

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung Immunologie und Zellbiologie
(Leiterin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus)

**Interaktionen von Mastzellen und thrombozytären Chemokinen:
Expression von Chemokinrezeptoren und
Regulation der Chemokinaktivität durch proteolytische Prozessierung**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Medizinischen Universität
zu Lübeck

vorgelegt von
Florian Schiemann
Lübeck
2005

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Mastzellen.....	1
1.1.1 Mastzellen in der Entzündung	3
1.2 Chemokine und deren Rezeptoren.....	4
1.2.1 Chemokinrezeptorexpression auf humanen Mastzellen.....	6
1.3 Thrombozytäre Chemokine.....	8
1.3.1 Proteolytische Prozessierung des β -TG Ag	8
1.3.2 Der Plättchenfaktor 4	10
1.4 Proteolytische Prozessierung von Zytokinen und anderen Mediatoren durch Neutrophile und Mastzellen.....	11
1.5 Fragestellung.....	12
2. MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1 Agenzien zur Stimulation und Kultur von Zellen.....	13
2.2 Chemokine.....	13
2.2.1 Rekombinante Chemokine	13
2.2.2 Aufreinigung humaner thrombozytärer Chemokine	14
2.3 Enzyme und Enzyminhibitoren.....	15
2.3.1 Enzyme zum Gewebeaufschluss humaner Haut und Lunge	15
2.3.2 Enzyme zur Prozessierung von Zytokinen.....	15
2.3.3 Enzyminhibitoren	15
2.4 Antikörper.....	16
2.5 Zellisolierung und Zellkultur.....	17
2.5.1 Neutrophile Granulozyten (Neutrophile)	17
2.5.2 Isolierung von Mastzellen aus humaner Haut.....	18
2.5.3 Lungenmastzellen	22
2.5.4 Kultur der Zelllinie LAD-2	23
2.6 Biochemische Testverfahren.....	23
2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	23

2.6.2	Sandwich-ELISA	24
2.6.3	Auftrennung und Immunchemischer Nachweis gespaltener Zytokine	25
2.6.4	Analyse der Spaltung von Zytokinen mit Hilfe der RP-HPLC	26
2.6.5	Immunaффinitätschromatographie.....	27
2.7	Biologische Testverfahren.....	28
2.7.1	Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest zum Nachweis von biologisch aktivem NAP-2	28
2.7.2	Hexosaminidase-Release-Assay	29
2.7.3	Nachweis der Expression und der Herabregulation zellassoziierter Rezeptoren	30
2.7.4	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	32
2.7.5	Bestimmung der intrazellulären Ca-Konzentration	33
3.	ERGEBNISSE	35
3.1	Etablierung einer Methode zur Gewinnung von Hautmastzellen	35
3.1.1	Enzymatischer Aufschluß von humanem Hautgewebe.....	35
3.1.2	Anreicherung von Hautmastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	39
3.1.3	Aufreinigung von Hautmastzellen durch Magnetseparation.....	40
3.1.4	Zellkultur isolierter Hautmastzellen	44
3.2	Wirkung inflammatorischer Chemokine auf Mastzellen.....	46
3.2.1	Zellen der Zelllinie LAD-2 exprimieren CD 117 und CD 203c	46
3.2.2	LAD-2-Zellen binden IgE und reagieren auf Kreuzvernetzung durch α -IgE	47
3.2.3	Hautmastzellen und LAD-2-Zellen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Chymase.....	49
3.2.4	Charakterisierung des Expressionsmusters von Chemokinrezeptoren auf Zellen der LAD-2 Linie...51	
3.2.5	Weder NAP-2 noch dessen Vorläufer induzieren Degranulation in Mastzellen und LAD-2-Zellen..60	
3.2.6	Der CXCR2 wird auf LAD-2-Zellen nur partiell durch NAP-2 herabreguliert	62
3.2.7	NAP-2 induziert keine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in LAD-2-Zellen	63
3.2.8	NAP-2 desensitiviert den IL-8-induzierten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in LAD-2-Zellen 65	
3.3	Prozessierung von CTAP-III durch Mastzellen: Kinetik, Induzierbarkeit und beteiligte Proteasen	68
3.3.1	Haut- und Lungenmastzellen unterscheiden sich von Neutrophilen in der Effizienz, der Induzierbarkeit und der Freisetzbarkeit der CTAP-III-prozessierenden Aktivität.....	70
3.3.2	Die Geschwindigkeit der CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen korreliert mit deren Degranulation	74
3.3.3	Chymase katalysiert die durch Mastzellen vermittelte CTAP-III-Prozessierung	78
3.3.4	PBP und CTAP-III werden sowohl von Mastzellen als auch von Chymase mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut	82

3.4	Regulation der CTAP-III-prozessierenden Aktivität von Mastzellen und Neutrophilen durch PF-4	86
3.4.1	PF-4 hemmt sowohl die durch Neutrophile als auch die durch Mastzellen katalysierte CTAP-III-Prozessierung.....	86
3.4.2	PF-4 inhibiert die durch Chymase und Kathepsin G katalysierte CTAP-III-Prozessierung	90
3.4.3	Die PF-4-vermittelte Inhibition der CTAP-III-Prozessierung basiert nicht auf Kompetitionsmechanismen.....	93
3.4.4	PF-4 inhibiert die Proteolyse von Substanz P durch Chymase, Kathepsin G und Hautmastzellen.....	97
4.	DISKUSSION.....	101
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
6.	LITERATUR.....	117
7.	ANHANG	128
7.1	Geräte	128
7.2	Computerprogramme	128
7.3	Reagenzien und Lösungen	129
7.3.1	Zellisolierung und -kultur	129
7.3.2	Tris-Tricin-Elektrophorese	131
7.3.3	Western-Blotting und Blot-Entwicklung	132
7.3.4	ELISA.....	133
7.3.5	Elastase-Freisetzungstest	133
7.3.6	Hexosaminidase-Freisetzungstest.....	134
7.3.7	FACS	134

Abkürzungen

α	gegen (<i>anti</i> -)
A23187	Kalziumionophor
AM	Azetoxyethanol
amu	Atomare Masseneinheiten (<i>atomic mass units</i>)
AS	Aminosäure
β -TG Ag	β -Thromboglobulin Antigen
BCA	Bicinchoninsäure-Test
BOC	N-t-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester
BSA	Rinderserumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CDU	<i><u>C</u>ollagenase <u>D</u>esitrometric <u>U</u>nit</i>
c-kit (CD117)	Rezeptor für SCF
Coll.2	Collagenase Typ II
Coll.4	Collagenase Typ IV
COPD	<i><u>c</u>hronic <u>o</u>bstructive <u>p</u>ulmonary <u>d</u>isease</i>
CTAP-III	<i>connective-tissue activating peptide III</i>
CTMC	<i>connective tissue mast cells</i>
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
Cy5	Indopentamethincyanin
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluoreszin
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELR	Glutamin-Leucin-Arginin-Sequenzmotiv (siehe Aminosäurencode)
EMEM	<i><u>E</u>agle's <u>m</u>inimal <u>e</u>ssential <u>m</u>edium</i>
ENA-78	<i><u>e</u>pithelial-derived <u>n</u>eutrophil <u>a</u>tractant-78</i>
ESI-FT-MS	Elektrospray-Fourier-Transfer-Massenspektrometrie
Fc ϵ RI	hochaffiner Rezeptor für Immunglobulin E (IgE)
FCS	Fötales Kälberserum
fMLP	formyl-Methioninyl-Lysyl-Phenylalanin
FURA-2	1-[2-5-Carboxyoxazol-2-yl-6-aminobenzfuran-5-oxyl]-2-amino-5'-methoxy-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure

g	Erdbeschleunigung
GCP-2	<i>granulocyte-chemotactic protein 2</i>
GD3	Disialogangliosid
G-Proteine	Guanidinnucleotide bindende Proteine
HBSS	<u>H</u> ank's <u>b</u> uffered <u>s</u> alt <u>s</u> olution
HMC-1	<i><u>h</u>uman <u>m</u>ast <u>c</u>ell line-1</i>
HPLC	Hochdruckflüssigkeitchromatographie
Hyal.	Hyaluronidase
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP-10	<i><u>I</u>nterferon-<u>g</u>amma inducible <u>p</u>rotein-<u>10</u></i>
I-TAC	<i><u>I</u>nterferon-<u>g</u>amma inducible <u>T</u> cell <u>a</u>lpha <u>c</u>hemoattractant</i>
kDa	Kilodalton
KU	<u>K</u> unitz <u>U</u> nit
LAD-2	<i>laboratory of <u>a</u>llergic <u>d</u>iseases-2</i>
Lsg.	Lösung
LS-Säule	Miltenyi
MCP-1	<i><u>m</u>onocyte <u>c</u>hemotactic <u>p</u>rotein-1</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MGSA	<i><u>m</u>elanocyte growth <u>s</u>timulatory <u>a</u>ctivity</i>
MIG	<i><u>M</u>onokine induced by Interferon-<u>g</u>amma</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein-1 α</i>
MMC	mucosal mast cells
MC _T	Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren
MC _{TC}	Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren
NAP-2	<i><u>n</u>eutrophil-<u>a</u>ctivating <u>p</u>eptide <u>2</u></i>
OPD	o-Phenylendiamin
PBP	<i>platelet basic protein</i>
PBS	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
PBS-D	phosphatgepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco
PE	Phycoerythrin
PF-4	<i>platelet factor 4</i>
PMSF	Serinproteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid

POD	Peroxidase
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluoridmembran
R α - β -TG	humanes β -TG
RANTES	<i><u>R</u>egulated upon <u>a</u>ctivation, <u>n</u>ormal <u>T</u> cell <u>e</u>xpressed and <u>s</u>ecreted</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
ELISA	<i><u>e</u>nzyme-<u>l</u>inked <u>i</u>mmuno<u>s</u>orbent <u>a</u>ssay</i>
SBTI	<i><u>S</u>oy<u>b</u>ean <u>t</u>rypsin <u>i</u>nhibitor</i>
SCF	<i>stem cell factor</i> oder <i>c-kit ligand</i>
SDF-1 α	<i><u>s</u>tromal cell-<u>d</u>erived <u>f</u>actor-1 <u>a</u>lpha</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Substanz P
Thrombozidin	abgeleitet von <i><u>th</u>rom<u>b</u>ocyte <u>m</u>icro<u>b</u>icidal <u>p</u>rotein</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TNF- α	<i>(<u>T</u>umor <u>n</u>ecrosis <u>f</u>actor- <u>a</u>lpha)</i>
ÜS	Überstand
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WU	<i><u>W</u>uensche <u>U</u>nit</i>

Internationaler Buchstabenkurzcode der Aminosäuren					
A	Alanin (Ala)	C	Cystein (Cys)	D	Aspartat (Asp)
E	Glutamat (Glu)	F	Phenylalanin (Phe)	G	Glycin (Gly)
H	Histidin (His)	I	Isoleucin (Ile)	K	Lysin (Lys)
L	Leucin (Leu)	M	Methionin (Met)	N	Asparagin (Asn)
P	Prolin (Pro)	Q	Glutamin (Gln)	R	Arginin (Arg)
S	Serin (Ser)	T	Threonin (Thr)	V	Valin (Val)
W	Tryptophan (Trp)	Y	Tyrosin (Tyr)		

1. Einleitung

Periphere Gewebe wie Haut, Lunge und Darm stehen in ständigem Kontakt mit der Umwelt und bilden die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Parasiten und infektiöse Erreger. Neben löslichen Faktoren sind es vor allem immunkompetente Zellen, die diese Aufgabe übernehmen. Einen immunkompetenten Zelltyp, der besonders zahlreich in den peripheren Geweben wie in der Haut¹, in der Lunge² und im Darm³ sowie darüber hinaus im Herzmuskel⁴ verbreitet ist, stellt die Mastzelle dar.

1.1 Mastzellen

Mastzellen entstehen aus multipotenten Stammzellen des Knochenmarks, die über das Blut in die verschiedenen Gewebe auswandern und dort unter dem Einfluß des gewebespezifischen Zytokinmilieus ausdifferenzieren. Ein essentielles Zytokin für die Ausdifferenzierung stellt der von verschiedenen Stromazellen produzierte Wachstumsfaktor SCF (*stem cell factor* oder *c-kit ligand*) dar, der über seinen Rezeptor c-kit (CD117) auf Stammzellen einwirkt^{5,6}. Im Gegensatz zu allen anderen aus Knochenmarkszellen differenzierten Zelltypen spielt SCF bei Mastzellen jedoch nicht nur für die frühe Zellentwicklung eine wichtige Rolle, sondern ist auch für das Überleben ausdifferenzierter Mastzellen im Gewebe essentiell⁷. Daher tragen Mastzellen aller Entwicklungsstufen c-kit auf ihrer Oberfläche, während dieser Rezeptor bei anderen aus Knochenmarkszellen differenzierten Zelltypen nur in unreifen Stadien exprimiert wird⁸. Neben SCF sind an der Einwanderung von Mastzellen in die verschiedenen Gewebe auch Chemokine beteiligt, wobei jedoch die Berichte sehr widersprüchlich sind, über welche der zahlreichen Chemokinrezeptoren dieses vermittelt wird.

Die Erstbeschreibung der Mastzelle geht auf Paul Ehrlich im Jahr 1878 zurück, der im Rahmen seiner Dissertation einen Zelltyp entdeckte, dessen Granula sich mittels des Farbstoffes Anilinblau tief violett anfärben ließen.⁹ Er nannte dieses Phänomen des Farbumschlags „Metachromasie“ und den Zelltyp „Mastzelle“, in der Annahme, es handle sich bei den Granula um phagozytiertes Material, wodurch die Zellen „gemästet“ erschienen. Obwohl man inzwischen weiß, daß es sich bei den Granulainhalten um präformierte, gespeicherte Zellmediatoren handelt, wurde die Bezeichnung „Mastzelle“ bis heute beibehalten. Die von Ehrlich beschriebene violette Farbreaktion mit dem basischen Farbstoff Anilinblau oder mit dessen heute verwendeten Derivaten wie z.B. Toluidinblau beruht auf

einer Reaktion mit dem in den sekretorischen Granula enthaltenen sauren Heparin. Eine maßgebliche Funktion des Heparins innerhalb der Granula besteht darin, zusammen mit verschiedenen Chondroitinsulfaten eine Matrix für die in kristalliner Form vorliegenden Zellmediatoren zu bilden¹⁰. Wird die Zelle aktiviert, treten diese Mediatoren in eine lösliche Form über und werden durch Exocytose aus den Granula in die Umgebung der Zelle ausgeschleust - ein Vorgang, den man als Degranulation bezeichnet¹⁰. Neben der Freisetzung präformierter Mediatoren wie der Enzyme Tryptase und Chymase sind Mastzellen jedoch auch in der Lage, nach Stimulation eine Reihe verschiedener anderer Mediatoren *de novo* zu synthetisieren. Diese umfassen Lipidmediatoren (Leukotriene und Prostaglandine) und Zytokine, wie z.B. verschiedene Interleukine und TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*)¹¹⁻¹³.

Beim Menschen aber auch bei anderen Spezies wurden Mastzellen aufgrund ihrer Lokalisation in verschiedenen Geweben und ihrer unterschiedlichen histochemischen Eigenschaften mehreren Subtypen zugeordnet. Eine erste Unterteilung erfolgte in den sechziger Jahren aufgrund der Beobachtung, daß bei Mäusen die Mastzellen der Haut („*connective tissue mast cells*“ CTMC) nach Fixierung von Präparaten in Formalin und Färbung mit Toluidinblau weiterhin das Phänomen der Metachromasie zeigten, während Mastzellen der intestinalen Mukosa („*mucosal mast cells*“, MMC) sich nach Formalinfixierung nicht mehr anfärben ließen¹⁴. Auch in humanen Geweben gibt es Formalin-sensitive und -resistente Mastzellen. Allerdings kommen beide Gruppen gemeinsam in der Haut, der Lunge sowie dem Intestinaltrakt vor, so daß die für Mäuse getroffene gewebsspezifische Einteilung für den Menschen nicht übernommen werden kann¹⁵.

Ein Unterscheidungsmerkmal humaner Mastzellen ist ihr Gehalt an mastzellspezifischen Proteasen. Man unterscheidet zwei Gruppen: Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren (M_T) und Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren (M_{TC})¹⁶. Diese beiden Subtypen unterscheiden sich auch hinsichtlich der Ultrastruktur ihrer Granula^{17,18}. M_{TC} exprimieren neben Tryptase und Chymase auch noch die Proteasen Carboxypeptidase und Kathepsin G¹⁹. Mastzellen in der Haut gehören zu fast 100 % dem M_{TC} -Typus an. Auch in der Submukosa des Gastrointestinaltraktes und in den Tonsillen finden sich überwiegend M_{TC} ²⁰. Dagegen sind die Mastzellen der intestinalen und nasalen Mukosa sowie des Alveolargewebes überwiegend M_T ²⁰. Die physiologische Bedeutung der Mastzell-Subtypen ist noch nicht geklärt.

Der bekannteste Mechanismus zur physiologischen Aktivierung von Mastzellen aller Spezies besteht in der Quervernetzung der auf ihrer Oberfläche befindlichen hochaffinen Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE), den $Fc_\epsilon RI$. Diese Rezeptoren binden IgE-Moleküle über deren

Fc-Region und sind in vivo immer mit IgE-Molekülen beladen. Wird nun ein multivalentes Antigen („Allergen“) von mehreren dieser IgE-Moleküle erkannt und gebunden, kommt es zu einer Quervernetzung („crosslinking“) der IgE-Moleküle und damit auch der Fc_εRI-Rezeptoren, was zu einer Aktivierung der Zelle und zur Freisetzung von Mediatoren führt. Diese Reaktion, bei der die Ausschüttung der gespeicherten Mediatoren innerhalb weniger Minuten erfolgt, wird als „allergische Sofortreaktion“ (Typ I) bezeichnet. Neben der IgE-Quervernetzung gibt es eine Reihe anderer, d.h. IgE-unabhängiger Stimuli, die ebenfalls Degranulation in Mastzellen auslösen können. Zu diesen Substanzen gehören physiologische Mediatoren wie z.B. die Neuropeptide Substanz P (SP), Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Somatostatin, aber auch synthetische Agenzien wie das stark basische Peptid *compound 48/80*, das porenbildende Kalziumionophor A23187 oder das dem Bienengift Mellitin ähnliche Oligopeptid Mastoparan²¹⁻²³.

1.1.1 Mastzellen in der Entzündung

Infolge der Mastzelldegranulation, wie sie bei Allergikern nach Kontakt mit Allergenen auftritt, werden Mediatoren wie Histamin freigesetzt, die u.a. durch die sofortige Induktion einer Konstriktion der Bronchien asthmatische Anfälle auslösen. Neben solchen sofortigen Effekten führt Mastzelldegranulation jedoch auch zu einem verzögerten Einstrom von anderen Mastzellen sowie von Granulozyten, wie Eosinophile und Neutrophile in das betroffene Gewebe, wodurch die jeweiligen Organe nachhaltig geschädigt werden und chronische Krankheitsbilder auftreten können wie chronisches Asthma oder die Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*). Mediatoren der Einwanderung von Neutrophilen sind u.a. Mastzellproteasen wie z.B. Chymase und Zytokine wie z.B. TNF- α ²⁴ und verschiedene Chemokine, insbesondere IL-8 (Interleukin-8)^{25,26}. Die Bedeutung der Enzyme für dieses Phänomen ließ sich in Tierexperimenten zeigen, in denen einerseits ein Inhibitor der Chymase und des Kathepsin G die allergen-induzierte Neutrophileneinwanderung hemmte²⁷ und andererseits die Injektion gereinigter Chymase zur Einwanderung von Neutrophilen führte²⁸. Die zugrundeliegenden Mechanismen scheinen sehr unterschiedlich zu sein. So kann Chymase einerseits direkt chemotaktisch auf die Zellen über Proteinase-aktivierte-Rezeptoren wirken²⁹, prozessiert jedoch andererseits auch Angiotensin I zu Angiotensin II³⁰, das die Expression von auf Neutrophile wirkenden Chemokinen in Endothelzellen induziert³¹. Die große Bedeutung der direkt von Mastzellen gebildeten oder von Mastzellen in anderen Zellen induzierten Chemokine konnte ebenfalls durch

Tierexperimente gezeigt werden²⁴. Hier erwies es sich, daß mastzelldefiziente Mäuse weniger Neutrophile-rekrutierende Chemokine bildeten als Kontrollmäuse, was mit einer verringerten Einwanderung von Neutrophilen in das Gewebe korrelierte.

Interessanterweise zeigte sich in Tierexperimenten ebenfalls, daß neben Mastzellen auch Blutplättchen an der Einwanderung von Neutrophilen während der allergischen Reaktion maßgeblich beteiligt sind. So zeigten Thrombozyten-depletierte Mäuse gegenüber Kontrollmäusen nach Stimulation mit einem Allergen einen massiv verringerten Einstrom von Neutrophilen sowie eine verringerte Restrukturierung (*Remodeling*) des Gewebes^{32,33}. Diese Befunde sind insofern besonders interessant, als daß einer Vielzahl von älteren Berichten zufolge auch beim Menschen im Verlauf einer allergischen Reaktion die Blutkonzentrationen der von Thrombozyten freigesetzten Chemokine β -TG Ag (*β -thromboglobulin-antigen*), PF-4 (*platelet factor 4*) und RANTES (*Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) ansteigen³⁴⁻³⁸. Inwieweit es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Mastzellproteasen und thombozytären Chemokinen hinsichtlich der Neutrophilenrekrutierung gibt, ist bis heute ungeklärt und wird eine der Fragestellungen dieser Arbeit sein.

1.2 Chemokine und deren Rezeptoren

Da Chemokine zentrales Thema dieser Arbeit sind, sollen ihre Charakteristika im folgenden ausführlicher beschrieben werden. Neben der namensgebenden Fähigkeit gerichtete Zellmigration (Chemotaxis) zu induzieren, konnten den Chemokinen mittlerweile noch weitere biologische Wirkungen zugewiesen werden, wie Modulation der Angiogenese, eine Rolle bei der Organisation lymphatischer Organe sowie ein Einfluß auf die Zelldifferenzierung (siehe Übersichtartikel von Rollins³⁹). In dieser Arbeit stehen jedoch vor allem die Funktionen von Chemokinen als Mediatoren inflammatorischer Prozesse im Vordergrund.

Die Gruppe der Chemokine umfaßt nach heutigem Kenntnisstand beim Menschen ca. 50 relativ kleine Proteine homologen Ursprungs von meist nur 70-100 Aminosäuren Länge. Die Verwandtschaft der Chemokine spiegelt sich in einer teilweise hohen Ähnlichkeit ihrer Primärstrukturen (20-70 % AS-Sequenzidentität) wider. Strukturanalysen zufolge ähneln sich die Chemokine ebenso in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur und weisen alle einen ungeordneten N-Terminus, drei sich anschließende antiparallel verlaufende β -Faltblattstränge und eine C-terminale α -Helix auf. Stabilisiert wird die räumliche Struktur durch zwei Disulfidbrücken zwischen insgesamt vier konservierten Cysteinen, bei denen jeweils das vom

N-Terminus aus gesehenen ersten Cystein mit dem dritten sowie das zweite mit dem vierten verbunden ist. Anhand dieser Cysteinreste erfolgt auch eine weitergehende Einteilung der Chemokine in insgesamt vier verschiedene Untergruppen. Die beiden prominentesten Untergruppen, in die man die weit überwiegende Mehrheit der Chemokine einordnen kann, sind dadurch charakterisiert, daß sich zwischen den ersten beiden Cysteinen entweder keine (CC-Chemokine) oder lediglich eine (CXC-Chemokine) zusätzliche Aminosäure befindet. Die Rezeptoren der Chemokine zeichnen sich durch sieben die Zellmembran durchziehende, helikale Domänen aus und gehören somit zur Familie der heptahelikalen Transmembran-Domänen-Rezeptoren. Nach Ligandenbindung an diese Rezeptoren erfolgt die Signalweiterleitung in das Zellinnere über Guanidinnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine), die ihrerseits über mehrere Zwischenschritte einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration hervorrufen. Dabei unterliegen die durch Chemokine induzierten Signale einer strengen Gegenregulation. So ist bekannt, daß mit IL-8 stimulierte Neutrophile mit einem kurzzeitigen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration antworten, auf eine kurz darauf folgende erneute Stimulation mit derselben Dosis IL-8 jedoch nicht mehr reagieren⁴⁰. Dieses als Desensitivierung bezeichnete Phänomen basiert u.a. auf der Internalisierung der Rezeptoren nach der ersten Stimulation, und der damit einhergehenden Verminderung der Rezeptoranzahl auf der Zelloberfläche⁴¹. Andere, die Zellaktivierung intrazellulärer Signalkomponenten betreffende Mechanismen sind ebenfalls beteiligt.

Ebenso wie zwischen CC- und CXC-Chemokinen unterschieden wird, werden auch deren Rezeptoren in CC- und CXC-Chemokinrezeptoren eingeteilt. Innerhalb einer Klasse können mehrere Rezeptoren durchaus eine Reihe verschiedener Liganden binden und umgekehrt. Nahezu allgemeingültig ist jedoch das Prinzip, daß keine Bindung zwischen Rezeptoren und Chemokinen unterschiedlicher Klassen stattfindet. Ein klassisches Beispiel hierfür stellt das CC-Chemokin RANTES dar, das zwar an die CC-Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 bindet, jedoch keine Interaktion mit einem der bekannten CXC-Chemokinrezeptoren zeigt⁴². MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) ist eines der wenigen monospezifischen CC-Chemokine und bindet nur an CCR2⁴³. Unter den Liganden der CXC-Chemokinrezeptoren unterscheidet man ELR⁺-CXC-Chemokine, die ein aus drei Aminosäuren bestehende Sequenzmotiv Glu-Leu-Arg (ELR) enthalten, welches die Bindung an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 ermöglicht, und ELR⁻-CXC-Chemokine, denen als Liganden anderer CXC-Chemokinrezeptoren dieses Sequenzmotiv teilweise oder vollständig fehlt. Die prominentesten Vertreter der ELR⁻ CXC-Chemokine sind der CXCR4-Ligand SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1 alpha*) und die drei klassischen CXCR3-Liganden IP-10

(*Interferon-gamma inducible protein-10*), MIG (*Monokine induced by Interferon-gamma*) und I-TAC (*Interferon-gamma inducible T cell alpha chemoattractant*)⁴⁴⁻⁴⁶.

Alle ELR⁺ CXC-Chemokine binden mit hoher Affinität an CXCR2, die meisten jedoch mit sehr viel niedrigerer Affinität an CXCR1. So zeigen IL-8 und GCP-2 eine nahezu gleiche Affinität gegenüber beiden Rezeptoren⁴⁷, während ENA-78 (*epithelial-derived neutrophil attractant-78*), MGSA (*melanocyte growth stimulatory activity*) und das zur Familie des β -TG Ag zählende NAP-2 (*neutrophil-activating peptide 2*) ca. 200-fach schwächer an CXCR1 als an den CXCR2 binden⁴⁸⁻⁵¹. Die am besten charakterisierten Zielzellen des NAP-2 sind Neutrophile, in denen es über CXCR2 und CXCR1 ähnliche Zellantworten induziert wie IL-8. So reagieren Neutrophile bereits auf nanomolare NAP-2-Konzentrationen mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, einer Freisetzung von Granulainhalten und einer chemotaktischen Zellwanderung⁵¹⁻⁵³.

1.2.1 Chemokinrezeptorexpression auf humanen Mastzellen

Teilweise widersprüchlich sind die Berichte hinsichtlich der Expression von Rezeptoren inflammatorischer Chemokine auf Mastzellen. Brightling *et al.* fanden CXCR3 auf adulten Lungenmastzellen und konnten in Zellen durch Stimulation mit CXCR3-Liganden Chemotaxis induzieren⁵⁴. Ebenso tragen Zellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 (*human mast cell line-1*) den CXCR3. Aus Stammzellen differenzierte Mastzellen exprimierten jedoch weder nach Beobachtungen dieser Autoren noch nach Ochi *et al.* CXCR3⁵⁵, weswegen angenommen wird, daß dieser Rezeptor erst ab einem gewissen Differenzierungsstadium der Mastzellen exprimiert wird. Hingegen scheint CXCR4 in fast allen Differenzierungsstadien von Mastzellen vorzukommen. So tragen HMC-1-Zellen, aus Stammzellen differenzierte Mastzellen, und adulte Mastzellen CXCR4 und reagierten alle chemotaktisch auf Stimulation mit SDF-1 α , dem Liganden des CXCR4^{54,56,57}. Lediglich Ochi *et al.* berichteten, daß Stammzellen während der Differenzierung zu Mastzellen CXCR4 zwar nach vierwöchiger Kultur noch exprimieren, den Rezeptor jedoch nach neunwöchiger Kultur verlieren. Äußerst widersprüchlich sind die Berichte, die die Expression der RANTES-Rezeptoren CCR1, -3 und -5 und die Expression des MCP-1-Rezeptors CCR2 betreffen. Laut Ochi *et al.* exprimieren aus Stammzellen differenzierte Mastzellen CCR3 und in frühen Differenzierungsstadien auch CCR5⁵⁵. Brightling *et al.* fanden auf diesen Zellen hingegen keine Expression des CCR3 dafür aber die Expression des CCR1⁵⁴. Adulte Lungenmastzellen exprimieren CCR1 und CCR3, jedoch nicht CCR5⁵⁴. Darüberhinaus wurde auf diesen Zellen keine signifikante

Expression des MCP-1-Rezeptors CCR2 festgestellt⁵⁴. Einem der wenigen Berichte über Hautmastzellen zufolge (Hartmann *et al.*⁵⁸) zufolge, reagieren diese Zellen nicht mit einer chemotaktischen Antwort gegenüber RANTES und MCP-1, während laut Romagnani *et al.*⁵⁹ und de Paulis *et al.*⁶⁰ sowohl Haut- als auch Lungenmastzellen, die dem M_{TC} zuzuordnen sind, RANTES-Rezeptor CCR3 exprimieren und auf Stimulation mit RANTES chemotaktisch reagieren. Ebenso kontrovers wie die Expression der meisten anderen Chemokinrezeptoren wird auch diejenige der NAP-2-Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 diskutiert. Brightling *et al.* fanden bei der Untersuchung von Lungenmastzellen eine Subpopulation, die CXCR1, nicht jedoch CXCR2 exprimiert⁵⁴. Dieselben Autoren fanden auf aus Stammzellen differenzierten Mastzellen keinen der beiden Rezeptoren, während Inamura *et al.* ebenfalls auf aus Stammzellen differenzierten Mastzellen die Expression beider Rezeptoren feststellten⁶¹. Hingegen fanden Nilsson *et al.* bei denselben Zellen sowie der Mastzelllinie HMC-1 (*human mast cell line-1*) nur die Expression des CXCR2. In klarem Widerspruch dazu standen die Erkenntnisse von Lippert *et al.*, die auf HMC-1 beide Rezeptoren fanden⁶². Einen besonders interessanten Unterschied stellten die Autoren jedoch hinsichtlich der Responsivität von HMC-1-Zellen gegenüber verschiedenen Liganden dieser Rezeptoren fest: während IL-8 und MGSA ein starkes Kalziumsignal in diesen Zellen induzieren, war das durch das thrombozytäre Chemokin NAP-2 verursachte Signal sehr viel schwächer. Inwieweit dieser Befund mit einer anderen Beobachtung aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen in Zusammenhang gebracht werden kann, nämlich, daß Hautmastzellen CXCR1 auf der zytoplasmatischen Membran tragen, während CXCR2 ausschließlich intrazellulär lokalisiert zu sein schien, bleibt jedoch ungeklärt⁶².

Faßt man diese heterogenen Beobachtungen zusammen, so läßt sich feststellen, daß das Expressionsmuster von Mastzellen der verschiedenen Differenzierungsstadien wenig einheitlich ist, wie anhand der CXCR4 und der CCR5 Expression von Ochi *et al.* festgestellt wurde⁵⁵. Bei adulten Lungenmastzellen sind vor allem die Rezeptoren CXCR1, CXCR3 und CXCR4 exprimiert, jedoch auch die RANTES-Rezeptoren CCR1 und CCR3. Die wenigen Berichte über Untersuchungen der Rezeptorexpression von Hautmastzellen belegen die Expression des CXCR1, CXCR2 und CCR3, während andere Rezeptoren nicht untersucht worden sind. Daher war es eine der Fragestellungen dieser Arbeit herauszufinden, welche Chemokinrezeptoren von Hautmastzellen exprimiert werden. Vor kurzem beschrieben Kirshenbaum *et al.* die Mastzelllinie LAD-2 (*laboratory of allergic diseases*), die anders als die Mastzelllinie HMC-1 einen funktionellen c-kit sowie einen funktionellen FcεRI besitzt⁶³. Allerdings ist hinsichtlich der Chemokinrezeptorausstattung dieser Zelllinie nur die Expression

des CXCR4 und des CCR5 bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die Expression anderer Chemokinrezeptoren auf dieser Zelllinie untersucht werden, um festzustellen, ob sie als geeignetes Modell für Untersuchungen von Chemokinfunktionen auf Mastzellen dienen konnte.

1.3 Thrombozytäre Chemokine

Die meisten Chemokine werden von Zellen auf einen proinflammatorischen Reiz hin *de novo* synthetisiert und erscheinen daher erst Stunden nach Initiation einer Entzündung. Im Gegensatz dazu liegen die thrombozytären Chemokine PF-4 und β -TG Ag bereits präformiert in den α -Granula von Blutplättchen vor und können im Zuge der Thrombozytenaktivierung augenblicklich in großen Mengen freigesetzt werden. So konnten in normalem Serum Konzentrationen der thrombozytären CXC-Chemokine PF-4 von 0,4 - 1,9 μ M und β -TG Ag von 1,6 - 4,8 μ M nachgewiesen werden⁶⁴. Zudem ist zu erwarten, daß die lokalen Konzentrationen in der unmittelbaren Nähe des Thrombus die im Serum gemessenen Werte bei Weitem übersteigen. Außerdem fanden verschiedene Autoren im Blut³⁴ sowie in der Lungenflüssigkeit³⁵ akut allergischer Patienten deutlich erhöhte Konzentrationen beider Chemokine, die mit dem gleichzeitigen verstärkten Auftreten anderer thrombozytärer Mediatoren einherging.

Man geht davon aus, daß Thrombozyten die einzig relevante Quelle des freigesetzten β -TG Ag darstellen. Zwar konnten Formen des β -TG Ag auch in proinflammatorisch stimulierten Leukozyten wie T-Zellen und Monozyten induziert werden, jedoch wurde lediglich die Expression von mRNA bzw. von intrazellulär gespeichertem Protein nachgewiesen⁶⁵⁻⁶⁷. Der Begriff β -TG Ag bezeichnet nicht ein definiertes Chemokin, sondern umfaßt als Sammelbegriff unterschiedlich lange Derivate des PBP (*platelet basic protein*), die gemeinsame Immunreaktivität gegenüber Antiseren zeigen. Die zwei deutlich überwiegenden Formen des β -TG Ag in Überständen aktivierter Thrombozyten sind mit ca. 20% das PBP und mit ungefähr 80% das CTAP-III (*connective-tissue activating peptide III*)⁶⁸.

1.3.1 Proteolytische Prozessierung des β -TG Ag

PBP und CTAP-III sind beide chemotaktisch inaktive Präkursoren des bereits oben beschriebenen ELR⁺ CXC-Chemokins NAP-2. Die Neutrophilen stellen jedoch nicht nur eine wesentliche Zielzelle des NAP-2 dar, sondern tragen auch selbst zur NAP-2-Bildung durch

proteolytische Abspaltung eines 15 AS-langen Peptids vom N-Terminus des CTAP-III bei. Es wird vermutet, daß dieser N-terminale Sequenzabschnitt das funktionell wichtige ELR-Motiv überdeckt und somit die Interaktion zwischen CTAP-III und den Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 verhindert^{53,69}. Alle bisher durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, daß Neutrophile die Umwandlung von CTAP-III zu NAP-2 durch das Zellmembran-assoziierte Enzym Kathepsin G vermitteln. Neben Neutrophilen wurde bislang nur Monozyten die Fähigkeit zugewiesen, CTAP-III zu NAP-2 mittels Kathepsin G umzuformen^{70,71}. *In vitro* Untersuchungen zufolge besitzen Monozyten allerdings eine deutlich geringere prozessierende Kapazität als Neutrophile, weshalb ein physiologisch wesentlicher Beitrag von Monozyten bei der Prozessierung von CTAP-III unwahrscheinlich erscheint⁶⁹.

Lange Zeit wurde angenommen, daß PBP eine Speicherform des CTAP-III darstellt, da mit fortschreitender Ausreifung der Megakaryozyten der Gehalt an PBP zugunsten von CTAP-III abnimmt. Bei einem Vergleich von PBP und CTAP-III als Substrat der proteolytischen Spaltung zu NAP-2 fanden Ehlert *et al.* jedoch heraus, daß PBP ca. sechsfach schneller durch Neutrophile sowie durch Kathepsin G umgesetzt werden kann als das in Thrombozyten mengenmäßig vorherrschende CTAP-III⁶⁸. Die Autoren nehmen an, es handle sich bei PBP um ein Vorläufermolekül, dessen beschleunigte Prozessierung während der initialen Phase der Entzündung die schnelle Verfügbarkeit von NAP-2 gewährleistet.

In vitro Daten zufolge bewirken physiologische Konzentrationen Neutrophiler nicht nur die Umsetzung von PBP, sondern auch diejenige von CTAP-III zu NAP-2 mit sehr hoher Geschwindigkeit. So wird auch bei Prozessierung von CTAP-III bereits innerhalb weniger Minuten genügend NAP-2 gebildet, um Chemotaxis und Degranulation in Neutrophilen auszulösen^{51,69}. Interessanterweise besitzt NAP-2 jedoch nicht nur die Fähigkeit Neutrophile zu aktivieren, sondern kann unter bestimmten Bedingungen auch desensitivierend auf die Zellen wirken. Diese desensitivierende Wirkung von NAP-2 ist bei CTAP-III-prozessierenden Neutrophilen selbst beobachtet worden. So antworten die prozessierenden Neutrophilen selbst nicht auf das von ihnen generierte NAP-2, sondern werden durch die sukzessive Erhöhung der NAP-2 Konzentration in ihrer Umgebung desensitiviert und zeigen gegenüber einer nachfolgenden Stimulation mit NAP-2 weder Chemotaxis noch Degranulation⁶⁸.

Neben der N-terminalen Prozessierung des CTAP-III durch Kathepsin G moduliert zusätzlich der Abbau am C-Terminus die chemotaktische Aktivität des NAP-2 und verändert sogar das Funktionsspektrum des Chemokins. So wurden im Überstand von Ko-Kulturen stimulierter mononukleärer Blutzellen mit Thrombozyten um 4 bzw. 7 C-terminale Aminosäuren verkürzte Formen des NAP-2 gefunden, die eine deutlich höhere biologische Aktivität

aufwiesen als das intakte NAP-2^{72,73}. Desweiteren entdeckte man im Überstand lysierter Thrombozyten C-terminal um 2 Aminosäuren verkürzte Varianten des NAP-2 und des CTAP-III, die im Gegensatz zu den intakten Chemokinen erhebliche antimikrobielle Wirkung zeigen⁷⁴. In Anlehnung an Herkunft und Funktion bezeichnet man die C-terminal um zwei Aminosäuren verkürzten Derivate des NAP-2 und CTAP-III als Thrombozidin-1 und -2 (abgeleitet von *thrombocyte microbicial protein*)⁷⁴.

1.3.2 Der Plättchenfaktor 4

Im Gegensatz zu NAP-2, das in Form inaktiver Prekusoren von Thrombozyten freigesetzt wird, stellt PF-4, ein weiteres thrombozyten-spezifisches CXC-Chemokin, in seiner freigesetzten Form bereits einen funktionell aktiven Mediator dar. Als ELR⁻-CXC-Chemokin bindet PF-4 nicht an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 und induziert in Neutrophilen andere Zellfunktionen als NAP-2 oder IL-8. In Neutrophilen vermittelt PF-4 weder eine chemotaktische Antwort noch die Degranulation der primären Granula, sondern löst u.a. die Exozytose sekundärer Granula im Zusammenspiel mit anderen Mediatoren (z.B. TNF- α) aus. Allen Untersuchungen zufolge agiert PF-4 auf Neutrophile nicht über einen klassischen heptahelikalen, G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptor, sondern über ein membran-assoziiertes Chondroitinsulfat-Proteoglykan als signalgebenden Rezeptor. Dieser Rezeptor bindet Tetramere des PF-4, die sich ab einer Konzentration von ca. 0,5 μ M PF-4 bilden. Dieses erklärt auch, warum es erst oberhalb dieser Konzentration von PF-4 zur Auslösung zellulärer Antworten in Neutrophilen kommt⁷⁵. Neben Neutrophilen wirkt PF-4 auf eine Reihe anderer Zellen in sehr unterschiedlicher Weise. So supprimiert PF-4 die IL-2 Expression und damit die Proliferation von T-Zellen⁷⁶, führt zur Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen⁷⁷ oder in Kombination mit IL-4 zu dendritischen Zellen^{78,79} und beeinflusst die Proliferation von Endothelzellen. Einer neueren Publikation von Lasagni *et al.* zufolge, scheint zumindest die letztere Funktion nicht ausschließlich über ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan vermittelt zu werden, sondern über eine Variante des CXCR3⁸⁰, die hingegen nicht von Neutrophilen exprimiert wird (persönliche Mitteilung von PD Dr. Frank Petersen, Forschungszentrum Borstel).

Wie aus mehreren verschiedenen Befunden hervorgeht, scheint PF-4 auch einige der Wechselwirkungen zwischen NAP-2 bzw. CTAP-III einerseits und Neutrophilen andererseits modulieren zu können. So unterbindet PF-4 die Adhärenz CTAP-III-prozessierender Neutrophiler an Endothelzellen, die durch das entstehende NAP-2 vermittelt wird. Dem

zugrunde liegt wahrscheinlich auch die von Dr. Tobias Grimm und Prof. Dr. Ernst Brandt (beide Forschungszentrum Borstel) entdeckte Fähigkeit des PF-4, die CTAP-III-Umwandlung zu NAP-2 durch Neutrophile inhibieren zu können⁸¹. Ungeklärt blieb jedoch die Frage, ob dieser Effekt des PF-4 auf die durch Neutrophile katalysierte Prozessierung von CTAP-III beschränkt ist oder in generellerer Weise die CTAP-III Umwandlung auch durch andere Zellen beeinflusst. Einen in diesem Zusammenhang interessanter Zelltyp stellt die Mastzelle dar, da diese wie Neutrophile Kathepsin G exprimiert und somit theoretisch in der Lage sein könnte, CTAP-III in NAP-2 umzuwandeln.

1.4 Proteolytische Prozessierung von Zytokinen und anderen Mediatoren durch Neutrophile und Mastzellen

Für das Enzym Kathepsin G sind außer CTAP-III weitere Chemokine als Substrat beschrieben worden. Kathepsin G wandelt ENA-78[1-78] in die biologisch zweifach potentere Form ENA-78[9-78] um⁸², zerstört hingegen die biologische Aktivität anderer Chemokine, z.B. durch Abbau von SDF-1 α [1-67] zu SDF-1 α [6-67]⁸³ und MIP-1 α [1-70] zu MIP-1 α [25-70] bzw. [29-70]⁸⁴. Etliche Literaturbefunde deuten darauf hin, daß Kathepsin G-vermittelte proteolytische Prozessierung auch die biologische Aktivität anderer inflammatorischer Mediatoren reguliert, die nicht zur Familie der Chemokine gehören. So prozessiert Kathepsin G Angiotensin I zu Angiotensin II⁸⁵, das Neuropeptid SP[1-11] (*Substance P*)⁸⁶, zu SP[1-7] und SP[1-8] sowie das 31 kDa große Vorläufermolekül des Zytokins IL-1 β zu aktivem IL-1 β ⁸⁷. Außerdem kann Kathepsin G auch Bradykinin proteolytisch deaktivieren⁸⁵.

Interessanterweise ist beschrieben worden, daß die Mastzellprotease Chymase Angiotensin I, das Neuropeptid SP, den Vorläufer des IL-1 β und Bradykinin in gleicher Weise umsetzt^{85,88,89}. Allerdings ist bisher nicht bekannt, ob auch Chemokine durch Mastzellen oder Chymase prozessiert werden können.

1.5 Fragestellung

Bei allergischen Entzündungen führt eine akute Mastzellaktivierung zur gleichzeitigen Aggregation von Thrombozyten im benachbarten Gewebe sowie zum verzögerten Einstrom von Neutrophilen. Diese und andere Beobachtungen legen nahe, daß wechselseitige Beziehungen zwischen Mastzellen und Thrombozyten sowie zwischen deren Mediatoren existieren. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegenüber thrombozytären Chemokinen und die Wirkung von Mastzellmediatoren (wie z.B. Proteasen) auf thrombozytäre Chemokine. Nachdem in dieser Arbeit zunächst ein Verfahren etabliert wurde, welches die Gewinnung von Mastzellen aus menschlicher Haut ermöglichte, standen folgende Fragen im Mittelpunkt :

1. Welche Rezeptoren für inflammatorische Chemokine werden von Mastzellen exprimiert?

Die Klärung dieser Frage soll Aufschluß über die Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegenüber inflammatorischen Chemokinen geben. Im Mittelpunkt standen hier die Rezeptoren des thrombozytären Chemokins NAP-2. Während dieser Untersuchungen ließ eine Beobachtung vermuten, daß Mastzellen NAP-2 durch proteolytische Prozessierung aus CTAP-III bilden können. Daraus resultierte die zweite Frage dieser Arbeit :

2. Können Mastzellen den thrombozytären Prekursor CTAP-III zu NAP-2 prozessieren und läuft die Prozessierung innerhalb physiologisch relevanter Konzentrationen und Zeiträume ab?

Hier standen vor allem die Effizienz, die zugrundeliegenden Mechanismen und die katalysierenden Enzyme der durch Haut- und Lungenmastzellen vermittelten CTAP-III-Prozessierung im Vergleich zu Neutrophilen im Mittelpunkt.

3. Ist die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen unter physiologischen Bedingungen regulierbar?

Kern dieser Untersuchungen war, ob das ebenfalls aus Thrombozyten stammende Chemokin PF-4 in physiologischen Konzentrationen und Zeiträumen auf die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen wirkt und welche Mechanismen einer solchen Wirkung zugrundeliegen könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen auf, daß Mastzellen und thrombozytäre Chemokine sich wechselseitig beeinflussen können. Dadurch ergibt sich eine Modellvorstellung, die zum Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen während der Frühphase der allergischen Reaktion beitragen kann.

2. Materialien und Methoden

Sofern nicht im Text angegeben, sind die verwendeten Geräte sowie die Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer dem Anhang (siehe Abschnitt 7) zu entnehmen.

2.1 Agenzien zur Stimulation und Kultur von Zellen

Aufgereinigtes humanes IgE stammte von der Firma Calbiochem (Frankfurt a.M.). Polyklonales Antiserum der Ziege gegen humanes Immunglobulin E (α -IgE) wurde von der Firma Biosource (Marseille, Frankreich) erworben. Substanz P sowie fMLP (*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) (beides von Sigma, Taufkirchen) wurden zu 1 mg/ml bzw. 1 mM in *Aqua dest.* aufgenommen. Ebenfalls von der Firma Sigma stammte das Kalziumionophor A23187, das zu einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol aufgenommen wurde. Der Hersteller des humanen rekombinanten Zytokins SCF (aufgenommen zu 100 μ g/ml in *Aqua dest.*) war die Firma Peprotech (London, UK). Alle diese Reagenzien wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2 Chemokine

2.2.1 Rekombinante Chemokine

Humanes monozytäres IL-8 wurde nach einer von Dr. J.E. Ehlert (Laborgruppe Biologische Chemie, Forschungszentrum Borstel) etablierten Methode in *E.coli* rekombinant generiert und anschließend bis zur Homogenität aufgereinigt⁹⁰. Die rekombinanten, humanen Chemokine RANTES, MCP-1, I-TAC, und SDF-1 α stammten von der Firma Peprotech. Sämtliche rekombinant hergestellten Chemokine wurden in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) zu einer Konzentration von 0,5 - 2 mg/ml aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.2 Aufreinigung humaner thrombozytärer Chemokine

Die humanen Chemokine PBP, CTAP-III und PF-4 wurden in der Laborgruppe Biologische Chemie aus Überständen mit Thrombin stimulierter Thrombozyten isoliert und aufgereinigt. Alle Varianten des β -TG Ag einschließlich des CTAP-III und PBP wurden zunächst mittels Immunaффinitäts-Chromatographie angereichert und anschließend über sequentielle Kationenaustausch- und Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, analytische HPLC) bis zur Homogenität aufgereinigt⁵³. PF-4 wurde aus Überständen mit Thrombin stimulierter Thrombozyten nach Absorption des β -TG Ag aus dem Durchfluß der Immunsäule mittels Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose und RP-HPLC bis zur Homogenität aufgereinigt⁷⁵. Die verwendeten Präparationen aller thrombozytären Chemokine übertrafen stets 99 % Reinheit, wie durch Silberfärbung nach Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie durch automatisierte N-terminale Sequenzierung nachgewiesen wurde.

Natürliches humanes NAP-2 wurde aus CTAP-III durch limitierte Spaltung mittels Chymotrypsin gewonnen. Dazu wurde 1 mg CTAP-III in PBS für 30 min bei 37°C mit 13 μ g bovinem Pankreas-Chymotrypsin (87 U/mg, Serva, Heidelberg) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern (pH 3,0) mit TFA gestoppt und das gebildete NAP-2 anschließend mittels des oben beschriebenen RP-HPLC-Verfahrens zur Trennung verschiedener Formen des β -TG Ag bis zur Homogenität aufgereinigt⁵¹. Hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz und seiner biologischen Aktivität entsprach das gereinigte Chemokin dem aus Zellkulturüberständen stammenden NAP-2.

Nach der Präparation wurden die Chemokine in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) lyophilisiert und bei -70°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die thrombozytären Chemokine in 0,1 %iger TFA gelöst, im Bicinchoninsäure-Assay (BCA, siehe Abschnitt 2.6.1) auf ihren Proteingehalt hin überprüft und in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 mg/ml bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3 Enzyme und Enzyminhibitoren

2.3.1 Enzyme zum Gewebeaufschluss humaner Haut und Lunge

Die bovinen Enzyme Hyaluronidase, Kollagenase Typ II, Elastase und Kollagenase Typ IV dienten dem Aufschluß humanen Gewebes und stammten von der Firma Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ, USA). Liberase wurde von Roche (Basel, Schweiz) erworben. Dispase und Chymopapain stammte von Sigma. Deoxyribonuklease I (DNase I) lieferte die Firma Gerbu (Gaiberg).

2.3.2 Enzyme zur Prozessierung von Zytokinen

Die humanen natürlichen Enzyme Kathepsin G aus Neutrophilen und Chymase aus Hautisolaten stammten von der Firma Calbiochem (Frankfurt a.M.), während bovines Chymotrypsin von Serva (Heidelberg) geliefert wurde.

2.3.3 Enzyminhibitoren

Der Serinproteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), der Kathepsin G-Inhibitor Aprotinin, der Kathepsin G- und Chymase-Inhibitor SBTI (*Soybean trypsin inhibitor*) sowie der Tryptase-Inhibitor Leupeptin stammten von Sigma.

2.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden gemäß den Angaben des Herstellers bei 4°C oder –20°C gelagert und sind in Tabelle 1 nach den unterschiedlichen Anwendungszwecken geordnet aufgelistet.

Tabelle 1 : In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Zellisolierung und Zellkultur				
Antikörper ^{a)}	Klon	Isotyp	Konjugat ^{b)}	Hersteller
humanes IgE	U266	IgE	---	Calbiochem, Frankfurt
Ziege α-Mensch IgE	polyklonal	---	---	Biosource, Nivelles, Belgien
Maus α-Mensch CD203c	97A6	IgG ₁	PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus α-Mensch CD117	YB5.B8	IgG ₁	---	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus α-PE	k.A.	---	Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Ratte α-Maus IgG	k.A.	---	Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Immunfluoreszenzfärbung zur Analyse im Durchflußzytometer				
Antikörper ^{a)}	Klon	Isotyp	Konjugat ^{b)}	Hersteller
Ziege α-Mensch IgE	polyklonal	---	FITC	Biosource, Nivelles, Belgien
Maus α-Mensch CXCR1	E3	IgG ₁	---	Dr. Voitenok, Minsk, Weißrussland
Maus α-Mensch CXCR2	R11 115	IgG _{2b}	---	Biolog. Chemie, FZB
Maus α-Mensch CXCR3	1C6	IgG ₁	---	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus α-Mensch CXCR4	44716.111	IgG _{2b}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Maus α-Mensch CCR1	53504.111	IgG _{2b}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Maus α-Mensch CCR2	48607.121	IgG _{2b}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Ratte α-Mensch CCR3	61828.111	IgG _{2a}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Maus α-Mensch CCR5	45531.111	IgG _{2b}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Maus α-Mensch Chymase	CCI	IgG ₁	---	Serotech, Oxford, UK
Maus IgG1 Isotypkontrolle	Ci4	IgG ₁	PE	Chemikon, Hampshire, UK
Maus IgG1 Isotypkontrolle	B07	IgG ₁	---	LG Biologische Chemie, FZB
Maus IgG2b Isotypkontrolle	DK-GO9	IgG _{2b}	---	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ratte IgG2a Isotypkontrolle	54447.1	IgG _{2a}	---	R&D Systems, Wiesbaden
Ziege α-Maus IgG (H+L)	k.A.	k.A.	DTAF	Dianova, Hamburg
Ziege α-Maus IgG (H+L)	k.A.	k.A.	Alexa-488	Dianova, Hamburg
Maus α-Ratte IgG (H+L)	k.A.	k.A.	DTAF	Dianova, Hamburg
Proteinbiochemische Analyse				
Antikörper ^{a)}	Klon	Isotyp	Konjugat ^{b)}	Hersteller
Kaninchen α-Mensch βTG	polyklonal	---	---	LG Biol. Chemie, FZB
Maus α-Mensch βTG	C24	IgG ₁	---	LG Biol. Chemie, FZB
Ziege α-Kaninchen IgG	polyklonal	---	POD	Dianova, Hamburg
Ziege α-Kaninchen IgG	polyklonal	---	IRDye-800	Rockland, Gibertsville, PA, USA

^{a)} H+L = spezifisch für schwere (H) und leichte (L) Kette von Maus-IgG

^{b)} DTAF = Dichlorotriazinylaminofluoreszin, POD = Peroxidase, PE = Phycoerythrin, Cy5 = Indopentamethincyanin, Beads = Fe₂O₃-Polysaccharid-Kügelchen

2.5 Zellisolierung und Zellkultur

2.5.1 Neutrophile Granulozyten (Neutrophile)

2.5.1.1 Isolierung neutrophiler Granulozyten

Neutrophile wurden aus peripherem Blut gesunder Einzelspender durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen⁹¹. Hierzu lag ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 04-89) vor. Humanes Vollblut wurde mit Natriumcitrat (3,8 % w/v Natriumcitrat in aqua dest.) im Verhältnis 5:1 versetzt, anschließend mit 3/8 des Volumens 37°C warmer $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier, phosphatgepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco (PBS-D) verdünnt und davon jeweils 17 ml auf 8 ml einer Ficoll-Hypaque Lösung (Pharmacia, Freiburg) in Glaszentrifugenröhrchen ($\varnothing = 20$ mm, Vol. = 30 ml) geschichtet. Nach Zentrifugation (400 x g, Raumtemperatur (RT), 40 min, 2 min Anlaufzeit, ohne Bremse) wurden die auf der Oberfläche des Erythrozytenpellets befindlichen Granulozyten mit einer Pipette abgenommen, je 15 ml davon mit 30 ml Polyvinylalkohol resuspendiert und die Erythrozyten durch Sedimentation (1 x g, 30 min, RT) abgetrennt. Der Überstand wurde zentrifugiert (250 x g, 20 min, RT, ohne Bremse) und die noch im Pellet verbliebenen Erythrozyten durch hypotonen Schock in 5 ml aqua dest. lysiert. Nach 45 s wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an zweifach konzentriertem PBS-D wieder physiologische Salzkonzentration eingestellt. Nach Zentrifugation (250 x g, 20 min, RT, ohne Bremse) wurde das Zellpellet zu den für den jeweiligen Versuch erforderlichen Konzentrationen in PBS-D/ 0,1 % BSA aufgenommen und bei 37°C für 10 min temperiert. Die so präparierten Zellen waren zu 99 % viabel und erwiesen sich nach Analyse im Vorwärts-Seitwärtsstreulicht eines Durchflußzytometers (Becton-Dickinson, San Jose, USA) regelmäßig zu 96 % als polymorphkernige neutrophile Granulozyten (siehe Abschnitt 2.7.3.3).

2.5.1.2 Bestimmung der Zellzahl neutrophiler Granulozyten

Im Anschluß an die Isolierung der Neutrophilen wurde die Anzahl der Zellen nach Zusatz von Türks-Lösung bestimmt. Die in der Türks-Lösung enthaltene Essigsäure bewirkt die selektive Lyse der Erythrozyten, während die Leukozyten intakt bleiben und angefärbt werden. Der Türks-Farbstoff färbt die Zellkerne an, anhand derer man Neutrophile gut von anderen Leukozyten unterscheiden kann. Zur Quantifizierung der Neutrophilen wurden Aliquots der

aufgereinigten Zellen 1:20 mit Türks-Lösung (Merk, Darmstadt) verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer (Brand, Ludwigshafen) lichtmikroskopisch ausgezählt.

2.5.1.3 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Überprüfung der Viabilität der Zellen wurde eine Vitalfärbung mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, daß tote Zellen aufgrund von Membranschädigungen den Trypanblau-Farbstoff aufnehmen und angefärbt werden, während lebende Zellen mit intakter Zellmembran den Farbstoff ausschließen und farblos bleiben. Dazu wurden Aliquots der Zellsuspensionen zu gleichen Teilen mit Trypanblaulösung versetzt und der prozentuale Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.5.2 Isolierung von Mastzellen aus humaner Haut

2.5.2.1 Gewebeproben zur Isolierung von Mastzellen aus humaner Haut

Die verwendeten Gewebeproben waren Hautresektate von Patienten, die sich in den Operationsräumen der Klinik für Hand-, Brust und Plastische Chirurgie am Klinikum Neustadt einem Schönheitschirurgischen Eingriff unterzogen hatten. Die Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme in eiskaltes Transportmedium überführt und mir freundlicherweise mit dem Einverständnis der Patienten zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt. Hierzu lag ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 04-90) vor.

2.5.2.2 Bestimmung des Mastzellanteils in Zellsuspensionen

Während der Isolierungsprozedur wurden die Mastzellzahl sowie der Mastzellanteil in Zellsuspensionen nach Zusatz von saurer Toluidinblau-Lösung bestimmt. In salzsaurer Toluidinblau-Lösung färben sich Zellkerne blau an. Die cytoplasmatischen Granula von Mastzellen nehmen einen tiefen violetten Farbton an, während das Cytoplasma anderer Zellen ungefärbt bleibt, so daß Mastzellen gut von anderen Zellen zu unterscheiden sind (siehe Abbildung 1). Zur Bestimmung des Mastzellanteils wurden Aliquots der Zellsuspensionen 1:2 mit Toluidinblau-Lösung (siehe Anhang) verdünnt in eine Neubauer Zählkammer

gegeben. Nach 20 Minuten wurden sowohl die gesamten Zellen als auch die Mastzellen lichtmikroskopisch ausgezählt und der prozentuale Mastzellanteil errechnet.

2.5.2.3 Gewebeaufschluß von humaner Haut zur Isolierung von Hautmastzellen

Direkt nach Ankunft im Labor der Biologischen Chemie am Forschungszentrum Borstel wurden die Gewebeproben aus dem eiskalten Transportmedium in 4°C kalten Mastzellpuffer überführt. Anschließend wurden das subkutane Fettgewebe sowie offensichtlich nekrotische Bereiche der Gewebeproben sorgfältig mittels Schere und Skalpell entfernt. Um den Enzymen in dem nachfolgenden Gewebeaufschluß eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten, wurden je 15 g des fettfreien Gewebes mit einer feinen Schere in möglichst gleichmäßig kleine Stückchen von 1 - 2 mm² zerkleinert und bei 4°C in Mastzellpuffer (siehe Anhang) aufbewahrt. Der enzymatische Gewebeaufschluss von je 15 g des Gewebematerials erfolgte anschließend in 200 ml Verdaupuffer (Mastzellpuffer versetzt mit 1 mg/ml BSA, 1,5 mg/ml Kollagenase Typ 2 und 0,75 mg/ml Hyaluronidase). Um eine gleichmäßige Temperatur von 37°C und eine optimale Durchmischung der Suspension im Verdaugefäß zu gewährleisten, fand der gesamte Verdau unter stetigem Rühren auf einem temperierbaren Magnetrührer statt, so daß die Gewebefragmente nicht sedimentieren konnten. Um einer Aggregation der dissoziierenden Gewebefragmente an dem Rührmagnet im Verdaugefäß entgegenzuwirken, wurden diese zusätzlich alle 10 - 30 min mit einer Spritze (50 ml, Becton-Dickinson), deren Kanülenaufsatz manuell auf einen Durchmesser von ca. 1 cm erweitert worden war, resuspendiert. Nach 4 – 6 h wurde der Verdau abgebrochen sobald die Gewebefragmente weitestgehend dissoziiert waren und keine Aggregation der Zellen mehr stattfand. Die Suspension wurde zuerst durch ein feinmaschiges Haushaltssieb, dann durch Gaze (Maschengröße 120 µm) filtriert und anschließend zentrifugiert (300 x g , 10 min, RT). Das jeweils aus 15 g Ausgangsmaterial erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml Mastzellpuffer bei 20°C aufgenommen und die darin enthaltenen Mastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert.

2.5.2.4 Dichtegradientenzentrifugation zur Anreicherung von Hautmastzellen

Die Anreicherung der Mastzellen mittels diskontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation durch einen Percoll-Gradienten erfolgte im Prinzip nach einer Methode von Gibbs & Ennis⁹². Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen des

Percolls (Sigma) mindestens 4 Stunden vor Beginn der Auftrennung angesetzt. Da die Percoll-Stammlösung nahezu keine Salze enthält, wurde zuerst isotones Percoll (entspricht 100% Percoll) durch Zugabe eines Teiles zehnfach konzentrierten Mastzellpuffers zu neun Teilen Percoll-Stammlösung erzeugt. Zur Herstellung der weiteren Gradientenlösungen wurde das 100 %ige Percoll mit einfachem Mastzellpuffer im Verhältnis 4:1 zu 80 %igem bzw. im Verhältnis 3:2 zu 60 %igem Percoll ausverdünnt. Jeweils 10 ml des 80 %igen Percolls wurden in ein 50 ml Polypropylenröhrchen gegeben und vorsichtig mit 10 ml 60 %igem Percoll überschichtet. Von der durch den Verdau gewonnenen, mastzellhaltigen Zellsuspension wurden nun jeweils 5 ml mit 5 ml 100 % Percoll vermischt und die so erhaltene Zellsuspension somit in 50 %igem Percoll auf den Gradienten gegeben und anschließend mit 2 ml Mastzellpuffer überschichtet. Nach Zentrifugation (400 x g, 20 min, 20°C) wurden die in verschiedenen Bereichen der Gradienten akkumulierten Zellen (Ringfraktionen) getrennt mit einer Pipette abgehoben, anschließend 1:10 mit 20°C-warmen Mastzellpuffer verdünnt und bei 300 x g für 10 min bei 20°C zentrifugiert, um das verbliebene Percoll zu entfernen. Die resultierenden Zellpellets wurden jeweils in 1 ml 4°C kaltem MACS-Puffer (PBS-D / 0,5% BSA) aufgenommen und sowohl die Zellviabilität durch Trypanblaufärbung als auch der Mastzellanteil durch Toluidinblaufärbung in Aliquots der Suspension bestimmt. Die nach der Dichtegradientenzentrifugation aus dem Pellet geernteten Zellen sowie die Zellen, die direkt oberhalb der 80 %igen Percollschicht geerntet worden waren, enthielten in der Regel die meisten Mastzellen und zeigten auch den höchsten Mastzellanteil (siehe Abschnitt 3.1.2).

Diese Zellen wurden vereinigt und nach Zugabe von 3 ml 4°C kaltem MACS-Puffer (PBS-D / 0,5 % BSA) zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet zu 5×10^7 Zellen/ ml MACS-Puffer bei 4°C aufgenommen und zur weiteren Anreicherung der Mastzellen der Magnetseparation zugeführt.

2.5.2.5 Aufreinigung humaner Hautmastzellen mittels Magnetseparation

Zur Aufreinigung der mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Mastzellen mittels eines Magnetseparationsverfahren diente ein MACS-System (Miltenyi, Bergisch-Gladbach). Die Magnetseparation stellt ein Trennverfahren dar, bei dem Zellpopulationen anhand der Expression spezifischer Oberflächenantigene voneinander getrennt werden. Dazu werden die für eine bestimmte Zellpopulation typischen Oberflächenantigene durch spezifische Antikörper markiert und in einem zweiten Schritt mit einem sekundären

Antikörper, der mit magnetischen Mikropartikel konjugiert wurde, gekoppelt. In einer Säule mit ferromagnetischer Matrix, die in einem geeigneten Magneten fixiert ist, werden die so markierten Zellen beim Trennungsgang festgehalten, während unmarkierte Zellen durch einen kontinuierlichen Pufferstrom aus der Säule entfernt werden. Schließlich können nach Entfernen der Säule aus dem Magneten die markierten Zellen aus der Säule gespült werden.

Im Laufe der Etablierung eines Magnetseparationsverfahrens zur Auftrennung humaner Mastzellen stellte sich heraus, daß andere Zellen in der Suspension ebenfalls den sekundären Antikörper banden. Daher wurden diese unspezifisch bindenden Zellen vor der eigentlichen selektiven Anreicherung der Mastzellen abgetrennt, indem die Zellsuspension nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde und die unspezifisch reagierenden Zellen anschließend durch einen ersten Säulenlauf entfernt wurden.

Im Einzelnen wurde das Verfahren wie folgt durchgeführt:

Die nach Dichtegradientenzentrifugation geernteten und anschließend gewaschenen Zellen wurden zu 5×10^7 Zellen /ml in MACS-Puffer aufgenommen und 10 min mit α -PE-microbeads (1:20, Miltenyi) bei 4°C inkubiert. Ungebundene α -PE-microbeads wurden durch Waschen in 5 ml MACS-Puffer entfernt (300 x g, 10 min, 4°C). Im Anschluß wurde das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine LS-Säule (Miltenyi) gegeben, die zuvor mit 2 Säulenvolumina (1 SV = 3 ml) MACS-Puffer äquilibriert und in einen Midi-MACS-Magneten (Miltenyi) eingespannt worden war. Während des Spülens mit 4 SV MACS-Puffer wurde der Durchlauf, der die unmarkierten Mastzellen enthielt, aufgefangen. Zur Charakterisierung der markierten, auf der Säule gebundenen Zellen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und 1 SV MACS-Puffer mit einem Stempel (Miltenyi) durch die Säule gedrückt. Die so eluierte Zellsuspension enthielt nach Bestimmung der Zellzahl, der Viabilität und des Mastzellanteil keine relevanten Mengen an Mastzellen und wurde verworfen.

Auf die gleiche Weise erfolgte die Bestimmung der Zellzahl, Viabilität und des Mastzellanteils der unmarkierten Zellen des Durchlaufs. Daraufhin wurden diese Zellen bei 300 x g sedimentiert, das Zellpellet zu 5×10^7 Zellen/ml aufgenommen und mit einem Phycoerythrin-gekoppelten, murinen Antikörper gegen CD203c (α -CD203c-PE) für 45 min lichtgeschützt inkubiert. Nachdem der ungebundene α -CD203c-PE durch Waschen entfernt worden war, folgte wiederum ein Inkubationsschritt mit α -PE-microbeads (1:20 bei 5×10^7 Zellen/ml für 10 min). Nach Abzentrifugieren (300 x g 10 min 4°C) wurden die ungebundenen α -PE-microbeads entfernt, das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen und in gleicher Weise wie bereits oben beschrieben über eine LS-Säule aufgetrennt. Die nicht

an die Säule gebundenen Zellen des mastzelldepletierten Durchlaufs wurden ebenso wie das mastzellreiche Eluat auf Zellzahl, Viabilität und Mastzellanteil hin untersucht. Die so aufgereinigten Mastzellen wurden zentrifugiert und anschließend in Kultur genommen.

2.5.2.6 Kultur von Hautmastzellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die aufgereinigten Mastzellen direkt nach der Isolierung zumeist keine adäquate Responsivität im Hexosaminidase-Freisetzungstest gegenüber mastzelltypischen Stimuli zeigten, sollte ihnen durch die Kultur die Möglichkeit geboten werden, sich von den Strapazen der Isolierung zu erholen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ ml in RPMI mit 10 % fötalem Kälberserum unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 100 U/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin kultiviert. Zusätzlich wurde der Kultur humanes SCF in einer Endkonzentration von 100 ng/ml zugesetzt. Die gesamte Kultur erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und konstantem 5 %CO₂-Anteil der Luft.

2.5.3 Lungenmastzellen

Mastzellen der Lunge unterscheiden sich von denen der Haut u.a. durch ihren Gehalt an gespeicherten Proteasen. Daher war es für einige Experimente interessant, Haut- und Lungenmastzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Spaltung von Chemokinen zu vergleichen. Isolierte Lungenmastzellen wurden mir freundlicherweise von Dipl.-Biol. R. Gross (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Das zur Isolierung der Lungenmastzellen verwendete Lungengewebe stammte von Patienten des Klinikums Großhansdorf, denen dort Lungentumore entfernt wurden. Nachdem die Resektate in der Pathologie des Forschungszentrums Borstel untersucht worden waren, wurden mir tumorfreie Resektate mit Einverständnis der Patienten zur Verfügung gestellt. Hierzu lag ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 03-158) vor. Zur Isolierung verwendete Dipl.-Biol. R. Gross ein von Schulman *et al.* beschriebenes Verfahren², welches er im Rahmen seiner Dissertationsarbeit weiterentwickelte. Prinzipiell besteht dieses Verfahren aus den gleichen vier Schritten wie das Verfahren zur Gewinnung von Hautmastzellen. Das Gewebe wird zuerst manuell zerkleinert und enzymatisch aufgeschlossen. Anschließend werden die Mastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

angereichert und nach Aufreinigung mittels Magnetseparation für 5-7 Tage mit SCF kultiviert. Die Reinheit der Lungenmastzellen war stets über 90 %.

2.5.4 Kultur der Zelllinie LAD-2

Die jüngst beschriebenen Zellen der Linie LAD-2 stellen die einzig bekannte humane Mastzelllinie dar, die in ihren Charakteristika humanen, natürlichen Mastzellen sehr nahe kommt⁶³. So hängt die Proliferation der LAD-2-Zellen im Gegensatz zu der bislang allgemein verwendeten humanen Mastzelllinie HMC-1 (*human mast cell leukemia cells*) von der Präsenz des Zytokins SCF ab⁶³. Ferner antworten LAD-2-Zellen anders als HMC-1-Zellen nach IgE-Kreuzvernetzung mit Degranulation⁶³. Die Zelllinie LAD-2 wurde mir freundlicherweise von Drs. Arnold S. Kirshenbaum und Cem Akin (beide National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultur der LAD-2-Zellen erfolgte nach Kirshenbaum *et al.* in StemPro-34-Medium (Life Technologies, Grand Island, NY) unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin und 100 ng/ml SCF in einer Zelldichte von 0,5 bis 1 x10⁶ Zellen/ ml bei 37°C. Alle 2 Wochen wurden die Zellen geerntet und in frischem Medium erneut ausgesät.

2.6 Biochemische Testverfahren

2.6.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt der aufgereinigten Chemokinpräparationen wurde im Mikro-Bicinchoninsäure-Assay nach Smith *et al.* bestimmt⁹³. Die Methode beruht darauf, daß zweiwertige Kupferionen unter alkalischen Bedingungen Komplexe mit Peptidbindungen bilden und dabei zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Die einwertigen Kupferionen reagieren mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem violetten Chelatkomplex, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Diese sensitive Methode erlaubt die Erfassung von Proteinen im Konzentrationsbereich von 5 – 250 µg/ml.

Zur experimentellen Durchführung wurde die frisch angesetzte BCA-Lösung B, welche zweiwertige Kupferionen und Bicinchoninsäure enthält, mit der auf pH =11,3 eingestellten BCA-Lösung A zu gleichen Volumenanteilen vermischt. Je 125 µl dieser Lösung A/B wurden in einer Pro-Bind-Mikrotiterplatte (Beckton-Dickinson, Heidelberg) mit je 125 µl der seriell in Schritten von 1:2 verdünnten Probe versetzt und 90 min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurde die Extinktion im Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 550 \text{ nm}$

gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration aus den Extinktionswerten diente Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

2.6.2 Sandwich-ELISA

Zur quantitativen Untersuchung von Proben auf ihren Gehalt eines bestimmten Antigens kann das Sandwich-ELISA-Verfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*) angewendet werden. Hierbei wird das Antigen zunächst mit Hilfe eines an eine feste Phase adsorbierten Fangantikörpers spezifisch gebunden und anschließend mit einem zweiten Antikörper detektiert. Dieser wiederum wird durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch nachgewiesen. Anhand der Intensität der Farbreaktion, die durch Umsetzung eines chromogenen Substrates durch das gekoppelte Enzym hervorgerufen wird, kann die Menge des eingesetzten Antigens durch Vergleich mit einem mitgeführten Antigenstandard bestimmt werden.

2.6.2.1 Quantitative Bestimmung von β -TG Antigen

Der als Fangantikörper verwendete mAk C24 erkennt alle bisher bekannten Formen des β -TG Ag. Zunächst wurde der mAk C24 auf einer Immulon-Mikrotiterplatte (Immulon, Dynatech, Virginia, USA) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in 0,5 M Natriumkarbonatpuffer pH 9,0 über Nacht bei 4°C vorbeschichtet. Alle Inkubationen wurden in einem Volumen von 50 μl pro Vertiefung durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Waschpuffer wurden die seriell in 1:2-Schritten verdünnten Proben in RS-Dil-Puffer gelöst, in die Vertiefungen überführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein viermaliges Waschen mit Tris-Waschpuffer und eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem Antiserum Kaninchen- α -human β -Thromboglobulin Antigen (R α - β TG, final 1:5000 in RS-Dil-Puffer) als Nachweisantikörper. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper Ziege- α -Kaninchen-IgG (final 1:8000 in RS-Dil) wurde nach viermaligem Waschen mit Tris-Waschpuffer hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mit dem Substrat o-Phenylendiamin (OPD), welches in der OPD-Substratlösung enthalten ist. OPD wird von der Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 zu einem gelblichen, wasserlöslichen Farbstoff umgesetzt. Die Extinktion des gebildeten Farbstoffs wurde im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen und der β -TG Antigengehalt anhand einer Standardpräparation von CTAP-III ermittelt.

2.6.3 Auftrennung und Immunchemischer Nachweis gespaltener Zytokine

2.6.3.1 Reduzierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die reduzierende Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld auf. Dabei wird ausgenutzt, daß Proteine in Anwesenheit von Reduktionsmittel und SDS denaturieren und mit einer negativen Nettoladung versehen werden, die mit ihrer Größe korreliert. Über ein Gel, in dem Acrylamid und Bisacrylamid vernetzt sind, können Proteine dann ihrem Molekulargewicht entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit wurde eine Variante der Methode von Laemmli⁹⁴ angewendet, wie sie von Schägger und von Jagow beschrieben wurde⁹⁵. Diese Methode bietet den Vorteil einer besonders scharfen Auftrennung von kleinen Proteinen, deren Größe unterhalb von 10 kDa liegt. Dabei handelt es sich um ein diskontinuierliches Trennsystem, bei dem zuerst ein 13 %iges Trenngel mit einem 10 %igen Zwischengel überschichtet wird. Nachdem das Gel über Nacht polymerisiert ist, wird ein 4 %iges Sammelgel darauf geschichtet. Die Dicke der Gele betrug 0,75 mm. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 60 min bei RT inkubiert. Um die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken zu verhindern, wurden die Proben für 30 min mit Jodazetamid (2 % Endkonzentration, Merck, Darmstadt) versetzt. Es wurden jeweils 20 µl pro Probenflasche aufgetragen. Zur Ermittlung des relativen Molekulargewichts der Proben wurde in parallele Probenflaschen eine Mischung standardisierter, gefärbter Proteine mit bekannten Molekulargewichten von 2,35 bis 46 kDa (Rainbow-Marker, Amersham Buchler, Braunschweig) gegeben. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einer Elektrophoresekammer (Modell GE-2/4, Pharmacia, Freiburg), die mit Anodenpuffer befüllt wurde. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 30 V, 70 mA und 30 W in Kathodenpuffer. Nach 60 min wurde die Spannung auf 600 V für den anschließenden fünfstündigen Trennlauf erhöht.

2.6.3.2 Western Blot-Analyse elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Das Western Blot-Verfahren dient dem Nachweis und der Quantifizierung von immunreaktiven Proteinen nach deren Transfer mittels eines angelegten elektrischen Feldes von einem Gel auf eine Membran.

Dazu wurde eine mit Towbinpuffer voräquilibrierte Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran, Immobilon-P, Millipore, Eschborn) auf die der Anode zugewandten Seite des Gels

gelegt. Membran und Gel wurden zwischen jeweils zwei Filterpapieren in eine mit Towbinpuffer gefüllte Blotkammer (Modell TE 50, Hoefer, San Francisco, CA, USA) überführt und über Nacht einem elektrischen Feld mit 0,6 mA bei 0,3 V ausgesetzt.

Am nächsten Morgen wurden die Membranen entnommen und für 1 h getrocknet. Nachdem die Membran kurz in reinem Methanol reäquilibriert worden war, folgte auf einen 30 minütigen Waschschrift in PBS eine 60 minütige Inkubation in Roti-block-Puffer. Die immunchemische Detektion begann mit der Inkubation für 60 min mit einem spezifischen Antiserum (Kaninchen α -humanes β -TG 1:5000 in Roti-block-Puffer). Anschließend wurde der ungebundene Antikörper durch fünfmaliges Waschen in PBS / 0,1 % Tween von der Membran entfernt. Zum Nachweis des gebundenen primären Antikörpers diente der darauffolgende 60 minütige Inkubationsschritt mit einem sekundären Fluorochromgekoppelten Antikörper (Ziege α -Kaninchen-IRDye-800, 1:5000 in Roti-block-Puffer). Nach nochmaligem, fünffachem Waschen in PBS / 0,1 % Tween wurde die Membran 30 min in PBS gespült und im Anschluß mittels eines Infrared Imaging Systems (Odyssey, Bad Homburg) auf angefärbte Banden hin untersucht. Dabei emittiert ein im Gerät eingebauter Laser monochromes Licht ($\lambda = 780$ nm), das den an den sekundären Antikörper gekoppelten Farbstoff IRDye-800 zur Fluoreszenz anregt (Absorptionsmaximum in Wasser bei $\lambda_{\text{max}} = 774$ nm). Das nach dieser Anregung von dem Farbstoff emittierte Licht (Emissionsmaximum in Wasser $\lambda_{\text{em}} = 789$ nm) wird von einem Photodetektor im Gerät gemessen. Auf diese Weise wurde der Western Blot mit einer Auflösung von 169 μm und einer gerätespezifischen Intensität von 5 eingelesen. Da die gemessene Fluoreszenzintensität sich proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers verhält, war es möglich, die Menge des auf die Membran übertragenen Zytokins über einen weiten Bereich quantitativ zu erfassen. Dazu wurde ein ellipsoider Bereich um das eingelesene Bild der immunchemisch detektierten Zytokinbande, z.B. NAP-2, gelegt und die Fluoreszenzintensität dieses Bereichs bestimmt. Nach Abzug der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, die aus einem bandenfreien Bereich gleicher Fläche ermittelt worden war, wurde anhand einer parallel auf demselben Gel gelaufenen Standardpräparation desgleichen Zytokins (NAP-2) mit bekanntem Proteingehalt (50 ng) der Zytokingehalt der Probe ermittelt.

2.6.4 Analyse der Spaltung von Zytokinen mit Hilfe der RP-HPLC

Die RP-HPLC ist eine chromatographische Methode, die es ermöglicht, in wässrigen Lösungen lösliche Substanzen nach ihrer Hydrophobizität zu trennen. Dazu werden die

Substanzen zunächst in wässrigem Milieu auf die Säule aufgetragen. Die Säule besitzt an ein inertes Trägermaterial gekoppelte Kohlenwasserstoffketten definierter Länge, welche hydrophobe Interaktionen mit den aufgetragenen Substanzen eingehen. Mit Hilfe ansteigender Konzentrationen eines zur Elution eingesetzten organischen Lösungsmittels werden anschließend die gebundenen Substanzen nach und nach aus der Interaktion mit dem Säulenmaterial verdrängt. Da die Fragmente eines Proteins sich meistens in ihrer AS-Zusammensetzung voneinander unterscheiden, können diese in der Regel über RP-HPLC von der Ausgangssubstanz getrennt werden.

Zur Analyse der Spaltung wurden jeweils 200 µl Probe über die RP-HPLC aufgetrennt (C2/C18-Säule µRPC PC 3.2/3 auf einem SMART-System, beides von Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Die Elution erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 300 µl/Min mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 50 % Azetonitril in 0,1 % TFA. Elutionspeaks wurden bei 214 nm Wellenlänge mit einem µPeak-Monitor (Amersham Pharmacia Biotech AB) erfaßt. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software SMART Manager 1.51 (Amersham Pharmacia Biotech AB).

2.6.5 Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätschromatographie dient zur selektiven Aufreinigung von Molekülen aus Substanzgemischen. Sie beruht auf der reversiblen Interaktion des aufzureinigenden Moleküls mit einem Antikörper. Während der spezifische Antikörper als statische Komponente an die Chromatographiematrix gekoppelt ist, wird das zu isolierende Molekül in Lösung an der Gelmatrix vorbeigeführt. Ungebundenes Material wird ausgewaschen und die gebundene Komponente durch Veränderung der physikochemischen Bedingungen, z.B. durch Absenken des pH-Wertes, von der Matrix abdissoziiert und eluiert.

2.6.5.1 Vorbereitung von Protease enthaltenden Proben für die Immunaффinitätschromatographie von β -TG Ag

In einigen Experimenten wurde CTAP-III mit Proteasen bzw. Mastzellen versetzt, um den Abbau des Chemokins zu verfolgen. Die Protease-Reaktion wurde durch Zugabe von TFA abgestoppt. Anschließend sollten die entstandenen Abbauprodukte auf biologische Aktivität im Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest überprüft werden. Um einer Störung der Aktivitätsbestimmung durch Mastzelldegranulationsprodukte vorzubeugen, wurde das in der

Probe enthaltene β -TG Ag vorher mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Für die Aufreinigung über die Immunaффinitätschromatographie müssen die Proben einen pH-Wert von pH 7,2 - 7,4 aufweisen. Um zu vermeiden, daß es durch Reneutralisierung der angesäuerten Proben zu einer Reaktivierung der proteolytischen Enzymaktivität kommt, mußten die prozessierende(n) Enzym(e) irreversibel inaktiviert werden. Da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß in Anwesenheit von 1 mM des Serinproteaseinhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) keine Prozessierung des CTAP-III durch Mastzellen mehr stattfindet, wurden die Proben direkt vor Auftrag auf die Immunaффinitätssäule mit 1 mM PMSF (gelöst in Ethanol) versetzt und anschließend durch Zugabe von NaOH neutralisiert (pH 7,4).

Bei der Immunaффinitätschromatographie des β -TG Ag diente der an CNBr-aktivierte Sepharose (CL-4B; Pharmacia, Freiburg) gekoppelte Antikörper mAk C24 (10 mg Antikörper/ml Gel, Laborgruppe Biologische Chemie) als Immunoabsorbens. Die chromatographische Auftrennung erfolgte in einem 1 ml-Gelvolumen. Nach Auftrag der neutralisierten, PMSF-behandelten Probe wurde die Säule nacheinander mit 3 Säulenvolumina (SV) PBS-D, 1 SV NP-40-Puffer, und 4 SV Wasser (Milli Q, pH 7,0) gespült, bevor die Elution des β -TG Ag durch Senkung des pH-Wert mit 4 SV Wasser (Milli Q, pH 2,5) erfolgte. Die Elutionsfraktion wurde aufgefangen und vereinigt. Nach Gefriertrocknung wurde die Trockensubstanz in 0,1 % TFA aufgenommen, der Gehalt an β -TG Ag mittels Sandwich-ELISA (siehe Abschnitt 2.6.2.1) bestimmt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Biologische Testverfahren

2.7.1 Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest zum Nachweis von biologisch aktivem NAP-2

Zum quantitativen Nachweis von biologisch aktivem NAP-2 diente dessen Fähigkeit, die Freisetzung lysosomaler Elastase durch Neutrophile zu induzieren⁵³. Neutrophile lassen sich durch verschiedene Stimuli zur Phagozytose aktivieren. Dabei schnüren sie Phagosomen von der Zelloberfläche ab, ein Vorgang, der von der Polymerisation des Aktins abhängig ist. Anschließend verschmilzt in einem vom Aktin unabhängigen Prozeß das Phagosom mit Lysosomen⁹⁶. Elastase ist eine lysosomale Serinprotease, die in das Phagosom entlassen wird und dort am Abbau des Vesikelinhaltes beteiligt ist. Vorinkubation der Zellen mit

Cytochalasin B führt zur Inhibition der Aktinpolymerisation, und damit wird selektiv die Abschnürung des Phagosoms von der Zelloberfläche verhindert. Bei der Zellaktivierung wird die Elastase nun über die zur Zellaußenseite offenen Phagosomen in das Medium abgegeben und kann dort quantitativ bestimmt werden.

Die Bestimmung der Degranulation neutrophiler Granulozyten erfolgte nach einer von Brandt *et al.* beschriebenen Methode⁵³. Dafür wurden Neutrophile ($1 \times 10^7/\text{ml}$) in PBS-D / 0,1% BSA für 30 min bei 37°C vorgewärmt und anschließend für 10 min mit Cytochalasin B (5 µg/ml) inkubiert. Gleich nach Zugabe von CaCl_2 und MgCl_2 (Endkonzentration 1,8 mM bzw. 1 mM) zu den Zellen wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl der Probenlösung (angesetzt in PBS-D/0,1 % BSA) in einer Flachbodenmikrotiterplatte vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 20 min) und 50 µl der gewonnenen Überstände seriell 1:2 in PBS-D/ 0,1 % BSA über vier Schritte ausverdünnt. Die Aktivitätsbestimmung der freigesetzten Elastase erfolgte über den enzymatischen Umsatz des in der Elastase-Substratlösung enthaltenen N-t-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester (BOC). Zehn Minuten nach Zugabe der Elastase-Substratlösung (50 µl/ Vertiefung) wurde die Extinktion ($\lambda = 450 \text{ nm}$) im Mikroplattenphotometer gemessen. Die Aktivität des freigesetzten Enzyms wurde anhand der Gesamt-Elastaseaktivität der Zellen (Aktivität von in mit 0,1 % Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Hexa) behandelten Totallysaten) berechnet und als dessen prozentualer Anteil angegeben. Der NAP-2-Gehalt der Testansätze wurde dann anhand der durch sie verursachten Elastase-Freisetzung im Vergleich zu derjenigen durch eine mitgeführte NAP-2 Standardpräparation errechnet.

2.7.2 Hexosaminidase-Release-Assay

Zu den wichtigen biologischen Funktionen von Mastzellen zählt ihre Fähigkeit, nach Stimulation mit aktivierenden Mediatoren die Inhalte ihrer sekretorischen Granula in die Umgebung der Zelle auszuschleusen. Dieser als Degranulation bezeichnete Vorgang vollzieht sich durch Exozytose (*compound exocytosis*), d.h. die kristallin vorliegenden Mediatoren gehen in eine lösliche Form über und werden nach Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran graduell in die Umgebung freigesetzt. Dabei wird unter anderem das Enzym β -Hexosaminidase ausgeschüttet, dessen Freisetzung mit derjenigen einiger anderer Granulainhalte wie Histamin und Chymase korreliert⁹⁷. Daher bietet die Aktivitätsbestimmung der β -Hexosaminidase im Überstand stimulierter, hochreiner

Mastzellen mittels einer von Schwarz *et al.* beschriebenen Methode⁹⁷ eine Möglichkeit, Mastzelldegranulation nachzuweisen.

Dafür wurden humane Mastzellen oder LAD-2-Zellen ($2 \times 10^5/\text{ml}$) in PBS-D + CaMg / 0,1% BSA für 10 min bei 37°C vorgewärmt und anschließend jeweils 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl der Probenlösung (angesetzt in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA) in einem Reaktionsgefäß (500 µl, Polypropylen, Sarstedt) vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C im Thermoschüttler wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3 min) und 50 µl der gewonnenen Überstände seriell 1:2 in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA über vier Schritte ausverdünnt. Die Aktivitätsbestimmung der freigesetzten β -Hexosaminidase erfolgte über den enzymatischen Umsatz des in der β -Hexosaminidase-Substratlösung enthaltenen 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid. Dafür wurden jedem Ansatz 50 µl β -Hexosaminidase-Substratlösung hinzugefügt und bei 37°C für 3 h (Mastzellen) oder für 4 h (LAD-2-Zellen) inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl Glycinpuffer pH 10,3 gestoppt und die Extinktion des entstandenen gelblichen p-Nitrophenols im Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen. Die Aktivität des freigesetzten Enzyms wurde anhand der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität der Zellen (bestimmt in mit 0,05 % Triton X-100-behandelten Totallysaten) berechnet und als prozentualer Anteil ausgegeben.

2.7.3 Nachweis der Expression und der Herabregulation zellassoziierter Rezeptoren

Eine herkömmliche Methode um die Oberflächenexpression von Rezeptoren auf Zellen zu bestimmen, ist die Immunfluoreszenzfärbung und anschließende Analyse im Durchflußzytometer. Dabei erfolgt die Immunfluoreszenzfärbung entweder direkt über einen Fluorochrom-gekoppelten, rezeptorspezifischen Antikörper oder indirekt über einen sekundären Fluorochrom-markierten Antikörper, der seinerseits den primären, rezeptorspezifischen Antikörper erkennt. In der anschließenden Analyse im Durchflußzytometer wird die Fluoreszenz und damit die relative Rezeptorexpression jeder einzelnen Zelle bestimmt. Zusätzlich kann bei Zellen, deren Chemokinrezeptoren nach Bindung des Liganden von der Zelle internalisiert wurden, durch die im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen verminderte Anzahl der auf der Oberfläche verbliebenen Rezeptoren nach Rezeptorfärbung im Durchflußzytometer als Rückgang der Rezeptorexpression erfaßt werden.

2.7.3.1 Vorbehandlung von Zellen zur Herabregulation von Chemokinrezeptoren

Um die Internalisierung von Chemokinrezeptoren in Gegenwart von Chemokinen bei Neutrophilen und LAD-2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen /ml in An- und Abwesenheit von Chemokinen in 200 μ l PBS-D + CaMg /0,1 % BSA für 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 4 ml eiskaltem PBS-D / 0,1 % BSA. Die erhaltene Suspension wurde mit 200 μ l eiskaltem FCS unterschichtet und die Zellen bei 300 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Expression der Chemokinrezeptoren auf den Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

2.7.3.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Oberflächenantigenen

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden Neutrophile, LAD-2, Lungen- oder Hautmastzellen in jeweils 100 μ l PBS-D/ 0,1% BSA, in dem der Primärantikörper gelöst worden war, aufgenommen und 60 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die dazu verwendeten Konzentrationen der jeweiligen Primärantikörper können der Tabelle 1 entnommen werden. Anschließend wurden die Ansätze mit 1,25 ml PBS-D / 0,1% BSA aufgefüllt, mit 300 μ l FCS unterschichtet und zentrifugiert (7 min, 300 x g, 2min Anlaufzeit bei 4°C). In den Fällen, bei denen zur Detektion direkt an ein Fluorochrom gekoppelte Primärantikörper eingesetzt wurden, konnten die Zellen nach Entfernen des Überstandes in 500 μ l PBS-D / 0,1% BSA aufgenommen und ihre Fluoreszenz im Durchflußzytometer bestimmt werden. Bei unkonjugierten Primärantikörpern wurden die Zellsedimente nach Entfernen des Überstandes zur Detektion der an die Antigene gebundenen primären Antikörper mit einem DTAF-gekoppelten Ziege α -Maus IgG Antiserum (1:100 in PBS-D/ 0,1% BSA) für 60 min bei 4°C inkubiert. Nach anschließender Sedimentation durch eine FCS-Schicht (wie für den Primärantikörper beschrieben) wurden die Zellen dann in 500 μ l PBS-D / 0,1% BSA aufgenommen und ihre Fluoreszenz im Durchflußzytometer bestimmt.

2.7.3.3 Analyse im Durchflußzytometer

In der durchflußzytometrischen Analyse durchlaufen die Zellen einzeln in einem feinen, gleichbleibenden Pufferstrom (PBS-Azid) den Lichtstrahl eines Argonlasers (488 nm Wellenlänge). Das von den Zellen mit unveränderter Wellenlänge gestreute Licht und das in den langwelligen Bereich verschobene emittierte Fluoreszenzlicht wird durch

Photodetektoren registriert. Dabei werden die Meßwerte für jede einzelne die Detektoren passierende Zelle als ein Ereignis gespeichert. Die Streulichtsignale erlauben eine Differenzierung der Zellen nach Größe und Granularität. Das Vorwärtsstreulicht wird in einem Winkel von 10° der ursprünglichen Strahlungsrichtung aufgenommen und stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Das in einem Winkel von 90° gemessene Seitwärtsstreulicht wird vor allem von der Granularität der Zelle beeinflusst. Zusätzlich wird im 90° -Winkel auch das Fluoreszenzsignal erfaßt. Auf diese Weise kann das Emissionslicht von Fluorochromen, die über Antikörper an die Zelle gebunden sind und vom Laserstrahl angeregt werden, gemessen werden. Die Messungen wurden in einem Durchflußzytometer der Firma Becton-Dickinson durchgeführt und mit dem dazugehörigen Computerprogramm Cellquest Pro analysiert. Pro Meßvorgang wurden 10000 Ereignisse aufgenommen. Von diesen Ereignissen wurden die von der jeweils zu untersuchenden Zellpopulation (Neutrophile, LAD-2, Mastzellen) stammenden Signale mit charakteristischem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht durch Festlegung eines Meßbereichs (Fenster) eingegrenzt und die restlichen, von anderen Zellen bzw. Zelltrümmern hervorgerufenen Signale außerhalb des Fensters ausgeblendet. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der so definierten Zellpopulation wurden als Histogramm dargestellt. Dabei wird die Häufigkeit der Ereignisse gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Aus der Häufigkeitsverteilung wird die für die gesamte Zellpopulation repräsentative mediane Fluoreszenzintensität rechnerisch ermittelt.

2.7.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie bietet gegenüber der durchflußzytometrischen Analyse den Vorteil, daß sie eine Aussage über die Lokalisation der Proteine in der Zelle erlaubt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode der intrazelluläre Chymasegehalt von Hautmastzellen und LAD-2-Zellen analysiert. Dazu wurden 10^5 Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert (300 x g, 10 min). Anschließend wurden die Zellen für 10 min in 3 %igem Paraformaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-D wurden die Zellen für 90 Sekunden mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Zur Markierung der Chymase wurden die Zellen dann mit einem murinen α -Chymase-Antikörper (IgG₁, Klon CCl mit 0,5 μ g/ml) oder einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps (IgG₁, Klon B07 mit 0,5 μ g/ml) für 60 min bei 4°C in PBS-D + 0,5 % BSA inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte nach dreimaligem Waschen durch Detektion mit einem Alexa488-gekoppelten Ziege α -Maus, der nach 30 min bei 4°C wieder entfernt wurde. Zur Färbung der Zellkerne diente

anschließend eine 20 min Inkubation mit dem Farbstoff TOTO-3 (Sigma). Nach Trocknen und Eindeckeln der Präparate wurden die Proben mittels konfokaler Lasermikroskopie auf ihre Fluoreszenz hin untersucht.

2.7.5 Bestimmung der intrazellulären Ca-Konzentration

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration von LAD-2-Zellen und Neutrophilen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 1-[2-5-Carboxyoxazol-2-yl-6-aminobenzfuran-5-oxyl]-2-amino-5'-methyloxy-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (FURA-2) nach einer von Grynkiewicz *et al.* beschriebenen Methode bestimmt⁹⁸. Durch Veresterung mit Azetoxymethanol (AM) liegt FURA-2 in einer lipophilen Verbindung vor, die von den Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert werden kann. Das freigesetzte FURA-2 ist nicht membranpermeabel und akkumuliert in den Zellen. FURA-2 bildet Komplexe mit den intrazellulären Kalziumionen und ändert dabei die Lage seines Absorptionsmaximums (mit Kalzium gesättigtes FURA-2: 340 nm, freies FURA-2: 380 nm). Bei ständig wechselnder Anregung mit Licht der Wellenlängen von $\lambda_{A1} = 340$ nm (F_1) bzw. von $\lambda_{A2} = 380$ nm (F_2) kann das emittierte Fluoreszenzsignal bei $\lambda_E = 510$ nm aufgenommen werden. Aus dem Verhältnis der beiden emittierten Fluoreszenzintensitäten $R = F_1/F_2$ läßt sich die Kalziumkonzentration nach folgender Formel berechnen :

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times [F_{2f}/F_{2b}]$$

Dabei stellt K_D die effektive Dissoziationskonstante des FURA-2/ Ca^{2+} Komplexes dar ($K_D = 224$ nM). R_{max} entspricht dem Verhältnis F_1/F_2 bei maximaler Beladung von FURA-2 mit Kalziumionen, das nach Lyse der Zellen und Freisetzung von FURA-2 in das kalziumionenhaltige Medium gemessen werden kann. R_{min} repräsentiert das Verhältnis F_1/F_2 bei unbeladenem FURA-2, das nach vollständigem Entzug des Kalziums mittels anderer starker Komplexbildner bestimmt werden kann. F_{2f} bzw. F_{2b} stellen die Fluoreszenzintensitäten (F_2) der unbeladenen FURA-2-Probe bzw. der mit Kalzium gesättigten FURA-2-Probe dar.

2.7.5.1 Beladung der Zellen mit Fura-2

LAD-2-Zellen ($2,5 \times 10^6$) wurden in 500 μ l PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA aufgenommen und mit 1 μ l Stammlösung (Stammlösung 1mM, 2 μ M Endkonzentration) versetzt und für 30 min im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Nicht von den Zellen aufgenommenes FURA-2/AM

wurde durch Waschschrift mit 2 ml warmen PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA mittels Zentrifugation bei 300 x g für 3 min entfernt. Anschließend wurden die mit dem Indikatorfarbstoff beladenen Zellen in 1 ml warmem PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA resuspendiert und in die vorgewärmte Quarzküvette des Fluoreszenzspektrometers überführt.

2.7.5.2 Analyse der Zellen im Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenzmessung von FURA-2-beladenen Zellen wurde mit einem PTI-Fluoreszenzspektrometer vorgenommen. Die Messungen erfolgten bei den alternierenden Anregungswellenlängen $\lambda_{A1} = 340$ nm und $\lambda_{A2} = 380$ nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde bei $\lambda_E = 510$ nm aufgenommen. Während der gesamten 400 s andauernden Messung wurden die Zellen in der Quarzküvette gerührt und konstant auf 37°C temperiert. 45 s nach Beginn der Messung erfolgte die erste Injektion des zu testenden Stimulus (gelöst in 2 bis 10 μ l 0,1 % TFA) in die Meßküvette. Um die Responsivität der Zellen gegenüber einer weiteren Stimulation zu testen, wurden nach 150 s nochmals Stimulus zugegeben. $R_{\max}$ und $R_{\min}$ wurden nach jeder Messung durch Lyse der Zellen in 0,05 % reduziertem Triton X-100 und anschließender Zugabe des Chelat-Bildners Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA) zu einer Endkonzentration von 10 mM bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Methode zur Gewinnung von Hautmastzellen

Bevor die Studien zur Interaktion zwischen humanen Hautmastzellen und Chemokinen beginnen konnten, mußte zunächst ein Verfahren zur Aufreinigung von Mastzellen aus Hautgewebe etabliert werden. Neben der laut Literaturangaben üblichen Reinheit von mehr als 90 %, war eine weitere Anforderung an das zu etablierende Verfahren, daß die isolierten Mastzellen im Anschluß mastzelltypische Funktionen, vor allem die Fähigkeit zur Degranulation nach IgE-Kreuzvernetzung, ausführen konnten. Zur Etablierung des Verfahrens versuchte ich bereits als effektiv beschriebene Vorgehensweisen anderer Autoren zu übernehmen und weniger gut arbeitende Schritte zu optimieren. Das hier entwickelte Aufreinigungsverfahren gliedert sich in vier verschiedene Hauptschritte. Im ersten Schritt wird das zerschnittene Hautgewebe durch enzymatische Behandlung in eine Zellsuspension überführt. Der zweite Schritt dient der Anreicherung der Hautmastzellen. Dazu werden die unterschiedlichen Zelltypen des Hautgewebes mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Die selektive Aufreinigung von Mastzellen geschieht dann in einem dritten Schritt durch Magnetseparation nach Markierung eines speziell auf Mastzellen exprimierten Antigens. Da sich die auf diese Weise aufgereinigten Mastzellen als nicht responsiv gegenüber IgE-Kreuzvernetzung erwiesen, wurden die Zellen in einem vierten Schritt in Kultur genommen, um die Responsivität der Zellen wiederherzustellen. Im folgenden Abschnitt sind die grundlegenden Schritte der Etablierung dieser Methode beschrieben.

3.1.1 Enzymatischer Aufschluß von humanem Hautgewebe

Wie schon in älteren Arbeiten von einer Vielzahl von Autoren beschrieben, bietet der enzymatische Aufschluß eine Möglichkeit, das aus einem festen Zellverband bestehende Hautgewebe in eine Zellsuspension umzuwandeln, aus der dann Mastzellen isoliert werden können. Freundlicherweise gab mir PD Dr. B.F. Gibbs (Klinik für Dermatologie, Universität Lübeck) Gelegenheit, die in seinem Labor etablierte Methode zum enzymatischen Gewebeaufschluß humaner Haut, sowie zur Anreicherung von Mastzellen mittels Percoll zu erlernen. Daher wurde zum Gewebeaufschluß der von Gibbs *et al.*²⁶ (ausführlich nachzulesen bei Gibbs & Ennis⁹²) beschriebenen Mastzellpuffer benutzt. Als Enzyme wurde die bei

Kambe *et al.* beschriebene Kombination aus 1,5 mg/ml Collagenase Typ II und 0,7 mg/ml Hyaluronidase verwendet⁹⁹. In dieser Kombination verschwanden die Zellaggregate in der Regel nach 4 h und die Zellen konnten geerntet werden.

Zunächst wurde versucht, die Ausbeute an Zellen ohne eine Verringerung der Viabilität durch eine Veränderung der Enzymzusammensetzung des Verdaupuffers zu erhöhen. Dazu wurden in dieser Arbeit verschiedene von Benyon *et al.*¹⁰⁰, Schwartz *et al.*¹⁰¹, Babina *et al.*¹⁰² und Lawrence *et al.*¹ beschriebene sowie selbst kreierte Enzymmischungen im Gewebeaufschluß auf ihre Eignung hin überprüft (Testansatz) und mit der in dieser Arbeit verwendeten Enzymzusammensetzung (Vergleichsansatz) verglichen (dargestellt in Tabelle 2). Als maßgebliches Kriterium für die Effizienz dieses Schrittes waren vor allem die isolierte Zellmenge und der Zustand der Zellen entscheidend, jedoch spielten nicht zuletzt auch die finanziellen Kosten dieses Verfahrens eine gewisse Rolle.

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, steigerte weder eine Halbierung noch eine Verdopplung der Enzymmenge des Vergleichsansatzes die Effizienz des Verdaus, da sich entweder die isolierte Zellmenge oder die Viabilität deutlich verschlechterte. Außerdem überprüfte ich noch, inwieweit jeweils die Enzyme Collagenase Typ IV, Liberase, DNase Typ I sowie Dispase den Verdau verbessern können. Collagenase Typ IV und Liberase wurden als Ersatz für Collagenase Typ II verwendet. Die Verwendung 1,5 mg/ml Collagenase Typ IV führte zu einer dramatischen Verschlechterung der Zellausbeute. Liberase, eine weiter aufgereinigte Collagenase, der vom Hersteller verschiedene andere Enzyme zugesetzt worden waren, bot gemäß den Angaben des Herstellers den Vorteil, daß die von Collagenase Typ II bekannten Schwankungen zwischen den verschiedenen Präparationen bei diesem Enzym nicht auftreten. Liberase erwies sich in der höchsten Konzentration, bei der die Aktivität derjenigen der zum Vergleich herangezogenen Collagenase Typ II entsprach, als sehr effizient. In geringeren Konzentrationen des Enzyms war das Enzym jedoch deutlich weniger effizient. Trotz des teilweise besseren Ergebnisses wurde Liberase aus Kostengründen nicht weiter benutzt. DNase Typ I und Dispase wurden dem Verdauansatz jeweils zusätzlich hinzugefügt. Der Zusatz von DNase Typ I führte zu keiner deutlichen Verbesserung des Aufschlusses, und durch Zusatz von Dispase verschlechterte sich der Verdau sogar. Somit wurde für den Verdau des humanen Hautgewebes der bei Gibbs *et al.* beschriebene Mastzellpuffer mit der bei Kambe *et al.* beschriebenen Enzymmenge von 1,5 mg/ml Collagenase Typ II und 0,75 mg/ml Hyaluronidase benutzt. Die Dauer des Verdau wurde auf 4 bis maximal 6 Stunden festgelegt. Die ausführliche Beschreibung der Methode kann in Materialien und Methoden unter Punkt 2.5.2.3 nachgelesen werden.

Tabelle 2 : Aufschluß von humaner Haut durch verschieden zusammengesetzte Enzymmischungen

Zusammensetzung Testansatz ^{a)}	Zellzahl/ Viabilität Testansatz ^{c)}	Zellzahl / Viabilität Vergleichsansatz ^{d)}	Versuche	Vergleich ^{e)}
0,75 mg/ml Coll.2	Zellen : 0,8	Zellen: 1,7	1	geringere Zellmenge (< 50%)
0,35 mg/ml Hyal.	Viabilität: 96%	Viabilität: 96%		ähnliche Viabilität geringere Kosten (50 %)
3,0 mg/ml Coll.2	Zellen : 3,1	Zellen: 2,5	1	ähnliche Zellmenge (120%)
1,5 mg/ml Hyal.	Viabilität: 48%	Viabilität: 89 %		niedrigere Viabilität höhere Kosten (200 %)
1,5 mg/ml Coll.4	Zellen: 0,7	Zellen: 4,0	1	geringere Zellmenge (< 20%)
0,75 mg/ml Hyal.	Viabilität: 97%	Viabilität: 87%		höhere Viabilität gleiche Kosten (100 %)
0,4 WU/ml Liberase ^{b)}	Zellen: 3,4	Zellen: 2,6	1	höhere Zellmenge (> 130%)
	Viabilität: 85%	Viabilität: 91%		ähnliche Viabilität höhere Kosten (174 %)
0,2 WU/ml Liberase ^{b)}	Zellen: 2,1	Zellen: 4,4	1	geringere Zellmenge (< 50%)
	Viabilität: 93%	Viabilität: 74%		höhere Viabilität geringere Kosten (87 %)
0,1 WU/ml Liberase ^{b)}	Zellen: 0,1	Zellen: 3,1	1	geringere Zellmenge (< 5%)
	Viabilität: 100%	Viabilität: 69 %		höhere Viabilität geringere Kosten (44 %)
1,5 mg/ml Coll.2	Zellen: 1,7 / 0,4	Zellen: 2,1 / 0,3	2	ähnliche Zellmenge (80% / 130%)
0,75 mg/ml Hyal.	Viabilität: 92%	Viabilität: 85%		ähnliche Viabilität
1000 KU/ml DNase I				höhere Kosten (167 %)
1,5 mg/ml Coll.2	Zellen: 0,6	Zellen: 1,1	1	geringere Zellmenge (< 60%)
0,75 mg/ml Hyal.	Viabilität: 28 %	Viabilität: 79%		niedrigere Viabilität
1,5 mg/ml Dispase				ähnliche Kosten (109 %)

^{a)} Coll.2 / 4 (Collagenase Typ II oder Typ IV), Hyal. (Hyaluronidase), Lsg. (Lösung), WU (Wuensche Unit), KU (Kunitz Unit)

^{b)} 1 WU (Wuensche Unit) entspricht 1000 CDU (Collagenase Desitrometric Unit). 1,5 mg/ml der zum Vergleich herangezogenen Collagenasepräparation besaß eine Aktivität von 409 CDU /ml (entspricht 0,4 WU/ml)

^{c)} Die erhaltene Zellmenge und Viabilität des jeweiligen Testansatzes.

^{d)} Der Vergleichsansatz gibt die erhaltene Zellmenge und Viabilität einer parallel zur Testansatz aufgearbeiteten Präparation des gleichen Hautgewebes mit 1,5 mg/ml Collagenase Typ II und 0,75 mg/ml Hyaluronidase.

^{e)} Verglichen wurde der Testansatz und der Vergleichsansatz hinsichtlich der erhaltenen Zellmenge, Viabilität der Zellen und der Kosten des Verfahrens.

Um die Aufreinigung von Mastzellen dokumentieren zu können, machte ich mir zur Erkennung der Mastzellen die von Ehrlich beschriebene Metachromasie nach Färbung mit dem basischen Farbstoff Toluidinblau zunutze. Dazu wurden die aus dem Verdau erhaltenen Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert, mit Toluidinblau gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert.

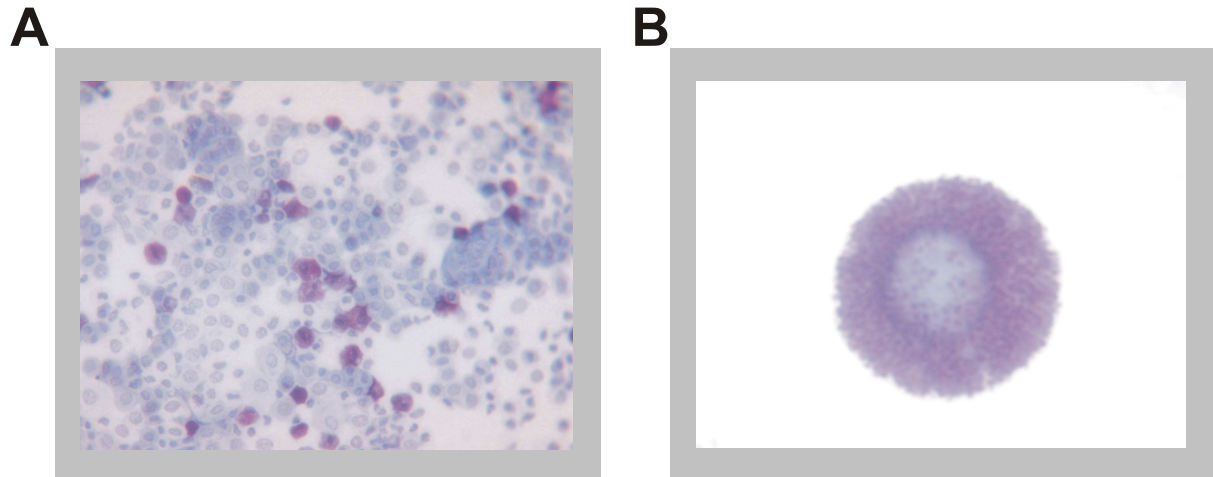


Abbildung 1: Toluidinblaufärbung aus Gewebeaufschluß erhaltener Hautzellen

Aus enzymatischem Gewebeaufschluß erhaltene Hautzellen (10^5 /Objektträger) wurden auf einen Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit 0,1 % saurer Toluidinblaulösung behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen getrocknet. Die Photographien wurden im Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung (A: Aus dem Gewebeaufschluß erhaltene Hautzellen) und bei 200-facher Vergrößerung (B: Einzelne Mastzellen) erstellt. Dargestellt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten.

Wie in Abbildung 1A zu sehen, färbte Toluidinblau die Zellkerne in einem hellen Blauton an. Durch die Verwendung stark saurer Toluidinblaulösung wird die normalerweise eintretende Blaufärbung der Zellmembran unterdrückt, wodurch bei allen Zellen außer den Mastzellen keine Färbung des Cytoplasmas eintritt. Hingegen zeigten Mastzellen die von Ehrlich beschriebene Metachromasie und färbten sich violett an. Wie in Abbildung 1B gezeigt, war die Färbung des Zytoplasmas einer Mastzelle nicht gleichmäßig, sondern wies, wie von Ehrlich beschrieben, eine granuläre Struktur auf.

Mit dieser Methode war es möglich, deutlich zwischen Mastzellen und anderen Zellen zu unterscheiden. Da diese Methode auch bei Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer funktionierte, wurde die Toluidinblaufärbung zur regelmäßigen Bestimmung des Mastzellanteils und der Mastzellzahl während der gesamten Aufreinigungsprozedur genutzt. Wie sich aus der Färbung der Zellen direkt nach dem Verdau ergab, variierte der Mastzellanteil an den Gesamtzellen jedoch sehr stark zwischen 0,3 und 14 % und betrug im Mittel 5 % (21 Experimente).

3.1.2 Anreicherung von Hautmastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Ein von verschiedenen Autoren benutztes Verfahren zur Anreicherung der aus dem Gewebeaufschluß humaner Haut gewonnenen Mastzellen stellt die Dichtegradientenzentrifugation dar. Dabei verwendeten die Autoren unterschiedlich abgestufte Gradienten aus verschiedenen verdünnten Percolllösungen. Kambe *et al.*⁹⁹ beschrieben den einfachsten Gradienten, in dem die Zellsuspension lediglich auf eine 75 %ige Percollschicht aufgebracht wurde. In meinen Händen führte diese Methode jedoch nicht zu der von den Autoren beschriebenen Anreicherung von Mastzellen in der Puffer-Percoll-Interphase. Bessere Ergebnisse konnten hingegen mit der von Gibbs *et al.*²⁶ beschriebenen Methode erzielt werden, die zur Vereinfachung modifiziert wurde. In der ursprünglichen Methode wurden die Zellen in 40 %igem Percoll aufgenommen und auf einen Gradienten, bestehend aus Schichten von 50 %igem, 60 %igem, 80 %igem und 100 %igem Percoll, geschichtet. Zur Vereinfachung wurden die Zellen direkt in 50 %igem Percoll aufgenommen und auf einen Gradienten, bestehend aus 60 %igem und 80 %igem Percoll, gegeben.

Tabelle 3 : Mastzellenanreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation

Phase	Reinheit ^{c)}	Wiederfindung ^{d)}
Auftrag ^{a)}	5 % (0,3 - 14 %)	100%
0-50	< 1 %	< 1%
50-60 ^{b)}	6 % (1 - 16 %)	41 % (12-50 %)
60-80 ^{b)}	34 % (4 - 72 %)	51 % (32-72 %)
Pellet	58 % (11 - 100 %)	8 % (1 - 15 %)

^{a)} Zellen vor der Auftrennung über den Gradienten

^{b)} Gibt die Interphase an, auf der die Zellen geerntet wurden.

^{c)} Die Reinheit gibt den durch Toluidinblaufärbung bestimmten Anteil von Mastzellen an den Gesamtzellen an.

^{d)} Die Wiederfindung gibt den in der jeweiligen Fraktion gefundenen Anteil der Mastzellen an den gesamten Mastzellen aller Fraktionen an. Angegeben sind die Mittelwerte und der Schwankungsbereich von 21 unabhängigen Experimenten.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, konnte der Mastzellanteil von 5 % mittels Dichtegradientenzentrifugation auf durchschnittlich 34 % oberhalb der Interphase zwischen 60-80 %igem Percoll gesteigert werden. Unter diesen Zellen befanden sich durchschnittlich

ca. 50 % der gesamten Mastzellen der Auftragszellen. Die weiter angereicherten Zellen des Pellets spielten keine bedeutende Rolle, da nur geringe Mengen der Gesamtmastzellen dort gefunden werden konnten. Aus diesen Resultaten ergab sich, daß die Dichtegradientenzentrifugation eine brauchbare Möglichkeit bot, Mastzellen anzureichern. Zur weiteren Aufreinigung der Mastzellen wurden die auf der 60-80 Interphase gelegenen Zellen mit den Zellen aus dem Pellet vereinigt und dem folgenden Magnetseparationsverfahren zugeführt.

3.1.3 Aufreinigung von Hautmastzellen durch Magnetseparation

Die Dichtegradientenzentrifugation führte zu einer Anreicherung der Mastzellen von 5 % auf durchschnittlich 34 % der Gesamtzellen. Da diese Reinheit für die geplanten Versuche noch nicht ausreichend war, sollte durch ein weiteres Verfahren die Reinheit nochmals erhöht werden. Ein in der Literatur häufig beschriebenes Verfahren zur weiteren Anreicherung von Mastzellen stellt die positive Magnetseparation dar. In diesem Verfahren wird ein nur auf den zu isolierenden Zellen exprimiertes Oberflächenantigen mit einem spezifischen Antikörper markiert. Anschließend werden die so mit dem primären Antikörper markierten Zellen mittels eines sekundären Antikörpers, der mit magnetischen Mikropartikeln konjugiert ist, gekoppelt. Indem die Zellen auf eine Magnetseparationssäule gegeben werden, können die unmarkierten Zellen ungehindert durch das angelegte Magnetfeld von der Säule heruntergespült werden, während die markierten Zellen zurückgehalten werden. Nach Entnahme der Säule aus dem Magneten können die zurückgehaltenen Zellen entnommen werden.

Besonders wichtig für die effektive Durchführung dieser Methode ist die Auswahl eines geeigneten Oberflächenantigens auf den Mastzellen. In der Literatur finden sich für die Anreicherung von Mastzellen drei verwendete Antigene: Erstens, der auf Mastzellen und Basophilen exprimierte hochaffine Rezeptor für Immunglobulin E, der FcεRI. Dieser Rezeptor ist allerdings äußerst schlecht für die Aufreinigung der Zellen geeignet, da die Markierung dieses Rezeptors zur Aktivierung der Zelle führen kann. Zweitens, der Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF, der sogenannte c-kit oder auch CD117. Ein Nachteil dieses Antigens für die Magnetseparation ist, daß durch die Markierung der c-kit für den Liganden SCF unzugänglich wird, wodurch sich auch die Responsivität der Zellen gegenüber SCF verringern kann. Im Hinblick auf die nachfolgende SCF-abhängige Zellkultur der Mastzellen stellt die Isolierung über den c-kit somit ein Risiko für die Viabilität der Zellen dar. Eine Alternative zum c-kit als Oberflächenantigen zur Magnetseparation fanden Ren *et al.* in dem

Disialogangliosid GD3¹⁰³, über dessen Markierung Mastzellen von ursprünglich 12 % auf über 90 % angereichert werden können. Jedoch ist der gegen GD3 gerichtete Antikörper nicht kommerziell verfügbar. Ein anderes aussichtsreiches Antigen schien mir hingegen der kommerziell verfügbare Antikörper 97A6 zu sein, der ein auf der Oberfläche von Stammzellen, Basophilen und Mastzellen exprimiertes Ektoenzym erkennt, das als CD203c klassifiziert wird^{104,105}. Wie Buhring *et al.* berichteten, erwies sich dieser Antikörper bereits als äußerst effektiv zur Aufreinigung von Stammzellen aus Knochenmark sowie zur Aufreinigung Basophiler aus dem peripheren Blut¹⁰⁵. In einem ersten Experiment sollte zunächst geklärt werden, ob eine auf den CD203c abzielende Magnetseparation tatsächlich zur Anreicherung von Hautmastzellen führt. In Vorversuchen hatte sich bereits gezeigt, daß einige der aus dem Percollgradienten erhaltenen Zellen das Sekundärreagenz, die α -PE-Beads, unspezifisch binden. Um diese unspezifisch bindenden Zellen im Vorfeld von der Aufreinigung auszuschließen, wurden sie in einem Vorlauf durch eine Magnetseparation in Abwesenheit des primären Antikörpers von den restlichen Zellen abgetrennt. Für die folgende Magnetseparation wurden dann die verbleibenden Zellen mit Phycoerythrin (PE)-konjugiertem α -CD203c auf Eis für 45 min inkubiert, anschließend mit sekundären α -PE-beads für 10 min markiert und über eine Magnetseparationssäule aufgetrennt. Die durch die Säule gelaufenen sowie die eluierten Zellen wurden im Durchflußzytometer analysiert und mit den Zellen vor dem Auftrag verglichen.

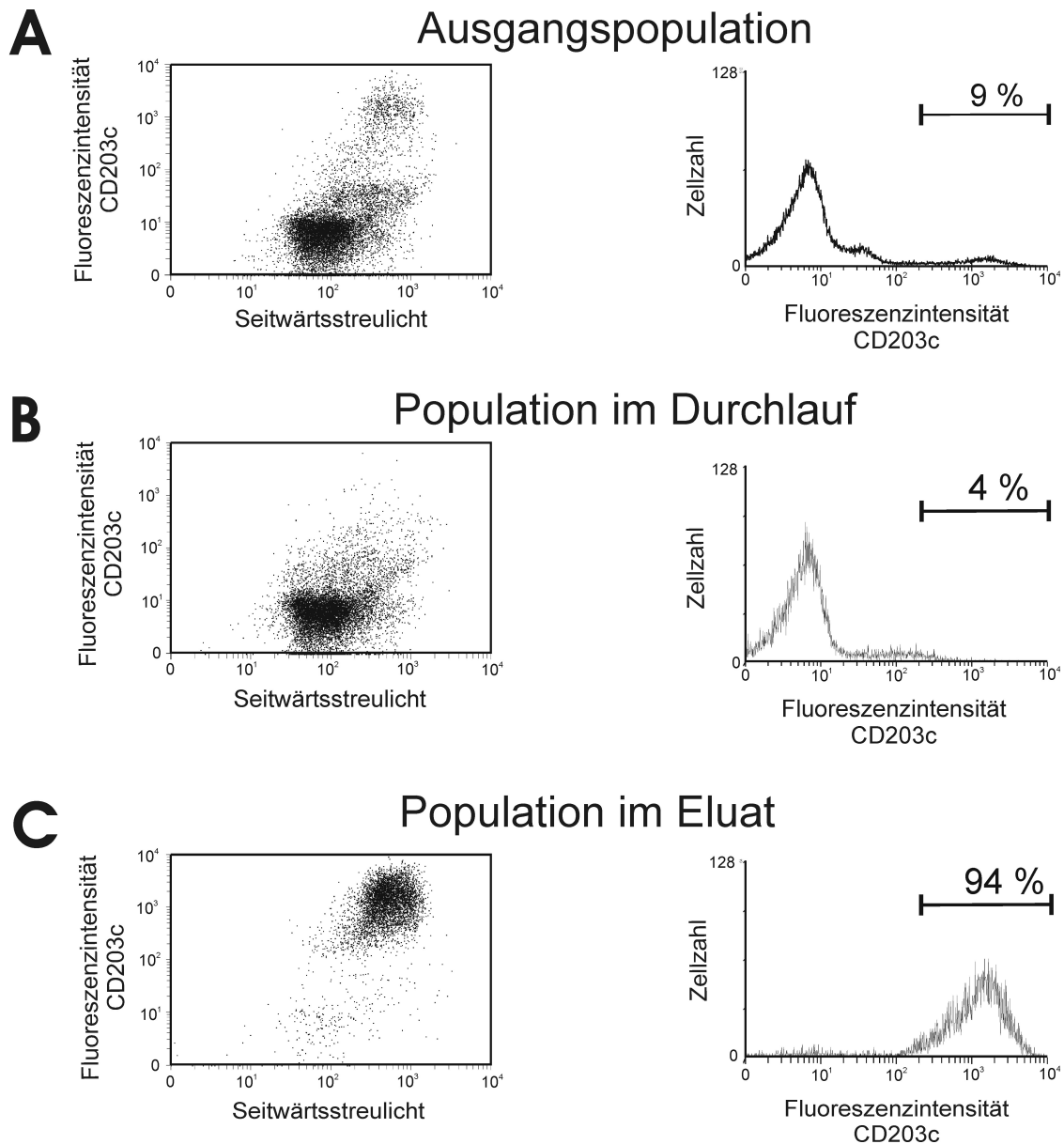


Abbildung 2: Expression des CD203c auf Zellen der Ausgangspopulation, des Säulendurchlaufs und des Eluates nach Magnetseparation mittels α -CD203c

Aus dem enzymatischen Gewebeaufschluß humaner Haut erhaltene Mastzellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert und direkt oberhalb der 80 %igen Percollschicht abgenommen. Diese Zellen wurden in 160 μ l MACS-Puffer aufgenommen und mit 40 μ l α -PE-Beads für 10 min auf Eis inkubiert. Nachdem die jeweiligen Zellen, die α -PE-Beads unspezifisch binden, über eine Magnetseparationssäule entfernt worden waren, wurden die eluierten Zellen nacheinander mit α -CD203c-PE und mit α -PE-Beads markiert (A). Anschließend wurden die Zellen auf eine Magnetseparationssäule aufgetragen. Die Zellen des Durchlaufs (B) sowie die eluierten Zellen (C) wurden aufgefangen und im Durchflußzytometer auf ihr Verhalten im Seitwärtsstreulicht sowie ihre Fluoreszenzintensität hin untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives von 5 Experimenten.

Wie das links in Abbildung 2A dargestellte Punktdiagramm zeigt, gab es unter den aus dem Percollgradienten erhaltenen Zellen eine Population, die den CD203c stark exprimierte und ein besonders starkes, für Mastzellen typisches Seitwärtsstreulicht aufwies. Wie in dem Histogramm rechts in Abbildung 2A zu sehen ist, machte diese CD203c-positive Population (mit einer relativen Fluoreszenzintensität > 200) 9 % der Gesamtzellen aus und entsprach damit weitgehend dem durch Toluidinblaufärbung der gleichen Präparation ermittelten Mastzellanteil von 11 % der Gesamtzellen. Das links in Abbildung 2B gezeigte Punktdiagramm zeigt die Zellen des Durchlaufes der Magnetsäule nach Magnetseparation. Es wird erkennbar, daß die CD203c-positive Subpopulation abgenommen hat. Wie dem daneben dargestellten Histogramm zu entnehmen ist, reduzierte sich der Anteil dieser Population auf 4 %. Ebenso nahm der durch Toluidinblaufärbung ermittelte Mastzellanteil auf 4 % ab. Hingegen ist bei der in Abbildung 2C dargestellten, durchflußzytometrischen Analyse der Zellen des Eluats zu sehen, daß der Anteil der CD203c-positiven Population auf 94 % angestiegen war. Dieses Resultat stand in guter Übereinstimmung mit einem Mastzellanteil von 93 %.

Wie aus der ca. zehnfachen Anreicherung der Mastzellen gegenüber der aus dem Percollgradienten erhaltenen Zellen klar hervorgeht, stellt der CD203c ein äußerst effizientes Zielantigen für die Aufreinigung humaner Hautmastzellen mittels Magnetseparation dar. So war sogar bei einem relativ niedrigen Anteil von Mastzellen nach Dichtegradientenzentrifugation (hier 9 %, im Mittel 34 %) in der Regel eine ausreichende Aufreinigung der Mastzellen gewährleistet. Falls die Reinheit nach Magnetseparation unterhalb von 90 % lag, konnte sie durch nochmaliges Auftragen auf die Säule auf über 90 % gesteigert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt war, daß diese Methode immer zur Gewinnung von mehr als 60 % der aus der Dichtegradientenzentrifugation hervorgegangenen Mastzellen führt (21 Experimente).

Allerdings stellte sich heraus, daß die auf diese Weise isolierten Hautmastzellen direkt nach der Isolierung keine Degranulation nach Stimulation mit kreuzvernetzenden α -IgE oder mit dem Kalziumionophor A23187 aufwiesen. Wie andere Autoren berichten, kann die Responsivität von Mastzellen durch eine solche strapaziöse Isolationsprozedur stark vermindert sein¹⁰⁶. Daher versuchte ich, die Responsivität durch Kultur der Zellen wiederherzustellen.

3.1.4 Zellkultur isolierter Hautmastzellen

Für die Kultur humaner Mastzellen wurden in der Literatur eine Reihe unterschiedlicher Medien beschrieben, von denen ich zunächst RPMI mit 10 % FCS auswählte. Notwendig ist jedoch grundsätzlich die Anwesenheit des Zytokins SCF während der Kultur. Daher wurde dem Medium zusätzlich noch die nach Literaturangaben übliche Dosis von 100 ng/ml SCF hinzugefügt¹⁰⁶.

Um die Erholung der Mastzellen von den Strapazen der Isolierung zu dokumentieren, wurden die Zellen bis zu einer Woche kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten auf ihre Responsivität auf α -IgE hin überprüft. Eine typische, durch IgE-Kreuzvernetzung ausgelöste Reaktion von Mastzellen ist die Degranulation, d.h. die Freisetzung der Inhalte der sekretorischen Granula, wie z.B. des Enzyms Hexosaminidase, in die Umgebung der Zelle. Diese Funktion machte ich mir zur Bestimmung der Responsivität der Zellen zunutze.

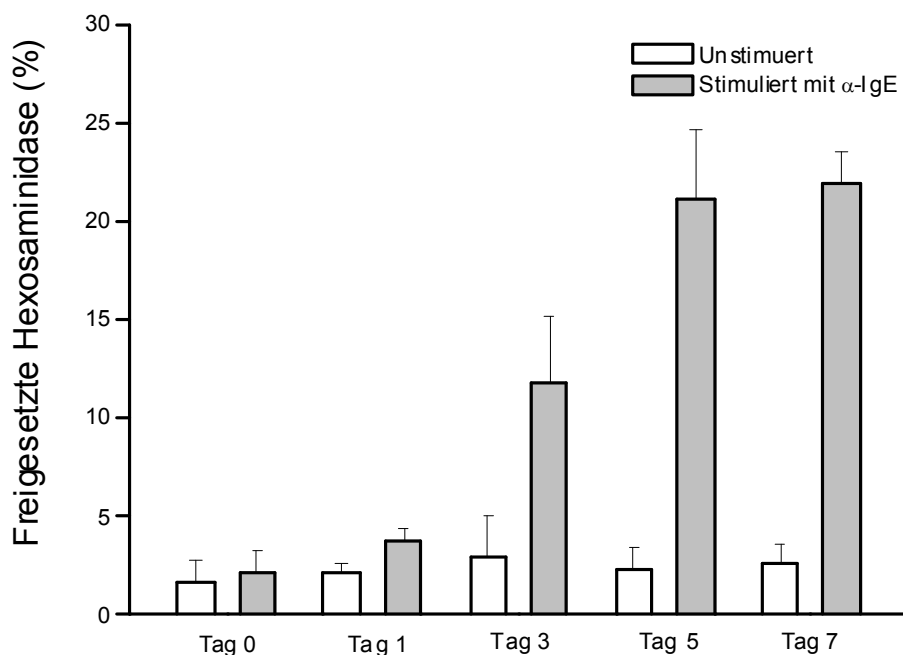


Abbildung 3 : Responsivität von isolierten Hautmastzellen gegenüber α -IgE während der Mastzellkultur

Isolierte Hautmastzellen wurden direkt nach der Isolierung oder nach verschieden langer Kultur in Medium (RPMI-1640/ 10 % FCS/ 100 ng/ml SCF) auf ihre Responsivität gegenüber 3 μ g/ml α -IgE hin überprüft. Dazu wurden die Hautmastzellen (2×10^4 Zellen /ml) für 30 min mit PBS-D/ 0,1%BSA allein oder zusätzlich mit 3 μ g/ ml α -IgE inkubiert und anschließend deren zellfreie Überstände auf freigesetzte Hexosaminidase-Enzymaktivität hin untersucht. Dazu wurden die Zellen entfernt und die zellfreien Überstände für 3 Stunden mit dem Hexosaminidase-Substrat 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Glyzinpuffer wurde die Extinktion bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Der Anteil der freigesetzten Hexosaminidase wurde als Prozentsatz der durch Triton-X-100-Lyse aus Vergleichszellen freigesetzten Menge (= 100 %) angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Wie Abbildung 3 zu entnehmen ist, blieb direkt nach der Isolierung (Tag 0) die Freisetzung der Hexosaminidase nach Stimulation mit α -IgE auf dem Niveau unstimulierter Zellen. Auch an Tag 1 war noch keine wesentliche Steigerung nach α -IgE-Stimulation gegenüber der unstimulierten Kontrolle zu beobachten. Am dritten Tag der Kultur zeigten die Zellen erstmals eine erhöhte Hexosaminidase-Freisetzung nach α -IgE-Stimulation ($11,8 \pm 3,5$ %). Nach fünftägiger Kultur belief sich die Hexosaminidase-Freisetzung nach α -IgE-Stimulation auf $21,2 \pm 3,6$ %, die sich durch längere Kultur bis zu sieben Tagen nicht weiter steigern ließ ($21,9 \pm 1,7$ %).

Diese Ergebnisse zeigen, daß isolierte Mastzellen sich während der Kultur erholen und nach 5 Tagen ihre maximale Responsivität gegenüber α -IgE wiedererlangt haben. Damit hatte ich Zellen erhalten, die für die folgenden Untersuchungen zur Interaktion von Mastzellen und Chemokinen geeignet sind. Ein Problem blieb jedoch der teilweise hohe Verlust an Zellen während der Kultur von durchschnittlich mehr als 50 %, der in seltenen Fällen sogar 100 % betragen konnte. Dieses Problem konnte weder durch die Verwendung anderer Medien wie Basal Iscoves Medium oder AIM-V noch durch Veränderung des Gehaltes an FCS im Medium oder der Zelldichte in der Kultur gelöst werden.

Zusammenfassend war es mittels der in diesem Abschnitt dargestellten Methode möglich, isolierte Hautmastzellen zu gewinnen. Dabei lag die Menge isolierter Mastzellen in nach der Kultur bei durchschnittlich $3,5 \times 10^4$ ($0,4 - 8,7 \times 10^4$) Mastzellen/ g Hautgewebe (21 Versuche). Da es aus technischen Gründen schwierig war mehr als maximal 45 g Hautgewebe eines Spenders aufzuarbeiten, war die Menge der verfügbaren Zellen nach der Kultur nur selten höher als 2×10^6 Zellen.

Für einige der geplanten Versuche reichte diese Menge an Zellen nicht aus. Daher wurde untersucht, inwieweit für einige der folgenden Versuche die Zelllinie LAD-2 als Modell dienen konnte.

3.2 Wirkung inflammatorischer Chemokine auf Mastzellen

3.2.1 Zellen der Zelllinie LAD-2 exprimieren CD 117 und CD 203c

Da abzusehen war, daß die Menge der aus Gewebe isolierte Mastzellen für einige der anstehenden Experimente zur Untersuchungen der Expression von Rezeptoren inflammatorischer Chemokine auf Mastzellen nicht ausreichen würde, schien die im Jahr 2003 erstmals von Kirshenbaum *et al.*⁶³ beschriebene Zelllinie LAD-2 eine gute Möglichkeit für solche Untersuchungen zu bieten. Da bereits von anderen Mastzelllinien bekannt war, daß diese Zellen häufig gravierende Unterschiede zu primären Mastzellen zeigen, überprüfte ich LAD-2-Zellen auf einige mastzelltypische Charakteriska, die ich zuvor schon bei der Charakterisierung der Hautmastzellen gefunden hatte.

Zuerst untersuchte ich mittels Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern und anschließender durchflußzytometrischer Analyse, ob LAD-2 das für Mastzellen typische Oberflächenantigen CD203c und, wie bereits bei Kirshenbaum *et al.* beschrieben⁶³, den SCF-Rezeptor CD117 exprimieren. Für die Untersuchung des CD117 wurden die Zellen zwei Tage in Abwesenheit von SCF kultiviert, um eine potentielle Herabregulation des Rezeptors zu vermeiden.

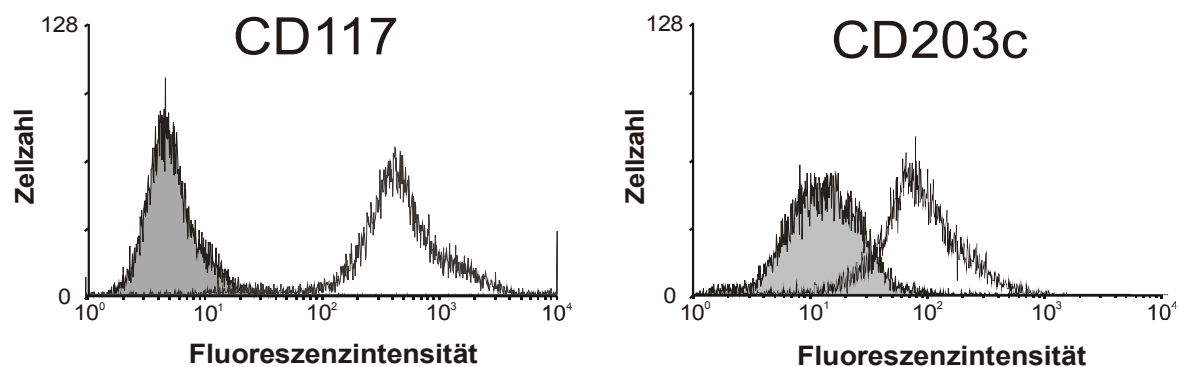


Abbildung 4: Expression von des CD117 und CD203c auf LAD-2-Zellen

LAD-2-Zellen wurden für zwei Tage in Abwesenheit von SCF kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD117 (transparent) oder mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps (grau) für 1 h auf Eis inkubiert und nach anschließender Detektion der zellgebundenen Antikörper mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-IgG-Sekundärantikörper durchflußzytometrisch auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Zur Analyse der Expression des CD203c wurden in Anwesenheit von SCF kultivierte LAD-2-Zellen mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CD203c (transparent) oder mit einer PE-konjugierten irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps (grau) markiert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde anschließend im Durchflußzytometer gemessen. Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität wieder. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, exprimieren LAD-2-Zellen sowohl CD117 als auch CD203c. So zeigten sowohl die mit dem Antikörper α -CD117 als auch die mit α -CD203c behandelten Zellen eine drastisch verstärkte Fluoreszenz im Gegensatz zu der jeweiligen Isotypkontrolle. Damit bestätigten diese Ergebnisse die bereits bei Kirshenbaum *et al.* beschriebene Expression des CD117 auf LAD-2-Zellen⁶³. Zusammen mit dem CD203c exprimieren LAD-2-Zellen somit zwei für Mastzellen typische Oberflächenantigene.

3.2.2 LAD-2-Zellen binden IgE und reagieren auf Kreuzvernetzung durch α -IgE

Als eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von Mastzellen gilt die Freisetzung von Mediatoren nach Kontakt mit Allergenen. Die Erkennung dieser Allergene findet über Immunglobulin E statt, das an den Fc ϵ RI auf der Oberfläche von Mastzellen gebunden ist. Wie von Kirshenbaum *et al.* beschrieben, exprimieren auch LAD-2-Zellen einen funktionellen Fc ϵ RI, wodurch diese Zellen ein geeignetes Modell für Studien von Mastzellfunktionen darstellen. Um die Funktionalität des Rezeptors bei den für diese Arbeit kultivierten LAD-2-Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen für 24 h in An- und Abwesenheit von humanen IgE kultiviert. Um das Vorhandensein von IgE-Bindungsstellen sowie die Wirkung einer Kreuzvernetzung von gebundenem IgE auf LAD-2-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen anschließend sowohl auf die Bindung des IgE an die Zelloberfläche durch Detektion mittels α -IgE im Durchflußzytometer untersucht als auch die Freisetzung von Hexosaminidase nach α -IgE-Behandlung bestimmt.

Wie in Abbildung 5A (linkes Histogramm) zu entnehmen ist, war die Bindung des DTAF-konjugierten α -IgE an Zellen, die in Abwesenheit von IgE kultiviert worden waren, praktisch identisch zur Bindung der irrelevanten Isotypkontrolle (MFI 10 und 10). Hingegen zeigten die in Anwesenheit von IgE kultivierten Zellen eine deutlich erhöhte Bindung des DTAF-konjugierten α -IgE (MFI 541 ± 27) gegenüber der irrelevanten Kontrolle (MFI 11) (Abbildung 5A, rechtes Histogramm). Diese Ergebnisse zeigten, daß IgE an die Oberfläche von LAD-2-Zellen binden kann. Wie in Abbildung 5B zu sehen, führte Inkubation mit α -IgE bei LAD-2-Zellen, die ohne IgE kultiviert worden waren, zu keiner gegenüber der unstimulierten Kontrolle deutlich erhöhten Freisetzung von Hexosaminidase ($3,4 \pm 1,2$ % und $4,3 \pm 1,5$ %). Hingegen war bei Zellen, die in Gegenwart von IgE kultiviert worden waren, die Freisetzung von Hexosaminidase nach Stimulation mit α -IgE gegenüber der unstimulierten Kontrolle dramatisch erhöht ($3,2 \pm 1,4$ % zu $18,2 \pm 4,5$ %).

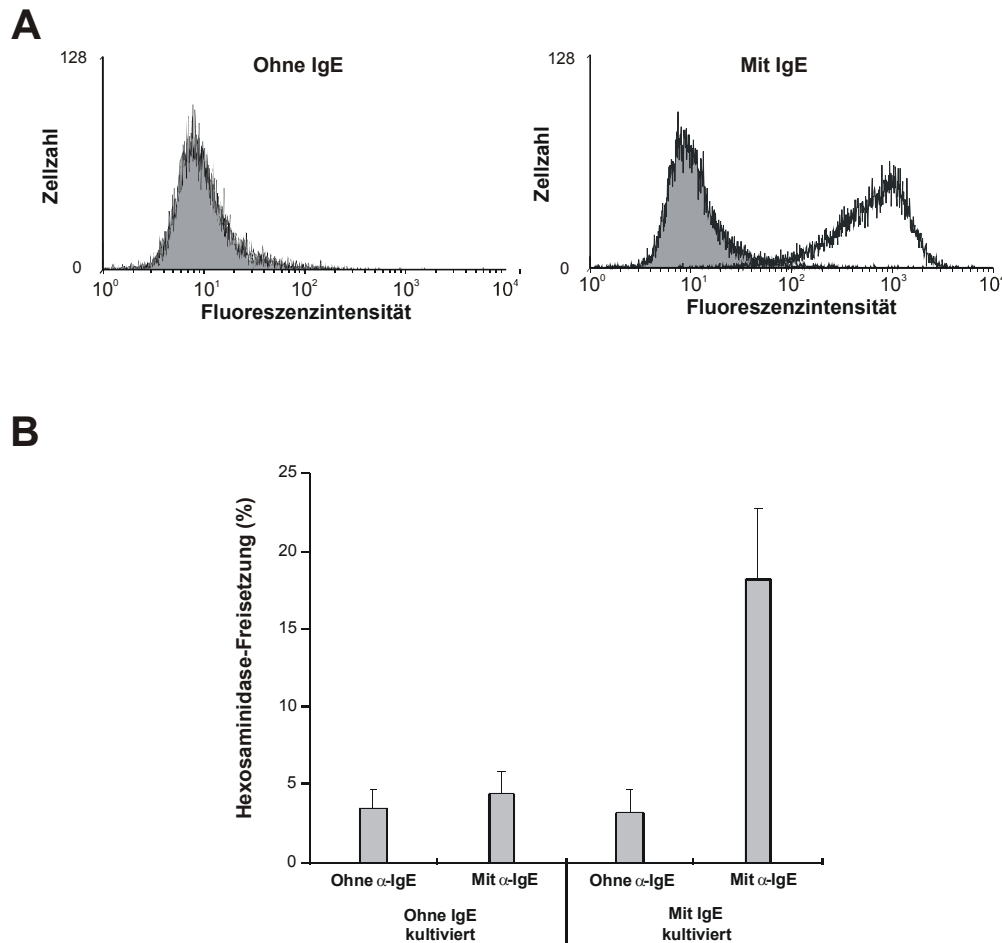


Abbildung 5: Bindung von IgE an LAD-2-Zellen und Freisetzung von Hexosaminidase nach Stimulation mit α -IgE

LAD-2-Zellen wurden für 24 h in Ab- und Anwesenheit von 1 $\mu\text{g/ml}$ IgE kultiviert. Zur Bestimmung des gebundenen Antikörpers (A) wurden die Zellen mit einem DTAF-konjugierten Ziegenantiserum gegen humanes IgE (transparent) oder mit einem irrelevanten DTAF-konjugierten Ziegenantiserum (grau) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflußzytometer auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität wieder. Dargestellt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten. Zur Bestimmung der Responsivität gegenüber IgE-Kreuzvernetzung wurden die Zellen auf die Freisetzung von Hexosaminidase nach Inkubation mit α -IgE hin untersucht (B). Dazu wurden 2×10^5 zuvor mit IgE beladene und unbeladene Zellen in Ab- und Anwesenheit von 30 $\mu\text{g/ml}$ α -IgE für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Zellen durch Abzentrifugieren wurden die zellfreien Überstände für vier Stunden mit dem Hexosaminidase-Substrat 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Glyzinpuffer wurde die Extinktion bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Der Anteil der freigesetzten Hexosaminidase wurde als Prozentsatz der durch Triton-Lyse aus Vergleichszellen freigesetzten Menge (= 100 %) angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte $\pm$ Abweichungen zweier unabhängiger Experimente.

Diese Ergebnisse zeigten somit, daß LAD-2-Zellen nicht nur IgE binden können, sondern darüber hinaus auch auf IgE-Kreuzvernetzung mit Degranulation reagieren. Damit konnten die von Kirshenbaum *et al.*⁶³ beschriebene Expression eines funktionellen Fc ϵ RI auf LAD-2-Zellen auch bei den für diese Arbeit verwendeten Zellen bestätigt werden, wodurch sie ein geeignetes Modell für das Studium von Mastzellfunktionen darstellen.

3.2.3 Hautmastzellen und LAD-2-Zellen unterscheiden sich in ihrem Gehalt an Chymase

Wie sich in den vorangegangenen Versuchen herausgestellt hatte, zeigen LAD-2-Zellen typische mastzellspezifische Charakteristika wie die Expression von CD117 und CD203c sowie Responsivität gegenüber IgE-Kreuzvernetzung.

Wie schon eingangs erwähnt, unterteilt man Mastzellen in zwei verschiedene Subpopulationen, die anhand der Expression des Enzyms Chymase unterschieden werden können. Um festzustellen, welcher Subpopulation die aus der Haut isolierten Mastzellen und LAD-2-Zellen zugeordnet werden können, sollten die Zellen auf ihren Gehalt an gespeicherter Chymase untersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurden Hautmastzellen und LAD-2-Zellen jeweils auf einen Objektträger zentrifugiert, daraufhin fixiert und permeabilisiert. Nach anschließender Färbung mit einem α -Chymase-Antikörper oder einem irrelevanten Kontrollantikörper gleichen Isotyps wurden sie im konfokalen Lasermikroskop auf ihre Fluoreszenz hin untersucht.

Wie in Abbildung 6 zu sehen, wurden die Zellen erkennbar durch Färbung der Zellkerne mit dem Farbstoff Toto-3 (blau). Das Photo in Abbildung 6A (links) zeigt, daß sich mit der Isotypkontrolle behandelte Hautmastzellen im Umfeld des Kerns, wo sich das Zytoplasma der Zelle befindet, nicht anfärbten. Hingegen war in den Hautmastzellen die mit α -Chymase-Antikörper behandelt worden waren, eine deutliche Färbung im Zytoplasma zu erkennen (grün, rechtes Bild). Angefärbt wurden dabei vor allem Bereiche, die in Form und Anordnung den in Abbildung 1 mit Toluidinblau angefärbten Granula der Mastzellen glichen. Die Auszählung der angefärbten (81) und nicht angefärbten Zellen (7) ergab einen Anteil von Chymase-positiven Zellen von mehr als 90 %.

Bei den in Abbildung 6B dargestellten LAD-2-Zellen wurde nach Behandlung mit der Isotypkontrolle eine schwache Immunfluoreszenz sichtbar. Nach Behandlung mit α -Chymase ergab sich eine verstärkte Färbung der Zellen. Diese war jedoch weitaus schwächer als die Chymase-Färbung bei Hautmastzellen. Im Gegensatz zu den Hautmastzellen, färbten sich alle LAD-2-Zellen gleich stark an.

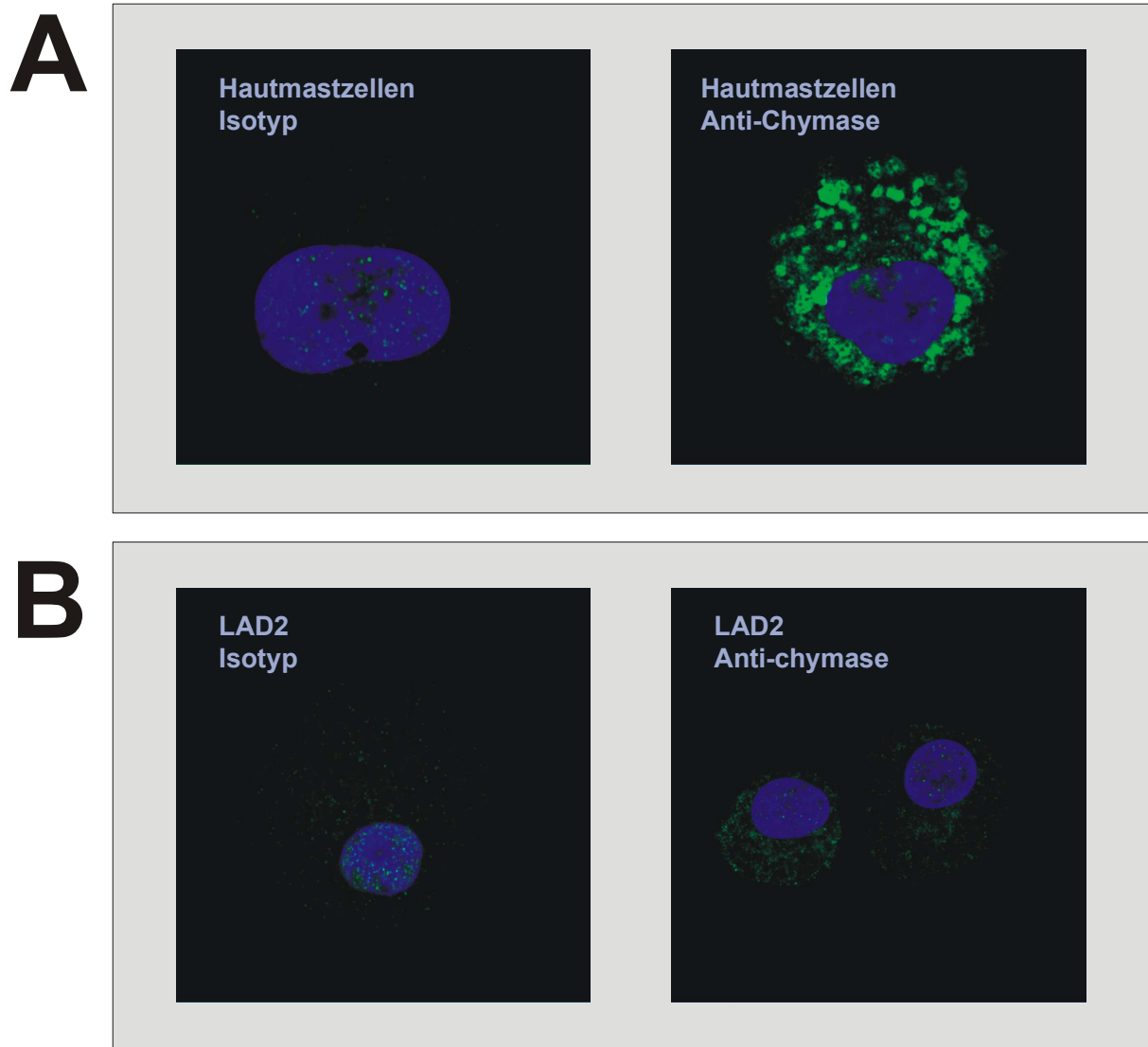


Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung von Chymase in Hautmastzellen und LAD-2-Zellen

Hautmastzellen (A) und LAD-2-Zellen (B) (jeweils 1×10^5 Zellen /Ansatz) wurden auf einen Objektträger zentrifugiert, mit Paraformaldehyd fixiert und danach mit Triton-X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellkerne durch Inkubation mit dem Farbstoff TOTO-3 blau gefärbt. Danach wurden die Zellen mit einem murinen α -Chymase-Antikörper oder einem irrelevanten Antikörper gleichen Isotyps behandelt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie nach Inkubation mit Alexa-488-konjugiertem Ziege α -Maus-IgG-Sekundärantikörper. Dargestellt ist jeweils ein für drei Experimente repräsentatives Experiment.

Aus diesen Experimenten geht hervor, daß isolierte Hautmastzellen mehrheitlich und deutlich Chymase exprimieren. Durch die vergleichsweise schwache Färbung von LAD-2-Zellen wurde jedoch klar, daß LAD-2-Zellen zwar ebenfalls Chymase exprimieren, in diesen Zellen jedoch wesentlich weniger Chymase gespeichert vorliegt als in Hautmastzellen.

Zusammenfassend ergab somit die Charakterisierung der LAD-2-Zellen hinsichtlich mastzellspezifischer Merkmale, daß sich diese Zellen in der Expression des CD117 und des CD203c sowie der Responsivität gegenüber IgE-Kreuzvernetzung mit Hautmastzellen ähneln,

jedoch quantitative Unterschiede in ihrem Gehalt an Chymase zeigen. Jedoch war eine klare Klassifizierung der Zelllinie in die Gruppe der Chymase-negativen oder -positiven Mastzellen aufgrund der sehr schwachen Expression von Chymase nicht möglich. Welche Konsequenzen die unterschiedliche Chymase-Expression beider Zellen für die Interaktion mit thrombozytären Chemokinen hat, wird in später beschriebenen Experimenten deutlich (Abschnitt 3.3) und in der Diskussion eingehend behandelt werden.

3.2.4 Charakterisierung des Expressionsmusters von Chemokinrezeptoren auf Zellen der LAD-2 Linie

Über das Expressionsprofil von Rezeptoren für inflammatorische Chemokine von Hautmastzellen ist wenig bekannt. Über die Chemokinrezeptorexpression auf LAD-2-Zellen existiert bis heute nur der Bericht von Kirshenbaum *et al.*, die die Expression des CCR5 und des CXCR4 auf LAD-2 untersuchten und beide Rezeptoren auf den Zellen nachweisen konnten.

Daher soll nun die Expression von Rezeptoren für inflammatorische Chemokine auf Hautmastzellen und LAD-2-Zellen untersucht und verglichen werden. Um festzustellen, ob die exprimierten Rezeptoren funktionell sind, sollten Mastzellen zusätzlich auf ihre potentielle Responsivität gegenüber inflammatorischen Chemokinen hin überprüft werden. Diese Untersuchungen gestalteten sich jedoch an aus Haut isolierten Zellen äußerst schwierig, da die Ausbeute an Zellen für einige funktionelle Versuchsansätze nicht ausreichend war. Daher sollte zunächst überprüft werden, inwieweit LAD-2-Zellen hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptorexpression ein brauchbares Modell für diese Untersuchungen darstellen.

3.2.4.1 Expression von CC-Chemokinrezeptoren auf Hautmastzellen und LAD-2-Zellen

Zunächst wurde die Expression der CC-Chemokinrezeptoren untersucht unter deren Liganden sich die inflammatorischen Chemokine RANTES, ein Ligand des CCR1, -3 und -5 sowie MCP-1, ein Ligand des CCR2, befinden. Zur Untersuchung der Expression dieser Rezeptoren wurden Hautmastzellen und LAD-2-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5 bzw. mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps inkubiert und nach anschließender Markierung mit einem DTAF-gekoppelten, sekundären Antiserum im Durchflußzytometer auf ihre Fluoreszenz hin untersucht.

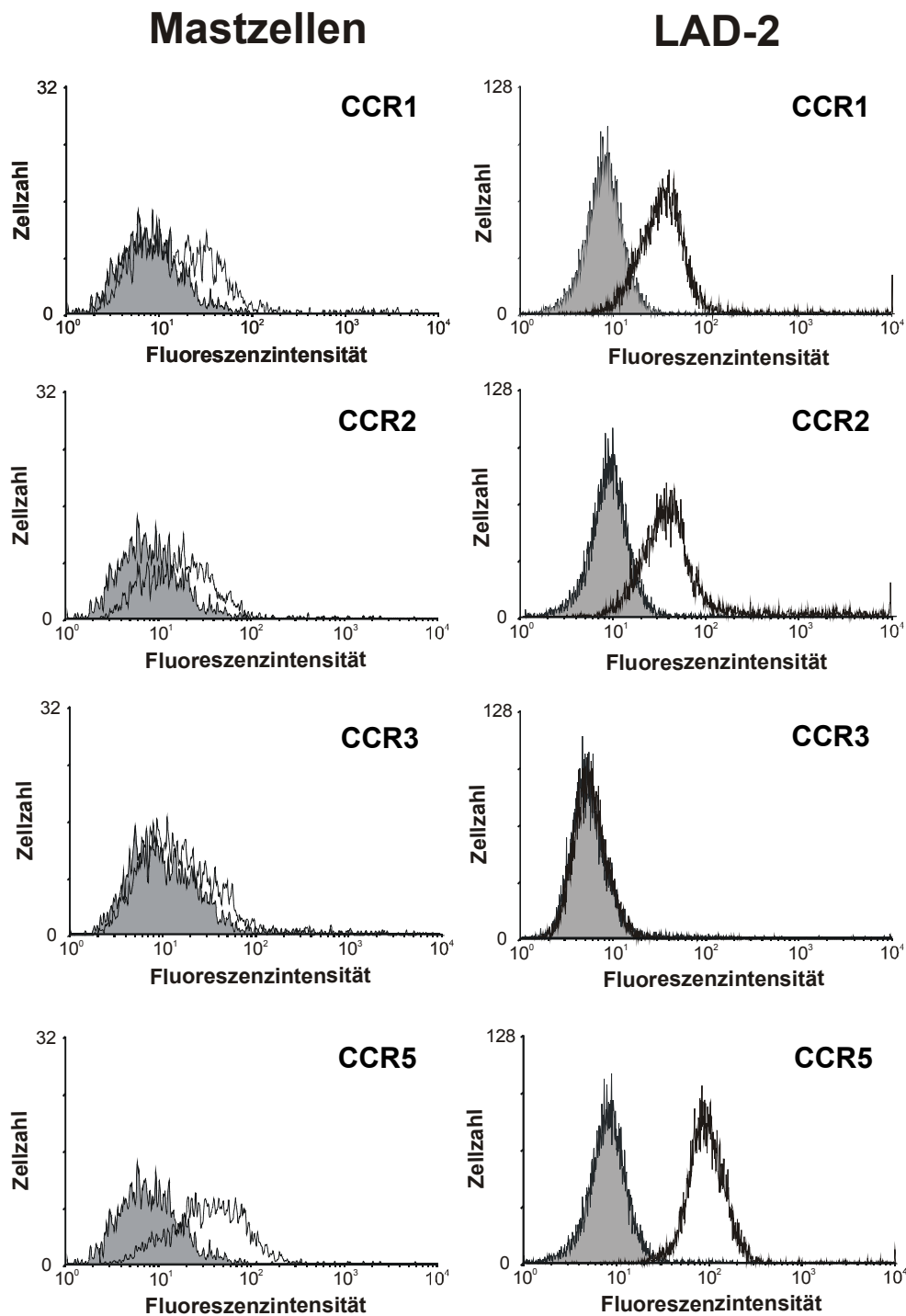


Abbildung 7: Expression von CC-Chemokinrezeptoren auf LAD-2-Zellen

Hautmastzellen (linke Spalte) und LAD-2-Zellen (rechte Spalte) wurden mit Antikörpern gegen CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5 (transparent) oder mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps (grau) für 1 h auf Eis inkubiert. Der Nachweis der zellgebundenen Antikörper erfolgte im Durchflußzytometer nach Inkubation mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-IgG-Sekundärantikörper (für CCR1, CCR2 und CCR5) oder mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Ratte-IgG-Sekundärantikörper (für CCR3). Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität wieder. Dargestellt ist jeweils ein für drei Experimente repräsentatives Experiment.

Wie in der linken Spalte von Abbildung 7 zu sehen ist, zeigten Hautmastzellen im Vergleich zur Isotypkontrolle (MFI: 13 ± 4) nach Inkubation mit den Antikörpern α -CCR1 (43 ± 18), und α -CCR5 (67 ± 21) eine deutlich erhöhte und nach Inkubation mit α -CCR2 (24 ± 5) eine leicht erhöhte Fluoreszenzintensität. Hingegen konnte praktisch keine erhöhte Fluoreszenzintensität der Zellen gegenüber der entsprechenden Isotypkontrolle (MFI: 16 ± 3) nach Inkubation mit α -CCR3 (MFI: 17 ± 5) festgestellt werden. Somit exprimieren Hautmastzellen die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5, jedoch nicht den CCR3.

Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit LAD-2-Zellen sind in der rechten Spalte von Abbildung 7 dargestellt und zeigen, daß nach Markierung mit den Antikörpern α -CCR1 ($34 \pm 5,9$), α -CCR2 ($42 \pm 8,3$) und α -CCR5 ($91 \pm 17,6$) die Fluoreszenzintensität von LAD-2-Zellen im Vergleich zu mit der Isotypkontrolle behandelten Zellen (MFI $8,9 \pm 2,6$) deutlich erhöht war. Jedoch war die Fluoreszenzintensität der Zellen nach Behandlung mit α -CCR3 ($7,3 \pm 2,6$) gegenüber der entsprechenden Isotypkontrolle ($6,7 \pm 3,0$) nicht erhöht.

Wie aus diesen Experimenten hervorging, exprimieren LAD-2-Zellen die Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5, jedoch nicht den CCR3 und zeigen im Bezug auf die untersuchten CC-Chemokinrezeptoren ein mit Hautmastzellen weitgehend identisches Expressionsprofil. Damit stellen LAD-2-Zellen ein gutes Untersuchungsobjekt dar, um die Wirkung von inflammatorischen CC-Chemokinen wie RANTES und MCP-1 auf Mastzellen zu untersuchen.

Um jetzt einen ersten Eindruck über die Funktionalität der Chemokinrezeptoren auf LAD-2-Zellen zu gewinnen, machte ich mir die Eigenschaft dieser Rezeptoren zunutze, daß sie nach Bindung eines Liganden in die Zelle internalisiert werden. Um die Internalisierung der Rezeptoren zu überprüfen, inkubierte ich LAD-2-Zellen vor der Immunfluoreszenzmarkierung mit den receptorspezifischen Antikörpern entweder mit RANTES, der unter anderem ein Ligand der Rezeptoren CCR1 und CCR5 ist, oder mit MCP-1, einem Liganden des CCR2. Dabei wurde sowohl RANTES⁴² als auch MCP-1⁴³ in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt, die laut Literaturangaben ausreichend für eine deutliche Regulation des Rezeptors und für die Auslösung von Zellfunktionen ist. Anschließend wurde die Expression der Rezeptoren auf den mit Chemokin behandelten Zellen mit derjenigen verglichen, die mit Puffer behandelte Zellen zeigten. Auf die Untersuchung des CCR3 wurde in diesem Zusammenhang verzichtet, da zuvor keine Expression dieses Rezeptors festgestellt werden konnte.

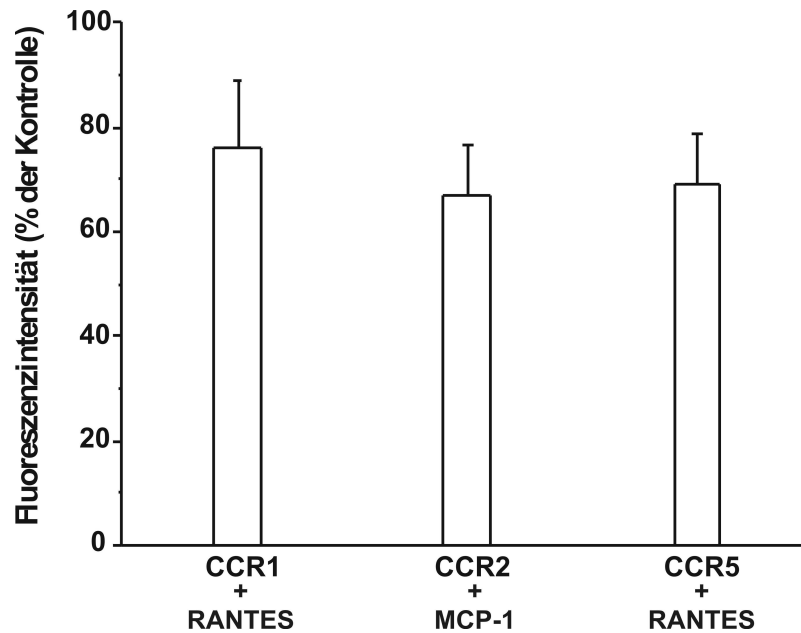


Abbildung 8: Einfluß von CC-Chemokinen auf die Oberflächenexpression ihrer Rezeptoren auf LAD-2-Zellen

LAD-2-Zellen wurden mit 100 nM RANTES, 100 nM MCP-1 oder in Puffer allein für 10 min bei 37°C behandelt und anschließend bei 4°C für 1 h mit Antikörpern gegen CCR1, CCR2 und CCR5 sowie einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps (IgG_{2b}) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde nach Detektion mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-Antikörper im Durchflußzytometer als mediane Fluoreszenzintensität aufgenommen. Die durch die Isotypkontrolle hervorgerufene unspezifische Immunfluoreszenz wurde abgezogen und die spezifische Immunfluoreszenz nach Chemokinbehandlung als prozentualer Anteil der spezifischen Immunfluoreszenz un behandelter Kontrollzellen berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Resultate dieser Experimente sind in Abbildung 8 gezeigt. Durch Vorbehandlung der LAD-2-Zellen mit dem Liganden RANTES verminderte sich die spezifische Fluoreszenzintensität des CCR1 auf $75,8 \pm 13,0$ % und die des CCR5 auf $69,3 \pm 9,5$ % der Kontrolle. Ebenso wie die Expression des CCR1 und CCR5 durch Vorbehandlung mit RANTES abnahm, verringerte sich auch die spezifische Fluoreszenzintensität des CCR2 in MCP-1-vorbehandelten Zellen auf $67,2 \pm 9,7$ %.

Wie sich in weiteren Experimenten herausstellte, ließ sich die der CCR5 auch durch höhere Konzentrationen an RANTES (300 nM) nicht weiter als bis auf 62,0 % herabregulieren (nicht gezeigt, 2 Experimente). Ähnliches zeigte auch der CXCR2 auf LAD-2-Zellen, weshalb dieses Phänomen an andere Stelle genauer untersucht wurde (siehe Abschnitt 3.2.6).

Die Internalisierung der Rezeptoren CCR1, -2 und -5 gab allerdings noch keinen Aufschluß darüber, ob auch die intrazelluläre Weiterleitung von Signalen durch diese Rezeptoren funktionierte. Ein für Chemokinrezeptoren typisches intrazelluläres Signal ist der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, was einerseits auf dem Öffnen Ca^{2+} -spezifischer Kanäle

in der Zellmembran, andererseits auf der Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Depot des Endoplasmatischen Retikulums beruht. Um nun weitergehende Informationen über die Funktionalität der Rezeptoren sowie die Wirkung von RANTES und MCP-1 auf LAD-2-Zellen zu erhalten, sollte daher in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob die Chemokine die Fähigkeit besitzen, einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu bewirken.

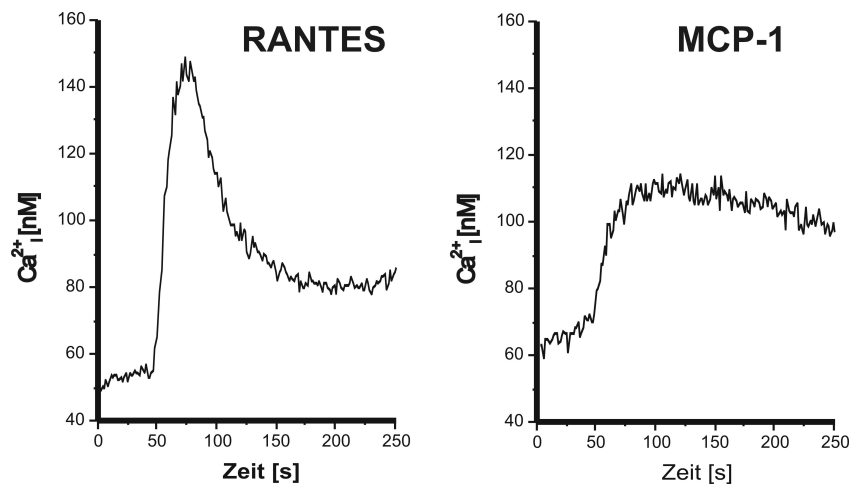


Abbildung 9: Induktion eines intrazellulären Ca^{2+} -Signals in LAD-2-Zellen nach Stimulation mit RANTES und MCP-1

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca^{2+}_i) mit FURA-2-beladener LAD-2-Zellen wurde in einem Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 250 s gemessen. Nach 50 s wurden die Zellen durch Zugabe von 100 nM RANTES und 100 nM MCP-1 stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Wie Abbildung 9 zeigt, waren sowohl 100 nM RANTES als auch 100 nM MCP-1 in der Lage, einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in LAD-2-Zellen zu induzieren. Vor dem Hintergrund, daß MCP-1 monospezifisch nur den CCR2 binden kann, zeigt die Reaktion der Zellen eindeutig die Funktionalität dieses Rezeptors an. Hingegen läßt der RANTES-induzierte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nur den Schluß zu, daß mindestens einer der Rezeptoren für dieses Chemokin (CCR1 oder CCR5) funktionsfähig ist, da dieses Chemokin polyspezifisch über die Bindung an beide Rezeptoren Signalweiterleitung induzieren kann.

3.2.4.2 Expression von CXC-Chemokinrezeptoren auf Hautmastzellen und LAD-2-Zellen

Nachdem ich mir einen Überblick über die Expression der prominentesten CC-Chemokinrezeptoren gemacht hatte, dehnte ich diese Untersuchungen auf die Rezeptoren der CXC-Chemokine aus. Im Fokus lagen dabei die Rezeptoren für inflammatorische Chemokine, CXCR1, CXCR2 und CXCR3. Zusätzlich untersuchte ich noch die Expression des CXCR4, dem Rezeptor des nicht-inflammatorischen Chemokins SDF-1 α , der wie einleitend beschrieben, während der Differenzierung der Mastzellen eine bedeutende Rolle zu spielen scheint. Zur Untersuchung der Expression dieser Rezeptoren wurden Hautmastzellen und LAD-2-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CXCR1, CXCR2, CXCR3 und CXCR4 oder mit irrelevanten Antikörpern des gleichen Isotyps inkubiert und nach anschließender Markierung mit einem DTAF-gekoppelten, sekundären Antiserum im Durchflußzytometer auf ihre Fluoreszenz hin untersucht.

Wie der linken Spalte in Abbildung 10 zu entnehmen ist, war die mittlere Fluoreszenzintensität von Hautmastzellen nach Inkubation mit α -CXCR1 (MFI: 15 ± 6) praktisch auf dem Niveau von Zellen, die mit der Isotypkontrolle (13 ± 4) behandelt worden waren. Demgegenüber stieg die Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit α -CXCR2 (43 ± 21), α -CXCR3 (48 ± 8) und α -CXCR4 (81 ± 18) deutlich an. Aus diesem Ergebnis wurde klar, daß Hautmastzellen die Rezeptoren CXCR2, CXCR3 und CXCR4 exprimieren, während der CXCR1 nicht detektiert werden konnte.

Wie der rechten Spalte in Abbildung 10 entnommen werden kann, blieb die Immunfluoreszenz von LAD-2-Zellen nach Inkubation mit einem α -CXCR1-Antikörper ($9,6 \pm 2,8$) im Vergleich zu derjenigen nach Inkubation mit der Isotypkontrolle ($9,2 \pm 2,4$) nahezu unverändert. Hingegen hatte die Inkubation mit α -CXCR2 ($97,2 \pm 58,6$), α -CXCR3 ($21,4 \pm 7,5$) und α -CXCR4 ($215 \pm 47,4$) eine deutliche Erhöhung der Immunfluoreszenz zur Folge. Durch die damit nachgewiesene Expression der Rezeptoren CXCR2, CXCR3 und CXCR4 und die Abwesenheit des CXCR1 wurde klar, daß LAD-2-Zellen ein zu Hautmastzellen weitgehend identisches Expressionsmuster von CXC-Chemokinrezeptoren aufweisen.

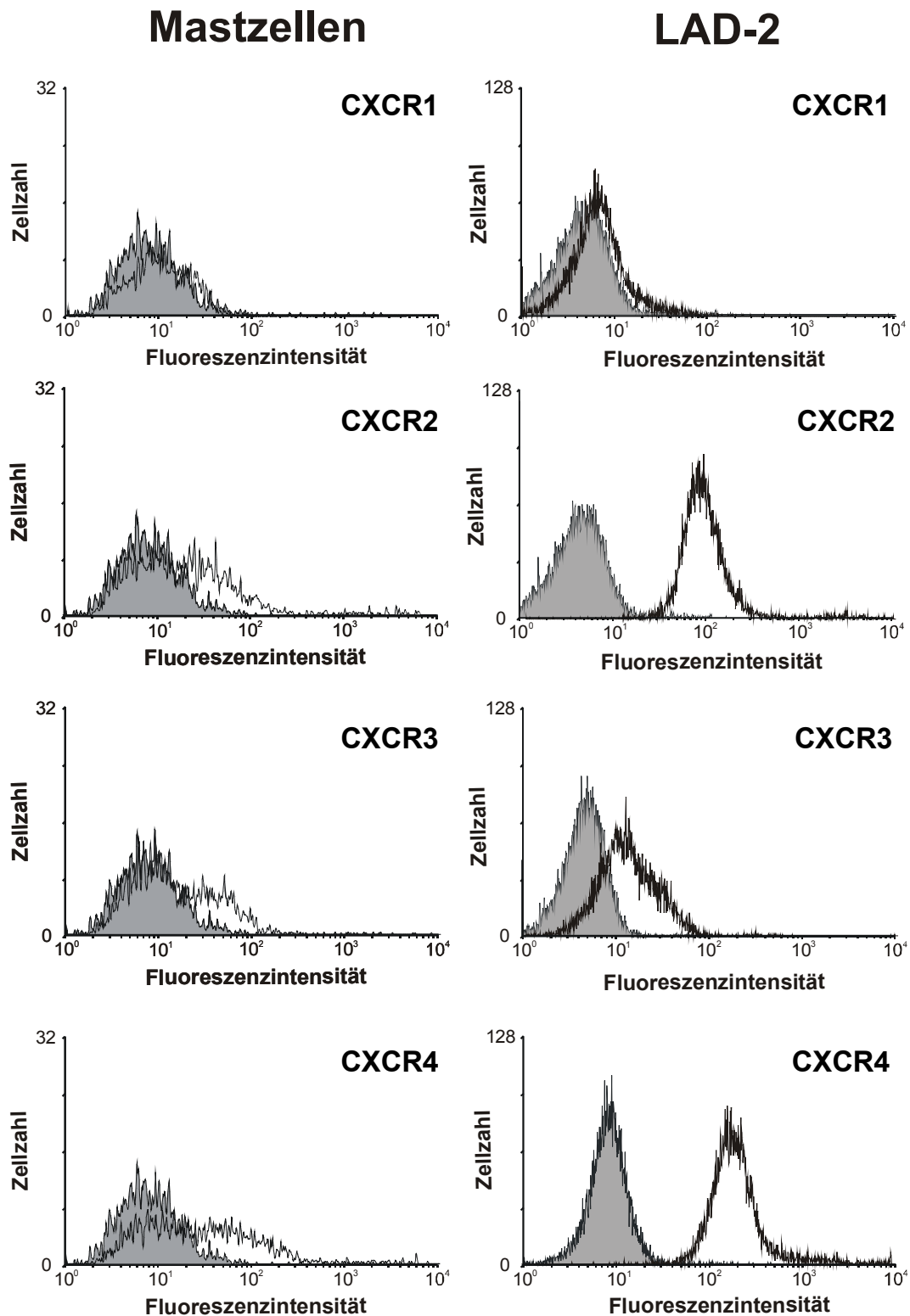


Abbildung 10 : Expression von CXC-Chemokinrezeptoren auf Hautmastzellen und LAD-2-Zellen

Hautmastzellen und LAD-2-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CXCR1, CXCR2, CXCR3 und CXCR4 (transparent) oder mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps (grau) für 1 h auf Eis inkubiert. Der Nachweis der zellgebundenen Antikörper erfolgte im Durchflußzytometer nach Inkubation mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-IgG-Sekundärantikörper. Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität wieder. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von drei Experimenten.

Zunächst sollte wie zuvor bei den Rezeptoren der CC-Chemokine auch hier die Eigenschaft der Rezeptoren zur Internalisierung nach Ligandenbindung untersucht werden, um erste Anhaltspunkte über die Funktionalität der Rezeptoren zu erhalten. Für diese Untersuchungen diente IL-8 als Ligand für CXCR2, I-TAC als Ligand für CXCR3 und SDF-1 α als Ligand des CXCR4. Da keine Expression des CXCR1 auf den LAD-2-Zellen gefunden wurde, verzichtete ich auf weitere Versuche zur Untersuchung dieses Rezeptors.

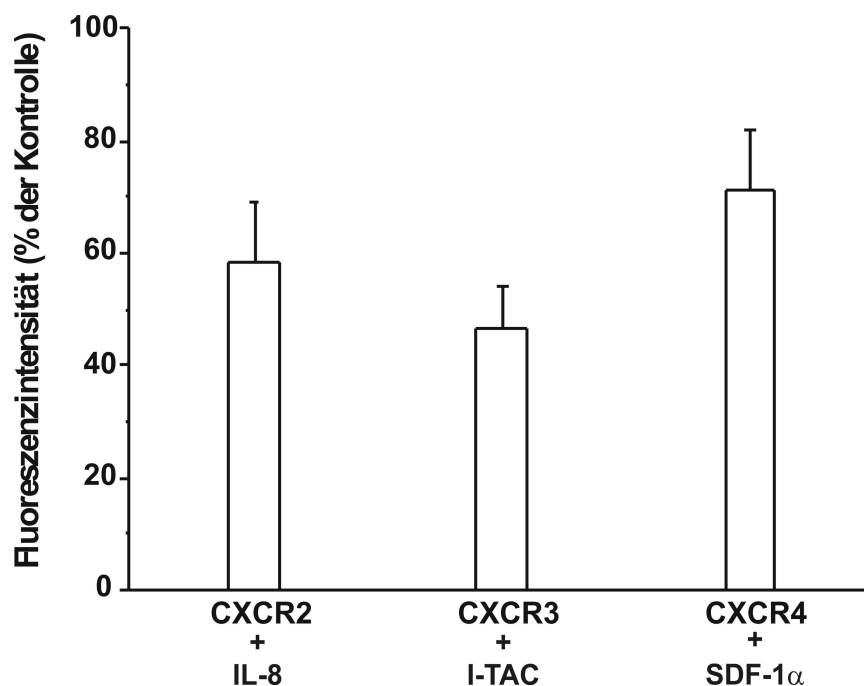


Abbildung 11 : Einfluß von CXC-Chemokinen auf die Oberflächenexpression ihrer Rezeptoren auf LAD-2-Zellen

LAD-2-Zellen wurden mit 100 nM IL-8, 100 nM I-TAC, 100 nM SDF-1 α oder in Puffer allein für 10 min bei 37°C behandelt und anschließend bei 4°C für 1 h mit Antikörpern gegen CXCR1, CXCR2 und CXCR4 sowie einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps (IgG_{2b} für CXCR2, IgG₁ für CXCR3 und CXCR4) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde nach Detektion mit DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-Antikörper im Durchflußzytometer als mediane Fluoreszenzintensität aufgenommen. Die durch die Isotypkontrolle hervorgerufene unspezifische Immunfluoreszenz wurde abgezogen und die spezifische Immunfluoreszenz nach Chemokinbehandlung als prozentualer Anteil der spezifischen Immunfluoreszenz unbehandelter Kontrollzellen berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Abweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 11 gezeigt, konnte die Expression aller untersuchten Rezeptoren durch Vorbehandlung mit ihrem jeweiligen Ligand vermindert werden. So führte die Vorbehandlung mit IL-8 zur Reduktion der CXCR2-Expression auf $58,4 \pm 10,5$ % verglichen mit der Expression unbehandelter Zellen. In ähnlicher Weise reduzierte sich die Expression

des CXCR3 auf $46,6 \pm 7,1$ % nach I-TAC-Behandlung sowie diejenige des CXCR4 auf $71,3 \pm 11,0$ % nach Behandlung mit SDF-1 α .

Ebenso wie zuvor für den CCR5 nur eine partielle Herabregulation durch RANTES beobachtet werden konnte, waren auch hier höhere Dosen von bis zu 300 nM IL-8 nicht in der Lage, den CXCR2 weiter als bis auf 55 % herabregulieren (2 Experimente, nicht gezeigt). Dieses Phänomen der partiellen Herabregulation wird später in Abschnitt 3.2.6 genauer untersucht.

Aus diesem Versuch ging hervor, daß alle untersuchten Rezeptoren reguliert werden konnten, was auf ihre Funktionalität hindeutete. Eine zusätzliche Evidenz für die Funktionalität der Rezeptoren sollte die nun folgenden Untersuchungen zur Induktion eines intrazellulären Kalziumsignals durch ihre Liganden liefern.

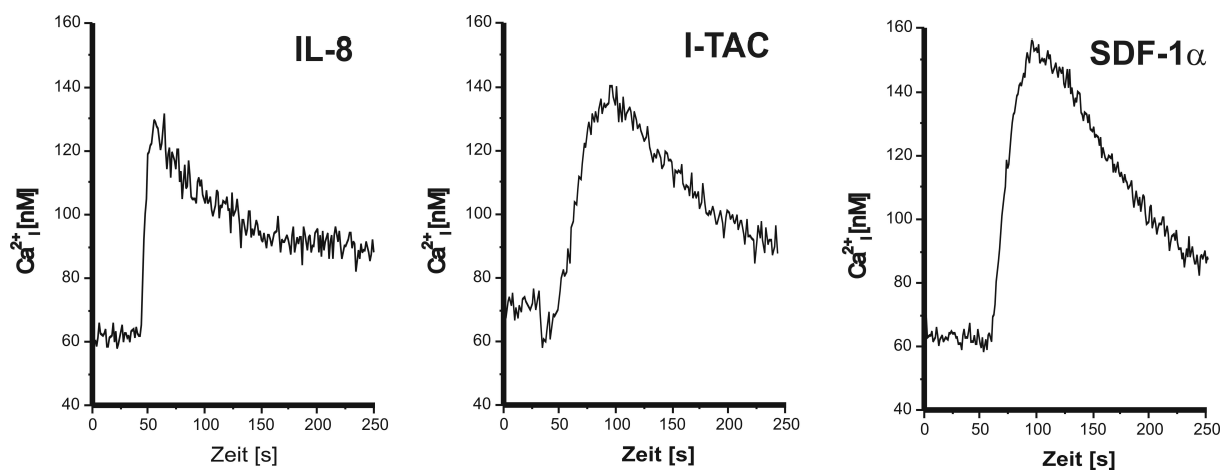


Abbildung 12 : Induktion eines intrazellulären Ca^{2+} -Signals in LAD-2-Zellen nach Stimulation mit IL-8, I-TAC und SDF-1 α

Die zytosolische Kalziumkonzentration (Ca^{2+}_i) mit FURA-2-beladener LAD-2-Zellen wurde in einem Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 250 s gemessen. Nach 50 s wurden die Zellen durch Zugabe von 100 nM IL-8, 100 nM I-TAC und 100 nM SDF-1 α stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnten alle drei untersuchten Chemokine einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration induzieren. So lag die zytosolische Kalziumkonzentration bei ruhenden LAD-2-Zellen zwischen 60 und 80 nM, während sie nach Stimulation mit IL-8 auf ca. 130 nM, mit I-TAC auf etwa 140 nM und mit SDF-1 α auf ca. 160 nM anstieg. Die Interpretation dieser Befunde gestaltete sich einfacher als zuvor in den

entsprechenden Versuchen mit CC-Chemokinen, da sowohl I-TAC als auch SDF-1 α monospezifisch jeweils CXCR3 bzw. CXCR4 binden und nur einer der beiden IL-8-Rezeptoren, der CXCR2, auf LAD-2-Zellen exprimiert war. Daher erhärteten diese Daten den bereits aus den Ergebnissen der Rezeptorregulation abgeleiteten Befund, daß alle drei auf LAD-2-Zellen nachgewiesenen CXC-Chemokinrezeptoren funktioniell aktiv sind.

Zusammenfassend zeigten die erhaltenen Befunde, daß Hautmastzellen und LAD-2-Zellen hinsichtlich ihres Expressionsprofils an Chemokinrezeptoren für inflammatorische Chemokine sehr gut übereinstimmen, wodurch die Zelllinie offensichtlich als brauchbares Modell zur Untersuchung der Wirkung von Chemokinen auf Mastzellen dient.

Beide Zelltypen exprimieren den CCR1, -2 und -5 sowie den CXCR2, -3 und -4. Zudem erwiesen sich auf LAD-2-Zellen alle nachgewiesenen Rezeptoren in den Studien zur Rezeptorregulation nach Ligandenzugabe als funktionell aktiv. Dadurch daß auch die inflammatorischen Chemokine in der Lage waren, ein intrazelluläres Signal auszulösen, ist zu vermuten, daß auch Mastzellen in inflammatorischen Prozessen durch Chemokine beeinflusst werden.

3.2.5 Weder NAP-2 noch dessen Vorläufer induzieren Degranulation in Mastzellen und LAD-2-Zellen

Wie bereits eingangs erwähnt, werden während einer allergischen Reaktion neben Mastzellen gleichzeitig auch Thrombozyten aktiviert, wodurch die Blutkonzentrationen thrombozytärer Chemokine wie z.B. des β -TG Ag drastisch ansteigen. Da in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, daß LAD-2-Zellen ebenso wie aus Gewebe isolierte Mastzellen mit dem CXCR2 einen der beiden Rezeptor für die aktive Form des β -TG Ag, das NAP-2, exprimieren, drängte sich die Frage auf, ob auch dieses inflammatorische Chemokin auf Mastzellen wirken kann. Zunächst sollte untersucht werden, ob NAP-2 und dessen Vorläufer CTAP-III und PBP eine der prominentesten Funktionen von Mastzellen, die Freisetzung von Granulainhalten, induzieren. Um dieses zu überprüfen, wurden die Zellen für 30 min mit PBP, CTAP-III oder NAP-2 inkubiert und anschließend die freigesetzte Aktivität von Hexosaminidase im Überstand gemessen.

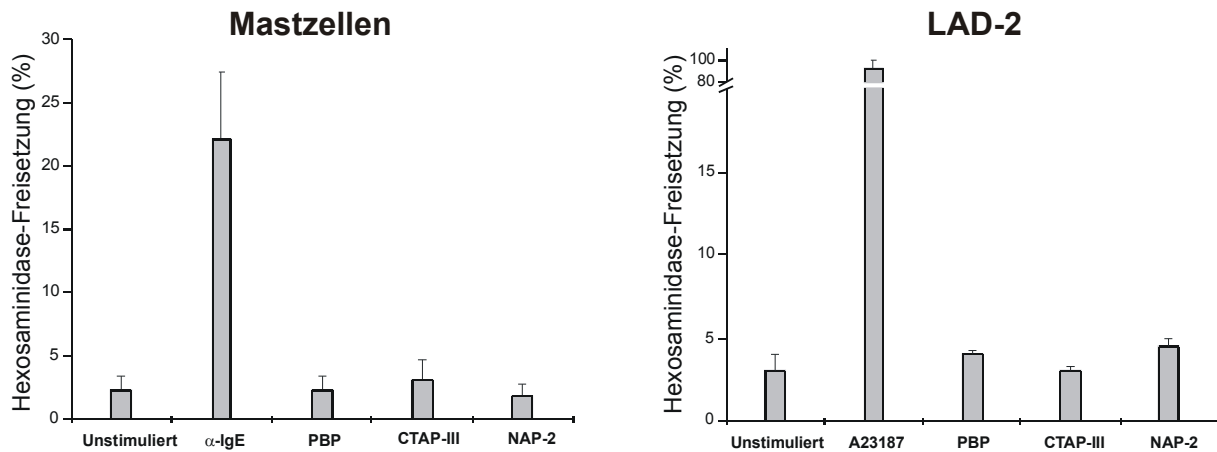


Abbildung 13: Freisetzung von Hexosaminidase durch stimulierte Hautmastzellen

Hautmastzellen oder LAD-2-Zellen (2×10^5 Zellen /ml) wurden für 30 min mit $1 \mu\text{M}$ PBP, CTAP-III und NAP-2 inkubiert. Zur Kontrolle wurden Zellen parallel entweder mit $3 \mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-IgE}$ (Hautmastzellen) oder 100 ng/ml A23187 (LAD-2-Zellen) und Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf freigesetzte Hexosaminidase hin untersucht, indem die Zellen durch Abzentrifugieren entfernt und die zellfreien Überstände für 3 Stunden (Hautmastzellen) oder 4 Stunden (LAD-2-Zellen) mit dem Hexosaminidase-Substrat 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta\text{-D}$ -glucopyranosid inkubiert wurden. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Glyzinpuffer wurde die Extinktion bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gemessen. Der Anteil der freigesetzten Hexosaminidase ist als Prozentsatz der durch Triton-Lyse aus Vergleichszellen freigesetzten Menge (= 100 %) angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Wie in der linken Graphik in Abbildung 13 zu sehen, induzierten in Hautmastzellen PBP ($2,3 \pm 1,2 \%$), CTAP-III ($3,2 \pm 1,5 \%$) und NAP-2 ($1,9 \pm 0,9 \%$) im Gegensatz zu $\alpha\text{-IgE}$ ($22,1 \pm 5,3 \%$) keine Freisetzung von Hexosaminidase, die deutlich über diejenige unstimulierter Zellen ($2,3 \pm 1,2 \%$) hinausging. Wie in der rechten Graphik in Abbildung 13 dargestellt, verursachte auch in LAD-2-Zellen weder eines der beiden NAP-2-Vorläufermoleküle noch NAP-2 selbst Degranulation. So war die Freisetzung von Hexosaminidase nach Stimulation mit PBP ($4,1 \pm 0,2 \%$), CTAP-III ($3,2 \pm 0,3 \%$) und NAP-2 ($4,5 \pm 0,5 \%$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle ($3,0 \pm 1,1 \%$) nahezu unverändert, wohingegen das Kalziumionophor A23187 deutlich erhöhte Freisetzung ($92 \pm 6,3 \%$) induzierte.

Aus diesen Experimenten geht hervor, daß die verschiedenen Formen des $\beta\text{-TG}$ Ag keine Degranulation in Mastzellen und LAD-2-Zellen auslösen. Auch in niedrigeren Konzentrationen ($1 \text{ nM} - 3 \mu\text{M}$) induzierten die verschiedenen Formen des $\beta\text{-TG}$ Ag keine Degranulation in LAD-2-Zellen (3 Experimente, nicht gezeigt). Daher stellte sich die Frage, ob möglicherweise der CXCR2 auf LAD-2-Zellen gegenüber NAP-2 nicht responsiv sein könnte.

3.2.6 Der CXCR2 wird auf LAD-2-Zellen nur partiell durch NAP-2 herabreguliert

Wie sich bereits aus den vorangegangenen Experimenten in Abschnitt 3.2.4 ergeben hatte, exprimieren sowohl LAD-2-Zellen als auch primäre Mastzellen lediglich einen der beiden Rezeptoren für NAP-2, den CXCR2 (siehe Abbildung 10). Dieser Rezeptor wurde auf LAD-2-Zellen in Anwesenheit von IL-8 zumindest partiell herabreguliert (siehe Abbildung 11). Da IL-8 und NAP-2 jedoch unterschiedlich an den CXCR2 binden, stellte sich die Frage, ob der CXCR2 auf LAD-2-Zellen auch gegenüber NAP-2 responsiv ist. In einem ersten Schritt sollte nun untersucht werden, ob NAP-2 die Expression des CXCR2 reguliert. Hierzu bot es sich an, einen Vergleich zu der bereits eingehend von Ludwig *et al.* studierten CXCR2-Regulation bei Neutrophilen zu ziehen⁵¹, um Effekte auf den Rezeptor auf LAD-2-Zellen besser beurteilen zu können.

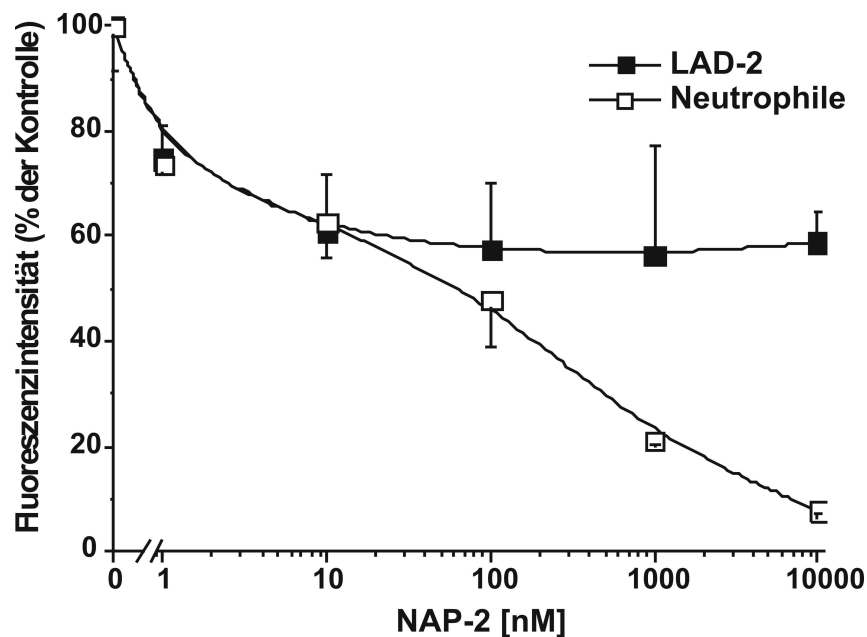


Abbildung 14: Effekt von NAP-2 auf die Oberflächenexpression des CXCR2 auf Neutrophilen und LAD-2

Neutrophile (□) und LAD-2-Zellen (■) wurden in An- und Abwesenheit ansteigender Konzentrationen von NAP-2 für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4°C für 1 h mit α -CXCR2 oder einem irrelevanten Antikörper des gleichen Isotyps (IgG_{2b}) inkubiert. Die mediane Fluoreszenzintensität wurde nach Färbung mit einem DTAF-konjugiertem Ziege α -Maus-Antikörper im Durchflußzytometer aufgenommen. Nach Subtraktion der durch die Isotypkontrolle hervorgerufene unspezifische Immunfluoreszenz wurde die spezifische Immunfluoreszenz nach Chemokinbehandlung als prozentualer Anteil der spezifischen Immunfluoreszenz unbehandelter Kontrollzellen berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, führte eine Vorbehandlung von Neutrophilen mit NAP-2 erwartungsgemäß, wie bereits bei Ludwig *et al.*⁵¹, zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Oberflächenexpression des CXCR2. So reduzierte bereits die Präsenz von 1 nM

NAP-2 die Oberflächenexpression auf $73,5 \pm 1,7$ %. Ungefähr 50 %ige Reduktion ($48,0 \pm 8,9$ %) trat nach Inkubation mit 100 nM NAP-2 ein, während 10 μ M des Chemokins den Rezeptor fast vollständig bis auf $7,8 \pm 0,8$ % Restexpression von der Oberfläche der Neutrophilen verdrängten. Ebenso wie bei Neutrophilen, reduzierte sich auch die CXCR2-Expression bei LAD-2-Zellen nach Vorinkubation mit 1 nM NAP-2 auf $74,6 \pm 6,2$ % und verminderte sich weiter durch Behandlung mit 10 nM NAP-2 auf $60,8 \pm 10,9$ %. Allerdings führte die Gegenwart höherer NAP-2-Konzentrationen nicht zu einer weiteren Abnahme der Expression. Diese blieb auf einer nahezu konstanten Höhe von ca. 60 % der Expression der Kontrollzellen. Zusammenfassend ging aus diesen Experimenten hervor, daß sich der CXCR2 auf LAD-2-Zellen gegenüber geringen Dosen NAP-2 ähnlich verhält, jedoch auf höhere Konzentrationen des Chemokins unterschiedlich reagiert wie der Rezeptor auf Neutrophilen. Dabei kann NAP-2 den CXCR2 auf Neutrophilen vollständig, auf LAD-2-Zellen nur partiell herabregulieren. Da dieses Phänomen der partiellen Internalisierung auch bei der Herabregulation des CCR5 durch RANTES sowie bei der Herabregulation des CXCR2 durch IL-8 beobachtet wurde (Abschnitte 3.2.4.1 und 3.2.4.2), scheint es sich hier nicht um eine Besonderheit des NAP-2 zu handeln. Vielmehr läßt diese abweichende Internalisierungskinetik auf eine unterschiedliche Regulation und einen unterschiedlichen Mechanismus der Internalisierung bei Neutrophilen und Mastzellen schließen.

3.2.7 NAP-2 induziert keine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in LAD-2-Zellen

Angesichts dieser überraschenden Unterschiede zwischen beiden Zelltypen hinsichtlich der Rezeptorregulation drängte sich die Frage auf, ob und inwieweit sich auch die NAP-2-induzierte Signalweiterleitung in beiden Zellen unterscheidet. Dazu untersuchte ich die Fähigkeit von NAP-2, ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal in Neutrophilen bzw. LAD-2-Zellen auszulösen. Um in diesen Versuchen Effekte auszuschließen, die nicht über den CXCR2 vermittelt werden, untersuchte ich auch die Wirkung von CTAP-III, des gegenüber Neutrophilen inaktiven Vorläufermoleküls von NAP-2, daß nicht an den CXCR2 binden kann⁶⁹.

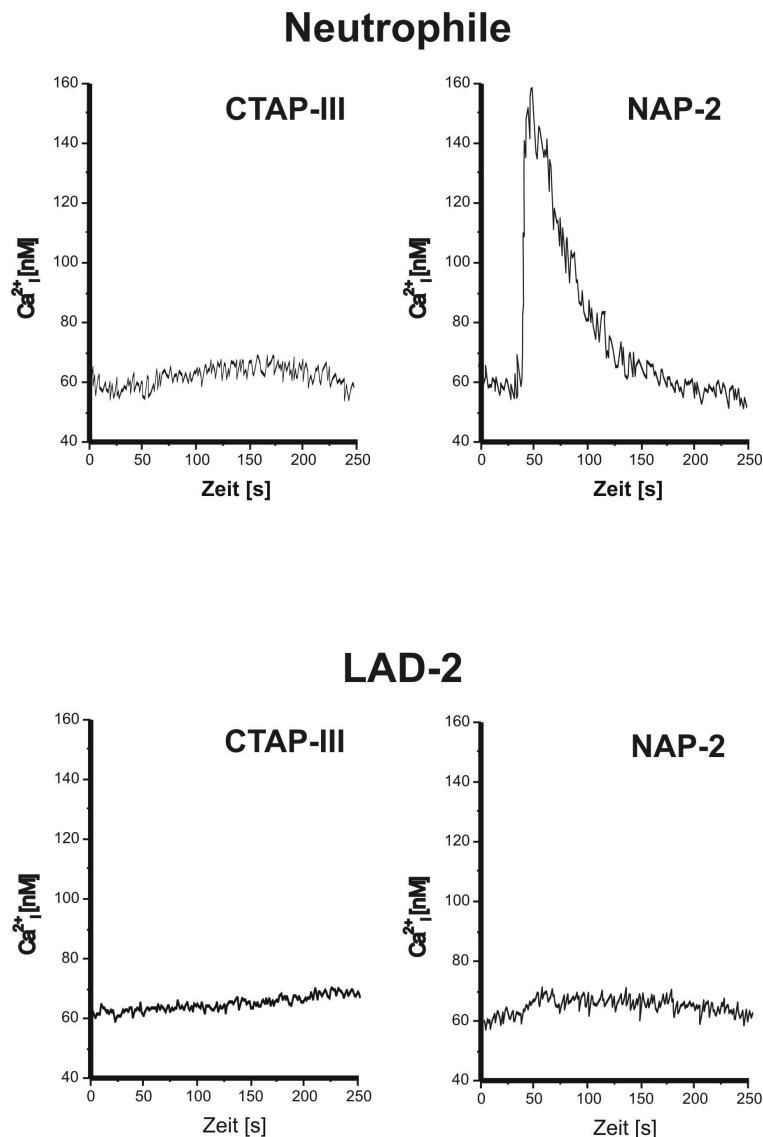


Abbildung 15: Induktion eines intrazellulären Ca^{2+} -Signals in Neutrophilen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit NAP-2 und CTAP-III

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca^{2+}_i) mit FURA-2-beladener Neutrophiler und LAD-2-Zellen wurde in einem Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 250 s gemessen. Nach 50 s wurden den Zellen 100 nM CTAP-III oder 100 nM NAP-2 hinzugefügt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei (Neutrophile) oder von neun (LAD-2) Ergebnissen.

Aus Abbildung 15 ist zu ersehen, daß 100 nM CTAP-III weder in Neutrophilen noch in LAD-2-Zellen einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration induzieren. Auch höhere Konzentrationen an CTAP-III bis zu 3 μM riefen kein Signal in den Zellen hervor (nicht gezeigt). Deutlich unterschiedlicher waren die Reaktionen auf Stimulation mit NAP-2. So induzierten 100 nM NAP-2 in Neutrophilen einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auf ca. 160 nM. Hingegen wurde in LAD-2-Zellen weder durch 100 nM CTAP-III noch durch 100 nM NAP-2 ein intrazelluläres Kalziumsignal induziert. Auch

Versuche mit höheren Konzentrationen bis zu 10 μ M NAP-2 riefen kein stärkeres Signal hervor (4 Versuche, nicht gezeigt).

Aus diesen Versuchen ging hervor, daß NAP-2 trotz seiner Fähigkeit den CXCR2 zu regulieren, keinen für Chemokine typischen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in LAD-2-Zellen induzierte. Dieses war insofern verwunderlich, als daß der andere untersuchte Ligand des Rezeptors IL-8 durchaus in der Lage war, ein Signal in LAD-2-Zellen zu induzieren (siehe Abbildung 12), wodurch die prinzipielle Funktionalität des Rezeptors klar geworden war. Inwieweit diese Beobachtung durch die unterschiedliche Bindung von IL-8 und NAP-2 zurückzuführen sein könnte, wird in der Diskussion ausgiebig erörtert.

3.2.8 NAP-2 desensitiviert den IL-8-induzierten Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in LAD-2-Zellen

Wie die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente zeigten, konnte NAP-2 zwar zumindest partiell den CXCR2 auf LAD-2-Zellen herabregulieren, induzierte jedoch kein deutliches Kalziumsignal in den Zellen. Ein solches Phänomen fand ich schon in meinen vorherigen Untersuchungen zur Prozessierung des Chemokins I-TAC durch das auf T-Zellen exprimierte Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)¹⁰⁷. In diesen Untersuchungen hatte sich herausgestellt, daß die nach Proteolyse am N-Terminus um zwei Aminosäuren verkürzte Form des I-TAC, das I-TACdesFP, zwar abgeschwächt noch seinen Rezeptor, den CXCR3 auf T-Zellen binden und internalisieren konnte, jedoch nicht mehr in der Lage war, ein Kalziumsignal in diesen Zellen zu induzieren. Interessanterweise beobachtete ich darüberhinaus, daß Vorinkubation mit I-TACdesFP diese Zellen gegenüber I-TAC-induzierten Funktionen wie z.B. Chemotaxis desensitiviert. Diese Beobachtungen gaben Anlaß zur Vermutung, daß T-Zellen durch Proteolyse ein Molekül generieren, das auf die Zellen selbst in einer negativen Rückkopplungsschleife zurückwirkt.

Wäre ein ähnlicher Mechanismus auch bei Mastzellen und NAP-2 vorhanden, würde NAP-2 ohne selbst ein Signal auszulösen die durch andere CXCR2-Liganden induzierten Signale desensitivieren. Um diese Annahme zu überprüfen, untersuchte ich, ob und inwieweit Vorinkubation mit ansteigenden Konzentrationen NAP-2 das durch IL-8 induzierte intrazelluläre Kalziumsignal desensitiviert.

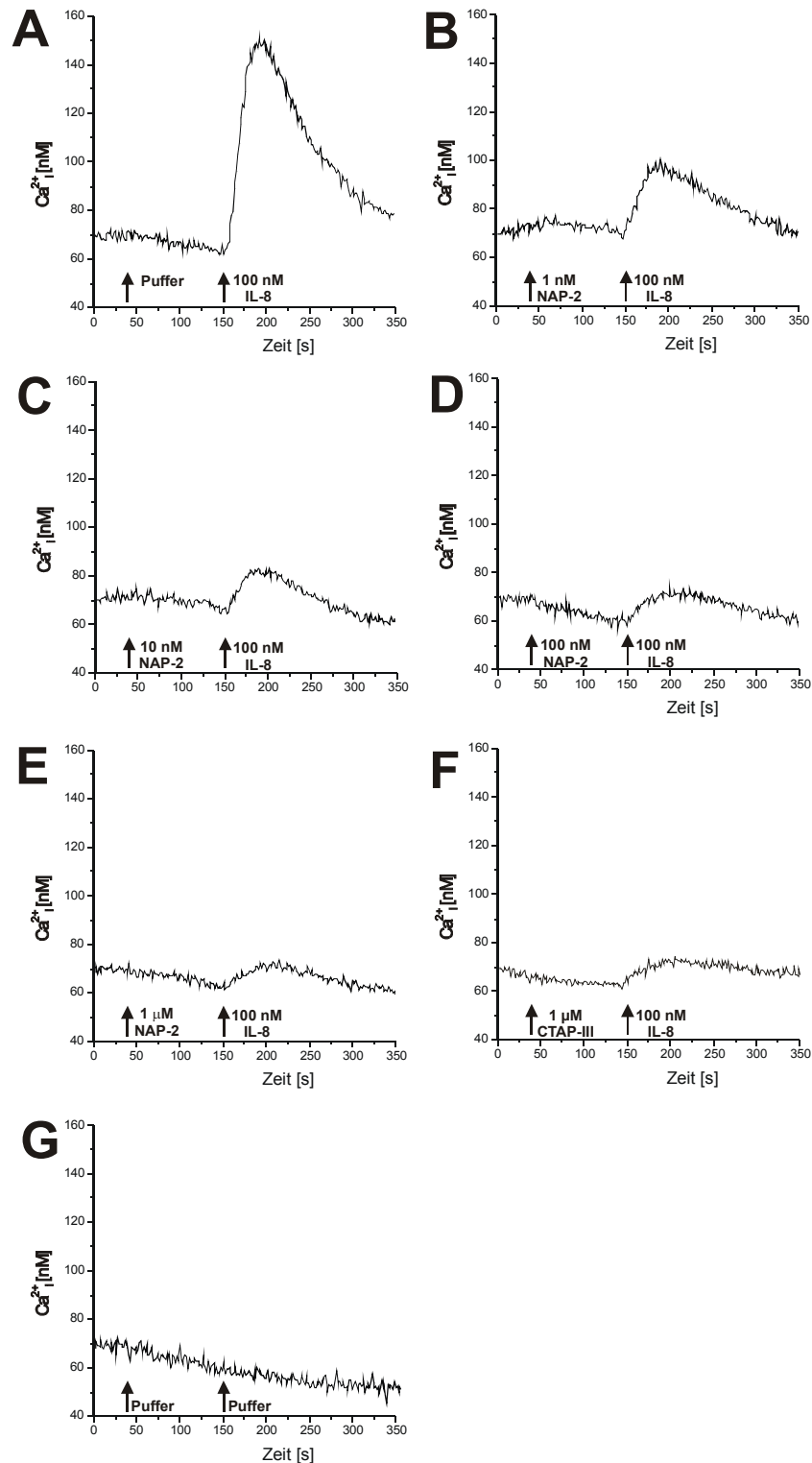


Abbildung 16: Wirkung einer Vorbehandlung von NAP-2 und CTAP-III auf das durch IL-8 induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signals in LAD-2-Zellen

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca^{2+}_i) mit FURA-2-beladener LAD-2-Zellen wurde in einem Fluoreszenzspektrometer über einen Zeitraum von 350 s gemessen. Nach 50 s wurde den Zellen Puffer (A und G), NAP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen (B bis E) oder CTAP-III (F) zugesetzt und nach 150 s auf ihre Responsivität gegenüber Stimulation mit 100 nM IL-8 untersucht (Die jeweiligen Zeitpunkte der Chemokinzugabe sind durch Pfeile gekennzeichnet). Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, induzierte IL-8 in Zellen, die nur mit Puffer vorbehandelt worden waren, einen deutlichen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration von ca. 70 nM auf maximal 150 nM (A). Eine 100 s lange Vorinkubation mit nur 1 nM NAP-2 senkte die Zellantwort auf Stimulation mit IL-8 beträchtlich auf ca. 100 nM ab (B). Die Antwort gegenüber IL-8 schwächte sich nach Vorbehandlung mit 10 nM NAP-2 auf unter 90 nM intrazelluläres Kalzium weiter ab (C) und fiel unter 80 nM nach Vorbehandlung mit 100 nM NAP-2 (D). Eine weitere Erhöhung der NAP-2-Konzentration auf 1 μ M hatte keine weitere Abschwächung der IL-8-induzierten Antwort zur Folge (E). Besonders überraschend war, daß auch die Vorinkubation mit CTAP-III eine drastische Desensitivierung des IL-8-induzierten Signals auf unter 80 nM intrazelluläres Kalzium zur Folge hatte und somit sogar eine stärkere desensitivierende Wirkung hatte als 10 nM NAP-2, obwohl CTAP-III selbst nicht an den CXCR2 bindet⁶⁹.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß sich NAP-2 desensitivierend auf die IL-8-induzierte Zellantwort auswirkt, ohne selbst ein Signal zu induzieren. Interessant war, daß ebenso wie zuvor in den Untersuchungen zur Rezeptorregulation bereits geringe Dosen von NAP-2 die Effekte hervorriefen. So wurden die deutlichsten Effekte sowohl die bei der Reduktion der CXCR2-Expression als auch bei der Desensitivierung des IL-8-induzierten Kalziumsignals bereits durch 1 nM NAP-2 ausgelöst, während die Effekte zwischen 10 und 100 nM NAP-2 maximal waren und oberhalb von 100 nM NAP-2 nicht weiter verstärkt wurden (vergleiche dazu Abbildung 14 und Abbildung 16).

Daß NAP-2 nicht nur stimulatorische sondern unter bestimmten Voraussetzungen auch desensitivierende Wirkung haben kann, wurde zuvor schon von Härter und Kollegen berichtet⁶⁹. Die Autoren zeigten, daß während der Prozessierung von CTAP-III zu NAP-2 durch Neutrophile diese Zellen selbst durch das langsame Ansteigen von NAP-2-Konzentrationen in ihrer Umgebung gegenüber nachfolgender Stimulation mit NAP-2 desensitiviert werden. Allerdings ist das Phänomen der Desensitivierung bei Neutrophilen nur bei prozessierenden Zellen beobachtet worden. Um mehr Anhaltspunkte dafür zu finden, ob es eine physiologische Bedeutung für diese Desensitivierung durch NAP-2 auf prozessierende Zellen gibt, sollte im Folgenden geklärt werden, ob Mastzellen auch PBP und CTAP-III in NAP-2 umwandeln können.

3.3 Prozessierung von CTAP-III durch Mastzellen: Kinetik, Induzierbarkeit und beteiligte Proteasen

Thrombozyten sezernieren nach Aggregation erhebliche Mengen der zur Familie des β -TG Ag gehörenden inaktiven Chemokinvorläufers CTAP-III und PBP. Beide Vorläufermoleküle können durch proteolytische Verkürzung am N-Terminus in das Neutrophile aktivierende Chemokin NAP-2 umgewandelt werden. Dabei sind es unter allen Blutleukozyten die Neutrophilen selbst, die mittels ihres oberflächengebundenen Enzyms Kathepsin G diese Umwandlung katalysieren. Das entstandene NAP-2 wirkt zwar chemotaktisch auf Neutrophile, die nicht an der Prozessierung beteiligt sind, jedoch werden bei den CTAP-III-prozessierenden Neutrophilen selbst die NAP-2-Rezeptoren durch den Anstieg der lokalen NAP-2-Konzentration von der Oberfläche herabreguliert, wodurch die Responsivität der Zelle gegenüber CXCR2-Liganden verlorenght. Somit wirkt CTAP-III auf indirekte Weise desensitivierend auf Funktionen von Neutrophilen. Erstaunliche Parallelen zu diesen Verhältnissen bei Neutrophilen zeigte die im vorangegangenen Abschnitt für LAD-2-Zellen geschilderte Beobachtung, daß CTAP-III in gleicher Weise wie NAP-2 die Fähigkeit besitzt, das durch IL-8 induzierte Kalziumsignal zu desensitivieren. Somit warfen diese Ergebnisse die Frage auf, ob der Desensitivierung durch CTAP-III bei LAD-2-Zellen derselbe Mechanismus zugrunde liegt wie bei Neutrophilen und, ob Mastzellen selbst auch CTAP-III in NAP-2 umwandeln können. Da CTAP-III mit ca. 80 % des gesamten β -TG Ag die vorherrschende Form in Thrombozyten gegenüber lediglich 20 % PBP darstellt, untersuchte ich zuerst die Wirkung der Mastzellen auf CTAP-III.

Es wurden in einem ersten Experiment unstimulierte sowie mit dem Kalziumionophor A23187 stimulierte LAD-2-Zellen und Hautmastzellen mit einer physiologischen Konzentration von CTAP-III (3 μ M) für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Die so gewonnenen zellfreien Überstände wurden zusammen mit je einer Standardpräparation von NAP-2 und CTAP-III über SDS-PAGE getrennt, durch Western Blotting auf eine Membran transferiert und mit einem Kaninchenserum gegen humanes β -TG Ag (R α - β TG) detektiert.

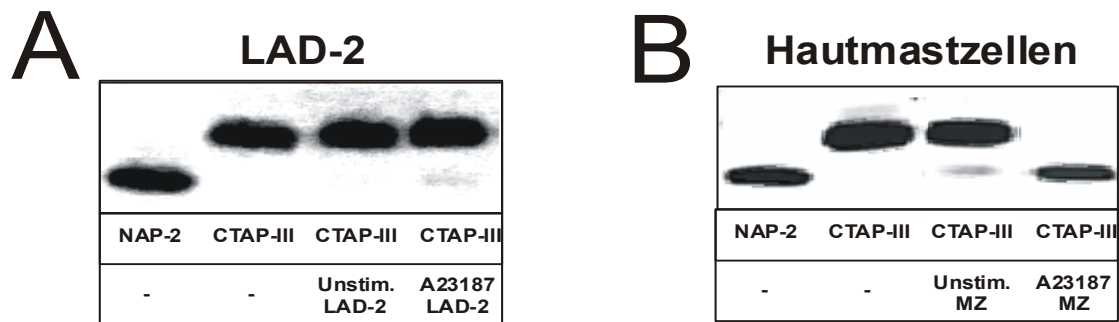


Abbildung 17: LAD-2-Zellen und Hautmastzellen prozessieren CTAP-III

LAD-2-Zellen (1×10^6 Zellen/ml) (A) und Hautmastzellen (1×10^5 Zellen/ml) (B) wurden mit $3 \mu\text{M}$ CTAP-III in $200 \mu\text{l}$ für 30 min bei 37°C inkubiert, nachdem sie zuvor für 30 min in Prozessierungspuffer allein oder in Anwesenheit von 100 ng/ml Kalziumionophor A23187 behandelt worden waren. Durch Zugabe von $2 \mu\text{l}$ 10 % TFA wurde die Reaktion in allen Ansätzen abgestoppt, die Zellen bei $300 \times g$ für 3 min sedimentiert und der zellfreie Überstand entnommen. Je 50 ng der Chemokine CTAP-III und NAP-2 sowie $2 \mu\text{l}$ des gewonnenen zellfreien Überstandes wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Western Blotting auf eine Membran transferiert und durch sequentielle Immundetektion mit einem Kaninchenantiserum gegen humanes $\beta\text{-TG}$ ($\alpha\text{-}\beta\text{TG}$) und IRDye-800-gekoppeltem Ziegerserum $\alpha\text{-Kaninchen-IgG}$ nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz wurde im 800 nm -Kanal eines Infrared imaging systems analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von Dreien.

Wie in Abbildung 17A zu sehen, trat nach Inkubation von CTAP-III mit unstimulierten LAD-2-Zellen keine erkennbare Änderung des Bandenmusters gegenüber der CTAP-III-Standardpräparation auf. Hingegen zeigten die Ansätze von CTAP-III mit aktivierten LAD-2-Zellen zusätzlich die schwache Bande eines Proteins, das mit NAP-2 comigrierte.

Wie in Abbildung 17B zu sehen, war der Einfluß von primären Hautmastzellen auf das CTAP-III deutlich stärker. Es zeigte sich, daß bereits unstimulierte Hautmastzellen nach Inkubation mit CTAP-III ein mit NAP-2 comigrierendes Protein generierten. In den Ansätzen mit stimulierten Hautmastzellen verstärkte sich die Bande auf Höhe von NAP-2 deutlich, während gleichzeitig die CTAP-III-Bande vollständig verschwand. Daß es sich bei dem durch CTAP-III-Prozessierung entstandenen Produkt tatsächlich um authentisches und biologisch aktives NAP-2 handelte, stellte sich in späteren Versuchen heraus (siehe Abschnitt 3.3.2).

Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, daß sowohl LAD-2-Zellen als auch Hautmastzellen die Fähigkeit besitzen, CTAP-III in NAP-2 umzuwandeln. Dadurch war es wahrscheinlich, daß die bei LAD-2-Zellen beobachtete Desensitivierung des IL-8-Signals durch CTAP-III tatsächlich auf durch Prozessierung gebildetes NAP-2 zurückzuführen ist. Allerdings war die Prozessierung durch primäre Hautmastzellen um ein Vielfaches stärker als durch LAD-2-Zellen. Dieser dramatische Unterschied machte jedoch deutlich, daß LAD-2-Zellen kein geeignetes Modell für weitere Untersuchungen dieses Aspektes darstellen, weshalb die folgenden Experimente mit primären Mastzellen durchgeführt wurden.

3.3.1 Haut- und Lungenmastzellen unterscheiden sich von Neutrophilen in der Effizienz, der Induzierbarkeit und der Freisetzbarkeit der CTAP-III-prozessierenden Aktivität

Der unerwartete Befund, daß Hautmastzellen CTAP-III in NAP-2 umwandeln können, warf die Frage auf, ob auch Mastzellen aus anderen Organen diese Fähigkeit besitzen. Daher verglich ich in den folgenden Experimenten Hautmastzellen mit aus Lunge isolierten Mastzellen und mit Neutrophilen, den hinsichtlich der CTAP-III-Prozessierung am besten untersuchten Zellen. Dabei galt es, in den folgenden Untersuchungen drei Fragen zu beantworten:

Zuerst sollte geklärt werden, wie hoch die Potenz zur Prozessierung von CTAP-III von Mastzellen im Vergleich zu Neutrophilen ist. Die zweite Frage war, welchen Einfluß die Aktivierung der Zellen auf die Prozessierung hat. Als letzte Frage ergab sich, ob die prozessierende Aktivität zellgebunden ist oder exozytiert wird.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden Haut- und Lungenmastzellen zunächst in aufsteigender Dichte vor der Inkubation mit CTAP-III entweder für 30 min mit 3 µg/ml α-IgE aktiviert oder mit Puffer versetzt. In gleicher Weise wurden verschiedene Konzentrationen neutrophiler Granulozyten in An- und Abwesenheit von 100 nM fMLP inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen Zellsuspensionen geteilt. In einer Hälfte der Ansätze wurden die Zellen sedimentiert und die zellfreien Überstände entnommen. Die so gewonnenen zellfreien Überstände wurden ebenso wie die verbliebenen ursprünglichen Zellsuspensionen mit 3 µM CTAP-III für 30 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion und Entfernen der Zellen wurden Aliquots der Ansätze über SDS-PAGE aufgetrennt und nach anschließendem Western Blotting mittels Immundetektion durch Rα-βTG auf Anwesenheit von NAP-2 hin untersucht.

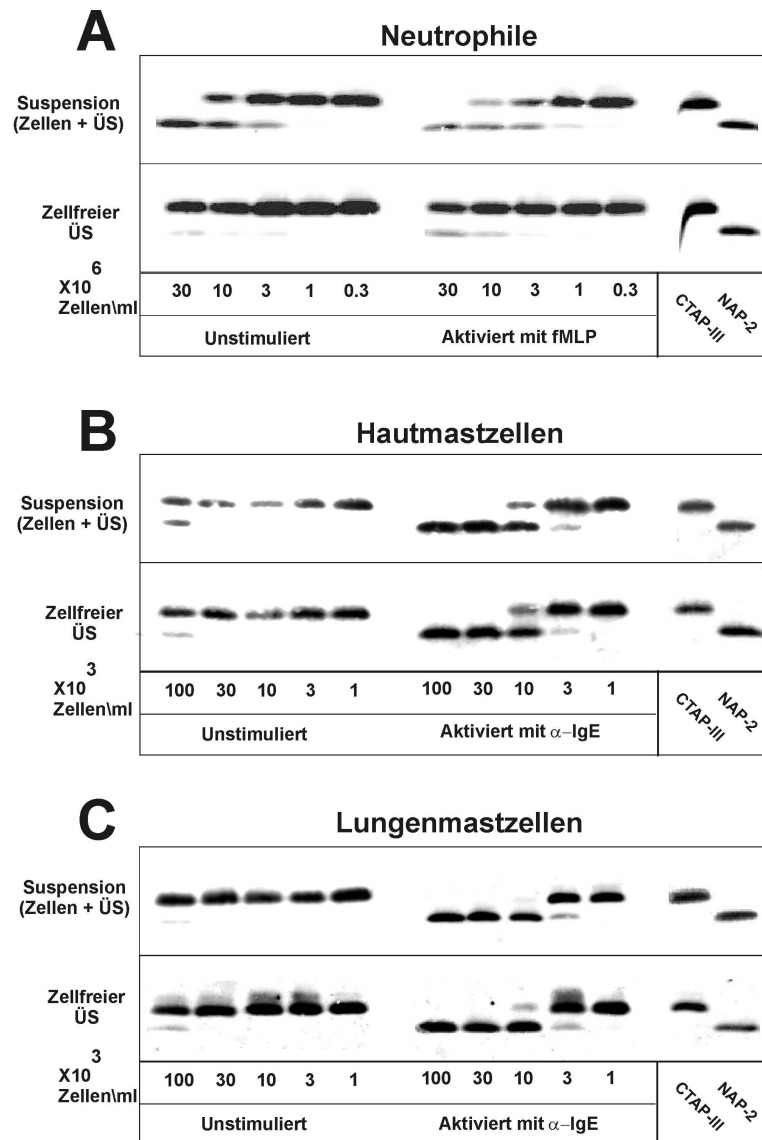


Abbildung 18: Prozessierung von CTAP-III durch Neutrophile, Hautmastzellen und Lungenmastzellen.

Neutrophile Granulozyten (A) sowie Hautmastzellen (B) und Lungenmastzellen (C) wurden in absteigender Zelldichte in An- und Abwesenheit von entweder 100 nM fMLP (Neutrophile) oder 3 μ g/ml Ziegen Serum α -humanes IgE (Mastzellen) für 30 min bei 37°C in Prozessierungspuffer inkubiert. Nach Entnahme von 100 μ l Zellsuspension (Suspension) wurde die restliche Zellsuspension bei 300 x g für 3 min sedimentiert und davon 100 μ l zellfreier Überstand (ÜS) entnommen. Sowohl die Suspension als auch der zellfreie Überstand wurden mit 100 μ l 6 μ M CTAP-III vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μ l 10 %iger TFA wurde die Reaktion in allen Ansätzen abgestoppt und die Zellen nach Zentrifugation entfernt. 2 μ l der Ansätze wurde zusammen mit je 50 ng der Chemokine CTAP-III und NAP-2 über SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Western Blotting auf eine Membran transferiert und durch sequentielle Immundetektion mit einem Kaninchenantiserum gegen humanes β -TG ($R\alpha$ - β TG) und IRDye-800-gekoppeltem Ziegen Serum α -Kaninchen-IgG nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz wurde im 800 nm-Kanal eines *Infrared Imaging Systems* analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment von jeweils Dreien.

Wie dem Western Blot links oben in Abbildung 18A zu entnehmen ist, waren unstimulierte Neutrophile ab einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml in der Lage, eine detektierbare Menge an NAP-2 durch Abbau des exogenen CTAP-III zu erzeugen. Des weiteren bauten

diese Zellen ab einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ ml die Hälfte und ab einer Konzentration von 3×10^7 Zellen/ ml das gesamte zugegebene CTAP-III ab. Wie in dem Western Blot rechts oben in Abbildung 18A dargestellt, zeigten mit fMLP aktivierte Neutrophile eine nahezu identische Prozessierungskinetik wie die unstimulierten Zellen. So entstanden nachweisbare Mengen NAP-2 ab 3×10^6 Zellen/ ml, halbmaximaler Umsatz des CTAP-III wurde bei 1×10^7 Zellen/ ml bzw. vollständiger Umsatz bei 3×10^7 Zellen/ ml erreicht. Somit zeigten die Ansätze mit unstimulierten und mit aktivierten Neutrophilen hinsichtlich der Prozessierung des CTAP-III nahezu identische Resultate, woraus ich schloß, daß Aktivierung durch fMLP keinen wesentlichen Einfluß auf die Kapazität neutrophiler Granulozyten zur Umwandlung von CTAP-III in NAP-2 hat.

Um zu überprüfen, ob das prozessierende Enzym von Neutrophilen in den Überstand abgegeben wird, verglich ich die prozessierende Aktivität der Zellsuspensionen mit derjenigen zellfreier Überstände. In diesem in Abbildung 18A (linker unterer Western Blot) gezeigten Experimenten stellte sich heraus, daß die zellfreien Überstände von 3×10^7 unstimulierten Neutrophilen/ml eine detektierbare Menge an NAP-2 bildeten. Bei den Überständen fMLP-stimulierter Neutrophiler (in Abbildung 18A rechter unterer Western Blot) wurden detektierbare Mengen NAP-2 bei einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml gefunden. Insgesamt konnte jedoch in keinem Überstand eine prozessierende Aktivität gefunden werden, die mindestens halbmaximalen Umsatz des zugegebenen CTAP-III hervorrief. Somit war die prozessierende Aktivität in den zellfreien Überständen im Vergleich zu derjenigen der ursprünglichen Zellsuspensionen deutlich niedriger. Diese Beobachtung ließ den Schluß zu, daß der überwiegende Teil der CTAP-III-prozessierenden Aktivität Neutrophiler nicht in den Überstand sezerniert wird, sondern zellassoziiert vorliegt.

Wie in dem linken oberen Western Blot in Abbildung 18B dargestellt, waren unstimulierte Hautmastzellen nur ab einer Konzentration von 10^5 Zellen /ml in der Lage, CTAP-III zu prozessieren. Im direkten Vergleich mit unstimulierten Neutrophilen (NAP-2-Bildung ab 3×10^6 Zellen/ ml, siehe links oben in Abbildung 18A) bedeutete dies, daß bereits unstimulierte Hautmastzellen eine 30-fach höhere prozessierende Aktivität zeigten.

Im Vergleich zu diesen unstimulierten Hautmastzellen trat NAP-2 in den Ansätzen mit α -IgE aktivierten Hautmastzellen (siehe Abbildung 18B, rechts oben) schon bei wesentlich niedrigeren Zellkonzentrationen auf. So waren bereits 3×10^3 aktivierte Hautmastzellen in der Lage, detektierbare Mengen an NAP-2 zu erzeugen. Der Umsatz des CTAP-III war mehr als halbmaximal bei 1×10^4 Zellen /ml und vollständig ab 3×10^4 Zellen /ml. Somit führte eine Aktivierung der Mastzellen zu einer 30-fachen Erhöhung der Umsatzrate gegenüber

unstimulierten Hautmastzellen. Da bei Neutrophilen der CTAP-III-Umsatz nicht durch Zellaktivierung beeinflusst wurde, waren aktivierte Hautmastzellen gegenüber Neutrophilen sogar 1000-fach effizienter.

In den Untersuchungen zur CTAP-III-Prozessierung durch zellfreie Überstände von Hautmastzellen traten detektierbare Mengen von NAP-2 erstmals in den Ansätzen mit 1×10^5 unstimulierten bzw. 3×10^3 stimulierten Hautmastzellen auf (siehe dazu Abbildung 18B, links bzw. rechts unten). Der Verlauf der Kinetiken war in Versuchen mit den zellfreien Überständen zu denjenigen mit den ursprünglichen Zellsuspensionen nahezu identisch. Daraus ergab sich der Schluß, daß der weit überwiegende Anteil der CTAP-III-prozessierenden Aktivität von Mastzellen sezerniert wird und somit, anders als bei Neutrophilen, nicht zellassoziiert vorliegt.

Für Lungenmastzellen ist beschrieben worden, daß sie sich gegenüber Hautmastzellen in ihrem Proteasegehalt und -repertoire unterscheiden. Daher untersuchte ich, inwieweit zwischen isolierten Mastzellen aus beiden Organen Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Prozessierung von CTAP-III existierten. Dazu wurden Versuche in gleicher Weise mit Lungenmastzellen wie zuvor mit Hautmastzellen durchgeführt. Aus den in Abbildung 18C dargestellten Ergebnissen ging hervor, daß auch bei Lungenmastzellen die prozessierende Aktivität stark von der α -IgE-Aktivierung abhängt und nahezu vollständig in den Überstand abgegeben wird. Zudem bildeten α -IgE-aktivierte Lungenmastzellen eine detektierbare Menge an NAP-2 bereits ab 3×10^3 Zellen/ml. Somit zeigten Lungenmastzellen eine ähnlich hohe Effizienz bei der Prozessierung von CTAP-III wie Hautmastzellen (vergleiche dazu die in Abbildung 18B und C dargestellten Bandenmuster).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß sowohl Lungen- als auch Hautmastzellen die Fähigkeit besitzen, CTAP-III in NAP-2 umzuwandeln. Dabei sind bereits 10^5 unstimulierte bzw. 3×10^3 aktivierte Mastzellen/ml in der Lage, detektierbare Mengen an NAP-2 zu generieren. Zudem zeigten diese Experimente, daß deutliche Unterschiede zwischen Mastzellen und Neutrophilen bestehen:

Unstimulierte Mastzellen weisen eine 30-fach, α -IgE-stimulierte Mastzellen sogar eine 1000-fach höhere Effizienz zur Spaltung von CTAP-III als Neutrophilen auf. Im Gegensatz zu Mastzellen hat Aktivierung bei Neutrophilen keinen wesentlichen Einfluß auf deren Kapazität zur Prozessierung von CTAP-III. Darüberhinaus unterschieden sich Neutrophile und Mastzellen darin, daß Mastzellen ihre prozessierende Aktivität fast vollständig in den Überstand abgeben, Neutrophile hingegen nur einen geringen Anteil.

3.3.2 Die Geschwindigkeit der CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen korreliert mit deren Degranulation

Thrombozytenaggregation und Mastzellaktivierung spielen vor allem in der initialen Phase eines inflammatorischen Prozesses eine große Rolle. Beobachtungen anderer Autoren zufolge, setzt bereits kurz nach Aktivierung von Thrombozyten und Mastzellen (innerhalb von ca. 2 h) die Akkumulation Neutrophiler in dem entzündeten Gewebe ein³². Sollte von Mastzellen durch Prozessierung gebildetes NAP-2 maßgeblich an dieser sehr schnell einsetzenden Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt sein, wäre insbesondere die Geschwindigkeit der Umsetzung von entscheidender Bedeutung.

Da sich in den vorangegangenen Experimenten gezeigt hatte, daß bei Mastzellen die Fähigkeit zur Prozessierung stark von der Aktivierung der Zellen abhängt, drängte sich die Frage auf, inwieweit die Geschwindigkeit der CTAP-III-Prozessierung mit der Degranulation korreliert. Um ferner zu überprüfen, ob es sich bei der Prozessierung um ein spezifisch durch Quervernetzung von FcεRI-assoziiertem IgE vermitteltes Phänomen handelt, wurden in den folgenden Versuchen Mastzellen außer mit α-IgE auch mit anderen Stimulatoren behandelt, die bekanntermaßen stark unterschiedliche Potenzen zur Freisetzung von Mastzellmediatoren zeigen.

Dazu wurden Hautmastzellen für 30 min entweder mit Puffer, mit α-IgE, mit dem Kalziumionophor A23187 oder mit dem Detergenz Triton X-100 inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze einerseits auf freigesetzte Hexosaminidase hin überprüft und andererseits zur Bestimmung der Prozessierungskapazität eine konstante Konzentration von 1×10^4 Zellen/ ml für 0 bis 120 min mit 3 μM CTAP-III versetzt.

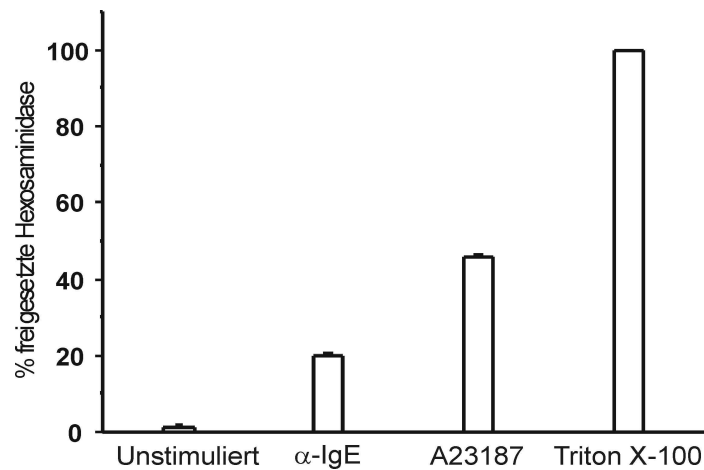


Abbildung 19: Freisetzung von Hexosaminidase durch stimulierte Hautmastzellen

Hautmastzellen (2×10^4 Zellen/ml) wurden für 30 min mit Puffer, 3 µg/ml α-IgE, 100 ng/ml A23187 oder 0,05 % Triton behandelt. Anschließend wurde ein Aliquot der Ansätze auf freigesetzte Hexosaminidase hin untersucht. Dazu wurden die Zellen entfernt und die zellfreien Überstände für 3 Stunden mit dem Hexosaminidase-Substrat 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosid inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Glyzinpuffer wurde die Extinktion bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Der Anteil der freigesetzten Hexosaminidase wurde als Prozentsatz der durch Triton-Lyse aus Vergleichszellen freigesetzten Menge (= 100 %) angegeben. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, setzten stimulierte Zellen lediglich einen geringen Anteil von ($1,2 \pm 0,4$ %) der Hexosaminidase spontan frei. Hingegen stieg die Freisetzung nach Stimulation mit α-IgE deutlich auf $19,8 \pm 0,4$ % und in Gegenwart des Kalziumionophors A23187 auf $45,8 \pm 0,6$ % an. Am höchsten war die Freisetzung durch Lyse der Zellen mit Triton X-100, die gleich 100 % gesetzt wurde.

Um in denselben Ansätzen die prozessierende Aktivität zu quantifizieren, wurden die mit CTAP-III versetzten Proben mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion mit R α-βTG auf die Bildung von NAP-2 hin untersucht. Gleichzeitig wurden die Proben auf ihre Aktivität gegenüber Neutrophilen im Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest hin geprüft, um festzustellen, ob das entstandene NAP-2 biologisch aktiv war. Um Störungen des biologischen Testverfahrens durch die zur Stimulation der Mastzellen eingesetzten Faktoren und durch von Mastzellen sezernierten Produkten zu vermeiden, wurde das CTAP-III sowie dessen Derivate aus Proben dieser Ansätze immunaffinitätschromatographisch mittels des Antikörpers mAb C24 aufgereinigt. Die Überprüfung des Eluats mittels eines β-TG Ag-spezifischen Sandwich-ELISA ergab, daß sich in allen Proben nach Immunaффinitätschromatographie mindestens 94 % des zuvor auf die Säule aufgegebenen β-TG Ag befanden. Zur Bestimmung der biologischen Aktivität wurden die Proben in einem Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest untersucht.

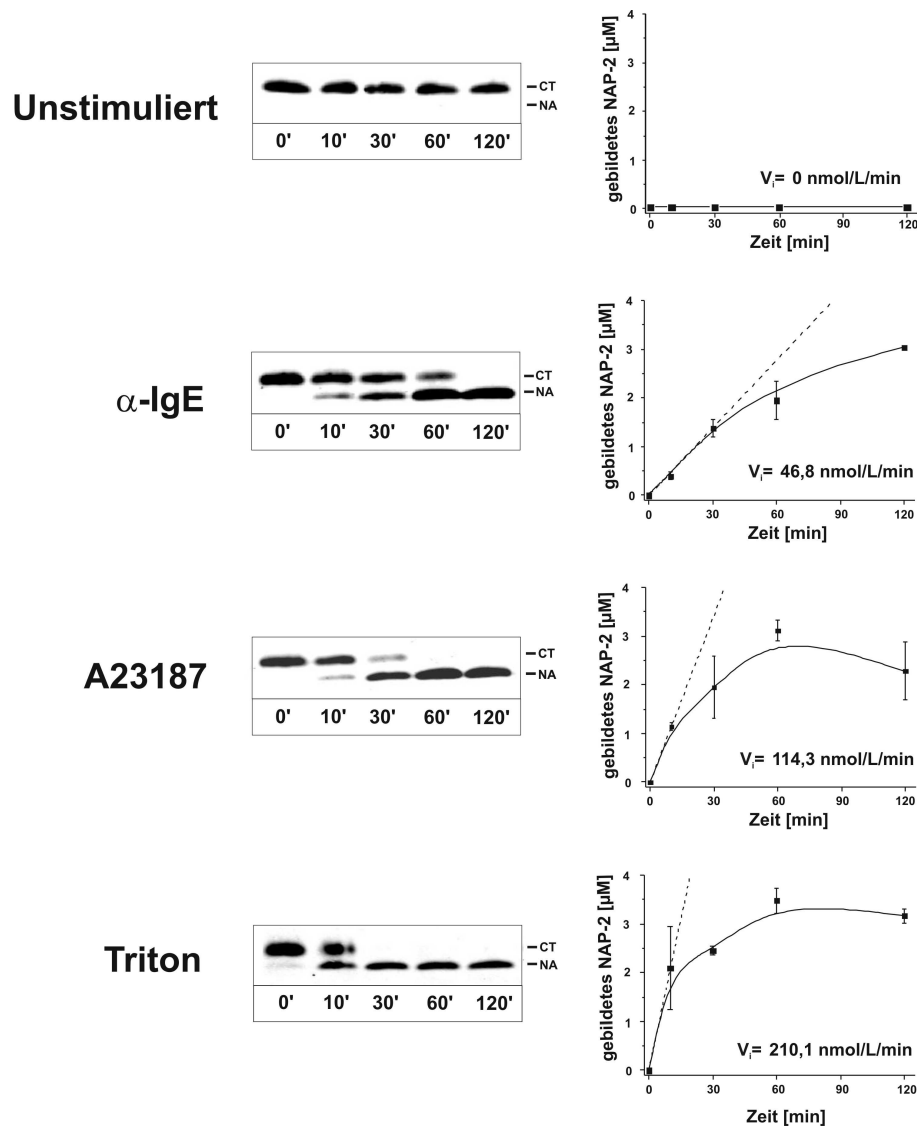


Abbildung 20 : Zeitlicher Verlauf der Prozessierung von CTAP-III zu biologisch aktivem NAP-2 durch stimulierte bzw. lysierte Hautmastzellen.

Hautmastzellen wurden für 30 min mit Puffer, 3 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-IgE}$, 100 ng/ml A23187 oder 0,05 % Triton inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^4 /ml mit 3 μM CTAP-III in 200 μl PBS-D + CaMg /0,1 % BSA inkubiert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeitpunkten abgestoppt und die Zellen nach Zentrifugation entfernt. Jeweils 2 μl des zellfreien Überstandes wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine mittels Western Blotting auf eine Membran überführt und nach Behandlung mit $\text{R}\alpha\text{-}\beta\text{TG}$ und Ziege $\alpha\text{-Kaninchen IRDye-800}$ auf Ihre Fluoreszenz hin untersucht (linke Spalte, gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von Dreien). Das $\beta\text{-TG}$ Ag des restlichen Überstandes wurde mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt und im Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest auf biologisch aktives NAP-2 hin untersucht (rechte Spalte). Dargestellt ist die Zunahme der biologischen Aktivität als NAP-2-Äquivalente über die Zeit (rechte Spalte, zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten). Die Anfangsgeschwindigkeiten der Prozessierung (V_i) wurden auf Grundlage der gebildeten Menge NAP-2 innerhalb der ersten 10 min berechnet.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, blieb in den Ansätzen mit unstimulierten Mastzellen das Bandenmuster im Western Blot über die gesamte Inkubationszeit von 120 min unverändert und zeigte zu allen Zeitpunkten jeweils nur eine Bande, die auf gleicher Höhe mit einer

parallel aufgetragenen CTAP-III Standardpräparation migrierte. Zudem enthielten diese Ansätze keinerlei biologische Aktivität im Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest. Im Gegensatz dazu führte Stimulation mit α -IgE bereits nach 10 min zur Entstehung detektierbarer Mengen von NAP-2. Mit fortlaufender Inkubationszeit stieg die Menge an gebildetem NAP-2 weiter an, während die CTAP-III-Menge abnahm, bis schließlich nach 120 min kein CTAP-III mehr vorhanden war. Die in denselben Ansätzen generierte biologische Aktivität stieg innerhalb der ersten 30 min linear an, bevor sich die Zunahme im weiteren Verlauf verringerte. Daraus ergab sich, die Prozessierung der ersten 30 min zugrunde gelegt, eine Anfangsgeschwindigkeit für die Bildung von NAP-2-Äquivalenten von 46,8 nmol/L/min. Ein Vergleich zwischen der im Neutrophilen-Elastase-Freisetzungstest ermittelten NAP-2-Äquivalente und einer densitrometrischen Analyse der entstandenen NAP-2-ähnlichen Banden im Western Blot zeigte nahezu vollständige Übereinstimmung der Resultate. Die Stimulation der Zellen mit dem Kalziumionophor A23187 führte zu einer im Vergleich zur α -IgE-Stimulation beschleunigten Abnahme von CTAP-III sowie zu einer sehr schnellen Zunahme der NAP-2-biologischen Aktivität, wie die erhöhte Anfangsgeschwindigkeit von 114,3 nmol/min/L dokumentiert. Um den maximal möglichen Umsatz des CTAP-III zu erfassen, wurden auch Lysate von Mastzellen untersucht, in denen sich eine Anfangsgeschwindigkeit der Bildung NAP-2-ähnlicher Aktivität von 210,1 nmol/L/min ergab.

Wie bereits vorher auf Seite 69 erwähnt, wurde nun überprüft, ob es sich bei dem neuentstandenen CTAP-III-Derivat um authentisches NAP-2 handelte. Dazu wurde die Masse des CTAP-III-Derivates massenspektrometrisch bestimmt. Diese Bestimmung ergab für dieses Derivat eine Masse m/z von 7625 amu, die sich in guter Übereinstimmung mit der kalkulierten Masse von NAP-2 (Masse: 7623 amu) befand. Somit konnte das entstandene CTAP-III-Derivat als authentisches NAP-2 identifiziert werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß die Induktion der CTAP-III-Prozessierung bei Mastzellen nicht restriktiv auf α -IgE-Stimulation beschränkt ist, sondern auch durch andere Stimuli hervorgerufen werden kann. Zudem korreliert die Geschwindigkeit der Prozessierung mit der Stärke der Degranulation. Jedoch führte sogar die verhältnismäßig schwache Aktivierung durch α -IgE zu einer so hohen Geschwindigkeit der CTAP-III-Prozessierung, daß bereits innerhalb von 10 min genügend aktives NAP-2 (400 ± 85 nM) vorhanden war, um Neutrophile zu aktivieren.

3.3.3 Chymase katalysiert die durch Mastzellen vermittelte CTAP-III-Prozessierung

Da für die Umwandlung von CTAP-III zu NAP-2 die Spaltung der Peptidbindung C-terminal zur aromatischen Aminosäure Tyrosin an Position 15 des CTAP-III notwendig ist, lag es nahe zu vermuten, es müsse an der mastzellvermittelten Entstehung des NAP-2 mindestens eine chymotryptische Protease, d.h. ein Enzym, das Peptidbindungen C-terminal zu aromatischen Aminosäuren spaltet, beteiligt sein. Interessanterweise ist für Mastzellen die Expression zweier chymotryptischer Enzyme bekannt: Einerseits diejenige von Kathepsin G, das die CTAP-III Prozessierung durch Neutrophile katalysiert⁵³. Andererseits existiert eine Subpopulation von Mastzellen (MC_{TC}), die durch die Expression des chymotryptischen Enzyms Chymase gekennzeichnet ist. Wie in Abschnitt 3.2.3 dargelegt, exprimiert der weit überwiegende Anteil der Hautmastzellen Chymase (ca. 90 %). Literaturangaben zufolge ist unter Lungenmastzellen nur ein geringer Anteil von Chymase-positiven Zellen zu finden¹⁰¹.

Das folgende Experiment sollte nun zwei Fragen klären: Einerseits, ob Chymase, wie Kathepsin G, die Proteolyse von CTAP-III zu NAP-2 katalysiert und andererseits, inwieweit sich beide Enzyme hinsichtlich ihrer Potenz, diese Umwandlung zu katalysieren, unterscheiden. Verwendet wurden in diesem und allen folgenden Experimenten zum einen aus humanen Neutrophilen aufgereinigtes Kathepsin G und zum anderen aus humanen Hautextrakten aufgereinigte Chymase. Laut Hersteller ergaben Silberfärbungen der gelelektrophoretisch aufgetrennten Enzympräparationen eine Reinheit von $\geq 95\%$. Um nun die Prozessierung durch diese Enzyme zu untersuchen, wurden aufsteigende Konzentrationen beider Enzyme (15 - 2000 ng/ml) mit 3 μ M CTAP-III für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das entstandene NAP-2, wie bereits beschrieben, nach Western Blotting densitrometrisch quantifiziert.

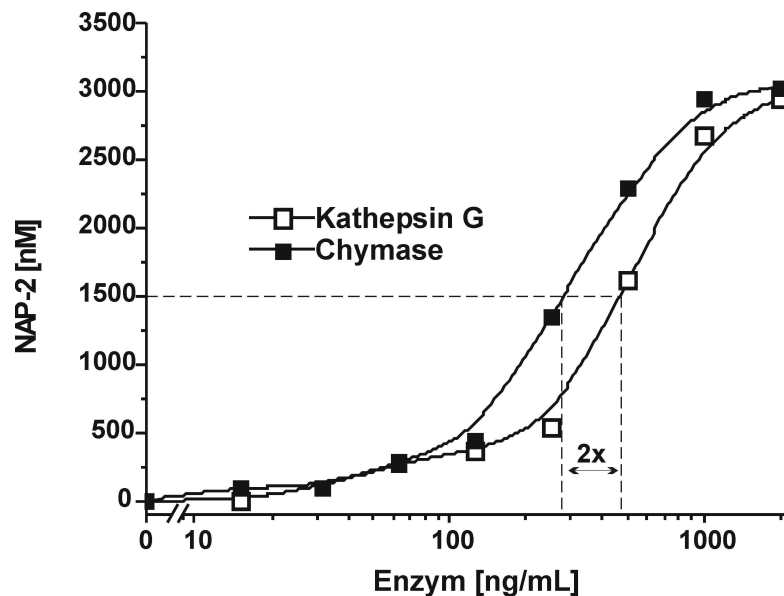


Abbildung 21 : Prozessierung von CTAP-III zu NAP-2 durch gereinigte Chymase und Kathepsin G.

Die Enzyme Chymase (■) und Kathepsin G (□) wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit 3 μ M CTAP-III in 200 μ l PBS-D/ 0,1 % BSA für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 μ l 10 %iger TFA wurden die Proteine aus 2 μ l jeder Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, durch Western Blotting auf eine Membran transferiert und nach Immunfluoreszenzfärbung mit α - β TG und einem IRDye-800-gekoppelten Ziege α -Kaninchen Antiserum densitometrisch auf ihren Gehalt an gebildetem NAP-2 hin untersucht. Als Referenzwert zur Quantifizierung dienten 50 ng einer parallel eingesetzten Standardpräparation von NAP-2. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von Dreien.

Wie in Abbildung 21 dargestellt, besaßen beide Enzyme die Fähigkeit, CTAP-III zu prozessieren. Innerhalb der festgelegten Versuchszeit wurde die Hälfte des zugegebenen CTAP-III von ca. 500 ng/ml Kathepsin G umgesetzt, was bei einem Molekulargewicht des Enzyms von ca. 30 kDa einer Konzentration von etwa 16,6 nM Kathepsin G entspricht. Ebenfalls halbmaximaler Substratumsatz zeigte sich bei einer Konzentration von ca. 250 ng/ml Chymase, was bei einem Molekulargewicht des Enzyms von ebenfalls ca. 30 kDa einer Konzentration von 8,3 nM Chymase entspricht. Oberhalb einer Konzentration von 1000 ng/ml (entspricht ca. 33 nM Kathepsin G und Chymase) setzten beide Enzyme CTAP-III vollständig um. In der massenspektrometrischen Analyse stellte sich heraus, daß beide Enzyme identische Abbauprodukte mit der exakten Masse des NAP-2 von 7623 amu generierten. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß Chymase ebenso wie Kathepsin G die Fähigkeit besitzt, CTAP-III in NAP-2 umzuwandeln. Da sich zudem die zur Umsetzung gleicher CTAP-III-Mengen erforderlichen Enzymmengen nur um den Faktor 2 unterschieden, kann den Enzymen eine vergleichbare Kapazität zur Spaltung des Substrates zugemessen werden.

Um nun der eigentlichen Frage nachzugehen, welches der beiden Enzyme für die CTAP-III-Prozessierung durch Haut- und Lungenmastzellen verantwortlich ist, wendete ich verschiedene Proteaseinhibitoren an. Da alle bis heute bekannten Inhibitoren der Chymase auch die katalytische Aktivität von Kathepsin G beeinträchtigen, benutzte ich zur Unterscheidung dieser beiden Enzyme eine bereits von Schechter *et al.* und He *et al.* beschriebene Kombination aus SBTI, einem Inhibitor beider Enzyme und Aprotinin, welches nur Kathepsin G, nicht aber Chymase hemmt^{108,109}. Außer α -IgE-aktivierten Haut- und Lungenmastzellen wurden bei der Durchführung dieser Experimente zur Kontrolle auch die isolierten Enzyme mit den Inhibitoren für 30 min vorinkubiert. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen verwendet, die bereits in Vorexperimenten maximale Wirkung auf die Aktivität der gereinigten Enzyme gezeigt hatten. Anschließend wurden die Enzyme und Mastzellen mit CTAP-III inkubiert und das entstandene NAP-2 mittels Western Blotting nachgewiesen. Die Konzentrationen der Mastzellen und Enzyme wurden dabei so gewählt, daß innerhalb der Versuchszeit ca. die Hälfte des eingesetzten CTAP-III mit einer linearen Umsatzrate in NAP-2 umgewandelt wird.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, setzten die Enzyme und Zellen in Abwesenheit der Inhibitoren ca. 50% des eingesetzten CTAP-III zu NAP-2 um (linke Spur). In sämtlichen Ansätzen, denen PMSF zugesetzt worden war, kam die NAP-2-Bildung vollständig zum Erliegen, wodurch die Beteiligung von Serinproteasen an der Prozessierung angezeigt wurde (rechte äußere Spur). Ebenso inhibierte SBTI einerseits die gereinigten Enzyme Chymase und Kathepsin G (Abbildung 22A und B), andererseits die Prozessierung sowohl durch Haut- als auch durch Lungenmastzellen (Abbildung 22C und D). Der zwischen beiden Enzymen diskriminierende Inhibitor Aprotinin hemmte erwartungsgemäß die Aktivität des Kathepsin G, während die CTAP-III-Umsetzung durch Chymase unbeeinflusst blieb. Interessanterweise zeigte der Zusatz von Aprotinin nahezu keine Wirkung auf Haut- (5.3 ± 8.3 % Hemmung) oder Lungenmastzellen (9.5 ± 11.3 % Hemmung).

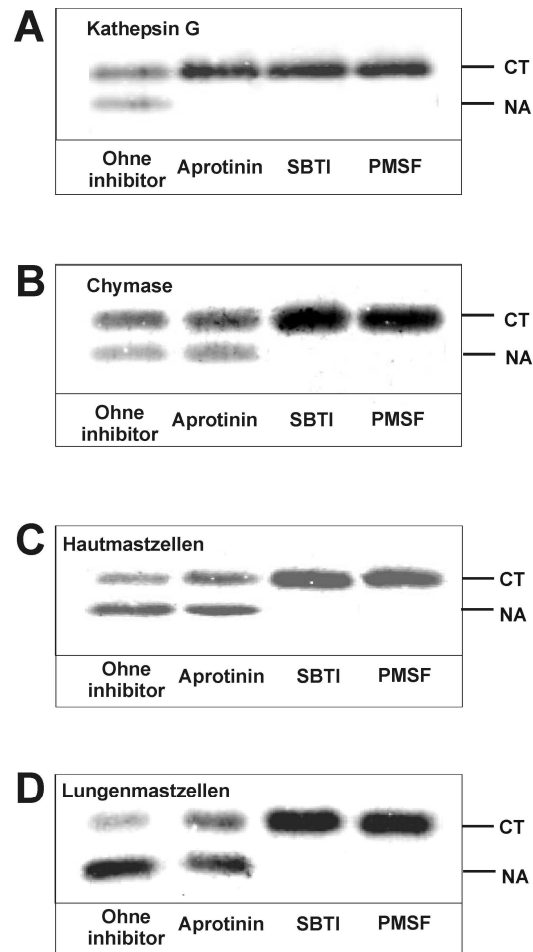


Abbildung 22 : Einfluß von SBTI, Aprotinin und PMSF auf die Prozessierung von CTAP-III durch Kathepsin G, Chymase, Lungen- und Hautmastzellen.

Die Enzyme Kathepsin G (500 ng/ml,A) und Chymase (250 ng/ml,B) sowie α -IgE-aktivierte Lungen- und Hautmastzellen (1×10^4 Zellen/ ml, C und D) wurden nach 30 min Vorinkubation mit Puffer oder mit den Inhibitoren Aprotinin (1 μ g/ml), SBTI (1 μ g/ml) oder PMSF (2 mM) mit 3 μ M CTAP-III in 200 μ l PBS-D +CaMg / 0,1% BSA für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden Aliquots der Ansätze nach SDS-PAGE mittels Western Blotting auf eine Membran transferiert und nach Immunfluoreszenzfärbung mit α -BTG densitometrisch auf ihren Gehalt an gebildetem NAP-2 hin untersucht. Als Referenzwert zur Quantifizierung dienten 50 ng einer parallel eingesetzten Standardpräparation von NAP-2. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes von Dreien.

Dadurch wurde klar, daß die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen aus beiden Organen hauptsächlich durch Chymase vermittelt wird, während dem Kathepsin G in diesem Zusammenhang offenbar keine bedeutende Rolle zufällt. Gleichzeitig zeigten diese Experimente auch, daß Tryptase, ein anderes wichtiges Enzym in Mastzellen, nicht involviert ist, da diese Protease ebenfalls sensitiv für Aprotinin, nicht jedoch für SBTI ist¹⁰⁸. Zur weiteren Absicherung wurde noch die Wirkung des Tryptase-Inhibitors Leupeptin auf die mastzellvermittelte CTAP-III-Prozessierung überprüft. Dessen Zusatz blieb ohne Wirkung auf die CTAP-III-Spaltung (bis zu 400 μ g/ml getestet, nicht gezeigt).

3.3.4 PBP und CTAP-III werden sowohl von Mastzellen als auch von Chymase mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut

Eine bekannte Besonderheit der durch Neutrophile bzw. durch Kathepsin G katalysierten Prozessierung ist, daß PBP ca. 6-fach schneller gespalten wird als CTAP-III⁶⁸. Um zu überprüfen, ob PBP auch für Chymase und Mastzellen ein besseres Substrat darstellt als CTAP-III, wurden die Konzentrationen an Enzymen, die nach 30 min ca. halbmaximalen Umsatz an CTAP-III bewirken (siehe Abschnitt 3.3.3), bis zu vier Stunden mit den NAP-2-Vorläufern inkubiert und nach SDS-PAGE und Western Blotting das gebildete NAP-2 quantifiziert.

Wie den in Abbildung 23A gezeigten Bandenmustern zu entnehmen ist, ähnelten sich die durch Inkubation mit Chymase und Kathepsin G aus CTAP-III und PBP erhaltenen Abbauprodukte. Während nach Prozessierung von CTAP-III lediglich NAP-2 als Abbauprodukt nach elektrophoretischer Auftrennung zu erkennen war, erschien beim Abbau des PBP durch jedes der beiden Enzyme ein zusätzliches Abbauprodukt, das ähnlich wie CTAP-III migrierte. Wie den Western Blots in Abbildung 23B und C zu entnehmen ist, erfolgte nach längerer Inkubation des PBP mit jeder der beiden Proteasen keine Anreicherung des intermediären Abbauproduktes, und es kam zur Akkumulation von NAP-2. Massenspektrometrische Analysen bestätigten, daß es sich bei den Endprodukten jeweils um NAP-2 handelte (ermittelte Masse in beiden Fällen: 7623 amu, kalkulierte Masse NAP-2: 7623 amu). Diese Ergebnisse zeigten, daß Chymase ebenso wie Kathepsin G die Fähigkeit besitzt, PBP unter Bildung eines Zwischenproduktes mit CTAP-III-ähnlichem Migrationsverhalten zu NAP-2 zu prozessieren.

Wie in Abbildung 23B zu sehen ist, waren die zeitlichen Verläufe der Prozessierung von PBP und CTAP-III durch Kathepsin G erwartungsgemäß sehr verschieden. So stieg in den Ansätzen mit CTAP-III und Kathepsin G die Menge des gebildeten NAP-2 innerhalb der ersten 10 min kontinuierlich mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\text{CTAP-III}} = 67,6$ nmol/L/min an und erreichte nach 30 min ca. halbmaximalen Umsatz ($1,80 \pm 0,15 \mu\text{M}$), bevor sich die Reaktion deutlich verlangsamte. Hingegen war die Bildung von NAP-2 durch Abbau von PBP mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\text{PBP}} = 334,2$ nmol/L/min in den ersten 5 min ungefähr fünfmal höher und erreichte in dieser Zeit bereits halbmaximalen Umsatz ($1,68 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Schon nach 10 min verlangsamte sich die Reaktion und war nach 30 min bereits nahezu abgeschlossen.

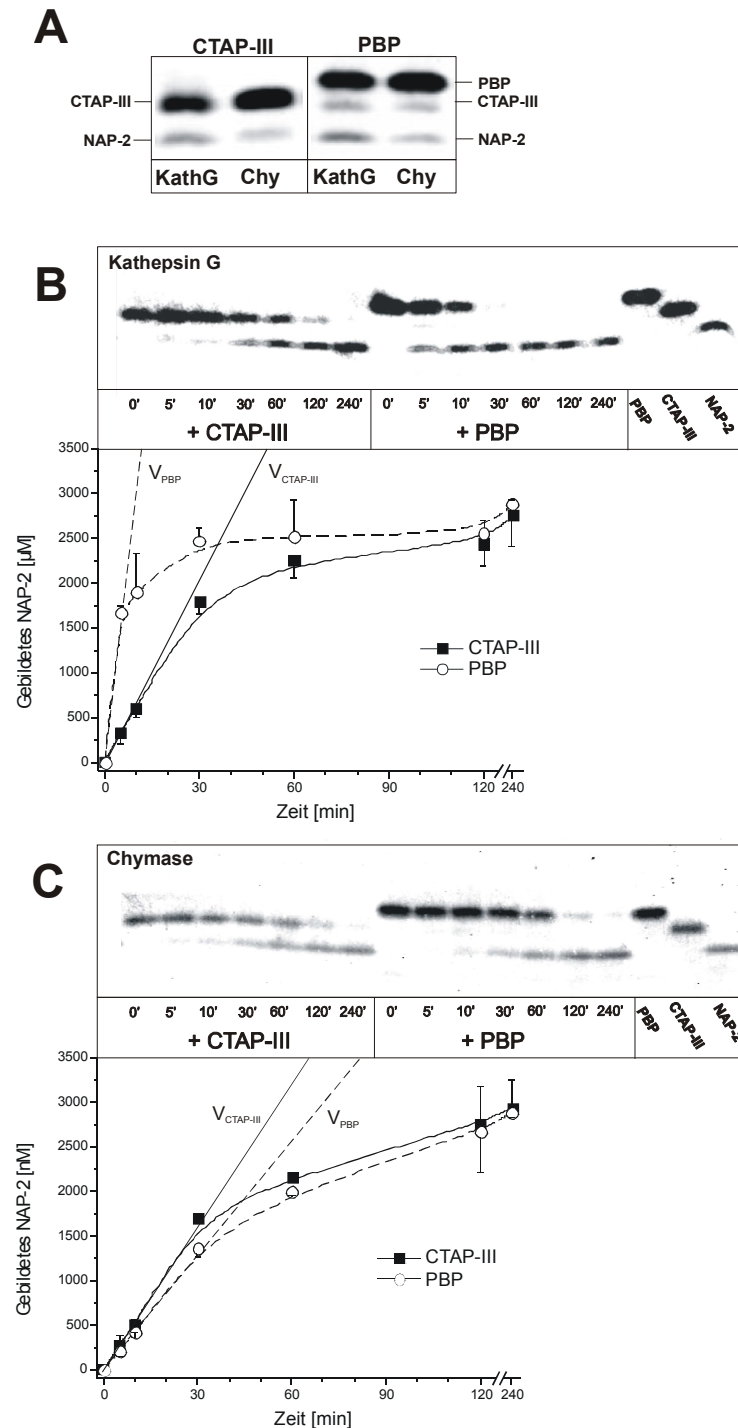


Abbildung 23 : Prozessierung von CTAP-III und PBP durch Kathepsin G und Chymase.

A zeigt das nach elektrophoretischer Auftrennung, Western Blotting und immunchemischem Nachweis mit α - β TG erhaltene Bandenmuster nach Inkubation von 3 μ M CTAP-III und PBP mit Chymase und Kathepsin G für 30 min. Für die Studien zum Zeitverlauf der Prozessierung wurden die Enzyme Kathepsin G (500 ng/ml) (B) und Chymase (250 ng/ml) (C) mit 3 μ M CTAP-III (■, durchgezogene Linie) und 3 μ M PBP (○, gestrichelte Linie) in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Nach SDS-PAGE und Western Blotting wurde das β -TG Ag immunchemisch mittels α - β TG detektiert (Western Blots in B und C). Die densitometrische Quantifizierung des gebildeten NAP-2 erfolgte anhand einer mitgeführten Standardpräparation von NAP-2 (50 ng) (Liniendiagramm). Die initiale Umsatzgeschwindigkeit wurde aus dem anfänglichen, linearen Anstieg des durch Prozessierung durch Kathepsin G und Chymase aus CTAP-III ($V_{CTAP-III}$) und aus PBP (V_{PBP}) entstandenen NAP-2 ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Abweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 23C dargestellt, verlief der Abbau von PBP und CTAP-III durch Chymase dagegen mit fast identischen Geschwindigkeiten. So erfolgte die Prozessierung von CTAP-III durch Chymase mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\text{CTAP-III}} = 52,6 \text{ nmol/L/min}$ und zeigte einen ca. halbmaximalen Umsatz ($1,70 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{M}$) nach 30 min. Anschließend verringerte sich die Reaktionsgeschwindigkeit. Einen weitgehend ähnlichen Verlauf nahm der Abbau von PBP durch Chymase mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\text{PBP}} = 42,0 \text{ nmol/L/min}$. Ungefähr halbmaximaler Umsatz ($1,36 \pm 0,11 \text{ } \mu\text{M}$) wurde nach 30 min erreicht, bevor sich die Reaktion verlangsamte.

Aus diesen Ergebnissen geht somit hervor, daß Chymase beide Vorläufermoleküle mit nahezu identischer Umsatzgeschwindigkeit zu NAP-2 prozessiert, während Kathepsin G PBP ca. fünfmal schneller als CTAP-III zu NAP-2 umsetzt.

Um nun der Frage nachzugehen, ob auch Mastzellen PBP schneller prozessieren als CTAP-III, wurden zuvor mit α -IgE stimulierte Hautmastzellen mit $3 \text{ } \mu\text{M}$ CTAP-III und PBP für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert und das entstandene NAP-2 densitrometrisch bestimmt.

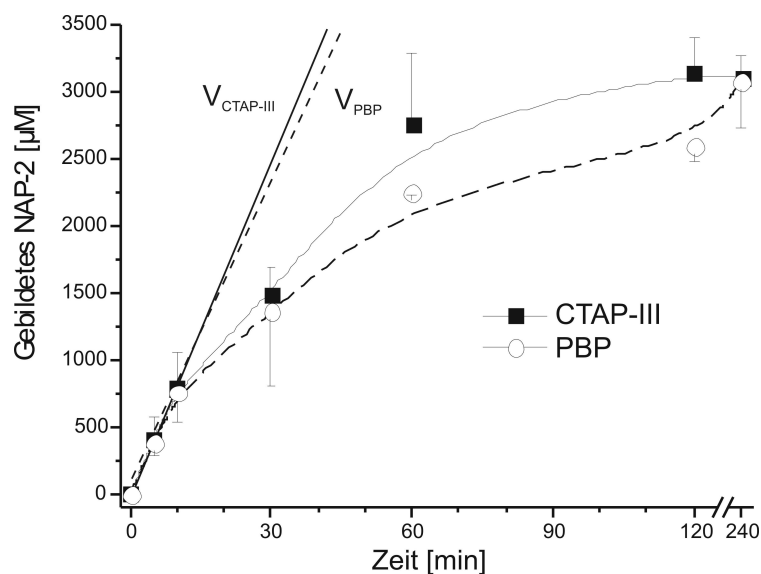


Abbildung 24: Prozessierung von CTAP-III und PBP durch Hautmastzellen.

Mit α -IgE aktivierte Hautmastzellen wurden mit $3 \text{ } \mu\text{M}$ CTAP-III (■, durchgezogene Linie) und $3 \text{ } \mu\text{M}$ PBP (○, gestrichelte Linie) in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA für die angegebenen Zeitintervalle inkubiert. Nach SDS-PAGE und Western Blotting wurden das β -TG Ag immunchemisch mittels $\text{R}\alpha\text{-}\beta\text{TG}$ detektiert und das gebildete NAP-2 anhand einer mitgeführten Standardpräparation von NAP-2 (50 ng) densitrometrisch quantifiziert. Die initialen Umsatzgeschwindigkeiten wurden anhand der Menge des in den ersten 10 min aus CTAP-III ($V_{\text{CTAP-III}}$) und aus PBP (V_{PBP}) gebildeten NAP-2 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Abweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, prozessierten aktivierte Mastzellen beide Vorläufer mit nahezu identischer Umsatzrate. So erfolgte die NAP-2-Bildung aus CTAP-III mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\text{CTAP-III}} = 81,2 \text{ nmol/L/min}$, während die Prozessierung von PBP mit einer initialen Umsatzgeschwindigkeit $V_{\text{PBP}} = 77,1 \text{ nmol/L/min}$ vonstatten ging. Die Beobachtung, daß Mastzellen ebenso wie Chymase PBP und CTAP-III mit nahezu identischen Umsatzzaten prozessieren, unterstützte den aus den Ergebnissen des Inhibitionsversuches gewonnenen Schluß, daß die mastzellvermittelte Prozessierung im Wesentlichen auf Chymaseaktivität zurückzuführen ist. Die physiologische Bedeutung dieses Befundes wird ausführlich in der Diskussion erörtert.

3.4 Regulation der CTAP-III-prozessierenden Aktivität von Mastzellen und Neutrophilen durch PF-4

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, können aktivierte Mastzellen mittels sezernierter Chymase die biologische Aktivität des β -TG Ag maßgeblich modulieren. So besitzen Mastzellen ebenso wie Neutrophile die Fähigkeit, CTAP-III proteolytisch in NAP-2 umzuwandeln. Interessanterweise hatten Drs. Ernst Brandt und Tobias Grimm (Forschungszentrum Borstel) entdeckt, daß das andere thrombozytäre CXC-Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF-4) innerhalb physiologischer Konzentrationen die durch Neutrophile vermittelte CTAP-III-Prozessierung zu hemmen vermag⁸¹. Somit ergab sich die naheliegende Frage, ob und inwieweit auch die mastzellvermittelte Spaltung des CTAP-III durch PF-4 gehemmt wird.

3.4.1 PF-4 hemmt sowohl die durch Neutrophile als auch die durch Mastzellen katalysierte CTAP-III-Prozessierung

Um dieser Frage nachzugehen, untersuchte ich die Wirkung von PF-4 auf die CTAP-III-Prozessierung durch Haut- und Lungenmastzellen. Zum Vergleich wurde ebenfalls die Wirkung von PF-4 auf die durch Neutrophile katalysierte Prozessierung untersucht. Dazu wurden Haut- und Lungenmastzellen ($1 \times 10^4/\text{ml}$) sowie eine ihrer Dichte im Blut entsprechenden Konzentration von Neutrophilen ($5 \times 10^6/\text{ml}$) in An- und Abwesenheit ansteigender Dosen von PF-4 (von 1,2 nM bis 12 μM) für 30 min mit 3 μM CTAP-III inkubiert. Unter diesen Bedingungen setzten die Zellen in Abwesenheit von PF-4 ungefähr die Hälfte des eingesetzten CTAP-III um, wodurch es möglich war, sowohl positive als auch negative Modulation durch zugesetztes PF-4 zu beobachten.

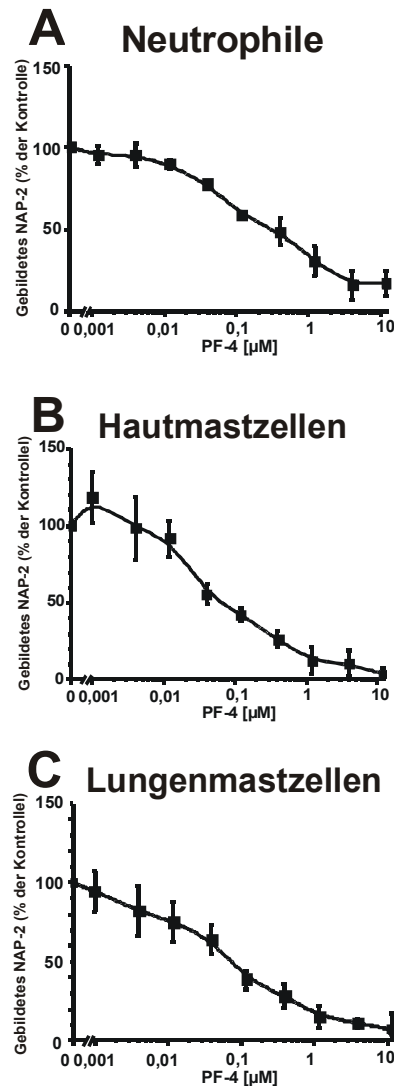


Abbildung 25: Inhibitorischer Effekt von PF-4 auf die CTAP-III-Prozessierung durch Neutrophile und Mastzellen.

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) (A), α -IgE-aktivierte Hautmastzellen ($1 \times 10^4/\text{ml}$) (B) und α -IgE-aktivierte Lungenmastzellen ($1 \times 10^4/\text{ml}$) (C) wurden mit $3 \mu\text{M}$ CTAP-III in An- und Abwesenheit ansteigender Konzentrationen von PF-4 für 30 min bei 37°C in PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten NAP-2 erfolgte nach SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion mit α - β TG densitometrisch anhand einer mitgeführten NAP-2-Standardpräparation (50 ng). Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die jeweilige Menge des in Abwesenheit von PF-4 gebildeten NAP-2 gleich 100 % gesetzt. Die dargestellten Ergebnisse geben die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender wieder.

Wie in Abbildung 25A zu sehen ist, führten ansteigende PF-4-Konzentrationen zu einer Abnahme des durch Neutrophile gebildeten NAP-2. Dabei trat ein erster meßbarer Effekt bei 12 nM PF-4 auf, während die Inhibition bei 220 nM PF-4 halbmaximal war und schließlich ab einer Konzentration von $4 \mu\text{M}$ PF-4 ein Maximum von ca. 80 % erreichte. Ähnlich wie die Prozessierung durch Neutrophile wurde auch diejenige durch Hautmastzellen dosisabhängig gehemmt. Der inhibitorische Einfluß des PF-4 begann ab einer Konzentration von 12 nM,

erreichte halbmaximale Hemmung bei 75 nM und zeigte schließlich ab 1,2 μ M einen maximalen Effekt von ca. 90 % Inhibition. Bei Lungenmastzellen zeigte sich ein nahezu identisches Bild wie bei Hautmastzellen. Hemmung trat ab einer Konzentration von 12 nM ein, erreichte 50 % bei 82 nM und ihr Maximum von ca. 90 % ab 1,2 μ M.

Diese Daten zeigen, daß sich die Menge des sowohl von Lungen- als auch von Hautmastzellen gebildeten NAP-2 in Anwesenheit von PF-4 deutlich verringerte. Im Vergleich zu der Wirkung des PF-4 auf die durch Neutrophile vermittelte Prozessierung war bei der mastzellvermittelten Prozessierung die Potenz des PF-4 ca. dreimal und die Kapazität um 10 % höher. Somit bleibt festzuhalten, daß PF-4 die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen noch drastischer hemmt als die Prozessierung durch Neutrophile.

In den soeben geschilderten Experimenten hatte sich herausgestellt, daß mit 4 μ M PF-4 bei allen untersuchten Zellen maximale Inhibition erreicht werden kann. Um nun zu untersuchen, ob PF-4 auch den zeitlichen Verlauf der NAP-2-Bildung durch Neutrophile und Mastzellen beeinflussen kann, wurden die Zellen mit 3 μ M CTAP-III in An- und Abwesenheit von 4 μ M PF-4 für unterschiedliche Zeiträume inkubiert und das nach verschiedenen Zeitintervallen gebildete NAP-2 bestimmt.

Wie in Abbildung 26A dargestellt ist, nahm in den Ansätzen mit Neutrophilen in Abwesenheit von PF-4 der NAP-2-Gehalt in den ersten 10 min kontinuierlich und anschließend langsamer zu. Die anfängliche Umsatzgeschwindigkeit des CTAP-III betrug 47,3 nmol/L/min. In Gegenwart von PF-4 wurde die anfängliche Umsatzgeschwindigkeit des CTAP-III drastisch auf 15,1 nmol/L/min gesenkt. Dabei hemmte PF-4 die Prozessierung über die gesamte Dauer der Inkubation hinweg, so daß die Inhibition auch nach 120 min noch ca. 74 % betrug. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit Haut- und Lungenmastzellen sind in Abbildung 26B und C dargestellt und zeigen, daß in Abwesenheit von PF-4 die Zunahme des gebildeten NAP-2 innerhalb der ersten 10 min linear war und danach abflachte. In den mit PF-4 versetzten Proben hingegen fand Bildung von NAP-2 nur in den ersten 5 min statt und kam anschließend vollständig zum Erliegen.

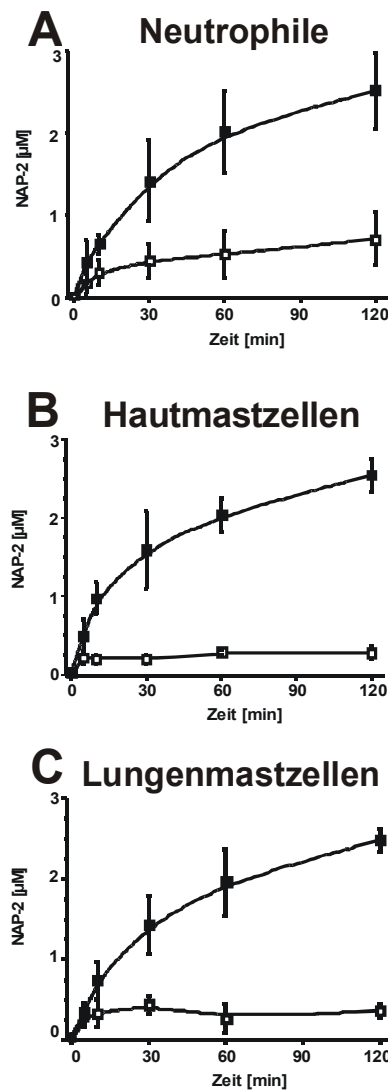


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der NAP-2-Bildung durch Neutrophile und Mastzellen in An- und Abwesenheit von PF-4

Neutrophile ($5 \times 10^6/\text{ml}$) (A), α -IgE-aktivierte Hautmastzellen ($1 \times 10^4/\text{ml}$) (B) und α -IgE-aktivierte Lungenmastzellen ($1 \times 10^4/\text{ml}$) (C) wurden für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit $3 \mu\text{M}$ CTAP-III alleine (■) oder unter Zusatz von $4 \mu\text{M}$ PF-4 (□) inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten NAP-2 erfolgte nach SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion mit $\text{R}\alpha\text{-}\beta\text{TG}$ densitometrisch anhand einer mitgeführten NAP-2-Standardpräparation (50 ng). Die dargestellten Ergebnisse geben die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender wieder.

Zusammenfassend geht aus diesen Daten hervor, daß PF-4 die mastzellvermittelte CTAP-III-Prozessierung nicht nur drastischer sondern auch nachhaltiger hemmt als die Prozessierung durch Neutrophile. Hingegen wurden keine Unterschiede zwischen Lungen- und Hautmastzellen hinsichtlich der PF-4-Inhibition gefunden, weshalb ich in weiteren Experimenten nur noch Hautmastzellen untersuchte und, falls erforderlich, mit Neutrophilen verglich.

3.4.2 PF-4 inhibiert die durch Chymase und Kathepsin G katalysierte CTAP-III-Prozessierung

Um eine Vorstellung über den Mechanismus der Hemmung zu bekommen, überprüfte ich, ob die inhibitorische Wirkung von PF-4 auf einer Modulation von Zellfunktionen oder auf einem direkten Einfluß auf die Proteolyse beruht. Daher untersuchte ich, ob PF-4 auch die Prozessierung von CTAP-III durch Zellysate beeinflusst, bei deren Verwendung durch das Chemokin ausgelöste Zellfunktionen keine Rolle spielen sollten. In Vorversuchen hatte sich allerdings gezeigt, daß lysierte Neutrophile gebildetes NAP-2 weiter abbauen, was auf die in Neutrophilen gespeicherten Enzyme Elastase und Gelatinase B zurückzuführen sein dürfte¹¹⁰. Deshalb verzichtete ich darauf, Neutrophile in diese Untersuchung mit einzubeziehen und konzentrierte mich auf den Einfluß von PF-4 auf die CTAP-III-Prozessierung durch Hautmastzellysate.

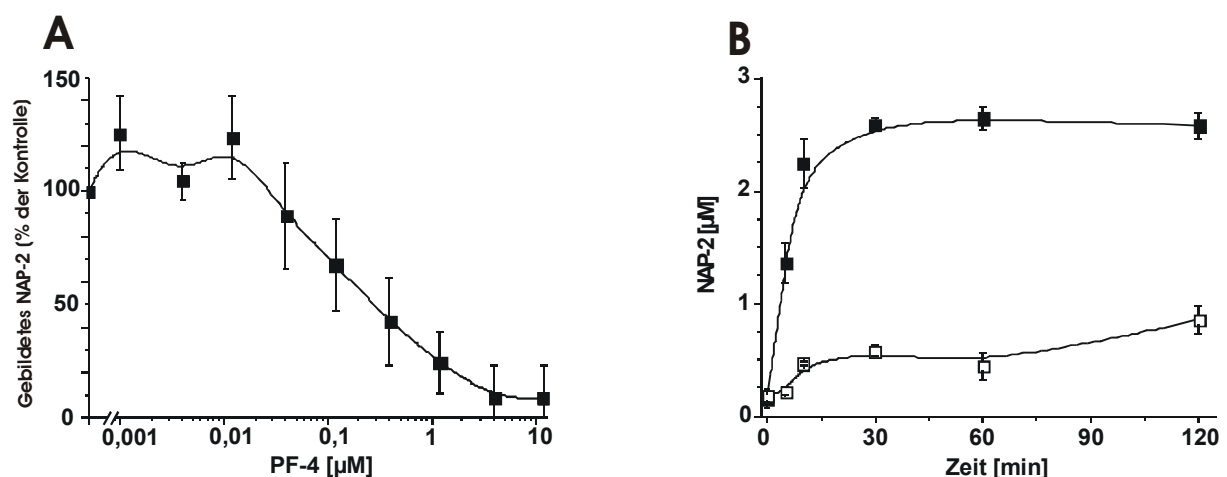


Abbildung 27: Konzentrations- und Zeitkinetik der PF-4-vermittelten Hemmung der CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellysate

Lysate von Hautmastzellen (1×10^4 Zelläquivalente /ml, lysiert in 0,05 % Triton) wurden mit 3 µM CTAP-III in An- und Abwesenheit ansteigender Konzentrationen von PF-4 für 30 min bei 37°C in PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA inkubiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Menge des in Abwesenheit von PF-4 gebildeten NAP-2 gleich 100 % gesetzt (A). Für die Studien zum Zeitverlauf der Inhibition wurden die Lysate für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit 3 µM CTAP-III alleine (■) oder unter Zusatz von 4 µM PF-4 (□) inkubiert (B). Die Quantifizierung des gebildeten NAP-2 erfolgte nach SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion mit Rα-βTG densitometrisch anhand von einer mitgeführten NAP-2-Standardpräparation (50 ng). Die dargestellten Ergebnisse geben die Mittelwerte ± Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender wieder.

Wie aus Abbildung 27A zu entnehmen ist, hemmte PF-4 die NAP-2-Bildung durch Mastzelllysate in konzentrationsabhängiger Weise. Erste meßbare Inhibition fand bei 40 nM PF-4 statt, während halbmaximale Inhibition bei ca. 180 nM und maximale Inhibition von über 90 % bei 1,2 μ M PF-4 beobachtet wurde. Somit zeigte PF-4 bei der Hemmung der CTAP-III-Prozessierung durch Mastzelllysate eine ebenso hohe Kapazität von über 90 % wie zuvor bei der Hemmung der durch intakte Zellen vermittelten Prozessierung (siehe Abbildung 25B). Bei der Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Inhibition (Abbildung 27B) war der Umsatz in Abwesenheit von PF-4 erwartungsgemäß sehr schnell und erreichte ein Plateau bereits nach 30 min. Trotzdem wurde in Gegenwart von 4 μ M PF-4 der Umsatz drastisch verlangsamt. Auch nach 120 min blieb der Umsatz deutlich unterhalb von 1 μ M gebildetem NAP-2 und erreichte somit zu keinem Zeitpunkt die bereits nach 5 min in Abwesenheit von PF-4 gebildete Menge an NAP-2 von ca. 1,3 μ M, woraus sich eine mehr als 24-fache Verlangsamung der Reaktion ergibt.

Mit diesen Experimenten konnte zwar die Wirkung von PF-4 auf die CTAP-III-Spaltung durch zellmodulierende Effekte nicht prinzipiell ausgeschlossen werden, jedoch sprach sowohl die ebenso hohe Kapazität der Hemmung wie in den entsprechenden Experimenten mit intakten Mastzellen als auch die Nachhaltigkeit der Hemmung dafür, daß eine Interaktion des Chemokins mit der Enzym-Substrat-Reaktion maßgeblich für die Inhibition verantwortlich ist.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die gereinigten humane Enzyme Chymase und Kathepsin G sowie zum Vergleich auch bovines Chymotrypsin, welches CTAP-III ebenfalls zu NAP-2 umwandelt¹¹¹, jeweils mit CTAP-III alleine oder mit einem Gemisch aus CTAP-III und PF-4 inkubiert und die Bildung von NAP-2 verfolgt. Die Konzentrationen der Enzyme wurden dabei aus bereits genannten Gründen so gewählt, daß es während der Inkubation zu einem ungefähr halbmaximalen Umsatz des zugegebenen Substrates kam.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, wurde der Umsatz des Vorläufermoleküls zu NAP-2 sowohl durch Chymase als auch durch Kathepsin G in Gegenwart von 4 μ M PF-4 drastisch reduziert. So wurde der Umsatz durch Chymase um 92,3 % (von $1,82 \pm 0,17 \mu\text{M}$ auf $0,14 \pm 0,13 \mu\text{M}$ NAP-2) und derjenige durch Kathepsin G um 75,3 % (von $1,33 \pm 0,26 \mu\text{M}$ auf $0,32 \pm 0,08 \mu\text{M}$ NAP-2) gesenkt. Diese Ergebnisse bestätigten die oben aufgestellte Annahme, daß PF-4 einen direkten Einfluß auf die Enzym-Substrat-Reaktion hat. Jedoch war dadurch noch nicht klar, ob dieser Einfluß auf Interaktion des PF-4 mit dem Enzym selbst oder womöglich mit dem CTAP-III beruht.

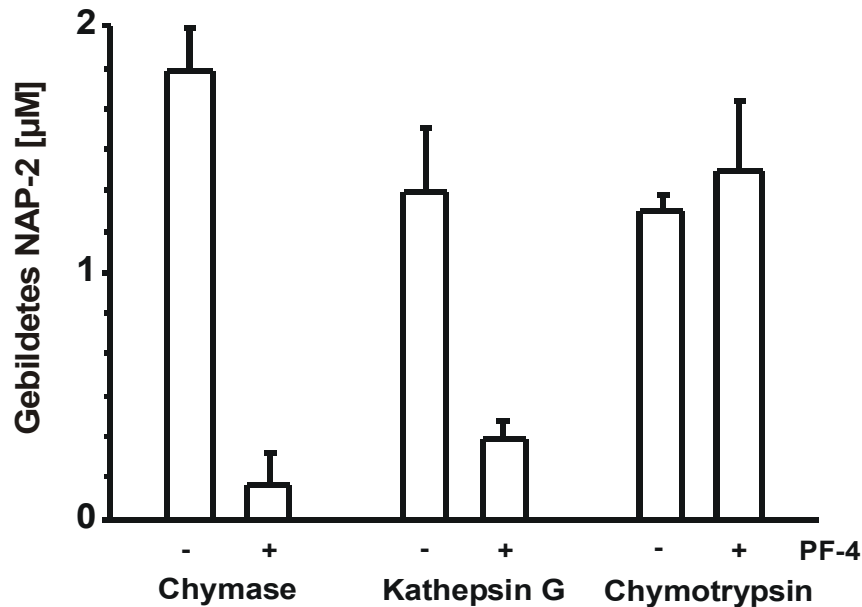


Abbildung 28 : Inhibitorischer Effekt von PF-4 auf die Prozessierung von CTAP-III durch Chymase, Kathepsin G und Chymotrypsin.

Die Enzyme Chymase (250 ng/ml), Kathepsin G (500 ng/ml) und Chymotrypsin (200 ng/ml) wurden in An- und Abwesenheit von 4 µM PF-4 mit 3 µM CTAP-III in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung des gebildeten NAP-2 erfolgte nach SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion mit Rα-βTG densitrometrisch anhand einer mitgeführten NAP-2-Standardpräparation (50 ng). Die dargestellten Ergebnisse geben die Mittelwerte ± Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente an.

Daß Interaktionen zwischen diesen beiden Chemokinen existieren, hatte Dr. Tobias Grimm am Forschungszentrum Borstel im Rahmen seiner Dissertationsarbeit bereits beschrieben⁸¹. Der Hypothese, daß die Inhibition auf einer Interaktion zwischen den beiden Chemokinen beruht, widersprach jedoch das in den Inhibitionsversuchen mit Chymotrypsin erhaltene Ergebnis. Hier trat im Gegensatz zu den Versuchen mit den anderen beiden Enzymen keine Hemmung in Gegenwart von PF-4 ein. Der Umsatz durch Chymotrypsin blieb nahezu unverändert mit der Bildung von $1,25 \pm 0,07$ µM NAP-2 in Abwesenheit und $1,41 \pm 0,29$ µM NAP-2 in Anwesenheit von PF-4. Würde die Inhibition von PF-4 auf der Interaktion mit CTAP-III beruhen, hätte ein solcher Mechanismus Schutz gegenüber allen chymotryptischen Enzymen einschließlich Chymotrypsin bieten müssen. Daher schloß ich, daß die Inhibition auf der direkten Wirkung des PF-4 auf Chymase und Kathepsin G beruht.

3.4.3 Die PF-4-vermittelte Inhibition der CTAP-III-Prozessierung basiert nicht auf Kompetitionsmechanismen

Die zuletzt dargestellten Ergebnisse sprachen dafür, daß die Inhibition der CTAP-III-Spaltung auf direkter Wechselwirkung des PF-4 mit dem jeweiligen Enzym beruht. Eine vorstellbare Interaktion zwischen Enzym und PF-4 könnte darin bestehen, daß dieses Chemokin selbst durch das Enzym abgebaut wird und somit als Substrat mit CTAP-III um das katalytische Zentrum des Enzyms kompetiert. Diese Annahme erschien umso plausibler, als PF-4 dem CTAP-III strukturell stark ähnelt (53 % Sequenzidentität) und darüberhinaus mehrere potentielle Schnittstellen für Chymase und Kathepsin G besitzt (einen Tyrosinrest an Position 60 sowie verschiedene basische AS-Reste).

Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchte ich, ob es nach Inkubation des Enzyms bzw. von Mastzellen mit PF-4 zur Akkumulation von Abbauprodukten des Chemokins und zur Reduktion der Menge an intaktem PF-4 kommt. Für solche Untersuchungen stellt die Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) eine nützliche Methode dar, da sie einerseits die Quantifizierung einer eventuellen Abnahme des intakten PF-4 erlaubt und andererseits die Erkennung und Gewinnung der potentiellen Abbauprodukte zur späteren massenspektrometrischen Analyse ermöglicht. Zur Kontrolle sollte die Spaltung von PF-4 mit derjenigen von CTAP-III durch Chymase, Kathepsin G und Mastzellen verglichen werden.

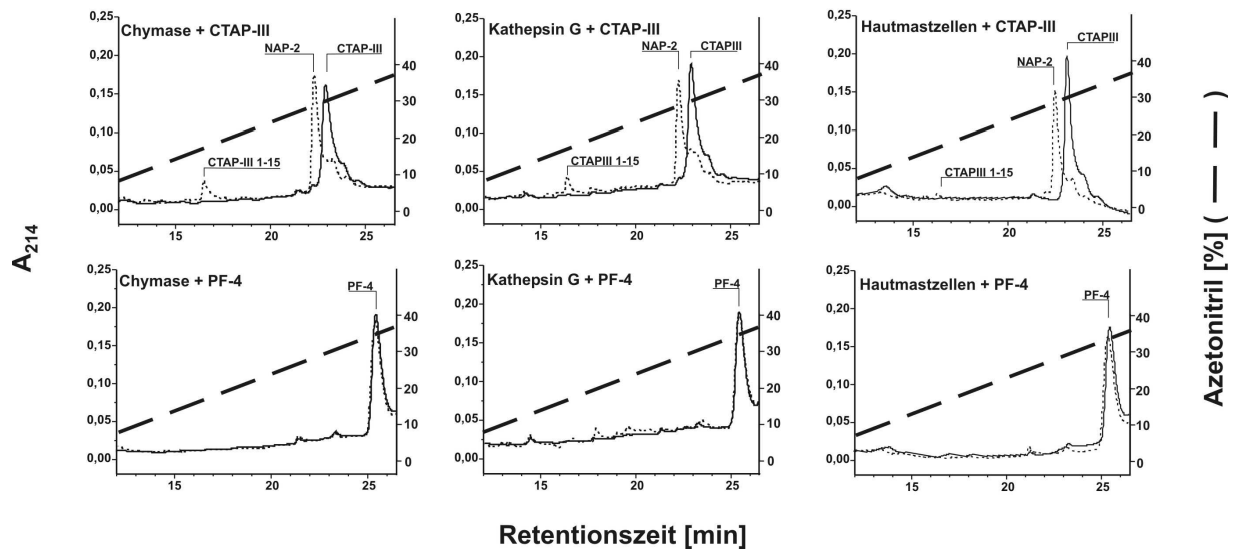


Abbildung 29 : Spaltung von CTAP-III und PF-4 durch Chymase, Kathepsin G und Hautmastzellen.

Die Chemokine CTAP-III (3 μ M) oder PF-4 (4 μ M) wurden jeweils mit 250 ng/ml Chymase, 500 ng/ml Kathepsin G und 1×10^4 /ml zuvor mit α -IgE aktivierten Hautmastzellen in 200 μ l PBS-D +CaMg/ 0,1% BSA für 0 min (durchgezogene Linie) bzw. 120 min (gepunktete Linie) bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion und Entfernen der Zellen wurden die Ansätze mittels RP-HPLC aufgetrennt. Die gezeigten Chromatogramme geben das Elutionsprofil dieser Ansätze wieder. Die eluierenden Proteine wurden durch die Extinktion bei 214 nm detektiert und fraktioniert aufgefangen. Die anschließende Identifizierung der Proteine CTAP-III [1-15], NAP-2, CTAP-III und PF-4 erfolgte durch massenspektrometrische Analyse dieser Proteine mittels ESI-FT-MS. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß in allen Ansätzen zum Zeitpunkt 0 min der Inkubation mit CTAP-III nur ein Protein bei einer Retentionszeit von 23,0 min eluierte (obere Reihe in Abbildung 29, durchgezogene Linie). Dieses Protein wurde aufgefangen und massenspektrometrisch wie erwartet als intaktes CTAP-III identifiziert (bestimmte Masse: 9288 amu, errechnete Masse von CTAP-III: 9286 amu). Nach 120 min Inkubation der Enzyme bzw. der Mastzellen mit CTAP-III änderte sich das Elutionsprofil, d.h. der von CTAP-III verursachte Peak bei 23,0 min nahm deutlich ab und zwei neue Peaks erschienen bei 16,6 min und 22,2 min im Elutionsdiagramm (obere Reihe in Abbildung 29, gepunktete Linie). Diese Proteine konnten anhand ihrer Massen von 1682 amu als N-terminales, 15-Aminosäuren langes Bruchstück des CTAP-III (CTAP-III[1-15] errechnete Masse: 1682 amu), und von 7623 amu als NAP-2 (errechnete Masse: 7623 amu) identifiziert werden.

Wie in Abbildung 29 (untere Reihe) zu sehen ist, enthielten die Ansätze mit PF-4 zum Zeitpunkt 0 min ein einziges bei 25,4 min eluierendes Protein, das erwartungsgemäß als PF-4 identifiziert werden konnte (ermittelte und errechnete Masse: 7764 amu). Nach 120 min Inkubation kam es weder zu einer Abnahme der Peakhöhe und -fläche von PF-4 noch konnten

neue Abbauprodukte gefunden werden. Des weiteren blieb die Masse des nach 25,4 min eluierten Proteins unverändert bei 7764 amu.

Diese Ergebnisse zeigten, daß unter Bedingungen, in denen ein deutlicher Abbau von CTAP-III eintritt, PF-4 weder durch Chymase oder Kathepsin G noch durch Mastzellen abgebaut wird. Somit sprach dieses Ergebnis klar dagegen, daß PF-4 als kompetitives Substrat die Spaltung von CTAP-III hemmen könnte.

Jedoch blieb es weiterhin denkbar, daß PF-4 aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit CTAP-III als nicht spaltbares Substratanalogon um die Bindung an das katalytische Zentrum mit dem Substrat konkurriert. Sollte dieses der Fall sein, müsste PF-4 durch ansteigende CTAP-III-Konzentrationen aus dem katalytischen Zentrum verdrängt werden können, was eine Reduktion der Inhibitionsrate zur Folge haben müßte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Hautmastzellen und Neutrophile mit ansteigenden Konzentrationen von CTAP-III in An- und Abwesenheit einer konstanten Dosis PF-4 inkubiert.

Wie Tabelle 4 zeigt, blieben die Inhibitionsraten trotz ansteigender CTAP-III-Konzentration sowohl in den Ansätzen mit Mastzellen als auch in denjenigen mit Neutrophilen nahezu gleich. So schwankte die durch PF-4 verursachte Inhibition der mastzellvermittelten Prozessierung zwischen 82 und 88 %, während sich diejenige der neutrophilenvermittelten Prozessierung zwischen 63 und 70 % bewegte.

Tabelle 4 : Die PF-4-vermittelte Inhibition der Bildung von NAP-2 durch Hautmastzellen und Neutrophile: Einfluß steigender Konzentrationen von CTAP-III

	Zugesetztes CTAP-III [nM]	Gebildetes NAP-2 [nM] ^{c)}		% Inhibition
		w/o PF-4	+ PF-4	
Mz ^{a)}	1000	792 ± 124	96 ± 136	88,3 ± 17,1
	3000	2168 ± 615	326 ± 149	85,5 ± 4,0
	9000	3883 ± 1147	525 ± 89	85,3 ± 6,2
	27000	8230 ± 3740	1570 ± 1071	82,0 ± 4,8
Neu ^{b)}	1000	795 ± 83	253 ± 219	66,1 ± 29,3
	3000	2088 ± 194	648 ± 446	69,3 ± 19,4
	9000	5098 ± 697	1572 ± 731	70,1 ± 10,7
	27000	10607 ± 3199	3928 ± 1160	62,6 ± 4,5

a) α -IgE-stimulierte Hautmastzellen (1×10^4 Zellen /ml, Mz) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an CTAP-III in An- und Abwesenheit einer konstanten Dosis PF-4 (4 μ M) für 30 min bei 37°C inkubiert.

b) Unstimulierte Neutrophile (5×10^6 Zellen /ml, Neu) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an CTAP-III in An- und Abwesenheit einer konstanten Dosis PF-4 (4 μ M) für 30 min bei 37°C inkubiert.

c) Zur Quantifizierung des gebildeten NAP-2 diente die densitometrische Analyse der NAP-2 Banden nach SDS-PAGE, Western Blotting und immunochemischem Nachweis mit α - β TG. Die Daten geben die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender wieder.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die inhibitorische Wirkung des PF-4 nicht durch Erhöhung der CTAP-III-Konzentration kompetierbar ist. Damit scheint es äußerst unwahrscheinlich, daß die Inhibition durch PF-4 auf der strukturellen Ähnlichkeit zwischen PF-4 und CTAP-III, d.h. auf einem kompetitiven Mechanismus beruht. Weitere Untersuchungen zum zugrundeliegenden Hemmechanismus wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.4.4 PF-4 inhibiert die Proteolyse von Substanz P durch Chymase, Kathepsin G und Hautmastzellen

Wie die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, beruht der inhibitorische Effekt von PF-4 nicht auf einer Interaktion mit CTAP-III, sondern auf seiner direkten Wirkung auf das jeweilige Enzym. Deswegen ist es sogar vorstellbar, daß PF-4 auch die Chymase- und Kathepsin G-katalysierte Spaltung anderer Mediatoren beeinflusst, die nicht zur Familie der Chemokine gehören. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurde der Einfluß von PF-4 auf die Prozessierung eines mit CTAP-III nicht verwandten Substrates beider Enzyme, des Neuropeptids Substanz P (SP[1-11], AA-Sequenz : RPKPQQFFGLM), untersucht.

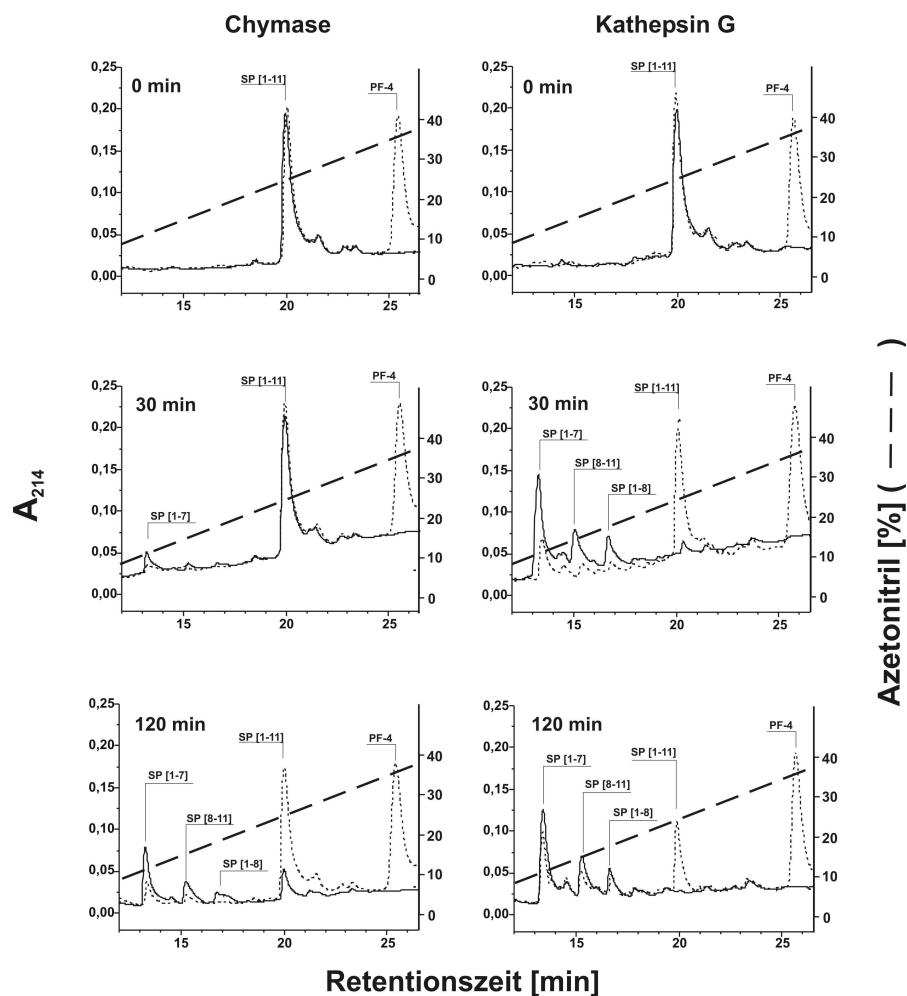


Abbildung 30 : Einfluß von PF-4 auf die Prozessierung von Substanz P durch Chymase und Kathepsin G.

Substanz P (10 µM) wurde mit 250 ng/ml Chymase (linke Spalte) und 500 ng/ml Kathepsin G (rechte Spalte) alleine (durchgezogene Linie) oder in Gegenwart von 4 µM PF-4 (gepunktete Linie) für 0, 30 und 120 min in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme der jeweiligen Elutionsprofile nach Auftrennung dieser Ansätze (200 µl) durch RP-HPLC mittels eines linearen Acetonitrilgradienten in 0,1 % TFA (gestrichelte Linie). Die Peptide wurden anhand ihrer Extinktion bei 214 nm detektiert, aufgefangen und mittels ESI-FT-MS identifiziert als intaktes SP, dessen Abbauprodukte SP[1-7], SP [1-8], SP[8-11] sowie PF-4. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment für drei unabhängige Experimente.

Wie in Abbildung 30 (obere Reihe) dargestellt, eluierte bei einer Retentionszeit von 20,4 min intaktes SP[1-11], das anhand der Masse von 1363 amu identifiziert werden konnte (entspricht exakt der kalkulierten Masse der oxidierten Form). Mit voranschreitender Inkubationszeit wurde die Menge an intakter SP[1-11] durch jedes der beiden Enzyme in Abwesenheit von PF-4 geringer. Dabei reduzierte Kathepsin G die Menge an SP[1-11] bereits innerhalb von 30 min um 97,8 % (bestimmt anhand der integralen Peakfläche) (mittlere Reihe), während Chymase erst nach 120 min zu einer größeren Reduktion (um 89,0 %) führte (untere Reihe). Im Gegenzug nahmen in allen Ansätzen die Flächen dreier neuer Peaks bei einer Retentionszeit von 13,7 min, von 15,4 min und von 17,1 min zu. Die entsprechenden Peptide wurden anhand ihrer Masse von 901 amu als SP[1-7] (kalkulierte Masse: 901 amu), von 466 amu als SP[8-11] (kalkulierte Masse: 467 amu) und von 1046 amu als SP[1-8] (kalkulierte Masse: 1048 amu) identifiziert. Wie in Abbildung 30 (untere Reihe, links) dargestellt, verringerte sich in Gegenwart von PF-4 der SP[1-11]-Peak nur um 22,4 % (gegenüber 89,0 % ohne PF-4) durch Chymase nach 120 min. Auch in den Ansätzen mit Kathepsin G nach 30 min (mittlere Reihe, rechts) verringerte sich in Anwesenheit von PF-4 der SP[1-11]-Peak nur um 40,7 % (gegenüber 97,8 % ohne PF-4). Einhergehend mit dem verringerten Abbau des intakten SP[1-11] reduzierte sich jeweils auch der Anstieg der Peaks der Abbauprodukte. Das Auftreten weiterer Abbauprodukte wurde nicht beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, daß die PF-4-vermittelte Inhibition nicht auf die Prozessierung von CTAP-III beschränkt ist, sondern auch den Chymase- und Kathepsin G-katalysierten Abbau anderer Substrate umfaßt. Damit deuten diese Resultate darauf hin, daß PF-4 als genereller Inhibitor der Enzyme Chymase und Kathepsin G wirken könnte.

Zwar ist die Fähigkeit der beiden Enzyme, Substanz P zu prozessieren, schon lange bekannt, jedoch gab es noch keine Untersuchungen zum Abbau von Substanz P durch humane Mastzellen. Aus diesem Grund hielt ich es zum Abschluß meiner Untersuchungen für wichtig, mir ein Bild über den Einfluß des PF-4 auf die prozessierende Aktivität von Mastzellen gegenüber diesem physiologisch so bedeutsamen Neuropeptid zu machen. Zu diesem Zweck wurden aktivierte Hautmastzellen mit 10 μ M SP in An- und Abwesenheit von 4 μ M PF-4 für 0, 30 und 120 min inkubiert und der Abbau des Neuropeptids mittels RP-HPLC verfolgt.

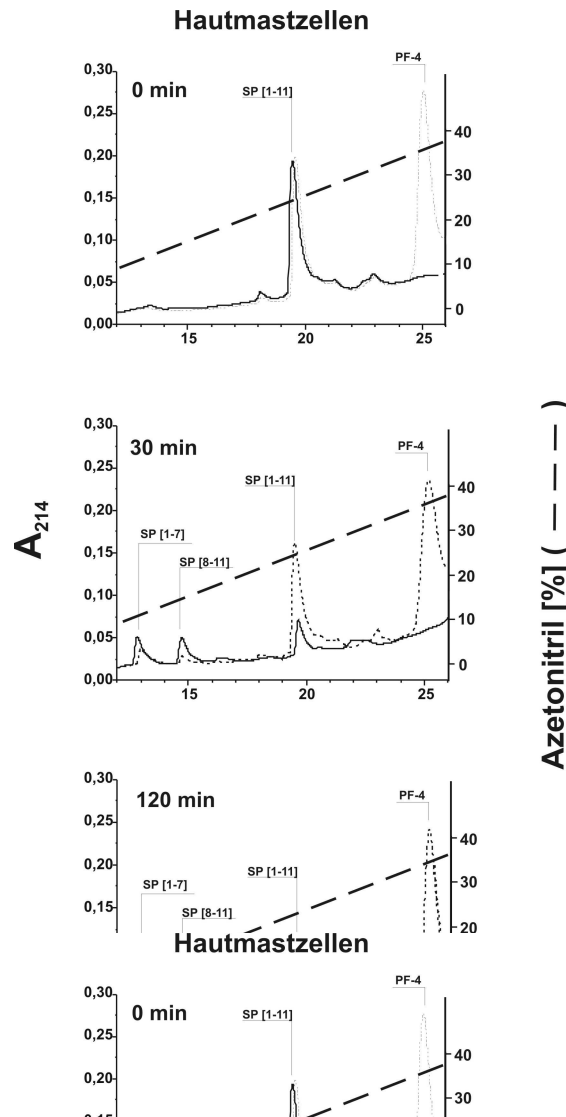


Abbildung 31 : Einfluß von PF-4 auf die Prozessierung von Substanz P durch Mastzellen

Substanz P ($10 \mu\text{M}$) wurde mit α -IgE-aktivierten Hautmastzellen alleine (durchgezogene Linie) oder in Gegenwart von $4 \mu\text{M}$ PF-4 (gepunktete Linie) für 0, 30 und 120 min in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA bei 37°C inkubiert. Dargestellt sind die Chromatogramme der jeweiligen Elutionsprofile dieser Ansätze nach Auftrennen durch RP-HPLC mittels eines linearen Acetonitrilgradienten in 0,1 % TFA (gestrichelte Linie). Die Peptide wurden anhand ihrer Extinktion bei 214 nm detektiert, aufgefangen und mittels ESI-FT-MS identifiziert als intaktes SP, dessen Abbauprodukte SP[1-7], SP [1-8], SP[8-11] sowie PF-4. Dargestellt ist ein für drei unabhängige Experimente repräsentatives Experiment.

Wie Abbildung 31 zu entnehmen ist, reduzierten Hautmastzellen die Menge an intakten SP[1-11] bereits innerhalb von 30 min dramatisch (um 86,7 %) und hatten nach 120 min das Neuropeptid schließlich vollständig abgebaut (zu 100%). Ebenso wie zuvor in den entsprechenden Ansätzen mit gereinigten Enzymen erschienen die massenspektrometrisch identifizierten Abbauprodukte SP[1-7] und SP[8-11], jedoch konnte hier kein SP[1-8] gefunden werden. Interessanterweise verschwand nach 120 min Inkubation mit Hautmastzellen auch das Spaltprodukt SP[1-7], das sich in den Ansätzen mit gereinigten

Enzymen angereichert hatte. In Gegenwart von PF-4 wurde der Abbau des intakten SP[1-11] drastisch verlangsamt. So reduzierte sich der Abbau des Neuropeptids nach 30 min auf 37,3 % und nach 120 min auf 64,4 %. Außerdem konnte in diesen Ansätzen auch nach 120 min noch das Abbauprodukt SP[1-7] detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch der von intakten Mastzellen katalysierte Abbau von SP durch PF-4 moduliert wird. Inwieweit diese Beobachtungen einen Schluß auf die mögliche physiologische Relevanz der inhibitorischen Wirkung des PF-4 auf durch Mastzellen katalysierte Prozessierungen zulassen, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4. Diskussion

Bei allergischen Entzündungen wurde beobachtet, daß akute Mastzellaktivierung zur gleichzeitigen Aggregation von Thrombozyten im benachbarten Gewebe sowie zum verzögerten Einstrom von Neutrophilen führt. Diese und andere Beobachtungen legen nahe, daß es wechselseitige Beziehungen zwischen Mastzellen und Thrombozyten gibt. Da bekannt ist, daß insbesondere Chemokine und Mastzellproteasen wesentlich am Verlauf der allergischen Entzündung beteiligt sind, untersuchte ich in dieser Arbeit einerseits die Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegenüber thrombozytären Chemokinen und andererseits mögliche Wechselwirkungen zwischen Mastzellproteasen und thrombozytären Chemokinen.

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, daß Mastzellen und thrombozytären Chemokinen sich auf unterschiedlichen Ebenen wechselseitig beeinflussen können. So exprimieren Mastzellen neben einer Reihe von Rezeptoren für andere inflammatorische Chemokine mit dem CXCR2 auch einen Rezeptor für NAP-2. Interessanterweise bewirkt dieses thrombozytäre Chemokin bei LAD-2-Zellen die Internalisierung des CXCR2 ohne ein Ca^{2+} -Signal auszulösen und kann dadurch die Zellen gegenüber einem IL-8-induzierten Ca^{2+} -Signal desensitivieren. Diese desensitivierende Wirkung hat auch der inaktive Präkursor des CTAP-III, was auf die Fähigkeit von Mastzellen zurückzuführen war, CTAP-III in NAP-2 durch das Enzym Chymase umzuwandeln. Eine regulatorische Rolle innerhalb dieses Prozesses scheint dabei dem anderen thrombozytären Chemokin PF-4 zuzufallen, da es der proteolytischen Bildung von NAP-2 aus CTAP-III als Proteaseinhibitor entgegenwirken kann.

Um die Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegenüber inflammatorischen Chemokinen zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Expression von Chemokinrezeptoren auf isolierten Hautmastzellen durchflußzytometrisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Hautmastzellen CCR1, -2 und -5 sowie CXCR2, -3, -4 exprimieren, jedoch nicht CCR3 und CXCR1. Die einzigen bis heute veröffentlichten Untersuchungen zur Chemokinrezeptorexpression auf Hautmastzellen beruhen auf mikroskopischen Aufnahmen nach immunzytochemischer Detektion mit spezifischen Antikörpern und beschreiben die Expression des CCR3^{59,60} sowie des CXCR1 und CXCR2⁶². Diese hinsichtlich der Expression von CCR3 und CXCR1 im Gegensatz zu meinen eigenen Befunden stehenden Daten könnten auf Unterschiede in den verwendeten Nachweismethoden zurückzuführen sein. Da bei der

Immunzytochemischen Färbung die Zellmembran durchlässig wird, könnten hier neben den membranständigen zusätzlich auch intrazelluläre Rezeptoren detektiert worden sein. Da die in dieser Arbeit verwendete Methode ausschließlich den Nachweis von membranassoziierten Rezeptoren erlaubt, wäre es vorstellbar, daß Hautmastzellen sich in ihrem extra- und intrazellulären Repertoire an Chemokinrezeptoren unterscheiden. Daß solche intrazellulären Rezeptoren in Mastzellen existieren, wurde bereits für den CCR3¹¹² und CXCR4^{56,57} bei aus Stammzellen differenzierte Mastzellen beschrieben.

Die Zellen der Linie LAD-2 sind hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptorexpression bis heute wenig charakterisiert. So wurde lediglich über die Expression von CXCR4 und CCR5 in der Erstbeschreibung berichtet⁶³. Andere Chemokinrezeptoren sind auf diesen Zellen bis jetzt nicht untersucht worden. Meine eigenen Untersuchungen zur Chemokinrezeptorexpression auf der Mastzelllinie LAD-2 ergaben, daß diese Zellen CCR1, -2, -5 und CXCR2, -3 und -4 exprimieren, jedoch weder CCR3 noch CXCR1. Zum einen konnte damit die von Kirshenbaum *et al.* beschriebene Expression des CCR5 und CXCR4 bestätigt werden. Zum anderen war offensichtlich, daß LAD-2-Zellen das gleiche Expressionsprofil für inflammatorische Chemokinrezeptoren zeigen wie die hier untersuchten Hautmastzellen. Da es sich um eine Zelllinie handelt, erwartete ich zunächst, daß die Zellen eher dem Phänotyp von Mastzellvorläuferzellen entsprechen würden. Laut Literaturberichten tragen aus Stammzellen differenzierte Mastzellen jedoch weder CCR1 noch CXCR3⁵⁵. Somit scheinen LAD-2-Zellen, zumindest hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptorexpression, nicht dem Phänotyp von Mastzellvorläufern anzugehören. Auch gegenüber Lungenmastzellen grenzen sich LAD-2-Zellen deutlich ab. Für Lungenmastzellen ist die Expression anderer Chemokinrezeptoren wie z.B. des CXCR1 und des CCR3 beschrieben worden⁵⁴, die sich auf LAD-2-Zellen nicht nachweisen ließen. Insgesamt geht daraus hervor, daß LAD-2-Zellen, soweit es die Rezeptoren inflammatorischer Chemokine betrifft, mit Hautmastzellen phänotypisch übereinstimmen und in dieser Hinsicht ein geeignetes Modell für Untersuchungen von Hautmastzellen repräsentieren. Ein mögliche Erklärung für die Ähnlichkeit zwischen LAD-2 und Hautmastzellen bietet die Herkunft der Zelllinie, da LAD-2-Zellen aus einem Mastozytom der Haut stammen⁶³.

Die Funktionalität der Chemokinrezeptoren auf LAD-2-Zellen wurde in dieser Arbeit anhand der Herabregulation der Rezeptoren nach Bindung der spezifischen Liganden sowie anhand des Chemokin-induzierten Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration überprüft. Diese Untersuchungen ergaben, daß alle gefundenen Rezeptoren durch Zugabe ihrer jeweiligen Liganden herabreguliert werden konnten. Mit Ausnahme von NAP-2, auf das später gesondert

eingegangen wird, waren alle getesteten Liganden in der Lage, ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal in LAD-2-Zellen auszulösen. Überraschend war jedoch die Beobachtung, daß die verwendeten Chemokine nur eine partielle Regulation ihres jeweiligen Rezeptors bewirkten, obwohl Literaturangaben zufolge auf anderen Zellen die verwendeten Chemokinkonzentrationen eine deutlichere Herabregulation des jeweiligen Rezeptors induzieren^{43,46,107,113}. Der Grund für die nur teilweise Responsivität der Rezeptoren gegenüber ihren jeweiligen Liganden ist, könnte in einer unterschiedlichen Lokalisation der Rezeptoren auf der Zelle begründet sein. Es existieren zahlreiche Hinweise in der Literatur, daß Ligandenbindung und Funktionalität von Chemokinrezeptoren deren Lokalisation in sogenannten Lipid Rafts, ein Begriff für cholesterinreiche Strukturen auf der Membran, bedingt^{114,115}. Interessanterweise ist für aus Stammzellen differenzierte Mastzellen beschrieben, daß auf der Zelloberfläche ein Teil der CCR3-Rezeptoren auf speziellen Zellausstülpungen, sogenannten Microplacae, konzentriert ist, während ein anderer Teil diffus über die gesamte Zelloberfläche verstreut liegt¹¹². Obwohl zur Zeit noch unklar ist, ob die Microplacae wirklich den Lipid rafts entsprechen, könnte dadurch erklärt werden, warum nur ein Teil der Rezeptoren durch Liganden ansprechbar ist. Die in meinen Experimenten quieszenten Rezeptoren könnten möglicherweise ein Reservoir an Chemokinrezeptoren darstellen, welches erst nach Stimulation der Zelle aktiviert wird. Eine solche Funktion wird auch dem von anderen Autoren für das bereits oben erwähnte, in aus Stammzellen differenzierten Mastzellen gefundene und intrazellulär in den Granula gespeicherte Reservoir des CCR3 zugesprochen¹¹². Von den Autoren konnte gezeigt werden, daß dieser Rezeptor während der Degranulation auf der Oberfläche erscheint. Weiter berichten die Autoren, daß anschließende Stimulation mit Eotaxin zu einer verstärkten IL-13-Bildung führt, wodurch die prinzipielle Funktionalität der Rezeptoren bewiesen wurde¹¹². Die Autoren vermuten, dieses Reservoir ermögliche vor allem die schnelle Bereitstellung von Rezeptoren direkt nach der Stimulation der Zelle. Ähnliches könnte auch für die in dieser Arbeit gefundenen, nicht ansprechbaren Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der LAD-2-Zellen gelten.

Für die vorliegende Arbeit war insbesondere die Expression der Rezeptoren für NAP-2, CXCR1 und -2, von Bedeutung. Wie die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, tragen sowohl Hautmastzellen als auch LAD-2-Zellen nur einen der beiden Rezeptoren, nämlich den CXCR2, wohingegen auf keiner der beiden Zellen der CXCR1 nachgewiesen werden konnte. Neuesten Untersuchungen in einem Mausmodell zufolge, fällt dem CXCR2 vor allem eine ganz besondere Rolle bei der Rekrutierung der Mastzellen in das Gewebe zu:

So ist die intestinale Mastzelldichte in CXCR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen drastisch vermindert, wohingegen CCR2-, CCR3- und CCR5-defiziente Mäuse keine Veränderung zeigen¹¹⁶. Laut Literaturangaben exprimieren auch humane Mastzellen aller Differenzierungsstadien den CXCR2⁵⁵, jedoch berichten eine Reihe von Autoren auch von der Expression des CXCR1 auf aus Knochenmark gereiften Mastzellen und Zellen der Linie HMC-1^{61,62}.

Angesichts der hohen NAP-2 Konzentrationen, die Mastzellen imstande sind durch Prozessierung zu bilden (darauf wird später eingegangen), erschien eine mögliche Beteiligung dieses Chemokins an der Mastzellaktivierung äußerst wahrscheinlich. Um so überraschender waren die Ergebnisse, daß NAP-2 zwar den CXCR2 auf LAD-2-Zellen herabreguliert, jedoch kein Ca^{2+} -Signal induziert. Im Vorfeld hatte sich schon gezeigt, daß IL-8 den CXCR2 auf LAD-2 herabzuregulieren und ein Ca^{2+} -Signal zu induzieren vermag, wodurch die prinzipielle Funktionalität des Rezeptors nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise stießen Lippert *et al.* bei Untersuchungen der Zelllinie HMC-1 auf ein ganz ähnliches Phänomen⁶². Sie zeigten, daß NAP-2 im Vergleich zu IL-8 trotz Bindung an die Zellen nur ein äußerst schwaches Ca^{2+} -Signal auslöst. Der Grund, weshalb NAP-2 auf Mastzellen anders wirkt als auf Neutrophile, könnte in den unterschiedlich hoch geladenen Zuckerketten der Proteoglykane auf der Zelloberfläche liegen. Die Bedeutung der oberflächengebundenen Heparansulfate für die Signalweiterleitung des CXCR2 wurde bereits von Wang *et al.* untersucht¹¹⁷. Die Autoren berichten, daß Zerstörung der Heparansulfate die Bindung von MGSA an den CXCR2 lediglich vermindert, wesentliche über den CXCR2-vermittelte Signale sowie Chemotaxis jedoch vollständig unterdrückt. Eine mögliche Erklärung fanden die Autoren in der Tatsache, daß der CXCR2 zwei unterschiedliche Bindungsstellen für Chemokine besitzt. Während eine Region das ELR-Motiv bindet, interagiert eine weitere, die als hydrophobe Tasche bezeichnet wird, mit anderen Domänen des Chemokins¹¹⁸. Insbesondere die letztgenannte Bindungsstelle scheint wesentlich durch die Ladung der umgebenen Proteoglykane beeinflusst zu werden. Da Mastzellen sehr viel stärker geladene Proteoglykane besitzen als Neutrophile, könnte dadurch die Bindung von IL-8 und NAP-2 unterschiedlich beeinflusst werden. So wäre vorstellbar, daß zwar IL-8 nicht jedoch NAP-2 die für die Bindung von G-Proteinen notwendige Konformationsänderung des Rezeptors auch auf Mastzellen bewirken kann. Einer Reihe von Literaturangaben zufolge, hängt die Internalisierung des CXCR2 jedoch nicht von der Bindung an G-Proteine ab, sondern verläuft über Endozytose in Clathrin-Vesikeln¹¹⁹. Wie schon von anderen Autoren gezeigt wurde,

können auch Liganden, die keine durch G-Proteine vermittelten Signale auslösen, trotzdem die Internalisierung der Rezeptoren bewirken¹²⁰.

Die Fähigkeit von NAP-2 den CXCR2 zu internalisieren, könnte die in dieser Arbeit festgestellte und äußerst interessante desensitivierende Wirkung von NAP-2 auf das IL-8-induzierte Ca^{2+} -Signal erklären. Wahrscheinlich bewirkt die Vorbehandlung mit NAP-2 die Internalisierung des CXCR2 auf LAD-2-Zellen, wodurch für IL-8 nicht mehr genügend Rezeptoren zur Auslösung eines Signals zur Verfügung stehen. Untermuert wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß dieselben verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen an NAP-2, die Rezeptorinternalisierung bewirken, auch zur Desensitivierung des durch IL-8 induzierten Ca^{2+} -Signals führen. Alle diese Befunde deuten darauf hin, daß NAP-2 als CXCR2-Antagonist zu IL-8 auf Mastzellen wirkt, während dasselbe thrombozytäre Chemokin einen potenten CXCR2-Agonist für Neutrophile darstellt.

Da der CXCR2 im Mausmodell, wie bereits oben erwähnt, für die Rekrutierung von Mastzellen von entscheidender Bedeutung ist, führen möglicherweise bereits geringe Konzentrationen an NAP-2 zu einem verminderten Einstrom von Mastzellen in das betroffene Gewebe. Im Gegensatz dazu würde die Akkumulation von Neutrophilen durch NAP-2 deutlich verstärkt werden. Tatsächlich wurde von verschiedenen Autoren im Verlauf allergischer Entzündungen beobachtet, daß bereits in den ersten Stunden nach Mastzelldegranulation und Thrombozytenaggregation Neutrophile in das Gewebe einwandern, während ein vermehrtes Auftreten von Mastzellen frühestens nach einigen Tagen zu beobachten war^{32,33}. Einer Reihe von Berichten zufolge, sind erhöhte Mastzelldichten im Gewebe zumeist kein Anzeichen einer akuten Entzündung, sondern eher einer chronischen Erkrankung wie beispielsweise Psoriasis¹²¹ - also von Krankheitsbildern, die im Allgemeinen nicht mit Thrombozytenaggregation in Verbindung gebracht werden. Zusammenfassend scheint NAP-2 eine Rolle bei der selektiven Rekrutierung Neutrophiler zu spielen, während es die Aktivierung von weiteren Mastzellen verhindern kann. Inwieweit NAP-2 dadurch sogar als Stellglied zwischen akuten und chronischen Erkrankungen dienen könnte, stellt ein sicherlich interessantes Ziel zukünftiger Untersuchungen dar.

Während der Untersuchung zur desensitivierenden Wirkung von NAP-2 auf das durch IL-8 induzierte Ca^{2+} -Signal zeigte sich, daß auch CTAP-III desensitivierend wirkt. Diese Entdeckung war insofern erstaunlich, als daß CTAP-III nicht an CXCR2 binden kann, da der verlängerte N-Terminus das zur Bindung an den Rezeptor notwendige ELR-Motiv des Chemokins überdeckt. Somit lag die Vermutung nahe, daß Mastzellen ähnlich wie

Neutrophile durch proteolytische Abspaltung eines 15 AS langen N-terminalen Peptids CTAP-III in funktionelles NAP-2 umwandeln. Tatsächlich stellte ich fest, daß Mastzellen die Fähigkeit besitzen, exogenes CTAP-III zu biologisch aktivem NAP-2 zu prozessieren. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß nicht nur Blutzellen, wie Neutrophile und in einem geringeren Ausmaß auch Monozyten^{69,71}, sondern auch Zellen außerhalb des Blutes befähigt sind, diesen notwendigen Schritt zur Entstehung von NAP-2 zu vollziehen. Interessanterweise ergab der direkte Vergleich zwischen der Kapazität von Neutrophilen und Mastzellen zur , daß bereits eine 30fach geringere Zahl an unstimulierten Mastzellen bzw. eine ca. 1000fach geringere Zahl an α -IgE-stimulierten Mastzellen ausreicht, um die Kapazität Neutrophiler zu erreichen. Berücksichtigt man, daß die Dichte von Mastzellen in normaler Haut ($0,4-1,3 \times 10^4$ Mastzellen/mm³)¹²² in etwa der Konzentration von Neutrophilen im Blut ($0,5-1 \times 10^4$ Neutrophile/mm³) entspricht, so wird das enorme physiologische Potential der Mastzellen zur CTAP-III-Prozessierung offenkundig. Vor diesem Hintergrund weist insbesondere der Befund auf die Relevanz der Mastzellen hin, daß bereits 1×10^4 α -IgE-aktivierte Mastzellen /ml innerhalb von 10 min durch Prozessierung von CTAP-III 400 ± 85 nM NAP-2 generieren – eine Chemokinkonzentration, die 40-fach bzw. 300-fach den Schwellenwert zur Auslösung wichtiger Neutrophilenfunktionen wie Elastase-Freisetzung (10 nM)¹²³ und Chemotaxis (1,3 nM)⁵¹ übersteigt. In Anbetracht der hohen Umsatzgeschwindigkeit durch α -IgE-aktivierte Mastzellen (46,4 nM NAP-2/ min entspricht 357 ng NAP-2/ ml/ min), wären damit biologisch relevante NAP-2-Konzentrationen innerhalb von Sekunden verfügbar. Dabei scheint das theoretisch in den Zellen vorhandene Potential zur Prozessierung noch deutlich höher zu sein, wie aus der ca. 4-fach beschleunigten Umsatzgeschwindigkeit von Mastzelllysaten gegenüber α -IgE-stimulierten Mastzellen hervorgeht. Während die Kapazität von Mastzellen zur proteolytischen Aktivierung von Chemokinen hier erstmalig beschrieben wurde, ist ihre Fähigkeit zur Produktion von Chemokinen bereits seit langem bekannt. Besonders gut untersucht ist die Freisetzung von präformiertem und neu synthetisiertem IL-8 durch Mastzellen, welches sich gegenüber NAP-2 u.a. durch seine ca. 20-fach höhere Potenz bei der Induktion von Neutrophilen-Transmigration auszeichnet¹²⁴. Legt man die in der Literatur beschriebenen Werte des im Überstand α -IgE-stimulierter Mastzellen nach Stunden gemessenen IL-8 von 5-30 ng/ 10^6 Mastzellen zugrunde^{26,102}, ist trotz der niedrigeren Potenz von NAP-2 eine maßgebliche Beteiligung der durch Proteolyse bewirkten NAP-2-Aktivierung an der Neutrophilenrekrutierung sehr wahrscheinlich.

Bemerkenswert war der Befund, daß Mastzellen die Prozessierung von CTAP-III im Wesentlichen durch Chymase katalysieren, obwohl auch die Expression von Kathepsin G in diesen Zellen beschrieben ist¹⁹. In meinen Experimenten stellte sich heraus, daß beide Enzyme eine ähnlich hohe Aktivität gegenüber CTAP-III als Substrat aufweisen. Der Grund für die geringe Bedeutung des Kathepsin G für die durch Mastzellen vermittelte Prozessierung könnte in dem laut Literaturangaben deutlich niedrigeren Gehalt an Kathepsin G (0,1 – 0,7 pg/ Mastzelle)¹²⁵ gegenüber Chymase (4,5 pg/ Mastzelle)¹⁰¹ liegen.

Deutliche Unterschiede zwischen Mastzellen und Neutrophilen taten sich bei der Prozessierung von PBP auf, die auf eine besondere Rolle dieses Präkursors in der Feinabstimmung der Bildung von NAP-2 vermuten lassen. Im Einklang mit zuvor publizierten Befunden⁶⁸ konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, daß Kathepsin G den Präkursor PBP ungefähr fünfmal schneller prozessiert als CTAP-III. Der Präkursor PBP macht ca. 20 % des von Thrombozyten freigesetzten β -TG Ag gegenüber 80 % CTAP-III aus¹²⁶, weswegen PBP im Anfangsstadium einer Entzündung eine bedeutende Quelle des durch Neutrophile und Kathepsin G generierten NAP-2 sein müßte. Da das vorhandene PBP jedoch schnell aufgebraucht sein dürfte, vermuten andere Autoren, die Prozessierung von PBP durch Neutrophile stelle die schnelle Verfügbarkeit von NAP-2 vor allem in der initialen Phase der Entzündung sicher⁶⁸. Wie sich in Versuchen zeigen ließ, prozessieren Chymase und Mastzellen beide Vorläufer hingegen mit fast identischer Umsatzgeschwindigkeit. Damit scheint die Präsenz von PBP selektiv die durch Neutrophile vermittelte NAP-2-Bildung zu beschleunigen, während sie für Mastzellen keine besondere Bedeutung zu haben scheint.

Zahlreiche in dieser Arbeit erhaltene Befunde deuten darauf hin, daß sich Mastzellen und Neutrophile in den Mechanismen der Prozessierung deutlich unterscheiden, was möglicherweise ihrer verschiedenen Lokalisation und Motilität sowie ihren individuellen Aufgaben in der Entzündung Rechnung trägt. Besonders deutlich wird dieses in dem Umstand, daß Mastzellen den weit überwiegenden Teil ihrer CTAP-III-prozessierenden Aktivität freisetzen, während diese bei Neutrophilen hauptsächlich zellgebunden vorliegt.

Literaturangaben zufolge hemmt bereits die Zugabe von 0,1 % Plasma die Prozessierung durch Neutrophile vollständig, was durch die hohen Empfänglichkeit des Kathepsin G für Plasmainhibitoren bedingt ist¹²⁷. Allerdings ist auch beschrieben, daß in einen Thrombus eingeschlossene Neutrophile CTAP-III auch in Gegenwart von Plasma prozessieren¹²⁸, was wahrscheinlich auf den Ausschluß von Plasma aus den Thromben zurückzuführen ist. Damit ist es wahrscheinlich, daß Neutrophile zunächst in plasmafreie Kompartimente migrieren, um dort nachfolgend die eigentliche Prozessierung durch zellgebundenes Kathepsin G

durchzuführen. Im Gegensatz zu den mobilen Neutrophilen sind adulte Mastzellen nahezu sessil im Gewebe verankert. Daher ist es nicht verwunderlich, daß Mastzellen durch Freisetzung von Chymase in einem begrenzten Areal ein Milieu generieren, in dem NAP-2 entstehen kann. Tatsächlich konnte von anderen gezeigt werden, daß exozytierte Chymase an der Oberfläche anderer, benachbarter Zellen gebunden wird. Daher ist anzunehmen, daß sich im Gewebe um die degranulierte Mastzelle ein immobilisierter Chymase-Gradient ausbildet. Wie aus zahlreichen Untersuchungen zum Chymase- und Tryptasegehalt des Blutes akut allergischer Patienten hervorgeht, scheint jedoch Chymase selbst, ganz im Gegensatz zu Tryptase, nicht in das Blutgefäßsystem einzudringen^{129,130}. Vielmehr steigert Chymase die Permeabilität der Gefäßwand¹³¹, was den Einstrom von Plasmakomponenten und vermutlich auch von thrombozytären Chemokinen zur Folge hat. Wahrscheinlich bildet das einströmende CTAP-III selbst einen Gradienten aus, der dem nach Mastzelldegranulation aufgebauten Chymase-Gradienten entgegengesetzt verläuft. Infolge der Prozessierung könnte sich so an den überlappenden Arealen von Enzym und Substrat ein für die Rekrutierung von Neutrophilen förderlicher Gradient an NAP-2 entwickeln.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Mastzellen und Neutrophilen betraf den Einfluß der Zellaktivierung. So stellte sich heraus, daß stimulierte Mastzellen eine ca. 30-fach höhere prozessierende Aktivität aufweisen als unstimulierte Mastzellen, während Aktivierung der Neutrophilen praktisch keinen Einfluß auf deren Fähigkeit zur Spaltung von CTAP-III hat. Dieses Phänomen könnte mit den individuellen Aufgaben der beiden Zelltypen bei der Koordination der Entzündung zusammenhängen. Während Mastzellen als primäre Induktoren die allergische Entzündung nach Kontakt mit einem Allergen selbst initiieren, stellen Neutrophile sekundär ins Gewebe einwandernde Effektorzellen dar. Da die CTAP-III-prozessierende Aktivität der Neutrophilen im Blut ohnehin einer strikten Suppression durch Plasmainhibitoren unterliegt^{69,128}, scheint es nicht erforderlich, die Enzymaktivität durch die Notwendigkeit der Zellaktivierung zusätzlich abzusichern. Bei Mastzellen im Gewebe ist die Suppression der Chymaseaktivität durch Plasmainhibitoren nicht gegeben. Da Chymase über eine Reihe verschiedener Mechanismen selbst entzündliche Prozesse in Gang setzen kann, scheint die für die Prozessierung erforderliche Zellaktivierung einen Sicherungsmechanismus gegenüber ungerichteten Aktivierungsprozessen darzustellen.

Eine besonders interessante Entdeckung dieser Arbeit war die regulative Wirkung von PF-4 auf die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen. Vor allem die hohe Potenz als Inhibitor spricht für die physiologische Relevanz des PF-4 bei der Regulation der Verfügbarkeit von

NAP-2. PF-4 bewirkte bereits in einer Konzentration von 75 nM halbmaximale und ab 1,2 μ M PF-4 maximale Hemmung der NAP-2-Bildung. Legt man durchschnittliche Konzentration im Serum von 0,4 – 1,9 μ M PF-4 zugrunde⁶⁴, liegen die inhibitorisch wirksamen Konzentrationen deutlich innerhalb des physiologisch relevanten Bereiches. Eindrucksvoll ist auch die besonders hohe Kapazität der Inhibition, die bei über 85 % Hemmung der NAP-2-Bildung durch Mastzellen innerhalb von 30 min lag. Über längere Zeiträume von bis zu 120 min, konnte keine weitere NAP-2-Bildung beobachtet werden, was für eine hohe Nachhaltigkeit der Hemmung spricht.

Vermutlich liegt die Bedeutung des PF-4 nicht in der Unterdrückung der NAP-2-Bildung, sondern in der räumlichen Stabilisierung des NAP-2-Gradienten im Gewebe. Schon länger ist bekannt, daß kationische Proteine im Gewebe weniger weit diffundieren als anionische. Der Grund dafür ist, daß kationische Proteine, wie u.a. auch Chymase, an die stark sauren, auf nahezu allen Gewebezellen verbreiteten Proteoglykane binden. Interessanterweise unterscheidet sich das fast neutral geladene CTAP-III mit einem theoretischen pI von 7,85 deutlich von den beiden stark kationischen Chemokinen PF-4 und NAP-2 mit einem theoretischen pI von 8,8 und 8,79. Daher ist anzunehmen, daß CTAP-III im Körper deutlich weiter diffundiert als PF-4 und erst nach Umwandlung in NAP-2 an den Zellen immobilisiert wird. PF-4 würde also die Prozessierung in der Nähe des Endothels verlangsamen, wohingegen sich mit zunehmender Entfernung die Menge des gebildeten NAP-2 erhöht. Das erlaubt den Aufbau eines deutlich steileren Gradienten und damit eine Fokussierung der Neutrophilen auf den Ort der Entzündung.

Die zum Vergleich durchgeführten Untersuchungen zum inhibitorischen Effekt von PF-4 auf die CTAP-III Prozessierung durch Neutrophile erbrachten Resultate, die mit denen von Dr. Tobias Grimm im Einklang stehen. Abgesehen von der etwas geringeren Potenz (halbmaximale Inhibition bei 220 nM PF-4) und Kapazität (80 %) ähnelten die Charakteristika der Inhibition der Neutrophilen-vermittelten Prozessierung weitgehend der bei Mastzellen beobachteten Hemmung. Da diese beiden Zelltypen die einzig bekannten, relevanten Aktivatoren von CTAP-III sind, fällt PF-4 damit wahrscheinlich die Rolle eines generellen Regulators der Verfügbarkeit von NAP-2 zu.

Meine Untersuchungen zur Art des zugrundeliegenden Hemmechanismus' ergaben, daß PF-4 neben der Aktivität von intakten Zellen auch die Prozessierung durch Mastzelllysate und darüber hinaus auch die Prozessierung durch gereinigte Chymase hemmt. Somit ist die hemmende Wirkung von PF-4 nicht auf intakte Zellen angewiesen, sondern beruht auf der direkten Inhibition der Proteolyse von CTAP-III.

Unklar war jedoch zunächst, ob der Inhibition eine Interaktion von PF-4 mit dem Substrat oder mit dem Enzym zugrundeliegt. Daß physische Interaktion zwischen verschiedenen Chemokinen z.B. über die Bildung von Heterooligomeren möglich ist und zu einer Veränderung ihrer biochemischen und funktionellen Eigenschaften führt, ist in der Literatur für PF-4 und RANTES¹³² sowie für PF-4 und IL-8¹³³ beschrieben worden. Dr. Tobias Grimm fand zuvor durch Kreuzvernetzungsstudien heraus, daß auch PF-4 und CTAP-III Heterooligomere bilden, beschrieb jedoch gleichzeitig, daß selbst in einem 9000-fachen Überschuß von PF-4 noch ca. 60 % des CTAP-III als ungeschütztes und proteolytisch spaltbares Monomer vorliegt⁸¹. Ein weiteres Argument gegen die Theorie der Inhibition durch Chemokin-Chemokin-Interaktion ist, daß in meinen Experimenten die CTAP-III-Spaltung durch Chymotrypsin, ein der Chymase homologes und strukturell ähnliches Enzym, nicht durch PF-4 gehemmt wurde, wie es bei einem potentiell unspaltbaren Heterooligomer hätte der Fall sein müssen. Somit sprechen alle Indizien für eine Wirkung von PF-4 als Inhibitor der Enzyme Chymase und Kathepsin G. Diese These wird zusätzlich durch den Befund untermauert, daß auch die Chymase- und Kathepsin G-vermittelte Spaltung von Substanz P, einem mit CTAP-III nicht verwandtem Neuropeptid, durch PF-4 inhibiert wird. Tatsächlich sind einige wenige Berichte über die aktivitätsmodulierende Wirkung von PF-4 auf Enzyme in der Literatur zu finden. In einer älteren Arbeit wurde die Inhibition von Collagenase durch PF-4 beschrieben^{134,135}. Der Mechanismus der Hemmung konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Mit weitaus mehr Interesse wird zur Zeit der aktivitätssteigernde Einfluß von PF-4 auf Thrombin verfolgt. Es wurde allerdings beschrieben, daß PF-4 nicht direkt auf das Enzym wirkt, sondern durch Bindung an Thrombomodulin die Affinität dieses als aktivierendes Hilfsmolekül wirkenden Faktors gegenüber Thrombin erhöht, was zu einem Ansteigen der Enzymaktivität führt¹³⁵⁻¹³⁷.

Während ansonsten keine weiteren Effekte von PF-4 auf Enzyme beschrieben worden sind, existieren zahlreiche Befunde über Mechanismen mittels derer die Aktivität von Chymase inhibiert werden kann. Da Chymase und Kathepsin G sehr ähnliche Substratspezifität besitzen und PF-4 mit einem Tyrosinrest an Position 60 für beide Proteasen eine potentielle Schnittstelle enthält, waren vor allem solche Hemmechanismen denkbar, die direkt auf die enzymatische Aktivität der Protease und die Spaltung des Substrates einwirken. Solche Hemmechanismen wurden bereits zuvor beschrieben. So verlangsamt die Anwesenheit des Chymasesubstrates Serumalbumin den gleichzeitigen Umsatz anderer Substrate durch die Protease und wirkt somit als kompetitives Substrat¹³⁸. Einen völlig unterschiedlichen Hemmechanismus, der auch über die enzymatische Aktivität des Enzyms vermittelt wird,

stellen sogenannte „Selbstmord-Substrate“ (*suicide substrates*) wie das Serpin SCCA2 dar. Nach Spaltung von SCCA2 durch Chymase reagiert das größere Spaltprodukt direkt mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms und wirkt so als irreversibler und nicht-kompetitiver Inhibitor¹³⁹. Sowohl bei kompetitiven als auch bei „Selbstmord-Substraten“ sind Abbauprodukte zu finden. Allerdings führte in meinen Experimenten die Inkubation von PF-4 mit Chymase auch nach 120 min weder zum Auftreten von Abbauprodukten noch zu einer Reduktion der PF-4-Menge. Überdies spricht auch der Befund, daß die Inhibition durch eine gleichbleibende Dosis an PF-4 bei verschiedenen CTAP-III-Konzentrationen konstant bei ca. 80 % (Chymase) bzw. 70 % (Kathepsin G) blieb, gegen eine Wirkung von PF-4 als kompetitives Substrat. Daher kann ausgeschlossen werden, daß PF-4 am katalytischen Zentrum des Enzyms angreift und die proteolytische Aktivität der Chymase oder des Kathepsin G selbst für die inhibitorische Wirkung des PF-4 verantwortlich ist.

Überraschend war, daß keine relevanten Unterschiede zwischen Haut- und Lungenmastzellen hinsichtlich der Prozessierung von CTAP-III und der Inhibition durch PF-4 gefunden werden konnten. Diese Ähnlichkeit zwischen Haut- und Lungenmastzellen war insofern erstaunlich, als daß älteren Berichten zufolge nur ca. 10 % von fixierten Lungenmastzellen Immunreaktivität gegenüber Chymase-spezifischen Antikörpern aufweisen¹⁰¹. Diese älteren Studien basieren auf der Färbung Formalin-fixierter Gewebeschnitte. Neueren Studien zufolge, blockiert Formalin-Fixierung jedoch bei Lungenmastzellen die Immunreaktivität von Chymase, was vermutlich auf den im Vergleich zu Hautmastzellen unterschiedlichen Aufbau ihrer Ultrastruktur zurückzuführen ist¹⁴⁰. In einer aktuelleren Untersuchung stellte sich jedoch heraus, daß mit neueren Fixierungsmethoden sowohl Gewebeschnitte als auch isolierte Lungenmastzellen deutliche Immunreaktivität gegenüber Chymase besitzen¹⁴¹. Bis heute sind allerdings noch keine Studien zur Chymaseaktivität in Lungenmastzellen bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate hinsichtlich der CTAP-III-Prozessierung durch Lungenmastzellen sprechen jedoch eindeutig dafür, daß auch Lungenmastzellen eine ähnliche Chymaseaktivität besitzen wie Hautmastzellen. Ferner weisen meine Daten darauf hin, daß die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen nicht nur in der Haut, sondern auch in anderen Organen wie der Lunge den Verlauf inflammatorischer Prozesse wie z.B. allergisches Asthma beeinflussen könnte.

Nach einer von Ludwig *et al.*⁵¹ entworfenen und von Schenk¹²⁸ weiterentwickelten Modellvorstellung findet durch Neutrophile katalysierte NAP-2-Bildung vor allen im Thrombus unter Ausschluß von Plasma statt. Dabei wird vermutet, daß in der Anfangsphase der Entzündung PBP die Hauptquelle des von Neutrophilen gebildeten NAP-2 darstellt, da Ehlert *et al.* über die deutlich schnellere Prozessierung von PBP im Vergleich zu CTAP-III durch Neutrophile und durch Kathepsin G berichten⁶⁸. Durch die Umsetzung beider Substrate werden die prozessierenden Neutrophilen selbst durch das von ihnen gebildete NAP-2 desensitiviert und reagieren nicht mehr chemotaktisch auf weitere Stimulation mit NAP-2. Daher vermuten Ludwig *et al.*, daß die prozessierenden Neutrophilen selbst nicht zur Infektionsabwehr in das Gewebe auswandern, sondern im Thrombus verbleiben, um durch Prozessierung von CTAP-III weiterhin der homotypischen Rekrutierung zusätzlicher Neutrophiler zum Ort der Thrombozytenaktivierung zu dienen⁵¹. Diese Modellvorstellung erweiterte Grimm durch seinen Befund, daß PF-4 die Prozessierung durch Neutrophile reguliert⁸¹. Er nimmt an, daß die Rolle des PF-4 als Inhibitor dieser Prozessierung eher in einer Verlangsamung als in einer vollständigen Unterdrückung der NAP-2-Bildung liegt. Somit könnte PF-4 einer zu rasanten CTAP-III-Prozessierung vorbeugen und die gleichmäßige Ausbildung eines NAP-2-Gradienten fördern.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhaltenen Daten, schlage ich eine Erweiterung der aktuellen Modellvorstellung um die Interaktion von Mastzellen und thrombozytären Chemokinen vor. Infolge einer gleichzeitigen Aktivierung von Thrombozyten und Mastzellen werden große Mengen von thrombozytären Chemokinen und Chymase freigesetzt. Nach Diffusion des CTAP-III und PBP in das Gewebe tritt vermutlich nach Kontakt mit der freigesetzten Chymase eine schnelle Umwandlung in NAP-2 ein, welches eine rasche Akkumulation von Neutrophilen in dem betroffenen Gewebe nach sich ziehen würde. Im Gegensatz zu Neutrophilen stammt hier jedoch der größte Teil des gebildeten NAP-2 vermutlich nicht aus PBP, sondern aus dem mengenmäßig vorherrschenden CTAP-III, wie die ähnlich schnellen Umsatzgeschwindigkeiten von beiden Substraten durch Mastzellen und Chymase vermuten lassen. Ähnlich empfänglich sind sich die beiden Zelltypen für die Inhibition der Prozessierung durch das gleichzeitig mit CTAP-III abgegebene PF-4. Vermutlich übt PF-4 jedoch bei der von Mastzellen vermittelten Ausbildung des NAP-2-Gradienten eher eine räumliche anstatt einer zeitlichen Kontrollfunktion aus. Da PF-4 aufgrund seiner stärker kationischen Ladung vermutlich weniger weit in das Gewebe diffundiert als CTAP-III, würde auch die Menge des gebildeten NAP-2 mit wachsender Entfernung vom Endothel bis zu den degranulierenden Mastzellen hin stetig zunehmen.

Dadurch würde PF-4 dem NAP-2-Gradienten eine schärfere Kontur verleihen, wodurch die einströmenden Neutrophilen noch präziser zum Ort der Mastzellaktivierung hin gelenkt werden könnten. Die desensitivierende Rückwirkung des gebildeten NAP-2 auf die prozessierenden Mastzellen selbst scheint entsprechend dem Neutrophilen-Modell ein Schutzmechanismus gegenüber der Aktivierung durch andere CXCR2-Liganden zu sein. Anders als bei Neutrophilen scheint NAP-2 jedoch auch keine durch Chemokine typischerweise induzierten Aktivitäten in nicht-prozessierenden Mastzellen auszulösen. Da NAP-2 auch bei diesen Zellen ein IL-8-Signal inhibieren kann, deutet vieles darauf hin, daß NAP-2 gleichzeitig proinflammatorisch auf Neutrophile und antiinflammatorisch auf Mastzellen wirken kann.

Folglich ist eine Frage, die sich aus den in dieser Arbeit gewonnenen Resultaten für zukünftige Projekte ergibt, welche potentielle Wirkung NAP-2 auf Mastzellen haben könnte. Die desensitivierende Wirkung des NAP-2 auf Mastzellen gegenüber Stimulation mit IL-8 deutet bereits auf eine mögliche antiinflammatorische Wirkung dieses Chemokins hin. Einen zusätzlichen Hinweis auf eine mögliche antiinflammatorische Wirkung von NAP-2 auf Mastzellen lieferte hier ein erstes Pilotexperiment, in dem NAP-2-stimulierte LAD-2-Zellen mittels eines *microarray* auf die Regulation von über 1000 Genprodukten untersucht wurden. In diesem Experiment wurde die mRNA von IL-10 sowie diejenige von TIMP-2 und -4 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) am deutlichsten aufreguliert – also von Mediatoren, die allgemein als antiinflammatorisch gelten. Insbesondere die Aufregulation von TIMP-2 und -4 könnte zusätzlich darauf hindeuten, daß NAP-2 auch den zeitlichen Verlauf des *tissue remodeling* reguliert, indem es in der Frühphase der Entzündung die Rekrutierung von Neutrophilen vorantreibt, die u.a. durch die Metalloproteinase Gelatinase B zum *tissue remodeling* beitragen. Im weiteren Verlauf der Entzündung könnten die durch NAP-2 in Mastzellen induzierten Metalloproteinaseinhibitoren die Aktivität der Gelatinase B drosseln und den Prozess des *tissue remodeling* abmildern.

Ein zweiter wichtiger Komplex zukünftiger Untersuchungen könnte die potentielle Wirkung von durch Neutrophile freigesetzten Faktoren auf Mastzellen selbst und auf die durch Mastzellen vermittelte CTAP-III-Prozessierung sein. So zeigten erste Experimente, daß aus Neutrophilen isolierte α -Defensine innerhalb physiologisch relevanter Konzentrationen in LAD-2-Zellen sowohl ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal induzieren als auch die Freisetzung von Hexosaminidase bewirken können. Neutrophile beinhalten jedoch auch Mediatoren, die eine

Hemmung von Mastzellfunktionen bewirken können, wie Lactoferrin, das als Inhibitor der Chymase bekannt ist und somit der CTAP-III-Prozessierung entgegenwirken könnte.

In dieser Arbeit konnte erstmals durch die Bildung von NAP-2 aus CTAP-III gezeigt werden, daß Mastzellen und Chymase die biologische Aktivität von Chemokinen durch Proteolyse verändern können. Eine Vielzahl von Indizien gibt jedoch Anlaß zu der Vermutung, daß Chymase auch die Aktivität anderer Chemokine beeinflussen könnte und somit sogar eine übergeordnete Funktion bei der Regulation der Chemokinaktivität einnehmen könnte. In dieser Hinsicht besonders aussichtsreiche Chemokine wären u.a. CCL15¹⁴² und ENA-78⁸², da bereits von anderen Autoren gezeigt wurde, daß Prozessierung durch Kathepsin G die biologische Aktivität dieser Chemokine erhöht. Dabei spaltet Kathepsin G beide Chemokine an chymotryptischen Spaltstellen, die wahrscheinlich auch für Chymase zugänglich sind. Insbesondere das CCL15 erscheint in diesem Zusammenhang interessant, da es bereits präformiert im Blut vorliegt und, ähnlich wie CTAP-III, erst nach Prozessierung seine volle biologische Aktivität entfaltet. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen könnten zusammen mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten zum besseren Verständnis der wechselseitigen Regulationmechanismen zwischen Chemokinen und Mastzellen in inflammatorischen Prozessen beitragen.

5. Zusammenfassung

Bei allergischen Entzündungen führt akute Mastzellaktivierung zur gleichzeitigen Aggregation von Thrombozyten im angrenzenden Gewebe sowie zum verzögerten Einstrom von Neutrophilen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß es Interaktionen zwischen Mastzellen und Thrombozyten sowie zwischen deren Mediatoren gibt. Daher war es zentraler Gegenstand dieser Arbeit, sowohl die Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegenüber thrombozytären Chemokinen als auch die Wirkung von Mastzellproteasen auf thrombozytäre Chemokine zu untersuchen.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurde zunächst ein Verfahren etabliert, welches die Gewinnung von Mastzellen aus humaner Haut ermöglicht. Diese aus vier Schritten bestehende Methode beinhaltet den Aufschluß des Gewebes, die Mastzellanreicherung mittels Dichtegradientenzentrifugation, die Mastzellaufreinigung durch Magnetseparation und schließlich die Mastzellkultur. Dieses Verfahren ermöglichte die Gewinnung von hinreichend reinen ($>90\%$) und funktionell aktivierbaren Hautmastzellen, jedoch erwies sich die Ausbeute mit etwa $3,5 \times 10^4$ Mastzellen /g Hautgewebe für einige Experimente als zu gering. Aus diesem Grund wurden parallel Zellen der Mastzelllinie LAD-2 mit untersucht. In durchflußzytometrischen Untersuchungen zur Charakterisierung des Rezeptorprofils für inflammatorische Chemokine zeigten sowohl Hautmastzellen als auch LAD-2-Zellen Expression von CCR1, -2 und -5 und von CXCR2, -3 und -4, jedoch weder von CXCR1 noch von CCR3. Die Funktionalität der Rezeptoren auf LAD-2-Zellen wurde durch Experimente zur Rezeptorinternalisierung und zur Bildung von intrazellulären Ca^{2+} -Signalen nachgewiesen. Die Expression eines funktionellen CXCR2 auf LAD-2-Zellen warf die Frage auf, ob auch der korrespondierende Ligand NAP-2 (*neutrophil activating protein 2*) Mastzellen aktivieren könne. Das aus Thrombozyten stammende NAP-2 bewirkte in LAD-2-Zellen zwar eine Herabregulation des CXCR2, löste jedoch weder Degranulation noch ein intrazelluläres Ca^{2+} -Signal in diesen Zellen aus. Vielmehr wirkte NAP-2 bereits in geringen Konzentrationen desensitivierend auf das durch IL-8-induzierte Ca^{2+} -Signal. Überraschenderweise zeigten weitere Untersuchungen, daß auch der inaktive Präkursor des NAP-2, das CTAP-III (*connective tissue activating peptide III*), ein durch IL-8 induziertes Ca^{2+} -Signal in LAD-2-Zellen desensitivieren konnte. Eine Erklärung für diese Wirkung des CTAP-III bot der Befund, daß sowohl Hautmastzellen als auch in viel geringerem Maße LAD-2-Zellen CTAP-III in NAP-2 umwandeln können. Bisher konnte eine physiologisch relevante Kapazität zur proteolytischen Spaltung von CTAP-III nur für Neutrophile

nachgewiesen werden. In einem direkten Vergleich zwischen Mastzellen und Neutrophilen erwiesen sich unstimulierte Haut- und Lungenmastzellen als 30-fach effizienter in der Prozessierung von CTAP-III. Noch deutlicher fiel der Unterschied nach Stimulation der Mastzellen mit α -IgE aus, nach der eine gegenüber Neutrophilen um das 1000-fache erhöhte Kapazität zur Prozessierung gemessen wurde. Interessanterweise gaben Mastzellen im Gegensatz zu Neutrophilen ihre prozessierende Aktivität nahezu vollständig in den Überstand ab. Dabei korrelierte die durch verschiedene Stimulantien hervorgerufene unterschiedlich hohe Degranulation der Mastzellen mit ihrer CTAP-III-prozessierenden Kapazität. Wie sich in Versuchen mit Protease-Inhibitoren herausstellte, vermitteln Mastzellen die CTAP-III-Prozessierung nicht wie Neutrophile durch Kathepsin G, sondern durch das Enzym Chymase. Da bereits bekannt ist, daß Kathepsin G und Neutrophile den anderen thrombozytären NAP-2-Vorläufer PBP deutlich schneller als CTAP-III prozessieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwieweit sich auch die durch Mastzellen und Chymase-vermittelte Prozessierung beider Vorläufermoleküle unterscheidet. In diesen Experimenten stellte sich heraus, daß sowohl Chymase als auch Hautmastzellen beide Vorläufer mit nahezu identischer Geschwindigkeit umsetzen und sich somit auch in dieser Hinsicht deutlich von Neutrophilen und Kathepsin G unterscheiden. Im abschließenden Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit die prozessierende Aktivität in Mastzellen physiologisch modulierbar ist. Aus Literaturbefunden war bekannt, daß ein anderes thrombozytäres CXC-Chemokin, das PF-4 (*platelet factor 4*), der durch Neutrophile katalysierten Umwandlung von CTAP-III in NAP-2 entgegenwirken kann. In entsprechenden Experimenten zeigte sich, daß PF-4 in physiologisch relevanten Konzentrationen die CTAP-III-Prozessierung durch Mastzellen sogar noch effektiver hemmen kann als diejenige durch Neutrophile. Bei der Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus stellte sich heraus, daß PF-4 als direkter Inhibitor der prozessierenden Enzyme Kathepsin G und Chymase wirkt, jedoch weder als kompetitives Substrat noch als kompetitiver Inhibitor auftritt. Da auch die durch Kathepsin G, Chymase und Hautmastzellen vermittelte Prozessierung des mit CTAP-III nicht verwandten Neuropeptids Substanz P inhibiert wurde, scheint PF-4 nicht nur eine Rolle bei der Regulation der Verfügbarkeit von NAP-2 zu spielen, sondern auch die durch Neutrophile und Mastzellen katalysierte Prozessierung anderer inflammatorischer Mediatoren zu beeinflussen. Insgesamt zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, daß Mastzellproteasen und thrombozytäre Chemokine sich wechselseitig beeinflussen können und möglicherweise über komplexe Regulationsmechanismen zur Neutrophileneinwanderung während der Frühphase der allergischen Reaktion beitragen können.

6. Literatur

- (1) **Lawrence ID**, Warner JA, Cohan VL *et al.* Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *J Immunol.* 1987;139:3062-3069.
- (2) **Schulman ES**, MacGlashan DW, Jr., Peters SP *et al.* Human lung mast cells: purification and characterization. *J Immunol.* 1982;129:2662-2667.
- (3) **Bischoff SC**, Schwengberg S, Raab R, Manns MP. Functional properties of human intestinal mast cells cultured in a new culture system: enhancement of IgE receptor-dependent mediator release and response to stem cell factor. *J Immunol.* 1997;159:5560-5567.
- (4) **Patella V**, Marino I, Lamparter B *et al.* Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J Immunol.* 1995;154:2855-2865.
- (5) **Kirshenbaum AS**, Goff JP, Kessler SW *et al.* 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;148:772-777.
- (6) **Valent P**, Spanblochl E, Sperr WR *et al.* Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood.* 1992;80:2237-2245.
- (7) **Bischoff SC**, Sellge G, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP. Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118:104-107.
- (8) **Valent P**. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp Dermatol.* 1995;4:255-259.
- (9) **Ehrlich P**. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Promotionsschrift Leipzig. 1878.
- (10) **Caulfield JP**, Lewis RA, Hein A, Austen KF. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol.* 1980;85:299-312.
- (11) **Okayama Y**, Semper A, Holgate ST, Church MK. Multiple cytokine mRNA expression in human mast cells stimulated via Fc epsilon RI. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107:158-159.
- (12) **Bradding P**, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol.* 1995;155:297-307.

-
- (13) **Walsh LJ**, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4220-4224.
 - (14) **Enerback L**. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1966;66:289-302.
 - (15) **Marshall JS**, Ford GP, Bell EB. Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis. *Br J Dermatol*. 1987;117:29-36.
 - (16) **Craig SS**, Schwartz LB. Tryptase and chymase, markers of distinct types of human mast cells. *Immunol Res*. 1989;8:130-148.
 - (17) **Craig SS**, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. *Lab Invest*. 1989;60:147-157.
 - (18) **Craig SS**, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest*. 1988;58:682-691.
 - (19) **Schechter NM**, Irani AM, Sprows JL *et al*. Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol*. 1990;145:2652-2661.
 - (20) **Lowman MA**, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;81:590-597.
 - (21) **Caulfield JP**, el Lati S, Thomas G, Church MK. Dissociated human foreskin mast cells degranulate in response to anti-IgE and substance P. *Lab Invest*. 1990;63:502-510.
 - (22) **Church MK**, Lowman MA, Rees PH, Benyon RC. Mast cells, neuropeptides and inflammation. *Agents Actions*. 1989;27:8-16.
 - (23) **Church MK**, Lowman MA, Robinson C, Holgate ST, Benyon RC. Interaction of neuropeptides with human mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;88:70-78.
 - (24) **Biedermann T**, Kneilling M, Mailhammer R *et al*. 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;192:1441-1452.
 - (25) **Moller A**, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P *et al*. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol*. 151[6], 3261-3266. 15-9-1993.
 - (26) **Gibbs BF**, Wierdecky J, Welker P *et al*. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol*. 2001;10:312-320.

-
- (27) **de Garavilla L**, Greco MN, Sukumar N *et al.* A novel, potent dual inhibitor of the leukocyte proteases cathepsin G and chymase: molecular mechanisms and anti-inflammatory activity in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280:18001-18007.
- (28) **He S**, Walls AF. Human mast cell chymase induces the accumulation of neutrophils, eosinophils and other inflammatory cells in vivo. *Br J Pharmacol.* 1998;125:1491-1500.
- (29) **Tani K**, Ogushi F, Kido H *et al.* Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2000;67:585-589.
- (30) **Reilly CF**, Tewksbury DA, Schechter NM, Travis J. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem.* 1982;257:8619-8622.
- (31) **Nabah YN**, Mateo T, Estelles R *et al.* Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation.* 2004;110:3581-3586.
- (32) **Pitchford SC**, Yano H, Lever R *et al.* Platelets are essential for leukocyte recruitment in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:109-118.
- (33) **Pitchford SC**, Riffo-Vasquez Y, Sousa A *et al.* Platelets are necessary for airway wall remodeling in a murine model of chronic allergic inflammation. *Blood.* 2004;103:639-647.
- (34) **Gresele P**, Dottorini M, Selli ML *et al.* Altered platelet function associated with the bronchial hyperresponsiveness accompanying nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;91:894-902.
- (35) **Gresele P**, Grasselli S, Todisco T, Nenci GG. Platelets and asthma. *Lancet.* 1985;1:347.
- (36) **Gresele P**, Todisco T, Merante F, Nenci GG. Platelet activation and allergic asthma. *N Engl J Med.* 1982;306:549.
- (37) **Gresele P**, Ribaldi E, Grasselli S, Todisco T, Nenci GG. Evidence for platelet activation in allergic asthma. *Agents Actions Suppl.* 1987;21:119-128.
- (38) **Hasegawa S**, Tashiro N, Matsubara T, Furukawa S, Ra C. A comparison of FcepsilonRI-mediated RANTES release from human platelets between allergic patients and healthy individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125 Suppl 1:42-47.
- (39) **Rollins BJ**. Chemokines. *Blood.* 1997;90:909-928.
- (40) **Smith RJ**, Sam LM, Leach KL, Justen JM. Postreceptor events associated with human neutrophil activation by interleukin-8. *J Leukoc Biol.* 1992;52:17-26.
- (41) **Samanta AK**, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem.* 1990;265:183-189.

-
- (42) **Pakianathan DR**, Kuta EG, Artis DR, Skelton NJ, Hebert CA. Distinct but overlapping epitopes for the interaction of a CC-chemokine with CCR1, CCR3 and CCR5. *Biochemistry*. 1997;36:9642-9648.
- (43) **Proost P**, Wuyts A, Van Damme J. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol*. 1996;59:67-74.
- (44) **Neville LF**, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8:207-219.
- (45) **Farber JM**. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J.Leukoc.Biol*. 61[3], 246-257. 1997.
- (46) **Cole KE**, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP *et al*. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non- ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J.Exp.Med*. 187[12], 2009-2021. 15-6-1998.
- (47) **Feniger-Barish R**, Belkin D, Zaslaver A *et al*. GCP-2-induced internalization of IL-8 receptors: hierarchical relationships between GCP-2 and other ELR(+)-CXC chemokines and mechanisms regulating CXCR2 internalization and recycling. *Blood*. 2000;95:1551-1559.
- (48) **Ahuja SK**, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem*. 1996;271:20545-20550.
- (49) **Schnitzel W**, Garbeis B, Monschein U, Besemer J. Neutrophil activating peptide-2 binds with two affinities to receptor(s) on human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180:301-307.
- (50) **Moser B**, Schumacher C, von T, V, Clark-Lewis I, Baggiolini M. Neutrophil-activating peptide 2 and gro/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J Biol Chem*. 1991;266:10666-10671.
- (51) **Ludwig A**, Petersen F, Zahn S *et al*. The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood*. 1997;90:4588-4597.
- (52) **Petersen F**, Van Damme J, Flad HD, Brandt E. Neutrophil-activating polypeptides IL-8 and NAP-2 induce identical signal transduction pathways in the regulation of lysosomal enzyme release. *Lymphokine Cytokine Res*. 1991;10:35-41.
- (53) **Brandt E**, Van Damme J, Flad HD. Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine*. 1991;3:311-321.

-
- (54) **Brightling CE**, Kaur D, Berger P *et al.* Differential expression of CCR3 and CXCR3 by human lung and bone marrow-derived mast cells: implications for tissue mast cell migration. *J Leukoc Biol.* 2005;77:759-766.
- (55) **Ochi H**, Hirani WM, Yuan Q *et al.* T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med.* 1999;190:267-280.
- (56) **Lin TJ**, Issekutz TB, Marshall JS. SDF-1 induces IL-8 production and transendothelial migration of human cord blood-derived mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 124[1-3], 142-145. 2001.
- (57) **Lin TJ**, Issekutz TB, Marshall JS. Human mast cells transmigrate through human umbilical vein endothelial monolayers and selectively produce IL-8 in response to stromal cell- derived factor-1 alpha. *J Immunol.* 2000;165:211-220.
- (58) **Hartmann K**, Henz BM, Kruger-Krasagakes S *et al.* C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood.* 1997;89:2863-2870.
- (59) **Romagnani P**, de Paulis A, Beltrame C *et al.* Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am J Pathol.* 1999;155:1195-1204.
- (60) **de Paulis A**, Annunziato F, Di Gioia L *et al.* Expression of the chemokine receptor CCR3 on human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;124:146-150.
- (61) **Inamura H**, Kurosawa M, Okano A, Kayaba H, Majima M. Expression of the interleukin-8 receptors CXCR1 and CXCR2 on cord-blood-derived cultured human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;128:142-150.
- (62) **Lippert U**, Artuc M, Grutzkau A, Moller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D *et al.* Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J. Immunol.* 161[5], 2600-2608. 1-9-1998.
- (63) **Kirshenbaum AS**, Akin C, Wu Y *et al.* Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res.* 2003;27:677-682.
- (64) **Files JC**, Malpass TW, Yee EK, Ritchie JL, Harker LA. Studies of human platelet alpha-granule release in vivo. *Blood.* 1981;58:607-618.
- (65) **Zipfel PF**, Bialonski A, Skerka C. Induction of members of the IL-8/NAP-1 gene family in human T lymphocytes is suppressed by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;181:179-183.
- (66) **El Gedaily A**, Schoedon G, Schneemann M, Schaffner A. Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2004;75:495-503.

-
- (67) **Schaffner A**, King CC, Schaer D, Guiney DG. Induction and antimicrobial activity of platelet basic protein derivatives in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2004;76:1010-1018.
- (68) **Ehlert JE**, Ludwig A, Grimm TA *et al.* Down-regulation of neutrophil functions by the ELR(+) CXC chemokine platelet basic protein. *Blood.* 2000;96:2965-2972.
- (69) **Harter L**, Petersen F, Flad HD, Brandt E. Connective tissue-activating peptide III desensitizes chemokine receptors on neutrophils. Requirement for proteolytic formation of the neutrophil-activating peptide 2. *J Immunol.* 1994;153:5698-5708.
- (70) **Walz A**, Baggiolini M. A novel cleavage product of beta-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159:969-975.
- (71) **Walz A**, Baggiolini M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med.* 1990;171:449-454.
- (72) **Brandt E**, Petersen F, Flad HD. A novel molecular variant of the neutrophil-activating peptide NAP-2 with enhanced biological activity is truncated at the C-terminus: identification by antibodies with defined epitope specificity. *Mol Immunol.* 1993;30:979-991.
- (73) **Ehlert JE**, Gerdes J, Flad HD, Brandt E. Novel C-terminally truncated isoforms of the CXC chemokine beta-thromboglobulin and their impact on neutrophil functions. *J Immunol.* 1998;161:4975-4982.
- (74) **Krijgsveld J**, Zaat SA, Meeldijk J *et al.* Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem.* 2000;275:20374-20381.
- (75) **Petersen F**, Ludwig A, Flad HD, Brandt E. TNF-alpha renders human neutrophils responsive to platelet factor 4. Comparison of PF-4 and IL-8 reveals different activity profiles of the two chemokines. *J Immunol.* 1996;156:1954-1962.
- (76) **Fleischer J**, Grage-Griebenow E, Kasper B *et al.* Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J Immunol.* 2002;169:770-777.
- (77) **Scheuerer B**, Ernst M, Durrbaum-Landmann I *et al.* The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood.* 2000;95:1158-1166.
- (78) **Xia CQ**, Kao KJ. Effect of CXC chemokine platelet factor 4 on differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol.* 2003;15:1007-1015.
- (79) **Fricke I**, Mitchell D, Petersen F *et al.* Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* 2004;18:1588-1590.
- (80) **Lasagni L**, Francalanci M, Annunziato F *et al.* An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig,

and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*. 2003;197:1537-1549.

- (81) **Grimm TA**. Inhibition der proteolytischen Prozessierung des Bindegewebe aktivierenden Peptids III (CTAP-III) durch den Plättchenfaktor 4 (PF-4): Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung, Promotionsschrift Universität Lübeck. 2000.
- (82) **Nufer O**, Corbett M, Walz A. Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochemistry*. 1999;38:636-642.
- (83) **Delgado MB**, Clark-Lewis I, Loetscher P *et al*. Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2001;31:699-707.
- (84) **Ryu OH**, Choi SJ, Firatli E *et al*. Proteolysis of MIP-1alpha isoforms LD78beta and LD78alpha by neutrophil-derived serine proteases. *J Biol Chem*. 2005.
- (85) **Reilly CF**, Schechter NB, Travis J. Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;127:443-449.
- (86) **Serra MC**, Bazzoni F, Della B, V, Greskowiak M, Rossi F. Activation of human neutrophils by substance P. Effect on oxidative metabolism, exocytosis, cytosolic Ca²⁺ concentration and inositol phosphate formation. *J Immunol*. 1988;141:2118-2124.
- (87) **Black R**, Kronheim S, Sleath P *et al*. The proteolytic activation of interleukin-1 beta. *Agents Actions Suppl*. 1991;35:85-89.
- (88) **Caughey GH**, Leidig F, Viro NF, Nadel JA. Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244:133-137.
- (89) **Mizutani H**, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med*. 1991;174:821-825.
- (90) **Krüger S**, Brandt E, Klinger M, Kreft B. Interleukin-8 secretion of cortical tubular epithelial cells is directed to the basolateral environment and is not enhanced by apical exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2000;68:328-334.
- (91) **Bøyum A**. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
- (92) **Gibbs BF**, Ennis M. Isolation and Purification of Human Mast Cells and Basophils. *Human Airway Inflammation Sampling Techniques and Analytical Protocols*. 2001:161-176.
- (93) **Smith PK**, Krohn RI, Hermanson GT *et al*. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150:76-85.

-
- (94) **Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
- (95) **Schägger H**, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. 1987;166:368-379.
- (96) **Cooper JA**. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987;105:1473-1478.
- (97) **Schwartz LB**, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol*. 1979;123:1445-1450.
- (98) **Grynkiewicz G**, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260:3440-3450.
- (99) **Kambe N**, Kambe M, Kochan JP, Schwartz LB. Human skin-derived mast cells can proliferate while retaining their characteristic functional and protease phenotypes. *Blood*. 2001;97:2045-2052.
- (100) **Benyon RC**, Lowman MA, Church MK. Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. *J Immunol*. 1987;138:861-867.
- (101) **Schwartz LB**, Irani AM, Roller K, Castells MC, Schechter NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol*. 1987;138:2611-2615.
- (102) **Babina M**, Guhl S, Starke A *et al*. Comparative cytokine profile of human skin mast cells from two compartments--strong resemblance with monocytes at baseline but induction of IL-5 by IL-4 priming. *J Leukoc Biol*. 2004;75:244-252.
- (103) **Ren S**, Kambe N, Du Z *et al*. Disialoganglioside GD3 is selectively expressed by developing and mature human mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:322-330.
- (104) **Buhring HJ**, Seiffert M, Giesert C *et al*. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*. 2001;97:3303-3305.
- (105) **Buhring HJ**, Simmons PJ, Pudney M *et al*. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*. 1999;94:2343-2356.
- (106) **Coward WR**, Okayama Y, Sagara H *et al*. NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *J Immunol*. 2002;169:5287-5293.
- (107) **Ludwig A**, Schiemann F, Mentlein R, Lindner B, Brandt E. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC) and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine. *J Leukoc Biol*. 2002;72:183-191.

-
- (108) **He SH**, Chen P, Chen HQ. Modulation of enzymatic activity of human mast cell tryptase and chymase by protease inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:923-929.
- (109) **Schechter NM**, Choi JK, Slavin DA *et al.* Identification of a chymotrypsin-like proteinase in human mast cells. *J Immunol.* 1986;137:962-970.
- (110) **Van Den Steen PE**, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 2000;96:2673-2681.
- (111) **Castor CW**, Walz DA, Ragsdale CG *et al.* Connective tissue activation. XXXIII. Biologically active cleavage products of CTAP-III from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:1071-1078.
- (112) **Price KS**, Friend DS, Mellor EA *et al.* CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:420-427.
- (113) **Oravecz T**, Pall M, Roderiquez G *et al.* Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med.* 1997;186:1865-1872.
- (114) **Jiao X**, Zhang N, Xu X, Oppenheim JJ, Jin T. Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. *Mol Cell Biol.* 2005;25:5752-5762.
- (115) **Nguyen DH**, Taub D. Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5. *Blood.* 2002;99:4298-4306.
- (116) **Abonia JP**, Austen KF, Rollins BJ *et al.* Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood.* 2005;105:4308-4313.
- (117) **Wang D**, Sai J, Richmond A. Cell surface heparan sulfate participates in CXCL1-induced signaling. *Biochemistry.* 2003;42:1071-1077.
- (118) **Hammond ME**, Shyamala V, Siani MA *et al.* Receptor recognition and specificity of interleukin-8 is determined by residues that cluster near a surface-accessible hydrophobic pocket. *J Biol Chem.* 1996;271:8228-8235.
- (119) **Yang W**, Wang D, Richmond A. Role of clathrin-mediated endocytosis in CXCR2 sequestration, resensitization, and signal transduction. *J Biol Chem.* 1999;274:11328-11333.
- (120) **Yang W**, Schraw WP, Mueller SG, Richmond A. Interruption of G protein-coupling in CXCR2 does not alter ligand binding, but eliminates ligand-activation of GTPgamma35S binding, calcium mobilization, and chemotaxis. *Biochemistry.* 1997;36:15193-15200.

-
- (121) **Jiang WY**, Chattedee AD, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Farber EM. Mast cell density and IL-8 expression in nonlesional and lesional psoriatic skin. *Int J Dermatol*. 2001;40:699-703.
- (122) **Irani AA**, Garriga MM, Metcalfe DD, Schwartz LB. Mast cells in cutaneous mastocytosis: accumulation of the MCTC type. *Clin Exp Allergy*. 1990;20:53-58.
- (123) **Petersen F**, Flad HD, Brandt E. Neutrophil-activating peptides NAP-2 and IL-8 bind to the same sites on neutrophils but interact in different ways. Discrepancies in binding affinities, receptor densities, and biologic effects. *J Immunol*. 1994;152:2467-2478.
- (124) **Schenk BI**, Petersen F, Flad HD, Brandt E. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J Immunol*. 2002;169:2602-2610.
- (125) **Meier HL**, Heck LW, Schulman ES, MacGlashan DW, Jr. Purified human mast cells and basophils release human elastase and cathepsin G by an IgE-mediated mechanism. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1985;77:179-183.
- (126) **Holt JC**, Niewiarowski S. Platelet basic protein, low-affinity platelet factor 4, and beta-thromboglobulin: purification and identification. *Methods Enzymol*. 1989;169:224-233.
- (127) **Durantón J**, Adam C, Bieth JG. Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochemistry*. 1998;37:11239-11245.
- (128) **Schenk BI**. Einfluß thrombozytärer CXC-Chemokine auf die Interaktion von Neutrophilen und Endothelzellen, Promotionsschrift Universität Lübeck. 2001.
- (129) **Proud D**, Bailey GS, Naclerio RM *et al*. Tryptase and histamine as markers to evaluate mast cell activation during the responses to nasal challenge with allergen, cold, dry air, and hyperosmolar solutions. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;89:1098-1110.
- (130) **Berger P**, N'guyen C, Buckley M *et al*. Passive sensitization of human airways induces mast cell degranulation and release of tryptase. *Allergy*. 2002;57:592-599.
- (131) **He S**, Walls AF. The induction of a prolonged increase in microvascular permeability by human mast cell chymase. *Eur.J.Pharmacol*. 352[1], 91-98. 3-7-1998.
- (132) **Von Hundelshausen P**, Koenen RR, Sack M *et al*. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*. 2005;105:924-930.
- (133) **Dudek AZ**, Nesmelova I, Mayo K *et al*. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood*. 2003;101:4687-4694.

-
- (134) **Hiti-Harper J**, Wohl H, Harper E. Platelet factor 4: an inhibitor of collagenase. *Science*. 1978;199:991-992.
- (135) **Slungaard A**, Key NS. Platelet factor 4 stimulates thrombomodulin protein C-activating cofactor activity. A structure-function analysis. *J Biol Chem*. 1994;269:25549-25556.
- (136) **Slungaard A**. Platelet factor 4 modulation of the thrombomodulin-protein C system. *Crit Care Med*. 2004;32:S331-S335.
- (137) **Slungaard A**, Fernandez JA, Griffin JH *et al*. Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo. *Blood*. 2003;102:146-151.
- (138) **Raymond WW**, Ruggles SW, Craik CS, Caughey GH. Albumin is a substrate of human chymase. Prediction by combinatorial peptide screening and development of a selective inhibitor based on the albumin cleavage site. *J Biol Chem*. 2003;278:34517-34524.
- (139) **Schick C**, Kamachi Y, Bartuski AJ *et al*. Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem*. 1997;272:1849-1855.
- (140) **Nagata M**, Shijubo N, Walls AF *et al*. Chymase-positive mast cells in small sized adenocarcinoma of the lung. *Virchows Arch*. 2003;443:565-573.
- (141) **Beil WJ**, Pammer J. In situ detection of the mast cell proteases chymase and tryptase in human lung tissue using light and electron microscopy. *Histochem Cell Biol*. 2001;116:483-493.
- (142) **Richter R**, Bistran R, Escher S *et al*. Quantum Proteolytic Activation of Chemokine CCL15 by Neutrophil Granulocytes Modulates Mononuclear Cell Adhesiveness. *J Immunol*. 2005;175:1599-1608.

7. Anhang

7.1 Geräte

Blotapparatur (Modell TE 50): *Hoefer Scientific Instruments*, Freiburg

Brutschrank (Typ B5061 EC-CO₂): *Heraeus*, Hanau

Durchflußzytometer (Modell FACScalibur): *Becton-Dickinson*, San Jose, USA

Fluoreszenzmikroskop (Leitz Aristoplan): *Leica, Diaphot, Nikon*, Tokyo, Japan

Infrared Imaging System (Odyssey): *Li-cor*, Bad Homburg

Mikroskop (Standard): *Zeiss*, Jena

Mikroskop (Inversmikroskop): *Zeiss*, Jena

Mikrotiterplatten-Photometer (340 ATTC): *SLT Labinstruments*, Crailsheim

Mikrotiterplatten-Washer (Titertek): *Flow Laboratories*, Irvine, Schottland

Powersupply (Modell 2197): *Pharmacia*, LKB, Freiburg

Schüttler (Titertek): *Flow Laboratories*, Irvine, Schottland

Sterile Arbeitsbank (LaminAir® HLB2472): *Heraeus*, Hanau

Thermomixer (Modell 5437): *Eppendorf*, Hamburg

Tischzentrifuge (Mikroliter): *Hettich*, Tuttlingen

Ultraschallbad (Bransonic 220): *Branson*, Carouge-Geneve, Schweiz

Vertikalelektrophorese-Apparatur (GE 2/4): *Pharmacia*, Freiburg

Vortex-Genie: *Bender & Hohbein AG*, Zürich, Schweiz

Zentrifuge (Ole Dich): *Instrumentmakers APS*, Hvidovre, Dänemark

Zentrifuge (Rotixa/RP): *Hettich*, Tuttlingen

Zentrifuge für Mikrotiterplatten (Rotixa/KS): *Hettich*, Tuttlingen

7.2 Computerprogramme

CorelDRAW 11 für Windows: *Corel*, Dublin, Irland

Lysis II für Hewlett Pacard Betriebssystem: *Becton-Dickinson*, San Jose, USA

Microsoft Exel 2000 für Windows: *Microsoft Cooperation*, Unterschleißheim

Microsoft Word 2000 für Windows: *Microsoft Cooperation*, Unterschleißheim

Origin 6.0 für Windows: *Microcal Software*, Northampton, MA, USA

Odyssey 2000 für Windows: *Li-cor*, Bad Homburg

SLT-fit für DOS: *SLT Labinstruments*, Crailsheim

7.3 Reagenzien und Lösungen

Das für die folgenden Lösungen verwendete Wasser wurde, wenn nicht anders angegeben, durch eine kombinierte Ultrafilter-Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (Milli-Q Regent Water System, Millipore, Eschborn) gereinigt. Die in den biologischen Testverfahren eingesetzten Puffer wurden sterilfiltriert. Nicht näher beschriebene Substanzen stammten von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Bachem (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Riedel de Haen (Seelze-Hannover) oder Biomol (Hamburg).

7.3.1 Zellisolierung und -kultur

Dulbecco's PBS

2,7 mM KCl
140 mM NaCl
1,5 mM KH_2PO_4
10 mM Na_2HPO_4 , in H_2O (Braundest, Aqua ad iniectabilia Braun, Pyrogenfrei, Braun Melsungen, Melsungen) gelöst; pH 7,4

PBS-D + CaMg

2,7 mM KCl
140 mM NaCl
1,5 mM KH_2PO_4
10 mM Na_2HPO_4
0,9 mM CaCl_2
0,5 mM MgCl_2 , in H_2O gelöst
pH 7,4

PBS-D + CaMg / 0,1%BSA

PBS-D + CaMg
0,1 % w/v BSA

Polyvinylalkohol-Lösung

0,9 % w/v NaCl
1 % w/v Polyvinylalkohol (Merck, Darmstadt); in Braundest gelöst, bei 150°C autoklaviert.

Mastzellpuffer

8 mg/ml NaCl
1 mg/ml Glucose
2,86 mg/ml HEPES
0,2 mg/ml KCl
1,45 mg/ml Na₃PO₄ x 12 H₂O
0,1 mg/ml BSA
pH 7,2

Verdaupuffer

8 mg/ml NaCl
1 mg/ml Glucose
2,86 mg/ml HEPES
0,2 mg/ml KCl
1,45 mg/ml Na₃PO₄ x 12 H₂O
1 mg/ml BSA
1,5 mg/ml Kollagenase Typ 2
0,75 mg/ml Hyaluronidase

Supplementiertes RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco, Karlsruhe), supplementiert mit final:

2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe)
200 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe)
200 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)

Trypanblau-Lösung

0,9 % w/v NaCl
0,1 % w/v Trypan-Blau; in H₂O gelöst

Toluidinblau-Lösung

0,1 % w/v Toluidinblau; in 1 M HCl gelöst

7.3.2 Tris-Tricin-Elektrophorese

Probenpuffer für Tris-Tricin-Elektrophorese

200 mM 1,4-dithiothreitol (DTT)
4,6 % w/v SDS
20 % v/v Glycerin
0,006 % w/v EDTA
0,01 % w/v Bromphenolblau
200 mM Tricine
200 mM Tris; in H₂O gelöst; pH 8,25

Gelpuffer

3 M Tris-HCl
0,3 % w/v SDS; in H₂O gelöst; pH 8,45

Acrylamidlösung 30/2

30 % w/v Acrylamid
0,6 % w/v Bisacrylamid; in H₂O gelöst

Acrylamidlösung 30/3

30 % w/v Acrylamid
0,9 % w/v Bisacrylamid; in H₂O gelöst

Gellösung für 4 %iges Sammelgel

14 % v/v Acrylamidlösung 30/2
25 % v/v Gelpuffer
0,3 % v/v APS
0,15 % v/v TEMED; in H₂O gelöst

Gellösung für 10 %iges Zwischengel

33 % v/v Acrylamidlösung 30/2
33 % v/v Gelpuffer
9 % v/v Glycerin
0,1 % v/v APS
0,05 % v/v TEMED; in H₂O gelöst

Gellösung für 13 %iges Trenngel

43 % v/v Acrylamidlösung 30/3
30 % v/v Gelpuffer
17 % v/v Glycerin
0,05 % v/v APS
0,025 % v/v TEMED; in H₂O gelöst

Anodenpuffer

200 mM Tris-HCL; in H₂O gelöst; pH 8,9

Kathodenpuffer

100 mM Tricin
100 mM Tris; in H₂O gelöst; pH 8,25

7.3.3 Western-Blotting und Blot-Entwicklung**Transferpuffer nach Towbin**

150 mM Glycin
20 % v/v Methanol
25 mM Tris-HCL; in H₂O gelöst; pH 8,3

Verdünnungspuffer

10 mM NaH₂PO₄
150 mM NaCl
0,01 % w/v Thimerosal; in H₂O gelöst; pH 7,4

Tris-Waschpuffer

10 mM Tris-HCL
0,05 % v/v Tween 20
0,01 % w/v Thimerosal; in H₂O gelöst; pH 8,0

7.3.4 ELISA

Beschichtungspuffer

0,1 M NaHCO_3

0,1 M Na_2CO_3 ; zum Einstellen des pH auf 9,0; in H_2O gelöst

OPD-Substratlösung

17 mM Zitronensäure

65 mM Na_2HPO_4

0,01 % w/v Thimerosal

0,4 % w/w o-Phenylendiamin (OPD)

0,015 % v/v H_2O_2 ; in H_2O gelöst; mit NaOH Einstellen des pH auf 6,3

Tris-Waschpuffer siehe oben

7.3.5 Elastase-Freisetzungstest

PBS

150 mM NaCl

10 mM NaH_2PO_4

10 mM Na_2HPO_4 ; in H_2O gelöst; pH 7,2

Elastase-Substratlösung

0,44 mM N-T-BOC-Ala-Pro-NorVal-p-Chlorothiobenzylester (Bachem, Heidelberg)

0,2 M HEPES

1 M NaCl

30 % v/v Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Taufkirchen)

0,75 mM 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (ELLMANs Reagenz, Sigma, Taufkirchen); in H_2O gelöst; pH 7,5

7.3.6 Hexosaminidase-Freisetzungstest

β -Hexosaminidase-Substratlösung

10 mM 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid, in Acetatpuffer gelöst

Acetatpuffer

1 M Na-Acetat, in H₂O gelöst
HCl zur Einstellung des pH auf 10,3

Glycinpuffer pH 10,3

0,4 M Glycin, in H₂O gelöst
HCl zur Einstellung des pH auf 10,3

7.3.7 FACS

PBS-Azid

15 mM Natriumazid, in PBS gelöst

Publikationen von Teilergebnissen

Schiemann F, Grimm TA, Hoch J, Gross R, Lindner B, Petersen F, Bulfone-Paus S, Brandt E
Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are
subject to counter-regulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G.
Blood. [acceptable after minor revision]

Weitere Publikationen verwandter Thematik

Mentlein R, Schiemann F, Ludwig A, Brandt E
Modification of the biological activity of chemokines by dipeptidyl peptidase IV--a side effect
in the use of inhibitors?
Adv Exp Med Biol. 2003;524:37-47.

Ludwig A, Schiemann F, Mentlein R, Lindner B, Brandt E
Dipeptidyl peptidase IV (CD26) on T cells cleaves the CXC chemokine CXCL11 (I-TAC)
and abolishes the stimulating but not the desensitizing potential of the chemokine.
J Leukoc Biol. 2002 Jul;72(1):183-91.

Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D
Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes:
strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells.
J Immunol. 2002 May 15;168(10):4920-9.

Lebenslauf

Personalien

Florian Schiemann
geboren am 26. Februar 1976 in Lübeck
ledig
deutscher Staatsangehöriger

Ausbildung

1982-1986

Marli Grundschule, Lübeck

1986-1995

Thomas-Mann-Gymnasium, Lübeck

Abitur in den Prüfungsfächern Chemie, Biologie,
Latein und Geschichte

1995-2001

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Studium des Faches Biologie

Oktober 1997

Vordiplom in den Fächern Zoologie, Botanik,
anorganische Chemie und Mathematik

April 1998 - Juli 1998

Studentische Hilfskraft im Institut für Zoophysiologie

Oktober 1998 - Februar 1999

Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben im
Fachbereich Zoomorphologie

April 1999 - Februar 2000

Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben im
Fachbereich Zoophysiologie

April 2000

Diplomprüfung in den Fächern Zoologie,
Mikrobiologie und Biochemie

Mai 2000 - Mai 2001

Forschungszentrum Borstel

Diplomarbeit unter der Leitung von PD Dr. Ernst
Brandt mit dem Thema: *Regulation des
Chemokins I-TAC durch Dipeptidylpeptidase IV*

Mai 2001 – Juli 2005

Forschungszentrum Borstel

Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Ernst
Brandt mit dem Thema: *Interaktion von Mastzellen
und thrombozytären Chemokinen: Expression von
Chemokinrezeptoren und Regulation der Chemokin-
aktivität durch proteolytische Prozessierung*

Danksagungen

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Sylvia Bulfone-Paus für die Überlassung dieses attraktiven Themas, ihr reges Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie für die optimalen Arbeitsbedingungen am Forschungszentrum Borstel.

Besonders herzlich möchte ich Prof. Dr. Ernst Brandt für die hervorragende wissenschaftliche Anleitung, die anregenden Diskussionen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

PD Dr. Bernhard F. Gibbs danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Etablierung der Mastzellisolierung und seine wertvollen Ratschläge im Umgang mit Mastzellen.

Ich danke Prof. Dr. Josef Hoch und seinen Mitarbeitern am Klinikum Neustadt für die zuverlässige und regelmäßige Bereitstellung von Hautresektaten.

Mein Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Laborgruppen Biologische Chemie und Biochemische Immunologie Herrn PD Dr. Frank Petersen, Frau Dr. Natalia Nashkievich, Frau Dr. Brigitte Kasper, Frau Geske Woller, Frau Diana Heinrich, Herrn Dr. Tobias Grimm, Frau Dr. Franziska Schwartzkopff und Frau Dr. Birgit Schenk und insbesondere Frau Gabi Huß, Frau Christine Engellenner, Herrn Roland Gross und Frau Alette Hettfleisch ohne deren Engagement und wertvolle Hilfe ein Gelingen dieser Arbeit kaum vorstellbar gewesen wäre. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Kathleen Marienfeld, Herrn Daniell Mitchell und Frau Dr. Zane Orinska für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen.

Ich möchte mich bei Herrn Christian Jessen und Frau Ingeborg Stöwahse für die zuverlässige Korrektur des Manuskriptes bedanken.

Für die jahrelange moralische Unterstützung und das liebevolle Verständnis in allen Phasen der Arbeit möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken.

Liebe Elke, Dir danke ich für all die Jahre, in denen Dein sonniges Lächeln mir die Kraft für diese Arbeit gab.

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit in Inhalt und Form selbständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Bad Segeberg, im Juli, 2005

1. Berichterstattender.....

2. Berichterstattender.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den.....