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

Direkte und indirekte Effekte thrombozytärer Chemokine auf humane Mastzellen

Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades <u>der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät</u> der Medizinischen Universität zu Lübeck

> vorgelegt von Roland Gross Lübeck 2007

Inhaltsverzeichnis

1. E	1. EINLEITUNG 1		
1.1	Mastzellen		
1.1.1	Chemokine, deren Rezeptoren und ihre Vertreter auf Mastzellen	4	
1.1.2	Die allergische Sofortreaktion	5	
1.1.3	Die allergische Spätreaktion	6	
1.2	Thrombozyten in der allergischen Situation	8	
1.2.1	Thrombozytäre Chemokine	8	
1.2.2	Prozessierung thrombozytärer Chemokine durch Mastzellen	10	
1.3	Fragestellung	11	
2. M	ATERIALIEN UND METHODEN	12	
2.1	Agenzien zur Stimulation und Kultur von Zellen	12	
2.2	Aufreinigung von Agenzien zur Stimulation von Mastzellen	12	
2.2.1	Aufreinigung humaner thrombozytärer Chemokine		
2.2.2	Aufreinigung von alpha-Defensinen aus humanen Granulozyten	13	
2.3	Enzyme zum Gewebeaufschluss humaner Haut und Lunge	14	
2.4	Zellisolierung und Zellkultur	14	
2.4.1	Bestimmung der Zellviabilität	14	
2.4.2	Bestimmung des Mastzellanteils in Zellsuspensionen	14	
2.4.3	Isolierung und Kultur von Mastzellen aus humanem Lungen- und Hautgewebe	15	
2.4.4	Kultur der Zelllinie LAD-2		
2.4.5	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut	21	
2.5	Biochemische Testverfahren		
2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen		
2.5.2	Sandwich-ELISA	22	
2.5.3	Stimulation von Mastzellen		
2.6	Biologische Testverfahren	23	
2.6.1	Hexosaminidase-Release-Assay		
2.6.2	Nachweis der Expression zellassoziierter Rezeptoren		

2.6.3	RNA – Isolierung, cDNA – Synthese und quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion ("Rea	1-
time	RT-PCR")	26
2.6.4	Bestimmung der intrazellulären Ca-Konzentration	27
3. E	RGEBNISSE	. 30
3.1	Etablierung einer Methode zur Isolierung von humanen Lungenmastzellen	30
3.1.1	Aufschluss des humanen Lungengewebes durch enzymatischen Verdau	30
3.1.2	Aufreinigung der Zellsuspension durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation	32
3.1.3	Aufreinigung der Mastzellen durch Magnetseparation	34
3.1.4	Kultivierung humaner Lungenmastzellen	35
3.1.5	Reaktivität der Mastzellen	36
3.2	Expression und Funktionalität von Chemokinrezeptoren auf humanen Mastzellen	38
3.2.1	NAP-2 und CTAP-III Rezeptoren	38
3.2.2	PF-4 Rezeptoren	39
3.3	Zytosolische Kalziumkonzentration von Mastzellen nach Stimulation mit thrombozytären	
Chemol	inen	42
3.3.1	PF-4 induziert ein intrazelluläres Ca ²⁺ -Signal in LAD-2-Zellen	42
3.3.2	Einfluss anderer Mastzellstimuli auf das PF-4 induzierte Kalziumsignal in LAD-2-Zellen	44
3.3.3	Wirkung von Inhibitoren auf das PF-4 – induzierte Kalziumsignal	46
3.4	Die Rolle von thrombozytären Chemokinen in der Aktivierung von Mastzellen	47
3.4.1	Stimulation mit thrombozytären Chemokinen	47
3.4.2	PF-4-induzierte Degranulation in TNF-behandelten Mastzellen	49
3.4.3	Modulation der $Fc_{\epsilon}RI$ induzierten β -Hexosaminidase – Freisetzung durch Koinkubation mit	
thron	bozytären Chemokinen	51
3.4.4	Modulation der anti-IgE induzierten β -Hexosaminidase – Freisetzung durch Vorinkubation mit	
thron	bozytären Chemokinen	53
3.4.5	Aktivierung von Mastzellen durch LL-37 und deren Modulation durch PF-4	55
3.4.6	Aktivierung von Mastzellen durch HNPs und deren Modulation durch PF-4	58
3.5	Zytokinproduktion stimulierter Mastzellen	61
3.5.1	Freisetzung von MIP-1 alpha und beta in Abhängigkeit von der Zeit	62
3.6	Stimulation von mononukleären Zellen durch PF-4 stimulierte LAD-2 - Überstände	64
3.7 2-Zellen	m-RNA-Expression der Spleißvarianten CXCR3A und CXCR3B in Lungenmastzellen und LA 67	۱D-

5.	ZI	USAMMENFASSUNG	82
6.	LI	ITERATUR	84
7.	A	NHANG	97
7.1		Geräte	
7.2		Computerprogramme	
7.3		Primer für PCR	
7.4		Reagenzien und Lösungen	
7.	.4.1	Zellisolierung und -kultur	
7.	.4.2	Tris-Tricin-Elektrophorese	100
7.	.4.3	ELISA	101
7.	.4.4	Hexosaminidase-Freisetzungstest	
7.	.4.5	FACS	103

Abkürzungen

α	gegen (anti-)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AM	Azetoxymethanol
AMP	Antimikrobielle Peptide
β-TG Ag	β-Thromboglobulin Antigen
BCA	Bicinchoninsäure-Test
BSA	Rinderserumalbumin
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
c-kit (CD117)	Rezeptor für SCF
CTAP-III	connective-tissue activating peptide III
DAG	Diacylglycerin
DNA	desoxyribonucleic acid
Dnase	Desoxyribonuklease
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluoreszin
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
ELR	Glutamin-Leucin-Arginin-Sequenzmotiv (siehe Aminosäurencode)
FACS	fluorescense activated cell sorting
Fc _e 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'-
	methyloxy-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
G-Proteine	Guanidinnucleotide bindende Proteine
Gro-alpha	growth related oncogene-alpha

h-βD	humane β -Defensine
HMC-1	human mast cell line-1
HMZ	Hautmastzellen
HNP	Humane Neutrophilen Proteine
HPLC	Hochdruckflüssigkeitchromatographie
HRP	horse raddish peroxidase
ICAM	intercellular adhesion molecule
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma inducible protein-10
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
I-TAC	Interferon-gamma inducible T cell alpha chemoattranctant
LAD-2	laboratory of allergic diseases-2
LMZ	Lungenmastzellen
LS-Säule	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach
MACS	magnetic-cell-sorting
MBP	major-basic-protein
MDC	macrophage derived chemokine
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MIF	Makrophagen migrations inhibitorischer Faktor
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 $lpha$
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein-1 eta
MC _T	Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren
MC _{TC}	Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren
MNZ	Mononukleäre Zellen
NAP-2	neutrophil-activating peptide 2
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBP	platelet basic protein
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-D	phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco
PE	Phycoerythrin
PF-4	platelet factor 4
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PLC	Phospholipase C
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
m-RNA	messenger-ribonucleic acid
RP-HPLC	Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
SCF	stem cell factor oder c-kit ligand
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SP	Substanz P
SV	Säulenvolumen
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumor Necrose Factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoaktives intestinales Polypetid
w/v	Gewicht/Volumen

1. Einleitung

Jeder Organismus befindet sich durch seinen Kontakt zur Umwelt in einem permanenten Abwehrkampf gegen mikrobielle Invasoren wie Parasiten, Viren oder infektiöse Bakterien. Die erste Verteidigung des Wirtes gegen diese Pathogene findet bereits an den Grenzflächen seines Körpers, in den peripheren Geweben von Haut, Lunge und Darm, statt. Neben löslichen Komponenten sind verschiedene Zelltypen der angeborenen Immunantwort für die initiale Abwehr verantwortlich. Abgesehen von unterschiedlichen Populationen von Phagozyten spielen die in diesen peripheren Geweben deutlich gehäuft auftretenden Mastzellen eine zentrale Rolle.

1.1 Mastzellen

Der Name "Mastzelle" geht auf die Bezeichnung ihres Entdeckers Paul Ehrlich zurück, der 1878 im Rahmen seiner medizinischen Dissertation unter anderem die histologische Anwendung von Anilinblau zum Färben bestimmter Zellen beschrieb¹. Er begründete das Färbeverhalten dieser Zellen mit einer für diese Zellen charakteristischen Anhäufung einer undefinierten Substanz in den Granula, welche für diese Zellen charakteristisch ist und sich durch Reaktion mit Anilinblau tief violett anfärben lässt. Diesen Farbumschlag nannte er "Metachromasie". Ehrlichs erste Annahme war, dass diese Zellen Strukturen aus dem umliegenden Gewebe phagozytieren und auf diese Weise große Mengen dichtgepackter Granula im Zytoplasma anhäufen. Diese Vorstellung von "gemästeten" Zellen begründete die nachfolgende Bezeichnung "Mastzellen". Obwohl heute bekannt ist, dass es sich bei den Granulainhalten um präformierte Mediatoren handelt wurde der Name "Mastzelle" beibehalten.

Heute weiß man, dass es sich bei der von Ehrlich beschriebenen anfärbbaren "undefinierten Substanz" um saures Heparin handelt. Dieses stark negativ geladene Glykosaminoglykan wird in den sekretorischen Granula gespeichert und lässt sich durch Anilinblau oder dessen heute häufig verwendeten Derivat Toluidinblau anfärben.

Die Funktion des Heparins innerhalb der Granula besteht darin, eine Matrix für die in kristalliner Form vorliegenden Mediatoren zu bilden. Nach Aktivierung der Zelle verschmelzen die Granula innerhalb der Zelle miteinander (Degranulation) und mit der Plasmamembran (Exocytose). Bei letzterem Vorgang gehen die präformierten Mediatoren in eine lösliche Form über und werden an die Umgebung der Zelle abgegeben².

Neben der Freisetzung präformierter Mediatoren wie z.B. Tryptase, Chymase oder Histamin sind Mastzellen ebenfalls in der Lage, nach Stimulation andere Mediatoren *de novo* zu synthetisieren. Hierzu gehören z.B. Lipidmediatoren wie Leukotriene und Prostaglandine, oder Zytokine wie IL-4 und IL-13 und TNF (Tumor Necrose Faktor)³⁻⁵.

Obwohl die Entstehung von Mastzellen noch über weite Strecken ungeklärt ist, so ist doch bekannt, dass sich aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks zunächst Vorläuferzellen der Mastzellen bilden. Diese Vorläuferzellen emigrieren in den Blutkreislauf von wo aus sie in die verschiedenen Gewebe einwandern. Innerhalb des Gewebes ist der von verschiedenen Gewebezellen (z.B. Fibroblasten) produzierte Wachstumsfaktor SCF (*stem cell factor* oder *c-kit* ligand) für die Bildung von Granula und für die Ausdifferenzierung zu adulten Mastzellen verantwortlich^{6,7}. SCF, welcher über CD117 (c-kit) an Mastzellen gebunden wird, ist jedoch nicht nur für die Zellreifung, sondern auch für das Überleben und die Proliferation der Zellen im Gewebe unabdingbar⁸. Mastzellen tragen im Gegensatz zu anderen Knochenmarkszellen CD117 in allen Entwicklungsstadien auf der Oberfläche⁹. Neben SCF werden auch Chemokine als verantwortliche Stimuli zur Einwanderung der Stammzellen in die verschiedenen Gewebe diskutiert.

Die physiologische Bedeutung von Mastzellen manifestiert sich sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunabwehr des Körpers¹⁰⁻¹². Verschiedene Hinweise legen nahe, dass eine physiologische Rolle von Mastzellen in der Bekämpfung von Parasiten liegt. So führt eine Darminfektion mit Würmern zu einer Anhäufung von Mastzellen, einer sogenannten Mastozytose im Darm¹³. Zudem zeigen mastzelldefiziente Mäuse gegenüber den entsprechenden Wildtypen eine deutlich reduzierte Kapazität in der Bekämpfung von Wurminfektionen¹⁴. Zusätzlich fördern Mastzellen die Entwicklung von T_H2-Zellen und ermöglichen in B-Zellen den Klassenwechsel zu IgE-Immunglobulinen. Auch die Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen konnte für Mastzellen nachgewiesen werden¹⁵.

Im Rahmen ihrer Rolle in der angeborenen Immunität ist beschrieben worden, dass Mastzellen zur Phagozytose von Fremdpartikeln und Bakterien fähig sind. Außerdem wurde ein weites Spektrum von *toll-like*-Rezeptoren auf Mastzellen gefunden. Rezeptoren dieser Gruppe binden verschiedene Bestandteile mikrobieller Erreger und induzieren die Produktion von Zytokinen in verschiedenen Zelltypen. Die Bindung von mikrobiellen Bestandteilen an diese Klasse von Rezeptoren führt in Mastzellen zwar nicht zu einer Degranulation, jedoch konnte die Sekretion von Zytokinen, wie zum Beispiel TNF, IL-6 und IL-8, welche das Einwandern von anderen Effektorzellen in das betroffene Gewebe ermöglichen¹⁶, nachgewiesen werden.

Die bekannteste physiologische Aktivierung von Mastzellen ist die Quervernetzung der IgE-Rezeptoren ($Fc_{\epsilon}RI$). Im Gegensatz zu allen anderen Fc-Rezeptoren binden diese Rezeptoren hochaffin freies Immunglobulin der Klasse E über die Fc-Region und sind daher *in vivo* stets beladen. IgE wird von Plasmazellen bestimmter Lymphknoten gebildet, die in räumlicher Nähe zu den Eintrittsstellen der Allergene liegen¹⁷.

Bindet ein Antigen mehrere IgE-Moleküle auf der Oberfläche von Mastzellen, so kommt es durch die Quervernetzung ("crosslinking") der Fc_{ϵ}-Rezeptoren zu einer Zellaktivierung, welche in einer schnellen Freisetzung von Mediatoren mündet. Neben der durch Antikörper vermittelten Aktivierung gibt es eine Reihe von IgE-unabhängigen Stimuli für Mastzellen, die ebenfalls eine Degranulation auslösen können. Zu diesen Stimuli gehören physiologisch auftretende Mediatoren, wie zum Beispiel das Neuropeptid Substanz P (SP)¹⁸, Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und das Hormon Somastatin. Darüber hinaus können synthetische Agenzien, wie z.B. das stark basische Peptid *compound 48/80*, das porenbildende Kalziumionophor A23187 oder das dem Bienengift ähnliche Oligopeptid Mastoparan¹⁸⁻²⁰ eine Degranulation in Mastzellen induzieren.

Mastzellen werden sowohl im Menschen als auch in anderen Spezies in verschiedene Subtypen unterteilt. Diese Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Granulainhalte und ihrer Lokalisation in den verschiedenen Geweben des Körpers. Das Einteilungsschema der Mastzellen ist jedoch nicht zwischen verschiedenen Spezies übertragbar²¹.

Beim Menschen werden Mastzellen aufgrund des Gehaltes an mastzellspezifischen Proteasen in zwei Subtypen unterteilt: Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren (M_T) und Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren (M_{TC})²². Diese beiden Subtypen unterscheiden sich auch hinsichtlich Form, Größe, Anzahl und Ultrastruktur der Granula^{23 24}. Neben Tryptase und Chymase exprimieren Mastzellen vom Typ M_{TC} Proteasen wie Carboxypeptidase und KathepsinG²⁵. Während Lungengewebe und die Mukosa des Darmes und der Nase hauptsächlich Mastzellen des Subtyps M_T beinhalten, sind M_{TC}-Mastzellen vor allem in der Haut, den Mandeln und in der Submukosa des Darmes zu finden²⁶. Die physiologische Bedeutung der Subtypen ist noch nicht geklärt.

1.1.1 Chemokine, deren Rezeptoren und ihre Vertreter auf Mastzellen

Chemokine sind eine Klasse von Zytokinen, deren gemeinsame Eigenschaft es ist, in entsprechenden Zielzellen eine gerichtete Migration (Chemotaxis) zu induzieren. Die Familie der Chemokine lässt sich in zwei große Gruppen unterteilen: den CXC-Chemokinen und den CC-Chemokinen. Während bei CC-Chemokinen die ersten beiden Cysteinreste direkt benachbart sind, sind diese bei CXC-Chemokinen durch eine beliebige Aminosäure getrennt. Innerhalb der CXC-Chemokine weist eine Gruppe mit der N-terminalen Konsensussequenz Glu-Leu-Arg, dem so genannten ELR-Motiv, ein gemeinsames Strukturmerkmal auf. Chemokine mit diesem Motiv binden an gemeinsame Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2) und werden den non-ELR-CXC-Chemokinen gegenübergestellt²⁷.

Zwei Chemokine lassen sich nicht in diese beiden Gruppen einteilen, das C-Chemokin Lymphotactin, welches nur ein Cysteinrest besitzt und das CX_3C -Chemokin Fractalkin mit drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten²⁷.

Chemokine binden im Allgemeinen an mehrere Chemokinrezeptoren. Umgekehrt sind die meisten Chemokinrezeptoren in der Lage, mit verschiedenen Chemokinen zu interagieren, jedoch binden CC-Chemokine nur an CC-Chemokinrezeptoren und CXC-Chemokine nur an CXC-Chemokinrezeptoren. Zur Zeit sind neun verschiedene CC-Rezeptoren (CCR1-9)²⁷ und sieben verschiedene CXC-Rezeptoren (CXCR1-7)^{28,29} bekannt.

Sämtliche Chemokinrezeptoren sind integrale Membranproteine mit sieben membrandurchspannenden Helices. Ein weiteres gemeinsames Merkmal ist die Beteiligung von heterodimeren G-Proteinen in der Signaltransduktion²⁷.

Mastzellen produzieren ein breites Spektrum von Chemokinen, jedoch werden diese Mediatoren in der Regel erst nach Zellaktivierung freigesetzt³⁰. Da die Produktion der Chemokine nach der Aktivierung und das Einwandern der verschiedenen Zelltypen in das Gewebe eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, manifestiert sich die Wirkung dieser Botenstoffe vor allem in der späten Phase nach der Mastzellaktivierung, d.h. etwa 6-9h nach Kontakt mit dem Stimulus.

Von Mastzellen produzierte Chemokine wie MIP-1 alpha (CCL3; Makrophagen inflammatorisches Protein-1 alpha)³¹, MIP-1 beta (CCL4; Makrophagen inflammatorisches Protein -1 beta)³², IL-8 (CXCL8; Interleukin-8)³³⁻³⁶ und MCP-1 (CCL2; Monozyten chemoattraktives Protein-1)^{37,38} wirken über unterschiedliche Rezeptoren als Chemoattraktoren auf eine Reihe verschiedener Zelltypen, wie beispielsweise Monozyten, T-Zellen oder Granulozyten.

1.1.2 Die allergische Sofortreaktion

Der Begriff "Allergie" wurde erstmals von Clemens von Pirquet geprägt und von ihm als "eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren" definiert. Da diese Definition jedoch prinzipiell auf alle Immunreaktionen zutrifft, wird die Allergie heute als "Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird", definiert. Die Allergie gehört zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man "Hypersensibilität" oder "Überempfindlichkeit" bezeichnet. Diese nachteiligen als Immunreaktionen verursachen Gewebeschäden und können zu ernsthaften Erkrankungen führen. Coombs und Gell haben diese Hypersensibilitätsreaktionen in vier Typen eingeteilt, wobei die Allergie häufig mit der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ 1, auch Typ der allergischen Sofortreaktion genannt, gleichgesetzt wird¹⁷. Bei diesem Reaktionstyp wird das pathologische Erscheinungsbild durch die Aktivierung von Mastzellen bestimmt. Durch die Aktivierung von Mastzellen werden verschiedene präformierte Mediatoren sezerniert, die direkten Einfluss auf das umliegende Gewebe haben. So bewirken die Enzyme Tryptase, Chymase, Kathepsin G und Carboxypeptidase durch Aktivierung von Metalloproteasen einen Umbau der Bindegewebematrix. Neben diesen Enzymen werden auch das kurzlebige vasoaktive Histamin und das Glykosaminoglykan Heparin sezerniert, welche toxisch auf Parasiten wirken, die Gefäßdurchlässigkeit erhöhen und eine Kontraktion der glatten Muskulatur auslösen. Diese Wirkung wird durch zusätzlich freiwerdende Lipidmediatoren wie Leukotrien C4, D4 und E4, noch verstärkt. Lipidmediatoren sind auch für eine verstärkte Schleimsekretion und die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion verantwortlich¹⁷.

Das klinische Bild einer allergischen Reaktion hängt sowohl von der Menge der vorhandenen allergenspezifischen IgE-Antikörper, als auch von der Dosis des Allergens und dessen Eintrittsweg ab. Allergene dringen normalerweise in geringen Dosen durch Diffusion über die Schleimhäute in die darunterliegenden Gewebe ein und lösen bei Kontakt mit Mastzellen eine allergische Sofortreaktion aus.

Bei der allergischen Sofortreaktion konzentrieren sich die Auswirkungen auf die Stelle des Gewebes, an der die Mastzelldegranulation stattfand. Die sezernierten Mediatoren lösen in dem betroffenen Gewebe eine Reihe verschiedener Reaktionen und damit klinischer Symptome aus¹⁷.

Da die Atemwege der häufigste Eintrittsweg für Allergene darstellt, zeigen viele Menschen schwache Allergien gegen eingeatmete Allergene. Diese Art von Allergien sind bekannt unter den Namen "allergische Rhinitis" oder "Heuschnupfen". Hier werden Mastzellen in der Schleimhaut des Riechepithels beispielsweise durch freigesetzte Proteine aus Pollenkörnern

aktiviert. Durch das ausgeschüttete Histamin kommte es zu intensivem Juckreiz und Niesanfällen. Die Bildung von lokalen Ödemen führt zu einer Nasenverstopfung und zur verstärkten Schleimproduktion.

Beim allergischen Asthma ist die Lunge das betroffene Organ. Durch das Einatmen eines Allergens werden Mastzellen in der Submucosa der unteren Atemwege aktiviert. Die daraufhin sezernierten Mediatoren lösen eine Kontraktion der Bronchien und eine verstärkte Flüssigkeits- und Schleimabsonderung aus, was zu Hustenanfällen und Atemnot führt¹⁷.

Bei der akuten Nesselsucht (*acute urticaria*) manifestiert sich die allergische Sofortreaktion in der Haut. Werden Patienten, bei denen beispielsweise eine Allergie gegen Latex oder Insektengifte vorliegt, mit den entsprechenden Allergenen konfrontiert, so degranulieren ihre Hautmastzellen. Dies führt zu Gefäßerweiterungen und damit zu Hautrötungen und zum Jucken der betroffenen Haut³⁹.

Gelangt ein Allergen direkt in die Blutbahn, so können theoretisch die Mastzellen an jedem Blutgefäß des Körpers aktiviert werden mit der möglichen Folge des potentiell lebensbedrohlichen Syndroms der systemischen Anaphylaxie. Charakteristischerweise führt die Erhöhung der Gefäßpermeabilität in vielen Blutgefäßen des Körpers zu extremen Blutdruckabfall und sowohl die Kontraktion der Atemwege als auch das Anschwellen des Kehldeckels kann die Atmung bis hin zum Erstickungstod erschweren. Auslöser eines anaphylaktischen Schocks sind vor allem Allergene, die sich schnell systematisch im Körper verteilen. Hierzu gehören beispielsweise Antibiotika aber auch Insektengifte, welche durch den Einstich sofort in das Blutgefäßsystem gelangen¹⁷.

1.1.3 Die allergische Spätreaktion

Während die allergische Sofortreaktion innerhalb von Sekunden nach der Mastzellaktivierung beginnt, setzt die allergische Spätreaktion erst 6-9h nach dem Kontakt mit dem Allergen ein. Die allergische Spätreaktion wird sowohl durch präformierte als auch durch neusynthetisierte Mediatoren nach der Mastzellaktivierung eingeleitet. Durch die Sekretion von Zytokinen, wie TNF, Leukotrien B4 oder Histamin werden Endothelzellen aktiviert, wobei TNF nach der Aktivierung der Mastzellen weiterhin in großen Mengen produziert und sezerniert wird. Die Aktivierung von Endothelzellen durch diese Mediatoren vermittelt eine Aufregulation der Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin und ICAM-1 auf ihrer Oberfläche. An diese Moleküle können Leukozyten, wie beispielsweise Neutrophile^{40,41}, Monozyten¹⁷ und CD4⁺ T-Zellen⁴² aus dem Blutstrom binden und nachfolgend über einen als Transmigration

beschriebenen Vorgang in das Gewebe einwandern. Durch Chemokine, wie zum Beispiel das von Mastzellen sezernierte MIP-1 alpha oder IL-8, geleitet gelangen die Zellen zum Ort der Entzündung. Darüberhinaus wirken Chemokine auch auf Zellen, die sich innerhalb des Gewebes befinden, wie Eosinophile⁴³, Basophile⁴⁴ oder Makrophagen⁴⁵. Unabhängig davon ob diese Zellen aus dem Blutstrom oder dem Gewebe rekrutiert sind, werden sie durch die von Mastzellen freigesetzten Mediatoren aktiviert. Die so aktivierten Immunzellen schütten weitere immunregulatorische Substanzen aus, welche eine Aufrechterhaltung und Intensivierung der Entzündungsreaktion bewirken. So fördert das durch aktivierte Mastzellen freigewordene IL-3, IL-5 und GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor) die Bildung von Eosinophilen und aktiviert diese, was wiederum eine Freisetzung von MBP (*major basic protein*) zur Folge hat. MBP aktiviert nachfolgend weitere Mastzellen und Basophile.

Neben Mastzellen werden Basophile und vor allem Eosinophile für die starken Gewebeschäden der allergischen Spätreaktion verantwortlich gemacht. Basophile besitzen ebenso wie Mastzellen Histamin in ihren Granula, welches nach Aktivierung frei wird. Aktivierte Eosinophile sezernieren das bereits erwähnte MBP, welches nicht nur toxisch für Parasiten, sondern auch für Säugerzellen ist. Freigesetzte Kollagenase hat den Umbau der Bindegewebsmatrix zur Folge und Neurotoxine schädigen in der Nähe des Entzündungsherdes befindliche Nervenbahnen.

Die allergische Spätreaktion ist in der Regel klinisch weniger ausgeprägt als die Sofortreaktion. Typischerweise wird sie begleitet von einer zweiten Kontraktionsphase der glatten Muskulatur und anhaltenden Ödemen. Durch längerfristige Anwesenheit des Allergens, welches spezifische T_H 2-Zellen stimuliert und somit zu einer Eosinophilie und zu weiterer IgE-Produktion führt, kann es, wie zum Beispiel beim chronischen Asthma, zu längerfristigen und schwerwiegenden Krankheitsbildern kommen¹⁷.

1.2 Thrombozyten in der allergischen Situation

Schon Ende der achtziger und Anfang der neunziger Jahre konnte gezeigt werden, dass bei Asthmapatienten der intravaskuläre Spiegel der thrombozyten-spezifischen Chemokine Plättchenfaktor 4 (PF-4) und β-Thromboglobulin (β-TG) nach einem asthmatischen Anfall deutlich ansteigt⁴⁶. In weiteren Untersuchungen wurden Plättchenmediatoren in Lavageflüssigkeiten von Asthmapatienten 19h nach Allergenkontakt nachgewiesen⁴⁷. Verschiedene Befunde machen deutlich, dass während einer allergischen Situation Plättchen ins Lungengewebe gelangen können. Zum einen konnten in Proben von Bronchialbiopsien asthmatischer Patienten Thrombozyten außerhalb von Blutgefäßen und auf der Oberfläche von zerstörten Epithelien nachgewiesen werden^{48,49}. Zum anderen wurde bei Asthmatikern eine verminderte Zahl an zirkulierenden Thrombozyten (*Thrombozytopenie*) nach Allergenprovokation festgestellt⁵⁰. Weiterhin legen Versuche in Tiermodellen die Vermutung nahe, dass Thrombozyten nach Exposition gegenüber Allergenen aktiv ins Gewebe einwandern⁵¹.

All diese Ergebnisse sprechen dafür, dass im Zuge einer allergischen Reaktion thrombozytäre Chemokine mit Mastzellen im betroffenen Gewebe in Kontakt kommen können.

Neben Mastzellen und anderen Zellen ist beschrieben, dass auch Thrombozyten die Rezeptoren Fc_{ε} -RI und Fc_{ε} -RII für IgE besitzen⁵²⁻⁵⁴. Zusätzlich wurde bei Asthmatikern eine höhere Expression des hochaffinen Fc_{ε} -Rezeptors auf Thrombozyten nachgewiesen als bei einer gesunden Kontrollgruppe⁵⁵. Den direkten Beweis für eine Aktivierung von Thrombozyten durch ein Allergen konnte Cardot *et al.* 1992 erbringen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Thrombozyten, die aus Patienten mit einer Hausstaubmilbenallergie gewonnen wurden, sich durch die entsprechenden künstlichen Allergene aktivieren lassen⁵⁶.

1.2.1 Thrombozytäre Chemokine

Zu den wichtigsten Vertretern der thrombozytären Chemokine gehören β -TG (CXCL7) und PF-4 (CXCL4). Diese CXC-Chemokine werden in den alpha-Granula von Blutplättchen gespeichert und nach Thrombozytenaggregation in ungewöhnlich hohen Konzentrationen freigesetzt. Während das Plasma gesunder Spender nur Spuren dieser Chemokine aufweist, findet man im Serum mit 0,4 - 1,9 µmol/L PF-4 und 1,6 - 4,8 µmol/L β -TG etwa 1000-fach höhere Konzentrationen⁵⁷. Neben Thrombozyten und deren Vorläuferzellen, die umfangreiche Mengen dieser Chemokine freisetzen, können auch andere Zellen wie Mastzellen⁵⁸,

Monozyten, Neutrophilen und T-Zellen ⁵⁹ im eingeschränkten Umfang diese Zytokine bilden. Über die physiologische Relevanz dieses Phänomens ist jedoch bisher wenig bekannt.

β-TG repräsentiert eine Gruppe von homologen CXC-Proteinen, welche Spaltprodukte des Vorläufermoleküls Basisches Plättchenprotein (*platelet basic protein*; PBP) darstellen. Es konnten bisher nur zwei Formen der β-Thromboglobuline in Thrombozyten gefunden werden, PBP und das Bindegewebe aktivierende Peptid –III (*connective tissue activating peptide III*; CTAP-III)^{60,61}. Sowohl in nichtaktivierten Thrombozyten, als auch in Überständen von aktivierten Plättchen liegen β-Thromboglobuline zu 90% als CTAP-III vor⁵⁷. Aus dem CTAP-III gehen durch N-terminale Proteolyse weitere Isoformen hervor. Besonders zu erwähnen ist das Neutrophilen aktivierende Peptid –2 (NAP-2), welches die biologisch aktive Variante darstellt und sowohl aus CTAP-III als auch aus PBP entstehen kann^{62,63}.

PF-4 besitzt zu β-TG 53 % übereinstimmende Aminosäuren. Im Gegensatz zum letzteren Protein findet sich in PF-4 jedoch kein ELR-Motiv und damit keine Bindung an CXCR1 oder CXCR2^{64,65}. Erst 1998 konnte der erste Rezeptor für PF-4 von F. Petersen⁶⁶ auf Neutrophilen entdeckt werden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht, wie bei den anderen CXC-Rezeptoren, um einen Sieben-transmembran-Rezeptor, sondern um ein Chrondroitinsulfat Proteoglykan. Lasagni und Mitarbeiter beschrieben 2003 einen weiteren Rezeptor für PF-4⁶⁷. Hierbei handelt es sich um eine Splice-Variante des CXCR3, die als CXCR3B bezeichnet wird. Während der auf Neutrophilen⁶⁶und Monozyten⁶⁸ exprimierte Proteoglykanrezeptor eine Aktivierung dieser Zellen vermittelt, könnte der vorwiegend auf T-Zellen und Endothelzellen exprimierte CXCR3B an einer Hemmung von zellulären Funktionen beteiligt sein.

PF-4 induziert in Neutrophilen eine feste Adhärenz an Endothelzellen⁶⁹ und nachfolgend die Exozytose von Inhalten der sekundären Granula⁷⁰.

Neben den verschiedenen Funktionen von PF-4 auf Neutrophile und Monozyten konnte unter meiner Mitwirkung 2006⁷¹gezeigt werden, dass PF-4 eine regulatorische Funktion bei der proteolytischen Spaltung von CTAP-III zu NAP-2 besitzt. Da diese Spaltung unter anderem mittels mastzellspezifischer Proteasen erfolgt, soll dieser Mechanismus im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden.

1.2.2 Prozessierung thrombozytärer Chemokine durch Mastzellen

Die von Neutrophilen exprimierte Serinprotease Kathepsin G ist in der Lage, durch limitierte proteolytische Spaltung 15 Aminosäuren vom N-Terminus des CTAP-III zu entfernen und damit zu NAP-2 zu prozessieren^{62,63,72,73}. F. Schiemann konnte 2005 nicht nur zeigen, dass Mastzellen, die neben Neutrophilen als einzige bekannte Zellpopulation Kathepsin G exprimieren, ebenfalls zu dieser Prozessierung fähig sind, sondern dass diese sich darüber hinaus als wesentlich effektiver erwiesen als Neutrophile⁷¹. Als Ursache für dieses Phänomen konnte die Beteiligung der mastzellspezifischen Serinprotease Chymase an der Spaltung ermittelt werden. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde eine im Vergleich zu Kathepsin G doppelt so hohe Aktivität der Chymase beobachtet.

Interessanterweise zeigte sich, dass das simultan mit dem CTAP-III sezernierte PF-4 einen Einfluss auf dessen Prozessierung hat, indem es die Aktivität sowohl von Kathepsin G als auch von Chymase in nicht-kompetitiver Weise hemmt.

Erstaunlich war hierbei das hohe inhibitorische Potential von PF-4. Bei Neutrophilen konnte eine halbmaximale Inhibition bereits bei 75 nM erreicht werden, während diese bei Mastzellen 220 nM betrug. Damit konnte erstmalig die Funktion eines Chemokins als Inhibitor einer Protease nachgewiesen werden.

He *et al.* 2002⁷⁴ konnte Lactoferrin als einen Inhibitor für Mastzell-Tryptase, -Chymase und Kathepsin G identifizieren. Lactoferrin zeigt antibakterielle, antivirale und antimykotische Wirkung und wird in den sekundären Granula von Neutrophilen gespeichert. Durch Aktivierung der Neutrophilen wird Lactoferrin ins umgebende Medium sezerniert. Neben der Enzym-inhibitorischen Funktion zeigt Lactoferrin auch eine stabilisierende Wirkung auf anti-IgE-stimulierte Mastzellen, weswegen sein Einsatz als potentielles Antiallergikum diskutiert wird.

Durch den Befund, dass ein Mastzell - Proteaseinhibitor ebenfalls ein Mastzellstabilisator sein kann, stellte sich nun die Frage, ob PF-4 ebenfalls die Degranulation von Mastzellen beeinflussen kann.

1.3 Fragestellung

Es ist bekannt, dass im Zuge einer allergischen Sofortreaktion sowohl Mastzellen als auch Thrombozyten im betroffenen Gewebe aktiviert werden. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob und wie Thrombozyten-Mediatoren Mastzellen beeinflussen können. Schwerpunkt dieser Arbeit war es zunächst zu prüfen, ob thrombozytäre Chemokine Mastzellen direkt aktivieren können. Weiterhin sollte geklärt werden, ob diese Mediatoren andere Zellen in der allergischen Spätreaktion aktivieren können, die wiederum indirekt einen Einfluss auf Mastzellen im entzündeten Gewebe haben.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Gewinnung von Mastzellen aus Lungengewebe etabliert wurde, standen folgende Fragen im Mittelpunkt:

- Besitzen Mastzellen Rezeptoren f
 ür thrombozyt
 äre Chemokine?
 Die Antwort auf diese Frage sollte die generelle Reaktionsbereitschaft von Mastzellen gegen
 über Pl
 ättchenfaktoren kl
 ären. Im Mittelpunkt standen hier die Rezeptoren f
 ür NAP-2 und PF-4.
- 2. Regulieren thrombozytäre Chemokine die Degranulation von Mastzellen? Hier sollte untersucht werden, ob die Chemokine direkt eine Degranulation in Mastzellen bewirken können, ob sie einen Einfluss auf die anti-IgE vermittelte Degranulation haben und ob sie in Kooperation mit sezernierten antimikrobiellen Peptiden aus Neutrophilen einen Einfluss auf die Degranulation von Mastzellen haben.
- 3. Induziert PF-4 in Mastzellen die Produktion von Zytokinen?

Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob bestimmte Zytokine nach PF-4 Stimulation exprimiert werden und ob diese Zytokine einen Einfluss auf weitere Zelltypen im betroffenen Gewebe haben.

2. Materialien und Methoden

Sofern nicht im Text aufgeführt, sind die Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer dem Anhang (siehe: Abschnitt 7) zu entnehmen.

2.1 Agenzien zur Stimulation und Kultur von Zellen

Das aufgereinigte humane Myeloma - IgE stammte von der Firma Calbiochem (Frankfurt a.M.). Das polyklonale Antiserum der Ziege gegen humanes Immunglobulin E (α -IgE) wurde von der Firma Biosource (Marseille, Frankreich) erworben. Substanz P sowie fMLP (*Nformyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) (beides von Sigma, Taufkirchen) wurden zu 1 mg/ml bzw. 1 mM in *Aqua dest*. aufgenommen. Das Kalziumionophor A23187, welches zu einer Konzentration von 1 mg/ml in Ethanol aufgenommen wurde, stammte von der Firma Sigma. Der Hersteller der humanen rekombinanten Zytokine SCF (aufgenommen zu 100 µg/ml in *Aqua dest.*), RANTES (500 µg/ml), I-TAC (500 µg/ml) und TNF (10 µg/ml) ist die Firma Peprotech (London, UK). Das rekombinant in *E. coli* exprimierte humane LL-37 (Stammlösung: 1 mg/ml in 0,01%iger Essigsäure) stellte mir freundlicherweise R. Bals (Universität Marburg) zur Verfügung.

Alle oben genannten Reagenzien wurden bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

2.2 Aufreinigung von Agenzien zur Stimulation von Mastzellen

2.2.1 Aufreinigung humaner thrombozytärer Chemokine

Die humanen Chemokine, PBP, CTAP-III und PF-4 wurden in der Laborgruppe Biologische Chemie (Forschungszentrum Borstel) aus Überständen Thrombin stimulierter Thrombozyten gewonnen und zur Verfügung gestellt. Alle Varianten des β-TG Ag einschließlich des CTAP-III und PBP wurden zunächst mittels Immunaffinitäts-Chromatographie angereichert und anschließend Kationenaustauschüber sequentielle und Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC, analytische HPLC) bis zur Homogenität aufgereinigt⁶². PF-4 wurde aus Überständen von Thrombin stimulierten Thrombozyten in drei Schritten bis zur Homogenität aufgereinigt. Zuerst wurde B-TG Ag durch Immun-Affinitätschromatographie aus den Überständen entfernt⁶². Der Durchlauf wurde daraufhin mit Triton X-100 bis zu einer finalen Konzentration von 0,1% versetzt und einer Immun-Affinitätschromatographie mit immobilisiertem monoklonalem anti-PF-4 (Klon PF63.1) Antikörper zugeführt⁶⁸. Das Material wurde in einem einzelnen Peak bei pH 2,5 eluiert und daraufhin mittels RP-HPLC bis zur Homogenität aufgereinigt⁷⁰. Die verwendeten Präparationen aller thrombozytären Chemokine übertrafen stets 99 % Reinheit, wie durch Silberfärbung nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie durch automatisierte N-terminale Sequenzierung und Matrix unterstützte Laser Desorption / Ionisierung (MALDI-ToF, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) nachgewiesen wurde.

Das natürliche humane NAP-2 wurde aus CTAP-III durch limitierte Spaltung mittels Chymotrypsin hergestellt. Dazu wurde 1 mg CTAP-III in PBS für 30min bei 37°C mit 13 µg bovinem Pankreas-Chymotrypsin (87 U/mg, Serva, Heidelberg) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern auf 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 aufgereinigt⁷⁵. Hinsichtlich seiner Aminosäuresequenz und Aktivität entsprach seiner biologischen das gereinigte Chemokin dem aus Zellkulturüberständen stammenden NAP-2.

Nach der Präparation wurden die Chemokine in 0,1%iger TFA-Lösung lyophilisiert und bei -70°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die thrombozytären Chemokine wiederum in 0,1 %iger TFA gelöst, im Bicinchoninsäure-Assay (BCA, siehe: Abschnitt 2.5.1) auf ihren Proteingehalt hin überprüft und in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 mg/ml bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.2.2 Aufreinigung von alpha-Defensinen aus humanen Granulozyten

Die Aufreinigung von alpha-Defensinen (humanen Neutrophilen-Proteinen, HNP) wurde nach einer Methode von T. Ganz⁷⁶ von der Arbeitsgruppe Biologische Chemie (Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Die gereinigten Produkte wurden mir von dieser Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Zur Gewinnung der alpha-Defensine wurden zunächst zwischen $5x10^9$ bis $6x10^9$ Granulozyten, wie unter 2.5.6.1 beschrieben, aufgereinigt und das Zellpellet bei –20 °C eingefroren. Die Zelllysate wurden anschließend in 10 ml Sucrose (0,34M) aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschallstabes (Branson, Modell 250,USA) homogenisiert.

Nach Abtrennung großer Partikel (Zellen, Zellmembranbestandteilen) durch Zentrifugation bei 200 x g für 10min bei 4°C wurden, die in dem Überstand enthaltenen Granula, bei 27.000 x g für 30min bei 4°C sedimentiert. Der Inhalt des Sedimentes wurde nachfolgend mittels 10% iger Essigsäure über Nacht extrahiert und das Extrakt durch Lyophilisation eingeengt. Die in den Konzentraten enthaltenen Defensine wurden anschließend über eine Gelfiltration (Bio-Rad, Biogel P10, Gelvolumen ca. 200 ml) angereichert und dann über eine Poros-Säule R2 einer HPLC der Firma Thermo Separation Products bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Konzentration der gereinigten alpha-Defensine wurde anschließend sowohl in einem Sandwich-ELISA-Test als auch in einem BCA-Test bestimmt.

Die hochreinen Defensine wurden daraufhin zu 3,3 mg/ml in 0,01%iger Essigsäure aufgenommen und bei –20°C aufbewahrt.

2.3 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). Dispase und Chymopapain stammten von der Firma Sigma.

2.4 Zellisolierung und Zellkultur

2.4.1 Bestimmung der Zellviabilität

Zur Überprüfung der Viabilität aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen, wurde eine Vitalfärbung mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt. Trypanblau ist ein für Membranen lebender Zellen impermeabler Farbstoff, so dass nur tote Zellen intensiv gefärbt werden. Aliquots der Zellsuspensionen wurden zu gleichen Teilen mit Trypanblaulösung versetzt und der prozentuale Anteil lebender Zellen an der Gesamtzellzahl lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.4.2 Bestimmung des Mastzellanteils in Zellsuspensionen

Der Anteil an Mastzellen in den gewonnenen Zellpräparationen wurde mittels Färbung mit saurer Toluidinblau-Lösung bestimmt. Während sich Zellkerne in salzsaurer Toluidinblau-Lösung blau darstellen lassen, nehmen die cytoplasmatischen Granula von Mastzellen einen tiefen violetten Farbton an. Da das Cytoplasma anderer Zellen ungefärbt bleibt, lassen sich diese von Mastzellen gut unterscheiden. Zur Bestimmung des Mastzellanteils wurden Aliquots der Zellensuspensionen 1:2 mit Toluidinblau-Lösung (siehe Anhang: Abschnitt 7) verdünnt in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Nach 20min wurden sowohl die gesamten Zellen als auch die Mastzellen lichtmikroskopisch ausgezählt und der Anteil an Mastzellen an der Gesamtfraktion errechnet.

2.4.3 Isolierung und Kultur von Mastzellen aus humanem Lungen- und Hautgewebe

2.4.3.1 Herkunft und Vorbehandlung des Lungengewebes

Das Lungengewebe stammte von Patienten mit nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomen bei denen eine Lobektomie bzw. eine Pneumektomie vorgenommen wurde.

Das Gewebe wurde im Klinikum Großhansdorf entnommen und zur Diagnose in die Pathologie des FZB geschickt. Nach dem Entfernen des Tumorgewebes wurde mir das tumorfreie Gewebe zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. Hierzu liegt ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 03-158) vor.

2.4.3.2 Mechanischer und und enzymatischer Aufschluss des Lungengewebes

Nach Erhalt wurde das Lungengewebe gewogen und in Tyrode's – Puffer bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Damit die Enzyme beim Verdau eine möglichst große Angriffsfläche haben, wurde das Gewebe mittels einer Schere in ca. 1-2 mm³ große Stücke zerschnitten. Zur Entfernung des im Gewebe enthaltenen Blutes wurde das Material über Nacht bei 4°C in Tyrode's – Puffer gewaschen.

Am nachfolgenden Tag wurden die Gewebestücke über ein Sieb vom Tyrode's –Puffer getrennt und dem enzymatischen Verdau zugeführt.

Der enzymatische Aufschluss der Gewebestücke erfolgte 4 Std. bei 37°C unter Agitation in 1 ml Verdaupuffer pro Gramm Gewebe. Der Verdaupuffer bestand aus TGMD-Puffer + 0,1 % Gelatine, 1,5 mg/ml Dispase II, 0,375 mg/ml Chymopapain, 0,75 mg/ml Kollagenase Typ I, 1,79 mg/ml Elastase.

Nach 4 Std. wurden die größeren verbliebenen Gewebestücke über ein Sieb vom Verdaupuffer mit den vereinzelten Zellen abgetrennt und verworfen. Residuelle Gewebestücke wurden durch Filtration durch Gaze (Maschenweite: 120 µm) entfernt.

Die in der Suspension enthaltenen Enzyme wurden durch zweimaliges Waschen (10min, 300 x g, 20°C) entfernt und die Zellen in 20 ml TGMD-Puffer für die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation aufgenommen.

2.4.3.3 Anreicherung der Lungenmastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Isotonisches Percollmedium wurde aus einem Konzentrat nach Angaben des Herstellers (Sigma, Taufkirchen) in TGMD-Puffer angesetzt und daraus nachfolgend Lösungen mit der Dichte von jeweils 80%, 60% und 50% in TGMD-Puffer hergestellt.

In 50 ml Kunststoffröhrchen wurde zunächst 10 ml 80% ige Percolllösung vorgelegt und diese dann vorsichtig mit 10 ml der 50% igen Lösung überschichtet. Die unter 2.5.1.2 gewonnene Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit der 60% igen Lösung vermischt und 10 ml dieser nun 30% igen Percolllösung auf den Gradienten aufgetragen. Der Gradient wurde durch Auftrag von 5 ml reinem TGMD-Puffer abgeschlossen und für 20min bei 20°C und 400 x g zentrifugiert.



Abbildung 1: Verteilung der Zellen vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation

Vor der Zentrifugation befanden sich die Zellen in der 30 %igen Percolllösung. Nach der Zentrifugation verteilen sich die Zellen, abhängig von ihrer Dichte, auf den Percollgradienten.

Die Fraktionen A,B,C und D zeigen an bis zu welchem Punkt die einzelnen Fraktionen nach der Zentrifugation abgeerntet wurden.

Während der Dichtegradientenzentrifugation verteilen sich die Zellen entsprechend ihrer Dichte über den Percoll-Gradienten. Zellen, die eine höhere Dichte als die 80%ige Percolllösung besitzen (hauptsächlich Erythrozyten) werden als Pellet auf den Boden des Kunststoffröhrchens zentrifugiert. Mastzellen befinden sich zum überwiegenden Teil in der 50%igen und an der Grenzschicht zur 80%igen Percolllösung.

Alle anderen Zellen verteilen sich gemäß ihrer Dichte über die übrigen Percolllösungen.

Nach der Zentrifugation wurden die Fraktionen A-D des Percoll-Gradienten, wie in Abbildung 1 beschrieben, mittels einer Pipette einzeln abgenommen, mit den korrespondierenden Fraktionen aus den anderen Kunststoffröhrchen vereinigt und die Zahl der enthaltenen Mastzellen bestimmt.

2.4.3.4 Isolierung von Mastzellen aus humanem Hautgewebe

Die Hautmastzellen wurden wie bereits beschrieben^{71,77-79} isoliert und mir von Dr. F. Schiemann (FZB, LG Biologische Chemie) zur Verfügung gestellt.

Die zur Isolierung verwendten Gewebeproben waren Hautresektate von Patienten, die sich in der Klinik für Hand-, Brust und Plastische Chirurgie am Klinikum Neustadt einem schönheitschirurgischen Eingriff unterzogen hatten. Die Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme in ein eiskaltes Transportmedium überführt und mit dem Einverständnis der Patienten zur weiteren Verwendung ins Forschungszentrum Borstel verbracht. Ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 04-90) liegt vor.

Vergleichbar der Prozedur zur Gewinnung von Lungenmastzellen, wurde das Hautgewebe zunächst mechanisch zerkleinert und nachfolgend enzymatisch aufgeschlossen. Der Unterschied zum enzymatischen Aufschluss des Lungengewebes liegt in der Zusammensetzung des Enzymcocktails. Bei der Haut wurden Hyaluronidase, Kollagenase Typ IV (beide Worthington Biochemicals; Lakewood, NJ, USA) und Liberase (Roche; Basel, Schweiz) verwendet. Im Anschluss daran wurden die Hautmastzellen wie unter 2.4.1.3 für Lungenmastzellen beschrieben mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt, mit dem Unterschied, dass bei den Hautmastzellen die 30%ige Percolllösung nicht verwendet wurde.

2.4.3.5 Aufreinigung der Mastzellen mittels Magnetseparation

Eine relativ neue und in den vergangenen Jahren weiterentwickelte Methode zur Aufreinigung von Zellpopulationen ist die Magnetseparation. Diese bietet neben einer unkomplizierten Anwendung den Vorteil eines hohen Probendurchsatzes bei einer guten Reinigungseffizienz (Reinheiten: >90%). Aus diesen Gründen wurde dieses Verfahren zur Aufreinigung der Mastzellen verwendet.

Um eine Aufreinigung von Zellen aus einer Zellsuspension mittels diesen Verfahrens erfolgreich durchführen zu können, benötigt man einen Antikörper der gegen ein zelltypspezifisches Antigen gerichtet ist.

Dieser Antikörper kann entweder direkt an paramagnetische beads gekoppelt sein (siehe: Aufreinigung der Mastzellen über CD117; Seite 22) oder wird in einem indirekten Verfahren an einen microbead gekoppelten Sekundärantikörper adsorbiert (siehe: Aufreinigung der Mastzellen über CD203c; Seite 21).

Im Rahmen meiner Dissertation wurde zunächst die Effizienz einer Aufreinigung über das Antigen CD203c mit der Aufreinigung über das Antigen CD117 (c-kit) vergleichend untersucht.

Aufreinigung der Mastzellen über CD203c:

Im Rahmen der Dissertationsarbeit von Dr. Florian Schiemann⁷¹ wurde die Isolierung von Hautmastzellen über das Antigen CD203c beschrieben. Bei diesem Antigen handelt es sich um ein Ektoenzym, welches auf Stammzellen, basophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert wird^{80,81}. Mit Hilfe des Antikörpers 97A6, der gegen dieses Antigen gerichtet ist, konnte Buhring *et al.*⁸¹ bereits Stammzellen aus dem Knochenmark und Basophile aus peripherem Blut isolieren.

Da bis zu dem Zeitpunkt dieser Experimente noch keine anti-CD203c-Microbeads kommerziell erhältlich waren, wurde ein Phycoerythrin (PE)-gekoppelter AK verwendet. Wie vorhergehend beschrieben, mussten zusätzlich anti-PE-Microbeads verwendet werden, um die markierten Zellen an die Säule zu binden.

Dr. Florian Schiemann konnte in seiner Dissertation ebenfalls zeigen, dass Bestandteile aus der Zellsuspension nach der Percoll-Gradienten-Zentrifugation die anti-PE-Microbeads unspezifisch binden. Aus diesem Grund wurde der eigentlichen, spezifischen Mastzellisolation über CD203c ein Reinigungsschritt durch alleinige Inkubation mit anti-PE-Microbeads vorangestellt.

Die Aufreinigung der Lungen- und Hautmastzellen durch Magnetseparation wurde nach dem MidiMACS – Verfahren der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach durchgeführt.

Die Zellen aus der Fraktion B, der Percoll-Gradienten-Zentrifugation, wurden in entgastem PBS-D–Puffer + 0,5 % BSA (MACS-Puffer) gewaschen und zu 5 x 10^7 Zellen /ml in MACS-Puffer aufgenommen und 10min mit anti-PE-Microbeads (1:20, Miltenyi) bei 4°C inkubiert. Die ungebundenen Microbeads wurden daraufhin durch Waschen in 5 ml MACS-Puffer entfernt (300 x g, 10min, 4°C). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine LS-Säule (Miltenyi) gegeben, die zuvor mit 4 Säulenvolumina (1 SV = 3 ml) MACS-Puffer äquilibriert und in einen Midi-MACS-Magneten (Miltenyi) eingespannt worden war. Während des Spülens mit 3 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 2 SV MACS-Puffer mit einem Stempel (Miltenyi) durch die Säule gedrückt. Die so eluierte Zellsuspension enthielt keine relevanten Mengen an Mastzellen und wurde verworfen.

Wie unter 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben 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 $5x10^7$ Zellen/ml in PBS-D-Puffer + 0,5% BSA aufgenommen und mit einem Phycoerythrin-gekoppelten, murinen Antikörper gegen CD203c (Maus anti human-CD203c-PE; Klon 97A6, Isotyp IgG₁, Immunotech, Marseille, Frankreich) für 45min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nachdem der ungebundene anti-CD203c-PE durch Waschen entfernt worden war, folgte wiederum ein Inkubationsschritt mit anti-PE-Microbeads (1:20 bei 5 x 10^7 Zellen/ml für 10min). Nach Abzentrifugieren (300 x g 10min 4°C) wurden die ungebundenen anti-PE-Microbeads entfernt, das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen und in gleicher Weise wie bereits zuvor beschrieben über eine LS-Säule aufgetrennt. Der Durchlauf wurde ebenso wie das mastzellreiche Eluat auf Zellzahl, Viabilität und Mastzellanteil hin untersucht. Die so aufgereinigten Mastzellen wurden zentrifugiert und anschließend in Kultur genommen.

Aufreinigung der Mastzellen über CD117 (c-kit):

CD117 oder auch c-kit ist der Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF (stem-cell-factor) und wird von Stammzellen und Mastzellen exprimiert.

Nachdem der Mastzellanteil und die Viabilität der Zellen aus der Fraktion B der Percoll-Gradienten-Zentrifugation bestimmt wurde, wurden die Zellen in entgastem MACS-Puffer gewaschen und in 300 µl dieses Puffers aufgenommen. Daraufhin wurden 100 µl Fc-Rezeptor-Blockierungsreagenz (Miltenyi) und 100 µl anti-CD117 Microbeads (Maus anti human –CD117-Beads, Miltenyi) gemäß den Angaben von Miltenyi, zu der Zellsuspension dazugegeben und für 15min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Zellsuspension erneut in entgastem MACS-Puffer gewaschen und in 5 ml dieses Puffers aufgenommen.

Die Aufreinigung der Zellen durch Magnetseparation wurde auch hier nach dem MidiMACS – Verfahren der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach durchgeführt. Für dieses Verfahren wurde die ebenfalls von dieser Firma hergestellte LS-Säule gewählt. Die gesamte Magnetseparation fand bei 4°C statt. Bevor die Zellsuspension auf die Säule gegeben werden konnte, wurde die Säule nach Angabe des Herstellers, mit 4 SV MACS-Puffer gespült.

Nach Auftrag der Zellsuspension auf die Säule wurden ungebundene Zellen durch Gabe von 3 SV des MACS-Puffers entfernt und der Durchlauf in einem 15 ml Kunststoffröhrchen aufgefangen. Nach dem Entfernen der Säule aus dem Magneten wurden nun mit Hilfe eines Stempels (Miltenyi) 2 SV MACS-Puffer zum Herausspülen der Zellen durch die Säule gedrückt. Das Eluat wurde in einem separaten Gefäß aufgefangen und die enthaltenen Zellen auf Viabilität und Reinheit geprüft.

2.4.3.6 Kultivierung humaner Lungen- und Hautmastzellen

Als Kulturmedium für die Lungenmastzellen wurde basales Iscove-Medium (+ 10 % fötales Kälberserum, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,025 M Hepes, 1,2 mM Monothioglycerol, 100 ng/ml SCF) verwendet, welches für die Kultur der Mastzelllinie HMC-1 von J.H. Butterfield⁸² beschrieben wurde.

Die Hautmastzellen wurden in RPMI-1640 (+ 10 % fötales Kälberserum, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 100 ng/ml SCF) kultiviert.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $5x10^5$ /ml mindestens fünf Tage vor ihrer Verwendung in Experimenten kultiviert.

2.4.4 Kultur der Zelllinie LAD-2

Die jüngst beschriebene Zelllinie LAD-2 stellt die derzeit einzige verfügbare humane Mastzelllinie dar, deren Zellen funktionell aktivierbare Fc_eRI exprimieren und damit eine große physiologische Nähe zu natürlichen Mastzellen aufweisen⁸³. So hängt die Proliferation der LAD-2-Zellen, im Gegensatz zur humanen Mastzelllinie HMC-1, von der Präsenz des Zytokins SCF ab und LAD-2-Zellen reagieren nach IgE-Kreuzvernetzung mit einer Degranulationsantwort⁸³. Die Zelllinie LAD-2 wurde mir freundlicherweise von Dr. Arnold S. Kirshenbaum und Cem Akin (beide National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultur der LAD-2-Zellen erfolgte wie von Kirshenbaum *et al.*⁸³ angegeben 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.

2.4.5 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut

Die Isolierung mononukleärer Zellen (MNZ) aus dem peripheren Blut gesunder Spender erfolgte mittels dikontinuierlicher Dichtegradientenzentrifugation⁸⁴. Das venöse Vollblut wurde mit Natriumcitrat (3,8 % Natriumcitrat in aqua bidest.) in einem Verhältnis von 5:1 versetzt und anschließend mit Ca²⁺ - und Mg²⁺ -freier, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Dulbecco`s PBS, D-PBS) verdünnt und zu jeweils 17 ml auf 8 ml einer Ficoll-Hypague Lösung (Pharmacia, Freiburg; spez. Dichte: 1,077 g/ml) in Glaszentrifugenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation (400x g, 40min, Anlaufzeit 2min, RT) wurde die Plasmaschicht mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Ring mononukleärer Zellen aus der Interphase entnommen. Die so gewonnenen MNZ wurden in zwei Waschschritten je im Verhältnis 1:1 mit 4°C kaltem D-PBS (ohne Ca²⁺ - und Mg²⁺ -Ionen) durchmischt und zentrifugiert (1200 Upm, 4°C, 10min). Anschließend wurde das Zellsediment in 5 ml RPMI-1640 (Biochrom, Berlin) aufgenommen, welches zuvor mit 1% Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum versetzt worden war.

2.5 Biochemische Testverfahren

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt in den Präparationen von Chemokinen und alpha-Defensinen wurde im Mikro-Bicichoninsäure-Assay nach Smith *et al.* bestimmt⁸⁵. 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 μ l dieser Lösung A/B wurden in einer Pro-Bind-Mikrotiterplatte (Beckton-Dickinson, Heidelberg) mit je 125 μ l der seriell in Schritten von 1:2 verdünnten Probe versetzt und 90min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurde die Extinktion im Mikrotiterplatten-Photometer bei λ = 550 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration aus den Extinktionswerten diente Rinderserumalbumin (BSA) als Standard.

2.5.2 Sandwich-ELISA

Zur quantitativen Bestimmung von Proben auf ihren Gehalt an IL-2, IL-5, IL-8, Gro-alpha (growth related oncogene alpha), IP-10 (Interferon induzierbares Protein), TNF, MIF (Makrophagen migrations-inhibitorischer Faktor), MDC (macrophage derived chemokine) und MIP-1 alpha / beta (Makrophagen inflammatorisches Protein) wurde das Sandwich-ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) angewendet. Hierbei wurde das Antigen zunächst mit Hilfe eines an eine feste Phase absorbierten Fangantikörpers spezifisch gebunden und anschließend mit einem zweiten Antikörper detektiert. Dieser wiederum wurde durch einen Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper spezifisch nachgewiesen. Anhand der Intensität der Farbreaktion, die durch Umsetzung eines chromogenen Substrates durch das gekoppelte Enzym hervorgerufen wurde, konnte die Menge des eingesetzten Antigens durch bestimmt Vergleich mit einem mitgeführten Antigenstandard werden. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang unter 7.3.3 aufgelistet.

Zunächst wurde der jeweilige Fangantikörper zu 50 μ l auf eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde jedes Well der Platte dreimal mit 400 μ l Waschpuffer gewaschen und für mindestens 60min mit 300 μ l Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Zum Waschen der Platte wurde ein Mikrotiterplatten-Wascher verwendet.

Nun wurden die Wells der Platte mit je 50 μ l der Standardlösung bzw. der Probe beladen und für 120min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte wurden 100 μ l der Detektionsantikörperlösung in jedes Well pipettiert und für 120min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurden 100 μ l einer Streptavidin-HRP-Lösung in jedes Well gegeben und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Enzymreaktion der Peroxidase zu starten wurden 100 μ l der Substratlösung pro Well pipettiert. 20min später wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l Stopp-Lösung beendet. Für die Ermittlung der optischen Dichte wurden die Platten bei 450 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge: 540 nm) in einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

2.5.3 Stimulation von Mastzellen

Für die Ermittlung der Zytokinproduktion wurden Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen für 0,5; 2; 4; 8; 16; 24; und 48h in dem entsprechenden Kulturmedium zu $1x10^6$ Zellen/ml in 24-Well-Platten der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) kultiviert und mit 4 µM PF-4, 3 µg/ml anti-IgE (Lungenmastzellen) bzw. 30 µg/ml anti-IgE (LAD-2-Zellen) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und nach Zentrifugation die Überstände entnommen. Daraufhin wurden die Überstände mittels Sandwich-ELISA-Verfahren auf ihren Zytokingehalt untersucht.

2.6 Biologische Testverfahren

2.6.1 Hexosaminidase-Release-Assay

Zu den wichtigen biologischen Funktionen von Mastzellen zählt ihre Fähigkeit, nach Stimulation mit entsprechenden Mediatoren, die Inhalte ihrer sekretorischen Granula in die Umgebung der Zelle auszuschleusen. Dieser als Exozytose (*compound exocytosis*) bezeichnete Vorgang vollzieht sich durch Fusion der Granulamembran mit der Plasmamembran, was eine Freisetzung der Granulainhalte in die Umgebung nach sich zieht. Dabei wird unter anderem das Enzym β -Hexosaminidase ausgeschüttet, dessen Freisetzung mit derjenigen einiger anderer Granulainhalte wie Histamin und Chymase korreliert⁸⁶. Über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Hexosaminidase im Überstand stimulierter, hochreiner Mastzellen kann die Mastzelldegranulation quantifiziert werden⁸⁶.

Da die Fc_eRI der LAD-2-Zellen im Gegensatz zu Primärzellen kein IgE gebunden haben und somit nicht durch anti-IgE stimuliert werden können, wurden diese Zellen mindestens 18h vor Beginn des Versuchs mit 1 μ g/ml humanem Myeloma-IgE (Calbiochem, Schwalbach) zu 7,5 x 10⁵ Zellen/ml StemPro-34-Medium inkubiert. Um einen Verlust der IgE-Moleküle von Primärzellen während der Kultur auszugleichen und um eine Gleichbehandlung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Primärzellen ebenfalls zu den oben beschriebenen Bedingungen in den entsprechenden Kulturmedien mit Myeloma-IgE inkubiert.

Primäre Mastzellen oder LAD-2-Zellen (5 x 10^4 /ml) wurden in PBS-D + CaMg / 0,1% BSA für 10min bei 37°C vorgewärmt und anschließend jeweils 120 µl der Zellsuspension mit 120 µl der Stimuluslösung (angesetzt in PBS-D + CaMg / 0,1 % BSA) in einem Reaktionsgefäß (500 µl, Polypropylen, Sarstedt) vermischt.

Nach 30min Inkubation bei 37°C im Thermoschüttler wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3min) und 100 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 18 h inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 µl Glycinpuffer pH 10,3 gestoppt und die Extinktion des entstandenen gelblichen p-Nitrophenols im Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 405$ 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 deren prozentualer Anteil angegeben.

2.6.2 Nachweis der Expression zellassoziierter Rezeptoren

Eine herkömmliche Methode um die Oberflächenexpression von Molekülen auf Zellen zu bestimmen, ist die Immunfluoreszenzfärbung mit anschließender Analyse im Durchflusszytometer. Dabei erfolgt die Immunfluoreszenzfärbung entweder direkt über einen Fluorochrom-gekoppelten, spezifischen Antikörper oder indirekt über einen sekundären Fluorochrom-markierten Antikörper, der seinerseits den primären, spezifischen Antikörper erkennt. In der anschließenden Analyse im Durchflusszytometer wird die Fluoreszenz und damit die relative Rezeptorexpression jeder einzelnen Zelle bestimmt.

Für die Detektion von Bindungsstellen für PF-4 auf Mastzellen wurde ein muriner, monoklonaler Antikörper verwendet (Klon PF63.1), welcher sowohl freies als auch rezeptorgebundenes PF-4 erkennt. Dieser Antikörper wurde in der Laborgruppe Biologische Chemie in Borstel hergestellt⁶⁸und an den Farbstoff Alexa Fluor-488 konjugiert.

Zur Detektion des CXCR1 und CXCR2 wurden monoklonale Maus-anti-human Antikörper verwendet (CXCR1: Klon E1; CXCR2: Klon RII 115; Isotyp IgG_1) hergestellt in der Laborgruppe Biologische Chemie des FZB. CXCR3 wurde ebenfalls mittels eines monoklonalen Maus-anti-human Antikörpers nachgewiesen (Klon 1C6; Isotyp IgG_1 ; hergestellt von BD Pharmingen, Heidelberg).

2.6.2.1 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung zum PF-4-Bindungsstellennachweis wurden 50 µl der jeweiligen Zellsuspension (2 x 10^5 Zellen) mit dem identischen Volumen PF-4-Lösung für 60min unter Agitation bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer (PBS + 0,5% BSA) wurden die Zellen in einem Endvolumen von 100 µl mit dem PF63.1-AK (4 µg/ml) für 30min unter Agitation bei 4°C inkubiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen zweimal mit Puffer gewaschen und abschließend in 300 µl Puffer aufgenommen.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion des CXCR1, CXCR2 und CXCR3 wurden 2 x 10^5 Zellen / Ansatz in 100 µl der jeweiligen Antikörperlösung (anti-CXCR1und anti-CXCR3: 3µg/ml; anti-CXCR2: 2,5 µg/ml in PBS-D + 0,1 % BSA) resuspendiert und für 60min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1,25 ml PBS-D + 0,1 % BSA aufgefüllt und mit 300 µl FCS unterschichtet und zentrifugiert (10min, 300 x g, bei 4°C). Die Zellsedimente wurden daraufhin vom Überstand getrennt und nachfolgend in 100 µl Sekundärantikörperlösung (DTAF-gekoppelten Ziegeanti-Maus Antiserum in PBS + 0,5% BSA) für 60min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Sedimentation durch ein FCS-Kissen wurden die Zellen in 500 µl PBS + 0,5% BSA aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

2.6.2.2 Funktion des Durchflusszytometers (FACS; *fluorescence activated cell sorter*)

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 korreliert mit der optischen Dichte der Partikel, welche vor allem von der Granularität der Zelle beeinflusst wird. 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. Routinemäßig wurden pro Meßvorgang 10000 Ereignisse aufgenommen. Von diesen Ereignissen wurden die von der jeweils zu untersuchenden Zellpopulation (LAD-2, primäre Mastzellen) stammenden Signale mit charakteristischem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht durch Festlegung eines Meßbereichs (Fenster) eingegrenzt und die restlichen von anderen Zellen bzw. Zelltrümmern Signale außerhalb des Fensters ausgeblendet. hervorgerufenen 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.

2.6.3 RNA – Isolierung, cDNA – Synthese und quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion ("Real-time RT-PCR")

Lungenmastzellen in basalem Iscove-Medium (+ 10 % fötales Kälberserum, 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,025 M Hepes, 1,2 mM Monothioglycerol, 100 ng/ml SCF) und LAD-2-Zellen in StemPro-34-Medium unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin und 100 ng/ml SCF wurden für 2h in einer Zelldichte von 1x 10^5 Zellen/ml bei 37°C mit 4 µM PF-4 und der jeweils optimalen Konzentration von anti-IgE (Lungenmastzellen mit 3 µg/ml und LAD-2-Zellen mit 30 µg/ml) inkubiert.

Die RNA dieser Zellen wurden mittels NucleoSpin RNA II Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt und durch reverse Transkription mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR wurde in einem Light-Cycler nach Vereinigung der cDNA mit dem SYBR Green PCR Master-Mix (Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I Kit; Roche Diagnostics GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und den geeigneten Primern (siehe Anhang; 7.3) zu 500 nM durchgeführt (40 Zyklen). Die Ergebnisse werden als Verhältnis der Expression des jeweiligen spezifischen Gens zu β 2-Mikroglobulin (b2M) dargestellt. β 2-Mikroglobulin unterliegt als sogenanntes *"housekeeping gene"* nur einer geringen Regulation. Die PCR-Produkte wurden in Probenpuffer (TAE; TRIS-Acetat-EDTA; 40mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) aufgenommen und mittels einer Agarose-Gelelektrophorese (3%ig) aufgetrennt.
2.6.4 Bestimmung der intrazellulären Ca-Konzentration

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration von LAD-2-Zellen und primären Mastzellen 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 bestimmt⁸⁷. Durch Veresterung mit Azetoxymethanol (AM) liegt FURA-2 in einer lipophilen Verbindung vor, die von den Zellen aufgenommen und durch unspezifische intrazelluläre Esterasen hydrolysiert wird. Das entstehende 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 (F₁) bzw. von λ_{A2} = 380 nm (F₂) kann das emittierte Fluoreszenzsignal bei λ_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 :

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

Dabei stellt K_D die effektive Dissoziationskonstante des FURA-2/Ca²⁺ 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 F1/F2 bei unbeladenem FURA-2, das nach vollständigem Entzug des Kalziums mittels anderer starker Komplexbildner bestimmt werden kann. F2f bzw. F2b stellen die Fluoreszenzintensitäten (F2) der unbeladenen FURA-2-Probe bzw. der mit Kalzium gesättigten FURA-2-Probe dar.

Sowohl LAD-2-Zellen als auch Lungenmastzellen $(2,5 \times 10^6)$ wurden in 500 µl PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA aufgenommen und mit 1 µl FURA-2/AM -Lösung (1mM) versetzt und für 30min im Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. FURA-2/AM wurde durch einen Waschschritt mit 2 ml warmen PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA mittels Zentrifugation bei 300 x g für 3min entfernt. Bei Versuchen in denen Inhibitoren zum Einsatz kamen, wurden die Zellen nun für 30min mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml warmem PBS-D + CaMg/ 0,1% BSA resuspendiert und in die vorgewärmte Quarzküvette des Fluoreszenzspektrometers überführt.

Folgende Inhibitoren wurden verwendet und in Vorversuchen als optimal bestimmte Konzentrationen eingesetzt: Manumycin zu 15 μ M, U73122 zu 1 μ M (Sigma, Taufkirchen) und Pertussistoxin zu 1 μ g/ml (Calbiochem, Schwalbach).

2.6.4.1 Analyse der Zellen im Spektralfluorimeter

Die Fluoreszenzmessung von FURA-2-beladenen Zellen wurde mit einem auf 37°C Spektralfluorimeter (Photon temperiertes PTI-Technology International, USA) vorgenommen. Die Messungen erfolgten unter Agitation für 400s bei den alternierenden Anregungswellenlängen $\lambda_{A1} = 340$ nm und $\lambda_{A2} = 380$ nm. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde bei $\lambda_E = 510$ nm aufgenommen. 45s nach Beginn der Messung erfolgte die erste Injektion des zu testenden Stimulus (gelöst in 2 bis 10 µl 0,1 % TFA) in die Meßküvette. Um die Antwort der Zellen gegenüber einer weiteren Stimulation zu testen, wurde nach 150s nochmals Stimulus zugegeben. Rmax und Rmin 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.

Neben der spektralfluorimetrischen Methode zur Bestimmung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen wurde ein durchflusszytometrisches Verfahren verwendet. Dieses hat den Vorteil, dass die Veränderungen in der Fluoreszenz nicht innerhalb eines Reaktionsgefäßes gemessen werden, sondern in den einzelnen Zellen die sich in einem Pufferstrom befinden.

Um die Kalziumsignale von MNZ, welche mit Überständen von PF-4 stimulierten LAD-2-Zellen inkubiert wurden, zu untersuchen, wurden MNZ zu 5 x 10^6 Zellen/ml PBS-D + 0,1 % BSA (ohne Ca und Mg) aufgenommen und mit 1mM Fluo-4 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 30min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Funktionsweise von Fluo-4 ähnelt der von FURA-2 mit dem Unterschied, dass ungebundenes Fluo-4 nichtfluoreszierend ist und Ca²⁺-gebundenes Fluo-4 sein Absorbtionsmaximum bei 488 nm Wellenlänge hat. Nach der Inkubation wurden die Zellen herunterzentrifugiert und zu 2,5 x 10^6 Zellen/ml in Stempro-Medium aufgenommen.

Zur Messung der Fluoreszenz unstimulierter Zellen wurden 100 µl der Zellsuspension für 30s im Durchflusszytometer gemessen. Daraufhin wurden 400 µl der verschiedenen Überstände zu den Zellen gegeben und gleich im Anschluss mit fünfach erhöhter Durchflussrate der Zellen 3min erneut gemessen. Die veränderte Fluoreszenz der Zellen wurde aufgezeichnet und in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Methode zur Isolierung von humanen Lungenmastzellen

Um die Effekte von thrombozytären Chemokinen auf Lungenmastzellen untersuchen zu können, wurde eine Methode zur Aufreinigung von Mastzellen aus humanem Lungengewebe etabliert. Als Grundlage für dieses Verfahren diente die von Schulman *et al.*⁸⁸ etablierte Methode aus dem Jahr 1982, welche im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit weiterentwickelt wurde.

Die Aufarbeitung besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: der grobmechanischen Zerkleinerung des Materials, dem enzymatischen Aufschluss des Gewebes sowie der Dichtegradientenzentrifugation und Magnetseparation des suspendierten Zellmaterials. Nach ihrer Aufreinigung wurden die Mastzellen zur Wiederherstellung ihrer funktionellen Integrität für mindestens fünf Tage kultiviert.

3.1.1 Aufschluss des humanen Lungengewebes durch enzymatischen Verdau

Eine von vielen Autoren beschriebene Methode zur Herstellung einer Zellsuspension aus Gewebeverbänden ist der enzymatische Verdau. Die verwendeten Enzyme und Puffer wurden im Wesentlichen aus dem Protokoll zur Lungenmastzellaufarbeitung von Schulman *et al.*⁸⁸ übernommen. In Abwandlung zu diesem Protokoll wurde der enzymatische Verdau statt in vier Schritten in einem Einzigen durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Enzym Pronase durch Dispase II ersetzt. DNase erwies sich nach Vorversuchen als nicht notwendig und wurde dem Ansatz nicht beigefügt.

Die Menge des Ausgangsmaterials variierte zwischen 10g und 150g. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension nach dem Entfernen der restlichen Gewebestücke und zweimaligem Waschen stand im proportionalen Verhältnis zur erhaltenen Gewebemenge (siehe Tabelle 1).

Der Anteil der Mastzellen in den jeweiligen Zellsuspensionen variierte sehr stark (von 4,3% bis 21,09% der Gesamtzellen; Tabelle 1). Laut Literatur⁸⁹ befinden sich durchschnittlich in einem Kubikzentimeter humanem Lungengewebe (ca. 1g) ca. 15,5 x10⁶ Mastzellen. Nach dem Herauswaschen der Verdauenzyme konnten durchschnittlich 2,51 (+/- 1,56) x10⁶ Mastzellen pro Gramm Gewebe gewonnen werden, dies entspricht einer mittleren Ausbeute von 16,2 %.

Präp-Nr.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	x
Gewebegewicht [g]	79,7	17,26	14,55	18,71	14,57	48,89	48,67	39,08	151,87	23,06	42,69	45,4
Gesamtzellzahl [x10 ⁶] ^{a.)}	558	35,7	28,45	98,1	41,5	403	398,4	845,6	1956	102,4	370	439,7
Mastzellzahl [x10 ⁶]	75	2,8	6	5,3	4,1	41	24,6	28,8	220	7,8	16	39,2
Mastzellanteil [%]	13,5	7,8	21,09	5,4	9,88	10,17	6,17	3,4	11,25	7,6	4,3	9,1

Tabelle 1 : Repräsentativer Vergleich von Gewebegewicht, Gesamt- und Mastzellzahl verschiedenerMastzellpräparationen

a.) Bestimmt nach enzymatischen Verdau und Entfernung von Restgewebe

Die in den Zellsuspensionen enthaltenen Mastzellen wurden mittels Toluidinblau – Lösung nach Farbumschlag (Metachromasie) identifiziert (siehe Abbildung 2).





Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden nach dem enzymatischen Verdau des Gewebes auf einen Objektträger zentrifugiert und für 20min mit 0,1 % saurer Toluidinblaulösung gefärbt. Nach Dekantieren der überschüssigen Lösung wurden die Präparate getrocknet und im Hellfeldmikroskop bei unterschiedlichen Vergrößerungen (10-fach, A; 60-fach, B; 200-fach, C) fotografiert.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, färbten sich Mastzellen tiefblau und konnten so von anderen Zellen deutlich unterschieden werden. Diese Methode wurde ebenfalls für die quantitative Bestimmung von Mastzellen in einer Neubauer-Zählkammer verwendet.

3.1.2 Aufreinigung der Zellsuspension durch Percoll-Gradienten-Zentrifugation

Eine häufig verwendete Methode zur Auftrennung von Zellsuspensionen ist die Separation der einzelnen Zellpopulationen nach ihrer Dichte mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation.

Nach Ishizaka *et al.*⁹⁰ sollten an der Grenzschicht zwischen einer 50%igen und 60%igen Percolllösung der größte Anteil von Mastzellen mit der höchsten Reinheit gefunden werden. Aufgrund dieser Daten wurde zuerst ein Percollgradient mit 0%iger, 50%iger, 60%iger und 80%iger Percolllösung verwendet. Wie in Tabelle 2 dargestellt, ist die Mastzellzahl zwischen der 50%igen und 60%igen Percolllösung ($\overline{x} = 1,8 \times 10^6$) durchschnittlich gleichwertig mit der Mastzellzahl zwischen der 60%igen und der 80%igen Percolllösung ($\overline{x} = 1,7 \times 10^6$). Jedoch zeigte sich, dass zwischen der 0%igen und der 50%igen Percolllösung ebenfalls eine relevante Menge an Mastzellen nachweisbar war ($\overline{x} = 1,3 \times 10^6$), welche eine niedrigere Reinheit ($\overline{x} = 6,4\%$) als die beiden anderen Fraktionen ($\overline{x} = 9,6\%$ und $\overline{x} = 21,2\%$) aufwiesen.

Grenzschicht zwischen den Percolllösungen:	PräpNr.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	x
	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	4,81	8,62	20,4	79,2	11,4	59,4	30,6
0% / 50%	Mastzellzahl (x10 ⁶)	0,4	0,36	3,24	2,4	0,7	0,95	1,3
	Mastzellanteil [%]	8,32	3,48	16	3	6,1	1,6	6,4
50% / 60%	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	11,65	4,36	13,22	65,6	5,6	45,9	24,4
	Mastzellzahl (x10 ⁶)	1	0,5	2,14	4,2	0,6	2,35	1,8
	Mastzellanteil [%]	8,58	11,47	16	6	10,71	5,12	9,6
	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	1,82	1,52	3,38	21,4	2	7,55	6,3
60% / 80%	Mastzellzahl (x10 ⁶)	0,3	0,4	0,5	7,8	0,5	0,65	1,7
	Mastzellanteil [%]	16,48	26,32	15	36	25	8,6	21,2

 Tabelle 2
 : Anreicherung von Mastzellen durch Percoll-Dichtegradienten Zentrifugation

Um eine verbesserte Aufreinigung der Mastzellen aus der Grenzschicht zwischen 0% iger und 50% iger Percolllösung zu ermöglichen, wurde in den nächsten Versuchen (siehe Tabelle 3) eine 30% ige Percolllösung dem Gradienten hinzugefügt. Da sich zwischen der 60% igen und der 80% igen Percolllösung sehr viele Mastzellen mit durchschnittlich höherer Reinheit (\overline{x} =21,2%) als zwischen der 50% igen und 60% igen Percolllösung (\overline{x} =9,6%) befanden, wurde die 60% ige Percolllösung in den nächsten Versuchen nicht mehr verwendet.

Tabelle 3 Anreicherung von Mastzellen durch Percoll-Dichtegradienten Zentreifugation nachVeränderung der Gradienten

Fraktion	PräpNr.	P1	P2	P3	P4	P5	x
	Gewebegewicht [g]	31,45	40,86	16,7	80	36,84	41,17
•	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	61,6	15	9	43,4	63,6	38,52
A	Mastzellzahl (x10 ⁶)	2	0,2	0,3	0,9	1,3	0,94
(0% 30%)	Mastzellanteil [%]	3	1,3	3,33	2	2	2,33
(0% - 30%)	Viabilität [%]	48	47,3	50	80	44	53,86
Р	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	184,8	72,3	50,5	124	124,6	111,24
В	Mastzellzahl (x10 ⁶)	16	7,8	9	9,5	9,3	10,32
(20% 50%)	Mastzellanteil [%]	13	10,8	17,82	9,2	7,5	11,66
(30% - 30%)	Viabilität [%]	94,4	90	90	90	90	90,88
6	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	134,8	58,6	47,2	238	115,8	118,88
C	Mastzellzahl (x10 ⁶)	9,6	3	2,2	2,8	1,4	3,80
(50% 90%)	Mastzellanteil [%]	7	5,1	4,66	1,1	1,2	3,81
(50 % - 80 %)	Viabilität [%]	90	61	90	90	90	84,20
P	Gesamtzellzahl (x10 ⁶)	211	238	120	321	190	216,00
D	Mastzellzahl (x10 ⁶)	0,75	1,35	0,63	1,9	1,2	1,17
(Sediment)	Mastzellanteil [%]	0,35	0,56	0,53	0,59	0,63	0,53
(Seument)	Viabilität [%]	92	89	91,5	96	93,5	92,40

Das Gewebegewicht vor Beginn der Isolation, die Gesamtzellzahl, die Anzahl an Mastzellen, der daraus berechnete Mastzellanteil und die Viabilität der Zellen in den einzelnen Fraktionen nach der Percoll-Gradienten-Zentrifugation, sind in der Tabelle 3 detailliert aufgeführt. Nach Veränderung der Percoll-Gradienten konnte der höchste Anteil an Mastzellen stets in der Fraktion B gefunden werden (\overline{x} =11,66%), welche aus der 30%igen Percolllösung und der Grenzschicht zwischen 30%iger und 50%iger Percolllösung bestand.

Interessanterweise fand sich keine direkte Korrelation zwischen der eingesetzten Gewebemenge und der daraus isolierten Menge an Mastzellen. Die Viabilität der Fraktionen B, C und D lag in den meisten Fällen bei ca. 90%, die Viabilität der Fraktion A lag im Schnitt nur bei ca. 50%. Tote Zellen besitzen in der Regel eine niedrigere Dichte als lebende Zellen und reichern sich daher in dieser Fraktion an. Da der Mastzellanteil in der Fraktion B stets am höchsten war und in den Fraktionen A und D am niedrigsten, wurde immer die Fraktion B für die Magnetseparation eingesetzt, während die Fraktion Fraktionen A und D verworfen wurden. Die Fraktion C enthielt in einigen Fällen ebenfalls eine hohe Anzahl an angereicherten Mastzellen. Enthielt diese Fraktion einen Mastzellanteil von mehr als 5% und eine Mastzellzahl die mindestens die Hälfte der Mastzellzahl der Fraktion B betrug, so wurde die Fraktion C mit der Fraktion B zu einer Zellsuspension vereinigt und ebenfalls für die Magnetseparation verwendet. Ein Beispiel hierfür ist die in Tabelle 3 aufgeführte Präparation P1.

3.1.3 Aufreinigung der Mastzellen durch Magnetseparation

Nach der Percoll-Gradienten-Zentrifugation variierte in den Fraktionen die Reinheit der Mastzellen von 7% bis 18%. Zur weiteren Anreicherung wurden die Präparationen einem weiteren Aufreinigungsschritt, der Magnetseparation, unterzogen.

Bei dieser Methode werden an bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen Antikörper gebunden, die an paramagnetische Beads gekoppelt sind. Diese werden im ferromagnetischen Feld der Säule zurückgehalten und können durch Entfernen des magnetischen Feldes von der Matrix gespült werden.

Während seiner Dissertationsarbeit konnte Dr. Florian Schiemann eine Methode zur indirekten Magnetseparation von Hautmastzellen über den Oberflächenmarker CD203c etablieren⁷¹. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Ektoenzym, welches auf der Oberfläche von Stammzellen, Basophilen und Mastzellen exprimiert wird. Da es sich bei Stammzellen und Basophilen um Zellen handelt, die hauptsächlich im Blut vorkommen, konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zellen zu einem Großteil vor dem enzymatischen Verdau aus den Gewebestücken gewaschen wurden. Darüber hinaus wurden im Laufe der Zeit meiner Dissertationsarbeit von der Firma Miltenyi CD117-spezifische Microbeads entwickelt, welche eine direkte und dadurch schnellere und schonendere Magnetseparation erlauben.

Bei dem Oberflächenmarker CD117 oder c-kit handelt es sich um den Rezeptor für den Wachstumsfaktor SCF (stem cell factor), welcher nur von Stammzellen und Mastzellen exprimiert wird. Beide Verfahren wurden zur Anreicherung verwendet und ihre Effizienz miteinander verglichen.

In der Tabelle 4 sind die Mastzellanteile (Reinheit) und die Viabilität der Zellsuspensionen vor und nach der Magnetseparation über CD203c und CD117 gegenübergestellt.

Isolation über CD 203c	PräpNr.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	x
Vor der MACS-	Reinheit [%]	8	7,95	12,88	18,2	18,5	11,46	12,83
Isolation	Viabilität [%]	90	75,5	92,5	90	90	90	88,00
Nach der MACS-	Reinheit [%]	96	91,6	81	80	89	90	87,93
Isolation	Viabilität [%]	70	85	97	80	90	90	85,33
lsolation über CD 117	PräpNr.	P7	P8	P9	P10	P11	P12	x
Vor der	Reinheit [%]	14,5	10	11,6	9,2	10,86	24,75	13,49
Isolation	Viabilität [%]	90	92,4	87	90	87,2	94,5	90,18
Nach der MACS-	Reinheit [%]	87	89	71	80	88	82	82,83
Isolation	Viabilität [%]	90	90	88	87	81	90	87,67

Tabelle 4 : Vergleich der Reinheit und der Viabilität von Mastzellpräparationen nach Magnetseparationüber CD203c (n=6) oder CD117 (n=6).

Bei der indirekten Isolation über CD203c konnte die durchschnittliche Reinheit der Zellen von 12,83% auf 87,93% gesteigert werden. Bei der direkten Isolation über CD117 wurde die durchschnittliche Reinheit von 13,49% auf 82,83% verbessert. Die durchschnittliche Viabilität der Zellen verschlechterte sich durch die Isolation über CD203c um 2,67% von 88% auf 85,33%, während die Isolation über CD117 die Viabilität um 2,51% von 90,18% auf 87,67% senkte.

Damit waren die Ergebnisse beider Methoden hinsichtlich Viabilität und Reinheit der Mastzellen vergleichbar. Aufgrund der geringeren Kosten und kürzeren Präparationszeit wurden die Mastzellen nachfolgend mittels direkter Magnetseparation über CD117 aufgereinigt.

3.1.4 Kultivierung humaner Lungenmastzellen

Die isolierten Lungenmastzellen wurden zur Wiederherstellung ihrer funktionellen Integrität vor ihrer experimentellen Verwendung für mindestens fünf Tage kultiviert. Wie in Abbildung 3 gezeigt, verbessert sich nach sieben Tagen Kultur sowohl die Reinheit, als auch die Viabilität. Dies bedingt sich dadurch, dass Mastzellen als sehr langlebige, proliferierende Zellen andere kontaminierende Zellen überleben.



Abbildung 3: Reinheit und Viabilität von Mastzellkulturen direkt nach der Isolation und 7 Tagen Kultur. Die Mastzellen wurden in einer Konzentration von $5x10^5$ in basalem Iscove-Medium (+ 10 % fötales Kälberserum, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,025 M Hepes, 1,2 mM Monothioglycerol, 100 ng/ml SCF) aufgenommen und sowohl die Reinheit (linke Seite) als auch die Viabilität (rechte Seite) direkt nach der Isolation (schwarze Balken) und nach 7 Tagen Kultur (graue Balken) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 10 unabhängigen Experimenten.

Der Anteil der Mastzellen in den Kulturen wurde alle 7 Tage bestimmt und die Zellen zu $5x10^5$ /ml in frischem Medium aufgenommen. Die Kulturen wiesen in der Regel nach drei Wochen eine Reinheit von nahezu 100% auf. Experimente wurden stets mit Zellen durchgeführt, deren Kultur eine Reinheit von mindestens 90% und eine Viabilität von mindestens 80% aufwiesen.

3.1.5 Reaktivität der Mastzellen

Um die physiologische Reaktivität oder funktionelle Integrität der Lungenmastzellen zu überprüfen, wurden für 5 Tage kultivierte Mastzellen stimuliert und die β -Hexosaminidase Freisetzung der Lungenmastzellen mit der Freisetzung von LAD-2-Zellen verglichen (siehe Abbildung 4). Um ein möglichst breites Spektrum unterschiedlicher Aktivierungswege zu erfassen, wurden die Zellen mit anti-IgE-Antikörper über den Fc_e–Rezeptor, mittels des Neuropeptids Substanz P über G-Protein abhängige Rezeptoren, sowie pharmakologisch mit dem Kalziumionophor A23187 aktiviert.



Abbildung 4: β-Hexosaminidase – Freisetzung von 5 Tage kultivierten Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Aktivierung mit anti-IgE, A23187 und Substanz P.

Lungenmastzellen (A) und LAD-2-Zellen (B) wurden zu 5 x 10^5 Zellen/ml fünf Tage kultiviert und nachfolgend zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit 100 ng/ml A23187 bzw. aufsteigenden Konzentrationen anti-IgE oder Substanz P stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die freigesetzte β -Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten bei Lungenmastzellen bzw. drei bei LAD-2-Zellen.

Die Stimulation durch 100 ng/ml A23187 löste bei Lungenmastzellen eine Freisetzung von ca. 60% aus, während LAD-2-Zellen auf diesen Stimulus mit einer Freisetzung von ca. 90% reagierten. Während sich Lungenmastzellen mit 3 μ g/ml anti-IgE maximal aktivieren ließen, fand sich dieses Maximum bei LAD-2-Zellen erst bei 30 μ g/ml. Die Lungenmastzellen der einzelnen Präparationen wiesen eine deutlich höhere Streuung in ihrer Aktivierbarkeit gegenüber Substanz P auf als LAD-2-Zellen. Ein Maximum der Aktivierbarkeit konnte bei Lungenmastzellen bei einer Konzentration von 10 μ M und bei LAD-2-Zellen bei 1 μ M Substanz P festgestellt werden.

Diese Daten zeigen, dass Lungenmastzellen, die für fünf Tage nach Isolierung kultiviert werden, sich durch physiologische wie auch pharmakologische Stimuli aktivieren lassen und damit als funktionell intakt angesehen werden können.

3.2 Expression und Funktionalität von Chemokinrezeptoren auf humanen Mastzellen

Um die potentielle Rolle thrombozytärer Chemokine für humane Mastzellen zu klären, wurde zunächst geprüft, ob diese Zellen die korrespondierenden Rezeptoren exprimieren.

3.2.1 NAP-2 und CTAP-III Rezeptoren

Wie bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben, stellen die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, unter anderem Bindungsstellen für das thrombozytäre Chemokin NAP-2 dar ^{65,91,92}. Um zu untersuchen, ob diese Rezeptoren von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen exprimiert werden, wurden diese Zellen mit spezifischen Maus-Antikörpern für die beiden Rezeptortypen bzw. den entsprechenden Isotyp-Antikörpern und nachfolgend mit fluoreszenzmarkierten Ziege-Anti-Maus-Antikörpern markiert und die Fluoreszenzintensitäten der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 5 ist die Fluoreszenzintensität von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Inkubation mit den oben beschriebenen Antikörpern grafisch dargestellt.



Abbildung 5: CXCR1 und CXCR2 Nachweis auf der Oberfläche von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen

Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CXCR1 und CXCR2 (transparent) oder mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps (grau) für 1 h auf Eis inkubiert. Der Nachweis der zellgebundenen Antikörper erfolgte mittels Durchflusszytometrie 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.

Wie in der linken Spalte der Abbildung 5 zu sehen, liegt die Fluoreszenzintensität von Lungenmastzellen nach Inkubation mit α -CXCR1 und α -CXCR2 auf dem gleichen Niveau wie die Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit der Isotypkontrolle behandelt worden sind. Der rechten Spalte der Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass die Fluoreszenzintensität von LAD-2-Zellen, welche mit α -CXCR1 und α -CXCR2 inkubiert wurden, höher liegt als die der korrespondierenden Isotypkontrolle.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 von LAD-2-Zellen exprimiert werden, jedoch nicht von primären Lungenmastzellen.

3.2.2 PF-4 Rezeptoren

PF-4 kann auf humane Zellen an zwei verschiedene Rezeptoren, an ein Proteoglykan und an den CXCR3B, binden. Da für keine der beiden Strukturen entsprechende Antikörper erhältlich sind, wurden PF-4 Rezeptoren funktionell mittels eines Bindungsassays nachgewiesen.

3.2.2.1 Bindungsstellen für PF-4 auf der Oberfläche von humanen Mastzellen

In einem ersten Ansatz wurde zunächst die Gesamtkapazität zur Bindung von PF-4 von Hautund Lungenmastzellen sowie LAD-2-Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen PF-4 inkubiert. Nachdem nichtgebundenes PF-4 durch Waschen entfernt wurde, wurde das gebundene PF-4 mittels eines murinen, monoklonalen Antikörpers (Klon PF63.1), welcher mit Alexa-488 konjugiert war, durchflusszytometrisch detektiert. In Abbildung 6 ist das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität PF-4 gebundener Antikörper zu unspezifisch gebundenen Antikörpern dargestellt.



Abbildung 6: PF-4-Bindung auf der Oberfläche von humanen Mastzellen.

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden für 1h bei 4°C mit ansteigenden Konzentrationen PF-4 inkubiert. Der Nachweis des zellgebundenen PF-4 erfolgte im Durchflusszytometer nach Inkubation mit einem murinen, monoklonalen Antikörper, welcher mit Alexa-488 konjugiert war (Klon PF63.1). Dargestellt ist das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität PF-4 gebundener Antikörper zu unspezifisch gebundenen Antikörpern. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichungen dreier unabhängiger Experimente.

Bei allen drei Zelltypen konnte eine Zunahme der PF-4 Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration des Liganden beobachtet werden (siehe Abbildung 6). Während sich eine erste Bindung bei Hautmastzellen schon bei einer Konzentration von $0,03 - 0,06 \mu$ M zeigt (siehe Abbildung 6A), lag diese bei Lungenmastzellen mit $0,12 \mu$ M (siehe Abbildung 6B) und bei LAD-2-Zellen mit $0,5 \mu$ M (siehe Abbildung 6C) deutlich höher. Interessanterweise unterschieden sich die kinetischen Verläufe hinsichtlich ihrer Sättigbarkeit. Während bei Lungenmastzellen bei einer PF-4 Konzentration von 4μ M die Bindung ein Plateau erreichte, trat bei Hautmastzellen und LAD-2-Zellen selbst bei einer Konzentration von 8μ M PF-4 noch keine Sättigung ein.

3.2.2.2 CXCR3 – Expression auf Mastzellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, entdeckten Lasagni *et al.* (2003)⁶⁷, dass eine Spleißvariante des CXCR3, genannt CXCR3B, einen Rezeptor für PF-4 darstellt. Da zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen noch kein spezifischer Antikörper für die Spleißvariante existierte, wurde zunächst ein Antikörper verwendet, der alle Varianten von CXCR3 erkennt.

Die Analyse im Durchflusszytometer ergab, dass LAD-2-Zellen, nicht jedoch Lungenmastzellen, CXCR3 auf ihrer Oberfläche exprimieren (siehe Abbildung 7).

Während die Rezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR3 von LAD-2-Zellen exprimiert werden, konnten diese auf Lungenmastzellen nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnten Bindungstellen für PF-4 sowohl auf Haut- und Lungenmastzellen als auch auf LAD-2-Zellen gefunden werden. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine potentielle Aktivierbarkeit von Mastzellen durch PF-4 nahe. Da die durchflusszytometrischen Untersuchungen von CXCR1, CXCR2 und CXCR3 eine zumindest niedrige Expression dieser Rezeptoren nicht ausschließen, wurden diese in den nachfolgenden Experimenten mit untersucht.



Abbildung 7: Expression von CXCR3 auf der Oberfläche von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen

Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CXCR3 (transparent) oder mit irrelevanten Antikörpern gleichen Isotyps (grau) für 1h 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.

3.3 Zytosolische Kalziumkonzentration von Mastzellen nach Stimulation mit thrombozytären Chemokinen

Nachdem Bindungsstellen für PF-4 sowohl auf Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen und potentielle Rezeptoren für NAP-2 auf LAD-2-Zellen nachgewiesen wurden, sollte geklärt werden, ob diese Rezeptoren funktionell aktivierbar sind. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss thrombozytärer Chemokine auf die zytosolische Kalziumkonzentration von Mastzellen untersucht. Da bei Hautmastzell-Isolationen die Ausbeute der gewonnenen Mastzellen in den meisten Fällen nur zwischen $1x10^6$ und $3x10^6$ Zellen lag und für eine Messung des intrazellulären Ca²⁺-Signals etwa 2,5x10⁶ Zellen benötigt werden, konnten diese Messungen nur mit Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen durchgeführt werden.

3.3.1 PF-4 induziert ein intrazelluläres Ca²⁺-Signal in LAD-2-Zellen

Einige Prozesse zur intrazellulären Weiterleitung eines Signals benötigen eine hohe Konzentration an cytosolischen Ca²⁺-Kationen. Durch Aktivierung einer Zelle können Kalziumkanäle sowohl in der Zellmembran als auch im Endoplasmatischen Reticulum geöffnet werden, was zu einer transienten Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels führt. Die Komplexierung der Kalziumionen mit einem fluoreszierenden Farbstoff erlaubt die Bestimmung der zytosolischen Kalziumkonzentration.

Um zu ermitteln, ob thrombozytäre Chemokine ein solches intrazelluläres Kalzium-Signal in Mastzellen auslösen, wurden Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen mit thrombozytären Chemokinen inkubiert und die Veränderung der Fluoreszenzintensität mittels eines Spektralfluorimeters über die Zeit gemessen (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit thrombozytären Chemokinen

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca²⁺_i) mit FURA-2-beladener Lungenmastzellen (linke Seite) und LAD-2-Zellen (rechte Seite) wurde in einem Spektralfluorimeter über einen Zeitraum von 650s - 800s gemessen. 50 - 100s nach Beginn der Messung wurde den Mastzellen durch Zugabe von NAP-2 (A), CTAP-III (B), PBP

(C) und mit ansteigenden Konzentrationen PF-4 (D) oder der in 4 μ M PF-4 enthaltenen Menge des Lösungsmittels TFA stimuliert. Die Stimulation von Lungenmastzellen mit 3 μ g/ml bzw. 30 μ g/ml anti-IgE bei LAD-2-Zellen diente als Positivkontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von zwei Experimenten (A-C) oder von drei Experimenten (D).

Während bei Lungenmastzellen die Stimulation mit anti-IgE einen deutlichen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration bewirkte, konnte durch die thrombozytären Chemokine kein entsprechender Effekt erzielt werden (siehe Abbildung 8, linke Seite).

Bei LAD-2-Zellen induzierten die Chemokine NAP-2 und CTAP-III ein sehr schwaches und PBP kein Kalziumsignal, während PF-4 ein deutliches und langanhaltendes Signal, welches ab einer Konzentration von 100 nM des Chemokins sichtbar wurde, vermittelte (siehe Abbildung 8, rechte Seite). Die Inkubation der LAD-2-Zellen mit dem PF-4-Lösungsmittel TFA allein hatte keinen Effekt auf die intrazellulären Kalziumspiegel.

Während die thrombozytären Chemokine in Lungenmastzellen kein Kalziumsignal auslösten induzierten NAP-2 und CTAP-III nur ein sehr geringes und PBP kein Kalziumsignal in LAD-2-Zellen. PF-4 hingegen induzierte in LAD-2-Zellen ein starkes, langanhaltendes Signal.

3.3.2 Einfluss anderer Mastzellstimuli auf das PF-4 induzierte Kalziumsignal in LAD-2-Zellen

Im nächsten Ansatz sollte geprüft werden, ob sich verschiedene Stimuli in der Induktion ihres Kalziumsignals gegenseitig beeinflussen können. Eine solche wechselseitige Regulation lässt auf gemeinsame Rezeptoren oder eine Interaktion auf Ebene der Signaltransduktion schließen. Da sowohl PF-4 als auch I-TAC potentielle CXCR3 Liganden sind, war es interessant zu untersuchen, ob sich diese beiden Stimuli bezüglich des Kalziumsignals beeinflussen. Um zu überprüfen, welche Stimuli eine Kreuzreaktivität zu PF-4 aufweisen, wurden LAD-2-Zellen sequentiell mit jeweils zwei Stimuli aktiviert und im Spektralfluorimeter analysiert. In Abbildung 9 ist der Einfluss der Stimuli auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration von LAD-2-Zellen dargestellt.



Abbildung 9: Induktion von Kalziumsignalen in LAD-2-Zellen nach sequenzieller Aktivierung mit verschiedenen Stimuli

Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca²⁺_i) mit FURA-2-beladener LAD-2-Zellen wurde in einem Spektralfluorimeter über die Zeit gemessen. Die Zugabe des ersten Stimulus erfolgte zwischen 50s und 120s nach Messbeginn, die des zweiten nach 150s, 450s bzw. 700s. Dargestellt ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach zweifacher Stimulation mit 4 μ M PF-4 (A), 30 μ g/ml anti-IgE und 4 μ M PF-4 (B), 200 nM I.TAC und 4 μ M PF-4 (C), 4 μ M PF-4 und 30 μ g/ml anti-IgE (D) bzw. 4 μ M PF-4 und 200 nM I.TAC (E). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives von drei Experimenten.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, findet eine fast vollständige Desensitivierung des PF-4 Signals sowohl durch eine vorangegangene PF-4 (siehe Abbildung 9A) als auch durch eine anti-IgE Stimulation statt (siehe Abbildung 9B), während eine Stimulation durch I-TAC das PF-4 Signal komplett desensitiviert (siehe Abbildung 9C). Eine Stimulation mit PF-4 hingegen hat nur einen geringen Einfluss auf das durch anti-IgE (siehe Abbildung 9D) oder I-TAC (siehe Abbildung 9E) induzierte Kalziumsignal.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die PF-4 vermittelten Signaltransduktionswege mit denen durch $Fc_{\epsilon}RI$ und I-TAC induzierten Wegen verbunden sind. Auffällig ist, dass das PF-4 vermittelte Signal sowohl durch Ligation des CXCR3 als auch $Fc_{\epsilon}RI$ desensitiviert werden kann, dies jedoch nicht umgekehrt gilt. Mögliche Erklärungen für dieses komplexe Phänomen werden im nachfolgenden Abschnitt "Diskussion" ausführlich erörtert.

3.3.3 Wirkung von Inhibitoren auf das PF-4 – induzierte Kalziumsignal

Um zu überprüfen, welche intrazellulären Signalwege an der PF-4 induzierten Aktivierung von LAD-2-Zellen beteiligt sind und um Hinweise auf mögliche Funktionen von PF-4 zu erhalten, wurden die Zellen mit Inhibitoren gegen verschiedene Signalproteine vorinkubiert. Pertussis-Toxin hemmt G_i-Proteine, die unter anderem für die Proliferation⁹³ verantwortlich sind. Das Aminosteroid U73122 hemmt das Enzym Phospholipase C (PLC), welches in Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Degranulation⁹⁴ spielt. Manumycin inhibiert die Farnesyl-Transferase, welche für die Aktivierung der monomeren GTPase Ras erforderlich ist. Ras stellt ein zentrales Signal-Protein dar, welches unter anderem bei der Produktion von Zytokinen beteiligt ist⁹⁴. In Abbildung 10 ist der Effekt dieser Inhibitoren auf das PF-4-induzierte Kalziumsignal in LAD-2-Zellen dargestellt.



Abbildung 10 : Effekt von Inhibitoren auf die Induktion von Kalziumsignalen in LAD-2-Zellen durch PF-4

LAD-2-Zellen wurden nach Beladung mit FURA-2 für 30min bei 37°C mit verschiedenen Inhibitoren vorinkubiert oder blieben unbehandelt (A: ohne Inhibitor, B: 1 µg/ml Pertussis-Toxin, C: 1 µM U73122, D: 15 µM Manumycin). Die zytoplasmatische Kalziumkonzentration (Ca²⁺_i) wurde über einen Zeitraum von 300s in einem Fluoreszenzspektrometer detektiert. Nach 50s wurde den Zellen 4 µM PF-4 hinzugefügt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Während die Behandlung der Zellen sowohl mit dem PLC-Inhibitor U73122 als auch dem Ras-Inhibitor Manumycin zu einer vollständigen Blockade des PF-4 induzierten Kalziumsignals führte, wurde nach Vorinkubation mit dem G_i-Protein-Inhibitor PTX nur eine partielle Inhibition beobachtet (siehe Abbildung 10). Dabei wurde die erste, schnelle Phase des Anstieges der Kalziumkonzentration unterdrückt, während die zweite Phase des langsamen Anstieges erhalten blieb. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben Ras, PLC und G_i-Proteine auch ein G_i-Protein unabhängiger, langsamer Mechanismus an der Vermittlung des PF-4 induzierten Kalziumsignals beteiligt ist.

3.4 Die Rolle von thrombozytären Chemokinen in der Aktivierung von Mastzellen

Nachdem Bindungsstellen für NAP-2 auf LAD-2-Zellen und für PF-4 auf Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nachgewiesen wurden und eine Stimulation mit PF-4 zu einer Mobilisierung von Kalziumionen führte, sollte im nächsten Ansatz geprüft werden, ob thrombozytäre Chemokine Mastzellen funktionell aktivieren können. Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zur Signaltransduktion, vor allem der Nachweis auf die Beteiligung der Phospholipase C an der PF-4 induzierten Signalweiterleitung, konnte vermutet werden, dass PF-4 eine Rolle bei der Degranulation von Mastzellen spielt.

Zunächst sollte untersucht werden, ob thrombozytäre Chemokine allein eine Degranulation in Hautmastzellen, Lungenmastzellen oder LAD-2-Zellen auslösen können. In einem zweiten Ansatz wurde geprüft, ob eine Vorinkubation der Mastzellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber den Chemokinen hervorruft. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Kostimulation mit den Chemokinen und anti-IgE bzw. mit antimikrobiellen Peptiden auf die Degranulation der Mastzellen untersucht. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob eine Vorinkubation mit den Chemokinen die anti-IgE induzierte Degranulation modulieren kann.

3.4.1 Stimulation mit thrombozytären Chemokinen

Um zu überprüfen, ob PF-4 oder eines der anderen thrombozytären Chemokine NAP-2, CTAP-IIII oder PBP eine Degranulation bei Mastzellen induziert, wurden Haut- und Lungenmastzellen sowie LAD-2-Zellen mit verschiedenen Konzentration der Chemokine für 30min bei 37°C inkubiert und deren Überstand auf die Freisetzung von β -Hexosaminidase untersucht (siehe Abbildung 11).



Abbildung 11 Effekt : thrombozytären von Chemokinen auf die β-Freisetzung von Hexosaminidase aus humanen Mastzellen Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10⁴ Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen NAP-2, CTAP-III, PBP und PF-4 stimuliert oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Primärzellen mit 3 µg/ml anti-IgE und die LAD-2-Zellen mit 100 ng/ml A23187 stimu-Die freigesetzte βliert. Hexosaminidase wurde bestimmt ist und als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, induzierten NAP-2, CTAP-III und PBP in keiner der verwendeten Zellpopulationen eine Degranulation. Interessanterweise vermittelte PF-4 in einer Konzentration von 8 μ M in Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen, nicht jedoch in Hautmastzellen eine Degranulationsantwort. Diese fiel jedoch deutlich geringer aus als eine durch anti-IgE oder A23187 induzierte Antwort.

3.4.2 PF-4-induzierte Degranulation in TNF-behandelten Mastzellen

Die Beobachtung, dass PF-4 trotz einer deutlichen Induktion eines Kalziumsignals nur eine schwache Degranulation vermittelte, legte den Verdacht nahe, dass eine vollständige biologische Antwort nur in Gegenwart eines geeigneten Kostimulus erreicht werden könnte. Ein vergleichbares Phänomen konnte bei Neutrophilen beobachtet werden. In diesen Zellen bewirkt eine Vor- bzw. Kostimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF eine synergistische Steigerung der Degranulationsantwort⁷⁰.

Um zu prüfen, ob TNF eine vergleichbare Reaktion bei Mastzellen hervorruft, wurden Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen zum einen mit verschiedenen Konzentrationen TNF und 4 μ M PF-4 koinkubiert und zum anderen für verschiedene Zeitpunkte mit TNF vorinkubiert und anschließend für 30min mit 4 μ M PF-4 inkubiert. TNF allein induzierte in keiner der verwendeten Konzentrationen eine Degranulation (Daten nicht gezeigt). Die Abbildung 12 stellt die β -Hexosaminidase-Freisetzung der Zellen nach Vorstimulation mit TNF und anschließender PF-4 Stimulation, bzw. Kostimulation mit TNF und PF-4, als prozentualen Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge β -Hexosaminidase dar.

Die Kombination von TNF und PF-4 induzierte zu keinem Zeitpunkt und in keiner der verwendeten Konzentrationen eine Degranulation in Hautmastzellen, Lungenmastzellen oder LAD-2-Zellen.



Abbildung 12: Effektevon TNF und PF-4 aufdie β-Hexosaminidase –FreisetzungvonMastzellen

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit 4 µM PF-4 allein stimuliert, mit ansteigenden Konzentrationen TNF für 0,5, 10 und 30min vorinkubiert und anschließend mit 4 µM PF-4 stimuliert oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Zellen mit 3 µg/ml (Primärzellen) oder 30 µg/ml anti-IgE (LAD-2-Zellen) stimuliert. Die freigesetzte β-Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

3.4.3 Modulation der $Fc_{\epsilon}RI$ induzierten β -Hexosaminidase – Freisetzung durch Koinkubation mit thrombozytären Chemokinen

Da NAP-2, CTAP-III und PBP keine und PF-4 nur eine geringe direkte Degranulation in Mastzellen induzierte, sollte nun untersucht werden, ob thrombozytäre Chemokine die $Fc_{\epsilon}RI$ induzierte Degranulation modulieren können. Eine solche Modulation könnte sowohl eine aktivierende, steigernde Wirkung besitzen oder sich hemmend auswirken.

Um eine potentielle Steigerung der Freisetzung untersuchen zu können, wurden die drei Mastzellpopulationen suboptimal mit 0,1 μ g/ml anti-IgE (Primärzellen) oder 3 μ g/ml (LAD-2-Zellen) stimuliert und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen der Chemokine koinkubiert. Zum Nachweis einer möglichen Herabregulation der Freisetzung optimal stimulierter Mastzellen, wurde die Koinkubation der Zellen in Gegenwart von 3 μ g/ml bei den Primärzellen bzw. 30 μ g/ml bei LAD-2-Zellen und verschiedenen Konzentrationen der Chemokine durchgeführt.

In Abbildung 13 ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Koinkubation mit verschiedenen Konzentrationen thrombozytärer Chemokine und einer suboptimalen bzw. einer optimalen Konzentration anti-IgE als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge β -Hexosaminidase dargestellt.



Abbildung 13 : Effekt von thrombozytären Chemokinen auf die $Fc_{\epsilon}RI$ induzierte β -Hexosaminidase – Freisetzung von humanen Mastzellen

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen thrombozytärer Chemokine und einer suboptimalen Konzentration (linke Seite) anti-IgE (Primärzellen: 0,1 µg/ml; LAD-2-Zellen: 3 µg/ml), bzw. einer optimalen Konzentration (rechte Seite) anti-IgE (Primärzellen: 3 µg/ml; LAD-2-Zellen: 30 µg/ml) koinkubiert oder oder verblieben unstimuliert. Um die Effekte der Einzelkomponenten zu untersuchen, wurden die Zellen außerdem mit anti-IgE allein und der höchsten Konzentration der Chemokine allein inkubiert. Die freigesetzte β -Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standard- abweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Die Koinkubation der Chemokine mit der suboptimalen Konzentration an anti-IgE führte bei keiner der untersuchten Zellpopulationen zu einer Freisetzung von β -Hexosaminidase, welche über den Effekt der einzelnen Stimuli hinausging (siehe Abbildung 13; linke Seite).

Weiterhin wurde keine chemokinvermittelte und signifikante Modulation der durch optimale anti-IgE Konzentration induzierten Degranulation beobachtet.

3.4.4 Modulation der anti-IgE induzierten β-Hexosaminidase – Freisetzung durch Vorinkubation mit thrombozytären Chemokinen

Abschließend wurde untersucht, ob eine Vorinkubation mit thrombozytären Chemokinen Einfluss auf die anti-IgE induzierte Degranulation hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden die verschiedenen Mastzellpopulationen mit unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Chemokine für 120min vorinkubiert und anschließend mit der suboptimalen Konzentration anti-IgE (Primärzellen: 0,1 μ g/ml; LAD-2-Zellen: 3 μ g/ml) stimuliert. In Abbildung 14 ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Vorinkubation von 120min mit verschiedenen Konzentrationen thrombozytärer Chemokine und anschließender Stimulation mit einer suboptimalen bzw. einer optimalen Konzentration anti-IgE als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge β -Hexosaminidase dargestellt.

Wie die Abbildung 14 zeigt, wurde bei keiner der untersuchten Mastzellpopulationen durch Vorinkubation mit den verschiedenen thrombozytären Chemokinen eine Modulation der durch anti-IgE vermittelten β -Hexosaminidase – Freisetzung beobachtet. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass weder die Koinkubation noch die Vorinkubation von Mastzellen mit thrombozytären Chemokinen eine modulierende Wirkung auf die Fc_eRI induzierte Degranulation besitzt.



Abbildung 14 : Effekt von thrombozytären Chemokinen auf die Fc_εRI induzierte β-Hexosaminidase – Freisetzung von humanen Mastzellen durch Vorinkubation

Hautmastzellen (A),

Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen thrombozytärer Chemokine für 120min vorinkubiert und anschließend mit einer suboptimalen Konzentration anti-IgE (Primärzellen: 0,1 µg/ml; LAD-2-Zellen: 3 µg/ml) stimuliert. Als Kontrollen dienten die Stimulationen mit der suboptimalen, bzw. optimalen Konzentration anti-IgE (Primärzellen: 3 μ g/ml; LAD-2-Zellen: 30 μ g/ml) allein, der höchsten Konzentration der Chemokine allein und der unstimulierten Zellen. Die β-Hexosaminidase freigesetzte wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabjeweils weichungen von drei unabhängigen Experimenten.

3.4.5 Aktivierung von Mastzellen durch LL-37 und deren Modulation durch PF-4

Im Verlauf der Spätreaktion wandern nach einer Mastzellaktivierung neben anderen Zelltypen auch Neutrophile in das betroffene Gewebe ein. Bei deren Aktivierung wird unter anderem das antimikrobiell wirkende Kathelizidin LL-37 frei. Da bereits bekannt war, dass LL-37 eine Degranulation in peritonealen Rattenmastzellen auslöst⁹⁵, lag die Vermutung nahe, dass dieses Peptid einen vergleichbaren Effekt in humanen Mastzellen hervorruft. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob LL-37 allein oder in Kombination mit thrombozytären Chemokinen eine Degranulation in humanen Mastzellen induzieren kann.

In Abbildung 15 ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen LL-37 als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt.





Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen LL-37 stimuliert oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Primärzellen mit 3 µg/ml und die LAD-2-Zellen mit 30 µg/ml anti-IgE stimuliert. Die freigesetzte β-Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 15 dargestellt induzierte LL-37 in allen drei humanen Mastzellpopulationen eine β-Hexosaminidase – Freisetzung. Im Vergleich zu den LAD-2-Zellen, welche in der höchsten Konzentration LL-37 (10 μg/ml) eine durchschnittliche β-Hexosaminidase – Freisetzung von 70,09 % (± 9,77) zeigten, reagierten die Primärzellen deutlich schwächer auf diese Konzentration (Hautmastzellen: 4,05 %, ± 2,82 und Lungenmastzellen: 8,82 %, \pm 4,16). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass bei allen drei Mastzellpopulationen bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml keine Degranulation ausgelöst wurde. Bei Hautmastzellen und LAD-2-Zellen wurde durch 3 µg/ml eine schwache Freisetzung induziert, während Lungenmastzellen erst ab einer Konzentration von 10 µg/ml reagierten. Bei allen drei Zellpopulationen vermittelte das Peptid in einer Konzentration von 3 µg/ml eine submaximale Antwort. Für die Untersuchung einer möglichen Kooperation zwischen den Chemokinen und LL-37 wurden die Zellen daher mit 3 µg/ml LL-37 und verschiedenen Konzentration der Chemokine koinkubiert. In Abbildung 16 ist die β-Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen thrombozytärer Chemokine allein (linke Seite) und nach Koinkubation mit der suboptimalen Konzentration LL-37 (rechte Seite) als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge β-Hexosaminidase dargestellt.

Bei Haut- und Lungenmastzellen zeigte sich bei keiner der untersuchten Konzentration ein kooperativer Effekt zwischen thrombozytären Chemokinen und LL-37. Ein differentielles Bild ergab sich jedoch bei der Stimulation von LAD-2-Zellen: Während die Chemokine NAP-2, CTAP-III und PBP keine Modulation der LL-37-vermittelten Antwort bewirkten, zeigten LAD-2-Zellen bei einer Koinkubation von 3 μ g/ml LL-37 und 8 μ M PF-4 eine β -Hexosaminidase – Freisetzung, die über einem additiven Effekt der Einzelkomponenten lag. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass LL-37 in humanen Mastzellen eine Degranulation induziert, welche zumindest in LAD-2-Zellen durch PF-4 synergistisch verstärkt wird.



Abbildung 16 : Effekte von thrombozytären Chemokinen und LL-37 auf die β -Hexosaminidase – Freisetzung von Mastzellen

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen thrombozytärer Chemokine inkubiert (linke Seite) und mit der suboptimalen Konzentration von 3 µg/ml LL-37 allein inkubiert oder mit den Chemokinen koinkubiert (rechte Seite) oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Zellen mit 3 µg/ml (Primärzellen) oder 30 µg/ml anti-IgE (LAD-2-Zellen) stimuliert. Die freigesetzte β-Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

3.4.6 Aktivierung von Mastzellen durch HNPs und deren Modulation durch PF-4

Neben LL-37 stellen humane alpha-Defensine (humane neutrophile Proteine; HNP) eine weitere Gruppe von antimikrobiell wirkenden Peptiden dar, welche von Neutrophilen sezerniert werden. Da PF-4 und LL-37 eine synergistische Erhöhung der Degranulation vermittelten, wurde im nächsten Schritt geprüft, ob dieses Wirkprinzip auch für HNPs gültig ist.

In einem dem obigen Abschnitt vergleichbaren Ansatz wurde zunächst die Kapazität von HNPs zur Induktion einer Mastzelldegranulation untersucht und nachfolgend eine potentielle Kooperation mit thrombozytären Chemokinen geprüft. In Abbildung 17 ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen HNPs als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt.



Abbildung 17 : Aktivierung von Mastzellen durch HNPs

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen HNPs stimuliert oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Primärzellen mit 3 μ g/ml und die LAD-2-Zellen mit 30 μ g/ml anti-IgE stimuliert. Die freigesetzte β -Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

In allen drei untersuchten humanen Mastzellpopulationen vermittelten HNPs eine Degranulation. Während Hautmastzellen ab einer Konzentration von 3 μ M eine β -Hexosaminidase – Freisetzung aufwiesen, wurden Lungenmastzellen bereits bei einer Konzentration von 1 μ M aktiviert. Im Gegensatz zu den Primärzellen, welche eine konzentrationsabhängige Induktion der Degranulation zeigten, fand sich bei LAD-2-Zellen bis zu einer Konzentration von 3 μ M keine Aktivierung. Bei einer Konzentration von 10 μ M stieg die Freisetzung von Granulainhalten jedoch sprunghaft an.

Da zuvor gezeigt wurde, dass PF-4 und LL-37 in kooperativer Wirkung die Degranulation von Mastzellen induzieren können, stellte sich die Frage, ob HNPs eine ähnliche Wirkungsweise besitzen.

Zur Klärung dieser Frage wurden Mastzellen mit 3 μ M HNPs in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen NAP-2, CTAP-III, PBP und PF-4 stimuliert und die Menge an freigesetzter β -Hexosaminidase bestimmt. In Abbildung 18 ist die β -Hexosaminidase-Freisetzung von Hautmastzellen, Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen thrombozytärer Chemokine allein (linke Seite) und nach Koinkubation mit der suboptimalen Konzentration HNPs (rechte Seite) als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge β -Hexosaminidase dargestellt.

Bei Haut- und Lungenmastzellen zeigte sich bei keiner der untersuchten Konzentrationen ein kooperativer Effekt zwischen thrombozytären Chemokinen und HNPs. Ähnlch dem Effekt von LL-37 ergab sich bei der Stimulation von LAD-2-Zellen ein differentielles Bild: Die Chemokine NAP-2, CTAP-III und PBP wiesen keine Modulation der HNP-vermittelten Antwort auf. LAD-2-Zellen zeigten jedoch bereits bei einer Koinkubation von 3 μ M HNPs und 0,1 μ M PF-4 eine β -Hexosaminidase – Freisetzung, die das Niveau der anti-IgE induzierten Degranulation erreicht. Durch Applikation höherer Konzentrationen PF-4 konnte die Freisetzung noch gesteigert werden.



Abbildung 18 : Effekte von thrombozytären Chemokinen und HNPs auf die β-Hexosaminidase – Freisetzung von Mastzellen

Hautmastzellen (A), Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C) wurden zu 5 x 10^4 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen thrombozytärer Chemokine inkubiert (linke Seite) und mit der suboptimalen Konzentration von 3 µM HNPs allein inkubiert oder mit den Chemokinen koinkubiert (rechte Seite) oder verblieben unstimuliert. Um die generelle Aktivierbarkeit zu prüfen, wurden die Zellen mit 3 µg/ml (Primärzellen) oder 30 µg/ml anti-IgE (LAD-2-Zellen) stimuliert. Die freigesetzte β-Hexosaminidase wurde bestimmt und ist als prozentualer Anteil der im Totallysat enthaltenen Menge dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Zytokinproduktion stimulierter Mastzellen

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob PF-4 neben seiner Wirkung auf die Degranulation auch einen Einfluss auf die Expression und Sekretion von Zytokinen humaner Mastzellen besitzt. Ein erster Hinweis ergab sich aus der Beteiligung von Ras an der PF-4 vermittelten Signaltransduktion, da in mehreren Veröffentlichungen eine Beteiligung von Ras an der Signalweiterleitung zur Zytokinproduktion beobachtet werden konnte^{94,96}.

Um zu untersuchen, ob PF-4 Potential besitzt die Produktion und Sekretion von Zytokinen in Mastzellen zu induzieren oder zu modulieren, wurden mit Myeloma-IgE beladene Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen in ihren entsprechenden Kulturmedien (siehe Abschnitt 2.4.3.6 und 2.4.4) für 24h zu $2x10^5$ Zellen/ml kultiviert und mit 4 µM PF-4, bzw. der optimalen Konzentration anti-IgE (Lungenmastzellen: 3 µg/ml; LAD-2-Zellen; 30 µg/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Überstände wurden nachfolgend mittels ELISA-Sandwich-Verfahren auf deren Gehalt bestimmter Zytokine (IL-2, IL-5, MIF und TNF) und Chemokine (Gro-alpha, IL-8, IP-10, MDC, MIP-1 alpha und MIP-1 beta) überprüft.

In Tabelle 5 ist die Menge der oben genannten Zytokine und Chemokine von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach 24h Stimulation mit PF-4 oder anti-IgE in pg/ml wiedergegeben.

	Lu	ungenmastzel	len ^{1.)}		LAD-2-Zellen ^{1.)}			
Zytokin Konz. [pg/ml]	unst.	ΡF-4 4 μΜ	anti-IgE 3 µg/ml	unst.	ΡF-4 4 μΜ	anti-IgE 30 µg / ml		
Gro-alpha	19	38	35	12	17	3		
IL-2	<1	<1	<1	<1	<1	<1		
IL-5	<1	<1	6,9	<1	<1	<1		
IL-8	414	512	3050	<1	41	95		
IP-10	26	20	31	31	39	36		
MDC	<1	14	<1	<1	6	<1		
MIF	534	467	412	1200	695	2871		
MIP-1 alpha	29	101	211	64	2025	80		
MIP-1 beta	11	514	62	71	5000	65		
TNF	3	5	16	8	14	3		

Tabelle 5 : Zytokinproduktion von Mastzellen stimuliert mit PF-4 und anti-IgE

1.) Dargestellt ist Ergebnis eines Einzelexperiments.

Wie in Tabelle 5 dargestellt, fanden sich in den Überständen von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen keine relevanten Mengen IL-2, IL-5, Gro-alpha, IP-10, TNF und MDC.

Bei Lungenmastzellen konnte die Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit anti-IgE von einer relativ hohen Grundexpression um etwa das siebenfache gesteigert werden. Durch Stimulation mit PF-4 zeigten Lungenmastzellen nur eine leichte Erhöhung der IL-8 Produktion. Bei LAD-2-Zellen lag die spontane Sekretion dieses Zytokins unterhalb der Detektionsgrenze, die Produktion konnte jedoch sowohl durch Stimulation mit PF-4 als auch durch anti-IgE leicht gesteigert werden.

Während die Inkubation mit PF-4 oder anti-IgE keinen Einfluss auf die MIF - Synthese bei Lungenmastzellen hatte, hemmte PF-4 die spontane Freisetzung bei LAD-2-Zellen um ca. 50%. Die Inkubation mit anti-IgE jedoch steigert die Produktion um etwa das Zweifache.

Die stärkste Aufregulation der Zytokinproduktion durch PF-4 konnte sowohl bei Lungenmastzellen als auch bei LAD-2-Zellen bei der Messung von MIP-1 alpha bzw. MIP-1 beta beobachtet werden. Bei Lungenmastzellen fand sich nach PF-4 Stimulation eine Verdreifachung der MIP-1 alpha bzw. eine 46fach erhöhte MIP-1 beta Freisetzung gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Noch deutlicher zeigte sich der Effekt von PF-4 bei den LAD-2-Zellen. Hier wurde die MIP-1 Produktion um das 30fache (MIP-1 alpha) bzw. 70fache (MIP-1 beta) gesteigert. Anti-IgE hingegen hat in diesem Versuch nur eine leichte Aufregulation in Lungenmastzellen und keine Regulation in LAD-2-Zellen vermittelt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Sekretion von MIP-1 alpha und MIP-1 beta nach Stimulation mit PF-4 bzw. anti-IgE in einer Zeitkinetik näher untersucht.

3.5.1 Freisetzung von MIP-1 alpha und beta in Abhängigkeit von der Zeit

Myeloma-IgE beladene Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen wurden in einer Konzentration von $8,5x10^5$ Zellen/ml kultiviert und mit 4 µM PF-4, bzw. anti-IgE (Lungenmastzellen: 3 µg/ml; LAD-2-Zellen; 30 µg/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0,5; 2; 4; 8; 16; 24 und 48h) wurden die Zellen geerntet und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Die Überstände wurden auf ihren Gehalt an MIP-1 alpha bzw. MIP-1 beta im Sandwich-ELISA-Verfahren (siehe Abschnitt 2.5.2) getestet. In Abbildung 19 ist die MIP-1 alpha und MIP-1 beta Sekretion von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit PF-4 und anti-IgE nach den oben genannten Zeitpunkten grafisch dargestellt.


Abbildung 19 : Zeitkinetik der MIP-1 alpha und MIP-1 beta Sekretion von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen nach Stimulation mit PF-4 und anti-IgE

Dargestellt ist die MIP-1 alpha (obere Zeile) und MIP-1 beta (untere Zeile) Sekretion von Lungenmastzellen (linke Spalte) und LAD-2-Zellen (rechte Spalte) nach Stimulation mit 4 μ M PF-4 (grau schraffiert), mit anti-IgE (Lungenmastzellen: 3 μ g/ml; LAD-2-Zellen; 30 μ g/ml; weiß schraffiert) und unstimuliert (schwarz) nach verschiedenen Zeitpunkten in Kulturmedium zu 8,5x10⁵ Zellen/ml. Abgebildet sind die Mittelwerte ± Standard-abweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 19 dargestellt sezernierten Lungenmastzellen zwischen 2h und 4h nach anti-IgE Stimulation sowohl MIP-1 alpha als auch MIP-1 beta. Die Sekretion beider Chemokine erreichte bereits nach 8h ein Plateau bei etwa 300 pg/ml (MIP-1 alpha) und 800 pg/ml (MIP-1 beta). Die Stimulation mit PF-4 konnte bei Lungenmastzellen keine Sekretion dieser beiden Chemokine induzieren.

Im Gegensatz dazu zeigten LAD-2-Zellen keine relevante MIP-1 alpha oder MIP-1 beta Sekretion nach Stimulation mit anti-IgE, jedoch konnte eine Sekretion beider Chemokine zwischen 2h und 4h nach Stimulation mit PF-4 beobachtet werden. Während die MIP-1 beta Sekretion nach 16h ein Plateau bei etwa 140 pg/ml fand, konnte bei der MIP-1 alpha Sekretion auch nach 48h noch kein Plateau ermittelt werden.

Obwohl das in der Tabelle 5 dargestellte Ergebnis der MIP-1 alpha und MIP-1 beta Sekretion von Lungenmastzellen nach Stimulation mit PF-4 eine deutliche Freisetzung der beiden Chemokine anzeigt, konnten diese Daten in der Zeitkinetik nicht bestätigt werden. Auch konnten die Daten der freigesetzten Mengen der Chemokine nach Stimulation mit anti-IgE nicht bestätigt werden. Da es sich bei dem in Tabelle 5 dargestellten Ergebnis um ein Einzelexperiment handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein spenderspezifisches Phänomen handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LAD-2-Zellen im Gegensatz zu Lungenmastzellen nach Stimulation mit PF-4 MIP-1 alpha und MIP-1 beta freisetzen, während Lungenmastzellen im Gegensatz zu LAD-2-Zellen nach Stimulation mit anti-IgE diese Chemokine sezernieren.

3.6 Stimulation von mononukleären Zellen durch PF-4 stimulierte LAD-2- Überstände

Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob die Überstände PF-4 aktivierter LAD-2-Zellen Mediatoren enthalten, die eine funktionelle Relevanz in der Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten besitzen. Zu diesem Zweck wurden LAD-2-Zellen ($2x \ 10^6$ /ml) mit 4 µM PF-4 für 24h stimuliert. Als Parameter der Aktivierung von mononukleären Zellen (MNZ) diente die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Da eine Messung der Aktivierung von MNZ im Spektralfluorimeter aufgrund des in den Überständen vorhandenen Phenolrot nicht möglich war, wurde eine alternative Methode angewandt. Hierzu bot sich die Messung im Durchflusszytometer an, da bei dieser Methode die intrazelluläre Kalziumkonzentration in einzelnen Zellen detektiert wird und die Anwesenheit des Phenolrot keinen Einfluss auf die Messung hat.

Bei Fluo-4 beladenen MNZ wurde zunächst für 30s der intrazelluläre Kalziumspiegel überprüft und nachfolgend die Zellen mit Überständen PF-4 stimulierter und unstimulierter

LAD-2-Zellen inkubiert und erneut analysiert. Ein Kontrollansatz enthielt nur PF-4 und Kulturmedium. Als Positivkontrolle diente 100 nM FMLP.

Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Dichte von Monozyten und Lymphozyten ist eine getrennte Analyse der Zellen im Durchflusszytometer möglich.

In Abbildung 20 ist die Fluoreszenzintensität von Monozyten vor und nach Stimulation mit den oben genannten LAD-2-Zellüberständen und Kontrollansätzen dargestellt.



Abbildung 20 : Effekte von LAD-2-Zellüberständen auf den intrazellulären Kalziumspiegel von Monozyten.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Monozyten vor und nach Zugabe von 4 μ M PF-4 (A), 200 nM FMLP (B), Überständen unstimulierter LAD-2-Zellen (C) und Überständen von 4 μ M PF-4 stimulierten LAD-2-Zellen (D). Die Zugabe der Stimuli erfolgte 30s nach Beginn der Messung. Die Überstände wurden vor Versuchsbeginn 1:2 mit Kulturmedium verdünnt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Die Stimulation der Monozyten mit 4 µM PF-4 vermittelte keinen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (siehe Abbildung 27A), während nach Aktivierung der Zellen mit FMLP ein deutliches, etwa 2min anhaltendes Signal messbar war (siehe Abbildung 27B). Die Stimulation der Zellen mit Überständen unstimulierter LAD-2-Zellen hat einen leichten Anstieg des Kalziumspiegels zur Folge, welcher bereits nach 30s wieder Ausgangsniveau erreichte (siehe Abbildung 27C). Durch Inkubation der Monozyten mit Überständen PF-4 stimulierter LAD-2-Zellen stieg der Kalziumspiegel der Zellen auf ein Niveau, welches mit dem durch FMLP induzierten Signal vergleichbar ist (siehe Abbildung 27D). Auch hier erreichte das Signal nach etwa 2min das Ausgangsniveau.

In Abbildung 21 ist die Fluoreszenzintensität von Lymphozyten vor und nach Stimulation mit den oben genannten LAD-2-Zellüberständen und Kontrollansätzen dargestellt.



Abbildung 21 : Effekte von LAD-2-Zellüberständen auf den intrazellulären Kalziumspiegel von Lymphozyten.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von Lymphozyten vor und nach Zugabe von 4 μ M PF-4 (A), 200 nM FMLP (B), Überständen unstimulierter LAD-2-Zellen (C) und Überständen von 4 μ M PF-4 stimulierten LAD-2-Zellen (D) 30s nach Messbeginn. Die Überstände wurden vor Versuchsbeginn 1:2 mit Kulturmedium verdünnt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, hat keiner der applizierten Überstände eine Aktivierung der Lymphozyten zur Folge.

Dieses Ergebnis zeigt, dass eine PF-4 induzierte Aktivierung von LAD-2-Zellen Mediatoren aus diesen Zellen freisetzt, welche in der Lage sind Monozyten zu aktivieren, jedoch keine Aktivierung von Lymphozyten zur Folge haben.

3.7 m-RNA-Expression der Spleißvarianten CXCR3A und CXCR3B in Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen

Da Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen Unterschiede in der Aktivierbarkeit durch PF-4 aufwiesen und unter Abschnitt 3.2.2.2 gezeigt werden konnte, dass diese beiden Mastzellpopulationen ein unterschiedliches CXCR3-Expressionsprofil besitzen, lag die Vermutung nahe, dass die Aktivierung der LAD-2-Zellen durch den bereits als PF-4 Rezeptor beschriebenen CXCR3B vermittelt wird. Im folgenden Abschnitt sollte geklärt werden, ob Lungenmastzellen bzw. LAD-2-Zellen mRNA für die beiden Spleißvarianten CXCR3A und CXCR3B exprimieren und ob die Expression durch Stimulation mit PF-4 oder anti-IgE moduliert wird.

Zu diesem Zweck wurden in Parallelansätzen Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen für 2h mit 4 μ M PF-4 oder mit anti-IgE stimuliert. Nach Extraktion der Gesamt-mRNA wurde diese mittels RT-Reaktion in cDNA überschrieben und Fragmente der respektiven Rezeptoren mittels spezifischer Primer amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente wurden sowohl qualitativ nach Auftrennung im Agarose-Gel (siehe Abbildung 22; A) wie auch quantitativ im Light-Cycler analysiert (siehe Abbildung 22; B,C).

Wie in Abbildung 25 A und B dargestellt, exprimieren unstimulierte Lungenmastzellen weder CXCR3A noch CXCR3B. Eine Aktivierung dieser Zellen mit anti-IgE, nicht jedoch mit PF-4, induzierte einen moderaten Anstieg der m-RNA Expression von CXCR3A (dreifache Steigerung gegenüber der Kontrolle), während der Anstieg von CXCR3B wesentlich stärker ausfiel (80fache Steigerung gegenüber der Kontrolle). LAD-2-Zellen exprimieren konstitutiv CXCR3B, nicht jedoch CXCR3A, wobei die Expression nicht durch anti-IgE moduliert wurde. Interessanterweise bewirkte die Stimulation mit PF-4 eine Herabregulation der CXCR3B Expression um 75%.



Abbildung 22 : Qualitative und quantitative Analyse der CXCR3A und CXCR3B mRNA-Expression stimulierter Mastzellen

Lungenmastzellen oder LAD-2-Zellen $(1x10^5 \text{ Zellen/ml})$ wurden für 2h mit 4 µM PF-4, 3 µg/ml (Lungenmastzellen) bzw. 30 µg/ml (LAD-2-Zellen) a-IgE stimuliert oder verblieben unstimuliert. Nach Extraktion der Gesamt-mRNA wurde diese mittels RT-Reaktion in cDNA überschrieben und Fragmente der respektiven Rezeptoren mittels spezifischer Primer amplifiziert. A: Qualitative Analyse der RT-PCR-Produkte im Agarosegel (3%ig). Als Kontrollen dienten: unstimulierte T-Zellen (positiv), Aqua dest. (negativ) und Endothelzellen (EC). B und C: Quantitative Analyse der RT-PCR-Produkte. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression des spezifischen Gens (CXCR3A: schwarz; CXCR3B: grau) zu β 2-Mikroglobulin der stimulierten bzw. unstimulierten Lungenmastzellen (B) und LAD-2-Zellen (C). Gezeigt ist ein repräsentatives von zwei Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass sich Zellen der Linie LAD-2 und primäre Lungenmastzellen grundsätzlich hinsichtlich ihrer Expression und Regulation von CXCR3 unterscheiden. Während LAD-2-Zellen CXCR3B konstitutiv exprimieren, findet bei Lungenmastzellen die mRNA-Expression für diesen Rezeptor erst nach Stimulation des $Fc_{\epsilon}RI$ statt. Des Weiteren konnte bei Lungenmastzellen eine Aufregulation des CXCR3A nach Stimulation des $Fc_{\epsilon}RI$ beobachtet werden, während bei LAD-2-Zellen weder die CXCR3A noch die CXCR3B Expression durch diesen Stimulus moduliert wurde.

4. Diskussion

In einer Reihe verschiedener Arbeiten konnte gezeigt werden, dass im Zuge einer allergischen Spätreaktion Thrombozyten in das betroffene Lungengewebe einwandern^{48,49,51} und dass der intravaskuläre Spiegel der thrombozyten-spezifischen Chemokine nach einer Allergen-Provokation ansteigt⁴⁶. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass diese Chemokine während einer allergischen Reaktion mit Mastzellen in Kontakt kommen. Weiterhin ist bekannt, dass nach einer Mastzellaktivierung neben einer Reihe anderer Zellen auch Neutrophile^{40,41} und Monozyten¹⁷ in das Gewebe einwandern.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst potentielle direkte Wirkungen thrombozytärer Chemokine auf primäre Mastzellen untersucht. Nachfolgend wurden auch mögliche indirekte über die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden vermittelte Effekte in diese Untersuchung mit einbezogen. Im Abschluss wurde wiederum die Wirkung von Chemokin-induzierten Mastzellmediatoren auf mononukleäre Zellen bestimmt.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass sich primäre Mastzellen aus humanem Haut- und Lungengewebe und Mastzellen der Linie LAD-2 hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression und ihrer Aktivierbarkeit gegenüber verschiedener Stimuli grundsätzlich voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu Primärzellen zeigten LAD-2-Zellen einen synergistischen Effekt bei der Kostimulation durch PF-4 und antimikrobiellen Peptiden. Nach einer PF-4 Stimulation sezernierten LAD-2-Zellen die Chemokine MIP-1 alpha/beta, während dies bei Lungenmastzellen nur nach einer anti-IgE Stimulation der Fall war. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Überstände PF-4-stimulierter LAD-2-Zellen Monozyten aktivieren. Obwohl auf allen drei Zellpopulationen Bindungsstellen für PF-4 nachweisbar waren, fanden sich die Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR3 konstitutiv nur auf LAD-2-Zellen. Interessanterweise konnte in Lungenmastzellen die Expression von zwei unterschiedlichen Varianten des CXCR3 nach Aktivierung des $Fc_{\epsilon}RI$ induziert werden.

Für eine potentielle Aktivierbarkeit der Zellen durch Chemokine ist die Expression der korrespondierenden Rezeptoren Voraussetzung. In der Literatur findet sich eine große Anzahl an Veröffentlichungen, welche die Expression von Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Mastzellpopulationen beschreiben. Da sich Mastzellen des Menschen in vielen Aspekten von denen anderer Spezies unterscheiden⁹⁷, werden im Folgenden die Ergebnisse dieser Arbeit hauptsächlich im Zusammenhang mit Befunden an humanen Mastzellen diskutiert.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, exprimieren LAD-2-Zellen auf ihrer Oberfläche CXCR1, CXCR2 und CXCR3. Damit konnten frühere Befunde von F. Schiemann⁹⁸ zumindest hinsichtlich CXCR2 und CXCR3 bestätigt werden. Überraschenderweise konnte keiner der Rezeptoren auf der Oberfläche von primären Lungenmastzellen nachgewiesen werden. Damit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den Befunden von Brightling *et al.*⁹⁹, die eine Expression des CXCR1 und CXCR3 und eine schwache Expression des CXCR2 auf humanen Lungenmastzellen beschreiben. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit oder das Fehlen von Zytokinen im Kulturmedium Auswirkungen auf die Rezeptorexpression haben kann¹⁰⁰. Die Zytokine IL-6 und IL-10 werden in der Regel Kulturen zugefügt, bei denen Mastzellen aus Stammzellen des Nabelschnurblutes differenziert werden¹⁰¹⁻¹⁰³, während sie für die Kultur isolierter Gewebsmastzellen nicht benötigt werden^{104,105}. Da die von mir untersuchten Lungenmastzellen im Gegensatz zu den von Brightling *et al.* untersuchten Zellen nicht in Anwesenheit von IL-6 und IL-10 kultiviert wurden, wäre es denkbar, dass diese Zytokine Auswirkungen auf die CXCR1-3 Expression haben. Zur Expression von Chemokinrezeptoren auf Hautmastzellen ist bekannt, dass CXCR1 und CXCR3 auf der Oberfläche^{106,107}, während

Bislang konnten zwei verschiedene Rezeptoren identifiziert werden, die PF-4 binden und an der Vermittlung biologischer Funktionen beteiligt sind. Dabei handelt es sich zum einen um ein Chrondroitinsulfat-Proteoglykan-Rezeptor, welcher zuerst auf Neutrophilen⁶⁶, später aber auch auf T-Zellen¹⁰⁸ und Monozyten¹⁰⁹ nachgewiesen wurde. Zum anderen wurde auf Endothelzellen eine Spleißvariante des CXCR3 (CXCR3B) entdeckt, welche mit hoher Affinität PF-4 bindet⁶⁷. Unveröffentlichte Daten der Laborgruppe Biochemische Immunologie am Forschungszentrum Borstel weisen darauf hin, dass dieser Rezeptor ebenfalls von T-Zellen intrazellulär exprimiert wird, wobei jedoch eine Oberflächenexpression nicht beobachtet wurde.

CXCR2 nur auf Membranen intrazellulärer Granula exprimiert werden¹⁰⁶.

Zur Interaktion zwischen PF-4 und Mastzellen war zu Beginn dieser Arbeit lediglich bekannt, dass humanes PF-4 eine Histaminfreisetzung in peritonealen Rattenmastzellen auslöst¹¹⁰.

Im Rahmen meiner Arbeit konnte erstmals eine Bindung von PF-4 auf humanen Haut- und Lungenmastzellen und auf der humanen Mastzelllinie LAD-2 nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob humane Mastzellen durch thrombozytäre Chemokine generell aktivierbar sind. Fast alle bisher bekannten Chemokinrezeptoren induzieren über G_i -Proteine einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration¹⁰⁰, welche ihrerseits an der Vermittlung einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt ist. Bei Lungenmastzellen wurde weder nach Stimulation mit NAP-2, CTAP-III oder PBP noch nach Gabe von PF-4 ein Anstieg der cytosolischen Kalziumkonzentration beobachtet (Abbildung 8). Bei LAD-2-Zellen hingegen induzierten die Chemokine NAP-2 und CTAP-III ein schwaches Kalziumsignal, welches nach Gabe von PBP nicht auftrat. Interessanterweise induzierte PF-4 in diesen Zellen ein starkes und langanhaltendes Signal. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen zur Rezeptorexpression, bei denen die korrespondierenden Rezeptoren für die Chemokine CXCR1-3 auf LAD-2-Zellen nicht jedoch auf Lungenmastzellen nachgewiesen wurden (Abbildung 5 und 7). Während durch Stimulation der Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 ein Kalziumsignal bei humanen Mastzellen beobachtet wurde^{106,111,112}, konnte mit PF-4 bislang weder bei Neutrophilen, Monozyten, T-Zellen^{70,108,109} noch bei Endothelzellen⁶⁷ ein Kalziumsignal induziert werden. LAD-2-Zellen stellen somit die erste bekannte Zellpopulation dar, welche auf eine PF-4 Stimulation mit einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration reagiert. Obwohl eine funktionelle Bindung von PF-4 an den typischen Chemokinrezeptor CXCR3B auf Endothelzellen festgestellt wurde, induziert PF-4 in diesen Zellen kein Kalziumsignal. Interessanterweise konnte jedoch eine gesteigerte Produktion von zyklischem AMP (Adenosin-Monophosphat) ermittelt werden, was für eine Kopplung des Rezeptors an Gs-Proteine spricht 67,113.

Um zu überprüfen, ob das PF-4 induzierte Signal in LAD-2-Zellen über den CXCR3 vermittelt wird bzw. Einfluss auf das $Fc_{\epsilon}RI$ induzierte Signal hat, wurden die Zellen sequentiell mit PF-4, anti-IgE und dem CXCR3 Liganden I-TAC stimuliert.

Dabei zeigte sich, dass sowohl das Fc_eRI als auch I-TAC einen hemmenden Einfluss auf das PF-4 Signal haben. Umgekehrt vermittelte PF-4 jedoch nur einen geringen Effekt auf das Fc_eRI oder ITAC induzierte Signal. Diesem Phänomen können mehrere Mechanismen zu Grunde liegen. Zum einen könnten durch Stimulation mit I-TAC und anti-IgE Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle induziert werden, welche eine direkte Hemmung des PF-4 Signals bewirken. Umgekehrt aktiviert jedoch PF-4 keinen entsprechenden I-TAC oder Fc_eRI inhibierenden Weg. Eine andere Erklärung wäre die Desensitivierung der Zellen durch Liganden, die zumindest teilweise identische Rezeptoren okkupieren. Wie von Lasagni *et al.*⁶⁷ gezeigt wurde, bindet I-TAC an beide Spleißvarianten des CXCR3, während PF-4 nur von der Variante CXCR3B erkannt wird. Konsequenterweise hätte eine Aktivierung der Zellen mit I-TAC die Desensitivierung beider Varianten zur Folge, welche eine Hemmung sowohl eines nachfolgenden I-TAC wie auch PF-4 Signals bewirken würde. Umgekehrt ständen nach PF-4 Stimulation einem nachfolgenden I-TAC Signal immer noch CXCR3A-

Rezeptoren zur Vermittlung eines Signals zur Verfügung. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch der an Endothelzellen erhobene Befund, dass CXCR3B an G_s-Proteine gekoppelt ist und somit, zumindest in diesen Zellen, keine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels bewirken kann⁶⁷.

Zur genaueren Untersuchung der PF-4-vermittelten intrazellulären Signalwege und um Hinweise auf mögliche zelluläre Funktionen des Chemokins zu erhalten, wurden LAD-2-Zellen mit Inhibitoren gegen verschiedene Signalproteine vorinkubiert. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich zum einen um Pertussis-Toxin, welches G_i-Proteine hemmt und in murinen Mastzellen die IL-4- vermittelte Proliferation unterdrückt⁹³. Zum anderen wurde das Aminosteroid U73122 verwendet, welches das Enzym Phospholipase C hemmt. Dieses Enzym spielt bei der $Fc_{\epsilon}RI$ vermittelten Degranulation von Mastzellen eine wichtige Rolle⁹⁴. Darüber hinaus wurde Manumycin verwendet, welches die Ras-Farnesyl-Transferase hemmt und somit die Aktivierung der monomeren GTPase Ras verhindert. Ras stellt ein zentrales Signal-Protein dar und ist unter anderem in der Signalweiterleitung zur Produktion von Zytokinen involviert⁹⁴.

Sowohl die Vorbehandlung der LAD-2-Zellen mit dem PLC-Inhibitor U73122 als auch dem Ras-Inhibitor Manumycin zeigten eine vollständige Hemmung des PF-4-induzierten Kalziumsignals. Die Behandlung der Zellen mit Pertussis-Toxin hingegen blockierte nur die erste schnelle Phase des Anstiegs, während die zweite langanhaltende Phase erhalten blieb. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass PF-4 sowohl an der Induktion einer Mastzelldegranulation als auch an der Produktion von Zytokinen beteiligt sein könnte. Die partielle Inhibition des Signals durch Perussis-Toxin lässt vermuten, dass sowohl ein G_i-Protein abhängiger als auch ein G_i-Protein unabhängiger, langsamer Mechanismus am PF-4 vermittelten Kalziumsignal beteiligt sind. Ein ähnliches Phänomen konnte von Melendez *et al.*¹¹⁴ beim Fc_eRI vermittelten Kalziumsignal bei Mastzellen beobachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass durch Aktivierung der Phospholipase C ein langsamer Anstieg der cytosolischen Kalziumkonzentration induziert wird, während durch Aktivierung der Sphingosin-Kinase 1 ein schnelles und transientes Kalziumsignal induziert wird.

Die Beobachtung, dass G-Proteine zumindest teilweise in der PF-4 induzierten Signalweiterleitung in LAD-2-Zellen involviert sind, ist ein weiteres Indiz für die Bindung von PF-4 an CXCR3B, da dieser Rezeptor der einzig bekannte PF-4 bindende Chemokinrezeptor ist⁶⁷ und Chemokinrezeptoren als G-Protein-gekoppelt beschrieben sind ¹⁰⁰ Die Expression von Bindungsstellen für NAP-2 auf LAD-2-Zellen und für PF-4 sowohl auf Haut- und Lungenmastzellen als auch auf LAD-2-Zellen legten nahe, dass thrombozytäre Chemokine in der Lage sind, Mastzellen funktionell zu aktivieren.

Zunächst wurde untersucht, ob die Chemokine direkt eine Degranulation in den verschiedenen Mastzellpopulationen induzieren. Eine Reihe von Autoren beschreiben degranulationsauslösende Effekte von Chemokinen bei Mäuse- und Rattenmastzellen. So konnte gezeigt werden, dass MIP-1 alpha eine Histamin-Freisetzung bei murinen peritonealen und kutanen Mastzellen auslöst^{115,116}, während MCP-1 eine Degranulation bei murinen Hautund Lungenmastzellen induziert^{115,117}. Besonders interessant erscheint der Befund, dass das carboxyl-terminale Fragment (58-70 AS) von PF-4 eine Histamin-Freisetzung bei peritonealen Rattenmastzellen auslöst¹¹⁰. Bei humanen Mastzellen konnte bisher nur für RANTES die Induktion einer Degranulation in Zellen der Linie HMC-1 nachgewiesen werden¹¹⁸, während Stimulationen von Lungenmastzellen mit NAP-2¹¹⁹ und Hautmastzellen mit PF-4, MCP-1, RANTES und MIP-1 alpha¹²⁰ keine solche Funktion vermitteln.

Meine Untersuchungen bestätigen, dass NAP-2 weder auf Primärzellen noch auf LAD-2-Zellen eine degranulierende Wirkung besitzt. Auch die Chemokine CTAP-III und PBP induzieren keine Degranulation in diesen Zellen. Während dies auch für PF-4 auf Hautmastzellen gilt, konnte erstmals sowohl bei humanen Lungenmastzellen als auch bei LAD-2-Zellen eine schwache Induktion einer Degranulation durch PF-4 nachgewiesen werden.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen dem verhältnismäßig starken Kalziumsignal und der schwachen Degranulationsantwort, lag die Vermutung nahe, dass zur vollständigen biologischen Antwort neben PF-4 die Gegenwart eines Kostimulus nötig ist. Da das proinflammatorische Zytokin TNF von aktivierten Mastzellen sowohl bei der Degranulation als auch im weiteren Verlauf einer allergischen Reaktion sezerniert wird⁵, wäre eine autokrine Wirkung zusammen mit thrombozytären Chemokinen denkbar. Des Weiteren ist bekannt, dass TNF eine vergleichbare Funktion bei Neutrophilen besitzt⁷⁰. In diesen Zellen bewirkt sowohl eine Vor- als auch Kostimulation mit TNF eine synergistische Steigerung der PF-4 induzierten Degranulationsantwort. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass weder Vor- noch Kostimulation mit TNF allein noch in Kombination mit thrombozytären Chemokinen eine Degranulation in Mastzellen induziert. Diese Beobachtung schließt jedoch nicht aus, dass ein anderer Kostimulus zu einer synergistischen Degranulationsantwort führen könnte.

In einer Reihe von Untersuchungen wurde bereits die immunmodulatorischen Eigenschaften von Zytokinen und Chemokinen auf die Fc_gRI induzierte Degranulation von Basophilen und Mastzellen beschrieben. So wurde gezeigt, dass eine Vorinkubation mit SCF eine verstärkte Degranulation bei humanen Hautmastzellen¹²⁰ anti-IgE induzierte und in Lungenfragmenten¹²¹ zur Folge hat. Durch Kostimulation mit den Chemokinen RANTES bezeihungsweise MIP-1 alpha und FceRI konnten ebenfalls synergistische Effekte bei werden¹²². Knochenmarksmastzellen festgestellt Auch bei murinen murinen Bindegewebsmastzellen und Mäuse- beziehungsweise Rattenmastzellen^{123,124} zeigte sich MIP-1 alpha als wichtiger Kostimulus für die optimale Fc_eRI induzierte Degranulation. Inhibitorische Effekte von Chemokinen konnten ebenfalls nachgewiesen werden, so inhibieren IL-8 und RANTES in geringen Konzentrationen die MCP-1 induzierte Degranulation bei Basophilen¹²⁵, jedoch nicht die anti-IgE induzierte Degranulation^{126,127}. Von thrombozytären Chemokinen ist bislang bekannt, dass NAP-2, CTAP-III¹²⁶ und PF-4¹²⁸

Von thrombozytaren Chemokinen ist bislang bekannt, dass NAP-2, CTAP-III – und PP-4 eine Degranulationsantwort bei Basophilen hervorrufen. Immunmodulatorische Eigenschaften dieser Chemokine wurden bislang weder bei Mastzellen noch bei Basophilen untersucht. Da modulierende Effekte von Chemokinen im Allgemeinen auf Mastzellen bereits beobachtet wurden¹²²⁻¹²⁷, wurde geprüft, ob auch thrombozytäre Chemokine die Fc_eRI induzierte Degranulation bei humanen Mastzellen beeinflussen können. Wie hier gezeigt, hatte jedoch weder die gleichzeitige Applikation noch die Vorstimulation einen modulierenden Effekt auf Haut- und Lungenmastzellen oder LAD-2-Zellen. Interessanterweise ist bisher in der Literatur eine biologische Wirkung auf Mastzellen nur für Mitglieder des CC-Zweiges der Chemokinfamilie (MCP-1: CCL2, MIP-1 alpha: CCL3 und RANTES: CCL5) nachgewiesen worden. Diese Präferenz lässt sich zumindest teilweise auch auf Basophile übertragen, bei denen eine Degranulation durch CC-Chemokine^{127,129,130} in gegenüber CXC-Vertretern etwa 1000fach niedrigeren Konzentrationen beobachtet wurde^{126,128}.

Eine besondere Rolle in der Mastzellaktivierung kommt dabei den Chemokinen MCP-1, MIP-1 alpha und MIP-1 beta zu. Diese verstärken nicht nur die Fc_eRI induzierte Degranulation, sondern werden darüber hinaus von aktivierten Mastzellen selbst sezerniert ^{31,131}. Nach publizierten Daten setzen Mastzellen nach einer Virus- oder Bakterieninfektion erhöhte Mengen MIP-1 beta frei^{149,150}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Zytokin Endothelin und der Nerven-Wachstumfaktor NGF (*nerve-growth-factor*), welche beide interessanterweise auch selbst von Mastzellen produziert werden, eine Produktion von MIP-1 alpha oder MIP-1 beta induzieren^{151,152}. Aufgrund der geringen Distanz zwischen den Mastzellen im Gewebe könnten diese Chemokine damit autokrin oder parakrin Mastzellen aktivieren und so die Auswirkungen einer allergischen Sofortreaktion verstärken. Thrombozytäre CXC-Chemokine hingegen kommen erst deutlich später mit Mastzellen in Kontakt^{46,47}. Aufgrund dieser Überlegung stellte sich mir die Frage, ob die thrombozytären CXC-Chemokine in Kombination mit Mediatoren aus Zellen, welche ebenfalls verzögert im Gewebe erscheinen, eine β -Hexosaminidase-Freisetzung in Mastzellen induzieren könnten.

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei chronischen allergischen Erkrankungen ist die verstärkte Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden in allergenaktivierten Geweben^{132,133}. Antimikrobielle Peptide wie LL-37 oder HNPs werden neben anderen Zelltypen wie Keratinozyten¹³⁴ und Epithelzellen^{135,136} hauptsächlich von Neutrophilen sezerniert^{136,137}, welche im Zuge einer allergischen Reaktion in das betroffene Gewebe einwandern^{40,41}. Des Weiteren konnten degranulierende Effekte sowohl von LL-37 als auch HNPs auf Rattenmastzellen nachgewiesen werden¹³⁸⁻¹⁴⁰. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse lag die Vermutung nahe, dass LL-37 beziehungsweise HNPs in Kombination mit thrombozytären Chemokinen eine Rolle bei der Degranulation von Mastzellen spielen könnten.

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine direkte Aktivierung humaner Mastzellen durch antimikrobielle Peptide nachgewiesen werden. Dabei bewirkte sowohl die Stimulation mit LL-37 als auch mit HNPs eine β -Hexosaminidase – Freisetzung in diesen Zellen. Während Primärzellen nur eine schwache Reaktivität gegenüber LL-37 zeigten, wiesen LAD-2-Zellen eine deutlich stärkere Aktivierbarkeit auf. Durch Stimulation mit HNPs reagierten Hautmastzellen nur mit einer relativ schwachen β -Hexosaminidase – Freisetzung, während diese bei Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen sehr viel deutlicher ausfiel (Abbildung 17).

Die Kostimulation von humanen Mastzellen mit einer suboptimalen Konzentration LL-37 beziehungsweise HNPs und den thrombozytären Chemokinen NAP-2, CTAP-III und PBP bewirkte bei keiner der untersuchten Mastzellpopulationen eine kooperative Steigerung der Degranulation. Während bei Primärzellen PF-4 ebenfalls keine Steigerung vermittelte, konnte bei LAD-2-Zellen eine synergistische Wirkung zwischen PF-4 und antimikrobiellen Peptiden beobachtet werden.

Diese Resultate sprechen dafür, dass antimikrobielle Peptide sowohl allein als auch in Kombination mit PF-4 die Auswirkungen einer allergischen Reaktion verstärken könnten. Aufgrund der Beobachtungen, dass NAP-2, CTAP-III und PF-4 nur in höheren Konzentrationen eine Degranulation bei Basophilen auslöst, wäre es interessant zu untersuchen, ob eine Kombination aus thrombozytären Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden eine ähnliche synergistische Wirkung auf Basophile besitzt. Es ist bekannt, dass Chemokine verschiedene Wirkungen auf ein und dieselben Mastzellpopulation besitzen können. So induziert beispielsweise SDF-1 (Stromal-derivedfactor-1) bei humanen Nabelschnur-Mastzellen sowohl eine gerichtete Migration als auch die Produktion von Interleukin(IL)-8¹⁴¹. Es stellte sich daher die Frage, ob PF-4 neben einer Degranulation auch die Produktion und Sekretion von Zytokinen in Mastzellen induzieren kann. Eine Reihe von Zytokinen/Chemokinen wurden bereits als Induktoren einer von der Degranulation unabhängigen Sekretion von Zytokinen identifiziert. Neben der IL-8 induzierenden Wirkung von SDF-1^{141,142} wurden IL-1 und Eotaxin-1 als Stimuli der Sekretion von IL-6 beziehungsweise IL-13 ermittelt^{143,144}. Darüber hinaus beschreiben eine Reihe Publikationen die Zytokinsekretion Mastzellen nach Induktion einer von Degranulationsantwort. Wie bereits oben erwähnt, setzen Mastzellen TNF nach Aktivierung der Fc_FRI frei⁵. Des Weiteren wurde die Produktion und Sekretion von IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11^{34,145,146} und des Wachstumsfaktors GM-CSF¹⁴⁷ nach einer Mastzelldegranulation beobachtet.

Im Rahmen eines Einzelexperiments wurden Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen mit anti-IgE oder PF-4 stimuliert und der Überstand nach 24h auf die Anwesenheit verschiedener Zytokine überprüft. Dabei konnte bei Lungenmastzellen durch Stimulation mit PF-4 oder anti-IgE ein leichter Anstieg der MIP-1 alpha und MIP-1 beta Sekretion beobachtet werden, während bei LAD-2-Zellen eine schwache Sekretion durch anti-IgE und eine sehr starke Sekretion dieser beiden Chemokine durch Stimulation mit PF-4 induziert wurde.

Die nachfolgend durchgeführten Zeitkinetiken der MIP-1 alpha und MIP-1 beta Freisetzung nach Stimulation mit anti-IgE oder PF-4 ergaben, dass bei LAD-2-Zellen nur nach einer PF-4 Stimulation MIP-1 alpha/beta freigesetzt wurde, während dies bei Lungenmastzellen nur nach einer Stimulation mit anti-IgE der Fall war. Während die Sekretion von MIP-1 alpha in Lungenmastzellen nach Aktivierung des Fc_eRI bereits bekannt war^{32,148}, konnte hier erstmals eine damit einhergehende Freisetzung von MIP-1 beta gezeigt werden. Unerwarteterweise führte die Aktivierung dieses Rezeptors auf LAD-2-Zellen zu keiner vergleichbaren Freisetzung der Chemokine. Entgegen den Befunden bei Lungenmastzellen reagierten LAD-2-Zellen jedoch auf PF-4 sowohl mit einer schwachen Degranulation als auch mit einer zeitabhängigen Sekretion von MIP-1 alpha und MIP-1 beta, welche im Falle von MIP-1 alpha bis 48h und MIP-1 beta bis 16h nach Stimulation noch ansteigt (Abbildung 19). Während die zwischen Zelllinie und Primärzellen beobachtete Diskrepanz der Ergebnisse hinsichtlich der PF-4-vermittelten Effekte möglicherweise auf einen Unterschied in der Rezeptorausstattung zurückzuführen ist (siehe nachfolgenden Abschnitt), sind die unterschiedlichen Befunde

bezüglich der Fc_eRI-abhängigen Aktivierung beider Zellpopulationen nur schwer interpretierbar. Eine mögliche Erklärung wären Unterschiede zwischen Linie und Primärzelle in der Expression bestimmter Signalelemente oder Transkriptionsfaktoren, die die Signalweiterleitung und die Proteinsynthese beeinflussen könnten. Neben dem erstmaligen Nachweis der durch ein thrombozytäres Chemokin induzierten Sekretion von MIP-1 alpha und MIP-1 beta in humanen Mastzellen zeigen diese Ergebnisse beispielhaft, dass an Zelllinien erhobene Befunde letztendlich immer an der korrespondieren Primärisolaten überprüft werden müssen.

Um die physiologische Relevanz der Sekretion von MIP-1 alpha/beta oder anderen zellaktivierenden Molekülen aus Mastzellen nach PF-4 Stimulation näher zu untersuchen, wurde der Effekt von Überständen PF-4-aktivierter LAD-2-Zellen auf andere Zellpopulationen hin untersucht.

Da MIP-1 alpha/beta ein Kalziumsignal in humanen Monozyten induziert^{153,154}, sollten die gewonnenen Überstände ebenfalls diese Funktion vermitteln. In der Tat induzierten die zellfreien Überstände PF-4 stimulierter LAD-2-Zellen in Monozyten, nicht jedoch in Lymphozyten einen transienten Anstieg des cytoplasmatischen Kalziumspiegels, während unstimulierte LAD-2-Zellen oder PF-4 selbst keinen vergleichbaren Effekt vermittelten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen nach Aktivierung durch PF-4 Mediatoren sezernieren, welche Monozyten aktivieren. Damit könnte PF-4 indirekt, über die Aktivierung von Mastzellen, an der Aktivierung von Monozyten beteiligt sein.

Ob es sich bei dem aus LAD-2-Zellen stammenden Monozyten aktivierenden Faktor tatsächlich um MIP-1 alpha oder MIP-1 beta handelt, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die schnelle Induktion des Kalziumsignals spricht jedoch für ein Chemokin oder einen vergleichbaren chemotaktischen Faktor. Aus physiologischer Sicht ist es denkbar, dass neben der Fc_eRI induzierten Stimulation auch die PF-4 induzierte Stimulation von Mastzellen zur Migration verschiedener Zellpopulationen in der allergischen Spätreaktion beitragen könnte, da eine chemotaktische Wirkung von MIP-1 alpha/beta auf Monozyten und MIP-1 alpha auf Mastzellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Basophilen bekannt ist¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. Andererseits könnte das freigesetzte MIP-1 alpha andere Mastzellen im Gewebe direkt aktivieren beziehungsweise bei der Fc_eRI induzierten Degranulation als Kostimulus dienen und so die allergische Reaktion fördern. Weiterhin ist bekannt, dass MIP-1 alpha die IL-4 induzierte IgE Produktion von B-Zellen steigert¹⁶⁰. Obwohl PF-4 selbst keine modulatorischen Effekte bei der Fc_eRI induzierten Degranulation aufweist, könnte es auf

diese Weise indirekt die zelluläre Antwort von Mastzellen und anderen Immunzellen in einer allergischen Reaktion erhöhen.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die thrombozytären Chemokine NAP-2, CTAP-III und PBP weder eine direkte Degranulationsantwort bei humanen Mastzellen induzieren können noch einen modulatorischen Effekt auf die durch $Fc_{\epsilon}RI$ oder durch antimikrobielle Peptide induzierte Degranulation haben. Die Stimulation von humanen Mastzellen mit PF-4 jedoch zeigte eine schwache Degranulationsantwort bei Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen sowie einen synergistischen Effekt in Kombination mit antimikrobiellen Peptiden und die Induktion zur Sekretion von MIP-1 alpha/beta bei LAD-2-Zellen.

Ein Grund für die unterschiedliche Reaktivität von Primärzellen und Zellen der Linie LAD-2 gegenüber PF-4 könnte die unterschiedliche Ausstattung an Rezeptoren sein. Wie bereits oben erwähnt sind zur Zeit zwei funktionell aktivierbare PF-4 Rezeptoren bekannt, zum einen das Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan und zum anderen CXCR3B. Da eine Expression für Gesamt-CXCR3 bereits auf LAD-2-Zellen beobachtet wurde (siehe Abschnitt: 3.2.2.2), wurde geprüft, ob Lungenmastzellen oder LAD-2-Zellen mRNA für CXCR3A oder CXCR3B exprimieren. Weiterhin wurde untersucht, ob eine anti-IgE oder PF-4 Stimulation die Expression modulieren kann.

Überraschenderweise stellte sich heraus, dass unstimulierte Lungenmastzellen weder mRNA für CXCR3A noch für CXCR3B exprimieren, während LAD-2-Zellen konstitutiv CXCR3B exprimieren, nicht jedoch CXCR3A. Interessanterweise induzierte eine anti-IgE Stimulation von Lungenmastzellen die mRNA Expression für CXCR3A schwach und für CXCR3B stark, während die Behandlung von LAD-2-Zellen mit diesem Stimulus keinen Einfluss auf die Expression hatte. Darüberhinaus bewirkte die Stimulation von LAD-2-Zellen mit PF-4 einen deutlichen Rückgang der Expression von CXCR3B. Diese Daten sprechen dafür, dass die PF-4 induzierte Aktivierung von LAD-2-Zellen über CXCR3B vermittelt werden könnte.

Zur Expression von Rezeptormolekülen nach einer $Fc_{\epsilon}RI$ induzierten Degranulation bei humanen Mastzellen ist bislang wenig bekannt. Es konnte jedoch eine Aufregulation der mRNA Expression für CCR1, CCR2, CCR3 und CCR5 nach IgE-Stimulation bei murinen Mastzellen beobachtet werden¹³¹.

Eine Reihe von Untersuchen haben gezeigt, dass die Rezeptorexpression von Mastzellen von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, wie zum Beispiel dem Alter der Zellen¹⁶¹, dem Herkunftsgewebe¹⁶² und den verwendeten Kulturmedien¹⁰⁰. Da sich Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen sowohl hinsichtlich ihres Ursprungs als auch ihrer Kulturbedingungen

unterscheiden, könnte dies eine Erklärung für die unterschiedliche Rezeptorexpression der beiden Zellpopulationen sein.

Interessant ist, dass sich das Rezeptorexpressionsprofil von Mastzellen durch eine Degranulation innerhalb weniger Stunden ändert. So konnte durch eine Fc_eRI Stimulation nicht nur die Aufregulation der mRNA Expression beobachtet werden¹³¹, sondern auch eine Translokation von Chemokinrezeptoren aus Membranen sekretorischer Granula auf die Zellmembran¹⁴³. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, ob Lungenmastzellen CXCR3B intrazellulär exprimieren und ob nach einer Degranulation diese Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert werden oder ob eine Degranulation ausschließlich als Induktor zur de novo-Synthese des Rezeptors dient. Obwohl, wie in Abbildung 22 dargestellt, unstimulierte Lungenmastzellen keine mRNA für CXCR3B exprimieren, wäre es denkbar, dass diese Zellen mRNA für den Rezeptor erst nach einer geeigneter Aktivierung exprimieren. Sollte sich herausstellen, dass eine Degranulation die Voraussetzung zur Expression des CXCR3B auf der Oberfläche von Primärzellen darstellt, wäre zu vermuten, dass PF-4 bei diesen Zellen ähnliche Reaktionen hervorruft wie bei LAD-2-Zellen. Um zu überprüfen, ob CXCR3B tatsächlich den vermittelnden Rezeptor für PF-4 darstellt, wäre eine Behandlung der Zellen mit einer korrespondierenden Si-RNA denkbar. Durch Blockierung des CXCRB-Transkripts wird der potentielle Rezeptor nicht mehr exprimiert und stände für eine Aktivierung durch PF-4 nicht mehr zur Verfügung. Um festzustellen, ob Proteoglykane als Rezeptoren für PF-4 auf Mastzellen fungieren, wäre eine Vorbehandlung der Zellen mit entsprechenden Glykanasen wie Chondroitinasen oder Heparinasen notwendig.

Die Bindung von Liganden an CXCR3B wurde bislang ausschließlich mit der Vermittlung von inhibitorischen Zellreaktionen in Zusammenhang gebracht. So hemmen die Chemokine MIG, IP-10, I-TAC und PF-4 die Chemotaxis und Proliferation von Endothelzellen¹⁶³⁻¹⁶⁵ und die Hämatopoese¹⁶⁶. Mit Ausnahme von PF-4, welches nur an CXCR3B bindet, vermitteln diese Chemokine über Bindung an CXCR3A ausschließlich aktivierende Effekte. Beispiele hierfür sind die Induktion einer Chemotaxis in T-Zellen^{167,168}, NK-Zellen¹⁶⁹, Makrophagen¹⁷⁰ und dendritischen Zellen¹⁷¹ oder einen Anstieg der Proliferation in Mesangialzellen^{172,173}. Sollte sich herausstellen, dass die in dieser Arbeit gezeigten Effekte von PF-4 über CXCR3B vermittelt werden, so würden humane Mastzellen die erste bekannte Zellpopulation darstellen, welche durch Bindung von PF-4 mit einem Kalziumsignal reagieren und aktivierende Effekte über CXCR3B vermitteln.

Um die physiologische Relevanz PF-4 stimulierter Mastzellen zu klären, erscheinen verschiedene weitere Versuchsansätze sinnvoll. Da die chemotaktische Wirkung der

Chemokine MIP-1 alpha und MIP-1 beta auf diverse Zellpopulationen bereits beschrieben wurde¹⁵⁵⁻¹⁵⁹, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Überstände PF-4 stimulierter Mastzellen eine gerichtete Migration bei diesen Zellpopulationen auslöst. Des Weiteren könnte die bei Mäusemastzellen beobachtete modulatorische Eigenschaft von MIP-1 alpha bei der $Fc_{\epsilon}RI$ induzierten Degranulation¹²²⁻¹²⁴ auch bei humanen Mastzellen zum Tragen kommen. Obwohl die Sekretion verschiedener Zytokine nach einer PF-4 Stimulation in dieser Arbeit untersucht wurde, ist es wahrscheinlich, dass weitere Mediatoren sezerniert werden, welche andere Zellpopulationen im betroffenen Gewebe beeinflussen. Zur Identifikation der verantwortlichen Mediatoren wäre die Verwendung blockierender Antikörper denkbar. So könnte zum Beispiel durch Blockierung von CCR1 und CCR5 ermittelt werden, ob MIP-1 alpha/beta für die Aktivierung von Monozyten verantwortlich ist.

Während nach den Ergebnissen dieser Arbeit unter den thrombozytären Chemokinen die Varianten des beta-Thromboglobulin Antigens (PBP, CTAP-III und NAP-2) in der Aktivierung und Regulation von Mastzellen eine eher untergeordnete Rolle spielen, stellt sich die Wirkung von PF-4 auf diese Zellen als komplex dar und erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Neben der direkten Aktivierung der Zellen in Form einer moderaten Degranulation und der Sekretion von Chemokinen erscheint vor allem das kooperative Zusammenspiel von PF-4 mit antimikrobiellen Peptiden von Bedeutung. Darüber hinaus haben Produkte PF-4aktivierter Mastzellen wiederum die Kapazität, weitere Immunzellen wie beispielsweise Monozyten zu aktivieren. Die vorliegenden Ergebnisse weisen damit nicht nur auf eine wichtige Rolle des Chemokins PF-4 in der Aktivierung von Mastzellen hin, sondern geben darüber hinaus einen ersten Einblick in die Komplexität der wechselseitigen Regulation von Thrombozyten, Mastzellen, Granulozyten und Monozyten in der allergischen Spätreaktion.

5. Zusammenfassung

Im Zuge einer allergischen Entzündung kommt es im Rahmen der Sofortreaktion zu einer akuten Mastzellaktivierung und zur Aggregation von Thrombozyten. Durch die Freisetzung von Mediatoren findet in der nachfolgenden Spätreaktion eine verzögerte Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten in das betroffene Gewebe statt. Bisher war jedoch weitgehend unklar, welche Mediatoren diese Reaktion vermitteln und welche Rolle thrombozytäre Produkte bei diesen zellulären Interaktionen spielen. Zentraler Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung und Wirkungsweise thrombozytärer Chemokine auf humane Mastzellen, der kooperativen Effekte dieser Chemokine mit antimikrobiellen Peptiden aus Neutrophilen und der Aktivierung von Monozyten durch chemokinaktivierte Mastzellen.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurde mittels Kombination von Dichtegradientenzentrifugation und Magnetseparation eine geeignete Methode zur Isolierung von Mastzellen aus humanem Lungengewebe etabliert. Die so präparierten Mastzellen wiesen eine Reinheit von über 90% auf und wurden nachfolgend im Vergleich mit Zellen der Mastzelllinie LAD-2 hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer zellulären Funktionen untersucht.

Während sich Bindungstellen für das Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF-4, CXCL4) sowohl auf nativen Mastzellen der Haut und Lunge als auch auf Zellen der Linie LAD-2 nachweisen ließen, fanden sich überraschenderweise die Chemokinrezeptoren CXCR3 (Liganden: I-TAC, Mig, IP-10), CXCR1 und CXCR2 (Liganden: IL-8, NAP-2) nur auf LAD-2 Zellen. Die letzteren Befunde wurden durch funktionelle Untersuchung bestätigt. Während die Stimulation von LAD-2 Zellen mit NAP-2 zumindest einen geringen transienten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration vermittelte, war ein solcher Effekt in den Primärzellen nicht nachweisbar. Da jedoch weder NAP-2 noch andere Varianten des beta-Thromboglobulins in Mastzellen eine Degranulation induzieren noch eine über den IgE-Rezeptor-vermittelten Exozytose modulieren konnten, erscheint ihre Bedeutung für die Mastzellaktivierung eher zweitrangig.

Im Gegensatz zu den Varianten des beta-Thromboglobulins induzierte PF-4 ein starkes, langanhaltendes Kalziumsignal in LAD-2-Zellen. Damit stellen LAD-2-Zellen die erste bekannte Zellpopulation dar, in der PF-4 ein Kalziumsignal induziert. Interessanterweise ließ sich das PF-4 Signal bei diesen Zellen durch Vorinkubation mit dem CXCR3 Liganden I-TAC hemmen, was auf die Beteiligung dieses Rezeptors hindeutet. Es sind auf humanen Zellen zwei alternative Spleißvarianten des Chemokinrezeptors CXCR3 bekannt. CXCR3A bindet mit hoher Affinität I-TAC, IP-10 und Mig, während CXCR3B diese Chemokine nur mit moderater Affinität, PF-4 jedoch hochaffin bindet. Überraschenderweise zeigte ein Vergleich der mRNA-Expression von Zelllinie und Primärzellen, dass LAD-2-Zellen CXCR3B konstitutiv exprimieren, während in Lungenmastzellen dieser Rezeptor durch einen geeigneten Stimulus induziert werden muss. CXCR3B erscheint damit als relevanter Rezeptor für PF-4-vermittelte Funktionen auf humanen Mastzellen. Die Untersuchung der an diesen Funktionen beteiligten Signaltransduktionsmechanismen weist auf eine zentrale Bedeutung von heterotrimeren G-Proteinen, der Phospholipase C und der monomeren GTPase Ras hin. Signaltransduktion G-Protein-assoziierte sieben-Transmembrandomainen-Die über Rezeptoren ist für Chemokine typisch und stellt damit ein weiteres Indiz für die PF-4-Aktivierung der LAD-2-Zellen über CXCR3B dar. Obwohl die Induktion eines Kalziumsignals und die Aktivierung der Phospholipase C für eine Degranulation von Mastzellen essentiell ist, wurde lediglich eine schwache Freisetzung von Mediatoren nach PF-4-Stimulation von Lungenmastzellen und LAD-2-Zellen beobachtet. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass PF-4 in synergistischer Weise eine durch antimikrobielle Peptide induzierte Degranulation zu erhöhen vermag. Dieser kooperative Effekt trat sowohl bei dem Kathelizidin LL-37 als auch bei den neutrophilen Defensinen (HNPs) auf und zeigte seine höchste Effizienz bei suboptimalen Konzentrationen der Peptide. Die biologische Wirkung von PF-4 ist jedoch nicht auf die Modulation der Degranulation beschränkt. So vermittelte PF-4 in LAD-2-Zellen die Induktion der beiden CC-Chemokine MIP-1 alpha und MIP-1 beta, welche in der Lage sind, neben einer Vielzahl von Entzündungszellen auch Mastzellen zu aktivieren. Überstände PF-4 stimulierter LAD-2-Zellen lösten ein Kalziumsignal in Monozyten, nicht jedoch in (unaktivierten) Lymphozyten aus.

Insgesamt zeigen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass das thrombozytäre Chemokin PF-4 humane Mastzellen *in vitro* auf direkte Weise aktivieren kann. Damit könnte dieses Chemokin einer derjenigen Faktoren sein über die Thrombozyten den Verlauf der allergischen Spätreaktion beeinflussen.

6. Literatur

- (1) Krishnaswamy G, Chi DS. Mast Cells: Methods and Protocols. Humana Press Inc.; 2006.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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.
- (8) Bischoff SC, Sellge G, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP. Stem cell factordependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. Int Arch Allergy Immunol. 1999;118:104-107.
- (9) Valent P. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. Exp Dermatol. 1995;4:255-259.
- (10) Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. Curr Opin Immunol. 1999;11:53-59.
- (11) Abraham SN, Thankavel K, Malaviya R. Mast cells as modulators of host defense in the lung. Front Biosci. 2, d78-d87. 15-2-1997.
- (12) Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. Exp Dermatol. 2001;10:1-10.
- (13) Pennock JL, Grencis RK. The mast cell and gut nematodes: damage and defence. Chem Immunol Allergy. 2006;90:128-140.

- (14) Abe T, Nawa Y. Localization of mucosal mast cells in W/Wv mice after reconstitution with bone marrow cells or cultured mast cells, and its relation to the protective capacity to Strongyloides ratti infection. Parasite Immunol. 1987;9:477-485.
- (15) Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. J Allergy Clin Immunol. 1999;104:517-523.
- (16) Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. Nat Rev Immunol. 2004;4:787-799.
- (17) Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Allergie und Hypersensibilität. Immunologie. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002:505-536.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) Church MK, Lowman MA, Rees PH, Benyon RC. Mast cells, neuropeptides and inflammation. Agents Actions. 1989;27:8-16.
- (21) Kuther K, Audige L, Kube P, Welle M. Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. Cell Tissue Res. 1998;293:111-119.
- (22) Craig SS, Schwartz LB. Tryptase and chymase, markers of distinct types of human mast cells. Immunol Res. 1989;8:130-148.
- (23) Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. Lab Invest. 1989;60:147-157.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol. 2000;18:217-242.
- (28) Goostrey A, Jones G, Secombes CJ. Isolation and characterization of CXC receptor genes in a range of elasmobranchs. Dev Comp Immunol. 2005;29:229-242.

- (29) Burns JM, Summers BC, Wang Y et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med. 2006.
- (30) Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. Methods Mol Biol. 2006;315:13-34.
- (31) Yano K, Yamaguchi M, de Mora F et al. Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. Lab Invest. 1997;77:185-193.
- (32) Selvan RS, Butterfield JH, Krangel MS. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. J Biol Chem. 1994;269:13893-13898.
- (33) Krishnaswamy G, Hall K, Youngberg G et al. Regulation of eosinophil-active cytokine production from human cord blood-derived mast cells. J Interferon Cytokine Res. 2002;22:379-388.
- (34) Krishnaswamy G, Lakshman T, Miller AR et al. Multifunctional cytokine expression by human mast cells: regulation by T cell membrane contact and glucocorticoids. J Interferon Cytokine Res. 1997;17:167-176.
- (35) Hultner L, Kolsch S, Stassen M et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. J Immunol. 2000;164:5556-5563.
- (36) Grutzkau A, Kruger-Krasagakes S, Kogel H et al. Detection of intracellular interleukin-8 in human mast cells: flow cytometry as a guide for immunoelectron microscopy. J Histochem Cytochem. 1997;45:935-945.
- (37) Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. J Pathol. 2000;190:100-106.
- (38) Baghestanian M, Hofbauer R, Kiener HP et al. The c-kit ligand stem cell factor and anti-IgE promote expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human lung mast cells. Blood. 1997;90:4438-4449.
- (39) Greaves MW, Sabroe RA. ABC of allergies. Allergy and the skin. I--Urticaria. BMJ. 1998;316:1147-1150.
- (40) Koh YY, Dupuis R, Pollice M et al. Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B4. Am J Respir Cell Mol Biol. 1993;8:493-499.
- (41) Montefort S, Gratziou C, Goulding D et al. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. J Clin Invest. 1994;93:1411-1421.

- (42) Robinson D, Hamid Q, Bentley A et al. Activation of CD4+ T cells, increased TH2type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. J Allergy Clin Immunol. 1993;92:313-324.
- (43) de Monchy JG, Kauffman HF, Venge P et al. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. Am Rev Respir Dis. 1985;131:373-376.
- (44) Guo CB, Liu MC, Galli SJ et al. Identification of IgE-bearing cells in the late-phase response to antigen in the lung as basophils. Am J Respir Cell Mol Biol. 1994;10:384-390.
- (45) Calhoun WJ, Jarjour NN, Gleich GJ, Stevens CA, Busse WW. Increased airway inflammation with segmental versus aerosol antigen challenge. Am Rev Respir Dis. 1993;147:1465-1471.
- (46) Yasuba H, Chihara J, Kino T, Satake N, Oshima S. Increased releasability of platelet products and reduced heparin-induced platelet factor 4 release from endothelial cells in bronchial asthma. J Lipid Mediat. 1991;4:5-21.
- (47) Averill FJ, Hubbard WC, Proud D, Gleich GJ, Liu MC. Platelet activation in the lung after antigen challenge in a model of allergic asthma. Am Rev Respir Dis. 1992;145:571-576.
- (48) Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. Am Rev Respir Dis. 1989;140:1745-1753.
- (49) Metzger WJ, Sjoerdsma K, Richerson HB et al. Platelets in bronchoalveolar lavage from asthmatic patients and allergic rabbits with allergen-induced late phase responses. Agents Actions Suppl. 1987;21:151-159.
- (50) Sullivan PJ, Jafar ZH, Harbinson PL et al. Platelet dynamics following allergen challenge in allergic asthmatics. Respiration. 2000;67:514-517.
- (51) Yoshida A, Ohba M, Wu X et al. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. Br J Pharmacol. 2002;137:146-152.
- (52) Cines DB, van der KH, Levinson AI. In vitro binding of an IgE protein to human platelets. J Immunol. 1986;136:3433-3440.
- (53) Hasegawa S, Pawankar R, Suzuki K et al. Functional expression of the high affinity receptor for IgE (FcepsilonRI) in human platelets and its' intracellular expression in human megakaryocytes. Blood. 1999;93:2543-2551.
- (54) Joseph M, Capron A, Ameisen JC et al. The receptor for IgE on blood platelets. Eur J Immunol. 1986;16:306-312.
- (55) Joseph M, Gounni AS, Kusnierz JP et al. Expression and functions of the highaffinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. Eur J Immunol. 1997;27:2212-2218.

- (56) Cardot E, Pestel J, Callebaut I et al. Specific activation of platelets from patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus by synthetic peptides derived from the allergen Der p I. Int Arch Allergy Immunol. 1992;98:127-134.
- (57) Brandt E, Petersen F, Ludwig A et al. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. J Leukoc Biol. 2000;67:471-478.
- (58) McLaren KM, Pepper DS. The immunoelectronmicroscopic localization of human platelet factor 4 in tissue mast cells. Histochem J. 1983;15:795-800.
- (59) Iida N, Haisa M, Igarashi A, Pencev D, Grotendorst GR. Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides. FASEB J. 1996;10:1336-1345.
- (60) Holt JC, Rabellino EM, Gewirtz AM et al. Occurrence of platelet basic protein, a precursor of low affinity platelet factor 4 and beta-thromboglobulin, in human platelets and megakaryocytes. Exp Hematol. 1988;16:302-306.
- (61) Holt JC, Harris ME, Holt AM et al. Characterization of human platelet basic protein, a precursor form of low-affinity platelet factor 4 and beta-thromboglobulin. Biochemistry. 1986;25:1988-1996.
- (62) 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.
- (63) 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.
- (64) Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, Moser B. Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. J Biol Chem. 1991;266:23128-23134.
- (65) Yan Z, Zhang J, Holt JC et al. Structural requirements of platelet chemokines for neutrophil activation. Blood. 1994;84:2329-2339.
- (66) Petersen F, Bock L, Flad HD, Brandt E. A chondroitin sulfate proteoglycan on human neutrophils specifically binds platelet factor 4 and is involved in cell activation. J Immunol. 1998;161:4347-4355.
- (67) 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.
- (68) 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.

- (69) Brandt E, Ludwig A, Petersen F, Flad HD. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. Immunol Rev. 2000;177:204-216.
- (70) 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.
- (71) Schiemann F, Grimm TA, Hoch J et al. Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. Blood. 2006;107:2234-2242.
- (72) Car BD, Baggiolini M, Walz A. Formation of neutrophil-activating peptide 2 from platelet-derived connective-tissue-activating peptide III by different tissue proteinases. Biochem J. 1991;275 (Pt 3):581-584.
- (73) Cohen AB, Stevens MD, Miller EJ, Atkinson MA, Mullenbach G. Generation of the neutrophil-activating peptide-2 by cathepsin G and cathepsin G-treated human platelets. Am J Physiol. 1992;263:L249-L256.
- (74) He S, McEuen AR, Blewett SA et al. The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin: uptake by mast cells and interaction with tryptase, chymase and cathepsin G. Biochem Pharmacol. 2003;65:1007-1015.
- (75) 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.
- (76) Ganz T, Selsted ME, Szklarek D et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest. 1985;76:1427-1435.
- (77) Benyon RC, Lowman MA, Church MK. Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. J Immunol. 1987;138:861-867.
- (78) 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.
- (79) 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.
- (80) 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.
- (81) 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.
- (82) Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. Leuk Res. 1988;12:345-355.

- (83) 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.
- (84) Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear 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.
- (85) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150:76-85.
- (86) Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of betahexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. J Immunol. 1979;123:1445-1450.
- (87) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. 1985;260:3440-3450.
- (88) Schulman ES, MacGlashan DW, Jr., Peters SP et al. Human lung mast cells: purification and characterization. J Immunol. 1982;129:2662-2667.
- (89) Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Mast cells in human keloid, small intestine, and lung by an immunoperoxidase technique using a murine monoclonal antibody against tryptase. Am J Pathol. 1986;124:427-435.
- (90) Ishizaka T, Conrad DH, Schulman ES, Sterk AR, Ishizaka K. Biochemical analysis of initial triggering events of IgE-mediated histamine release from human lung mast cells. J Immunol. 1983;130:2357-2362.
- (91) Moser B, Schumacher C, von T, V, Clark-Lewis I, Baggiolini M. Neutrophilactivating 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.
- (92) Schumacher C, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89:10542-10546.
- (93) Jiang Y, Kanaoka Y, Feng C et al. Cutting edge: Interleukin 4-dependent mast cell proliferation requires autocrine/intracrine cysteinyl leukotriene-induced signaling. J Immunol. 2006;177:2755-2759.
- (94) Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. Nat Rev Immunol. 2006;6:218-230.
- (95) Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. Eur J Immunol. 2001;31:1066-1075.
- (96) Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6:167-180.

- (97) Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. Nat Rev Immunol. 2007;7:93-104.
- (98) Schiemann F. Interaktionen von Mastzellen und thrombozytären Chemokinen: Expression von Chemokinrezeptoren und Regulation der Chemokinaktivität durch proteolytische Prozessierung. 2005.
- (99) 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.
- (100) Juremalm M, Nilsson G. Chemokine receptor expression by mast cells. Chem Immunol Allergy. 2005;87:130-144.
- (101) 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.
- (102) Oehler L, Foedinger M, Koeller M et al. Interleukin-10 inhibits spontaneous colonyforming unit-granulocyte-macrophage growth from human peripheral blood mononuclear cells by suppression of endogenous granulocyte-macrophage colonystimulating factor release. Blood. 1997;89:1147-1153.
- (103) Saito H, Ebisawa M, Tachimoto H et al. Selective growth of human mast cells induced by Steel factor, IL-6, and prostaglandin E2 from cord blood mononuclear cells. J Immunol. 1996;157:343-350.
- (104) Piliponsky AM, Gleich GJ, Nagler A, Bar I, Levi-Schaffer F. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. Blood. 2003;101:1898-1904.
- (105) Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. J Immunol. 2000;164:43-48.
- (106) Lippert U, Artuc M, Grutzkau A et al. Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. J Immunol. 1998;161:2600-2608.
- (107) Fukiwake N, Moroi Y, Imafuku S et al. Anti-CXCR3 staining is useful for detecting human cutaneous and mucosal mast cells. J Dermatol. 2006;33:326-330.
- (108) 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.
- (109) Pervushina O, Scheuerer B, Reiling N et al. Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. J Immunol. 2004;173:2060-2067.

- (110) Suzuki R, Kimura T, Kitaichi K et al. Platelet factor 4 fragment induces histamine release from rat peritoneal mast cells. Peptides. 2002;23:1713-1717.
- (111) Nilsson G, Mikovits JA, Metcalfe DD, Taub DD. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. Blood. 1999;93:2791-2797.
- (112) 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.
- (113) Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:368-376.
- (114) Melendez AJ, Khaw AK. Dichotomy of Ca2+ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. J Biol Chem. 2002;277:17255-17262.
- (115) Alam R, Kumar D, Anderson-Walters D, Forsythe PA. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. J Immunol. 1994;152:1298-1303.
- (116) Alam R, Forsythe PA, Stafford S, Lett-Brown MA, Grant JA. Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. J Exp Med. 1992;176:781-786.
- (117) Campbell EM, Charo IF, Kunkel SL et al. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2-/- mice: the role of mast cells. J Immunol. 1999;163:2160-2167.
- (118) Zhao ZZ, Sugerman PB, Zhou XJ, Walsh LJ, Savage NW. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. Oral Dis. 2001;7:246-251.
- (119) Okayama Y, Brzezinska-Blaszczyk E, Kuna P, Kaplan AP, Church MK. Effects of PBMC-derived histamine-releasing factors on histamine release from human skin and lung mast cells. Clin Exp Allergy. 1995;25:890-895.
- (120) Nitschke M, Sohn K, Dieckmann D et al. Effects of basophil-priming and stimulating cytokines on histamine release from isolated human skin mast cells. Arch Dermatol Res. 1996;288:463-468.
- (121) Louis R, Dowlati A, Weber T et al. Modulation of immunological histamine release from human lung fragments by stem cell factor, IL-3, IL-5 and GM-CSF: comparison with human leukocytes. Int Arch Allergy Immunol. 1994;105:18-25.
- (122) Laffargue M, Calvez R, Finan P et al. Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. Immunity. 2002;16:441-451.
- (123) Toda M, Dawson M, Nakamura T et al. Impact of engagement of FcepsilonRI and CC chemokine receptor 1 on mast cell activation and motility. J Biol Chem. 2004;279:48443-48448.

- (124) Miyazaki D, Nakamura T, Toda M et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. J Clin Invest. 2005;115:434-442.
- (125) Alam R, Forsythe PA, Lett-Brown MA, Grant JA. Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. Am J Respir Cell Mol Biol. 1992;7:427-433.
- (126) Kuna P, Reddigari SR, Kornfeld D, Kaplan AP. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. J Immunol. 1991;147:1920-1924.
- (127) Kuna P, Kaplan AP. Relationship of histamine-releasing factors and histaminereleasing inhibitory factors to chemokine group of cytokine. Allergy Asthma Proc. 1996;17:5-11.
- (128) Brindley LL, Sweet JM, Goetzl EJ. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. J Clin Invest. 1983;72:1218-1223.
- (129) Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ et al. Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. J Immunol. 1993;150:1932-1943.
- (130) Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, Oppenheim JJ, Kaplan AP. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. J Exp Med. 1992;175:489-493.
- (131) Oliveira SH, Lukacs NW. Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. Inflamm Res. 2001;50:168-174.
- (132) Hida RY, Ohashi Y, Takano Y et al. Elevated levels of human alpha -defensin in tears of patients with allergic conjunctival disease complicated by corneal lesions: detection by SELDI ProteinChip system and quantification. Curr Eye Res. 2005;30:723-730.
- (133) Ong PY, Ohtake T, Brandt C et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Engl J Med. 2002;347:1151-1160.
- (134) Frohm M, Agerberth B, Ahangari G et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. J Biol Chem. 1997;272:15258-15263.
- (135) Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol. 2003;3:710-720.
- (136) Beisswenger C, Bals R. Antimicrobial peptides in lung inflammation. Chem Immunol Allergy. 2005;86:55-71.

- (137) van Wetering S, Tjabringa GS, Hiemstra PS. Interactions between neutrophilderived antimicrobial peptides and airway epithelial cells. J Leukoc Biol. 2005;77:444-450.
- (138) Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2003;2:224-231.
- (139) Befus AD, Mowat C, Gilchrist M et al. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. J Immunol. 1999;163:947-953.
- (140) Yamashita T, Saito K. Purification, primary structure, and biological activity of guinea pig neutrophil cationic peptides. Infect Immun. 1989;57:2405-2409.
- (141) 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. 2001;124:142-145.
- (142) 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.
- (143) 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.
- (144) Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D et al. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. J Immunol. 2003;171:4830-4836.
- (145) Plaut M, Pierce JH, Watson CJ et al. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. Nature. 1989;339:64-67.
- (146) Sayama K, Diehn M, Matsuda K et al. Transcriptional response of human mast cells stimulated via the Fc(epsilon)RI and identification of mast cells as a source of IL-11. BMC Immunol. 2002;3:5.
- (147) Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptormediated activation. Nature. 1989;339:150-152.
- (148) Burd PR, Rogers HW, Gordon JR et al. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. J Exp Med. 1989;170:245-257.
- (149) King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. J Virol. 2002;76:8408-8419.
- (150) Sun G, Liu F, Lin TJ. Identification of Pseudomonas aeruginosa-induced genes in human mast cells using suppression subtractive hybridization: up-regulation of IL-8 and CCL4 production. Clin Exp Immunol. 2005;142:199-205.

- (151) Coulombe M, Battistini B, Stankova J, Pouliot P, Bissonnette EY. Endothelins regulate mediator production of rat tissue-cultured mucosal mast cells. Upregulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines. J Leukoc Biol. 2002;71:829-836.
- (152) Ahamed J, Venkatesha RT, Thangam EB, Ali H. C3a enhances nerve growth factorinduced NFAT activation and chemokine production in a human mast cell line, HMC-1. J Immunol. 2004;172:6961-6968.
- (153) Vaddi K, Newton RC. Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine-beta family. J Leukoc Biol. 1994;55:756-762.
- (154) McColl SR, Hachicha M, Levasseur S, Neote K, Schall TJ. Uncoupling of early signal transduction events from effector function in human peripheral blood neutrophils in response to recombinant macrophage inflammatory proteins-1 alpha and -1 beta. J Immunol. 1993;150:4550-4560.
- (155) Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. J Immunol. 1993;151:2852-2863.
- (156) Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. J Exp Med. 1993;178:63-72.
- (157) Bischoff SC, Krieger M, Brunner T et al. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. Eur J Immunol. 1993;23:761-767.
- (158) Wang JM, Sherry B, Fivash MJ, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 alpha and -beta and monocyte chemotactic and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. J Immunol. 1993;150:3022-3029.
- (159) Rot A, Krieger M, Brunner T et al. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. J Exp Med. 1992;176:1489-1495.
- (160) Kimata H, Yoshida A, Ishioka C et al. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. J Exp Med. 1996;183:2397-2402.
- (161) Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO. Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. Allergy. 2004;59:1087-1096.
- (162) 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.
- (163) Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L et al. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. J Clin Invest. 2001;107:53-63.

- (164) Luster AD, Greenberg SM, Leder P. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. J Exp Med. 1995;182:219-231.
- (165) Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem. 1995;270:27348-27357.
- (166) Aronica SM, Mantel C, Gonin R et al. Interferon-inducible protein 10 and macrophage inflammatory protein-1 alpha inhibit growth factor stimulation of Raf-1 kinase activity and protein synthesis in a human growth factor-dependent hematopoietic cell line. J Biol Chem. 1995;270:21998-22007.
- (167) Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J Exp Med. 1998;187:129-134.
- (168) Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J Exp Med. 1998;187:875-883.
- (169) Loetscher M, Gerber B, Loetscher P et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. J Exp Med. 1996;184:963-969.
- (170) Janatpour MJ, Hudak S, Sathe M, Sedgwick JD, McEvoy LM. Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. J Exp Med. 2001;194:1375-1384.
- (171) Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. J Immunol. 2001;167:1862-1866.
- (172) Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F et al. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 1999;10:2518-2526.
- (173) Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. J Am Soc Nephrol. 2002;13:53-64.

7. Anhang

7.1 Geräte

Brutschrank (Typ B5061 EC-CO₂): *Heraeus*, Hanau Durchflusszytometer (Modell FACScalibur): Becton-Dickinson, San Jose, USA LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) 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

7.2 Computerprogramme

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

Primer-	Sense 5´3´	Temp.	Annealin	Messung	Produkt-
Name	Antisense 5´3´	(°C)	(℃) PCR	(°°)	länge
b2M	GCT GTC CTC GCG CTA CTC TC	63,4	55	60-52 /82	368
	GCG GCA TCT TCA AAC CTC CAT	59,8			
CXCR3-A	CCA TGG TCC TTG AGG TGA G	58,8	54	64 - 54 /82	92
	TCC ATA GTC ATA GGA AGA GCT GAA	59,3			
CXCR3-B	TGC CAG GCC TTT ACA CAG C	58,8	55	64 - 54 /84	79
	TCG GCG TCA TTT AGC ACT TG	57,3			

7.4 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).

7.4.1 Zellisolierung und -kultur

Dulbecco's PBS

- 2,7 mM KCl
- 140 mM NaCl
- 1,5 mM KH₂PO₄
- 10 mM Na₂HPO₄, in H₂O (Braundest, Aqua ad iniectabila Braun, Pyrogenfrei, Braun Melsungen, Melsungen) gelöst; pH 7,4

PBS-D + CaMg

- 2,7 mM KCI 140 mM NaCl
- 1,5 mM KH₂PO
- 1,5 mM KH₂PO₄ 10 mM Na₂HPO₄
- 10 mM Na₂HPO₄
- $0,9 \text{ mM} \text{ CaCl}_2$
- 0,5 mM MgCl₂, in H₂O 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

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

Tyrode's-Puffer

8 mg/ml NaCl
0,2 mg/ml KCl
0,056 mg/ml NaH₂PO₄ [1 x H₂O]
1,089 mg/ml Glucose - Monohydrat
2,86 mg/ml HEPES
mit NaHCO₃ auf pH 7,2 eingestellt

TGMD-Puffer

- 8 mg/ml NaCl
- 0,2 mg/ml KCl

0,056 mg/ml NaH₂PO₄ [1 x H₂O]

1,089 mg/ml Glucose - Monohydrat

- 1,0 mg/ml Gelatine
- $0,25 \hspace{0.1in} mg/ml \hspace{0.1in} MgCl_2 \hspace{0.1in} [6 \hspace{0.1in} x \hspace{0.1in} H_2O]$

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

7.4.2 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 H_2O 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 H_2O 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

7.4.3 ELISA

PBS

2,7 mM KCl 137 mM NaCl 1,5 mM KH₂PO₄ 8,1 mM Na₂HPO₄ pH 7,2 - 7,4

Waschpuffer

0,05 % Tween 20 (R&D Systems, Europe, LTd., Abingdon, England) in PBS pH 7,2 - 7,4

Blockpuffer

1 % BSA (bovines Serum-Albumin, Fraktion V, proteasefrei) in PBS pH 7,2 - 7,4

Substratlösung

50 % H₂O₂ 50 % Tetramethylbenzidin

Stopp-Lösung

 $2 \text{ N H}_2 \text{SO}_4$

Fangantikörper

Ziege anti humanes MIP-1 alpha Antikörper (R&D Systems) gelöst zu 72 μ g/ml in PBS Maus anti humanes MIP-1 beta Antikörper (R&D Systems) gelöst zu 180 μ g/ml in PBS

Standardlösung

100 ng/ml rekombinantes humanes MIP-1 alpha, bzw. 60 ng/ml rekombinantes humanes MIP-1 beta (R&D Systems) gelöst in Blockpuffer

Detektionsantikörper

biotinilierter Ziege anti humanes MIP-1 alpha Antikörper (R&D Systems) gelöst zu 36 μ g/ml in Blockpuffer

biotinilierter Ziege anti humanes MIP-1 beta Antikörper (R&D Systems) gelöst zu 9 µg/ml in Blockpuffer

Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung

Streptavidin konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (R&D Systems) aufgenommen in Blockpuffer

7.4.4 Hexosaminidase-Freisetzungstest

$\beta \text{-}Hexosaminidase\text{-}Substratlösung$

 $10 \quad mM \quad \ \ 4 \mbox{-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-$$\beta$-D-glucopyranosid, in Acetatpuffer gelöst}$

Acetatpuffer

1MNa-Acetat, in H2O gelöstHCl 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

7.4.5 FACS

PBS-Azid

15 mM Natriumazid, in PBS gelöst

Lebenslauf

Zur Person

Schulausbildung

1977 – 1981 Grundschule in Quickborn

1981 – 1987 Realschule in Quickborn

1987 – 1990 Fachgymnasium in Norderstedt

6/1990 Erreichen der allgemeinen Hochschulreife

Grundwehrdienst

7/1990 - 6/1991

Berufsausbildung

8/1991 – 6/1993Ausbildung zum Kaufmann im Groß- und Außenhandel bei der FirmaPaul Müggenburg GmbH & Co. In Alveslohe

Universitätsstudium

4/1994 - 6/2002

Biologiestudium an der Universität Hamburg mit dem Hauptfach Angewandte Botanik und den Nebenfächern Biochemie und Naturschutz

Diplomarbeitsthema: "Isolierung und Charakterisierung der Polyphenoloxidase aus den Blättern von *Theobroma Cacao* L."

Promotion

1/2003 - 9/2006

Anfertigung einer Dissertationsarbeit mit dem Titel:"Direkte und indirekte Effekte thrombozytärer Chemokine auf humane Mastzellen"

Berufserfahrung

6/1993 – 3/1994 Lagermitarbeiter bei der Sony-Reparaturwerkstatt AVC in Hamburg

5/1994 – 4/2000 Studentische Aushilfskraft als Kaufmann bei der Firma Granuliertechnik + Handel Volker Benson

7/2002 – 11/2002 Studentische Aushilfskraft beim Servicecenter IT der LBK Hamburg als technischer Support für das Krankenhaus St. Georg

Danksagungen

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

Besonders herzlich möchte ich PD Dr. Frank Petersen für die hervorragende wissenschaftliche Anleitung, die anregenden Diskussionen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Florian Schiemann danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Etablierung der Mastzellisolierung, seine wertvollen Ratschläge im Umgang mit Mastzellen und seiner kompetenten Hilfe bei jeglicher Fragestellung.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Adolf Vollmer und Dr. Torsten Goldmann und deren Mitarbeitern der Laborgruppe Klinische und Experimentelle Pathologie am Forschungszentrum Borstel für die Bereitstellung von Lungengewebe.

Mein Dank gilt den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Laborgruppen Biochemische Immunologie und Biologische Chemie Herrn Prof. Dr. Ernst Brandt, Frau Dr. Natalia Nashkievich, Frau Dr. Brigitte Kasper, Frau Geske Woller, Frau Diana Heinrich und Frau Dr. Franziska Schwartzkopff und insbesondere Frau Gabi Huß, Frau Christine Engellenner, Frau Alette Hettfleisch, Cindy Hass und Gabriele Steller ohne deren Engagement und wertvolle Hilfe ein Gelingen dieser Arbeit kaum vorstellbar gewesen wäre. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Kathleen Marienfeld, Herrn Dr. Martin Ernst und PD Dr. Holger Heine für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen.

Ich möchte mich bei Frau Ina Justin und Frau Stephanie Gondolatsch für die zuverlässige Korrkektur des Manuskriptes bedanken.

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

Liebe Catharina, Dir danke ich für all die Jahre, in denen mir Dein Verständnis und aufbauender Zuspruch 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.

Quickborn, im Juni, 2007

••••
••••