

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. D. Zillikens

**Funktionelle Untersuchungen zur Wirkung des Interleukin 4-
induzierenden Prinzips aus *Schistosoma mansoni* -Eiern (IPSE)
auf menschliche basophile Granulozyten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Anne Räthling

aus Hamburg

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Bernhard Gibbs Ph.D.

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jens Gieffers

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 09.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	3
2. Abkürzungsverzeichnis.....	4
3. Einleitung.....	6
3.1. IgE-vermittelte Erkrankungen: Allergie und helminthische Parasitose.....	6
3.2. Die menschlichen basophilen Granulozyten.....	7
3.3. Mediatoren der menschlichen basophilen Granulozyten.....	8
3.3.1. Histamin.....	8
3.3.2. LTC ₄	8
3.3.3. IL-4 und IL-13.....	9
3.4. Die Rolle der Basophilen bei IgE-vermittelten Erkrankungen.....	9
3.5. IgE-vermittelte Aktivierung menschlicher basophiler Granulozyten.....	12
3.5.1. Sensibilisierung.....	12
3.5.2. Stimulation.....	13
3.5.2.1. IgE-vermittelte Stimulation.....	13
3.5.2.2. IgE-unabhängige Stimulation.....	13
3.5.3. Intrazelluläre Signalkaskade.....	14
3.6. Schistosoma mansoni und IPSE.....	16
4. Ziele.....	18
5. Material.....	19
5.1. Aufreinigung basophiler Granulozyten.....	19
5.2. Stripping und Resensibilisierung basophiler Granulozyten.....	19
5.3. Stimulantien.....	19
5.4. Inhibitoren.....	20
5.5. Mediatorenbestimmung.....	20
5.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting.....	20
5.7. Sonstige Puffer und benötigtes Material.....	21
6. Methoden.....	22
6.1. Aufreinigung basophiler Granulozyten.....	22
6.2. Bestimmung von Zellzahl, Reinheit und Viabilität der Basophilen.....	24
6.3. Stimulation der basophilen Granulozyten.....	25
6.3.1. Stimulationsprotokoll.....	25

6.3.2.Modifikationen des Stimulationsprotokolls.....	26
6.4.Mediatorenbestimmung.....	27
6.4.1.Histamin.....	27
6.4.2.LTC4 und Zytokine.....	27
6.5.SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting.....	28
6.6.Statistik.....	30
7.Ergebnisse.....	31
7.1.Reinheit und Viabilität der basophilen Granulozyten.....	31
7.2.IPSE ist ein IgE-abhängiger Basophilenaktivator.....	32
7.3.Signaltransduktionsversuche.....	38
7.4.IPSE ist PTX-insensitiv.....	39
7.5.Funktionelle Untersuchungen.....	40
7.6.Vorinkubierte IPSE-IgE-Gemische können menschliche Basophile stimulieren.....	47
7.7.Die Unfähigkeit des IPSE, menschliche Basophile über alleinige Bindung an das IgE(Fc)-Fragment zu aktivieren.....	49
8.Diskussion.....	50
8.1.IPSE ist ein IgE-abhängiger Basophilenaktivator.....	50
8.2.IPSE entfaltet seine Wirkung über dieselbe Signalkaskade wie Anti-IgE.....	51
8.3.Funktionelle Untersuchungen.....	52
8.4.IPSE und IgE formen aktivierende Komplexe.....	53
9.Zusammenfassung.....	57
10.Literaturverzeichnis.....	59
11.Anhang.....	69
11.1.Veröffentlichungen.....	69
11.2.Danksagung.....	70
11.3.Lebenslauf.....	71

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: IgE-vermittelte Hauptaktivitäten menschlicher basophiler Granulozyten.....	11
Abb. 2: Bindung des IgE-Moleküls an den FcεRI-Rezeptor.....	12
Abb. 3: IgE-vermittelte Signalkaskade im menschlichen basophilen Granulozyten.....	15
Abb. 4: Lebenszyklus von <i>S. mansoni</i> (aus [84], verändert).....	17
Abb. 5: Prinzip der Elutriation (aus [5], verändert).....	23
Abb. 6: Prinzip der negativen Selektion (MACS).....	24
Abb. 7: Experimenteller Aufbau der SDS-PAGE (aus [65]).....	28
Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahme von aufgereinigten menschlichen Basophilen....	31
Abb. 9: Einfacher Strippingversuch.....	33
Abb. 10: Releaser- versus Non-Releaser-Dosiswirkungskurven.....	35
Abb. 11: Histaminfreisetzung in An- und Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium.....	36
Abb. 12: Restimulationsversuch.....	37
Abb. 13: Signaltransduktionsversuch.....	38
Abb. 14: Inhibitionsversuch mit PTX.....	39
Abb. 15: Dosiswirkungskurven von Anti-IgE (B) sowie zugehörige Western Blots (A)....	41
Abb. 16: Dosiswirkungskurven von IPSE (B) sowie zugehörige Western Blots (A).....	42
Abb. 17: Histaminfreisetzungskinetik im Vergleich Anti-IgE versus IPSE.....	43
Abb. 18: Syk-Kinetik im Vergleich Anti-IgE versus IPSE.....	44
Abb. 19: p38 MAPK-Kinetik im Vergleich Anti-IgE versus IPSE.....	45
Abb. 20: ERK-Kinetik im Vergleich Anti-IgE versus IPSE.....	46
Abb. 21: IPSE-IgE-Gemisch-Versuch.....	48
Abb. 22: IgE(Fc)-Fragment-Versuch.....	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.....	29
--	----

2. Abkürzungsverzeichnis

Anti-IgE	Anti-Immunglobulin E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bis I+II	Bisindolylmaleinid I+II
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CMF	Kalzium- und magnesiumfreier HEPES-Puffer
Cn	Calcineurin
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylen-diamino-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i>
ERK 1+2	<i>Extracellular signal regulated kinases 1+2</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment cristalline</i>
FHB	<i>Full HEPES buffer</i>
fMLP	N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-Phenylalanin
FRP	Formylpeptidrezeptor
FRP 1	FRP- like 1
GM-CSF	<i>Granonulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpeperazin-N`-2-ethan-Sulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPSE	Interleukin-4-induzierendes Prinzip aus <i>Schistosoma Mansoni</i> -Eiern
KCl	Kaliumchlorid
LTC ₄	Leukotrien-C ₄
LY	LY 294002
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase

N	Nukleus
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nukleärer Transkriptionsfaktor aktivierter T-Lymphozyten
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
OPT	O-phthaldialdehyd
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PD	PD 98059
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
RANTES	<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted CCL5</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S.	Seite
SB	SB 203580
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SHIP	<i>SH2-containing inositol 5'-phosphatase</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
Stat 6	<i>Signal transducers and activators of transkription 6</i>
Stim.	Stimulus
TBST	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U73	U-73122
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	<i>Vascular adhesion molecule-1</i>
Wm	Wortmannin

3. Einleitung

3.1. IgE-vermittelte Erkrankungen: Allergie und helminthische Parasitose

IgE ist die seltenste der Immunglobulinklassen im menschlichen Organismus. Doch ihre Aktivierung, die vor allem bei Allergien und helminthischen Parasitosen auftritt, hat starke Effekte auf viele Organsysteme, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Als Allergie wird ein Krankheitsbild bezeichnet, das durch eine Immunreaktion gegenüber einem sonst harmlosen Antigen ausgelöst wird, welches dann als Allergen bezeichnet wird. Allergene sind kleine, lösliche Proteine, die in geringer Dosis durch die Schleimhäute in der Nase, der Lunge und dem Darm in den Körper gelangen, oder auch subkutan (Insektenstiche) oder intravenös (Medikamente, Serum) injiziert werden. Zwischen 20 und 30 Prozent der Weltbevölkerung, insbesondere in den industrialisierten Ländern, sind gegenwärtig von einer Allergie betroffen, deren verschiedene Erscheinungsformen als Typ I-Hypersensibilitätsreaktion subsummiert werden [9]. Der Begriff der Hypersensibilitätsreaktion geht auf Coombs und Gell [11] zurück, die die Hypersensibilitätsreaktionen in vier Typen unterteilt haben. Ursächlich neben genetischer Veranlagung ([10], [41], [71], [93]) werden unter anderem Umweltfaktoren für die Entwicklung allergischer Erkrankungen verantwortlich gemacht [10].

Auch bei Wurminfektionen treten vorübergehende allergische Symptome auf [103]. Diese unterscheiden sich im Pathomechanismus nicht wesentlich von der Allergie, sind aber im Gegensatz dazu keine fehlgeleitete Immunantwort, sondern bilden die Abwehrreaktion gegen den eindringenden Helminthen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass mit *Trichuris muris* infizierte gesunde Mäuse eine Th2-Antwort entwickelten, die zur Elimination der Würmer führte, bevor diese das Ei-produzierende Stadium erreichen konnten. Mäuse, die ausschließlich zur Bildung von Th1-Antworten in der Lage waren, entwickelten dagegen chronische Infektionen [20] (zur Verbindung Th2-Antwort und Allergie siehe 3.4., S. 9 und Abb. 1, S. 11).

Interessanterweise besteht eine negative Korrelation zwischen helminthischen Parasitosen und der Prävalenz sowie der Ausprägung allergischer Erkrankungen ([1], [75]). Dies wird darauf zurückgeführt, dass zum Beispiel Schistosomen ein „Eigen-Antigen“ produzieren, welches von spezifischen Rezeptoren erkannt wird und letztendlich zu einer Toleranzentwicklung gegen dieses Antigen führt. So täuscht der Helminth das Wirtsimmunsystem zum eigenen Vorteil. Gleichzeitig schützt sich der Wirtsorganismus vor Schädigung durch den Helminthen, indem er die durch den Helminthen induzierte

Th2-Antwort herunterreguliert. Dabei ist er gleichzeitig vor exzessiven Th2-vermittelten allergischen Reaktionen geschützt [101]. Dieses Phänomen macht man sich in der Therapie in jüngster Zeit bei *Morbus Crohn*- und *Colitis ulcerosa*-Patienten zu Nutze, denen die Eier des Schweinebandwurms *Taenia solium* gegeben werden [102].

3.2. Die menschlichen basophilen Granulozyten

Erstmals beschrieben wurden die 10-14 µm durchmessenden basophilen Granulozyten 1879 von Paul Ehrlich ([18], [19]). Mit einem Anteil von knapp 1 % sind sie die kleinste Subpopulation der Leukozyten. Sie entwickeln sich, wie ihr gewebständiges Pendant, die Mastzellen, aus CD34+ pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Im Gegensatz zu Mastzellen werden diese physiologischerweise als reife Basophile in den Blutkreislauf abgegeben ([2], [22], [29]), in dem sie zirkulieren und den sie bei Anwesenheit bestimmter Mediatoren mittels Chemotaxis in Richtung Gewebe verlassen können (Abb. 1, S. 11). Die Mastzellen hingegen reifen unter dem Einfluss von SCF im Bindegewebe von Nase, Lunge, Darm sowie Haut und zirkulieren nicht im Blut.

Auf ihrer Oberfläche tragen die basophilen Granulozyten, wie die Mastzellen, hochaffine IgE-Membranrezeptoren (Fc_εRI-Rezeptoren), die sowohl für die Vermittlung IgE-abhängiger allergischer Reaktionen [45] als auch bei der Immunomodulation eine bedeutende Rolle spielen, vor allem bei der Th2-Immunreaktion. Die Aktivierung des Rezeptors führt nach Ablauf einer intrazellulären Signalkaskade zur Produktion und Sekretion verschiedener entzündlicher und immunmodulatorischer Mediatoren. So werden nach heutigem Wissensstand vor allem die basophilen Granulozyten zusammen mit den Mastzellen für die Produktion des Amins Histamin im menschlichen Organismus verantwortlich gemacht. Außerdem sind Basophile und Mastzellen in der Lage Heparin freizusetzen. Zusätzlich können die basophilen Granulozyten verschiedene Zytokine, Chondroitinsulfat [73] und Leukotrien-C₄ (LTC₄) produzieren und abgeben.

Von tierischen basophilen Granulozyten unterscheiden sich die menschlichen durch ihren Anteil im Differentialblutbild [29]. Im Gegensatz zu tierischen Basophilen benötigen humane Basophile zu einem frühen Zeitpunkt zur Reifung IL-3 ([55],[61]), ein Zytokin, das außerdem die Apoptose verhindert [112] und die Mediatorfreisetzung durch Allergene erhöht [22]. Diese Unterschiede legen nahe, die Funktionen der humanen Basophilen nicht nur in Tiermodellen, sondern auch an menschlichen Zellen zu erforschen, da die Ergebnisse aus Tiermodellen möglicherweise nicht auf humane basophile Granulozyten übertragbar sind.

3.3. Mediatoren der menschlichen basophilen Granulozyten

3.3.1. Histamin

Histamin ist ein biogenes Amin, das durch die Dekarboxylierung des Histidin entsteht. Es wird beim Menschen hauptsächlich in den Mastzellen und basophilen Granulozyten gebildet, in Granula gespeichert und durch verschiedene Histaminliberatoren wie Antigene (Typ I- Hypersensibilitätsreaktion nach Coombs und Gell), Komplementspaltprodukte (bei Endotoxinschock, Verbrennung und Entzündung), Gastrin, Pharmaka (u.a. Morphin) und bestimmte Röntgenkontrastmittel freigesetzt.

Im Organismus werden die unterschiedlichen Wirkungen des Histamins nach spezifischer Bindung an membranständige Rezeptoren vermittelt, von denen vier Subtypen bekannt sind: Über H_1 -Rezeptoren bewirkt Histamin die Kontraktion von Darm, Uterus, Bronchien, größeren Gefäßen ($\varnothing > 80 \mu m$), die Dilatation kleinerer Gefäße mit Hautrötung sowie Quaddelbildung und die Dilatation der Koronargefäße. Weiterhin kommt es zur Endothelkontraktion an Kapillaren und Venolen mit Permeabilitätssteigerung und Hämokonzentration sowie zu Schmerzen und Juckreiz durch Wirkung auf sensible Nervenendigungen. Allergische Reaktionen resultieren überwiegend aus der H_1 -Rezeptor-Aktivierung und dem nachfolgenden intrazellulären Signalweg über Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol. Über H_2 -Rezeptoren wird die Stimulation der Magensaftsekretion, die positiv inotrope und chronotrope Wirkung am Herzen, die Beteiligung an der Dilatation kleinerer Gefäße und der Koronargefäße sowie die Suppression zellulärer Funktionen einiger immunkompetenter Zellen vermittelt. Im Gegensatz zu den in der Peripherie vorkommenden H_1 - und H_2 -Rezeptoren ist der H_3 -Rezeptor vor allem im Nervengewebe (Inhibition verschiedener Transmitterfreisetzungen) und ZNS (Inhibition der Histaminsynthese und -freisetzung) zu finden [24]. Der H_4 -Rezeptor ist erst seit einigen Jahren bekannt. Er ist auf verschiedenen Immunzellen der Peripherie exprimiert, unter anderem auf basophilen Granulozyten und Mastzellen. Seine Funktion ist noch nicht vollständig verstanden. Allerdings ist seine Funktion an Mastzellen als Vermittler der Chemotaxis und der intrazellulären Kalziummobilisation nachgewiesen [40].

3.3.2. LTC₄

LTC₄ (Leukotrien-C₄) fungiert im menschlichen Organismus als starker Broncho-konstriktor. Es ist ein körpereigener Metabolit des Arachidonsäurestoffwechsels: Die Arachidonsäure ist eine vierfach ungesättigte essentielle Fettsäure in tierischen Fetten, die in der Phospholipidmembran der Zellen eingebaut ist. Nach Aktivierung der zytosolischen

arachidonsäure-spezifischen Phospholipase A₂ (PLA₂) und unter dem Einfluss von Kalzium wird die Arachidonsäure an der Zellmembran freigesetzt. In der Zelle wird diese dann enzymatisch unter anderem durch die Wirkung der Lipoxygenase über mehrere Zwischenprodukte zu dem Lipidmediator LTC₄ [78]. Dieses wird nach IgE-vermittelter Stimulation durch Mastzellen und basophile Granulozyten innerhalb von circa 30 Minuten neu produziert und umgehend freigesetzt und nicht wie Histamin in Granula gespeichert [88].

3.3.3. IL-4 und IL-13

Die Interleukine IL-4 und IL-13 sind Kommunikationsproteine der Immunregulation, die eine entscheidende Rolle bei der Immunmodulation und bei der Erhaltung der allergischen Spätreaktion spielen [89]. Beide Interleukine verursachen eine erhöhte VCAM-1-Expression in Endothelzellen der Endstrombahn sowie eine erhöhte Eotaxinsynthese. Dadurch wird ein Einstrom von Leukozyten inklusive der Basophilen in das entzündete Gewebe günstig beeinflusst ([64], [77], [110]). IL-4 und IL-13 sind außerdem die einzigen bekannten Zytokine, die einen Isotypenwechsel der B-Lymphozyten von IgM zu IgE induzieren können [14]. Ebenfalls können beide Interleukine die Antikörperbildung (IgE) durch Plasmazellen heraufregulieren. Nur IL-4 bewirkt die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th2-Helferzellen, was wiederum zur Produktion von IL-4, IL-13 und anderen Zytokinen führt [36]. Die Notwendigkeit der Anwesenheit von IL-4 zur Induktion der Th2-Immunantwort wurde an knockout-Mäusen gezeigt, denen entweder IL-4R α oder Stat6, das eine von IL-4 ausgehende Signaltransduktion vermittelt, fehlten. Beide knockout-Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Th2-Immunität ([79], [49]). Seit Mitte der 1990er Jahre weisen immer mehr Studien auf die Bedeutung der basophilen Granulozyten als IL-4- und IL-13-produzierende Zellen hin ([8], [28], [30], [63], [69], [81], [90]). Die IL-4- [50] und IL-13-Sekretion [15] von Leukozytensuspensionen konnte überwiegend auf basophile Granulozyten zurückgeführt werden.

3.4. Die Rolle der Basophilen bei IgE-vermittelten Erkrankungen

Den basophilen Granulozyten kommt bei IgE-vermittelten Erkrankungen eine wichtige Bedeutung zu (Abb. 1, S. 11). Die aktuell gültige Hypothese ist, dass bei der Allergie spezifisches IgE, das an hochaffine Rezeptoren (Fc ϵ RI) auf Basophilen und Mastzellen gebunden ist, durch ein Allergen quervernetzt wird. Dies bewirke die Degranulation der Zellen, die Freisetzung der in Granula gespeicherten Mediatoren und die rasche Synthese

und Abgabe von unter anderem IL-4 und IL-13 [82] und Histamin.

Histamin und verschiedene Prostaglandine verursachen innerhalb von 30 Minuten die sogenannte Sofortreaktion in Form einer schnellen Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit und der Kontraktion glatter Muskulatur. Dies führt unter anderem zur Quaddelbildung auf der Haut sowie zur Verengung und Verschleimung der Atemwege. Es konnte gezeigt werden, dass basophile Granulozyten während der allergischen Reaktion bei allergischer Rhinitis, allergischem *Asthma bronchiale* sowie Kontaktdermatitis frühzeitig in verschiedene Gewebe wie Nasenschleimhaut [43], Haut [17] und Lunge [67] einwandern.

Die Spätreaktion, die acht bis zwölf Stunden nach Allergenexposition eintritt, wird ebenfalls unter anderem durch die basophilen Granulozyten und die Mastzellen mittels Freisetzung von Leukotrienen, Chemokinen und Zytokinen ausgelöst. Diese bewirken eine weitere Kontraktion der glatten Muskulatur und eine Ödembildung. Die Ausschüttung von Histamin durch die Basophilen und Mastzellen ist für die Spätreaktion ebenfalls von Bedeutung, da dies in anderen Zelltypen die Synthese von Zytokinen induziert oder moduliert. Im Lungengewebe von im *Status asthmaticus* Verstorbenen konnte mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 2D7 eine erhöhte Anzahl von basophilen Granulozyten nachgewiesen werden [54]. In einer weiteren Studie wurde bei antigen-induziertem Asthma in der verzögerten Sofortreaktion Histamin und LTC₄ nachgewiesen, nicht jedoch die Mastzell-spezifischen Mediatoren PGD₂ oder Tryptase [65]. Auch in der Haut konnte nach antigeninduzierter Mediatorfreisetzung die persistierende Histaminfreisetzung auf basophile Granulozyten zurückgeführt werden, da diese nicht von einer Tryptase- oder PGD₂-Freisetzung begleitet war ([3], [44]).

Beim Menschen wurde gezeigt, dass der basophile Granulozyt der erste Zelltyp ist, der IL-4 nach Allergenexposition sowohl im peripheren Blut als auch in asthmatischer Bronchialschleimhaut exprimiert ([15], [80]). Schlussfolgernd daraus sollte aus Basophilen freigesetztes IL-4 eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Entwicklung einer Th2-Immunantwort spielen, zumindest aber eine verstärkende Wirkung auf eine vorbestehende Th2-Polarisierung haben. Dass Basophile und Th2-Helferzellen miteinander in enger Verbindung stehen, wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass eine spezifische Allergenimmuntherapie die Th2-Antwort reduzieren und gleichzeitig zu einer Reduktion der Basophilen sowohl in der Quantität als auch in der Reaktivität führen kann [92]. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Basophile eine frühe Rolle in der Initiation der Th2-Immunantwort spielen, rührt von ihrer lange bekannten Funktion als ein Hauptabwehrmechanismus gegen Parasiteninfektionen her [23]. Eines der Kennzeichen

der Infektion mit parasitären Helminthen ist der Anstieg des Serum-IgE und eine Tendenz zur Th2-Antwort.

Bezüglich einer möglichen Rolle von basophilen Granulozyten bei der angeborenen Immunität ist von Interesse, dass Basophile von nicht-immunisierten Spendern eine beträchtliche Menge an IL-4 und anderen Mediatoren nach Erstkontakt mit bestimmten Parasitenantigenen ausschütten ([4], [21], [86]).

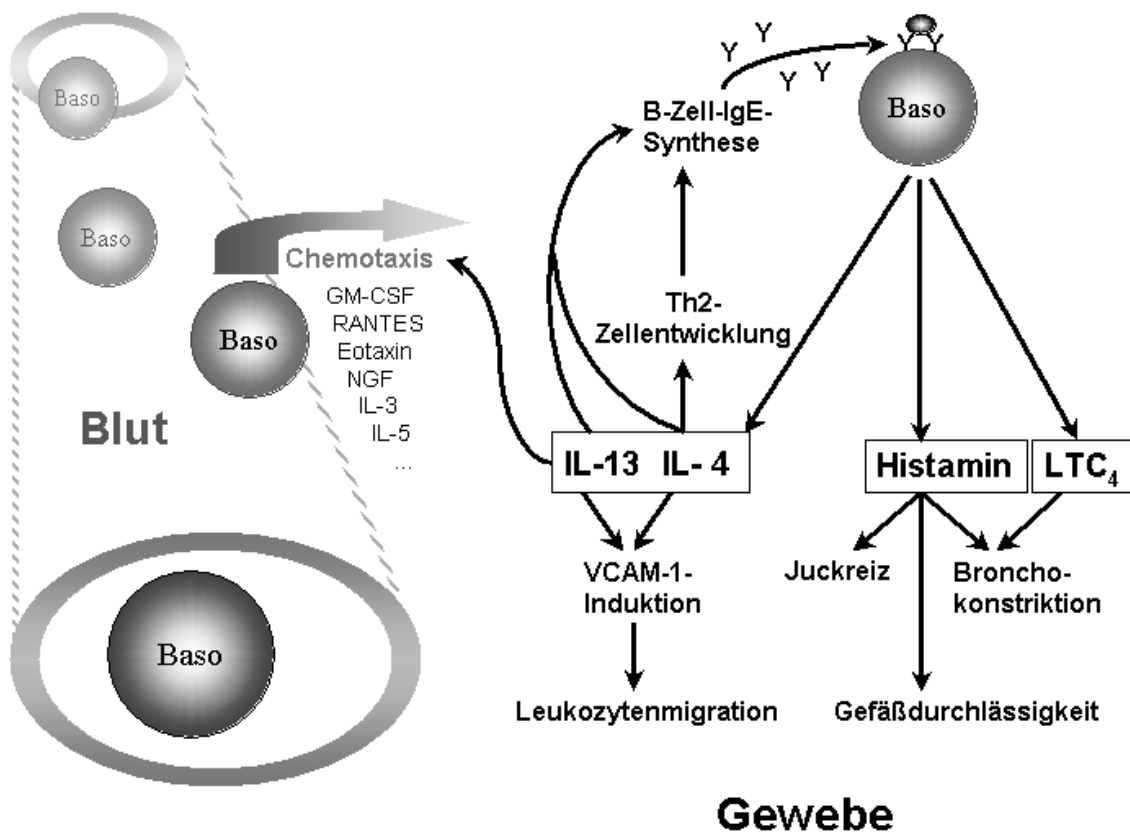


Abbildung 1: IgE-vermittelte Hauptaktivitäten menschlicher basophiler Granulozyten

Abbildung 1 stellt die Hauptaktivitäten menschlicher Basophiler nach IgE-abhängiger Stimulation dar. Verschiedene ansässige Zellen können die Migration der Basophilen aus der Blutbahn ins Gewebe bei Entzündungsreaktionen durch Ausschüttung unterschiedlicher Mediatoren bewirken. Dazu zählen glatte Muskelzellen und epitheliale Zellen durch Ausschüttung von Eotaxin ([12], [42]), endotheliale Zellen [53] und Mastzellen durch Ausschüttung von PGD₂ ([7], [39], [111]), sowie bakterielle und virale Peptide [70]. Weitere Mediatoren, die die Chemotaxis der Basophilen initiieren, sind IL-3, IL-5, RANTES, NGF und GM-CSF [42].

3.5. IgE-vermittelte Aktivierung menschlicher basophiler Granulozyten

3.5.1. Sensibilisierung

Die IgE-vermittelte intrazelluläre Signalkaskade beim menschlichen basophilen Granulozyten beginnt mit der Bindung des IgE-Moleküls an den $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor. Das IgE-Molekül besteht aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L), die durch kovalente Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die Leichtketten besitzen jeweils eine variable (V_L) und eine konstante Domäne (C_L), die schweren jeweils eine variable (V_H) und vier konstante Domänen ($C_{\epsilon}1$, $C_{\epsilon}2$, $C_{\epsilon}3$, $C_{\epsilon}4$). Die beiden Leichtketten bilden zusammen mit V_H und $C_{\epsilon}1$ der schweren Ketten das Antigen-bindende Fragment *Fab*, welches enzymatisch von dem darunterliegenden kristallinen Fragment *Fc* abgespalten werden kann. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung in den $C_{\epsilon}3$ - ([104], [107]) und möglicherweise auch in den $C_{\epsilon}2$ -Domänen [72] des IgE-Moleküls, welche Bestandteile der konstanten Region der schweren Ketten sind. Durch dieses „Einrasten“ des IgE-Moleküls in den $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor soll es zur Hochregulierung der $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor-Expression kommen, aber meist ohne Degranulation ([51], [58], [59])(Abb. 2).

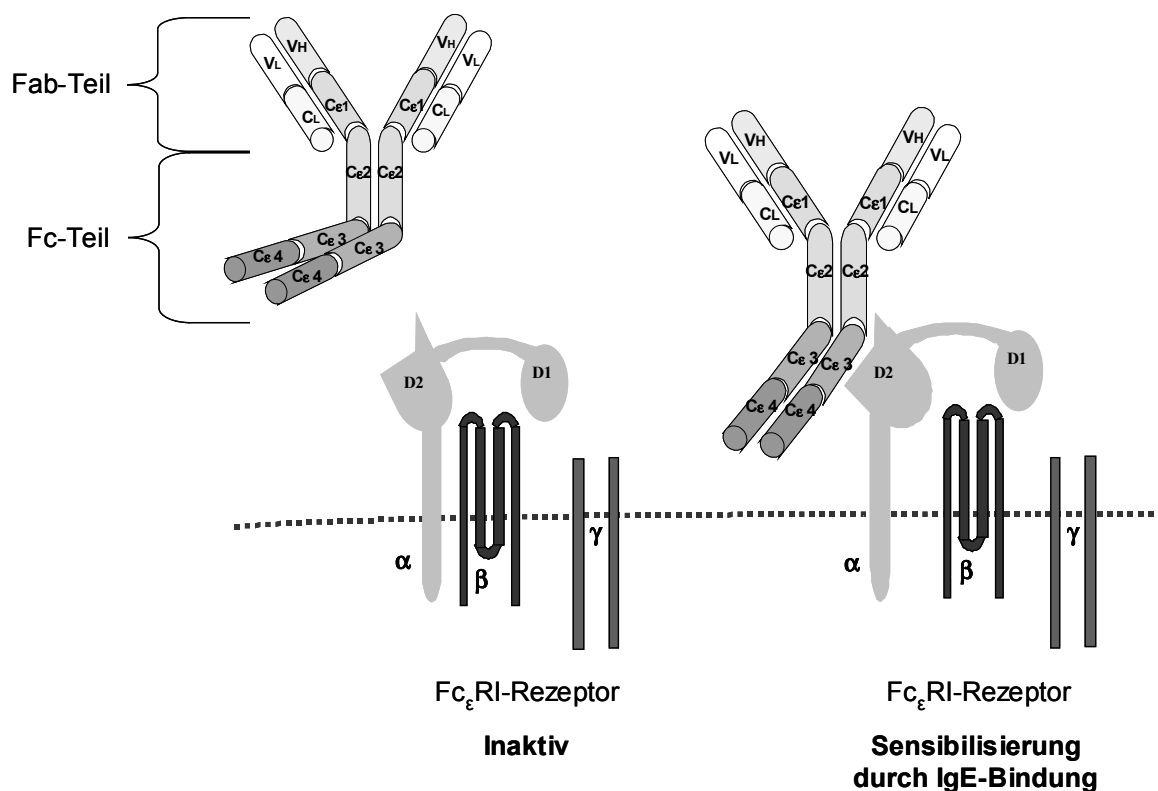


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung des IgE an den $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor

3.5.2. Stimulation

3.5.2.1. IgE-vermittelte Stimulation

Gegenwärtig wird die membrangebundene Antikörperquervernetzung als Voraussetzung für die Immunglobulin/Rezeptor-vermittelte Aktivierung von Zellen angenommen ([74], [60]). Der Fc_εRI-Rezeptor auf basophilen Granulozyten kann folglich nach heutigem Stand der Wissenschaft nur über eine Quervernetzung der Fab-Teile von IgE-Molekülen spezifisch durch bestimmte Antigene oder durch unspezifisches Anti-IgE aktiviert werden. Lektine als auch B-Zell-Superantigene zeichnen sich dadurch aus, dass sie Basophile und Mastzellen IgE-abhängig und antigen-unspezifisch aktivieren können. Für die Aktivierung von Basophilen und Mastzellen durch Lektine wird, wie für die allergenspezifische Aktivierung, eine Quervernetzung von Fc_εRI-gebundenem IgE über die Kohlenhydratseitenketten ausschließlich der Fc-Teile angenommen [91]. Die Voraussetzung dafür ist eine Multivalenz jedes Lektins mit mindestens zwei Bindungsstellen [37]. Im Gegensatz dazu quervernetzen B-Zell-Superantigene die IgE-Moleküle auch oder ausschließlich über die Fab-Teile. Protein L beispielsweise, ein Zelloberflächenprotein aus *Peptostreptococcus magnus* (kappa leichte Kette vom IgE-Molekül), vernetzt nur über die Fab-Teile [27]. Protein A aus *Staphylococcus aureus* vernetzt sowohl über den Fab-(V_H3-Region-spezifisch, zwei oder mehr Fab-Bindungsstellen) als auch über den Fc-Teil [95]. Anti-IgE aktiviert Basophile sowie Mastzellen ebenfalls IgE-abhängig und antigen-unspezifisch, indem es zwei IgE-Moleküle über deren Fc-Teile quervernetzt. Dieses synthetische Produkt wird experimentell zur Stimulation des Fc_εRI-Rezeptors genutzt.

3.5.2.2. IgE-unabhängige Stimulation

Basophile und Mastzellen können auch IgE-unabhängig aktiviert werden, zum Beispiel durch Complement und NGF. Auch N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) aktiviert Basophile und Mastzellen IgE-unabhängig. fMLP ist ein synthetisches Peptid, das die Aktivität von bakteriellen Peptiden aufgrund seiner formylierten N-terminalen Methioningruppen nachahmt. fMLP stimuliert, genau wie bakterielle Peptide, basophile Granulozyten durch Bindung an den FRP (Formylpeptidrezeptor) oder den FRP 1 (FRP-like 1), die mit einem Pertussistoxin-sensitiven G-Protein gekoppelt sind [62]. Durch die Aktivierung des FRP wird das G-Protein aktiviert, das zur Senkung des intrazellulären cAMP- Spiegels führt. Diese Senkung bewirkt wiederum die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, was eine Mediatorfreisetzung zur Folge hat. PTX blockiert die Hauptfunktionen der basophilen Granulozyten, die durch fMLP induziert werden.

Außerdem gibt es die sogenannten Priming Faktoren, wie GM-CSF, verschiedene Zytokine (IL-3, IL-5, IL-6, IL-8) und Chemokine (z.B. Eotaxin). Diese führen zu einem verlängerten Überleben von Basophilen und Mastzellen, sie können die IgE-Synthese hochregulieren und eine erhöhte Mediatorfreisetzung bewirken.

3.5.3. Intrazelluläre Signalkaskade

Die intrazelluläre Signalkaskade, die nach Aktivierung des $Fc_\epsilon RI$ -Rezeptors abläuft und die Produktion und Sekretion der verschiedenen Mediatoren kontrolliert, ist noch nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass die IgE-abhängige Zellaktivierung zunächst zu einer Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinasen, Lyn und Syk, nachfolgend von Inositoltrisphosphat (IP_3) über die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K), Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) und die Phospholipase C (PLC) führt. Dadurch wird eine Freisetzung intra- sowie extrazellulären Kalziums initiiert (Abb. 3, S. 15) [22]. U-73122 (U73) ist ein spezifischer PLC-hemmer. Proteinkinase C (PKC), die unter Katalyse durch Diacylglycerin (DAG) aus PLC entsteht, kann durch Bisindolylmaleimid I+II (Bis I+II) inhibiert werden. LY 294002 (LY) und Wortmannin (Wm) inhibieren die PI 3-K, wobei LY 294002 die ATP-Bindungsstelle derselben blockiert, Wortmannin dagegen an die katalytische Untereinheit bindet und dadurch die PI 3-K hemmt. Diese und die unten genannten Inhibitoren werden zur Erforschung der intrazellulären Signaltransduktion genutzt.

Nach Kepley et al. haben 20% aller von ihm untersuchten Blutspender eine Syk-defizienz, aus der sich die Differenzierung in Releaser und Non-Releaser ergibt ([56], [57]). Die basophilen Granulozyten der Spender mit Syk-defizienz setzen nach Stimulation mit optimaler oder supraoptimaler Konzentration von Anti-IgE weniger als 5 % des in ihnen enthaltenen Histamins frei und werden als Non-Releaser bezeichnet. Releaser werden diejenigen Spender genannt, deren basophile Granulozyten mehr als 20 % ihres Gesamthistamins nach Stimulation mit Anti-IgE in optimaler oder supraoptimaler Konzentration freisetzen.

Die in der Signaltransduktion unterhalb von IP_3 befindlichen Extracellular Signal Regulated Kinases 1+2 (ERK 1+2), die durch PD 98059 (PD) inhibiert werden kann, beeinflussen über die Phospholipase A_2 (PLA_2) überwiegend die LTC_4 -Sekretion, weniger die Histamin- oder Zytokinproduktion [76]. Das Signalprotein p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38 MAPK), das in der späten Signalkaskade vor ERK 1+2 und hinter IP_3 steht, spielt bei der Modulation der Histamin-, Zytokin- und Leukotrienproduktion

ebenfalls eine essentielle Rolle [31]. SB 203580 (SB) ist ein spezifischer p38 MAPK-Inhibitor.

Inhibitorische Signale, wie SH2-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP), sind bei Hochregulation in der Lage, die Signaltransduktion zu mindern oder zu unterbrechen, in diesem Fall durch Katalyse der Dephosphorylierung von PIP_3 zu PIP_2 . Ein Tiermodell mit SHIP-knock-out-Mäusen zeigte, dass SHIP die Aktivierung von Basophilen terminiert, vor allem im supraoptimalen Bereich der Allergenkonzentrationen [35].

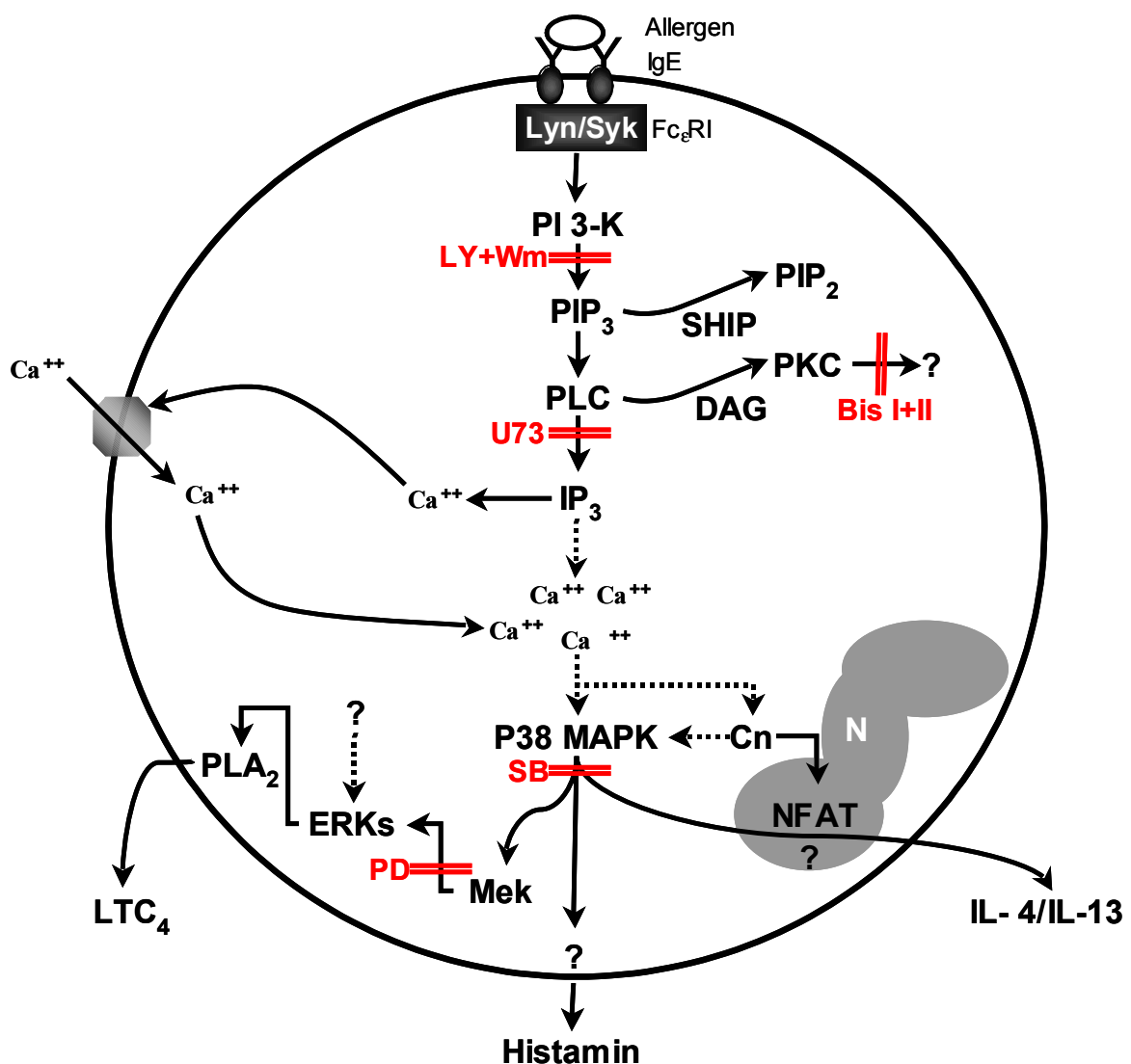


Abbildung 3: IgE-vermittelte Signalkaskade im menschlichen basophilen Granulozyten

3.6. *Schistosoma mansoni* und IPSE

Bereits 1960 wurden Faktoren aus Wurmextrakten beschrieben, die zu einer Histaminfreisetzung aus Mastzellen von nicht-sensibilisierten Tieren ([96], [97], [98], [99], [100]) oder generell zu einer Th2-Antwort im Menschen führten [26]. Die Eier des Bilharzioseerregers *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*), auch als Pärchenegel bezeichnet, wurden als das Th2-induzierende Stadium dieses in Afrika und Südamerika weit verbreiteten Parasiten des Menschen identifiziert [83]. 2003 beschrieben Schramm *et al.* [86] die Isolierung und Charakterisierung eines Faktors aus *S. mansoni*-Eiern, der humane Basophile zur Degranulation und Freisetzung von Histamin, IL-4 und IL-13 anregte. Dieser Faktor wurde Interleukin-4-inducing Principle from *S. mansoni* Eggs (IPSE) genannt. Natürliches IPSE (nIPSE) zeigt eine Doppelbande mit einem Molekulargewicht um 40 kD. Es handelt sich um ein stark glykosyliertes Homodimer mit einem reinen Proteingewicht von 26,4 kD (aus der Sequenz berechnet); das heißt, ein Drittel des Molekulargewichtes beruht auf dem Zuckeranteil. Die Sequenz von IPSE wurde analysiert und das Molekül rekombinant in einer nicht-glykosylierten homodimeren Form mit einem Molekulargewicht von 32 kD als His-getaggttes Fusionsprotein (rIPSE) exprimiert. Die rekombinante Form weist ebenfalls in der SDS-PAGE mindestens zwei dicht beieinander liegende Banden auf, die auf unterschiedlichen Faltungen beruhen könnten [6].

In Abbildung 4 (S. 17) ist der Lebenszyklus von *S. mansoni* dargestellt. Die Pärchenegel können Jahrzehnte in ihrem Wirt [47] leben und mehrere hundert Eier pro Tag produzieren [83]. Die Eier werden von eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Plasmazellen umschlossen, es kommt zur Granulombildung. Da die Granulome aufgrund der sie umgebenden Zellen mobil sind, ergab sich die Vermutung, der Parasit würde das Immunsystem des Wirts für den Transport der Eier nutzen ([13], [16]). Etwa ein Drittel der Eier erreichen den Darm und können den Lebenszyklus vollenden, sofern sie in Gewässer gelangen, die durch die Wasserschnecke (*Biomphalaria*) besiedelt sind. Die übrigen Eier verbleiben im Gewebe und werden dort eingeschlossen. Die Bildung der Granulome erfolgt unter dem Einfluss von Th2-Zytokinen [109]. Lösliche Schistosomenei-Antigene stimulieren *in vitro* die Proliferation von Fibroblasten und steigern die Kollagensynthese, was vermutlich zu der bei Bilharziose beobachteten Leberfibrose führt ([84], [108]). Außerdem führen die Granulome zu einer Minderdurchblutung des befallenen Organs, da sie mit dem Blutstrom wandern und Mikroembolien verursachen. Der Wirt versucht dies durch Neovaskularisierung auszugleichen, wobei es zur Organvergrößerung kommt [106].

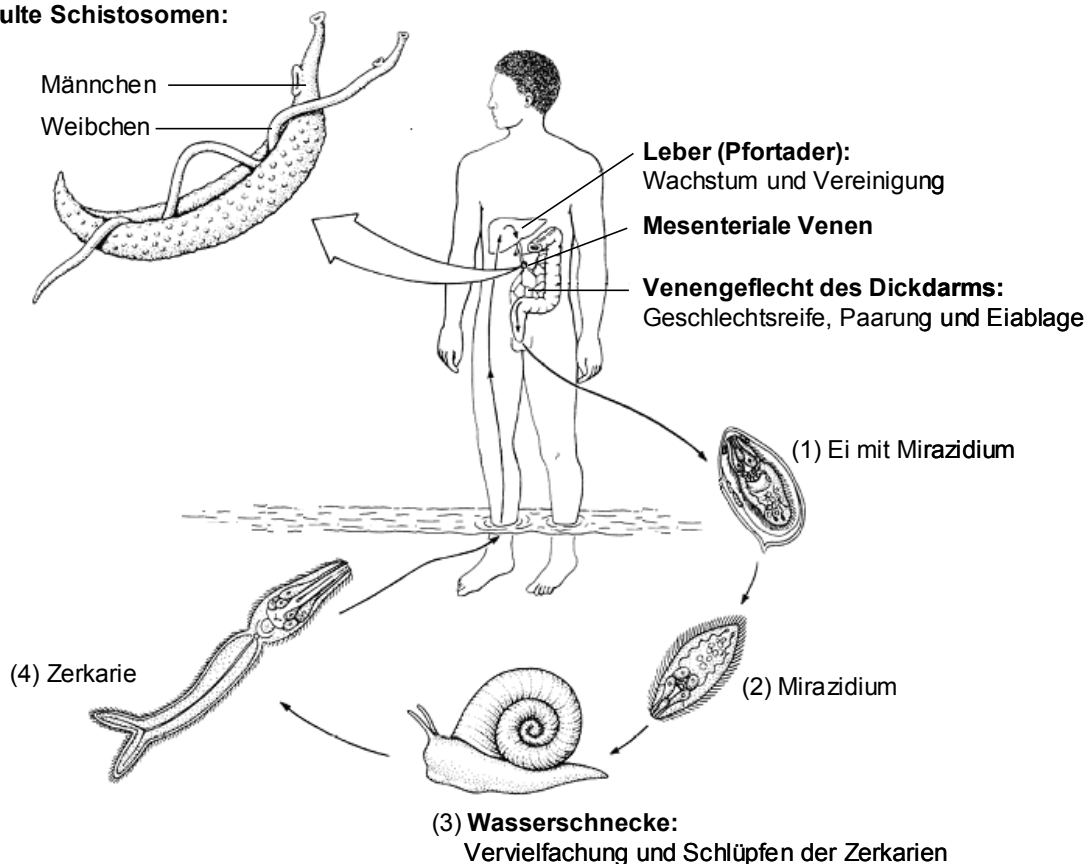
Adulte Schistosomen:

Abbildung 4: Lebenszyklus von *S. mansoni* (aus [85], verändert)

Abbildung 4 zeigt den Lebenszyklus von *S. mansoni*. Dessen Eier werden mit dem Darminhalt abgegeben (1). Gelangen sie in Süßwasser, schlüpft das Mirazidium aus (2). Die Mirazidien dringen in ihren Zwischenwirt, die Wasserschnecke (*Biomphalaria* spp.), ein, in dem sie sich zu Muttersporozysten entwickeln. Die Muttersporozysten bilden Tochtorsporozysten, die verschiedene Organe der Schnecke befallen. Dabei findet eine Vervielfachung des Parasiten statt (3). Aus den Tochtorsporozysten schlüpfen die Zerkarien, welche die Schnecke verlassen (4) und in ihren Endwirt (Primaten, Nager) eindringen, wobei sie ihren Schwanz verlieren und zu Schistosomula werden. Die Schistosomula dringen in den peripheren Blutkreislauf ein und werden zum Herzen transportiert. Sie verlassen die rechte Herzseite und erreichen die linke Herzseite über den Lungenkreislauf. Von dort gelangen sie in die mesenterialen Blutgefäße und erreichen die Pfortader, in der sie heranwachsen. Kurz vor der Geschlechtsreife vereinigen sich Männchen und Weibchen und migrieren gemeinsam in die Venengeflechte von Darm und Blase, wo sie sich paaren und das Weibchen Eier produziert (aus [85], verändert).

4. Ziele

Basophilen Granulozyten kommt bei IgE-vermittelten Erkrankungen eine wichtige Rolle zu: Beim Menschen wurde gezeigt, dass der basophile Granulozyt der erste Zelltyp ist, der IL-4 nach Allergenexposition exprimiert. Wie zuvor bereits erwähnt, sollte daher das aus Basophilen freigesetzte IL-4 eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Entwicklung einer Th2-Immunantwort spielen, zumindest aber eine verstärkende Wirkung auf eine vorbestehende Th2-Polarisierung haben.

Jeder gesunde Mensch reagiert mit einer Th2-Antwort auf eine Infektion mit Helminthen, aber nicht jeder entwickelt Allergien, die wie die Parasitose durch eine Th2-Antwort und eine IgE-Erhöhung gekennzeichnet sind. Um die Mechanismen einer Allergieentwicklung zu ergründen, bietet es sich daher an, die Infektion mit Helminthen und deren Charakteristika zu studieren. IPSE, ein Faktor aus *S. mansoni*-Eiern, der humane Basophile zur Degranulation und zur Freisetzung von Histamin, IL-4 und IL-13 anregt, scheint dafür verantwortlich zu sein, dass die Eier von *S. mansoni* zuverlässig eine Th2-Antwort induzieren.

In Kooperation mit unserer Partnerforschungsgruppe aus Borstel unter Leitung von Herrn PD Dr. Helmut Haas war es unser Ziel im Rahmen des SFB-TRR22 (TPA12) die Mechanismen der Mediatorfreisetzung aus humanen Basophilen durch IPSE zu erforschen. Dabei war es meine Aufgabe vor allem die funktionellen Eigenschaften des IPSE in Bezug auf dessen Wirkung an humanen Basophilen zu ergründen. Diese Aufgabe wurde durch den Vergleich der funktionellen Eigenschaften von Anti-IgE und IPSE realisiert.

Weiterhin sollten die molekularbiologischen Ergebnisse der Partnerforschungsgruppe durch Untersuchungen auf zellulärer Ebene ergänzt werden. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Erforschung der Bindungseigenschaften des IPSE an den Fc ϵ RI-Rezeptor.

5. Material

5.1. Aufreinigung basophiler Granulozyten

- Alcianblau 8G (Sigma, St. Louis, USA)
- Basophil Isolation Kit (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Cetyl Pyridinium Chlorid (Merck, Darmstadt)
- EDTA (0,1% in NaCl) (Sigma, St. Louis, USA)
- Elutriationspuffer (CMF mit 2 mg/ml BSA, Sigma, St. Louis, USA)
- Elutriator mit JE-6B-Kammer (Beckmann Instruments, Palo Alto, USA)
- Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)
- Lanthanum Chlorid (Merck, Darmstadt)
- MACS Säulentrennpuffer (5 mmol/l EDTA in CMF gelöst und 0,5 % BSA zugesetzt)
- Magnetische Trennsäule (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Menschliche basophile Granulozyten, isoliert aus frischen Buffy Coats (produziert und zur Verfügung gestellt durch das Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck)
- Separator VarioMACS (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Trypitanblaulösung (Sigma, St. Louis, USA)

5.2. Stripping und Resensibilisierung basophiler Granulozyten

- Humanes IgE, polyklonal (Acris Antibodies, Hiddenhausen)
- IgE(Fc)-Fragmente (produziert und zur Verfügung gestellt durch E. Spillner, Universität Hamburg, Fachbereich Chemie)
- Laktatpuffer (759,7 mg NaCl, 379,8 mg KCl, 90,08 mg Lactic acid ad 100 ml Aqua dest.), pH 2,58
- RPMI Medium (GIBCO BRL, Uxbridge, Großbritannien)

5.3. Stimulantien

- Anti-IgE (Sigma, St. Louis, USA)
- fMLP (Sigma, St. Louis, USA)
- IL-3 (Sigma, St. Louis, USA)

- homodimeres, rekombinantes IPSE, nicht glykolisiert (produziert und zur Verfügung gestellt durch H. Haas et al., Forschungszentrum Borstel)

5.4. Inhibitoren

- Bisindolylmaleimid I+II (Sigma, St. Louis, USA)
- LY 294002 (Calbiochem, San Diego, USA)
- PD 98059 (Alexis Biochemicals, Läufelfingen, Schweiz)
- PTX (Sigma, St. Louis, USA)
- SB 203580 (Alexis Biochemicals, Läufelfingen, Schweiz)
- U-73122 (Calbiochem, San Diego, USA)
- Wortmannin (Alexis Biochemicals, Läufelfingen, Schweiz)

5.5. Mediatorenbestimmung

- IL-13 Elisa-Kit (Bender MedSystem, Wien, Österreich)
- IL-4 Elisa-Kit (BioSource International, Camarillo, USA)
- LTC₄ Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical, Michigan, USA)
- Microplate Reader Model 450 (Bio-Rad, München)
- Technicon Autoanalyser II (Bran & Luebbe, Hamburg)

5.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

- Acrylamid/bis-Acrylamid 30 % (Sigma, St. Louis, USA)
- Anti-Kaninchen IgG HRP (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Anti-Maus IgG HRP (Cell Signaling, Beverly, USA)
- APS 10% (Sigma, St. Louis, USA)
- ECL-Plus-Lösung (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien)
- Glycerin (Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Merck, Darmstadt)
- Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien)
- Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Kaninchen anti-p38 MAPK (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen anti-ERK-1&2 (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen anti-Syk (Cell Signaling, Beverly, USA)

- Kaninchen anti-phosphoryliertes p38 MAPK (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen anti-phosphoryliertes SHIP1 (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Kaninchen anti-phosphoryliertes Syk (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Laemmli Probenpuffer (Sigma, St. Louis, USA)
- Maus anti-phosphoryliertes ERK-1+2 (Cell Signaling, Beverly, USA)
- SDS Lösung 10 % (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Stripping Reagent Re-blot plus (Chemicon international, Kalifornien, USA)
- TBST (24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl, 10 ml Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) ad 10 l Aqua dest.), pH 7,6
- TEMED (Sigma, St. Louis, USA)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) (Merck, Darmstadt)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl) (Merck, Darmstadt)
- Zell-Lyse-Puffer (Cell Signaling, Beverly, USA)
- Perchlorsäure 70% (Merck, Darmstadt)

5.7. Sonstige Puffer und benötigtes Material

- CMF (kalziumfreier Standardpuffer aus 16 g NaCl, 2 g Glukose, 402 mg KCl, 124,8 mg Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt) sowie 5,72 g HEPES (Sigma, St. Louis, USA) ad 2 l Aqua dest.), pH 7,4
- FHB (132 mg CaCl_2 (Merck, Darmstadt) ad 500 ml CMF (Endkonzentration von CaCl_2 im Puffer: 1mM), pH 7,4
- Methanol (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
- DMSO (Serva, Heidelberg)

6. Methoden

6.1. Aufreinigung basophiler Granulozyten

Das Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie der Universität zu Lübeck stellt aus je 500 ml menschlichem venösen Vollblut circa 70 ml umfassende Buffy Coats her, deren Verwendung die Ethikkommission der Universität zu Lübeck für die vorliegende Dissertation genehmigte (Datum des Genehmigungsschreibens: 20.12.2004, Aktenzeichen: 03-003). Der Buffy Coat enthält, neben allen anderen Blutbestandteilen, Leukozyten in konzentrierter Form, von denen die basophilen Granulozyten in drei Schritten aufgereinigt wurden: durch Dichtegradientenzentrifugation, Elutriation und negative Selektion.

Die Dichtegradientenzentrifugation beruht darauf, dass Ficoll mit 1077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und basophile Granulozyten hat. Diese Dichte ist jedoch kleiner als die von Erythrozyten, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie eosinophilen Granulozyten. Während der Zentrifugation setzen sich die Bestandteile des Buffy Coats, die eine größere Dichte als Ficoll haben, als Pellet ab. Die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) sowie die basophilen Granulozyten hingegen reichern sich als Interphase zwischen Ficoll und Plasma an.

Durchführung:

Drei Zentrifugenröhrchen wurden jeweils mit 15 ml Ficoll Paque befüllt, mit einer äquivalenten Menge an Buffy Coat-Blut überschichtet und zentrifugiert (523 x g, 17 min, 10°C). Die Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Paque wurde abpipettiert, auf 50 ml mit CMF aufgefüllt, resuspendiert und abermals zentrifugiert (460 x g, 8 min, 10°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die herunterzentrifugierten Zellen (Pellet) auf 21 ml mit CMF aufgefüllt und resuspendiert. Die Gesamtbasophilenzahl und deren Reinheit wurde mittels Alcianblau-Färbelösung mikroskopisch ermittelt (6.2., S. 24).

Der Pilotversuch dient der Differenzierung von Releasern und Non-Releasern (3.5.3, S.14).

Durchführung:

Von der nach der Dichtegradientenzentrifugation entstandenen Zellsuspension wurden etwa 200 000 basophile Granulozyten pro Versuchsröhrchen entnommen und mit Anti-IgE in supraoptimaler Konzentration stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Versuch gestoppt und das Histamin gemessen, wobei die Releaser eine Histaminfreisetzung von $\geq 20\%$, die Non-Releaser von $< 5\%$ zeigten.

Die Elutriation (Abb. 5, S.23) ist als Zwischenschritt der Aufreinigung zu verstehen, durch

den die Basophilen von Erythrozyten sowie Thrombozyten ohne Zellverluste getrennt werden können. Sie beruht auf dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation. Dabei sind zwei entgegengesetzt wirkende Kräfte von Bedeutung: Die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors bestimmt wird, und die Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums in Richtung der Rotationsachse durch eine geeichte Pumpe bestimmt wird. Bei Vorgehen nach dem unten aufgeführten Protokoll befinden sich diese beiden Kräfte in einem solchen Verhältnis zueinander, dass die Basophilen in der Elutriationskammer konzentriert werden. Durchführung:

Die nach der Dichtegradientenzentrifugation entstandene Zellsuspension wurde in die Elutriationskammer eingesogen (Pumprate 20 ml/min Elutriationspuffer, Rotorgeschwindigkeit 2400 U/min). Der durch die Elutriationskammer fließende Elutriationspuffer wurde verworfen. Für 12-13 min wurde die Rotorgeschwindigkeit von 2400 U/min beibehalten, dann erfolgte eine Umstellung auf 2250 U/min für eine Laufzeit von 2 min. Nach einer Reduktion auf 2200 U/min für 1 min wurde die Elutriation beendet und 50 ml des Elutriationspuffers mit den darin enthaltenen Zellen gesammelt.

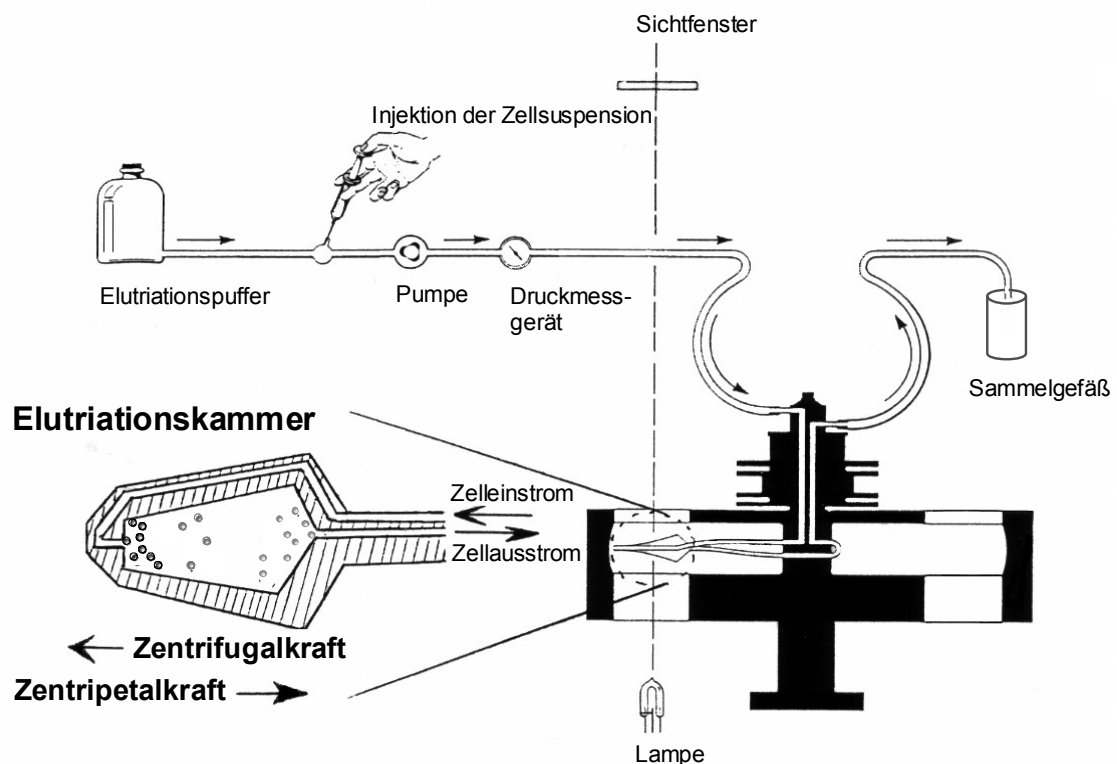


Abbildung 5: Prinzip der Elutriation (aus [5], verändert)

Bei der negativen Selektion (Abb. 6) binden mikroskopisch kleine, eisenhaltige Partikel über eine Brücke aus einem primären und einem sekundären Antikörper an verschiedene nicht basophile Zellen in der Zellsuspension. B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen, erythroide Zellen, Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten sowie T-Zellen werden auf diese Weise markiert. Die Suspension wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die aus kunststoffumhüllten, magnetisch aufladbaren Fasern besteht. Um die Säule herum erzeugt ein Separator ein starkes Magnetfeld. Während die markierten Zellen an der Säulenmatrix haften, werden die nicht markierten basophilen Granulozyten hochrein gesammelt.

Dem Protokoll des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wurde gefolgt [25].

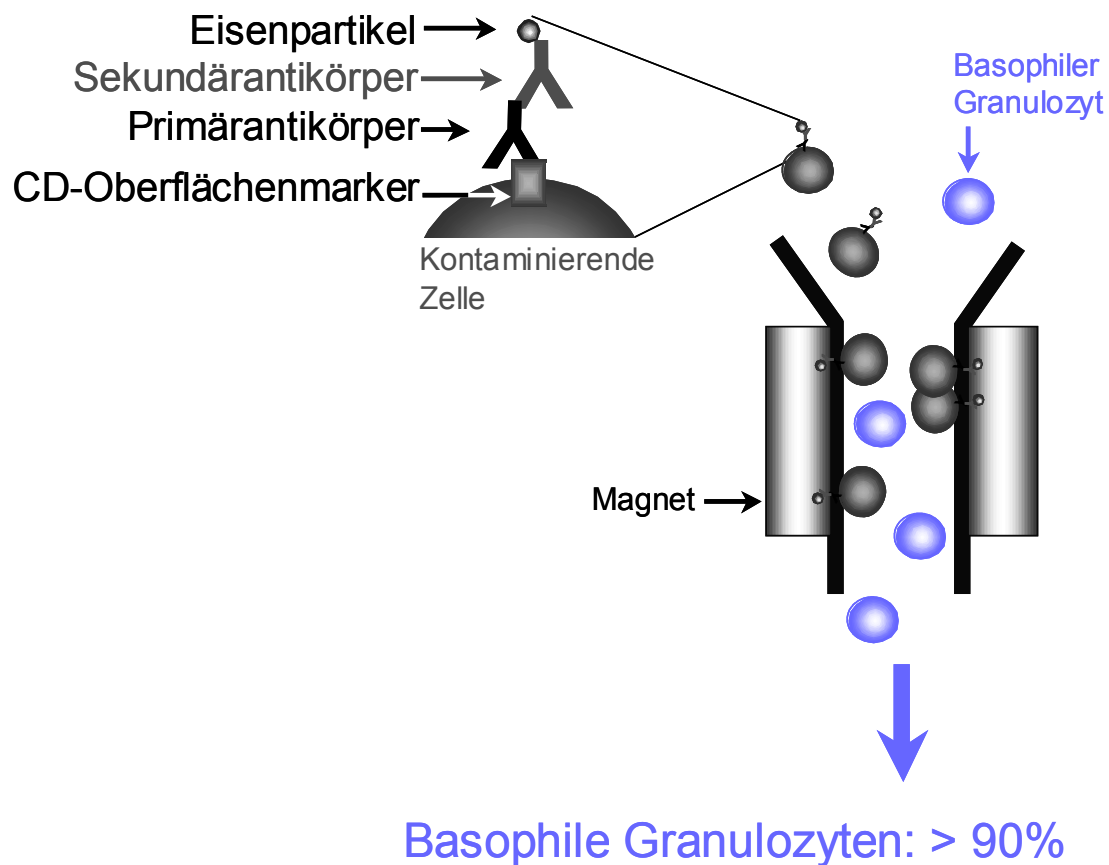


Abbildung 6: Prinzip der negativen Selektion (MACS)

6.2. Bestimmung von Zellzahl, Reinheit und Viabilität der Basophilen

Die Quantifizierung der basophilen Granulozyten erfolgte mittels Alcianblau-Färbung nach Gilbert und Ornstein [34]. Diese besteht aus 65µl EDTA (0,1%) in NaCl, 5 µl HCl (1M)

und 65 µl einer Alcianblau-Suspension (76 mg Cetyl Pyridinium Chlorid, 700 mg Lanthanum Chlorid x 6 H₂O, 900 mg NaCl, 21 µl Tween 20, 143 mg Alcianblau ad 100 ml Aqua dest.). Zu dieser Alcianblau-Färbelösung wurden 10 µl der Zellsuspension gegeben. Nach circa 5 min färbten sich die basophilen Granulozyten blau an und konnten mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

Viabilitätsmessungen erfolgten mittels Tryptanblaulösung, die im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension gemischt wurde. Nach zehnminütiger Inkubation wurde die Viabilität im Haemozytometer gemessen, wobei die Zellen, die nicht blau gefärbt waren, als viabel angesehen werden konnten.

6.3. Stimulation der basophilen Granulozyten

6.3.1. Stimulationsprotokoll

Die aufgereinigten basophilen Granulozyten wurden in kalziumhaltigen Puffer (FHB) gebracht und die Zellsuspension, 400 µl pro Röhrchen, 15 min im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Es folgte die Stimulation der Zellen mit jeweils 50 µl der verwendeten Stimulantien. Die in den einzelnen Versuchen verwendeten Stimulantienkonzentrationen wurden durch Verdünnung mit FHB erreicht. Soweit nicht anders im Ergebnisteil angegeben, betrugen die verwendeten Konzentrationen für Anti-IgE 1/ 30000-Verdünnung, für IPSE 300 ng/ml und für fmlp 50 nM. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C für die Histamin- und LTC₄-Bestimmung, sowie 5 Stunden bei 37°C für die Interleukinbestimmung, wurde die weitere Reaktion der Zellen unterbunden. Die Art der Termination des Versuchs richtete sich nach dem Mediator, der bestimmt werden sollte: Bei der Histaminbestimmung wurde nach der Inkubation die Reaktion durch Zugabe von 1 ml CMF und anschließender Zentrifugation (902 x g, 2 min, 10°C) beendet. Die Überstände wurden abpipettiert und im Technicon Autoanalyser II (Bran & Luebbe, Hamburg) gemäß Gebrauchsanleitung des Herstellers gemessen. Nach Lyse der Pellets mit 50 µl Perchlorsäure pro Versuchsröhrchen und Zugabe von 1,5 ml CMF wurden diese zentrifugiert (902 x g, 5 min, 10°C), um ausgeflockte Proteine und Zelltrümmer zu eliminieren, und ebenfalls im Autoanalyser gemessen. Bei LTC₄ und den Zytokinen wurde nach Inkubation die Reaktion durch Zentrifugation (902 x g, 2 min, 10°C) terminiert und die entstandenen Überstände bei -30°C verwahrt. Für die Bestimmung von Signaltransduktionsproteinen der intrazellulären IgE-vermittelten Signalkaskade wurde die Reaktion nach der Inkubationszeit durch rasche Abkühlung der Proben mittels Eiswasser (Dauer: 10 sec) und anschließender Zentrifugation (73 x g, 30 sec, Raumtemperatur)

terminiert. Die Überstände wurden abpipettiert und für die Histaminmessungen verwendet. Die Pellets wurden in 20 µl Lysepuffer (1:1-Gemisch aus kommerziellem Zell-Lyse-Puffer und Laemmli-Probenpuffer) resuspendiert, für 4 min in kochendem Wasser erhitzt und bis zur Bestimmung bei –80°C verwahrt.

6.3.2. Modifikationen des Stimulationsprotokolls

Die Kinetikversuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Inkubationszeiten variierten.

Bei den Inhibitionsversuchen wurden die Zellen nach Erwärmung im Wasserbad mit 50 µl des jeweiligen Hemmstoffes 15 min, bei der Verwendung von PTX 2 bis 3 Stunden vorinkubiert, anschließend stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen der Hemmstoffe betrugen 5 µM, außer bei Wm (20 nM) und PTX (1 µg/ml). Die Konzentrationen wurden durch Lösen der Inhibitoren in DMSO (10 mM) und anschließender Verdünnung in FHB erreicht.

Strippen bedeutet, die natürlicherweise auf der Zelloberfläche der basophilen Granulozyten vorkommendem IgE- und IgG-Moleküle zu entfernen. Resensibilisieren der gestrippten Basophilen ist das Wiederzuführen von IgE-Molekülen, die dann an den entsprechenden Rezeptoren der Zelloberfläche binden. Das Strippen der basophilen Granulozyten erfolgte nach folgendem Protokoll: Die Zellsuspension mit den aufgereinigten Zellen wurde zentrifugiert (460 x g, 4 min, 10°C). Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 3 ml Laktatpuffer resuspendiert und 3 min unter gelegentlichem Resuspendieren auf Eis belassen. Die Strippingreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 20 ml kaltem Elutriationspuffer und Zentrifugation (460 x g, 4 min, 10°C) beendet. Ein weiterer Waschgang mit Elutriationspuffer folgte (460 x g, 4 min, 10°C). Anschließend wurden die Zellen in RPMI resuspendiert, auf die Versuchsröhrchen aufgeteilt und ein weiteres Mal zentrifugiert (460 x g, 4 min, 10°C). Diejenigen Zellen, die in gestripptem Zustand bleiben sollten, wurden abermals in RPMI resuspendiert. Die Zellen, die resensibilisiert werden sollten, wurden in IgE-haltigem (1 µg/ml), beziehungsweise IgE(Fc)-Fragment-haltigem (1µg/ml) Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Resuspension und die anschließende Zentrifugation (401 x g, 2 min, 10°C) der Zellen. Einem letzten Waschgang mit Elutriationspuffer (460 x g, 4 min, 10°C) und der Resuspension in FHB folgte die Stimulation der Zellen nach obigem Protokoll (6.3.1., S. 25).

Die IPSE-IgE-Gemische wurden nach folgendem Protokoll erstellt: IPSE (0,15 mg/ml)

wurde 1:2 in FHB verdünnt, was eine Stammlösung von 50 µg/ml ergab. Das IgE wurde auf eine Stammlösung von 100 µg/ml oder 50 µg/ml verdünnt. Ausgehend von einem relativen Massenverhältnis von 32:180 (IPSE:IgE) wurden die folgenden Verdünnungen vorgenommen: Für 0,5:1=10µl IPSE (immer 50 µg/ml) + 56,3 µl IgE (100 µg/ml). Für 1:1=10 µl IPSE + 56,3 µl IgE (50 µg/ml). Für 1:2=10 µl IPSE + 28,3 µl IgE (50 µg/ml) + 28,3 µl Puffer et cetera einschließlich IPSE- und IgE-Kontrollen, die in einem äquivalenten Puffervolumen verdünnt wurden. 50 µl von diesen Lösungen wurden zu 450 µl Zellsuspension gegeben. Auf diese Weise war die hinzugefügte Menge an IPSE die Gleiche für jedes Versuchsröhrchen (1 µg/ml Endkonzentration).

6.4. Mediatorenbestimmung

6.4.1. Histamin

Zur Auswertung der Histaminmenge diente ein Verfahren der Methode nach Shore et al. [94]. Bei der Reaktion zwischen O-phthaldialdehyd (OPT) und Histamin unter basischen Bedingungen entsteht ein fluoreszierendes Kondensationsprodukt, welches spektrofluorometrisch gemessen werden kann. Das Sensitivitätslimit liegt bei 0,5 ng/ml Histamin. Die Ergebnisse sind in Prozent der Histaminfreisetzung im Überstand vom Gesamthistamingehalt aus Überstand und Pellet angegeben.

6.4.2. LTC₄ und Zytokine

Diese Mediatoren wurden mit Hilfe des ELISA-Prinzips bestimmt. Die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper liegen an eine Trägersubstanz gebunden vor. Bei Inkubation mit der Probe bindet das Antigen an diese Antikörper. An den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex bindet ein HRP-konjugierter Antikörper, der gegen den Antikörper gerichtet ist. Ein Substrat wird hinzugefügt, welches mit HRP ein farbiges Produkt bildet. Je mehr HRP sich mit dem Substrat verbindet, desto intensiver wird die Färbung. Somit ist die Stärke der Färbung proportional zu der in der Probe vorhandenen Antigenkonzentration. Diese wird mittels photometrischer Messung (Microplate Reader) durch Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität ermittelt. Die LTC₄-Bestimmung erfolgte mittels kommerzieller Enzym Immunoassay Kits und die Interleukinbestimmung mittels kommerzieller ELISA-Kits nach Protokoll des Herstellers und in Doppelbestimmung. Das Sensitivitätslimit liegt bei 1 pg/ml sowohl für IL-13 als auch für IL-4. Die LTC₄- und Interleukin-Angaben sind ausgedrückt als Prozenthemmung oder als pg/10⁶ basophile Granulozyten.

6.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und *Western Blotting*

Es wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) mit anschließendem *Western Blotting* angewandt, um die in den Proben enthaltenen Signaltransduktionsproteine zu differenzieren und zu quantifizieren (Abb. 7).

Bei der Gelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihrer elektrischen Ladung im Gleichstromfeld (50 mV, 3 Stunden) aufgetrennt. Dabei wandern kleinere Proteine innerhalb eines bestimmten Zeitraums weiter als größere. Eine Größenbestimmung der Proteine in der Probe ist durch Vergleich mit einem kommerziellen *Kaleidoscope Prestained Standard* bekannter Molekulargewichte und Farben möglich [66].

Durchführung:

Für die Herstellung eines Gels wurden 2 Glasplatten so verbunden, dass ein Spalt zwischen ihnen entstand, in den die zuvor angesetzte, noch nicht polymerisierte Trenngel-Lösung (Tab. 1, S. 29) gegossen wurde. Es blieben 2 cm bis zum Abschluss der Platten frei. In diesen Teil wurde nach Polymerisation der Trenngellösung die Sammelgellösung (Tab. 1, S. 29) gegossen, in die anschließend ein Plastikkamm gesteckt wurde, so dass sich Probentaschen à 30 µl bildeten. Nach Polymerisation der Sammelgellösung wurde die Elektrophoresekammer mit Elektrodenpuffer gefüllt, der Plastikkamm entfernt, die Proben hineinpipettiert und der Gleichstrom appliziert.

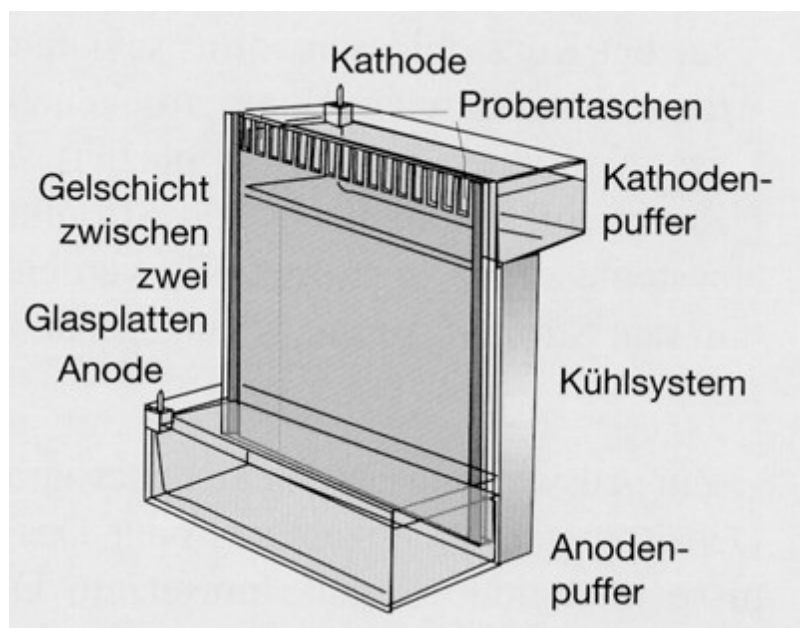


Abbildung 7: Experimenteller Aufbau der SDS-PAGE (aus [66])

	Sammelgel (5%)	Trenngel (12%)
Aqua dest.	2,94 ml	3,5 ml
Tris-Base (1,5 M, pH 8,8)	-	1,78 ml
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	700 µl	-
Acrylamid/bis-Acrylamid (30%)	812 µl	5,28 ml
Glycerin	250 µl	660 µl
Glycin (1M)	-	1,32 ml
SDS-Lösung (10%)	200 µl	528 µl
TEMED	12 µl	16 µl
APS (10%)	100 µl	200 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Western Blotting:

Nach Auftrennung der Proteine in dem Gel werden anschließend die Proteine auf eine Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern inkubiert, die jeweils ein bestimmtes Protein markieren.

Durchführung:

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entfernt und eine Nitrozellulosemembran auf dieselben gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer fixiert. Das anschließende Anlegen von Gleichstrom großer Stärke für 72 min bewirkte die Übertragung der Proteine auf die Membran. Die noch unbesetzten Stellen auf derselben wurden mittels fünfprozentiger Magermilch, gelöst in TBST, blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach einem Waschgang (3 x 5 min mit TBST) wurde die Nitrozellulosemembran in eine Primärantikörperlösung gebracht und damit inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden optimiert und sind je nach Antikörper unterschiedlich. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für ungefähr eine Stunde. Dieser ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an HRP gekoppelt. Anschließend wurde nach einem weiteren Waschgang die Membran mit ECL-Lösung beschichtet. Diese reagiert mit Peroxidase opaleszierend. Die benetzte und mit Kopierfolie abgedeckte Nitrozellulosemembran wurde für circa 15 min in einer Dunkelkammer belassen, wobei ein unbelichteter Röntgenfilm auf ihr platziert wurde. Die auf dem entwickelten Film sichtbaren Banden konnten zur Kontrolle mit dem Kaleidoskope Prestained Standard und untereinander verglichen werden. Nach der Detektion der Banden wurden die Magermilchproteine und Antikörper mit Hilfe des *Re-blot plus reagent* nach Anleitung des Herstellers von den

Membranen entfernt. Die Membranen wurden gewaschen (4 x 5 min in TBST) und erneut mit anderen Antikörpern inkubiert. Die entstandenen Banden wurden eingescannt und durch densitometrische Messung gemittelt.

6.6. Statistik

Sämtliche Statistiken wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel 2000 erarbeitet. Die Signifikanzen wurden mittels Student t-Test erhoben; Werte mit $p \geq 0,05$ werden als nicht signifikant (in den Abbildungen mit NS gekennzeichnet), Werte mit $p < 0,05$ werden als signifikant (in den Abbildungen mit * gekennzeichnet), Werte mit $p < 0,01$ als hochsignifikant bezeichnet (in den Abbildungen mit ** gekennzeichnet). Alle Werte sind als Mittelwerte $\pm$ SEM für den jeweiligen Stichprobenumfang n angegeben.

7. Ergebnisse

7.1. Reinheit und Viabilität der basophilen Granulozyten

Die durchgeführte Aufreinigung der basophilen Granulozyten steigerte deren Reinheit von 0,7 % $\pm$ 0,4 im Buffy Coat auf 94 % $\pm$ 5.

Mit der Dichtegradientenzentrifugation erreichten die Basophilenreinheiten 1 bis 5%. Mit Hilfe der Elutriation nach oben beschriebenem Prozedere ließ sich die Reinheit der basophilen Granulozyten verdrei- bis verfünffachen ausgehend von den Zellen, die wir durch die Dichtegradientenzentrifugation erhielten. Nach der negativen Selektion mittels MACS wurden Endreinheiten von 94 % $\pm$ 5 erreicht.

Die Viabilität der basophilen Granulozyten lag bei 97 % $\pm$ 2.

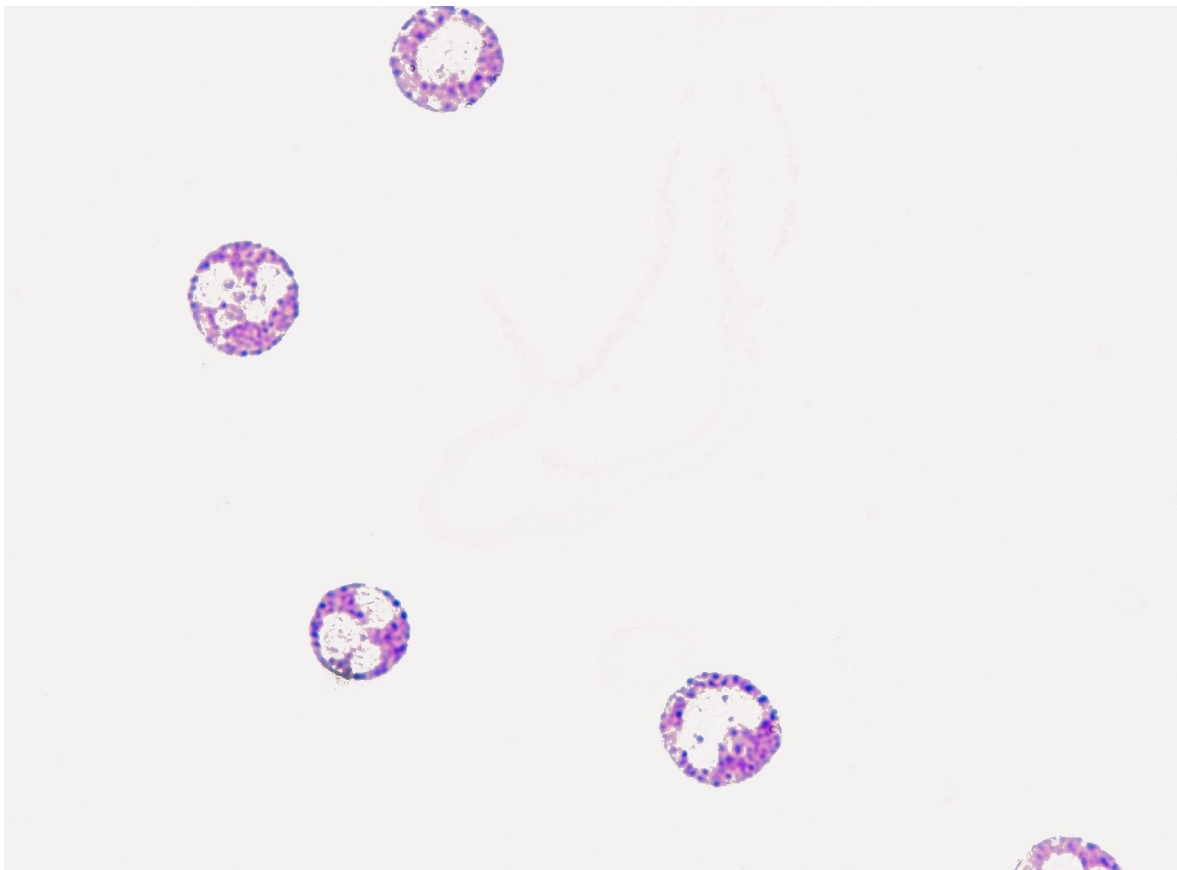


Abbildung 8: Aufgereinigte menschliche basophile Granulozyten (99,5%), mit May-Grünwald gefärbt (Vergrößerung x 359)

7.2. IPSE ist ein IgE-abhängiger Basophilenaktivator

Gestrippte basophile Granulozyten ließen sich signifikant schlechter durch Anti-IgE und IPSE stimulieren als native (für Anti-IgE $p=0,0004$, für IPSE $p=0,0001$) oder resensibilisierte (für Anti-IgE $p=9 \times 10^{-6}$, für IPSE $p=3 \times 10^{-5}$). Bei Stimulation der Basophilen mit fMLP ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen nativen, gestrippten und resensibilisierten Basophilen in der Histaminfreisetzung (Abb. 9, S. 33).

Non-Releaser ließen sich signifikant schlechter durch Anti-IgE und IPSE stimulieren als Releaser (Abb. 10 A+B, S. 34). Durch die Stimulation mit fMLP (Abb. 10 C, S. 35) dagegen war kein signifikanter Unterschied in der Histaminfreisetzung zu beobachten ($p=0,1-0,6$).

Wir fanden eine Abhängigkeit der Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten vom extrazellulären Kalziumeinstrom in die Zelle bei Stimulation mit Anti-IgE und IPSE (Abb. 11, S. 36).

Weiterhin ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Histaminfreisetzung sowohl nach erneuter als auch ohne erneute Stimulation mit Anti-IgE. Bei Stimulation mit IPSE ist dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 12, S. 37). Außerdem zeigten die mit IPSE stimulierten Zellen, die nicht restimuliert wurden, eine signifikant höhere Histaminfreisetzung als die vergleichbaren mit Anti-IgE stimulierten Zellen ($p=0,009$).

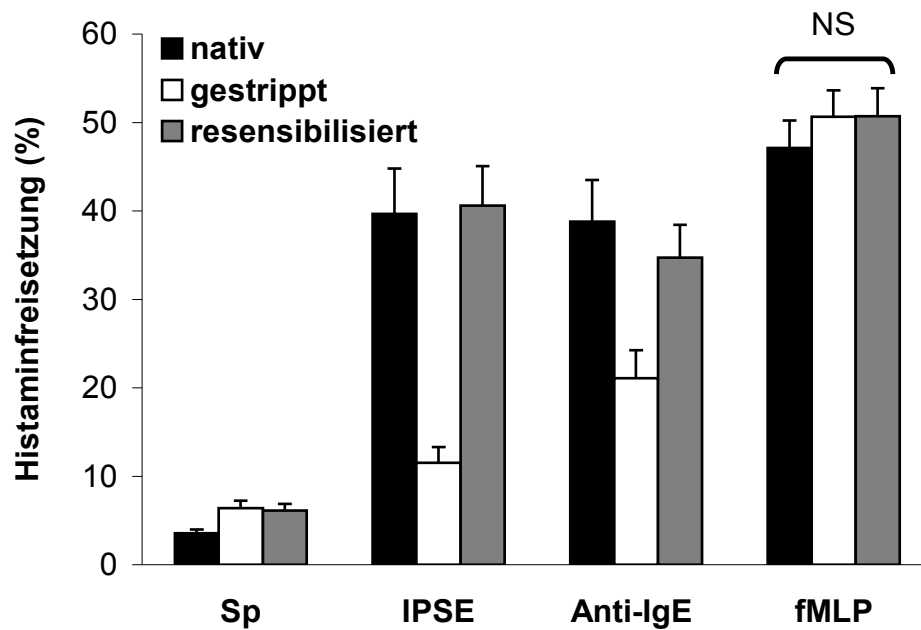
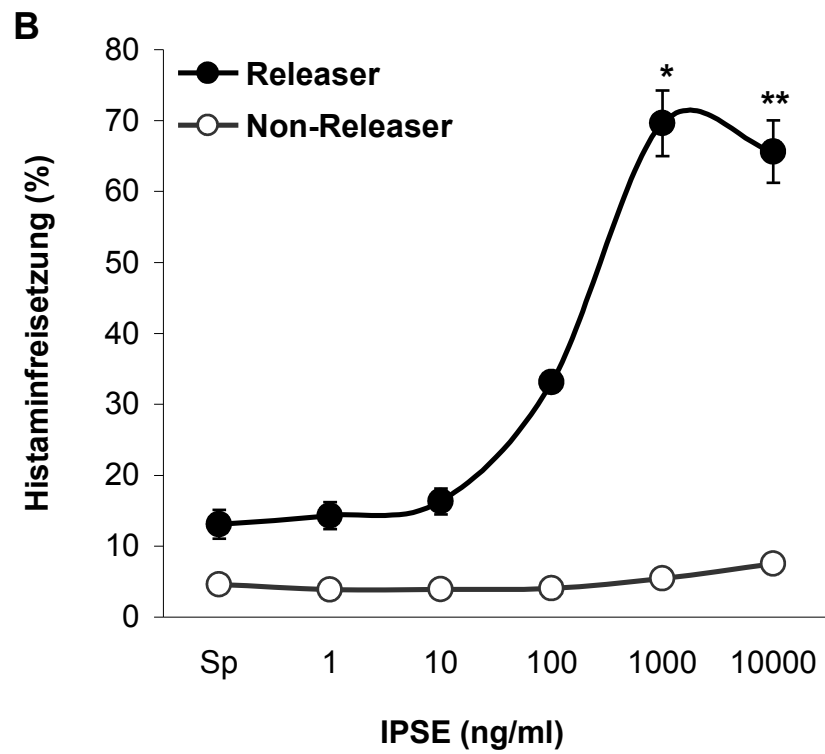
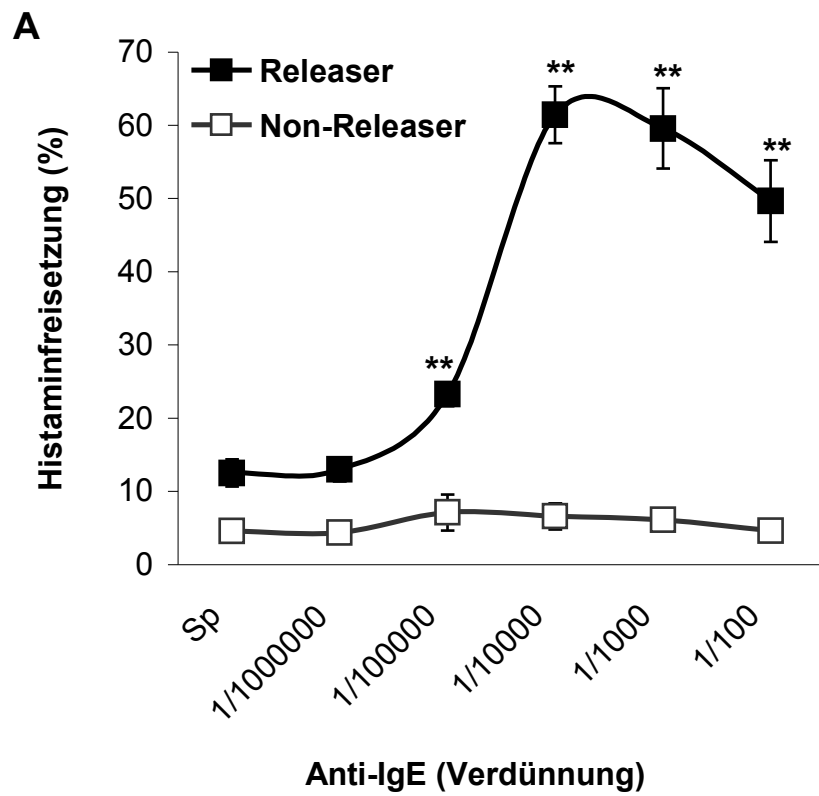


Abbildung 9: Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten in nativem, gestripptem und resensibilisiertem Zustand durch Stimulation mit Anti-IgE, IPSE und fMLP. Die Zellen wurden nativ belassen, gestrippt oder resensibilisiert, stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (NS=nicht signifikant, n=10). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation



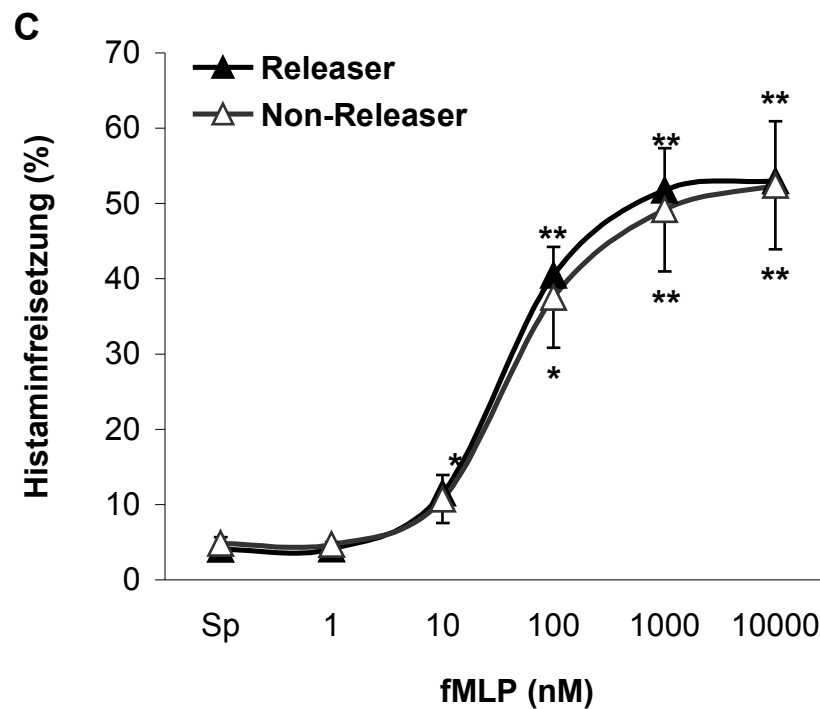


Abbildung 10: dosisabhängige Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE (A), IPSE (B) und fMLP (C) bei Releasern und Non-Releasern. Die Zellen wurden stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (* = signifikante, ** = hochsignifikante Histaminfreisetzung im Vergleich zu Sp, n=5). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

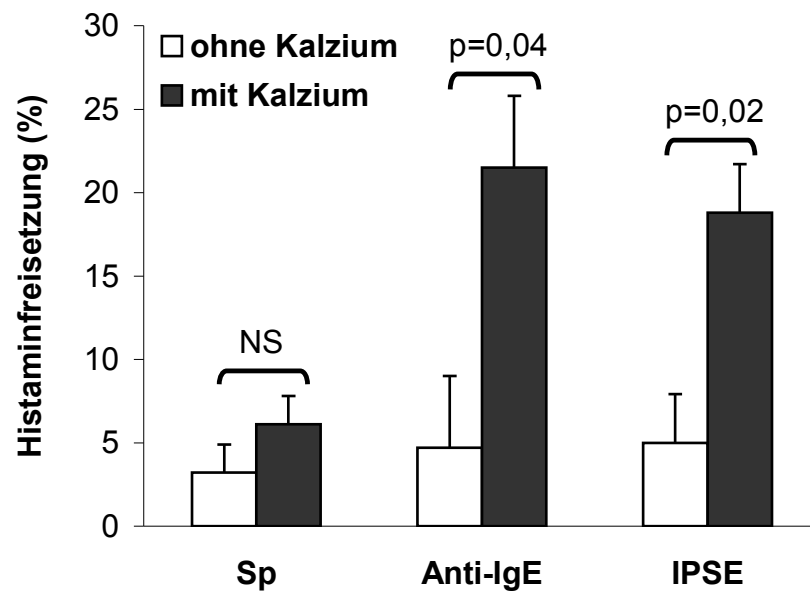


Abbildung 11: Histaminfreisetzung aus menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE und IPSE in An- oder Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium. Die Zellen wurden in kalziumfreiem Puffer nach 15 min Aufwärmzeit stimuliert, 30 min bei 37°C inkubiert, die Reaktion durch Zentrifugation beendet und die Überstände zur Histaminbestimmung gesammelt. Es folgte die Resuspension der Zellen in kalziumhaltigem Puffer und erneute Inkubation für 30 min bei 37°C. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (NS=nicht signifikant, n=5). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

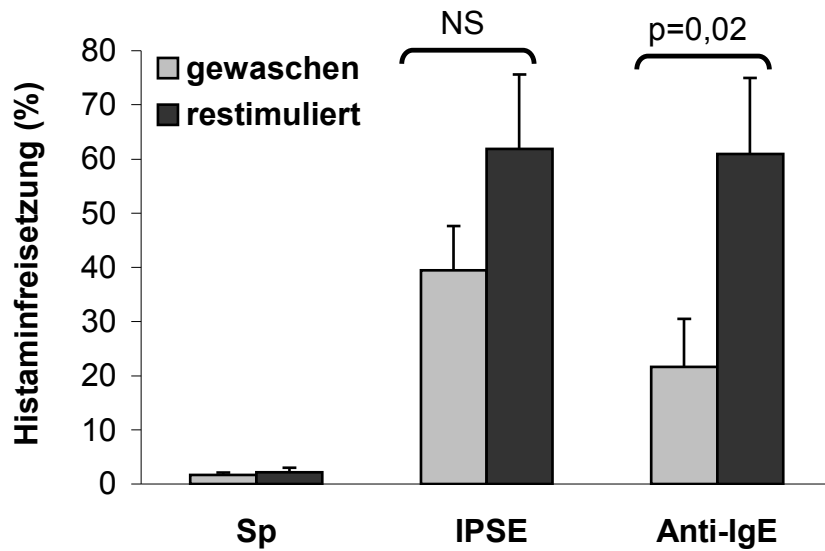


Abbildung 12: Effekt des Entfernens von IPSE oder Anti-IgE nach kurzer (30 sec) Stimulation der menschlichen basophilen Granulozyten verglichen mit Zellen, die mit demselben Stimulus restimuliert wurden. Nach Erwärmung auf 37°C wurden die basophilen Granulozyten stimuliert und nur 30 sec damit inkubiert. Es folgte die Reaktionbeendigung durch Pufferzugabe und Zentrifugation (6.3.1., S. 25) und eine weitere Inkubationszeit von 30 min bei 37°C in jeweils An- oder Abwesenheit des Stimulus. Die Prozentwerte der übrigbleibenden Histaminfreisetzungsfähigkeit von IPSE und Anti-IgE nach Stimulusentfernung wurden aus dem Vergleich zur Freisetzung bei Restimulation errechnet. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (NS=nicht signifikant, n=3). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

7.3. Signaltransduktionsversuche

Die Histaminfreisetzung durch Anti-IgE und IPSE ließ sich signifikant durch Wortmannin, LY 294002, SB 203580 und U-73122 hemmen. Die Vorinkubation mit PD 98059 und Bisindolylmaleimid I+II ergab keine signifikante Hemmung der Histaminfreisetzung (Abb. 13).

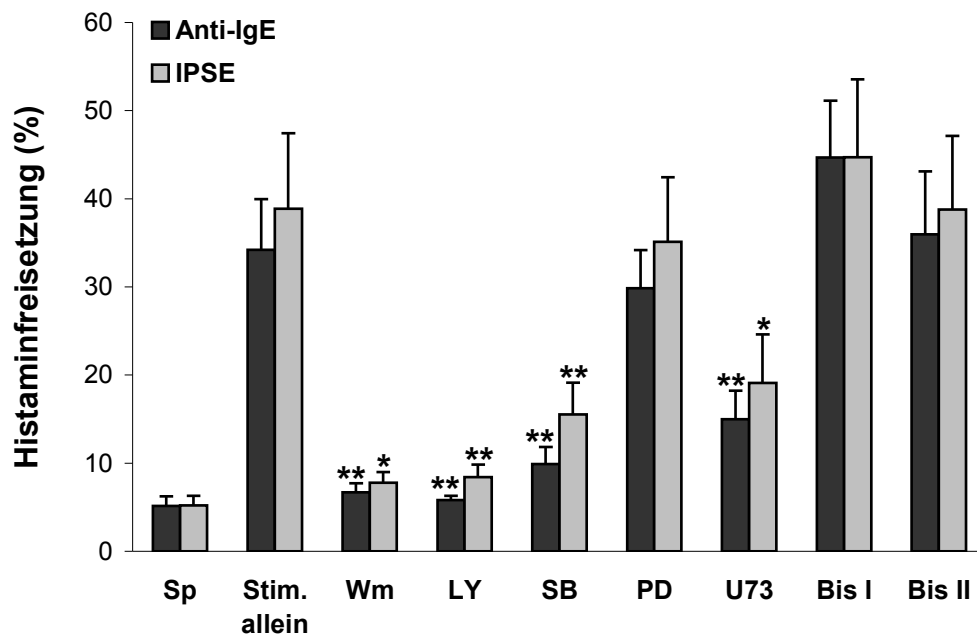


Abbildung 13: Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE und IPSE. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert (Konzentration von Wm: 20 nM, bei allen anderen Inhibitoren: 5 μ M), anschließend stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (* = signifikant, ** = hochsignifikant). Signifikanzen sind vom Unterschied der Freisetzung ohne Inhibition (Stim.allein) zur Freisetzung mit Inhibitorvorinkubation angegeben (n=7). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

7.4. IPSE ist PTX-insensitiv

IPSE ließ sich, wie Abbildung 14 zeigt, nicht signifikant durch PTX hemmen ($p=0,08$).

Auch Anti-IgE konnte nicht durch PTX gehemmt werden ($p=0,15$). fMLP hingegen wurde durch PTX signifikant gehemmt.

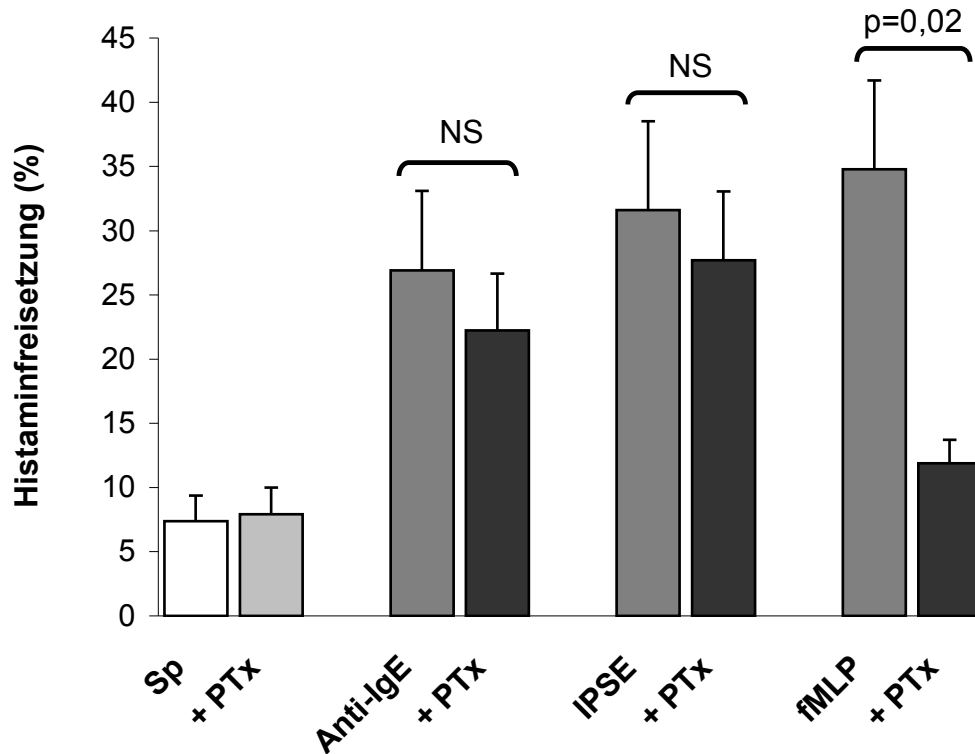


Abbildung 14: Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE, IPSE und fMLP. Ein Teil der Zellen wurde zwei bis drei Stunden mit PTX (1 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert, alle Zellen anschließend stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (NS=nicht signifikant, $n=7$). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

7.5. Funktionelle Untersuchungen

Die Dosiswirkungskurven der Histamin- und Zytokinausschüttung nach Stimulation mit Anti-IgE (Abb. 15 B, S. 41) und IPSE (Abb. 16 B, S. 42) sind glockenförmig. Ein ähnliches Muster konnte bei der Aktivierung (Phosphorylierung) der Signaltransduktionsproteine p38 MAPK und ERK 1+2 in den basophilen Granulozyten beobachtet werden, die mit steigenden Konzentrationen von Anti-IgE (Abb. 15 A, S. 41) und IPSE (Abb. 16 A, S. 42) stimuliert wurden. Auffällig ist, dass supraoptimale Konzentrationen von Anti-IgE und IPSE zu einem schnellen Abfall der Zytokinproduktion führen, wohingegen die Histaminfreisetzung dadurch weniger beeinflusst wird (Abb. 15 B und 16 B).

Die Kinetik der Histaminfreisetzung von Anti-IgE und IPSE unterscheiden sich in ihrem Grundmuster nicht, wenn die Konzentrationen so angeglichen werden, dass sie dieselbe maximale Histaminfreisetzung ergeben (Abb. 17, S. 43). Eine Erklärung dazu findet sich in der Diskussion (8.3., S. 52). Der einzige Unterschied ist, dass IPSE signifikant schneller ($p=0,03$ für 1 min, $p=0,03$ für 5 min) zu einer Histaminausschüttung führt als Anti-IgE.

Abbildung 18 A, 19 A und 20 A (S. 44-46) zeigen jeweils einen durch denselben Versuch entstandenen repräsentativen Western Blot von Syk, p38 MAPK und ERK 1+2 in deren aktiviertem (phosphoryliertem) Zustand sowie deren Gesamtgehalt in der Zelle. Die Western Blots der drei Signaltransduktionsproteine weisen das gleiche Muster auf wie die densitometrischen Daten (Abb. 18 B, 19 B, 20 B, S. 44-46) und die Histamindaten.

Ein früher Zeitpunkt in der Kinetik geht mit einer geringeren Menge an exprimiertem Protein bei p38MAPK und vor allem bei ERK 1+2 einher (Abb. 19 B, 20 B). Bei Syk ist die Menge an exprimiertem Protein von Anfang an hoch (Abb. 18 B).

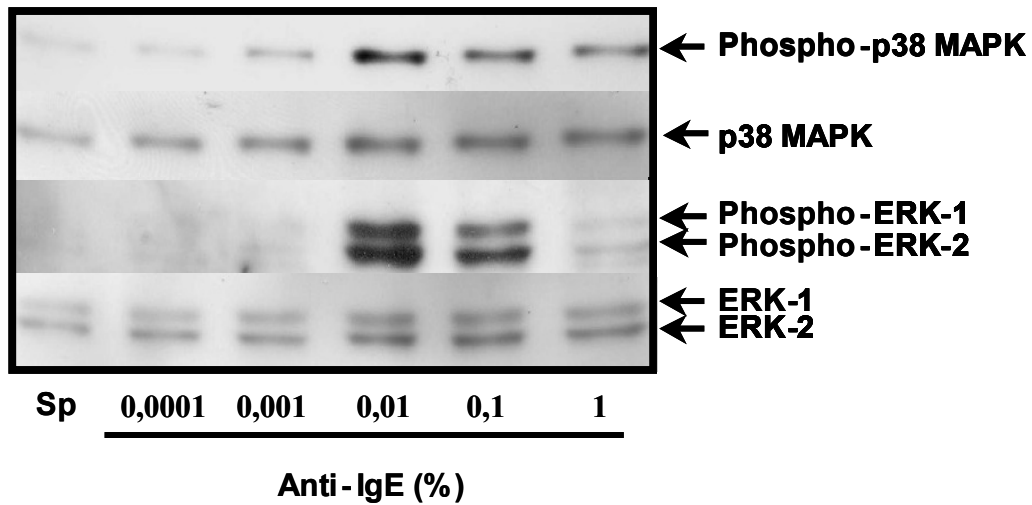
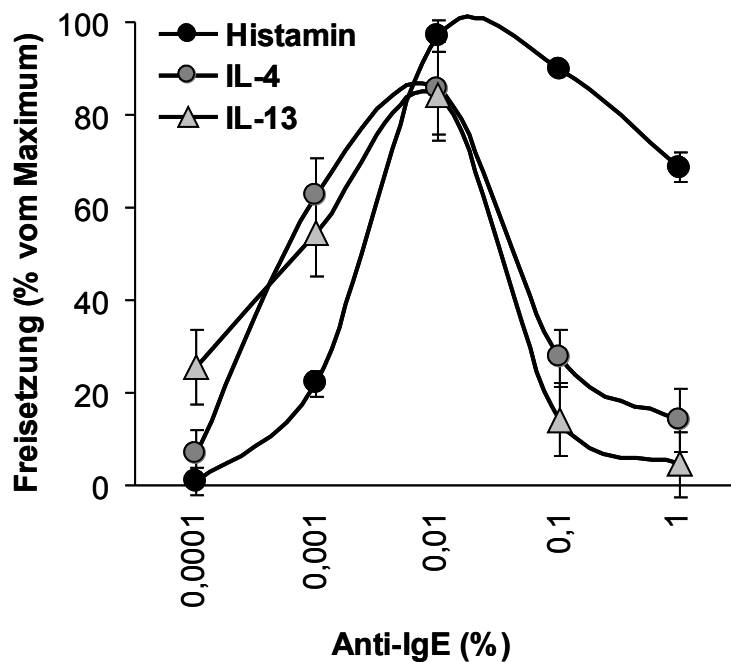
A**B**

Abbildung 15: dosisabhängige Histamin- und Interleukinfreisetzung (B) sowie jeweils ein repräsentativer Western Blot von p38 MAPK und ERK 1+2 in aktivierter Form sowie deren Gesamtgehalt in der Zelle (A) von menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE. Die Zellen wurden stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (n=7). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

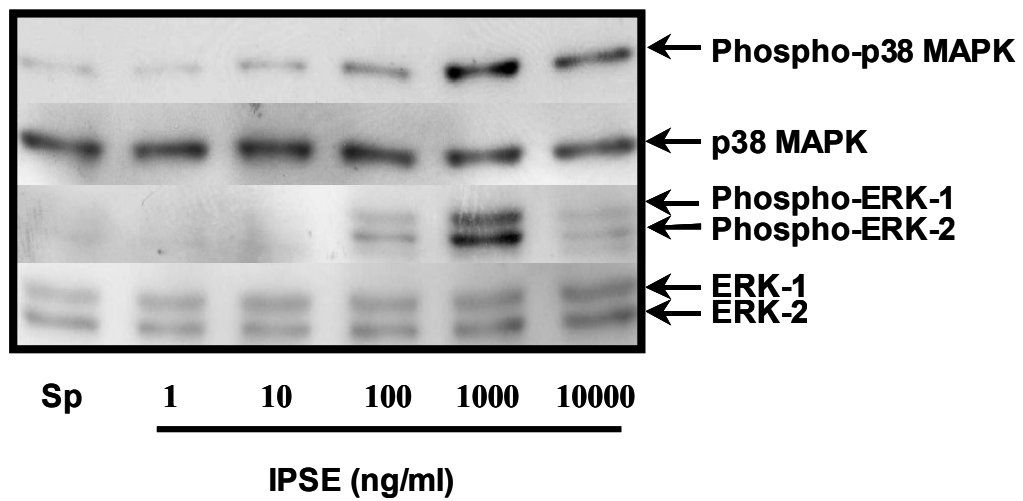
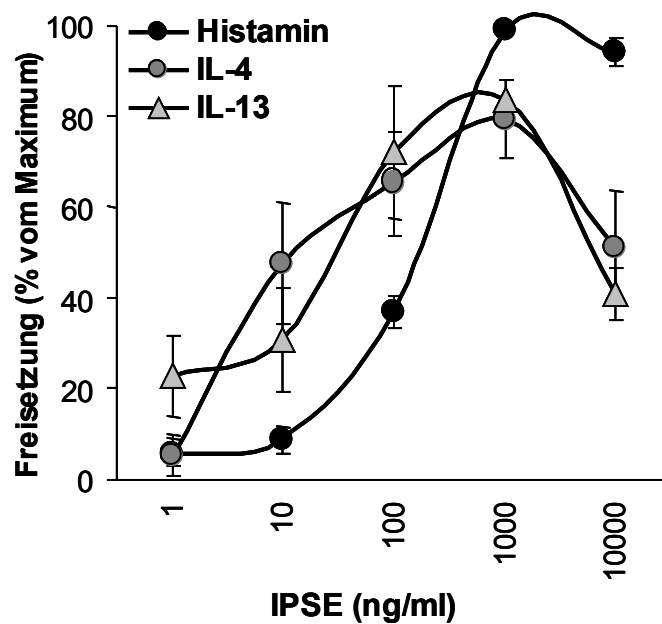
A**B**

Abbildung 16: dosisabhängige Histamin- und Interleukinfreisetzung (B) sowie jeweils ein repräsentativer Western Blot von p38 MAPK und ERK 1+2 in aktivierter Form sowie deren Gesamtgehalt in der Zelle (A) von menschlichen basophilen Granulozyten durch IPSE. Die Zellen wurden stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (n=7). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

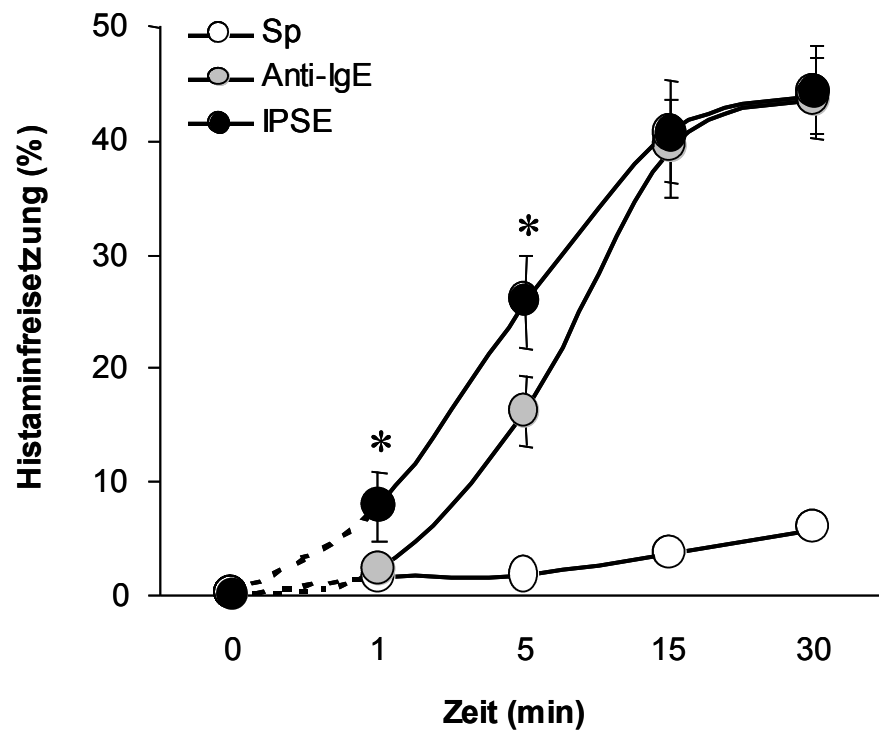


Abbildung 17: zeitabhängige Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten durch Anti-IgE und IPSE. Die Zellen wurden stimuliert und 5 min, 10 min, 15 min oder 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (* = signifikant). Signifikanzen sind angegeben vom Unterschied zwischen der Kinetik nach Stimulation mit Anti-IgE und der Kinetik nach Stimulation mit IPSE (n=9). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

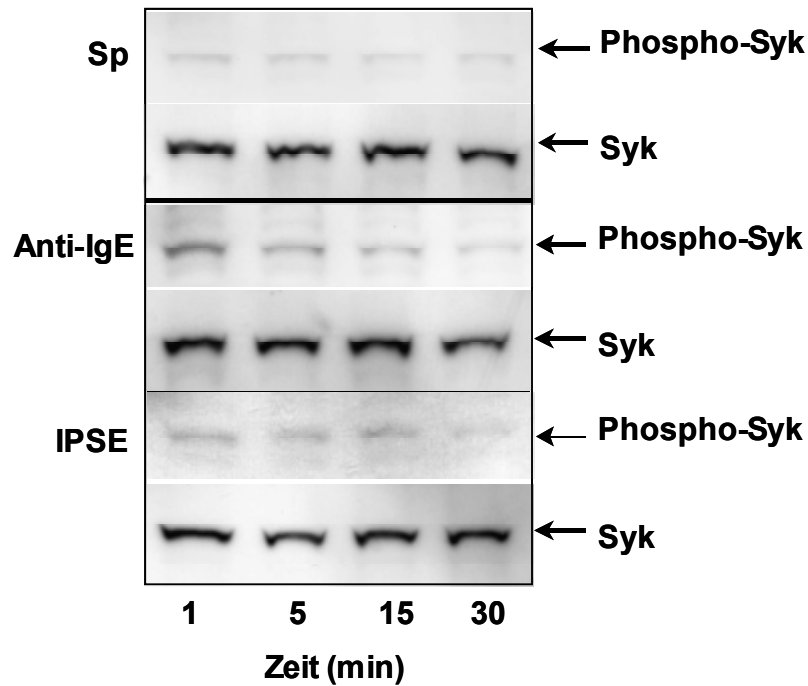
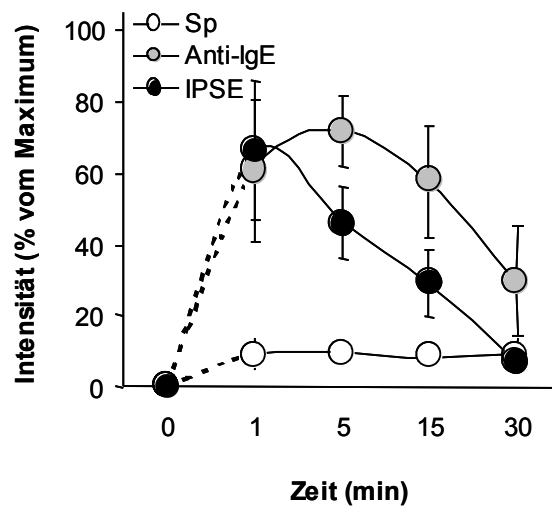
A**B**

Abbildung 18: vergleichende Signalkinetik der Syk von Anti-IgE versus IPSE. Western Blots von der aktivierten Form sowie von dem Gesamtgehalt des Signalproteins in der Zelle (A) und die zugehörigen densitometrische Daten (B). Die Zellen wurden stimuliert und 5 min, 10 min, 15 min oder 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (n=9). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

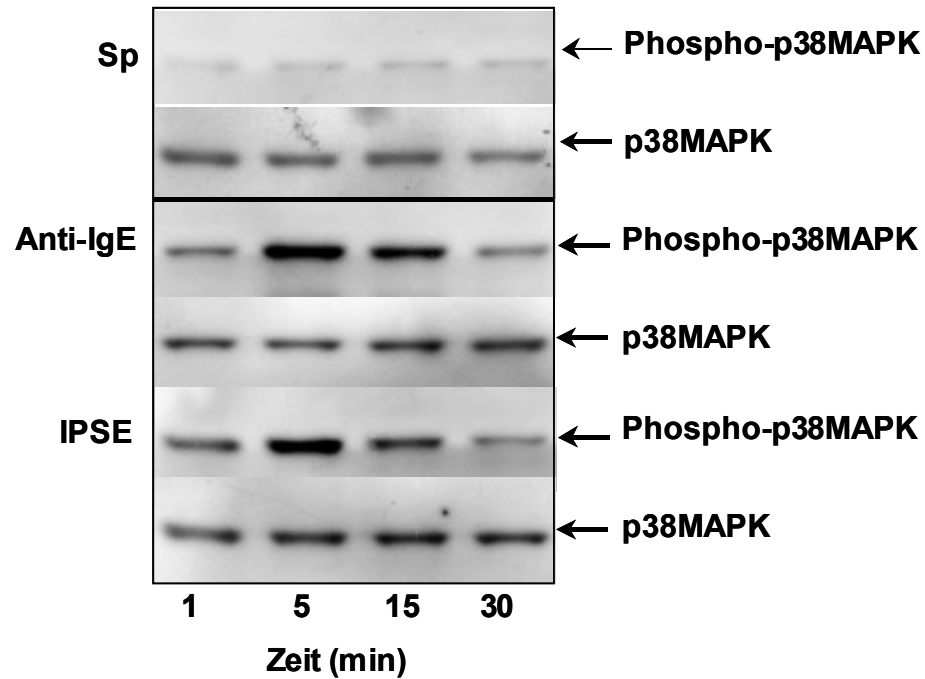
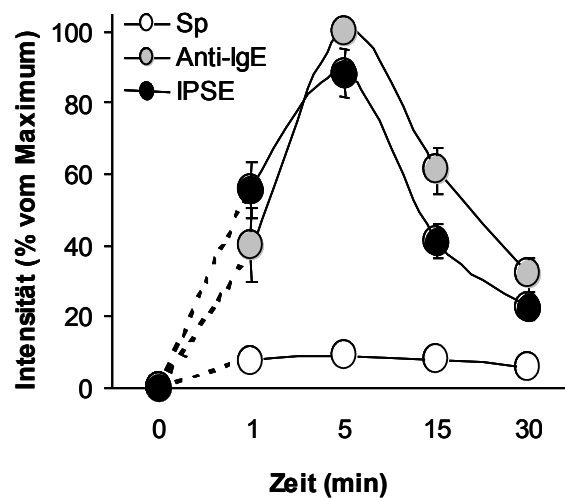
A**B**

Abbildung 19: vergleichende Signalkinetik der p38 MAPK von Anti-IgE versus IPSE. Western Blots von der aktivierten Form sowie von dem Gesamtgehalt des Signalproteins in der Zelle (A) und die zugehörigen densitometrische Daten (B). Die Zellen wurden stimuliert und 5 min, 10 min, 15 min oder 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (n=9). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

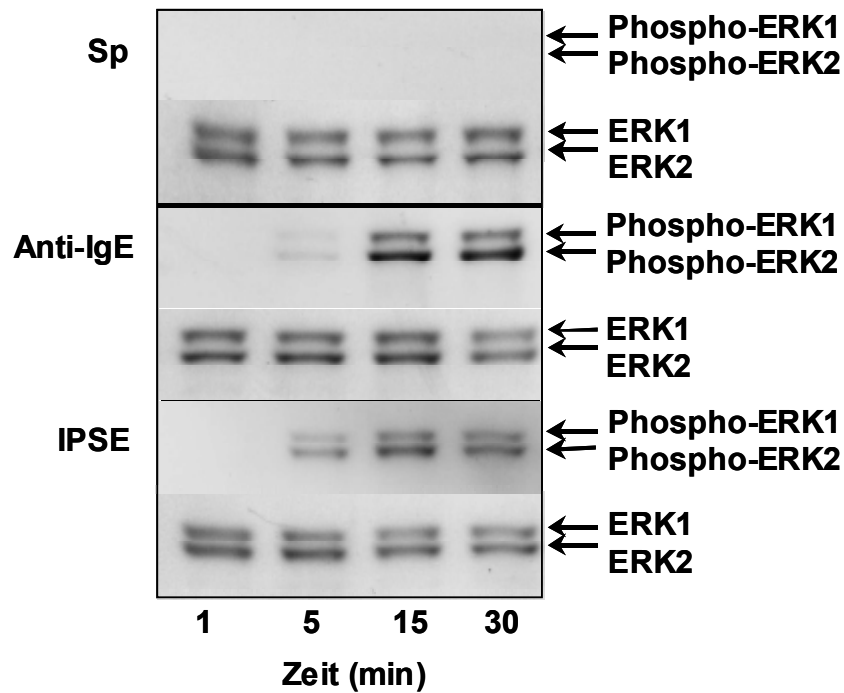
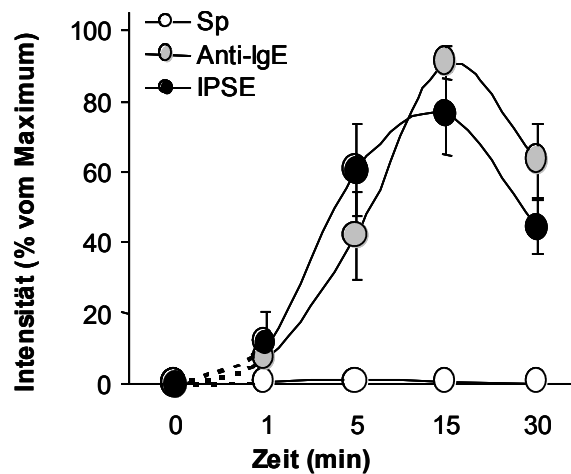
A**B**

Abbildung 20: vergleichende Signalkinetik der ERK 1+2 von Anti-IgE versus IPSE. Western Blots von der aktivierten Form sowie von dem Gesamtgehalt des Signalproteins in der Zelle (A) und die zugehörigen densitometrische Daten (B). Die Zellen wurden stimuliert und 5 min, 10 min, 15 min oder 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt (n=9). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

7.6. Vorinkubierte IPSE-IgE-Gemische können menschliche Basophile stimulieren

In den IPSE-IgE-Gemisch-Versuchen wurden IgE-Moleküle mit IPSE-Molekülen in verschiedenen Mischverhältnissen inkubiert. Mit diesen Gemischen wurden die gestrippten basophilen Granulozyten stimuliert. Es kam abhängig vom Mischverhältnis zu verschiedenen hohen Histaminausschüttungen (Abb. 21, S. 48). Dabei ergab sich, dass bei einem Mischverhältnis von IPSE zu IgE von 1:2 die Histaminausschüttung sehr gering (auf Niveau des IPSE allein) ausfiel. Bei einem Mischverhältnis zwischen 2:1 und 4:1 war die Histaminfreisetzung maximal. Ab einem Mischverhältnis von 4:1 bis 32:1 fiel die Histaminausschüttung bis auf das Niveau der Kontrolle ab, bei der IPSE allein auf die gestrippten Basophilen gegeben wurde. So entstand eine glockenförmige Histaminfreisetzungskurve nach Stimulation mit den Gemischen. Resensibilisierte, aber nicht stimulierte Basophile sowie mit IPSE allein stimulierte gestrippte basophile Granulozyten wurden als Kontrollen eingesetzt. Als weitere Kontrolle dienten resensibilisierte Zellen, die mit der gleichen Menge IPSE stimuliert wurden, wie für die IPSE-IgE-Gemische eingesetzt wurde. Die Menge des IPSE war in jedem Mischverhältnis gleich. Die Mischverhältnisse wurden durch Variation der IgE-Menge erreicht (6.3.2., S. 27). Die Signaltransduktionsproteinexpression korreliert mit der Höhe der Histaminfreisetzung (Abb. 21 A, S. 48).

Um sicherzustellen, dass die fallende Histaminausschüttung ab einem Mischverhältnis von 4:1 von IPSE zu IgE nicht durch eine zu geringe Menge an IgE zustande gekommen war, inkubierten wir die gestrippten basophilen Granulozyten mit den gleichen Mengen an IgE vor, wie sie für die jeweiligen IPSE-IgE-Gemische eingesetzt wurden. Das bedeutete, dass zuerst das IgE an die Basophilen band und dann erst das IPSE wiederum an das IgE band. Das Ergebnis war, dass die Histaminausschüttung bei allen Mischverhältnissen nahezu gleich hoch ausfiel. Die Histaminfreisetzung war so hoch wie bei einem IPSE-IgE-Gemisch von 2:1 oder 4:1. Das beweist, dass die fallende Menge an IgE in den IPSE-IgE-Gemischen nicht für die fallende Histaminausschüttung verantwortlich ist. Da es sich hierbei um präliminäre Versuche handelt, werden die Daten nicht graphisch dargestellt.

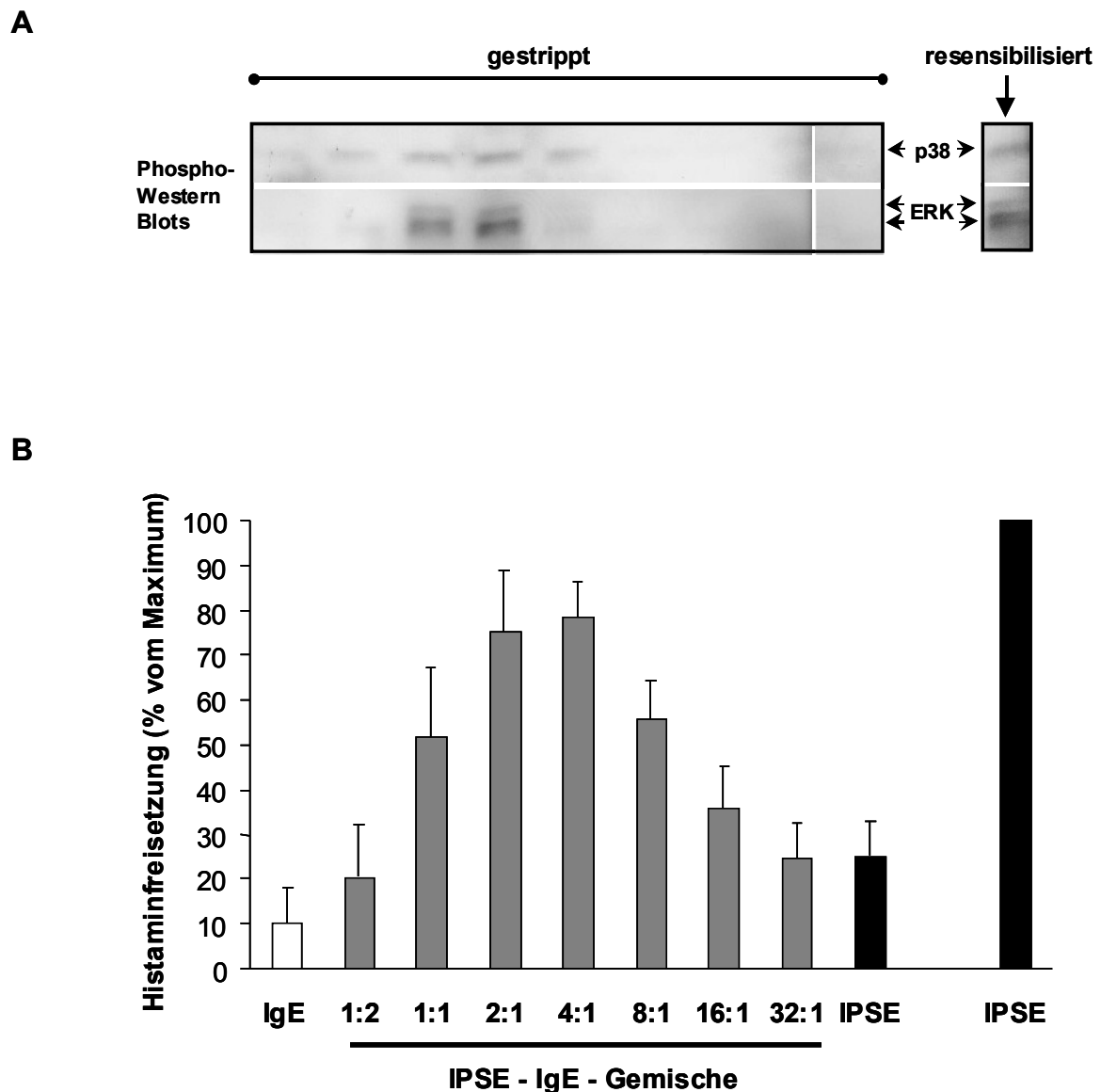


Abbildung 21: Histaminfreisetzung und repräsentativer Western Blot von p38MAPK und ERK 1+2 von menschlichen basophilen Granulozyten nach Strippen und anschließender Stimulation mit IPSE-IgE-Gemischen unterschiedlicher Stöchiometrie. Die IPSE-IgE-Gemische (Herstellung siehe 6.3.2., S. 26) wurden für 45 min bei 37°C vorinkubiert, die Basophilen gestrippt und ein Teil der Zellen in IgE-haltigem Puffer (1µg/ml) resensibilisiert. Nach mehreren Waschgängen wurden die Zellen vorgewärmt und mit den Gemischen stimuliert, bzw. der resensibilisierte Teil der Zellen mit IPSE allein stimuliert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert +/- SEM dargestellt (n=7).

7.7. Die Unfähigkeit des IPSE, menschliche Basophile über alleinige Bindung an das IgE(Fc)-Fragment zu aktivieren

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass basophile Granulozyten, die mit IgE(Fc)-Fragmenten resensibilisiert wurden, nicht durch Stimulation mit IPSE eine signifikant erhöhte Histaminfreisetzung im Vergleich zu gestrippten Basophilen zeigen ($p=0,2$). Der Unterschied in der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit IPSE bei mit IgE-Molekülen resensibilisierten Basophilen und bei mit IgE(Fc)-Fragmenten resensibilisierten Basophilen ist signifikant ($p=0,001$). Bei Anti-IgE hingegen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Histaminfreisetzung bei gestrippten im Vergleich sowohl zu mit IgE-Molekülen resensibilisierten ($p=0,002$) als auch im Vergleich zu mit IgE(Fc)-Fragmenten resensibilisierten ($p=0,01$) Zellen. Der Unterschied in der Histaminfreisetzung bei mit IgE-Molekülen resensibilisierten Zellen im Vergleich zu mit IgE(Fc)-Fragmenten resensibilisierten Zellen ist nicht signifikant ($p=0,07$).

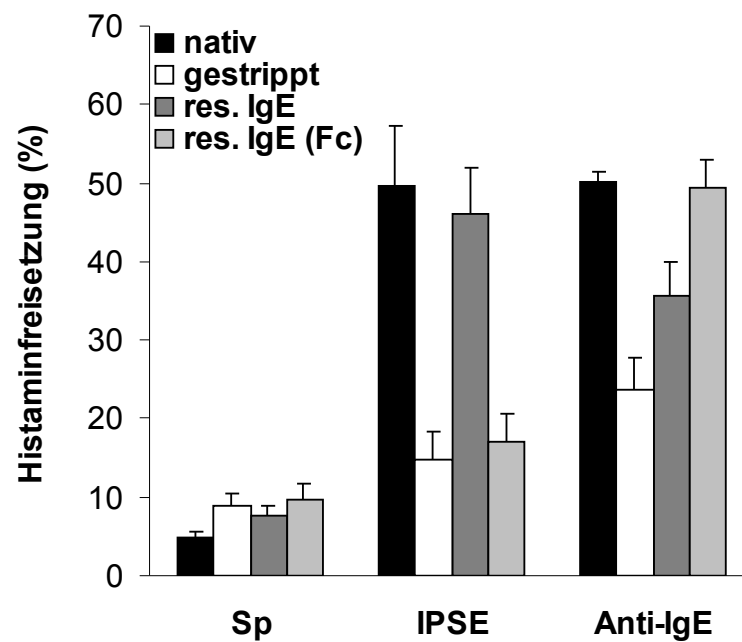


Abbildung 22: Histaminfreisetzung von menschlichen basophilen Granulozyten in nativem, gestripptem und in mit IgE-Molekülen oder IgE(Fc)-Fragmenten resensibilisiertem Zustand durch Stimulation mit Anti-IgE und IPSE. Die Zellen wurden jeweils nativ belassen, gestrippt oder resensibilisiert, stimuliert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Prozentwerte sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt ($n=5$). Sp=Spontanfreisetzung der Zellen ohne Stimulation

8. Diskussion

8.1. IPSE ist ein IgE-abhängiger Basophilenaktivator

IgE-Moleküle müssen auf den Basophilen vorhanden sein, damit IPSE seine Wirkung entfalten kann. Für die Bestätigung dieser Arbeitshypothese konnten drei Beweise erarbeitet werden: mit Hilfe der Strippingversuche, durch den Vergleich von Releasern und Non-Releasern sowie durch die Untersuchung der Kalziumabhängigkeit der Histaminfreisetzung nach Stimulation mit IPSE.

Die Strippingversuche (Abb. 9, S. 33) liefern den ersten Beweis, dass IPSE IgE-abhängig menschliche basophile Granulozyten stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Anti-IgE gewählt. fMLP, das bekannterweise nicht über den $Fc\epsilon RI$ -Rezeptor seine Wirkung entfaltet, diente als Negativkontrolle. Schon 2003 hatten Schramm et al. mit Hilfe von SDS-PAGE sowie Western Blotting von IPSE und anschließender Inkubation mit humanem IgE Hinweise auf die Bindung von IPSE an IgE erhalten [86]. Silke Blindow verwendete SDS-PAGE und Western Blotting um zu zeigen, dass IPSE nicht nur an IgE, sondern auch an IgG, IgA und IgM(kappa) sowie IgG1(lambda), IgG3(lambda) bindet [6]. Da wir die Resensibilisierung der basophilen Granulozyten mit unspezifischem humanem IgE vorgenommen haben, ergibt sich eine weitere Schlussfolgerung: IPSE ist demnach unabhängig von IPSE-spezifischem IgE in der Lage, basophile Granulozyten zu stimulieren. Unsere Schlussfolgerung in diesem Punkt wird durch Ergebnisse unserer Partnergruppe in Borstel bestätigt, in denen Basophile verschiedener norddeutscher Spender, die nie an Schistosomiasis litten, mit IPSE stimuliert wurden und trotzdem eine Histaminausschüttung zeigten [38]. Auch in murinen basophilen Granulozyten wurde dieser Effekt von IPSE vor kurzem nachgewiesen [87]. Diese Ergebnisse weisen des Weiteren auf die Rolle der menschlichen basophilen Granulozyten bei der angeborenen Immunität hin, die erst in den letzten Jahren erkannt worden ist [29].

Releaser und Non-Releaser zeigten jeweils das gleiche Muster bei den Dosiswirkungskurven nach Stimulation mit Anti-IgE und IPSE (Abb. 10 A+B, S. 34): Non-Releaser ließen sich signifikant schlechter durch beide stimulieren als Releaser. Bei Stimulation mit fMLP hingegen zeigten Releaser wie auch Non-Releaser gleich hohe Histaminfreisetzung (Abb.10 C, S. 35). Non-Releaser zeichnen sich durch eine Syk-defizienz aus ([56], [57]). Sie zeigen bei Stimulation mit IgE-abhängigen Stimuli keine oder eine sehr geringe Histaminfreisetzung, da Syk eines der ersten Signaltransduktionsproteine in der

IgE-vermittelten Signalkaskade ist, das direkt mit dem $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor in Verbindung steht. Somit erbringen wir mit Hilfe dieses Versuchs den zweiten Beweis, dass IPSE an IgE bindet und über den $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor seine Wirkung entfaltet. Anti-IgE und fMLP fungierten als Kontrollen.

Die Abhängigkeit der Histaminfreisetzung vom extrazellulären Kalziumeinstrom in die Zelle bei Stimulation mit IPSE (Abb. 11, S. 36) ist der dritte Beweis, dass das Wirkprinzip des IPSE IgE-abhängig ist, da die IgE-vermittelte Signalkaskade abhängig vom extrazellulären Kalzium abläuft [46]. Als Positivkontrolle wurde Anti-IgE verwendet.

In dem Versuch, der in Abbildung 12 (S. 37) dargestellt ist, wurden Basophile mit Anti-IgE oder IPSE stimuliert, die Zellen gewaschen und entweder so belassen oder restimuliert. Die mit IPSE stimulierten Zellen, die nicht restimuliert wurden, zeigten eine signifikant höhere Histaminfreisetzung als die vergleichbaren mit Anti-IgE stimulierten Zellen. Außerdem ist der Unterschied zwischen gewaschenen und restimulierten Basophilen bei Stimulation mit IPSE nicht signifikant im Gegensatz zu Anti-IgE. Aus diesen beiden Ergebnissen folgern wir, dass nach dem Waschen mehr IPSE am $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor verblieben ist als Anti-IgE. Also muss die Bindungsstärke von IPSE zum $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor größer sein als die von Anti-IgE zum $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass IPSE eine höhere Affinität zum IgE-Molekül hat als Anti-IgE. Das unterschiedliche Bindungsverhalten der beiden zum IgE-Molekül könnte ein Grund hierfür sein (8.4., S.54).

8.2. IPSE entfaltet seine Wirkung über dieselbe Signalkaskade wie Anti-IgE

Die Hemmstoffversuche (Abb. 13, S. 38) deuten darauf hin, dass IPSE keinen „eigenen“ bisher unbekannten Signaltransduktionsweg einschlägt, nachdem es an den $\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$ -Rezeptor bindet. Demnach sind die Signaltransduktionsproteine PI-3-Kinase, p38MAPK und PLC an der Signalkaskade des IPSE beteiligt, die alle der IgE-vermittelten Signalkaskade angehören. ERK 1+2 beeinflussen über die Phospholipase A_2 (PLA_2) überwiegend die LTC_4 -Sekretion, weniger die Histamin- oder Zytokinproduktion [76]. Demzufolge sind sie bei der Histaminbestimmung nicht aktiviert. Die Funktion der PKC-Familie ist noch nicht vollständig geklärt ([105], [68]). An der IPSE-Signalkaskade ist sie zumindest nicht beteiligt.

PTX blockiert die Hauptfunktionen, die durch fMLP induziert sind. Die PTX-Insensitivität von IPSE zeigt also, dass IPSE seine Wirkung nicht zusätzlich über den Signaltransduktionsweg des fMLP entfaltet (Abb. 14, S. 39).

8.3. Funktionelle Untersuchungen

Die funktionellen Untersuchungen ergaben eine starke Ähnlichkeit von IPSE und Anti-IgE im Dosiswirkungsprofil und in der Kinetik zeigten sich leichte Unterschiede:

Die Dosiswirkungskurven der Histamin- und Zytokinausschüttung nach Stimulation mit Anti-IgE und IPSE sind glockenförmig. Beachtenswert ist, dass supraoptimale Konzentrationen von Anti-IgE und IPSE zu einem schnellen Abfall der Zytokinproduktion führen, wohingegen die Histaminfreisetzung dadurch weniger beeinflusst wird (Abb. 15 und 16, S. 41-42). Diese Unterschiede führten uns zu der Annahme, dass möglicherweise ein endogener Inhibitormechanismus und nicht ein Überschuss an monovalenten Antigen-IgE/Fc ϵ RI-Komplexen, wie bisher angenommen [74], für die reduzierte Antwort nach Stimulation mit supraoptimaler Anti-IgE-Konzentration verantwortlich sein könnte [33]. Die Western Blots von p38 MAPK und ERK 1+2 der korrespondierenden Versuchsreihe zeigen eine "Glockenkurvigkeit" in der Expression ihrer aktivierten Form. Das deutet darauf hin, dass der Mechanismus, der für die Glockenkurvigkeit verantwortlich ist, über diesen Signalen liegt. SHIP war nach supraoptimaler Anti-IgE-Stimulation stark phosphoryliert im Vergleich zu niedrigeren Stimuluskonzentrationen (Daten nicht als Graphik dargestellt). fMLP hingegen, das als Kontrolle diente, konnte SHIP nicht phosphorylieren und zeigte keine glockenförmige Dosiswirkungskurve. SHIP liegt in der Signalkaskade oberhalb von p38 MAPK und ERK 1+2. Diese Ergebnisse führten uns zu der Annahme, dass SHIP ein inhibitorisches Signal der IgE-vermittelten Aktivierung von humanen Basophilen ist, vor allem im supraoptimalen Bereich. Zur gleichen Zeit, als die ersten Versuche zur Erforschung dieses Phänomens von uns unternommen wurden, veröffentlichten Huber et al. ein Tiermodell mit SHIP-knock-out-Mäusen. Dieses zeigte, dass SHIP die Fc ϵ RI-induzierte Degranulation von Mastzellen im supraoptimalen Bereich herunterregulieren kann [35].

Zur Ausführung der Kinetikversuche, die Bestandteil dieser Dissertation sind, war es notwendig, die Konzentrationen zu ermitteln, bei denen die maximale Histaminfreisetzung nach Stimulation mit Anti-IgE und IPSE gleich ist. Nur so war ein direkter Vergleich der Kinetiken möglich. Dabei war zu erkennen, dass die maximale Histaminausschüttung je nach Konzentration des Stimulus unterschiedlich hoch ausfiel. Unsere Forschungsgruppe, vor allem B.F. Gibbs, hat sich mit dem Thema ausführlich auseinandergesetzt. Unsere Daten demonstrieren, dass der Zeitverlauf der Phosphorylierung aktivierender sowie inhibitorischer Signaltransduktionsproteine dosisabhängig ist. Dabei führen hohe Anti-IgE-

und IPSE-Konzentrationen zu einer schnelleren Phosphorylierung als niedrige Anti-IgE- und IPSE-Konzentrationen ([32], [33]). Zudem folgt die Phosphorylierungskinetik von aktivierenden Molekülen einer glockenförmigen Kurve, die weiter nach links, das heißt zu früheren Zeitpunkten in der Kinetik verschoben ist, je höher die Stimuluskonzentration ist. Das lässt vermuten, dass in einem klinischen Zusammenhang die Quantität und nicht nur die Qualität eines Antigens ein wichtiger Parameter für die Festlegung eines Zeitrasters einer allergischen Reaktion ist ([32], [33]).

Bei gleich hoher maximaler Histaminfreisetzung zeigte sich in den Kinetikversuchen, die für die vorliegende Dissertation durchgeführt worden sind, dass IPSE signifikant schneller zu einer Histaminausschüttung führt als Anti-IgE (Abb. 17, S. 43). Die Western Blots von Syk, p38MAPK und ERK 1+2, die durch denselben Versuch entstanden sind, weisen das gleiche Muster auf wie die densitometrischen Daten und die Histaminfreisetzungsdaten. Bemerkenswert ist, dass p38MAPK und vor allem ERK 1+2 zu einem frühen Messzeitpunkt gering exprimiert waren (Abb. 19 B und 20 B, S. 45-46). Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass p38MAPK und ERK 1+2 späte Signale in der IgE-vermittelten Signalkaskade sind. Im Gegensatz dazu ist Syk, welches ein frühes Signaltransduktionsprotein ist, von Anfang an stark exprimiert.

8.4. IPSE und IgE formen aktivierende Komplexe

Das IgE-Molekül ist in der Lage den Fc_εRI-Rezeptor zu aktivieren, auch wenn es vor Kontakt zu den Basophilen mit einer bestimmten Menge an IPSE beladen wird (Abb. 21, S. 48). Wir gehen davon aus, dass IPSE und IgE Komplexe bilden. Das stöchiometrische Verhältnis zwischen IPSE und IgE in den Komplexen, das zu einer maximalen Histaminausschüttung führt, scheint dabei zwischen 2:1 und 4:1 zu liegen. Wir vermuten, dass 1:2- und 1:1-IPSE-IgE-Komplexe nur zu einer partiellen Aktivierung des Rezeptors führen, hingegen bei 8:1- bis 32:1-IPSE-IgE-Komplexen zum Teil die Bindungsstelle des IgE-Moleküls mit dem Fc_εRI-Rezeptor durch die IPSE-Moleküle blockiert ist, was zu einer Minderung der Histaminausschüttung führt. Die Expression von p38MAPK und ERK 1+2 korreliert mit der Histaminfreisetzung, wie aus Abbildung 21 A (S. 48) ersichtlich ist. Daraus ergibt sich, dass die Histaminfreisetzung über den IgE-vermittelten Weg zustande gekommen ist, da p38MAPK und ERK Schlüsselproteine in der IgE-vermittelten Signalkaskade sind.

Dass IPSE IgE-vermittelt seine Wirkung an basophilen Granulozyten entfaltet, aber nicht über eine Quervernetzung zweier IgE-Moleküle, sondern über monovalente Bindung,

vermutete G. Schramm aufgrund von unter anderem folgendem Versuchsaufbau: Es wurden verschiedene *Sandwich Assays* durchgeführt, wobei IgE im *BLACORE* oder auf einem *Dot-Blot* immobilisiert und mit IPSE inkubiert, dann die weitere Bindung von gelöstem IgE überprüft wurde. Statt IPSE wurden als Kontrollen eine Pufferlösung und Anti-IgE verwendet. Dabei konnte keine Quervernetzung der IgE-Moleküle durch IPSE oder durch die Pufferlösung, wohl aber durch Anti-IgE nachgewiesen werden (G. Schramm, unveröffentlicht).

Aufgrund unserer Ergebnisse und der Ergebnisse von Schramm et al. gehen wir davon aus, dass ein Komplex aus zwei IPSE-Molekülen an einem IgE-Molekül an den Fc_εRI-Rezeptor bindet und so monovalent den menschlichen basophilen Granulozyten aktiviert.

Dass IPSE zwei Bindungsstellen an einem IgE-Molekül hat, im Gegensatz zu Anti-IgE, das jeweils eine Bindungsstelle an zwei IgE-Molekülen besitzt, könnte eine Erklärung für die höhere Affinität des IPSE zum IgE-Molekül im Vergleich zur Affinität von Anti-IgE zum IgE bieten. Diese Beobachtung machten wir indirekt in Versuchen, bei denen die Bindungsstärke von IPSE zum Fc_εRI-Rezeptor größer war als die von Anti-IgE zum Fc_εRI-Rezeptor (8.2., S. 51 und Abb. 12, S. 37). Die Feststellung von Silke Blindow im Rahmen ihrer Dissertation, dass die Daten für die Bindung von IPSE an Immunglobuline auf eine positiv kooperative Bindung hinweisen, sind eine Bestätigung unserer Vermutungen. Die positiv kooperative Bindung schließt eine Bindung von mindestens zwei Molekülen IPSE an IgE ein, wobei die Bindung des ersten Moleküls IPSE die Affinität für die Bindung des zweiten erhöht [6].

Wie aus Abbildung 22 (S. 49) ersichtlich, ist IPSE nicht in der Lage, den Fc_εRI-Rezeptor zu aktivieren und eine Histaminfreisetzung zu bewirken, wenn nur IgE(Fc)-Fragmente auf den basophilen Granulozyten vorhanden sind. Schlussfolgernd daraus ergibt sich, dass eine alleinige Bindung von IPSE an den Fc-Teil des IgE-Moleküls nicht zu einer Aktivierung der IgE-abhängigen Signalkaskade führen kann; IPSE kann, nach diesem Ergebnis urteilend, nur den Fc_εRI-Rezeptor aktivieren durch Bindung sowohl an den Fc- als auch an den Fab-Teil des IgE-Moleküls oder aber durch alleinige Bindung an den Fab-Teil. Auch Silke Blindow beschrieb in ihrer Dissertation, dass sie aufgrund von Ergebnissen aus SDS-PAGE und Western Blotting von Fab- und Fc-Teilen und anschließender Inkubation mit IPSE davon ausgeht, dass IPSE an die Fab- und die Fc-Teile des IgE bindet [6].

Wie in 3.5.1. (S. 12) beschrieben, wird davon ausgegangen, dass es zu einer Konformationsänderung im IgE-Molekül bei dessen Bindung an den Fc_εRI-Rezeptor kommt ([104], [107]). Es ist denkbar, dass das IgE-Molekül eine weitere Konformations-

änderung durch die Bindung des IPSE an den Fab- sowie den Fc-Teil des IgE-Moleküls erfährt (Abb. 23, S. 55). Silke Blindow hat bereits beschrieben, dass es Hinweise auf das Vorliegen konformationeller Bindungsstellen auf dem IPSE-Molekül und bestimmter daran beteiligter Aminosäurenkombinationen gibt [6]. Dies würde der bisher allgemein akzeptierten Erklärung der Signaltransduktion durch Aggregation von Fc ϵ RI auf Basophilen und Mastzellen nach Quervernetzung des daran gebundenen IgE durch multivalente Antigene ohne Konformationsänderung des IgE [74] widersprechen.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse kann IPSE weder den B-Zell-Superantigenen noch den Lektinen im herkömmlichen Sinne zugeordnet werden (3.5.2.1., S. 13). Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen neuartigen, bisher unbekannten Mechanismus der IgE-vermittelten Zellaktivierung handelt, der durch die Bindung und Konformationsänderung des monomeren IgE/Fc ϵ RI-Rezeptorkomplexes ohne dessen Quervernetzung vermittelt wird. Unter dieser Hypothese führt die Bindung von zwei bis vier Molekülen IPSE an ein Molekül IgE zu einer maximalen Mediatorausschüttung.

Es stellt sich die Frage, ob IPSE mit seinen Bindungseigenschaften ein Einzelfall ist oder ob es weitere Antigene oder andere Substanzen gibt, bei denen ein ähnlicher Bindungs- und Wirkmechanismus vorliegt. Die These, dass grundsätzlich eine monovalente Aktivierung des Fc ϵ RI-Rezeptors möglich wäre, wird durch die Ergebnisse von Kalesnikoff et al. gestützt. Sie untersuchten die Effekte der monomeren IgE-Bindung an murinen Mastzellen. Kalesnikoff et al. zeigten, dass monomerisches IgE in Abwesenheit eines Antigens mehrere Phosphorylierungsvorgänge in murinen Mastzellen stimuliert. Diese Phosphorylierungsvorgänge bewirken eine verstärkte Zytokinproduktion und ein verlängertes Zellüberleben [48]. Außerdem wird in einigen Veröffentlichungen beschrieben, dass es durch Bindung des IgE-Moleküls an den Fc ϵ RI-Rezeptor zur Hochregulierung der Fc ϵ RI-Rezeptor-Expression kommt ([51], [58]). Kitaura et al. stellen zur Diskussion, ob monomerische IgE-Moleküle in Abwesenheit eines Antigens den Fc ϵ RI-Rezeptor auf murinen Mastzellen aggregieren können und so eine Zytokin-freisetzung bewirken [59]. Vor dem Hintergrund der von uns gewonnenen Ergebnisse stellt sich allerdings die Frage, ob es nicht eher zu einer monovalenten Stimulation des Fc ϵ RI-Rezeptors durch IgE - ohne Quervernetzung - auf Grund von Konformationsänderungen im IgE-Molekül kommt. Kitaura et al. selbst schreiben, dass neben der von ihnen favorisierten Aggregationstheorie auch eine Konformationsänderung des IgE die Ursache für ihre Versuchsergebnisse sein könnte ([52], [59]).

Insofern scheint die monomerische IgE-Bindung an den Fc ϵ RI-Rezeptor nicht allein ein

passiver Vorsensibilisierungsschritt zu sein, wie bisher angenommen. Und es ist denkbar, dass Antigene oder andere an IgE gebundene Substanzen durch monomerische Bindung an den Fc_εRI-Rezeptor ohne Quervernetzung ihre Wirkung auf die Zelle entfalten, sei es an Mastzellen oder an Basophilen.

9. Zusammenfassung

Basophile Granulozyten besitzen bei IgE(Immunglobulin E)-vermittelten Erkrankungen eine wichtige Funktion: An humanen Basophilen wurde gezeigt, dass sie der Zelltyp sind, der als erstes IL-4 (Interleukin 4) nach Allergenexposition exprimiert. Daher spielt das aus Basophilen freigesetzte IL-4 höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Entwicklung einer Th2-Immunantwort. Jeder gesunde Mensch reagiert mit einer Th2-Antwort auf eine Infektion mit Helminthen, aber nicht jeder entwickelt Allergien, die wie die Parasitose durch eine Th2-Antwort und eine IgE-Erhöhung gekennzeichnet sind. Um die Mechanismen einer Allergieentwicklung zu ergründen, bietet es sich daher an, die Infektion mit Helminthen und deren Charakteristika zu studieren. IPSE (Interleukin 4-induzierendes Prinzip aus *Schistosoma mansoni*-Eiern) ist ein vor kurzem entdeckter Faktor aus *Schistosoma mansoni*-Eiern. Er regt humane Basophile zur Degranulation und zur Freisetzung von Histamin, IL-4 sowie IL-13 an und ist dafür verantwortlich, dass die Eier von *Schistosoma mansoni* zuverlässig eine Th2-Antwort induzieren.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die funktionellen Eigenschaften des IPSE in Bezug auf dessen Wirkung an humanen Basophilen vor allem im Vergleich mit Anti-IgE zu ergründen. Außerdem sollten die molekularbiologischen Ergebnisse unserer Partnerforschungsgruppe durch Untersuchungen auf zellulärer Ebene verifiziert werden.

Die folgenden Ergebnisse sind das Produkt aus Stimulationsversuchen mit aufgereinigten humanen basophilen Granulozyten. Es wurden Histamin im *Technicon Autoanalyser II*, Leukotrien-C₄ und Interleukine mit Hilfe des ELISA(*Enzym-linked immunosorbent assay*)-Prinzips, sowie verschiedene Signaltransduktionsproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und *Western Blotting* bestimmt.

Die Untersuchungen ergaben eine starke Ähnlichkeit von IPSE und Anti-IgE im Dosiswirkungsprofil und der Signaltransduktionskaskade, in der Kinetik zeigten sich leichte Unterschiede. Der Bindungs- und Wirkmechanismus von IPSE am Fc ϵ RI-Rezeptor scheint sich dagegen grundlegend von dem des Anti-IgE zu unterscheiden.

Unsere Ergebnisse bestätigten nicht nur, dass IPSE IgE-abhängig menschliche Basophile stimuliert, sondern auch, dass es seine Wirkung über dieselbe Signalkaskade wie Anti-IgE und nicht zusätzlich über den Signaltransduktionsweg des fMLP (N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-Phenylalanin) entfaltet. Da die Resensibilisierung der basophilen Granulozyten mit unspezifischem humanem IgE vorgenommen wurde, ergibt sich schlussfolgernd, dass

IPSE unabhängig von Antigen-spezifischem IgE basophile Granulozyten zu stimulieren vermag. Dieses Ergebnis weist auf die Rolle der humanen Basophilen bei der angeborenen Immunität hin, die erst in letzter Zeit zur Diskussion steht. Die Dosiswirkungskurven der Histamin- und Zytokinausschüttung von IPSE und Anti-IgE sind jeweils glockenförmig. In den Kinetikversuchen zeigte sich bei gleich hoher maximaler Histaminfreisetzung, dass IPSE signifikant schneller zu einer Histaminausschüttung führte als Anti-IgE.

Unsere Untersuchungen ergaben weiterhin, dass ein Komplex aus zwei bis vier IPSE-Molekülen und einem IgE-Molekül an einen Fc_εRI-Rezeptor bindet und so monovalent zu einer maximalen Mediatorausschüttung des menschlichen basophilen Granulozyten führt. Außerdem weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass IPSE seine Wirkung am Fc_εRI-Rezeptor durch Bindung sowohl an den Fab(*Fragment antigen binding*)- als auch an den Fc(*Fragment cristalline*)-Teil des IgE entfaltet. Aufgrund dieser Ergebnisse kann IPSE weder den B-Zell-Superantigenen noch den Lektinen im herkömmlichen Sinne zugeordnet werden, die zwar auch Basophile und Mastzellen IgE-abhängig und antigen-unspezifisch aktivieren, aber sich in ihren Bindungseigenschaften grundlegend von IPSE unterscheiden. Damit liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen neuartigen, bisher unbekannten Mechanismus der IgE-vermittelten Zellaktivierung handelt, der durch die Bindung und Konformationsänderung des monomeren IgE/Fc_εRI-Rezeptorkomplexes ohne dessen Quervernetzung vermittelt wird.

10. Literaturverzeichnis

1. Araujo MI, de Carvalho EM. Human schistosomiasis decreases immune responses to allergens and clinical manifestations of asthma. *Chem Immunol Allergy* 90: 29-44; 2006
2. Arock M, Schneider E, Boissan M, Tricottet V, Dy M. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol* 71: 557–564; 2002
3. Atkins PC, Schwartz LB, Adkinson NF, von Allmen C, Valenzano M, Zweimann B. In vivo antigen-induced cutaneous mediator release: simultaneous comparisons of histamine, tryptase and prostaglandin D2 release and the effect of oral corticosteroid administration. *J Allergy Clin Immunol* 86: 360-370; 1990
4. Aumuller E, Schramm G, Gronow A, Brehm K, Gibbs BF, Doenhoff MJ, Haas H. *Echinococcus multilocularis* metacystode extract triggers human basophils to release interleukin-4. *Parasite Immunol* 26: 387–395; 2004
5. Beckman JE-6B Elutriation System and Rotor Instruction Manual. Beckman Instruments Inc. Palo Alto : 10; 1992
6. Blindow S. Untersuchungen des Mechanismus der IL-4-Freisetzung aus humanen Basophilen durch einen Immunglobulin-bindenden Faktor aus *Schistosoma mansoni* – Eiern (IPSE). Medizinische Universität zu Lübeck- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Forschungszentrum Borstel Zentrum für Medizin und Biowissenschaften: Abteilung Klinische Medizin; 2004
7. Böhm E, Sturm GJ, Weiglhofer I, Sandig H, Shichijo M, McNamee A, Pease JE, Kollros M, Peskar BA, Heinemann A. 11-Dehydro-thromboxane B2, a stable thromboxane metabolite, is a full agonist of chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells (CRTH2) in human eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 279: 7663–7670; 2004
8. Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med* 177: 605-611; 1993
9. Casolaro V, Georas SN, Song Z, Ono SJ. Biology and genetics of atopic disease. *Curr Opin Immunol* 8: 769-776; 1999
10. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402

- (Supp): B5-B11; 1999
- 11.Coombs RRA, Gell PGH. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. *Clinical Aspects of Immunol* 37: 151-216; 1985
 - 12.Corrigan CJ. Eotaxin and asthma: some answers, more questions. *Clin Exp Immunol* 116: 1-3; 1999
 - 13.Damian RT. Presidential adress - the exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol* 73: 1-13; 1987
 - 14.Defrance T, Carayon P, Bilian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J Exp Med* 179: 135-143; 1994
 - 15.Devouassoux G, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD, Prussin C. Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13-producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 104: 811-819; 1999
 - 16.Doenhoff MJ, Hassounah OA, Lucas SB. Does the immunopathology induced by schistosome eggs potentiate parasite survival. *Immunol Today* 6(7): 203-206; 1985
 - 17.Dvorak HF, Mihm MC Jr. Basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis. *J Exp Med* 135: 235-254; 1972
 - 18.Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. *Arch Anat Physiol Lpz 3 Physiol Abt* : 166-169; 1879
 - 19.Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Diss. Leipzig* : 30; 1878
 - 20.Else KJ, Hültner L, Grecis RK. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential induction of TH-cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunology* 75: 232-237; 1992
 - 21.Falcone FH, Dahinden CA, Gibbs BF, Noll T, Amon U, Hebestreit H, Abrahamsen O, Klaucke J, Schlaak M, Haas H. Human basophils release interleukin-4 after stimulation with *Schistosoma mansoni* egg antigen. *Eur J Immunol* 26: 1147-1155; 1996
 - 22.Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96: 4028-4038; 2000
 - 23.Falcone FH, Pritchard DI, Gibbs BF. Do basophils play a role in immunity against parasites. *Trends Parasitol* 17: 126-129; 2001
 - 24.Fogel WA, Lewinski A, Jochem J. Histamine in idiopathic inflammatory bowel disease - not a standby player. *Folia Med Cracov* 46(3-4): 107-118; 2005
 - 25.Gane P, Pequet C, Lombin P, Abuaf N, Leyandier F, Rauger P. Flow Cytometric

- Evaluation of Human Basophils. *Cytometry* 14 (3): 344 –348; 1993
- 26.Garraud O, Nkenfou C, Bradley JF, Perler FB, Nutman TB. Identification of recombinant filarial proteins capable of inducing polyclonal and antigen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J Immunol* 155: 1316-1325; 1995
- 27.Genovese A, Borgia G, Björck L, Petraroli A, de Paulis A, Piazza M, Marone G. Immunoglobulin superantigen protein L induces IL-4 and IL-13 secretion from human FcεRI cells through interaction with the kappa light chain of IgE. *J Immunol* 170(4): 1854-1861; 2003
- 28.Gibbs B, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T, Wolff HH, Amon U. Purified peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 26: 2493-2498; 1996
- 29.Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med* 5: 43–49; 2005
- 30.Gibbs BF, Haas H, Wolff HH, Grabbe J. Early IgE-dependent release of IL-4 and IL-13 from leukocytes is restricted to basophils: A comparison with other granulocytes and mononuclear cells. *Inflamm Res* 49(Suppl 1): 9-10; 2000
- 31.Gibbs BF, Plath KE, Wolff HH, Grabbe J. Regulation of mediator secretion in human basophils by p38 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization. *J Leukoc Biol* 72(2): 391-400; 2002
- 32.Gibbs BF, Rätthling A, Huber M, Haas H. Substantial differences in the kinetics of histamine release from human basophils caused by varying strengths of IgE-dependent activators. *Inflamm Res* 14 : 3; 2007
- 33.Gibbs BF, Rätthling A, Zillikens D, Huber M, Haas H. Initial FcεRI-mediated signal strength plays a key role in regulating basophil signaling and deactivation. *J Allergy Clin Immunol* 118(5): 1060-1067; 2006
- 34.Gilbert HS, Ornstein L. Basophil counting with a new staining method using alcian blue. *Blood* 46 (2): 279-286; 1975
- 35.Gimborn K, Lessmann E, Kuppig S, Krystal G, Huber M. SHIP down-regulates FcεRI-induced degranulation at supraoptimal IgE or antigen levels. *J Immunol* 174: 507-516 ; 2005
- 36.Haas H, Falcone FH, Holland MJ, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, Bufe A, Schlaak M. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 119: 86–94; 1999

- 37.Haas H, Falcone FH, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, Klaucke J, Pöppelmann M, Becker WM, Gabius HJ, Schlaak M. Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur J Immunol* 29: 918-927; 1999
- 38.Haisch K, Schramm G, Falcone FH, Alexander C, Schlaak M, Haas H. A glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs binds non-antigen-specific immunoglobulin E and releases interleukin-4 from human basophils. *Parasite Immunol* 23: 427-434; 2001
- 39.Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193: 255–261; 2001
- 40.Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung W. Histamine H4 receptor mediates Chemotaxis and Calcium Mobilization of Mast Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 305(3): 1212-1221; 2003
- 41.Howell WM, Holgate ST. HLA genetics and allergic disease. *Thorax* 50: 815-818; 1995
- 42.Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Transendothelial migration of human basophils. *J Immunol* 173: 5189–5195; 2004
- 43.Iliopoulos O, Baroody FM, Naclerio RM, Bochner BS, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Histamine containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils. *J Immunol* 148: 2223-2228; 1992
- 44.Irani AM, Huang C, Xia HZ, Kepley C, Nafie A, Fouda ED, Craig S, Zweiman B, Schwartz LB. Immunohistochemical detection of human basophils in late phase skin reactions. *J Allergy Clin Immunol* 101: 354–362; 1998
- 45.Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with γ E-globulin antibody. *J Immunol* 97: 840-853; 1966
- 46.Ishizaka T, Foreman JC, Sterk AR, Ishizaka K. Induction of calcium flux across the rat mast cell membrane by bridging IgE receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(11): 5858-5862; 1979
- 47.Jordan P. *Schistosomiasis- the St. Lucia Project*. Cambridge University Press : 35-40; 1985
- 48.Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, Siraganian RP, Krystal G. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 14: 801-811; 2001

- 49.Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4: 313–319; 1996
- 50.Kasaian MT, Clay MJ, Happ MP, Garman RD, Hirani S, Luqman M. IL-4 production by allergen-stimulated primary cultures: identification of basophils as the major IL-4-producing cell type. *Int Immunol* 8: 1287-1297; 1996
- 51.Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2: 773-786; 2002
- 52.Kawakami T, Kitauro J. Mast cell survival and activation by IgE in the absence of antigen: a consideration of the biologic mechanisms and relevance. *J Immunol* 175(7): 4167-4173; 2005
- 53.Kepley CL, Andrews RP, Brown DC, Chigaev A, Sklar LA, Oliver JM, Larson RS. Regulation of human basophil adhesion to endothelium under flow conditions: Different very late antigen 4 regulation on umbilical cord blood-derived and peripheral blood basophils. *J Allergy Clin Immunol* 110: 469–475; 2002
- 54.Kepley CL, McFeeley PJ, Oliver JM, Lipscomb MF. Immunohistochemical detection of human basophils in postmortem cases of fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1053-1058; 2001
- 55.Kepley CL, Pfeiffer JR, Schwartz LB, Wilson BS, Oliver JM. The identification and characterization of umbilical cord blood-derived human basophils. *J Leukoc Bio* 64: 474–483; 1998
- 56.Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Multiple defects in Fc epsilon RI signaling in Syk-deficient nonreleaser basophils and IL-3 induced recovery of Syk expression and secretion. *J Immunol* 165(10): 5913-5920; 2000
- 57.Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J Allergy Clin Immunol* 104: 279-284; 1999
- 58.Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcRI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17: 931-972; 1999
- 59.Kitauro J, Song J, Tsai M, Asai K, Maeda-Yamamoto M, Mocsai A, Kawakami Y, Liu FT, Lowell CA, Barisas BG, Galli SJ, Kawakami T. Evidence that IgE molecules mediate a spectrum of effects on mast cell survival and activation via aggregation of the FcεRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(22): 12911-12916; 2003
- 60.Knol EF. Requirements for effective IgE cross-linking on mast cells and basophils. *Mol Nutr Food Res* 50(7): 620-624; 2006
- 61.Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff

- G, Galli SJ. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392: 90–93; 1998
- 62.Le Y, Murphy PM, Wang WM. Formylpeptide receptors revisited. *Trends Immunol* 23(11): 541-548; 2002
- 63.Li H, Sim TC, Alam R. IL-13 released by and localised in human basophils. *J Immunol* 156: 4833-4838; 1996
- 64.Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, Lo D. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol* 162: 2477–2487; 1999
- 65.Lichtenstein LM, Bochner BS. The role of basophils in asthma. *Ann N Y Acad Sci* 66: 807-815; 1991
- 66.Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Spektrum Verlag : 36; 1998
- 67.Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB. Basophils, eosinophils and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol* 105: 99–107; 2000
- 68.MacGlashan D Jr, Miura K, Lavens-Phillips S. Pharmacology of IgE-mediated desensitization of human basophils: effects of protein kinase C and src-family kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 60(11): 1717-1727; 2000
- 69.MacGlashan DW Jr, White JM, Huang S, Ono SJ, Schroeder JT, Lichtenstein LM. Secretion of IL-4 from human basophils: the relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J Immunol* 152: 3006-3016; 1994
- 70.Marone G, Triggiani M, de Paulis A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma. *Trends Immunol* 26: 25–31; 2005
- 71.Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264: 1152-1156; 1994
- 72.McDonnell JM, Calvert R, Beavil RL, Beavil AJ, Henry AJ, Sutton BJ, Gould HJ, Cowburn D. The structure of the IgE Cepsilon2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcepsilonRI alpha. *Nat Struct Biol* 8: 437–444; 2001
- 73.Metcalf DD, Bland CE, Wasserman SI. Biochemical and functional characterization of proteoglycans isolated from basophils of patients with chronic myelogenous leukemia. *J*

- Immunol 132(4): 1943-1950; 1984
- 74.Metzger H. Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol* 149(5): 1477-1487; 1992
- 75.Mitre E, Nutman TB. Basophils, basophilia and helminth infections. *Chem Immunol Allergy* 90: 141-156; 2006
- 76.Miura K, Schroeder JT, Hubbard WC, MacGlashan DW Jr. Extracellular Signal-Regulated Kinases regulate Leukotrien C4 generation, but not histamine release or IL-4 production from human basophils. *J Immunol* 162: 4198-4206; 1999
- 77.Moore PE, Church TL, Chism DD, Panettieri RA Jr, Shore SA. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: 847–853; 2002
- 78.Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J* 405(3): 379-395; 2007
- 79.Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF Jr, GuH, Paul WE. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10838–10843; 1997
- 80.Nouri-Aria KT, Irani AM, Jacobson MR, O'Brien F, Varga EM, Till SJ, Durham SR, Schwartz LB. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen induced late asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108: 205–211; 2001
- 81.Ochsenberger B, Daepf GC, Rihs S, Dahinden CA. Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and –independent activation. *Blood* 88: 3028-3037; 1996
- 82.Parker DC. T-cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11: 331-340; 1993
- 83.Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 response by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 173: 159-166; 1999
- 84.Prakash S, Wyler DJ. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. *J Immunol* 146(5): 1679-1684; 1991
- 85.Schmidt GS, Roberts LS. *Foundation of Parasitology*. McGraw Hill Sixth edition: 59; 2000
- 86.Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, Doenhoff MJ, Oliveira G, Galle J, Dahinden CA, Haas H. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J Biol Chem* 278(20): 18384-18392; 2003
- 87.Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, Doenhoff MJ, Pearce EJ, Haas H, Mohrs M.

- IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils in vivo. *J Immunol* 178(10): 6023-7; 2007
- 88.Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald SM. Recombinant histamin releasing factor enhances IgE dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *J Immunol* 159: 447-452; 1997
- 89.Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol* 77: 93–122; 2001
- 90.Schroeder JT, MacGlashan DW Jr., Kagey-Sobotka A, White JM, Lichtenstein LM. IgE- dependent IL-4 secretion by human basophils: The relationship between cytokin production and histamine release in mixed leukocyte cultures. *J Immunol* 153: 1808-1817; 1994
- 91.Shibasaki M, Sumazaki R, Isoyama S, Takita H. Interactions of lectins with human IgE: IgE-binding property and histamine-releasing activity of twelve plant lectins. *Int Arch Allergy Immunol* 98: 18-25; 1992
- 92.Shim JY, Kim BS, Cho SH, Min KU, Hong SJ. Allergen-specific conventional immunotherapy decreases immunoglobulin E-mediated basophil histamine releasability. *Clin Exp Allergy* 33: 52–57; 2003
- 93.Shirakawa T, Li A, Dubowitz M, Dekker JW. Association between atopy and variants of the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Nat Gene* 7(2): 125-129; 1994
- 94.Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH. The detection of histamine, a new approach. *J Pharmacol Exp Ther* 127: 182-186; 1959
- 95.Silverman GJ. B cell superantigens: possible roles in immunodeficiency and autoimmunity. *Immunology* 10: 43-55; 1998
- 96.Thompson A. Isolation and charakterisation of a mast cell degranulation substance from *Ascaris suum*. *Biochem Biophys Acta* : 245-257; 1972
- 97.Tolone G, Bonasera L, Brai M, Ferina F, Pontieri GM. Isolation of mast cell degranulators from the coelomatic fluid of *Parascaris equorum*. *Pathol Microbiol* 41(1): 41-50; 1974
- 98.Tolone G, Brai M, Bonasera L, Bellavia A, Pontieri GM. Role of mast cell and eosinophils in tissue injury caused by injections of *Ascaris* fluid in the rat. *Pathol Microbiol* 38: 192-199; 1972
- 99.Uvnäs B, Diamant B, Högberg B, Thon IL. Mechanism of mast cell disruption induced

- by a principle extracted from *Ascaris suis*. *Am J Physiol* 199: 575-578; 1960
- 100.Uvnäs B, Wold JK. Isolation of a mast cell-degranulating polypeptide from *ascaris suis*. *Acta physiol Scand* 70: 269-276; 1967
- 101.van Die I, Cummings RD. Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy. *Chem Immunol Allergy* 90: 91-112; 2006
- 102.van Kolfs F. Diet of worms protects against bowel disease. *New Sci* 2442: 8; 2004
- 103.von Baehr R, Sima D. Infektionen und allergische Reaktionen. *Allergology* 9: 354-362; 1993
- 104.Wan T, Beavil RL, Fabiane SM, Beavil AJ, Sohi MK, Keown M, Young RJ, Henry AJ, Owens RJ, Gould HJ, Sutton BJ. The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation. *Nat Immunol* 3: 681–686; 2002
- 105.Warner JA, MacGlashan DW Jr. Protein kinase C (PKC) changes in human basophils. IgE-mediated activation is accompanied by an increase in total PKC activity. *J Immunol* 142(5): 1669-1677; 1989
- 106.Warren KS, Domingo EO, Cowan RB. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am J Pathol* 51(5): 735-756; 1967
- 107.Wurzberg BA, Garman SC, Jardetzky TS. Structure of the human IgE-Fc C epsilon 3- C epsilon 4 reveals conformational flexibility in the antibody effector domains. *Immunity* 13: 375–385; 2000
- 108.Wyler DJ, Wahl SM, Cheever AW, Wahl LM. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. I. Stimulation in vitro of fibroblasts by soluble products of egg granulomas. *J Infect Dis* : 144(3); 1981
- 109.Yamashita T, Boros DL. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis *mansoni*. *J Immunol* 149 (11): 3659-3664; 1992
- 110.Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, KayAB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Immunol* 158: 5050–5057; 1997
- 111.Yoshimura-Uchiyama C, Iikura M, Yamaguchi M, Nagase H, Ishii A, Matsushima K, Yamamoto K, Shichijo M, Bacon KB, Hirai K. Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D2 receptors DP and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells/DP2. *Clin Exp Allergy* 34: 1283–

1290; 2004

- 112.Zheng X, Karsan A, Duronio V, Chu F, Walker DC, Bai TR, Schellenberg RR. Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. *Immunology* 107: 306–315; 2002

11. Anhang

11.1. Veröffentlichungen

Paper:

Gibbs BF, R  thling A, Zillikens D, Huber M, Haas H. Initial Fc  RI-mediated signal strength plays a key role in regulating basophil signaling and deactivation. J Allergy Clin Immunol 118(5): 1060-1067; 2006

Gibbs BF, R  thling A, Huber M, Haas H. Substantial differences in the kinetics of histamine release from human basophils caused by varying strengths of IgE-dependent activators. Inflamm Res 14; 2007

Abstracts:

Gibbs BF, R  thling A, Schramm G, Blindow S, Doenhoff MJ, Spillner E, Sutton BJ, Zillikens D, Haas H. A parasitic antigen (IPSE) secreted by schistosoma mansoni eggs causes immunoglobulin E-dependent basophil activation in non-sensitized individuals without crosslinking immunoglobulin E. Exp Dermatol 15: 188-189; 2006

(wurde als Poster und Vortrag im 33rd Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Aachen, 23.-25. März 2006, vorgestellt)

Gibbs BF, R  thling A, Huber M, Zillikens D, Haas H. The kinetics of immunoglobulin E-mediated signalling and mediator release in human basophils crucially depend on the magnitude of stimulation and are controlled by the phosphatase SHIP. Exp Dermatol 15: 188; 2006

(wurde als Poster im 33rd Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Aachen, 23.-25. März 2006, vorgestellt)

11.2. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Bernhard F. Gibbs für die Überlassung des Themas, für eine fundierte Ausbildung in der wissenschaftlich, experimentellen Forschung sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien.

Herrn Prof. Dr. med. D. Zillikens gebührt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. H. Haas und seiner Forschungsgruppe für die Herstellung und freundliche Überlassung des IPSE.

Herrn Dr. E. Spillner danke ich für die Produktion und Überlassung von IgE(Fc)-Fragmenten.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Kirchner und seinen Mitarbeitern in der Blutbank für die freundliche Überlassung der Buffy Coats.

Frau Kongsbak-Reim möchte ich für die zahlreichen praktischen Hilfestellungen sowie für ihre logistische Unterstützung danken, die mir den Laboralltag erleichtert haben.

Den Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Lübeck spreche ich meinen Dank aus, da sie mir während der Umbauarbeiten des Mastzelllabors einen Teil ihres Arbeitsbereiches zur Verfügung stellten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meinen Eltern, für ihre Unterstützung.

11.3. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Anne Rätthling
Geburtsdatum	16. Mai 1981
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	verheiratet, 1 Kind (geb. am 24. Mai 2006)



Schulische Ausbildung und Hochschulstudium

08/1987 – 07/1991	Grundschule Alsterdorfer Straße, Hamburg
08/1991 – 07/1991	Gymnasium Eppendorf, Hamburg, bilingualer Zweig (Englisch), Abschluss: Abitur, Note: 1,4
ab 10/2001	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
09/2003	Ärztliche Vorprüfung, Note: 2,66
12/2004 – 05/2006	Experimentelle Untersuchungen der Dissertation

Pflegepraktikum und Famulaturen

08/2001 – 8 Wochen	Innere Medizin, Israelitisches Krankenhaus, Hamburg (Pflegepraktikum)
09/2003 – 4 Wochen	Sport- und Bewegungsinstitut, Hamburg
02/2004 – 4 Wochen	Unfall-, Gelenk- und Wirbelsäulenchirurgie, Sana Kliniken, Lübeck
08/2004 – 4 Wochen	Kardiologie, Hospital Clínic Universitari, Valencia, Spanien (dfa-Famulatur)
02/2006 – 4 Wochen	Internistische Praxis Dr. Studt, Lübeck
03/2006 – 2 Wochen	Dermatologische Praxis Dr. Schulz-Kiesow/Dr.Reimers, Lübeck

Praktisches Jahr

12/2006 – 02/2007	allgemeinchirurgische Ambulanz, Notfallaufnahme und OP, UK-SH, Lübeck
02/2007 – 04/2007	Kinderchirurgie: Station, Poliklinik, Notfallaufnahme und OP, UK-SH, Lübeck
04/2007 – 06/2007	Innere Medizin: Station und Notfallaufnahme, Spitalzentrum Oberwallis, Visp, Schweiz
06/2007 – 08/2007	Endokrinologie, Medizinische Klinik I, UK-SH, Lübeck
08/2007 – 12/2007	Klinik für Dermatologie und Venerologie: Station, Poliklinik und OP, UK-SH, Lübeck

Zusätzliche Tätigkeiten

10/2000 – 05/2001	Tätigkeit als Au-pair, Madrid, Spanien
03/2002 – 12/2003	Tätigkeit als Exrawache, UK-SH, Lübeck
SS 2003	Praktikumsassistent im medizinstudentischen Histologiekurs, Universität zu Lübeck
05/2004 – 05/2006	Tätigkeit als Nachtwache, sozialtherapeutische Einrichtung „Die Brücke“, Lübeck