

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

**Mastzellen und Proteinase-aktivierbare Rezeptoren (PAR) :
Expression funktioneller PAR durch primäre humane Mastzellen
und
Einfluss des PAR-Liganden Thrombin auf die Fc ϵ RI-vermittelte
Degranulationsreaktion**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Oranos Ghulam
Hamburg
2010

Referent/in : Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Koreferent/in : Prof. Dr. Thomas Röder

Tag der mündlichen

Prüfung : 15.06.2010

Zum Druck genehmigt : 15.06.2010

gez. Der Dekan : Prof. Dr. Lutz Kipp

1	EINLEITUNG	1
1.1	MASTZELLEN	1
1.1.1	Physiologische Bedeutung von Mastzellen.....	4
1.1.2	Mastzellen in der allergischen Reaktion	6
1.1.2.1	Die akute allergische Reaktion.....	7
1.1.2.2	Die allergische Spätreaktion	8
1.2	IGE-UNABHÄNGIGE AKTIVIERUNG VON MASTZELLEN.....	10
1.2.1	Proteinase-aktivierbare Rezeptoren	11
1.2.2	Aktivierung Proteinase-aktivierbarer Rezeptoren.....	14
1.2.3	Mastzellen und Proteinase-aktivierbare Rezeptoren.....	17
1.3	FRAGESTELLUNG	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	AGENZIEEN ZUR KULTUR UND STIMULATION VON MASTZELLEN	21
2.2	ENZYME UND INHIBITOREN	22
2.2.1	Enzyme zum Aufschluss humanen Gewebes (Lunge und Haut)	22
2.2.2	Zur Modulation der Mastzellreaktivität eingesetzte Proteinase.....	22
2.3	ZUR ZELLISOLIERUNG, IN DER ZELLKULTUR UND ZUR IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND STIMULATION EINGESETZTE ANTIKÖRPER	23
2.4	ISOLIERUNG UND KULTUR HUMANER MASTZELLEN.....	25
2.4.1	Herkunft von Gewebeproben humaner Lunge und humaner Haut	25
2.4.2	Isolierung humaner Mastzellen aus Lungen- und Hautgewebe	26
2.4.2.1	Vorbereitung des Gewebes für den enzymatischen Verdau.....	26
2.4.2.2	Enzymatischer Aufschluss des Lungen- und Hautgewebes	27
2.4.2.2.1	Enzymatischer Aufschluss des Lungengewebes	27
2.4.2.2.2	Enzymatischer Aufschluss des Hautgewebes	27

2.4.2.3	Anreicherung humaner Lungen- und Hautmastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	28
2.4.2.3.1	Anreicherung humaner Lungenmastzellen	29
2.4.2.3.2	Anreicherung humaner Hautmastzellen	30
2.4.2.4	Aufreinigung humaner Mastzellen mittels Magnetseparation	31
2.4.2.4.1	Magnetseparation humaner Lungenmastzellen	32
2.4.2.4.2	Magnetseparation humaner Hautmastzellen	34
2.4.3	Kultur primärer humaner Lungen - und Hautmastzellen.....	35
2.4.4	Kultur der Mastzelllinie LAD 2	35
2.4.5	Bestimmung der Zellviabilität	36
2.4.6	Bestimmung des Mastzellanteils	37
2.5	ISOLIERUNG VON BASOPHILEN GRANULOZYTEN	37
2.6	BIOCHEMISCHE UND BIOLOGISCHE TESTVERFAHREN	37
2.6.1	Hexosaminidase-Release-Assay.....	37
2.6.2	Hexosaminidase-Release-Assay nach Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Proteinaseen oder Inhibitoren.....	39
2.6.3	Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen auf Mastzellen.....	40
2.6.3.1	Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung von PAR auf primären Mastzellen und LAD 2 Zellen	41
2.6.3.2	Analyse im Durchflusszytometer	42
2.6.4	Messung des intrazellulären Gehaltes an freien zytosolischen Kalziumionen.....	43
2.6.4.1	Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM und Analyse im Durchflusszytometer	43
2.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE TESTVERFAHREN	44
2.7.1	RNA-Isolierung	44
2.7.2	Reverse Transkriptase-Reaktion zur Synthese komplementärer DNA	45
2.7.3	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	47
2.7.4	Real-Time Polymerasekettenreaktion (Real Time-PCR)	49

2.7.4.1	LightCycler PCR SYBER Green Assay	50
2.7.4.2	LightCycler PCR Probe Master Assay	51
2.7.4.3	Agarose – Gelelektrophorese	53
2.7.4.4	PAR1 und PAR4 Gen – knockdown durch siRNA (small interfering RNA).....	54
2.8	DARSTELLUNG DER DATEN	56
2.9	STATISTIK	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	EXPRESSION VON PROTEINASE-AKTIVIERBAREN REZEPTOREN AUF HUMANEN MASTZELLEN	57
3.1.2	PAR mRNA-Expression in primären humanen Mastzellen der Haut und der Lunge und in LAD 2-Zellen.....	57
3.1.3	Nachweis der Zelloberflächenexpression von PAR auf humanen primären Lungen- und Hautmastzellen und Zellen der Linie LAD 2.....	59
3.1.4	Nachweis der intrazellulären Expression von PAR2 in humanen Mastzellen der Lunge und der Haut und in LAD 2-Zellen.....	62
3.1.5	Versuche zur Aufregulation der Oberflächenexpression des PAR2 durch Behandlung mit Proteinaseinhibitoren und verschiedenen Zytokinen	62
3.2	AKTIVIERUNG HUMANER MASTZELLEN DURCH SYNTHETISCHE PAR-AKTIVIERENDE PEPTIDE (PAR-AP) UND POTENTIELLE PHYSIOLOGISCHE PAR-LIGANDEN.....	67
3.2.1	Degranulation von humanen Mastzellen nach Stimulation mit PAR-aktivierenden Peptiden und PAR-spezifischen Proteinasen	67
3.2.2	Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Kalziumionen in Mastzellen nach Stimulation mit PAR-AP und PAR-spezifischen Proteinasen	72
3.3	REGULATION DER FCεRI-INDUZIERTEN DEGRANULATION VON MASTZELLEN DURCH DIE PROTEINASE THROMBIN	76
3.3.1	Thrombin inhibiert die FcεRI-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen	76

3.3.2	Vergleich des Einflusses von bovinem und humanem Thrombin auf die FcεRI-induzierte Degranulation.....	82
3.3.3	Einfluss anderer PAR-spezifischer Proteinasen auf die FcεRI-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen.....	83
3.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER DURCH THROMBIN VERMITTELTEN INHIBITION DER MASTZELLDEGRANULATION	86
3.4.1	Wirkung von Thrombin auf die durch Substanz P und LL 37 induzierte Degranulation humaner Mastzellen	86
3.4.2	Bedeutung der enzymatischen Aktivität und der Interaktion mit Integrinen für die Thrombin- vermittelte Inhibition der FcεRI-induzierten Mastzelldegranulation	87
3.4.2.1	Hitzedenaturierung hebt die inhibitorische Wirkung des Thrombins auf die Mastzelldegranulation auf.....	89
3.4.2.2	Blockierung der enzymatischen Aktivität von Thrombin hebt dessen inhibitorische Wirkung auf	90
3.4.2.3	Synthetische RGD-Peptide und Prothrombin modulieren nicht die FcεRI-vermittelte Degranulation humaner Mastzellen.....	94
3.4.3	Thrombin beeinflusst nicht die Bindung von IgE auf der Oberfläche von humanen Mastzellen	95
3.4.4	Thrombin inhibiert nicht die FcεRI-induzierte Degranulation humaner basophiler Granulozyten.....	96
3.4.5	Desensibilisierung von PAR und PAR-Liganden-vermittelter Funktionen durch Thrombin und PAR-AP	98
3.4.5.1	Internalisierung von PAR1 auf humanen Mastzellen durch Thrombin und PAR-AP.....	98
3.4.5.2	Vorinkubation humanen Mastzellen mit Thrombin hebt die durch PAR1-AP und PAR4-AP- induzierten Ca-Signale auf.....	100
3.4.5.3	Vorinkubation mit Thrombin hebt die durch PAR1-AP und PAR4-AP induzierte Mastzelldegranulation auf	102
3.4.6	Beteiligung von PAR an der durch Thrombin induzierten Inhibition der Mastzelldegranulation.....	104

3.4.6.1	Aktivierung von PAR1 und PAR4 mit PAR-AP inhibiert die Fc ϵ RI-induzierten Mastzelldegranulation.....	104
3.4.6.2	Die Transfektion von Mastzellen mit siRNA für PAR1 und PAR4 hat keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von Thrombin.....	108
3.4.6.3	Intrazelluläre Antagonisten für PAR1 und PAR4 (Pepduzine) heben Thrombins inhibitorischen Effekt auf die Mastzelldegranulation auf.....	110
4	DISKUSSION	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	131
5.1	Zusammenfassung in deutscher Sprache.....	131
5.2	Zusammenfassung in englischer Sprache / Summary.....	133
6	LITERATUR.....	135
7	ANHANG.....	153
7.1	GERÄTE	153
7.2	COMPUTERPROGRAMME.....	153
7.3	REAGENZIEN UND LÖSUNGEN	154
7.3.1	Zellisolierung und Zellkultur	154
7.3.2	Hexosaminidase Release Assay	156
7.3.3	RNA-Isolierung	156
7.3.4	cDNA-Synthese, RT-Reaktion und PCR.....	157
7.3.5	siRNA-Behandlung von Mastzellen	159

Abkürzungen

α	gegen (<i>anti-</i>)
Abb.	Abbildung
AM	Azetoxymethanol
APC	aktiviertes Protein C
bp	Basenpaare
Braun dest	Wasser für Injektionszwecke, sterilisiert
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-Kit (CD117)	Rezeptor für SCF
DEPC	Dicarbonyldicarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo-4	N-[4-[6-[(acetyloxy)methoxy]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xanthen-9-yl]-2-[2-[2-[bis[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]phenyl]-N-[2-[(acetyloxy)methoxy]-2-oxoethyl]- (acetyloxy)methyl ester
Fc ϵ RI	Rezeptor für Immunglobulin E (IgE)
FCS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guanidinnukleotid bindendes Protein

GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>lat. Hora</i> (Stunde)
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
HLMZ	Humane Lungenmastzellen
HHMZ	Humane Hautmastzellen
HNP	Humanes Neutrophilen Protein (<i>human neutrophil protein</i>)
IgG	Immunglobulin G
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
LAD 2	<i>laboratory of allergic diseases 2</i>
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-D	phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco
PE	Phycoerythrin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SCF	<i>stem cell factor (c-Kit ligand)</i>
SubP	Substanz P
SV	Säulenvolumen
TAE	(Tris Acetat EDTA)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPL	<i>Universal Probe Library</i>
w/v	Weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

Der Organismus steht im ständigen Kontakt mit seiner Umwelt und muß daher einen permanenten Abwehrkampf gegen mikrobielle Erreger wie Bakterien, Viren oder Parasiten aufrecht erhalten. Die erste Verteidigungslinie stellen dabei die zellulären und löslichen Komponenten der angeborenen Immunität dar. Diese Abwehr findet bereits an den verschiedenen Grenzflächen des Körpers wie Haut, Lunge und Darm statt. In diesen peripheren Geweben sind neben Phagozyten gehäuft Mastzellen anzutreffen. Diese sind vornehmlich in der Nähe von Blutgefäßen lokalisiert. Sie sind die zellulären Mediatoren in der allergischen Entzündung. Hier lösen sie nach Aktivierung durch Allergene die für eine Allergie bekannten Symptome wie Husten, Niesen und Juckreiz aus. Neben ihrer Beteiligung an allergischen Reaktionen sind Mastzellen auch in Reaktionen der angeborenen Immunität involviert. Hier besteht ihre Funktion hauptsächlich darin Pathogene zu erkennen und proinflammatorische Mediatoren freizusetzen, die wiederum für die Rekrutierung verschiedener Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten oder T-Zellen verantwortlich sind.

1.1 Mastzellen

Mastzellen wurden zum ersten Mal von Paul Ehrlich beschrieben, der 1878 im Rahmen seiner Dissertationsarbeit unter anderem die Eignung von Anilinblau zum Färben verschiedener Zelltypen in Gewebeschnitten untersuchte. Er konnte zeigen, dass die Behandlung mit Anilinblau zu einem charakteristischen Färbeverhalten bestimmter Granula enthaltender Zellen führte. Er erklärte dieses Phänomen damit, dass diese Zellen eine (bis dahin noch undefinierte), charakteristische Substanz in ihren Granula enthalten, die in einer chemischen Reaktion mit Anilinblau eine tief violette Färbung dieser Granula zur Folge hat. Diesen Farbumschlag nannte er „Metachromasie“ und die angefärbten Zellen „Mastzellen“, da er der Ansicht war, dass Mastzellen Bestandteile aus dem umliegenden Gewebe phagozytieren, welche dann in Form von Granula im Zytoplasma sichtbar werden (140). Heute weiß man, dass es sich bei der von Ehrlich beobachteten Substanz um das negativ

geladene, saure Glykosaminoglykan Heparin handelt. Heparin wird in den sekretorischen Granula der Mastzelle gespeichert und kann durch das heute häufig verwendete Anilinderivat Toluidinblau angefärbt werden. Seine Funktion besteht darin, eine Matrix für ebenfalls in den Granula enthaltene, in kristalliner Form vorliegende präformierte Mediatoren zu bilden (2, 3).

Mastzellen sind selektiv und in großen Mengen angrenzend an Blut- und Lymphgefäßen anzutreffen. Sie befinden sich vorwiegend unter der Epithelzellschicht der Haut im Corium und in der Lamina propria der Schleimhaut des Urogenital-, Gastrointestinal- und des respiratorischen Traktes (4). Sie entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks und emigrieren als unreife Vorläuferzellen in den Blutkreislauf von wo aus sie in die verschiedenen Gewebe einwandern. Dort differenzieren sie unter dem gewebespezifischen Zytokinmilieu zu adulten Mastzellen aus. Innerhalb der Gewebe spielt der von verschiedenen Stromazellen (z.B. Fibroblasten) gebildete Wachstumsfaktor SCF (*stem cell factor*) bei der Entwicklung und Ausdifferenzierung von Mastzellen (5, 6) eine wichtige Rolle. SCF bindet über seinen spezifischen, über Tyrosinkinasen signalisierenden Rezeptor CD117 (c-Kit) an die Zelloberfläche und interagiert auf diese Weise mit Mastzellen. Während SCF für andere aus Knochenmarkszellen ausdifferenzierte Zelltypen in deren frühen Entwicklungsphase entscheidend ist, ist er bei Mastzellen nicht nur für die Zellreifung essentiell, sondern auch für das Überleben und die Proliferation der ausdifferenzierten Zelle von großer Bedeutung (7). Deshalb tragen Mastzellen im Gegensatz zu anderen Zelltypen in allen Entwicklungsstadien CD117 auf ihrer Oberfläche (8). Studien sowohl an humanen als auch an murinen Mastzellen haben gezeigt, dass selbst in gesunden Organismen Unterschiede innerhalb der verschiedenen Mastzellpopulationen hinsichtlich ihrer histochemischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften zu beobachten sind (9). Diese als Mastzellheterogenität bezeichneten Eigenschaften führen unter anderem dazu, dass Mastzellen verschiedener Gewebe unterschiedlich auf mastzellspezifische Stimuli reagieren (10). Die einzelnen Mastzellpopulationen lassen sich hinsichtlich ihrer Gewebelokalisation und ihrer Granulainhalte voneinander unterscheiden. Dabei ist allerdings

anzumerken, dass es kein allgemeingültiges, auf alle Spezies übertragbares Einteilungsschema gibt. In den sechziger Jahren wurden Mastzellen hinsichtlich ihrer Formalinresistenz eingeteilt. Beobachtungen an murinen Mastzellen hatten gezeigt, dass Mastzellen der Haut nach Fixierung in Formalin weiterhin eine „Metachromasie“ aufwiesen, während Mastzellen der intestinalen Mukosa sich nicht mehr mit Toluidinblau anfärben ließen. Beim Menschen kann die Formalinresistenz nicht als Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden, da Mastzellen beider Typen sowohl in der Haut als auch in der intestinalen Mukosa vorkommen (11, 12). Ein Unterscheidungsmerkmal hier ist der Gehalt an den mastzellspezifischen Proteasen Tryptase und Chymase (9). Demnach werden humane Mastzellen in drei Subtypen eingeteilt: Mastzellen, die entweder Tryptase (M_T) oder Chymase (M_C) enthalten und Mastzellen die beide Proteasen exprimieren (M_{TC}). Sie unterscheiden sich dabei auch in ihrer Form, Größe und der Anzahl und Ultrastruktur ihrer Granula (13, 14). Mastzellen vom Typ M_{TC} exprimieren neben Tryptase und Chymase auch Carboxypeptidase und Kathepsin G. Sie kommen vor allem in der Haut, den Mandeln und der Submukosa des Darms vor, während Mastzellen der Lunge vorwiegend dem M_T Typ angehören. Mastzellen des Typs M_C sind sowohl in der Lunge als auch in der Mukosa und der Submukosa des Gastrointestinaltraktes anzutreffen (9, 15). Die physiologische Bedeutung der verschiedenen Subtypen ist jedoch noch nicht völlig verstanden. Ein anderes Unterscheidungsmerkmal für Mastzellen ist ihre Gewebelokalisation. Je nach ihrem (anatomisch eingrenzba- ren) Aufenthaltsort unterscheidet man Bindegewebsmastzellen (*connective tissue mast cells, CTMC*), die mit durchblutetem Bindegewebe assoziiert sind und Mukosamastzellen (*mucosal mast cells, MMC*), die man in der Submukosa des Respirations- und Gastrointestinaltraktes findet (16).

Mastzellen exprimieren eine Reihe von verschiedenen sezernierbaren Mediatoren. Dabei unterscheidet man zwischen zwei Mediator- klassen. Neben der Ausschüttung von präformierten, in zytoplasmatischen Granula gelagerten Mediatoren wie Proteasen, Proteoglykanen oder Histamin sind Mastzellen nach Aktivierung auch zur Neusynthese verschiedener Mediatoren wie von Lipidmediatoren, Leukotrienen, Prostaglandinen und

Thromboxane (17) oder verschiedener Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL4 oder IL-13 (18-20) in der Lage. Der wichtigste Mechanismus zur Aktivierung von Mastzellen besteht in der Kreuzvernetzung von auf der Zelloberfläche exprimierten IgE-Rezeptoren ($\text{FC}\epsilon\text{RI}$) durch polyvalente Antigene bzw. Allergene, oder experimentell durch anti-IgE (αIgE) Antikörper. Diese für IgE hochaffinen Rezeptoren binden IgE-Moleküle über deren Fc-Region und sind *in vivo* stets mit IgE beladen (21, 22). Bindet ein multivalentes Antigen an mindestens zwei dieser IgE-Moleküle so kommt es infolge dieser Kreuzvernetzung („*crosslinking*“) zur Aktivierung der Zelle. Nach Aktivierung verschmelzen die intrazellulären sekretorischen Granula mit der Plasmamembran. Die darin enthaltenen Mediatoren gehen in eine lösliche Form über und werden durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust, ein Vorgang, der als Degranulation bezeichnet wird (3, 21). Neben den Aktivatoren der IgE-abhängigen Degranulation gibt es auch andere physiologische, IgE-unabhängige Stimuli, die eine Degranulation von Mastzellen induzieren können. Zu diesen Stimuli gehören z.B. verschiedene Peptidhormone wie das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) (23), Somatostatin (24, 25) und das Neuropeptid Substanz P (SP) (26). Zusätzlich zu diesen physiologischen Stimuli gibt es verschiedene synthetische Agenzien wie z.B. Mastoparan (ein bienengiftähnliches Oligopeptid), das stark basische Peptid *compound 48/80* oder das porenbildende Kalziumionophor A23187 (24-26), die Mastzellen zur Degranulation veranlassen können. Eine langfristige Aktivierung von Mastzellen führt zur Neusynthese verschiedener Zytokine wie IL-4, oder $\text{TNF}\alpha$, die ihrerseits für die Aktivierung anderer Zelltypen wie Th_2 -Zellen oder Endothelzellen verantwortlich sind (16).

1.1.1 Physiologische Bedeutung von Mastzellen

Mastzellen sind sowohl an immunologischen als auch an nicht-immunologischen Reaktionen beteiligt. Neben ihrer Bedeutung für allergischen Reaktionen, die bisher als ihre wichtigste Funktion eingeschätzt wurde (s. Näheres unter 1.1.2), ist ihre Beteiligung an verschiedenen nicht-immunologischen, regulatorischen Mechanismen, wie z. B. am Geweberemodelling, an der Wundheilung und der Homöostase zunehmend deutlich geworden. Untersuchungen

diesbezüglich wurden überwiegend im murinen System durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass murine Mastzellen durch die Bildung verschiedener Wachstumsfaktoren (*nerve growth factor (NGF)*, *platelet derived growth factor (PDGF)*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*) sowohl Gewebeintegrität als auch Funktionalität (27-30) beeinflussen. Sie sind so auch an Reparaturmechanismen wie der Regeneration der Epithelzellschicht und der Revaskularisierung nach Gewebeschädigungen beteiligt (31, 32). Auch humane Mastzellen produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren. Die Freisetzung von VEGF und PDGF durch humane Mastzellen wurde zwar beschrieben, inwieweit sie aber in Angiogeneseprozesse involviert sind, ist noch ungeklärt (33, 34). Die Freisetzung verschiedener Mastzellmediatoren wie Tryptase (im menschlichen System) und die vasoaktiven Substanzen Histamin (im humanen System) oder auch Serotonin (im murinen System) hat Einfluss auf sensorische Neuronen. Umgekehrt können durch Neuronen freigesetzte Mediatoren wie Substanz P und VIP (*vaso-intestinal peptide*) Mastzellen aktivieren (23, 28). Desgleichen konnte eine Beteiligung von Mastzellen auch an der Homöostase verschiedener Organe und Gewebe gezeigt werden. Maurer *et al.* zeigte, dass von Mastzellen freigesetztes Histamin und TNF Einfluss auf Haarzyklus und Haarwachstum bei Mäusen haben (27, 35, 36). Der Abbau des vasokonstriktorisches Peptids Enothelin-1 durch murine Mastzellproteasen ist ein weiteres Beispiel für die Beteiligung an homöostatischen Prozessen (37).

Im murinen System manifestiert sich die immunologische Relevanz von Mastzellen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunabwehr. Von Vorteil ist dabei ihre strategisch günstige Lokalisation in der Nähe der hauptsächlichen Eintrittswege für Mikroorganismen bzw. deren Antigene, d. h. in der Haut, in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt. Diese Positionierung bietet optimale Voraussetzungen für Interaktionen mit der „Außenwelt“ und die daraus resultierenden protektiven Immunantworten (27, 38-41). So sind z.B. Mastzellen in der Lage durch die rasche Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und Leukotrienen (LTB_4 und LTC_4) neutrophile Granulozyten während einer bakteriellen Infektion an den Infektionsherd zu rekrutieren (42). Die Expression verschiedener *toll-like*-Rezeptoren

(TLR2,3,4,7,9) und Rezeptoren des Komplementsystems (C3aR, C5aR) trägt dazu bei, dass an diese Rezeptoren bindende mikrobielle Bestandteile (z.B. doppelsträngige virale RNA und Lipopolysaccharide bzw. Immunkomplexe) die Produktion von Zytokinen und Chemokinen induzieren, die wiederum das Einwandern von Effektorzellen in das betroffenen Gewebe ermöglichen (27, 43). Mastzellen besitzen jedoch auch eigenständige antibakterielle Funktionen wie z.B. (in geringem Maße) die Phagozytose von Pathogenen oder die Freisetzung von NO, Superoxidradikalen und antimikrobiellen Peptiden (z.B. Cathelicidine) (44-46). Verschiedene Untersuchungen zur Rolle von Mastzellen in der adaptiven Immunantwort beschreiben die Beteiligung dieser Zellen an der Aktivierung von T-Zellen (27). So führt eine Darminfektion mit Würmern zu einer Anhäufung von Mastzellen (Mastozytose) und der Freisetzung sogenannter Th2 Zytokine (IL-4, IL-9, IL-10, IL-13), die für eine Th2-Zellaktivierung verantwortlich sind, was zur beschleunigten Ausschleusung des Erregers führt (47, 48). Auch für das menschliche System ist die Beteiligung von Mastzellen an der Immunabwehr diskutiert worden. Burke *et al.* zeigten, dass humane Mastzellen aus der Nabelschnur in der Lage sind nach Stimulation mit TLR-Liganden (z.B. poly (I:C)) Zytokine zu produzieren, welche wiederum für die chemotaktische Anlockung von NK-Zellen oder CD8+ T-Zellen verantwortlich sind (43, 49). Die Fähigkeit von humanen Hautmastzellen nach Stimulation IL-8 freizusetzen liefert einen Hinweis auf deren Beteiligung an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (50). Zusätzlich lassen einige wenige Untersuchungen zu humanen Mastzellen auf ihre Eigenschaft als antigenpräsentierende Zellen schließen (38, 51). So ist die Expression von MHC II-Molekülen auf der Mastzelllinie HMC-1 als auch in primären humanen Mastzellen z.B. Haut beschrieben worden. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass MHC-II-vermittelte Antigenpräsentation zu einer Aktivierung von CD4+ T-Zellen führt (51).

1.1.2 Mastzellen in der allergischen Reaktion

Der Begriff „Allergie“ geht auf Clemens von Pirquet zurück, der die Allergie „ als eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf Fremdstoffen zu reagieren“. beschreibt. Diese

Definition ist eine sehr Allgemeine, die gleichermaßen physiologische als auch pathophysiologische Immunreaktionen umfasst. Bei einer Allergie haben die ausgelösten Immunreaktionen jedoch bedeutsame pathophysiologische Folgen. Daher beschreibt der Ausdruck „Allergie“ heute nachteilige Immunreaktionen des Körpers, ausgelöst durch ansonsten harmlose Antigene, die hier jedoch zu Gewebeschäden und zu ernsthaften Erkrankungen und sogar zum Tod führen können. Allergische Reaktionen, auch Hypersensibilitäts- oder Überempfindlichkeitsreaktionen genannt, werden in vier Typen eingeteilt (Typ I, II, III, IV). Die Typen I bis III werden durch Antikörper induziert. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Klasse der beteiligten Antikörper. Während Typ I die IgE-vermittelte allergische Reaktion darstellt, werden die Typen II und III durch Interaktion des Antigens mit IgG-Antikörper ausgelöst. Der vierte Typ (Typ IV) ist keine durch Antikörper vermittelte sondern eine auf zellulärer Ebene induzierte Reaktion. Die daran beteiligten Zelltypen sind T_H1 - und T_H2 -T-Zellen sowie eosinophile Granulozyten (16).

Die IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion kann in drei zeitlich voneinander abgegrenzte Reaktionen eingeteilt werden: 1) die akute allergische Reaktion, auch allergische Sofortreaktion genannt, welche sich innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Antigenkontakt entwickelt, 2) die allergische Spätreaktion, welche sich innerhalb von Stunden aufbaut und 3) die chronische allergische Entzündungsreaktion, die über Tage bis zu Jahren persistieren kann (52).

1.1.2.1 Die akute allergische Reaktion

Die Atemwege stellen beim Menschen den häufigsten Eintrittsweg für Allergene dar. Viele Menschen besitzen deshalb schwache Allergien gegen solche eingeatmete Allergene. Diese äußern sich in Symptomen wie „Heuschnupfen“ (allergische Rhinitis) oder Bindehautentzündung (Konjunktivitis) bekannt. Allergene dringen dabei in geringen Dosen durch Diffusion über Schleimhäute in die darunterliegenden Gewebe ein und lösen innerhalb von Sekunden aufgrund von Mastzellaktivierung eine allergische Sofortreaktion aus. Dieses führt zu den bekannten Symptomen wie Juckreiz und Niesanfällen direkt nach

Allergenexposition. Die Aktivierung von Mastzellen führt zur Ausschüttung verschiedener präformierter Mediatoren, die direkten Einfluss auf das umliegende Gewebe haben. So induziert die Freisetzung des vasoaktiven Histamins eine lokal erhöhte Durchblutung und Gefäßpermeabilität (16, 52), während die mastzellspezifischen Proteinase Chymase, Tryptase, Kathepsin G und Carboxypeptidase A Metalloproteinase des Bindegewebes aktivieren, die ihrerseits Matrixproteine abbauen und so Gewebeschädigungen hervorrufen können. Verstärkt wird diese Reaktion durch freiwerdende Lipidmediatoren wie die Leukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄. Diese wirken sehr schnell und induzieren ebenfalls eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur und Schleimfreisetzung (16). Letzteres führt beim allergischen Asthma (betroffenes Organ ist die Lunge) zu Hustenanfällen und Atemnot. Die freigesetzten Mediatoren sind nur für kurze Zeit aktiv und die durch sie ausgelöste Reaktion ist lokal auf den Ort der Mastzelldegranulation beschränkt. Gelangt das Allergen jedoch direkt in den Blutkreislauf (z.B. durch Insektenstiche oder Injektion) oder wird es vom Darmepithel (z.B. durch Nahrungsaufnahme) schnell absorbiert, können Bindegewebsmastzellen an allen Blutgefäßen aktiviert werden. Diese systemische Mastzellaktivierung führt zum Syndrom des anaphylaktischen Schocks. Die Folge ist eine erhöhte Permeabilität vieler Blutgefäße, was zum drastischen Blutdruckabfall führt. Es kommt zur Bronchokonstriktion in den Atemwegen und zum Anschwellen des Kehlkopfes und dadurch möglicherweise zum Erstickungstod.

1.1.2.2 Die allergische Spätreaktion

Anders als die allergische Sofortreaktion entwickelt sich die allergische Spätreaktion nicht innerhalb von Sekunden sondern setzt mehrere Stunden nach Antigenkontakt ein, oft erst wenn die Effekte der Sofortreaktion nachgelassen haben (52). Klinisch ist diese Reaktion weniger stark ausgeprägt. Sie wird begleitet von einer zweiten Kontraktionsphase der Vaskulatur und anhaltenden Ödemen. Bei länger anhaltendem Allergenkontakt kann sie zu chronischen Krankheitsbildern (z.B. chronisches Asthma) führen.

Während bei der akuten Reaktion die Symptome hauptsächlich durch Mastzellen und von ihnen freigesetzte präformierte Mediatoren ausgelöst werden, sind bei der Spätreaktion neben Mastzellen, d.h. über die von ihnen neu synthetisierten Mediatoren, auch andere Zelltypen wie Endothelzellen und Leukozyten beteiligt (16, 52, 53). Die von Mastzellen sezernierten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, sowie Leukotriene oder Histamin aktivieren Endothelzellen, was zur Aufregulation von bestimmten Adhäsionsmolekülen (z.B. P-Selektin, E-Selektin) auf deren Zelloberfläche führt. Daraufhin werden Leukozyten, wie neutrophile und eosinophile Granulozyten und $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen aus dem Blut ins Gewebe an den Entzündungsherd rekrutiert (53-55). Diese schütten weitere immunmodulatorische Substanzen aus, die ihrerseits für die Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion verantwortlich sind. So induziert die Bildung und Freisetzung von IL-5 durch $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen und Mastzellen die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (Eosinophile) (16, 56). Dies führt zur Freisetzung von MBP (*major basic protein*) und in einem rückläufigen Zyklus zur Amplifikation der Aktivierung von Mastzellen und von basophilen Granulozyten (Basophile) (16, 56, 57). Neben den Mastzellen selbst werden auch Basophile und Eosinophile für die starken Gewebeschädigungen der allergischen Spätreaktion verantwortlich gemacht. Die von Mastzellen ausgeschütteten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, VEGF und $\text{TGF}\beta$ können in verschiedenen Zelltypen (z.B. Fibroblasten, Epithelzellen) die Zellproliferation aktivieren, was zur Gefäßneubildung und zum Gewebeumbau (*tissue remodeling*) führt. Die längerfristige Exposition gegenüber einem Allergen kann letztlich zu einer Chronifizierung (chronische allergische Entzündungsreaktion) der Entzündung führen, welche assoziiert ist mit massiven strukturellen und funktionellen Veränderungen im betroffenen Gewebe (52, 58, 59).

1.2 IgE-unabhängige Aktivierung von Mastzellen

Mastzellen lassen sich, wie bereits erwähnt, über verschiedene Mechanismen aktivieren, wobei der wichtigste Mechanismus im „*crosslinking*“ von IgE-Molekülen besteht, was zur Ausschleusung verschiedener präformierter oder neusynthetisierter Mediatoren führt. Neben dieser IgE-abhängigen Aktivierung gibt es eine Reihe anderer IgE-unabhängiger Mechanismen. So sind auch Neuropeptide wie Substanz P und VIP oder das antibakterielle Peptid LL 37 in der Lage Mastzellen zu aktivieren (60, 61). Es konnte gezeigt werden, dass LL 37 sowohl Degranulation als auch Chemotaxis in Mastzellen induziert. LL 37 ist ein Spaltprodukt aus der hCAP18-Familie (*human cationic antibacterial protein of 18 kDa*) und wurde erstmals in Neutrophilen gefunden. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor FPRL1 (*formyl peptide receptor-like 1*) konnte als funktioneller Rezeptor für LL 37 auf Neutrophilen und Monozyten identifiziert werden. Es zeigte sich aber, dass dieser Rezeptor bei der Aktivierung von Mastzellen keine Rolle spielt (62). Inhibitionsversuche mit Pertussis Toxin (Inhibitor von G_i Proteinen durch ADP-Ribosylierung der G_α-Untereinheit) und U-73122 (Phospholipase C (PLC) Inhibitor) enthüllten jedoch die Beteiligung des G_i-Protein-Phospholipase C Signalweges nach Aktivierung mit LL 37 (62, 63). Substanz P ist ebenfalls in der Lage Mastzelldegranulation auszulösen. Substanz P ist ein Neuropeptid aus der Tachykininfamilie und vermittelt seine Funktionen über die G-Protein-gekoppelten Neurokininrezeptoren 1, 2 und 3 (NK1R, NK2R und NK3R), hauptsächlich über NK1R (64). Auch Mastzellen exprimieren Neurokininrezeptoren, doch hier scheint die Aktivierung durch Substanz P nicht ausschließlich über NKR vermittelt zu sein, da gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der Rezeptoren die Substanz P-induzierten Funktionen nur teilweise aufhebt (8, 65). Neben der Rezeptor-vermittelten ist auch eine Rezeptor-unabhängige Aktivierung von Mastzellen durch Substanz P beschrieben worden. Substanz P ist, aufgrund seiner amphiphilen Struktur, in der Lage die Zellmembran zu passieren. Im Zytosol angelangt, aktiviert es direkt G-Proteine und induziert auf diese Weise die Exozytose von Mastzellen (66). Die Anwesenheit von Komplementrezeptoren für C3a und C5a und *toll-like* Rezeptoren auf Mastzellen ermöglicht eine Aktivierung über virale und bakterielle

Komponenten (16, 23, 27, 28). Die Stimulation von murinen wie humanen Mastzellen mit poly (I:C), einem TLR3-Liganden, führt zur Freisetzung von verschiedenen Zytokinen, wie $\text{INF}\beta$ und RANTES (Ratte) oder CXCL8 und CXCL10 (Mensch), die wiederum für eine Rekrutierung verschiedener Immunzellen verantwortlich sind (43, 49). Wie vor allem bereits im murinen System gezeigt wurde, können Mastzellfunktionen auch über Proteinase-aktivierbare Rezeptoren (PAR) vermittelt werden. Dabei handelt es sich um eine relativ neue Rezeptorklasse der Sieben-transmembransegment Rezeptorfamilie, deren Mitglieder mittels selektiver Proteolyse ihres N-Terminus durch bestimmte Proteinasen aktiviert werden können, was primär zur Initiation einer G-Protein gekoppelten intrazellulären Signalkaskade führt. Auf diese Rezeptoren, die in den letzten Jahren zunehmendes wissenschaftliches Interesse gefunden haben, wird im nächsten Abschnitt (1.2.1) näher eingegangen.

1.2.1 Proteinase-aktivierbare Rezeptoren

Die Erstbeschreibung von Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren geht auf Thien-Khai H. Vu *et al.* zurück, die 1991 versuchten einen funktionellen Rezeptor für die durch Thrombin induzierte Aktivierung humaner Blutplättchen (Thrombozyten) zu finden. Seinen Kollegen und ihm gelang es cDNA eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu isolieren, die für einen funktionellen humanen Thrombinrezeptor kodierte (67). Bald darauf wurden auch weitere Vertreter dieser Rezeptorklasse entdeckt und kloniert (68, 69). Bis heute sind vier verschiedene Rezeptoren im murinen wie im menschlichen System bekannt PAR1, 2, 3 und 4 (70). PARs sind nicht nur in Säugetieren gefunden worden, sondern auch in Fröschen und Fischen (71-74). In der heutigen Literatur sind sie nicht mehr unter dem Namen Thrombinrezeptoren zu finden, sondern werden vorwiegend Proteinase-aktivierbare Rezeptoren genannt, da PAR nicht nur Rezeptoren für Thrombin darstellen, sondern auch mit anderen Proteinasen interagieren können.

PAR sind auf Zellen verschiedener Gewebe anzutreffen und induzieren dort sowohl physiologische als auch pathophysiologische Funktionen (75). Gut untersucht ist diese Rezeptorfamilie im murinen System, aber auch für das humane System gibt es zahlreiche

Untersuchungen. Sie werden sowohl in der Maus als auch im Menschen auf Zellen des kardiovaskulären Systems, des Gastrointestinal- und des Respirationstrakts exprimiert und kommen darüber hinaus auf Zellen des Immun- wie auch des Zentralnervensystems vor. So exprimieren murine Gefäßendothelzellen und glatte Muskelzellen des kardiovaskulären Systems PAR1 und PAR2. Sie sind dort beteiligt an der Regulation des Gefäßtonus und der Gefäßpermeabilität (70, 71). Darüber hinaus induziert die Aktivierung von murinen PAR2 die Proliferation von Endothelzellen und bewirkt auf diese Weise die Neubildung von Gefäßen (76). Im humanen System ist ebenfalls eine Beteiligung von PAR1 und PAR2 an der Regulation des Gefäßtonus beschrieben worden. Untersuchungen von Robin *et al.* zeigten, dass die Freisetzung von NO aus Endothelzellen, vermittelt über PAR1 und/oder PAR2 eine Vasodilatation induziert (77, 78). Neben PAR1 und PAR2 konnte im humanen System auch für PAR4 eine Rolle in kardiovaskulären Prozessen nachgewiesen werden. So wird, vermittelt über PAR2 und/oder PAR4, die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen induziert (79-82). Die Expression von PAR3 konnte zwar auf menschlichen Endothelzellen, Fibroblasten (PAR3 Proteinexpression) und in glatten Muskelzellen (PAR3 mRNA Expression) nachgewiesen werden, jedoch ist dessen Funktion noch unklar (83-86). Untersuchungen mit strukturell dem PAR3-*tethered ligand* (eine aktivierende Sequenz innerhalb des Rezeptors N-Terminus) entsprechenden Peptiden haben gezeigt, dass dieser Rezeptor einen „non-signalling“ Rezeptor darstellt. Es existieren jedoch Hinweise auf eine Korezeptorfunktion die im humanen System zur Aktivierung von PAR1 führt (87, 88). Diskutiert wird ein Mechanismus, der über eine Heterodimerisierung von PAR3 mit PAR1 verläuft. Dadurch interagiert PAR1 mit bestimmten G-Proteinen ($G_{\alpha 13}$), was zu einer erhöhten Zellantwort führt (87, 89).

Die Expression von PAR auf Blutplättchen ist für die zahlreichen Thrombin-induzierten Funktionen dieser Zellen (z.B. Aggregation und Sekretion) verantwortlich. Murine Blutplättchen, exprimieren PAR3 und PAR4 (90). PAR4 ist hier als funktioneller Thrombinrezeptor eingestuft, während PAR3 als dessen Korezeptor fungiert (91). Dagegen werden in humanen Thrombozyten Thrombinfunktionen über PAR1 und PAR4 vermittelt

(92). Hier ist PAR1 der Hauptrezeptor für Thrombin, der zu einer raschen und kurzfristigen Aktivierung schon gegenüber geringen Thrombinkonzentrationen (1 nM) führt, während PAR4 bei höheren Konzentrationen (30 nM) aktiviert wird (92). Eine funktionelle Rolle von PAR im Zentralnervensystem (ZNS) ist ebenfalls beschrieben worden. Strigow *et al.* beschrieben die Expression aller vier PAR im ZNS des murinen Systems. Für PAR1 und PAR4 konnte eine antiapoptotische Funktion auf Neuronen des ZNS beobachtet werden (70, 75, 93). Beim Menschen konnten PAR1, PAR2 und PAR4 im ZNS nachgewiesen werden (94). Auch hier sind sie in der Vermittlung protektive Funktionen involviert (95, 95, 96). PAR nehmen darüberhinaus Einfluss auf die Immunantwort und auf Entzündungsprozesse des Körpers. Befunde mit murinen als auch mit menschlichen Zellen legen nahe, dass PAR die Chemotaxis, Zytokinproduktion, Proliferation und Apoptose verschiedener Immunzellen aktivieren oder modulieren. So beschreiben Arbeiten von Szaba *et al.* die Freisetzung der Zytokine IL-6 und MCP-1 aus Peritonealmakrophagen der Maus nach Stimulation mit Thrombin (97). Untersuchungen im Menschen haben gezeigt, dass in mononukleären Zellen nach Thrombinstimulation, vermittelt durch PAR1, eine erhöhte Expression der Zytokine IL-1, IL-6 und MCP-1 erfolgt (98, 99). Im Respirationstrakt konnten ebenfalls PAR-vermittelte Zellfunktionen nachgewiesen werden. Im murinen System sind PAR an der Regulation des Gefäßtonus der Atemwege beteiligt. Durch die Induktion von Bronchodilatation und Bronchokonstriktion, vermittelt über PAR1 und PAR2, greifen PAR sowohl in physiologische als auch pathophysiologische Prozesse des Atemwegsystems ein (70, 100, 101). Arbeiten von Cocks *et al.* und Lan *et al.* belegen, dass eine Aktivierung über PAR2 zu einer Inhibition der Bronchokonstriktion bzw. dass eine Aktivierung über PAR1 und PAR2 zur Relaxation der glatten Muskulatur führt (100, 102). Im menschlichen Respirationstrakt sind alle vier Typen der PAR vertreten (70, 85). Untersuchungen mit menschlichen Lungenschnitten haben gezeigt, dass PAR2-vermittelt eine Inhibition der Kontraktion des Bronchialepithels induziert wird (100). Eine andere Arbeit demonstrierte die Kontraktion der glatten Muskulatur und die daraus resultierende Bronchokonstriktion vermittelt über PAR2 (101).

1.2.2 Aktivierung Proteinase-aktivierbarer Rezeptoren

Proteinase-aktivierbare Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie bestehen aus einer heptahelikalen, transmembranen Proteinkette, welche die Membran siebenmal durchzieht (75). Der N-Terminus der Proteinkette befindet sich im Extrazellularraum, während der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. GPCRs koppeln auf der Innenseite der Plasmamembran an trimere GTP-hydrolysierende Proteine, kurz G-Proteine genannt. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer α -Untereinheit, einer β - und einer γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand hat der Komplex GDP gebunden. Nach Bindung eines Liganden kommt es in Folge einer Konformationsänderung des Rezeptors zur Interaktion mit diesen intrazellulären heterotrimeren G-Proteinen. Dieses führt zum beschleunigten Austausch von GDP durch GTP und anschließend zur Dissoziation des Komplexes in die GTP-tragende $G\alpha$ -Untereinheit und den zusammenbleibenden $\beta\gamma$ -Komplex. Die beiden Untereinheiten können nun unabhängig voneinander das extrazellulär durch den Liganden induzierte Signal in das Zellinnere weiterleiten und dabei verschiedene Transduktionselemente (z.B. Ionenkanäle, Adenylatzyklase, Phospholipase C) aktivieren, die ihrerseits die Freisetzung sogenannter „*second messenger*“ induzieren (70, 103, 104). So führt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). IP_3 bindet anschließend über spezifische IP_3 -Rezeptoren an das endoplasmatische Retikulum und führt zur Mobilisierung von Kalziumionen aus diesem intrazellulären Speicher. Die Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration ist bei vielen Zellen essentiell für die Induktion von Degranulation (z. B. PMN, Mastzellen) (105, 106)

PAR gehören zu einer neuartigen Klasse von GPCRs. Während bei klassischen GPCRs Aktivierung durch direkte Interaktion mit exogenen Molekülen („primäre Liganden“) erfolgt, die an eine spezifische Erkennungsstruktur binden, geht die Aktivierung von PAR einen anderen „indirekten“ Weg. Dieser beinhaltet als initialen Schritt eine molekulare Spaltung des Rezeptors. Proteinasen, vor allem Serinproteinasen, welche im Extrazellularraum zirkulieren sind in der Lage PAR selektiv am N-Terminus zu spalten, was zur Entstehung eines neuen,

um mehrere Aminosäuren verkürzten N-Terminus führt. Dieser neue, noch am Rezeptor gebundene Teil der Proteinkette bindet anschließend als Ligand („*tethered ligand*“) an eine extrazelluläre Domäne des Rezeptors (die innerhalb der „*second extracellular loop*“) und setzt, wie oben beschrieben, intrazelluläre Signalkaskaden in Bewegung (67, 107-109). Die als Ligand fungierende Aminosäuresequenz ist für jeden Rezeptor spezifisch und umfasst als Minimalstruktur jeweils 5-6 definierte Aminosäurereste. Wie bereits erwähnt sind vier Vertreter dieser Rezeptorklasse bekannt, die von teilweise unterschiedlichen Proteinase aktiviert werden. So stellt PAR1 im humanen System den Hauptrezeptor für Thrombin dar, aber auch PAR4 wird von Thrombin gespalten, während PAR2 den Hauptrezeptor für Trypsin und Trypsin darstellt (92, 110, 111). Die hohe Affinität von Thrombin für PAR1 erklärt sich aus der strukturellen Interaktion von Thrombin mit diesem Rezeptor. PAR1 besitzt in seiner extrazellulären N-terminalen Domäne eine sogenannte hirudinähnliche Bindungsstelle (*hirudin-like binding site*). Diese Domäne besteht aus einer stark negativ geladenen Aminosäuresequenz (WEDEEKNES). Thrombin ist aus zwei Proteinketten aufgebaut, die eine hohe Zahl ionisierbarer Gruppen besitzen. Diese sind nicht über das gesamte Molekül verteilt, sondern in Ladungsklustern angeordnet. Ein Bereich besonders hoher positiver Ladungsdichte wird als Anionenbindungsstelle (*anion-binding exosite*) bezeichnet. Während der Spaltung interagiert diese *anion-binding-exosite* mit der negativ geladenen *hirudin-like binding site* des Rezeptors und führt so zu einer erhöhten Bindungsaffinität und Spaltungseffizienz des Enzyms gegenüber PAR1, im Vergleich zu PAR4, der keine solche *hirudin-like binding site* enthält. Eine *hirudin-like binding site* ist auch in der Sequenz des PAR3 zu finden, weshalb zunächst vermutet wurde, dass dieser Rezeptor ebenfalls durch Thrombin aktiviert werden kann (70, 75). Doch, wie bereits unter 1.2.1 erwähnt, konnte seine Funktionalität als Thrombinrezeptor auf Primärzellen nicht bestätigt werden (81, 82). Lediglich die Stimulation von PAR3-transfizierten COS7-Zellen mit Thrombin ergab eine Spaltung des Rezeptors durch diese Proteinase (110). Neben aktivierenden Proteinase gibt es auch solche, die zur Rezeptorinaktivierung führen. Diese spalten den N-Terminus des Rezeptors so, dass eine andere, den Rezeptor nicht

aktivierende Amniosauresequenz, entsteht. Kathepsin G, eine Serinproteinase aus Neutrophilen, aktiviert den PAR4 (112), während für PAR1 sowohl eine aktivierende als auch eine inaktivierende Eigenschaft des Enzyms beschrieben wurde (113). Kathepsin G ist in der Lage PAR1 an zwei verschiedenen Stellen des N-Terminus zu spalten, wie anhand von synthetischen Peptidsubstraten demonstriert wurde (114). Eine der Spaltungen führt zur Bildung des *thetherd ligand* und somit potentiell zur Rezeptoraktivierung während die Spaltung an anderer Stelle zur Entfernung des *thetherd ligand* führt und damit den Rezeptor inaktiviert, wie an PAR1-exprimierenden Primärzellen gezeigt wurde (112, 113, 115, 116). Bislang liegen jedoch keine Arbeiten vor, die Aktivierung von PAR1 durch Kathepsin G nachweisen. Es existiert eine Reihe weiterer Proteinase, die unterschiedliche PAR ansprechen. So sind die Enzyme Plasmin, aktiviertes Protein C (APC) sowie Elastase in der Lage PAR1 zu aktivieren, während Tryptase und Chymase Zellfunktionen über PAR2 vermitteln (109, 117-120).

Neben diesen physiologischen Liganden gibt es auch nicht-physiologische Aktivatoren - die sogenannten PAR-aktivierenden Peptide (PAR-AP, s Tabelle 1). Diese sind synthetisch hergestellte, 5-6 Aminosäuren lange Oligopeptide, deren Sequenzen auf denjenigen des jeweiligen „*thetherd ligand*“ beruhen. PAR-AP binden direkt an die zweite extrazelluläre Loop des Rezeptors und aktivieren ihn somit, ohne dass eine Spaltung des Rezeptors stattfinden muß (75, 108, 109, 121). PAR-AP werden eingesetzt, um selektiv die physiologischen Funktionen einzelner PAR *in vitro* zu untersuchen. Tabelle 1 gibt eine kurze Übersicht über bekannte aktivierende und inaktivierende Proteinase für PAR, sowie über rezeptorspezifische PAR-AP .

Tabelle 1: Humane Proteinase-aktivierbare Rezeptoren: Aktivierende und inaktivierende Proteinase, „*tethered ligand*“-Sequenzen und selektive PAR-aktivierende Peptide

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4	Literaturquelle
Spezifische aktivierende Proteinase	Thrombin,	Trypsin, Tryptase	Thrombin	Thrombin, Kathepsin G	Ref (69, 75, 92, 110, 110, 111)
„ <i>Tethered ligand</i> “ Sequenz	SFLLR	SLIGKV	TRFGAP	GYPKVQ	(75)
Spezifische aktivierende Peptide	TFFLR-NH₂	SLIGKV-NH₂	unbekannt	GYPKVQ-NH₂ AYPGKF-NH₂	(75)
Inaktivierende Proteinase	Kathepsin G	Plasmin	Kathepsin G	Nicht bekannt	(75, 112-116)

1.2.3 Mastzellen und Proteinase-aktivierbare Rezeptoren

Wie Eingangs erwähnt lassen sich Mastzellen auch durch FcεRI-unabhängige Mechanismen aktivieren. Dazu zählt auch die Aktivierung über Proteinase-aktivierbare Rezeptoren. Relativ gut untersucht sind PAR auf Mastzellen des murinen Systems. So konnte für murine Peritonealmastzellen die mRNA-Expression von PAR1 nachgewiesen werden (122, 123), während Mastzellen der Haut PAR1 und PAR2-mRNA exprimieren (122, 124). Zur Expression von PAR3 und PAR4 in murinen Mastzellen liegen bislang keine Arbeiten vor. Die Expression dieser Rezeptoren ist bislang lediglich in Zellen der Rattenmastzelllinie P815 gezeigt worden, hier sowohl auf mRNA- als auch auf der Proteinebene (125). Zahlreiche Untersuchungen auf murinen Mastzellen haben erwiesen, dass diese Rezeptoren auch

funktionell sind. So ist mehrfach die Induktion von Degranulation muriner Knochenmarks- und Peritonealmastzellen nach Stimulation mit PAR1-AP oder Thrombin beschrieben worden (126-129). Ebenso waren das PAR2-AP, Trypsin und Chymase in der Lage in murinen Peritonealmastzellen Degranulation zu induzieren (130, 131). Auch eine PAR-vermittelte Zytokinproduktion ist in murinen Mastzellen bereits demonstriert worden. Gordon *et al.* und H. Vliagoftis berichten eine durch Thrombin-induzierte Freisetzung des Zytokins IL-6 in murinen Mastzellen des Knochenmarks und des Peritoneums (126, 132). Weiterhin berichten die Autoren über eine koregulatorische Funktion von Thrombin in der Allergen-induzierten Degranulation dieser Zellen. So kommt es während Kostimulation muriner Mastzellen mit anti-IgE-Antikörpern und Thrombin zu einer synergistischen Erhöhung der Freisetzung von IL-6 (132). PAR stehen im murinen System mit entzündlichen Prozessen in Verbindung. So führte im Tiermodell, die Injektion von Thrombin oder Trypsin zu starker Ödembildung im betroffenen Gewebe, welche über die Freisetzung vasoaktiver Mastzellmediatoren wie Histamin und Serotonin induziert wurde (131, 133). Über die Expression und Funktionalität von PAR auf humanen Mastzellen ist hingegen bislang nur sehr wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass die Mastzelllinie HMC-1 mRNA für PAR2 und PAR4 exprimiert (134). Gordon *et al.* beschreiben die Expression von PAR1 und PAR2 auf humanen Mastzellen in Gewebeschnitten der Uterusschleimhaut, der Submukosa, des Dickdarms und der Lymphknoten (135). Arbeiten von C. Moormann und R.F. Carvalho demonstrieren die Expression von PAR1-4 mRNA und PAR2-Protein in humanen Hautmastzellen bzw. von PAR2-Protein auf Zellen der Linie LAD 2. Experimente zur Funktionalität von PAR auf humanen Mastzellen sind bisher nur für PAR2 bekannt. Es existieren mehrere Untersuchungen die belegen, dass humane Mastzellen durch die Ausschüttung von mastzellspezifischen Proteinasen wie Tryptase PAR auf anderen Zellpopulationen aktivieren können (111, 136). Jedoch gibt es nur einige wenige Arbeiten, die über eine direkte PAR-vermittelte Aktivierung von Mastzellen selbst berichten. Diese beschränken sich auf die Beschreibung der Aktivierung von PAR2 durch PAR2-Liganden. So existieren zwei Arbeiten, die zeigen, dass humane Mastzellen der Haut und des Darms nach

Stimulation mit PAR2-AP bzw. Trypsin degranulieren (1, 137). Über die Expression und Funktionalität anderer PAR ist bislang nichts bekannt. Lediglich eine Arbeit beschreibt die Induktion von $\text{TNF}\alpha$ in der Mastzelllinie HMC-1 nach Stimulation mit PAR4-AP (134). Insgesamt gesehen bleibt also festzuhalten, dass Informationen zur Expression und funktionellen Bedeutung von PAR auf humanen Mastzellen fast ausschließlich den PAR2 betreffen und hauptsächlich auf der Untersuchung von Gewebeschnitten oder Mastzelllinien beruhen (134, 135).

1.3 Fragestellung

Wie die wenigen unter 1.2.3 zitierten Arbeiten über die Expression und Funktionalität von PAR auf humanen Mastzellen belegen, sind PAR auf diesen Zellen bislang kaum charakterisiert worden, insbesondere für isolierte primäre humane Mastzellen liegen nur wenige Untersuchungen vor. Unter Verwendung von primären humanen Lungen- und Hautmastzellen sowie der Mastzelllinie LAD 2 untersuchte ich daher, ob und welche PAR auf diesen Zellen exprimiert sind, ob und wie diese Rezeptoren durch spezifische Stimuli aktiviert werden können und welchen Einfluss sie auf typische Mastzellfunktionen wie die $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -induzierte Degranulation haben. Somit standen folgende Fragen im Mittelpunkt meiner Arbeit:

1. Welche Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren werden von humanen Mastzellen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert?
Untersuchungen zu dieser Frage dienten zur allgemeinen Charakterisierung der PAR-Expression humaner primärer Mastzellen aus Lunge und Haut.
2. Sind diese Rezeptoren auf humanen Mastzellen funktional?
Hier sollte durch Einsatz PAR-spezifischer Proteinase und synthetischer

PAR-AP geklärt werden, ob PAR direkt Mastzellfunktionen induzieren können. Es zeigte sich, dass PAR-AP sowohl Degranulation als auch intrazelluläre Ca-Signale induzieren, während die als PAR-spezifisch beschriebenen Proteinase überwiegend negativ waren. Ausnahmen bildeten lediglich Thrombin und Trypsin, die zwar keine Degranulation, jedoch Ca-Signale induzierten. Weitere Untersuchungen mit Thrombin führten zu der überraschenden Entdeckung, dass diese Proteinase einen drastischen inhibitorischen Einfluss auf die FcεRI-induzierte Mastzelldegranulation ausübte. Dieser Befund führte zu der folgenden Frage:

3. Welcher Mechanismus liegt dem inhibitorischen Einfluss von Thrombin auf die FcεRI-induzierte Degranulation zugrunde?

Hier überprüfte ich meine Arbeitshypothese, dass der inhibitorische Einfluss von Thrombin auf die Mastzelldegranulation über die klassischen Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 vermittelt wird. Zur Klärung dieser Frage wurden Methoden zur selektiven Aktivierung bzw. Blockierung von PAR eingesetzt.

2 Material und Methoden

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendete Reagenzien und Substanzen sowie die angewendeten Methoden aufgeführt. Zusammensetzung und Herkunft der Reagenzien sind entweder direkt bei den jeweiligen Methoden oder im Abschnitt 7.3 unter „Reagenzien und Lösungen“ beschrieben. Benutzte Geräte und Computerprogramme sind im Abschnitt 7 unter Geräte (7.1) und Computerprogramme (7.2) aufgeführt.

2.1 Agenzien zur Kultur und Stimulation von Mastzellen

Alle Agenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, als Lyophilisate geliefert und von mir in *Braun dest. (Aqua ad injectabilia*, Braun, pyrogenfrei, Braun, Melsungen) aufgenommen. Das humane rekombinante Zytokin SCF (rSCF, aufgenommen zu 1 mg/ml.) zur Kultur primärer Mastzellen und der Zelllinie LAD 2 lieferte die Firma Biosource (Marseille, Frankreich). Die rekombinanten Zytokine IL-1 β , IL-12, TNF α , TNF β und INF γ (aufgenommen zu 1 μ g/ml) wurde mir freundlicherweise von Dr. M. Ernst, Laborgruppe Immunzellanalytik (FZB), und rekombinantes IL-4 (aufgenommen zu 100 U/ml) von Dr. F. Petersen, Laborgruppe Biochemische Immunologie (FZB) zur Verfügung gestellt. Humanes IgE (affinitätschromatographisch aufgereinigt) zur Beladung von Primärzellen als auch von LAD 2-Zellen wurde entweder in den Räumen der Laborgruppe Biologische Chemie (FZB) aufgereinigt oder von der Firma Calbiochem (Frankfurt a.M., Deutschland) bezogen. Substanz P (1 mg/ml) und das PAR4-aktivierende Peptid H-AYPGKF-NH₂ (PAR4-AP) stammten von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland). Die RGD-Peptide H-RGDS-OH, H-G-Pen-GRGDSP-Cys-A-OH und H-RGES-OH wurden von der Firma Bachem (Weil, Deutschland) bezogen. Die PAR-aktivierenden Peptide H-TFLLR-CONH₂ für PAR1 (PAR1-AP) und H-SLIGKV-CONH₂ für PAR2 (PAR2-AP) wurden von R. Bartels (Laborgruppe Strukturbiochemie, FZB) synthetisiert. Alle oben erwähnten Peptide wurden, bis auf PAR1-AP (5,8 mg/ml) und PAR2-AP (5,23 mg/ml), zu 5 mg/ml aufgenommen. Das Kontrollpeptid H-YAPGKF-NH₂ für PAR4 (PAR4-Iso-AP, 5 mg/ml) stammte von der Firma

Bio-Connect (Huissen, Niederlande). Die Kontrollpeptide für PAR1 H-LFTNRL-CONH₂ (PAR1-Iso-AP, 11,37 mg/ml) und für PAR2 H-ILSVKG-CONH₂ (PAR2-Iso-AP, 10,3 mg/ml), die inhibitorischen membrangängigen Peptide (Pepduzine) C₁₅H₃₁CONH-RCLSSSAVANRS-CONH₂ für PAR1 (PAR1-Pep, 7,2 mM) und Palmitinsäure- C₁₅H₃₁CONH-SGRRYGHALR-CONH₂ für PAR4 (PAR4-Pep, 17,2 mM), sowie das antimikrobielle Peptid LL 37 (2 mg/ml in 0,01% Essigsäure) wurden ebenfalls von R. Bartels synthetisiert. Alle Agenzien wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2 Enzyme und Inhibitoren

2.2.1 Enzyme zum Aufschluss humanen Gewebes (Lunge und Haut)

Die zum Aufschluss von humanem Gewebe verwendeten bovinen Enzyme Kollagenase Typ I, Kollagenase Typ II, Elastase, und Hyaluronidase stammten von der Firma Worthington Biochemicals (Lakewood, NJ, USA). Rekombinante Dispase (aus *Bacillus polymyxa*, grade II) wurde bei der Firma Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) und das aus *Papaya latex* gewonnene Chymopapain von der Firma Sigma Aldrich bezogen.

2.2.2 Zur Modulation der Mastzellreaktivität eingesetzte Proteinasen

Die hier aufgeführten Enzyme wurden, wenn nichts anderes angegeben, in *Braun dest.* aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C oder -70 °C (s. Angaben bei den jeweiligen Enzymen) aufbewahrt.

Humanes Thrombin und bovines Thrombin und Trypsin (lyophilisiert, aufbewahrt bei -20 °C) wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen und für jeden Versuch frisch in dem für das jeweilige Experiment erforderlichen Puffern angesetzt. Ebenfalls von Sigma Aldrich bezog ich die aus humanem Plasma gewonnenen Enzyme Plasmin (2 mg/ml) und aktiviertes Protein C (APC, 1 mg/ml), beide aufbewahrt bei -20 °C. Die Firma Calbiochem lieferte die Enzyme Chymase (aus humaner Haut, 20 µg/ml, in 50 mM Na-Acetat, 1 M NaCl, pH 5), die aus humanen Neutrophilen gewonnenen Enzyme Elastase (42 U/ml, in 50 mM Na-Acetat,

200 mM NaCl, pH 5,5) und Kathepsin G (50 µg/ml, 50 mM Na-Acetat, 150 mM NaCl, pH 5,5) sowie die aus humanen Fibroblasten isolierte Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1, 0,08 mg/ml, in 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 5 mM CaCl, 1 µM ZnCl₂, 0,05 % BRIJ 35 Detergent, 0,05 % NaN₃, pH 7) (aufbewahrt bei -20 °C) und Prothrombin aus humanem Plasma (10,6 mg/ml, aufbewahrt bei -70°C). Faktor Xa aus humanem Plasma (in 20 mM Tris, 700 mM NaCl, pH 7.4, aufbewahrt bei -70 °C) bezog ich von der Firma Biomol (Lörrach, Deutschland).

Humane Tryptase wurde mir freundlicherweise von Dr. C.P. Sommerhoff, Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie der LMU München, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Zur Inhibition endogener Mastzellproteinasen und zur Überprüfung der Selektivität der exogen zur Modulation der Mastzellreaktivität wurden folgende Proteinaseinhibitoren eingesetzt: Leupeptin (2 mg/ml) zur Inhibition von Tryptase, Aprotinin (2 mg/ml) zur Inhibition von Kathepsin G und SBTI (*soybean trypsin inhibitor*, 1 mg/ml) zur Inhibition von Kathepsin G und Chymase sowie PMSF (ein Serinproteinaseinhibitor) stammten von der Firma Sigma Aldrich. Den Thrombininhibitor Hirudin bezog ich von der Firma Calbiochem.

2.3 Zur Zellisolierung, in der Zellkultur und zur Immunfluoreszenzfärbung und Stimulation eingesetzte Antikörper

Alle verwendeten Antikörper wurden, gemäß den Angaben des Herstellers, entweder bei 4 °C oder -20 °C gelagert und sind in Tabelle 2 nach ihrem Verwendungszweck aufgelistet.

Tabelle 2: In der Zellisolierung (ZI), Zellkultur (ZK), zur Immunfluoreszenzfärbung (IF), und Stimulation (S) verwendete Antikörper

Antikörper	Klon ²⁾	Isotyp	Markierung ³⁾	Hersteller	Anwendung ⁴⁾
humanes IgE ¹⁾	U266	IgE	-	LG Immuntherapie, FZB	ZK
humanes IgE ¹⁾	k. A.	IgE		Calbiochem, Frankfurt a.M.	ZK
Ziege α -Mensch IgE	polyklonal	-	-	Biosource, Camarillo	S
Maus α -Mensch CD203c	97A6	IgG ₁	PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach	ZI
Maus α -Mensch CD117	AC126	IgG ₁	Beads	Miltenyi, Bergisch Gladbach	ZI
Maus α -PE	k. A.	-	Beads	Miltenyi, Bergisch Gladbach	ZI
Ziege α -Mensch IgE	polyklonal	-	FITC	Biosource, Camarillo	IF
Maus α -Mensch PAR1	ATAP2	IgG ₁	-	Invitrogen, San Francisco	IF
Maus α -Mensch PAR1	WEDE15	IgG ₁	-	Immunotech, Marseille	IF
Maus α -Mensch PAR2	SAM11	IgG _{2a}	-	Invitrogen, San Francisco	IF
Kaninchen α -Mensch PAR3	polyclonal	IgG	-	Santa Cruz, Heidelberg	IF
Kaninchen α -Mensch PAR4	polylonal	IgG	-	Alomone Labs, Jerusalem	IF
Maus IgG ₁ (Isotypkontrolle)	B0-7	IgG ₁	-	LG Biologische Chemie, FZB	IF
Maus IgG _{2a} (Isotypkontrolle)	DAK-OG5	IgG _{2a}	-	Dako, Glostrup	IF
Kaninchen IgG-Fraktion (Isotypkontrolle)	polyklonal (Kaninchen-serum)	IgG	-	Abcam, Cambridge	IF
Maus α -Mensch CD 117	YB5.B8	IgG ₁	-	Becton Dickinson	IF
Ziege α -Maus Sekundäntikörper	k.A.	IgG	DTAF	Dianova, Hamburg	IF
Ziege α -Kaninchen Sekundäntikörper	polyklonal	IgG	FITC	Abcam, Cambridge	IF

¹⁾ Humanes Immunglobulin E zur Beladung von Mastzellen, aus Überständen der Zelllinie U266 aufgereinigt

²⁾ k.A. = keine Angaben des Herstellers

³⁾ FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, Beads = F₂O₃-Polysaccharid-Kügelchen der Firma Miltenyi, DTAF = Dichlorotriazinylaminofluorescein

⁴⁾ Antikörper eingesetzt in der ZK = Zellkultur und ZI = Zellisolierung, zur S = Stimulation und IF = Immunfluoreszenzfärbung

2.4 Isolierung und Kultur humaner Mastzellen

Da Mastzellen in verschiedenen Geweben vorkommen und dort auch unterschiedliche Funktionen und Rezeptorausstattung besitzen, wurden in dieser Arbeit primäre Mastzellen sowohl aus der Lunge als auch aus der Haut verwendet. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellen Lungen- und Hautmastzellen jeweils Vertreter der sogenannten mukosalen bzw. Bindegewebsmastzellen dar. Aufgrund der begrenzten Ressourcen an humanem Gewebe wurde insbesondere bei sehr materialintensiven Versuchsansätzen zusätzlich mit Zellen der humanen Mastzelllinie LAD 2 gearbeitet.

2.4.1 Herkunft von Gewebeproben humaner Lunge und humaner Haut

Das zur Mastzellisolierung verwendete Lungengewebe stammte aus zu diagnostischen Zwecken bestimmten Resektaten, die im Klinikum Großhansdorf (Abteilung Thoraxchirurgie) Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom entnommen und in die Pathologie des FZB transportiert wurden. Mit dem Einverständnis der Patienten wurde dort abgetrenntes tumorfreies Gewebe in 4 °C kalten Mastzellpuffer (s. Anhang) überführt und in den Laboren der Laborgruppe Biologische Chemie am selben Tag weiterverarbeitet. Hierzu lag ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 03 – 158) vor.

Das zur Mastzellisolierung verwendete Hautgewebe wurde mir zur Verfügung gestellt von Patienten des Klinikums für Hand-, Brust- und plastische Chirurgie in Neustadt, die sich dort einem Schönheitschirurgischen Eingriff unterzogen hatten. Direkt nach der Entnahme wurde das Gewebe in eiskaltes Transportmedium (s. Anhang) überführt und in den Laborräumen der Laborgruppe Biologische Chemie des FZB am selben Tag weiterverarbeitet. Hierzu lag ebenfalls ein positives Gutachten der Ethikkommission der Universität Lübeck (AZ: 04-90) vor.

2.4.2 Isolierung humaner Mastzellen aus Lungen- und Hautgewebe

Die Isolierung humaner Mastzellen erfolgte in vier Schritten. Zunächst wurde das Gewebe für den enzymatischen Verdau vorbereitet. Dazu wurde das Gewebe zerkleinert (s. 2.4.2.1) und mit einer für die Dispersion des jeweiligen Gewebetyps geeigneten Enzymlösung versetzt (s. 2.4.2.2). Nachdem der enzymatische Verdau abgeschlossen war, erfolgte die Anreicherung der Mastzellen durch Dichtegradientenzentrifugation (s.2.4.2.3) und ihre immunzytochemische Aufreinigung mittels Magnetseparation unter Verwendung mastzellspezifischer Antikörper (s. 2.4.2.4).

Als Grundlage für die Aufreinigung der Lungenmastzellen diente die von Schulmann *et al.* (138) etablierte Methode, welche in der Dissertationsarbeit von R. Gross (139) weiterentwickelt wurde. In Abwandlung zu dem dort aufgeführten Protokoll wurde der zur Aufreinigung verwendete Puffer in meiner Arbeit durch Mastzellpuffer (s. Anhang) ersetzt. Die Aufreinigung der Hautmastzellen erfolgte nach einer Methode von Gibbs & Ennis (140), welche in der Dissertationsarbeit von F. Schiemann (141) weiterentwickelt wurde.

2.4.2.1 Vorbereitung des Gewebes für den enzymatischen Verdau

Das zur Aufarbeitung bestimmte Lungengewebe wurde zunächst für den enzymatischen Verdau vorbereitet. Dazu wurde das Gewebe in 1-2 mm² große Stücke zerschnitten, um den Enzymen eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten. Zur Entfernung des im Gewebe enthaltenen Blutes wurde das Material (maximal 60 g Gewebe/300 ml Mastzellpuffer) über Nacht bei 4 °C auf einem Magnetrührer unter leichtem Rühren in Mastzellpuffer gewaschen und dann wie unter 2.4.2.2 beschrieben weiterverarbeitet.

Die im Transportmedium gelieferten Hautgewebeprobe wurden nach Ankunft im FZ-Borstel ebenfalls in 4 °C kalten Mastzellpuffer überführt. Nekrotische Bereiche und das subkutane Fettgewebe wurden sorgfältig mit Schere und Skalpell entfernt und anschließend, wie oben beschrieben, ebenfalls für den enzymatischen Aufschluß mechanisch zerkleinert. Je 15 g der so aufbereiteten Gewebeprobe wurden in 150 ml Mastzellpuffer über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und dann wie unter 2.4.2.2 beschrieben weiterverarbeitet.

2.4.2.2 Enzymatischer Aufschluss des Lungen- und Hautgewebes

2.4.2.2.1 Enzymatischer Aufschluss des Lungengewebes

Das zerschnittene und gewaschene Lungengewebe (s.o.) wurde über ein feinmaschiges Metallsieb mit einer Maschenweite von 1 mm vom Mastzellpuffer getrennt und für den enzymatischen Verdau pro Gramm Gewebe mit 1 ml Verdaupuffer I versetzt, der tags zuvor angesetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert worden war. Der Verdaupuffer I bestand aus Mastzellpuffer, versetzt mit 1 % Gelatine, 1,5 mg/ml Dispase II, 0,15 mg/ml Chymopapain, 0,75 mg/ml Kollagenase Typ I und 1,79 mg/ml Elastase. Die Gewebesuspension (ca. 10-40 ml) wurde in eine Polypropylenflasche (Volumen: 250 ml, NALGENE) überführt. Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur und einer gleichmäßigen Durchmischung wurde das Gewebe auf einem Rollmischer (Typ RM5.40, Karl Hecht KG, Sondheim) in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde die Inkubation beendet und größere verbliebene Gewebestücke durch ein feinmaschiges Metallsieb (Maschenweite: 1 mm) von der Suspension abgetrennt und verworfen. Kleinere Gewebestücke wurden mittels Filtration durch Gaze (Maschenweite: 120 µm) entfernt. Das Filtrat wurde zentrifugiert (10 min, 300 x g, 20 °C) und das erhaltene Zellpellet anschließend zweimal in Mastzellpuffer gewaschen, um die restliche Enzymlösung vollständig zu entfernen. Es folgte dann die Aufnahme der Zellpellets in Mastzellpuffer so, dass in jeweils 5 ml des Puffers eine Menge äquivalent zu 5 g des ursprünglichen Gewebes enthalten war. Die so angesetzte Zellsuspension wurde anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgetrennt (s.2.4.2.3).

2.4.2.2.2 Enzymatischer Aufschluss des Hautgewebes

Das Schema des enzymatischen Aufschlusses der Haut war zum größten Teil dem der Lunge identisch. Die wesentlichen Unterschiede sind im folgenden aufgeführt. Vergleichbar der Prozedur zur Gewinnung von Lungenmastzellen, wurde das Hautgewebe enzymatisch verdaut mit dem Unterschied, dass aufgrund der andersartigen Zusammensetzung dieses

Gewebes (hoher Anteil an Kollagenen, Proteoglykanen) andere Enzyme eingesetzt wurden. Dazu versetzte ich je 15 g des zerkleinerten Hautgewebes mit 50 ml Verdauopuffer II (Mastzellpuffer + 0,75 mg/ml Hyaluronidase, 1,5 mg/ml Kollagenase Typ 2 und 1 mg/ml BSA). Die Gewebesuspension wurde dann auf ein Volumen von 200 ml mit Mastzellpuffer aufgefüllt und wie bereits oben beschrieben enzymatisch verdaut, mit dem Unterschied, dass die Inkubation auf einem auf 37 °C temperierten Magnetprüher durchgeführt wurde. Um das Anheften von Hautstückchen am Rührmagneten zu verhindern, wurde die Gewebesuspension alle 15-30 min mittels einer 50 ml Spritze (Becton-Dickinson), deren Kanülenaufsatz manuell auf einen Durchmesser von ca. 1 cm erweitert worden war, resuspendiert. Nach dem Verdau wurde die Suspension wie oben beschrieben von groben Gewebestücken befreit und das Filtrat zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden jeweils in 1 ml 20 °C warmem Mastzellpuffer, versetzt mit 1 % FCS, resuspendiert und anschließend vereinigt. Im Anschluß erfolgte eine Bestimmung der Gesamtzellzahl (s. 2.4.5), da für die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.4.2.3) 2×10^7 Zellen pro Gradient aufzutragen waren.

2.4.2.3 Anreicherung humaner Lungen- und Hautmastzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation stellt ein Verfahren dar, mit dem nicht nur Makromoleküle sondern auch verschiedene Zelltypen in Medien mit unterschiedlicher Dichte voneinander getrennt werden können. Das Verfahren kann unter Verwendung eines kontinuierlichen oder eines diskontinuierlichen Dichtegradienten durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Prinzip der diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation verwendet. Dabei wird durch vorsichtiges Übereinanderschichten von mindestens zwei Trennlösungen unterschiedlicher Dichte ein Gradient aufgebaut. Durch anschließende Zentrifugation sammeln sich die verschiedenen Zelltypen aufgrund ihrer Dichte und Größe an den Grenzschichten der Trennlösungen. Als Trennlösungen kommen synthetische Polymere aus Saccharose (Ficoll), oder wie hier verwendet, Kieselgel (Percoll) zum Einsatz. Die

Dichtegradientenzentrifugation humaner Mastzellen aus der Haut erfolgte nach einer Methode von Gibbs & Ennis(140) und wurde wie bereits in der Dissertationsarbeit von R. Gross (139) beschrieben, für die Isolierung von Lungenmastzellen adaptiert.

2.4.2.3.1 Anreicherung humaner Lungenmastzellen

Für die Dichtegradientenzentrifugation der durch enzymatischen Verdau gewonnenen Zellsuspension aus Lungengewebe wurde tags zuvor isotonische Percolllösung gemäß den Angaben des Herstellers (Sigma, Steinheim) angesetzt. Durch Zugabe von einem Teil zehnfach konzentrierten Mastzellpuffers zu neun Teilen salzfreier Percoll-Stammlösung erhielt ich die als „100 %ig“ definierte Percolllösung, aus welcher durch nachfolgende Verdünnung (4+1 bzw 3+2 bzw. 1+2) mit Mastzellpuffer Trennlösungen hergestellt wurden, die der Dichte einer 80 %igen, 60 %igen und 50 %igen Percolllösung entsprachen. Zur Etablierung des Dichtegradienten wurden jeweils 10 ml der 80 %igen Percolllösung mit 10 ml des 50 %igen Percolls vorsichtig in einem 50 ml Kunststoffröhrchen (Greiner bio-one) überschichtet.

Die durch den enzymatischen Verdau gewonnene, mastzellhaltige Suspension wurde nun 1:2 mit 60 %igem Percoll zur Einstellung einer 30 %igem Percoll entsprechenden Dichte versetzt und anschließend zu 10 ml auf den Gradienten gegeben. Durch vorherige Verdünnung mit Mastzellpuffer wurde sichergestellt, dass eine 5 g des Ausgangsgewebes entsprechende Menge an Zellsuspension pro 10 ml 30 %iger Percolllösung und Gradient aufgetragen wurde. Je nach Menge des aufgearbeiteten Lungengewebes wurden 4-6 Gradienten angesetzt. Zum Schluss erfolgte eine Überschichtung mit jeweils 5 ml Mastzellpuffer. Bei der anschließenden Zentrifugation (400 x g, 20 min, 20°C) akkumulieren die Zellen entsprechend ihrer Dichte an den Grenzschichten der verschieden konzentrierten Percollösungen in sogenannten „Ringfraktionen“. Zellen, die eine höhere Dichte als die 80 %ige Percolllösung besitzen (hauptsächlich Erythrozyten) sammeln sich als Sediment am Gefäßboden. Wie durch Zellzählung ermittelt, sind Mastzellen zum größten Teil an der Grenzschicht zwischen 30 %iger und 50 %iger (Ringfraktion 30/50) und an der Grenzschicht

zwischen 50 %iger und 80 %iger (Ringfraktion 50/80) Percolllösung anzutreffen. Da der Mastzellanteil in beiden Ringfraktionen stark variierte (0,5-30 % der Gesamtzellen) wurden nur solche Fraktionen zur weiteren Aufreinigung verwendet, die einen Mastzellanteil von mindestens 4 % aufwiesen.

Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen Ringfraktionen, zusammen mit der jeweils darunterliegenden Percollschicht, nacheinander von oben her mit einer 10 ml Pipette abgenommen und separat in 50 ml Kunststoffröhrchen überführt, wobei die Fraktionen 30/50 und 50/80 getrennt gesammelt wurden. Anschließend erfolgte jeweils eine 1:5 Verdünnung der abgeernteten Zellsuspensionen mit 20 °C warmem Mastzellpuffer und Zentrifugation bei 300 x g für 10 min bei 20 °C, um das verbliebene Percoll zu entfernen. Als finaler Waschschrift wurden je zwei Zellpellets aus gleichen Ringfraktionen verschiedener Röhrchen vereinigt und nochmals zentrifugiert (300 x g für 10 min bei 20°C). Anschließend erfolgte die Resuspendierung und Vereinigung aller Zellpellets aus korrespondierenden Ringfraktionen in 10 ml warmem Mastzellpuffer und die Bestimmung der Zellzahl bzw. der Zellviabilität (s. 2.4.5) und des Mastzellanteiles (s. 2.4.6) durch Trypan- bzw. Toluidinblaufärbung. Die Zellen aus beiden Fraktionen (30/50 und 50/80) wurden dann vereinigt (ausreichender MZ-Gehalt von mindestens 4 % der Gesamtzellen vorausgesetzt), mit 4 °C kaltem MACS-Puffer (s. Anhang) aufgefüllt und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet (maximal 1×10^8 Gesamtzellen) wurde in 300 µl (zur Inkubation mit CD 117 Antikörper) bzw. 600 µl (zur Inkubation mit CD 203c Antikörper) kaltem MACS-Puffer aufgenommen und zur weiteren Aufreinigung von Mastzellen mittels Magnetseparation (s. 2.4.2.4) weiterverwendet.

2.4.2.3.2 Anreicherung humaner Hautmastzellen

Die Methode zur Anreicherung von Hautmastzellen entsprach im Wesentlichen derjenigen zur Anreicherung von Lungenmastzellen (s. 2.4.2.3.1). Im Unterschied zu der für die Lungenmastzellen verwendeten Trennlösungen wurden hier die 80 %ige und 60 %ige Percolllösung durch Verdünnen mit Mastzellpuffer, der 1 % FCS enthielt, hergestellt. Zur Etablierung des Gradienten folgte die Überschichtung von 80 %iger Percolllösung mit 60

%iger Percolllösung. Nach Verdünnen (1:2) der mastzellhaltigen Suspension mit 100 %igem Percoll zu 50 %iger Percoll-Zellsuspension wurde diese auf den Gradienten aufgeschichtet und anschließend zentrifugiert (s. 2.4.2.3.1). Auch hier sammeln sich die Zellen an den Grenzschichten der verschiedenen Percollösungen (Ringfraktionen), wobei sich die Hautmastzellen vorwiegend in der Ringfraktion oberhalb der 80%igen Percollschicht befinden (ca. 10-30 % Mastzellanteil der lebenden Gesamtzellen). Fraktionen, die einen geringeren Mastzellanteil als 4 % aufwiesen wurden auch hier verworfen. Es folgte, wie bereits oben beschrieben, die Abnahme und wiederholte Zentrifugation der einzelnen Ringfraktionen. Die schließlich erhaltenen Zellpellets wurden in 10 ml Mastzellpuffer (+ 1 % FCS) vereinigt und danach die Bestimmung der Zellzahl bzw. der Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung (s. 2.4.5) und diejenige des Mastzellanteiles (s. 2.4.6) mittels Toluidinblaufärbung durchgeführt. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das erhaltene Zellpellet (maximal 1×10^7 Gesamtzellen) in 80 μ l MACS-Puffer aufgenommen und zur weiteren Anreicherung von Mastzellen mittels Magnetseparation (s. 2.4.2.4) verwendet.

2.4.2.4 Aufreinigung humaner Mastzellen mittels Magnetseparation

Die Magnetseparation stellt ein Trennverfahren dar, bei dem Zellpopulationen aufgrund von spezifischen Zelloberflächenantigenen voneinander getrennt werden können. Dabei wird das zellspezifische Oberflächenantigen mit einem selektiven Antikörper markiert, der entweder direkt an magnetische Mikropartikel konjugiert ist, oder in einem zweiten Inkubationsschritt an einen mit Mikropartikeln konjugierten Sekundärantikörper adsorbiert wird. Die Zellsuspension wird dann auf eine Säule mit ferromagnetischer Matrix gegeben. Da diese in einem Magneten fixiert ist, binden Zellen, die über das spezifische Antigen an magnetische Mikropartikel gebunden haben, an die Säule, während unmarkierte Zellen durch einen kontinuierlichen Pufferstrom aus der Säule entfernt werden. Anschließend wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen, und die gebundenen Zellen werden mit Puffer herausgespült.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung humaner Mastzellen über die Oberflächenantigene CD117 oder CD203c. CD117, auch c-Kit genannt, ist ein Protein, das

insbesondere auf Stammzellen und Mastzellen exprimiert ist. Es gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase. Als Rezeptorprotein kann CD117 durch den Wachstumsfaktor SCF (stem-cell-factor) aktiviert werden und ist so an der Proliferation von Mastzellen beteiligt. Als weiteres Antigen diente CD203c. CD203c ist ein Ektoenzym, auch Phosphodiesterase 3 genannt (142), welches auf Stammzellen, basophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert wird. Bühring *et al.* konnten über dieses Antigen Stammzellen aus dem Knochenmark und Basophile aus peripherem Blut isolieren (143). Da bei den von mir durchgeführten Präparationen das humane Gewebe zuvor von Blutresten befreit wurde, konnte die Anwesenheit von Basophilen weitestgehend ausgeschlossen und damit die Mastzellen selektiv auch über CD203c isoliert werden. Die Aufreinigung über CD203c erfolgte nach einer Methode von Gibbs & Ennis (140), welche wie bereits erwähnt von F. Schiemann (141) weiterentwickelt wurde. Um speziell die Ausbeute an humanen Lungenmastzellen zu erhöhen, wurde in späteren Aufreinigungen eine Separation über beide Antigene gleichzeitig durchgeführt (s. 2.4.2.4.1). Alle unter 2.4.2.4 verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

2.4.2.4.1 Magnetseparation humaner Lungenmastzellen

Wie bereits oben erwähnt (s. 2.4.2.4) erfolgte die Magnetseparation der Lungenmastzellen sowohl mit anti-CD117 Antikörpern allein als auch über eine Kombination von anti-CD117 und anti-CD203c Antikörpern.

Für die Aufreinigung wurde das MidiMACS-Verfahren der Firma Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) verwendet. Für die Aufreinigung über anti-CD117 wurden die durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Mastzellen (aufgenommen in 300 µl MACS-Puffer) mit je 100 µl Fc-Rezeptor-Blockierungreagenz (FcR Blocking Reagent, Miltenyi) und anti-CD117 Mikrobeads versetzt und für 15 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Der ungebundene Antikörper wurde daraufhin durch Waschen in 5 ml MACS-Puffer entfernt (300 x g, 10 min, 4 °C). Das resultierende Pellet wurde in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen und bei 4 °C auf eine ferromagnetische Säule gegeben, welche zuvor in einen Midi-MACS-

Magneten eingespannt und mit 3 Säulenvolumina (SV; 1 SV = 3 ml) 4 °C kaltem MACS-Puffer äquilibriert worden war. Ein Polyethylenfilter (Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec, Maschenweite: 30 µm) diente dazu, gröbere Bestandteile der Zellsuspension zurückzuhalten, um das Verstopfen der Säule zu verhindern. Nicht an die Säule bindende Zellen wurden durch Spülen mit 3 SV (9 ml) Puffer vollständig entfernt. Auftrags- und Spülfractionen (Durchläufe) wurden gemeinsam in einem 50 ml-Kunststoffröhrchen aufgefangen. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld, wurden 2 SV MACS-Puffer mit einem Stempel (Miltenyi) durch die Säule gedrückt und das die gebundenen Mastzellen enthaltende Eluat in einem 15 ml-Kunststoffröhrchen (Greiner bio-one) aufgefangen. Anschließend wurden im Eluat und im Durchlauf sowohl die Zellzahl und die Viabilität, als auch die Reinheit der jeweiligen Fraktionen mittels Trypanblau- bzw. Toluidinblaufärbung überprüft (s. 2.4.5 und 2.4.6). Die Ausbeute (zwischen 3×10^6 und 20×10^6 Lungenmastzellen) betrug ca. 50 % der nach der Dichtegradientenzentrifugation bestimmten Menge an Mastzellen. Die Mastzellen wurden in Kulturmedium I (s. 2.4.3) gewaschen und anschließend in Kultur genommen (s. 2.4.3).

Für die Aufreinigung durch Kombination von anti-CD117 und anti-CD203c Antikörpern wurden die aus der Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen, in 600 µl MACS-Puffer aufgenommen Zellen, mit 200 µl FcR Blockierungsreagenz und 100 µl anti-CD203c-Phycoerythrin (PE) versetzt und 15 min bei 4 °C unter Schütteln markiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl anti-CD117-Mikrobeads, gefolgt von einer erneuten Inkubation für 15 min bei 4 °C. Die ungebundenen Antikörper wurden durch einmaliges Waschen mit MACS-Puffer für 10 min, bei 4 °C und 300 x g entfernt, das resultierende Zellpellet dann in 800 µl MACS-Puffer aufgenommen, mit 200 µl anti-PE Mikrobeads (zur Bindung von anti-CD203c-PE tragenden Zellen) versetzt und 15 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Währenddessen erfolgte die Äquilibrierung der Säule mit Puffer (s. oben). Nach Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen, wie bereits für die Inkubation mit anti-CD117 beschrieben, über das MidiMACS-Säulensystem aufgetrennt. Die so aufgereinigten Mastzellen besaßen stets eine Viabilität und Reinheit von mindestens 80 %.

Viabilität und Reinheit stiegen in der nachfolgenden Zellkultur bis auf 95 % an. Die Ausbeute an Zellen variierte zwischen 3×10^6 und 20×10^6 Lungenmastzellen. Der Vorteil dieses Verfahrens bestand darin, dass ca. 80 % der nach der Dichtegradientenzentrifugation ermittelten Mastzellen isoliert werden konnten. Die Mastzellen wurden in Kulturmedium I gewaschen und anschließend in Kultur genommen (s. 2.4.3).

2.4.2.4.2 Magnetseparation humaner Hautmastzellen

Die Aufreinigung der Hautmastzellen erfolgte über das Antigen CD203c mit Hilfe des bereits oben beschriebenen MidiMACS-Systems. Als ein wesentlicher Unterschied zu dem über das Antigen CD117 verlaufenden Verfahren wurde hier der eigentlichen, spezifischen Mastzellisolierung über anti-CD203c Antikörper ein Reinigungsschritt durch alleinige Inkubation mit anti-PE Mikrobeads vorangestellt. Es stellte sich heraus, dass sich dadurch die Viabilität und der Mastzellanteil der Zellsuspension verbessern lassen, da die Zellsuspension kontaminierende Bestandteile (Zellen und Zelltrümmer) durch diesen Schritt unspezifisch von der Säule adsorbiert werden. Dazu wurde die durch Dichtegradientenzentrifugation angereicherte Zellfraktion, aufgenommen in 80 μ l MACS-Puffer, zunächst mit 20 μ l anti-PE Mikrobeads 15 min bei 4 °C inkubiert, danach in 5 ml 4 °C kaltem MACS-Puffer gewaschen (300 x g, 10 min, 4 °C) und anschließend in 3 ml Puffer auf die ferrromagnetische Säule (s. 2.4.2.4.1) gegeben. Es folgte das Spülen der Säule (s.o.). Der die unmarkierten Mastzellen enthaltende Durchlauf wurde aufgefangen, die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die unspezifisch gebundenen Zellen mit 2 SV Mastzellpuffer aus der Säule gedrückt. Die so eluierte Zellsuspension enthielt keine relevanten Mengen an Mastzellen (Mastzellanteil < 0,01 % der Gesamtzellen) und wurde verworfen. Im Anschluss an eine Zentrifugation (300 x g, 10 min, 4 °C) und nach Aufnehmen des Zellpellets in 100 μ l MACS-Puffer (maximal 1×10^7 Gesamtzellen/100 μ l) wurden die Zellen mit dem mastzellspezifischen PE-markierten anti-CD203c Antikörper (95 μ l Zellsuspension + 5 μ l anti-CD203c) 45 min bei 4 °C lichtgeschützt unter Schütteln inkubiert. Nachdem der ungebundene anti-CD203c-PE durch Waschen entfernt worden war, folgte wiederum ein

Inkubationsschritt mit anti-PE Mikrobeads (80 µl Zellsuspension mit 1×10^7 Gesamtzellen + 20 µl anti-PE Mikrobeads) für 15 min bei 4 °C. Nach Zentrifugation zur Abtrennung von ungebundenen anti-PE Mikrobeads wurde das Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen und wie bereits oben beschrieben über eine MidiMACS-Säule aufgetrennt. Der Durchlauf und das mastzellreiche Eluat wurden auf Zellzahl, Viabilität und Mastzellanteil untersucht. Die so aufgereinigten Mastzellen besaßen eine Viabilität und Reinheit von mindestens 70 %. Beide Parameter stiegen im Laufe der Kultur auf bis zu 95 % an. Die Ausbeute variierte zwischen 1×10^6 und 4×10^6 Hautmastzellen. Die Mastzellen wurden in Kulturmedium I gewaschen und danach in Kultur genommen (s. 2.4.3).

2.4.3 Kultur primärer humaner Lungen - und Hautmastzellen

Zur Kultivierung der primären humanen Mastzellen wurde StemPro-34 Medium (Invitrogen, USA, Grand Island NY), versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 ng/ml SCF (Kulturmedium I), verwendet. Da frisch isolierte Mastzellen keine adäquate Responsivität im Hexosaminidase-Release-Assay (s. 2.6.1) gegenüber mastzelltypischen Stimuli zeigten wurde ihnen durch 14-tägige Kultivierung die Möglichkeit gegeben, sich von der Prozedur der Isolierung zu erholen, bevor sie für Experimente verwendet wurden. Die Zellen wurden in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml aufgenommen und in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank und bei konstantem CO₂-Gehalt der Luft (5 % CO₂) kultiviert. Alle 7 Tage erfolgte die Versorgung der Mastzellen mit frischem Kulturmedium. Dazu wurden die Zellen in Kulturmedium gewaschen und erneut in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml in frisch angesetztem Kulturmedium aufgenommen und weiterkultiviert.

2.4.4 Kultur der Mastzelllinie LAD 2

LAD 2-Zellen wurden von Kirshenbaum *et al.* als humane Mastzelllinie aus dem Knochenmark von Leukämiepatienten etabliert (144). Diese Zelllinie ist bislang die einzige verfügbare humane Mastzelllinie, die funktionell aktivierbare FcεRI (Fc-Rezeptor I für IgE)

exprimiert und somit eine große physiologische Ähnlichkeit zu Primärzellen aufweist. Im Gegensatz zu der bislang allgemein verwendeten Mastzelllinie HMC-1 (human mast cell leukemia cells, (145) reagieren LAD 2 nach Kreuzvernetzung FcεRI-gebundenen IgEs (über polyvalentes Antigen oder anti-IgE Antikörper) mit Degranulation. HMC-1 besitzen eine Mutation im c-Kit Gen, was eine SCF-unabhängige Proliferation dieser Zellen zur Folge hat. LAD 2 besitzen keine entsprechende Mutation und benötigen, wie auch Primärzellen, zur Proliferation die Anwesenheit des Zytokins SCF. Ihr relativ langsames Wachstum (Verdopplungszeit in Zellkultur ca. 2-3 Wochen) zeigt große Ähnlichkeit mit demjenigen von Primärzellen. Andere Tumorzelllinien verdoppeln ihre Zellzahl bereits innerhalb von 3-5 Tagen (144).

Die Zellen wurden mir freundlicherweise von Drs. Arnold S. Kirshenbaum und Cem Akin (beide National Institute of Health, MD, USA) zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen wie von Kirshenbaum *et al* (144) angegeben in StemPro-Medium, versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 100 ng/ml SCF (Kulturmedium II) in einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Wie bereits oben erwähnt kommt es innerhalb von 14 Tagen zu einer Verdoppelung der Zellzahl. Aus diesem Grund wurden LAD 2 Zellen alle zwei Wochen in StemPro-34 Medium gewaschen, in frischem Kulturmedium II erneut zu $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml aufgenommen und dann weiterkultiviert.

2.4.5 Bestimmung der Zellviabilität

Die Überprüfung der Zellviabilität wurde mittels einer Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Tote Zellen sind (aufgrund von Membranschädigungen) für Trypanblau permeabel, und werden durch diesen Farbstoff intensiv blau gefärbt, während vitale Zellen im Lichtmikroskop farblos erscheinen. Aliquots der Zellsuspension wurden zu gleichen Teilen mit Trypanblaulösung versetzt und anschließend lichtmikroskopisch in einer Neubauerkammer ausgezählt. Die Viabilität wird als prozentualer Anteil der lebenden Zellen (Zellzahl) an der Gesamtzellzahl angegeben. Die Gesamtzellzahl ist dabei die Summe aus lebenden und toten Zellen.

2.4.6 Bestimmung des Mastzellanteils

Die spezifische Anfärbbarkeit von Mastzellen mit salzsaurer Toluidinblaulösung gibt Aufschluss über den Anteil der Mastzellen in einer Zellsuspension. Nach Behandlung mit Toluidinblau nehmen die zytoplasmatischen Granula von Mastzellen einen tief violetten Farbton an, wodurch sie von anderen, diesen heparinreichen Granulartyp nicht enthaltenden Zellen unterschieden werden können. Aliquots der jeweiligen Zellsuspension wurden 1:2 mit Färbelösung versetzt, in eine Neubauerkammer gegeben und nach 10-20 min Inkubationszeit ausgezählt. Der Mastzellanteil wird als prozentualer Anteil der Mastzellen an der Gesamtzellzahl angegeben.

2.5 Isolierung von basophilen Granulozyten

Humane basophile Granulozyten (Basophile) wurden aus peripherem Blut gesunder Spender durch eine Kombination aus Sedimentation und Dichtegradientenzentrifugation und durch anschließende Aufreinigung über eine Negativselektion mit dem MACS Basophil Isolation Kit der Firma Milteny Biotec, (Bergisch Gladbach) mittels eines MACS-System gewonnen (146, 147). Die so frisch isolierten Basophilen wurden mir freundlicherweise von Drs. H. Haas und G. Schramm (Laborgruppe Zelluläre Allergologie, FZB) zur Verfügung gestellt. Die Experimente wurden unmittelbar im Anschluss der Isolierung der Zellen durchgeführt.

2.6 Biochemische und biologische Testverfahren

2.6.1 Hexosaminidase-Release-Assay

Eine wichtige biologische Funktion von Mastzellen (und Basophilen) ist ihre Fähigkeit, nach Stimulation mit Aktivatoren, zu degranulieren. Dieser als Exozytose (*compound exocytosis*) bezeichnete Vorgang vollzieht sich durch die Fusion der intakten Membran der sekretorischen Granula mit der Plasmamembran, was eine Freisetzung der Granulainhalte in den Extrazellularraum nach sich zieht. Dabei wird unter anderem das Enzym β -Hexosaminidase ausgeschüttet, dessen Freisetzung mit derjenigen vieler anderer Granulainhalte

wie Histamin und Chymase korreliert (148). Die Messung der enzymatischen Aktivität der in den Überstand freigesetzten β -Hexosaminidase gibt Aufschluss über das Ausmaß der Mastzelldegranulation (148).

Mastzellen lassen sich durch zahlreiche Stimuli zur Degranulation aktivieren. Einer der wichtigsten Mechanismen ist die Kreuzvernetzung von mindestens zwei an $Fc\epsilon RI$ gebundenen IgE-Molekülen durch polyvalentes Antigen bzw. Allergen. Eine weit verbreitete experimentelle Methode zur Aktivierung von Mastzellen besteht in der Kreuzvernetzung durch anti-IgE Antikörper. Da die $Fc\epsilon RI$ der LAD 2 Zellen im Gegensatz zu den Rezeptoren auf Primärzellen keine IgE-Moleküle gebunden haben und somit nicht unmittelbar durch anti-IgE stimuliert werden können, wurden diese Zellen mindestens 18 h vor Versuchsbeginn mit humanem Myeloma-IgE inkubiert. Dazu versetzte ich LAD 2 Zellen (5×10^5 Zellen/ml) in Kulturmedium II (s. Anhang) mit $1 \mu\text{g/ml}$ humanem IgE. Dies entsprach einer Konzentration, ab der in Vorexperimenten keine weitere Steigerung der Degranulation durch Erhöhung der anti-IgE-Antikörperkonzentration (Sättigung) zu beobachten war. Um auf Primärzellen einem möglichen Verlust bereits gebundener IgE-Moleküle während der Kultur entgegenzuwirken und um eine Gleichbehandlung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Primärzellen ebenfalls mit Myeloma-IgE vorbehandelt. Auch zur Bestimmung der Degranulationsaktivität $Fc\epsilon RI$ -unabhängiger Stimuli wurden mit IgE beladene Mastzellen eingesetzt.

Die Durchführung des Degranulationsassays wurde wie folgt gehandhabt: LAD 2 oder primäre Mastzellen (5×10^5 Zellen/ml) wurden in PBS-D + CaMg/0,1 % BSA (s. Anhang) für 10-20 min im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt. In eine für 10-20 min im Brutschrank bei 37°C vorgewärmten Mikrotiterplatte (Greiner GmbH, geblockt mit PBS-D/0,1 % BSA) wurden $120 \mu\text{l}$ Stimuluslösung/well (angesetzt in PBS-D + CaMg/0,1 % BSA) vorgelegt und mit $120 \mu\text{l}$ vorgewärmter Zellsuspension vermischt. Nach 30 min Inkubation auf einem Schüttler bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen abzentrifugiert ($300 \times g$, 10 min). Es folgte die Abnahme von $2 \times 100 \mu\text{l}$ (Duplikate) der zellfreien Überstände, Überführung in eine Mikrotiterplatte und serielle 1:2 Verdünnung der Überstände über vier Stufen in PBS-D + CaMg/ 0,1 % BSA. Jedem Ansatz wurden $50 \mu\text{l}$ einer β -Hexosaminidase-Substratlösung

(s. Anhang) hinzugefügt und für 18 h in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank inkubiert. Gemessen wurde der enzymatische Umsatz des in der Substratlösung enthaltenen 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosids durch die aus den Zellen in den Überstand freigesetzte β -Hexosaminidase. Nach der Inkubation folgte die Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 50 μ l Glycinpuffer (s. Anhang) pH = 10,3, wobei eine Gelbfärbung des während der enzymatischen Spaltung gebildeten Produktes p-Nitrophenol auftritt. Die Extinktion des entstandenen p-Nitrophenols wurde in einem Mikrotiterplatten-Photometer (s. Anhang) bei $\lambda = 405$ nm gemessen und die damit korrelierende Enzymaktivität der Proben als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität der Zellen (bestimmt in mit 0,05 % Triton X-100 behandelten Totallysaten) berechnet.

2.6.2 Hexosaminidase-Release-Assay nach Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Proteinase- oder Inhibitoren

In vielen Experimenten wurden humane Mastzellen vor der Stimulation mit α IgE-Antikörpern oder anderen Stimuli mit verschiedenen Proteinase-, Enzyminhibitoren (z.B. PMSF, Hirudin), Pepduzinen etc. vorinkubiert, um den modulatorischen Einfluss dieser Argenzien auf die Degranulationsreaktion zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, zu 5×10^5 Zellen/ml PBS-D + CaMg/0,1 % BSA aufgenommen und mit den oben genannten Argenzien zu den bei den einzelnen Experimenten angegebenen Konzentrationen und Zeiten versetzt. Im Einzelnen wurden nach folgenden Protokollen vorgegangen. Für die Vorinkubation mit Proteinase wurden 1 ml Zellsuspension in ein Kunststoffröhrchen überführt, mit der jeweiligen Proteinase versetzt und in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad für 5 min inkubiert. In einigen Experimenten wurde bei Vorinkubation mit Thrombin zur Inhibition der Enzymaktivität den Ansätzen mit PMSF oder Hirudin zugefügt. Speziell für den Einsatz von PMSF war es erforderlich das Zielenzym Thrombin (45 U/ml) vor Zugabe zur Zellsuspension mit PMSF (1 mM, 10 min bei 37 °C) vorzubehandeln und das zelltoxische PMSF anschliessend bei pH-Wert von 8,8 (eingestellt mit NaOH) für 30 min bei Raumtemperatur zu inaktivieren. Erst anschliessend erfolgte nach Einstellen des Ansatzes

(mit HCl) auf einen pH-Wert von 7,4 die Zugabe des Thrombins zu den Mastzellen (finale Thrombinkonzentration 0,45 U/ml bzw. PMSF-Konzentration 0,01 mM). Nach Inkubation für 5 min bei 37 °C erfolgte die finale Stimulation der Zellen für 30 min mit 3 µg/ml αIgE. Parallel mitgeführte Kontrollansätze blieben unstimuliert oder wurden mit inaktiviertem PMSF alleine vorinkubiert. Die Inhibitionsansätze mit Hirudin erforderten keine Inaktivierung des Inhibitors vor Zellzugabe. Thrombin und Hirudin wurden im Verhältnis 1:1 für 10 min bei 37 °C vorinkubiert, anschließend für 5 min bei 37 °C mit den Zellen inkubiert (finale Thrombinkonzentration 0,45 U/ml) und final mit 3 µg/ml αIgE für 30 min stimuliert. Kontrollansätze blieben entweder unstimuliert oder wurden mit Hirudin alleine vorinkubiert. Zur funktionellen Inhibition von PAR1 und PAR4 verwendete ich die Inhibitoren PAR1-Pepduzin (P1-Pep, 1 µM), PAR4-Pepduzin (P4-Pep, 0,25 µM). Dazu versetzte ich Zellen entweder separat mit P1- oder P4-Pep oder mit beiden Pepduzinen gemeinsam und inkubierte die Ansätze für 15 min bei 37 °C. Dann erfolgte die Inkubation mit Thrombin (0,45 U/ml) für 5 min und schließlich die Stimulation mit 3 µg/ml αIgE für 30 min. Als Kontrollen dienten Ansätze inkubiert mit 0,45 U/ml Thrombin allein oder Puffer allein. Nach der Stimulation mit αIgE-Antikörpern wurde die in den Überstand freigesetzte β-Hexosaminidaseaktivität gemessen (s. 2.6.1).

2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenmolekülen auf Mastzellen

Die Immunofluoreszenzfärbung stellt eine gängige Methode zum Nachweis und zur Bestimmung der Expression von Molekülen auf der Zelloberfläche dar. Dabei erfolgt die Färbung entweder direkt über einen an ein Fluorochrom gekoppelten, für das jeweilige Molekül spezifischen Antikörper (Primärantikörper), oder indirekt über einen speziesspezifischen, sekundären, mit Fluorochrom markierten Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird dabei in einem zweiten Schritt zum Nachweis eines antigenspezifischen, unkonjugierten Primärantikörpers eingesetzt. Anschließend kann die Fluoreszenz der so markierten Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden (s. 2.6.3.2).

2.6.3.1 Extra- und intrazelluläre Immunfluoreszenzmarkierung von PAR auf primären Mastzellen und LAD 2 Zellen

Die Detektion von PAR auf der Zelloberfläche von Mastzellen sowie der Oberflächenmarker c-Kit und IgE erfolgte nach der Methode der Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung spezifischer unkonjugierter Primäantikörper gegen PAR1 (ATAP2), PAR2 (SAM11), PAR3 (α -PAR3), PAR4 (α -PAR4) und c-Kit sowie eines FITC-konjugierten Primäantikörper gegen IgE (s. 2.3, Tabelle 2).

Die gesamte Markierungsprozedur verlief bei 4 °C. Dazu wurden die Zellen ($0,03-0,1 \times 10^6$) in einem 5 ml-Polycarbonatröhrchen (BD, Heidelberg) mit ATAP2 (4 $\mu\text{g/ml}$), SAM11 (2 $\mu\text{g/ml}$), α -PAR3 (4 $\mu\text{g/ml}$) oder α -PAR4 (16 $\mu\text{g/ml}$) in 50 μl PBS-D/ 0,1 % BSA (s. Anhang) für 60 min unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurden die Proben mit 1,25 ml PBS-D/0,1 % BSA versetzt und mit 300 μl inaktiviertem (1 h, bei 56 °C) und filtriertem FCS unterschichtet und zentrifugiert (300 x g, 4 °C, 10 min). Da die Verwendung von FCS zu unerwünschten Zellverlusten führte, wurde in späteren Versuchen dieses nicht mehr verwendet. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 50 μl des sekundären, Fluorochrom gekoppelten Antikörpers und Inkubation für weitere 30 min unter Schütteln bei 4 °C, vor Licht geschützt. Zum Nachweis des zellgebundenen, unmarkierten ATAP2 bzw. SAM11 wurde ein DTAF-Ziege- α -Maus-IgG Antikörper (s. 2.3, Tabelle 2, Verdünnung 1:100) verwendet. Die unmarkierten Antikörper α -PAR3 und α -PAR4 wurden mit einem FITC-markierten Ziege- α -Kaninchen-IgG Antikörper (s. 2.3, Tabelle 2, Verdünnung 1:50) nachgewiesen. Nach anschließender Zentrifugation durch eine FCS-Schicht (wie bereits oben beschrieben) wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (PFA: finale Konzentration 1,5 %) für 20 sek fixiert. Die Zellen wurden dazu in 150 μl PBS-D/0,1 % BSA aufgenommen und unter Mischen mit 150 μl PFA versetzt. Die jeweiligen Kontrollantikörper identischen Isotyps (Isotyp-Kontrollen) sind ebenfalls in Tabelle 2 aufgeführt. Der IgG₁-Kontrollantikörper wurde zu 5 $\mu\text{g/ml}$, der IgG_{2a}-Kontrollantikörper zu 20 $\mu\text{g/ml}$ und die

Kontrolle für Kaninchen-IgG zu 4 und 16 µg/ml eingesetzt. Die Proben wurden bis zur Analyse im Durchflusszytometer bei 4 °C vor Licht geschützt aufbewahrt.

Zum Nachweis der Expression intrazellulär lokalisierter PAR wurden die Zellen vor der Inkubation mit primärem Antikörper durch Zugabe von Paraformaldehyd PFA (1×10^6 Zellen/600 µl PFA) für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen durch Zugabe von 0,1 % Triton-X-100 (1×10^6 Zellen/200 µl Triton) permeabilisiert und schließlich nach der oben beschriebenen Vorgehensweise markiert.

2.6.3.2 Analyse im Durchflusszytometer

Nach Immunfluoreszenzmarkierung der Mastzellen wurde das Fluoreszenzsignal in einem Durchflusszytometer gemessen. Dabei werden die Zellen in einem feinen, gleichbleibenden Pufferstrom am Fokussierungspunkt eines Argonlasers (Anregungswellenlänge: 488 nm) vorbeigeführt. Das von Zellen mit unveränderter Wellenlänge gestreute Licht und das von den Fluorochromen in den langwelligen Bereich verschobene emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Photodetektoren registriert und die Messdaten für jede einzelne Zelle als ein Ereignis gespeichert. Die Streulichtsignale erlauben eine Differenzierung der Zellen nach Größe und Dichte. Das Vorwärtsstreulicht wird in einem Winkel von bis zu 10° der ursprünglichen Strahlungsrichtung aufgenommen und stellt ein Maß für die Zellgröße dar, während das in einem Winkel von 90° detektierte Seitwärtsstreulicht sich proportional zur optischen Dichte verhält, welche im wesentlichen von der Granularität der Zelle abhängt. Das Emissionslicht von Fluorochrom-markierten Antikörpern, die an Zellen gebunden haben, wird ebenfalls in einem Winkel von 90° gemessen. Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer der Firma Becton-Dickinson (s. Anhang) durchgeführt und die Daten anschließend mit dem Computerprogramm WinMDI (s. Anhang) ausgewertet. Routinemäßig erfolgte die Aufnahme von 10.000 Ereignissen pro Messvorgang. Die Ereignisse der zu untersuchenden Zellpopulationen (primäre Mastzellen und LAD 2 Zellen) wurden durch Festlegung eines Messbereichs (Fenster) eingegrenzt und so von Signalen anderer, kontaminierender Zellen und abgestorbener Zellen bzw. Zelltrümmer getrennt. Die Darstellung erfolgte als

Histogramm, wobei die Häufigkeit der Ereignisse gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen und deren repräsentativer Median rechnerisch ermittelt wurde.

2.6.4 Messung des intrazellulären Gehaltes an freien zytosolischen Kalziumionen

Kalziumionen agieren als universeller sekundärer Botenstoff in allen Zellen, so auch in Mastzellen. Eine weitverbreitete Methode, den stimulierenden Effekt eines Mediators zu messen, ist die Bestimmung der intrazellulär in das Zytosol freigesetzten Kalziumionen (Ca^{2+}). Diese können mit Hilfe von Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden.

Zur Messung der intrazellulären Freisetzung von Kalziumionen verwendete ich Fluo-4. Durch die Veresterung mit Azetoxymethanol (AM) liegt der Farbstoff in einer lipophilen Verbindung vor (Fluo-4-AM), die von den Zellen aufgenommen und durch unspezifische intrazelluläre Esterasen hydrolysiert werden kann. Der freigesetzte Farbstoff ist nicht membranpermeabel und akkumuliert in der Zelle. Hier bildet der Farbstoff Komplexe mit intrazellulären Ca^{2+} -Ionen. Fluo-4 ist ein nicht-ratiometrischer Farbstoff und sendet nur ein Fluoreszenzsignal aus. Zur Anregung des Farbstoff- Ca^{2+} -Ionen-Komplexes wird Licht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ eingesetzt. Das anschließend emittierte Fluoreszenzsignal kann dann bei $\lambda = 516 \text{ nm}$ aufgenommen werden. Die Darstellung der ausgewerteten Messdaten erfolgt als Histogramm, wobei die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen wird.

2.6.4.1 Beladung der Zellen mit Fluo-4-AM und Analyse im Durchflusszytometer

Humane Mastzellen oder LAD 2 ($0,03\text{-}0,1 \times 10^5$) wurden in 1 ml $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem PBS-D + CaMg/BSA (s. Anhang) aufgenommen und mit Fluo-4-AM ($2 \text{ } \mu\text{M}$) 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermoschüttler (s. Anhang) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließende Zentrifugation diente dazu, nicht von den Zellen aufgenommenen Farbstoff zu entfernen. Das resultierende Zellpellet wurde in $0,5 \text{ ml}$ PBS-D + CaMg/BSA resuspendiert, in ein auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtes FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer (s. Anhang) vor

und nach Stimulation gemessen. Aufgenommen wurden die Fluoreszenzsignale nach Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$. Nach 45-60 Sekunden Vorlauf (Registrierung der Basalintensität) erfolgte die Zugabe des Stimulus. Signale wurden über einen Zeitraum von 5-11 min aufgenommen. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit den Programmen WinMDI (s. Anhang).

2.7 Molekularbiologische Testverfahren

Der qualitative Nachweis der konstitutiv exprimierten mRNA erfolgte mittels der PCR-Methode. Für die quantitative mRNA-Bestimmung wurden die Real-Time-PCR-Methode angewendet. Die Bestimmung von PAR 1- und PAR2-mRNA erfolgte unter Verwendung von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (SyberGreen) im Kapillar-LightCycler System, während mRNA-Bestimmung für PAR3 und PAR4 unter Verwendung von TaqMan-Sonden im Platten-LightCycler System durchgeführt wurde.

2.7.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (ribonucleic acid, RNA) aus LAD 2-Zellen und primären humanen Mastzellen wurde das Isolierungs-Kit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim) verwendet. LAD 2- und primäre Mastzellen ($0,2-0,5 \times 10^6$ Zellen) wurden in 200 μl PBS (s. Anhang) aufgenommen und durch Zugabe von 400 μl Lysepuffer (s. Anhang) lysiert. Danach erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der RNA über eine mit einer Silikamembran versehene Säuleneinheit (High Pure Filter Tube, Roche). Nach Auftragen des Zelllysates (max. 700 μl) auf die Säule und Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (15 sec, 8000 x g) binden Nukleinsäuren (RNA, DNA) an die Glasfasern der Membran. Der Durchlauf wurde verworfen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation (15 min, bei 25 °C) mit 95 μl DNase, angesetzt im Verhältnis 1:10 in Inkubationspuffer (s. Anhang), um residueller DNA-Kontamination entgegenzuwirken. Anschließend erfolgten die Zugabe von 500 μl Waschpuffer I (s. Anhang) und Zentrifugation (s. oben), um möglicherweise enthaltene Inhibitoren der nachfolgenden RT-Reaktion (s. 2.7.2) zu

entfernen. Der Durchlauf wurde verworfen. Ein zweiter Waschschriff mit 200 µl Waschpuffer II (s. Anhang) diente dazu Salze, Proteine und andere zelluläre Bestandteile zu entfernen. Die auf der Säule gebundene RNA wurde mit 50-60 µl Elutionspuffer (s. Anhang) eluiert. Anschließend wurde über Messung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm die Konzentration ermittelt. Da OD = 1 gemessen bei $\lambda = 260$ nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht lässt sich die Konzentration mit folgender Formel bestimmen:

$$\text{RNA-Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Die RNA-Konzentration variierte zwischen 10 ng RNA/µl und 100 ng RNA/µl. Das Verhältnis der Absorptionen, gemessen bei $\lambda = 260$ nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum der Proteine), stellt ein Maß für die Reinheit der Probe dar und sollte Werte zwischen 1,8 und 2,2 annehmen. Die Reinheit aller RNA-Proben lag in diesem Bereich. Die so isolierte RNA wurde bis zur Verwendung in der RT-Reaktion (s. 2.7.2) bei - 70 °C gelagert.

2.7.2 Reverse Transkriptase-Reaktion zur Synthese komplementärer DNA

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) dient dazu, unter Verwendung isolierter RNA als Vorlage, komplementäre doppelsträngige DNA zu synthetisieren. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird zunächst einzelsträngige DNA hergestellt, während die RNA bei der Reaktion nach und nach hydrolysiert wird. Danach erfolgt, aufgrund der DNA-Polymerase-Aktivität des Enzyms, die Komplementierung des DNA-Einzelstranges zur doppelsträngigen DNA.

In den von mir durchgeführten Experimenten benutzte ich zur Herstellung von komplementärer DNA (complementary desoxyribonucleic acid, cDNA) den First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas, St. Leon-Rot. Die im folgenden verwendeten Reagenzien sind, wenn nicht anders angegeben, unter 7.3.4 definiert.

Zunächst stellte ich ein Reverse Transkriptions-Mix (RT-Mix) folgender Zusammensetzung her:

RT-Mix	4 µl Reaktionspuffer
	1 µl RiboLock Ribonuklease Inhibitor
	2 µl 10 mM dNTP Mix

Für die RT-Reaktion wurden zunächst 10 µl isolierter RNA (mind. 9 ng RNA/µl) mit 1 µl Oligo (dT)₁₈-Primerlösung versetzt. Diese enthält zur RNA komplementäre Primer, die zur Initiation der DNA-Synthese dienen. Anschließend wurden 7 µl RT-Mix zugegeben, der einen Ribonuklease-Inhibitor (RiboLock) gegen RNA-Degradation und die für die Verlängerung der DNA erforderlichen Desoxynukleotide (dNTP) enthält. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 2 µl reverser Transkriptase M-MuLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Folgendes Programm wurde verwendet:

1. 5 min bei 70 °C Inkubation mit Oligo-(dT)₁₈ -Primerlösung
2. 2 min Abkühlphase
3. 5 min bei 37 °C Inkubation mit RT-Mix
4. 60 min bei 37 °C Inkubation mit M-MuLV (reverse Transkriptase)
5. 10 min bei 70 °C Abstoppen der Reaktion

Die Schritte 3 und 4 wurden in späteren Synthesen, gemäß den Angaben des Herstellers, zu einem Schritt zusammengefasst, indem die reverse Transkriptase dem RT-Mix hinzugefügt wurde und eine Inkubation für 60 min bei 37 °C folgte. Durchgeführt wurde die Reaktion in einem Thermocycler der Firma Roche (s. Anhang).

Die synthetisierte cDNA wurde 1:5 (bei Primärzellen und LAD 2) bzw. 1:10 (bei den als Kontrollen verwendete Zelllinien A549, MEG01 und Jurkatzellen) mit RNase-freiem Wasser verdünnt, welches mit Diethylcarbonat (DEPC) behandelt worden war, um kontaminierende

RNAsen zu inhibieren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert oder sofort in einer PCR-Reaktion eingesetzt (s. 2.7.3).

2.7.3 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Sie wird eingesetzt um meist kürzere, durch Primer definierte Sequenzen einer Original-DNA (Template) zu amplifizieren. Dabei kann es sich um ein Gen oder aber auch nur um einen Teil eines Gens handeln. Zur Amplifizierung des Templates wird das Enzym DNA-Polymerase verwendet. DNA-Polymerase kommt in allen Lebewesen vor und dient zur Vervielfältigung der DNA während der Zellteilung. *In vitro* wird dieser Prozess eingeleitet durch sogenannte Primer. Diese sind kurze Oligonukleotide, die komplementär an einen einzelnen DNA-Strang binden und die Anlagerung der DNA-Polymerase erleichtern. Letztere synthetisiert nun mit Hilfe des „sense“-Primers, der den Startpunkt festlegt, einen neuen komplementären DNA-Strang. Die Länge des neusynthetisierten Stranges wird durch einen zweiten Primer („antisense“-Primer) begrenzt. Die neu entstandene doppelsträngige DNA dient im nächsten Schritt wiederum als Template. Dieser Zyklus wird bis zu 50 x wiederholt. Dabei besteht jeder Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Schritten: Denaturierung, Primer-Annealing, Elongation. Während der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen in ihre Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt erfolgt bei konstanter Temperatur (eine für jedes Primerpaar spezifische „Annealing“-Temperatur) und für eine definierte Zeit („Annealing“-Zeit) die Anlagerung der beiden Primer (sense und antisense). In der letzten Phase verlängert die DNA-Polymerase (hier: Taq-Polymerase) in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) das Template. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Polymerasekettenreaktionen wurde das PCR-Kit High Fidelity PCR Enzyme Mix der Firma Fermentas (Kalifornien, USA) mit folgendem Programm verwendet :

1. 2 min initiale Denaturierung bei 94 °C
2. 30 sec Denaturierung bei 94 °C
3. 30 sec Primer-Annealing bei 57 °C
4. 30 sec Elongation bei 72 °C
5. 10 min finale Elongation 72 °C
6. 10 min Abkühlphase bei 40 °C

Je PCR-Ansatz wurden zu 20 µl Endvolumen in der aufgeführten Reihenfolge zusammengegeben:

2,0	µl	High Fidelity PCR Puffer + MgCl ₂ (High Fidelity PCR Enzyme Mix, Fermentas, Kalifornien, USA)
2,0	µl	dNTP-Mix (C. Roth, Karlsruhe, Deutschland, s. Anhang)
0,5	µl	10 µM sense Primer (s. Tabelle 3)
0,5	µl	10 µM antisense Primer (s. Tabelle 3)
0,125	µl	High Fidelity PCR Enzyme Mix (High Fidelity PCR Enzyme Mix)
12,875	µl	H ₂ O, nukleasefrei (High Fidelity PCR Enzyme Mix)
2,0	µl	cDNA (erhalten aus RT-Reaktion, s. 2.7.2)

Im ersten Zyklus wurde dem Denaturierungsschritt eine initiale Denaturierung von 2 min bei 94 °C vorangestellt um sicherzustellen, dass sich sowohl die Original-DNA als auch Primer vollständig voneinander trennten.

Da bestimmte Sequenzen Probleme bei der PCR verursachten (GC-reiche Sequenzen besitzen hohe Schmelztemperaturen und sind deshalb schwerer zu amplifizieren) verwendete ich neben dem PCR-Kit der Firma Fermentas (s.o) auch das PCR-Kit FastStart Taq DNA Polymerase, dNTPPack der Firma Roche. Dieses enthält eine sogenannte GC-reiche Lösung (GC-rich Solution), welche im PCR-Ansatz verwendet, die Schmelzeigenschaften der zu amplifizierenden DNA so verändert, dass GC-reiche

Sequenzen besser zugänglich sind. Mit diesem Kit wurden die PCR-Ansätze wie folgt zusammengesetzt und mit dem oben beschriebenen Programm durchgeführt (Endvolumen 20 µl):

2,0 µl	10x FastStart PCR Puffer + MgCl ₂ (FastStart PCR-Kit)
4,0 µl	GC-reiche Lösung (FastStart PCR-Kit)
0,4 µl	FastStart PCR Nukleotid-Mix (FastStart PCR-Kit)
0,5 µl	10 µM sense Primer (s. Tabelle 3)
0,5 µl	10 µM antisense Primer (s. Tabelle 3)
0,16 µl	FastStart Taq DNA Polymerase (FastStart PCR-Kit)
10,44 µl	H ₂ O, nukleasefrei (FastStart PCR-Kit)
2,0 µl	cDNA (erhalten aus reverser Transkription)

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler der Firma BioRad (s. Anhang) durchgeführt und die amplifizierten Proben nach Beendigung bei -20 °C bis zur Analyse in der Gelelektrophorese (s. 2.7.4.3) eingefroren.

2.7.4 Real-Time Polymerasekettenreaktion (Real Time-PCR)

Diese in den 90er Jahren entwickelte Variante der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) bietet die Möglichkeit zur Quantifizierung einer isolierten RNA im Vergleich zu einem Standard. Dabei unterscheidet man zwischen einer quantitativen PCR, bei der eine absolute Quantifizierung mit Hilfe eines definierten Standards bekannter Konzentration erfolgt, und einer semiquantitativen PCR, die einen relativen Mengenvergleich der Expression des Zielgens und eines sogenannten Haushaltsgens (*house keeping gene*) erlaubt. Haushaltsgene werden in allen Zellen einer Zellpopulation gleichermaßen exprimiert und unterliegen im Idealfall keiner Schwankung durch exogene Einflüsse.

Das Prinzip der Real-Time PCR besteht darin, die in der PCR-Reaktion amplifizierten Produkte noch während der Elongationsphase zu messen („Echtzeit“-PCR). Die Verwendung

von Fluoreszenzfarbstoffen, die an die amplifizierte doppelsträngige DNA binden, ermöglicht nach Anregung mit Licht eine Fluoreszenzdetektion der gebildeten Produkte. Eingesetzt werden neben interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen wie Syber Green s. 2.7.4.1 auch sogenannte Hydrolyse-Sonden, die nach Bindung an DNA enzymatisch aktiviert werden (TaqMan-Sonden s. 2.7.4.2). In dieser Arbeit wurden sowohl der SYBER Green Assay als auch der TaqMan Assay verwendet. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt und die dazu benötigten Reagenzien stammten aus den LightCycler PCR Kits der Firma Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland).

2.7.4.1 LightCycler PCR SYBER Green Assay

Bei dieser Methode wird der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBER Green I der Firma Roche Applied Science zum Nachweis der Ziel-DNA verwendet. Interkalierende Farbstoffe sind in der Lage sich in die DNA einzulagern (interkalieren) bzw. an doppelsträngige DNA zu binden, wodurch das Fluoreszenzsignal dieser Farbstoffe mit fortlaufender Zykluszahl ansteigt, während ungebundener Farbstoff kaum fluoresziert. Die Intensität des emittierten Signals (gemessen bei $\lambda = 530 \text{ nm}$) ist dabei direkt proportional zur entstandenen Menge an doppelsträngiger DNA. Quantitative Untersuchungen für die Expression von PAR1 und PAR2 wurden nach dieser Methodik durchgeführt.

Zur Durchführung der PCR wurde das PCR-Kit LightCycler SYBER Green I Master in Kombination mit dem LightCycler-Gerät 2.0 der Firma Roche genutzt. Der Ablauf des Programms umfasste folgende Schritte:

1. 10 min 95 °C, heißer Start
2. 10 s 95 °C, initiale Denaturierung
3. 30 s 60 °C, (pro Zyklus um 0,5 °C reduziert) Anlagerung der Primer und
Amplifikation der DNA
4. 1 s 72 °C, Aufnahme
5. 44 – malige Wiederholung der Schritte 2 – 4

6. 30 s 40 °C, Abkühlphase

Ansätze mit einem Endvolumen von 10 µl waren wie folgt zusammengesetzt:

2,0	µl	SYBR Master Mix
0,5	µl	10 µM sense primer
0,5	µl	10 µM antisense primer
2,0	µl	cDNA (erhalten aus reverser Transkription)
5,0	µl	H ₂ O

2.7.4.2 LightCycler PCR Probe Master Assay

Bei dieser Methode werden sogenannte Probes (TaqMan-Sonden) zum Nachweis von Ziel-DNA verwendet. Diese sind kurze Nukleotide, die komplementär zur Ziel-DNA sind. Sie tragen am 5'-Ende ein Fluorochrom und am 3'-Ende einen sogenannten Quencher. Fluorochrom und Quencher befinden sich bei intakten Sonden in einer definierten räumlichen Nähe. Wird das Fluorochrom mit Licht angeregt, sendet es zunächst kein Fluoreszenzsignal aus, sondern überträgt strahlungslos seine Energie an den Quencher (Fluoreszenzlöschung). Sobald das Enzym Taq-Polymerase bei der Elongation mit seiner doppelstrangspezifischen 5'-Nukleasereaktivität auf die gebundene Sonde trifft, wird das Fluorochrom abgespalten und somit der räumliche Abstand zwischen Fluorochrom und Quencher vergrößert. Dadurch wird die Fluoreszenzlöschung aufgehoben und das emittierte Fluoreszenzsignal kann jetzt registriert werden. Expressionsuntersuchungen für PAR3 und PAR4 wurden mittels dieses Verfahrens durchgeführt

Zur Durchführung der PCR diente der Platten-LightCycler 480 (s. Anhang) der Firma Roche. Grund dafür war der im Vergleich zum Kapillar-LightCycler 2.0 höhere Probendurchlauf (96 Proben statt 48) und die Kostenersparnis bei gleicher Versuchsdauer. Das Gerät wurde mit folgendem Programm verwendet:

1. 10 min 95 °C, heißer Start
2. 10 s 95 °C, initiale Denaturierung
3. 30 s 60 °C, Anlagerung der Primer und Amplifikation
4. 1 s 72 °C, Aufnahme
5. 54 – malige Wiederholung der Schritte 2 – 4
6. 30 s 40 °C Abkühlphase

Ansatz für die PCR in 10 µl Endvolumen:

5	µl	TaqMan Master-Mix
0,2	µl	10 µM sense Primer
0,2	µl	10 µM antisense Primer
0,1	µl	<i>Universal Probe Library</i> -Sonde (UPL-Sonde)
2,0	µl	cDNA (erhalten aus reverser Transkription)
2,5	µl	H ₂ O

Das unter 2.7.4.1 und 2.7.4.2 verwendet Wasser (Braun dest.) stammte von der Firma Braun, Melsungen, Deutschland.

Zur relativen Quantifizierung des zu untersuchenden Zielgens wurde die LightCycler PCR sowohl für das Zielgen als auch für das Haushaltsgen (HPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) durchgeführt, anschließend der Quotient der erhaltenen Meßgrößen (Zielgen/Haushaltsgen) ermittelt und daraus die relative Menge an RNA mit Hilfe der LightCycler-Software 2.0 (für PAR1- und PAR2-mRNA) und LightCycler-Software 480 (für PAR3- und PAR4-mRNA) berechnet.

2.7.4.3 Agarose – Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird als analytische Methode eingesetzt um Nukleinsäuren (RNA und DNA) und Proteine nach ihrer Größe und/oder Ladung zu trennen. Moleküle der Probenmischung wandern dabei unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Polymergel, welches mit einer isotonischen Pufferlösung getränkt ist. Je nach Größe und Ladung der Moleküle wandern diese mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel. Negativ geladene Moleküle wandern dabei zur Anode, während positiv geladenen Moleküle sich zur Kathode bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Molekülgröße, der Porengröße und vom pH-Wert des Puffermediums.

In dieser Arbeit wurde als Gelmatrix Agarose (PeqLab, Erlangen) in einer Konzentration von 4 % (w/v) verwendet. Agarosepolymere bilden relativ großporige Gele, die sich zur Auftrennung von Nukleinsäuren (hier: cDNA) gut eignen. Durchgeführt wurde die Elektrophorese in 1 x TAE Laufpuffer (Millipore Corp., Schwalbach, s Anhang) in einer horizontalen Gelkammer (Roth, Karlsruhe). Als Nachweisreagenz für DNA-Moleküle wurde dem Gel Ethidiumbromid (C.Roth, Karlsruhe) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Diese Substanz interkaliert mit doppelsträngiger DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) bei $\lambda = 590 \text{ nm}$.

Für den Lauf wurden 10 µl Probenvolumen mit 2 µl 6fach konzentriertem Gel-Ladepuffer (Roti-Load DNA, C.Roth, Karlsruhe, s. Anhang) versetzt und zu 10 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgröße lief stets ein Größenstandard (100 bp DNA-Leiter, C. Roth, Karlsruhe) mit. Dieser enthielt eine Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge, mit der die DNA-Probe verglichen und so die erhaltenen Größen ermittelt werden konnten. Als Positivkontrollen für die verschiedenen PAR wurde cDNA folgender Zelllinien verwendet: für PAR1 und PAR3 cDNA von Jurkatzellen (T-Zelllinie), für PAR2 cDNA von A549-Zellen (Epithelzelllinie) und für PAR4 cDNA von Zellen der Megakaryozytenlinie MEG01. Das Gel lief 35 min bei einer angelegten Spannung von 100 V. Die Detektion und Dokumentation erfolgte mit dem GelDoc 2000 System der Firma Biorad (München).

Tabelle 3: In der PCR und Real-Time PCR verwendete Primer zum Nachweis der Expression von PAR

Primer ¹⁾	UPL-Sonde ²⁾	Sense / Antisense 5' - ... - 3'	Produktlänge (bp) ³⁾
PAR1	19	GGCGGACCTTGTAGTGAGC/ TGGTATTTGGAAATAGTTTGCTCTT	130
PAR2	59	TGCTAGCAGCCTCTCTCC/ AGGCTTCTTCCTTTAGAGGATCTATT	70
PAR3	9	CCAGCGTCTACGACGAG/ CAGACCTTGGCCTGGGTAGC	72
PAR4	9	AAGCAGGAATATTATCTTGTTTCAGC/ TGAGGACC TCGCAAGTGTTGT	94

¹⁾ Primer, spezifisch für PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 stammten von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland);

²⁾ UPL = Taq-Man-Sonden von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) mit *Universal Probe Library (UPL)* Nummer

³⁾ bp = Basenpaare

2.7.4.4 PAR1 und PAR4 Gen – knockdown durch siRNA (small interfering RNA)

Small interfering RNAs (siRNAs) sind 21-28 Nukleotide lange Sequenzen, die in der Zelle aus doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten werden. Dort interagieren sie mit mRNA und initiieren ggf. deren Abbau und tragen somit zur Regulation der Genexpression bei. Im natürlichen Ablauf vollzieht sich dieser Prozess im Zytoplasma der Zelle mit Hilfe des Enzyms DICER (149, 150). In der molekularbiologischen Forschung setzt man synthetisch hergestellte siRNAs ein, um die Expression von Zielgenen zu verringern. Dadurch wird es möglich, deren physiologische Bedeutung zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden siRNAs eingesetzt, um den Einfluss der Expression von PAR1 und PAR4 auf den inhibierenden Effekt von Thrombin (auf das α IgE-induzierte Signal) zu untersuchen. Diese stammten von der Firma Qiagen (Deutschland). Das verwendete

Transfektionsreagenz X-treme GENE wurde von der Firma Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Zur Transfektion von Mastzellen mit siRNAs wurden die Zellen zunächst in Kulturmedium I gewaschen und zu $2,75 \times 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen. Die Transfektion erfolgte in einem Endvolumen von 300 μ l. Für Versuchs- und Kontrollansätze wurden jeweils 200 μ l dieser Zellsuspension in eine 24-well-Platte gegeben. Die Platte wurde für 24 h in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank bei konstantem CO₂-Gehalt der Luft (5 % CO₂) gelagert. Am nächsten Tag folgte das Ansetzen des Transfektionsreagenz-siRNA-Mixes in 100 μ l Endvolumen. Dazu versetzte ich 1,1 μ l Transfektionsreagenz X-Treme Gene der Firma Roche mit 23,9 μ l serumfreiem Kulturmedium (s. Anhang). Parallel dazu wurde entweder 0,75 μ l PAR1-siRNA- oder PAR4-siRNA-Lösung (finale Konzentration: 50 nM in 300 μ l Endvolumen) mit 24,25 μ l serumfreiem Kulturmedium (s. Anhang) versetzt. Zusätzlich zur jeweils separaten Transfektion mit PAR1- oder PAR4-siRNA wurden auch Versuche zur kombinierten Transfektion mit PAR1- und PAR4-siRNA durchgeführt. Dafür wurden jeweils 0,75 μ l PAR1 und PAR4 siRNA-Lösung (finale Konzentrationen: 50 nM in 300 μ l Endvolumen) mit 22,5 μ l serumfreiem Kulturmedium (Endvolumen: 50 μ l) versetzt. Die Transfektionslösung für die kombinierte Transfektion wurde in einem Gemisch aus 2,2 μ l Transfektionsreagenz X-Treme Gene und 22,8 μ l serumfreien Kulturmedium angesetzt. Nachdem sowohl die Transfektionsreagenz- als auch die siRNA-Lösung angesetzt waren, erfolgte im nächsten Schritt die Vereinigung beider Lösungen (Endvolumen: 50 μ l) durch vorsichtiges Mischen mit einer Eppendorfpipette. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, damit sich Transfektionsreagenz und siRNAs zu einem Komplex vereinigen konnten. Nach der Inkubation folgte die Zugabe des Transfektionsreagenz-siRNA-Gemisches zur Zellsuspension. Als Kontrolle diente ein Ansatz versetzt mit einer irrelevanten siRNA. Zusätzlich wurde eine irrelevante siRNA zur Kontrolle angesetzt, um eine mögliche Beeinträchtigung der Zellen durch die Transfektion selbst zu überprüfen. Die Ansätze wurden auf 300 μ l mit Kulturmedium I ergänzt und in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank bei konstantem CO₂-Gehalt der Luft (5 % CO₂) inkubiert. Nach 24 h wurden 700

µl Kulturmedium I zugefügt und der Ansatz weitere 48 h inkubiert. Nach 72 h erfolgte die Ernte der Zellen und ihre Verwendung im Hexosaminidase Release Assay.

2.8 Darstellung der Daten

Die in den Abbildungen (Abb: 1, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 21 und 25) dargestellten Daten stammen von drei unabhängigen Experimenten. Aus den Daten wurden Mittelwerte und die zugehörigen Standardabweichungen mit dem Computerprogramm Origin (s. Anhang) berechnet und die erhaltenen Werte als Kurven oder Säulendiagramme dargestellt und mit dem Computerprogramm CorelDraw (s. Anhang) bearbeitet und beschriftet. Für die Histogramme (Abb: 2-5, 20 und 22), die durchflusszytometrischen Bestimmungen der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen (Abb: 8-9, 23 und 24) und die gelelektrophoretischen Nachweise für die PAR-Expression (Abb: 1) ist jeweils ein repräsentatives von mindestens drei Experimenten aufgeführt. Die Experimente mit Primärzellen (humane Lungen- und Hautmastzellen) wurden mit Zellen verschiedener Spender durchgeführt.

2.9 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Dargestellt wurde entweder ein repräsentatives von drei Experimenten oder die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelten Mittelwerte und Standardabweichungen. Für die Inhibitionsversuche mit Thrombin wurde zusätzlich eine statistische Analyse mithilfe des Computerprogramms SPSS 8.0 (s. Anhang) und dem Wilcoxon Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde als p-Wert angegeben und sollte Werte $< 0,05$ % annehmen. Die p-Werte für meine Experimente lagen stets in diesem Bereich.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren auf humanen Mastzellen

Während Expression und Funktionalität von PAR auf murinen Mastzellen bereits gut untersucht sind, liegen bislang nur wenige Erkenntnisse für primäre humane Mastzellen vor. Diese beschränken sich im wesentlichen auf Befunde zur Expression und Funktionalität des PAR2 humaner Hautmastzellen und aus Nabelschnurblut gereifter Mastzellen. Um ein umfassendes Bild über die Ausstattung von humanen Mastzellen mit PAR zu erhalten, untersuchte ich die Expression von PAR1, 2, 3 und 4 sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene.

3.1.2 PAR mRNA-Expression in primären humanen Mastzellen der Haut und der Lunge und in LAD 2-Zellen

Die Tatsache berücksichtigend, dass Mastzellen unterschiedlicher Gewebeherkunft sich in vielen Eigenschaften unterscheiden können, führte ich die Untersuchungen zur mRNA-Expression sowohl mit primären humanen Hautmastzellen (HBMZ) als auch mit humanen Lungenmastzellen (HLMZ) durch. Zusätzlich untersuchte ich Mastzellen der Linie LAD 2. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus jeder Zellsorte isoliert und zu gleichen Mengen mittels RT-PCR in cDNA transkribiert. Mit dieser führte ich dann zunächst unter Verwendung von PAR-spezifischen Primern eine qualitative PCR durch, deren Amplifikate ich mittels Agarose-Gelelektrophorese auftrennte. Als Positivkontrollen für die Expression von PAR1 und PAR3 verwendete ich aus Jurkatzellen isolierte Gesamt-RNA, während als Kontrollen für die Expression von PAR2 und PAR4 Gesamt-RNA der Epithelzelllinie A549 bzw. der Megakaryozyten-Zelllinie MEG01 eingesetzt wurde. Wie in Abbildung 1A zu erkennen ist exprimieren sowohl Haut- und Lungenmastzellen als auch LAD 2-Zellen mRNA für PAR1, -2, -3 und PAR4. Die in der Elektrophorese erhaltenen Banden entsprachen den zu erwartende

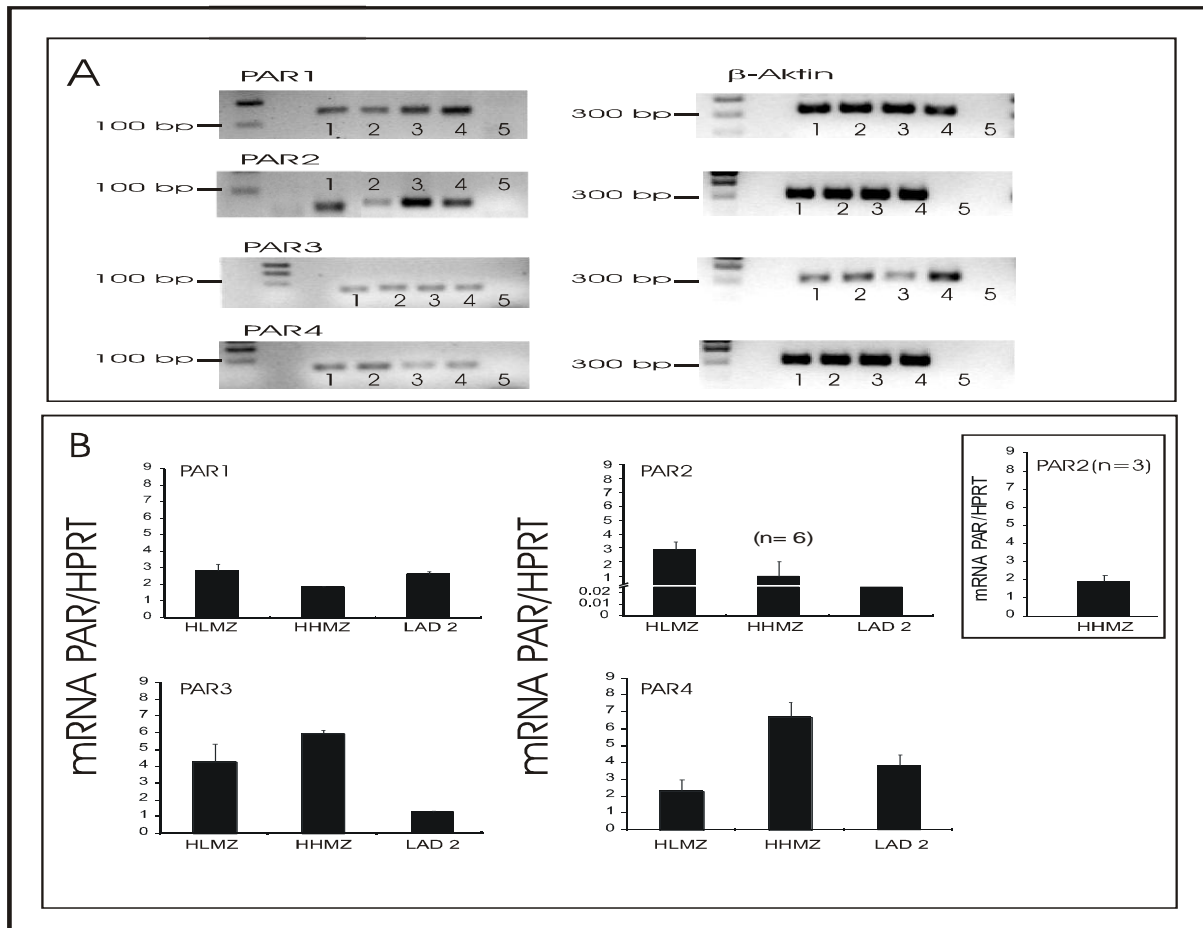


Abbildung 1: Expression von PAR1-, 2-, 3- und 4-mRNA in humanen Mastzellen der Lunge und der Haut und in Zellen der Linie LAD 2.

Gesamt-RNA aus primären humanen Lungenmastzellen (HLMZ), Hautmastzellen (HHMZ) und LAD 2-Zellen (jeweils $0,2-0,5 \times 10^6$ Zellen) wurde extrahiert, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und mittels PAR-spezifischen Primern amplifiziert.

A: Qualitative Analyse der PCR-Produkte auf mRNA-Expression für PAR1-4 und für β -Aktin (Beladungskontrolle) mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bahn 1: humane Lungenmastzellen, Bahn 2: humane Hautmastzellen, Bahn 3: LAD 2-Zellen, Bahn 4: Positivkontrollen für PAR1/PAR3 mRNA aus Jurkatzellen, für PAR2 mRNA aus A549-Zellen und für PAR4 mRNA aus MEG01-Zellen. Bahn 5: Negativkontrolle: H_2O . Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt drei Experimenten.

B: Quantitativer Nachweis der Amplifikate mit der Real-Time-PCR-Methode. Aufgetragen ist das Verhältnis der Expression der spezifischen Gene (PAR1-4) zu derjenigen von HPRT. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experiment mit Lungen- und Hautmastzellen verschiedener Spender bzw. von zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen der Linie LAD 2. Für den Nachweis von PAR2 in HHMZ wurden 6 Experimente durchgeführt (s. n=6). Diejenigen, in denen positive Signale enthalten wurden, (n=3) sind im Diagramm rechts oben wiedergegeben.

Fragmentgrößen von ca 100 bp (für PAR1 130 bp, für PAR2 70 bp, für PAR3 72bp und für PAR4 94 bp). Zur Überprüfung und Validierung dieser Ergebnisse führte ich anschließend eine quantitative Analyse der mRNA-Expression mittels der Real-Time-PCR-Methode durch. Zur Auswertung der aus diesen Experimenten gewonnenen Daten wurde der Quotient der für die jeweils spezifischen PAR-Gene und für das Haushaltsgen (HPRT) erhaltenen Fluoreszenzen ermittelt (Abb.1 B). Diese Experimente zeigten ebenfalls die Expression von mRNA für PAR1, 2, 3 und 4 sowohl in primären Lungen- und Hautmastzellen als auch in Zellen der Linie LAD 2. Deutlich zu erkennen ist in Abb. 1 B die annähernd gleich starke Expression von PAR1 in allen drei Zelltypen. Für die PAR2-Expression zeigten sich hingegen Unterschiede. So war eine deutliche Expression in Lungen- und Hautmastzellen zu erkennen, wobei für Hautmastzellen jedoch bei insgesamt 6 durchgeführten Experimenten mit Zellen verschiedener Spender drei positive und drei negative Resultate erhalten wurden (in Abb 1 B zum Vergleich als Mittel aller 6, sowie als Mittel der 3 positiven Experimente dargestellt). LAD 2-Zellen hingegen zeigten eine äußerst geringfügige PAR2-Expression. Die PAR3-mRNA Expression betreffend zeigten Lungen- und Hautmastzellen eine vergleichbar deutliche Expression, während die Expression in LAD 2-Zellen merklich geringer war. Die mRNA für PAR4 war dagegen in allen Zelltypen deutlich und zu ähnlichen Ausmaßen exprimiert. Insgesamt belegen diese Daten die mRNA-Expression aller vier PAR in primären Lungen- und Hautmastzellen wie auch in Zellen der Linie LAD 2. Damit bestätigten sie die von Moormann *et al.* (1) bereits beschriebene mRNA-Expression aller vier PAR in humanen Hautmastzellen. Als neue Befunde hingegen sind meine Ergebnisse zur mRNA-Expression von PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 in primären Lungenmastzellen und in Mastzellen der Linie LAD 2 anzusehen .

3.1.3 Nachweis der Zelloberflächenexpression von PAR auf humanen primären Lungen- und Hautmastzellen und Zellen der Linie LAD 2

Da die Nachweisbarkeit von mRNA für PAR in Mastzellen noch nichts über deren Expression als Protein in diesen Zellen aussagt, untersuchte ich in nachfolgenden Experimenten die

PAR-Proteinexpression. Hierfür markierte ich humane Lungenmastzellen, Hautmastzellen und LAD 2-Zellen mit Rezeptor-spezifischen Maus-Antikörpern gegen PAR1 und PAR2 und spezifischen Kaninchen-Antikörpern gegen PAR3 und PAR4 bzw. mit Kontrollantikörpern des jeweiligen Isotyps. Die nachfolgende Markierung mit Fluorochrom-markierten Ziege-anti-Maus- oder Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern diente der Analyse im Durchflusszytometer. Die in Abbildung 2 wiedergegebenen Histogramme zeigen die Verteilung der Fluoreszenzintensität von Mastzellen der Lunge und der Haut, sowie von LAD 2-Zellen nach Inkubation mit den oben beschriebenen Antikörpern. Wie dort zu erkennen, existieren deutliche Signale für die Oberflächenexpression des PAR1 sowohl für beide Typen von Primärzellen als auch für LAD 2-Zellen. PAR2 war dagegen weder auf humanen Lungemastzellen noch auf LAD 2-Zellen detektierbar und auch humane Hautmastzellen waren ganz überwiegend negativ für die PAR2-Expression. Nur mit einer von 10 verschiedenen Hautmastzellpräparationen erhielt ich ein deutlich positives Signal. Kein die Intensität der Isotypkontrolle übersteigendes Signal war für PAR3 erkennbar, weder für Primärzellen noch für LAD 2-Zellen. Die Expression von PAR4 konnte auf LAD 2-Zellen nicht detektiert werden (Abb. 2 C), während sie für Primärzellen variabel war. So war bei Lungenmastzellen in 3 von 6 Zellpräparationen und bei Hautmastzellen in 2 von 5 Zellpräparationen eine PAR4-Expression zu beobachten (Abb 2 A/B). Zusammengefasst konnte ich in diesen Experimenten erstmals die Zelloberflächenexpression von PAR1 und eine (variable) Expression von PAR4 auf humanen Mastzellen der Lunge und der Haut und auf LAD 2-Zellen zeigen. Nicht bestätigen konnte ich hingegen die von anderen Autoren beschriebene Oberflächenexpression von PAR2 auf Hautmastzellen und LAD 2-Zellen (1, 151). Die möglichen Gründe hierfür werden später diskutiert.

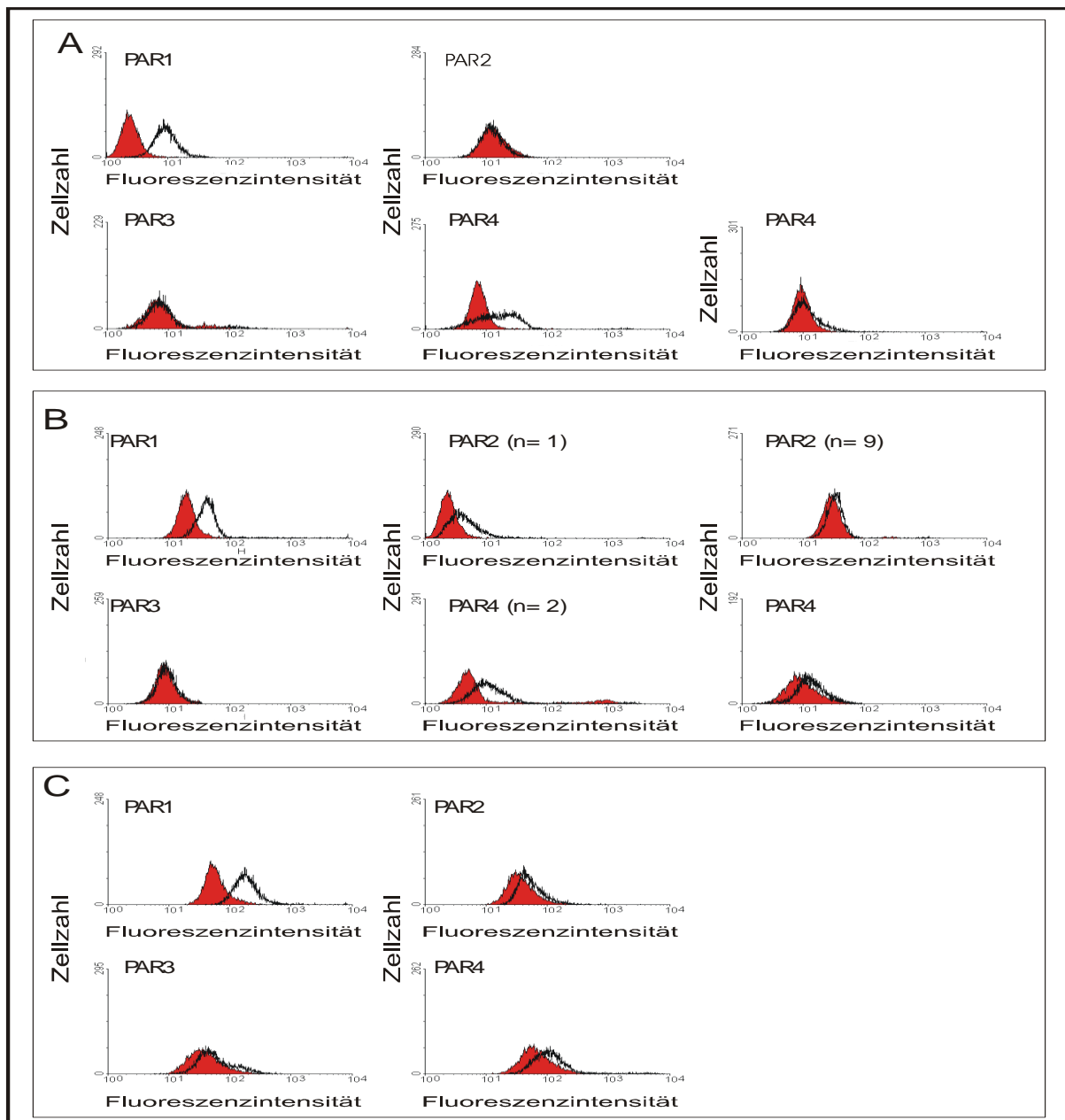


Abbildung 2: Durchflusszytometrischer Nachweis von PAR1, 2, 3 und 4 auf der Oberfläche von humanen Haut- und Lungenmastzellen und auf LAD 2-Zellen

Lungen- (A) und Hautmastzellen (B) und LAD 2-Zellen (C) wurden mit anti-PAR1- (ATAP2), anti-PAR2-, anti-PAR3- oder anti-PAR4-Antikörper (schwarze Linie) oder den entsprechenden Isotypkontrollen (rot) für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Inkubation mit DTAF- bzw. FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (Ziege- α -Maus-DTAF bzw. Ziege- α -Kaninchen-FITC) erfolgte der Nachweis mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Dargestellt ist, wenn nicht anders angegeben, jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit primären Mastzellen verschiedener Spender bzw. LAD 2-Zellen. n=1, n=2 und n=9 bezeichnet die Anzahl der durchgeführten Experimente, für die das dargestellte Histogramm repräsentativ ist.

3.1.4 Nachweis der intrazellulären Expression von PAR2 in humanen Mastzellen der Lunge und der Haut und in LAD 2-Zellen

Wie bereits oben gezeigt konnte ich in meinen Experimenten keine PAR2-Oberflächenexpression auf humanen Mastzellen detektieren, weder für Primärzellen noch für LAD2-Zellen. Für PAR2 in humanen Hautmastzellen und LAD 2-Zellen ist aber auch eine intrazelluläre Expression beschrieben worden (1, 151). Deshalb untersuchte ich in vergleichenden Experimenten, ob Lungenmastzellen diesen Rezeptor ebenfalls intrazellulär exprimieren. Dafür erfolgte vor der Markierung mit spezifischen und sekundären Antikörpern eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % Triton-X 100. Nach Permeabilisierung ließ sich durchflusszytometrisch in allen Zelltypen eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu nicht permeabilisierten Zellen nachweisen. Letztere waren entweder völlig negativ für PAR2 (Lungenmastzellen, LAD 2) oder wiesen eine sehr geringe Oberflächenexpression auf (Hautmastzellen) (s. Abb 3). Diese Daten zeigen somit als neuen Befund, dass auch in humanen Lungenmastzellen eine intrazelluläre PAR2-Expression vorliegt und bestätigen darüber hinaus die von Moormann *et al.* Und Carvalho *et al.* (1, 151) beschriebene intrazelluläre Expression von PAR2 in humanen Hautmastzellen bzw. LAD 2-Zellen.

3.1.5 Versuche zur Aufregulation der Oberflächenexpression des PAR2 durch Behandlung mit Proteinaseinhibitoren und verschiedenen Zytokinen

Die deutliche intrazelluläre Expression von PAR 2 bei gleichzeitiger Abwesenheit oder schwacher Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche lässt vermuten, dass PAR2 möglicherweise während der Mastzellkultur durch freigesetzte Mastzellproteasen (hauptsächlich Serinproteinasen wie Chymase und Trypsin) gespalten und somit der Detektion mit dem spezifischen PAR2-Antikörper entzogen wird. Um dieses zu überprüfen kultivierte ich Mastzellen in Anwesenheit von Proteinase-Inhibitoren und untersuchte anschließend ihre PAR2-Oberflächenexpression. Für diese Experimente wählte ich primäre Lungenmastzellen, da sich diese zuvor als zuverlässig negativ für die die PAR2-

Oberflächenexpression erwiesen hatten (s. Abb. 2) und somit im Falle einer Aufregulation des Rezeptors eindeutige Signale zu liefern versprochen. Kulturen von humanen Lungenmastzellen wurden alle 3 Tage mit den Serinproteinaseinhibitoren SBTI (*soy bean trypsin inhibitor*, selektiv für Kathepsin G- und Chymase), Leupeptin (selektiv für Tryptase) oder Aprotinin (selektiv für Kathepsin G) inkubiert. Nach einer einwöchigen Kultur in An- und Abwesenheit der Inhibitoren untersuchte ich die PAR2-Oberflächenexpression der Zellen mittels Durchflusszytometrie.

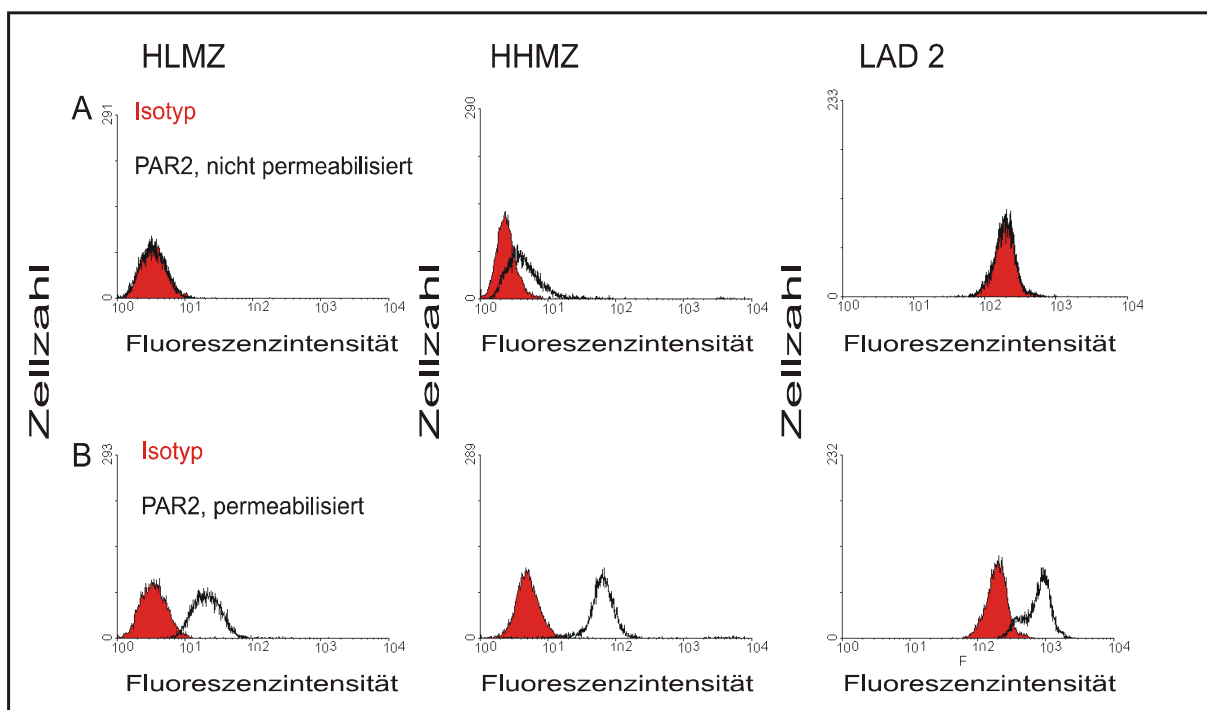


Abbildung 3: Intrazelluläre Expression von PAR2 in humanen Lungen- und Hautmastzellen und LAD 2-Zellen

Humane Lungenmastzellen (HLMZ), Hautmastzellen (HHMZ) und LAD 2-Zellen verblieben unbehandelt (**A**) oder wurden mit 0,1 % Triton-X 100 permeabilisiert (**B**) und anschließend mit anti-PAR2 -Antikörper (schwarze Linie) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (rot) für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Inkubation mit DTAF-konjugiertem Ziege- α -Maus Sekundärantikörper erfolgte die Analyse mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Primärzellen verschiedener Spender bzw. mit LAD 2-Zellen.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, bewirkte keiner der Inhibitoren eine Veränderung der PAR2-Zelloberflächenexpression gegenüber derjenigen von unbehandelten Zellen. Die Konzentrationen der Inhibitoren waren so gewählt, dass eine vollständige Inhibition der angesprochenen Mastzellproteinasen hätte gewährleistet sein müssen. Somit ist anzunehm-

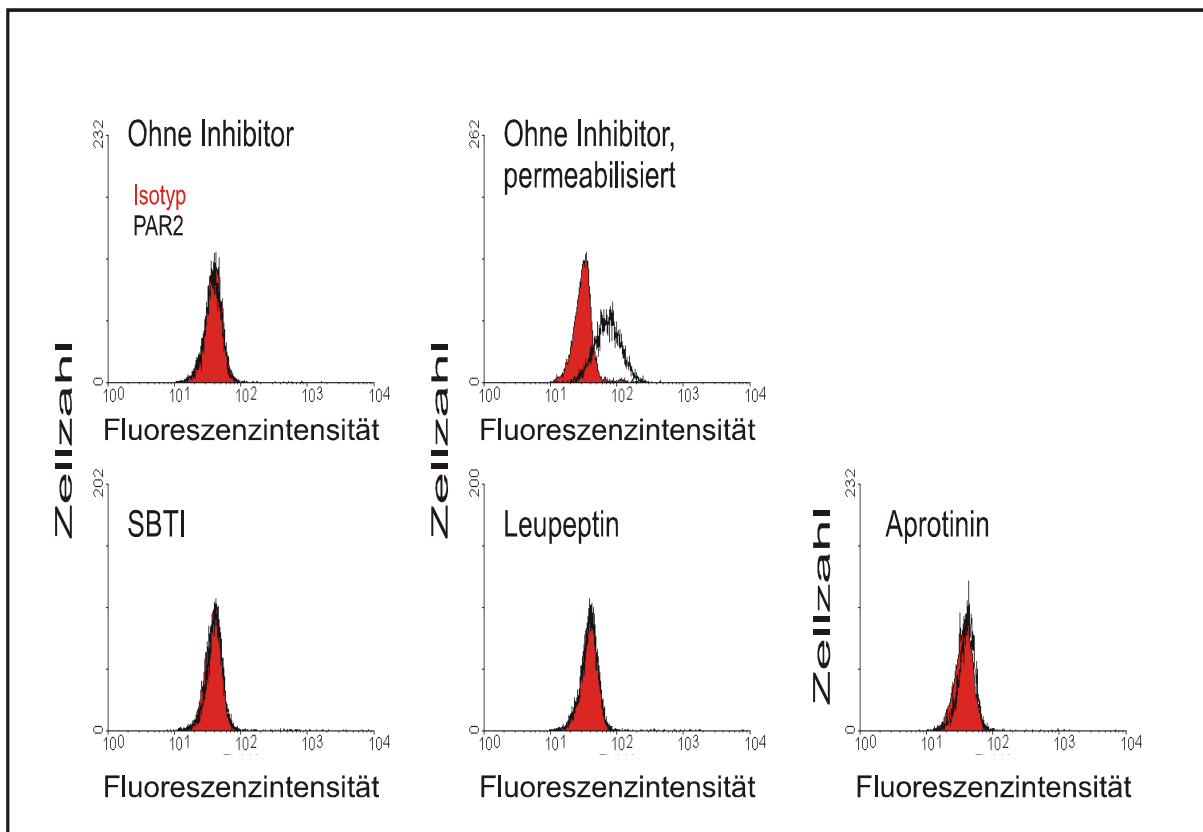


Abbildung 4: Zelloberflächenexpression von PAR2 auf humanen Lungenmastzellen nach Behandlung mit verschiedenen Proteinaseinhibitoren

Kulturen von Lungenmastzellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden alle 3 Tage mit SBTI (1 $\mu\text{g/ml}$), Leupeptin (2 $\mu\text{g/ml}$) oder Aprotinin (1 $\mu\text{g/ml}$) versetzt oder ohne Inhibitor kultiviert. Nach einer Woche in Kultur erfolgte die Bestimmung der PAR2-Oberflächenexpression mit einem spezifischen anti-PAR2 -Antikörper (schwarze Linie) im Vergleich zu einer IgG_{2a}-Isotypkontrolle (rot). Zellen wurden für 1 h auf Eis mit den Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit DTAF-konjugiertem Ziege- α -Maus Sekundärantikörper erfolgte der Nachweis mittels Durchflusszytometrie. Als positive Kontrolle ist die Reaktivität des anti-PAR2-Antikörpers mit permeabilisierten Mastzellen dargestellt. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Es ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit humanen Lungenmastzellen verschiedener Spender dargestellt.

en, dass freigesetzte Mastzell-Serinproteinasen, die den bei Weitem größten Anteil der von diesen Zellen stammenden proteolytischen Aktivität ausmachen, nicht für die mangelnde Expression des PAR2 auf der Zelloberfläche verantwortlich sind. Weiterhin untersuchte ich, ob PAR2 möglicherweise durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Zytokinen heraufreguliert werden kann. Wegen der hohen Zahl der für diese Experimente erforderlichen Zellen, führte ich diese Versuche mit LAD 2-Zellen durch. Es sind verschiedene Arbeiten bekannt, die eine Aufregulation der PAR2-Expression nach Behandlung mit den Zytokinen IL-1 β , TNF α und TGF β in z. B. humanen glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten beschreiben (152-155). Außer mit diesen Zytokinen stimulierte ich LAD 2-Zellen auch mit einigen weiteren Mediatoren (INF γ und IL-12), für die eine Aufregulation anderer PAR (PAR1 auf Monozyten, PAR1 und PAR4 in Zellen der Mastozytomlinie P815) beschrieben wurde (156, 157). Für die Stimulation der Zellen verwendete ich die in der oben zitierten Literatur als wirksam angegebenen Zytokinkonzentrationen. Nach Inkubation für 4 h und 24 h, untersuchte ich die PAR2-Oberflächenexpression im Vergleich zu nicht mit Zytokinen stimulierte LAD 2-Zellen. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, induzierte Stimulation mit keinem der Zytokine eine Veränderung der PAR2-Oberflächenexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Aufgrund dieser durchweg negativen Ergebnisse wurden keine ergänzenden Versuche mit primären Mastzellen durchgeführt.

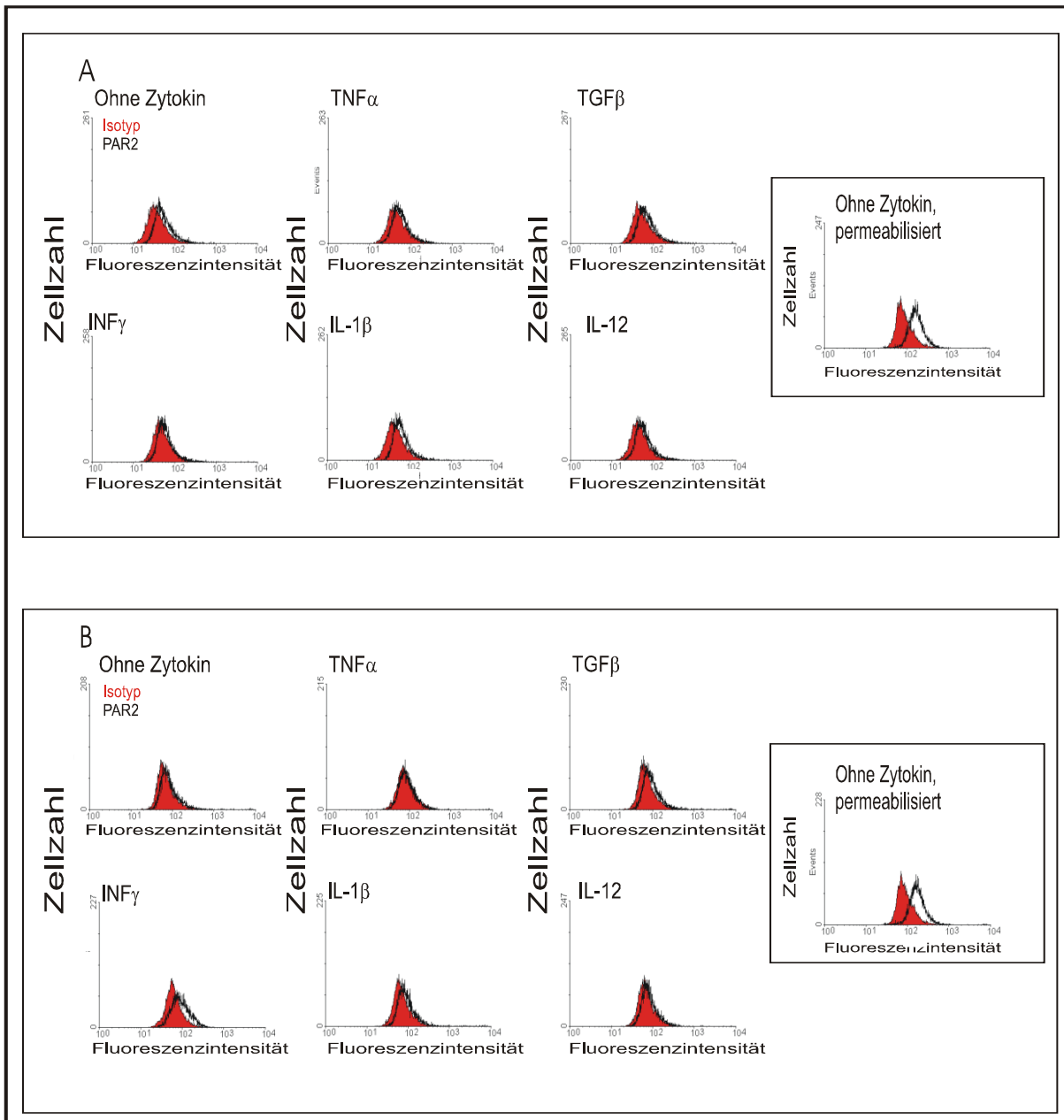


Abbildung 5: Zelloberflächenexpression von PAR2 auf LAD 2-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen

LAD 2-Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen (TNF α , TGF β , INF γ , IL-1 β und IL-12, eingesetzt zu jeweils 10 ng/ml) für 4 h (A) oder 24 h (B) stimuliert und anschließend mit anti-PAR2 -Antikörper (schwarze Linie) oder der entsprechenden Isotypkontrolle (rot) für 1 h auf Eis inkubiert. Zellen ohne Zytokinstimulation dienten als negative Kontrolle. Als Positivkontrolle ist jeweils die Reaktivität des anti-PAR2-Antikörpers mit permeabilisierten Zellen wiedergegeben. Nach Inkubation mit DTAF-konjugiertem Ziege- α -Maus Sekundärantikörper erfolgte der Nachweis mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Es ist jeweils ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten mit LAD 2-Zellen dargestellt.

3.2 Aktivierung humaner Mastzellen durch synthetische PAR-aktivierende Peptide (PAR-AP) und potentielle physiologische PAR-Liganden

Wie soeben beschrieben, exprimieren primäre humane Lungen- und Hautmastzellen zwar konstitutiv mRNA für alle PAR, die Oberflächenexpression der Rezeptoren war jedoch in einigen Fällen variabel bzw. nicht nachweisbar. Prinzipiell blieb hierbei unklar, ob die mangelnde Nachweisbarkeit der betreffenden Rezeptoren möglicherweise auf eine nicht ausreichende Sensitivität der eingesetzten Antikörperreagenzien zurückzuführen ist. Um weitere Indizien für die Expression und vor allem für die Funktionalität der PAR auf Mastzellen zu erhalten, stimulierte ich humane Mastzellen mit klassischen PAR-Liganden. Zu diesem Zweck verwendete ich sowohl natürliche (PAR-spezifische Proteinase) als auch synthetisch hergestellte PAR-Liganden (PAR-aktivierende Peptide, PAR-AP). Zunächst untersuchte ich, ob Stimulation mit PAR-AP und PAR-spezifischen Proteinase zu einer Degranulation von humanen Mastzellen führt. Zusätzlich prüfte ich die Fähigkeit dieser PAR-Liganden, die intrazelluläre Freisetzung von zytosolischen Kalziumionen (Ca^{2+}) zu induzieren.

3.2.1 Degranulation von humanen Mastzellen nach Stimulation mit PAR-aktivierenden Peptiden und PAR-spezifischen Proteinase

Zunächst untersuchte ich, ob die aktivierenden Peptide für PAR1 (PAR1-AP), PAR2 (PAR2-AP) und PAR4 (PAR4-AP) eine Degranulation in humanen Mastzellen induzieren. Da zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen kein selektives, aktivierendes Peptid für PAR3 bekannt war, konnten entsprechende Untersuchungen zur Funktionalität dieses Rezeptors nicht durchgeführt werden. Für die Versuche wurden primäre mit Myeloma-IgE beladene Haut- und Lungenmastzellen sowie beladene LAD 2-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen der oben genannten Peptide für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Degranulationsreaktivität anhand der in den zellfreien Überstand freigesetzten enzymatischen β -

Hexosaminidaseaktivität photometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, degranulierten sowohl Primärzellen als auch LAD 2-Zellen nach Stimulation mit PAR1-AP ab einer Konzentration von 10 µg/ml (Lungenmastzellen) bzw. 100 µg/ml (Hautmastzellen und LAD 2-Zellen), während annähernde Sättigung der Reaktion für alle drei Zellpopulationen bei 200 µg/ml PAR1-AP zu beobachten war. Entsprechend reagierten alle drei Zellpopulationen ab einer Schwellenkonzentration von 100 µg/ml PAR4-AP, und Sättigung wurde bei einer Konzentration von 200 µg/ml erreicht. Die Stimulation mit dem PAR2-aktivierenden Peptid führte hingegen selbst bei einer Dosis von 200 µg/ml zu keiner Degranulation in Lungenmastzellen, und in Hautmastzellen und LAD 2-Zellen zu einer sehr geringfügigen Zellantwort. Die Reaktion der zuletzt genannten Zellen war zwar nur marginal erhöht, jedoch ergab sich nach allen mit ihnen durchgeführten Experimenten eine deutlich reproduzierbare Tendenz zu einer schwachen Degranulation nach Stimulation mit dem PAR2-AP. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass humane Mastzellen funktionelle Rezeptoren für PAR1 und PAR4 exprimieren, während eine Expression für PAR2 auch auf funktioneller Ebene nicht eindeutig gezeigt werden konnte. Diese für PAR2 erhaltenen Ergebnisse weichen von den in der Literatur beschriebenen positiven Befunden zur Degranulation von humanen Haut- und Darmmastzellen durch PAR2-Aktivatoren ab (137, 158), wie später noch diskutiert werden wird. Im nächsten Schritt überprüfte ich die Wirkung verschiedener physiologische PAR-Liganden (zumeist Serinproteinasen) auf die Degranulation humaner Mastzellen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die in diesen Experimenten verwendeten Proteinasen, deren Zuordnung als Liganden bestimmter PAR-Spezifität sowie Verweise auf Literaturquellen, in denen die Spezifität der Liganden beschrieben wird. Für alle verwendeten Enzyme wurden Konzentrationsreihen erstellt, wie in Tabelle 4 wiedergegeben, und zur Stimulation von Lungen- und Hautmastzellen eingesetzt. Diese Versuche führten zu insgesamt völlig unerwarteten Ergebnissen, da auch Stimulation mit höchsten Konzentrationen der Proteinasen zu keinerlei messbarer Degranulation der Mastzellen führte. Diese für alle eingesetzten Proteinasen ausnahmslos negativen Resultate habe ich hier nicht im Zusammenhang dargestellt. Stattdessen zeigt Abb. 7 Experimente mit

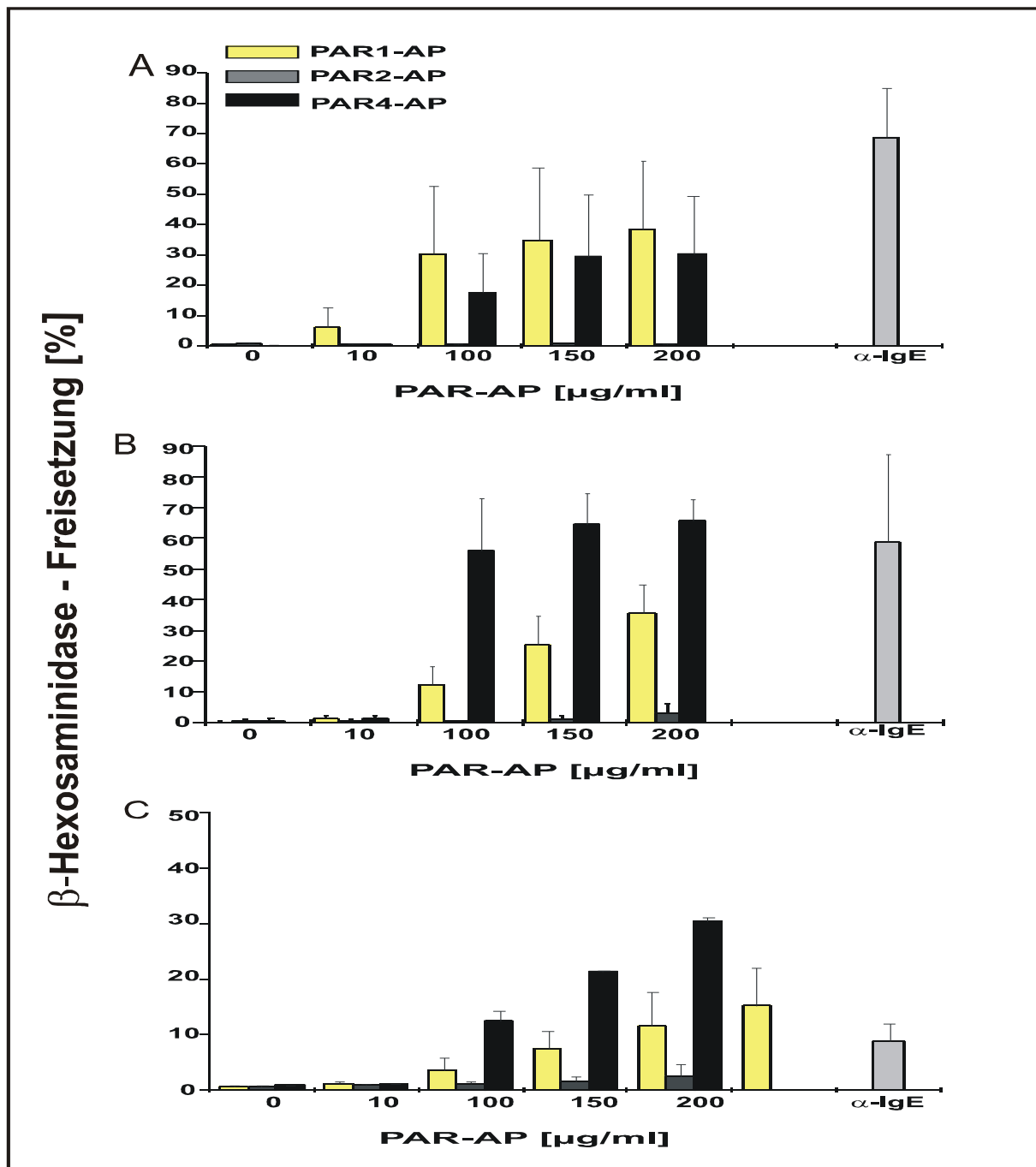


Abbildung 6: Degranulation humaner Mastzellen nach Stimulation mit PAR-aktivierenden Peptiden

Lungen- (A) und Hautmastzellen (B) und LAD 2-Zellen (C) (jeweils 5×10^5 Zellen/ml) wurden mit steigenden Konzentrationen an PAR1-, PAR2- und PAR4-AP stimuliert oder verblieben unstimuliert. Die in den zellfreien Überstand freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität wurde gemessen. Um die generelle Aktivierbarkeit der Zellen zu überprüfen, wurden Primärzellen mit 3 µg/ml und LAD 2-Zellen mit 30 µg/ml α IgE stimuliert (Positivkontrolle). Dargestellt ist die freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Primärzellen verschiedener Spender bzw. mit LAD 2-Zellen.

Proteinasekonzentrationen, die in der Literatur als wirksam für die Aktivierung von PAR beschrieben wurden (s. Tabelle 4). Wie eindeutig zu ersehen, war auch unter diesen Bedingungen weder in Haut-, noch in Lungenmastzellen eine Degranulationsreaktion zu induzieren.

Tabelle 4: PAR-spezifische Proteinase

Proteinase	Spezifität	Literaturquelle	Konzentrationsbereich¹⁾
APC	PAR1	Ref. (120)	1-1000 nM
Elastase	PAR1	Ref.(118)	0,003-0,3 U/ml
Chymase	PAR2	Ref. (117)	0,1-100 ng/ml
Faktor Xa	PAR1 / PAR2	Ref. (159, 160)	0,5-200 nM
Kathepsin G	PAR1 / PAR4	Ref.(112, 113, 115, 116)	0,4-40 nM
Metalloproteinase-1	PAR1	Ref.(161, 162)	0,2-10 nM
Plasmin	PAR1	Ref. (119)	0,1-400 nM
Thrombin	PAR1 / PAR3 / PAR4	Ref. (92, 124, 127)	$4,5 \times 10^{-5}$ -0,9 U/ml
Tryptase	PAR2	Ref. (136)	0,5-50 µg/ml
Trypsin	PAR1 / PAR2 / PAR4	Ref. (102)	0,002-5 U/ml

¹⁾ Zur Stimulation von Mastzellen in den unter 3.2.1 beschriebenen Experimenten eingesetzte Konzentrationsbereiche der Proteinase.

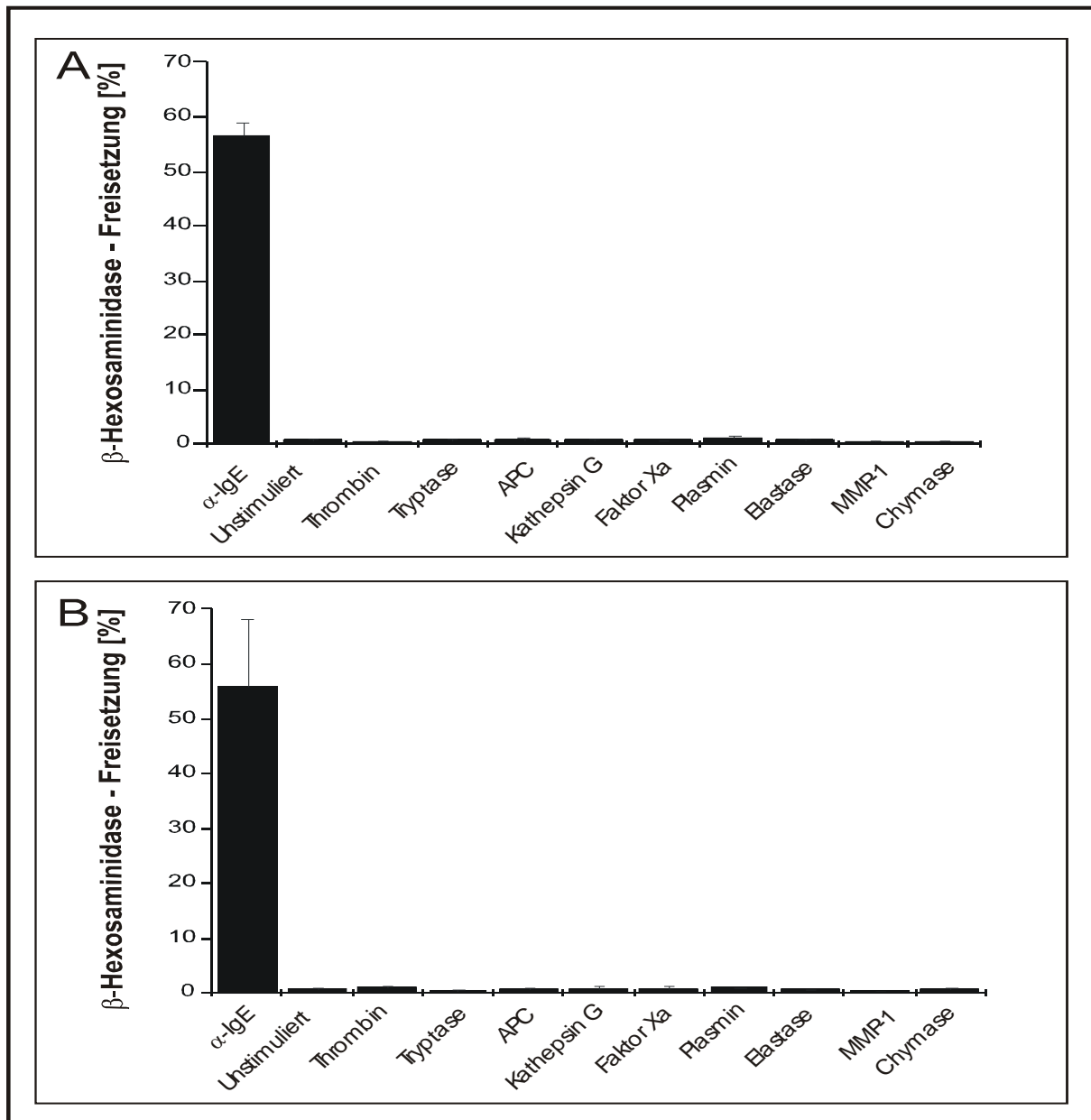


Abbildung 7: Degranulation humaner Mastzellen nach Stimulation mit PAR-spezifischen Proteinase

Lungen- **(A)**- und Hautmastzellen **(B)** (jeweils 5×10^5 Zellen/ml) wurden mit PAR-spezifischen Proteinase für 5 min stimuliert oder verblieben unstimuliert, und die in den zellfreien Überstand freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität wurde gemessen. Um die prinzipielle Aktivierbarkeit der Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen mit $3 \mu\text{g}/\alpha\text{IgE}$ stimuliert (Positivkontrolle). Eingesetzte Enzymkonzentrationen: 0,45 U/ml Thrombin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tryptase, 1 μM APC, 40 nM Kathepsin G, 50 nM Faktor Xa, 100 nM Plasmin, 0,3 U/ml Elastase, 10 nM MMP-1 und 100 ng/ml Chymase. Dargestellt ist die freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Wiedergegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender.

Abbildung 7 enthält nicht die Daten für den PAR2-Liganden Trypsin. Inkubation der Mastzellen mit Trypsin (eingesetzt zu 5 U/ml) führte zwar zum Auftreten meßbarer β -Hexosaminidaseaktivität im Überstand. Dieses Ergebnis erwies sich jedoch als Artefakt, da in Anwesenheit von Trypsin keine vollständige Sedimentation der Zellen erreicht und somit kein zellfreier Überstand zur β -Hexosaminidase-Bestimmung gewonnen werden konnte. Erst in späteren Experimenten unter Verwendung eines veränderten Zentrifugationsprotokolls (Verlängerung der Zentrifugationszeit) konnte ich nachweisen, dass auch Trypsin Mastzellen nicht zur Degranulation stimuliert (Daten nicht gezeigt). Zusammengenommen bestätigen die Degranulationsversuche mit PAR1- und PAR4-AP die Funktionalität der auf der Mastzelloberfläche exprimierten Rezeptoren PAR1 und PAR4, während für die Funktionalität des PAR2 in diesem System keine eindeutige Aussage möglich war. Als überraschender und bislang nicht beschriebener Befund stellt sich die völlige Wirkungslosigkeit aller physiologischer PAR-Liganden gegenüber humanen Mastzellen dar, obwohl insbesondere für murine Mastzellen Degranulation nach Stimulation mit verschiedenen Proteinase (z.B. Thrombin, Chymase) beschrieben worden ist (124, 127). Mögliche Gründe für diese Unterschiede werden später diskutiert.

3.2.2 Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Kalziumionen in Mastzellen nach Stimulation mit PAR-AP und PAR-spezifischen Proteinase

Nachdem sich im vorherigen Abschnitt erwiesen hatte, dass bestimmte synthetisch hergestellte PAR-Liganden (PAR-AP) nicht jedoch die getesteten natürlichen PAR-Liganden humane Mastzellen zur Degranulation stimulieren, stellte sich die Frage, ob PAR-spezifische Proteinase generell unfähig sind humane Mastzellen zu aktivieren. Um dieser Frage nachzugehen überprüfte ich, ob PAR-spezifische Proteinase in der Lage sind, die Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in Mastzellen zu induzieren. Werden Zellen über PAR aktiviert, können, wie bei anderen GPCRs auch, Kalziumkanäle in der Zellmembran und/oder im endoplasmatischen Retikulum geöffnet werden. Dieses führt

zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in den zytoplasmatischen Raum und somit zur Erhöhung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration, welche experimentell durch Verwendung von kalziumbindenden Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt werden kann. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden Mastzellen mit dem Ca^{2+} -bindenden Farbstoff Fluo-4 beladen und mit PAR-spezifischen Proteinase wie auch mit PAR-AP und zur Kontrolle mit PAR-Iso-AP (Peptide gleicher Aminosäurezusammensetzung, jedoch unterschiedlicher Sequenz) stimuliert. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen den in der Literatur als wirksam beschriebenen (1). Die Änderung der intrazellulären Fluoreszenzintensität nach Stimulation der Zellen wurde im Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 300 Sekunden registriert. Alle PAR-aktivierenden Peptide (PAR1-AP, PAR2-AP, PAR4-AP) lösten, wie in Abbildung 8 dargestellt, sowohl in humanen Primärzellen als auch in LAD 2-Zellen ein typisches Ca-Signal mit raschem Anstieg und über die Zeit abnehmender Amplitude aus, während PAR-Kontrollpeptide (PAR1-Iso-AP, PAR2-Iso-AP und PAR4-Iso-AP) in korrespondierender Konzentrationen keine Aktivierung induzierten. Diese Daten bestätigen einerseits die in den Degranulationsexperimenten erhaltenen Befunde zur Funktionalität von PAR1 und PAR4 und weisen zusätzlich daraufhin, dass alle untersuchten Mastzelltypen auch aktivierbare, funktionelle Rezeptoren des Typs PAR2 exprimieren. Wiederum überraschende Ergebnisse lieferten die Experimente zur Proteinase-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung. Die zur Stimulation eingesetzten Proteinase-Konzentrationen entsprachen auch hier den in der Literatur als wirksam beschriebenen (vgl. auch Tab. 4). Von den insgesamt zehn verschiedenen getesteten Enzymen waren nur Thrombin (Ligand für PAR1 und PAR4) und Trypsin (Ligand für PAR2) in der Lage intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen zu mobilisieren (s. Abb. 9). Somit erhärten diese Ergebnisse die zuvor mit den PAR-AP erhaltenen Daten und weisen darauf hin, dass, sowohl primäre Lungen- und Hautmastzellen als auch LAD 2-Zellen funktionelle PAR der Typen 1, 2 und 4 exprimieren. Eine Besonderheit dieser humanen Mastzellen scheint jedoch in ihrer fehlenden Degranulationsantwort gegenüber Serinproteinase zu bestehen, die im Gegensatz zur beschriebenen Reaktivität muriner Mastzellen steht (124, 127).

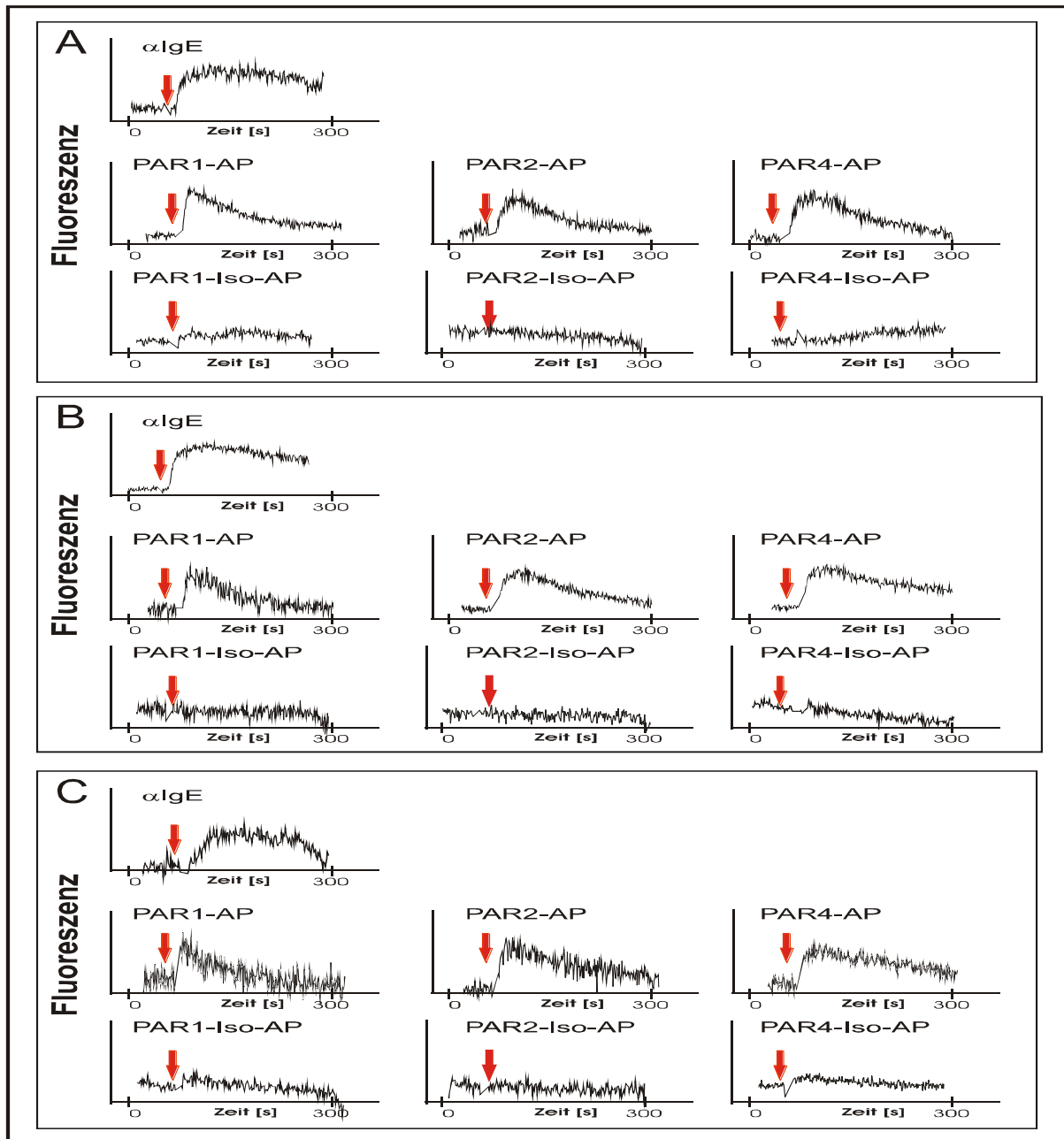


Abbildung 8: Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in Haut- und Lungenmastzellen und in LAD 2-Zellen nach Stimulation mit PAR-AP und PAR-Isoeptiden

Lungen- (A), und Hautmastzellen (B) und LAD 2-Zellen (C) wurden für 30 min mit Fluo4 beladen und die Fluoreszenz bei $\lambda = 516 \text{ nm}$ in einem Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 300 s gemessen. Nach 45-60 s Vorlaufzeit wurden die Zellen durch Zugabe von PAR-AP oder PAR-Iso-AP stimuliert. Der Zeitpunkt der Zugabe des Stimulus ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Konzentrationen: PAR1-AP/PAR1-Iso-AP 100 $\mu\text{g/ml}$, PAR2-AP/PAR2-Iso-AP 200 $\mu\text{g/ml}$, PAR4-AP/PAR4-Iso-AP 100 $\mu\text{g/ml}$. Zur Positivkontrolle wurden Primärzellen mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und LAD 2-Zellen mit 30 $\mu\text{g/ml}$ αIgE stimuliert. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender bzw mit LAD 2-Zellen.

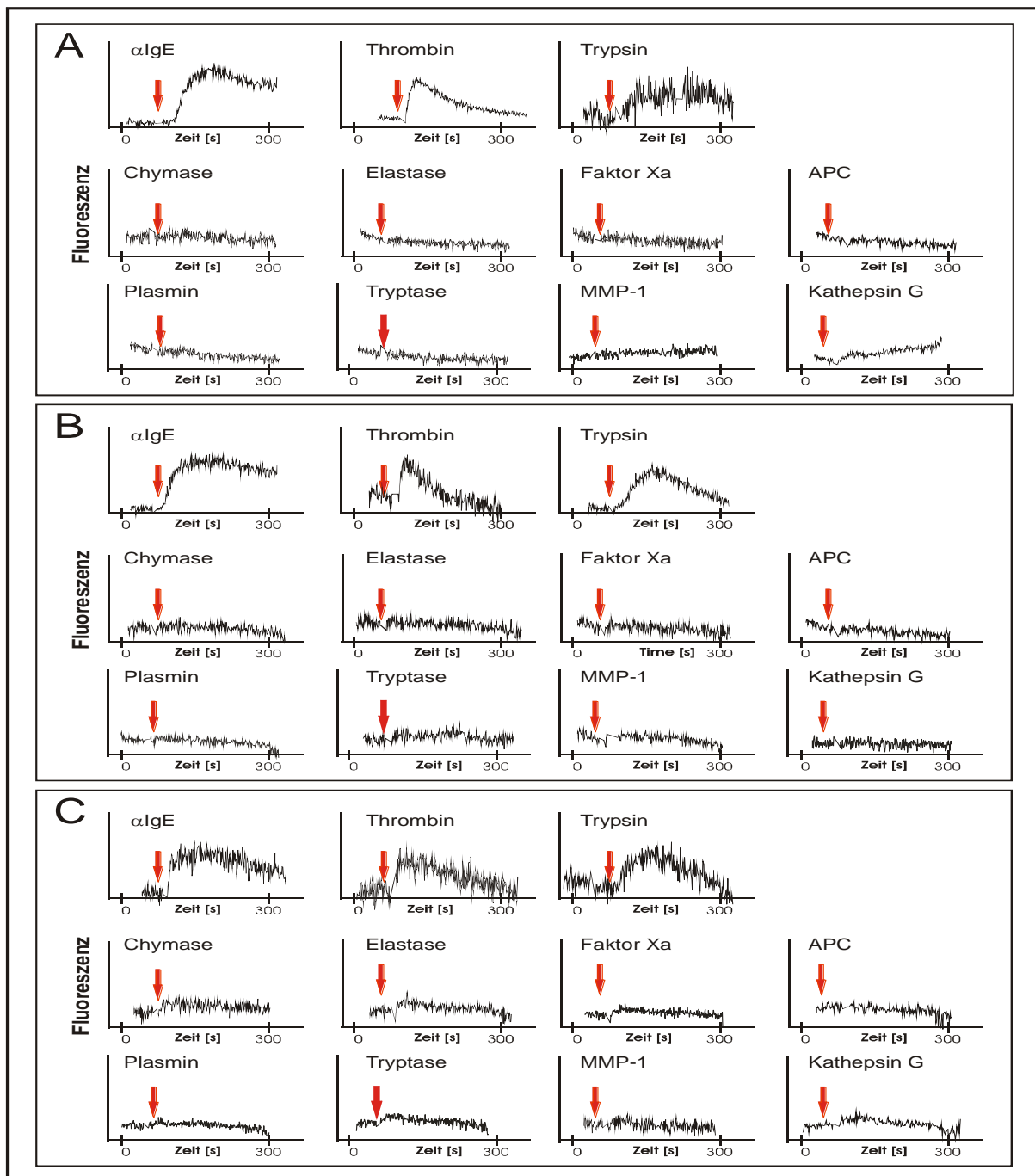


Abbildung 9: Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in Lungen- und Hautmastzellen und in LAD 2-Zellen nach Stimulation mit PAR-spezifischen Proteinase

Lungen- (A) und Hautmastzellen (B) und LAD 2-Zellen (C) wurden für 30 min mit Fluo4 beladen und die Fluoreszenz bei $\lambda=516$ nm in einem Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 300 s gemessen. Nach 45-60 s Vorlaufzeit wurden die Zellen durch Zugabe von Proteinase zu folgenden Konzentrationen stimuliert: 0,45 U/ml Thrombin, 5 $\mu\text{g/ml}$ Tryptase, 1 μM APC, 40 nM Kathepsin G, 50 nM Faktor Xa, 100 nM Plasmin, 0,3 U/ml Elastase, 10 nM MMP-1 und 100 ng/ml Chymase. Dargestellt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender bzw. mit LAD 2-Zellen.

3.3 Regulation der Fc ϵ RI-induzierten Degranulation von Mastzellen durch die Proteinase Thrombin

Im vorangegangenen Abschnitt hatte sich gezeigt, dass Thrombin keine Degranulation in humanen Mastzellen bewirkt, obwohl eine solche Aktivierung durch Thrombin in murinen Mastzellen mehrfach beschrieben wurde (124, 127). Da jedoch Thrombin in meinen Versuchen in der Lage war ein deutliches Ca-Signal in humanen Mastzellen auszulösen, was für die Funktionalität der adressierten Rezeptoren sprach, stellte sich die Frage, ob Thrombin möglicherweise kostimulatorische Effekte auf Mastzellenfunktionen besitzt. Als einfaches und naheliegendes System zur Untersuchung einer solch kostimulatorischen Funktion wählte ich die über den Fc ϵ RI-induzierte Mastzelldegranulation, die sowohl über Quervernetzung des Rezeptors durch Allergene als auch experimentell durch dessen Quervernetzung über α IgE-Antikörper induziert werden kann. Im Rahmen dieser Experimente wurde zunächst der Einfluss von Thrombin auf die Degranulation humaner Mastzellen, induziert durch ansteigenden Konzentrationen an α IgE-Antikörpern, untersucht. Weiterhin wurden Zeit- und Konzentrationskinetiken zur Thrombinwirkung durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für weitere Untersuchungen zu bestimmen. Zusätzlich wurden auch andere PAR-spezifische Proteinase hinsichtlich ihres kostimulatorischen Einflusses auf die α IgE-induzierte Degranulation überprüft.

3.3.1 Thrombin inhibiert die Fc ϵ RI-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen

Um einen möglichen Effekt von Thrombin auf die durch Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation zu untersuchen, wurden humane, mit Myloma-IgE-beladene Mastzellen mit 0,45 U/ml Thrombin (einer im Ca²⁺-Ionen-Release-Assay aktiven Konzentration des Enzyms, s.o) vorinkubiert, anschließend mit steigenden Konzentrationen an α IgE-Antikörpern stimuliert und das Ausmaß der Degranulation dann im Hexosaminidase-Release-Assay bestimmt. In diesen Experimenten wählte ich eine 5-minütige Vorinkubationszeit für Thrombin, da das durch

dieses Enzym in Mastzellen induzierte Ca-Signal, wie in Abb. 9 zu erkennen, unmittelbar nach dem raschen Anstieg innerhalb von Sekunden bereits über einen Zeitraum von 5 min wieder drastisch abnahm. Zur Kontrolle wurden Ansätze mit der entsprechenden Menge an Puffer allein versetzt und anschließend mit α IgE-Antikörpern stimuliert. Zu meiner Überraschung stellte sich heraus, dass Thrombin, nicht wie erwartet eine kostimulatorische Wirkung, sondern im Gegenteil einen drastisch inhibierenden Einfluss auf die α IgE-vermittelte Mastzelldegranulation ausübte. Dies war sowohl bei humanen Primärzellen als auch bei LAD 2-Zellen zu beobachten, wie in einem repräsentativen Experiment in Abbildung 10 dargestellt. Diese Inhibition war für alle Zelltypen über den gesamten hier eingesetzten Konzentrationsbereich der α IgE-Antikörpern (0,03-3 μ g/ml) zu erkennen und lag für Lungen- und Hautmastzellen im dargestellten Experiment je nach Antikörperdosis zwischen ca 60% und 90% und für LAD 2-Zellen zwischen ca 32 % und 78 %. Zur Präzisierung dieser Resultate sind in Abb. 11 sämtliche Experimente (22 mit Lungenmastzellen, 11 mit Hautmastzellen, 6 mit LAD 2-Zellen) zur Thrombin-vermittelten Inhibition zusammengefasst und signifikante Unterschiede nach Stimulation mit 3 μ g/ml α IgE-Antikörper (Haut- und Lungenmastzellen) bzw. 30 μ g/ml α IgE- Antikörper (LAD 2-Zellen) angegeben. Wie aus Abb. 11 zu ersehen ist, zeigen sowohl Primärzellen als auch LAD 2-Zell statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in ihrer Degranulationsreaktion zwischen thrombinbehandelten und unbehandelten Zellen. Die durchschnittliche Inhibition lag für Lungenmastzellen bei $70,3 \% \pm 23,9 \%$, für Hautmastzellen bei $50,1 \% \pm 31,3 \%$ und für LAD 2-Zellen bei $55,3 \% \pm 14,7 \%$. Da in diesen Versuchen keine vollständige (100 %ige) Inhibition durch die gewählte Thrombinkonzentration bzw. durch die Vorinkubationszeit zu beobachten war, prüfte ich im nächsten Ansatz welchen Einfluss eine Veränderung der Thrombinkonzentration oder der Vorinkubationszeit auf die Thrombin-induzierte Inhibition haben. Dazu erfolgte zunächst die Vorinkubation von humanen Lungenmastzellen mit steigenden Thrombinkonzentrationen und anschließender Stimulation mit 3 μ g/ml α IgE-Antikörpern. Wie Abb. 12 A zeigt, ist Inhibition der Mastzelldegranulation ab einer

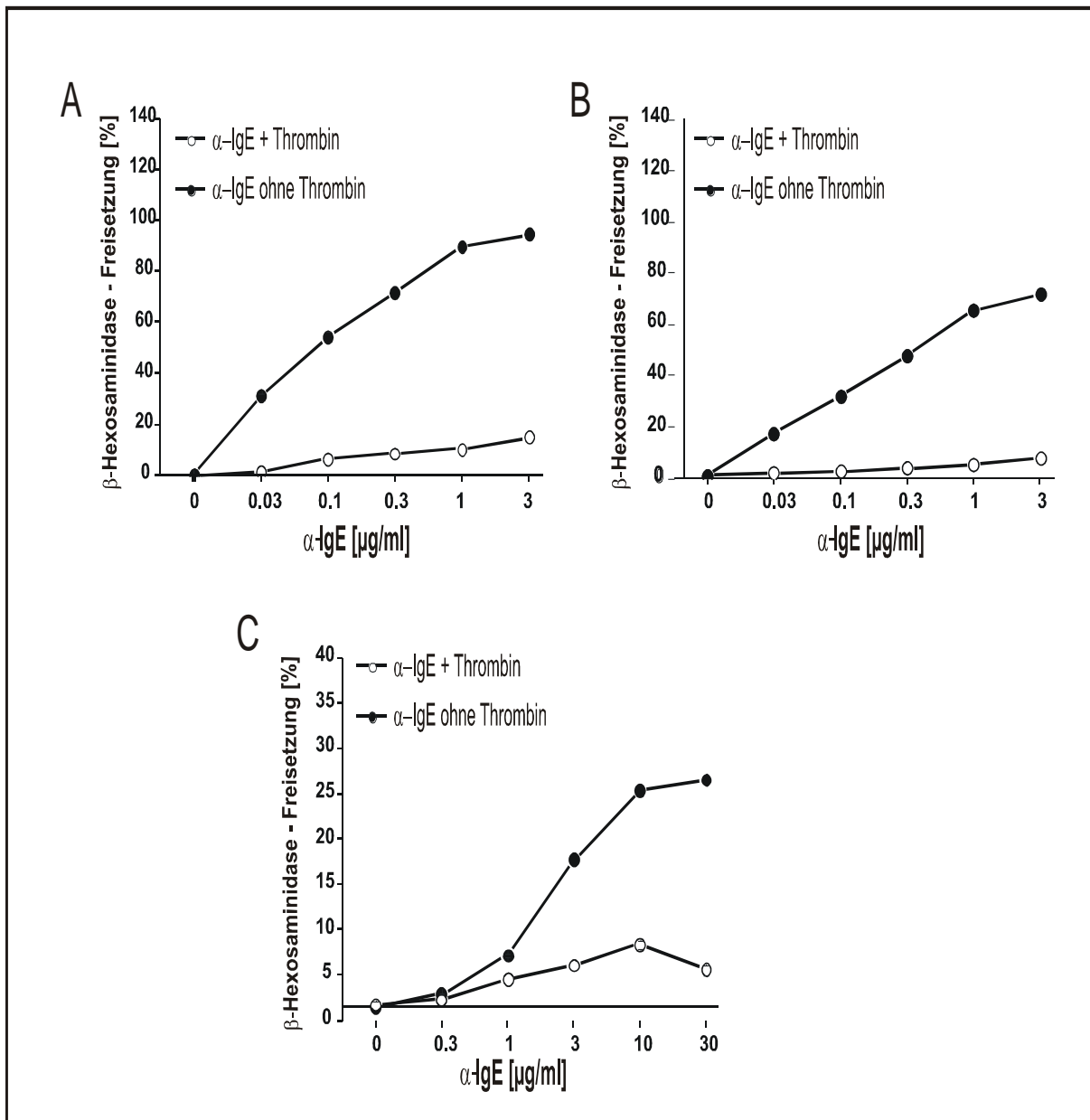


Abbildung 10: Einfluss von Thrombin auf die durch α IgE-Antikörper-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen

Lungen- und Hautmastzellen und LAD 2-Zellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen an α IgE für 30 min stimuliert. Als Kontrollen dienten entsprechende Versuchsansätze versetzt mit Puffer und α IgE. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität im zellfreien Überstand. Dargestellt ist die freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zellysaten. Es ist jeweils eines von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender bzw. mit LAD 2-Zellen abgebildet.

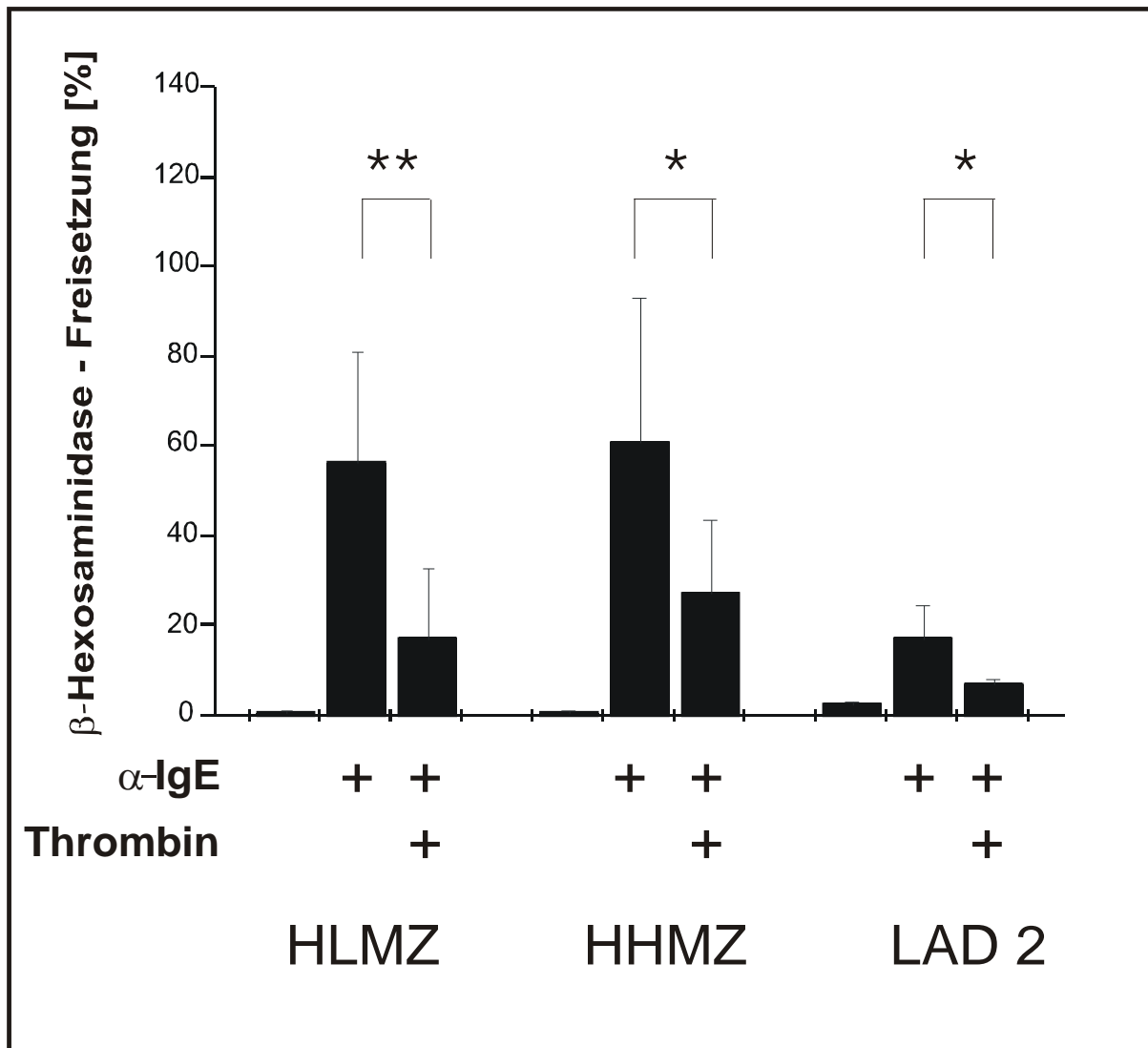


Abbildung 11: Inhibition der α IgE-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen durch Thrombin

Lungen (HLMZ)- und Hautmastzellen (HHMZ) und LAD 2-Zellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 3 μ g/ml α IgE für 30 min stimuliert. Dargestellt ist die β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %) bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 22 Experimenten mit Lungenmastzellen und 11 Experimenten mit Hautmastzellen verschiedener Spender sowie von 6 unabhängigen Experimenten mit LAD2-Zellen. ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,05$ weisen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Reaktivität thrombinbehandelter und unbehandelten Zellen hin.

Thrombinkonzentration von 0,0045 U/ml zu verzeichnen, welche sich durch Erhöhung der Enzymkonzentration noch weiter steigern lässt und eine Sättigung (ca. 80% Inhibition) bei 0,45 U/ml Thrombin erreicht. Diese Konzentration liegt innerhalb des physiologischen Konzentrationsbereich des Thrombins (0,02-1 U) (163). Die Abhängigkeit der Inhibition von der Vorinkubationszeit mit Thrombin ist in Abb 12 B dargestellt. Hier wurden Lungenmastzellen für verschieden lange Zeiträume mit 0,45 U/ml vorinkubiert, bzw. zum gleichen Zeitpunkt mit Thrombin und α IgE stimuliert. Ein weiterer Ansatz, in dem Thrombin 30 min nach der Stimulation für 5 min hinzugefügt diente als Kontrolle um zu überprüfen, ob Thrombin möglicherweise sekundär die enzymatische Aktivität der freigesetzten β -Hexosaminidase beeinflusst. Wie in Abb 12 B zu erkennen, genügt bereits eine 10- bis 5-minütige Vorinkubation der Zellen, um maximale Inhibition (ca. 80%) zu induzieren. Auch nach 30-minütiger Vorinkubation tritt noch eine durchaus relevante Inhibition (ca. 60%) auf, während der Effekt nach 60 min deutlich verringert ist (ca. 30% Inhibition). Eine vergleichbar schwache Inhibition (ca. 20%) tritt bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Thrombin und α IgE-Antikörpern auf, während eine nachträgliche Zugabe von Thrombin nach 30 min keine Inhibition zur Folge hat. Durch den zuletzt genannten Befund kann ausgeschlossen werden, dass Thrombin über Inaktivierung der freigesetzten β -Hexosaminidase wirkt und somit die Inhibition der Degranulation lediglich simuliert wird. Diese Ergebnisse machen insgesamt deutlich, dass Thrombin als negativer Regulator der Degranulation zwar nur eine sehr kurzfristige Exposition gegenüber den Mastzellen benötigt, diese Exposition aber essentiell vor Initiation der Mastzellstimulation erfolgen muss. Andererseits scheint das Zeitfenster für die Wirkung so bemessen, dass auch nach längerer Thrombinexposition (ca. 1 h) noch ein die Zellreaktivität messbar modulierender Einfluss besteht.

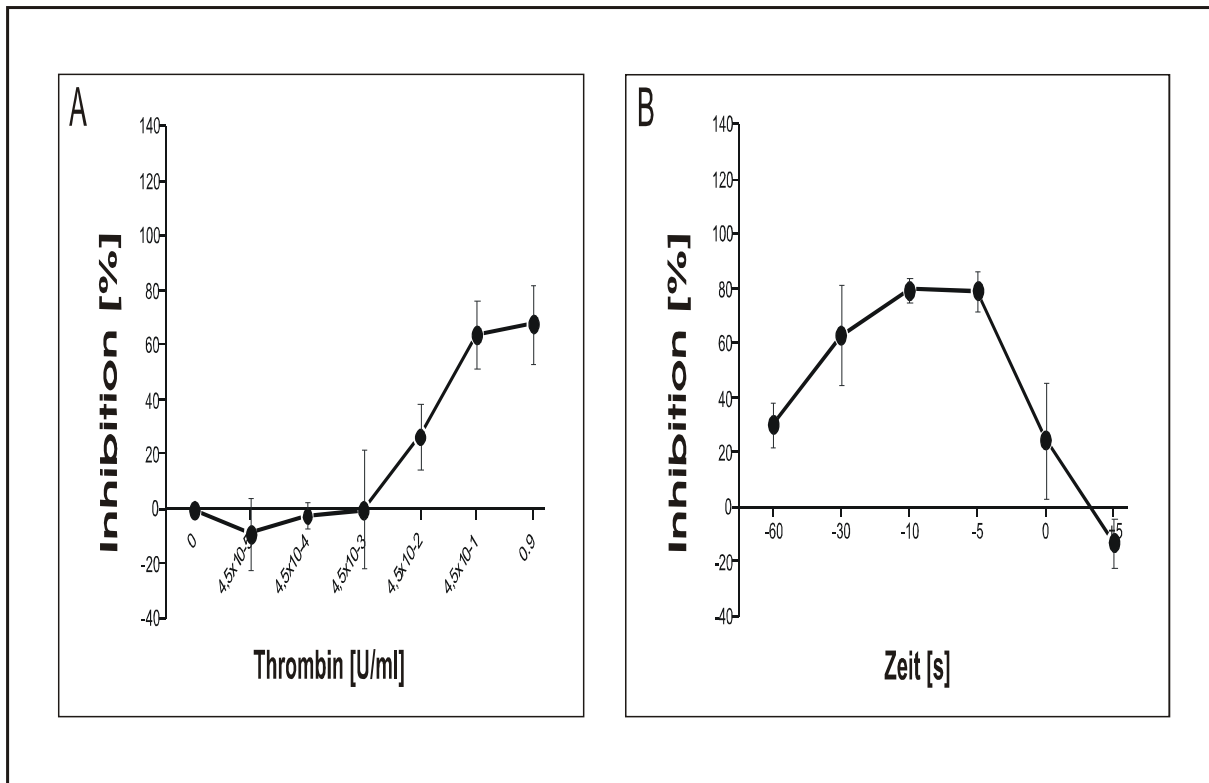


Abbildung 12: Einfluss von Enzymkonzentration und Vorinkubationszeit auf die durch Thrombin-vermittelte Inhibition der α IgE-induzierten Degranulation humaner Lungenmastzellen

A: Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienen entsprechende Versuchsansätze ohne Thrombin, versetzt mit Puffer und $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE.

B: Lungenmastzellen wurden mit $0,45 \text{ U/ml}$ Thrombin für unterschiedliche Zeitpunkte vorinkubiert und anschließend mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE stimuliert. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im zellfreien Überstand. Die Inhibition der β -Hexosaminidase-Freisetzung durch Thrombin ist dargestellt als prozentuale Reduktion der in Abwesenheit von Thrombin freigesetzten β -Hexosaminidaseaktivität (=100) % bestimmt aus mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE allein stimulierten Vergleichszellen. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender.

3.3.2 Vergleich der Wirkung von bovinem und humanem Thrombin auf die Fc ϵ RI-induzierte Degranulation

Da für alle bisherigen Versuche aus Kostengründen bovines Thrombin verwendet wurde, musste noch ein wichtiges Kontrollexperiment zur Überprüfung der Wirksamkeit von Thrombin humanen Ursprungs durchgeführt werden. Dazu versetzte ich humane Lungenmastzellen für 5 min mit gleichen Konzentrationen an bovinem und humanem Thrombin und stimulierte die Zellen anschließend mit steigenden Konzentrationen an α IgE-Antikörpern. Aus Abbildung 13 ersieht man an einem repräsentativem Experiment, dass beide Präparationen die Degranulation von humanen Lungenmastzellen in gleichem Maße inhibieren. Dieses Experiment war in zwei weiteren Versuchen reproduzierbar. Somit konnten auch die nachfolgenden Experimente weiterhin mit bovinem Thrombin durchgeführt werden.

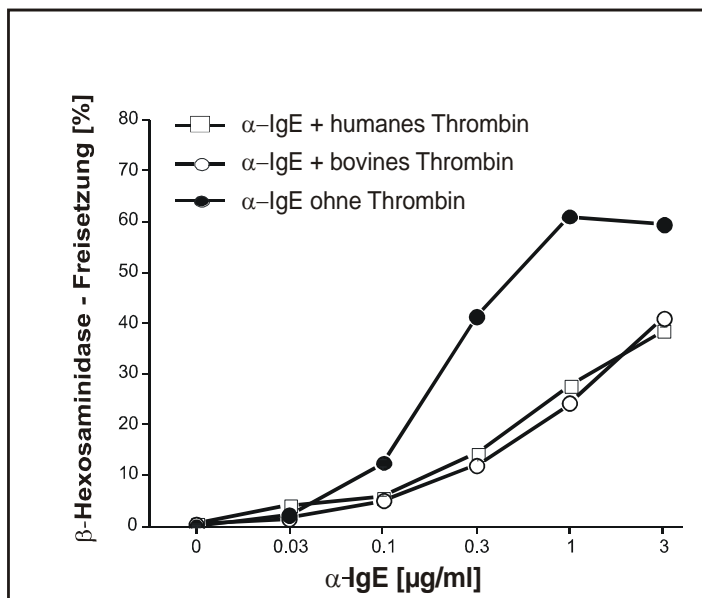


Abbildung 13: Vergleich der inhibitorischen Effekte von bovinem und humanem Thrombin auf die α IgE-induzierte Degranulation humaner Lungenmastzellen

Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml an bovinem oder humanem Thrombin oder ohne Enzym für 5 min vorinkubiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen an α IgE für 30 min stimuliert. Bestimmt wurde die

freigesetzte β -Hexosaminidase im Überstand. Dargestellt ist die β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Es ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender abgebildet.

3.3.3 Einfluss anderer PAR-spezifischer Proteinasen auf die Fc ϵ RI-induzierte Degranulation von humanen Mastzellen

Nachdem sich Thrombin als effektiver Inhibitor der über Fc ϵ RI vermittelten Degranulationsreaktion erwiesen hatte, stellte sich die Frage, ob diese Art der Inhibition spezifisch nur für Thrombin ist, oder ob auch andere PAR-spezifische Proteinasen einen solchen Effekt ausüben können. Zur Beantwortung dieser Frage verwendete ich in den nachfolgend beschriebenen Experimenten insgesamt acht verschiedene Proteinase, die in der Literatur bereits als PAR-Liganden beschrieben worden sind (Chymase, Elastase, Faktor Xa, Plasmin, Tryptase, MMP-1, APC und Kathepsin G, s. auch Tab. 4). Um deren Einfluss auf die durch α IgE induzierte Degranulation zu untersuchen, wurden Lungenmastzellen ohne oder mit steigenden Konzentrationen der Proteinase für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 3 μ g/ml α IgE-Antikörpern stimuliert. Zum Vergleich wurden jeweils mit 0,45 U/ml Thrombin vorinkubierte Zellen mitgeführt. Die in Abbildung 14 wiedergegebenen Daten zeigen deutlich, dass von den acht eingesetzten Enzymen sieben keinerlei Kapazität zur Inhibition oder auch anderweitigen Modulation der durch α IgE-Antikörper-induzierten Mastzelldegranulation besaßen, während für das Kontrollenzym Thrombin in allen Fällen eine deutliche Inhibition zu beobachten war. Nur für Kathepsin G erhielt ich variable Ergebnisse, d.h. von insgesamt 4 Experimenten ergab sich in zweien keinerlei Einfluss auf die Degranulation, während in zwei weiteren Experimente eine moderate Inhibition (ca. 40%) der Degranulation durch 40 nM (höchste eingesetzte Konzentration) der Proteinase zu beobachten war. Aus den im Abschnitt 3.2.1 erwähnten experimentellen Gründen (Probleme bei der Gewinnung von zellfreiem Überstand) konnte ich aussagefähige Inhibitionsversuche mit Trypsin erst gegen Ende meiner Arbeit durchführen. Bei diesen ebenfalls mit Lungenmastzellen durchgeführten Experimenten erwies sich Trypsin in der Tat als effizienter Inhibitor der Degranulation. Wie Abbildung 15 zeigt, ist seine Effizienz durchaus vergleichbar mit derjenigen von Thrombin (ca. 65% Inhibition mit beiden Enzymen). Diese wird jedoch erst bei einer im Vergleich zum Thrombin ca- 10-fach höheren Enzymkonzentration 5 U/ml erreicht. Somit bleibt insgesamt festzuhalten, dass außer Thrombin auch die

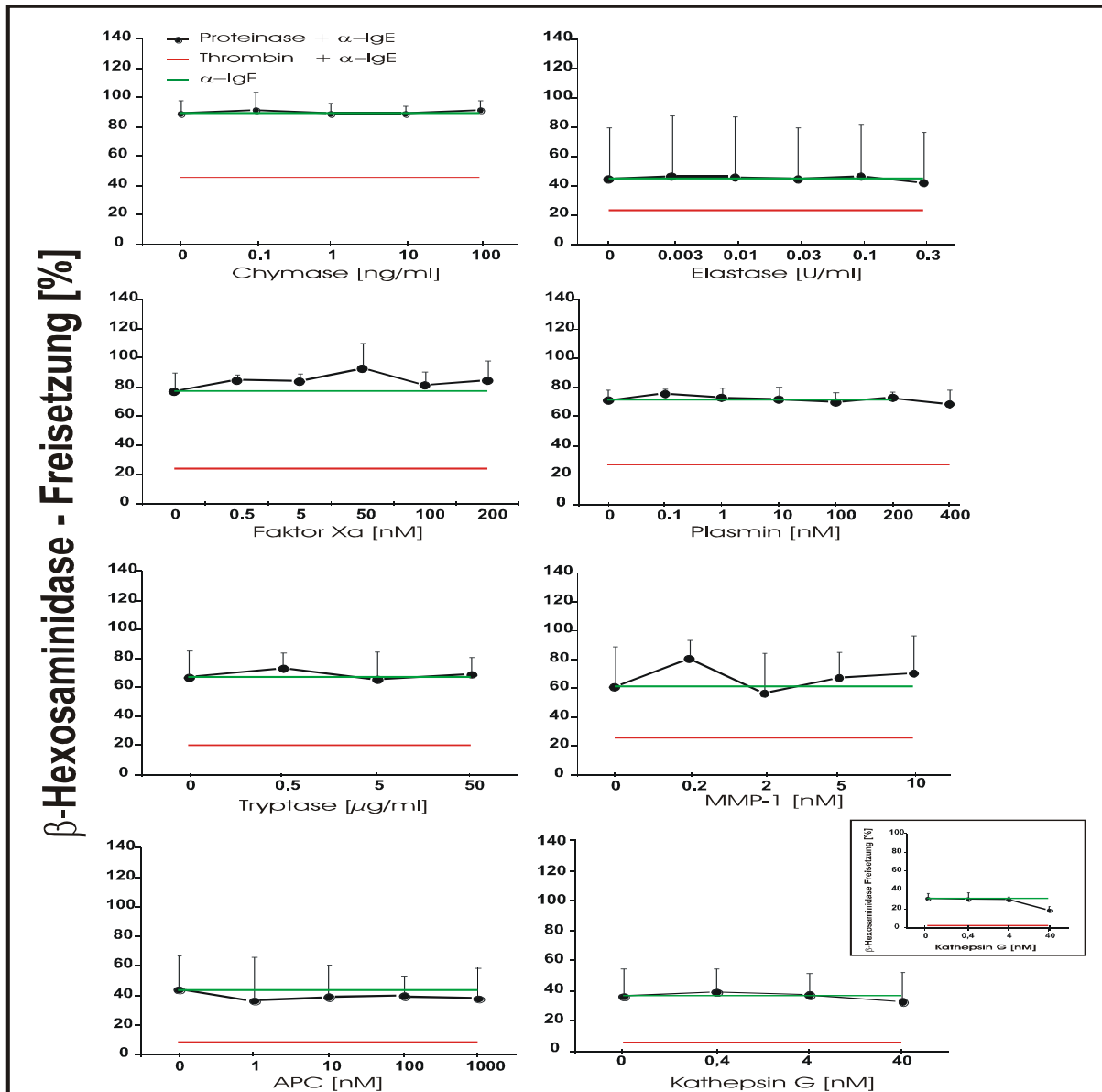


Abbildung 14: Einfluss verschiedener PAR-spezifischer Proteinase auf die α IgE-induzierte Degranulation humaner Mastzellen

Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit steigenden Konzentrationen der angegebenen Proteinase (gefüllte Kreise) oder mit den entsprechenden Mengen an Puffer für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 3 μ g/ml α IgE für 30 min stimuliert. Zum Vergleich dienten mit 0,45 U/ml Thrombin (rote Linie) vorinkubierte Zellen. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im zellfreien Überstand. Dargestellt ist die β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zellysaten. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender. Von insgesamt vier mit Kathepsin G durchgeführten Experimenten sind diejenigen (zwei) mit positiven Resultaten nochmals separat dargestellt (s. Kasten).

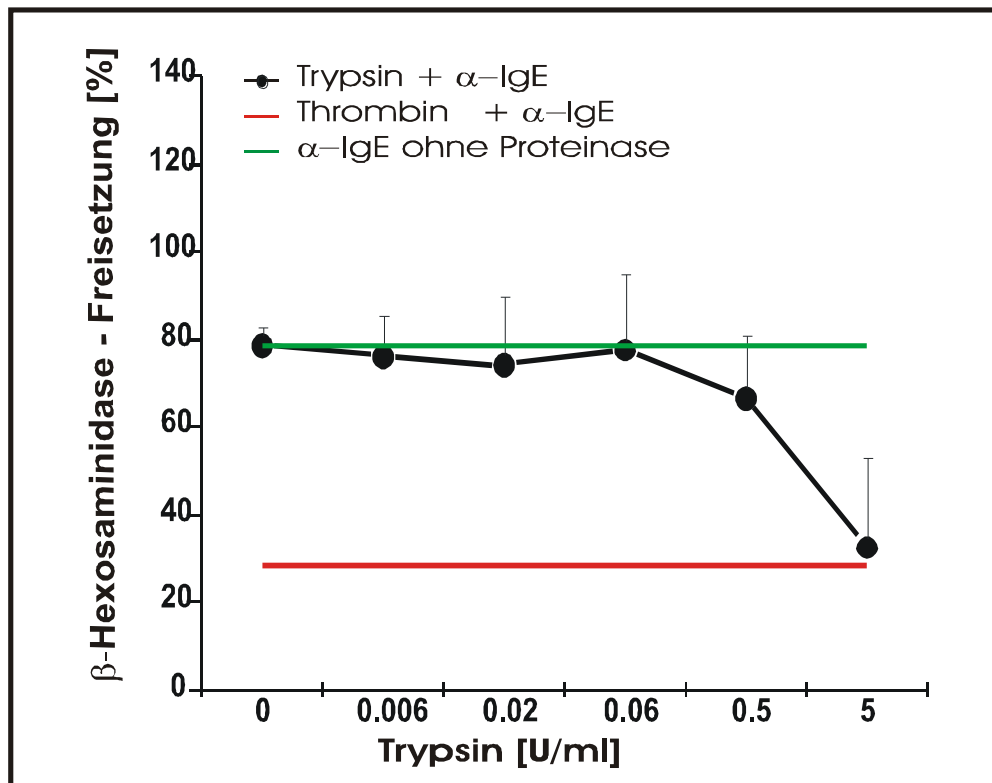


Abbildung 15: Einfluss von Trypsin auf die α IgE-induzierte Degranulation humaner Lungenmastzellen

Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit steigenden Konzentrationen an Trypsin (gefüllte Kreise) oder der entsprechenden Menge an Puffer (grüne Linie) für 5 min vorinkubiert und anschließend mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE für 30 min stimuliert. Zum Vergleich dienten mit $0,45 \text{ U/ml}$ Thrombin (rote Linie) vorinkubierte Zellen. Dargestellt ist die β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit $0,05 \%$ Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender abgebildet.

Serinproteinasen Kathepsin G und Trypsin eine gewisse Kapazität zur Modulation der $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -vermittelten Mastzelldegranulation besitzen, dem Thrombin an Effizienz (Kathepsin G) bzw. Potenz (Trypsin) jedoch nicht gleichkommen. Auch aus diesem Grund konzentrierte ich mich im weiteren Verlauf meiner Arbeit auf die funktionelle Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung von Thrombin auf die Mastzelldegranulation.

3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der durch Thrombin vermittelten Inhibition der Mastzelldegranulation

Die im vorangegangenen Abschnitt erhaltenen Hinweise auf eine mögliche Funktion von Thrombin als potentem negativen Regulator der Mastzelldegranulation warf verschiedene Fragen zum zugrundeliegenden Mechanismus auf. Es ist bekannt, dass Degranulation in Mastzellen auch durch Fc ϵ RI-unabhängige Mechanismen induziert werden kann, wie z.B. durch Stimulation mit antimikrobiellen Peptiden oder Neuropeptiden (60, 61). Deshalb führte ich zunächst Experimente zur näheren Charakterisierung der inhibitorischen Wirkungsbreite des Thrombins durch, in denen ich überprüfte, ob Thrombin auch die durch das Neuropeptid Substanz P (SubP) oder das antimikrobielle Peptid LL 37 induzierte Mastzelldegranulation zu modulieren vermag. Diese Versuche sollten auch Aufschluss darüber geben, ob der Wirkung des Thrombins eine generelle Blockierung des zellulären Degranulations-mechanismus zugrunde liegt, oder ob es sich um einen mehr selektiven Einfluss auf die vom jeweiligen Stimulus induzierten Signale handelt. Weitere Untersuchungen zum Inhibitionsmechanismus, u.a. zur Bedeutung der enzymatischen Aktivität des Thrombins, sowie zum Beitrag und der Interaktionsweise von PAR werden im Anschluss dargestellt.

3.4.1 Wirkung von Thrombin auf die durch Substanz P und LL 37 induzierten Degranulation humaner Mastzellen

Um zu überprüfen, ob sich die Thrombin-vermittelte Inhibition der Mastzelldegranulation auch auf unabhängig vom Fc ϵ RI agierende Mediatoren erstreckt, untersuchte ich die Wirkung einer Vorinkubation mit Thrombin auf die durch das Neuropeptid Substanz P und das antimikrobielle Peptid LL 37 induzierte Degranulation. Dazu wurden humane Lungen- und Hautmastzellen sowie LAD 2-Zellen 5 min mit Thrombin vorinkubiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen an LL 37 oder Substanz P stimuliert. Abbildung 16 zeigt, dass weder die durch Substanz P noch die durch LL 37 induzierte Degranulation humaner Primärzellen und LAD 2-Zellen durch Thrombin moduliert wurde, d.h. in allen durchgeführten

Experimenten traten keinerlei Unterschiede zwischen den mit Thrombin vorinkubierten und den nicht vorinkubierten Ansätzen auf. Hingegen bewirkte Vorinkubation mit Thrombin bei Stimulation mit α IgE-Antikörpern eine deutliche Inhibition. Diese Daten zeigen, dass die Thrombin-vermittelte Inhibition der Mastzelldegranulation kein generell die zelluläre Degranulationreaktion betreffender Effekt ist, sondern im Rahmen der hier untersuchten Stimuli eine Selektivität für die vom Fc ϵ RI-ausgehenden Signale aufweist.

3.4.2 Bedeutung der enzymatischen Aktivität und der Interaktion mit Integrinen für die Thrombin-vermittelte Inhibition der Fc ϵ RI-induzierten Mastzelldegranulation

Thrombin ist als ein Protein beschrieben worden, das zelluläre Effekte nicht nur mittels seiner enzymatischen Aktivität zu induzieren vermag. Zwar ist für seine Funktion als PAR-Ligand die proteolytische Aktivität des Enzyms unentbehrlich und stellt auch für die weitaus überwiegende Zahl der bislang beschriebenen physiologischen Aktivitäten die funktionelle Grundlage dar (92, 107, 164, 165). Dennoch weisen insbesondere die dem (enzymatisch inaktiven) Prothrombin zugeschriebenen biologischen Aktivitäten auf alternative, von PAR unabhängige Aktivierungsmechanismen des Proteins hin (166, 167). Als wichtige Interaktionspartner des Prothrombins als auch des Thrombins sind in diesem Zusammenhang Integrine, heterodimere Oberflächenrezeptoren, bestehend aus einer α - und einer β -Kette, beschrieben worden (164, 168). Insbesondere das α v β 3-Integrin, das nachweislich auch auf humanen Mastzellen exprimiert ist (169, 170), vermag über eine gleichermaßen im Prothrombin und Thrombin vorhandene RGD-Sequenz mit diesen Proteinen zu interagieren (164, 168). Für humane Endothelzellen wurde gezeigt, dass das RGD-Motiv essentiell für die Bindung von Thrombin und α v β 3-Integrine ist und dass die vermittelte Funktion (Zelladhäsion) unabhängig ist von der enzymatischen Aktivität des

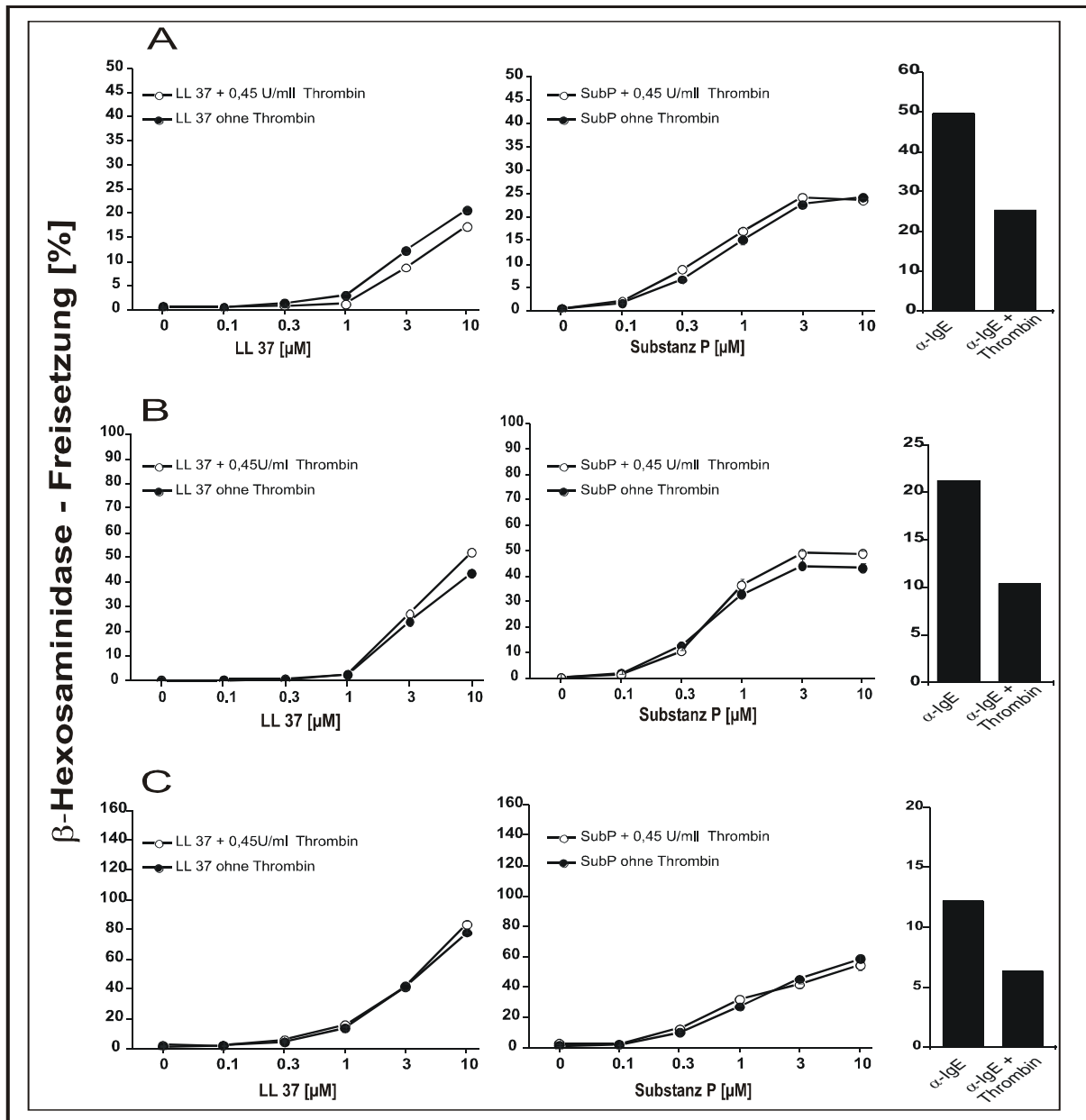


Abbildung 16: Einfluss von Thrombin auf die LL 37- und SubP-induzierte Degranulation humaner Mastzellen

Lungen- (A) und Hautmastzellen (B) und LAD 2-Zellen (C) wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit steigenden Konzentrationen an LL 37 oder SubP für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienten mit 0,45 U/ml Thrombin oder der entsprechenden Menge an Puffer allein vorinkubierte Zellen. Als Positivkontrolle ist die Wirkung von Thrombin auf die durch α IgE stimulierte Degranulation für jeden Zelltypus wiedergegeben (A, B: 3 µg/ml α IgE und C: 30 µg/ml α IgE; Stabdiagramme, rechts). Dargestellt ist die β -Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zelllysaten. Es ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender bzw. mit LAD 2-Zellen abgebildet.

Thrombins (171). Somit stellte sich auch bei den von mir erhobenen Befunden die Frage, welchen Beitrag die enzymatische Aktivität bzw. die Interaktion mit $\alpha\beta$ 3-Integrinen für die Funktion des Thrombins als Inhibitor der Fc ϵ RI-abhängigen Mastzelldegranulation leisten. Im Folgenden werden Experimente dargestellt, in denen ich einerseits durch Verwendung selektiver Inhibitoren die Bedeutung der enzymatischen Aktivität und andererseits durch Einsatz agonistischer RGD-Peptide den potentiellen Beitrag von $\alpha\beta$ -Integrinen analysierte. Zuvor war jedoch in einem Experiment zur Hitzeinaktivierung zu prüfen, ob die von mir verwendete Thrombinpräparation frei von kontaminierenden, den Thrombineffekt vortäuschenden Komponenten war. Insbesondere lagen von Seiten des Herstellers keine Angaben zur möglichen Verunreinigung mit Lipopolysaccharid (LPS) vor, einem bakteriellen Zellbestandteil mit vielfältigen Wirkungen in zellulären Systemen.

3.4.2.1 Hitzedenaturierung hebt die inhibitorische Wirkung des Thrombins auf die Mastzelldegranulation auf

Um zu klären, ob der die Mastzelldegranulation inhibierende Effekt auf ein Protein zurückzuführen ist, oder womöglich enthaltene LPS-Rückstände dafür verantwortlich sind unterzog ich die verwendete Thrombinpräparation einer Hitzedenaturierung. Durch die Anwendung von Hitze ist es möglich gezielt Proteine in einer Präparation zu zerstören, während kontaminierende Bestandteile wie LPS davon nicht betroffen sind. So wurden mit Myeloma-IgE-beladene Lungen- und Hautmastzellen mit 0,45 U/ml Thrombin, welches zuvor entweder für 10 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln inkubiert worden war oder unbehandelt blieb, für 5 min vorinkubiert und anschließend mit steigenden α IgE-Konzentrationen stimuliert. Wie in Abb. 17 deutlich zu erkennen ist, hatte das hitzebehandelte Thrombin seinen inhibierenden Einfluss auf das durch α IgE induzierte Degranulationssignal vollständig eingebüßt. Aus diesen Experimenten ergaben sich somit eindeutige Hinweise, dass der die Degranulation inhibierende Effekt durch ein Protein, in diesem Falle allem Anschein nach durch Thrombin induziert wird. Da aus diesen Untersuchungen jedoch nicht klar wurde, ob die proteolytische Aktivität von Thrombin an der

Inhibition beteiligt ist, führte ich nachfolgend entsprechende Experimente mit Thrombininhibitoren durch (s. 3.4.3).

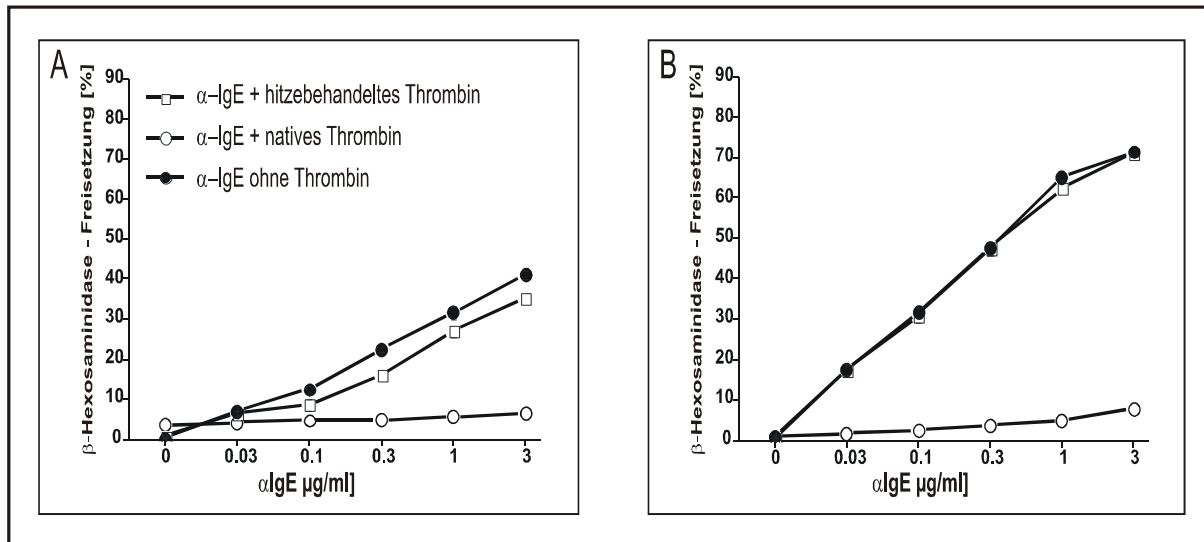


Abbildung 17: Einfluss von hitzebehandeltem Thrombin auf die αIgE-induzierte Degranulation humaner Lungen- und Hautmastzellen

Thrombin wurde zur Inaktivierung für 10 min bei 70 °C erhitzt oder unbehandelt belassen. Lungen- (A) und Hautmastzellen (B) wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml an hitzebehandeltem oder nativem Thrombin oder der entsprechenden Menge an Puffer für 5 min vorinkubiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen an αIgE für 30 min stimuliert. Bestimmt wurde die in den zellfreien Überstand freigesetzte β-Hexosaminidaseaktivität. Dargestellt ist die β-Hexosaminidaseaktivität als prozentualer Anteil der Gesamt-β-Hexosaminidaseaktivität (=100 %), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 behandelten Zellysaten. Es ist jeweils eines von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender abgebildet.

3.4.2.2 Blockierung der enzymatischen Aktivität von Thrombin hebt dessen inhibitorische Wirkung auf

Nachdem unter 3.4.2.1 gezeigt werden konnte, dass der inhibitorische Effekt auf die Mastzelldegranulation einem Protein (d.h. Thrombin), und nicht einer Kontamination mit z.B. LPS zuzuschreiben ist, stellte sich als nächstes die Frage, ob Thrombin die Wirkung über seine enzymatische Aktivität oder möglicherweise über einen davon unabhängigen Mechanismus ausübt. Zur Klärung dieser Frage verwendete ich zwei Inhibitoren der enzymatischen Aktivität, zum einen PMSF, einen Serinproteinaseinhibitor mit breitem

Wirkungsspektrum und zum anderen Hirudin einen als selektiv für Thrombin beschriebenen Inhibitor. Während PMSF kovalent den aktiven Serinrest im katalytischen Zentrum von Serinproteinasen sulfoniert und das Enzym dadurch blockiert, interagiert Hirudin über eine Peptidsequenz in nicht kovalenter Weise mit dem aktiven Zentrum und enthält seine Selektivität für Thrombin durch zusätzliche Interaktion mit der außerhalb des aktiven Zentrums gelegenen Fibrinogenbindungsstelle der Proteinase (166, 172, 173). In den Inhibitionsversuchen mit PMSF inkubierte ich Thrombin mit dem Inhibitor für 10 min bei 37 °C vor und stellte den Ansatz dann mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,8 ein, um das zytotoxische, in Lösung befindliche PMSF zu zerstören. Die nachfolgende Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur diente dazu noch verbliebene Reste des PMSF zu inaktivieren. Nach Einstellen des Ansatzes mit HCL auf eine pH von 7,4 erfolgte die Zugabe zu den Lungenmastzellen, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C und anschließender Stimulation für 30 min mit 3 µg/ml αIgE. Die dazugehörenden Kontrollansätze erhielten entweder kein PMSF oder wurden mit PMSF allein (ohne Thrombin, zur Kontrolle einer möglicherweise noch vorhandenen zytotoxischen Restaktivität) vorinkubiert. Für die Inhibition von Thrombin durch Hirudin wurden Thrombin und Hirudin für 10 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend direkt zu den Zellen gegeben. Die oben für PMSF beschriebenen Kontrollansätze wurden in entsprechender Weise auch für Hirudin durchgeführt. Aus Abbildung 18 ist zunächst zu entnehmen, dass die Anwesenheit der Inhibitoren die durch αIgE-induzierte Degranulation der Mastzellen nicht beeinträchtigte. Während PMSF die Reaktivität der Zellen unbeeinflusst ließ, erschien diese in Anwesenheit von Hirudin sogar noch etwas erhöht. Die durch Thrombin induzierte Hemmung der Degranulationsreaktion (ca. 20% Restaktivität) ließ sich hingegen vollständig aufheben, sowohl durch PMSF als auch durch Hirudin, wie sich durch Vergleich der Restaktivitäten von Zellen ergab, die in Anwesenheit der Inhibitoren mit und ohne Thrombin inkubiert wurden. Insbesondere der Effekt des spezifischen Inhibitors Hirudin lässt darauf schließen, dass die enzymatische Aktivität von Thrombin für dessen inhibitorische Wirkung essentiell ist.

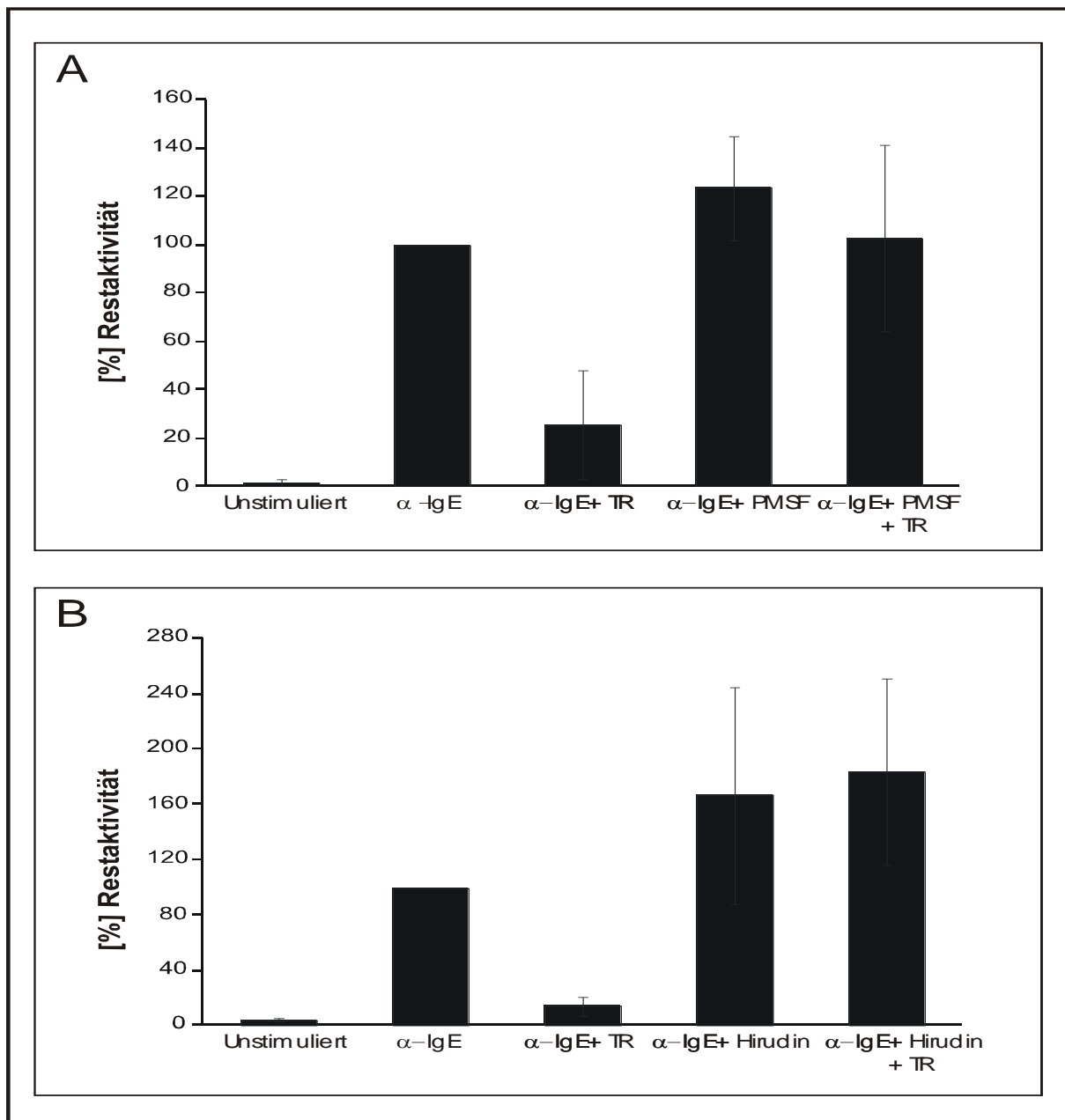


Abbildung 18: Einfluss der Inhibitoren PMSF und Hirudin auf die Thrombin-induzierte Hemmung der Degranulation humaner Lungemastzellen

Lungemastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml Thrombin, in An- und Abwesenheit von 1 mM PMSF (**A**) bzw. 0,45 U/ml Hirudin (**B**) für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 3 μ g/ml α IgE für 30 min stimuliert. Als Kontrollen dienten Zellen versetzt mit Puffer und 3 μ g/ml α IgE bzw. Inhibitor allein versetzt mit 3 μ g/ml α IgE. 100% Restaktivität entsprechen der von α IgE-stimulierten Mastzellen in den Überstand freigesetzten β -Hexosaminidaseaktivität. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender wiedergegeben.

3.4.2.3 Synthetische RGD-Peptide und Prothrombin modulieren nicht die Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation humaner Mastzellen

Die RGD-Sequenz ist eine Struktur innerhalb des Thrombinmoleküls, die unabhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms mit Integrinen interagieren kann. Hier sollte nun geklärt werden, ob eine solche Struktur, möglicherweise über Interaktion mit von Mastzellen exprimierten Integrinen an der Inhibition der α IgE-induzierten Degranulation beteiligt ist. Für *in vitro* Untersuchungen zur Funktion von RGD-Sequenzen stehen synthetische RGD-Peptide zur Verfügung. Diese sind meist 5-6 Aminosäuren lange Oligopeptide, welche die RGD-Sequenz enthalten oder imitieren. In den folgenden Experimenten verwendete ich sowohl das relativ unspezifische Peptid RGDS, welches viele verschiedene Integrine bindet und aktiviert, als auch das zyklische Peptid cRGD, welches selektiv α v β 3-Integrine aktiviert. Zur Kontrolle diente ein inaktives, d.h. nicht an Integrine bindendes Peptid (RGES). Neben den Peptiden wurde auch Prothrombin, eine enzymatische inaktive Vorstufe des Thrombins in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt. Primäre mit Myeloma-IgE-beladene Lungenmastzellen versetzte ich mit ansteigenden Konzentrationen der verschiedenen Peptide (Abb. 19 A-C) oder mit Prothrombin (Abb. 19 D). Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit 3 μ g/ml α IgE stimuliert und die in den Überstand freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität wurde gemessen. Wie aus Abbildung 19 hervorgeht waren weder das unspezifische noch das α v β 3-spezifische RGD-Peptid in der Lage die Degranulationsreaktion zu beeinflussen. Diese Daten weisen darauf hin, dass RGD-bindende Integrine nicht an der negativen Regulation der Mastzelldegranulation beteiligt sind. Ebenso konnte keine Veränderung der Degranulation nach Vorinkubation mit Prothrombin festgestellt werden, was weiterhin darauf schließen lässt, dass die nicht enzymatische Aktivität des Thrombins keine Rolle bei der Inhibition der Mastzelldegranulation spielt und bestätigen gleichzeitig die mit den Thrombininhibitoren erhaltenen Ergebnisse.

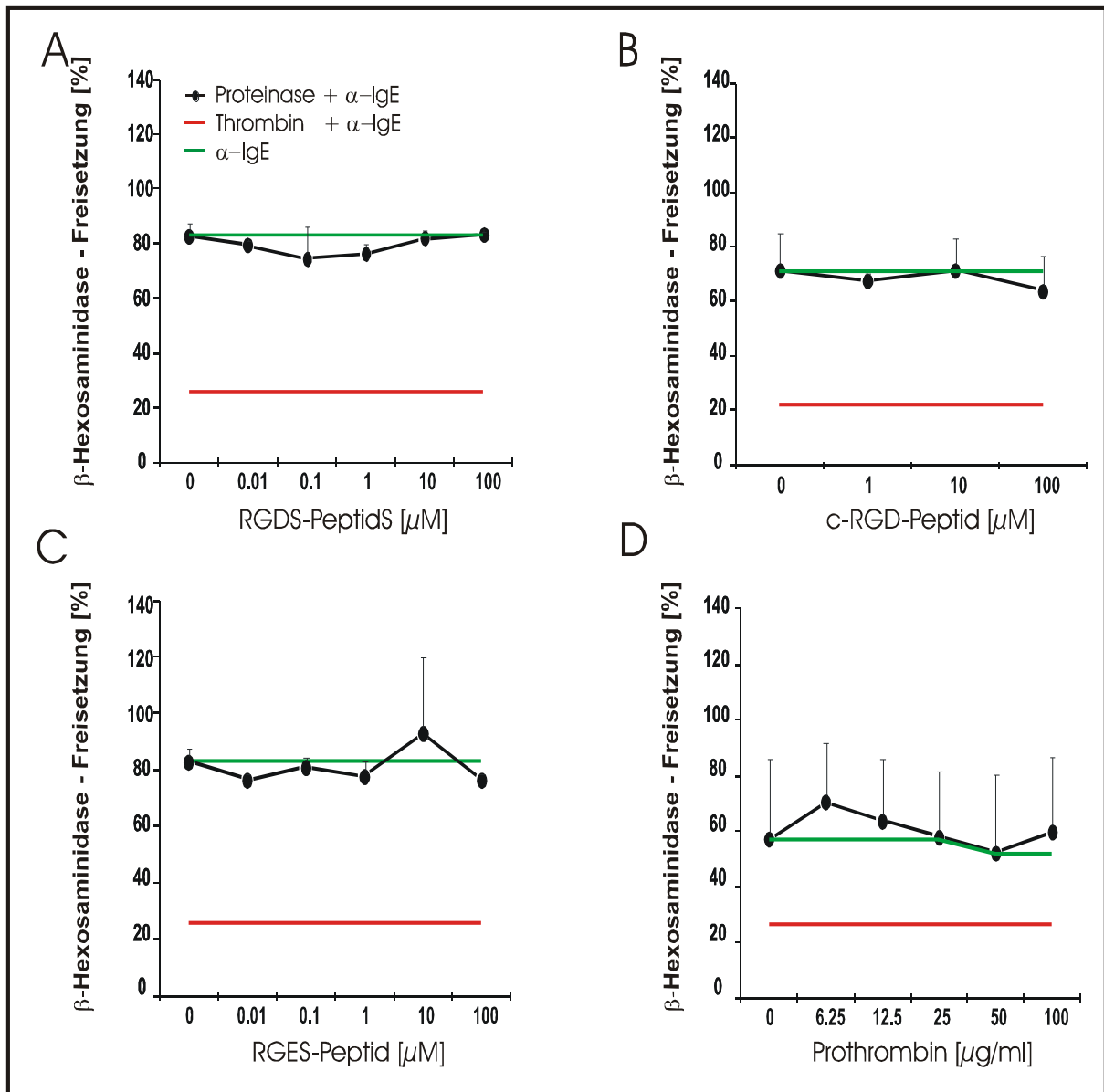


Abbildung 19: Einfluss von RGD-Peptiden und Prothrombin auf die α IgE-induzierte Degranulation humaner Lungenmastzellen

Humane Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen an Peptid RGDS (**A**), cRGD (**B**), RGES (**C**) oder Prothrombin (**D**) für 5 min vorinkubiert und anschließend mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE für 30 min stimuliert. Als Kontrollen dienten Zellen, die unstimuliert verblieben oder entweder mit $0,45 \text{ U/ml}$ Thrombin (rote Linie) oder Puffer allein (grüne Linie) versetzt und anschließend mit $3 \mu\text{g/ml}$ α IgE stimuliert wurden. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im Überstand. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der β -Gesamt-Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit $0,05 \%$ Triton-X 100 lysierten Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender.

3.4.3 Thrombin beeinflusst nicht die Bindung von IgE auf der Oberfläche von humanen Mastzellen

Nachdem ich zeigen konnte, dass die enzymatische Aktivität des Thrombins für dessen inhibitorische Wirkung auf die Mastzelldegranulation essentiell ist, stellte sich die naheliegende Frage auf, ob Thrombin möglicherweise die Bindung von IgE auf der Oberfläche von Mastzellen herabsetzt, und dadurch die α IgE-induzierte Effektorantwort einschränkt. Aufgrund der proteolytischen Aktivität von Thrombin wäre es denkbar, dass in Anwesenheit des Enzyms auf der Zelloberfläche gebundenes IgE abgespalten wird und so die Zielmoleküle der zur Stimulation eingesetzten α IgE-Antikörper verloren gehen. Um dieses zu überprüfen versetzte ich mit Myeloma-IgE beladene humane Lungenmastzellen mit 0,45 U/ml Thrombin und inkubierte diese unter Bedingungen (30 min bei 37 °C), die denjenigen der Exposition der Mastzellen gegenüber Thrombin im Degranulationsversuch entsprachen. Anschließend wurde die Menge des an die Zelloberfläche gebundenen IgEs mittels eines spezifischen FITC-markierten α IgE-Antikörpers durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abb. 20 gezeigt, hatte die Inkubation der Lungenmastzellen mit Thrombin nach einer Inkubationsdauer von 30 min keine Veränderung in der IgE-Bindung der Zellen zur Folge. Im Vergleich zu Zellen die kein Thrombin erhalten hatten, ergaben sich für Zellen die mit Thrombin inkubiert worden waren, sehr ähnliche Werte der MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) für die Expression von IgE auf der Zelloberfläche. Diese betragen (für ein repräsentatives Experiment) MFI=144 für unbehandelte bzw. MFI=142 für thrombinbehandelte Zellen. Auch kürzere und längere Inkubationszeiten (5, 10, 60 min) mit Thrombin führten zu keinen Unterschiede in der IgE-Expression von humanen Lungemastzellen (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate lassen darauf schliessen, dass Thrombin seine inhibitorische Wirkung auf die Mastzelldegranulation nicht über eine Veränderung der IgE-Expression auf der Oberfläche humaner Lungenmastzellen induziert.

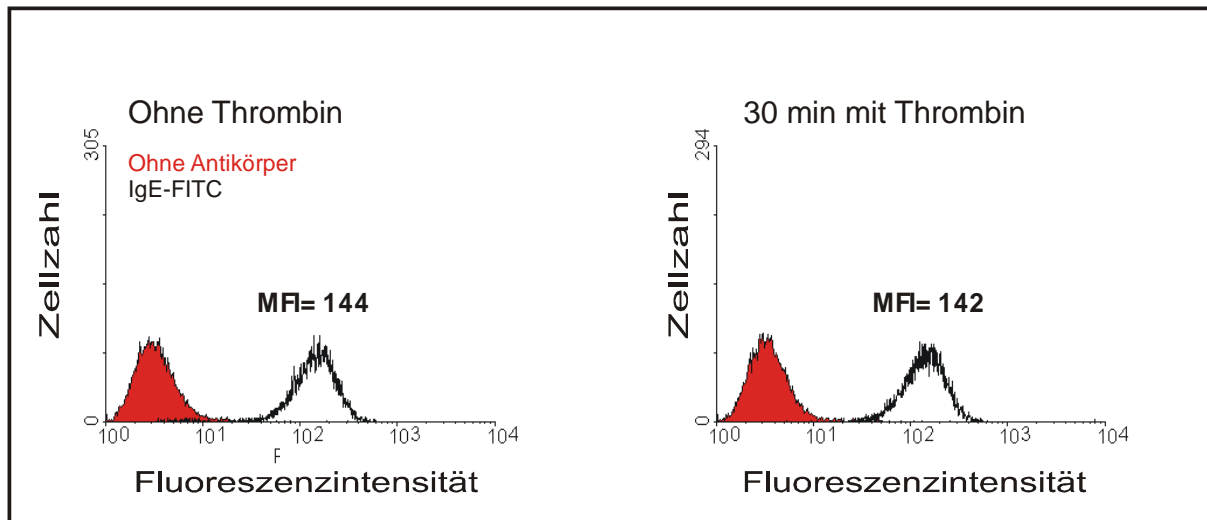


Abbildung 20: Einfluss einer Vorinkubation mit Thrombin auf die Bindung von IgE auf der Oberfläche von humanen Lungenmastzellen

Lungenmastzellen wurden mit oder ohne Thrombin (0,45 U/ml) für 30 min inkubiert und anschließend mit einem FITC-markierten anti-IgE Antikörper (schwarze Linie) gefärbt oder blieben ungefärbt (rot). Danach erfolgte der Nachweis gebundenen IgEs mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Es ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender dargestellt.

3.4.4 Thrombin inhibiert nicht die $Fc\epsilon RI$ -vermittelte Degranulation humaner basophiler Granulozyten

Die bisherigen Ergebnisse zum Mechanismus der Thrombin-abhängigen Inhibition der Mastzelldegranulation führten mich zu der Arbeitshypothese, dass Thrombin seine Wirkung über die Interaktion mit PAR vermittelt. Um einen ersten Eindruck zur Haltbarkeit dieser Hypothese zu gewinnen, untersuchte ich den Einfluss von Thrombin auf die α IgE-induzierte Degranulation basophiler Granulozyten. Basophile Granulozyten (Basophile) sind aus dem Knochenmark stammende Leukozyten und kommen im Blut als ausgereifte Zellen vor. Wie Mastzellen auch, besitzen Basophile heparin- und histaminreiche Granula, die nach Kreuzvernetzung von Zelloberflächen- $Fc\epsilon RI$ mit der Zellmembran fusionieren und so ihren Inhalt (u.a. auch β -Hexosaminidase) in den extrazellulären Raum freisetzen. Interessant für

meine Arbeit waren diese Zellen, weil sie nachweislich keine funktionellen PAR exprimieren (174). Somit eigneten sie sich hervorragend als Kontrollzellen zur Überprüfung meiner Hypothese, dass die Thrombin-induzierte Inhibition der Fc ϵ RI-abhängigen Degranulation über PAR vermittelt wird. Für diesen Zweck versetzte aus menschlichem Blut aufgereinigte primäre Basophile für 5 min mit ansteigenden Thrombinkonzentrationen (0,015-5 U/ml) und stimulierte die Zellen anschließend mit steigenden α IgE-Konzentrationen. Bei keiner der zur Vorinkubation eingesetzten Thrombinkonzentrationen ergab sich ein Einfluss auf die α IgE-induzierte Degranulation der Basophilen. Zur Dokumentation dieses Ergebnisses ist in Abbildung 21 daher lediglich die Reaktivität der Zellen gegenüber 0,45 U/ml Thrombin dargestellt. Wie dort zu erkennen ist, bleibt die α IgE-induzierte Degranulation von basophilen Granulozyten in An- und Abwesenheit von Thrombin über den gesamten Konzentrationsbereich des eingesetzten Stimulus völlig unverändert. Diese Ergebnisse veranlassten mich weiterhin der Hypothese nachzugehen, dass PAR eine wesentliche Funktion bei der Thrombin-induzierten Inhibition ausüben.

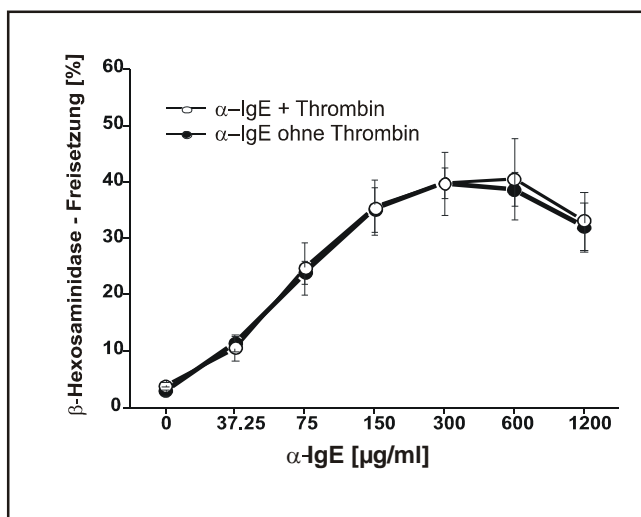


Abbildung 21: Einfluss von Thrombin auf die Degranulation humaner basophiler Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden zu 16×10^5 Zellen/ml mit 0,45 U/ml Thrombin oder der entsprechenden Menge an Puffer für 5 min vorinkubiert und anschließend mit ansteigenden Konzentrationen α IgE für 30 min stimuliert. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidaseaktivität im zellfreien Überstand.

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 lysierten Zellen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit basophilen Granulozyten verschiedener Spender abgebildet.

3.4.5 Desensibilisierung von PAR und PAR-Liganden-vermittelter Funktionen durch Thrombin und PAR-AP

Im Abschnitt 3.2.2 wurde bereits gezeigt, dass Thrombin in humanen Mastzellen intrazelluläre Ca-Signale zu induzieren vermag, was auf eine mögliche Interaktion von Thrombin mit GPCR hinweist. Wie bereits erwähnt ist Thrombin der natürliche Ligand für PAR1 und PAR4, welche ebenfalls auf humanen Mastzellen nachgewiesen wurden (s. 3.1.2 und 3.1.3). Da Thrombin meinen Ergebnissen zufolge in humanen Mastzellen, anders als im murinen System, keine Degranulation induzierte, blieb fraglich, ob es auch mit den auf Mastzellen exprimierten PAR interagieren kann. Um dieses zu klären, überprüfte ich, ob Inkubation mit Thrombin zur Internalisierung von PAR auf Mastzellen führt. Aufgrund der variablen Detektierbarkeit des PAR4 war es schwierig diese Versuche auch für PAR4 durchzuführen. Aus diesem Grund wurden ausser Experimenten zur Liganden-induzierten Internalisierung der Oberflächenrezeptoren zusätzlich Experimente zur Desensibilisierung der durch PAR-AP induzierten intrazellulären Kalziumsignale und der Degranulation durchgeführt.

3.4.5.1 Internalisierung von PAR1 auf humanen Mastzellen durch Thrombin und PAR-AP

Zur Prüfung der Reaktivität von Thrombin mit Mastzell-exprimiertem PAR1 inkubierte ich Lungenmastzellen mit Thrombin und zum Vergleich mit PAR-APs für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Expression des Rezeptors mit dem PAR1-spezifischen Antikörper WEDE1, der sowohl N-terminal verkürzte (d.h. aktivierte) als auch nicht gespaltene (intakte) PAR1 erkennt, durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abb. 22 dargestellt konnte sowohl nach Thrombin- als auch PAR1-AP-Stimulation der Zellen keine Oberflächenexpression des PAR1 mehr gemessen werden, während das zur Kontrolle eingesetzte PAR1-Iso-AP keine Veränderung der Expression bewirkte. Desgleichen hatten auch Peptide anderer Rezeptorspezifität (PAR2-AP und PAR4-AP) keine Veränderung der PAR1-Expression zur Folge. Mit dem WEDE1 Antikörper vergleichbare Ergebnisse lieferte der Nachweis der

PAR1-Expression mit einem Antikörper (ATAP2), der nur N-terminal verkürzte PAR1 erkennt. Auch nach Detektion mit diesem Reagenz stellten sich mit Thrombin oder PAR1-AP vorinkubierte Lungenmastzellen als negativ für die Expression von PAR1 dar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass Thrombin die Internalisierung des auf Mastzellen exprimierten PAR1 bewirkt, also mit diesem Rezeptor interagieren kann.

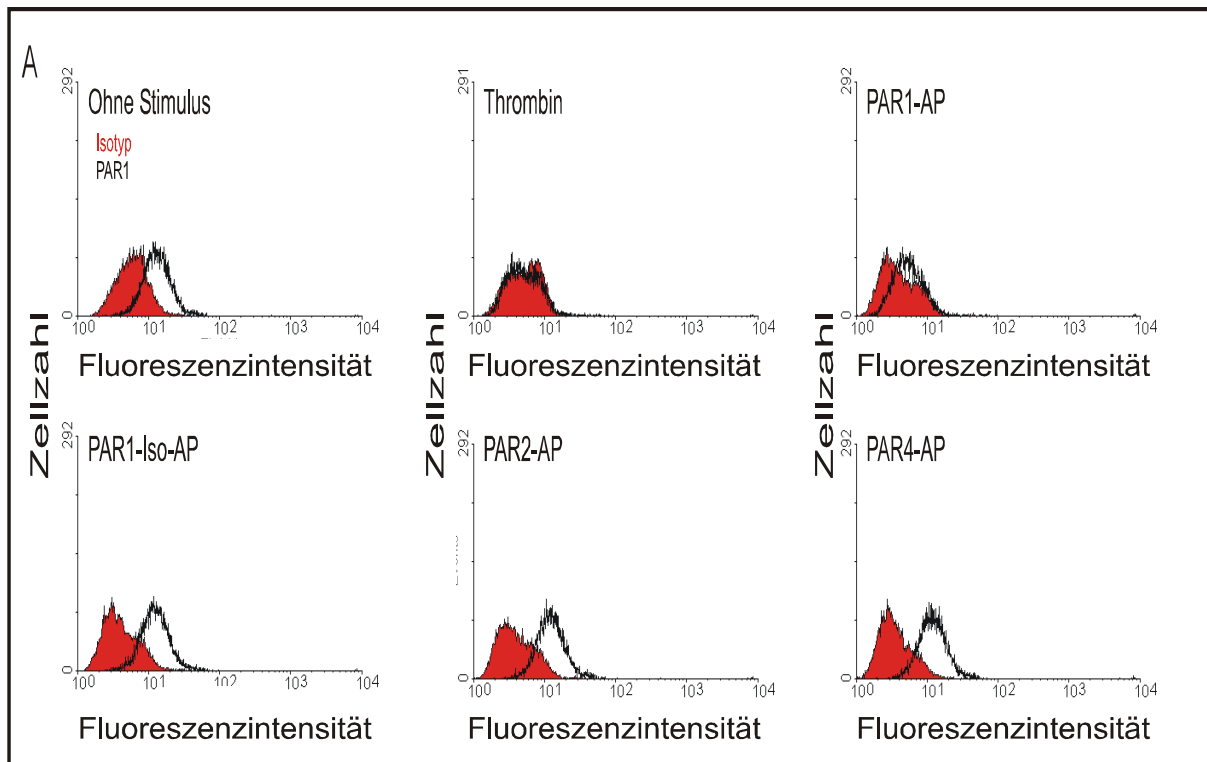


Abbildung 22: Wirkung von Thrombin und PAR-AP auf die Oberflächenexpression von PAR1 in humanen Lungenmastzellen

Lungenmastzellen wurden 30 min mit 0,45 U/ml Thrombin oder mit 100 µg/ml PAR1-AP, PAR2-AP, PAR4-AP bzw. PAR1-Iso-AP inkubiert und anschließend mit einem spezifischen anti-PAR1-Antikörper (WEDE1) markiert. Die Expression des PAR1 wurde anschließend in einem Durchflusszytometer gemessen. Aufgetragen ist die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten als Histogramm. Es ist jeweils ein repräsentatives von drei Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender dargestellt.

3.4.5.2 Vorinkubation humaner Mastzellen mit Thrombin hebt die durch PAR1-AP und PAR4-AP induzierten Ca-Signale auf

Wie bereits zuvor gezeigt (Abschnitt 3.2.2) lässt sich sowohl durch Stimulation mit PAR1-AP oder PAR4-AP als auch mit Thrombin in Mastzellen ein Ca-Signal induzieren. Um zu klären, ob Thrombin außer mit PAR1 auch mit Mastzell-exprimiertem PAR4 interagieren, prüfte ich ob Thrombin in der Lage ist das durch PAR1- und PAR4-AP induzierte Ca-Signal zu desensibilisieren. Dazu wurden Lungenmastzellen nacheinander mit Thrombin und den PAR-AP stimuliert und die Freisetzung von intrazellulären Kalziumionen für insgesamt jeweils ca. 600 sek mittels Durchflusszytometrie registriert. Zur Kontrolle der Reaktivität der Zellen wurden zunächst Stimulationen mit α IgE, PAR1- oder PAR4-AP allein durchgeführt. In allen diesen Experimenten erhielt ich gut messbare Ca-Signale für jeden der Stimuli (Abb. 23 A). In den folgenden Experimenten wurden die Zellen dann sequenziell mit Thrombin und PAR-AP stimuliert. Hier zeigte sich, dass Thrombin sein eigenes Signal vollständig auslöschte (Abb 23 B), während die vorangegangene Stimulation mit Thrombin keinen Einfluss auf das nachfolgend durch α IgE-induzierte Signal hatte (Abb 23 C). Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass Thrombin sein Ca-Signal über selektive, von Fc ϵ RI unabhängige Rezeptoren generiert, und andererseits, dass die Inhibition der Fc ϵ RI-vermittelten Mastzelldegranulation nicht über die Modulation des von Fc ϵ RI ausgehenden Ca- Signal verlaufen kann. Aus Abb 23D und E hingegen ist deutlich zu erkennen, dass bereits 0,45 U/ml Thrombin in der Lage sind, das PAR1-AP-Signal vollständig zu desensibilisieren, während diese Konzentration das PAR4-AP-Signal nur teilweise auslöschte. Wie in Abb. 23 F zu sehen, ist eine vollständige Desensibilisierung jedoch nach vorangegangener Stimulation mit einer 20fach höheren Konzentration an Thrombin möglich. Diese Resultate zeigen, dass Thrombin ausser mit PAR1 auch mit PAR4 auf humanen Mastzellen funktionell interagiert, und lassen darüber hinaus vermuten, dass entsprechend den in anderen humanen Zellen gefundenen Verhältnissen, z.B. bei Blutplättchen (175) Thrombin auch in Mastzellen eine höhere Affinität gegenüber PAR1 als gegenüber PAR4

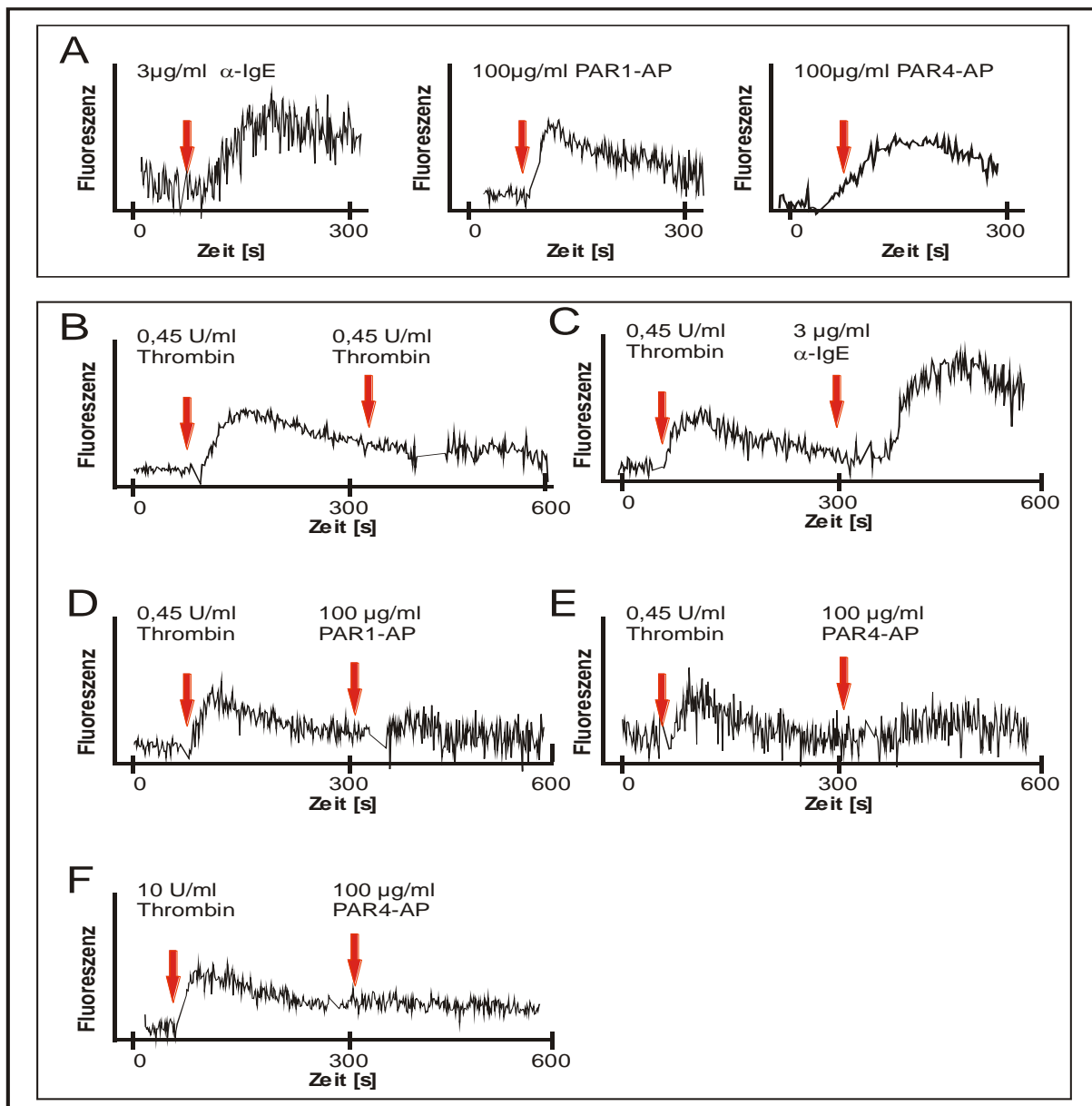


Abbildung 23: Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in humanen Lungenmastzellen nach sequenzieller Aktivierung mit Thrombin und PAR-AP

Lungenmastzellen wurden für 30 min mit Fluo4 beladen und anschließend das intrazelluläre Ca-Signal in einem Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 300s für die einfache Stimulation mit αIgE , PAR1-AP und PAR4-AP aufgenommen (A). Bei der sequenziellen Stimulation mit Thrombin als erstem Stimulus (B-F) erfolgte die Zugabe des zweiten Stimulus nach 300 s. Dargestellt ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach Stimulation mit αIgE , PAR1-AP oder PAR4-AP alleine (A) bzw. nach sequenzieller Stimulation mit 0,45 U/ml Thrombin als erstem Stimulus, gefolgt von 0,45 U/ml Thrombin (B), 3 $\mu\text{g/ml}$ αIgE (C), 100 $\mu\text{g/ml}$ PAR1-AP (D) 100 $\mu\text{g/ml}$ PAR4-AP (E), 100 $\mu\text{g/ml}$ PAR4-AP, sowie 10 U/ml Thrombin gefolgt von 100 $\mu\text{g/ml}$ PAR4-AP (F). Abgebildet ist eines von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender.

besitzt. Zur Überprüfung dieser Befunde kehrte ich in weiteren Experimenten die Reihenfolge Stimuli in den Desensibilisierungsversuchen um. So konnte durch Prästimulation mit dem PAR1-AP das Kalziumsignal von 0,45 U/ml Thrombin vollständig und dasjenige von 10 U/ml Thrombin teilweise desensibilisiert werden (Abb. 24 B/C), was für eine starke Interaktion von Thrombin mit dem PAR1 spricht. Vorstimulation mit dem PAR4-AP hingegen hatte keinen Einfluss auf das von 0,45 U/ml Thrombin ausgelöste Signal (Abb. 24 D), während eine sequenzielle Stimulation der Zellen mit dem PAR1-AP und PAR4-AP das von 10 U/ml Thrombin ausgehende Signal vollständig zu desensibilisieren vermochte (Abb. 24 E). Diese Ergebnisse weisen wiederum auf eine schwächer affine Interaktion von Thrombin mit dem PAR4 hin und bestätigen insgesamt die in den vorangehenden Experimenten erhaltenen Befunde. Interessant erscheint die Beobachtung, dass Vorinkubation mit PAR1-AP auch das Ca-Signal von PAR4-AP desensibilisiert.

3.4.5.3 Vorinkubation mit Thrombin hebt die durch PAR1-AP und PAR4-AP induzierte Mastzelldegranulation auf

Wie sich anhand der durch Thrombin desensibilisierbaren Ca-Signal von PAR1-AP und PAR4-AP erwiesen hatte, ist Thrombin offensichtlich in der Lage mit PAR1 und PAR4 auf humanen Mastzellen funktionell zu interagieren. Somit stellte sich jetzt die Frage, ob diese Interaktion auch für die Inhibition der Fc ϵ RI-induzierten Degranulation verantwortlich ist. Hierzu prüfte ich zunächst in entsprechender Weise, ob sich auch die von den PAR-AP vermittelte Degranulation durch Präinkubation mit Thrombin inhibieren lässt. Lungen- und Hautmastzellen wurden dafür mit 0,45 U/ml Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 200 μ g/ml PAR1-AP oder PAR4-AP für 30 min stimuliert und die in den Überstand freigesetzt β -Hexosaminidaseaktivität photometrisch bestimmt. Die für die Peptide eingesetzte Konzentration entsprach derjenigen, bei der in vorangegangenen Experimenten eine Sättigung der Degranulationsreaktion in Mastzellen erreicht wurde (vgl. Abb. 5). Zur Kontrolle der generellen Aktivierbarkeit der Zellen diente die Stimulation mit 3 μ g/ml α IgE.

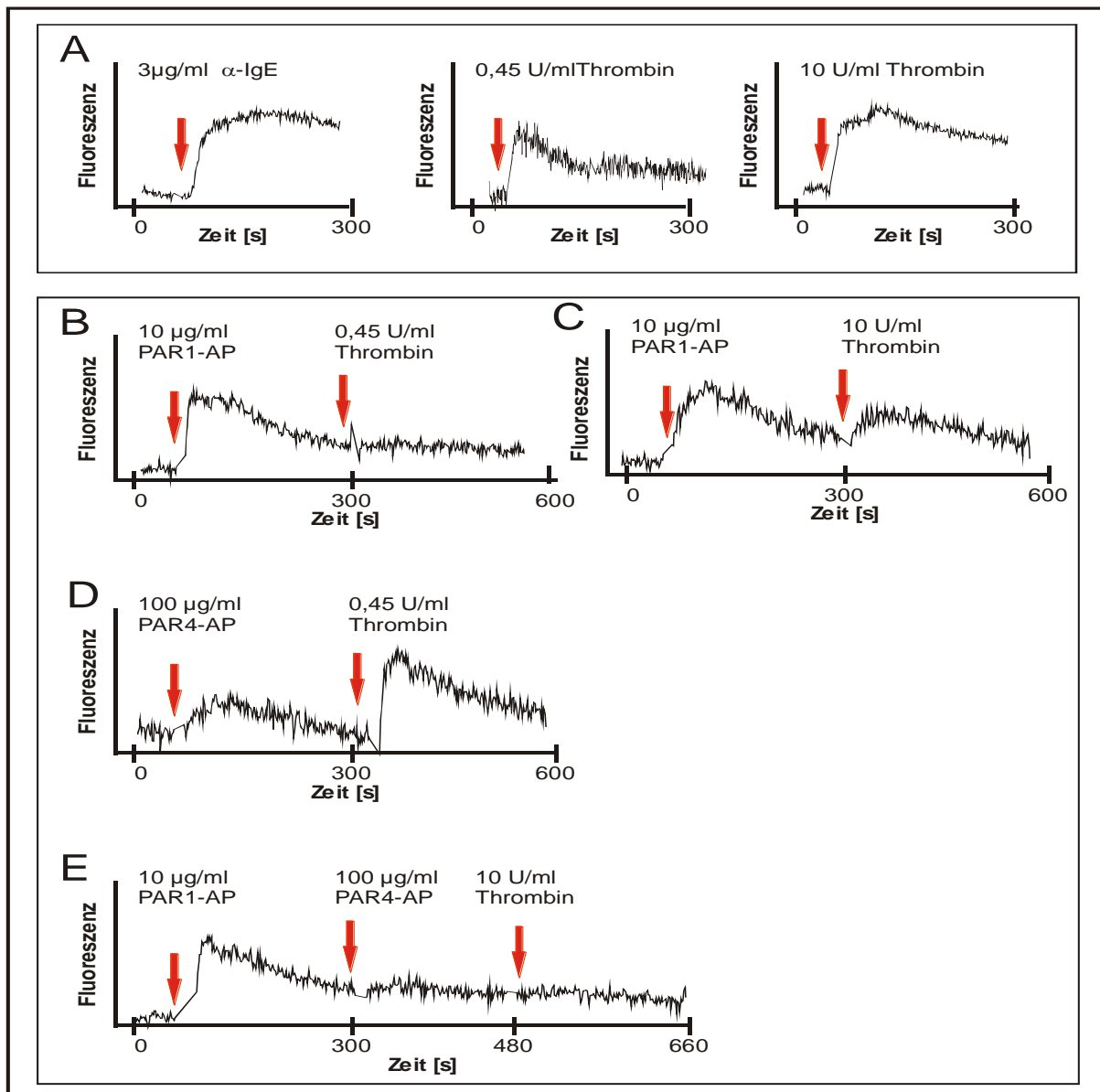


Abbildung 24: Freisetzung von intrazellulären zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in humanen Lungenmastzellen nach sequenzieller Aktivierung mit PAR-AP und Thrombin

Lungenmastzellen wurden für 30 min mit Fluo4 beladen und anschließend das intrazelluläre Ca-Signal in einem Durchflusszytometer über einen Zeitraum von 300 s für die Stimulation mit 3 µg/ml αIgE, sowie mit 0,45 U/ml und 10 U/ml Thrombin allein registriert (A). Bei der sequenziellen Stimulation erfolgte die Registrierung des Signals für insgesamt 600 s (B-D) bzw. 660s (E). Die Zugabe des ersten Stimulus erfolgte zwischen 45s und 60 s nach Messbeginn, die des Zweiten nach 300 s und die des Dritten nach 480 s. Dargestellt ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration nach sequenzieller Stimulation mit 10 µg/ml PAR1-AP und 0,45 U/ml Thrombin (B), 10 µg/ml PAR1-AP und 10 U/ml Thrombin (C), 100 µg/ml PAR4-AP und 0,45 U/ml Thrombin (D) und 10 µg/ml PAR1-AP, 100 µg/ml PAR4-AP und 10 U/ml Thrombin (E). Abgebildet ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender.

Wie in Abb. 25 dargestellt, hatte Vorinkubation von Lungen- und Hautmastzellen mit 0,45 U/ml Thrombin eine deutliche Inhibition der durch PAR1-AP und PAR4-AP-induzierten Degranulation zur Folge, wobei die Inhibition der PAR1-AP-induzierten Degranulation mit ca. $91\% \pm 2,9$ (Lungenmastzellen) bzw. $67\% \pm 7,1$ (Hautmastzellen) durchweg stärker ausfiel, als diejenige gegenüber PAR4-AP, dessen Effekt zu ca $60\% \pm 18,7$ (Lungenmastzellen) bzw. $45\% \pm 8,7$ (Hautmastzellen) gehemmt wurde. Diese Beobachtungen bestätigen auf der Ebene der über PAR vermittelten Degranulation, dass Thrombin funktionell mit PAR1 und PAR4 auf humanen Mastzellen interagiert.

3.4.6 Beteiligung von PAR an der durch Thrombin induzierten Inhibition der Mastzelldegranulation

Nachdem ich auf verschiedenen Ebenen die funktionelle Interaktion von Thrombin mit PAR1 und PAR4 demonstrieren konnte, war nun zu klären, ob und inwieweit diese Rezeptoren auch an der Vermittlung des von Thrombin ausgehenden inhibitorischen Effektes auf die Fc ϵ RI-induzierte Mastzelldegranulation beteiligt sind. Zur Prüfung dieser Hypothese verwendete ich drei, nach verschiedenen Prinzipien operierende experimentelle Ansätze, welche die selektive Aktivierung bzw. die Ausschaltung der betreffenden Rezeptoren zum Ziel hatten. Als erstes untersuchte ich den Effekt einer selektiven Aktivierung von PAR1 und PAR4 mit PAR-AP auf die α IgE-induzierte Degranulation humaner Lungenmastzellen. Desweiteren versuchte ich die Expression von PAR1 und PAR4 durch Transfektion in Mastzellen mit rezeptorspezifischen siRNA zu blockieren. Schließlich verwendete ich antagonistische Peptide (Pepduzine) für PAR1 und PAR4, welche über die Zellmembran eingeschleust, an eine intrazelluläre Domäne der Rezeptoren binden und diese blockieren.

3.4.6.1 Aktivierung von PAR1 und PAR4 mit PAR-AP inhibiert die Fc ϵ RI-induzierte Mastzelldegranulation

Zunächst überprüfte ich, ob es möglich ist, durch Aktivierung von PAR1 und/oder PAR4 die ϵ RI-vermittelte Degranulation zu inhibieren. In einem ersten Ansatz versetzte ich mit

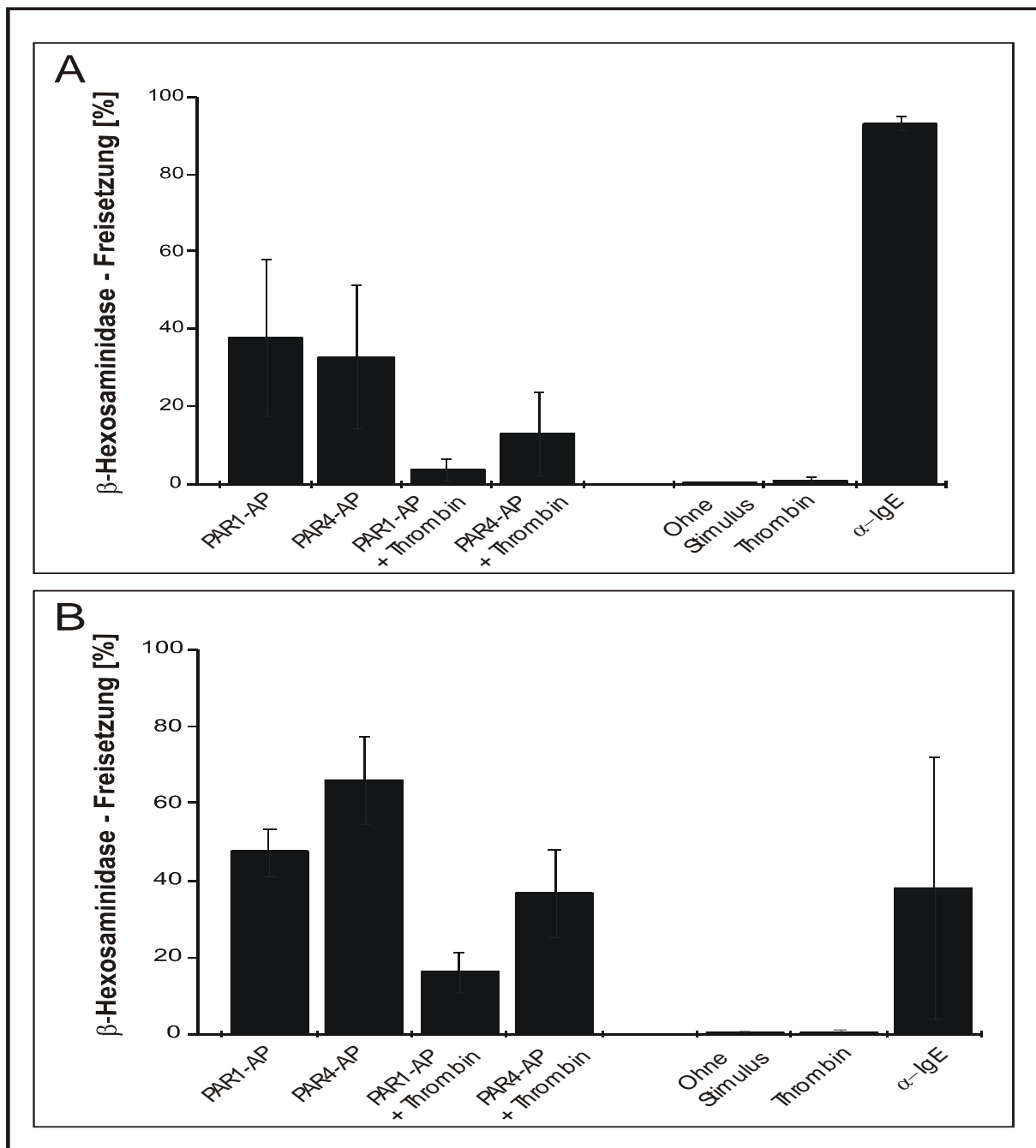


Abbildung 25: Vorinkubation mit Thrombin inhibiert die durch PAR1-AP und PAR4-AP induzierte Degranulation humaner Lungen- und Hautmastzellen

Lungen- (A) oder Hautmastzellen (B) wurden zu 5×10^5 Zellen/ml in An- und Abwesenheit von 0,45 U/ml Thrombin für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 200 μ g/ml PAR1-AP oder PAR4-AP für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, Zellen nur versetzt mit 0,45 U/ml Thrombin und Zellen nur versetzt mit 3 μ g/ml α IgE. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im zellfreien Überstand. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 lysierten Zellen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender wiedergegeben.

Myeloma-IgE beladene Lungenmastzellen entweder mit steigenden Konzentrationen an PAR1-AP oder PAR4-AP. Diese Ansätze wurden für 15 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit für 30 min mit α IgE-Antikörpern stimuliert, oder zur Ermittlung der degranulatorischen Eigenaktivität der PAR-AP, unstimuliert belassen. Weitere Kontrollansätze die entweder nur mit Puffer oder 0,45 U/ml Thrombin vorinkubiert und dann mit α IgE stimuliert wurden, dienten zur Überprüfung der Degranulationsantwort der Zellen auf α IgE bzw. zur Erfassung der inhibitorischen Wirkung des Thrombins. Wie in Abbildung 26 A ist zu erkennen ist, bewirkte Vorinkubation mit PAR1-AP eine konzentrationsabhängige Inhibition der α IgE-induzierten Degranulation. Die Inhibition des PAR1-AP war bereits bei 1 μ g/ml Peptid nahezu maximal (ca.44% Inhibition) und ließ sich durch weitere Erhöhung der Konzentration auf 10 μ g/ml nicht wesentlich steigern. Ab dieser Konzentration war bereits eine geringe degranulatorischen Eigenaktivität des Peptids zu erkennen, die bei 50 μ g/ml das Ausmaß der α IgE-induzierten Zellantwort annahm. Somit wird erklärlich, dass bei 50 μ g/ml PAR1-AP keinerlei Inhibition mehr zu beobachten war. Dennoch lässt sich aus diesen Ergebnissen schliessen, dass Aktivierung des PAR1 zur Inhibition der Degranulation beiträgt. Weniger deutlich waren die Ergebnisse für PAR4-AP (Abb. 25 B). Dieses Peptid besaß zwar selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration (50 mg/ml) keine eigene degranulatorische Aktivität, das Maximum seiner inhibitorischen Wirkung (bei 10 μ g/ml) betrug jedoch lediglich ca. 16%. Insgesamt zeigen diese Daten zunächst, dass durch separate Aktivierung von PAR1 oder PAR4 zwar jeweils eine partielle Inhibition der Degranulation erreicht werden kann, diese jedoch sehr viel schwächer ausgeprägt ist, als die durch Thrombin induzierte. Somit lag die Vorstellung nicht fern, dass Thrombin seinen inhibitorischen Effekt über beide Rezeptoren gleichzeitig vermittelt und dass es dabei möglicherweise zu einem kooperativen Effekt kommt. Um dieses zu untersuchen führte ich Experimente mit Kombinationen der beiden Peptide durch (Abb 26 C). Für PAR1-AP wählte ich eine feste Konzentration von 1 μ g/ml (besitzt noch keine degranulatorische Eigenaktivität), die mit steigenden Konzentrationen an PAR4-AP (1-50 μ g/ml) kombiniert wurde. Vorinkubation der Zellen mit diesen Peptidkombinationen führte zu deutlich höheren

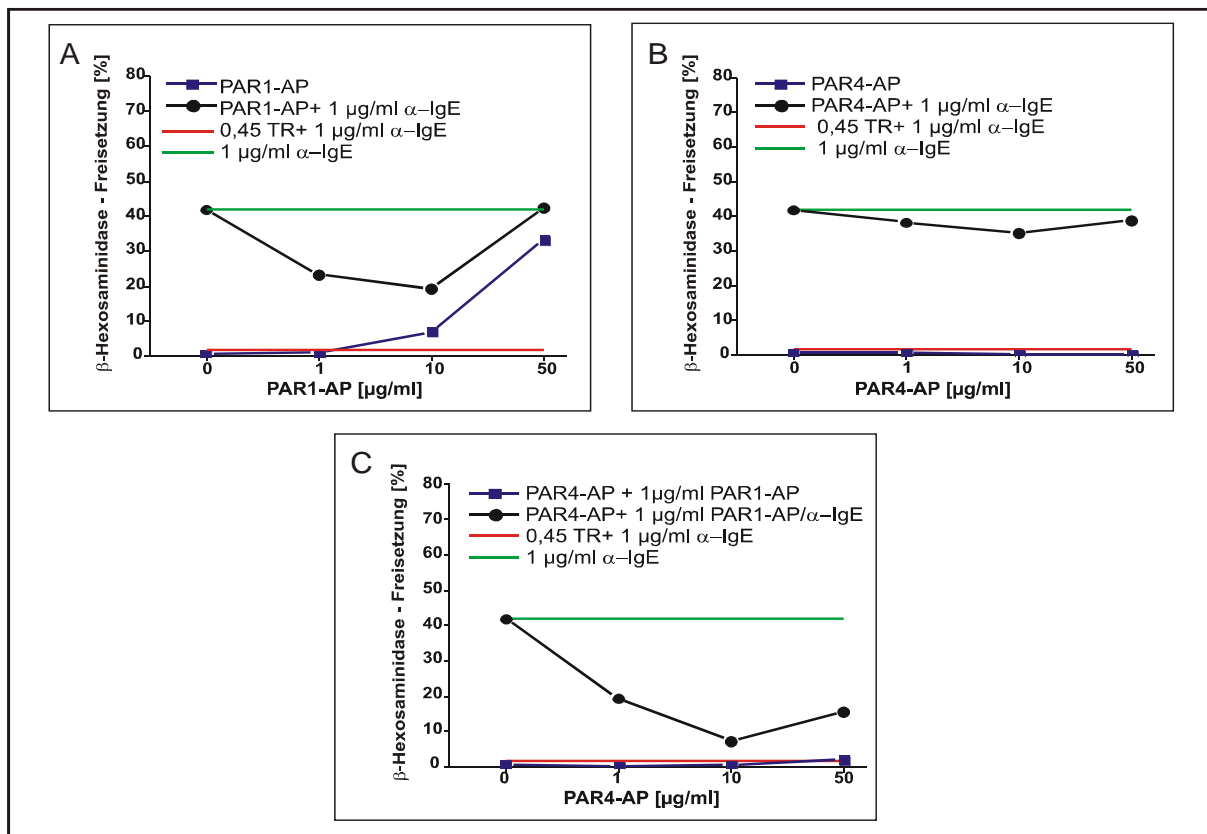


Abbildung 26: Einfluss einer Vorinkubation mit PAR1-AP und PAR4-AP auf die Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation humaner Mastzellen

A: Humane Mastzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an PAR1-AP für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αIgE für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen versetzt mit steigenden Konzentrationen an PAR1-AP alleine.

B: Humane Mastzellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an PAR4-AP für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αIgE für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen versetzt mit steigenden Konzentrationen an PAR4-AP alleine.

C: Humane Mastzellen wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ PAR1-AP in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen an PAR4-AP für 15 min vorinkubiert und anschließend mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αIgE für 30 min stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen versetzt mit 1 $\mu\text{g/ml}$ PAR1-AP und ansteigenden Konzentrationen an PAR4-AP ohne nachfolgende Stimulation mit αIgE . Zum Vergleich wurden (in A, B und C) Zellen mit 0,45 U/ml Thrombin (rote Linie) oder ohne Thrombin (grüne Linie) vorinkubiert und anschließend mit 1 $\mu\text{g/ml}$ αIgE stimuliert. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im zellfreien Überstand. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 lysierten Zellen. Es ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender abgebildet, d.h. für alle Versuche in A, B und C wurden die Mastzellen desselben Spenders am selben Tag verwendet.

Inhibitionsraten als mit den einzelnen Peptiden allein. Ein Maximum wurde mit 82% Inhibition bei Kombination von 1 µg/ml PAR-AP und 10 µg/ml PAR4-AP erreicht, das damit dem Effekt von 0,45 U/ml Thrombin (96% Inhibition) sehr nahe kam. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Inhibition der FcεRI-vermittelten Degranulation über beide Rezeptoren, PAR1 und PAR4 induziert wird, und dass beide Rezeptoren dabei kooperieren.

3.4.6.2 Die Transfektion von Mastzellen mit siRNA für PAR1 und PAR4 hat keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von Thrombin

Small interfering RNAs (siRNAs) sind 21-28 Nukleotide lange Sequenzen, die in der Zelle aus doppelsträngigen RNAs herausgeschnitten werden. Dort interagieren sie mit mRNA und initiieren ggf. deren Abbau und tragen somit zur Regulation der Genexpression bei. Synthetisch hergestellte siRNAs werden eingesetzt um bestimmte Gentranskripte zu blockieren und somit ihre Expression zu verringern. Um mittels einer anderen Herangehensweise zu überprüfen, ob und inwieweit PAR1 und PAR4 an der Thrombin-induzierten Inhibition der αIgE-induzierten Degranulation beteiligt sind, transfizierte ich Lungemastzellen mit PAR1- oder PAR4-siRNA oder mit beiden in Kombination für 72 h und untersuchte anschließend ihre Reaktivität im Hexosaminidase-Release Assay. Um einen möglichen durch den Prozess der Transfektion selbst ausgelösten Einfluss ebenfalls zu erfassen, wurde ein Teil der Zellen mit einer irrelevanten siRNA transfiziert. Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, führte die Transfektion der Zellen weder mit PAR1- noch mit PAR4-siRNA alleine und desgleichen auch nicht mit einer Kombination beider siRNAs zu einer Aufhebung des inhibierenden Effektes von Thrombin. Auch andere siRNA-Konzentrationen (100nM) und Transfektionszeiten (24 h, 48 h, 6 Tage) führten nicht zu einer erwarteten Reduktion oder Aufhebung des inhibitorischen Thrombineffektes (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse unterstützen somit nicht meine Hypothese, dass PAR1 und PAR4 an der Vermittlung des inhibitorischen Einfluss von Thrombin auf die αIgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen beteiligt sind. Allerdings ist auch bekannt, dass die Transfektion von Primärzellen mit siRNA häufig zu methodischen Problemen führt und so

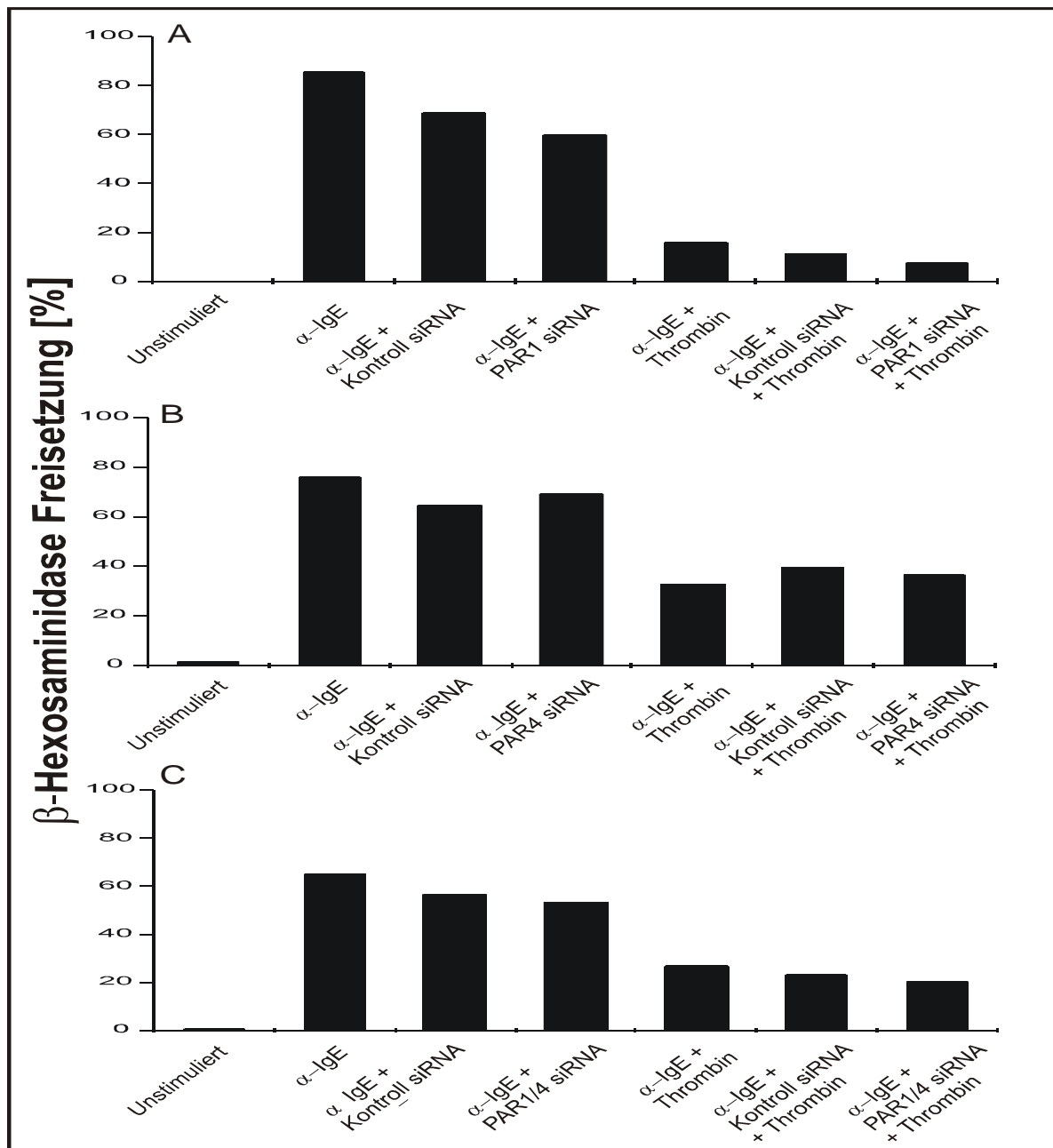


Abbildung 27: Einfluss einer Transfektion von PAR1 und PAR4 siRNA auf den inhibitorischen Effekt von Thrombin auf die Fc ϵ RI-vermittelte Mastzelldegranulation

Humane Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml mit 50 nM PAR1- oder PAR4-siRNA oder mit beiden in Kombination bei 37 °C für 72 h transfiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, versetzt mit 50 nM einer irrelevanten siRNA. Nach 72 h erfolgte eine 5-minütige Vorinkubation mit 0,45 U/ml Thrombin und anschließend eine 30-minütige Stimulation mit 1 μ g/ml α IgE. Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im Überstand. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 lysierten Zellen. Es ist ein repräsentatives von jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender abgebildet.

eine unzureichende Transfektion nicht auszuschließen ist (176). Aufgrund dieser methodischen Unsicherheiten wendete ich ein weiteres, auf der Wirkung von Pepduzinen beruhendes Verfahren zur Blockierung von PAR-Rezeptoren an.

3.4.6.3 Intrazelluläre Antagonisten für PAR1 und PAR4 (Pepduzine) heben Thrombins inhibitorischen Effekt auf die Mastzelldegranulation auf

Zur weiteren Überprüfung meiner Hypothese, dass PAR1 und PAR4 an der Thrombin-vermittelten Inhibition der Mastzelldegranulation beteiligt sind, verwendete ich in der aktuellen Literatur häufig zitierte anti-PAR-Reagenzien, die als Pepduzine bezeichnet werden. Diese sind, basierend auf der Aminosäuresequenz des dritten intrazellulären Loops des jeweiligen Rezeptors, 10–12 Aminosäuren lange Peptide, die eine Palmitinsäurerest an ihrem N-Terminus tragen. Dieser Rest verleiht dem Peptid die Eigenschaft die Zellmembran durchdringen zu können und gleichzeitig mit dem inneren „leaflet“ zu assoziieren. Im Intrazellularraum bindet das Pepduzin an den vierten intrazellulären Loop von PAR und blockiert so dessen Interaktion mit G-Proteinen (177, 178). Für das folgende Experiment wurden Lungenmastzellen entweder nur mit PAR1-Pepduzin (P1-Pep, 1 μ M) oder PAR4-Pepduzin (P4-Pep, 0,25 μ M) allein oder mit einer Kombination beider Pepduzine für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte Inkubation für 5 min mit 0,45 U/ml Thrombin und schließlich die Stimulation mit 3 μ g/ml α IgE für 30 min. Als Kontrollen dienten Zellen, die vorinkubiert wurden mit Puffer allein, mit P1-Pep oder P4-Pep allein oder mit beiden Pepduzinen in Kombination und anschließend in Abwesenheit von Thrombin mit α IgE stimuliert wurden. Wie aus Abbildung 28 hervor geht, beeinträchtigen PAR1- und PAR4-Pepduzin weder allein noch in Kombination die α IgE-vermittelte Degranulation. Ebenso ist zu erkennen, dass die Beladung der Zellen mit entweder PAR1- oder PAR4-Pepduzin alleine keine oder allenfalls eine sehr schwache Aufhebung des inhibitorischen Thrombineffektes bewirkten (Abb. 28, rechte Seite). Andere Pepduzinkonzentrationen (0,05-1 μ M) hatten ebenfalls keinen oder nur einen marginalen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Wurden jedoch Zellen mit beiden Pepduzinen gemeinsam vorinkubiert, war eine nahezu

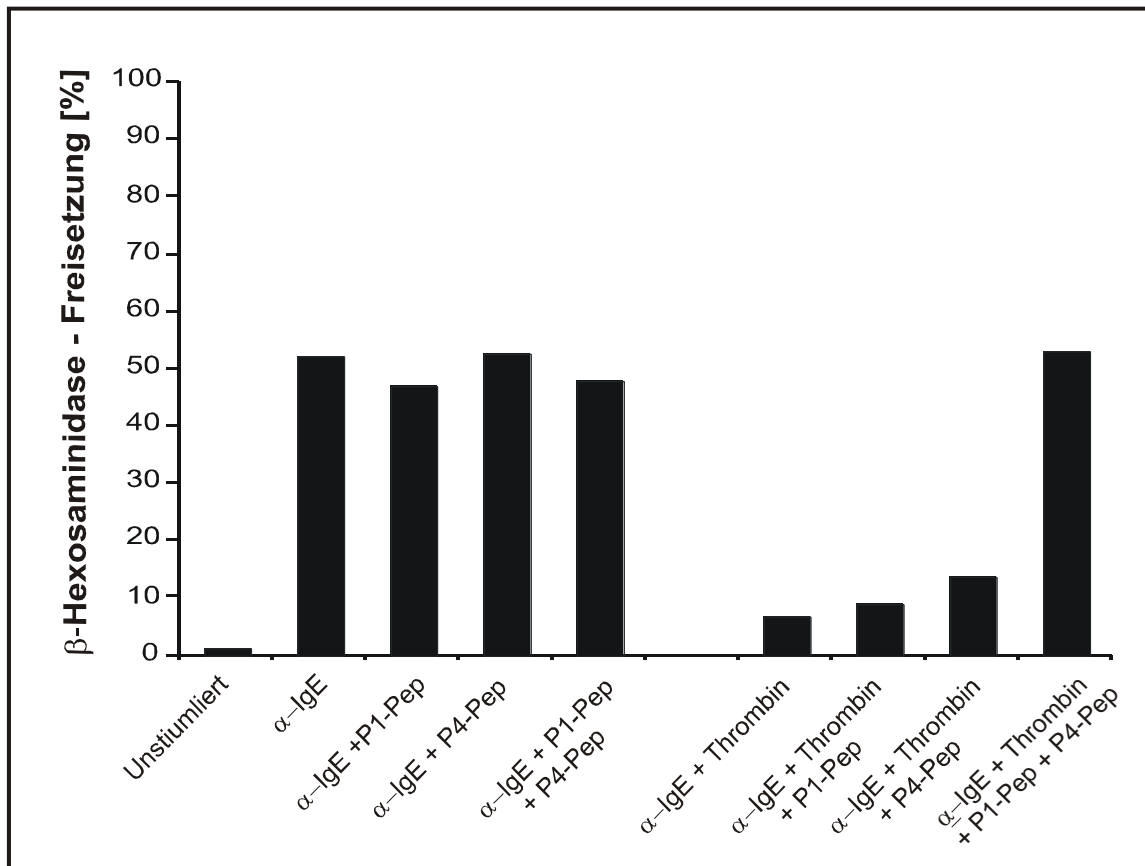


Abbildung 28: Einfluss von PAR1- und PAR4-Pepduzinen auf Thrombin-induzierte Inhibition die FcεRI-vermittelte Degranulation humaner Mastzellen

Humane Lungenmastzellen wurden zu 5×10^5 Zellen/ml in An- und Abwesenheit von $1 \mu\text{M}$ P1-Pep, $0,25 \mu\text{M}$ P4-Pep oder P1-Pep ($1 \mu\text{M}$) und P4-Pep ($0,25 \mu\text{M}$) in Kombination für 15 min bei 37°C inkubiert, dann mit $0,45 \text{ U/ml}$ Thrombin für 5 min inkubiert und schließlich mit $3 \mu\text{g/ml}$ αIgE für 30 min stimuliert. Als Kontrollen dienten die oben erwähnten Ansätze ohne Thrombin bzw. versetzt mit $0,45 \text{ U/ml}$ Thrombin oder Puffer und $3 \mu\text{g/ml}$ αIgE . Bestimmt wurde die freigesetzte β -Hexosaminidase im Überstand. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität (=100%), bestimmt in mit 0,05 % Triton-X 100 lysierten Zellen. Es ist ein repräsentatives von jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Mastzellen verschiedener Spender abgebildet.

vollständige Aufhebung des inhibitorischen Einflusses von Thrombin auf die α IgE-induzierte Degranulation zu beobachten. Dieses Ergebnis unterstützt meine Hypothese, dass Thrombin seinen inhibitorischen Einfluss über PAR1 und PAR4 vermittelt und dass eine effiziente Inhibition durch Thrombin die Kooperation beider Rezeptoren voraussetzt. Es steht damit im Einklang mit meinen Befunden im Abschnitt 3.4.6.1, die ebenfalls eine Kooperation von PAR1 und PAR4 (hier stimuliert durch PAR-AP) als effektiven Mechanismus zur Inhibition der Mastzelldegranulation nahelegen.

Nochmals zusammengefasst konnte ich in meiner Arbeit also erstmals zeigen, dass Thrombin die Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation sowohl von primären Lungen- und Hautmastzellen als auch von Zellen der Linie LAD 2 effektiv inhibiert, dass dafür die enzymatische Aktivität des Thrombins erforderlich ist, und dass die beiden Rezeptoren PAR1 und PAR4 in kooperativer Weise die inhibitorische Wirkung des Thrombins vermitteln.

4 Diskussion

Mastzellen sind als wichtige Komponenten von Immunreaktionen und hier besonders als Vermittler allergischer Reaktionen bekannt. Zahlreiche Berichte existieren über die Beteiligung dieser Zellen sowohl an der angeborenen als auch an der adaptiven Immunabwehr. Wie für murine Mastzellen gezeigt wurde, sind sie z. B. durch die Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und Leukotrienen (LTB_4 und LTC_4) an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer bakteriellen Infektion beteiligt (42), und die Fähigkeit von humanen Mastzellen IL-8 zu produzieren ist ein Hinweis für deren Beteiligung an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (50). Beschrieben ist auch die Eigenschaft von humanen Mastzellen als antigenpräsentierende Zellen zu fungieren (38, 51). Gezeigt wurde die Expression von MHC II-Molekülen auf Zellen der Linie HMC-1 als auch auf primären humanen Mastzellen, z.B. der Haut. Die Antigenpräsentation über MHC-II führt zur Aktivierung von CD4^+ T-Zellen (51). Ursprünglich als Schlüsselzellen in der Abwehr von vielzelligen Parasiten beschrieben, kommt den Mastzellen heute eine immer größere Rolle als finale Mediatoren bei allergischen Reaktionen zu. Die Aktivierung von Mastzellen durch Allergene, vermittelt über die Kreuzvernetzung von $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -gebundenen IgE-Molekülen, führt dabei zur Ausschleusung verschiedenster Mediatoren, die dann die für eine Allergie bekannten Symptome wie Niesen, Juckreiz und Hustenanfälle auslösen, bis hin zu schwerwiegenden Symptomen wie starker Blutdruckabfall, Atemnot und Erstickungsanfälle (52). Somit sind Mastzellen die Hauptakteure während einer akuten allergischen Reaktion.

Es ist bekannt, dass Mastzellen auch über IgE-unabhängige Mechanismen aktiviert werden können. Ein kürzlich beschriebener Weg ist die Aktivierung über Proteinase-aktivierbare Rezeptoren (PAR), einer neuen Klasse aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Segment-Rezeptoren. Arbeiten hauptsächlich im murinen System haben gezeigt, dass PAR involviert sind in entzündliche und allergische Prozesse, die durch Mastzellaktivierung induziert werden. Sie stellen somit eine neue und wichtige

Rezeptorklasse für die Regulation von Mastzellfunktionen dar. In der Tat existieren zahlreiche Berichte über die Induktion von Mastzelldegranulation durch Thrombin und PAR-AP. E. Razi und G. Marx konnten nach Stimulation mit Thrombin die Freisetzung von β -Hexosaminidase aus murinen Mastzellen des Knochenmarks zeigen (124). Eine andere Arbeit von G. Cirino und A. Kawabata zeigte im Tiermodell, dass Thrombin- bzw. Trypsininjektion in die Pfote von Ratten zu starker Ödembildung führt, induziert durch die Freisetzung von Histamin und Serotonin aus Mastzellen und die daraus resultierende erhöhte Gefäßpermeabilität (131, 133). Dugina *et al.* beschreiben die Freisetzung von Histamin nach Stimulation von murinen Mastzellen mit Thrombin und Trypsin. Die Autoren konnten weiterhin zeigen, dass die Degranulation von Mastzellen bei einer akuten Peritonitis signifikant höher war als diejenige in Mastzellen aus gesundem Gewebe (179). Diese und andere Befunde lassen darauf schliessen, dass PAR-vermittelte Prozesse maßgeblich in entzündliche mastzellabhängige Prozesse involviert sind. Während PAR auf Mastzellen für das murine System gut untersucht sind, beschränken sich die Befunde für das menschliche System auf einige wenige Arbeiten. Diese befassen sich hauptsächlich mit der Expression von PAR auf der mRNA-Ebene oder weisen das Rezeptorprotein immunhistochemisch in Gewebeschnitten, kaum aber auf viablen isolierten Mastzellen nach (135). So zeigt z.B. eine Arbeit von D'Andrea *et al.* die Expression von PAR1 und PAR2 auf humanen Mastzellen in Gewebeschnitten der Haut und der Submukosa des Darms (135). Die vorliegenden funktionellen Untersuchungen sind auf die Charakterisierung von PAR2 auf Zellen der Mastzelllinien HMC-1 und LAD 2 oder auf humane Mastzellen der Haut beschränkt (1, 151). Andere Autoren beschreiben die Aktivierung von humanen Mastzellen des Darms oder der Nabelschnur durch PAR2-Agonisten wie Trypsin und PAR2-AP (137, 151, 158). Moormann *et al.* fanden heraus, dass humane Hautmastzellen funktionellen PAR2 exprimieren, und die Autoren postulierten eine Beteiligung von PAR2 an allergischen Reaktionen der Haut (1). Diese ersten Indizien für eine Beteiligung von PAR an allergische Reaktionen beim Menschen und die Tatsache, dass diese interessanten Rezeptoren auf humanen Mastzellen bisher kaum charakterisiert worden sind, führten zu meiner Beschäftigung mit diesem

Thema. Der Zugang zu humanen primären Lungenmastzellen in der Arbeitsgruppe Biologische Chemie am FZB ermöglichte mir die Charakterisierung von PAR dieses schwer zugänglichen und daher bislang nur wenig untersuchten Mastzelltyps. Zum Vergleich verwendete ich die bisher häufiger untersuchten primären Hautmastzellen und Zellen der Linie LAD 2, da diese von allen bislang verfügbaren humanen Mastzelllinien den Primärzellen in ihren für Mastzellen typischen Eigenschaften am nächsten kommen (144).

Im ersten Teil meiner Arbeit untersuchte ich einerseits die Expression von PAR auf humanen Mastzellen und andererseits deren Reaktionsbereitschaft gegenüber PAR-spezifischen Liganden, wie den synthetischen PAR-aktivierenden Peptiden und den als physiologisch anzusprechenden PAR-spezifischen Proteinase. Ein sehr einheitliches und klares Bild erhielt ich hinsichtlich der mRNA-Expression dieser Rezeptoren. Unter Verwendung PAR-spezifischer Primer gelang es mir sowohl mittels qualitativer PCR als auch durch Einsatz quantitativer RT-PCR-Methoden nachzuweisen, dass isolierte humane *Mastzellen der Lunge, der Haut und LAD 2-Zellen konstitutiv mRNA für PAR1, 2, 3, und -4 exprimieren. Diese Befunde bestätigen einerseits die bereits von Moormann et al. beschriebene Expression aller vier PAR auf humanen Mastzellen der Haut (1),* und erweitern andererseits als neue Befunde den Kenntnisstand zur PAR-mRNA-Expression in humanen Lungenmastzellen und der Zelllinie LAD 2.

Kein so einheitliches Bild erhielt ich dagegen für die Expression der Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche und die Funktionalität der einzelnen PAR. Im Falle des PAR1 liess sich mittels eines für diesen Rezeptor spezifischen Antikörpers dessen Zelloberflächenexpression sowohl auf unstimulierten Primärzellen als auch auf LAD 2-Zellen deutlich nachweisen. Für die Funktionalität des PAR1 sprachen sowohl die Degranulationsbereitschaft aller drei Mastzelltypen gegenüber PAR1-AP als auch die Induktion von Ca-Signalen durch PAR1-AP und Thrombin, einem klassischen physiologischen PAR1-Liganden, der allerdings auch mit PAR4 zu interagieren vermag. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Befunden zur Expression von PAR1-Protein auf murinen und humanen Mastzellen. So beschreibt die

Arbeit von H. Vliagoftis *et al.* die Expression von PAR1 in murinen Knochenmarkszellen (126), während Moormann und D'Andrea *et al.* zeigen konnten, dass humane Mastzellen der Lymphknoten, der Submukosa des Dickdarms und der Haut ebenfalls PAR1 exprimieren (1, 135). Allerdings beschränken sich letztere Befunde auf Untersuchungen in Gewebeschnitten (135). So stellen die von mir erhaltenen Ergebnisse neue Befunde für die PAR1-Expression auf zellulärer Ebene dar, insbesondere für die bislang nicht nachgewiesene Expression des Rezeptors auf humanen Lungenmastzellen. Auch über die Funktionalität des PAR1 auf humanen Mastzellen war bislang nichts bekannt. Unter Verwendung des aktivierenden Peptids für PAR1-AP zeigte ich erstmals eine PAR1-vermittelte Induktion der Degranulation und die Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen in humanen Mastzellen der Lunge, der Haut und in LAD 2-Zellen. Die Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen durch Thrombin, im Zusammenhang gesehen mit der Fähigkeit des Enzyms zur Desensibilisierung sowohl des durch PAR1-AP in Mastzellen induzierten Ca-Signals als auch der PAR1-AP-induzierten Degranulation unterstützen meine Ergebnisse zur Funktionalität des Mastzell-exprimierten PAR1. Die als gesichert geltende Eigenschaft von Thrombin, direkt Degranulation in murinen Mastzellen (128, 163, 180) zu induzieren, konnte ich für humane Mastzellen nicht reproduzieren. Auf mögliche Gründe für diese Diskrepanz werde ich später, nach Diskussion der Einzelbefunde für die anderen PAR, noch genauer eingehen.

Meine Untersuchungen zur Zelloberflächenexpression des PAR2 auf humanen Mastzellen führten zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. So konnte ich PAR2 mittels eines rezeptorspezifischen Antikörpers auf der Zelloberfläche von Lungenmastzellen und LAD 2-Zellen nicht detektieren, obwohl dessen Expression für LAD 2-Zellen bereits beschrieben wurde (151). Auch für die für Hautmastzellen bereits beschriebene PAR2-Oberflächenexpression (1) ergaben sich Unterschiede. So waren diese Zellen in meinen Experimenten ganz überwiegend negativ für PAR2, d.h. nur auf einer von 10 Mastzellpräparationen konnte ich eine schwache PAR2-Expression nachweisen. Alle drei Zelltypen exprimierten PAR2 jedoch sehr deutlich intrazellulär. Eine solche intrazelluläre Expression ist bislang für Hautmastzellen und LAD 2-Zellen gezeigt worden (1, 151),

während für Lungenmastzellen derartige Befunde noch nicht vorlagen. Die mangelnde Degranulationsbereitschaft aller drei Zelltypen gegenüber PAR2-AP und Trypsin, einem physiologischen PAR2-Liganden, schien das Fehlen einer PAR2-Oberflächenexpression zu bestätigen. Allenfalls eine sehr schwache, dabei aber reproduzierbare Degranulationsantwort von Hautmastzellen und LAD 2 gegenüber PAR2-AP liess Zweifel an dieser Annahme aufkommen, und in deutlichem Widerspruch dazu stand mein Befund, dass sowohl PAR2-AP als auch Trypsin in allen Zelltypen deutliche Ca-Signale induzierten, was für die Expression funktioneller PAR2 spricht. Einer der Gründe für diese widersprüchlichen Befunde könnte darin bestehen, dass Mastzellen eine sehr variable Expression von PAR2 besitzen, die ihre Detektion mit nicht ausreichend sensitiven Antikörperreagenzien erschwert. So zeigte erst kürzlich die Arbeit von Carvalho *et al.* eine variable Expression von PAR2 auf humanen Mastzellen der Haut. Die Autoren beschreiben eine stark erhöhte Expression von PAR2 auf Mastzellen in entzündetem Hautgewebe (151). Dieser Befund und das Ergebnis, dass humane Mastzellen PAR2 intrazellulär exprimieren (und möglicherweise auf die Zelloberfläche mobilisieren können?) veranlasste mich, über eine Aufregulation des PAR2 in diesen Zellen nachzudenken. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Zytokine wie IL1 β , TNF α oder TGF β in der Lage sind, die Expression von PAR2 auf humanen glatten Muskelzellen, Endothelzellen oder Fibroblasten zu erhöhen (152-154). Meine mit LAD 2-Zellen durchgeführten Experimente zur Aufregulation des PAR2 durch diese Zytokine führten jedoch nicht zur erhöhten Expression des Rezeptors auf den untersuchten Zellen. Es ist zu vermuten, dass die in diesen Versuchen *in vitro* nachgestellten Bedingungen denjenigen *in vivo* nicht gerecht werden und eine messbare Aufregulation des Rezeptors daher nicht erfolgte. Womöglich ist die Expressionsdichte des Rezeptors auf der Oberfläche von humanen „gesunden“ Mastzellen sehr gering und liegt somit zumeist unterhalb der Detektionsgrenze des hier eingesetzten Antikörpers. Anzumerken bleibt noch, dass in humanen Mastzellen anderer Gewebeherkunft (Vorhaut und Darm) durch Stimulation mit Trypsin oder PAR2-AP durchaus eine Degranulationsantwort induziert werden konnte (137,

151, 158). Dieses weist darauf hin, dass die individuellen Funktionen von Mastzellen auch von ihrer Gewebelokalisation abhängig sein können.

Trotz der eindeutig positiver Nachweise von PAR3 in Primärzellen und LAD 2-Zellen auf mRNA-Ebene, war mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des anti-PAR3-Antikörpers (4 µg/ml) auf keinem der verwendeten Zelltypen eine Zelloberflächenexpression dieses Rezeptors detektierbar. Erst unter Verwendung einer sehr hohen Antikörperkonzentration (32 µg/ml) war es möglich ein positives Signal zu erhalten. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich einige Arbeiten, die zum Nachweis der PAR3-Oberflächenexpression denselben Antikörper verwenden. So ist für humane Blutplättchen, Endothelzellen aus der Nabelschnur und für Monozyten eine PAR3-Expression beschrieben worden (86, 181, 182). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass für die Detektion des PAR3 auf diesen Zellen extrem hohe Antikörperkonzentrationen (100 µg/ml) eingesetzt wurden. Auch ich setzte daraufhin in meinen Experimenten zusätzlich höhere Antikörperkonzentrationen ein und stellte zu meiner Überraschung fest, dass das mit 32 µg/ml Antikörper erhaltenen positive Signal bei Erhöhung der Konzentration auf 64 µg/ml drastisch weiter zunahm (Daten nicht gezeigt). Diese mangelnde Sättigung der Antikörperreaktion liessen es zweifelhaft erscheinen, dass es sich um ein spezifisches Signal handelt und PAR3-Protein also tatsächlich exprimiert ist. Vielmehr kam ich zu dem Schluss, dass eine Expression durch die hohe Antikörperkonzentrationen, d.h. durch unspezifische Bindung, nur vorgetäuscht wird. Über die Funktionalität dieses Rezeptors ist bisher sehr wenig bekannt. Die nachgewiesene Eigenschaft von PAR3 als „non-signalling“ Rezeptor gegenüber potentiellen synthetischen Peptiden („PAR3-AP“) und Thrombin, machen es sehr schwer seine funktionelle Eigenschaften zu untersuchen. Obwohl Thrombin als PAR3-Ligand beschrieben ist, konnte bislang noch keine direkte Aktivierung von nativem, Zell-exprimiertem PAR3 durch Thrombin gezeigt werden. Lediglich mittels PAR3-transfizierter COS7-Zellen konnte eine proteolytische Spaltung des nativen Rezeptors durch Thrombin demonstriert werden (110). Diskutiert wird eine Korezeptorfunktion des PAR3 sowohl für das

murine als auch für das humane System. Coughling *et al.* haben gezeigt, dass die Aktivierung von PAR3 auf murinen Blutplättchen selbst keine Zellanwort („non-signaling“) hervorruft, jedoch die durch PAR4-vermittelte Aktivierung von Thrombozyten, induziert durch geringe Thrombinkonzentrationen, begünstigt (91). Ein ähnliches Phänomen wurde für PAR3 als Korezeptor für PAR1 im humanen System beschrieben. Hier kommt es zur Heterodimerisierung zwischen PAR1 und PAR3 auf humanen Endothelzellen. Diese Dimerisierung führt zur Konformationsänderungen im PAR1-Molekül und begünstigt so die Interaktion mit bestimmten G-Proteinen im Intrazellularraum. Auch hier führt die Kooperation der beiden Rezeptoren nach Aktivierung mit Thrombin zu einer Verstärkung der induzierten Zellantwort (87).

PAR4-mRNA war in allen drei untersuchten Mastzelltypen nachweisbar. Zudem konnte ich erstmals eine, wenn auch variable, PAR4-Oberflächenexpression in humaner Mastzellen zeigen. So erwiesen sich LAD 2-Zellen negativ für die Expression von PAR4, während primäre Lungen- und Hautmastzellen in ca. 50% der untersuchten Mastzellpräparationen eine deutliche Expression zeigten. Auch hier könnte ein Grund für die schwankende Detektierbarkeit des Rezeptors in der mangelnden Sensitivität des spezifischen Antikörpers zu suchen sein, denn gleichzeitig stellen die Induktion von Mastzelldegranulation und intrazellulären Ca-Signalen durch das PAR4-AP ein aussagekräftiges Indiz für die Expression von funktionellem PAR4 auf primären humanen Mastzellen und LAD 2-Zellen dar. Bestätigt wird die Anwesenheit von PAR4 auch durch das eindeutig messbare Ca-Signal in allen Zelltypen, induziert durch PAR4-AP. Das durch Thrombin (PAR4- und zusätzlich PAR1-Ligand) induzierte Signal ist dagegen nur mit Einschränkung positiv zu werten. Über die Expression von PAR4 in humanen Mastzellen war bisher nichts bekannt. Lediglich mRNA-Expression für PAR4 konnte in humanen Hautmastzellen nachgewiesen werden (1). Für die variable Expression von PAR4 wäre ausser der PAR4-Antikörper-Sensitivität auch folgender Grund denkbar: Ähnlich wie im Falle der PAR2-Expression könnte ein verändertes Zytokinmilieu die Expression des Rezeptors auf Mastzellen modulieren. Wie berichtet wurde, ist das Zytokin IL-12 in der Lage, die PAR4-Expression in murinen Mastzellen der Linie P815

sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu erhöhen (156). Es wäre denkbar, dass die hier untersuchten Mastzellen (Lungen- und Hautmastzellen) im ursprünglichen Gewebeverband möglicherweise erhöhten Konzentrationen dieses und/oder anderer Zytokine *in vivo* ausgesetzt waren. Obwohl Lungenmastzellen gezielt nur aus tumorfreiem Lungengewebe von Tumorpatienten, und Hautmastzellen aus Hautgewebe von Patienten, die sich einem Schönheitschirurgischen Eingriff unterzogen hatten verwendet wurde, ist nicht vollständig auszuschließen, dass die betreffenden Gewebeareale *in vivo* z.T. doch entzündlichen Prozessen ausgesetzt waren. Da schon Versuche zur Aufregulation von PAR2 mit Zytokinen *in vitro* keine positiven Resultate erbracht hatten (s.o.), verzichtete ich auf entsprechende Experimente zur Aufregulation von PAR4. Insgesamt stellen meine Ergebnisse den erstmaligen Nachweis der Expression und der Funktionalität von PAR4 auf Mastzellen. Bislang ist nur für murine Mastzellen die Aktivierbarkeit durch PAR4-AP, nicht jedoch die Expression des Rezeptorproteins gezeigt worden (183).

Ein ganz zentrales und unerwartetes Ergebnis meiner Arbeit stellte das Ausbleiben einer Degranulationsantwort nach Stimulation humaner Mastzellen der Lunge und der Haut mit PAR-spezifischen Proteinase dar. Keine der hier eingesetzten Proteinase (APC, Elastase, Chymase, Faktor Xa, Kathepsin G, Metalloproteinase-1, Plasmin, Thrombin, Trypsin und Trypsin) induzierte eine Mastzelldegranulation, obwohl deren Zielstrukturen PAR1, PAR2 und PAR4 als funktionelle Rezeptoren auf Mastzellen exprimiert sind und die hier eingesetzten spezifischen aktivierenden Peptide (zumindest für PAR1 und PAR4) das Potential zur Induktion einer deutlichen Degranulationsantwort besitzen. Zudem konnte die Induktion eines intrazellulären Ca-Signals lediglich nach Stimulation mit Thrombin oder Trypsin beobachtet werden.

Die Aktivierung anderer Zellpopulationen durch diese PAR-spezifischen Proteinase ist bereits gut untersucht. So weiß man heute, dass APC (aktiviertes Protein C), Elastase, Metalloproteinase-1 und Plasmin zwar monospezifisch PAR1 aktivieren, jedoch ist für keines dieser Enzyme Induktion der Mastzelldegranulation beschrieben. Plasmin als PAR1-Aktivator

induziert die Freisetzung von intrazellulären Kalziumionen in Astrozyten (119) und L.R. Gorbacheva zeigte, dass geringe APC-Konzentrationen (0,01-10 nM) vermittelt über PAR1 eine protektive Wirkung auf Neurone des Hippocampus besitzen, während höhere Konzentrationen (> 50 nM) den Zelltod induzierten (120). Das aus neutrophilen Granulozyten stammende Enzym Elastase aktiviert PAR1 auf humanen Epithelzellen (118), während für murine und humanen Mastzellen bislang keine Befunde vorliegen. Des weiteren ist gezeigt worden, dass MMP-1 vermittelt durch PAR1 das Wachstum von humanen Brustkrebszellen beeinflusst (161), oder im Tiermodell über Aktivierung des PAR1 auf Blutplättchen maßgeblich zur Entwicklung einer Thrombose beiträgt (162).

Die beiden Mastzellproteinasen Chymase und Tryptase sind bekannt als monospezifische Liganden für PAR2. Während für Tryptase bislang keine Induktion von Mastzelldegranulation, weder in murinen noch in humanen Mastzellen beschrieben wurde, weiß man, dass Chymase Degranulation in murinen Mastzellen induziert (184, 185). Für Tryptase ist die Freisetzung von Kalziumionen in humanen Mastzellen der Haut berichtet worden (1). Allerdings konnte ich diese oben genannten Befunde in meinen Untersuchungen mit Tryptase und Chymase nicht bestätigen.

Die Enzyme Faktor Xa, Kathepsin G, Thrombin und Trypsin besitzen Spezifität für mehr als einen PAR. In der wissenschaftlichen Literatur liegen Berichte vor, denen zufolge Thrombin (Ligand für PAR1, PAR3 und PAR4) und Trypsin (Ligand für PAR2 und PAR4) Degranulation in Mastzellen induzieren. Thrombin induziert eine deutlich messbare Degranulation muriner Mastzellen über die Aktivierung von PAR1 (128, 163, 180) und fördert die Adhäsion dieser Zellen an Fibronectin (126). Es ist an der PAR1- und PAR4-vermittelten Sekretion und Aggregation humaner Blutplättchen beteiligt (92). Über die Funktion von Thrombin auf humanen Mastzellen ist bislang nichts berichtet worden. Ich konnte zwar keine Degranulation nach Stimulation mit Thrombin zeigen, dafür aber die Induktion eines deutlichen Ca-Signals sowohl in humanen Lungen- und Hautmastzellen als auch LAD 2-Zellen. Trypsin, ein Enzym des Verdauungssystem, ist für seine PAR2-Spezifität auf verschiedenen Zellen bekannt. So induziert es Degranulation in humanen Mastzellen des

Darms und der Vorhaut (137, 158) und löst ein Ca-Signal in humanen Hautmastzellen aus (1). Letzteres konnte ich erstmals auch für Lungenmastzellen und LAD 2-Zellen zeigen und für Hautmastzellen bestätigen, während eine Degranulation mit Trypsin in meinen Experimenten nicht zu beobachten war. Trypsin reagiert auch mit PAR2 auf Jurkatzellen (T-Zell-Linie) oder glatten Muskelzellen und induziert deutliche Ca-Signale in diesen Zellen (101, 186). Faktor Xa aktiviert sowohl PAR1 als auch PAR2. Es induziert die Kollagenbildung und Proliferation in Fibroblasten (vermittelt über PAR1) (159), oder aktiviert Endothelzellefunktionen über PAR1 und PAR2 (160). Die aus neutrophilen Granulozyten stammende Proteinase Kathepsin G inaktiviert PAR1 (z.B. auf Monozyten) (115) und aktiviert PAR4 (z.B. Blutplättchen) (112). In meinen Versuchen konnte ich mit Kathepsin G weder Degranulation noch Ca-Signale in humanen Mastzellen messen, noch existieren vorangegangene Untersuchungen anderer Autoren, die eine solche Aktivierung beschreiben. Im Gegensatz zu diesen zahlreichen Befunden über die Aktivierung von PAR durch die hier verwendeten PAR-spezifischen Proteinase in verschiedenen Zellsystem konnte ich für keines der Enzyme Mastzelldegranulation, und nur für Thrombin und Trypsin die Induktion eines Ca-Signals zeigen, obwohl die korrespondierenden PAR-AP beides, Degranulation und Ca-Signale auslösten. Wie ist diese Diskrepanz zu erklären? In der Literatur existieren einige Arbeiten, die Unterschiede in der Art der Interaktion für PAR-AP und ihren korrespondierenden physiologischen Liganden beschreiben. Hollenberg *et al.* gelang es, durch eine Mutation in der zweiten extrazellulären Loop des Rezeptors die Induktion eines Ca-Signals durch das PAR2-AP zu reduzieren, während die durch Trypsin induzierte Aktivierung nicht beeinflusst wurde, obwohl beide Aktivatoren die gleiche Aktivierungssequenz („*tethered ligand*“ Sequenz) besitzen. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die Interaktion des sich in Lösung befindlichen PAR2-AP mit dem Rezeptor eine Andere ist, als diejenige mit dem durch Trypsin generierten, rezeptorgebundenen Liganden (*tethered ligand*) (187). Eine andere Arbeit konnte ein solchen Unterschied auch für Thrombin und PAR1-AP deutlich machen. Auch in dieser Arbeit stellten die Autoren die Hypothese auf, dass für PAR-1-AP und Thrombin

unterschiedliche Interaktionsmechanismen existieren. Die Autoren führten an, dass PAR-AP im Vergleich zum *tethered ligand* womöglich mit zusätzlichen Bereichen des Rezeptors interagieren (187, 188). Welche strukturellen Merkmale jedoch dafür verantwortlich sind bleibt unklar. Es wäre also denkbar, dass die Stimulation humaner Mastzellen mit PAR-AP, bedingt durch eine höhere Flexibilität dieser Peptide, sowohl eine Degranulationsantwort als auch ein Ca-Signal induziert, während der durch die Enzyme Thrombin und Trypsin freigesetzte gebundene Ligand durch seine eingeschränkte Flexibilität lediglich in der Lage ist ein Ca-Signal zu bewirken.

Dieses erklärt jedoch nicht meine Beobachtung, dass nur Thrombin und Trypsin ein Ca-Signal induzierten und andere PAR-spezifische Proteinase weder Degranulation noch ein Ca-Signal zeigten. Ein möglicher Grund für diese unterschiedliche Reaktivität verschiedener PAR-spezifischer Proteinase könnte die unterschiedliche Glykosylierung der Oberfläche verschiedener Zellpopulationen sein. So ist für murine und humane Epithelzellen der Niere (KNRK-Linie bzw. HEK-Linie) bereits beschrieben, dass die PAR2-spezifische Proteinase Tryptase den PAR2 nicht aktiviert, während Trypsin und das PAR2-AP (SLIGRL) dazu in der Lage waren. Beide Enzyme (Trypsin und Tryptase) waren jedoch in der Lage das aktivierende PAR2-Peptid aus einem 20 Aminosäuren langen synthetischen Peptid abzuspalten. Erfolgte vor der Stimulation mit Tryptase eine Behandlung der Zellen mit Neuraminidase, einem Enzym zur Entfernung von Sialinsäureresten auf der Zelloberfläche, oder wurde unter Verwendung eines Inhibitors die N-Glykosylierung der Zelloberfläche unterbunden, so war eine deutliche Aktivierung dieser Zellen durch Tryptase zu beobachten (189, 190). Alle vier PAR besitzen potentielle Glykosylierungsbereiche in ihrer extrazellulären Rezeptordomäne (191). Für PAR1 konnten bislang fünf und für PAR2 zwei N-verknüpfte Glykosylierungsbereiche im extrazellulären Bereich des Rezeptors nachgewiesen werden (191, 192). Über das Glykosylierungsmuster von PAR4 ist bisher nichts bekannt. Diese oben beschriebenen Befunde stellen zumindest eine Erklärungsmöglichkeit für die Beobachtung dar, dass gegenüber humanen Mastzellen lediglich Thrombin und Trypsin in der Lage sind eine Aktivierung zu bewirken, während alle anderen Proteinase (APC, Elastase, Chymase,

Faktor Xa, Kathepsin G, Plasmin und Trypsin) negativ für eine Zellaktivierung waren. Womöglich sind diese Enzyme sterisch daran gehindert in optimaler Weise mit ihren Rezeptoren zu interagieren, um dadurch eine Zellantwort zu induzieren. Um dieses zu klären wären sehr komplexe weiterführende Experimente zur gezielten Deglykosylierung der Rezeptoren oder auch der Zelloberfläche erforderlich, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar waren.

Die Präsenz der beiden „klassischen“ Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 auf allen von mir untersuchten Mastzellpopulationen liess die Frage aufkommen, ob Thrombin, wie z.B. für humane Thrombozyten beschrieben, beide PAR aktiviert (92) oder ob es möglicherweise nur zur Interaktion mit einem der Rezeptoren kommt. Dass Thrombin auch in Abwesenheit eines der beiden oder separat mit den Rezeptoren interagieren kann, wurde durch Arbeiten gezeigt, die z.B. eine erhöhte Expression von IL-6 und IL-1 in mononukleären Zellen nach PAR1-vermittelter Stimulierung mit Thrombin beschreiben (98). Thrombin induziert auch, durch PAR1-vermittelt, die Adhäsion von murinen Mastzellen an Fibronectin (126), oder bewirkt Mastzelldegranulation in murinen Knochenmarksmastzellen (124, 163). Über die Interaktion von Thrombin mit humanen Mastzellen wurde dagegen bislang nichts berichtet. Belege für eine Interaktion mit PAR1 lieferten von mir durchgeführte Desensibilisierungsversuche in denen es nach Vorinkubation humaner Lungenmastzellen mit Thrombin als auch mit PAR1-AP zur Internalisierung von auf der Oberfläche exprimiertem PAR1 kam. Durch Verwendung eines spezifischen PAR1-Antikörpers, der sowohl den intakten als auch den durch Proteinase gespaltenen Rezeptor erkennt, konnte ausgeschlossen werden, dass das Verschwinden des PAR1-Signals von der Zelloberfläche nach Inkubation mit Thrombin lediglich durch proteolytische Spaltung des Rezeptors zustandekam, eine Internalisierung also lediglich simuliert wurde. Ein solches Phänomen ist z.B. für die potentielle Spaltung von PAR1 durch Kathepsin G beschrieben worden (107, 184) (s. auch 1.2.2). Bestätigt wurden diese Befunde zur funktionellen Interaktion von Thrombin mit PAR1 auch durch die Fähigkeit des Enzyms zur Desensibilisierung der durch PAR1-AP-

induzierten Degranulationsantwort und des Ca-Signals. Nach vorangegangener Stimulation mit Thrombin wurden ausser den durch PAR1-AP induzierten Zellantworten in Lungen- und Hautmastzellen auch die durch PAR4-AP induzierte Degranulation desensibilisiert, wobei das Signal von PAR1-AP stärker inhibiert wurde als dasjenige von PAR4-AP. Ebenso erfolgte eine Desensibilisierung der durch PAR1-AP und PAR4-AP-induzierten Ca-Signale in humanen Lungenmastzellen. Für die vollständige Desensibilisierung des PAR4-AP-Signals war jedoch eine ca. 20-fach höhere Thrombinkonzentration erforderlich als für diejenige des PAR1-AP-Signals. In der Literatur findet man Berichte, die eine solche unterschiedliche Aktivierungskinetik für PAR1 und PAR4 bereits beschrieben haben (92, 175). So konnten Coughlin *et al.* zeigen, dass durch Blockade von PAR1 die durch geringe Thrombinkonzentrationen (1 nM) induzierte Aktivierung humaner Blutplättchen aufgehoben wurde, nicht jedoch diejenige induziert durch eine 30-fach höhere Thrombinkonzentration (17). Somit zeigen meine Resultate nicht nur, dass Thrombin mit beiden Rezeptoren, PAR1 und PAR4, auf humanen Mastzellen interagiert, sondern legen darüberhinaus nahe, dass diese Interaktion ähnlich wie bei humanen Thrombozyten mit unterschiedlicher Affinität erfolgt – hochaffin mit PAR1 und niedrig affin mit PAR4.

Meine Befunde, dass Thrombin in humanen Lungenmastzellen die Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen vermittelt, gleichzeitig aber keine Degranulation der Zellen induziert, führten mich zu der Vermutung, dass dieser Proteinase eine kostimulatorische Funktion zukommen könnte. Diese Annahme basierte auf Befunden anderer Autoren, denen zufolge PAR-spezifischen Proteinase regulatorische Funktionen auf Zellantworten zugeschrieben werden. Ein erst kürzlich veröffentlichter Bericht zeigt, dass Plasmin (PAR1-Ligand) Funktionen des NMDA-Rezeptors (N-methyl-D-aspartat-Rezeptor) auf Astrozyten zu potenzieren vermag (119). Vor allem aber konnte für Thrombin ein synergistischer Einfluss auf die Allergen-induzierte Degranulation muriner Mastzellen demonstriert werden. Wie die Autoren berichten, lässt sich die FcεRI-induzierte IL-6-Freisetzung dieser Zellen durch Kostimulation mit Thrombin deutlich erhöhen (132). Meine eigenen Untersuchungen zum Einfluss von Thrombin auf die FcεRI-induzierte Degranulation humaner Mastzellen führten zu

einem überraschenderweise ganz anderen Ergebnis. Wider Erwarten bewirkte Vorinkubation von humanen Mastzellen der Lunge und der Haut und von LAD 2-Zellen mit Thrombin eine deutliche Inhibition der α IgE-induzierten Degranulation. Diese erwies sich als ein konzentrations- und zeitabhängiges Phänomen. So wurde maximale Inhibition (um 80%) ab einer Konzentration von 0,45 U/ml Thrombin, einer durchaus als physiologisch zu bezeichnenden Konzentration erreicht, und eine Vorinkubationszeit von 5-10 min war bereits ausreichend, um maximale Inhibition zu induzieren, während gleichzeitige Stimulation mit Thrombin und α IgE weitaus weniger effektiv war. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Thrombin im humanen System die Funktion eines negativen Regulators der primären Mastzellaktivierung ausüben könnte. Wie analoge Experimente mit LL 37 und Substanz P als Mastzellstimulatoren zeigten, hatte Thrombin keinen Einfluss auf die durch diese Stimuli induzierte Degranulation und zeigte somit eine gewisse Selektivität für die über $Fc\epsilon RI$ induzierte Mastzellaktivierung, was weiterhin eine Rolle der Proteinase als potentieller Gegenregulator von Mastzellen bei Aktivierung durch Allergene nahelegte.

Der Frage nach dem der Inhibition der Mastzelldegranulation zugrundeliegenden Mechanismus ging ich über verschiedene experimentelle Ansätze nach. Einen häufigen Angriffspunkt für Inhibitoren der Mastzelldegranulation stellt die Oberflächenexpression von $Fc\epsilon RI$ -gebundenem IgE dar. So zeigten z.B. Rauter *et al.* die Abspaltung von an $Fc\epsilon RI$ -gebundenem IgE durch Trypsin von der Oberfläche aufgereinigter humaner Mastzellen (193). Nachdem ich ein solches Phänomen für Thrombin experimentell ausschließen konnte, verfolgte ich die Hypothese, dass Interaktion über PAR die Grundlage des inhibitorischen Mechanismus bildet. Zunächst erhielt ich eine Reihe von indirekten Evidenzen, welche diese Hypothese unterstützten. Dazu zählten zuerst die Unfähigkeit von Thrombin die $Fc\epsilon RI$ -induzierte Degranulation humaner basophiler Granulozyten zu inhibieren. Interessant in diesem Zusammenhang war die Eigenschaft von Basophilen, nachweislich keine PAR zu exprimieren und auch nicht mit PAR-AP oder PAR-spezifischen Proteinase wie Thrombin und Trypsin zu reagieren (174, 194). Die mangelnde Inhibition der

Degranulation nach Vorinkubation mit Thrombin konnte somit als ein erstes Indiz für eine Beteiligung PAR genommen werden. Ein weiteres, stärkeres Indiz war in der Tatsache zu sehen, dass die enzymatische Aktivität des Thrombins essentiell für dessen inhibitorische Wirkung ist, wie Versuche zur Hitzeinaktivierung des Enzyms und vor allem Experimente mit den Serinproteinase-Inhibitoren PMSF (breites Wirkungsspektrum gegen Serinproteinasen) und Hirudin (selektiver Thrombininhibitor), die beide zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes führten, belegten. Gleichzeitig konnte in diesen Versuchen ausgeschlossen werden, dass Kontaminationen der Enzympräparation wie LPS für den inhibitorischen Effekt verantwortlich waren.

Zur Klärung der Frage, welcher der auf humanen Mastzellen exprimierten Thrombinrezeptoren, PAR1, PAR4 oder beide gemeinsam, die Thrombin-induzierte Inhibition vermittelt, wählte ich verschiedene experimentelle Ansätze. Zunächst überprüfte ich, ob selektive oder kombinierte Aktivierung dieser Rezeptoren mit PAR-AP zur Inhibition der Fc ϵ RI-induzierten Mastzelldegranulation führt. In diesen Versuchen, die quasi eine Imitation des angenommenen Thrombin-Wirkungsmechanismus darstellten, war es möglich durch Vorinkubation mit PAR1-AP eine moderate Inhibition der Mastzelldegranulation zu induzieren, während PAR4-AP nur sehr schwach wirksam war. Vorinkubation mit beiden Peptiden gemeinsam jedoch zeigte, dass eine dem Thrombin vergleichbar starke Inhibition der Degranulation humaner Mastzellen erreicht werden konnte. Dieser Effekt konnte mit relativ niedrigen Peptidkonzentrationen erreicht werden, bei denen die PAR-AP noch keine eigene degranulatorische Aktivität aufwies. Diese Ergebnisse zeigten somit eindeutig, dass durch synergistische Aktivierung von PAR1 und PAR4 die Fc ϵ RI-vermittelte Degranulation humaner Mastzellen inhibiert werden kann. Wie bereits zuvor zitiert, ist ein solches duales Rezeptorsystem für Thrombin bereits für humane Thrombozyten beschrieben worden. Kahn *et al.* berichteten, dass erst die gleichzeitige Blockierung von PAR1 und PAR4 zur Inhibition der Thrombin-vermittelten Aktivierung humaner Blutplättchen führt. Nach selektiver Blockierung von PAR1 war Thrombin bei höheren Konzentrationen dennoch in der Lage

Aktivierung von Thrombozyten zu induzieren, während selektive Inhibition von PAR4 keinen Einfluss hatte (92).

Zur Verifizierung meiner Hypothese, dass Thrombin über Interaktion mit PAR1 und PAR4 die Mastzelldegranulation hemmt, setzte ich zwei Methoden zur Inaktivierung dieser Rezeptoren ein. Einerseits versuchte ich durch Transfektion humaner Lungenmastzellen mit siRNA für PAR1 oder PAR4 die Expression dieser Rezeptoren selektiv zu unterdrücken, und andererseits mit Hilfe membrangängiger PAR-spezifischer Peptidinhibitoren (Pepduzine), die Interaktion von PAR1 und PAR4 mit G-Proteinen zu blockieren. Während die Transfektion mit rezeptorspezifischer siRNA keinen Einfluss auf die Thrombin-vermittelte Inhibition der Mastzelldegranulation hatte, führte die Vorbehandlung der Zellen mit einer Kombination von P1-Pep und P4-Pep zur vollständigen Aufhebung des inhibitorischen Thrombin-Effektes. Worin genau die Gründe für die Wirkungslosigkeit der siRNA-Transfektion zu suchen sind, ist nicht bekannt. Allerdings ist speziell für Primärzellen bekannt, dass Transfektionsversuche häufig mit Problemen verbunden sind, die von einer mangelnden Transfektionseffizienz herrühren (176, 195). So ist auch hier nicht ausgeschlossen, dass eine unzureichende Transfektion für das negative Ergebnis verantwortlich war. Demgegenüber bestätigten die mit den Pepduzinen erhaltenen Ergebnisse meine Arbeitshypothese:

Während nämlich die selektive Blockierung nur eines Rezeptors (PAR1 oder PAR4) kaum oder nur sehr schwach zur Aufhebung des inhibitorischen Einflusses von Thrombin führte, wurde die Inhibition durch Blockierung beider Rezeptoren gemeinsam fast vollständig aufgehoben. Aus diesem Resultat geht eindeutig hervor, dass Thrombin seinen inhibitorischen Effekt über PAR1 und PAR4 vermittelt und dass eine Kooperation dieser beiden Rezeptoren essentiell ist für eine effektive Inhibition der über Fc ϵ RI-induzierten Mastzelldegranulation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Versuche zur Signaltransduktion der Thrombin-vermittelten Inhibition der Mastzelldegranulation durchgeführt. Jedoch lassen

Arbeiten von verschiedenen Autoren auf mögliche Ansatzpunkte schließen. Im Laufe der letzten Jahre konnten verschiedene, an der negativen Regulation der Fc ϵ RI-induzierten Mastzelldegranulation beteiligte zytosolische Signalproteine identifiziert werden. Eines dieser Moleküle ist die Phosphatase SHIP (*SH2 domain-containing inositol phosphatase*). Huber *et al.* fanden heraus, dass die Aktivierung und anschließende Assoziation dieser Phosphatase mit der β -Untereinheit im Fc ϵ RI zu einer Inhibition der IgE-vermittelten Degranulation muriner Mastzellen führt (196). Es wäre also denkbar, dass Stimulation von humanen Mastzellen mit Thrombin PAR-vermittelt zur Aktivierung von SHIP führt und damit die Inhibition der Mastzelldegranulation induziert. Da über eine PAR-vermittelte Aktivierung dieses Signalproteins bislang nicht berichtet wurde, könnte dieses Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Insgesamt zeigen meine Daten erstmals die Expression verschiedener PAR auf humanen Mastzellen und die Interaktion von mastzellexprimiertem PAR1 und PAR4 mit ihrem physiologischen Liganden Thrombin. Sie demonstrieren weiterhin, dass Thrombin in diesem System die Rolle eines negativen, die Mastzelldegranulation inhibierenden, Regulators einnimmt. Die biologische Relevanz des inhibierenden Einflusses von Thrombin auf die Fc ϵ RI-induzierte Mastzelldegranulation *in vivo* ist noch nicht geklärt, zumal sich hier die Frage stellt, wie eine Proteinase aus dem Blut ins Gewebe gelangt, um dort mit Mastzellen zu interagieren. Es ist bekannt, dass es während einer allergischen Reaktion, bedingt durch Mastzelldegranulation und die Freisetzung vasoaktiver Substanzen (z.B. Histamin), zur erhöhten Gefäßpermeabilität kommt. Ebenso kommt es während dieser Prozesse zur Aggregation von Thrombozyten. Infolgedessen könnten Bestandteile aus dem Blut, somit auch Thrombin, ins Gewebe gelangen und mit Mastzellen in Kontakt treten. So konnte bereits im Tiermodell, nach Exposition mit Allergenen, die Einwanderung von Thrombozyten ins Gewebe gezeigt werden (197). Im humanen System liegen Befunde vor, denen zufolge in Proben von Bronchialbiopsien asthmatischer Patienten Thrombozyten auch außerhalb von

Blutgefäßen und auf Oberflächen von zerstörten Epithelien anzutreffen sind (198, 199). Eine andere Arbeit beschreibt den Übertritt von Lactoferrin, ein von Neutrophilen sezerniertes ebenfalls die Mastzellaktivierung inhibierendes Protein, in den extravaskulären Raum (200). So ist es wahrscheinlich, dass Mastzellen in der Lage sind auch mit Thrombin in Kontakt zu treten. Es ist vorstellbar dass ein solcher Mechanismus auch bei akuten Gefäßverletzungen relevant sein könnte, wenn Allergene aus dem Blut ins Gewebe gelangen und Mastzellen aktivieren. Dabei ist durchaus denkbar, dass neben Thrombin auch andere physiologische PAR-Liganden an der Regulation der Mastzellaktivierung beteiligt sind. Wie ich zeigen konnte, besitzen prinzipiell auch Trypsin und Kathepsin G die Fähigkeit die Degranulation humaner Lungenmastzellen zu inhibieren. Es war mir im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, diese Phänomene näher zu charakterisieren und die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen zu analysieren. Besonders im Hinblick auf ihre potentielle pharmakologische Einsetzbarkeit zur Prävention oder Behandlung akuter allergischer Reaktionen beim Menschen, könnte eine weitere Analyse des PAR-vermittelten Inhibitionsprinzips lohnend sein.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der akuten allergischen Reaktion. Sie sind die Hauptakteure während dieser Reaktion. Aktivierung von FcεRI-induzierten Signalwegen über Kreuzvernetzung von oberflächengebundenem IgE durch Antigen oder Allergen führt dabei zur überschießenden Degranulationsreaktion dieser Zellen, die für die typischen allergischen Symptome wie Niesen, Husten und Juckreiz verantwortlich ist. Durch Untersuchungen in Mäusen ist bekannt, dass Mastzellen auch über Proteinase-aktivierbare Rezeptoren (PAR) aktiviert werden können, einen IgE-unabhängigen Mechanismus. Wenig ist jedoch über die Expression und Funktion dieser neuen Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren bei humanen Mastzellen bekannt. Daher war es Ziel meiner Untersuchungen zu klären, ob und welche PAR (PAR1, -2, -3, oder -4) von primären humanen Mastzellen aus der Lunge und aus der Haut exprimiert werden und ob diese Rezeptoren auch eine Rolle in der Regulation der Mastzelldegranulation spielen. Mittels qualitativer und quantitativer PCR-Methoden konnte ich nachweisen, dass isolierte humane Lungen- und Hautmastzellen konstitutiv mRNA für alle PAR-Typen exprimieren. Demgegenüber führte der immunzytochemische Nachweis mittels PAR-spezifischer Antikörper lediglich zur Detektion der Zelloberflächenexpression der Rezeptorproteine für PAR1 und PAR4. Obwohl PAR2 per Durchflusszytometrie nur intrazellulär nachweisbar war, liess sich die Oberflächenexpression und zudem die Funktionalität dieses Rezeptors nach Stimulation von Mastzellen mit PAR2-AP, einem synthetischen rezeptorspezifischen PAR-aktivierenden Peptid, anhand der Induktion eines intrazellulären Ca-Signals und einer (schwachen) Degranulationsreaktion demonstrieren. Die Induktion von Mastzelldegranulation durch die PAR-aktivierenden Peptide PAR1-AP und PAR4-AP sowie die Mobilisierung von intrazellulären Kalziumionen erwiesen die Funktionalität auch von mastzellexprimiertem PAR1 und PAR4. Ganz unerwartet, im Widerspruch zu Ergebnissen im Maussystem stehend, war keine der neun als physiologische PAR-Liganden bekannten Proteinasen in der Lage Mastzelldegranulation zu

induzieren, und nur zwei dieser Enzyme Thrombin (PAR1-/PAR4-Ligand) und Trypsin (PAR2-Ligand) induzierten ein Ca-Signal. Interessanterweise führte Vorinkubation humaner Mastzellen mit Thrombin oder Trypsin jedoch zu einer drastischen Inhibition der Fc ϵ RI-vermittelten Degranulation und liess daher eine gegenregulatorische Rolle von Proteinasen, bzw. von PAR, bei der Mastzellaktivierung vermuten. Weiterhin mit Thrombin durchgeführte Experimente zeigten, dass eine 5-minütige Vorinkubation mit einer physiologischen Konzentration des Enzyms für maximale Inhibition der Degranulation ausreichend war, und der inhibitorische Effekt eine gewisse Selektivität für die über den Fc ϵ RI vermittelte Degranulation aufwies. Wie Versuche zur selektiven Inhibition der enzymatischen Aktivität des Thrombins durch PMSF und Hirudin zeigten, war die katalytische Aktivität des Enzyms, und damit möglicherweise auch die Aktivierung von PAR, essentiell für dessen inhibitorische Wirkung. Tatsächlich konnte Vorinkubation von Mastzellen mit nicht stimulatorischen Konzentrationen an PAR1-AP und PAR4-AP den inhibitorischen Effekt von Thrombin simulieren, und gleichzeitige funktionelle Blockierung von PAR1 und PAR4 durch rezeptorspezifische membranpermeable Pepduzine hoben die durch Thrombin vermittelte Inhibition der Mastzelldegranulation vollständig auf. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Aktivierung von PAR1 und PAR4 durch Thrombin auf humanen primären Mastzellen die Fc ϵ RI-induzierte Mastzelldegranulation kontrolliert. Damit scheinen auf Mastzellen exprimierte PAR im humanen System eine andere Funktion zu erfüllen als im murinen System. Aufgrund ihrer möglichen Funktion als negative Regulatoren mastzellabhängiger entzündlicher, insbesondere allergischer Prozesse, könnten sie Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für mastzellabhängige allergische Reaktionen darstellen.

5.2 Zusammenfassung in englischer Sprache / Summary

Mast cells play a pivotal role during acute allergic reactions. Crosslinking of surface-bound (i.e. Fc ϵ RI-bound) IgE molecules by antigen or allergen leads to mast cell degranulation, thereby stimulating the release of a variety of mediators which then cause the typical allergic symptoms such as sneezing, itching and coughing. Current investigations in mice revealed the activation of mast cells via proteinase-activated receptors (PAR), i.e. in an IgE-independent manner. However, still little is known about the expression and function of this novel family of G protein-coupled receptors on primary mast cells of human origin. Therefore the aim of this study was to investigate what types of PAR (PAR1, -2, -3, or -4) are present on human primary mast cells isolated from lung and skin and whether these receptors might be involved in regulating mast cell degranulation. Using qualitative as well as quantitative PCR-methods I could show that human primary mast cells constitutively express mRNA for all four types of PAR, whereas immunostaining with PAR-specific antibodies detected cell surface expression of receptor protein only for PAR1 and PAR4. Although PAR2 was detectable by flow cytometry only intracellularly, stimulation of mast cells by synthetic receptor-specific PAR-activating peptides (PAR-AP) revealed the surface expression of PAR2 as well as its functionality, as demonstrated by the ability of PAR2-AP to induce an intracellular Ca-signal and a (slight) degranulation response. Likewise, PAR1 and PAR4 proved to be functional, as mast cells responded to PAR1- and PAR4-AP by Ca-signals and vigorous degranulation. Unexpectedly, as contradictive to previous observations in mice, none out of nine proteinases known to represent physiological PAR-ligands induced mast cell degranulation, and only two them, thrombin (a PAR1/PAR4-ligand) and trypsin (a PAR2-ligand) induced intracellular Ca-release. Interestingly, preincubation of mast cells with these two latter enzymes drastically inhibited Fc ϵ RI-dependent degranulation, suggesting a counter-regulatory role for proteinases and PAR in mast cell activation. Choosing thrombin for further investigation, it turned out that preincubation of cells with a physiological concentration of the enzyme for 5 min was sufficient to obtain maximal inhibition and that the

inhibitory effect was selective for Fc ϵ RI-induced degranulation, but not other stimuli such as LL 37 and substance P. Inhibitors of thrombin enzymatic activity (PMSF, hirudin) completely abolished its inhibitory impact, demonstrating that catalytic enzyme activity, and thus possibly PAR-activation is required. In fact, preincubation of mast cells with non-stimulating dosages of PAR1- and PAR4-AP in combination mimicked thrombins' inhibitory effect on Fc ϵ RI-induced degranulation, while simultaneous blockade of PAR1- and PAR4-signalling by application of receptor-specific membrane permeable pepducins completely abrogated thrombins' inhibitory effect. Taken together these results demonstrate that combined activation of PAR1 and PAR4 by thrombin in human primary mast cells controls Fc ϵ RI-induced mast cell degranulation. Thus, mast cell-expressed PARs in the human system appear to have acquired a role quite different from that in the murine system. Although further investigation is needed to explore the physiological relevance of these findings, they may perhaps provide a basis for the development of anti-allergic strategies in the future.

6 Literatur

1. Moormann, C., M. Artuc, E. Pohl, G. Varga, J. Buddenkotte, N. Vergnolle, R. Brehler, B. M. Henz, S. W. Schneider, T. A. Luger, and M. Steinhoff. 2006. Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J. Invest Dermatol.* 126:746-755.
2. Humphries, D. E., G. W. Wong, D. S. Friend, M. F. Gurish, W. T. Qiu, C. Huang, A. H. Sharpe, and R. L. Stevens. 1999. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400:769-772.
3. Caulfield, J. P., R. A. Lewis, A. Hein, and K. F. Austen. 1980. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J. Cell Biol.* 85:299-312.
4. Okayama, Y., and T. Kawakami. 2006. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* 34:97-115.
5. Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, S. W. Kessler, J. M. Mican, K. M. Zsebo, and D. D. Metcalfe. 1992. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J. Immunol.* 148:772-777.
6. Valent, P., E. Spanblochl, W. R. Sperr, C. Sillaber, K. M. Zsebo, H. Agis, H. Strobl, K. Geissler, P. Bettelheim, and K. Lechner. 1992. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 80:2237-2245.
7. Bischoff, S. C., G. Sellge, S. Schwengberg, A. Lorentz, and M. P. Manns. 1999. Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:104-107.
8. Valent, P. 1995. Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp. Dermatol.* 4:255-259.
9. Kuther, K., L. Audige, P. Kube, and M. Welle. 1998. Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. *Cell Tissue Res.* 293:111-119.
10. Lowman, M. A., P. H. Rees, R. C. Benyon, and M. K. Church. 1988. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81:590-597.

11. Enerback, L. 1966. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66:289-302.
12. Marshall, J. S., G. P. Ford, and E. B. Bell. 1987. Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis. *Br. J. Dermatol.* 117:29-36.
13. Craig, S. S., N. M. Schechter, and L. B. Schwartz. 1988. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 58:682-691.
14. Craig, S. S., N. M. Schechter, and L. B. Schwartz. 1989. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. *Lab Invest* 60:147-157.
15. Weidner, N., and K. F. Austen. 1993. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol. Res. Pract.* 189:156-162.
16. Janeway CA., Traver P, Walport M, and Shlomchik M.2002. Immunologie. Spektrum Verlag, Heidelberg.
17. Abraham, S. N., and R. Malaviya. 1997. Mast cells in infection and immunity. *Infect. Immun.* 65:3501-3508.
18. Walsh, L. J., G. Trinchieri, H. A. Waldorf, D. Whitaker, and G. F. Murphy. 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:4220-4224.
19. Okayama, Y., A. Semper, S. T. Holgate, and M. K. Church. 1995. Multiple cytokine mRNA expression in human mast cells stimulated via Fc epsilon RI. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:158-159.
20. Bischoff, S. C. 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat. Rev. Immunol.* 7:93-104.
21. Turner, H., and J. P. Kinet. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* 402:B24-B30.
22. Metzger, H. 2004. The high affinity receptor for IgE, FcepsilonRI. *Novartis. Found. Symp.* 257:51-59.
23. Kulka, M., C. H. Sheen, B. P. Tancowny, L. C. Grammer, and R. P. Schleimer. 2008. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 123:398-410.

24. Church, M. K., M. A. Lowman, P. H. Rees, and R. C. Benyon. 1989. Mast cells, neuropeptides and inflammation. *Agents Actions* 27:8-16.
25. Church, M. K., M. A. Lowman, C. Robinson, S. T. Holgate, and R. C. Benyon. 1989. Interaction of neuropeptides with human mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88:70-78.
26. Caulfield, J. P., S. el Lati, G. Thomas, and M. K. Church. 1990. Dissociated human foreskin mast cells degranulate in response to anti-IgE and substance P. *Lab Invest* 63:502-510.
27. Rao, K. N., and M. A. Brown. 2008. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143:83-104.
28. Maurer, M., T. Theoharides, R. D. Granstein, S. C. Bischoff, J. Bienenstock, B. Henz, P. Kovanen, A. M. Piliponsky, N. Kambe, H. Vliagoftis, F. Levi-Schaffer, M. Metz, Y. Miyachi, D. Befus, P. Forsythe, Y. Kitamura, and S. Galli. 2003. What is the physiological function of mast cells? *Exp. Dermatol.* 12:886-910.
29. Abe, M., M. Kurosawa, O. Ishikawa, and Y. Miyachi. 2000. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:S78-S84.
30. Artuc, M., U. M. Steckelings, and B. M. Henz. 2002. Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J. Invest Dermatol.* 118:391-395.
31. Noli, C., and A. Miolo. 2001. The mast cell in wound healing. *Vet. Dermatol.* 12:303-313.
32. Weller, K., K. Foitzik, R. Paus, W. Syska, and M. Maurer. 2006. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* 20:2366-2368.
33. Detoraki, A., R. I. Staiano, F. Granata, G. Giannattasio, N. Prevete, A. de Paulis, D. Ribatti, A. Genovese, M. Triggiani, and G. Marone. 2009. Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:1142-9, 1149.
34. Toda, S., Y. Tokuda, N. Koike, N. Yonemitsu, K. Watanabe, K. Koike, N. Fujitani, Y. Hiromatsu, and H. Sugihara. 2000. Growth factor-expressing mast cells accumulate at the thyroid tissue-regenerative site of subacute thyroiditis. *Thyroid* 10:381-386.
35. Maurer, M., R. Paus, and B. M. Czarnetzki. 1995. Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp. Dermatol.* 4:266-271.

36. Maurer, M., E. Fischer, B. Handjiski, E. von Stebut, B. Algermissen, A. Bavandi, and R. Paus. 1997. Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab Invest* 77:319-332.
37. Maurer, M., J. Wedemeyer, M. Metz, A. M. Piliponsky, K. Weller, D. Chatterjea, D. E. Clouthier, M. M. Yanagisawa, M. Tsai, and S. J. Galli. 2004. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 432:512-516.
38. Henz, B. M., M. Maurer, U. Lippert, M. Worm, and M. Babina. 2001. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp. Dermatol.* 10:1-10.
39. Abraham, S. N., K. Thankavel, and R. Malaviya. 1997. Mast cells as modulators of host defense in the lung. *Front Biosci.* 2:d78-d87.
40. Galli, S. J., M. Maurer, and C. S. Lantz. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:53-59.
41. Marshall, J. S. 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4:787-799.
42. Malaviya, R., and S. N. Abraham. 2000. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* 67:841-846.
43. Orinska, Z., E. Bulanova, V. Budagian, M. Metz, M. Maurer, and S. Bulfone-Paus. 2005. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood* 106:978-987.
44. Malaviya, R., E. A. Ross, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, B. A. Jakschik, and S. N. Abraham. 1994. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J. Immunol.* 152:1907-1914.
45. Di Nardo, A., A. Vitiello, and R. L. Gallo. 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.* 170:2274-2278.
46. Beaven, M. A. 2009. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur. J. Immunol.* 39:11-25.
47. Pennock, J. L., and R. K. Grencis. 2006. The mast cell and gut nematodes: damage and defence. *Chem. Immunol. Allergy* 90:128-140.
48. Mekori, Y. A., and D. D. Metcalfe. 1999. Mast cell-T cell interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:517-523.

49. Burke, S. M., T. B. Issekutz, K. Mohan, P. W. Lee, M. Shmulevitz, and J. S. Marshall. 2008. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* 111:5467-5476.
50. Moller, A., U. Lippert, D. Lessmann, G. Kolde, K. Hamann, P. Welker, D. Schadendorf, T. Rosenbach, T. Luger, and B. M. Czarnetzki. 1993. Human mast cells produce IL-8. *J. Immunol.* 151:3261-3266.
51. Poncet, P., M. Arock, and B. David. 1999. MHC class II-dependent activation of CD4+ T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *J. Leukoc. Biol.* 66:105-112.
52. Williams, C. M., and S. J. Galli. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:847-859.
53. Montefort, S., C. Gratziau, D. Goulding, R. Polosa, D. O. Haskard, P. H. Howarth, S. T. Holgate, and M. P. Carroll. 1994. Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J. Clin. Invest* 93:1411-1421.
54. Koh, Y. Y., R. Dupuis, M. Pollice, K. H. Albertine, J. E. Fish, and S. P. Peters. 1993. Neutrophils recruited to the lungs of humans by segmental antigen challenge display a reduced chemotactic response to leukotriene B4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8:493-499.
55. Robinson, D., Q. Hamid, A. Bentley, S. Ying, A. B. Kay, and S. R. Durham. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 92:313-324.
56. Hogan, S. P., A. Koskinen, K. I. Matthaei, I. G. Young, and P. S. Foster. 1998. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 157:210-218.
57. Piliponsky, A. M., G. J. Gleich, A. Nagler, I. Bar, and F. Levi-Schaffer. 2003. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. *Blood* 101:1898-1904.
58. Wilson, J. W. 1998. What causes airway remodelling in asthma? *Clin. Exp. Allergy* 28:534-536.

59. Galli, S. J. 1993. New concepts about the mast cell. *N. Engl. J. Med.* 328:257-265.
60. Schiemann, F., E. Brandt, R. Gross, B. Lindner, J. Mittelstadt, C. P. Sommerhoff, J. Schulmistrat, and F. Petersen. 2009. The cathelicidin LL-37 activates human mast cells and is degraded by mast cell tryptase: counter-regulation by CXCL4. *J. Immunol.* 183:2223-2231.
61. Shanahan, F., J. A. Denburg, J. Fox, J. Bienenstock, and D. Befus. 1985. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J. Immunol.* 135:1331-1337.
62. Niyonsaba, F., K. Iwabuchi, A. Someya, M. Hirata, H. Matsuda, H. Ogawa, and I. Nagaoka. 2002. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology* 106:20-26.
63. De, Y., Q. Chen, A. P. Schmidt, G. M. Anderson, J. M. Wang, J. Wooters, J. J. Oppenheim, and O. Chertov. 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* 192:1069-1074.
64. O'Connor, T. M., J. O'Connell, D. I. O'Brien, T. Goode, C. P. Bredin, and F. Shanahan. 2004. The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell Physiol* 201:167-180.
65. Guhl, S., H. H. Lee, M. Babina, B. M. Henz, and T. Zuberbier. 2005. Evidence for a restricted rather than generalized stimulatory response of skin-derived human mast cells to substance P. *J. Neuroimmunol.* 163:92-101.
66. Lorenz, D., B. Wiesner, J. Zipper, A. Winkler, E. Krause, M. Beyermann, M. Lindau, and M. Bienert. 1998. Mechanism of peptide-induced mast cell degranulation. Translocation and patch-clamp studies. *J. Gen. Physiol* 112:577-591.
67. Vu, T. K., D. T. Hung, V. I. Wheaton, and S. R. Coughlin. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068.
68. Nystedt, S., K. Emilsson, C. Wahlestedt, and J. Sundelin. 1994. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:9208-9212.
69. Xu, W. F., H. Andersen, T. E. Whitmore, S. R. Presnell, D. P. Yee, A. Ching, T. Gilbert, E. W. Davie, and D. C. Foster. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:6642-6646.

70. Ramachandran, R., and M. D. Hollenberg. 2008. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1:S263-S282.
71. al Ani, B., M. Saifeddine, and M. D. Hollenberg. 1995. Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 73:1203-1207.
72. Maeda, S., S. Maeda, S. Shibata, N. Chimura, and T. Fukata. 2009. Molecular cloning of canine protease-activated receptor-2 and its expression in normal dog tissues and atopic skin lesions. *J. Vet. Med. Sci.* 71:577-582.
73. Yu, S., G. Gao, B. Z. Peterson, and A. Ouyang. 2009. TRPA1 in mast cell activation-induced long-lasting mechanical hypersensitivity of vagal afferent C-fibers in guinea pig esophagus. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 297:G34-G42.
74. Thorsen, J., E. Lilleeng, E. C. Valen, and A. Krogdahl. 2008. Proteinase-activated receptor-2: two potential inflammatory mediators of the gastrointestinal tract in Atlantic salmon. *J. Inflamm. (Lond)* 5:18.
75. Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger, and M. D. Hollenberg. 2005. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* 26:1-43.
76. Milia, A. F., M. B. Salis, T. Stacca, A. Pinna, P. Madeddu, M. Trevisani, P. Geppetti, and C. Emanuelli. 2002. Protease-activated receptor-2 stimulates angiogenesis and accelerates hemodynamic recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ. Res.* 91:346-352.
77. Hamilton, J. R., J. D. Moffatt, A. G. Frauman, and T. M. Cocks. 2001. Protease-activated receptor (PAR) 1 but not PAR2 or PAR4 mediates endothelium-dependent relaxation to thrombin and trypsin in human pulmonary arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38:108-119.
78. Robin, J., R. Kharbanda, P. Mclean, R. Campbell, and P. Vallance. 2003. Protease-activated receptor 2-mediated vasodilatation in humans in vivo: role of nitric oxide and prostanoids. *Circulation* 107:954-959.
79. Mirza, H., V. Yatsula, and W. F. Bahou. 1996. The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* 97:1705-1714.
80. Bretschneider, E., R. Kaufmann, M. Braun, G. Nowak, E. Glusa, and K. Schror. 2001. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4

- (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 132:1441-1446.
81. O'Brien, P. J., N. Prevost, M. Molino, M. K. Hollinger, M. J. Woolkalis, D. S. Woulfe, and L. F. Brass. 2000. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J. Biol. Chem.* 275:13502-13509.
 82. Hollenberg, M. D. 1999. Protease-activated receptors: PAR4 and counting: how long is the course? *Trends Pharmacol. Sci.* 20:271-273.
 83. Ramachandran, R., L. R. Sadofsky, Y. Xiao, A. Botham, M. Cowen, A. H. Morice, and S. J. Compton. 2007. Inflammatory mediators modulate thrombin and cathepsin-G signaling in human bronchial fibroblasts by inducing expression of proteinase-activated receptor-4. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 292:L788-L798.
 84. Hauck, R. W., C. Schulz, A. Schomig, R. K. Hoffman, and R. A. Panettieri, Jr. 1999. alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors. *Am. J. Physiol* 277:L22-L29.
 85. Ramachandran, R., A. H. Morice, and S. J. Compton. 2006. Proteinase-activated receptor2 agonists upregulate granulocyte colony-stimulating factor, IL-8, and VCAM-1 expression in human bronchial fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35:133-141.
 86. Schmidt, V. A., W. C. Nierman, D. R. Maglott, L. D. Cupit, K. A. Moskowitz, J. A. Wainer, and W. F. Bahou. 1998. The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. *J. Biol. Chem.* 273:15061-15068.
 87. McLaughlin, J. N., M. M. Patterson, and A. B. Malik. 2007. Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:5662-5667.
 88. Hansen, K. K., M. Saifeddine, and M. D. Hollenberg. 2004. Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. *Immunology* 112:183-190.
 89. Kaufmann, R., B. Schulze, G. Krause, L. M. Mayr, U. Settmacher, and P. Henklein. 2005. Proteinase-activated receptors (PARs)--the PAR3 Neo-N-terminal peptide TFRGAP interacts with PAR1. *Regul. Pept.* 125:61-66.
 90. Kahn, M. L., Y. W. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, Jr., C. Tam, and S. R. Coughlin. 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694.

91. Nakanishi-Matsui, M., Y. W. Zheng, D. J. Sulciner, E. J. Weiss, M. J. Ludeman, and S. R. Coughlin. 2000. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-613.
92. Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, and S. R. Coughlin. 1999. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest* 103:879-887.
93. Vaughan, P. J., C. J. Pike, C. W. Cotman, and D. D. Cunningham. 1995. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J. Neurosci.* 15:5389-5401.
94. Striggow, F., M. Riek-Burchardt, A. Kiesel, W. Schmidt, P. Henrich-Noack, J. Breder, M. Krug, K. G. Reymann, and G. Reiser. 2001. Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur. J. Neurosci.* 14:595-608.
95. Grishina, Z., E. Ostrowska, W. Halangk, M. Sahin-Toth, and G. Reiser. 2005. Activity of recombinant trypsin isoforms on human proteinase-activated receptors (PAR): mesotrypsin cannot activate epithelial PAR-1, -2, but weakly activates brain PAR-1. *Br. J. Pharmacol.* 146:990-999.
96. Kaufmann, R., S. Patt, M. Zieger, R. Kraft, S. Tausch, P. Henklein, and G. Nowak. 2000. The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization in human astrocytoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126:91-94.
97. Szaba, F. M., and S. T. Smiley. 2002. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood* 99:1053-1059.
98. Naldini, A., D. H. Carney, A. Pucci, A. Pasquali, and F. Carraro. 2000. Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Gen. Pharmacol.* 35:255-259.
99. Colotta, F., F. L. Sciacca, M. Sironi, W. Luini, M. J. Rabinet, and A. Mantovani. 1994. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am. J. Pathol.* 144:975-985.
100. Cocks, T. M., B. Fong, J. M. Chow, G. P. Anderson, A. G. Frauman, R. G. Goldie, P. J. Henry, M. J. Carr, J. R. Hamilton, and J. D. Moffatt. 1999. A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* 398:156-160.
101. Schmidlin, F., S. Amadesi, R. Vidil, M. Trevisani, N. Martinet, G. Caughey, M. Tognetto, G. Cavallero, C. Mapp, P. Geppetti, and N. W. Bunnett. 2001. Expression and function of proteinase-activated receptor 2 in human bronchial smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164:1276-1281.

102. Lan, R. S., D. A. Knight, G. A. Stewart, and P. J. Henry. 2001. Role of PGE(2) in protease-activated receptor-1, -2 and -4 mediated relaxation in the mouse isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 132:93-100.
103. Kuehn, H. S., and A. M. Gilfillan. 2007. G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *Immunol. Lett.* 113:59-69.
104. Forth W., Henschler D, Rummel W., Forstermann U, and Starke K.2001. *Pharmakologie und Toxikologie*. Urban u. Fischer Verlag,
105. Kawabe, H., H. Hayashi, and O. Hayaishi. 1987. Differential calcium effects on prostaglandin D2 generation and histamine release from isolated rat peritoneal mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143:467-474.
106. van Haaster, C. M., W. Engels, P. J. Lemmens, G. Hornstra, G. J. van der Vusse, and J. W. Heemskerk. 1995. Differential release of histamine and prostaglandin D2 in rat peritoneal mast cells: roles of cytosolic calcium and protein tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1265:79-88.
107. Coughlin, S. R. 1999. How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:11023-11027.
108. Scarborough, R. M., M. A. Naughton, W. Teng, D. T. Hung, J. Rose, T. K. Vu, V. I. Wheaton, C. W. Turck, and S. R. Coughlin. 1992. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.* 267:13146-13149.
109. Vu, T. K., V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, and S. R. Coughlin. 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674-677.
110. Ishihara, H., A. J. Connolly, D. Zeng, M. L. Kahn, Y. W. Zheng, C. Timmons, T. Tram, and S. R. Coughlin. 1997. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502-506.
111. Molino, M., E. S. Barnathan, R. Numerof, J. Clark, M. Dreyer, A. Cumashi, J. A. Hoxie, N. Schechter, M. Woolkalis, and L. F. Brass. 1997. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J. Biol. Chem.* 272:4043-4049.
112. Sambrano, G. R., W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik, and S. R. Coughlin. 2000. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275:6819-6823.
113. Molino, M., N. Blanchard, E. Belmonte, A. P. Tarver, C. Abrams, J. A. Hoxie, C. Cerletti, and L. F. Brass. 1995. Proteolysis of the human platelet and

- endothelial cell thrombin receptor by neutrophil-derived cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 270:11168-11175.
114. Loew, D., C. Perrault, M. Morales, S. Moog, C. Ravanat, S. Schuhler, R. Arcone, C. Pietropaolo, J. P. Cazenave, A. van Dorsselaer, and F. Lanza. 2000. Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry. *Biochemistry* 39:10812-10822.
 115. Roche, N., R. G. Stirling, S. Lim, B. G. Oliver, and K. F. Chung. 2003. Regulation of protease-activated receptor-1 in mononuclear cells by neutrophil proteases. *Respir. Med.* 97:228-233.
 116. Cumashi, A., H. Ansuini, N. Celli, A. De Blasi, P. J. O'Brien, L. F. Brass, and M. Molino. 2001. Neutrophil proteases can inactivate human PAR3 and abolish the co-receptor function of PAR3 on murine platelets. *Thromb. Haemost.* 85:533-538.
 117. Sharma, R., V. Prasad, E. T. McCarthy, V. J. Savin, K. N. Dileepan, D. J. Stechschulte, E. Lianos, T. Wiegmann, and M. Sharma. 2007. Chymase increases glomerular albumin permeability via protease-activated receptor-2. *Mol. Cell Biochem.* 297:161-169.
 118. Suzuki, T., T. J. Moraes, E. Vachon, H. H. Ginzberg, T. T. Huang, M. A. Matthey, M. D. Hollenberg, J. Marshall, C. A. McCulloch, M. T. Abreu, C. W. Chow, and G. P. Downey. 2005. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33:231-247.
 119. Mannaioni, G., A. G. Orr, C. E. Hamill, H. Yuan, K. H. Pedone, K. L. McCoy, P. R. Berlinguer, C. E. Junge, C. J. Lee, M. Yepes, J. R. Hepler, and S. F. Traynelis. 2008. Plasmin potentiates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor function in hippocampal neurons through activation of protease-activated receptor-1. *J. Biol. Chem.* 283:20600-20611.
 120. Gorbacheva, L. R., T. P. Storozhevykh, V. G. Pinelis, O. N. Davydova, S. Ishiwata, and S. M. Strukova. 2008. Activated protein C via PAR1 receptor regulates survival of neurons under conditions of glutamate excitotoxicity. *Biochemistry (Mosc.)* 73:717-724.
 121. Blackhart, B. D., K. Emilsson, D. Nguyen, W. Teng, A. J. Martelli, S. Nystedt, J. Sundelin, and R. M. Scarborough. 1996. Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J. Biol. Chem.* 271:16466-16471.
 122. Dugina, T. N., E. V. Kiseleva, I. V. Chistov, B. A. Umarova, and S. M. Strukova. 2002. Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry (Mosc.)* 67:65-74.

123. Nishikawa, H., A. Kawabata, R. Kuroda, M. Nishida, and K. Kawai. 2000. Characterization of protease-activated receptors in rat peritoneal mast cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 82:74-77.
124. Razin, E., and G. Marx. 1984. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* 133:3282-3285.
125. Zhang, Z., H. Zhang, H. Yang, L. Zhang, X. Chen, X. Zheng, and S. He. 2008. Induction of T-helper type 2 cytokine release and up-regulated expression of protease-activated receptors on mast cells by recombinant American cockroach allergen Per a 7. *Clin. Exp. Allergy* 38:1160-1167.
126. Vliagoftis, H. 2002. Thrombin induces mast cell adhesion to fibronectin: evidence for involvement of protease-activated receptor-1. *J. Immunol.* 169:4551-4558.
127. Pervin, R., B. I. Kanner, G. Marx, and E. Razin. 1985. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells: effect on calcium uptake. *Immunology* 56:667-672.
128. Makarova, A. M., T. S. Zamolodchikova, L. D. Rumsh, and S. M. Strukova. 2007. [Duodenase activates rat peritoneal mast cells via protease-activated receptors of type 1]. *Bioorg. Khim.* 33:520-526.
129. Strukova, S. M., T. N. Dugina, S. V. Khlgatian, A. E. Redkozubov, G. P. Redkozubova, and V. G. Pinelis. 1996. Thrombin-mediated events implicated in mast cell activation. *Semin. Thromb. Hemost.* 22:145-150.
130. Schick, B., and K. F. Austen. 1989. Modulation of chymase-mediated rat serosal mast cell degranulation by trypsin or diisopropyl fluorophosphate. *Immunology* 66:434-438.
131. Kawabata, A., R. Kuroda, T. Minami, K. Kataoka, and M. Taneda. 1998. Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br. J. Pharmacol.* 125:419-422.
132. Gordon, J. R., X. Zhang, K. Stevenson, and K. Cosford. 2000. Thrombin induces IL-6 but not TNFalpha secretion by mouse mast cells: threshold-level thrombin receptor and very low level FcepsilonRI signaling synergistically enhance IL-6 secretion. *Cell Immunol.* 205:128-135.
133. Cirino, G., C. Cicala, M. R. Bucci, L. Sorrentino, J. M. Maraganore, and S. R. Stone. 1996. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J. Exp. Med.* 183:821-827.
134. Kang, O. H., H. J. Jeong, D. K. Kim, S. C. Choi, T. H. Kim, Y. H. Nah, H. M. Kim, and Y. M. Lee. 2003. Trypsin induces tumour necrosis factor-alpha

- secretion from a human leukemic mast cell line. *Cell Biochem. Funct.* 21:161-167.
135. D'Andrea, M. R., C. J. Rogahn, and P. Andrade-Gordon. 2000. Localization of protease-activated receptors-1 and -2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. *Biotech. Histochem.* 75:85-90.
 136. Berger, P., D. W. Perng, H. Thabrew, S. J. Compton, J. A. Cairns, A. R. McEuen, R. Marthan, J. M. Tunon De Lara, and A. F. Walls. 2001. Trypsase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol* 91:1372-1379.
 137. He, S. H., Y. S. He, and H. Xie. 2004. Activation of human colon mast cells through proteinase activated receptor-2. *World J. Gastroenterol.* 10:327-331.
 138. Schulman, E. S., D. W. MacGlashan, Jr., S. P. Peters, R. P. Schleimer, H. H. Newball, and L. M. Lichtenstein. 1982. Human lung mast cells: purification and characterization. *J. Immunol.* 129:2662-2667.
 139. Gross R. Direkte und indirekte Effekte thrombozytärer Chemokine auf humane Mastzellen. 2007.
 140. Gibbs BF. E. M.2001. Methods in Molecular Medicin, *Isolation and Purification of human mast cells and basophils.*
 141. Schiemann F.2005. Interaktionen von Mastzellen und thrombozytären Chemokinen: Expression von Chemokinrezeptoren und Regulation der Chemokinaktivität durch proteolytische Prozessierung.
 142. Buhring, H. J., M. Seiffert, C. Giesert, A. Marxer, L. Kanz, P. Valent, and K. Sano. 2001. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood* 97:3303-3305.
 143. Buhring, H. J., P. J. Simmons, M. Pudney, R. Muller, D. Jarrossay, A. van Agthoven, M. Wilhelm, W. Brugger, P. Valent, and L. Kanz. 1999. The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 94:2343-2356.
 144. Kirshenbaum, A. S., C. Akin, Y. Wu, M. Rottem, J. P. Goff, M. A. Beaven, V. K. Rao, and D. D. Metcalfe. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk. Res.* 27:677-682.

145. Butterfield, J. H., D. Weiler, G. Dewald, and G. J. Gleich. 1988. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk. Res.* 12:345-355.
146. Aumuller, E., B. F. Gibbs, A. Gronow, and H. Haas. 2003. Interleukin-4 production from human basophils is critically dependent on the storage conditions employed prior to stimulation. *Inflamm. Res.* 52:107-110.
147. Haisch, K., B. F. Gibbs, H. Korber, M. Ernst, E. Grage-Griebenow, M. Schlaak, and H. Haas. 1999. Purification of morphologically and functionally intact human basophils to near homogeneity. *J. Immunol. Methods* 226:129-137.
148. Schwartz, L. B., K. F. Austen, and S. I. Wasserman. 1979. Immunologic release of beta-hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J. Immunol.* 123:1445-1450.
149. Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon, and R. H. Plasterk. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15:2654-2659.
150. Macrae, I. J., K. Zhou, F. Li, A. Repic, A. N. Brooks, W. Z. Cande, P. D. Adams, and J. A. Doudna. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311:195-198.
151. Carvalho, R. F., G. Nilsson, and I. T. Harvima. 2010. Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. *Exp. Dermatol.* 19:117-122.
152. Freund-Michel, V., and N. Frossard. 2006. Inflammatory conditions increase expression of protease-activated receptor-2 by human airway smooth muscle cells in culture. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 20:351-357.
153. Ritchie, E., M. Saka, C. Mackenzie, R. Drummond, C. Wheeler-Jones, T. Kanke, and R. Plevin. 2007. Cytokine upregulation of proteinase-activated-receptors 2 and 4 expression mediated by p38 MAP kinase and inhibitory kappa B kinase beta in human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 150:1044-1054.
154. Gruber, B. L., M. J. Marchese, F. Santiago-Schwarz, C. A. Martin, J. Zhang, and R. R. Kew. 2004. Protease-activated receptor-2 (PAR-2) expression in human fibroblasts is regulated by growth factors and extracellular matrix. *J. Invest Dermatol.* 123:832-839.
155. Amiable, N., S. K. Tat, D. Lajeunesse, N. Duval, J. P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, and C. Boileau. 2009. Proteinase-activated receptor (PAR)-2 activation impacts bone resorptive properties of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone* 44:1143-1150.

156. Qiao, L., H. Zhang, S. Wu, and S. He. 2009. Downregulation of protease activated receptor expression and cytokine production in P815 cells by RNA interference. *BMC. Cell Biol.* 10:62.
157. Naldini, A., L. Sower, V. Bocci, B. Meyers, and D. H. Carney. 1998. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J. Cell Physiol* 177:76-84.
158. He, S. H., H. Xie, and Y. L. Fu. 2005. Activation of human tonsil and skin mast cells by agonists of proteinase activated receptor-2. *Acta Pharmacol. Sin.* 26:568-574.
159. Blanc-Brude, O. P., F. Archer, P. Leoni, C. Derian, S. Bolsover, G. J. Laurent, and R. C. Chambers. 2005. Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. *Exp. Cell Res.* 304:16-27.
160. Feistritzer, C., R. Lenta, and M. Riewald. 2005. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J. Thromb. Haemost.* 3:2798-2805.
161. Boire, A., L. Covic, A. Agarwal, S. Jacques, S. Sherifi, and A. Kuliopulos. 2005. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120:303-313.
162. Trivedi, V., A. Boire, B. Tchernychev, N. C. Kaneider, A. J. Leger, K. O'Callaghan, L. Covic, and A. Kuliopulos. 2009. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell* 137:332-343.
163. Razin, E., D. Baranes, and G. Marx. 1985. Thrombin-mast cell interactions. Binding and cell activation. *Exp. Cell Res.* 160:380-386.
164. Papaconstantinou, M. E., C. J. Carrell, A. O. Pineda, K. M. Bobofchak, F. S. Mathews, C. S. Flordellis, M. E. Maragoudakis, N. E. Tsopanoglou, and E. Di Cera. 2005. Thrombin functions through its RGD sequence in a non-canonical conformation. *J. Biol. Chem.* 280:29393-29396.
165. Sajid, M., R. Zhao, A. Pathak, S. S. Smyth, and G. A. Stouffer. 2003. Alphavbeta3-integrin antagonists inhibit thrombin-induced proliferation and focal adhesion formation in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285:C1330-C1338.
166. Fenton, J. W. 1989. Thrombin interactions with hirudin. *Semin. Thromb. Hemost.* 15:265-268.

167. Wang, Z., M. Wang, and B. I. Carr. 2008. Integrin alpha5-induced EGFR activation by prothrombin triggers hepatocyte apoptosis via the JNK signaling pathway. *J. Cell Physiol* 216:551-557.
168. Byzova, T. V., and E. F. Plow. 1998. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J. Cell Biol.* 143:2081-2092.
169. Columbo, M., and B. S. Bochner. 2001. Human skin mast cells adhere to vitronectin via the alphavbeta3 integrin receptor (CD51/CD61). *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:554.
170. Shimizu, Y., A. M. Irani, E. J. Brown, L. K. Ashman, and L. B. Schwartz. 1995. Human mast cells derived from fetal liver cells cultured with stem cell factor express a functional CD51/CD61 (alpha v beta 3) integrin. *Blood* 86:930-939.
171. Bar-Shavit, R., V. Sabbah, M. G. Lampugnani, P. C. Marchisio, J. W. Fenton, I. Vlodavsky, and E. Dejana. 1991. An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J. Cell Biol.* 112:335-344.
172. Glusa, E., and F. Markwardt. 1990. Platelet functions in recombinant hirudin-anticoagulated blood. *Haemostasis* 20:112-118.
173. Glusa, E. 1991. Platelet aggregation in recombinant-hirudin-anticoagulated blood. *Haemostasis* 21 Suppl 1:116-120.
174. Falcone, F. H., S. Morroll, and B. F. Gibbs. 2005. Lack of protease activated receptor (PAR) expression in purified human basophils. *Inflamm. Res.* 54 Suppl 1:S13-S14.
175. Shapiro, M. J., E. J. Weiss, T. R. Faruqi, and S. R. Coughlin. 2000. Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *J. Biol. Chem.* 275:25216-25221.
176. Leng, Q., M. C. Woodle, P. Y. Lu, and A. J. Mixson. 2009. Advances in Systemic siRNA Delivery. *Drugs Future.* 34:721.
177. Covic, L., A. L. Gresser, J. Talavera, S. Swift, and A. Kuliopulos. 2002. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:643-648.
178. Covic, L., M. Misra, J. Badar, C. Singh, and A. Kuliopulos. 2002. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat. Med.* 8:1161-1165.
179. Dugina, T. N., E. V. Kiseleva, E. Glusa, and S. M. Strukova. 2003. Activation of mast cells induced by agonists of proteinase-activated receptors under normal conditions and during acute inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 471:141-147.

180. Kiseleva, E. V., T. N. Dugina, E. Gluza, and S. M. Strukova. 2001. [The role of PAR family receptors in activation of mast cells in the norm and in acute inflammation in rats]. *Ross. Fiziol. Zh. Im I. M. Sechenova* 87:1527-1533.
181. Colognato, R., J. R. Slupsky, M. Jendrach, L. Burysek, T. Syrovets, and T. Simmet. 2003. Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* 102:2645-2652.
182. Popovic, M., S. Paskas, M. Zivkovic, L. Burysek, and Y. Laumonnier. 2010. Human cytomegalovirus increases HUVEC sensitivity to thrombin and modulates expression of thrombin receptors. *J. Thromb. Thrombolysis*.
183. Tsujii, K., T. Andoh, J. B. Lee, and Y. Kuraishi. 2008. Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J. Pharmacol. Sci.* 108:385-388.
184. Schick, B., K. F. Austen, and L. B. Schwartz. 1984. Activation of rat serosal mast cells by chymase, an endogenous secretory granule protease. *J. Immunol.* 132:2571-2577.
185. Kido, H., N. Fukusen, and N. Katunuma. 1985. Antibody and inhibitor of chymase inhibit histamine release in immunoglobulin E-activated mast cells. *Biochem. Int.* 10:863-871.
186. Mari, B., S. Guerin, D. F. Far, J. P. Breitmayer, N. Belhacene, J. F. Peyron, B. Rossi, and P. Auberger. 1996. Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB J.* 10:309-316.
187. al Ani, B., M. Saifeddine, A. Kawabata, and M. D. Hollenberg. 1999. Proteinase activated receptor 2: Role of extracellular loop 2 for ligand-mediated activation. *Br. J. Pharmacol.* 128:1105-1113.
188. Blackhart, B. D., L. Ruslim-Litrus, C. C. Lu, V. L. Alves, W. Teng, R. M. Scarborough, E. E. Reynolds, and D. Oksenberg. 2000. Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide. *Mol. Pharmacol.* 58:1178-1187.
189. Compton, S. J., J. J. McGuire, M. Saifeddine, and M. D. Hollenberg. 2002. Restricted ability of human mast cell tryptase to activate proteinase-activated receptor-2 in rat aorta. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 80:987-992.
190. Compton, S. J., B. Renaux, S. J. Wijesuriya, and M. D. Hollenberg. 2001. Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br. J. Pharmacol.* 134:705-718.

191. Compton, S. J., S. Sandhu, S. J. Wijesuriya, and M. D. Hollenberg. 2002. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *Biochem. J.* 368:495-505.
192. Soto, A. G., and J. Trejo. 2010. N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: A critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization. *J. Biol. Chem.*
193. Rauter, I., M. T. Krauth, K. Westritschnig, F. Horak, S. Flicker, A. Gieras, A. Repa, N. Balic, S. Spitzauer, J. Huss-Marp, K. Brockow, U. Darsow, H. Behrendt, J. Ring, F. Kricek, P. Valent, and R. Valenta. 2008. Mast cell-derived proteases control allergic inflammation through cleavage of IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121:197-202.
194. Alic, A., N. Hashemi-Shirazi, and F. L. Pearce. 2001. Protease activated receptors and mast cell activation. *Inflamm. Res.* 50 Suppl 2:S57-S58.
195. Zeitelhofer, M., D. Karra, J. P. Vessey, E. Jaskic, P. Macchi, S. Thomas, J. Riefler, M. Kiebler, and R. Dahm. 2009. High-efficiency transfection of short hairpin RNAs-encoding plasmids into primary hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 87:289-300.
196. Gimborn, K., E. Lessmann, S. Kuppig, G. Krystal, and M. Huber. 2005. SHIP down-regulates FcepsilonR1-induced degranulation at supraoptimal IgE or antigen levels. *J. Immunol.* 174:507-516.
197. Yoshida, A., M. Ohba, X. Wu, T. Sasano, M. Nakamura, and Y. Endo. 2002. Accumulation of platelets in the lung and liver and their degranulation following antigen-challenge in sensitized mice. *Br. J. Pharmacol.* 137:146-152.
198. Jeffery, P. K., A. J. Wardlaw, F. C. Nelson, J. V. Collins, and A. B. Kay. 1989. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140:1745-1753.
199. Metzger, W. J., K. Sjoerdsma, H. B. Richerson, P. Moseley, D. Zavala, M. Monick, and G. W. Hunninghake. 1987. Platelets in bronchoalveolar lavage from asthmatic patients and allergic rabbits with allergen-induced late phase responses. *Agents Actions Suppl* 21:151-159.
200. He, S., A. R. McEuen, S. A. Blewett, P. Li, M. G. Buckley, P. Leufkens, and A. F. Walls. 2003. The inhibition of mast cell activation by neutrophil lactoferrin: uptake by mast cells and interaction with tryptase, chymase and cathepsin G. *Biochem. Pharmacol.* 65:1007-1015.

7 Anhang

7.1 Geräte

Durchflusszytometer	FACS Calibur, Beckton-Dickinson, San Jose, USA
Platten-LightCycler	LightyCycler Instrument II 480, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
LightCycler 2.0	LC 2.0, , Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Mikrotiterplatten-photometer	Tecan Sunrise Remote, Crailsheim, Deutschland
Thermocycler	MJ Mini, BioRad, USA
Thermoschüttler	Modell 5437, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikroliter, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikro 200, Hettich, Steifurt, Deutschland

7.2 Computerprogramme

CorelGraphics Suite 11 für Windows	Corel, Dublin, Irland
FlowJo	BioRad, München, Deutschland
LightCycler 2.0 Software	Version 3.5.3, Roche, Mannheim, Deutschland
Microsoft Word 2000	Microsoft Cooperation, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft PowerPoint	Microsoft cooperation, Unterschleißheim, Deutschland
Origin 6.0 für Windows	Microbial Software, Northampton, USA
PlattenLightCycler 480 Software	Version 1.5., Roche, Mannheim, Deutschland

SPSS 8.0

SPSS GmbH Software, München, Deutschland

WinMDI 2.9

J. Trotter, Scripps Institut, Kalifornien, USA

7.3 Reagenzien und Lösungen

Das hier verwendete Wasser (H₂O) wurde, wenn nichts anderes angegeben, durch eine kombinierte Ultrafilter- Ionenaustausch-Membranfiltrationsanlage (Milli-Q Regent Water System, Millipore, Eschborn) gereinigt.

Braun dest (*Aqua ad injectabilia* Braun, pyrogenfrei) stammte von der Firma Braun, Melsungen).

7.3.1 Zellisolierung und Zellkultur

Dulbecco's PBS

2,7	mM	KCL
140	mM	NaCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
10	mM	Na ₂ HPO ₄ , in Braundest gelöst

pH 7,4

MACS-Puffer

PBS-D

0,5	% w/v	BSA
-----	-------	-----

10 x Mastzellpuffer

2,9	M	NaCl
60	mM	Glukose
120	mM	Hepes

30	mM	KCl
37	mM	Na ₃ PO ₄ x 12 H ₂ O
1	%	BSA, gelöst in Braun dest

PBS-D + CaMg

2,7	mM	KCl
140	mM	NaCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
10	mM	Na ₂ HPO ₄
0,9	mM	Ca ₂ Cl
0,5	mM	MgCl ₂ , in H ₂ O gelöst

pH 7,4

PBS-D + CaMg/BSA

PBS-D + CaMg

0,1 % w/v BSA

Transportmedium

20	mM	Hepes
10	%	FCS
1	%	Penicillin/Steptomycin
1,67	nM	Heparin, gelöst in RPMI 1640 (biochrom, Berlin, Deutschland)

Trypanblaulösung

0,9	% w/v	NaCl
0,1	% w/v	Trypanblau, in H ₂ O gelöst

Toluidinblaulösung

0,1 % w/v Toluidinblau, in 1 m HCL gelöst

7.3.2 Hexosaminidase Release Assay**Acetatpuffer**

1 m Na-Acetat, in H₂O gelöst
HCl zur Einstellung des pH auf 4,5

β-Hexosaminidase-Substratlösung

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

Glycinpuffer

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

7.3.3 RNA-Isolierung**Elutionspuffer II (30 ml, High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics)**

Nukleasefreies, destilliertes Wasser

Sterilfiltriert

Lysepuffer (25 ml, High Pure RNA Isolation Kit)

4.5 M Guanidin-HCL
50 mM Tris-HCL
30 % Triton X-100 (w/v)
pH 6,6

Inkubationpuffer (10 ml, High Pure RNA Isolation Kit)

1	M	NaCl
20	mM	Tris-HCL
10	mM	MnCl ₂

pH 7,0

PBS

2,7	mM	KCL
137	mM	NaCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄

pH 7,2 - 7,4

Waschpuffer I (33 ml, High Pure RNA Isolation Kit)

5	M	Guanidin-HCL
20	mM	Tris-HCL

pH 6,6, finale Konzentrationen nach Zugabe von 20 ml Ethanol

Waschpuffer II (10 ml, High Pure RNA Isolation Kit)

20	mM	NaCl
2	mM	Tris-HCL

pH 7,5, finale Konzentrationen nach Zugabe von 40 ml Ethanol

7.3.4 cDNA-Synthese, RT-Reaktion und PCR**M-MuIV Reverse Transkriptase (20U/μl, First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas)**

50	mM	Tris-HCL
0,1	M	NaCl

1	mM	EDTA
5	mM	DTT
0,1	%	Triton X-100
50	%	Glycerol

dNTP-Mix (C. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

10	mM	dGTP
10	mM	dATP
10	mM	dTTP
10	mM	dCTP in H ₂ O gelöst

Oligo(dT)₁₈-Primerlösung (First Strand cDNA Synthesis Kit)

0,5 µg/ml Oligo(dT)₁₈-Primer in H₂O gelöst

DEPC behandeltes Wasser (First Strand cDNA Synthesis Kit)

H₂O gereinigt durch das Milli-Q-System, versetzt mit DEPC

Gelladepuffer

60	mM	Tris-HCL
30	mM	Na-Acetat
12	mM	EDTA
60	%(w/v)	Glycerin
0,18	%(w/v)	Bromphenolblau
0,12	%(w/v)	Xylencyanolblau

Reaktionspuffer (First Strand cDNA Synthesis Kit)

250	mM	Tris-HCL
250	mM	KCL
20	mM	MgCl ₂

50 mM DTT
pH 8.3

Ribonuclease Inhibitor (First Strand cDNA Synthesis Kit)

20 mM HEPES-NaOH
50 mM NaCL
8 mM DTT
0,5 mM Elugent Detergenz
50 % Glycerol

TAE-Puffer

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA
pH 8.5

7.3.5 siRNA-Behandlung von Mastzellen

PAR1 siRNA-Lösung

20 μ M PAR1 siRNA gelöst in Suspensionspuffer

PAR4 siRNA-Lösung

20 μ M PAR4 siRNA gelöst in Elutionspuffer (s. 7.3.3)

Serumfreies (SF-) Medium

Kulturmedium (s. 2.4.3), ohne Supplement, ohne Penicillin/Streptomycin

X-Treme GENE Transfektionsreagenz (Roche Applied Science)

Mischung aus verschiedenen Lipiden (keine weiteren Angaben des Herstellers), gelöst in H₂O,
steril filtriert

Veröffentlichungen

Gedruckte Abstracts:

Oranos Ghulam, Frank Petersen, Brigitte Kasper, Ernst Brandt. 2009. *Expression and functionality of proteinase-activated receptors on primary human lung mast cells*

Pneumologie 2010; 64: 49.

Kongressbeitrag:

32nd Symposium of the North-German Immunologists (NDI), Borstel, Deutschland

Oranos Ghulam, Frank Petersen, Brigitte Kasper, Ernst Brandt. 2009. *Expression and function of proteinase-activated receptors (PARs) on primary human lung mast cells*

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ernst Brandt für die Überlassung des aktuellen Themas und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die intensive Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und sein unschätzbares Engagement.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus als Leiterin des Institutsbereichs Immunologie und Zellbiologie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die sehr gute wissenschaftliche Atmosphäre am Forschungszentrum Borstel.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Petersen möchte ich mich für die hilfreichen Ratschläge, seine stete Ansprechbarkeit und die fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Herrn Dr. Martin Ernst danke ich vor allem für seine Unterstützung im Bereich der Statistik.

Mein herzlicher Dank gilt den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Laborgruppe Biologische Chemie und Biochemische Immunologie Herrn Jan Schulmistrat, Frau Dr. Brigitte Kasper, Frau Dr. Franziska Schwartzkopff, Herrn Dr. Xinhua Yu, Frau Lisette Leonhardt, Frau Anika Kasprick für praktische Hinweise, Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die Bereitstellung von humanen primären basophilen Granulozyten möchte ich mich bei den Drs. H. Haas und G. Schramm und der Arbeitsgruppe Zelluläre Allergologie bedanken.

Natürlich dürfen die Mitarbeiterinnen der Laborgruppe Biologische Chemie, Frau Gabrielle Huß und Frau Christine Engellenner und der Laborgruppe Biochemische Immunologie, Frau Cindy Hass, Frau Carola Schneider und Frau Diana Heinrich, nicht unerwähnt bleiben, ohne

die diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre. Mein besondere Dank gilt dabei Frau Gabrielle Huß und Frau Cindy Hass, die mich vor allem in der letzten Phase meiner Arbeit nicht nur technisch, sondern auch freundschaftlich unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte meinen Eltern und meinen Schwestern Jasamin und Moqaddassa für ihre Unterstützung und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit danken. Besonderer Dank geht an meinen Mann Nazeer, der mir durch seine Geduld und seine Fröhlichkeit gerade in der letzten Phase meiner Arbeit eine große seelische Stütze war.

Lebenslauf

Persönliche Informationen:

Name : Oranos Ghulam
Anschrift : Rügelsberg 12, 23845 Itzstedt
Geburtsdatum : 26.12.1980
Geburtsort : Kabul
Staatsangehörigkeit : deutsch

Bisheriger Werdegang:

August 1986 - Juli 1990 : Besuch der Grundschule am Diebsturm Grünberg

August 1990 - Dezember 1994: Besuch der Theo-Koch Gesamtschule, Grünberg

Januar 1995 – Juni 2000: Besuch der Otto-Hahn Gesamtschule, Hamburg

Oktober 2000 – Juni 2004: Besuch der Universität / Institut für Pharmazie, Hamburg

Oktober 2004: Abschlussprüfungen; Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung

November 2004 – April 2005: Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres in der Pinnau-Apotheke, Quickborn

Mai 2005 – Oktober 2005: Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres am Forschungszentrum Borstel, Borstel

Januar 2006 – Juli 2006: Vollzeitbeschäftigung in der Pinnau-Apotheke, Quickborn

Juli 2006 – April 2010: Promotion am Forschungszentrum Borstel
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie

Laborgruppe Biologische Chemie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Oranos Ghulam, die vorliegende Arbeit, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers, nach Form und Inhalt selbstständig verfasst und keine als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Itzstedt, Mai 2010

Oranos Ghulam

