

Extrazelluläre RNA (eRNA) als Alarmsignal in der angeborenen Immunität

– Charakterisierung der Freisetzung von eRNA
aus Mastzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Elsemüller, Ann-Kathrin Julia
aus Wiesbaden

Gießen 2019

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Gutachter: PD Dr. Eva M. J. Peters

Tag der Disputation: 14.01.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entzündungsreaktion	1
1.1.1	Definition Entzündung	1
1.1.2	Einteilung	1
1.1.3	Ursachen einer Entzündung	3
1.1.4	Symptome einer Entzündung	3
1.1.5	Ablauf einer Entzündungsreaktion	5
1.1.6	Mediatoren der Entzündungsreaktion	7
1.2	Mastzellen	8
1.2.1	Funktion	8
1.2.2	Entstehung und Aufbau	9
1.2.3	Arten von Mastzellen	9
1.2.4	Die Rolle von Mastzellen in der Entzündungsreaktion	10
1.2.5	Mastzellmediatoren	11
1.2.6	Aktivierung von Mastzellen	14
1.2.7	Hemmung von Mastzellen	20
1.3	Extrazelluläre RNA (eRNA) – ein neuer Mastzellmediator	21
1.3.1	Merkmale der RNA	22
1.3.2	Codierende und nicht-codierende RNA	23
1.3.3	Extrazelluläre RNA als inflammatorisches Agens	24
1.4	Ziel dieser Arbeit	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer	30
2.1.1	Geräte	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3	Chemikalien	32
2.1.4	Antikörper	35
2.1.5	Verwendete KITs	36
2.2	Zellkultur	36
2.2.1	Kultivierung von HMC-1	36
2.2.2	Isolation und Kultivierung von Mastzellen aus murinem Knochenmark	37
2.2.3	Charakterisierung der Mastzellen durch Durchflusszytometrie	38
2.2.4	Einfrieren und Auftauen von HMC-1	39
2.3	Toxizitätstests	40
2.3.1	Zellzählung	40
2.3.2	LDH-Assay	41
2.4	Mastzelldegranulation	42
2.4.1	Stimulation der murinen und humanen Mastzellen	42

2.4.2	Inhibition der Mediatorfreisetzung	43
2.5	Quantifizierung der Degranulation von Mastzellen.....	43
2.5.1	β -Hexosaminidase-Messung	43
2.5.2	Histamin Freisetzung	44
2.6	Isolierung und Quantifizierung von RNA	46
2.6.1	RNA-Quantifizierung aus den Lysaten	47
2.6.2	RNA-Quantifizierung aus dem Überstand und den Mikropartikeln	48
2.7	Immunzytochemie der Mastzellen	49
2.8	Elektronenmikroskopie	50
2.9	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Charakterisierung von murinen Mastzellen	51
3.2	Stimulation von Mastzellen.....	52
3.2.1	Toxizitätstest.....	52
3.2.2	Aktivierung der Mastzellen in Abhängigkeit von Ionomycin, C48/80 und Fc ϵ	54
3.2.3	Aktivierung von Mastzellen durch Komplementfaktoren	59
3.2.4	Aktivierung der Mastzellen über Toll-like-Rezeptoren.....	61
3.2.5	Aktivierung der Mastzellen unter Hypoxie Bedingungen.....	64
3.3	Identifizierung der RNA	67
3.4	Reversibilität der RNA-Freisetzung	69
3.5	Hemmung der Degranulation und der RNA-Freisetzung	70
3.5.1	Hemmung mittels Cromolyn	70
3.5.2	Hemmung mittels Calcium-Chelatierung.....	72
3.5.3	Hemmung mittels Wortmannin	77
3.6	Lokalisation der RNA.....	79
3.6.1	Immunzytochemie.....	79
3.6.2	Elektronenmikroskopie	83
4	Diskussion	84
4.1	Extrazelluläre RNA als neuer Mastzellmediator	84
4.2	Stimulus-abhängige Freisetzung von eRNA	85
4.2.1	Mastzellaktivierung durch membranständigen Fc ϵ -Rezeptor	86
4.2.2	Mastzellaktivierung über TLR.....	87
4.2.3	Mastzellaktivierung über den G-Protein-gekoppelten-Signalweg	88
4.2.4	Mastzellaktivierung durch Hypoxie.....	88
4.2.5	Hemmung der Mastzelldegranulation.....	89
4.2.6	RNA-Analyse	89
4.3	Lokalisation der extrazellulären RNA	90
4.4	Extrazelluläre RNA im Kontext der Mastzelldegranulation.....	91
4.5	Limitierungen dieser Arbeit.....	93

5	Zusammenfassung	94
6	Abstract.....	95
7	Abkürzungsverzeichnis.....	96
8	Abbildungsverzeichnis.....	100
9	Tabellenverzeichnis	102
10	Formelverzeichnis.....	103
11	Literaturverzeichnis	104
12	Publikationsverzeichnis	119
13	Ehrenwörtliche Erklärung	IV
14	Danksagung.....	V

1. Einleitung

1 Einleitung

1.1 Entzündungsreaktion

Mastzellen, als Zellbestandteil des angeborenen Immunsystems, sind maßgeblich an der Einleitung, Aufrechterhaltung und Eindämmung einer Entzündungsreaktion beteiligt. Dies ermöglichen sie durch ihre strategische Lage im Gewebe sowie durch eine Vielzahl an Mediatoren, die sie in ihren Granula speichern und nach Stimulation freisetzen (1). Zu ihren Mediatoren zählen beispielsweise Histamin, Heparin, Prostaglandine und Proteasen (2). Mastzellen gewährleisten so die schnelle Verfügbarkeit von gefäßerweiternden und die Abwehrreaktion fördernden Zytokinen. Über diese Mediatoren wirken Mastzellen proinflammatorisch und ermöglichen so im weiteren Entzündungsverlauf den Nachschub an notwendigen Entzündungsmediatoren. Es sind jedoch noch nicht alle Inhaltsstoffe bekannt, die von Mastzellen freigesetzt werden (3). Diese Arbeit untersucht die Bedingungen und Einflussfaktoren unter denen das bislang unbekanntes Freisetzungserzeugnis der angeborenen Immunität, die extrazelluläre RNA, im Rahmen des Degranulationsprozesses von Mastzellen sezerniert wird.

1.1.1 Definition Entzündung

Der Begriff *Entzündung* beschreibt die Abwehrreaktion des Körpers auf innere oder äußere Reize. Die Entzündungsreaktion schützt den Körper vor gefährlichen Einflüssen und hilft ihm, sich selbst zu heilen. Dieses Alarmsignal ist abhängig von einwirkenden beziehungsweise auslösenden Faktoren und stellt einen aktiven Abwehrprozess der Immunantwort unseres Körpers dar. Die zahlreichen an einer Entzündungsreaktion beteiligten Stoffe ermöglichen einen funktionierenden Heilungsprozess. Die Entzündung wird noch am Ort des Geschehens eingedämmt, um eine Ausbreitung (Sepsis genannt) zu verhindern. Nachdem die Schädigung eingegrenzt wurde, wird sie beseitigt und der Schaden repariert (3).

1.1.2 Einteilung

Eine Entzündungsreaktion wird je nach zeitlichem Ablauf in vier Unterformen gegliedert. Grundsätzlich werden eine akute und eine chronische Form der Entzündung unterschieden. Auch Mischformen zwischen beiden Arten der Entzündung sind möglich. Die vier Formen der Entzündungsreaktion sind:

- Perakuter Verlauf
- Akuter Verlauf

1. Einleitung

- Subakuter Verlauf
- Chronischer Verlauf (3).

1.1.2.1 Perakute Entzündung

Die perakute Entzündung stellt eine sehr schnell verlaufende Form der Entzündung dar, die entweder durch ein besonders toxisches Bakteriengift oder durch ein stark geschwächtes Immunsystem ausgelöst wird. Sie entwickelt sich innerhalb von Stunden und verläuft ohne Therapie binnen weniger Tage meist tödlich (4).

1.1.2.2 Akute Entzündung

Unter einer akuten Entzündungsreaktion wird ein Abwehrprozess des Körpers verstanden, der sowohl örtlich als auch zeitlich begrenzt auftritt. Prädestiniert für eine solche Art von Entzündung sind die sogenannten Endstrombahnen. Dies sind die letzten, fein verzweigten Gefäßabschnitte in einem Gewebe. Der Körper versucht an Ort und Stelle mit allen ihm zur Verfügung stehenden Abwehrmaßnahmen die Entzündung einzudämmen. Bedingt durch eingetretene Fremdstoffe, beispielsweise Bakterien, werden Entzündungsmediatoren und Zytokine freigesetzt (5). Gekennzeichnet ist die akute Entzündung durch einen plötzlichen Beginn und schnell auftretende klassische Entzündungszeichen wie Fieber, Schwellung und Schmerzen (4).

1.1.2.3 Subakute Entzündung

Diese Art der Entzündung ist eine Mischform aus einer akuten und einer chronischen Entzündung, die über Wochen bis Monate verläuft (6). Aufgrund eines granulierenden Prozesses wird der Körper an der Bekämpfung der Entzündungsreaktion gehindert. Eine Vermehrung des Granulationsgewebes umgibt den Auslöser und schützt ihn somit vor den Abwehrmechanismen des Körpers (4).

1.1.2.4 Chronische Entzündung

Eine chronische Entzündung ist ein schleichender Prozess über Monate bis Jahre, bei dem der Körper nicht in der Lage ist, einen optimalen Schutz aufzubauen. Eine länger andauernde Entzündung – per Definition meist länger als vier Wochen – bedeutet Stress für den Körper (4). Die vielzähligen Abwehrsubstanzen des Körpers liegen über einen längeren Zeitraum in einer hohen Konzentration vor und sind daher schädlich für den Körper. Durch die zunehmende Gefäßschädigung (Arteriosklerose) entwickeln sich Krankheiten wie Herzinfarkte, Schlaganfall, Alzheimer, Arthrose oder Diabetes (7).

1. Einleitung

1.1.3 Ursachen einer Entzündung

Ursachen einer Entzündung im Körper können sowohl äußere als auch innere Einflussfaktoren sein. Dabei kommt es zu einer Störung der natürlichen Barriere, so dass schädigende Substanzen in den Körper eindringen können. Ist beispielsweise der kontinuierliche Fluss von Urin oder Schleim gestört, so kommt es durch den Aufstau und den damit verbundenen fehlenden Abtransport von schädlichen Substanzen zu optimalen Voraussetzungen für die Entstehung einer Entzündung (3). Solch schädigende Substanzen können sowohl exogene als auch endogene Noxen sein (4).

1.1.3.1 Exogene Noxen

Zu den äußeren Einflussfaktoren zählen neben Erregern ebenfalls physikalische, traumatisch-mechanische, aktinische und chemisch-toxische Trigger. Viren, Pilze, Würmer, Protozoen oder Bakterien können als *belebte Noxen* das Abwehrsystem des Körpers umgehen, indem sie beispielsweise über eine Hautläsion eindringen. Physikalische Einflüsse, zum Beispiel starke Sonnenlichtexposition, kann in Form eines Sonnenbrandes ebenso eine Entzündung auslösen (4).

Die Einleitung der Entzündungsreaktion wird durch *Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)* induziert, die durch zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems erkannt werden (8) (9).

1.1.3.2 Endogene Noxen

In manchen Situationen kann der Körper sich selbst Schaden zufügen beispielsweise durch pathogene Stoffwechselprodukte wie Harnsäurekristalle oder harnpflichtige Stoffe. Das Immunsystem versucht diese Substanzen abzuwehren und es kommt zu einer Entzündungsreaktion. Auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen greift der Körper seine eigenen Bestandteile in Form einer Entzündungsreaktion an (4).

Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) lösen auch in Abwesenheit von Mikroorganismen, beispielsweise durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR), eine Entzündung aus. DAMPs sind zum Beispiel chromosomale DNA, Hitzeschockproteine, Histone oder ATP. Sie werden von nekrotischen Zellen freigesetzt (10).

1.1.4 Symptome einer Entzündung

Die Kriterien, anhand derer die entzündliche Reaktion unterteilt wird, gliedern sich in allgemeine und lokale Entzündungskriterien (4). In den nachfolgenden zwei Abschnitten werden die einzelnen Charakteristika dieser Reaktionen detaillierter erläutert.

1. Einleitung

1.1.4.1 Allgemeine Entzündungskriterien

Ein Hauptmerkmal der Entzündung stellt das Fieber dar, also eine Erhöhung der Körpertemperatur über 38 °C. Die Signalsubstanzen des Immunsystems Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10), welche das Thermoregulationszentrum des Thalamus beeinflussen, rufen eine Sollwertverschiebung der Körperkerntemperatur nach oben hervor. Es resultiert die Bildung von Prostaglandin E, welches über eine Sympathikusstimulation zur Verengung der kleinen Hautgefäße führt. Auf diese Weise kann weniger Wärme über die Oberfläche der Haut abgegeben werden, die Körpertemperatur steigt an und nähert sich somit der nach oben regulierten Körperkerntemperatur.

Schmerzen werden durch eine Reihe von entzündungsfördernden Mediatoren ausgelöst, wie zum Beispiel Histamin, Bradykinin, Serotonin, Prostaglandin PGE₂, Prostazyklin PGI₂ und Acetylcholin (3). Die Weitstellung der Arteriolen mündet in einer vermehrten Durchblutung (Hyperämie), so erklärt sich der Temperaturanstieg im entzündeten Gebiet (4).

1.1.4.2 Lokale Entzündungskriterien

Seit der Antike existiert eine Definition der Entzündung, die auch heute im Klinikalltag noch Verwendung findet. Bereits der römische Arzt Celsus (30 v. Chr. bis 38 n. Chr.) beschrieb vier Hauptmerkmale der Entzündung.

Diese wurden von seinem Kollegen Galen (130 bis 200 n. Chr.) einige Jahre später durch ein fünftes Kardinalsymptom der lokalen Entzündung ergänzt (3) (4). Zu ihnen zählen:

Kardinalsymptom	Definition
Tumor	Das entzündete Gewebe ist geschwollen
Rubor	Das entzündete Gewebe ist gerötet
Calor	Das entzündete Gewebe ist erwärmt
Dolor	Das entzündete Gewebe schmerzt
Functio laesa	Das entzündete Gewebe ist in seiner Funktion eingeschränkt

Tabelle 1: Kardinalsymptome nach Galen (3)

Bedingt durch die gesteigerte Kapillarpermeabilität kommt es am Ort des Entzündungsgeschehens zu einer Schwellung. Das freigesetzte Blutplasma führt zu einem entzündlichen Ödem (11). Gleichzeitig resultiert aus der Vasodilatation der Gefäße eine vermehrte Durchblutung mit entsprechender Rötung und Überwärmung der Haut. Freigesetzte Mediatoren verursachen Schmerzen und schränken die Beweglichkeit ein (4).

1. Einleitung

1.1.5 Ablauf einer Entzündungsreaktion

Die entzündliche Reaktion lässt sich in eine vaskuläre und eine zelluläre Phase gliedern. Die *vaskuläre Reaktion* wird durch geschädigte Zellen ausgelöst, die Botenstoffe (Entzündungsmediatoren) freisetzen und so die interzellulären Verbindungen der Endothelzellen im Bereich der postkapillären Venolen lockern (11). Neben der Freisetzung von intravasaler Flüssigkeit wird der ungerichtete Austritt von Entzündungszellen ermöglicht. Dieser Vorgang wird *Chemokinese* genannt (11).

An der *zellulären Reaktion* beteiligte Entzündungszellen sind neben den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auch Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Unterstützt werden sie durch Plasmaproteine, gewebständige zelluläre Bestandteile (Mastzellen, Fibroblasten), ortsständige Zellen und Matrixmoleküle (3). Durch Stimulation von gewebständigen Mastzellen werden weitere Mediatoren freigesetzt. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Leukotriene, Prostaglandine, Histamin und Bradykinin. Nachfolgend kommt es zur eigentlichen Abwehr der schädigenden Substanz durch Phagozytose (11).

Neutrophile Granulozyten und auch Monozyten haften aufgrund der Wirkung der zahlreichen Entzündungsmediatoren an den neu entstandenen Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des Endothels. Dadurch induziert beginnt der Austritt der Zellen aus den Gefäßen, *Emigration* genannt. Sie werden durch die Entzündungsmediatoren angelockt und gelangen so direkt zum Hauptort der Entzündung. Diese gerichtete Zellbewegung wird *Chemotaxis* genannt. Unterstützt werden die einwandernden Abwehrzellen durch die bereits stimulierten Mastzellen. Denn diese sind in der Lage, mittels freigesetzter Proteasen, wie beispielsweise Trypsin, Chymase und Carboxypeptidase, die Extrazellulärsubstanz abzubauen und sie für weitere Entzündungszellen durchgängig zu machen (2).

Die neutrophilen Granulozyten fahren mit der Phagozytose der eingedrungenen Erreger fort (12). Zusammen mit Makrophagen und Monozyten bilden sie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wie zum Beispiel Superoxid-Anionen und Stickstoffmonoxid. Diese Derivate sind für die eingedrungenen Erreger toxisch (13). Zusätzlich produzieren und sezernieren Phagozyten verschiedene Zytokine, durch die Lymphozyten und natürliche Killerzellen aktiviert werden (14).

Makrophagen fördern die Bildung neuer Abwehrzellen durch Freisetzung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und gewährleisten auf diese Weise die fortlaufende Abwehrreaktion des Körpers (15). Um die Abwehrreaktion noch spezifischer zu gestalten, präsentieren sie einen Teil der von ihnen aufgenommenen Bakterienbestandteile an ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können T-Lymphozyten

1. Einleitung

Fremdantigene als solche erkennen. Daraufhin differenzieren und vermehren sie sich. Die ebenfalls durch die antigenpräsentierenden Makrophagen angesprochenen B-Lymphozyten entwickeln sich zu Plasmazellen. Diese sind in der Lage Antikörper zu produzieren, wodurch der Körper spezifisch den auslösenden Erreger abwehren kann. Die zunächst ungerichtete und unspezifische Abwehrreaktion hat sich zu einer gerichteten entwickelt. T- und B-Lymphozyten entwickeln sich zu sogenannten Gedächtniszellen, so kann der Körper bei einer erneuten Exposition effektiver auf das Pathogen reagieren (15).

Im nächsten Schritt kommt es zu einer verstärkten Einwanderung von eosinophilen Granulozyten, welche die Entzündungsreaktion eindämmen, indem sie die Antigen-Antikörper-Komplexe und freigesetzten Mastzellmediatoren wieder entfernen (11).

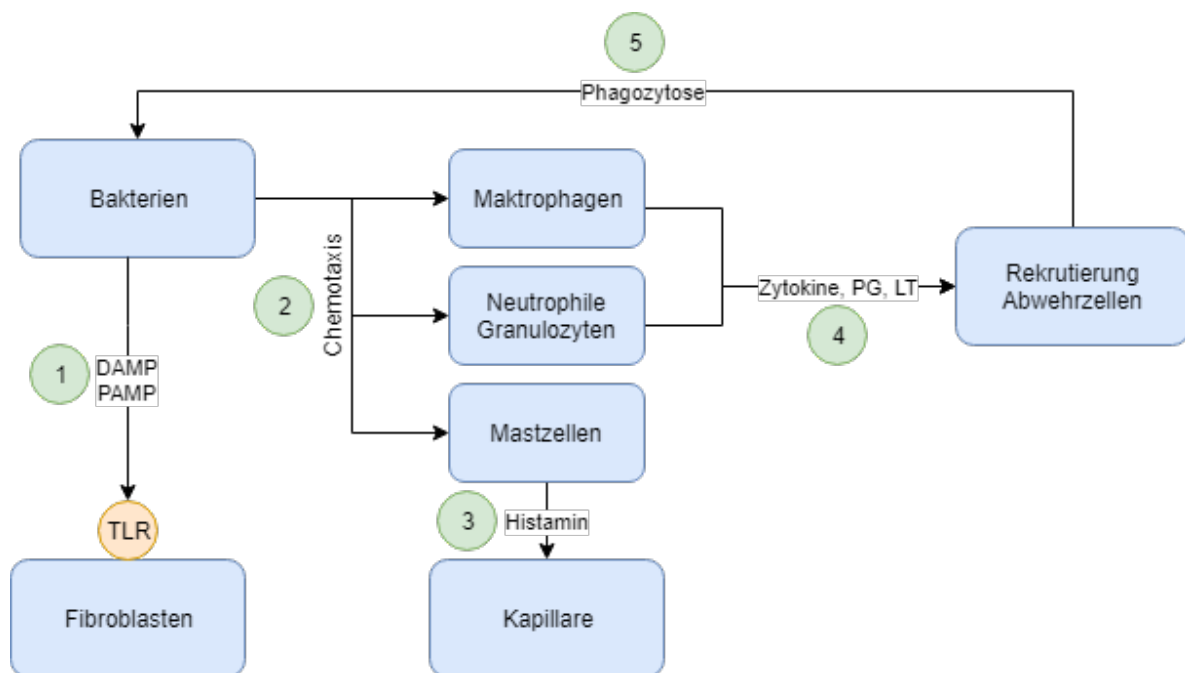


Abbildung 1: Beginn der Entzündungsreaktion. In der ersten Phase der Entzündung werden von Bakterien spezifische Toxine (PAMP) freigesetzt [1], von TLR erkannt und so vor allem die Fibroblasten geschädigt. Chemische Produkte der Bakterien wirken chemotaktisch auf ortsansässige Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen [2]. Durch das von den Mastzellen freigesetzte Histamin [3] wird die Durchlässigkeit der Kapillaren erhöht und es können vermehrt Plasmaproteine ins Gewebe eintreten, die wiederum die Abwehrreaktion unterstützen. Mit Hilfe der von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen [4] freigesetzter Prostaglandine (PG), Leukotriene (LT) und Zytokinen kommt es zur weiteren Rekrutierung von Abwehrzellen und letztlich zur Phagozytose der Bakterien [5], modifiziert nach (11).

Die meisten neutrophilen Granulozyten gehen im Rahmen der Phagozytose zugrunde, wobei apoptotisch lysosomale Enzyme freigesetzt werden. Diese führen zur Einschmelzung des Gewebes – umgangssprachlich Eiter genannt. Hierbei handelt es sich um Zellen und extrazelluläre Matrix. Der Eiter wird mit Hilfe von Makrophagen und aus dem Blut einwandernden Monozyten abgebaut, die Abwehrreaktion wird gehemmt und Aufräum- und Regenerationsprozesse beginnen. Die ursprünglich

1. Einleitung

proinflammatorisch ausgerichteten Mediatoren weichen einem antiinflammatorisch geprägten Muster aus Lipoxinen und Resolvinen (3).

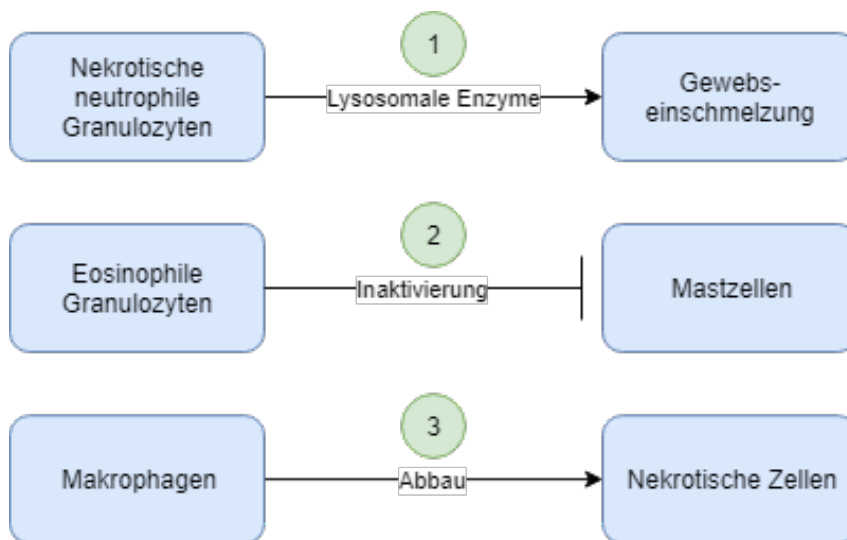


Abbildung 2: Einleitung der Heilungsphase. Diese Abbildung gibt eine Übersicht über die Arbeitsweise von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten während der Heilungsphase. Die meisten neutrophilen Granulozyten gehen im Rahmen der Phagozytose zugrunde und setzen dabei lysosomale Enzyme [1] frei. Die eosinophilen Granulozyten [2] sind an der Inaktivierung der aktiven Mastzellen [3] beteiligt und die Makrophagen an dem Abbau nekrotischer Fibroblasten, modifiziert nach (11).

Angiogenetische Faktoren der Makrophagen und Thrombozyten fördern das Wachstum und die Neubildung von Kapillarsprossen. So entsteht unter dem Einfluss von Fibroblasten ein gewebs- und zellreiches Granulationsgewebe. Innerhalb der nächsten Tage bis Wochen entwickelt sich das Granulationsgewebe zu einer Narbe aus gefäß- und zellarmem straffen Bindegewebe (11).

1.1.6 Mediatoren der Entzündungsreaktion

Der Begriff *Mediator* beschreibt eine Gruppe von Stoffen, welche die Aufgabe besitzt, Signale an nachfolgende Zellen zu übertragen. Es folgt eine zeitliche Einordnung der Mediatoren in den Ablauf der Entzündungsreaktion (3).

1.1.6.1 Sofortreaktion

Zu Beginn der Entzündung kommt es innerhalb von Sekunden bis Minuten zu einer veränderten Hämodynamik mit nachfolgender Hyperämie, Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung und Ödembildung. Diese Gewebsreaktionen werden vor allem durch die Mediatoren Histamin, Kinine und die Komplementfaktoren C3a und C5a hervorgerufen (3) (16).

1. Einleitung

1.1.6.2 Verzögerte Reaktion

Innerhalb der nächsten Stunden setzt die wenige Tage dauernde verzögerte Reaktion ein, deren Mediatoren zunächst neu produziert werden müssen. Komplementfaktor C5a, Leukotriene, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid (NO), Plättchenaktivierender Faktor (PAF), Interleukine und Chemokine induzieren die Einwanderung der Leukozyten (*Diapedese*), die Zellaktivierung und die Phagozytose (3) (14).

1.1.6.3 Spätreaktion

Besteht eine entzündliche Reaktion über einen längeren Zeitraum, so wird sie Spätreaktion genannt. Die Produktion der vorherigen Mediatoren wird durch die Anregung der adaptiven Immunantwort komplementiert. Aus der ungerichteten beziehungsweise angeborenen Immunantwort entwickelt sich eine gerichtete Immunantwort, die schädliche Einflussfaktoren gezielter abwehren kann (3) (15).

1.1.6.4 Herkunft der Mediatoren

Vorgefertigte und gespeicherte Mediatoren werden zügig aus ortsanständige Gewebsmastzellen und Blutbasophilen freigesetzt, um einen schnellen Beginn der Abwehrmechanismen zu gewährleisten. Diese sind bereits vorgefertigt in ihnen gespeichert. Es folgt die Freisetzung von neu gebildeten Mediatoren wie Chemokine und Interleukine und die Bildung von Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteinen und Kininen (17). Diese werden als inaktive Vorstufen in der Leber gebildet und innerhalb kürzester Zeit am Ort des Entzündungsgeschehens aktiviert. Gleiches gilt für die in der Leber gebildeten Gerinnungsfaktoren, welche durch das Kinin-System direkt mit der Entzündungsreaktion verbunden sind und dessen Produkte beispielsweise vasodilatatorisch wirken (3).

1.2 Mastzellen

1.2.1 Funktion

Paul Ehrlich, Medizinstudent der Universität Freiburg und späterer Nobelpreisträger, entdeckte im Wintersemester 1875/76 eine im Rahmen der Immunantwort außerordentlich wichtige Zelle. Weil sie unter dem Lichtmikroskop durch ihre zahlreichen Granula ins Auge fiel, gab er ihr den Namen Mastzelle – inspiriert durch die Ähnlichkeit zu gemästeten Tieren (18). Mastzellen spielen vor allem für das Immunsystem des Menschen eine wichtige Rolle. Aber auch an der Wundheilung (19) und der Abwehr von Parasiten (20) sind sie beteiligt. Die ursprüngliche Annahme war, dass sie nur für die

1. Einleitung

Freisetzung von Histamin während akuter und chronischer Erkrankungen verantwortlich sind (21) (22) (23). Heute ist bekannt, dass sie auch bei der Entstehung und der Weiterentwicklung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (24) (25), Herzinsuffizienz (26), bei Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (27) und der Multiplen Sklerose (28) involviert sind und viele weitere Degranulationsprodukte freisetzen.

1.2.2 Entstehung und Aufbau

Mastzellen werden zur Gruppe der Leukozyten gezählt und entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Aus diesen bilden sich unter dem Einfluss des *Stern Cell Factors (SCF)* hämatopoetische Vorläuferzellen (29), die dann ins Blut gelangen und dort zirkulieren (1) (30). Sind sie vollständig differenziert, dann findet man sie vor allem im Gewebe (31), insbesondere in der Nähe von Gefäßen, Nerven, den Schleimhäuten, in der Epidermis sowie glatten Muskelzellen (1) (32) (33). Im Falle einer Entzündung werden sie zu dem betroffenen Gewebe rekrutiert und reifen dort unter dem Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren heran (34).

Sie sind 10 – 20 µm groß und besitzen bis zu tausend Granula, deren Inhalt sie selbst bilden. Diese zahlreichen Granula, die bis zu 40% des gesamten Zellvolumens ausmachen, ermöglichen die Speicherung vieler verschiedener Inhaltsstoffe, die für die Verstärkung einer Alarmreaktion notwendig sind (35).

1.2.3 Arten von Mastzellen

Es ist möglich Mastzellen direkt aus unterschiedlichen Geweben zu isolieren (36) (37) (38) (39), sie enzymatisch aufzureinigen und sie hinsichtlich ihrer Funktion zu untersuchen. Es gibt zwei Arten von Mastzellen, die sich in ihrer Gewebeverteilung und dem Inhalt ihrer intrazellulär gelegenen Granula unterscheiden (40).

Einerseits gibt es die *Mukosa-assoziierten Mastzellen* auch *MCT* genannt. Sie kommen vorwiegend in der Nähe von Darm und Atemwegen vor, stellen die ersten Abwehrzellen gegen Parasiten dar und sind 5-10 µm groß. In ihren Granula findet man vor allem Histamin, Heparin und Tryptase. Letztere charakterisiert diese Gruppe von Mastzellen. Im Rahmen ihrer Differenzierung sind sie vor allem auf Interleukin-3 angewiesen, welches von T-Zellen gebildet wird (40) (41).

Andererseits gibt es auch die *Bindegewebs-assoziierten Mastzellen* (*MCTC* genannt), die überwiegend in der Haut und dem interstitiellen Bindegewebe der Organe vorkommen und 10-20 µm groß sind. Ihre Granula enthalten unter anderem die Carboxypeptidase, Cathepsin G und neben der Tryptase auch Chymase. Ein weiterer Unterschied ist, dass sie sich unabhängig von T-Zellen differenzieren können (40) (41)

1. Einleitung

(42). Mastzellen besitzen verschiedenartige Granula. Bis jetzt sind drei verschiedene Arten bekannt. Neben endo- und lysosomalen Organellen mit zahlreichen intraluminalem Vesikeln und einem dichten Proteinkern, umgeben von multivesikulären Körperchen, gibt es auch diejenigen Granula, die aus elektronendichtem Material wie Histamin und Heparin bestehen (43).

1.2.4 Die Rolle von Mastzellen in der Entzündungsreaktion

Mastzellen gelten als Aktivatoren der Entzündungsreaktion und können über rezeptorvermittelte Aktivierung innerhalb von Sekunden auf einen einwirkenden Reiz mit einer Freisetzung ihrer Mediatoren reagieren. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Histamin, Prostaglandin, Leukotriene und Bradykinin, die zu einer Vasodilatation führen und proinflammatorisch wirken. Das Zusammenspiel der Mastzellmediatoren induziert die Ausbildung der fünf Kardinalsymptome der Entzündung (11). Ebenfalls freigesetzte Proteasen wie beispielsweise Tryptase, Chymase oder Carboxypeptidase induzieren die *Chemotaxis* von Zellen des Immunsystems wie den Leukozyten (2).

Durch Signalstoffe des adaptiven Immunsystems und Mediatoren der Sofort- und verzögerten Reaktion der Entzündung können weitere Mastzellen aktiviert werden und für Nachschub an Entzündungsmediatoren sorgen. Auch eine Interaktion zwischen Mastzellen und anderen Zellen des Immunsystems spielt bei der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion eine zentrale Rolle (3).

In der Entzündungsreaktion werden zusätzlich Neuropeptide wie Substanz P freigesetzt, die als Modulatoren proinflammatorischer Prozesse angesehen werden, indem sie Mastzellen und Phagozyten stimulieren und dadurch die Freisetzung von Alarmzytokinen induzieren (44) (45) (46) (47).

Darüber hinaus sind Mastzellen an der Unterstützung der Leukozyten beteiligt. Es wurde durch Chillo et al. gezeigt, dass vaskuläre Mastzellen durch Scherspannung aktiviert werden können (48). Durch ein Zusammenspiel mit Thrombozyten, Neutrophilen und von Neutrophilen gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann die Degranulation eingeleitet werden (49) (50). Mastzellen sind aber auch an der anschließenden Regenerationsphase beteiligt. Sie sind in der Lage, das gewebstoxische und im Rahmen der Entzündung gebildete Endothelin-1 abzubauen (51).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Immunsystem, ohne die Beteiligung von Mastzellen, nicht in der Lage wäre, eine effektive Abwehr gegenüber Schadstoffen aufzubauen. Mastzellen sind durch die Vielzahl an unterschiedlich wirkenden Mediatoren gleich zu mehreren Zeitpunkten in die Entzündungsreaktion involviert und insbesondere auch an der Aufrechterhaltung sowie der späteren Eindämmung beteiligt (3) (2) (51).

1. Einleitung

1.2.5 Mastzellmediatoren

Mastzellen besitzen zahlreiche Mediatoren, die sie in kleinen Vesikeln den sogenannten Granula speichern. Diese Granula besitzen einen hohen Anteil an polyanionischem Heparin und Chondroitinsulfaten, was sie stark basophil macht (1) (33) (52).



Abbildung 3: Elektronenmikroskopbild einer Mastzelle mit zahlreichen Granula (11)

Mastzellmediatoren besitzen entzündliche, vasoaktive und nozizeptive Eigenschaften (53). Die gespeicherten Botenstoffe wie Heparin sind beispielsweise an der Regulation der Blutgerinnung, aber auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Die Degranulation der Mediatoren geschieht sofort nach der Aktivierung der Mastzellen. Anschließend brauchen sie bis zu 72 Stunden, um sich zu regenerieren und ihre Mediatoren zu rekonstruieren (35).

Die Vielzahl an Botenstoffen im Inneren der Granula lässt sich anhand ihrer Syntheseigenschaften in drei Gruppen untergliedern:

- Granula-assoziierte Mediatoren, die präformiert in diesen gespeichert sind,
- de-novo synthetisierte Lipidmediatoren
- de-novo synthetisierte Zytokine, wobei proinflammatorische aber auch antiinflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-10 freigesetzt werden (31) (54).

In den folgenden Tabellen werden relevante Mediatoren und deren biologische Funktion dargestellt.

1. Einleitung

1.2.5.1 Granula-assoziierte Mastzellmediatoren

Mediator	Biologische Funktion
<u>Biogene Amine</u> - Histamin	<ul style="list-style-type: none">• Schleim- und Elektrolytsekretion• Muskelkontraktion• Peristaltik• Vasodilatation• Plasma Leakage• Regulation intestinaler Neuronen• Granulozyten-Chemokinese
<u>Proteasen</u> - Tryptase	<ul style="list-style-type: none">• Abbau von Fibrinogen, Kininogen, Neuropeptiden, VIP• Endothelzellregulation
- Chymase	<ul style="list-style-type: none">• Abbau von Basalmembransubstanzen• Abbau von Substanz P• Schleimsekretion• Katalysierung des Umsatzes von Antithrombin I und II (AT I und II)
- Carboxypeptidase	<ul style="list-style-type: none">• Abbau von AT I
<u>Proteoglykane</u> - Heparin	<ul style="list-style-type: none">• Bindung und Stabilisierung von Histamin, Proteasen und Zytokinen• Antikoagulation• Inhibition von Komplementsystem und Kallikrein• Endothelzellregulation
- Chondrotinsulfat	<ul style="list-style-type: none">• wie Heparin jedoch weniger potent

Tabelle 2: Granula-assoziierte Mastzellmediatoren und ihre Funktion (modifiziert nach Bischoff et al. 2000) (2)

Histamin, gebildet durch die Decarboxylierung der Aminosäure Histidin im Golgi-Apparat (41), liegt gespeichert in den Granula vor und induziert nach seiner Freisetzung einen Großteil der sogenannten allergischen und entzündlichen Reaktionen.

Hierzu zählt die Kontraktion der glatten Muskulatur von Arteriolen (durch Aktivierung der an Phospholipase C β gekoppelten H₁-Rezeptoren) (55) und die Endothelerweiterung in Kapillaren und Venolen mit nachfolgender Lückenbildung zwischen den einzelnen Endothelzellen (3), wodurch die Permeabilität der Gefäßwand erhöht wird (11).

Auch die Proteasen Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase sowie die Glykosaminoglykane Heparin und Chondrotinsulfat werden in den Vesikeln gespeichert,

1. Einleitung

können sofort nach der Stimulation der Mastzelle freigesetzt werden und sind spezifische Marker der Mastzelle (54).

1.2.5.2 Lipidmediatoren

Mediator	Biologische Funktion
<u>Lipidmediatoren</u>	
- Leukotriene (LTC ₄ , D ₄ , E ₄)	<ul style="list-style-type: none">• Schleim- und Elektrolytsekretion• Muskelkontraktion• Peristaltik• Vasodilatation und Plasma Leakge
- Prostaglandin D ₂	<ul style="list-style-type: none">• wie Leukotriene

Tabelle 3: Lipidmediatoren und ihre Funktion (modifiziert nach Bischoff et al. 2000) (2)

Lipidmediatoren wie Leukotriene sind Metaboliten der Arachidonsäure, die durch Gefäßdilataion die Blutzufuhr am Entzündungsort fördern (51) und eosinophile Granulozyten zum Ort der Entzündung locken (56). Prostaglandine können je nach Rezeptor kontrahierend oder dilatierend auf glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Epithelzellen wirken (3).

1.2.5.3 Zytokine

Mediator	Biologische Funktion
<u>Zytokine</u>	
- TNF- α , IL-1, IL-6, IL-16, IL-18	<ul style="list-style-type: none">• Proinflammatorischer Effekt
- IL-3, IL-4, IL-5, IL-13	<ul style="list-style-type: none">• Th₂-dominierte Immunantwort
- IL-10, TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none">• Antiinflammatorischer Effekt auf Immunantwort• Wundheilung und Gewebeumbau
- MIP-1 α /1 β , MCP-1, IL-8	<ul style="list-style-type: none">• Chemokine (Signalprotein der Chemotaxis verschiedener Zellen)
- B-FGF, VEGF	<ul style="list-style-type: none">• Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Endothelzellen

Tabelle 4: Zytokine und ihre Funktion (modifiziert nach Bischoff et al. 2000) (2)

Zytokine sind regulatorische Proteine, welche die Immunantwort steuern, indem sie pyrogen und antiviral wirken, die B- und T-Lymphozyten aktivieren und Makrophagen unterstützen. Sie wirken pleiotrop, d.h. auf mehrere Zelltypen (57) und verstärken die Entzündungsantwort, in dem sie Eosinophile, Lymphozyten und Phagozyten rekrutieren und so den begleitenden Gewebsschaden auslösen (51). Zu der Gruppe der Zytokine zählen neben dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) auch Interleukine sowie Chemokine,

1. Einleitung

die unmittelbar nach der Aktivierung der Mastzelle freigesetzt werden (58) (59). Sie sind maßgeblich an der Entstehung der sogenannten *Typ 1 allergischen Reaktion* beteiligt (60) (61) (62). Insbesondere Interleukin-4, welches die nachfolgende Ausschüttung von Mastzellmediatoren stimuliert, trägt zur Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion bei (63).

Ebenso sind Mastzellen über Mediatoren wie Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt (64). So unterdrücken sie beispielsweise die Zytokinproduktion von T-Zellen und Monozyten durch die Sekretion von IL-10 (65).

Ein weiteres in der Mastzelle vorkommendes Enzym ist das lysosomale Enzym β -Hexosaminidase, welches durch den Degranulationsprozess freigesetzt wird. Seine Funktion ist weitestgehend unklar, jedoch ist es ein sehr geeigneter Marker, um das Ausmaß der Degranulation zu quantifizieren (66).

1.2.6 Aktivierung von Mastzellen

Nicht jede Mastzellstimulation führt zur Freisetzung des kompletten Repertoires an Mediatoren. Vielmehr entscheidet der Stimulus darüber, ob ein breites Spektrum an Mastzellmediatoren ausgeschüttet wird oder ob auch eine kleinere Auswahl genügt (64) (67) (68). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Mastzellen zu aktivieren und damit die Degranulation ihrer Mediatoren auszulösen.

Die physiologisch bedeutsamste Aktivierungsmöglichkeit ergibt sich durch die Kreuzvernetzung von an den hochaffinen IgE-Rezeptor gebundenen IgE-Molekülen (69). Aber auch bakterielle und virale Antigene sowie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Komplementfaktoren und Neuropeptide können als Ligand auf den zahlreichen Rezeptoren der Mastzelloberfläche wirken und diese so aktivieren (70). Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die wichtigsten Rezeptoren an der Mastzelloberfläche und die zugehörigen Liganden.

Rezeptor	Ligand
<u>Immunrezeptoren</u>	
- Fc ϵ RI	• IgE
- Fc γ EIII	• IgG
<u>Komplementrezeptoren</u>	
- CR2, CR3, CR3a, CR5, CR5a,	• Komplementbestandteile
<u>Toll-like-Rezeptoren</u>	
- TLR 1	• Lipopeptide
- TLR 2	• Peptidoglykane
- TLR 3	• Doppelsträngige RNA (viral), PolyIC

1. Einleitung

Rezeptor	Ligand
- TLR 4	• LPS
- TLR 6	• Zymosan und PGN
- TLR 7	• DNA, Resiquimod (R848), CLO 75
- TLR 8	• CLO 75
- TLR 9	• CPG-DNA

Manosylierte Rezeptoren

- CD48	• FimH
--------	--------

Tabelle 5: Rezeptoren an der Mastzelloberfläche und ihre Liganden (53) (61) (62) (63) (66) (68)

In der nachfolgenden Abbildung 4 sind drei zentrale Signalkaskaden der Mastzelldegranulation aufgezeigt.

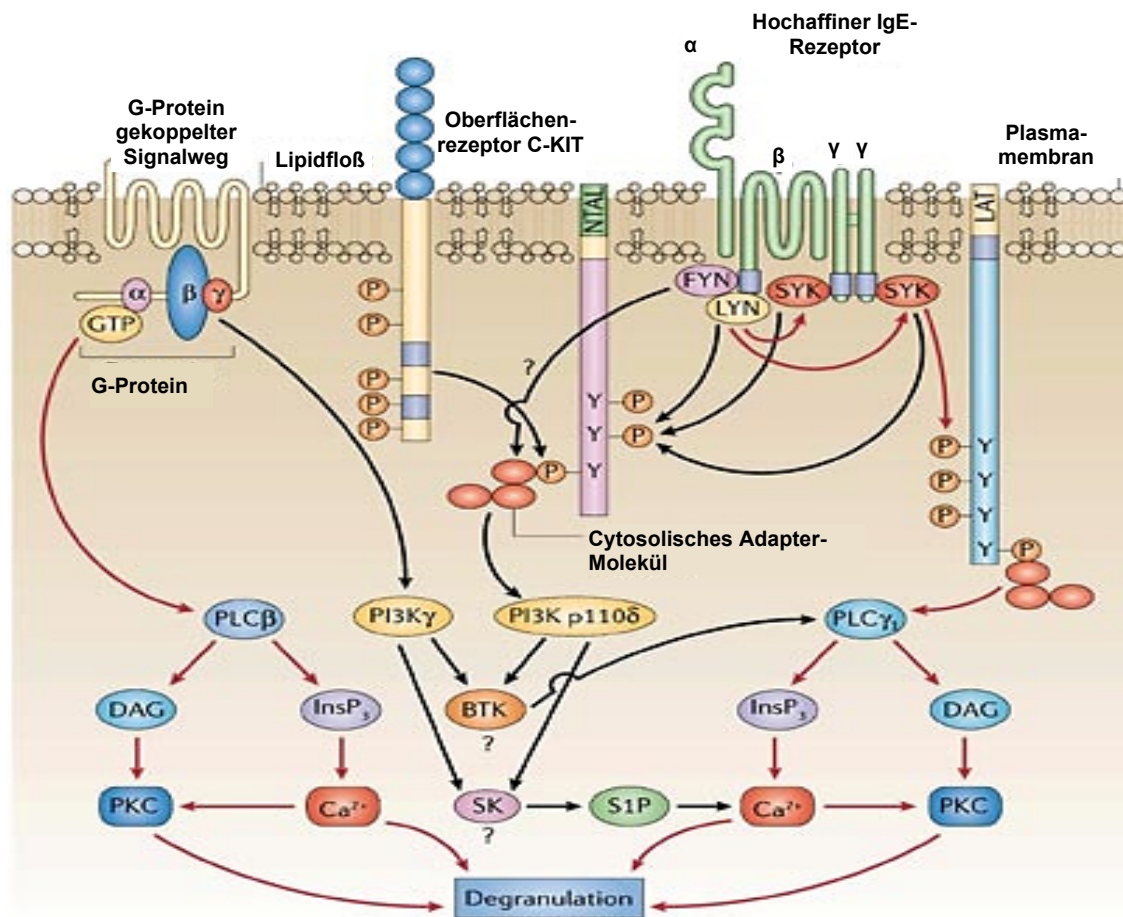


Abbildung 4: Einleitung der Degranulation von Mastzellen. Hier sind drei zentrale Wege, die zu einer Degranulation von Mastzellen führen, dargestellt. Hierbei handelt es sich zum einen um die Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors auf der Mastzelloberfläche. Durch Quervernetzung der einzelnen IgE-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung einer Phospholipase C (PLC γ) und zur gesteigerten Calciumfreisetzung mit anschließender Degranulation. Eine zweite Möglichkeit der Aktivierung von Mastzellen stellt der Oberflächenrezeptor c-KIT dar. Dabei ist der genaue Ablauf dieses Signalweges noch nicht geklärt, letztlich kommt es jedoch auch über die vermehrte Calciumfreisetzung zur Degranulation. Die dritte Möglichkeit der Aktivierung erfolgt über den G-Protein-gekoppelten Signalweg, der über die Bildung von Phospholipase C (PLC β) bzw. der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃ Kinase) zur Freisetzung von Calcium führt und darüber die Degranulation induziert (73).

1. Einleitung

Nach Kontakt mit dem Allergen kann die Mastzelle durch Quervernetzung der $Fc\epsilon$ -Rezeptoren aktiviert werden (71).

Unterstützt durch diese Quervernetzung werden eine Reihe von molekularen Reaktionen in Gang gesetzt, die in der Aktivierung der Phospholipase C münden (72). Am Ende dieser Signalkaskade steht die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Der erhöhte Calciumspiegel führt zur Degranulation (69). Die zweite wichtige Signalkaskade wird über die Aktivierung des c-kit-Rezeptors ausgelöst. Hierbei kommt es durch Phosphorylierung zur Aktivierung einer speziellen Tyrosinkinase mit anschließender Calciumfreisetzung und Degranulation (73).

Der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor (dritte Signalkaskade) induziert über die Aktivierung der Phospholipase C β und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI_3 Kinase) einen Anstieg der Calciumkonzentration mit nachfolgender Degranulation (73).

1.2.6.1 Aktivierung von Mastzellen durch membranständige $Fc\epsilon$ -Rezeptoren

Mastzellen besitzen auf ihrer Oberfläche charakteristische membranständige $Fc\epsilon$ -Rezeptoren (IgE-Rezeptoren) (34). Die allergenspezifischen Immunglobulin E Moleküle (IgE-Moleküle) werden nach dem Kontakt mit dem Allergen sezerniert und binden an den mastzellspezifischen $Fc\epsilon$ -Rezeptor auf der Oberfläche der Mastzelle. Dieser Vorgang wird *Sensibilisierung* genannt (68).

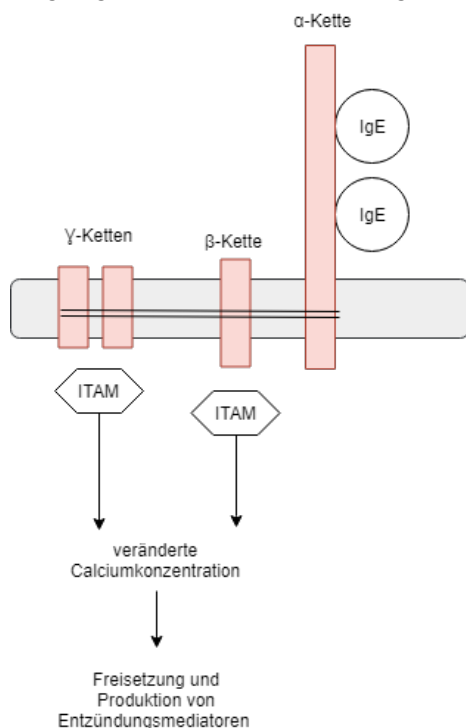


Abbildung 5: Struktur des hochaffinen IgE-Rezeptors. Der membranständige $Fc\epsilon$ -Rezeptor besteht aus einer α -Kette, einer β -Kette und zwei γ -Ketten. IgE bindet über die α -Kette. Eine Signalsequenz an den β - und γ -Ketten ermöglicht die Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren, modifiziert nach (75).

1. Einleitung

Der Fcε-Rezeptor ist ein tetrameres Transmembranprotein der Struktur α, β, γ₂ und besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten (74):

- die α-Kette, an die IgE bindet,
- die tetraspannige β-Kette und
- zwei γ-Ketten (75).

Der Fcε-Rezeptor ist in die Zellmembran eingebettet und durchdringt diese insgesamt sieben Mal (76). Die α-Kette besteht aus 260 Aminosäuren, die ein langes extrazelluläres Segment bilden, an dem zwei Bindungsstellen für das Immunglobulin E vorhanden sind. Die β-Kette besteht aus 244 Aminosäuren. Sie besitzt im zytosolischen Bereich eine Carboxylgruppe mit einem zellaktivierenden Abschnitt, das sogenannte *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM)*. Diese Signalsequenz ist entscheidend für die Freisetzung und Produktion von Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Arachidonsäuremetaboliten und Zytokinen (73) (77). Die beiden über Disulfidbrücken verbundenen γ-Ketten (bestehend aus je 68 Aminosäuren (78)) bilden ein Dimer und besitzen ebenfalls ein ITAM (79). Durch Kreuzvernetzung der Fcε-Rezeptoren wird eine Tyrosin-Kinase (scr-Familie) aktiviert, diese phosphoryliert Tyrosin-Reste im ITAM und ermöglicht dadurch mittels Induktion einer Signalkaskade die Phosphorylierung von Adapterproteine der Membran wie beispielsweise der Phospholipase C (PLCγ). Die aktivierte PLCγ ist in der Lage Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-3-Phosphat (IP₃) zu spalten. Diese beiden Stoffe können die Calciumkonzentration in der Zelle verändern und sind so maßgeblich an der Mastzelldegranulation beteiligt (73).

Wird hingegen der Fcε-Rezeptor phosphoryliert, so wird das Adaptermolekül Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) aktiviert. PI₃K reguliert ebenfalls über PLCγ die Calciumkonzentration (80) (81).

1.2.6.2 Weitere rezeptorvermittelte Reaktionen, die zur Mastzellaktivierung führen

Folgende rezeptorvermittelte Aktivierungsmöglichkeiten der Mastzellen sind bekannt:

- über den c-Kit-Rezeptor (SCF-Rezeptor) (73)
- über G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (73)
- über Toll-like-Rezeptoren (TLR) (82)
- und über C48/80 und (83)
- Ionomycin (84).

Der Wachstumsfaktor SCF kann über den sogenannten *c-kit-Rezeptor* auf der

1. Einleitung

Oberfläche der Mastzellen (34) die Fc ϵ -Rezeptor-abhängige Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Histamin, Leukotriene oder Chemokinen unterstützen (73) (77) (85), indem er eine Phosphorylierungskaskade in Gang setzt.

Im Rahmen dieser Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung von PI₃K γ und anschließend der *Burton`s Tyrosin Kinase (BTK)*. Diese aktiviert die *Sphingosine Kinase (SK)*, die wiederum die Bildung des Spingosine-1-Phosphates veranlasst und so über die erneute Freisetzung von Calcium ebenfalls in der Degranulation mündet (73).

Auch *G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren* befinden sich an der Mastzelloberfläche. Ein heterotrimeres G-Protein besteht aus drei Untereinheiten (α -, β - und γ -Untereinheit). Im Ruhezustand ist an der α -Untereinheit ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, welches nach Bindung eines Botenstoffs am Rezeptor durch das energiereichere Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird, so dass die α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit abdiffundiert. Sie kann nun das Effektorprotein Phospholipase C aktivieren, das anschließend Phospholipide aus der Zellmembran in die beiden Anteile DAG und IP₃ spaltet. DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche weitere Funktionsproteine phosphorylieren kann. IP₃ ist in der Lage Calcium aus den intrazellulären Speichern freizusetzen und die Degranulation der Mastzellmediatoren erfolgt (86). Auch die β - und γ -Untereinheiten wirken an der Freisetzung von Calcium mit, indem sie PI₃K aktivieren und so die Bildung von BTK und SK fördern (73). So können auch peptidergene Mastzellaktivatoren wie Substanz P über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Neurokinin-1 die Mastzelldegranulation induzieren (44). Auf diese Weise werden Alarmmoleküle der Inflammation wie TNF-alpha stimuliert (45) (46). Diese Arbeit verwendet einige G-Protein-gekoppelten Signalwege, um über unterschiedliche Aktivierungswege eine intrazelluläre Calciumerhöhung mit nachfolgender Degranulierung der Mastzelle zu erreichen.

Eine Mastzellaktivierung wird in gleicher Weise durch Pathogene (DAMP und PAMP), also zum Beispiel Bakterien, Viren aber auch Parasiten induziert, indem lösliche Stoffwechselprodukte dieser Pathogene die Mastzelle über sogenannte *Toll-like-Rezeptoren (TLR)* auf ihrer Oberfläche zur Freisetzung zahlreicher Interleukine und proinflammatorisch wirkenden Zytokinen anregen (82) (87) (88) (89) (90).

Das Repertoire an TLR auf Mastzellen ist groß, unterscheidet sich aber nach Spezies. So findet man TLR 5 und TLR 8 auf Mastzellen der Ratte (91) (92). TLR 1 bis TLR 4, TLR 6, TLR 7 und TLR 9 finden sich auch auf murinen und humanen Mastzelllinien (87) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99). Nachdem die TLR auf den Mastzellen durch Pathogene stimuliert worden sind, werden vor allem neutrophile Granulozyten angelockt und aktiviert (88). Neutrophile Granulozyten gelten als Hauptakteure der unspezifischen (angeborenen) Immunantwort (88). Kommt es zu einer gleichzeitigen Stimulation des

1. Einleitung

Fcε-Rezeptors und TLR 2 beziehungsweise TLR 4, so wird die Bildung von proinflammatorischen und Th₂- assoziierten Zytokinen verstärkt (89) (100) (101).

Ebenso ist es möglich, die Zytokinproduktion durch den Fcε-Rezeptor zu unterdrücken, wenn bereits im Voraus TLR 2 aktiviert worden ist (102).

Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt, dass die Signaltransduktion der einzelnen TLR unterschiedlich ist. Es gibt vier Wege, über die dieses Signaltransduktion ablaufen kann:

- über MyD88 (TLR 5 und TLR 7 bis TLR 9)
- über TIRAP und MyD88 (TLR 1, TLR 2, TLR 4 und TLR 6)
- über TRIF (TLR 3)
- oder über TRIF und TRAM (TLR 4).

Die Aktivierung der TLR 3 und TLR 4 führen zur Bildung von Interferon-α (IFN-α) und IFN-β. Die der TLR 7, TLR 8 und TLR 9 induzieren nur die Produktion von IFN-α. Interferone spielen insbesondere bei der Abwehr von Viren eine wichtige Rolle, da sie die Replikation des Virus unterdrücken können (103).

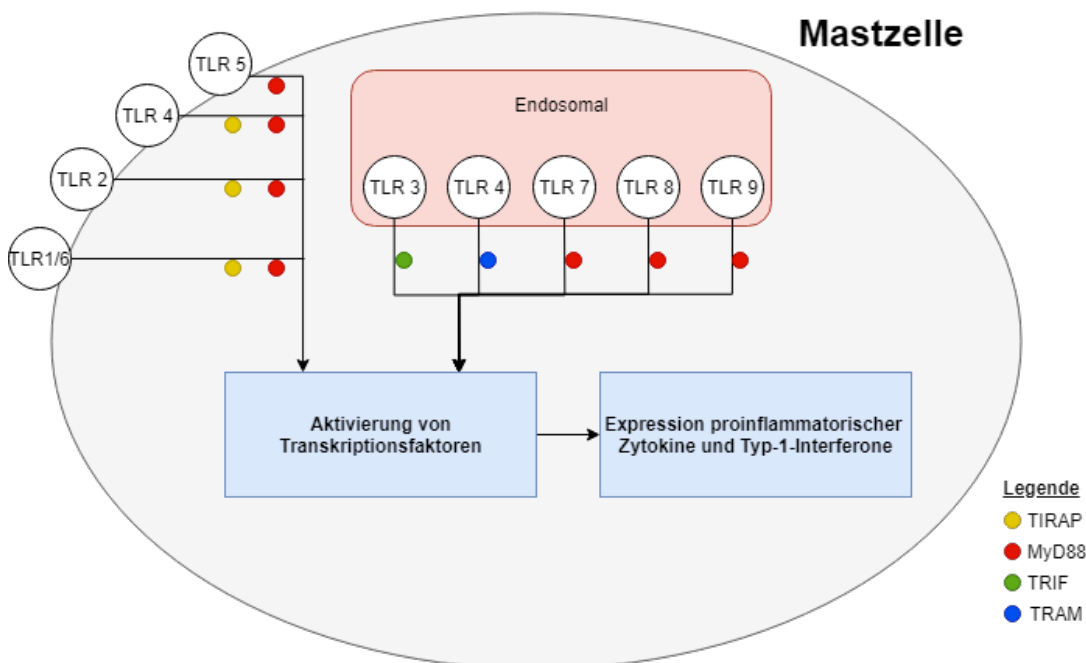


Abbildung 6: Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren. Die Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren erfolgt entweder über MyD88 (TLR 5 und TLR 7 – TLR 9), TIRAP und MyD88 (TLR 1, TLR 2, TLR 4 und TLR 6), TRIF (TLR 3) oder TRIF und TRAM (TLR 4).

TLR-induzierte Signalkaskaden führen zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB, IRF3 und IRF7, die wiederum die Expression proinflammatorischer Zytokine sowie Typ I Interferone (IFN-α und IFN-β) regulieren. Darüberhinaus zeigt die Abbildung, dass TLR 1, TLR 2, TLR 4 und TLR 6 auf der Oberfläche der Zelle exprimiert werden. TLR 3, TLR 4 und TLR 7 bis TLR 9 werden endosomal exprimiert, modifiziert nach (103).

Bei allen Signalkaskaden kommt es zusätzlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, der ebenfalls die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen ermöglicht (103). Bezüglich der TLR und deren Einfluss auf die Degranulierung gibt es in der Literatur

1. Einleitung

widersprüchliche Aussagen, die teilweise auch die Induktion der Degranulierung beschreiben (88) (96).

Compound 48/80 (C48/80) ist eine Verbindung aus N-methyl-p-methoxyphenethylamin und Formaldehyd (104) und ist in der Lage, eine Histaminfreisetzung auszulösen, ohne dass dabei die extrazelluläre Calciumkonzentration einen Einfluss hat (41). C48/80 interagiert mit den Membranproteinen auf der Oberfläche der Zelle und aktiviert direkt ein G-Protein. Durch die Aktivierung der PI_3 -Kinase γ wird letztlich die Freisetzung von Histamin ermöglicht (83).

Ein weiterer wichtiger Stimulus für die Mastzelldegranulation ist *Ionomycin*. Dieser Botenstoff aktiviert die Degranulation durch Freisetzung von intra- und extrazellulärem Calcium (84) (105). Ionomycin kann auf diese Weise die Degranulation stärker fördern als C48/80 (106).

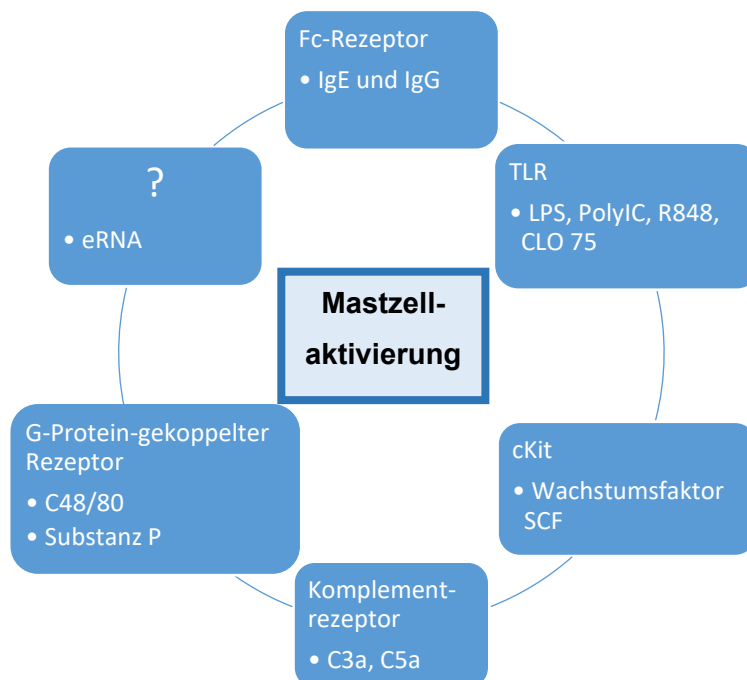


Abbildung 7: Zusammenfassende Übersicht der unterschiedlichen Aktivierungswege von Mastzellen. Dargestellt sind die Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche mit einer Auswahl an Induktoren. In Anlehnung an (34) (69) (70) (73) (82) (83).

1.2.7 Hemmung von Mastzellen

Mastzellen sind über die Mediatorfreisetzung maßgeblich an der Entstehung einer Entzündungsreaktion beteiligt. Die Unterdrückung der Mastzellaktivität durch verschiedene Hemmstoffe stellt einen Regulationsmechanismus der Entzündungsreaktion dar (107). Die nachfolgende Abbildung 8 zeigt verschiedene Möglichkeiten der Mastzellblockade.

1. Einleitung

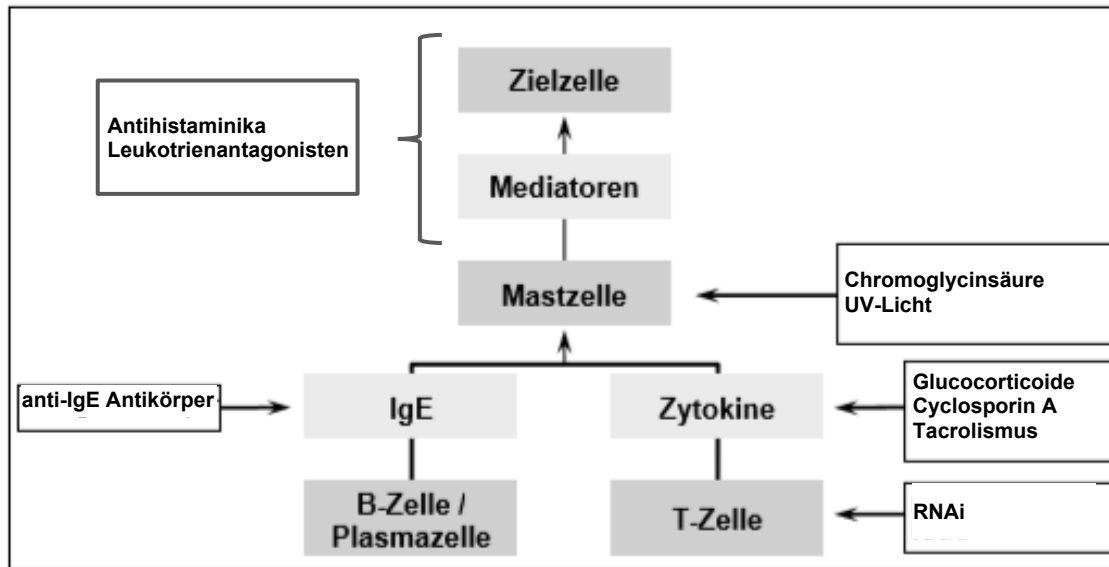


Abbildung 8: Angriffsebene verschiedener Analgetika. Hier sind die verschiedenen Angriffspunkte der einzelnen Wirkstoffgruppen in der Pharmakotherapie allergischer Erkrankungen gezeigt (107).

Nicht nur durch entsprechende Antikörper gegen IgE kann die Freisetzung der Zytokine unterdrückt werden, auch durch Immunsuppressiva wie Glukokortikoide (108) (109), Cyclosporin A oder Tacrolimus (110) und durch Eindämmung der Th₂-Immunantwort mittels RNA-Interferenz (RNAi) kann die Mediatorproduktion herabreguliert werden (111) (112) (113) (114) (115) (116) (117).

Ein weiterer Therapieansatzpunkt ist die direkte Stabilisierung der Mastzelle beispielsweise mittels Cromoglycinsäure oder Tritoqualin, welche die Degranulierung hemmen (118) (119). UV-Licht ist in der Lage, die Anzahl an Mastzellen zu reduzieren und auf diese Weise eine verminderte Mastzellaktivierung zu gewährleisten (120) (121). Letztendlich ist es auch nach der Degranulation der Mastzelle möglich, die Wirkung der Mediatoren zu unterdrücken beziehungsweise die Zielzelle vor der Wirkung der Mediatoren zu schützen. In diesem Fall kommen sogenannte Mediatoren-Antagonisten wie Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptorantagonisten und Antihistaminika (122) (123) zum Einsatz, die mit den Mediatoren um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren und sie kompetitiv vom Rezeptor verdrängen (124).

1.3 Extrazelluläre RNA (eRNA) – ein neuer Mastzellmediator

Nachdem die Arbeitsgruppe um Professor Preissner bereits in den letzten Jahren gezeigt hat, dass eRNA im Rahmen der inflammatorischen Immunantwort des Körpers eine bedeutende Rolle spielt, zeigte Annika Mauer, dass eRNA auch aus Mastzellen freigesetzt wird (48) (125) (126).

1. Einleitung

Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt den Einfluss der Stimulation mit Ionomycin auf die Freisetzung der eRNA. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bedeutung von ribosomaler RNA als Degranulationsprodukt der Mastzelle näher betrachtet. Dabei liegt der Fokus auf den Freisetzungsbedingungen der als inflammatorisches Agens geltenden RNA.

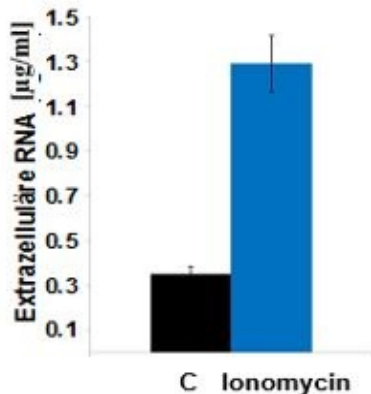


Abbildung 9: Freisetzung von extrazellulärer RNA nach Stimulation mit Ionomycin (Ergebnisse von Annika Mauer). Hierbei wurden murine Mastzellen für je eine Stunde mit Ionomycin der Konzentration 1 µM stimuliert und anschließend der RNA-Gehalt bestimmt. Im Vergleich zu unstimulierten murinen Mastzellen wird durch die Stimulation mit Ionomycin eine deutlich größere Menge an extrazellulärer RNA freigesetzt (125).

1.3.1 Merkmale der RNA

Nukleinsäuren wurden 1871 zuerst durch den Schweizer Friedrich Miescher beschrieben (127). Es wird zwischen der Ribonukleinsäure (RNA) und der Desoxyribonukleinsäure (DNA) unterschieden. Dabei ist nicht nur der Aufbau verschieden, auch hinsichtlich der Funktionen unterscheiden sich die beiden Nukleinsäuren. Während die DNA als Speicher der genetischen Information im Zellkern fungiert, ist die Anwesenheit von intrazellulär vorkommender RNA essentiell für die Übersetzung dieser genetischen Information in ein Protein (Transkription und Translation) sowie für die Genregulierung (128) (129).

Die intrazellulär vorkommende RNA untergliedert sich in verschiedene Subtypen, die zu einem Alarmsignal werden, sobald sie extrazellulär vorliegen. Die RNA besteht aus einer kettenförmigen Verbindung zwischen Nucleosidmonophosphaten.

Im Vergleich zur DNA sind RNA-Moleküle eine kürzere Kette, welche die Pentose D-Ribose enthalten und oft als Einzelstrang vorliegen. Durch unterschiedliche Zusammenlagerungen dieser Einzelstränge kann es zur Entstehung von Doppelsträngen kommen. Bezogen auf die intrazellulär vorkommende RNA wird zwischen den zwei großen Bereichen: codierende und nicht-codierende RNA unterschieden (129).

1. Einleitung

1.3.2 Codierende und nicht-codierende RNA

Die einzelnen Arten der RNA werden allgemein eingeteilt in codierend und nicht codierend. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle 6 aufgelistet.

Zur Gruppe der *codierenden RNA* zählt die Messenger-RNA (mRNA), die als Matrize der Proteinbiosynthese fungiert (129).

Die *nicht-codierende RNA* mit strukturell/katalytischer Funktion bildet den größten Anteil der RNA. Zu ihnen zählen unter anderem die Transfer-RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA). Die tRNA dient als Adaptermolekül im Rahmen der Proteinbiosynthese. Die rRNA ist ein wichtiger Bestandteil der Ribosomen, die für die Proteinbiosynthese verantwortlich sind (129).

Es gibt zahlreiche Untergruppen der ribosomalen RNA. Diese unterscheiden sich vor allem durch ihr Molekulargewicht und werden anhand der verschiedenen Sedimentationskoeffizienten (zwischen 5 und 28 S) eingeteilt (129).

Die anderen RNA-Arten dieser Gruppe werden für den intrazellulären Proteintransport, die Modifikation von RNA oder das Spleißen der prä-mRNA benötigt. Nicht-codierende RNA mit regulatorischer Funktion sind an der Genexpression, der Chromosomeninaktivierung und der Regulation des mRNA-Abbaus beteiligt (129).

Typ	Name	Funktion
Codierende RNA	mRNA	Matrize der Proteinbiosynthese
Nicht-codierende RNA mit struktureller katalytischer Funktion	tRNA	Translation der genetischen Information
	rRNA	Strukturelement der Ribosomen bei der Knüpfung von Peptidbindungen
	snRNA	Spleißen der Prä-mRNA
	snoRNA	Modifikation von RNA
	SRP	Intrazellulärer Proteintransport
	Ribonuclease P-RNA	Reifung der Prä-tRNA
	Telomerase RNA	DNA-Synthese an den Telomeren
Nicht-codierende RNA mit regulatorischer Funktion	miRNA	Abbau von mRNA
	Xist-RNA	Inaktivierung des X-Chromosoms

Tabelle 6: Übersicht über die Klassifizierung der RNA (Tabelle erstellt in Anlehnung an Löffler „Basiswissen Biochemie“) (129).

1. Einleitung

1.3.3 Extrazelluläre RNA als inflammatorisches Agens

Bei Abwehrreaktionen des Körpers spielt vor allem die erstmals 1948 durch Mandel und Metais erwähnte extrazellulär vorkommende RNA (eRNA) eine entscheidende Rolle. Extrazelluläre RNA kann dabei als DAMP gesehen werden. Sie wird entweder passiv durch Membranruptur aus nekrotischen beziehungsweise apoptotischen Zellen oder aktiv freigesetzt und in Mikropartikeln transportiert (130) (131) (132).

Die Gesamtheit der freigesetzten eRNA ist abhängig davon, welche Zellen aktiviert oder verletzt wurden. Gleiches gilt auch für die Struktur sowie die Interaktion mit den verschiedenen Mikrovesikeln. Zur Gruppe der eRNA zählen rRNA, lange nicht-codierende RNA, miRNA und mRNA (126) (133). Die Zusammensetzung der eRNA wird vermutlich durch die innerhalb der Zelle vorkommenden RNA-Arten beeinflusst. Durch Fischer et al. konnte gezeigt werden, dass sich in zellfreiem Plasma oder Zellüberständen vor allem 28S/18S rRNA als Hauptbestandteil der eRNA findet (134) (135).

1.3.3.1 Einfluss auf Endothelpermeabilität

Durch Zerstörung von Geweben oder Gefäßen wird eRNA aus den verletzten Zellen freigesetzt und induziert im umliegenden Gewebe eine gesteigerte Permeabilität der Membran mit nachfolgender Ödembildung (133). Zell-Zell-Kontakte werden verändert, wodurch eRNA prothrombotische und proinflammatorische Vorgänge beeinflussen und regulieren kann (136). Extrazelluläre RNA interagiert mit VEGF und beeinflusst so das Zusammenspiel zwischen Proteinen und Zytokinen (136) (137). Auch die Permeabilität der Membran wird durch diese Interaktion beeinflusst, denn VEGF gilt als der stärkste Permeabilitätsfaktor im Gefäßsystem (138). Hypoxie beziehungsweise Ischämie induzieren die Genexpression von VEGF, so dass die Proliferation von Endothelzellen unterstützt wird (138) (139) (140).

Extrazelluläre RNA als ein Bindeglied zwischen VEGF und dessen Ko-Rezeptor Neuropilin-1 verstärkt die Interaktion zwischen beiden Rezeptoren. Der VEGF-Rezeptor wird phosphoryliert, die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt an und induziert die Zunahme der Membranpermeabilität sowie die Exozytose von Endothel-spezifischen Weibel-Palade-Granula. Auf diese Weise werden proinflammatorische und prokoagulatorische Substanzen und RNase 1 freigesetzt (141) (142).

Als Folge der Erhöhung der Gefäßpermeabilität kann eRNA als Ko-Faktor verschiedener Zytokine die Wechselwirkung zwischen den tight-junction-Proteinen Occludin und Claudin 5 beeinflussen. Gleiches gilt für die mit dem Zytoskelett assoziierten Proteine ZO-1 und ZO-2 (136).

1. Einleitung

1.3.3.2 Einfluss auf das Gerinnungssystem

Während einer Abwehrreaktion kann eRNA Kontaktphaseproteine aktivieren, indem sie an die Proteasen des intrinsischen Gerinnungsweges bindet und sie somit aktiviert (143). Sie kann auf diese Weise prokoagulatorisch wirken (144). Zu diesen Proteasen zählen nach heutigem Stand der Forschung die Faktor-VII-aktivierende Protease (FSAP) und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (143).

FSAP ist eine Serinprotease, die durch katalytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt werden kann (145) (146). Dabei gilt eRNA, neben Heparin und Dextransulfaten, als Autoaktivator dieser Serinprotease (147) (148) (149) (150), die an Koagulation und Inflammation beteiligt ist (151) (152) (153) (154). FSAP ist das erste Molekül, bei dem eine Wechselwirkung mit eRNA gezeigt werden konnte. Aufgrund der polyanionischen Struktur der eRNA kann sie auch mit verschiedenen weiteren Proteinen interagieren, wie beispielsweise dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (143) (153).

Der *Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1* ist in der Lage die Fibrinolyse zu inhibieren und den entstandenen Thrombus zu stabilisieren. Dies geschieht durch die Inhibition des gewebspezifischen Plasminogenaktivators, der Serinprotease Urokinase und Faktor-VII-aktivierender-Protease. In Anwesenheit von eRNA wird die aktive Form dieser Protease stabilisiert (155).

Prokoagulatorische Funktionen von eRNA lassen sich dadurch erklären, dass eRNA ein Ko-Faktor von Gerinnungsfaktoren wie Faktor XII und XI, sowie Präkallikrein und Kininogen ist. Aufgrund der polyanionischen Struktur der eRNA fungiert sie ebenfalls als Autoaktivator (143).

1.3.3.3 Interaktion von eRNA mit Tumorzellen

Extrazelluläre RNA ist aufgrund der beschriebenen vielfältigen Interaktionen mit den Proteinen des Zytoskeletts und des Gerinnungssystems ein im menschlichen Körper ubiquitär vorkommendes Alarmsignal (156).

Als Interakteur der angeborenen Immunität induziert sie Abwehrreaktionen, denn sie kann in jedem Gewebe durch Zellschaden in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Dies erklärt auch, warum sie beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen und bei Tumorpatienten in erhöhter Konzentration gefunden wird (157). Im Plasma von Tumorpatienten gibt es spezifische RNAs beziehungsweise RNA-Proteolipid-Komplexe. Sie sind in diesem Fall im Blut nachweisbar und werden als Tumormarker verwendet (126) (158) (159) (160) (161). Abbildung 10 gibt einen Überblick über die genannten Funktionen der eRNA sowie die Interaktion mit den Zellen des Immunsystems.

1. Einleitung

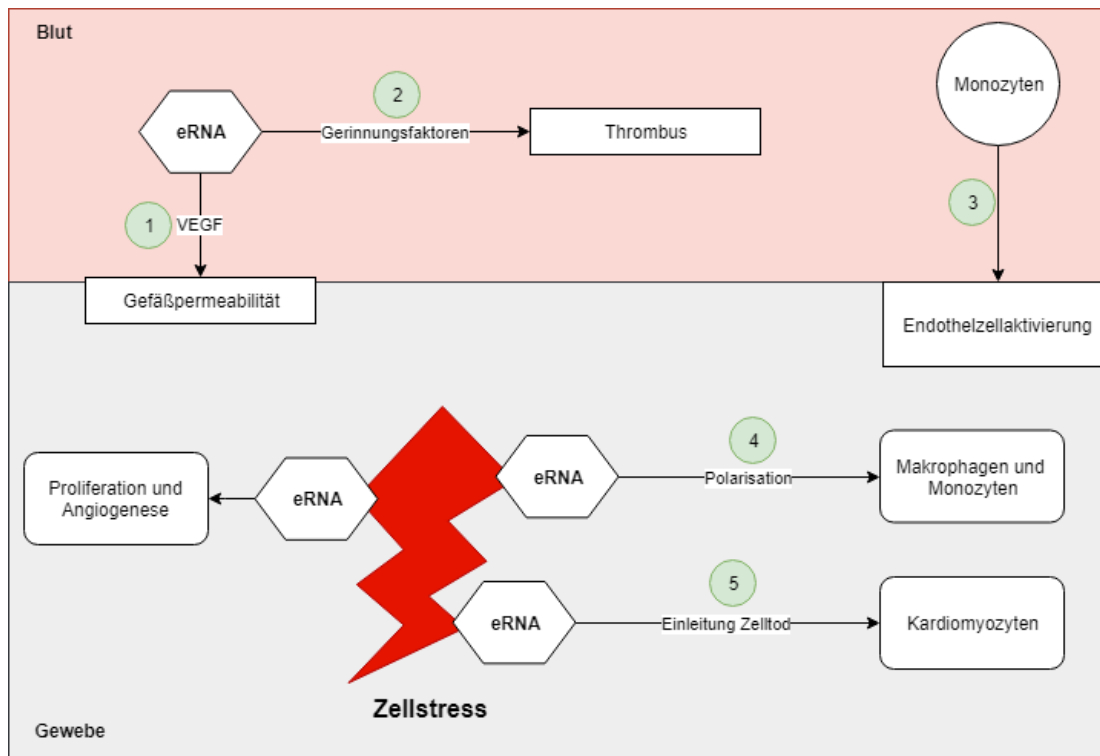


Abbildung 10: Zusammenfassung der Rolle von eRNA in der vaskulären Hämostase und kardiovaskulären Pathologien. Durch Zellstress, wie Hypoxie oder Zellverletzung, kommt es zur intra- und extravaskulären Freisetzung von eRNA. Die Abbildung zeigt die fünf Hauptfunktion der eRNA und ihre Interaktion mit spezifischen extrazellulären Proteine:

- (1) eRNA beeinflusst die Gefäßpermeabilität durch Interaktion mit VEGF.
- (2) Einleitung der intrinsischen Gerinnungskaskade durch Aktivierung von Gerinnungsfaktoren (FXII, XI, Präkallikrein) und anschließender Thrombusbildung.
- (3) Leukozytenrekretierung und Bildung von Adhäsionsmolekülen im Endothel.
- (4) Umwandlung von Monozyten und Makrophagen hin zur proinflammatorischen Form mit Bildung des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), IL-12 und Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).
- (5) Einleitung des Kardiomyozytentodes ausgelöst durch TNF- α als Bestandteil einer hyperinflammatorischen Kaskade, modifiziert nach (156).

1.3.3.4 RNase - Regulation von extrazellulärer RNA

Vaskuläre RNase 1 reguliert die Funktion von eRNA. Durch das Zusammenspiel ergibt sich eine gefäßprotective Wirkung (162).

RNase 1 wird von menschlichen Endothelzellen gebildet. Proinflammatorische und prothrombotische Mediatoren oder eRNA selbst induzieren die Freisetzung von RNase 1 aus den Weibel-Palade-Körperchen der menschlichen Endothelzellen. Sie ist identisch mit der pankreastypischen-RNase (162) (163) (164). Aufgebaut ist sie aus 128 Aminosäuren (165). Die vaskuläre RNase 1 ist eine von acht RNase-Arten, die zur Genfamilie der RNaseA gehören. Sie sind auf dem Chromosom 14 lokalisiert und bestehen aus einer Signalsequenz und einer kompakten Struktur, welche durch drei bis vier Disulfidbrücken stabilisiert wird. RNase 1 ist hitzestabil (166).

Im Inneren der Zelle liegt die RNase 1 inaktiv vor, da sie fest an einen hochaffinen RNase Inhibitor gebunden ist. Erst bei Freisetzung aus der Zelle wird sie aktiv, daher ist RNase

1. Einleitung

1 nicht, wie beispielsweise die bakterielle RNase, toxisch für die Zelle (162).

RNase 1 kann als Gegenpart zur eRNA gesehen werden, welche von zerstörten Zellen freigesetzt wird (163). Auf diese Weise kann sie einen regulatorischen Einfluss auf die vaskuläre Homöostase nehmen, wobei das RNA/RNase-System als zusätzlicher Regulator dieses Gleichgewichts gilt. Ein ausgeglichenes Verhältnis von eRNA zu RNase1 dient dem Schutz von Blutgefäßen und Gewebe (142) (162) (163) (164) (167). Es konnte gezeigt werden, dass zerebrale Ödeme und die Infarktgröße durch eine gezielte RNase-Therapie reduziert werden können. Zusätzlich kann eine Vorbehandlung mit RNase im Falle eines Schlaganfalls neuroprotektiv wirken (168).

1.3.3.5 Mikropartikel als Transporter von eRNA

Extrazelluläre RNA wird durch Mikropartikel transportiert (131) (132). Im Jahr 1967 beschrieb Wolf zum ersten Mal die Existenz der Mikropartikel. In humanem Plasma konnte er sie als Membranfragmente von Thrombozyten nachweisen (169). Sie werden nach Aktivierung der Thrombozyten mittels Thrombin, Kollagen oder mechanischem Stress freigesetzt (170).

Heute ist bekannt, dass Mikropartikel von einer Vielzahl verschiedener Zellen freigesetzt werden können – Thrombozyten setzen jedoch den größten Anteil an Mikropartikeln ins Blut frei. Als weitere Ursprungszellen von Mikropartikeln gelten Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und auch Endothelzellen (170).

Mikropartikel sind kleine Membranvesikel, die neben Membranbestandteilen ihrer Ursprungszelle auch zytoplasmatische Elemente beinhalten (171) (172). Nicht nur durch eine Aktivierung der Ursprungszelle, sondern auch im Rahmen der Apoptose (173) (174) oder unter physiologischen Bedingungen (175) können sie freigesetzt werden.

Der genaue Mechanismus der Mikropartikelbildung und –freisetzung ist noch nicht bekannt. Die Freisetzung geschieht durch eine Abschnürung von Membranen, wobei einzelne Bestandteile der Plasmamembran und zytoplasmatische Komponenten in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Diese Zusammensetzung variiert je nachdem, unter welchen Bedingungen und aus welcher Ursprungszelle die Mikropartikel freigesetzt werden. Geschieht die Bildung im Rahmen der Apoptose, so finden sich beispielsweise Fragmente des Zellkerns und Organellen der Zelle in der Plasmamembran (176) (177).

Mikropartikel sind zwischen 0,1 – 2 µm groß und wichtig für Zell-Zell-Interaktionen sowie den Transfer von einzelnen Molekülen (178).

Die nachweisbaren Mikropartikelfractionen im Blut sind nicht einheitlich. So gibt es eindeutige Unterschiede zwischen gesunden (179) (180) und kranken (174) (181) (182) (183) Probanden. Die Mikropartikel der Probanden unterscheiden sich dabei hinsichtlich

1. Einleitung

Quantität und Zusammensetzung. Eine veränderte Zusammensetzung der Mikropartikel finden sich bei verschiedenen Krankheiten wie beispielsweise Diabetes mellitus, arteriosklerotische vaskuläre Erkrankungen, Sepsis und auch bei Nierenversagen (174) (181) (182) (183).

Dadurch, dass sich Mikropartikel im Blutkreislauf befinden, sind sie in der Lage sowohl lokal als auch weiter entfernt zu wirken. Sie können dabei zum Beispiel Entzündungsmarker wie E-Selektin oder Tissue Faktor transportieren (184). Mikropartikel, die von Leukozyten freigesetzt werden, können Endothelzellen aktivieren, die Freisetzung inflammatorischer Substanzen triggern und eRNA transportieren, welche ein wichtiges Alarmsignal der Entzündungsreaktion darstellt (173) (185). Werden sie von Thrombozyten gebildet, so induzieren sie die vermehrte Produktion von IL-8, IL-1 β , IL-6 und TNF- α (186).

1.4 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Freisetzung von eRNA aus stimulierten Mastzellen genauer charakterisiert werden. Hierzu sollen primäre Mastzellen, die aus Mausstammzellen differenziert werden, und eine humane Mastzelllinie verwendet werden.

Im Detail sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Korreliert der Degranulationsprozess von murinen und humanen Mastzellen mit der RNA-Freisetzung? Hierzu werden die Mastzellen mit unterschiedlichen Stimulanzen behandelt und das Ausmaß der Degranulation durch Messung typischer Mastzellmediatoren (β -Hexosaminidase und Histamin) mit der RNA-Freisetzung verglichen.
2. Welche Art von eRNA wird freigesetzt? Die Analyse der extrazellulären RNA soll durch Gelelektrophorese erfolgen.
3. Wie wird die freigesetzte RNA vor einem ribonukleolytischen Abbau geschützt? Hierzu wird untersucht, ob sezernierte eRNA mit der Mikropartikelfraktion assoziiert ist.
4. Handelt es sich bei der RNA-Freisetzung um einen reversiblen Prozess? Hierzu wird untersucht, ob in Mastzellen nach einer Degranulation auch die RNA-Speicher, wie die anderer Degranulationsmediatoren, wieder aufgefüllt werden.
5. Ist es möglich, die RNA-Freisetzung durch Hemmung des Degranulationsprozesses ebenfalls zu unterdrücken? Dazu wird die Degranulation durch den Mastzellstabilisator Cromolyn, durch Hemmung der Phospholipase C (Wortmannin) und den Calciumion-Chelator BAPTA gehemmt.

1. Einleitung

6. Um eRNA als Freisetzungprodukt und zellulären Agonist zu etablieren, ist sie in den Mastzellen zu lokalisieren. Die Darstellung soll mittels Immunzytochemie und Elektronenmikroskopie erfolgen und eine genauere Einordnung in den Degranulationsprozess ermöglichen. Es soll die Frage geklärt werden, ob eRNA Bestandteil der Granula oder zytosolisch lokalisiert ist.

Durch diese Untersuchungen sollen detaillierte Kenntnisse über die Einflussfaktoren auf die RNA-Freisetzung aus Mastzellen und deren Mechanismus gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Kennzeichen
Camina Flow	Holten LaminAir, Model 1,2; 981290000H Heraeus Instruments LaminAir, HBB 2448
Brutschrank	Sanyo CO2 Inkubator, IR Sensor, IncuSafe, Ewald Innovationstechnik GmbH
Durchflusszytometer	BD FACSCantoTM, BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Venon Hills (USA)
Elektronenmikroskop	Zeis 902
ELISA Reader	BioTek Instruments Inc., EL 808, Ultra microplate reader, Friedrichshall
Fokales Mikroskop	Nikon eclipse Te 2000-E
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Fisher Scientific, Rockford USA
Heizblock	Biometra Jena, TS1 Thermo Shaker
Mikroskope	Hund Wetzlar, Typ Wilowert 30 Leica, DMIL Leica DMR fluoreszenz mikroskop
NanoDrop	Nanodrop 2000 Thermo Scientific PEQLAB Spectrophotometer
pH Meter	Eductional HANNA HI 208, Kehl am Rhein
Photometer	Eppendorf, BioPhotometer, ID: BGV 1250
Roller	SRT9 Stuart, Staffordshire Großbritannien
Rührer	Heidolph MR Hei-Standard
Schüttler	Biometra T1 Thermo Shaker
Sterilbank	Holten LaminAit, Model 1,2: S. 2010, Seriennummer 981290000H Heraeus Instruments Lamin Air HBB 2448 Heraeus Instruments
Thermo Shaker	TS1 Thermo Shaker, biometra Jena

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
Vortexer	SLG Charley 2, Gautingen
Wage	Denver Instrument Katalognummer SI-2002
Wasserbad	1. Memmert, Schwabach 2. VWR International, Darmstadt
Zellzähler	TC 10 Automated Cell Counter Bio Rad
Zentrifugen	Labofuge 400R, Function Line, Heraeus Instruments Eppendorf, Centrifuge 5415R Heraeus Fresco 21 Centrifuge Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge Thermo Scientific Kendro Laboratory Produkts, Function line Rotina 46 R, Hettich Zentrifuge
FACS	FACSCanto II flow cytometer, BD Bioscience, San Jose (USA)

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Kennzeichen
Chamber Slides (8 Well Permanox Slide)	LabTek Chamber Slides, 8-well Permanox Slides, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe/Germany, 1119528
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, 100 Stück, 24 x 60 mm Katalognummer H 87
ELISA-Platten (96 Well)	Microplatte, 96-well, Half-Area, Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
FACS Röhrchen	BD Falcon™ 5 ml Rundboden-Röhrchen (Polystyrol), BD Biosciences, Heidelberg
Röhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipetten	Eppendorf Combitips advanced 5ml, 0030089456
Sieb	Cellstrainer BD 100 µm, 352360
Slides (8 Well)	Ibidi, Martinsried 070274

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
Sterilfilter	Millex®-GS 0,22 µm, Millipore, Billerica, USA R2CA57053
Zählfarbstoff	Trypan Blue Dye 0,4%, Bio-Rad Laboratories Katalognummer 1450013
Zählplatten	Counting Slides Dual Chamber for Cell Counter Bio-Rad Katalognummer 1450011
Zellkulturflaschen	Cellstar® 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² , PS, steril, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6 Well und 12 Well)	6 well – Greiner Bio-one, Katalognummer 657160 12 well - Greiner Bio-one, Katalognummer 665980
Zellkulturschalen	1. Nunclon™ surface 144 x 21 mm, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold 2. Petrischalen 145 x 20 mm, steril, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen 3. Zellkulturschale 94 x 16 mm, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Disposable Cell Scraper, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Kennzeichen
4-PNAG	4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, Sigma-Aldrich, München, N9376
Adrenomedullin	Phoenix, Karlsruhe EK-010-08
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis, Biomol, Hamburg, ABD-21002 25mg
Bay 11-7082	Sigma-Aldrich, München, 11-7082
BSA	Bovin Serum Albumin, Sigma-Aldrich, München, 1000694380

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
C3a	R&D, Minneapolis (USA), 3677-C3-025
C5a	R&D, Minneapolis (USA), 2037-c5a-025
CaCl₂	Calciumchlorid, Merck, Darmstadt, 2382
CLO 75	Invivo Gen, Karlsruhe, <i>tlrl-c75</i>
Compound 48/80	1. Sigma-Aldrich, München, C2313 2. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, <i>sc200736A</i>
Cromolyn	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, <i>sc-207459</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Eedium Invitrogen, Karlsruhe, 42430-025
DMSO	Dimethylsulfoxide, Merck Darmstadt, 1029311001
FACS	BD Biosciences, Heidelberg
<ul style="list-style-type: none"> - BD FACSTFlow™ - BD FACS™ Shutdown Solution - Cell Wash - FACS Clean 	
fBSA	Fetal Bovine Serum Albumin, Worthington, New Jersey (USA), Sigma-Aldrich, München, F6765
FCS	Fetal Calf Serum, HyClone, Wien, SV3014303
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, SV30143.03
Glycin	Roth, Karlsruhe, 3908.2
Glykogen	Sigma-Aldrich München, G1767-1VL
HEPES	Sigma-Aldrich, München, 3375-100G
Hoechst Farbstoff (trihydrochloride)	Invitrogen, San Diego (USA), 538990
IMDM	Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium, Invitrogen, Karlsruhe 21980-032
Ionomycin	Ionomycin Calcium salt from Streptomyces conglobatus, Calbiochemie, Darmstadt, 407952
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, 6752.4

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
LPS	Lipopolysaccharid Sigma-Aldrich München, <i>L2630</i>
Methanol	Roth, Karlsruhe, <i>4627.5</i>
Mouse-IL3	PeptoTech 10 µg, Hamburg, <i>213-13</i>
MPC Protein	Epicentre, Madison (USA), <i>M95-00831</i>
MPC Protein Precipitation Reagent	MasterPure™ Kit epicentre, Madison (USA), <i>MMP095H</i>
NaOH	Roth, Karlsruhe, <i>T198.1</i>
NEAA	Non-essential-aminoacid, Invitrogen, Karlsruhe, <i>11140-035</i>
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Darmstadt, <i>15140-122</i>
PFA	Paraformaldehy, Sigma-Aldrich, München, <i>30525-89-4</i>
PMA	Phorbol myriat acetate, Calbiochemie, Darmstadt, <i>524400</i>
PolyIC	Polyinosinic: polycytidylic acid, Sigma-Aldrich München, <i>181986</i>
ProLong	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt <i>1514788</i>
Proteinase K	BioLabs, Ipswich (USA), <i>0070909</i>
R848	Invivo Gen, Karlsruhe <i>8483305</i>
RNA Isolierung	peqGOLD viral RNA Kit, <i>12-6874-02</i> peqGOLD Total RNA Kit, <i>12-6834-02</i>
RNA Lysis Buffer T	PEQLAB, Gold RNA Kit, <i>12-TRK-02</i>
RNase Inhibitor	Ribo Lock RNase Inhibitor Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, <i>E00381</i>
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe, <i>164011835</i>
RPMI w/o Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe, <i>32404-014</i>
SCF	Stem cell factor, Isokine ORF Genetics 10 µg, Kopavogur (Iceland) <i>01-AA170-0010</i>
Streptavidin	<i>S. avidinii</i> , Invitrogen, Karlsruhe, <i>43401</i>
Thioglycerol	1-Thioglycerol liquid BioReagent Sigma, München, <i>SLBD 2820V</i>
Thrombozytenrelysat	von E. Deindel aus München generiert
Tissue & Cell Lysis Solution	MasterPure™ Kit epicentre, Madison

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
	(USA), <i>MTC096H</i>
Tissue & Cell Lysis Solution	Epicentre, Madison (USA), <i>TC-20762</i>
Tris	Roth, Karlsruhe, <i>HN95-1</i>
Trisodium-citrate	Roth, Karlsruhe, <i>7125.2</i>
Triton	Roth, Karlsruhe <i>3051.4</i>
Tween	Roth, Karlsruhe, <i>9127.2</i>
Tween-20	Roth, Karlsruhe, <i>9127.3</i>
Ultra-Pure Water	Biochrome, Berlin, <i>L0015</i>
uPA	Urokinase Typ Plasminogen-Aktivator, molecular Innovations, Novi (USA), <i>MUPA-211</i>
Vectashield with Dapi	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, <i>H-1200</i>
Wortmannin	1. Calbiochemie, Darmstadt, <i>681675</i> , 1 mg 2. Invivo Gen, San Diego (USA), <i>tlrl-wtm</i>
Ethanol	Roth, Karlsruhe, <i>9065.4</i>
4 pNAG	4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide, Sigma-Aldrich München, <i>3459185</i>
DAPI	Diamine-2-Phenylindol, Vector Laboratories Inc., Peterborough (UK), <i>H-1200</i>

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Chemikalien

2.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Kennzeichen
Antimouse FCϵR1	eBioscience, San Diego (USA), Clone MAR 1 <i>14-5898-81</i>
Gold-Antikörper	Aurion, Wagenringen (Niederlande), 6 nm Gold-konjugierter Ziege-anti-Maus-IgG
IgE	Alpha-hu IgE mAB, Biotin conjugate, <i>0910-1-010-B</i>
Anti-CD 117	FITC anti-mouse Clone 2B8, Biolegend, San Diego (USA), <i>105805</i>
Anti-CD 46	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,

2. Material und Methoden

Bezeichnung	Kennzeichen
	Sc-52647
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt 1423052
Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt 1369678
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt 1454443
Mast Cell Tryptase	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, <i>C2212, Rabbit polyclonal IgG</i>
mAb anti-rRNA Antibody	Novus Biologicals, Littleton (USA), <i>NB</i> <i>100-662</i>
Ribosomales Protein L11	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, <i>B0614, goat polyclonal IgG</i>
Mouse-IgG	Sigma-Aldrich, München, <i>I5381</i>
Rabbit-IgG	Polyscience, Eppelheim, <i>23874-10</i>
Goat-IgG	Sigma-Aldrich, München, <i>I9140</i>

Tabelle 10: Antikörper

2.1.5 Verwendete KITS

Bezeichnung	Hersteller
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Life Science
Histamin ELISA	IBL International
Master Pure™ Kit	epibio
Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie
Viral RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies

Tabelle 11: Auflistung verwendeter KITS

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von HMC-1

Die erste humane Mastzelllinie wurde 1988 von J. Butterfield aus dem Blut eines an Mastozytose erkrankten Patienten isoliert (187). Inzwischen existieren zwei Subkolonien, HMC-1.1 und HMC-1.2. Beide besitzen unterschiedliche Mutationen für den c-Kit Rezeptor, der mit dem Wachstumsfaktor SCF interagiert. Bedingt durch diese Mutationen kommt es zu einer Autophosphorylierung von c-Kit ohne dass SCF

2. Material und Methoden

anwesend sein muss. Es folgt eine dauerhafte Aktivierung. Dies ist der Grund, weshalb diese Zelllinie nicht auf SCF angewiesen ist und sich die Zellen somit von primären Mastzellen deutlich unterscheiden (188).

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Mastzellen handelt es sich ebenfalls um eine HMC-1 Zelllinie, die freundlicherweise durch J. H. Butterfield (Mayo Clinic & Mayo Foundation, Rochester USA) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Kultivierung der HMC-1 erfolgte in *Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM)* unter Zusatz von 10% *Fetal Calf Serum (FCS)*, 1% Antibiotika Penicillin Streptomycin (PenStrep) und 0,01% Thioglycerol bei einer Zelldichte von 1 - 2 x 10⁷ Zellen/ml bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Humidität.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen ca. zwei bis drei Mal pro Woche gesplittet, indem sie für 5 min bei 1000g zentrifugiert und das entstehende Pellet in frischem, 37 °C warmem Zellkulturmedium aufgenommen wurde.

HMC-1 Kulturmedium	Hersteller
IMDM	gibco
10% FCS	Thermo Scientific
1% PenStrep	gibco
0,01% Thioglycerol (11,5 M)	BioReagent

Tabelle 12: Zellkulturmedium HMC-1

2.2.2 Isolation und Kultivierung von Mastzellen aus murinem Knochenmark

Bone Marrow Derived Mast Cells (BMMC) wurden aus unreifen Zellen des Knochenmarks von Mäusen gewonnen (189) (190). Anschließend wurden sie über mehrere Wochen in Kultur unter Zugabe von SCF, Interleukin 3 und 4 differenziert.

Zur Gewinnung der BMMC`s wurden Mäuse im Alter von fünf bis maximal 13 Wochen verwendet (191). Die Tiere wurden auf der Tierversuchsmeldung JLU-Nummer 481_M gemeldet. Sie wurden zunächst durch zervikale Dislokation getötet, anschließend wurden die Ober- und Unterschenkel sowie Muskeln und Sehnen entfernt.

Um einen von beiden Seiten offenen Knochen zu erhalten, wurden zusätzlich die angrenzenden Gelenke entfernt und mit Hilfe einer Spritze und einer kleinen Kanüle das Knochenmark aus den Knochenkanälchen gespült und in einem Falconröhrchen aufgefangen. Je nach Knochenende wurden zur Spülung ca. 5 ml 37 °C warmes Medium (Zusammensetzung siehe Zellkultivierung nächster Abschnitt) benötigt, um die gelösten Zellen zu gewinnen (192). Im Anschluss wurden die Zellen auf ein Zellsieb mit einer Porenweite von 100 µm gegeben und in einem neuen Falconröhrchen aufgefangen, um die Einzelzellsuspension der Zellen isolieren zu können.

Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 200g wurde das entstandene Pellet in frischem

2. Material und Methoden

Medium resuspendiert und in eine 250 ml Zellkulturflasche gegeben. Optimale Wachstumsvoraussetzungen waren gewährleistet, wenn das gewonnene Knochenmark von zwei Mäusen in einer Zellkulturflasche mit 20 ml Medium in einem Inkubator (37 °C, 5% CO₂, 95% Humidität) kultiviert wurde.

Nach ein bis zwei Tagen wurde die Zellsuspension abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Dabei war noch kein Wechsel des Mediums notwendig, es sollten lediglich adhärente Zellen entfernt werden. Nach weiteren zwei bis drei Tagen war ein Wechsel des Mediums erforderlich. Dazu wurde die Zellsuspension in einem Falconröhrchen für 10 min bei 200g zentrifugiert, anschließend das komplette Medium bis auf ca. 5 ml entfernt und 15 ml neues Medium hinzugegeben.

In den folgenden zwei bis drei Wochen war ein wöchentlicher Austausch des Mediums notwendig. Nach Ablauf dieser Zeit konnte der Reifegrad der Mastzellen mittels einer FACS-Analyse mit einem Anti-CD117 Antikörper bestimmt werden.

Die weitere Kultivierung der BMMC`s erfolgte ebenfalls in IMDM unter Zusatz von 10% FCS, 1% Pen Strep, 1% Non-essential Amino Acid (NEAA), 0,01% IL-3 und 0,03% SCF bei einer Zelldichte von 1 bis 2 x 10⁷ Zellen/ml bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Humidität.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen ca. alle zwei bis drei Tage gesplittet. Dazu wurden sie für 5 min bei 200g zentrifugiert, das verbrauchte Medium entfernt und das entstehende Pellet in frischem, 37 °C warmen, Zellkulturmedium aufgenommen.

BMMC Kulturmedium	Hersteller
IMDM	gibco
10% FCS	Thermo Scientific
1% Pen/Strep	gibco
1% NEAA	Invitrogen
0,01% IL-3 (10 ng/ml)	PeproTech
0,03% SCF (25 ng/ml)	Isokine ORF Genetics

Tabelle 13: Zellkulturmedium BMMC nach Sly et al. 2008 (193).

2.2.3 Charakterisierung der Mastzellen durch Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung des Reifegrades der isolierten Mastzellen wurden diese durchflusszytometrisch untersucht. Dies geschah mittels einer *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* Analyse. Hierbei handelt es sich um ein Messverfahren, das basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Bestandteilen genutzt wird.

2. Material und Methoden

Es wurden ca. $0,5-1 \times 10^6$ Mastzellen bei 200g für 5 min bei einer Temperatur von 20 °C zentrifugiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und 2 µl Anti-CD117 (1 µg/100 µl Stocklösung) hinzugegeben.

Nach 30 min Inkubationszeit im Dunkeln und auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 350g, 20 °C) und wiederum zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach der Resuspension in 500 µl PBS und Überführung in FACS-Röhrchen erfolgte die Messung im Durchflusszytometer (FACS CantoTM, Becton Dickinson).

Die Zellen flossen durch eine Messkammer, dabei wurde jede einzelne Zelle von dem Lichtstrahl eines Argonlasers ($\lambda=488$ nm) erfasst und als ein Ereignis registriert. Trifft der Lichtstrahl auf eine Zelle, so wird er an ihrer Oberfläche abgelenkt, so dass ein für jede Zellart charakteristisches Streulicht entsteht.

Dieses Streulicht ist proportional abhängig von der Größe und dem Differenzierungsgrad der Zellorganellen (194). Das auf diese Weise gestreute Licht, sowie das zusätzlich emittierende Fluoreszenzlicht, werden von einem Photodetektor erfasst. So können die Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht), Granularität (Seitwärtsstreulicht) und der Intensität der Fluoreszenz beurteilt werden (194).

Diese Daten wurden mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (FACS DivaTM) ausgewertet. Die registrierten Ereignisse und die gemessene Intensität der Fluoreszenz wurden gegeneinander aufgetragen und durch die Größe und Granularität ein bestimmter Messbereich festgelegt.

Es war möglich auftretende Signale auszuschließen, die nicht in diesem Messbereich liegen, beispielsweise wenn Zelltrümmer vorhanden waren (194).

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von HMC-1

Die humane Mastzelllinie wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufgetaut. Das Auftauen musste zügig geschehen, da das Medium, in dem die Zellen eingefroren sind, toxisch für sie ist, sobald sie es verstoffwechseln. Um dies zu verhindern, wurde die eingefrorene Probe in einem 37 °C warmen Wasserbad langsam aufgetaut und zügig in 5 ml des entsprechenden HMC-Mediums aufgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 200g, 20 °C), absaugen des alte Mediums und Zugabe von 20 ml frischem Medium wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche (Wachstumsfläche 175 cm²) gegeben und im Inkubator kultiviert.

Um die humanen Mastzellen langfristig nutzen zu können, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden 10×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert (5 min, 200g, 20 °C). Das entstehende Zellpellet wurde in 10% DMSO in FCS resuspendiert (DMSO vorsichtig zugegeben), in ein vorgekühltes Kyroröhrchen

2. Material und Methoden

gegeben und zunächst in einer Alkohollösung bei -80 °C für zwei Tage zum langsamen Runterkühlen eingefroren. Im Anschluss erfolgte dann die Aufbewahrung im flüssigen Stickstoff.

Einfriermedium	Hersteller
10% DMSO	Merck Darmstadt
FCS	Thermo Scientific

Tabelle 14: Einfriermedium

2.3 Toxizitätstests

Um eine Aussage über die Anzahl der Zellen und den Anteil der lebenden Zellen treffen zu können, wurde nach jedem Wechsel des Mediums und vor der Durchführung der Versuche die Zahl der Mastzellen durch einfache Zellzählung bestimmt.

Auf gleiche Weise wurde auch überprüft, ob die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus den Mastzellgranula aufgrund einer Zerstörung der Mastzelle oder in Abhängigkeit der Mastzelldegranulation geschah. Zusätzlich wurden die einzelnen Stimulantien nochmals mit Hilfe eines LDH Zytotoxizitätstests auf ihre Zytotoxizität überprüft.

2.3.1 Zellzählung

Insgesamt 20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypan-Blau angefärbt und anschließend mindestens 100 Zellen in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt, um den prozentualen Anteil an lebenden und toten Zellen zu bestimmen.

Tote Zellen nahmen aufgrund der geschädigten Zellmembran eine größere Menge des Farbstoffs Trypan-Blau auf (195). Unter Berücksichtigung der Verdünnung des Farbstoffes mit der Zellsuspension, konnte die Zellzahl pro Milliliter in einem Zählquadrat bestimmt werden. Dies erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{Mittelwert Zellzahl pro Quadrat} = \frac{\sum \text{Zellzahl aller Quadrate}}{\text{Anzahl der Quadrate}}$$

Ein solches Zählquadrat besaß ein Fassungsvermögen von 0,1 µl. Mit Hilfe der nachfolgenden Formel konnte die Zellzahl pro Milliliter bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Mittelwert Zellzahl pro Quadrate} \times \frac{1 \text{ ml}}{0,1 \mu\text{l}}$$

Die Gesamtzellzahl konnte wie folgt berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Zellzahl pro ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Formel 1: Berechnung der Zellzahl pro Milliliter

2. Material und Methoden

Ebenso wurden die Zellen mit Hilfe des automatischen Zellzählers *TC 10 Automated Cell Counter* der Firma Bio-Rad gezählt. Nach Verdünnung von 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blue Dye 0,4% Farbstoff, Durchmischung der beiden Lösungen und Auftragung auf einen Objektträger wurde die Zellzahl pro Milliliter, analog zum Vorgehen der Neubauer-Zählkammer, bestimmt.

Das Ausmaß der Zellschädigung konnte durch Zählung der Zellen vor und nach der Stimulation mit Hilfe des *TC 10 Automated Cell Counter* der Firma Bio Rad bestimmt werden. So konnte die Stimulationsdauer ermittelt werden, die zur optimalen Degranulation aber gleichzeitig auch zur geringsten Zellzerstörung führte. Nach diesem Prinzip wurden alle verwendeten Stimulanzen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer überprüft.

2.3.2 LDH-Assay

Zur Überprüfung der Stimulanzen auf Toxizität wurde ebenfalls das *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* von Roche Life Science nach Angaben des Herstellers verwendet.

Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) kommt ubiquitär zytosolisch vor und katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat (196). Kommt es zu einem Anstieg der Konzentration dieses Enzyms, so spricht dies für einen vermehrten Zelluntergang. Die Konzentration dieses Enzyms im Überstand der Zelle wurde als Marker für einen Zellschaden, wie er beispielsweise im Rahmen der Behandlung von Mastzellen mit toxischen Substanzen auftreten kann, verwendet.

Von allen zu testenden Proben wurde ein Triplikat erstellt und wie nachfolgend beschrieben auf Toxizität getestet.

Pro Testung wurden 2×10^6 Zellen/ml in 100 µl RPMI (Zellkulturmedium, welches erstmals von G. E. Moore und Kollegen am *Roswell Park Memorial Institute* entwickelt wurde, daher RPMI (197)) aufgenommen, in eine 96 Well Platte gegeben und durch 100 µl der verschiedenen Stimulationssubstanzen ergänzt.

Als Negativkontrolle dienten 200 µl reines Kulturmedium. Die Positivkontrolle wurde gebildet durch 100 µl Kulturmedium, versehen mit 100 µl unstimulierten Zellen (zur Kontrolle der spontanen LDH-Ausschüttung der Zelle) sowie 100 µl Triton X-100-Lösung (2%) mit 100 µl unstimulierten Zellen (zur Bestimmung der maximalen LDH-Ausschüttung). Die 96 Well Platte wurde dann eine Stunde bei 37 °C und 95% Humidität inkubiert und anschließend 10 min bei 250g zentrifugiert. Dann wurden vorsichtig 100 µl der Zellüberstände abgenommen, ohne die adhärenen Zellen zu berühren und nach dem gleichen Schema auf eine neue 96 Well Platte pipettiert. Anschließend wurden 100 µl der Testlösung (enthält den Katalysator Diaphorase, den Kofaktor NAD⁺, Laktat und den Farbstoff Iodtetrazoliumchlorid, Verdünnungsfaktor 1:46) ergänzt. Nach einer

2. Material und Methoden

Inkubationszeit von ca. 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Proben im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=500$ nm (Referenzwellenlänge 630 nm) gemessen.

Durch die Messung der zytosolischen LDH-Aktivität konnte der Grad der Zellzerstörung gemessen werden. Wurde LDH freigesetzt, dann oxidierte es Laktat zu Pyruvat. Begleitend wurde NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Im nächsten Schritt übertrug der Katalysator Diaphorase die Reduktionsäquivalente (Hydridionen) auf den gelben Farbstoff Iodtetrazoliumchlorid, der so zu dem roten Formazan-Salz reduziert wurde (198).

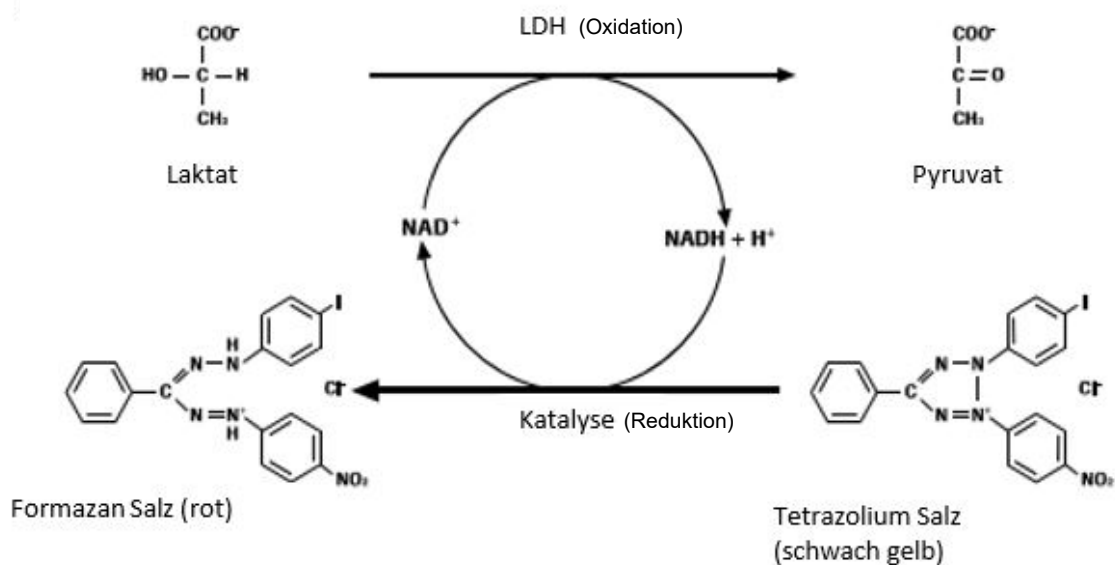


Abbildung 11: Durch Laktat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion, modifiziert nach (198).

Wurde der Blindwert von dieser Rotfärbung abgezogen, so war die beobachtete Färbung direkt proportional zum Ausmaß der Zellschädigung:

$$\text{LDH Aktivität (\%)} = \frac{\text{Absorption der Probe} - \text{Absorption des Zellkulturmediums}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Absorption des Zellkulturmediums}} \times 100$$

Formel 2: Berechnung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität in Prozent

2.4 Mastzelldegranulation

2.4.1 Stimulation der murinen und humanen Mastzellen

Zur Stimulation der Mastzellen wurden diese in RPMI (ohne FCS und Phenolrot) aufgenommen. Pro Stimulanz wurden 2×10^6 Zellen/ml verwendet. Ein Milliliter der Mastzellsuspension wurde in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben, 15 min inkubiert und anschließend der entsprechende Stimulus hinzugegeben. Die 6-Well-Platte wurde

2. Material und Methoden

für eine Stunde in den Inkubator gestellt (37 °C, 5% CO₂, 95% Humidität).

Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden die nun adhärennten Zellen vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers von der 6-Well-Platte entfernt und in Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Nach der Zentrifugation (5 min, 200g, Raumtemperatur) wurde der Überstand auf zwei neue Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt, wobei 200 µl des Überstandes ohne weitere Zugabe von Reagenzien aufbewahrt wurden. Die restlichen 800 µl wurden mit einem RNase-Inhibitor (2 µl/ml) versetzt, um so zu verhindern, dass die darin enthaltene RNA durch das Enzym RNase zerstört wird.

Die 6-Well-Platte wurde erneut mit 200 µl PBS gespült, um übrig gebliebene Zellen mit aufzunehmen und zum Zellpellet zu geben. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall lysiert und in RIPA-Puffer aufgenommen.

Dieses Protokoll der Stimulation wurde sowohl für die murinen als auch für die humanen Mastzellen verwendet.

2.4.2 Inhibition der Mediatorfreisetzung

In weiteren Versuchen wurden Mastzellen an der Ausschüttung ihrer Mediatoren gehindert. Hierzu wurden sie mit Mastzellstabilisatoren wie Wortmannin oder Cromolyn und dem Calcium-Chelator BAPTA behandelt. Bei gleichzeitiger Verwendung von Stimulanzen wurde so die Degranulation verhindert.

Pro Stimulanz wurden 2×10^6 Mastzellen in 1 ml RPMI aufgenommen und in je ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Der Ansatz wurde für 60 min mit einem der Hemmstoffe vorinkubiert (37 °C, 5% CO₂, 95% Humidität). Anschließend wurden die vorinkubierten Zellen mit einem Stimulus behandelt, der unter normalen Bedingungen eine Degranulation induzierte. Nach Ablösung der adhärennten Zellen mit einem Zellschaber wurden diese in ein Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben und zentrifugiert (5 min, 200g, Raumtemperatur). Das weitere Vorgehen ist in Kapitel 2.4.1 dargestellt.

Die Inhibition der Mediatorfreisetzung wurde sowohl für die murinen als auch für die humanen Mastzellen nach diesem Protokoll durchgeführt.

2.5 Quantifizierung der Degranulation von Mastzellen

2.5.1 β -Hexosaminidase-Messung

Das Enzym β -Hexosaminidase befindet sich hauptsächlich in Mastzellen und basophilen Granulozyten. In den Mastzellen ist es innerhalb der Granula gespeichert, so dass es sich gut als Indikator für die Degranulation der Mastzelle eignet (199) (200) (201) (202). Die Aktivität der Mastzellen lässt sich mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion bestimmen.

2. Material und Methoden

Das bei der Degranulation freigesetzte Enzym β -Hexosaminidase reagiert mit dem in der Substratlösung enthaltenen 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (pNAG), wobei pNAG am Ende der Reaktion zu p-Nitrophenol umgewandelt wird. Dies ließ sich an einer leichten gelblichen Färbung erkennen.

Zur Quantifizierung der Degranulation wurden 25 μ l des nach der Stimulation gewonnenen Überstandes (insgesamt 100 μ l, ohne RNase Inhibitor) beziehungsweise 2,5 μ l der Lysate in eine 96-well Platte pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden 50 μ l pNAG-Substratlösung (c=2 mM, pH 4,5) hinzugegeben und die 96-Well-Platte für 90 min bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 150 μ l 0,2 M Glycin-Lösung (pH 10,7) gestoppt (203) und bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm die optische Dichte (OD) mit Hilfe des Photometers gemessen (204) (205).

Der auf diese Weise bestimmte Anteil der ausgeschütteten β -Hexosaminidase wurde prozentual zu der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität der lysierten Zellen angegeben und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Freisetzung (in \%)} = \frac{\text{OD nach Stimulation} - \text{OD spontane Aktivität}}{\text{OD gesamt} - \text{OD spontane Aktivität}} \times 100$$

Formel 3: Berechnung der β -Hexosaminidase-Aktivität in Prozent (192)

Die Auswertung dieses Experimentes erfolgte in Triplets, wobei jedes Experiment drei Mal wiederholt wurde (n=3).

Puffer	Zusammensetzung	Menge
pNAG-Puffer (2mM)	pNAG	100 mg
	Zitronensäure	146 mL
	pH mit Hilfe von NaOH auf 4,5 einstellen	
Natrium-Citrat-Puffer (0,04mM)	Trisodium Citrate	2,94 g
	ddH ₂ O	250 mL
	pH 4,7	
Glycin-NaOH-Puffer (0,2M)	Glycine	0,2 M
	NaOH	0,2 M
	pH 10,7	

Tabelle 15: Verwendete Puffer zur Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität

2.5.2 Histamin Freisetzung

Histamin wird ebenso wie das Enzym β -Hexosaminidase, bei der Degranulation der Mastzellen freigesetzt (3). Daher eignet sich dieses biogene Amin ebenfalls zur Quantifizierung der Mastzellaktivität.

Zur Bestimmung der Histamin Freisetzung wurde das *Histamin ELISA*-Kit von IBL

2. Material und Methoden

International GmbH nach Angaben des Herstellers verwendet (206).

Gemäß Herstellerangaben beruht das Prinzip dieses Tests auf der Konkurrenz um die Bindungsstelle des an die Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Eine unbekannte Menge Antigen in der Probe und eine bekannte Menge an enzymmarkiertem Antigen konkurrieren um diese Bindungsstelle. Dieser Vorgang nennt sich *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* und dient der Bestimmung des Histamingehaltes (206).

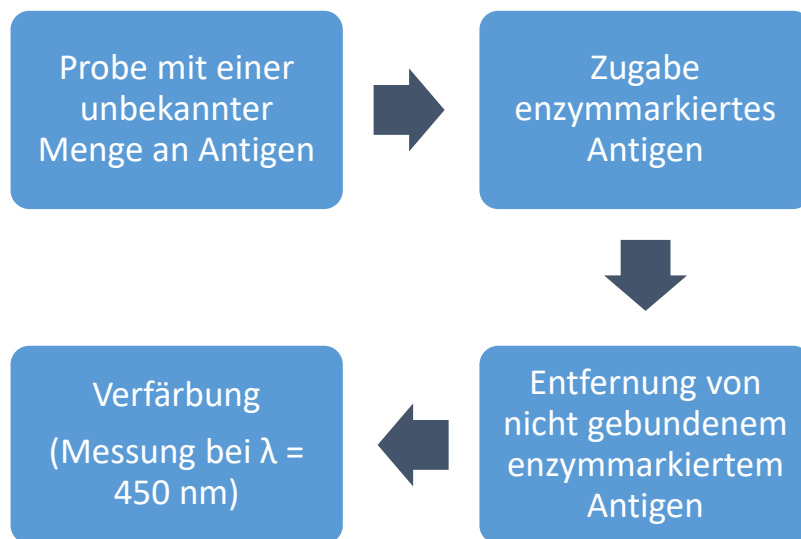


Abbildung 12: Darstellung des ELISA-Prinzips im Rahmen der Bestimmung der Histaminfreisetzung (206)

Hierzu wurden die Zellkulturüberstände zunächst acyliert, indem 100 µl des nach der Stimulation gewonnenen Mastzellüberstandes zusammen mit 100 µl Indikatorpuffer in ein Well einer 96-Well-Acylierungsplatte pipettiert wurden. Nach Zugabe weitere 20 µl Acylierungsreagenz und Abklebung der Platte mit einer Haftklebefolie folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Im nächsten Schritt wurden die Proben, die Standards und die Kontrollen mit einer 8-Kanal Mikropipette durchgemischt, je 50 µl auf die Mikrotiterplatte überführt und 50 µl frisch hergestelltes Enzymkonjugat sowie 50 µl Histamin Antiserum hinzugegeben. Auch diese Platte wurde mit einer Haftfolie verschlossen und 180 min bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubiert. Nach der Entfernung der Folie wurde die Inkubationslösung verworfen und die Platte vier Mal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen.

Die restliche Flüssigkeit wurde auf einem Papiertuch ausgeklopft. Nun wurden 100 µl TMB Substratlösung in jedes Well pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 100 µl TMB Stopplösung die Reaktion unterbrochen.

Nach kurzem Schütteln der Platte wurde innerhalb der nächsten 15 min die optische

2. Material und Methoden

Dichte (OD) mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm (Referenzwellenlänge 600 – 650 nm) gemessen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch eine halblogarithmische Darstellung der Standards. Dazu wurden die OD Werte der gemessenen Standards auf der y-Achse linear gegen den Logarithmus des Histamingehaltes der Standards auf der x-Achse aufgetragen. Anhand der entstehenden Funktion konnte der Histamingehalt der Proben direkt abgelesen werden. Die Auswertung dieses Experimentes erfolgte in Triplets, wobei jedes Experiment drei Mal wiederholt wurde ($n=3$). Für die Berechnung des Gesamthistamingehaltes der Proben galt folgende Formel:

$$\text{Histamingehalt Probe} \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right) = 10^{\text{abgelesener Histaminwert Probe}}$$

Formel 4: Berechnung des Histamingehaltes in ng/ml

2.6 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Die Isolierung und Quantifizierung der RNA erfolgte aus stimulierten Zellen. Diese wurden durch Zentrifugation aufgeteilt in ein Pellt (Lysat), den Überstand und die Fraktion der Mikropartikel. Für die Isolierung der RNA standen, je nach verwendeter Fraktion der Mastzellen, zwei verschiedene Methoden zur Verfügung.

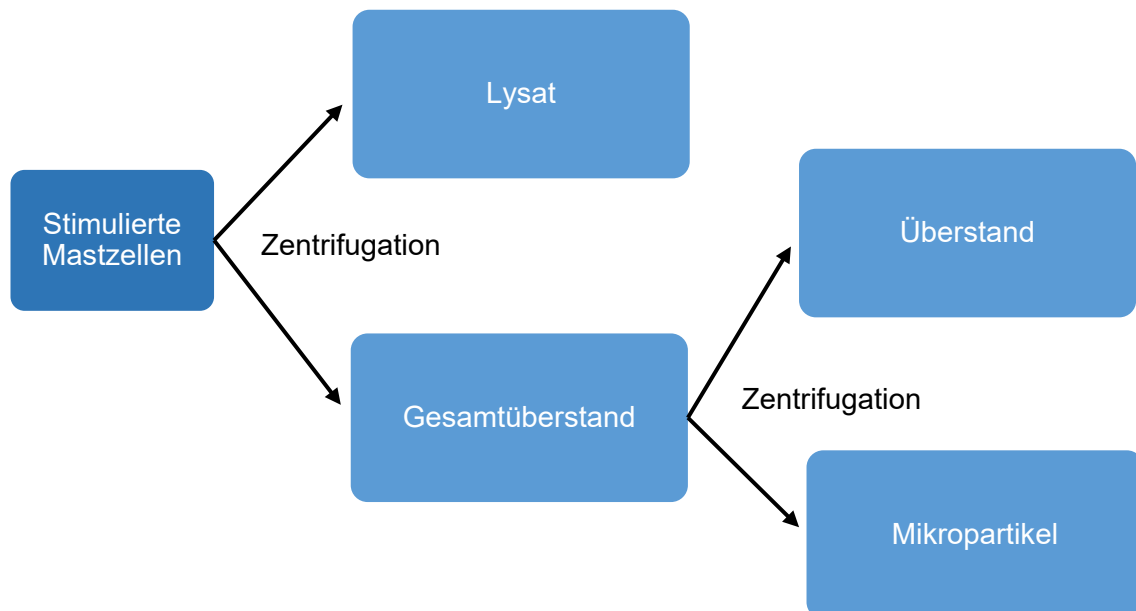


Abbildung 13: Übersicht über die einzelnen Fraktionen der Mastzellen. Übersicht über die einzelnen Fraktionen der stimulierten Mastzellen, die zur Isolierung der RNA und zur Bestimmung des RNA-Gehaltes verwendet wurden.

2. Material und Methoden

2.6.1 RNA-Quantifizierung aus den Lysaten

Um aus dem Pellet der stimulierten Mastzellen RNA isolieren zu können, wurde das *Total RNA Kit* der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die zu untersuchenden Lysate wurden homogenisiert und lysiert, um alle in ihr vorliegenden Enzyme und RNasen suffizient zu hemmen. Die lysierten Zellen wurden anschließend auf eine spezielle Säule mit einer Silikonmembran gebracht, an der die RNA-Moleküle der Probe binden konnten. Andere Bestandteile, wie zelluläre Komponenten oder Kontaminationen, wurden durch mehrere Waschschriffe entfernt und anschließend folgte die Ablösung der RNA-Moleküle von der Silikonmembran durch RNase-freies Wasser.

Die homogenisierten Zellen wurden mit 400 µl RNA Lysis Buffer T ergänzt und auf eine DNA Removing Column gegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 12.000g und Raumtemperatur folgte der Bindungsschritt der RNA, indem der Durchfluss der DNA Removing Column mit dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol versetzt und gründlich durchgemischt wurde. Die gesamte Probe wurde auf die PerfectBind RNA Column geladen und nach einer weiteren Minute Zentrifugation bei 10.000g und Raumtemperatur wurde die gebundene RNA mit 500 µl RNA Wash Buffer I gewaschen. Im Anschluss an das Zentrifugieren (15 s, 10.000g, Raumtemperatur) folgte ein weiterer Waschschriffe mit 600 µl RNA Wash Buffer II. Nach zweiminütigem trocken zentrifugieren bei 10.000g wurde die gebundene RNA durch 50 – 100 µl RNase-freies Wasser aus der Säule gelöst und im darunter stehenden Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen. Hierfür musste sie nach dreiminütiger Inkubationszeit eine Minute bei 5.000g und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Die Konzentration der auf diese Weise isolierten RNA konnte nun mit Hilfe des Programms NanoDrop gemessen werden. 1 µl der unverdünnten Probe wurde auf die Messoberfläche gegeben und mittels Spektralphotometrie die Konzentration bestimmt, indem die Absorption der Probe bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gemessen wurde. Dabei entsprach eine Einheit A_{260} 40 µg RNA/ml, so dass sich für die Berechnung der RNA-Konzentration folgende Formel ergab:

$$\text{RNA – Konzentration } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \text{Absorption } 260 \text{ nm} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 5: Berechnung der RNA-Konzentration in µg/ml aus den Lysaten

Lag das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm zwischen 1,8 und 2, dann besaß die gemessene RNA eine Reinheit von 90% bis 100%. Die Auswertung

2. Material und Methoden

dieses Experimentes erfolgte in Triplets, wobei jedes Experiment drei Mal wiederholt wurde (n=3).

2.6.2 RNA-Quantifizierung aus dem Überstand und den Mikropartikeln

Die RNA-Quantifizierung aus dem Überstand erfolgte mit dem *Master Pure™ Kit* der Firma epicentre nach den Angaben des Herstellers.

Nachdem 100 µl des durch Zentrifugation gewonnenen Überstandes in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben worden sind, wurden 400 µl Lysis-Puffer und 1 µl Proteinkinase K pro Probe hinzugegeben und der Ansatz gemischt. Die Proben wurden dann 15 min in einem Heizblock mit der Temperatur 65 °C erhitzt und anschließend 10 min auf Eis gestellt, bevor 250 µl MPC-Reagenz unter Durchmischung hinzugegeben wurden. Nach Zentrifugation (10 min, 10.000g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang der Zentrifugation (10 min, 10.000g, 4 °C) wurde wiederholt, der Überstand ein weiteres Mal in ein neues Behältnis überführt und mit 600 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen ergänzt. Nachdem alles per Hand gut durchgeschüttelt worden ist, wurde es erneut zentrifugiert (10 min, 10.000g, 4 °C), der Überstand entfernt und 500 µl 70%iges Ethanol zu dem Zellpellet gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 10.000g, 4 °C), die Abnahme des Überstandes, ein Waschschrift mit 70% Ethanol und anschließendes Verwerfen des Überstandes. Nun wurden die Proben 30 min lang unter einem Abzug getrocknet und das entstandene Pellett in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration konnte mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen werden, der spezifisch nur die RNA nicht aber die DNA anfärbte.

Die Quantifizierung der RNA aus den Mikropartikeln erfolgte nach vorheriger Separierung der Mikropartikelfraktion aus dem Überstand durch Zentrifugation (60 min, 21.000g, 20 °C). Das hierbei entstehende Zellpellet wurde in 100 µl PBS aufgenommen, ein weiteres Mal zentrifugiert (60 min, 21.000g, 20 °C) und das neue Pellet (inklusive Mikropartikelfraktion) in 100 µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Aus dieser Fraktion konnte der RNA-Gehalt der Mikropartikel auf gleiche Weise bestimmt werden wie im Überstand.

$$\begin{aligned} & \text{RNA – Konzentration Probe} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \\ &= \text{Absorption Probe} \times \frac{\text{Volumen Gesamtprobe nach RNA – Isolierung}}{\text{Volumen der gemessenen Probe}} \\ & \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Volumen Gesamtprobe vor RNA – Isolierung}}{\text{Volumen der gemessenen Probe}} \end{aligned}$$

Formel 6: Berechnung der RNA-Konzentration in µg/ml aus dem Überstand bzw. den Mikropartikeln

2. Material und Methoden

Die Auswertung dieses Experimentes erfolgte in Triplets, wobei jedes Experiment drei Mal wiederholt wurde (n=3).

2.7 Immunzytochemie der Mastzellen

Für die Erstellung der Fluoreszenzbilder wurden 50 μl (Zelldichte mindestens 3×10^6 Zellen/ml) der zuvor stimulierten Zellen für 10 min mit 100 μl 4% Paraformaldehyd (PFA) versetzt. Nach Abnahme des Überstandes, wurden die Zellen mit 200 μl PBS (eisgekühlt) gewaschen und 100 μl 0,1% Triton hinzugegeben. Nach 10 min wurde der Überstand abgenommen, die Zellen drei Mal mit 200 μl PBS gewaschen und eine Stunde lang mit 100 μl 3% Bovines Serumalbumin (BSA) inkubiert.

Es folgte die Zugabe von 100 μl des Erst-Antikörpers (zum Beispiel mAB anti-RNA-Antibody, Novus Biologicals) nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS. Dafür wurde dieser mit 1% BSA und *Tris Buffered Saline und Tween 20 (TBS-T)* 1:100 verdünnt, zu den Zellen gegeben und eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an den Waschschrift wurden 100 μl des Zweit-Antikörpers (Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG bzw. anti-goat IgG) hinzugegeben und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper wurde dafür ebenfalls mit 1% BSA und TBS-T 1:200 verdünnt. Nach einem weiteren Waschschrift (insgesamt drei Mal mit PBS waschen für 3, 5 und 10 min) wurde der Objektträger mit vier Tropfen Vectaschild und Dapi versehen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Puffer	Zusammensetzung
4% PFA	800 ml PBS 40 g Paraformaldehyd PBS hinzufügen bis insgesamt 1000 ml (pH 7,5)
TBS (10x)	12,1 g TRIS-HCl (c=7,7 mM; pH 7,5) 87,7 g NaCl (c=150 mM) mit dH ₂ O auf 1000 ml auffüllen
BSA 3%	0,75 g BSA 25 ml TBS-T (aus TBS (10x) 1:9 verdünnen mit dH ₂ O und Tween 20 μl)

Tabelle 16: Verwendete Puffer für Immunzytologie

2. Material und Methoden

2.8 Elektronenmikroskopie

Die Erstellung der Elektronenmikroskop-Bilder erfolgte bis zur Zugabe des zweiten Antikörpers wie in Kapitel 2.7 beschrieben. Anschließend wurden 100 µl eines sechs nm Gold-Antikörpers (Verdünnung 1:100) hinzugegeben. Hierbei handelte es sich um einen Ziege-Anti-Mouse-IgG-Antikörper. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurde drei Mal mit dem Puffer PBS gewaschen und mit 0,1% Triton nachfixiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Einbettung in Kunstharz. Hierzu wurden die Zellen drei Mal für je 10 min in einem 0,15 M HEPES-Puffer gewaschen und hinterher zur Kontrastierung der Lipide für 60 min mit 1% Osmiumtetroxid behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit destilliertem Aqua für je 10 min kam es zur Blockkontrastierung mit Hilfe von halbgesättigter Uranylacetat-Lösung über Nacht. Am nächsten Tag wurde erneut drei Mal mit destilliertem Aqua für je 10 min gewaschen und dann in aufsteigender Konzentration zwei Mal mit je 30; 50; 70; 90 und 100%igem Ethanol jeweils für 10 min entwässert. Dann wurden die Zellen mit Agar 100, einem Epoxydharz, überschichtet und bei 48-65 °C polymerisiert.

Zur Herstellung der eigentlichen Bilder wurden diese Blöcke aus Kunstharz mit Hilfe eines Ultramikrotoms in ca. 60-70 nm dicke Ultradünnschnitte zerlegt. Diese Schnitte wurden auf einem kleinen Netz, dem sogenannten *Grids*, aufgefangen. Diese dienten als Objektträger und wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskops Zeiss 902 begutachtet. Dieser Versuchsteil erfolgte mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Ulrich Gärtner (Leiter Servicebereich Elektronenmikroskop), Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel 2013 und GraphPad Prism 5.03. Die in jedem Diagramm enthaltenen Datenpunkte stellen den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, wobei jedes von ihnen aus $n \geq 3$ Messungen besteht. Sie wurden graphisch als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Ergebnisse zwischen den Gruppen wurden mittels 1way ANOVA verglichen, gefolgt von einem mehrfachen paarweisen Vergleichstest (Tukey's multiple comparison test) oder einem ungepaarten t-Test, falls zutreffend. Als statistisch signifikant wurden Werte ab $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von murinen Mastzellen

Nach Isolierung der BMMC (siehe Kapitel 2.2.2) wurde zunächst mit Hilfe der Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.2.3) eine Analyse der Mastzellen vorgenommen. Aus den pluripotenten Stammzellen der Mäuse müssen reife Mastzellen entstanden sein, damit sie nach der Stimulation mit einer entsprechenden Degranulation reagieren. Eine solche Analyse entfiel bei der humanen Zelllinie (HMC-1), da dort bereits vollständig entwickelte Zellen zur Verfügung standen, die nicht differenziert werden mussten.

In den zwei nachfolgenden Abbildung 14 und 15 sind die Ergebnisse der CD117 Expression durch FACS-Analyse der murinen Mastzellen dargestellt. Ab einer CD177 Expression von $> 80\%$ der isolierten Mastzellen wurden diese für die Versuche verwendet.

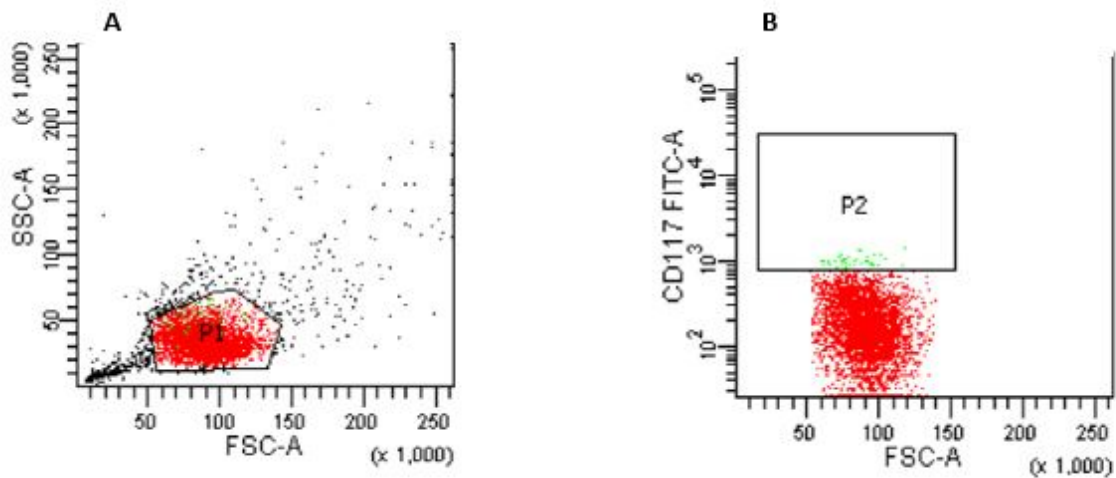


Abbildung 14: FACS-Analyse der ungefärbten Probe als Negativkontrolle.

A Die Granularität (SSC-A) wird gegen die Größe (FSC-A) aufgetragen. P1 zeigt alle Mastzellen (86,3%), wobei die Mastzellen in diesem Fall nicht gefärbt wurden und als Negativkontrolle dienen.

B Der Nachweis des Oberflächenmarkers CD117 wird gegen die Größe (FSC-A) aufgetragen. P2 zeigt, dass 1% der ungefärbten Zellen aus P1 den mastzellspezifischen CD117 Oberflächenmarker aufweisen.

3. Ergebnisse

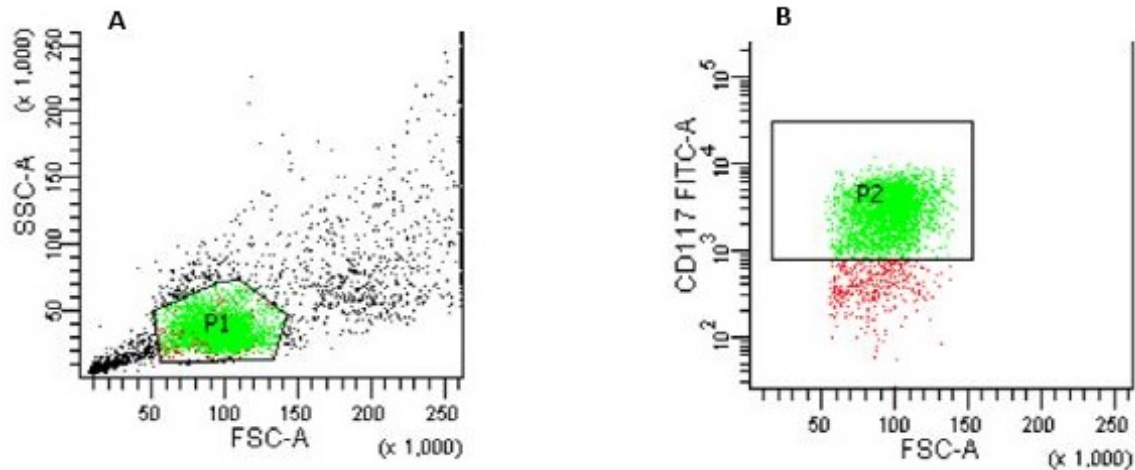


Abbildung 15: FACS-Analyse der gefärbten Zellen.

A Darstellung der mit CD117 gefärbten Zellen durch Auftragung der Granularität (SSC-A) gegen die Größe (FSC-A). P1 zeigt mit 62,5% alle gezählten Mastzellen

B In der rechten Grafik ist der Oberflächenmarker CD117 gegen die Größe (FSC-A) aufgetragen. P2 zeigt mit 88,8% den Anteil der gefärbten Mastzellen aus P1.

3.2 Stimulation von Mastzellen

Nach Analyse und Stimulation der Mastzellen erfolgte die Auswertung der einzelnen Mastzellstimulationen. Die verwendeten Stimulanzen wurden so ausgewählt, dass die Mastzelldegranulation über unterschiedliche Aktivierungswege eingeleitet wurde. Als Grundlage diente die in Kapitel 1.2.6 beschriebene Auflistung der Aktivierungsmöglichkeiten von Mastzellen.

3.2.1 Toxizitätstest

Um auszuschließen, dass es aufgrund von zytotoxischen Vorgängen in den Mastzellen zur Freisetzung der Mediatoren kam, wurde ein Toxizitätstest durchgeführt.

Dabei wurden die Stimulanzen analog zu den vorhergehenden Versuchen verwendet. Die Mastzellen wurden wie unter Versuchsbedingungen für eine Stunde mit den zuvor genutzten Stimulanzen (gleiche Konzentration) behandelt. Auch die Mastzellstabilisatoren Wortmannin und Cromolyn sowie der Calcium-Chelator BAPTA wurden auf ihre Toxizität überprüft. Hierfür wurden die Mastzellen zwei Stunden (aufgrund einer längeren Kontaktzeit während der Versuche) mit den Degranulationshemmstoffen behandelt.

Im Anschluss an die Stimulation wurde die Anzahl der lebenden Zellen vor und nach der Stimulation bestimmt.

3. Ergebnisse

Bei nahezu konstanter Zellzahl war davon auszugehen, dass die Mastzellen durch die Stimulanzen nicht geschädigt werden. So konnte sichergestellt werden, dass die Mastzellmediatoren im Rahmen der Stimulation freigesetzt wurden.

Wie anhand der nachfolgenden zwei Diagramme in Abbildung 16 zu erkennen ist, kam es zu keiner Schädigung der Mastzellen durch die verwendeten Stimulanzen.

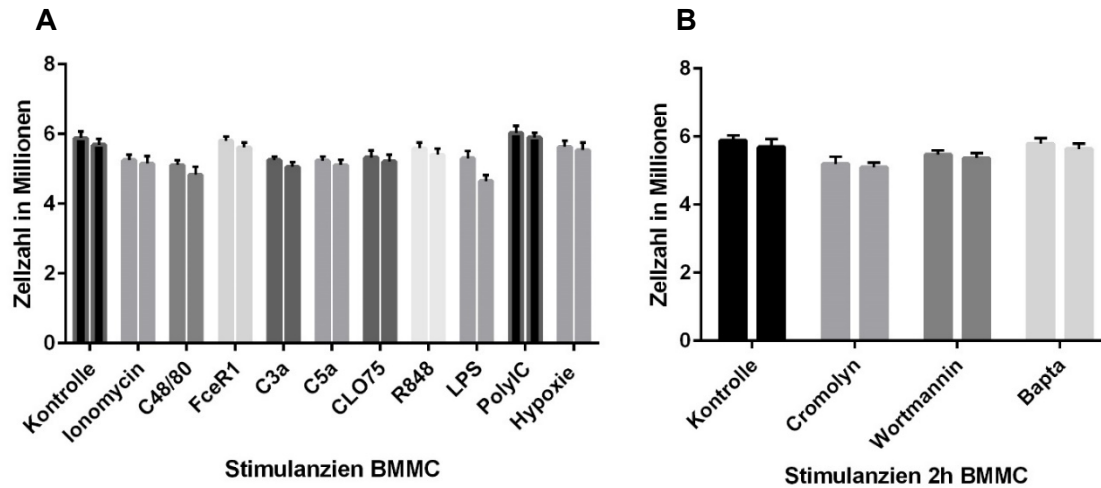


Abbildung 16: Toxizitätstests.

A: Bestimmung der Zellzahl vor (linker Balken) und nach (rechter Balken) einstündiger Stimulation mittels Erhöhung der intra- und extrazellulären Calciumkonzentration durch Ionomycin (1,5 μM), der Aktivierung der Mastzelle über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor durch C48/80 (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. über den IgE-Rezeptor über FcεR1 (1 $\mu\text{g/ml}$), Aktivierung des Komplementsystems durch C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml), Agonisten von TLR 7 CLO 75 (5 $\mu\text{g/ml}$) und R848 (1 $\mu\text{g/ml}$), Agonisten von TLR 4 LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), Agonisten für TLR 3 PolyIC (5 $\mu\text{g/ml}$) und 24 stündiger Stimulation unter Hypoxie Bedingungen.

B: Bestimmung der Zellzahl vor und nach zweistündiger Behandlung mit den Hemmstoffen Cromolyn (10 $\mu\text{g/ml}$) und Wortmannin (10 μM), die als Mastzellstabilisator fungieren und dem Calciumchelator BAPTA (10 mM).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$.

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der Toxizität ist der LDH-Assay. Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes zytosolisches Enzym, das nach Zellschaden freigesetzt wird (198).

Die verwendeten Stimulanzen wurden auf die Freisetzung von LDH untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation der Mastzellen mit den angegebenen Stimulanzen kein LDH freigesetzt wurde.

Wie Abbildung 17 A zeigt, induzierte die Stimulation der Mastzellen eine Degranulation der Zelle und war nicht schädlich für sie. Die eingesetzten Substanzen und Konzentrationen konnten in den nachfolgenden Versuchen für die Auslösung der Degranulation genutzt werden.

3. Ergebnisse

Auch bei gleichzeitiger Verwendung von Ionomycin und Unterdrückung der Mastzelldegranulation durch die Mastzellstabilisatoren Cromolyn und Wortmannin sowie dem Calcium-Chelator BAPTA (siehe Abb. 17 B) kam es nicht zu einer Freisetzung von LDH.

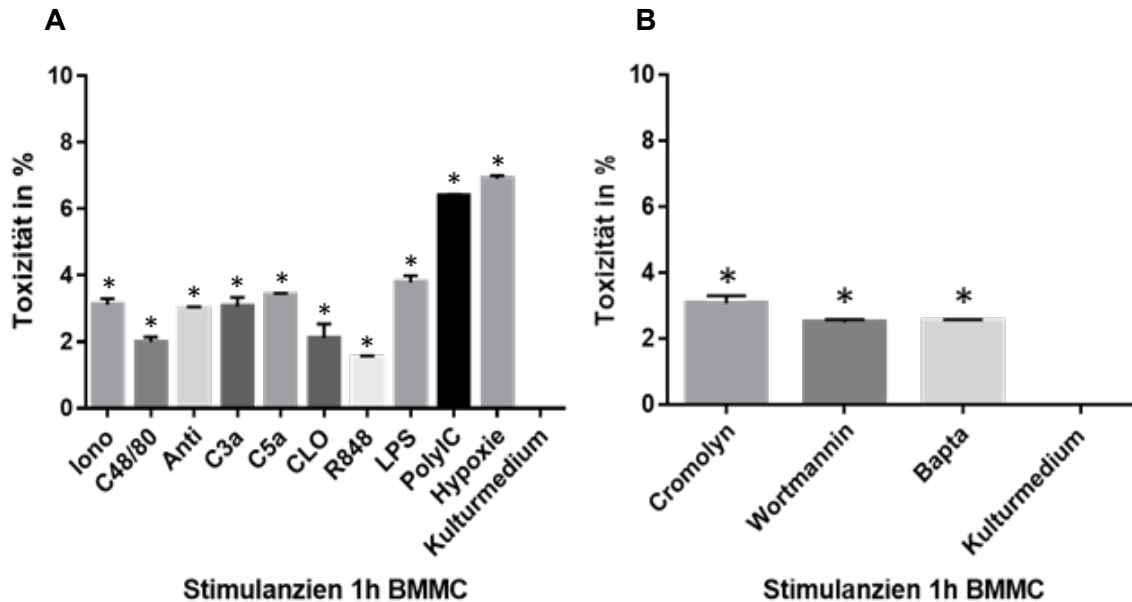


Abbildung 17: Überprüfung der Toxizität mittels dem Nachweis der Laktat-Dehydrogenase.

A: Bestimmung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase nach einstündiger Stimulation mittels Erhöhung der intra- und extrazellulären Calciumkonzentration durch Ionomycin (1,5 μ M), der Aktivierung der Mastzelle über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor durch C48/80 (10 μ g/ml) bzw. über den IgE-Rezeptor über Anti-Fc ϵ R1 (1 μ g/ml), Aktivierung des Komplementsystems durch C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml), Agonisten von TLR 7 CLO 75 (5 μ g/ml) und R848 (1 μ g/ml), Agonisten von TLR 4 LPS (1 μ g/ml), Agonisten für TLR 3 PolyIC (5 μ g/ml) und 24 stündiger Stimulation unter Hypoxie Bedingungen.

B: Bestimmung des Enzyms Laktat-Dehydrogenase nach zweistündiger Behandlung mit Ionomycin (1,5 μ M) und mit den Hemmstoffen Cromolyn (10 μ g/ml) und Wortmannin (10 μ M), die als Mastzellstabilisator fungieren und dem Calciumchelator BAPTA (10 mM). Als Positivkontrolle wurde in beiden Fällen eine 2% Triton-Lösung verwendet. Dieser Stoff führt durch Lösung der Zellmembran zu einer Zerstörung der Zelle. Als Negativkontrolle diente das reine Kulturmedium der murinen Mastzellen (198). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3 ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.2.2 Aktivierung der Mastzellen in Abhängigkeit von Ionomycin, C48/80 und Fc ϵ

3.2.2.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Als nächstes wurde die Degranulation von Mastzellen durch verschiedene Stimulanzen induziert, um anschließend eine RNA-Quantifizierung und -Qualifizierung der gewonnenen Zellüberstände durchzuführen.

Bei der Auswahl der Stimulanzen wurde das Ziel verfolgt, möglichst jeden in Kapitel 1.2.6 beschriebenen Signalweg zur Aktivierung von Mastzellen zu berücksichtigen.

Zunächst wurden die murinen und humanen Mastzellen für eine Stunde, wie in Kapitel

3. Ergebnisse

2.4.1 erläutert, stimuliert und mit Hilfe von Zentrifugation in einen Überstand und Lysat aufgeteilt.

Der Effekt der eingesetzten Stimulantien auf die Mastzellen war abhängig von der Konzentration und dem Signalweg. Die Degranulation wurde durch Messung der Hexosaminidaseaktivität im Überstand und den Lysaten bestimmt. β -Hexosaminidase ist ein Enzym, das in Mastzellgranula gespeichert wird und als Indikator für die Degranulation von Mastzellen dient (199).

Kommt es zur Degranulation der Mastzelle, so verschmelzen Granula- und Zellmembran miteinander und die in den Granula gespeicherten Stoffe werden freigesetzt. So wurde auch das Enzym β -Hexosaminidase durch Exozytose in den Interzellularraum gegeben. Das Ausmaß der Degranulation ließ sich anschließend quantifizieren, da die Aktivität des Enzyms direkt proportional zur Degranulationsstärke ist (195) (200) (201) (207).

Alle Stimulationen wurden sowohl mit humanen Mastzellen als auch murinen Mastzellen als Triplet durchgeführt. Humane und murine Mastzellen reagierten dabei sehr ähnlich auf die einzelnen Stimulantien, lediglich die Stärke der Aktivierung wich geringfügig ab. Die Aktivierung der Mastzelle wurde durch Ionomycin und mittels IgE über den membranständigen $Fc\epsilon$ -Rezeptor ($Fc\epsilon R1$) ausgelöst, indem die intrazelluläre Calcium-Freisetzung gesteigert wurde (69) (73). C48/80 hingegen bewirkte durch direkte Aktivierung eines G-Proteins eine Degranulation (41).

Die zwei nachfolgenden Diagramme in Abbildung 18 geben einen Überblick über die Reaktion der Mastzellen auf die einzelnen Stimuli. Anhand der β -Hexosaminidaseaktivität zeigte sich, dass es im Vergleich zur Kontrolle zu einer vermehrten Freisetzung von Mediatoren kam.

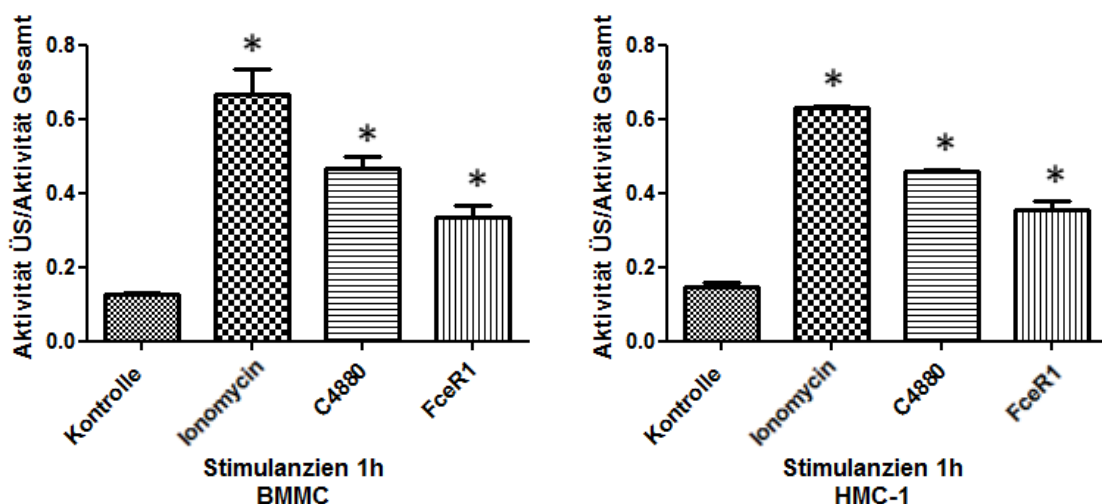


Abbildung 18: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation mit dem Ionomycin (1,5 μ M), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors C48/80 (10 μ g/ml) und des IgE-Rezeptors FcεR1 (1 μ g/ml). Dargestellt ist das Verhältnis zwischen der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.2.2.2 Histaminfreisetzung

Zusätzlich wurde die Degranulierung über die Freisetzung von Histamin bestimmt. Histamin ist ein Hauptbestandteil der Granula und wird bei der Degranulation in großen Mengen freigesetzt (3).

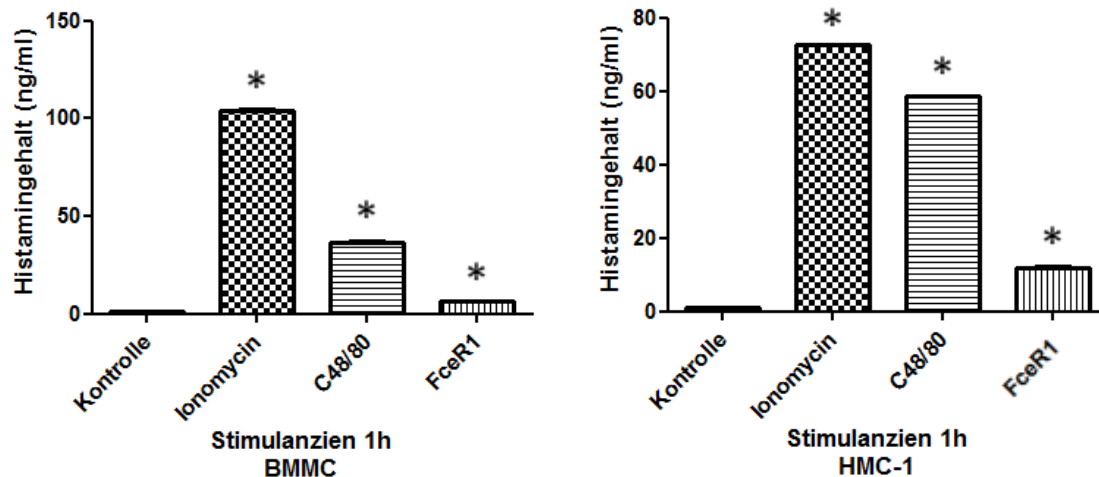


Abbildung 19: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 µM), welches die intra- und extrazelluläre Calciumkonzentration erhöht, dem Agonisten des G-Proteingekoppelten-Rezeptors C48/80 (10 µg/ml) und des IgE-Rezeptors FcεR1 (1 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) ± Standardabweichung bei n= 3 ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

Ein Vergleich der Histaminfreisetzung von humanen und murinen Mastzellen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Beide Zellarten reagierten auf die verwendeten Stimulanzien in ähnlicher Weise und auch die Konzentration der freigesetzten Histaminmenge war nahezu identisch (siehe Abb. 19). Die stärkste Histaminfreisetzung wurde, ebenso wie die β -Hexosaminidase-Freisetzung, durch Ionomycin ausgelöst.

3.2.2.3 Vergleich β -Hexosaminidase- und Histaminfreisetzung

Das Enzym β -Hexosaminidase, welches ebenso wie Histamin in den Mastzellgranula gespeichert wird, kann durch entsprechende Stimuli im Rahmen der Degranulation aus diesen freigesetzt werden (199) (200). Ein Vergleich der prozentualen Histamin- und β -Hexosaminidase Freisetzung zeigte keinen signifikanten Unterschied. Beide Mediatoren eignen sich um das Ausmaß der Mastzellaktivierung zu quantifizieren (Abb. 20). Nach einstündiger Stimulation zeigte sich für beide Mastzellarten kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der über β -Hexosaminidase und Histamin gemessenen Aktivierung.

3. Ergebnisse

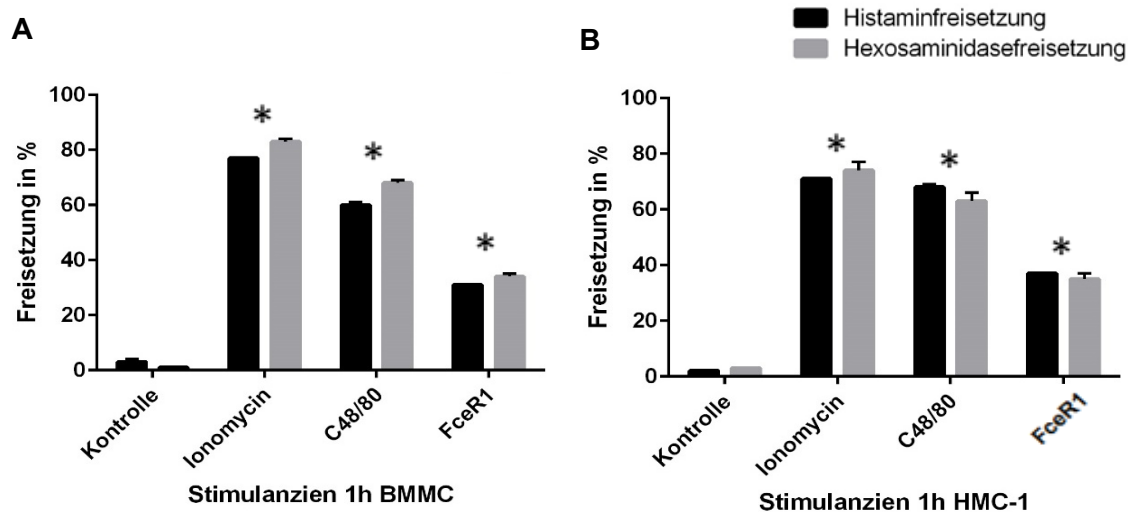


Abbildung 20: Vergleich der Freisetzung von β -Hexosaminidase und Histamin aus aktivierten Mastzellen.

A: Dargestellt ist die Freisetzung von β -Hexosaminidase im Vergleich zur Histaminfreisetzung nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors C48/80 ($10 \mu\text{g/ml}$) und der IgE-Rezeptors Fc ϵ R1 ($1 \mu\text{g/ml}$) bezogen auf unstimulierte murine Mastzellen.

B: Hier ist die Freisetzung von β -Hexosaminidase im Vergleich zur Histaminfreisetzung nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors C48/80 ($10 \mu\text{g/ml}$) und des IgE-Rezeptors mittels Fc ϵ R1 ($1 \mu\text{g/ml}$) gezeigt. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um humane Mastzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.2.2.4 RNA-Freisetzung

Im Nachfolgenden soll genauer untersucht werden, ob die freigesetzte RNA mit der Mikropartikel-Fraktion assoziiert ist, da es verschiedene Theorien über die Freisetzung und den Transport von eRNA gibt. In der Literatur wird eine Assoziation zwischen den Mikropartikeln und der RNA beschrieben (130) (131) (132).

Mittels Zentrifugation wurde die Fraktion der Mikropartikel gewonnen. Die RNA wurde aus den Mikropartikeln, den Überständen und den Lysaten isoliert und anschließend jeweils der RNA-Gehalt bestimmt (siehe Abb. 13), um zu überprüfen, ob das Ausmaß der RNA-Freisetzung mit dem der Degranulierung korreliert.

3.2.2.4.1 Verhältnis RNA-Gehalt in den Mikropartikeln zur Gesamt-RNA

Nach der Stimulation der Mastzellen mit unterschiedlichen Agenzien, wurde der Anteil der freigesetzten RNA, wie unter 2.6 beschrieben, quantifiziert. Durch die verwendeten Stimulanzen Ionomycin, C48/80 und Fc ϵ R1 wurden die Mastzellen nicht nur zu Degranulation angeregt, sondern auch die Freisetzung von RNA induziert (Abb. 21). Im

3. Ergebnisse

Vergleich zur Kontrolle wurden im Durchschnitt ca. 97% der RNA im Gesamt-Überstand freigesetzt.

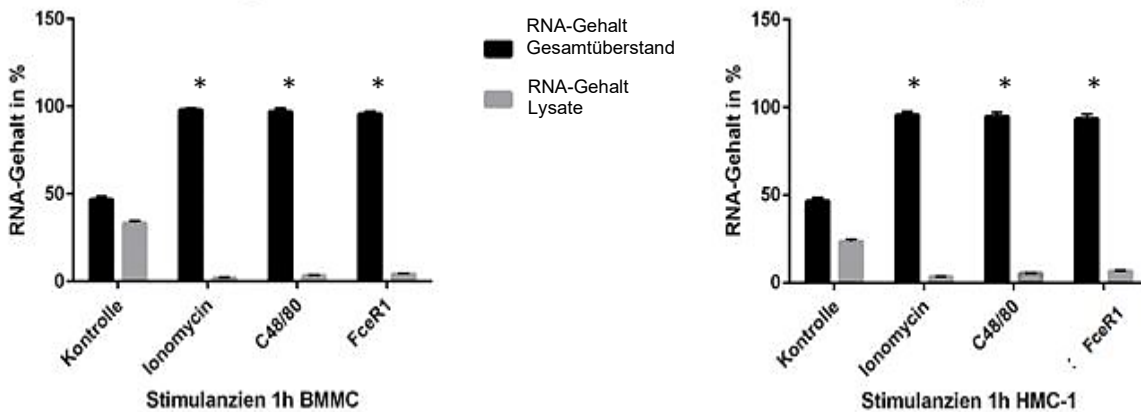


Abbildung 21: Vergleich zwischen der freigesetzten RNA-Menge im Gesamtüberstand und den Lysaten. Dargestellt ist der freigesetzte RNA-Gehalt nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors C48/80 (10 μ g/ml) und des IgE-Rezeptors Fc ϵ R1 (1 μ g/ml) im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen. Der RNA-Gehalt wurde zum einen im gesamten Überstand und zum anderen in den Lysaten gemessen. Dabei werden sowohl murine als auch humane Mastzellen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3, wobei 100% 460 ng/ml RNA entsprechen (p \leq 0,05 gegenüber der Kontrolle).

Anschließend wurde untersucht in welcher Fraktion der größte Anteil der RNA lokalisiert ist. Es zeigte sich, dass die RNA hauptsächlich (ca. 94%) in den Mikropartikeln vorkam (siehe Abb. 22). Nachfolgend wird daher nur die in den Mikropartikeln gemessene RNA-Menge dargestellt.

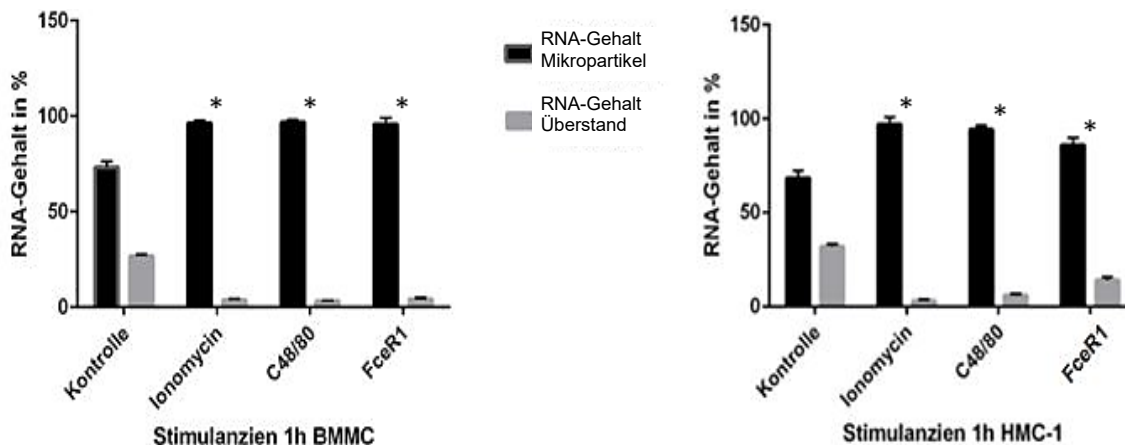


Abbildung 22: Vergleich zwischen der freigesetzten RNA-Menge in den Mikropartikeln und dem restlichen Überstand. Dargestellt ist der freigesetzte RNA-Gehalt nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors C48/80 (10 μ g/ml) und des IgE-Rezeptors Fc ϵ R1 (1 μ g/ml) im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen. Der RNA-Gehalt wurde zum einen in der Mikropartikelfraktion und zum anderen im restlichen Überstand gemessen. Dabei werden sowohl murine als auch humane Mastzellen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei n = 3 wobei 100% 423 ng/ml RNA entsprechen (p \leq 0,05 gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.2.2.4.2 RNA-Gehalt in Mikropartikeln

Abbildung 23 zeigt den RNA-Gehalt der Mikropartikel, der von aktivierten Mastzellen im Vergleich zu nicht aktivierten freigesetzt wurde.

Es ist eine Korrelation zwischen der über Histamin und β -Hexosaminidase gemessenen Degranulationsstärke und der freigesetzten RNA-Menge ersichtlich (siehe Abb. 23). Die Stimulation durch Ionomycin führte nicht nur zu einer stärkeren Degranulation als die Stimulation mit C48/80 und Fc ϵ R1, sondern mündete auch in einer stärkeren RNA-Freisetzung.

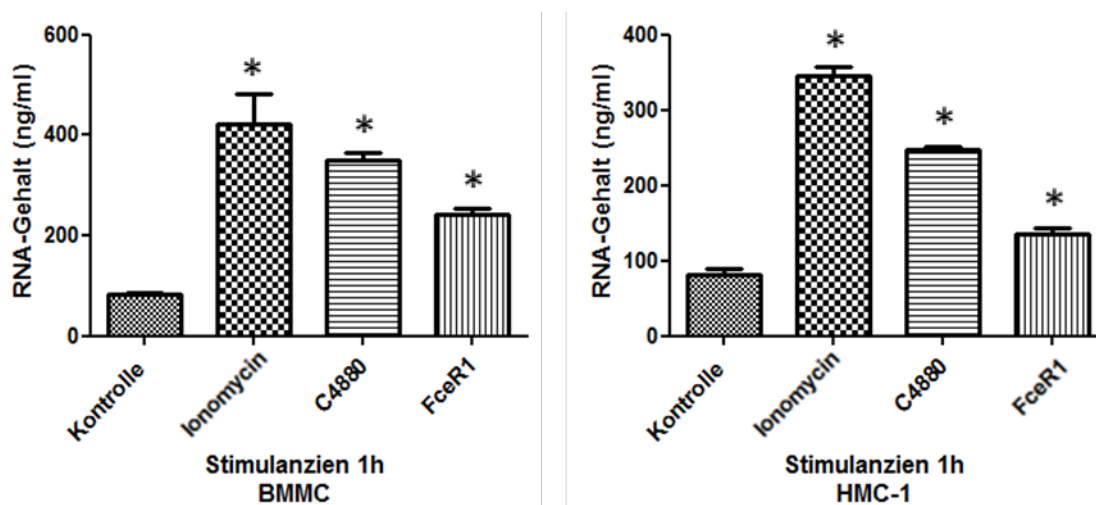


Abbildung 23: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M), dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors C48/80 (10 μ g/ml) und des IgE-Rezeptors Fc ϵ R1 (1 μ g/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des RNA-Gehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei n= 3 ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.2.3 Aktivierung von Mastzellen durch Komplementfaktoren

Eine weitere Möglichkeit der Mastzellaktivierung stellen C3a und C5a dar, die durch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die Freisetzung der intrazellulären Mediatoren induzieren (54) (208) (209) (210).

Dies geschieht nach M. K. Church vermutlich durch eine Verstärkung der IgE-vermittelten Mediatorfreisetzung (211). Auch für diesen Signalweg wurde der Zusammenhang zwischen der Stärke der ausgelösten Mastzelldegranulation und der freigesetzten RNA-Menge näher betrachtet.

3.2.3.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Murine und humane Mastzellen reagierten auf eine einstündige Stimulation durch die Komplementfaktoren C3a und C5a mit einer Degranulation.

Wie Abbildung 24 zeigt, ergab sich im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen eine deutlich gesteigerte Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase. Dabei stimulierte der

3. Ergebnisse

Komplementfaktor C3a murine und auch humane Mastzellen stärker als der Komplementfaktor C5a. Die unterschiedlich starke Aktivierung durch die

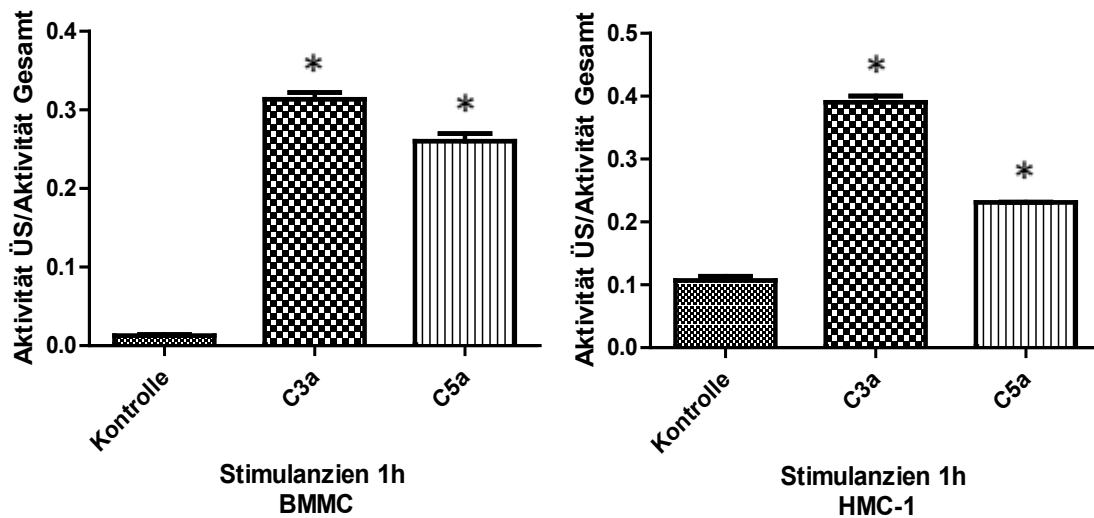


Abbildung 24: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation mit den Aktivatoren des Komplementsystems C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml). Dargestellt ist das Verhältnis der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

Komplementfaktoren C3a und C5a war bei den humanen Mastzellen stärker ausgeprägt. Humane Mastzellen wurden insgesamt besser durch den Komplementfaktor C3a aktiviert.

3.2.3.2 Histaminfreisetzung

Die Komplementaktivierung durch C3a und C5a induzierte auch einen starken Anstieg der Histaminfreisetzung, wie Abbildung 25 zeigt. Während die Histaminfreisetzung der murinen Mastzellen nahezu identisch war, ist die Histaminfreisetzung der murinen Mastzellen durch C5a stärker.

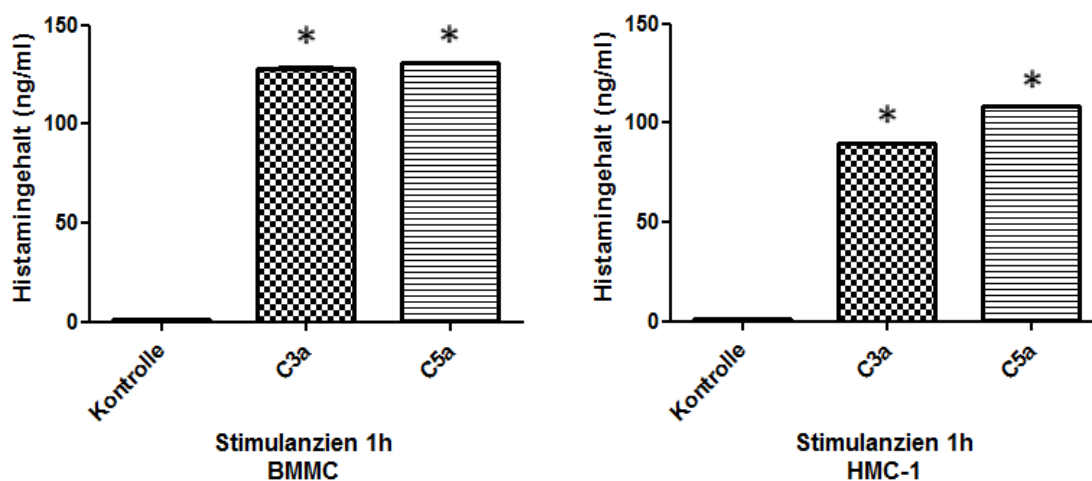


Abbildung 25: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation mit den Aktivatoren des Komplementsystems C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.2.3.3 RNA-Freisetzung

Abbildung 26 zeigt, dass durch die Aktivatoren des Komplementsystems C3a und C5a ebenfalls eine deutliche RNA-Freisetzung induziert wurde.

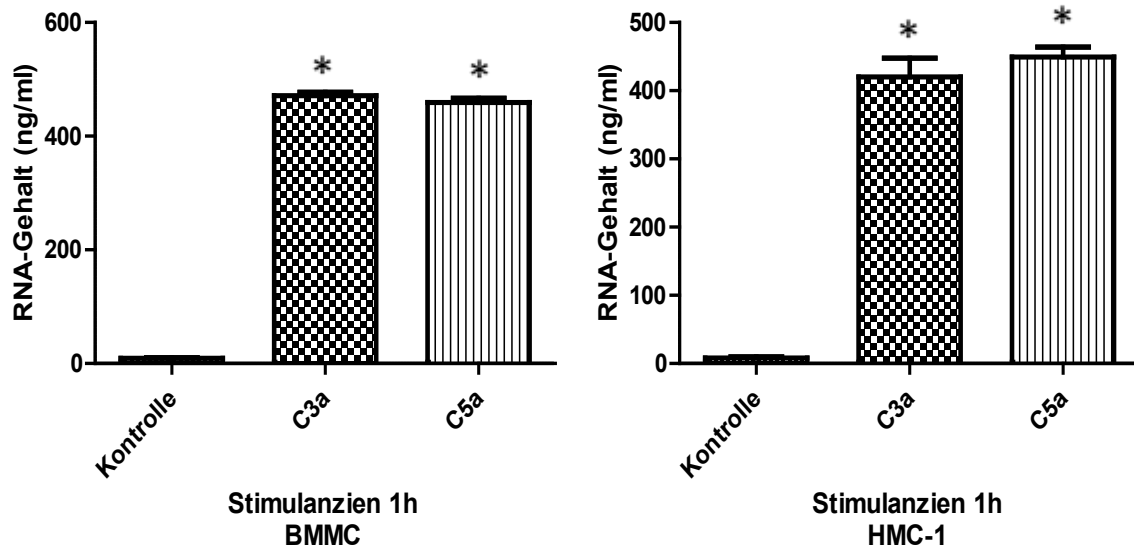


Abbildung 26: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation mit den Aktivatoren des Komplementsystems C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des RNA-Gehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

Im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen wurde eine deutlich erhöhte RNA-Menge aus den murinen und humanen Mastzellen freigesetzt.

Bezogen auf die ebenso deutliche Freisetzung von β -Hexosaminidase und Histamin durch die Stimulanzen C3a und C5a ist ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Mastzelldegranulation und der freigesetzten RNA-Menge wahrscheinlich.

3.2.4 Aktivierung der Mastzellen über Toll-like-Rezeptoren

Wie in Kapitel 1.2.6.2 beschrieben, gibt es je nach Spezies der Mastzelle ein unterschiedliches Repertoire an TLR auf ihrer Oberfläche. Im Rahmen der nachfolgenden Versuche wurden einige der auf murinen und humanen Mastzellen vorhandenen TLR mit entsprechenden Stimulanzen aktiviert. Dann wurden die Auswirkungen auf die Degranulation und die Freisetzung von RNA untersucht. Dabei wurde folgende TLR-Agonisten verwendet:

- PolyIC als Agonist für TLR 3,
- LPS als Agonist für TLR 4,
- R848 und CLO 75 als Agonisten für TLR 7 und
- CLO 75 als Agonist für TLR 8 (bei humanen Mastzellen).

3. Ergebnisse

3.2.4.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Wie bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte, kann die Degranulation von Mastzellen auch durch die Aktivierung von TLR-Rezeptoren eingeleitet werden. Die Mechanismen, die hinter dieser Degranulationskaskade stehen, sowie die Einflussfaktoren auf die Kaskade sind noch weitestgehend unerforscht (88) (96).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass durch Agonisten der TLR-Rezeptoren wie CLO 75, R848, LPS und PolyIC eine Degranulation der murinen und humanen Mastzellen induziert werden kann (siehe Abb. 27).

Die Aktivierung der Mastzelle über TLR wiesen eindeutige Unterschiede bezüglich der Stärke der ausgelösten Degranulation auf. TLR 3 und TLR 4, aktiviert über PolyIC und LPS, zeigten eine deutlich geringere Auswirkung auf die Mastzellen als beispielsweise die Aktivierung von TLR 7 mittels R848 oder CLO 75. Trotzdem ist die durch LPS ausgelöste Degranulation stärker als die durch PolyIC ausgelöste Mastzelldegranulation.

Es ist bekannt, dass Mastzellen auf den Bestandteil LPS, der in der Bakterienwand vorkommt, nicht nur mit einer Degranulation, sondern auch über transkriptionelle Aktivierung reagieren. Die dadurch induzierte Produktion von proinflammatorischem TNF, IFN- β und IL-6 aktiviert weitere Entzündungszellen (64) (88) (90).

Hierdurch könnte sich die, in Abbildung 27 gezeigte, stärkere Degranulation im Vergleich zu PolyIC erklären lassen.

Der TLR-Agonist CLO 75 aktiviert bei humanen Mastzellen zusätzlich TLR 8 (96). Dies zeigte sich in einer vermehrten Hexosaminidaseaktivität.

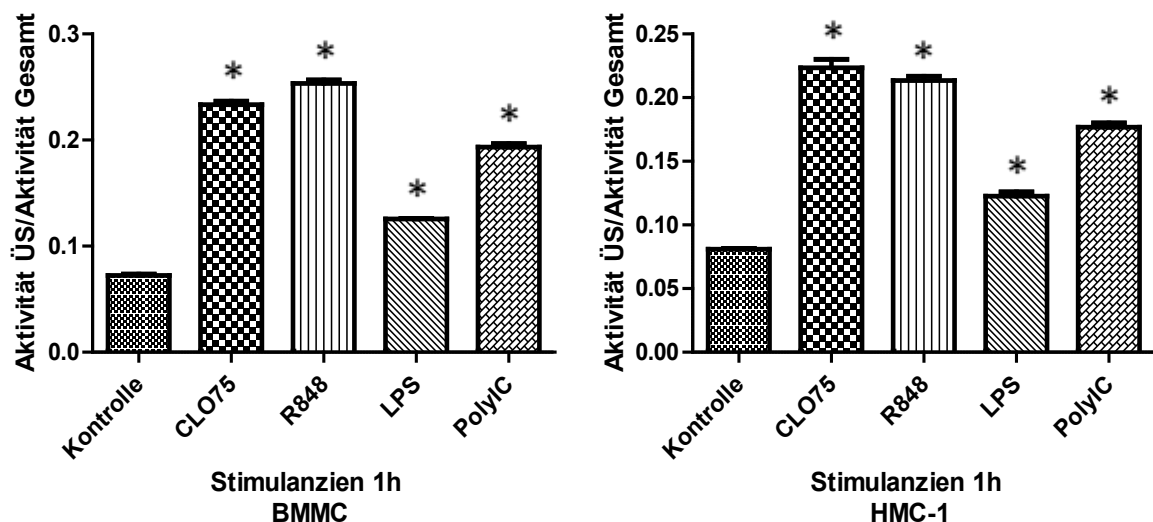


Abbildung 27: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation mit den Agonisten des TLR 7 CLO 75 (5 μ g/ml) und R848 (1 μ g/ml), den Agonisten des TLR 4 LPS (1 μ g/ml) und des TLR 3 PolyIC (5 μ g/ml). Dargestellt ist das Verhältnis zwischen der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.2.4.2 Histaminfreisetzung

Abbildung 28 zeigt, dass durch Aktivierung von TLR durch CLO 75, R848, LPS sowie PolyIC und die damit verbunden Degranulation auch eine vermehrte Histaminfreisetzung nachweisbar war.

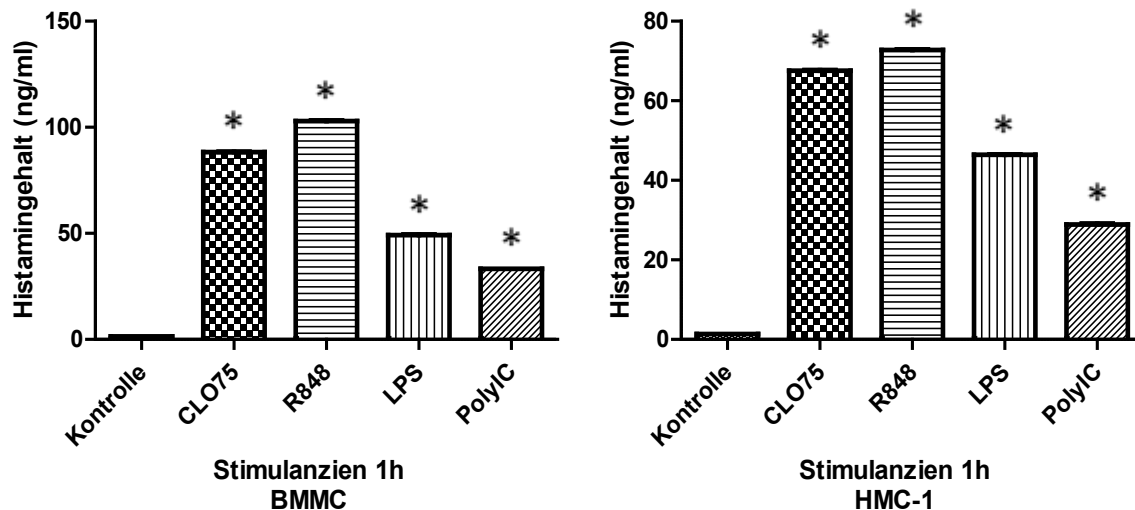


Abbildung 28: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation mit den Agonisten des TLR 7 CLO 75 (5 µg/ml) und R848 (1 µg/ml), den Agonisten des TLR 4 LPS (1 µg/ml) und des TLR 3 PolyIC (5 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) ± Standardabweichung bei n= 3 (p ≤ 0,05 gegenüber der Kontrolle).

Bei murinen und humanen Mastzellen gab es eindeutige Parallelen zwischen der Histaminfreisetzung und der Hexosaminidasefreisetzung.

Trotz der endosomalen Expression zeigten die Mastzellen bei Aktivierung von TLR 7 und TLR 8 durch die TLR-Agonisten R848 und CLO 75 eine Degranulation. Die TLR-Agonisten sind membrangängig und können daher die Mastzelle aktivieren. Die bereits über das Enzym β-Hexosaminidase nachgewiesene stärkere Degranulation konnte auch durch die Histaminfreisetzung bestätigt werden.

Sowohl bei murinen als auch bei humanen Mastzellen zeigte sich eine deutlich geringere Histaminfreisetzung nach Stimulation mit den TLR-Agonisten LPS und PolyIC. Wobei PolyIC, welches zu einer stärkeren Freisetzung des Enzyms β-Hexosaminidase führte, eine schwächere Histaminfreisetzung induzierte.

3.2.4.3 RNA-Freisetzung

Auch der RNA-Gehalt der Mikropartikel zeigte eine Abhängigkeit von der vorausgegangenen Mastzellaktivierung. Dies ist in Abbildung 29 ersichtlich.

LPS oder PolyIC, die nachweislich zu einer geringeren Degranulation führten, zeigten auch eine geringere RNA-Freisetzung.

3. Ergebnisse

Im Vergleich von murinen und humanen Mastzellen fiel auf, dass humane Mastzellen trotz einer etwas schwächeren Histaminfreisetzung bei Aktivierung von TLR 7 durch R848 eine deutlich stärkere RNA-Freisetzung zeigten. Vermutlich spielen hier noch unbekannte Interaktionen zwischen TLR eine Rolle. CLO 75, ein weiterer TLR 7 Agonist, zeigte dies Auffälligkeit nicht.

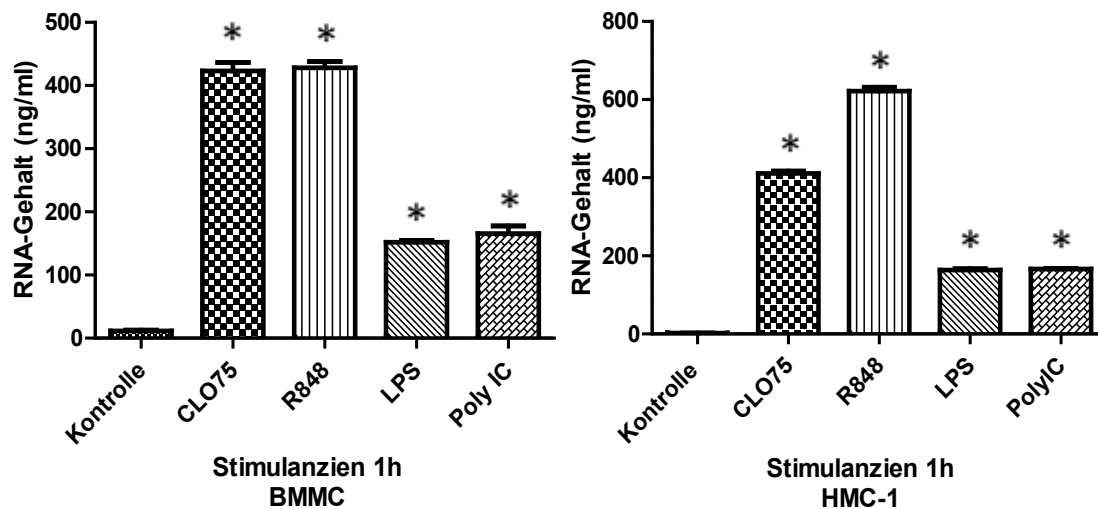


Abbildung 29: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation mit den Agonisten des TLR 7 CLO 75 (5 µg/ml) und R848 (1 µg/ml), den Agonisten des TLR 4 LPS (1 µg/ml) und des TLR 3 PolyIC (5 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des RNA-Gehaltes (ng/ml) ± Standardabweichung bei n= 3 (p ≤ 0,05 gegenüber der Kontrolle).

3.2.5 Aktivierung der Mastzellen unter Hypoxie Bedingungen

3.2.5.1 β-Hexosaminidase-Aktivität

Hypoxie wurde ebenfalls als starker Induktor der Mastzellaktivierung beschrieben. Der Sauerstoffmangel stellt eine Stressreaktion für den Körper dar (173).

Die Auswirkungen von Hypoxie auf die Degranulierung der Mastzelle wurde in den nachfolgenden Versuchen näher untersucht.

Abbildung 30 zeigt die Auswirkungen von Hypoxie auf murine Mastzellen nach 1, 12, 24 und 36 Stunden. Die von den Mastzellen freigesetzte RNA-Menge wurde dabei mit der Anzahl der lebenden Mastzellen in Abhängigkeit von der Zeit verglichen.

Zwar stieg die freigesetzte RNA-Menge an, je länger die Mastzellen der Hypoxie ausgesetzt waren, aber die Abnahme der Zellzahl zeigte, dass eine länger als 24 Stunden andauernde Hypoxie zur Zerstörung der murinen Mastzellen führt.

Die nachfolgenden Versuche wurden daher mit einer Hypoxiezeit von 24 Stunden durchgeführt, um die Mediatorfreisetzung durch Degranulation sicherzustellen und eine Freisetzung durch Zerstörung der Mastzellen auszuschließen.

3. Ergebnisse

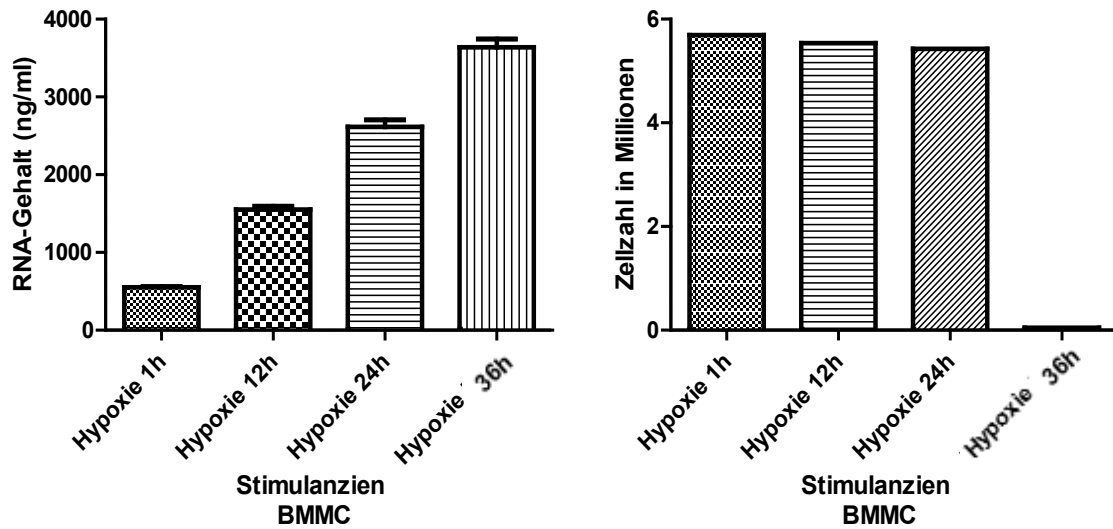


Abbildung 30: Zeitabhängigkeit der Hypoxie. Die linke Graphik zeigt die ansteigende RNA-Freisetzung in Abhängigkeit von der Zeit. Die rechte Graphik verdeutlicht die Entwicklung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit. Eine Hypoxie über 24 Stunden wirkt toxisch auf

Wie Abbildung 31 zeigt, ergab sich eine besonders starke Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase unter Hypoxie-Bedingungen.

Hinsichtlich der beiden Mastzellarten gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der freigesetzten β -Hexosaminidase-Menge.

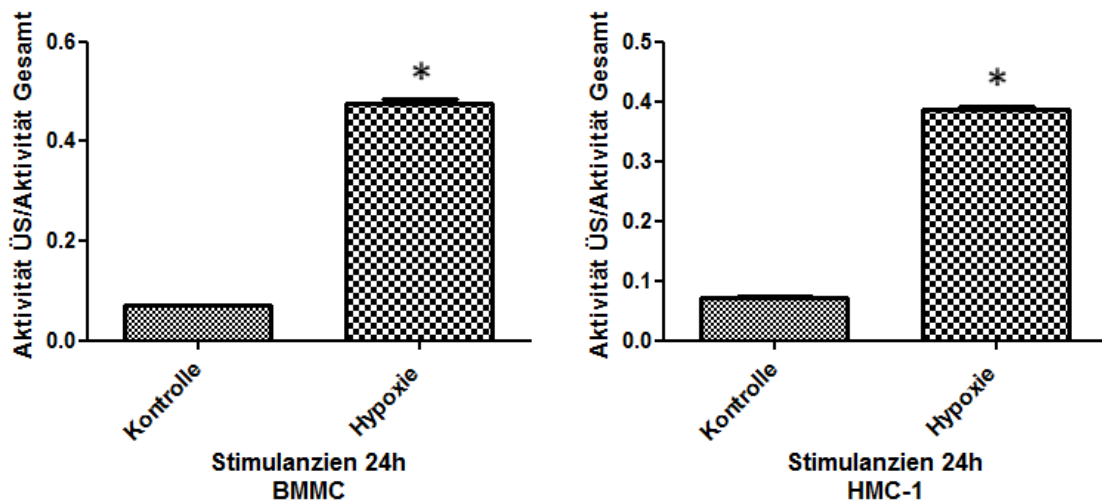


Abbildung 31: Hexosaminidaseaktivität nach 24 stündiger Hypoxie. Dargestellt ist das Verhältnis der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.2.5.2 Histaminfreisetzung

Unter Hypoxie-Bedingungen setzten Mastzellen nicht nur eine größere Menge des Enzyms β -Hexosaminidase frei. Abbildung 32 zeigt, dass der Sauerstoffmangel ebenfalls eine starke Histaminfreisetzung aus den Mastzellen induziert.

Die Histaminfreisetzung von murinen und humanen Mastzellen während einer 24-stündigen Hypoxiephase zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Mastzellarten (siehe Abb. 32).

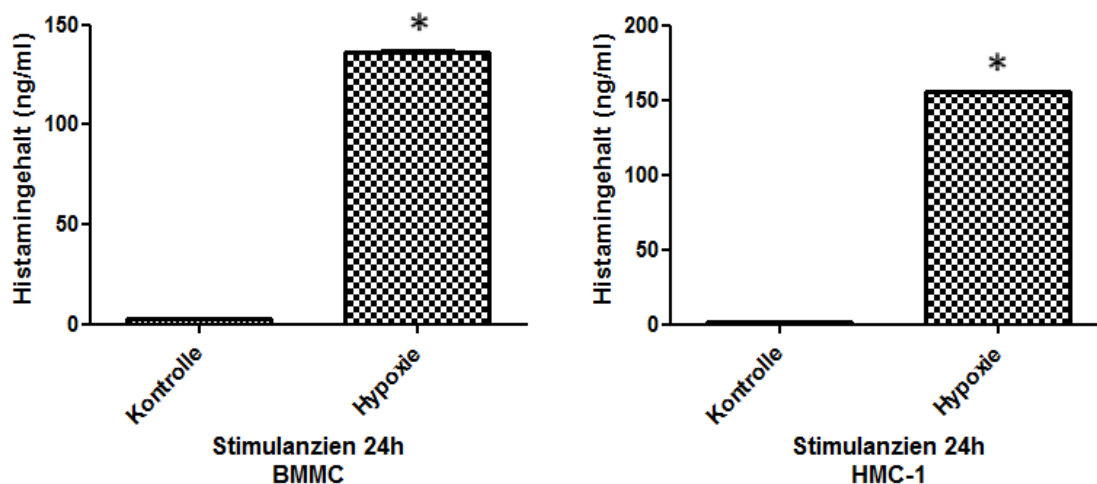


Abbildung 32: Freisetzung von Histamin nach 24 stündiger Hypoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.2.5.3 RNA-Freisetzung

Wie in den Kapiteln 3.2.5.1 und 3.2.5.2 dargestellt, reagierten murine und humane Mastzellen deutlich auf einen 24-stündigen Sauerstoffentzug. Sowohl die β -Hexosaminidase-Freisetzung, als auch die Histamin-Freisetzung stieg stark an. Dabei war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Mastzellart zu erkennen.

Mit Hilfe der nachfolgenden Versuche sollte überprüft werden, ob diese Tatsache sich auch in der freigesetzten RNA-Menge widerspiegelt. Abbildung 33 zeigt, dass die aus den Mastzellen freigesetzte RNA-Menge ebenso deutlich anstieg. Auch hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen murinen und humanen Mastzellen.

Im Vergleich zu den zuvor durchgeführten Mastzellstimulationen mit den bereits beschriebenen Stimulanzien, konnte durch die 24-stündige Hypoxie eine deutlich gesteigerte RNA-Freisetzung erzielt werden.

3. Ergebnisse

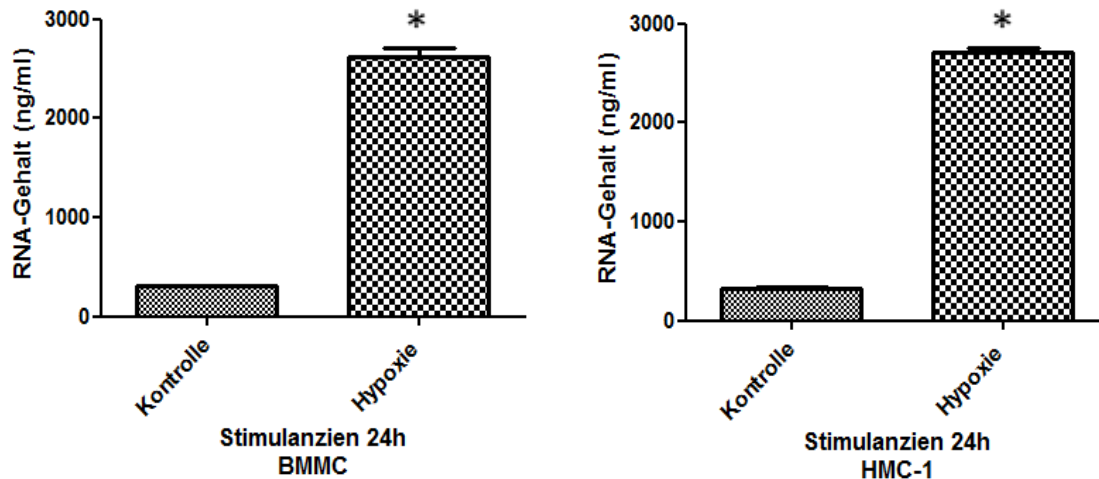


Abbildung 33: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach 24 stündiger Hypoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte des RNA-Gehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.3 Identifizierung der RNA

Um beurteilen zu können, welche RNA-Art Mastzellen freisetzen, wurde die aus den Mikropartikeln muriner Mäuse isolierte RNA mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kit von Agilent Technologies nach Angaben des Herstellers analysiert. Extrazellulär vorkommende RNA lässt sich vor allem im Rahmen von Abwehrprozessen des Körpers nachweisen (131). Wie unter 1.3.3 erläutert, besteht eRNA aus verschiedenen RNA-Arten. Zu ihnen zählen rRNA, lange nicht-codierende RNA, miRNA und mRNA (126) (133). Durch S. Fischer wurde gezeigt, dass sich in Zellüberständen vor allem 28S/18S rRNA als Hauptbestandteil der eRNA findet (134) (135). Für die RNA-Analyse wurde die Fraktion der Mikropartikel von stimulierten Mastzellen verwendet. Die genaue Analyse in Abhängigkeit von den verwendeten Stimulanzen ist in der nachfolgenden Abbildung 34 dargestellt. Die murinen Mastzellen wurden je eine Stunde mit

- dem Ionophor Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$, Abb. 34 A),
- dem Agonisten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors C48/80 ($10 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 B),
- den Aktivatoren des Komplementsystems C3a ($250 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 C) und C5a ($100 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 D) sowie den
- Agonisten von TLR 7 und TLR 8 CLO 75 ($5 \mu\text{g/m}$, Abb. 34 E),
- dem Agonisten von TLR 7 R848 ($1 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 F),
- dem Agonisten von TLR 4 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 G) und
- dem Agonist von TLR 3 PolyIC ($5 \mu\text{g/ml}$, Abb. 34 H) stimuliert.

Auch die nach 24-stündiger Hypoxie freigesetzte RNA-Menge wurde untersucht (siehe

3. Ergebnisse

Abb. 34 I). Die Analyse der RNA in den Mikropartikeln zeigte, dass es sich bei der aus den Mastzellen freigesetzten RNA ebenfalls um ribosomale RNA (28s und 18s ribosomale RNA) handelt.

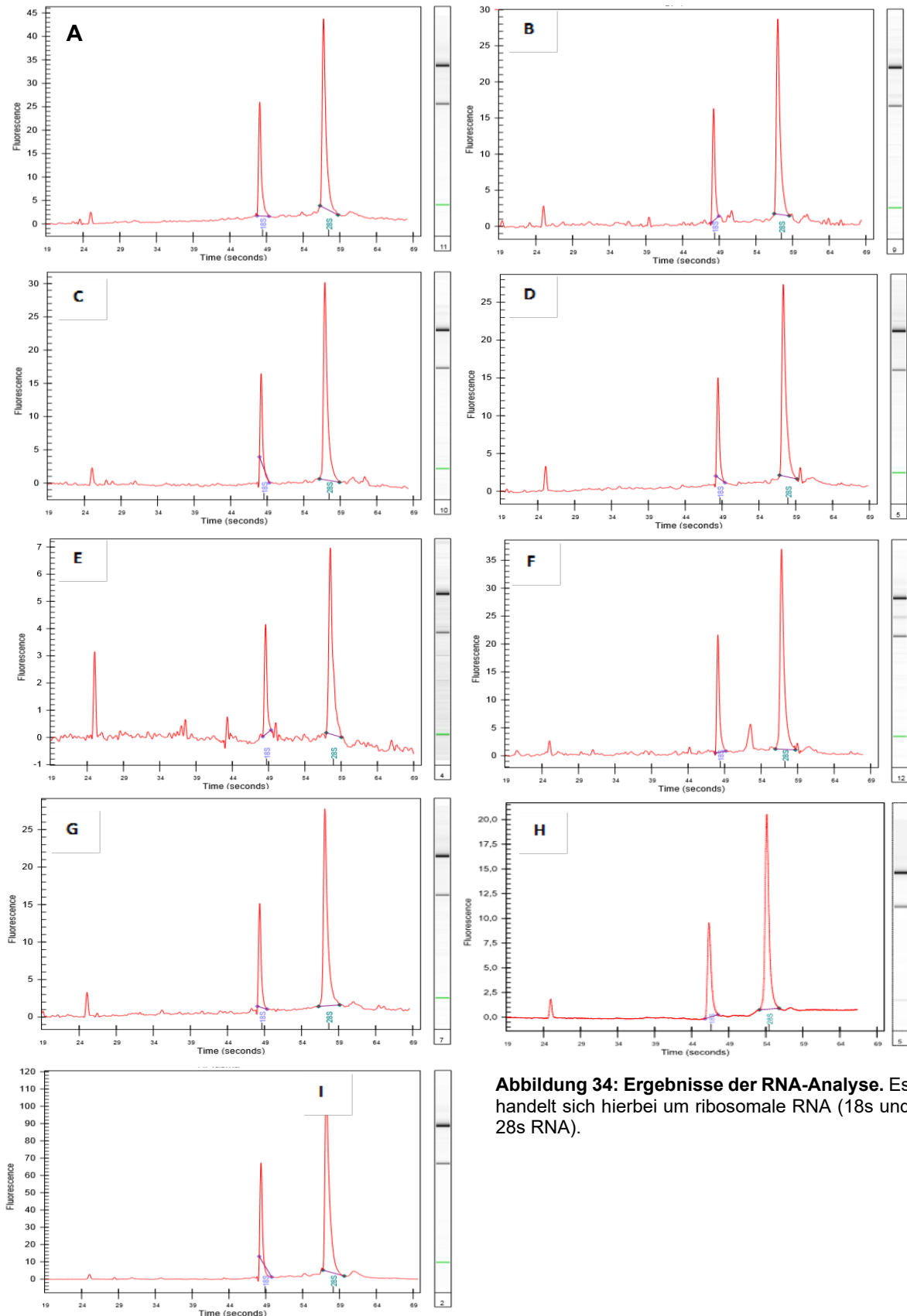


Abbildung 34: Ergebnisse der RNA-Analyse. Es handelt sich hierbei um ribosomale RNA (18s und 28s RNA).

3. Ergebnisse

3.4 Reversibilität der RNA-Freisetzung

Um die Frage zu beantworten, ob eine degranulierte Mastzelle ihre RNA-Speicher auffüllen kann, wurden humane Mastzellen wiederholt stimuliert (siehe Abb. 35). Unter Berücksichtigung der Reproduktionszeit der Mastzellmediatoren wurde zwischen den einzelnen Stimulationen eine Ruhephase von 36 Stunden eingehalten (35).

Es wurde zunächst der RNA-Gehalt von unstimulierten und der RNA-Gehalt von mit Ionomycin stimulierten (Stimulationsdauer eine Stunde) Mastzellen bestimmt. Anschließend ruhten die Zellen erneut für 36 Stunden, bevor sowohl die unstimulierten als auch die stimulierten Mastzellen ein weiteres Mal mit Ionomycin stimuliert wurden.

Es zeigte sich, dass die freigesetzte RNA-Menge nahezu unabhängig von der vorangehenden Stimulation war. Ein Vergleich der RNA-Freisetzung nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin mit der RNA-Freisetzung von unstimulierten und in normalem Kulturmedium wachsenden Mastzellen, ergab keine Beeinflussung der freigesetzten RNA-Menge. Nachdem die Zellen ein zweites Mal mit Ionomycin (ebenfalls für eine Stunde) stimuliert wurden, setzten sie noch eine, mit der Freisetzung von unstimulierten Zellen, vergleichbare Menge an eRNA frei.

Mastzellen sind nicht nur in der Lage die gespeicherten Degranulationsprodukte wie Zytokine oder Lipidmediatoren nach der Freisetzung neu zu bilden, sie können ebenso die im Zuge der Degranulation entleerten RNA-Speicher auffüllen.

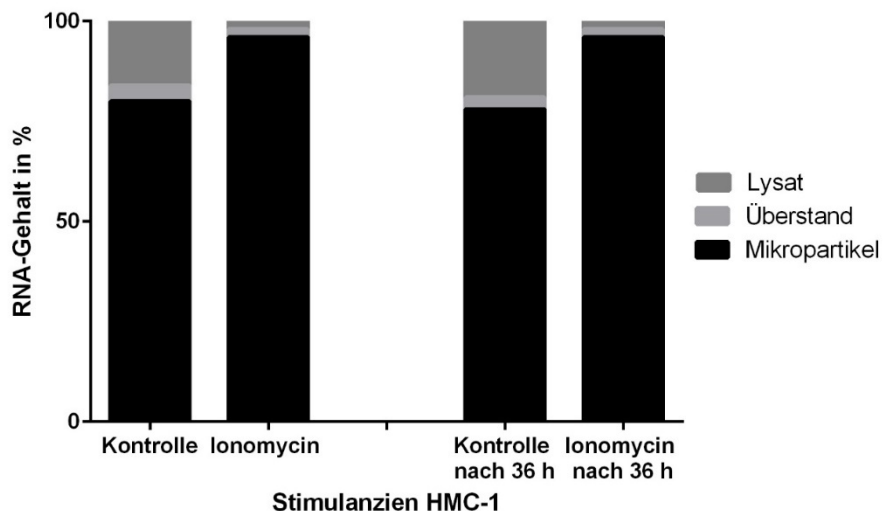


Abbildung 35: Darstellung der Reversibilität der RNA-Freisetzung nach vorangegangener Stimulation. Die Abbildung zeigt, dass auch nach erneuter Stimulation der humanen Mastzellen (nach 36h) mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M) die Verteilung der freigesetzten RNA-Menge nahezu konstant blieb. Der Großteil der RNA befand sich weiterhin in den Mikropartikeln. Beim Vergleich der unstimulierten mit den stimulierten Zellen war ersichtlich, dass durch die Stimulation ein Teil der RNA aus den Lysaten in die Mikropartikel verlagert wurde. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der freigesetzten RNA-Menge als Mittelwerte bei n= 3.

3. Ergebnisse

3.5 Hemmung der Degranulation und der RNA-Freisetzung

Um zu kontrollieren, ob die nachgewiesene RNA gleichzeitig mit anderen Mastzellmediatoren freigesetzt wird, wurde versuchsweise die Freisetzung dieser Mediatoren gehemmt. Durch diese Versuche sollte genauer untersucht werden, ob die nachgewiesene RNA im Zuge des Degranulationsprozesses freigesetzt wird. Hierzu wurden die Mastzellstabilisatoren Cromolyn und Wortmannin verwendet. Nach Burgis ist Cromolyn vermutlich durch die Blockade von Chlorid Kanälen in der Lage, die Membran der Mastzellen zu stabilisieren und somit die Freisetzung von Mediatoren zu verhindern (212). Wortmannin kann durch Inhibition der PI_3K ebenfalls in die degranulationsauslösende Signalkaskade eingreifen (213).

Zusätzlich wurde durch den Calcium-Chelator BAPTA die Freisetzung der Mastzellmediatoren aus den Granula verhindert (214).

Nach Behandlung der murinen und humanen Mastzellen mit diesen Stabilisatoren beziehungsweise dem Calcium-Chelator BAPTA und anschließender Stimulation wurde zum einen über das Enzym β -Hexosaminidase und zum anderen über die freigesetzte Histaminmenge kontrolliert, ob die Degranulation effizient verhindert werden konnte. Anschließend wurde der RNA-Gehalt bestimmt und so kontrolliert, ob auch die Freisetzung von RNA unterbunden wurde.

3.5.1 Hemmung mittels Cromolyn

3.5.1.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Um die Unterdrückung der Degranulation von murinen und humanen Mastzellen zu überprüfen, wurden die Mastzellen nach einer einstündigen Vorbehandlung mit dem Stabilisator Cromolyn durch Ionomycin stimuliert.

Abbildung 36 zeigt den Vergleich der β -Hexosaminidasefreisetzung von stimulierten und gehemmten Mastzellen. Durch eine Vorbehandlung mit dem Mastzellstabilisator Cromolyn konnte die freigesetzte Menge des Enzyms β -Hexosaminidase deutlich reduziert werden. Der Mastzellstabilisator selbst löste dabei keine Aktivierung der Mastzellen aus. Ein Vergleich der mit Ionomycin stimulierten Mastzellen mit den zunächst vorbehandelten und im Anschluss stimulierten Mastzellen zeigte eine deutliche Reduktion der Aktivierung. Durch die Vorbehandlung konnte annähernd die Aktivität der unstimulierten Mastzellen erreicht werden. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, funktionierte diese Vorbehandlung mit dem Mastzellstabilisator Cromolyn gleichermaßen bei murinen und humanen Mastzellen.

3. Ergebnisse

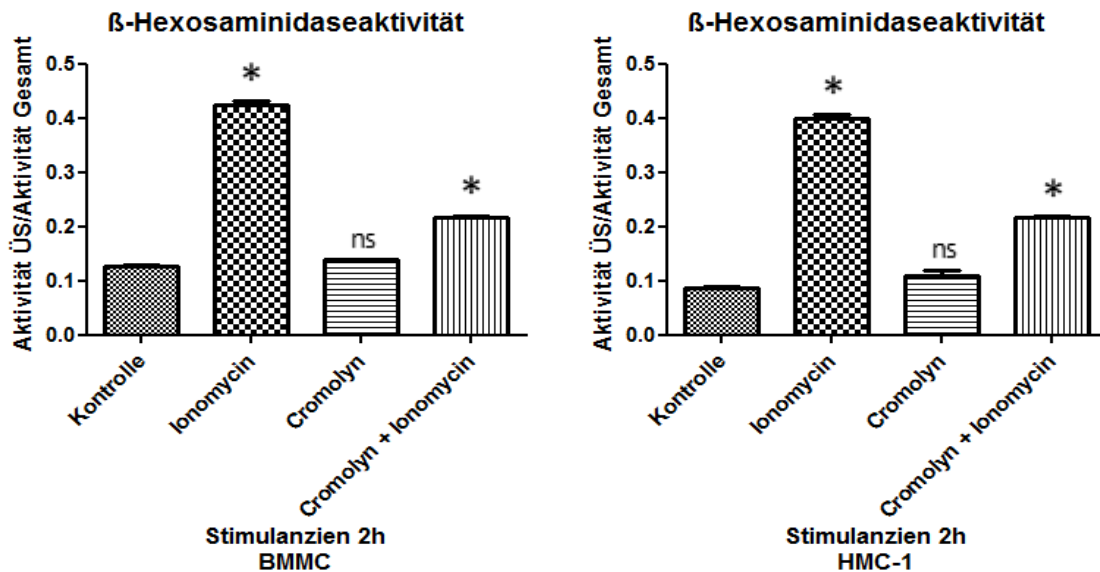


Abbildung 36: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M) und dem Mastzellstabilisator Cromolyn (10 μ g/ml). Dargestellt ist das Verhältnis der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.5.1.2 Histaminfreisetzung

Wie Abbildung 37 zeigt, wurden gleiche Ergebnisse bei Kontrolle der Degranulation mittels Messung der Histaminfreisetzung erzielt. Auch in diesem Fall zeigte sich eine eindeutige Reduktion der Histaminfreisetzung, wenn vor der Stimulation der Mastzellstabilisator Cromolyn verwendet wurde.

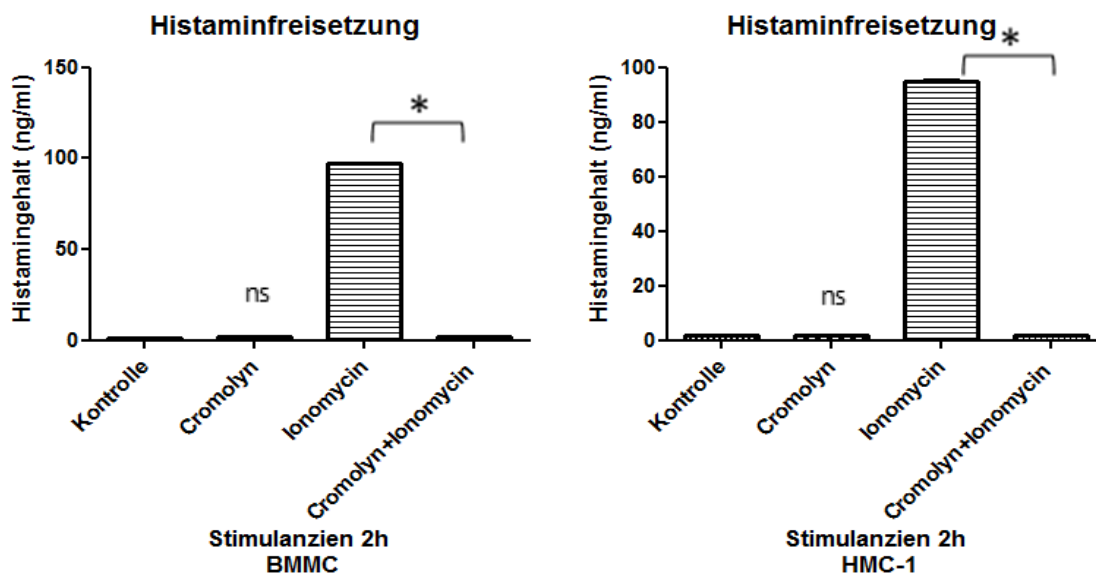


Abbildung 37: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließend einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M) und dem Mastzellstabilisator Cromolyn (10 μ g/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.5.1.3 RNA-Freisetzung

Da nun eindeutig gezeigt wurde, dass Mastzellstabilisatoren die Freisetzung der Mediatoren unterdrücken, sollte nachfolgend überprüft werden, ob auf diese Weise auch die freigesetzte RNA-Menge reduziert werden kann. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass die RNA im Zuge der Mastzelldegranulation ausgeschüttet wird.

Die Freisetzung der RNA aus murinen und humanen Mastzellen konnte, wie Abbildung 38 zeigt, durch eine einstündige Vorbehandlung mit dem Mastzellstabilisator Cromolyn (10 µg/ml) und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin (1,5 µM) signifikant reduziert werden.

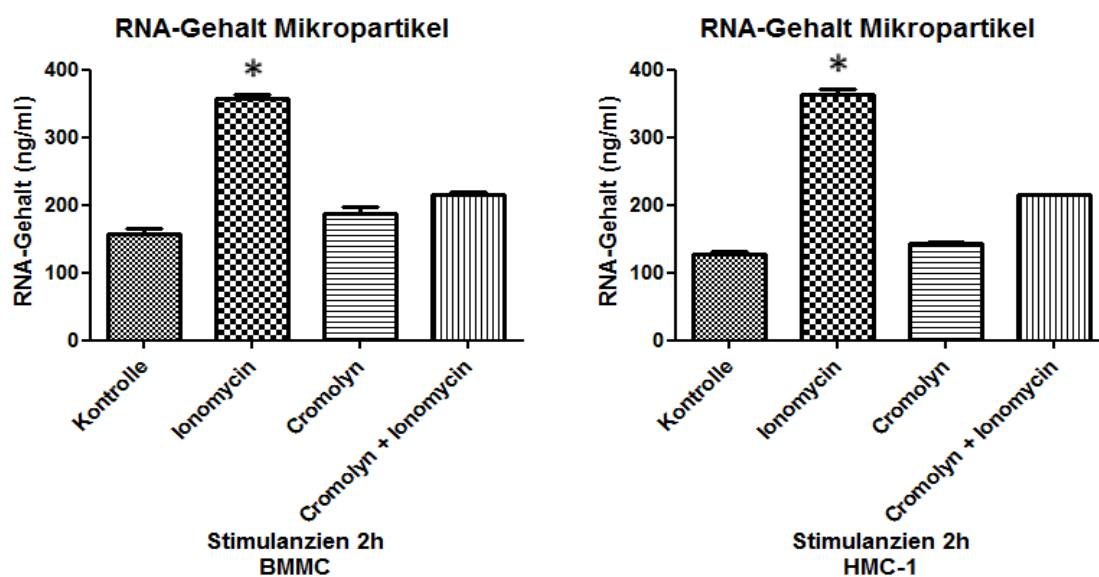


Abbildung 38: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5µM) in Anwesenheit des Mastzellstabilisators Cromolyn (10 µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte des RNA-Gehaltes (ng/ml) ± Standardabweichung bei n=3 ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.5.2 Hemmung mittels Calcium-Chelatierung

3.5.2.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Die über BAPTA induzierte Chelatierung von Calcium unterdrückt die Degranulation (214). Ebenso wie bei Verwendung des vorangegangenen Hemmstoffes war dies auch auf die Freisetzung der Mastzellmediatoren übertragbar. Da die Mastzelldegranulation durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration ausgelöst werden kann, wurden die Auswirkungen von BAPTA nicht nur durch Ionomycin sondern auch durch weitere Aktivierungswege der Mastzelle (TLR und Komplementsystem) überprüft (73).

Abbildung 39 A zeigt, dass bei gleichzeitiger Verwendung von dem Ionophor Ionomycin (1,5 µM) und BAPTA (10 mM) die Ausschüttung des Enzyms β -Hexosaminidase

3. Ergebnisse

eindeutig unterdrückt werden konnte. Die Aktivierung der murinen und humanen Mastzellen über Agonisten von TLR 7 und TLR 8 durch R848 (1 µg/ml) und CLO 75 (5 µg/ml) konnte ebenfalls bei gleichzeitiger Verwendung von BAPTA (10 mM) unterdrückt werden (siehe Abb. 39 B). C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml) induzieren als Aktivatoren des Komplementsystems eine Degranulierung von Mastzellen. Abbildung 39 C zeigt, dass nach Vorbehandlung mit BAPTA (10 mM) weder murine noch humane Mastzellen degranulierten.

3.5.2.2 Histaminfreisetzung

Die durch BAPTA induzierte Calciumchelatierung verhindert die Freisetzung von Histamin aus murinen und humanen Mastzellen trotz eines einwirkenden Stimulus. Abbildung 40 A zeigt die reduzierte Histaminfreisetzung bei einstündiger Vorbehandlung mit BAPTA (10 mM) und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 µM). Abbildung 40 B zeigt die Reduktion der Freisetzung von Histamin für die Vorbehandlung mit BAPTA (10 mM) und anschließender einstündiger Stimulation mit den TLR-Agonisten R848 (1 µg/ml) und CLO 75 (5 µg/ml). Auch die Histaminfreisetzung bei gleichzeitiger Verwendung von BAPTA (10 mM) und den Komplementsystemaktivatoren C3a (250 ng/ml) sowie C5a (100 ng/ml) konnte deutlich reduziert werden, wie in Abbildung 40 C ersichtlich ist.

3.5.2.3 RNA-Freisetzung

Durch Messung des RNA-Gehaltes in den Mikropartikeln nach einstündiger Vorbehandlung der Mastzellen mit BAPTA und anschließender einstündiger Stimulation, konnte dargestellt werden, dass BAPTA neben der Mastzelldegranulation auch die RNA-Freisetzung unterdrückt.

In Abbildung 41 A ist der RNA-Gehalt nach Stimulation mit Ionomycin (1,5 µM) im Vergleich zum RNA-Gehalt nach Vorbehandlung mit BAPTA (10 mM) und anschließender Ionomycinstimulation dargestellt. Die Anwesenheit von BAPTA reduziert den freigesetzten RNA-Gehalt deutlich. Dieser ist vergleichbar mit dem RNA-Gehalt von unstimulierten Mastzellen. Abbildung 41 B zeigt, dass auch die RNA-Freisetzung nach Stimulation mit den TLR-Agonisten R848 (1 µg/ml) und CLO 75 (5 µg/ml) durch die Vorbehandlung mit BAPTA (10 mM) nahezu unterdrückt werden kann. Auch durch die Aktivatoren des Komplementsystems C3a (250 ng/ml) und C5a (100 ng/ml) konnte bei Vorbehandlung mit BAPTA nur eine sehr geringe Menge an freigesetzter RNA nachgewiesen werden (Abb. 41 C).

3. Ergebnisse

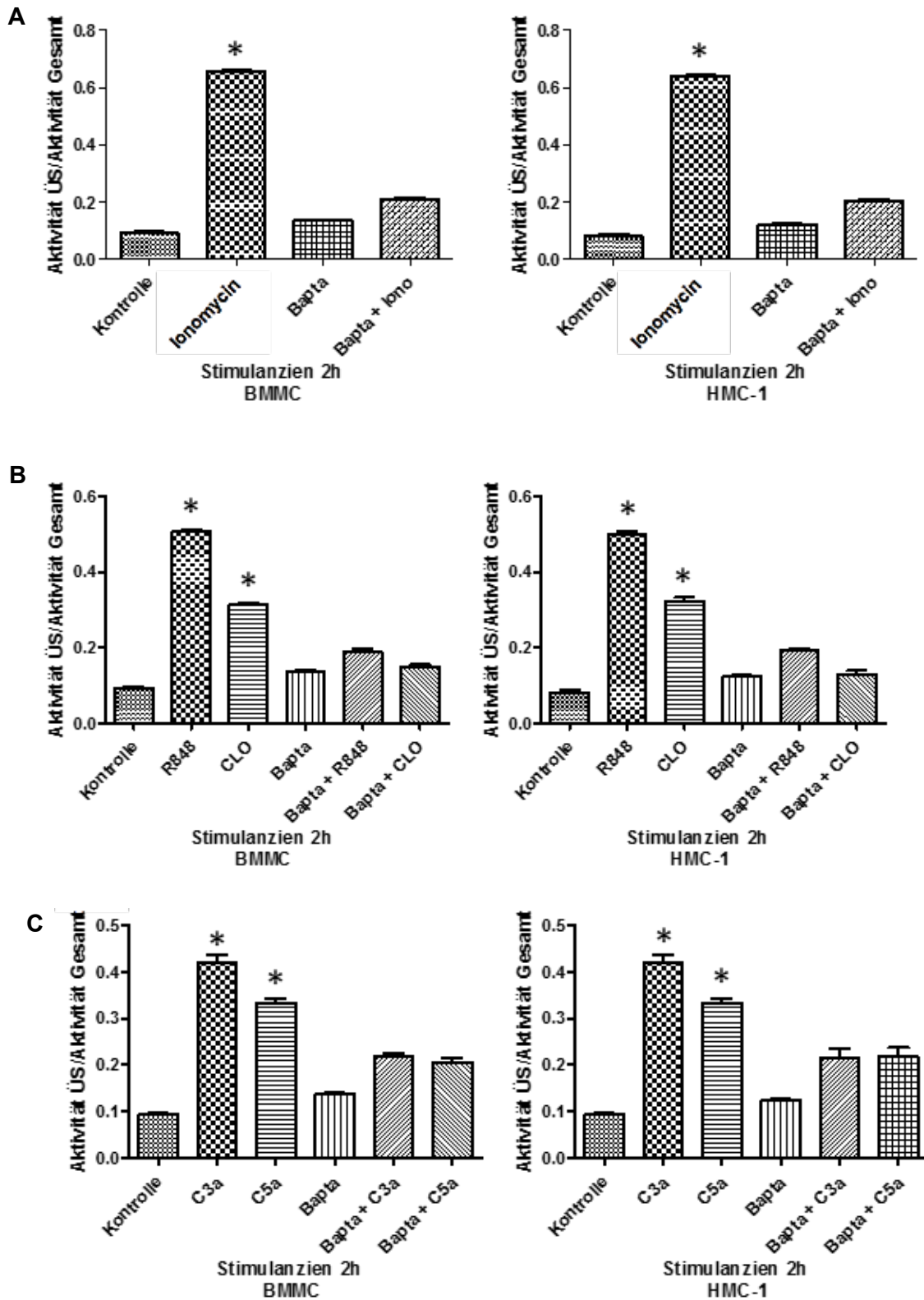


Abbildung 39: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen (A: Ionomycin, B: TLR-Agonisten, C: Komplementsystemaktivatoren) in Gegenwart des Calcium-Chelators BAPTA. Dargestellt ist das Verhältnis zwischen der Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n = 3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

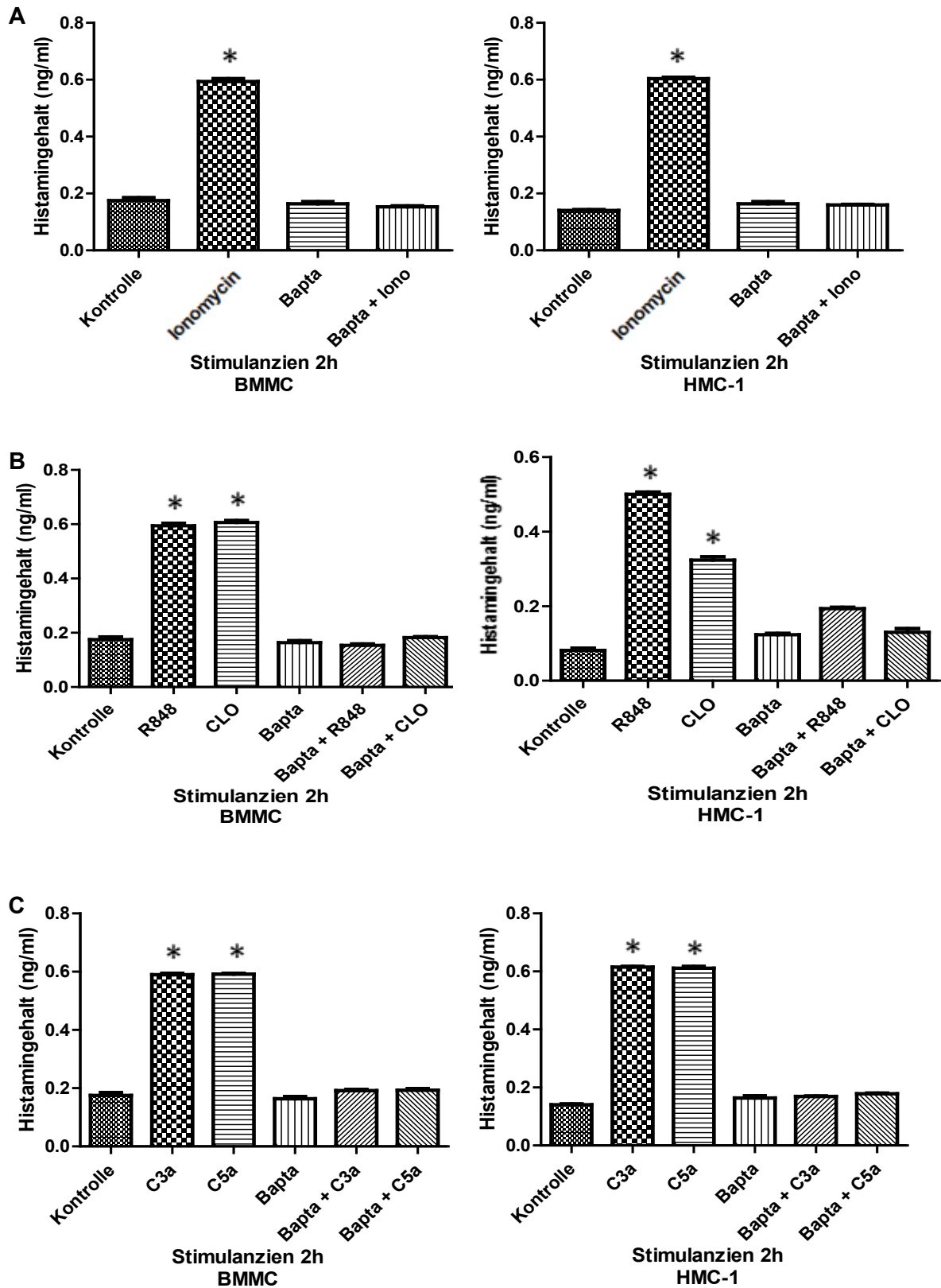


Abbildung 40: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen (A: Ionomycin, B: TLR-Agonisten, C: Komplementsystemaktivatoren) unter Verwendung des Calcium-Chelators BAPTA. Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n = 3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

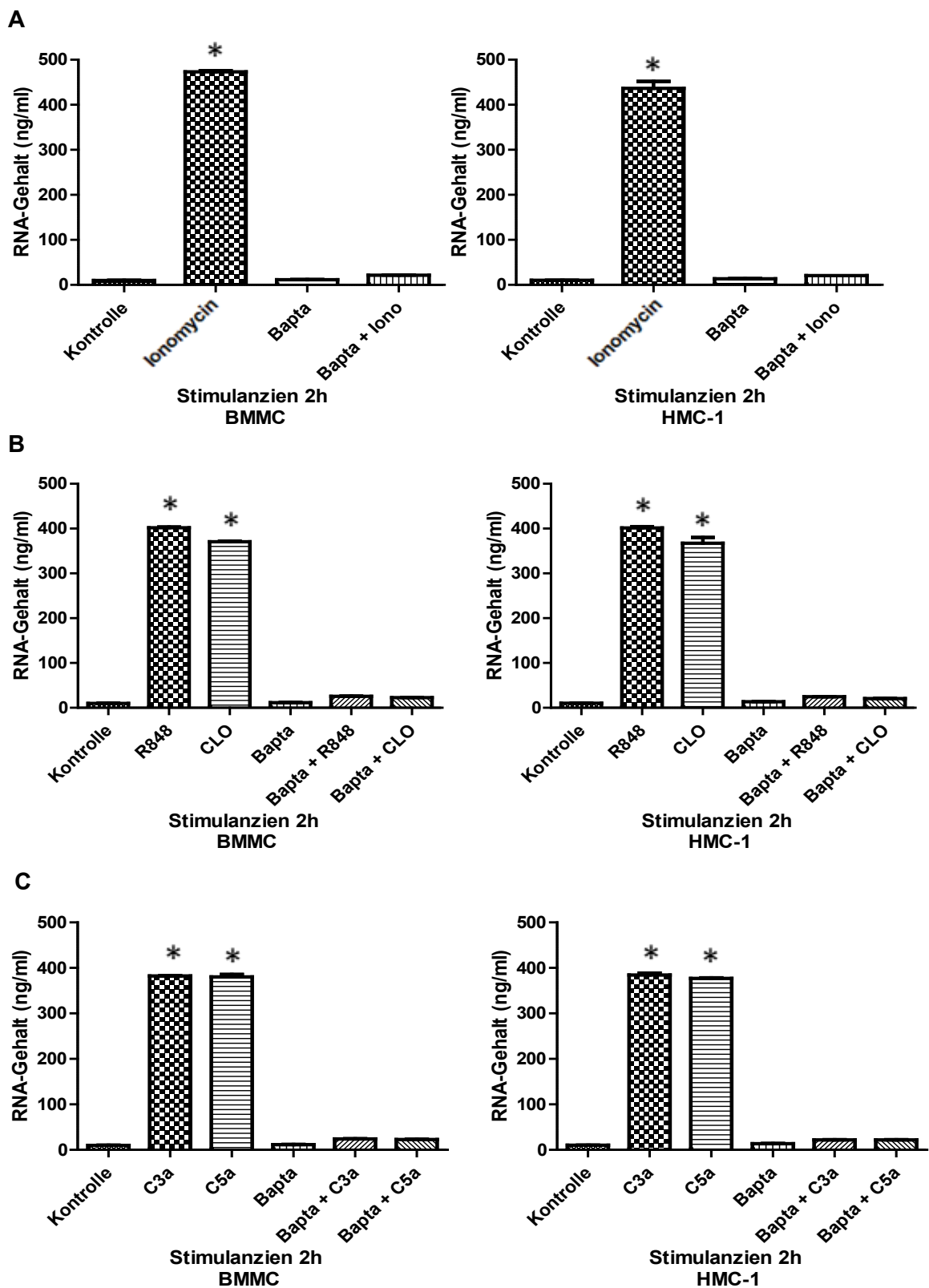


Abbildung 41: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach unterschiedlichen Stimulationen (A: Ionomycin, B: TLR-Agonisten, C: Komplementsystemaktivatoren) in Gegenwart des Calcium-Chelators BAPTA. Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung bei $n = 3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.5.3 Hemmung mittels Wortmannin

3.5.3.1 β -Hexosaminidase-Aktivität

Wortmannin, als Inhibitor der PI₃K (213), war ebenfalls in der Lage die Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase zu unterdrücken. Abbildung 42 zeigt, dass durch Vorbehandlung der murinen und humanen Mastzellen mit Wortmannin (10 μ M) und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin (1,5 μ M) das Ausmaß der Mediatorfreisetzung signifikant herabgesetzt werden konnte.

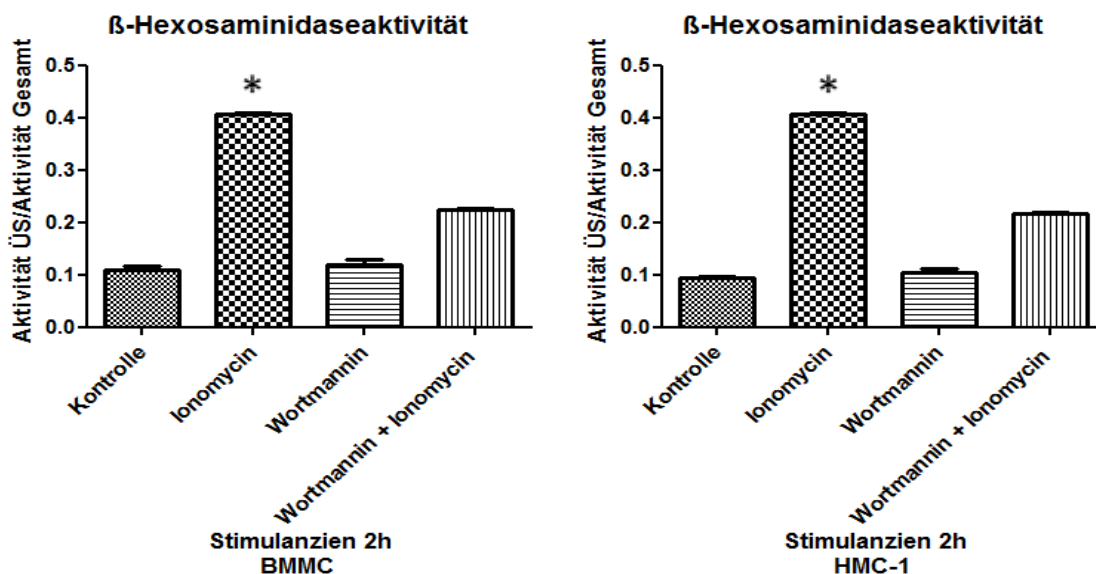


Abbildung 42: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin (1,5 μ M) in Gegenwart des Mastzellstabilisators Wortmannin (10 μ M). Dargestellt ist das Verhältnis zwischen Aktivität des Überstandes und der insgesamt messbaren β -Hexosaminidaseaktivität als Mittelwerte \pm Standardabweichung bei $n=3$ ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3.5.3.2 Histaminfreisetzung

Gleiche Ergebnisse waren bei der Histaminfreisetzung zu beobachten. Auch in diesem Fall hatte die Vorbehandlung mit Wortmannin (10 μ M) und die darauffolgende Stimulation mit Ionomycin (1,5 μ M) eine deutliche Reduktion der Histaminfreisetzung zur Folge. Wie Abbildung 43 zeigt, ist der Effekt des Mastzellstabilisators Wortmannin auf murinen und humanen Mastzellen ähnlich.

3.5.3.3 RNA-Freisetzung

Im folgenden Schritt wurde überprüft, ob die Verwendung von Wortmannin ebenfalls einen Einfluss auf die freigesetzte RNA-Menge hat. Durch die Unterbindung der Mastzelldegranulation konnte, wie auch bereits durch die anderen Inhibitoren der Degranulation gezeigt, die Freisetzung der RNA stark herabgesetzt werden.

3. Ergebnisse

Abbildung 44 zeigt, dass die starke RNA-Freisetzung bei Stimulation der Mastzelle mit Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$) durch eine einstündige Vorbehandlung mit Wortmannin ($10 \mu\text{M}$) eingegrenzt werden kann. Auch durch diesen Mastzellstabilisator ist der so gemessene RNA-Gehalt vergleichbar mit dem RNA-Gehalt unstimulierter muriner und humaner Mastzellen.

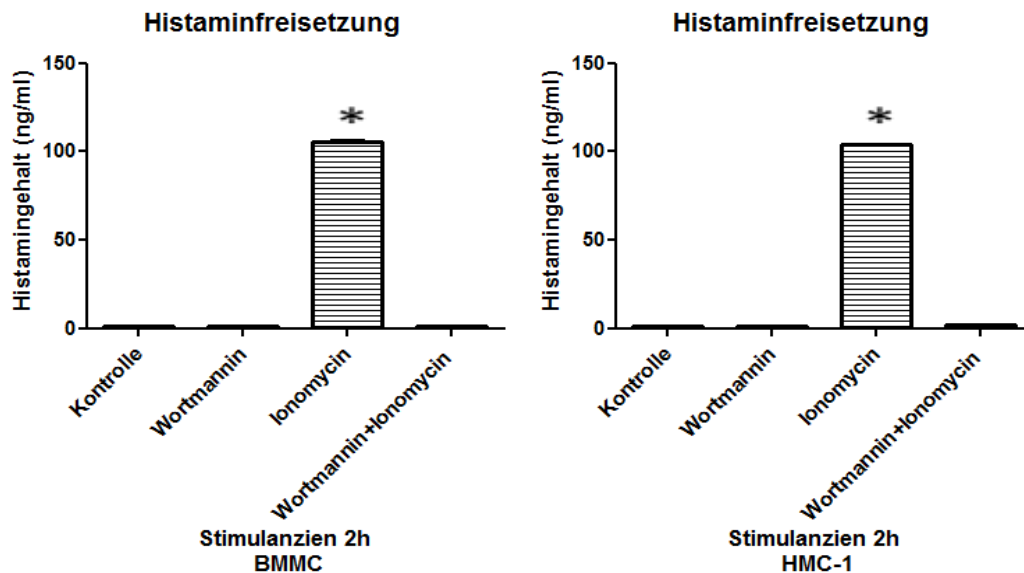


Abbildung 43: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$) in Gegenwart des Mastzellstabilisators Wortmannin ($10 \mu\text{g/ml}$). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

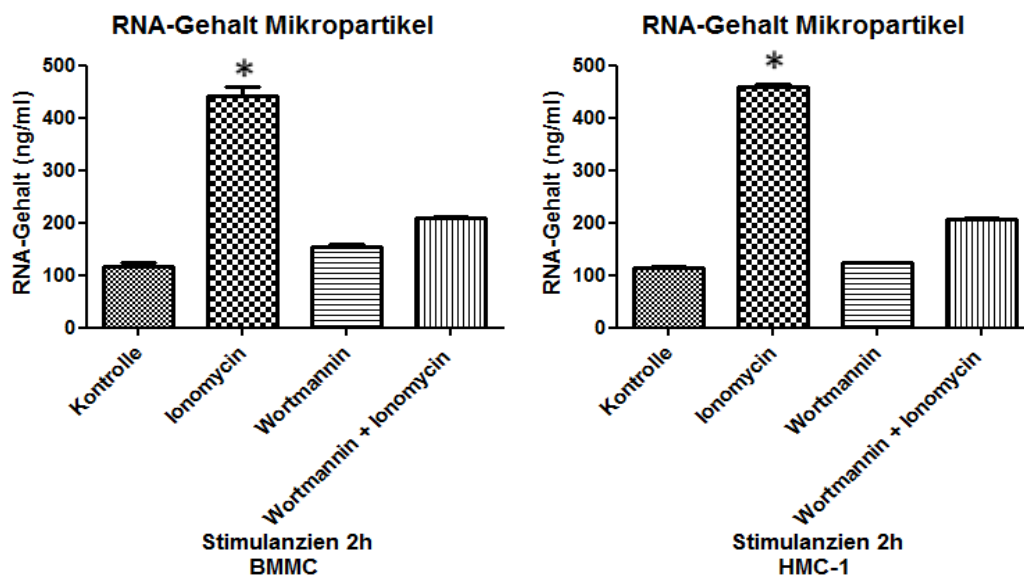


Abbildung 44: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit dem Ionophor Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$) in Gegenwart des Mastzellstabilisators Wortmannin ($10 \mu\text{g/ml}$). Dargestellt sind die Mittelwerte des Histamingehaltes (ng/ml) \pm Standardabweichung ($p \leq 0,05$ gegenüber der Kontrolle).

3. Ergebnisse

3.6 Lokalisation der RNA

3.6.1 Immunzytochemie

Um den Hauptlokalisationsort der RNA näher bestimmen zu können, wurden spezielle Färbungen zu Hilfe genommen (Vorgehen siehe Kapitel 2.7). Abbildung 45 zeigt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte RNA. Die RNA ist hierbei rot markiert und der Zellkern blau.

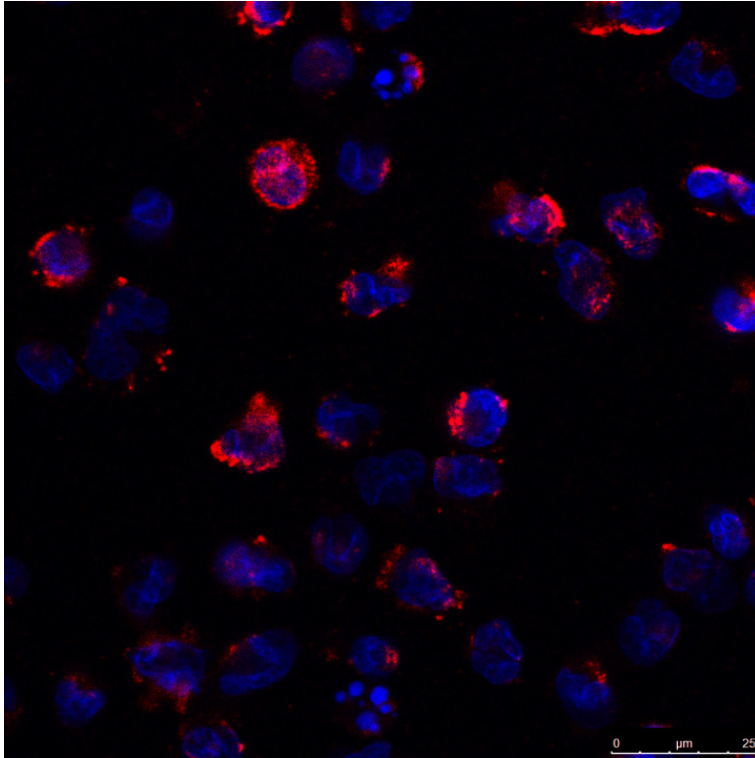


Abbildung 45: RNA-Färbung (rot) von unstimulierten Mastzellen. Mittels Immunzytochemie wurde an unstimulierten Mastzellen das Vorhandensein von RNA nachgewiesen. Der für die RNA verwendete Fluoreszenzfarbstoff färbte diese rot (Erstantikörper: mAB anti-rRNA + Zweitantikörper: Alexa Fluor Donkey anti-mouse IgG-Rhodamin). Bei unstimulierten Mastzellen ließ sich im Bereich um den Zellkern auf diese Weise RNA nachweisen.

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass während der Degranulation der Mastzellen auch RNA freigesetzt wird. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob und wie sich das Verhältnis der RNA nach der Stimulation verändert.

Dazu wurde ein Teil der Zellen vor der Färbung für eine Stunde mit Ionomycin behandelt und erst im Anschluss daran, zusammen mit den restlichen unstimulierten Zellen, gefärbt. Um Fehlerquellen, wie beispielsweise eine spontane Degranulation, zu verhindern, wurden die unstimulierten Zellen genauso vorbehandelt wie die stimulierten. Ebenso erfolgte die Aufnahme der Bilder auf gleiche Weise. Neben dem verwendeten Objektiv blieb auch die Belichtungszeit bei der Erstellung der Bilder konstant.

Beim anschließenden Vergleich der gefärbten Bilder fiel auf, dass nach der Stimulation

3. Ergebnisse

deutlich weniger RNA zu sehen war. Dies untermauert die vorherigen Ergebnisse und zeigte ebenfalls, dass es durch Stimulation zu einer RNA-Freisetzung kam.

Durch die Stimulation und die damit verbundene Degranulation wurde neben den bereits bekannten Mastzellmediatoren auch RNA freigesetzt. Diese ist daher nicht mehr in der Zelle nachweisbar. Abbildung 46 zeigt die RNA-Färbung vor und nach der Stimulation mit Ionomycin.

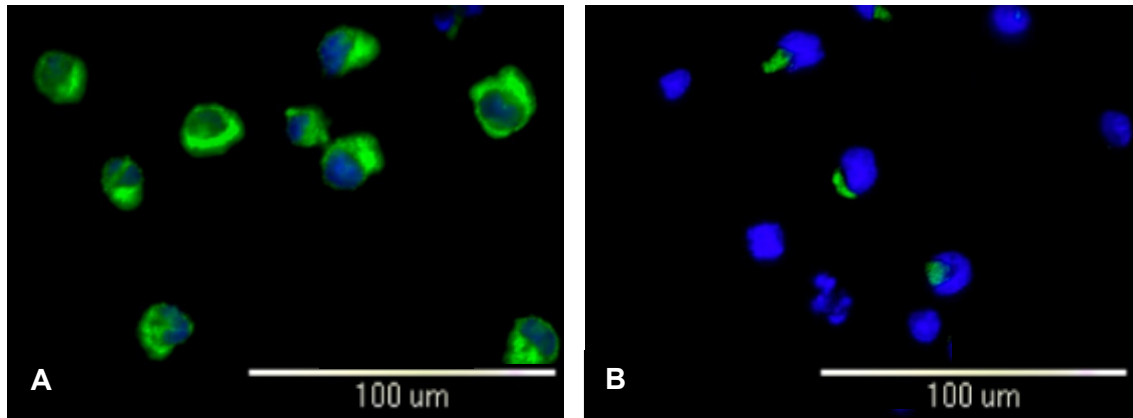


Abbildung 46: RNA-Färbung (grün) von unstimulierten und stimulierten Mastzellen.

Vergleicht man die angefärbte RNA Menge von unstimulierten Mastzellen (grün Erstantikörper: mAB anti-rRNA + Zweitantikörper: Alexa Fluor donkey anti-mouse IgG) mit der von stimulierten Mastzellen (grün ebenfalls Erstantikörper: mAB anti-rRNA + Zweitantikörper: Alexa Fluor donkey anti-mouse IgG), so war eine deutlich geringere Menge an RNA nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin ($1,5 \mu\text{M}$) nachweisbar. Nach Stimulation finden sich nur noch zellkernnahe Expressionsmuster, die bestimmte Organellkolokalisationen suggerieren.

A: RNA-Färbung bei unstimulierten Mastzellen. Es zeigt sich überwiegend eine zytoplasmatische Verteilung der RNA.

B: RNA-Färbung bei stimulierten Mastzellen. Die meiste RNA wurde sezerniert.

Anschließend wurde überprüft, ob es eine gemeinsame Lokalisation von RNA und Tryptase gibt. Tryptase ist ebenfalls ein Mastzellmediator, der in den Granula der Mastzellen gespeichert wird. Das Enzym Tryptase ist in der Lage Peptidbindungen zu spalten (2). Um die Frage der Lokalisation der RNA zu klären, wurde überprüft, ob es eine Ko-Lokalisation der RNA mit dem Mastzellmediator Tryptase gibt.

Abbildung 47 zeigt die Anfärbung des Mastzellmediators Tryptase und der RNA. Die Immunzytochemie der unstimulierten Mastzellen zeigt keine Ko-Lokalisation zwischen Tryptase und RNA. Auf diese Weise konnte die Lokalisation von RNA innerhalb der Mastzellgranula ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde auch nach einer gemeinsamen Lokalisation von RNA und ribosomalen Proteinen geschaut. Die Ribosomen, auch als ribosomale Proteine bezeichnet, sind Ort der Translation (Proteinneubildung). Ribosomen bestehen aus kleinen Proteinen und rRNA (55). Diese Zusammensetzung erklärt auch die mittels

3. Ergebnisse

Färbung entdeckte Ko-Lokalisation zwischen RNA und ribosomalen Proteinen (Abb. 48).

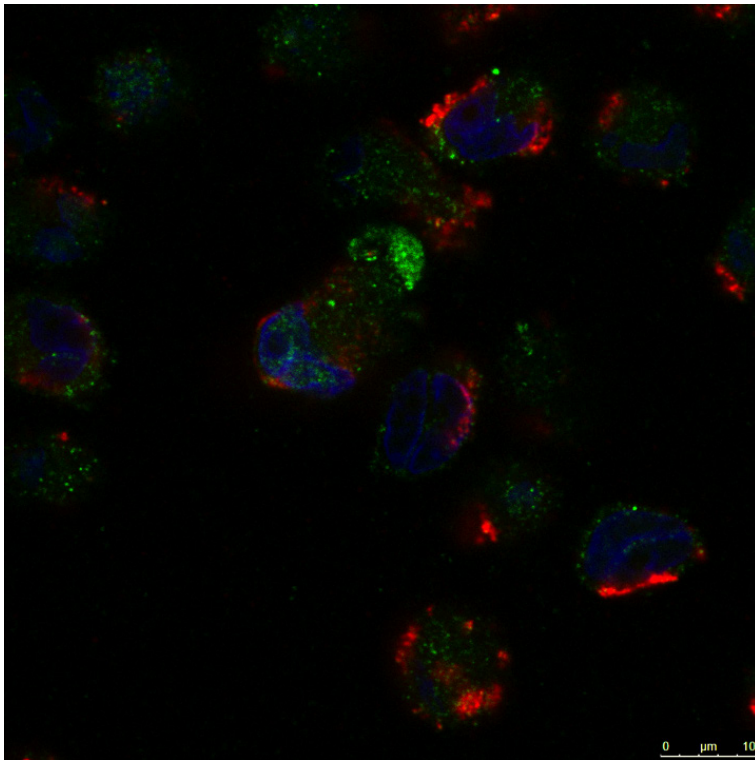


Abbildung 47: Tryptase-Färbung. Erstantikörper: polyklonale Antikörper gegen Mast cell Tryptase (rot) und RNA (grün) mit einer Verdünnung von 1:50 beziehungsweise 1:100 und Zweitantikörper: Alexa Flour donkey anti-IgG mit einer Verdünnung von 1:200 von unstimulierten Mastzellen. Es zeigt sich eine überwiegend zytoplasmatische, nicht granuläre, Verteilung.

Im nächsten Schritt wurde eine weitere Färbung mit CD46 vorgenommen (siehe Abb. 49). CD46 ist ein Membran Kofaktor Protein (MCP), welches in der Lage ist an die Komplementfaktoren C3b und C4b zu binden. Dadurch ist CD46 ein regulatorischer Bestandteil des Komplementsystems. Über die Bindung von C3b und C4b an CD46 können diese Komplementfaktoren inaktiviert und die Zelle vor weiteren Schäden durch die Komplementkaskade geschützt werden. Dadurch wird beispielsweise die Lyse der Zelle verhindert. CD46 findet sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers. Außerdem ist es in der Lage, auch die Entzündungsreaktionen zu regulieren, indem es die T-Zell-Antwort verlängert. Auf der Oberfläche der Zelle fungiert CD46 als Rezeptor für verschiedene Schadstoffe wie beispielsweise Adenoviren Typ B oder Herpesviren Typ 6 (215). Diese Färbung dient der Überprüfung, ob die RNA an extra- und intrazellulären Membranbestandteilen bindet. Wie in Abbildung 49 dargestellt, ist keine deutliche Ko-Lokalisation von RNA und CD46 vorhanden.

3. Ergebnisse

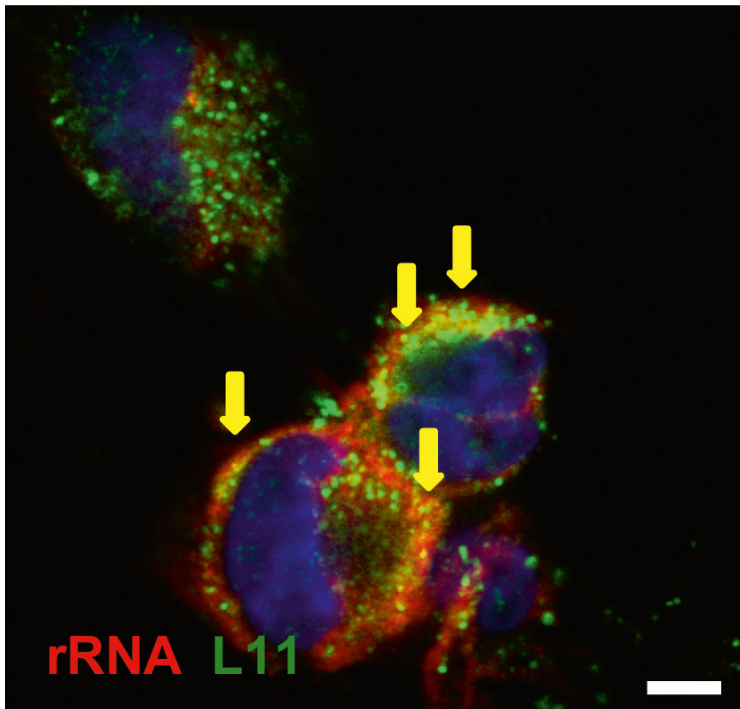


Abbildung 48: RNA-Färbung. Erstantikörper: polyklonaler Antikörper gegen ribosomale Proteine (grün) und RNA (rot) mit einer Verdünnung von 1:50 beziehungsweise 1:100 und Zweitantikörper: Alexa Flour donkey anti-IgG mit einer Verdünnung von 1:200 bei unstimulierten Mastzellen. Es zeigt sich eine Ko-Lokalisation mit ribosomalen Proteinen.

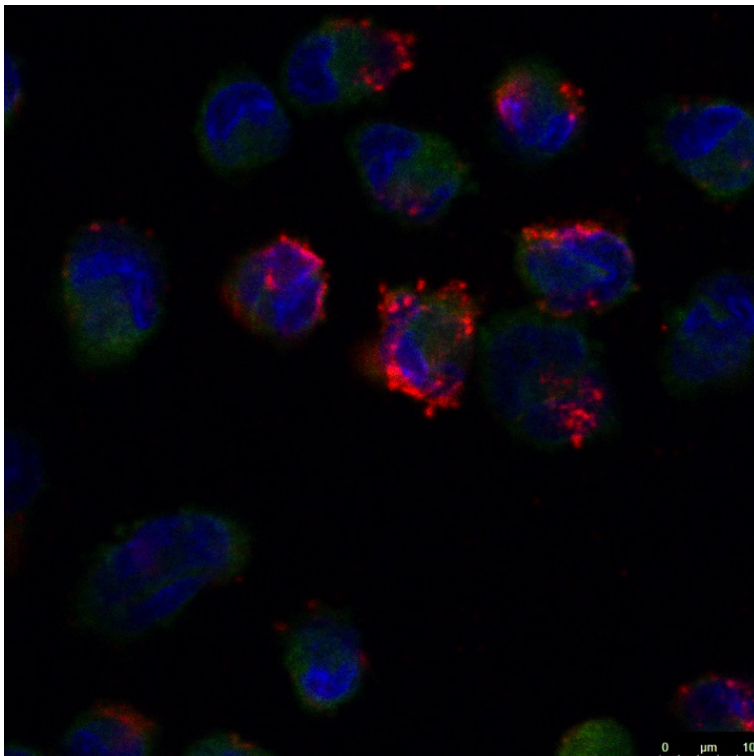


Abbildung 49: CD46-Färbung. Erstantikörper: polyklonaler Antikörper gegen CD46 (rot) und RNA (grün) mit einer Verdünnung von 1:50 beziehungsweise 1:100 und Zweitantikörper: Alexa Flour donkey anti-IgG mit einer Verdünnung von 1:200 bei unstimulierten Mastzellen. Es zeigt sich eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung der rRNA.

3. Ergebnisse

3.6.2 Elektronenmikroskopie

Die Lokalisation der RNA wurde auch durch Elektronenmikroskopie (siehe Beschreibung in Kapitel 2.8) untersucht. Die Negativstain-Aufnahme in Abbildung 50 zeigt, dass die RNA innerhalb der Mastzelle zwischen den Granula nachweisbar ist.

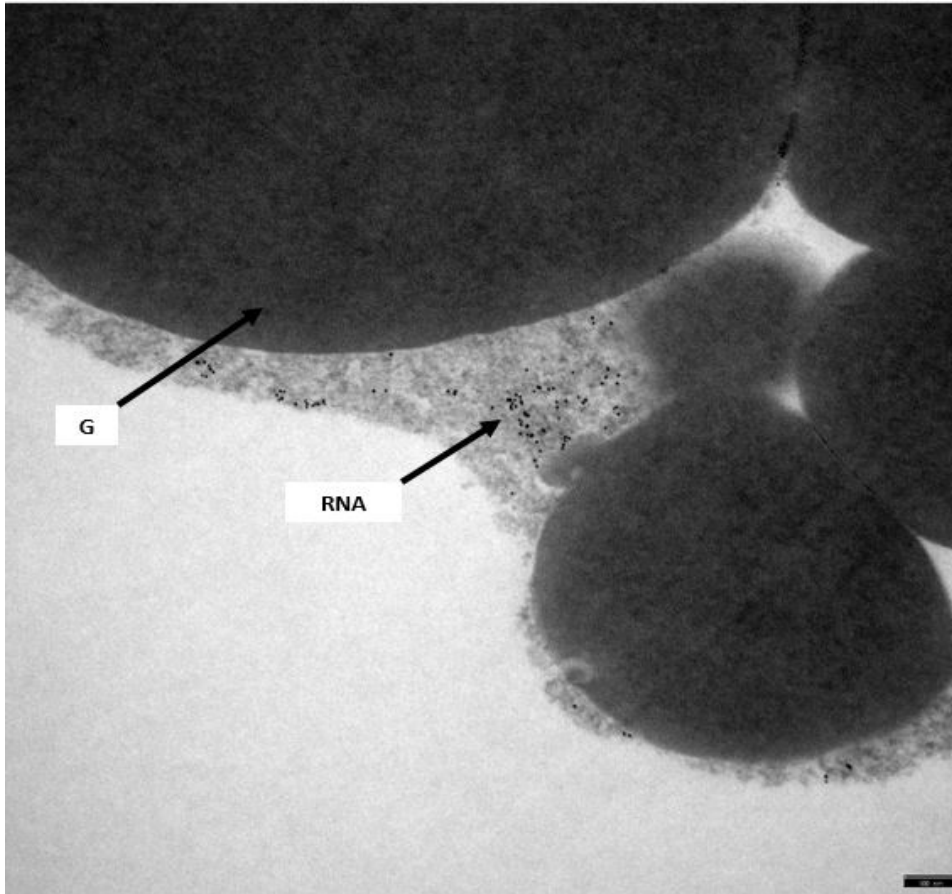


Abbildung 50: Elektronenmikroskopbild RNA in unstimulierten Mastzellen (G=Granula, RNA=extrazelluläre RNA)

4. Diskussion

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch unterschiedliche Aktivatoren stimulierte Mastzellen eRNA sezernierten, die überwiegend aus rRNA bestand und mit der Mikrovesikelfraktion assoziiert war.

Das Ausmaß der Freisetzung von eRNA korrelierte mit dem Degranulationsprozess, der durch die Sezernierung typischer Granulabestandteile wie β -Hexosaminidase und Histamin gemessen wurde. Dies konnte auch dadurch bestätigt werden, dass sowohl die RNA als auch die Freisetzung typischer Mastzellmediatoren durch Hemmung des Degranulationsprozesses gehemmt wurden.

Innerhalb der Mastzelle war RNA jedoch zytosolisch lokalisiert, was sowohl immunhistochemisch als auch durch Elektronenmikroskopie gezeigt wurde.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass RNA, die aus aktivierten Mastzellen freigesetzt wird, die Entzündungsreaktion verstärken könnte.

4.1 Extrazelluläre RNA als neuer Mastzellmediator

Annika Mauer zeigte, dass nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin eine signifikante Freisetzung von RNA stattfindet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Freisetzung von RNA während der Mastzellaktivierung näher untersucht. Neben der genaueren Betrachtung der notwendigen Stimuli, wurde der Fokus auf die Lokalisation und Quantifizierung dieser RNA gesetzt. Um zu überprüfen, ob die RNA-Ausschüttung von der Art der Stimuli abhängig ist, wurde ein breites Spektrum an Aktivierungswegen untersucht. Nicht nur durch Ionomycin, sondern auch durch zahlreiche weitere Stimuli ist die Induktion der RNA-Ausschüttung möglich.

Folgende Möglichkeiten der Mastzellaktivierung waren dabei Bestandteil der Untersuchung:

- membranständiger Fc ϵ Rezeptor durch IgE
- Toll-like-Rezeptoren durch CLO 75, R848, LPS und PolyIC
- G-Protein-gekoppelter Signalweg durch C48/80 sowie über Rezeptoren für Komplementfaktoren durch C3a und C5a
- Hypoxie

Die verschiedenen Aktivierungen mündeten – mit Ausnahme der Aktivierung durch C48/80 – in einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration als Voraussetzung der Degranulierung (73). So werden nicht nur Granulabestandteile wie Histamin mittels

4. Diskussion

Exozytose freigesetzt, sondern auch eRNA, die sich zwischen den Mastzellgranula befindet. Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurde die Degranulierung über die Freisetzung des Enzyms Hexosaminidase und die Freisetzung von Histamin quantifiziert (3) (199) (200) (201) (202). Dabei wurde gezeigt, dass die RNA-Freisetzung mit dem Ausmaß der Degranulierung korreliert.

Um sicherzustellen, dass die nachgewiesene RNA auch tatsächlich im Zuge der Degranulation ausgeschüttet wird, wurde zusätzlich überprüft, ob die verwendeten Stimulanzien die Vitalität der Zellen beeinflussen. Bei einer Zerstörung der Mastzelle würden die Granulabestandteile ebenfalls freigesetzt werden. Neben der Zählung der lebenden Zellen vor und nach der Stimulation wurde auch das Enzym Laktat-Dehydrogenase nachgewiesen, um das Ausmaß der Zellschädigung zu kontrollieren. Die Laktat-Dehydrogenase ist ein Enzym, welches zytosolisch vorliegt und bei Nekrose der Zelle freigesetzt wird (196). Bei keinem der verwendeten Stimulanzien kam es zu einer messbaren Schädigung der Zelle. Die Freisetzung der RNA entstand folglich nicht durch eine Zellschädigung, sondern durch einen Prozess, der mit der Degranulation korreliert.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Degranulation und die damit verbundene RNA-Freisetzung durch verschiedene Stimuli induziert. Über unterschiedliche Aktivierungswege der Mastzelle wurde die Degranulierung eingeleitet, um die Auswirkungen des Stimulus auf die RNA-Freisetzung zu überprüfen.

Da noch nicht für jeden Stimulus die komplette Signalkaskade, die zur Einleitung der Degranulation führt, bekannt ist, ist es schwer den genauen Auslöser für die RNA-Freisetzung zu identifizieren (73).

4.2 Stimulus-abhängige Freisetzung von eRNA

Nachfolgend werden die vier in Kapitel 4.1 genannten Möglichkeiten der Mastzellaktivierung näher diskutiert. Das Ausmaß der Degranulation wurde mittels des Enzyms Hexosaminidase und mittels Histamin beurteilt. Die Versuche haben gezeigt, dass eRNA parallel zum Granulationsprozess von der Mastzelle freigesetzt wird.

Um eine mögliche Interaktion zwischen dem Degranulationsprozess und der Freisetzung von eRNA aufzuzeigen, sollte die zeitabhängige Freisetzung von Mastzellmediatoren und eRNA untersucht werden. So kann zwischen einer Freisetzung im Rahmen der Degranulation und einer Freisetzung aus dem Zytosol unterschieden werden. Zusätzlich sollten die Granula von Mastzellen isoliert und auf eRNA untersucht werden. Hierfür ist die Behandlung von Mastzellen mit einem Stabilisator bei gleichzeitiger Stimulation geeignet.

4. Diskussion

4.2.1 Mastzellaktivierung durch membranständigen Fcε-Rezeptor

Die Aktivierung von Mastzellen im Rahmen der allergischen Reaktion mittels IgE über den zugehörigen Fcε-Rezeptor zählt zu den zentralen Aktivierungswegen im Rahmen allergischer Reaktionen (69).

In vitro ließ sich dieses Phänomen nicht in dem bekannten Ausmaß nachweisen. Weder murine Mastzellen noch die humane Mastzelllinie reagierten mit einer besonders starken Degranulation. Auch über eine mögliche Quervernetzung des IgE während der Aktivierung von humanen Mastzellen konnte nur eine geringe Degranulation erzielt werden, die auch mit einer geringen RNA-Freisetzung korrelierte (71). Diese Tatsache erschwert es, die eigentliche Bedeutung von RNA im Rahmen allergischer Reaktionen einzuordnen. Die verwendeten humanen Mastzellen besitzen einen mutierten IgE-Rezeptor und reagieren daher nur mit einer schwachen Degranulation auf IgE (216). Da sie für die anderen Versuche gut geeignet sind, wurden sie trotzdem verwendet.

In vivo bewirkt die Kreuzvernetzung von, an den hochaffinen IgE-Rezeptor gebundenen, IgE-Molekülen die Freisetzung von Histamin (69). Auf diese Weise werden Reaktionen, wie beispielsweise die Kontraktion der glatten Muskulatur von Arteriolen und die Endotheldilatation in Kapillaren und Venolen mit nachfolgender Lückenbildung zwischen den einzelnen Endothelzellen eingeleitet (55) (217). Es kommt zur Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwand (11). Ein Vergleich der bei einer Entzündung beziehungsweise Allergie auftretenden Symptome mit denen, die durch eRNA ausgelöst werden können, zeigt jedoch Parallelen. Wird im Rahmen von Gefäßverletzungen eRNA freigesetzt, so ist diese in der Lage, die Permeabilität der Membran zu verändern und somit die Ödembildung positiv zu beeinflussen (136). Ödeme zählen auch zu einem der fünf Kardinalsymptome der Entzündung (3). Zusätzlich kann eRNA durch die Aktivierung von Kontaktphaseproteinen, wie FXII und Kallikrein, unter anderem Einfluss auf die Thromboseentstehung nehmen (143). Hierbei spielt insbesondere das Bradykinin-System eine wichtige Rolle. Bradykinin gehört zur Gruppe der Kinine und entsteht durch proteolytische Spaltung aus Kininogen. Die Spaltung wird durch Kallikrein induziert. Bradykinin hat eine ähnliche Wirkung wie Histamin und induziert eine Vasodilatation mit einer daraus resultierenden Blutdrucksenkung. Auf die glatte Muskulatur wirkt es kontrahierend. Bradykinin ist nicht nur ein Entzündungsmediator sondern auch ein Mediator des Schmerzes und wirkt chemotaktisch auf Leukozyten. Es wirkt über mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. In der Kontaktphase der Blutgerinnung wird Bradykinin ebenfalls freigesetzt (218). Bradykinin kann über den Faktor XII (Hageman-Faktor) das intrinsische System der Blutgerinnung aktivieren. Faktor XII wiederum induziert die Aktivierung von Kallikrein. Aufgrund der dadurch erhöhten Bildung von

4. Diskussion

Bradykinin wird die Freisetzung des gewebsspezifischen Plasminogenaktivators (tPA) aus dem Gefäßendothel gefördert. Somit wird die Fibrinolyse eingeleitet (219) (220).

Die zusätzliche Aktivierung von Kontaktphaseproteinen durch eRNA könnte die notwendige langfristige Aktivierung von Mastzellen während einer Entzündung unterstützen. Mastzellen sorgen so für den nötigen Nachschub an Entzündungsmediatoren (3).

4.2.2 Mastzellaktivierung über TLR

Mastzellen besitzen spezielle Toll-like-Rezeptoren, die nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch endosomal exprimiert werden. TLR 1, TLR 2 und TLR 4 – 6 auf der Oberfläche der Mastzellen ermöglichen die Abwehr von extrazellulären Molekülen. TLR 3 und TLR 7 – 9 sind endosomal exprimiert und ermöglichen die Abwehr von intrazellulären Substanzen, wie beispielsweise viraler RNA oder bakterieller DNA (221) (222).

Das Repertoire und die Anzahl an TLRs unterscheiden sich deutlich je nach Spezies. So findet man TLR 5 und TLR 8 insbesondere auf Mastzellen der Ratte. TLR 1 bis TLR 4 sowie TLR 6, TLR 7 bis TLR 9 finden sich auch auf murinen und humanen Mastzelllinien (82) (91) (92) (93) (94) (95) (97) (98) (99). In der Literatur gibt es verschiedene Auffassungen darüber, ob Toll-like-Rezeptoren in der Lage sind, eine Degranulation auszulösen. Nach McCurdy und Supajatura sind Toll-like-Rezeptoren in der Lage eine Mastzelldegranulation zu induzieren (88) (96).

Dies konnten auch die Versuchsergebnisse dieser Arbeit zeigen. Es waren nicht alle TLR-Liganden in gleichem Ausmaß in der Lage eine Degranulation auszulösen. Da nicht alle Mastzelltypen die gleichen Arten von Toll-like-Rezeptoren besitzen, ist die Spezifität der Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche entscheidend für die Reaktion der Mastzelle auf den einwirkenden Stimulus.

Die Versuche in Kapitel 3.2.4 haben gezeigt, dass die Aktivierung der TLR 7 und TLR 8 durch CLO 75 und R848 in einer stärkeren Degranulation mündet, als die Aktivierung der TLR 3 und TLR 4 durch PolyIC und LPS. Dies spiegelt sich auch in der dadurch ausgelösten RNA-Freisetzung wider. Die RNA-Freisetzung verläuft parallel zum Degranulierungsprozess der Mastzelle und wird durch den einwirkenden Stimulus beeinflusst.

Dass die spezifische Verteilung der entsprechenden Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielt, zeigt sich daran, dass bei humanen Mastzellen durch CLO 75 nicht nur TLR 7 sondern gleichzeitig auch TLR 8 aktiviert wird (88) (90). Durch diese gleichzeitige Aktivierung konnte eine gesteigerte Freisetzung von eRNA ausgelöst werden.

Um diese Informationen besser beurteilen zu können, ist es wichtig, die Verteilung von

4. Diskussion

TLR auf den einzelnen Mastzelltypen genau zu kennen. Dies muss in weiteren Untersuchungen getestet werden. Hierzu ist die Überprüfung an einem geeigneten Tiermodell erstrebenswert.

4.2.3 Mastzellaktivierung über den G-Protein-gekoppelten-Signalweg

Ebenso sind Mastzellen über den G-Protein-gekoppelten-Signalweg aktivierbar. Diese Aktivierung wurde einerseits mittels C48/80, andererseits durch Komplementfaktoren eingeleitet.

C48/80 erhöht die extrazelluläre Calciumkonzentration und induziert so die Degranulation der Mastzelle (41). Wie die durchgeführten Versuche zeigten, löst diese Art der Aktivierung eine deutliche Freisetzung von eRNA aus murinen und humanen Mastzellen aus.

Mastzellen besitzen ebenfalls Rezeptoren für Komplementfaktoren. Auch über diese Rezeptoren wird ein G-Protein aktiviert. Die Degranulierung wird in vivo vermutlich über eine Verstärkung der IgE-vermittelten Mediatorfreisetzung induziert (211). Um diesen Signalweg zu untersuchen, wurden die Mastzellen mit den Komplementfaktoren C3a und C5a stimuliert. Es zeigte sich auch bei dieser Stimulation, dass die RNA Freisetzung mit der Degranulation korreliert, so dass in vitro auch eine Mediatorfreisetzung unabhängig von IgE möglich ist.

Ebenso könnte nachfolgend die Wirkung von Substanz P auf die RNA-Freisetzung der Mastzellen untersucht werden. Substanz P induziert über den G-Protein-gekoppelten Signalweg, genauer über den Neurokinin-1-Rezeptor, die Mastzelldegranulation (44).

Walczak-Drzewiecka et al. konnten zeigen, dass es in Mastzellen unter Hypoxie-Bedingungen zu einer signifikanten Hochregulierung der HIF1A-Expression kommt, wenn diese durch Ionomycin und Substanz P aktiviert werden. Nur unter hypoxischen oder unter normoxischen Bedingungen konnte diese signifikante Hochregulierung nicht erreicht werden (223).

4.2.4 Mastzellaktivierung durch Hypoxie

Nicht nur während einer Entzündungsreaktion, sondern auch bei onkologischen Erkrankungen kommt es zu einem Sauerstoffmangel im betroffenen Gewebe (217). Daher wurde auch der Einfluss von Hypoxie auf Mastzellen genauer untersucht. Mastzellen sind die Aktivatoren der Entzündungsreaktion und aufgrund ihrer Interaktion mit den Zellen des Immunsystems an der Abwehr von schädigenden Einflüssen beteiligt (217). Es zeigte sich deutlich, dass unter Hypoxie-Bedingungen eine starke Aktivierung von Mastzellen möglich ist, die auch mit einer vermehrten Freisetzung von RNA einhergeht.

4. Diskussion

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Mastzellen nicht nur im Kontext allergischer Reaktionen sondern auch an vaskulären Adaptationsprozessen und der Gefäßneubildung involviert sind (52). Ebenso wird Mastzellen eine Rolle im Prozess der Tumorentstehung zugeteilt (224). In all diesen Situationen kommt es zu einem Sauerstoffmangel im Gewebe. Die Freisetzung der Mastzellmediatoren, insbesondere die Freisetzung von Histamin, führt zu einer Erweiterung und verbesserten Durchlässigkeit der Gefäße. Die Infiltration des Gewebes durch immunologische und nicht-immunologische Zellen wird ermöglicht. So kann beispielsweise die Wundheilung unterstützt werden (225). Neben den Mastzellen spielt auch eRNA bei diesen Vorgängen eine entscheidende Rolle. Sie ist ebenfalls in der Lage die Permeabilität zu verändern (136). Ebenso kann eRNA als Tumormarker verwendet werden (157). Hypoxie und Ischämie sind Bestandteile von entzündlichen und onkologischen Erkrankungen, so dass die Freisetzung von RNA aus Mastzellen die Begleitsymptomatik dieser Krankheiten erklären könnte.

Neben den Mastzellen und der freigesetzten eRNA können die Mikropartikel als dritter Akteur gesehen werden. Es konnte ein signifikanter Unterschied bezogen auf das Repertoire an Mikropartikeln von Mastzellen im Plasma von beispielsweise an Diabetes oder Sepsis erkrankten Personen gezeigt werden (174) (181) (182) (183).

Somit spielen diese drei Akteure im Kontext von entzündlichen und onkologischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle und die in dieser Arbeit nachgewiesene Interaktion zwischen ihnen kann helfen, neue Behandlungsmöglichkeiten, im Sinne einer Regulierung der eRNA-Freisetzung, zu entwickeln.

4.2.5 Hemmung der Mastzelldegranulation

Anschließend wurde untersucht, welche Auswirkung die Hemmung der Degranulation durch Cromolyn, BAPTA und Wortmannin hat. Bei allen drei Hemmstoffen hat sich gezeigt, dass es ohne Mastzelldegranulation nicht zu einer Freisetzung von eRNA kommt. Die verwendeten Hemmstoffe unterbinden die Degranulation auf verschiedene Arten. Cromolyn ist ein Mastzellstabilisator, der durch die Hemmung von Chlorid-Kanälen die Freisetzung der Mastzellmediatoren unterdrückt (212).

Der Calciumchelator BAPTA reguliert über die Kontrolle des intrazellulären Calciumspiegels die Mediatorfreisetzung (226) und Wortmannin hemmt die PI₃K (213) und ist somit ebenfalls in der Lage, die Degranulation zu beeinflussen.

4.2.6 RNA-Analyse

Mittels einer Gelelektrophorese ließ sich nachweisen, dass es sich bei der freigesetzten RNA um ribosomale RNA handelt. Diese besteht aus 18s und 28s ribosomaler RNA. Die

4. Diskussion

freigesetzte RNA könnte auch mit den Ribosomen assoziiert sein, da durch Immunzytochemie eine zytosolische Ko-Lokalisation von RNA und ribosomalen Proteinen nachgewiesen werden konnte.

In weiteren Untersuchungen muss die genaue Funktion der RNA unter Berücksichtigung dieser Tatsache betrachtet werden. Eine Rolle der RNA im Rahmen von Zelldifferenzierung, dem Ablauf des Degranulationsprozesses oder der Bildung der Mastzellgranula ist denkbar. Diese Vermutung wird durch die Tatsache untermauert, dass die RNA-Freisetzung mit der Degranulationsstärke assoziiert ist und vom Stimulus abhängig ist.

4.3 Lokalisation der extrazellulären RNA

Zur Untersuchung der eRNA wurde mittels Zentrifugation der Überstand nach Mastzelldegranulation verwendet. Dabei wurde die Fraktion identifiziert, in der der mengenmäßig größte Anteil an RNA nachweisbar war. Hierbei handelte es sich um die Fraktion der Mikropartikel.

Mikropartikel sind kleine Zellvesikel, die während der Zellaktivierung oder der Apoptose freigesetzt werden (227) (228). Sie entstehen durch Exozytose und besitzen daher verschiedene Oberflächenantigene und spezifische Zellkomponenten ihrer Herkunftszelle (229) (230). Sie besitzen eine entzündliche und gerinnungsfördernde Wirkung (231) (232) (233). Ebenso sind sie in der Lage mit einer Zielzelle zu fusionieren und so beispielsweise inflammatorische Enzyme, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Signalproteine und funktionelle RNA zu übertragen. Sie sind folglich ein wichtiger Bestandteil der parakrinen Zellkommunikation (234).

Basierend auf dieser Grundlage stellt der Nachweis von eRNA innerhalb der Mikropartikel von Mastzellen eine wichtige Erkenntnis dar. Die funktionelle Bedeutung der Mastzelle im Rahmen der Sofortreaktion der Entzündung, aber auch während der späteren Phase der Entzündungsreaktion, kann auf diese Weise verstärkt werden.

Die Assoziation zwischen Mikropartikel und RNA fand bereits in der Literatur Erwähnung (131) (132). Die nachgewiesene Interaktion zwischen den beiden Akteuren lässt den Schluss zu, dass Mikropartikel als Transporter der RNA dienen. Es ist denkbar, dass die RNA auf diese Weise vor dem Abbau durch RNasen geschützt ist (131) (132).

Um die Frage zu klären, ob die nachgewiesene eRNA ein Bestandteil der Granula ist, wurden immunzytologische Färbungen mit dem Ziel der genaueren Lokalisation der Nukleinsäure angefertigt. Biologisch gesehen ist eine Lokalisation von eRNA im Inneren der Mastzellgranula nicht denkbar. In der immunzytologischen Färbung konnte diese Vermutung bestätigt werden, da keine Ko-Lokalisation des Granulabestandteils Tryptase

4. Diskussion

und der eRNA nachgewiesen werden konnte. Um auszuschließen, dass eRNA innerhalb der Granula lokalisiert ist, sollte versucht werden, Mastzellgranula zu isolieren und eRNA innerhalb der Granula nachzuweisen.

Eine Ko-Lokalisation mit ribosomalen Proteinen ließ sich durch die immunzytologische Färbung nachweisen. Nach jetzigem Stand liegt die nachgewiesene eRNA intrazellulär und zytoplasmatisch lokalisiert vor, ist mit den Ribosomen assoziiert aber befindet sich nicht innerhalb der Granula der Mastzelle.

Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Bilder erstellt. Hierbei wurde die RNA ebenfalls außerhalb der Granula an den Ribosomen der Mastzellen nachgewiesen. In weiteren Versuchen muss getestet werden, ob der verwendete Antikörper auch in der Lage ist in das Innere der Granula zu gelangen. Nur unter diesen Bedingungen ist es möglich das Vorhandensein von eRNA im Inneren der Mastzellgranula auszuschließen.

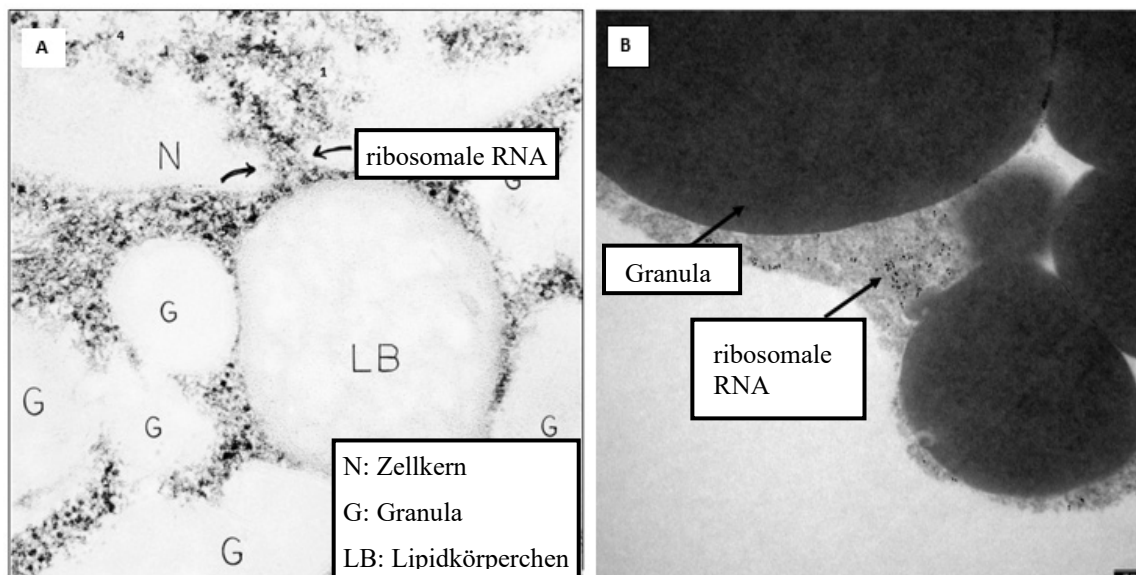


Abbildung 51: ribosomale RNA im Elektronenmikroskopbild.

A: EM von Dvorak et al. 2003; Nach der Stimulation von Mastzellen wird die Freisetzung von eRNA induziert. Der Großteil der freigesetzten eRNA ist rRNA, modifiziert nach (235).

B: Die für diese Arbeit angefertigten Elektronenmikroskopbilder zeigen ebenfalls die Anwesenheit von rRNA zwischen den Granula der Mastzelle.

4.4 Extrazelluläre RNA im Kontext der Mastzelldegranulation

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RNA als ein neuer Mediator der Mastzelle gesehen werden kann. Die Korrelation zwischen einer gesteigerten Degranulation und der dadurch induzierten RNA-Freisetzung wurde auf unterschiedlichen Wegen gezeigt. Nicht nur eine gesteigerte Calciumfreisetzung ausgelöst durch Ionomycin, sondern auch die Aktivierung von G-Proteinen durch C48/80, die IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung durch direktes Einwirken von IgE oder durch indirektes mittels Komplementfaktoren

4. Diskussion

sowie noch weitestgehend unerforschte Prozesse ausgelöst durch TLR oder Hypoxie führen durch die Auslösung der Degranulation zu einer gleichzeitigen RNA-Freisetzung aus Mastzellen. Wie die Ergebnisse zeigten, ergibt sich eine Korrelation zwischen der Degranulationsstärke und der RNA-Menge. Umgekehrt lässt sich diese Korrelation auch durch die durchgeführte Hemmung der Degranulation bestätigen.

Wird die Degranulation durch die in Kapitel 3.5 dargestellten Wegen unterdrückt, so zeigen sich trotz gleichzeitiger Stimulation keine Degranulation und ebenfalls keine Freisetzung der RNA.

Die RNA konnte durch Zellfärbungen und Elektronenmikroskopie intrazellulär nachgewiesen werden, ist jedoch nicht zusammen mit anderen Mediatoren innerhalb der Granula lokalisiert. Vermutlich befindet sie sich außerhalb der Granula und ist mit den Ribosomen der Mastzellen assoziiert. Kommt es zur Degranulation, so wird die Bildung von Mikropartikeln induziert und die darin enthaltene eRNA freigesetzt.

Anhand der Versuchsergebnisse dieser Arbeit ließ sich zeigen, dass eRNA im Falle einer Degranulation mit der Mikropartikelfraktion assoziiert ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass Mikropartikel als Transporter der eRNA dienen (131) (132).

Durch ein Zusammenspiel von eRNA und Degranulationsprodukten wie Histamin ergeben sich nicht nur neue Erklärungsansätze für die zahlreichen körperlichen Symptome (beispielsweise Ödeme) einer Entzündungsreaktion, sondern möglicherweise auch neue Therapieansätze zur Behandlung dieser Symptome.

Wie bereits bei Versuchen an Ratten gezeigt werden konnte, kann durch eine Vorbehandlung der Tiere mit RNase 1 die Anzahl von Gefäßverschlüssen, die Infarktgröße und die Ödembildung reduziert werden, wenn mittels Eisenchlorid ein Verschluss des Sinus sagittal superior induziert wird. Gleiches konnte auch in vitro an mikrovaskulären Gehirndothelzellen gezeigt werden (136). RNase 1 reguliert die Funktion von eRNA. Das Gleichgewicht zwischen eRNA und RNase 1 durch Hydrolyse dient dem Schutz von Blutgefäßen und Gewebe (142) (162) (163) (164) (167).

Mittels geeigneter Tiermodelle sollte zukünftig überprüft werden, ob sich ein solcher Effekt auch in Bezug auf die Freisetzung von eRNA durch Mastzellen im Rahmen der Entzündungsreaktion zeigen lässt.

4. Diskussion

4.5 Limitierungen dieser Arbeit

Zusätzlich ist es Aufgabe weiterer Untersuchungen die nachgewiesene eRNA genauer zu charakterisieren und Details über den Mechanismus der Freisetzung herauszufinden. Hierzu sind auch genauere Analysen der Mikropartikelfraktion nötig, beispielsweise hinsichtlich ihrer Größe und Zusammensetzung. Es muss berücksichtigt werden, dass es nicht möglich ist, homogene Mikropartikel einer Größe zu isolieren. Es können kleine Anteile zum Beispiel von Exosomen nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin muss die genauere Zusammensetzung der Mikropartikel-assoziierten Fraktion analysiert werden, zum Beispiel durch Proteomanalyse und gezielte Analysen der RNA (microRNAs, lncRNAs usw). Auch Ribonucleoproteine könnten in der Mikropartikelfraktion enthalten sein.

Ebenso muss geklärt werden, ob eRNA membrangebunden oder innerhalb der Vesikel zu finden ist. Dies kann durch eine RNase-Behandlung der Mikrovesikelfraktion und auch durch Elektronenmikroskopie evaluiert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass freie eRNA bei Makrophagen eine Zytokinantwort hervorruft (236). Daher muss in Zukunft die biologische Aktivität der Mikropartikel-assoziierten RNA untersucht werden.

5. Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Extrazelluläre RNA (eRNA) wurde bereits als ein neues Alarmsignal im Rahmen der angeborenen Immunität gewertet und als potenter Stimulator der Zytokinfreisetzung bei Monozyten und Makrophagen beschrieben.

Um die Bedeutung von extrazellulärer RNA in der Entzündungsreaktion weiter zu untersuchen, wurde die Freisetzung aus Mastzellen mittels verschiedener Methoden charakterisiert. Verschiedene Stimuli einschließlich Ionomycin, C48/80, C3a sowie C5a und weitere waren in der Lage Mastzellen zu stimulieren und eine eRNA-Freisetzung zu induzieren. Dabei korrelierte die Menge an freigesetzter RNA mit dem Ausmaß der Degranulierung. Zusätzlich wurde durch die Hemmung der Degranulierung mittels Cromolyn (Mastzellstabilisator), Wortmannin (Hemmstoff der PI_3 -Kinase) und BAPTA (Calciumchelator) die RNA-Freisetzung reduziert.

Der Großteil der freigesetzten RNA konnte in der Mikropartikel-Fraktion der Mastzellen nachgewiesen werden, die mittels Zentrifugation aus den Zellüberständen isoliert wurde. Eine Analyse der freigesetzten RNA mittels Gelelektrophorese zeigte, dass es sich hierbei um 18s und 28s rRNA handelt.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Lokalisation im Inneren der Mastzelle untersucht. Durch Verwendung von Antikörpern gegen ribosomale RNA und ribosomale Proteine konnte eine Ko-Lokalisation der RNA mit ribosomalen Proteinen im Zytosol aber außerhalb der Mastzellgranula gezeigt werden. Tryptase fungierte als Marker der Mastzellgranula und zeigte keine Ko-Lokalisation mit RNA. Zusätzlich konnte keine Ko-Lokalisation von intrazellulärer RNA mit dem Membranprotein CD46 gezeigt werden, welches die zytoplasmatische Lokalisation der rRNA bestätigt. Die Elektronenmikroskopbilder, die mit Hilfe eines Gold-Antikörpers gegen RNA angefertigt wurden, untermauerten ebenfalls diese These.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ribosomale RNA (in Assoziation mit Mikropartikeln) im Verlauf der Stimulation und Degranulation von Mastzellen freigesetzt wird. Dieser Prozess könnte an der Stimulation von Zellen der angeborenen Immunität beteiligt sein und daher inflammatorische Prozesse beeinflussen.

6 Abstract

Self-extracellular RNA (eRNA) is considered to be a new alarm signal in innate immunity and was described as potent stimulator of cytokine release in monocytes/macrophages. In order to evaluate the importance of eRNA in association with inflammatory reactions, mast cells were characterized for liberation of eRNA using different methodological approaches. Various stimuli, including Ionomycin, C48/80, complement C3a and C5a and others were able to promote mast cell stimulation, accompanied by the release of eRNA, whereby the quantity of liberated eRNA correlated well with the degree of mast cell degranulation. In addition, inhibition of degranulation by Cromolyn (mast cell stabilizer), Wortmannin (inhibitor of PI3-kinases) or BAPTA (calcium chelator) reduced the extent of eRNA liberation. Interestingly, after mast cell stimulation, the majority of eRNA was found in association with microparticles that were isolated by centrifugation from cell supernatants. Following gel electrophoretic analysis of extracted eRNA, the characteristic 18S/28S pattern of ribosomal RNA was discernable. Inside mast cells, immunofluorescence staining using antibodies against ribosomal RNA and ribosomal proteins revealed their co-localisation in the cytosol but outside mast cell granules, which stained positive for e.g. tryptase. Additionally, no co-localisation of intracellular RNA with CD46 could be demonstrated. Finally, electron microscopical inspection using colloidal gold-labeling against the indicated components underlined these findings. Together, these studies characterize ribosomal RNA (in association with microparticles) as the predominant component of eRNA, being released upon mast cell stimulation and degranulation. Subsequently, this eRNA serves as potent stimulator of immune cells for robust induction of various cytokines in the context of inflammatory processes.

7. Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
AT I	Antithrombin I
AT II	Antithrombin II
B-FGF	basic fibroblast growth factor
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis
BMMC	Bone marrow derived mast cells
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovin serum albumin</i>)
BTK	Burton`s Tyrosin Kinase
Bzw.	Beziehungsweise
C48/80	Compound 48/80
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
CLO 75	Thiazoloquinolone Derivat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPG-DNA	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin DNA
CR	Komplementrezeptor
DAG	Diazylglyzerol
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DAPI	4-6-Diamid-2-phyindol-dihydrochlorid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (<i>double distilled water</i>)
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium, Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonuclein acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
eRNA	Extrazelluläre Ribonukleinsäure
et al.	et alii
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence acticated cell sorting</i>)
Fc	kristalline Fragmente eines Antikörpers (<i>Fragment crystalizable</i>)
FCS	fetales Kälberserum
FSAP	Faktor-VII-aktivierendes-Protein (<i>Factor VII-activating protease</i>)
g	gravity force (<i>Erdbeschleunigung g=9,80665 m/s²</i>)

7. Abkürzungsverzeichnis

γ	Gamma
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour, englische Abkürzung für Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethansulfonsäure
HMC	Human mast cell
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s Medium
INF	Interferon
IP₃	Inositol-3-Phosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LTB₄	Leukotrien B ₄
LTC	Leukotrien
M	Molar
MCP	Membran Cofactor Protein
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1 (<i>CCL-2</i>)
MC_T	Mukosa-assoziierte Mastzellen (<i>mast cells tryptase</i>)
MC_{TC}	Bindegewebs-assoziierte Mastzellen (<i>mast cells tryptase and chymase</i>)
MHC	major histocompatibility complex
miRNA	Micro-RNA
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
MyD88	myeloid differentiation factor 88
n	Anzahl der Versuche
n. Chr.	nach Christus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Non-essential-amino-acid
NfκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	optische Dichte

7. Abkürzungsverzeichnis

PAF	Plättchenaktivierender Faktor (<i>platelet activating factor</i>)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PGD₂	Prostaglandin D ₂
PGE	Prostaglandin E
PGN	Peptidoglykan
pH	Maß für Säure oder Alkalität
PI₃K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI₃P	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PLC-γ	Phospholipase Cγ
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
pNAG	4-Nitrophenyl-2-acetamido-2desoxy-β-D-glucopyranosid
PolyIC	Polyinosinic: polycytidylic acid
PTK	protein tyrosin kinase
R848	Resiquimod
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleinacid</i>)
rRNA	Ribosomale RNA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium
S	Svedberg
SCF	Stern cell factor
SK	Sphingosine Kinase
Syk	Spleen Tyrosin Kinase
TBST	Tween-20-Tris-gepufferte-Säure
TGF-β1	Transformin growth factor - β1
TH₁	T-Helferzelle vom Typ 1
TH₂	T-Helferzelle vom Typ 2
TIR	Toll/IL-1 receptor homology domain
TIRAP	Adaptormolekül TLR-Signalweg (<i>Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor protein</i>)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	gewebsspezifischer Plasminogenaktivator (<i>tissue-type plasminogen activator</i>)
TRAM	Adaptormolekül TLR-Signalweg (<i>TRIF-related adaptor molecule</i>)
TRIF	Adaptormolekül TLR-Signalweg (<i>TIR domain-containing adapter inducing interferon β</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

7. Abkürzungsverzeichnis

tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
uPA	Urokinase
UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
α	Alpha
β	Beta
fBSA	Fetal Bovin Serum Albumin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

8. Abbildungsverzeichnis

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beginn der Entzündungsreaktion	6
Abbildung 2: Einleitung der Heilungsphase.....	7
Abbildung 3: Elektronenmikroskopbild einer Mastzelle mit zahlreichen Granula	11
Abbildung 4: Einleitung der Degranulation von Mastzellen	15
Abbildung 5: Struktur des hochaffinen IgE-Rezeptors	16
Abbildung 6: Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren	19
Abbildung 7: Zusammenfassende Übersicht der unterschiedlichen Aktivierungswege von Mastzellen	20
Abbildung 8: Angriffsebene verschiedener Analgetika.....	21
Abbildung 9: Freisetzung von extrazellulärer RNA nach Stimulation mit Ionomycin....	22
Abbildung 10: Zusammenfassung der Rolle von eRNA in der vaskulären Hämostase und kardiovaskulären Pathologien	26
Abbildung 11: Durch Laktat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion, modifiziert nach ..	42
Abbildung 12: Darstellung des ELISA-Prinzips im Rahmen der Bestimmung der Histaminfreisetzung.....	45
Abbildung 13: Übersicht über die einzelnen Fraktionen der Mastzellen	46
Abbildung 14: FACS-Analyse der ungefärbten Probe als Negativkontrolle	51
Abbildung 15: FACS-Analyse der gefärbten Zellen.....	52
Abbildung 16: Toxizitätstests.....	53
Abbildung 17: Überprüfung der Toxizität mittels dem Nachweis der Laktat-Dehydrogenase.....	54
Abbildung 18: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin, C48/80 und FceR1	55
Abbildung 19: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin, C48/80 und FceR1	56
Abbildung 20: Vergleich der Freisetzung von β -Hexosaminidase und Histamin aus aktivierten Mastzellen.....	57
Abbildung 21: Vergleich zwischen der freigesetzten RNA-Menge im Gesamtüberstand und den Lysaten.....	58
Abbildung 22: Vergleich zwischen der freigesetzten RNA-Menge in den Mikropartikeln und dem restlichen Überstand	58
Abbildung 23: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation mit Ionomycin, C48/80 und FceR1.....	59
Abbildung 24: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation mit C3a und C5a	60
Abbildung 25: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation mit C3a und C5a.....	60
Abbildung 26: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation mit C3a und C5a.....	61
Abbildung 27: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Stimulation CLO 75, R848, LPS und PolyIC.....	62
Abbildung 28: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Stimulation CLO 75, R848, LPS und PolyIC.....	63
Abbildung 29: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Stimulation CLO 75, R848, LPS und PolyIC).....	64
Abbildung 30: Zeitabhängigkeit der Hypoxie	65
Abbildung 31: Hexosaminidaseaktivität nach 24 stündiger Hypoxie.....	65
Abbildung 32: Freisetzung von Histamin nach 24 stündiger Hypoxie.....	66
Abbildung 33: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach 24 stündiger Hypoxie).....	67
Abbildung 34: Ergebnisse der RNA-Analyse.....	68
Abbildung 35: Darstellung der Reversibilität der RNA-Freisetzung nach	

8. Abbildungsverzeichnis

vorangegangener Stimulation	69
Abbildung 36: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Cromolyn.	71
Abbildung 37: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Cromolyn.	71
Abbildung 38: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Cromolyn).	72
Abbildung 39: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen und BAPTA.....	74
Abbildung 40: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen und BAPTA.....	75
Abbildung 41: RNA-Gehalt in Mikropartikel nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit unterschiedlichen Stimulanzen und BAPTA.....	76
Abbildung 42: Hexosaminidaseaktivität nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Wortmannin	77
Abbildung 43: Freisetzung von Histamin nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Wortmannin.	78
Abbildung 44: RNA-Gehalt in Mikropartikeln nach einstündiger Vorbehandlung und anschließender einstündiger Stimulation mit Ionomycin und Wortmannin	78
Abbildung 45: RNA-Färbung	79
Abbildung 46: RNA-Färbung von unstimulierten und stimulierten Mastzellen	80
Abbildung 47: Tryptase-Färbung.....	81
Abbildung 48: Färbung von ribosomalen Proteinen	82
Abbildung 49: CD46-Färbung.....	82
Abbildung 50: Elektronenmikroskopbild RNA in unstimulierten Mastzellen	83
Abbildung 51: ribosomale RNA im Elektronenmikroskopbild	91

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kardinalsymptome nach Galen	4
Tabelle 2: Granula-assoziierte Mastzellmediatoren und ihre Funktion	12
Tabelle 3: Lipidmediatoren und ihre Funktion	13
Tabelle 4: Zytokine und ihre Funktion	13
Tabelle 5: Rezeptoren an der Mastzelloberfläche und ihre Liganden	15
Tabelle 6: Übersicht über die Klassifizierung der RNA.	23
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Geräte	31
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Chemikalien	35
Tabelle 10: Antikörper	36
Tabelle 11: Auflistung verwendeter KITS.....	36
Tabelle 12: Zellkulturmedium HMC-1	37
Tabelle 13: Zellkulturmedium BMMC	38
Tabelle 14: Einfriermedium	40
Tabelle 15: Verwendete Puffer zur Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität	44
Tabelle 16: Verwendete Puffer für Immunzytologie	49

10. Formelverzeichnis

10 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Zellzahl pro Milliliter	40
Formel 2: Berechnung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität in Prozent	42
Formel 3: Berechnung der β -Hexosaminidase-Aktivität in Prozent.....	44
Formel 4: Berechnung des Histamingehaltes in ng/ml.....	46
Formel 5: Berechnung der RNA-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ aus den Lysaten.....	47
Formel 6: Berechnung der RNA-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ aus dem Überstand bzw. den Mikropartikeln.....	48

11. Literaturverzeichnis

11 Literaturverzeichnis

- [1] Lüllmann-Rauch, Renate. Taschenlehrbuch Histologie. 3. Kiel : Georg Thieme Verlag KG, 2009. S. 301 f. ISBN 978-3-13-129243-8.
- [2] Bischoff SC, Marone LM, Lichtenstein SJ. Regulation and Function of Human Intestinal Mast Cells. In Mast Cells and Basophils. Ac Press. 2000, 541-566.
- [3] Müller J, Müller-Hermelink HK. Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. 11. München : Elsevier GmbH, 2008. S. 123-137. ISBN 978-3-437-41541-8.
- [4] Schmitz-Moormann, P, Gebert, G und Thomas, C. Allgemeine Pathologie. [Hrsg.] Thomas C. Stuttgart : Schattauer, 1995. S. 116-126. ISBN 3-7945-1655-9.
- [5] Lüllmann-Rauch, Renate. Taschenlehrbuch Histologie. 3. Kiel : Georg Thieme Verlag KG, 2009. S. 253f. ISBN 978-3-13-129243-8.
- [6] Philipp Pflieger. netdoktor. [Online] 03 2014. [Zitat vom: 07. 10 2014.] <http://www.netdoktor.at/krankheit/entzuendung-7415>.
- [7] Forschungsgruppe Dr. Feil. [Online] 26. 07 2012. [Zitat vom: 07. 10 2014.] <http://www.dr-feil.com/medizin/entzuendung-2.html>.
- [8] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat.Immunol. 2001, 2: 675-680.
- [9] Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. N Engl J Med. 2000, 343: 338-344.
- [10] Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. Nature Reviews Immunology 8. 2008, 8: 279-289.
- [11] Juncqueira LC, Carneiro J. Histologie. Heidelberg : Springer Verlag, 2004. S. 70-73. ISBN 978-3540418580.
- [12] Greenberg, S. und Grinstein, S. Phagocytosis and innate immunity. Immunol . 2002, 14: 136-145.
- [13] Beutler, B. Innate immunity: an overview. Mol Immunol. 2004, 40: 845-859.
- [14] Twigg , HL 3rd. Macrophages in innate and acquired immunity. Semin Respir Crit Care Med. 2004, 25: 21-31.
- [15] Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001, 357: 1777-1789.
- [16] Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Tolllike receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol. 2001, 2: 947-950.
- [17] Robertson, MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. J Leukoc Biol. 2002, 71: 173-183.
- [18] Ehrlich, P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Test (Hrsg.), I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer

11. Literaturverzeichnis

und histologischer Beziehung. Leipzig : s.n., 1878. S. 65.

- [19] Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol.* 1999, 8: 1-16.
- [20] Galli SJ, Maurer M, Lantz CS. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999, 11: 53-59.
- [21] Maurer M, Lopez KS, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von Stebut E. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J.* 2006, 20: 2460-2467.
- [22] Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol.* 2006, 315: 13-34.
- [23] Bischoff SC, Mayer JH, Manns MP. Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000, 121: 270-283.
- [24] Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang ZS, Galli SJ. Dexamethasone and cyclosporin A suppress mast cell-leukocyte cytokine cascades by multiple mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995, 107: 323-324.
- [25] Wershil BK, Castagliuolo I, Pothoulakis C. Direct evidence of mast cell involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology.* 1998, 114: 956-964.
- [26] Hara M, Ono K, Hwang MW, Iwasaki A, Okada M, Nakatani K, Sasayama S, Matsumori A. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J Exp Med.* 2002, 195: 375-381.
- [27] Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 2002, 297: 1689-1692.
- [28] Pedotti R, De Voss JJ, Steinman L, Galli SJ. Involvement of both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases. *Trends Immunol.* 2003, 24: 479-484.
- [29] Metcalfe, DD. Mast Cells and Mastocytosis. *Blood.* 2008, 112: 946-956.
- [30] Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol.* 1991, 146: 1410-1414.
- [31] Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, 125: 73-80.
- [32] Botchkarev VA, Eichmuller S, Peters EM, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, Paus. A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle--dependent changes in mast cell--nerve fiber contacts in murine skin. *Arch Dermatol Res.* 1997, 289: 292-302.
- [33] Galli SJ, Mindy T. Mast Cells: Versatile Regulators of Inflammation, Tissue Remodeling, Host Defense and Homeostasis. *J Dermatol Sci.* 2008, 49: 7-19.
- [34] Galli, SJ. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest.* 1990, 62: 5-33.

11. Literaturverzeichnis

- [35] Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 2004, 25: 266-270.
- [36] Fox CC, Dvorak AM, Peters SP, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. *J Immunol.* 1985, 135: 483-491.
- [37] Schulman ES, Macglashan DW, Jr., Peters SP, Schleimer RP, Newball HH, Lichtenstein LM. Human lung mast cells: purification and characterization. *J Immunol.* 1982, 129: 2662-2667.
- [38] Benyon RC, Lowman MA, Church MK. Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. *J Immunol.* 1987, 138: 861-886.
- [39] Sellge G, Bischoff SC. Isolation, culture, and characterization of intestinal mast cells. *Methods Mol Biol.* 2006, 315: 123-130.
- [40] Rink L, Kruse A, Haase H. *Immunologie für Einsteiger.* Heidelberg/Berlin : Springer Spektrum, 2013. S. 19. Bd. 2. Auflage. ISBN 978-3-662-44842-7.
- [41] Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast Cells. *Physiol Rev.* 1997, 77: 1033-1065.
- [42] Metcalfe DD, Prussin C. IgE, Mast Cells, Basophils and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, 111: 486-494.
- [43] Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C,. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell.* 1997, 8: 2631-2645.
- [44] Hide M, Yanase Y, Greaves MW. Cutaneous mast cell receptors. *Dermatol Clin.* 2007, 25: 563-567.
- [45] Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol.* 1993, 150: 4478-4485.
- [46] Cocchiara R, Lampiasi N, Albeggiani G, Bongiovanni A, Azzolina A, Geraci D. Mast cell production of TNF-alpha induced by substance P evidence for a modulatory role of substance P-antagonists. *J Neuroimmunol.* 1999, 101: 128-136.
- [47] Sun J, Bhatia M. Substance P at the neuro-immune crosstalk in the modulation of inflammation, asthma and antimicrobial host defense. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2014, 13: 112-120.
- [48] Chillo O, Kleinert EC, Lautz T, ..., Mannell H, Preissner KT, Deindl E. Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Reports.* 2016, 16: 2197-2207.
- [49] Gan X, Xing D, Su G, Li S, Luo C, Irwin MG, Xia Z, Li H, Hei Z. Propofol attenuates small intestinal ischemia reperfusion injury through inhibiting NADPH oxidase mediated mast cell activation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 167014.
- [50] Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int. Immunopharmacol.* 2013, 17: 1176-1184.
- [51] Renz-Polster H, Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin.* 4. München : Elsevier GmbH, 2008. S. 371. ISBN 978-3-437-41055-0.
- [52] Bot I, van Berkel TJ, Biessen EA. Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases. 3. *Curr Cardiol Rev.* 2008, 4: 170-178.

11. Literaturverzeichnis

- [53] Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev.* 2007, 217: 65-78.
- [54] Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005, 6: 135-142.
- [55] Löffler, George. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* 7. Regensburg : Springer Medizin Verlag, 2008. S. 362. ISBN 978-3-540-76511-0.
- [56] Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology.* 2010, 85: 336-349.
- [57] Lüllmann-Rauch, Renate. *Taschenlehrbuch Histologie.* 3. Kiel : Georg Thieme Verlag KG, 2009. S. 305. ISBN 978-3-13-129243-8.
- [58] Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol.* 2001, 10: 312-320.
- [59] Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol.* 1993, 151: 3261-3266.
- [60] Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol.* 2000, 164: 43-48.
- [61] Pradaliere, A. Late-phase reaction in asthma: basic mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993, 101: 322-325.
- [62] Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, Manns MP. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96: 8080-8085.
- [63] Bischoff SC, Dahinden CA. c-kit ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells. *J Exp Med.* 1992, 175: 237-244.
- [64] Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2004, 10: 787-799.
- [65] Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature.* 2008, 454: 445-454.
- [66] Lundequist A, Pejler G. Biological implications of preformed mast cell mediators. *Cell Mol Life Sci.* 2011, 68: 965-975.
- [67] Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006, 117: 1214-1225.
- [68] Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 2005, 23: 749-786.
- [69] Löffler, Georg. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* 7. Heidelberg : Springer-Verlag, 2008. S. 398. ISBN 978-3-540-76511-0.
- [70] Theoharides TC, Cochrane DE. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol.* 2004, 146: 1-12.

11. Literaturverzeichnis

- [71] Bischoff SC, Schwengberg S, Wordelmann K, Weimann A, Raab R, Manns MP. Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Gut*. 1996, 38: 104-114.
- [72] Kinet, JP. The high-affinity IgE receptor: from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol*. 1999, 17: 931-972.
- [73] Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nature Reviews Immunology* 6. 2006, 6: 218-230.
- [74] Blank U, Ra C, Miller L, White K, Metzger H, Kinet JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature*. 1989, 337: 187-189.
- [75] Albert G, Miller L, Jelsema CL, Varin-Blank N, Metzger H. Structure-function relationships in the mast cell high affinity receptor for IgE. Role of the cytoplasmic domains and of the bet subunit. *J Biol Chem*. 1991, 266: 22613-22620.
- [76] Bieber, T. FcεRI-expressing antigen presenting cells: new players in the atopic games. *Immunolog*. 1997, 18: 311-313.
- [77] Gebhardt T, Sellge G, Lorentz A, Raab R, Manns MP, Bischoff SC. Cultured human intestinal mast cells express functional IL-3 receptors and respond to IL-3 by enhancing growth and IgE receptor-dependent mediator release. *Eur J Immunol*. 2002, 32: 2308-2316.
- [78] Xu Y, Potter JW, Willmann CL. The function of src family tyrosine kinases in hematopoietic cells. *Leukemia Research*. 1996, 20: 229-234.
- [79] Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM. Fcγ receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004, 133: 305-331.
- [80] Kovarova M, Tolar P, Arudchandran R, Draberova L, Rivera J, Draber P. Structure- function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fcεpsilon receptor I aggregation. *Mol Cell Biol*. 2001, 21: 8318-8328.
- [81] Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol Rev*. 2011, 242: 128-143.
- [82] McCurdy JD, Lin TJ, Marshall JS. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol*. 2001, 70: 977-984.
- [83] Byrne RD, Rosivatz E, Parsons M, Larijani B, Parker P, Ng T, Woscholski R. Differential Activation of the Pi3-Kinase Effectors Akt/Pkb and P70 S6 Kinase by Compound 48/80 Is Mediated by Pkα. *Cell Signaling*. 2007, 19: 321-329.
- [84] Morgan AJ, Jacob R. Ionomycin Enhances Ca²⁺ Influx by Stimulating Store-Regulated Cation Entry and Not by a Direct Action at the Plasma Membrane. *Biochem J*. 1994, 380: 665-672.
- [85] Lorentz A, Bischoff SC. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. *Immunol Rev*. 2001, 179: 57-60.
- [86] Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2009. S. 8 ff. 978-3-13-136433-3.
- [87] Varadaradjalou S, Feger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol*. 2003, 33: 899-

11. Literaturverzeichnis

906.

[88] Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest.* 2002, 109: 1351-1359.

[89] Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K. and Matsuguchi, T. Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c- Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol.* 2002, 169: 3801-3810.

[90] Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994, 152: 5468-5476.

[91] Imajo N, Kurihara D, Fukuishi N, Inukai A, Matsushita S, Noda S, Toyoda M, Yoshioka M, Teruya H, Nishii Y, Matsui N, Akagi M. Lipoteichoic acid improves the capability of mast cells in the host defense system against bacteria. *Inflamm Res.* 2009, 58: 797-807.

[92] Yang H, Wei J, Zhang H, Lin L, Zhang W, He S. Upregulation of Toll- like receptor (TLR) expression and release of cytokines from P815 mast cells by GM- CSF. *BMC Cell Biol.* 2009, 10: 37.

[93] Pietrzak A, Wierzbicki M, Wiktorska M, Brzezinska-Blaszczyk E. Surface TLR2 and TLR4 Expression on Mature Rat Mast Cells Can Be Affected by Some Bacterial Components and Proinflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm.* 2011, 2011: 427-473.

[94] Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. Variable expression of Toll- like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol.* 2002, 14: 1065-1074.

[95] Passante E, Ehrhardt C, Sheridan H, Frankish N. RBL-2H3 cells are an imprecise model for mast cell mediator release. *Inflamm Res.* 2009, 58: 611-618.

[96] McCurdy JD, Olynych TJ., Maher LH., Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol.* 2003, 170: 1625-1162.

[97] Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H. and Shimada, S. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow- derived mast cells. *J Immun.* 2004, 173: 531-541.

[98] Kubo Y, Fukuishi N, Yoshioka M, Kawasoe Y, Iriguchi S, Imajo N, Yasui Y, Matsui N, Akagi M. Bacterial components regulate the expression of Toll- like receptor 4 on human mast cells. *Inflamm Res.* 2007, 56: 70-75.

[99] Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone- Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood.* 2005, 106: 978-987.

[100] Saturnino SF, Prado RO, Cunha-Melo JR, Andrade MV. Endotoxin tolerance and cross-tolerance in mast cells involves TLR4, TLR2 and FcepsilonR1 interactions and SOCS expression: perspectives on immunomodulation in infectious and allergic diseases. *BMC Infect Dis.* 2010, 10: 240.

[101] Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood.* 2006, 107: 610-618.

11. Literaturverzeichnis

- [102] Kasakura K, Takahashi K, Aizawa T, Hosono A, Kaminogawa S. A TLR2 ligand suppresses allergic inflammatory reactions by acting directly on mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009, 150: 359-369.
- [103] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental and Molecular Medicine*. 2007, 39: 421-438.
- [104] Viaro F, Celotto AC, Capellini VK, Baldo CF, Rodrigues AJ, Vicente WV, Evora PR. Compound 48/80 Induces Endothelium-Dependent and Histamine Release-Independent Relaxation in Rabbit Aorta. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2008, 18: 87-92.
- [105] Puri N, Roche PA. Mast Cells Possess Distinct Secretory Granule Subsets Whose Exocytosis Is Regulated by Different Snare Isoforms. *Proc Natl Acad Sci*. 2007, 105: 2580-2585.
- [106] Hide I, Bennett JP, Pizzey A, Boonen G, Bar-Sagi D, Gomperts BD, Tatham PE. Degranulation of Individual Mast Cells in Response to Ca²⁺ and Guanine Nucleotides: An All-or-None Event. *J Cell Biol*. 1993, 123: 585-593.
- [107] Peiser C, Groneberg D, Fischer A. Das therapeutische Arsenal - Pharmakotherapie allergischer Erkrankungen. *Kliniker* 2003. Berlin : Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003. S. 32. DOI: 10.1055/s-2003-39221.
- [108] Welker P, Lippert U, Nurnberg W, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Czarnetzki BM. Glucocorticoid-induced modulation of cytokine secretion from normal and leukemic human myelomonocytic cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996, 109: 110-115.
- [109] Lippert U, Welker P, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Henz BM. Modulation in vitro cytokine release from human leukemic mast cells (HMC-1) by glucocorticoides. *Skin Pharmacol*. 1996, 9: 93-98.
- [110] Stellato C, De Paulis A, Ciccarelli A, Cirillo R, Patella V, Casolaro V, Marone G. Anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human skin mast cells. *J Invest Dermatol*. 1992, 98: 800-804.
- [111] Meinicke H, Darcan Y, Hamelmann E. Targeting allergic airway diseases by siRNA: an option for the future? *Curr Mol Med*. 2009, 9: 483-494.
- [112] Suzuki M, Zheng X, Zhang X, Ichim TE, Beduhn ME, Min W. Oligonucleotide based-strategies for allergy with special reference to siRNA. *Expert Opin Biol Ther*. 2009, 9: 441-450.
- [113] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990, 2: 279-289.
- [114] van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. 1990, 2: 291-299.
- [115] Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol*. 2000, 18: 896-898.
- [116] Li YX, Farrell MJ, Liu R, Mohanty N, Kirby ML. Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev Biol*. 2000, 217: 394-405.
- [117] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001, 411: 494-

11. Literaturverzeichnis

498.

[118] Alton EW, Norris AA. Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1996, 98: 102-105.

[119] Cox, JS. Disodium cromoglycate. Mode of action and its possible relevance to the clinical use of the drug. *Br J Dis Chest.* 1971, 65: 189-20.

[120] Byrne SN, Limon-Flores AY, Ullrich SE. Mast cell migration from the skin to the draining lymph nodes upon ultraviolet irradiation represents a key step in the induction of immune suppression. *J Immunol.* 2008, 180: 4648-4655.

[121] Kim MS, Kim YK, Lee DH, Seo JE, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *Br J Dermatol.* 2009, 160: 393- 402.

[122] Chari S, Clark-Loeser L, Shupack J, Washenik K. A role for leukotriene antagonists in atopic dermatitis? *Am J Clin Dermatol.* 2001, 2: 1-6.

[123] Lippert U, Moller A, Welker P, Artuc M, Henz BM. Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2-receptor antagonists. *Exp Dermatol.* 2000, 9: 118-124.

[124] Baroody FM, Naclerio RM. Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy.* 2000, 55: 17-27.

[125] Mauer, Annika. Mast cells contribute to arteriogenesis in a PI3 Kinase γ -dependent manner. 2014.

[126] Fischer S, Preissner KT. Extracellular nucleic acids as novel alarm signals in the vascular system: mediators of defence and disease. *Hamostaseologie.* 2013, 33: 37-42.

[127] Dahm , R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet.* 2008, 122: 565-581.

[128] M. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information *Biochemie* (ed 6). s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 2007. Kapitel 4.

[129] Löffler, Georg. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* 7. Heidelberg : Springer Verlag, 2008. S. 243-263. ISBN 78-3-540-76511-0.

[130] Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin che l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948, 142: 241-3.

[131] Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology.* 2007, 39: 197-207.

[132] Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, Camussi G. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 2007, 110: 2440-2448.

[133] Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant meloma. *Clin Cancer Res.* 1999, 5: 1961-1965.

[134] Fischer S, Cabrera-Fuentes HA, Noll T, Preissner KT. Impact of extracellular RNA on endothelial barrier function. *Cell Tissue Res.* 2014, 355: 635-645.

11. Literaturverzeichnis

- [135] Cabrera-Fuentes HA, Ruiz-Meana M, Simseyilmaz S, Kostin S, Inserte J, ..., Fischer S, Lochnit G, Schlüter KD, Preissner KT. RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- α in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost.* 2014, 112: 1110-1119.
- [136] Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT. Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor. *Blood.* 2007, 110: 2457-2465.
- [137] Fischer S, Nishio M, Peters SC, Tschernatsch M, Walberer M, Weidemann S, Heidenreich R, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Gerriets T, Preissner KT. Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. *FASEB J.* 2009, 23: 2100-2109.
- [138] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995, 146: 1029-1039.
- [139] Goldman CK, Bharara S, Palmer CA, et al. Brain edema in meningiomas is associated with increased vascular endothelial growth factor expression. *Neurosurgery.* 1997, 40: 1269-1277.
- [140] Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain.* 2002, 125: 2549-2557.
- [141] Matsushita K, Yamakuchi M, Morrell CN, Ozaki M, O'Rourke B, Irani K, Lowenstein CJ. Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis. *Blood.* 2005, 105: 207-214.
- [142] Fischer S, Nishio M, Dadkhahi S, Gansler J, Saffarzadeh M, Shibamiyama A, Kral N, Baal N, Koyama T, Deindl E, Preissner KT. Expression and localisation of vascular ribonucleases in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2010, 105: 345-355.
- [143] Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Brühl ML, ..., Günther A, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 104: 6388-6393.
- [144] Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schuber U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT. Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J.* 2005, 385: 831-838.
- [145] Etscheid M, Hunfeld A, König H, Seitz R, Dodt J. Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism. *Biol Chem.* 2000, 381: 1223-1231.
- [146] Kannemeier C, Feussner A, Stöhr HA, Wisse J, Preissner KT, Römisch J. Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem.* 2001, 268: 3789-3796.
- [147] Romisch J, Vermohlen S, Feussner A, Stöhr H. The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators. *Haemostasis.* 1999, 29: 292-299.
- [148] Muhl L, Nykjaer A, Wygrecka M, Monard D, Preissner KT, Kanse SM. Inhibition of PDGF-BB by factor VII-activating protease (FSAP) is neutralized by protease nexin-1 and the FSAP-inhibitor complexes are internalized via LRP. *Biochem J.* 2007, 404: 191-196.

11. Literaturverzeichnis

- [149] Zeerleder S, Zwart B, te Velthuis H, Stephan F, Manoe R, Rensink I, Aarden LA. Nucleosome-releasing factor: a new role for factor VII-activating Protease (FSAP). *FASEB J.* 2008, 22: 4077-4084.
- [150] Muhl L, Galuska SP, OÖmi K, Hernandez-Ruiz L, Andrei-Selmer LC, Geyer R, Preissner KT, Ruiz FA, Kovanen PT, Kanse SM. High negative charge-to-size ratio in polyphosphates and heparin regulates factor VII-activating protease. *FEBS J.* 2009, 276: 4828-4839.
- [151] Kanse SM, Declerck PJ, Ruf W, Broze G, Etscheid M. Factor VII-Activating Protease Promotes the Proteolysis and Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012, 32: 427-433.
- [152] Stephan F, Aarden LA, Zeerleder S. FSAP, a new player in inflammation? *Hamostaseologie.* 2012, 32: 51-55.
- [153] Sedding D, Daniel JM, Muhl L, Hersemeyer K, Brunsch H, Kemkes-Matthes B, Braun-Dullaeus RC, Tillmanns H, Weimer T, Preissner KT, Kanse SM. The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation. *J Exp Med.* 2006, 203: 2801-2807.
- [154] Shibamiya A, Muhl L, Tannert-Otto S, Preissner KT, Kanse SM. Nucleic acids potentiate Factor VII-activating protease (FSAP)-mediated cleavage of platelet-derived growth factor BB and inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem J.* 2007, 404: 45-50.
- [155] Wygrecka M, Morty RE, Markart P, Kanse SM, Andreasen PA, Wind T, Guenther A, Preissner KT. Plasminogen activator inhibitor-1 is an inhibitor of factor VII-activating protease in patients with acute respiratory distress syndrome. *J Biol Chem.* 2007, 282: 21671-21682.
- [156] Zerneck A., Preissner KT. Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2016, 118: 469-479.
- [157] Simsekylmaz S, Cabrera-Fuentes HA, Meiler S, Konstin S, Baumer Y, Liehn EA, Weber C, Boisvert WA, Preissner KT, Zerneck A. The role of extracellular RNA in atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation.* 2014, 129: 598-606.
- [158] Kopreski MS, Benko FA, Gocke CD. Circulation RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum. *Ann NY Acad Sci.* 2001, 945: 172-178.
- [159] Wiczorek AJ, Rhyner C, Block LH. Isolation and characterization of an RNA-proteolipid complex associated with the malignant state in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985, 82: 3455-3459.
- [160] Chen XQ, Bonnefoi H, Pelte MF, Lyautey J, Lederrey C, Movarekhi S, Schaeffer P, Mulcahy HE, Meyer P, Stroun M, Anker P. Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000, 6: 3823-3826.
- [161] Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. *Histol Histopathol.* 2004, 19: 575-583.
- [162] Gaur D, Swaminathan S, Batra JK. Interaction of human pancreatic ribonuclease with human ribonuclease inhibitor: generation of inhibitor-resistant cytotoxic variants. *J Biol Chem.* 2001, 276: 24978-24984.

11. Literaturverzeichnis

- [163] Landre JBP, Hewett PW, Olivot JM, Friedl P, Ko Y, Sachinidis A, Moenner M. Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1). *J Cell Biochem.* 2002, 86: 540–552.
- [164] Weickmann JL, Olson EM, Glitz DG. Immunological assay of pancreatic ribonuclease in serum as an indicator of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1984, 44: 1682–1687.
- [165] Beintema JJ, Wietzes P, Weikmann JL, Glitz DG. The amino acid sequence of human pancreatic ribonuclease. *Anal Biochem.* 1984, 136: 48-64.
- [166] Beintema JJ, Hofsteenge J, Iwana M, Morita T, Ohgi K, Irie M, Sugiyama RH, Schieven GL, Dekker CA, Glitz DG. Amino acid sequence of the nonsecretory ribonuclease of human urine. *Biochemistry.* 1988, 27: 4530-4538.
- [167] Moenner M, Hatzi E, Bader J. Secretion of ribonucleases by normal and immortalized cells grown in serum-free culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997, 33: 553–561.
- [168] Walberer M, Tschernatsch M, Fischer S, Ritschel N, Volk K, Friedrich C, Bachmann G, Mueller C, Kaps M, Nedelmann M, Blaes F, Preissner KT, Gerriets T. RNase therapy assessed by magnetic resonance imaging reduces cerebral edema and infarct size in acute stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2009, 6: 12-19.
- [169] Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967, 13: 269-288.
- [170] George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood.* 1982, 60: 834-840.
- [171] Dainiak N, Riordan MA, Strauss PR, Feldman L, Kreczko S. Contractile proteins participate in release of erythroid growth regulators from mononuclear cells. *Blood.* 1988, 72: 165-171.
- [172] Raz A, Geiger B. Altered organization of cell-substrate contacts and membrane-associated cytoskeleton in tumor cell variants exhibiting different metastatic capabilities. *Cancer Res.* 1982, 42: 5183-5189.
- [173] Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997, 99: 2118-2127.
- [174] Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* 1999, 99: 348-353.
- [175] Beaudoin AR, Grondin G. Shedding of vesicular material from the cell surface of eukaryotic cells: different cellular phenomena. *Biochim Biophys Acta.* 1991, 1071: 203-219.
- [176] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972, 26: 239-257.
- [177] Kim J, Cha JH, Tisher CC, Madsen KM. Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. *Am J Physiol.* 1996, 270: 575-579.
- [178] Diamant M., Tushuizen M. E., Sturk A. and Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest.* 2004, 34: 392-400.
- [179] George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane

11. Literaturverzeichnis

microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest.* 1982, 78: 340-348.

[180] Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001, 85: 639f.

[181] Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000, 95: 930-935.

[182] Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes.* 2002, 51: 2840-2845.

[183] Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2002, 106: 2442-2447.

[184] Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med.* 2004, 53: 210-230.

[185] Mesri MC, Altieri D. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem.* 1999, 274: 23111-23118.

[186] Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001, 158: 277-287.

[187] Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Research.* 1988, 12: 345-355.

[188] Sundstrom M, Vliagoftis H, Karlberg P, Butterfield JH, Nilsson K, Metcalfe DD, Nilsson G. Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology.* 2003, 108: 89-90.

[189] Escribano L, Orfao A, Villarrubia J, Diaz-Agustin B, Cervero C, Rios A, Velasco JL, Ciudad J, Navarro JL, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of human bone marrow mast cells. A flow cytometric study of normal and pathological bone marrow samples. *Anal Cell Pathol.* 1998, 16: 151-159.

[190] Shimizu Y, Sakai K, Miura T, Narita T, Tsukagoshi H, Satoh Y, Ishikawa S, Morishita Y, Takai S, Miyazaki M, Mori M, Saito H, Xia H, Schwartz L. Characterization of 'adult-type' mast cells derived from human bone marrow CD34(+) cells cultured in the presence of stem cell factor and interleukin-6. Interleukin-4 is not required for constitutive expression of CD54, Fc epsilon RI alpha and chymase. *Clin Exp Allergy.* 2002, 32: 872-880.

[191] Stopfer P, Männel DN, Helgans T. Lymphotoxin-B Receptor Activation by Activated T Cells Induces Cytokine Release from Mouse Bone Marrow-Derived Mast Cells. *J Immunol.* 2004, 172: 7459-7465.

[192] Abel J, Goldmann O, Ziegler C, Höltje C, Smeltzer MS, Cheung AL, Bruhn D, Rohde M, Medina E. *Staphylococcus Aureus* Evades the Extracellular Antimicrobial Activity of Mast Cells by Promoting Its Own Uptake. *J Innate Immun.* 2011, 3: 495-507.

11. Literaturverzeichnis

- [193] Sly LM, Kalesnikoff J, Lam V, Wong D, Song C, Omeis S, Chan K, Lee CW, Siraganian RP, Rivera J, Krystal G. Ige-Induced Mast Cell Survival Requires the Prolonged Generation of Reactive Oxygen Species. *J Immunol.* 2008, 18: 3850-3860.
- [194] Holschbach, Martin. Antikörper-online. [Online] 06. 12 2013. [Zitat vom: 14. 10 2014.] <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>.
- [195] Laboratoire, Bio-Rad. Bio-Rad. [Online] TC20™ Automated Cell Counter. [Zitat vom: 29. 12 2017.] <http://www.bio-rad.com/de-de/product/tc20-automated-cell-counter>.
- [196] Löffler, George. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2008. S. 59. ISBN 978-3-540-76511-0.
- [197] Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *J.A.M.A.* 1967, 199: 519-524.
- [198] Cytotoxizität Dection KIT LDH . s.l. : Roche , Version 06 5/2011.
- [199] Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic release of beta- hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells. *J Immunol.* 1979, 123: 1445-1450.
- [200] Thierry AC, Bernasconi E, Mercenier A, Corthesy B. Conditioned polarized Caco-2 cell monolayers allow to discriminate for the ability of gut-derived microorganisms to modulate permeability and antigen-induced basophil degranulation. *Clin Exp Allergy.* 2009, 39: 527-536.
- [201] Gehlhar K, Peters M, Brockmann K, van Schijndel H, Bufe A. Characterization of modified allergen extracts by in vitro beta-hexosaminidase release from rat basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005, 136: 311-319.
- [202] Kempuraj D, Adadi S, Zhang B, Manola A, Hogan J, Peterson E, Theoharides TC. Mercury Induces Inflammatory Mediator Release from Human Mast Cells. *J Neuroinfl.* 2010, 7: 20.
- [203] McCall-Culbreath K, Li Z, Zhang Z, X Lu L, Orear L, Zutter M. Selective, A2β1 Integrin-Dependent Secretion of Il-6 by Connective Tissue Mast Cells. *J Innate Immun.* 2011, 3: 459-470.
- [204] Chatterjee S, Velicer LF, Sweeley CC. Glycosphingolipid glycosyl hydrolases and glycosidases of synchronized human KB cells. *J. Biol. Chem.* 1975, 250: 4972–4979.
- [205] Walker PG, Woollen JW, Heyworth R. Studies on glucosaminidase. 5. Kidney N-acetyl-β-glucosaminidase and N-acetyl-bgalactosaminidase. *Biochem. J.* 1961, 79: 288–294.
- [206] www.ibl-international.com. Histamine ELISA (RE59221); V2010_10. [Online] [Zitat vom: 10. 12 2017.] http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/f/i/file_109_14.pdf.
- [207] Fritsch, Peter. Dermatologie Venerologie 2. Auflage. Berlin : Springer Verlag, 2004. S. 34. Bd. 1. ISBN 978-3-662-065563.
- [208] Füreder W, Agis M, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, Müller MR, Czerwenka K, Radaszkiewicz T, Butterfield JH, Sperr WR, Lechner K, Valent P. Differential expression of complement receptors on human basophils and mastcells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* 1995, 155: 3152–3160.
- [209] Ghannadan M, Baghestanian M, Wimazal F, Eisenmenger M, Latal D, Kargül G, Wachshofer S, Sillaber C, Lechner K, Valent P. Phenotypic characterization of human skin mast cells by

11. Literaturverzeichnis

- combined staining with toluidine blue and CD antibodies. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 111: 689–695.
- [210] Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, Schwantz L. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005, 115: 1162–1168.
- [211] Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 1999, 83: 471–475.
- [212] Burgis, Eduard. *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. München : Elsevier GmbH, 2008. S. 260. ISBN 978-3-437-426131.
- [213] Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Research.* 1994, 54: 2419-2423.
- [214] Bers DM, Patton CW, Nuccitelli R. A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers. *Methods Cell Biol.* 1994, 40: 3-29.
- [215] Seya T, Hara T, Matsumoto M, Akedo H. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol.* 1990, 145: 238-245.
- [216] Nilsson G, Blom T, Kusche-Gulberg M, Kjellen L, Butterfield JH, Sundstrom C, Nilsson K, Hellman L. Phenotypic Characterization of the Human Mast-Cell Line HMC-1. *Scandinavian Journal of Immunology.* 1994, 39:489-498.
- [217] Müller J, Müller-Hermelink HK. *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. 11. München : Elsevier GmbH, 2008. S. 134ff. 978-3-437-41541-8.
- [218] Peter Karlson, Detlef Doenecke. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. [Hrsg.] Detlef Doenecke. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2005. S. 559. 9783133578158.
- [219] Fu T, Okano Y, Hagiwara M, Hidaka H, Nozawa Y. Bradykinin-induced translocation of protein kinases C in neuroblastoma NCB-20 cell: Dependence on 1,2-diacylglycerol content and free calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1989, 162: 1279-1286.
- [220] Golias Ch, Charalabopoulos A, Stagikas D, Charalabopoulos K, Batistatou A. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system - bradykinin. *Hippokratia.* 2007, 11: 124-128.
- [221] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 2006, 13: 816-825.
- [222] McGettrick AF, O'Neill LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr Opin Immunol.* 2010, 22: 20-27.
- [223] Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Wagner W, Dastyk J. HIF-1a is up-regulated in activated Mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT. *The Journal of Immunology.* 2008, 181: 1665-1672.
- [224] Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med.* 2007, 13:1211-1218.
- [225] Rodella LF, Rezzani R, Buffoli B, Bonomini F, Tengattini S, Laffranchi L, Paganelli C, Sapelli PL, Bianchi R. Role of mast cells in wound healing process after glass-fiber composite implant in

11. Literaturverzeichnis

rats. *J Cell Mol Med.* 2006, 10: 946-954.

[226] Ricci AJ, Gray-Keller M, Fettiplace R. Tonotopic variations of calcium signalling in turtle auditory hair cells. *J Physiol.* 2000, Bd. 524, 2: 423-436.

[227] Aupeix K., Hugel B., Martin T., Bischoff P., Lill H., Pasquali J.L., Freyssinet J.M. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997, 99: 1546-1554.

[228] Tans G, Rosing J, Thomassen MC, Heeb MJ, Zwaal RF, Griffin JH. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood.* 1991, 77: 2641-2648.

[229] Fox JE, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. Evidence that agonist-induced vation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem.* 1991, 266: 13289-13295.

[230] Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem.* 1988, 263: 18205-18212.

[231] Nomura S, Imamura A, Okuno M, Kamiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. Platelet-derived microparticles in patients with arteriosclerosis obliterans: Enhancement of high shear-induced microparticle generation by cytokines. *Thromb Res.* 2000, 98: 257-268.

[232] Mallat Z., Benamer H., Hugel B., Benessiano J., Steg P.G., Freyssinet J.M., Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000, 101: 841-843.

[233] Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, Horstman LL, Soriano AO, Zambrano J., Ahn YS. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol.* 2005, 45: 1467-1471.

[234] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of mircoRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008, 20: 847-856.

[235] Cabrera-Fuentes HA, Lopez ML, McCurdy S, Fischer S, Meiler S, Baumer Y, Galuska SP, Preissner KT, Boisvert WA. Regulation of monocyte/macrophage polarisation by extracellular RNA. *Thromb Haemost.* 2015, 113: 473-481.

[236] Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. RNA is closely associated with human

12. Publikationsverzeichnis

12 Publikationsverzeichnis

International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Kongress Juli 2017

„Inflammatory Activities of rRNA-containing Microparticles from Mast Cells“

Ann-Kathrin Elsemüller, Vanessa Y. Tomalla, Klaus T. Preissner, Silvia Fischer

The FASEB Journal 2019

„Characterization of mast cell-derived rRNA-containing microvesicles and their inflammatory impact on endothelial cells.“

Ann-Kathrin Elsemüller, Vanessa Y. Tomalla, Ulrich Gärtner, Kerstin Troidl, Sylvia Jeratsch, Johannes Graumann, Nelli Baal, Holger Hackstein, Manuel Lasch, Elisabeth Deindl, Klaus T. Preissner, Silvia Fischer

13. Ehrenwörtliche Erklärung

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14. Danksagung

14 Danksagung

Abschließend möchte ich mich gerne bei den Menschen bedanken, die mich während der Erstellung meiner Doktorarbeit begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Herrn Prof. Preissner möchte ich danken, da Sie es mir ermöglicht haben, in Ihrer Arbeitsgruppe die notwendigen Versuche durchzuführen. Sie haben mir nicht nur viel Geduld, sondern auch wertvolle Ratschläge entgegengebracht. In ausführlichen Gesprächen und anregenden Diskussionen haben Sie mir wichtige Denkanstöße gegeben und mir neue Perspektiven aufgezeigt. Bei jeder Phase dieser Doktorarbeit haben Sie mich interessiert und professionell unterstützt. Mit Ihrer kompetenten Hilfe haben Sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Silvia. Du hast mich während der gesamten Doktorarbeit toll betreut. Nicht nur bei der Einführung in die Laborarbeit und der Planung des Themas hast du mich tatkräftig unterstützt, sondern auch bei der weiteren Durchführung der Versuche und Auswertung der Ergebnisse. Bei jedem Problem hattest du stets ein offenes Ohr für mich. Durch deine kreativen Ideen, deine wegweisenden Denkanstöße und deine hilfsbereite Art hast auch du einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bärbel, dir möchte ich danken, weil du mich so klasse bei der Isolation der Mastzellen unterstützt hast. Ohne dich wäre ich nicht in der Lage gewesen, meine Versuche durchzuführen. Immer wieder hast du mir Fragen beantwortet und mir wo du konntest geholfen.

Annika, Barbara, Jessy, Julia, Silke, Susanne, Thomas und Uwe euch möchte ich für die nette Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima danken. Ihr habt mich wunderbar bei meinen ersten Schritten in der Laborarbeit begleitet, mir alles genau erklärt und geduldig meine Fragen beantwortet. Mit euren hilfreichen Ratschlägen und eurem Wissen habt ihr mir sehr weitergeholfen.

Auch Prof. Gärtner möchte ich danken. Ohne Sie wäre es mir nicht möglich gewesen Elektronenmikroskopbilder der Mastzellen zu erstellen. Durch Ihr großes Engagement haben Sie mir tatkräftig geholfen. Vielen Dank auch für die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung.

14. Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Schwester. Nicht nur während der Zeit der Doktorarbeit, sondern auch während des gesamten Studiums habt ihr immer an mich geglaubt. Ihr habt nie an mir gezweifelt, wart immer für mich da. Ihr habt euch meine Sorgen angehört, mich aufgemuntert und mich immer wieder zum Lachen gebracht. Ihr habt mir so oft den Rücken freigehalten und euch schützend hinter mich gestellt. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Dennis auch dir möchte ich Danke sagen! Von Anfang an bist du diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen. Du hast jede meiner Launen ertragen, mir Halt gegeben und mich wo du konntest unterstützt. Du hast mir immer wieder Mut gemacht. Du hast an mich geglaubt, wenn ich es selbst nicht konnte. Du hast mir Geduld gegeben, wenn ich sie selbst nicht hatte. Jedes noch so große Problem hast du mit deiner ruhigen Art relativiert. Zusammen mit unserem kleinen Sonnenschein hast du mir die nötige Kraft gegeben, um all das zu erreichen, was ich mir vorgenommen habe. Dafür bin ich dir so dankbar!