

Rolle von SNARE-Proteinen bei der Mediatorfreisetzung humaner Mastzellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Ernährungsmedizin

vorgelegt von
Simon P. C. Frank
aus Pforzheim
2010

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: PD Dr. Axel Lorentz
2. berichtende Person: Prof. Dr. Lutz Graeve
Eingereicht am: 19.02.2010
Mündliche Prüfung am: 03.05.2010

Die vorliegende Arbeit wurde am 15.04.2010 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

*Für meine Frau Luby
und meine Familie*

Zusammenfassung

Mastzellen sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge im Körper beteiligt. Sie verfügen über ein breites Spektrum an gespeicherten sowie *de novo* synthetisierten inflammatorisch wirksamen Mediatoren, weshalb sie nicht nur – wie ursprünglich angenommen – bei allergischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen detaillierten Einblick in die Prozesse der Mediatorfreisetzung reifer menschlicher Mastzellen zu vermitteln. Damit es zur Ausschüttung von Histamin, Proteasen, Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren kommen kann, müssen sekretorische Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren. An diesem Vorgang sind sogenannte SNARE-Proteine essenziell beteiligt. Diese werden allgemein in Vesikelmembran (v)- und Ziel (target) membran (t)-SNAREs eingeteilt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine ganze Reihe von SNAREs in humanen Darmmastzellen exprimiert werden. Die t-SNAREs SNAP-23, Syntaxin-2, -3, -4, -6 und Vti1b sowie die v-SNAREs VAMP-2, -3, -5, -7, -8 konnten klar nachgewiesen werden, während SNAP-25, Syntaxin-1b und VAMP-4 nur schwach exprimiert vorliegen. Durch eine anschließende Markierung dieser Proteine mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern konnte deren Lokalisation in der Zelle mikroskopisch dargestellt werden. Es zeigte sich eine deutlich plasmamembranständige Anordnung der t-SNAREs SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, während Syntaxin-2, Vti1b, VAMP-3, -7 und -8 in ruhenden Zellen zytoplasmatisch verteilt sind. Nach Aktivierung der Zellen änderte sich diese Anordnung jedoch für VAMP-7 und -8, die nach 15-minütiger Stimulation in Richtung Plasmamembran wanderten sowie Vti1b, das sich nach einer längeren Aktivierungsphase von 2 Stunden ebenfalls an den Zellrand verlagerte. In aktivierten Mastzellen gelang es außerdem, Kollokationen von SNAP-23, Syntaxin-3 und -4, VAMP-7 und -8 sowie Vti1b sichtbar zu machen. Mittels Ko-Immunpräzipitation wurden Komplexbildungen von SNAP-23 mit Syntaxin-4, VAMP-7 und -8 bestätigt.

Für die Aufklärung der funktionellen Bedeutung der jeweiligen SNARE-Proteine wurden einzelne SNAREs inhibiert. Nachdem Transfektionsversuche menschlicher Darmmastzellen mittels verschiedener Transfektionsreagenzien fehl schlugen, gelang es, Mastzellen per Elektroporation mit siRNA zu transfizieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass die elektrisch behandelten Zellen ihre Stimulierbarkeit verloren. Im Gegensatz dazu gelang ein Blockieren von SNARE-Proteinen unter Verwendung inhibitorischer Antikörper ohne negative Beeinflussung der Zellen. Interessanterweise zeigte sich bei einer ganzen Reihe von SNARE-Proteinen eine Beteiligung an Ausschüttungsprozessen in Mastzellen. Die Freisetzung der gespeichert vorliegenden β -Hexosaminidase wurde durch Antikörper gegen

SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, VAMP-7 und -8 sowie Vti1b nach einer Stimulationszeit von einer Stunde deutlich reduziert. Erstaunlicherweise schien im Gegensatz dazu VAMP-7 im Falle einer längeren Aktivierungszeit der Zellen von sechs Stunden keine Rolle mehr zu spielen. Die gleichen SNAREs waren außerdem auch für die Freisetzung von LTC₄ verantwortlich. Für die Ausschüttung der gemessenen Zytokine und Chemokine IL-5, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1α und MIP-1β zeigte sich eine uneinheitliche Beteiligung von SNARE-Proteinen. Allerdings ergab sich durch die Inhibition von SNAP-23, Syntaxin-3 und Vti1b für alle gemessenen Zytokine eine fast vollständige Blockade der Freisetzung. Des Weiteren verursachten Antikörper gegen Syntaxin-6 eine signifikante Reduktion der Ausschüttung von IL-5, IL-8 und MCP-1 sowie eine tendenzielle Verminderung von IL-6, MIP-1α und MIP-1β. Von den v-SNAREs VAMP-7 und -8 schien zum Teil das eine, zum Teil das andere für die Ausschüttung der verschiedenen Zytokine notwendig zu sein. Da für das Chemokin MIP-1β weder die Blockade von VAMP-7 noch VAMP-8 einen Effekt hervorriefen, könnte auch noch ein weiteres, nicht untersuchtes Mitglied der VAMP-Familie beteiligt sein. Die Inhibition von Syntaxin-4 führte nur für IL-8 zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der Freisetzung.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung verschiedener Mediatoren in humanen Darmmastzellen durch unterschiedliche SNAREs katalysiert wird und somit die Existenz spezifischer sekretorischer Vesikel und ein gezielter Transport von Mediatoren sehr wahrscheinlich sind. Eine Erklärung für die Beteiligung einer ganzen Reihe von SNARE-Proteinen an Ausschüttungsprozessen könnte sein, dass für das Ausbilden intrazellulärer Strukturen, die für die *compound exocytosis* notwendig sind, andere SNAREs verantwortlich sind, als für das Andocken von Vesikeln an der Plasmamembran.

Ein detailliertes Verständnis der Mechanismen und der Beteiligung spezifischer SNARE-Proteine an der Freisetzung verschiedener Mediatoren menschlicher Mastzellen könnte eine Grundlage für neuartige Behandlungsformen von Allergien und Asthma bilden. Neue Therapieansätze könnten darauf abzielen, durch das zeitweilige Ausschalten bestimmter SNARE-Proteine eine gezielte Reduktion der Mediatorenfreisetzung zu erreichen.

Abstract

Mast cells are involved in a variety of physiological and pathophysiological processes in the body. They possess a wide range of stored and *de novo* synthesized inflammatory mediators. Therefore they play an important role not only in allergic diseases - as it was originally assumed.

The aim of the present work is to acquire a more detailed insight into the processes of mediator release of human intestinal tissue mast cells. To enable the release of histamine, proteases, cytokines, chemokines and other substances, it is necessary that secretory vesicles fuse with the plasma membrane. In this process so-called SNARE proteins are essentially involved. They are generally divided into vesicle membrane (v)- and target membrane (t)-SNAREs.

The present work could show that a large number of SNAREs are expressed in human intestinal mast cells. The t-SNAREs SNAP-23, syntaxin-2, -3, -4, -6, Vti1b, and the v-SNAREs VAMP-2, -3, -5, -7, -8 could be clearly detected, while SNAP-25, Syntaxin-1b and VAMP-4 were expressed only slightly. A subsequent visualization of these proteins by coupling with fluorescence-marked antibodies showed their localization in the cell. There is a clear arrangement of the t-SNAREs SNAP-23, syntaxin-3, -4 and -6 at the plasma membrane, whereas syntaxin-2, Vti1b, VAMP-3, -7 and -8 are distributed in the cytoplasm in resting cells. However, after activation of the cells for 15 minutes, this arrangement changed for VAMP-7 and -8 which moved in the direction of the plasma membrane, as well as Vti1b, which shifted after a prolonged activation phase of 2 hours also towards the cell edge. In activated mast cells colocalization of SNAP-23, syntaxin-3 and -4, VAMP-7 and -8, as well as Vti1b could be demonstrated. Using co-immunoprecipitation complex formation of SNAP-23 with syntaxin-4, VAMP-7 and -8 was confirmed.

For the elucidation of the functional significance of individual SNARE proteins, respective SNAREs have been turned off. After transfection of human intestinal mast cells by using different transfection reagents failed, transfection of mast cells with siRNA by electroporation succeeded. However, it turned out that the electrically treated cells lost their ability to be stimulated. In contrast, blocking of the SNARE proteins achieved by using inhibitory antibodies was successful with no deterioration of cells. Interestingly enough it was revealed that a variety of SNARE proteins participate in degranulation processes in mast cells. The release of the prestored β -hexosaminidase was significantly reduced by antibodies against SNAP-23, syntaxin-3, -4 and -6, VAMP-7 and -8 and Vti1b after a stimulation time of one hour. It could be noted that VAMP-7 seemed to play no role anymore in the case of a prolonged activation time of six hours. The same SNAREs were also responsible for the

release of LTC₄. The liberation of the cytokines and chemokines IL-5, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 α and MIP-1 β showed an inconsistent involvement of SNARE proteins. However, inhibition of SNAP-23, syntaxin-3 and Vti1b resulted in almost complete blockage of the release of all measured cytokines. Furthermore, antibodies against syntaxin-6 caused a significant reduction in the secretion of IL-5, IL-8 and MCP-1 and a trend towards a reduction of IL 6, MIP-1 α and MIP-1 β . To different degrees both of the v-SNAREs VAMP-7 and -8 seemed to account individually for the release of different cytokines. Since release of the chemokine MIP-1 β was not affected neither by the blockade of VAMP-7 nor by VAMP-8, another non-studied member of the VAMP family could be involved. Inhibition of syntaxin-4 led only for IL-8 to a marked and significant reduction in the release.

In summary, it was shown that the release of different mediators in human intestinal mast cells is catalyzed by various different SNAREs and thus the existence of specific carriers and a targeted transport of mediators are very likely. One explanation for the involvement of a number of SNARE proteins in secretion processes may be that while some SNAREs are responsible for building up intracellular structures which are necessary for the compound exocytosis, some others are in charge of the docking of vesicles at the plasma membrane.

A detailed understanding of the mechanisms and the involvement of specific SNARE proteins in the release of various mediators of human mast cells is the basis for new forms of treatments for allergies and asthma. New therapeutic approaches might aim through the temporary deactivation of certain SNARE proteins to achieve an intended reduction of mediator release.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Allergische Erkrankungen	1
1.2 Mastzellen	2
1.2.1 Anatomie, Bildung und Vorkommen von Mastzellen	3
1.2.2 Mastzell-Heterogenität	4
1.2.3 Humane und murine Mastzell-Modellsysteme	5
1.2.4 Mastzellmediatoren	7
1.2.5 Aktivierung von Mastzellen	9
1.2.6 Hemmung von Mastzellwirkungen als Behandlung allergischer Erkrankungen	10
1.3 Ausschüttungsprozesse	12
1.3.1 Strukturelle Aspekte der Exozytose	12
1.3.2 Die Familie der SNARE-Proteine	13
1.3.3 Die Bildung und Auflösung des SNARE-Komplexes	16
1.4 Ziel dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer	19
2.2 Isolation von Mastzellen aus humaner Darmmukosa	25
2.3 Aufreinigung und Kultivierung von Darmmastzellen	26
2.4 Zellzählung und Differenzierung	27
2.5 Kultivierung von Mastzelllinien	28
2.6 Aktivierung von Mastzellen	29
2.6.1 Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors	29
2.6.2 Unspezifische Aktivierung	30
2.7 Mediatorenmessung	30
2.7.1 β -Hexosaminidase- Messung	30
2.7.2 Histamin-, Leukotrien- und Zytokinmessung	31
2.8 Gewinnung von RNA und reverse Transkription in cDNA	32
2.9 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.10 Agarose-Gelelektrophorese	33
2.11 Real-time quantitative PCR	33

2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	34
2.13	Fluoreszenzfärbung von SNARE-Proteinen	36
2.14	Ko-Immunpräzipitation	36
2.15	Transfektion von LAD2 und humanen Darmmastzellen mit siRNA	38
2.16	Durchflusszytometrie	38
2.17	Inhibition durch anti-SNARE Antikörper	39
2.18	Statistische Analysen	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Mediatorfreisetzung aus Mastzellen	41
3.1.1	Vergleich der Wirkung verschiedener Trigger auf die Ausschüttung gespeicherter Mediatoren	41
3.1.2	Expression und Freisetzung <i>de novo</i> synthetisierter Mediatoren	44
3.2	Expression von SNARE-Proteinen in humanen intestinalen Mastzellen	46
3.2.1	Nachweis von mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion	46
3.2.2	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	48
3.3	Intrazelluläre Lokalisation von SNARE-Proteinen in Mastzellen	49
3.4	Komplexbildung zwischen SNARE-Proteinen nach Aktivierung von Mastzellen	51
3.5	Rolle von SNARE-Proteinen bei der Freisetzung von gespeicherten und <i>de novo</i> synthetisierten Mediatoren	52
3.5.1	Transfektion von Mastzellen mit siRNA	52
3.5.2	Einbringen von neutralisierenden Antikörpern in humane Darmmastzellen	59
3.5.3	Analyse der Freisetzung gespeicherter Mediatoren nach Inhibition von SNAREs	60
3.5.4	Analyse der Freisetzung <i>de novo</i> synthetisierter Mediatoren nach Inhibition von SNAREs	61
4	Diskussion	66
4.1	Mediatorenfreisetzung und Zytokinexpression	66
4.2	SNARE-Expression	68
4.3	Lokalisation und Interaktionen von SNARE-Proteinen	70
4.4	Funktionelle Bedeutung von SNARE-Proteinen bei der Mediatorfreisetzung	72
4.5	Ausblick	79
5	Literaturverzeichnis	81
6	Danksagung	100
7	Lebenslauf	101
8	Publikationsliste	102
9	Erklärung	103

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein
AFM	Rasterkraftmikroskopie
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymvermittelter Immuno(sorbent)assey
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcεRI	hochaffine IgE-Rezeptor
FcεRII	niedrigaffine IgE-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
kDa	Kilodalton
M	Molar
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
mAk	Monoklonaler Antikörper
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
mM	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MC	Mastzelle/n
MC _T	Tryptase positive und chymase negative Mastzellen
MC _{TC}	Tryptase und Chymase positive Mastzellen
n	Anzahl der Versuche
NSF	<i>(ATPase) N-ethylmaleimide-sensitive-factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	Standardfehler
SLO	Streptolysin O
SNAP	<i>Soluble NSF attachment proteins</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
Stx	Syntaxin
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBST	Tween-20-Tris-gepufferter Saline
U	<i>Unit</i>
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vti1b	<i>Vesicle transport through interaction with t-SNARE homologue 1b</i>
v/v	<i>Volume per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

Allergische Erkrankungen nahmen in den letzten Jahrzehnten besonders in den westlichen Industrienationen deutlich zu und zählen inzwischen zu den häufigsten chronischen Erkrankungen [1-3]. In Deutschland leiden heute über 30 % der Bevölkerung an Allergien [4]. Vor 30 Jahren betrug der Anteil der Allergiker lediglich 10 % [5]. Als Grund hierfür wird der veränderte Lebensstil angenommen. Die Hygienehypothese postuliert, dass die zunehmend hygienische Lebensweise zu einer mangelnden Stimulation der T_H1 -Antwort des Immunsystems führt, was ein Überschießen der T_H2 -Antwort und somit den Ausbruch von allergischen Reaktionen zur Folge hat. Dieser Zusammenhang wird jedoch kontrovers diskutiert [6-8]. Inzwischen werden zahlreiche andere Faktoren für eine Zunahme allergischer Erkrankungen verantwortlich gemacht. Hierzu zählt eine veränderte medizinische Versorgung, Auslandsreisen und die damit gehäuften Kontakte mit fremden Allergenen, die Zunahme von Luftschadstoffen wie Feinstaub [9;10] und eine Veränderung in den Ernährungsgewohnheiten wie z. B. eine verminderte Aufnahme von antioxidativen Vitaminen durch frisches Obst und Gemüse [11], eine erhöhte Vitamin D Zufuhr [12] und ein Wechsel von tierischen zu pflanzlichen Fetten [13].

Der Begriff Allergie wurde erstmals 1906 von dem österreichischen Kinderarzt und Universitätsprofessor Clemens Peter Freiherr von Pirquet verwendet [14]. Er erkannte als erster, dass Antikörper nicht nur schützende Immunantworten vermitteln, sondern auch Ursache von Überempfindlichkeitsreaktionen sein können. Die typische Allergie, bei der die Symptome bereits Minuten bis Stunden nach Allergenkontakt auftreten, wird als Typ I-Allergie bezeichnet. Dem vorausgehend muss jedoch zuerst eine Sensibilisierung des Immunsystems stattgefunden haben. Makrophagen und andere antigenpräsentierende Zellen wie z. B. dendritische Zellen phagozytieren körperfremde Stoffe und prozessieren diese in kleine Antigenfragmente, welche sie auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Naive T-Lymphozyten (T_H0 , $CD4^+$) erkennen die degradierten Antigenfragmente und differenzieren zu T_H2 -Zellen aus. Als Folge dessen schütten diese Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 aus. Das autokrine Zytokin IL-4 spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Entwicklung von T_H2 -Zellen [15;16]. IL-5 unterstützt unter Mitwirkung von IL-4 und IL-13 das Überleben von eosinophilen Granulozyten und deren Blutinvasion aus dem Knochenmark [17;18]. Durch den Einfluss von IL-4 und IL-13 kommt es zum *Isotyp-switch* bestimmter B-Zellen zu Plasmazellen, welche große Mengen von Immunglobulin E (IgE) bilden und freisetzen [19]. Das im Körper zirkulierende IgE bindet mit der *Fc*-Rezeptor-Bindungsstelle an seinem

Immunglobulinrezeptor (FcεR). Von diesem sind zwei Typen bekannt: Der niedrig-affine FcεRII ist auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Thrombozyten und dendritischen Zellen [20] zu finden, während der hochaffine FcεRI von Mastzellen, Basophilen und aktivierten Eosinophilen [21] exprimiert wird. Nach dieser bis zu diesem Zeitpunkt völlig ohne Symptome ablaufenden Sensibilisierung reicht schon ein weiterer Allergenkontakt aus, um die ganze Bandbreite der allergischen Beschwerden auszulösen. Auf der Zellmembran von Mastzellen gebundene IgE-Antikörper binden bei Exposition des entsprechenden Allergens an dieses, wodurch es zur Vernetzung (engl. *crosslinking*) von mindestens zwei FcεRI kommt. Dies stellt für die Mastzelle das Signal zur Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren dar, welche dann z. B. die Sekretion von Schleim, eine Erhöhung der Permeabilität kleiner Blutgefäße und eine Stimulation freier Nervenendigungen verursachen [22].

Der Leidensdruck von Allergikern ist durch die charakteristischen Symptome wie laufende Nase, Juckreiz, Hautausschlag, Atembeschwerden bis hin zum lebensbedrohenden anaphylaktischen Schock sehr hoch. Die symptomatische Behandlung von Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale, der atopischen Dermatitis, der Rhinokonjunktivitis, der chronischen Urtikaria, Nahrungsmittelallergien oder anaphylaktischen Reaktionen stellt somit eine große medizinische Herausforderung dar.

1.2 Mastzellen

Seit ihrer Entdeckung konnten Mastzellen immer neue Funktionen zugeordnet werden. Für die ursprünglich hauptsächlich als Entzündungszellen angesehenen Mastzellen wurden im Laufe der Zeit vielfältige weitere Funktionen entdeckt, wodurch ein genaueres Verständnis dieses Zelltyps entstand. Eine grundlegende Eigenschaft von Mastzellen ist ihre Fähigkeit, beträchtliche Mengen an Mediatoren auszuschütten. Die massive Freisetzung von Histamin ist der Grund dafür, dass Mastzellen eine Schlüsselfunktion bei akuten und chronischen allergischen Erkrankungen spielen [23-25]. Des Weiteren sind Mastzellen bei einer Vielzahl weiterer pathologischer sowie physiologischer Prozesse im Körper beteiligt. Während ihre Gewebdichte in den meisten Organen unter gesunden Bedingungen gering ist, kann sie bei krankhaften Veränderungen bis zu 50-fach ansteigen [26;27].

Bei den chronischen inflammatorischen Darmerkrankungen Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa* [28], der *Clostridium difficile* induzierten Enteritis [29] und Gastritis [30] wird Mastzellen eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben. Mastzellen sind außerdem involviert in neurologischen Erkrankungen [31], der rheumatischen Arthritis [32], der Herzinsuffizienz [33], bei Autoimmunerkrankungen [34] wie z. B. der Multiplen Sklerose [35] und bei der

Abwehr von Bakterien, Parasiten [36] und Viren [37]. So findet bei den Infektionen mit einigen Parasiten eine starke Vermehrung von Mastzellen statt, welche einen gewissen Schutz und eine reduzierte Ausbreitung des Parasiten gewährleistet [38]. Außerdem kommt Mastzellen eine Schutzfunktion gegen UV-Strahlung, Bienen- und Schlangengift zu [39;40]. Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen konnte ebenfalls die Beteiligung von Mastzellen nachgewiesen werden. Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Akkumulation von Mastzellen und deren Mediatoren am Tumorrand die Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren unterstützt oder ob die mastzellvermittelte Rekrutierung von Immunzellen zur Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen beitragen kann [41;42]. Auch im Rahmen von Geweb umbauprozessen und der Wundheilung scheint Mastzellen eine bedeutende Rolle zuzukommen, da ihre Ausschüttungsprodukte zur akuten Blutstillung als auch zur späteren Angiogenese und Re-epithelialisierung beitragen [43;44].

1.2.1 Anatomie, Bildung und Vorkommen von Mastzellen

Nachdem Friedrich Daniel von Recklinghausen 1863 an Schnitten des ungefärbten Froschmesenteriums eine bis dahin unbekannte Zelle nachwies [45], beschrieb Paul Ehrlich diesen Zelltyp im Jahr 1878 ausführlich in seiner Dissertation über histologische Färbungen [46]. Der Name „Mastzelle“ geht auf die Annahme zurück, die 10–20 µm große Zelle habe die Fähigkeit zur Phagozytose und erreiche so ihr „gemästetes“ Erscheinungsbild. Jedoch bildet die Zelle die bis zu 1000 in ihr gespeicherten sekretorischen Granula selbst, welche sich im Zytoplasma anreichern und bis zu 40 % des Zellvolumens ausfüllen [47]. Diese 300–1000 nm großen Granula lassen sich durch den basischen Farbstoff Toluidinblau violett färben und sind ein typisches Merkmal für die Anatomie der mononukleären Mastzellen. Der runde, meist zentral gelegene Zellkern zeigt im Gegensatz zu den metachromatisch gefärbten Granula eine blaue Färbung [48].

Mastzellen werden im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen als CD34⁺/CD117⁺ gebildet und verlassen vermutlich unter Einfluss des *stem cell factor* (SCF) das Knochenmark und zirkulieren dann als CD34⁺/CD117⁺/CD13⁺ Vorläuferzellen im Blut. Diese wandern durch chemotaktisch wirkende Faktoren rekrutiert in ihr Zielgewebe ein und entwickeln sich dort unter dem Einfluss verschiedener lokaler Wachstumsfaktoren zur reifen Mastzelle mit ihren charakteristischen membranständigen IgE-Rezeptoren, ihrem SCF-Rezeptor (c-Kit/CD 117) und ihren ausgereiften Granula [49;50]. Die Bedeutung von SCF für die Entwicklung von Mastzellen konnte in Mäusen mit einer defekten SCF-Expression oder einer defekten Expression des SCF-Rezeptors gezeigt werden, welche beide zu mastzelldefizienten Mäusen führen [51;52]. Auch für das weitere Überleben ist SCF

unerlässlich und ein Fehlen führt schon nach 5–6 Stunden zur Einleitung einer Signalkaskade, die in der Zellapoptose endet [53].

Zu finden sind die langlebigen Mastzellen in allen vaskularisierten Geweben, wo sie sich bevorzugt in der Nähe von Blut- und Lymphgefäßen, Nerven, glatten Muskelzellen, Schleim-produzierenden Drüsen und Haarfollikeln aufhalten. Besonders zahlreich sind sie in Bereichen, die an die äußere Umgebung grenzen, wie der Haut und den Schleimhäuten, speziell der Submukosa der Atemwege, der Nase und des Gastrointestinaltraktes [54-56]. In geringerer Zahl sind die fast ubiquitär verbreiteten Zellen hingegen in parenchymatösen Organen wie der Niere, der Leber, des Herzens und des Gehirns vorhanden und nur in Knorpelgewebe lassen sich so gut wie keine Mastzellen nachweisen [57-60]. Eine Vermehrung von Mastzellen im Gewebe durch Proliferation konnte bisher nicht überzeugend gezeigt werden [61]. Es ist daher anzunehmen, dass eine erhöhte Mastzellzahl, wie sie in pathologischen Prozessen auftreten kann, durch Vermehrung der Vorläuferzellen im Knochenmark, verstärkte Zirkulation im peripheren Blut und/oder ein vermehrtes Einwandern und Ausdifferenzieren im Gewebe sowie eine verminderte Apoptose zustande kommt.

1.2.2 Mastzell-Heterogenität

Mastzellen werden durch charakteristische Eigenschaften definiert, die allen Mastzellen gemein sind. Trotz dieser Gemeinsamkeiten besteht zwischen Mastzellen unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Lokalisation eine starke Heterogenität in Bezug auf ihre morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften [62-64]. Hardy und Westbrook veröffentlichten bereits im Jahr 1895 ihre Vermutungen von der Existenz verschiedener Subpopulationen von Mastzellen, die sich in unterschiedlichen anatomischen Regionen in ihrer Morphologie unterscheiden [65]. Wenige Jahre später stellte Maximow Unterschiede in der histochemischen Anfärbbarkeit bestimmter Mastzellen fest [66]. Seit den 60er Jahren beschäftigte sich insbesondere Enerbäck mit verschiedenen Mastzellpopulationen und beschrieb detailliert histochemische Unterschiede zwischen Mastzellen des Bindegewebes und der intestinalen Mukosa von Ratten [67-69]. Seitdem wurden auch in zahlreichen anderen Spezies unterschiedliche Mastzell-Subpopulationen nachgewiesen, deren Einteilung sich jedoch oft schwierig gestaltet und kontrovers diskutiert wird.

Murine Mastzellen werden anhand ihrer Lokalisation, ihrer Größe und unterschiedlichen Färbereigenschaften in Bindegewebs-Mastzellen (*connective tissue mast cells*, CTMC) und Schleimhaut-Mastzellen (*mucosal mast cells*, MMC) unterteilt [54]. Funktionell unterscheiden sich die größeren CTMC von den MMC dadurch, dass sie durch Compound 48/80 und Substanz P stimulierbar sind [54]. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich die

Zugehörigkeit der Mastzellen zu CTMC und MMC in Abhängigkeit der organspezifischen Umgebung umkehren kann [70;71].

Humane Mastzellen werden üblicherweise - je nach ihrem Proteasegehalt in den Granula - in zwei Subklassen unterteilt. Mastzellen, die Tryptase und Chymase enthalten, werden MC_{TC} genannt, während Zellen die nur Tryptase exprimieren als MC_T bezeichnet werden. MC_{TC} werden vorzugsweise in der Haut und der intestinalen Submukosa gefunden, wo sie über 80 % der Mastzellen repräsentieren [72]. Sie sind aber auch in der glatten Bronchialmuskulatur und in Drüsengewebe angesiedelt [73]. MC_T bilden hingegen mit über 90 % die Mehrheit in der intestinalen Mukosa und werden vermehrt in der Alveolarwand und den Epithelien der Lunge sowie in malignen Tumoren gefunden [74;75]. Morphologisch und histochemisch betrachtet unterscheiden sich MC_{TC} und MC_T nicht. Beide Subtypen besitzen die gleiche Größe und den gleichen Gehalt an Histamin, Heparin und anderen Mediatoren [76;77]. In funktioneller Hinsicht scheint die Lokalisation und das damit verbundene Mikromilieu einen deutlich größeren Einfluss auf die Eigenschaften der Mastzelle auszuüben. So lassen sich zum Beispiel Hautmastzellen (ca. 99 % MC_{TC}) durch die Agonisten Substanz P, Compound 48/80 oder Morphin stimulieren, während weder MC_T , noch MC_{TC} aus dem Darm oder der Nasenschleimhaut mit diesen Stimuli aktivierbar sind [76]. Auch unterscheiden sich Mastzellen aus der Lunge, dem Darm, der Haut und dem Herzen in der Synthese von Lipidmediatoren wie Cysteinyl-Leukotrienen oder Prostaglandin D2 nach der Aktivierung über den IgE-Rezeptor [78].

Da verschiedenartige Mastzellsubpopulation existieren, ist es nur bedingt möglich, Ergebnisse, die mit Mastzellen unterschiedlicher Spezies und Herkunft gewonnen wurden, miteinander gleichzusetzen.

1.2.3 Humane und murine Mastzell-Modellsysteme

Mastzellen sind seit ihrer Entdeckung von besonderem Interesse für die Forschung. Eine große Schwierigkeit besteht jedoch in der Gewinnung einer ausreichend hohen Anzahl von Zellen mit der entsprechenden Reinheit. Es wurden verschiedene *in vitro* Kultursysteme aus Vorläuferzellen unterschiedlicher Reifungsstadien entwickelt. Dazu gehören die *Bone marrow derived mast cells* (BMMC), die aus unreifen Zellen aus dem Knochenmark gewonnen werden [79;80]. Nach mehrwöchiger Kultivierung in serumhaltigem Medium, mit *stem cell factor* (SCF) sowie Interleukin (IL)-6 und wahlweise IL-10, entwickeln sich MC_{TC} charakteristische Zellen. Zusätzlich zu den gewünschten Mastzellen entwickeln sich jedoch auch dendritische Zellen [81]. Eine weitere Möglichkeit ist die Isolierung von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut. Da dieses nur wenige $CD34^+$ Zellen beinhaltet, werden relativ

große Mengen an Blut benötigt, weshalb die Verwendung von *Buffy-Coats* als Quelle vorteilhaft ist [82]. Die in serumfreiem Medium unter Zusatz von SCF, IL-6 und IL-3 und je nach Protokoll auch IL-9 und IL-4 kultivierten *Peripheral blood derived mast cells* (PBMC) besitzen ebenfalls Eigenschaften von MC_{TC} Zellen mit in Abhängigkeit der zugegebenen Zytokine recht unterschiedlichem Verhalten auf verschiedene Stimulantien [83;84]. Nabelschnurblut enthält im Gegensatz zu peripherem Blut eine hohe Anzahl von CD34⁺ Vorläuferzellen sowie mononukleären Zellen. Durch Kultivierung dieser CD34⁺ Vorläuferzellen in serumfreiem Medium mit SCF, IL-3 und IL-6 sowie der mononukleären Zellen mit serumhaltigem Medium, SCF und IL-6, erhält man MC_{TC} charakteristische *Cord blood derived mast cells* (CBMC) [85;86]. *Fetal liver derived mast cells* (FLMC) werden aus mononukleären Zellen der fetalen Leber durch Kultivierung in serumhaltigem Medium gewonnen und exprimieren primär Tryptase. Werden die Zellen in ein serumfreies Medium überführt, lassen sich mehr Chymase-positive Zellen finden. FLMC sind die einzigen aus Vorläuferzellen gewonnenen Mastzellen, die nicht von sich aus den IgE-Rezeptor FcεRI exprimieren, was jedoch durch IL-4 induziert werden kann [87;88].

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Mastzelllinien. Zu den bekanntesten und weitverbreitetsten murinen Mastzelllinien gehören die RBL-2H3 Zellen. Diese Zelllinie entstand aus Leukämiezellen, die einer Ratte nach der Behandlung mit dem chemischen Karzinogen β-chlorethylamine entnommen wurden [89]. Die Tatsache, dass RBL-2H3 Zellen aus basophilen Tumorzellen hervorgehen und einige typische Basophilen-Eigenschaften besitzen, wird häufig vergessen [90;91]. Zahlreiche Studien über die Interaktion von IgE mit seinem Rezeptor sowie zu den Signalwegen der Degranulation und Untersuchungen neuartiger Mastzellstabilisatoren wurden mit ihnen durchgeführt [92-94]. Dabei sollte beachtet werden, dass RBL-2H3 Zellen verschiedener Labore keine hundertprozentig einheitliche Zelllinie darstellt, sondern sich z. B. in ihrer IgE-Rezeptordichte und dessen Molekulargewicht und sich somit auch in ihrem Ausschüttungsverhalten unterscheiden [95;96]. Ergebnisse, die mit der RBL-2H3 Zelllinie gewonnen wurden, sollten daher kritisch in Bezug auf Ihre Reproduzierbarkeit hinterfragt werden und sind nur teilweise auf primäre Mastzellen übertragbar [97].

Bis heute existieren nur wenige humane Mastzelllinien. Die Zelllinie HMC-1 wurde erstmals im Jahr 1988 von Butterfield vorgestellt [98]. Sie stammt aus dem peripheren Blut eines Mastrozytose-Patienten. Inzwischen existieren zwei Subkolonien, HMC-1.1 und HMC-1.2. Beide besitzen unterschiedliche Mutationen für den c-Kit Rezeptor, die eine Autophosphorylierung von c-Kit verursachen und somit für eine dauerhafte Aktivierung sorgen [99]. Dies ist der Grund, weshalb diese Zelllinie nicht auf SCF angewiesen ist und sich die Zellen somit von primären Mastzellen deutlich unterscheiden. HMC-1 Zellen

exprimieren 0,9 pg/Zelle Histamin [100] sowie Tryptase und Chymase, was sie den MC_{TC} zugehörig sein lässt. Sie exprimieren außerdem FcεRI, jedoch in einer sehr uneinheitlichen Weise, was die wechselhafte IgE-vermittelte Aktivierung und die hohe spontane Ausschüttung von ca. 20 % erklärt [101].

Eine weitere, im Jahr 2003 beschriebene humane Mastzelllinie, ist die LAD-Zelllinie, von der die beiden Untergruppen LAD1 und LAD2 existieren [100]. Diese Zellen wurden aus dem Knochenmark eines Mastozytosepatienten gewonnen und besitzen ähnliche Eigenschaften wie aus CD34⁺ Blutvorläuferzellen gewonnene Mastzellen. Die 8–15 µm großen Zellen besitzen keine Mutation für c-Kit und benötigen somit essentiell SCF um zu überleben. Sie besitzen eine hohe Telomerase-Aktivität im gesamten Zellzyklus, exprimieren funktionell aktivierbare FcεRI und FcγRI und lassen sich über eine Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren stimulieren. Außerdem exprimieren sie Histamin, Tryptase und Chymase, wodurch sie sich als MC_{TC} charakterisieren. Der Histamingehalt liegt bei den LAD1 bei 6,5 pg/Zelle und bei LAD2 Zellen bei 3,1 pg/Zelle [100]. Ihre lange Verdopplungszeit von 2–3 Wochen sowie die Abhängigkeit von SCF und dem teuren StemPro-34-Medium, machen sie zu einer kostenintensiven Zelllinie.

Die wohl beste Art für möglichst naturgetreue Untersuchungen gewebespezifischer Mastzellen, ist deren Isolation aus dem jeweiligen Gewebe. Für das enzymatische Auslösen von Mastzellen aus der Lunge, den Mandeln, der Haut, den Drüsen, der Gelenkflüssigkeit und der Darmmukosa und deren Aufreinigung gibt es unterschiedliche Methoden, die alle sehr zeitaufwendig sind [76;102-105].

1.2.4 Mastzellmediatoren

Das Spektrum der Mastzell-Mediatoren ist vielfältig und erklärt die vielseitigen Funktionen von Mastzellen. In Granula gespeicherte Substanzen können innerhalb kurzer Zeit nach Aktivierung der Zelle freigesetzt werden, wohingegen deren Regeneration und Rekonstitution bis zu 72 Stunden dauern kann [47]. Im Vergleich dazu ist die Wiederherstellung von neuronalen Vesikeln sehr schnell und benötigt nur ca. eine Sekunde [47;106]. Zu den bedeutendsten gespeicherten Mediatoren zählt das biogene Amin Histamin, welches eine Vielzahl von Effekten in allergischen und entzündlichen Prozessen auslöst. Dazu gehört z. B. die Kontraktion von Muskeln, die vasoaktive Wirkung auf Blutgefäße und der Juckreiz, der durch Nervenzellen vermittelt wird [107]. Weitere Stoffe, die sofort nach Stimulation ausgeschüttet werden können, sind die Proteasen Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase und die Glykosaminoglykane Heparin und Chondroitinsulfat [55]. Von Mastzellen bestimmter Gewebe ist bekannt, dass sie auch einige Zytokine wie TNF-α und

IL-8 präformiert exprimieren und somit unmittelbar nach Aktivierung freisetzen können [108;109]. Der schnellen Freisetzung von präformierten Mediatoren folgt bei der Typ I Hypersensitivitätsreaktion, auch bekannt als Anaphylaktische Reaktion, eine optionale Spätphase. Diese ist charakterisiert durch die Expression von Leukotrienen, Prostaglandin und einer Vielzahl von Zytokinen, einschließlich Interleukinen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Interferon und Tumornekrosefaktor [110-112]. Eine Übersicht über Mediatoren, die von Mastzellen freigesetzt werden können, ist in Tabelle 1 dargestellt.

Mediatoren humaner Mastzellen
<p>Biogene Amine Histamin, Serotonin</p>
<p>Proteasen und andere Enzyme Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase, MMP-9, β-Hexosaminidase</p>
<p>Proteoglykane (Glykosaminoglykane) Heparin, Chondroitinsulfat</p>
<p>Eikosanoide Leukotriene (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), Prostaglandin D₂, PAF</p>
<p>Zytokine</p> <p>Interleukine IL-1α, IL-1β, IL-1R Antagonist, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-18</p> <p>Interferone IFNγ</p> <p>Tumornekrosefaktoren TNF-α</p> <p>Wachstumsfaktoren GM-CSF, M-CSF, EGF, β-FGF, NGF, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF-β1, VEGF</p> <p>Chemokine CCL1, Eotaxin, Gro-α, Gro-β/MIP-2α, Gro-γ/MIP-2β, IL-8, IP-10, LARC, Lymphotoctin, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, TARC</p>
<p>Freie Radikale Stickoxide, Superoxide</p>
<p>Andere Corticotropin-releasing factor, Urocortin, Substanz P, Sphingosine-1-phosphate (S1P)</p>

Tabelle 1: Zusammenfassung der bisher bekannten Mastzellmediatoren

1.2.5 Aktivierung von Mastzellen

Die Ausschüttung von Mediatoren ist ein komplexer Vorgang, der durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst wird. Abhängig vom jeweiligen Aktivierungsmechanismus und der Stärke des Impulses, schütten Mastzellen entweder ein breites Spektrum an Substanzen oder eine bestimmte Untergruppe von Mediatoren aus [56;113;114]. Der physiologisch bedeutsamste Reiz für eine Degranulation ist das Kreuzvernetzen von an dem hochaffinen IgE-Rezeptor gebundenen IgE-Molekülen durch ein spezifisches Antigen oder Allergen [115]. Der FcεRI-Rezeptor besteht aus 4 Untereinheiten: der IgE-bindenden α-Kette, der *tetraspanning* β-Kette und zwei Disulfid-verknüpften γ-Ketten [116]. Die Gruppierung des Rezeptors führt zu einer Reihe von molekularen Ereignissen, die in der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und dem Auslösen von Kalziumsignalen mündet. Diese Erhöhung des Kalziumspiegels wiederum befähigt die Mastzelle zur Degranulation [117]. IgE kann zwar auch an die IgG Rezeptoren FcγRII und FcγRIII, sowie galectin-3 binden, die von einigen Mastzell-Populationen exprimiert werden, man nimmt jedoch an, dass die hauptsächliche Funktion von der Interaktion mit dem FcεRI-Rezeptor ausgeht [113;117]. Neben der Aktivierung über den FcεRI-Rezeptor, gibt es noch weitere Arten der Mastzellaktivierung. Hierzu zählen Pathogene, einschließlich Bakterien, Viren, Parasiten und deren löslichen Stoffwechselprodukte, welche in der Lage sein können, Mastzellen zu stimulieren. Mikrobielle Stoffwechselprodukte aktivieren Mastzellen direkt über *Toll-like*-Rezeptoren oder Rezeptoren für bakterielle Toxine oder indirekt z. B. über die Aktivierung des Komplementsystems. Dies verursacht wiederum die Bildung von Produkten, die mit den entsprechenden auf der Mastzelle exprimierten Rezeptoren interagieren [114;118]. Weiterhin sind eine Vielzahl endogener und exogener Peptide, Zytokine und andere inflammatorische Mediatoren in der Lage, Mastzellen zu aktivieren [56;119;120]. Auch SCF, der wichtigste Wachstumsfaktor für Mastzellen, verstärkt die IgE-abhängige Mediatorenausschüttung, kann aber auch direkt die Degranulation von Mastzellen verursachen [121]. IL-4 erhöht die Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin und Leukotrienen in humanen Darmmastzellen. Außerdem verursacht IL-4 eine Verschiebung von pro-inflammatorischen Zytokinen hin zu T_H2-typischen Zytokinen wie IL-3, IL-5 und IL-13, nach einer IgE-abhängigen Stimulation [110;122].

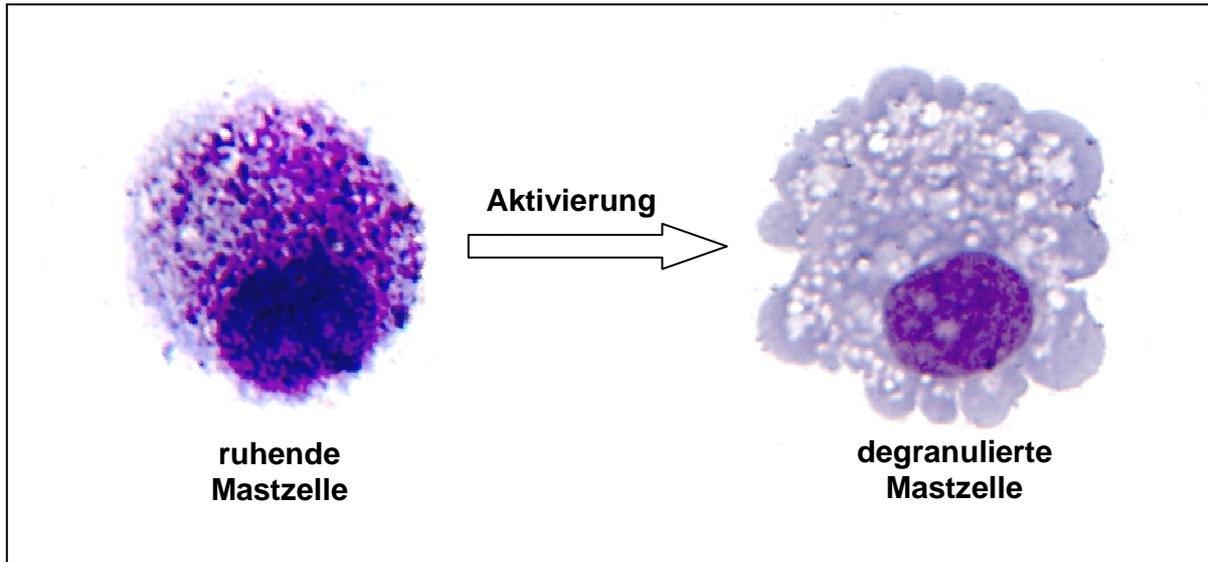


Abbildung 1: Degranulation einer humanen Darmmastzelle. Nach der Stimulation der Zelle verschmilzt ein großer Teil der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran, wodurch es zu einer deutlichen Strukturveränderung der Zelle kommt.

1.2.6 Hemmung von Mastzellwirkungen als Behandlung allergischer Erkrankungen

Bei der Verminderung allergischer Symptome gibt es eine Reihe von möglichen Angriffspunkten. Neben der kausalen Therapie, d. h. Karenzmaßnahmen, De- bzw. Hyposensibilisierung und dem Abfangen von IgE mit monoklonalen anti-IgE-Antikörpern, entwickeln sich zunehmend alternative Behandlungsformen. Da weltweit eine auffällige gegenläufige Korrelation zwischen parasitären Erkrankungen und Allergien festzustellen ist, stellt die kontrollierte Applikation eines harmlosen Nematoden oder aus diesem gewonnene immunmodulierende Proteine eine Alternative gegen schwerwiegende entzündliche Erkrankungen dar [123;124].

Das bedeutendste Standbein der Intervention allergischer Erkrankungen bildet jedoch noch immer die Anwendung antientzündlich wirkender Pharmaka, welche häufig direkt auf die Funktion von Mastzellen oder auf deren Ausschüttungsprodukte Einfluss nehmen. Hierzu gehören die immunsuppressiven Glucocorticoide wie Cortisol und Cortisol-Derivate [125;126], Cyclosporin A und Tacrolimus [127] sowie Mastzellstabilisatoren wie Cromoglycinsäure, Nedocromil und Tritoqualin [128;129], welche die IgE-abhängige Mediatorfreisetzung hemmen. Mediator-Antagonisten wie die Cysteinyl-Leukotrien₁-Rezeptorantagonisten und Antihistaminika [130-132] verdrängen hingegen den entsprechenden Mediator kompetitiv von dessen Rezeptor. Trotz guter Behandlungserfolge bei Allergien, gehen von allen medikamentösen Therapieformen Nebenwirkungen aus, die man durch neue Konzepte zu

minimieren versucht. Ein alternativer Ansatzpunkt stellt die Reduktion der Mastzellzahl im entsprechenden Gewebe durch UV-Bestrahlung dar [133;134]. Diese schon seit längerem angewandte Methode ergab sich aus der Beobachtung, dass Sonnenlicht einen positiven Einfluss auf die Heilung mastzellassoziierter entzündlicher Hauterkrankungen hat. Des Weiteren ist die Herabregulierung von T_H2 Zellen und ihren Zytokinen durch RNA-Interferenz (RNAi) ein zukunftssträchtiges Verfahren für eine genau steuerbare, nebenwirkungsarme Reduzierung allergischer Symptome [135;136]. RNAi wird als eine der aufregendsten Entdeckungen der letzten Jahre im Bereich Biologie angesehen. Hierbei macht man sich einen natürlichen Abwehrmechanismus gegen virale Pathogene und die Schädigung des Erbgutes zunutze, der von der Pflanze über Nematoden und Insekten bis hin zum Menschen nachgewiesen werden konnte [137-141]. Experimentell oder im therapeutischen Einsatz wird 21-23 Nukleotid-lange *small interfering RNA* (siRNA) in eine Zelle gebracht, wodurch es nach Trennung der doppelsträngigen siRNA und Bindung an einen sogenannten *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) zum Zerstören der sequentiell entsprechenden mRNA und somit zur Unterdrückung der Translation und Produktion eines Proteinies kommt [142;143].

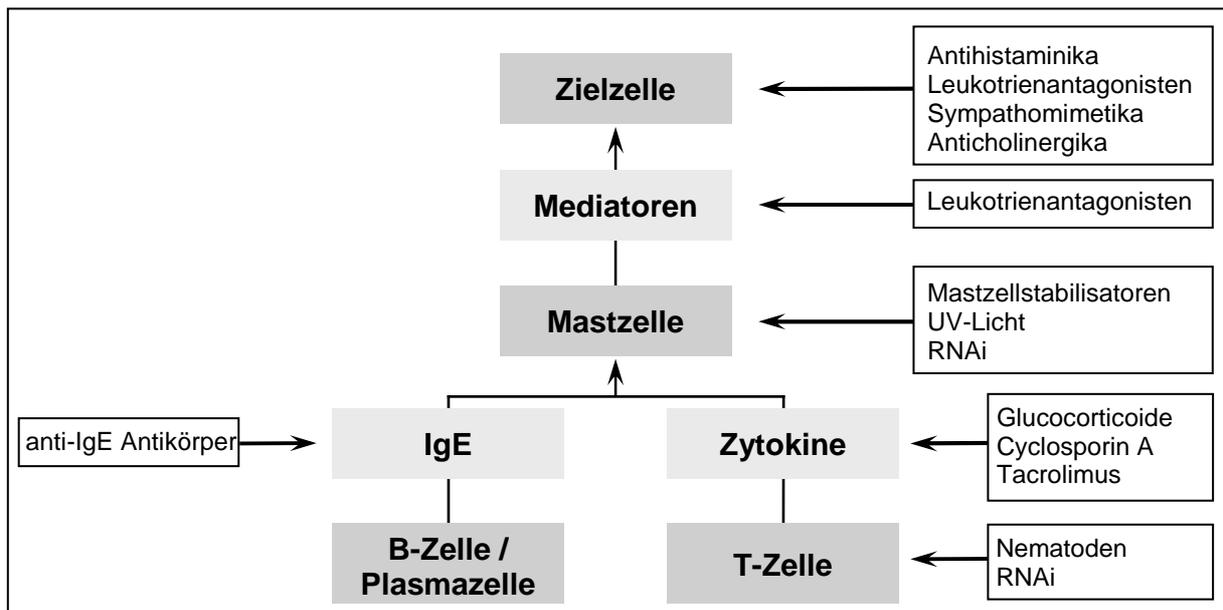


Abbildung 2: Angriffsebenen verschiedener Antiallergika. Die stark vereinfachte Übersicht zeigt die verschiedenen Angriffspunkte der einzelnen Wirkstoffgruppen in der Pharmakotherapie allergischer Erkrankungen. Verändert nach Peiser, C. et al. [144].

1.3 Ausschüttungsprozesse

1.3.1 Strukturelle Aspekte der Exozytose

Transportvorgänge innerhalb der Zelle bilden die Grundlage vielerlei zellulärer Vorgänge aller Eukaryoten, wie z. B. dem Zellwachstum, der Wiederherstellung der Plasmamembran, Recyclingsvorgängen und der Ausschüttung von Mediatoren in den extrazellulären Raum. Mediatoren werden in der Zelle synthetisiert und in das Endoplasmatische Retikulum transloziert. Von dort werden sie zum Golgi-Apparat und daraufhin zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert, wo sie in sekretorische Vesikel eingebaut werden. Diese Vesikel sind außerdem mit Proteinen ausgestattet, welche es ihnen erlauben, an der Zielmembran anzudocken und mit dieser zu verschmelzen [145]. Fertige sekretorische Granula akkumulieren im Zytosol, bis sie durch einen Stimuli veranlasst werden, zur Plasmamembran zu wandern und ihren Inhalt auszuschütten.

Die Fusion von Membranen ist durch zwei Hauptschritte charakterisiert. Im ersten Schritt wird eine sogenannte „*stalk-structure*“ von wenigen Dutzend Lipidmolekülen zwischen den Membranen gebildet. Diese erweitert sich zu einem ausgedehnteren Bereich, in dem sich die berührenden *Monolayer* mischen, während die distalen *Monolayer* intakt bleiben. Die Zwischenstufe des ersten Schritts wird „Hemifusion“ genannt und wird in einem zweiten Schritt vollendet, in dem die *Bilayer* komplett miteinander verschmelzen [146].

Im Gegensatz zu den meisten Neuronen, in denen jeder Vesikel unabhängig mit der Plasmamembran interagiert [147], sind Mastzellen und andere sekretorische Zellen in der Lage, schnell eine große Menge Vesikelinhaltes durch einen Vorgang, der „*compound exocytosis*“ genannt wird, auszuschütten. Hierbei bilden mehrere Vesikel einen Kanal, indem sie miteinander fusionieren. Man unterscheidet zwei Arten der *compound exocytosis*. Bei der sequentiellen Exozytose verschmelzen Vesikel anfänglich mit der Plasmamembran, bevor tiefer liegende Vesikel an die zuerst gebundenen anschließen. Im Gegensatz dazu fusionieren bei der multivesikulären Exozytose Vesikel homotypisch und bilden so intrazelluläre Strukturen, bevor sie mit der Plasmamembran interagieren. In Mastzellen finden beide Arten der *compound exocytosis* statt, wobei angenommen wird, dass die multivesikuläre Form häufiger vorkommt. Durch die *compound exocytosis* vergrößert sich der Bereich der Plasmamembran bei Aktivierung um bis zu 30 % [148]. Man könnte annehmen, dass es eine gewisse Zeit dauert, bis die multivesikulären Strukturen gebildet werden. Messungen der Zellmembran-Kapazität mit Hilfe der *whole-cell patch-pipette technique* zeigten jedoch, dass die Mehrzahl der multivesikulären Fusionsereignisse sehr schnell nach der Stimulation stattfinden [148]. Die Tatsache, dass Granula nicht direkt mit der Plasma-

membran fusionieren müssen, ermöglicht Mastzellen ihre Mediatoren sehr effizient auszuschütten [149].

Eine weitere Form der Granulaentleerung ist die sogenannte „*piecemeal degranulation*“. Sie ist durch einen geringen, aber dauerhaften Verlust von Granulainhalt charakterisiert, ohne dass dabei eine sichtbare Granulaverschmelzung zu erkennen ist [150]. Dieser Vorgang, der sowohl unter pathophysiologischen, als auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet, basiert womöglich auf dem teilweisen Verlust von Granulainhalt schon an ihrem Entstehungsort [151;152]. Es ist aber auch denkbar, dass eine progressive Entleerung von unvollständig oder vorübergehend fusionierten Granula stattfindet [153].

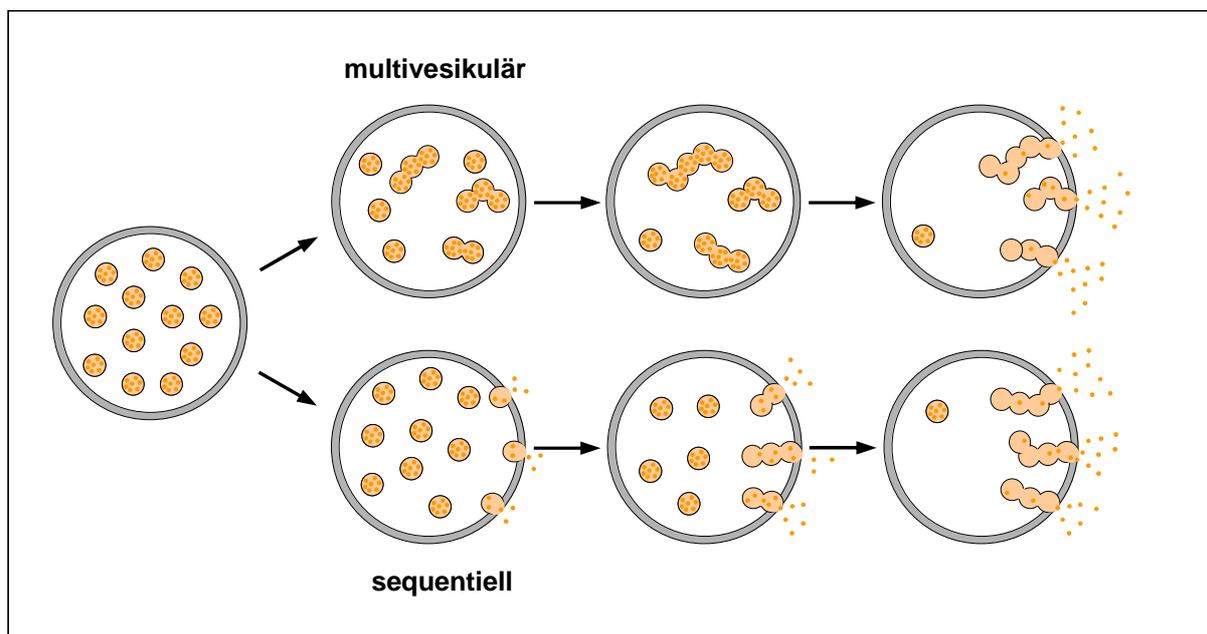


Abbildung 3: Compound exocytosis. Bei der multivesikulären Form fusionieren Vesikel miteinander und bilden dabei lange intrazelluläre Strukturen aus, mit denen sie mit der Plasmamembran verschmelzen. Die sequenzielle Exozytose ist dadurch charakterisiert, dass zuerst einzelne Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen und dann erst tiefer liegende Vesikel mit den zuerst gebundenen fusionieren. Aus Frank, S.P.C. und Lorentz, A. [154].

1.3.2 Die Familie der SNARE-Proteine

Soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) bilden eine hoch konservierte Familie von membrangebundenen Proteinen, die im kompletten Endomembransystem von eukaryotischen Zellen zu finden sind [155]. Nach ihrer Entdeckung in den späten Achtzigerjahren wurde schnell offensichtlich, dass sie für die Mehrzahl der intrazellulären Fusionsvorgänge von der Hefe bis hin zur Säugernervenzelle

unentbehrlich sind, in der sie die regulierte Exozytose von Neurotransmittern an den prä-synaptischen Enden ermöglichen [145]. SNAREs sind durch ihre charakteristische Verteilung in zahlreichen Membranstrukturen in der Zelle dazu prädestiniert, als grundlegende Fusionsfaktoren zu fungieren [156]. Sie sind in der Lage, außerordentlich stabile Komplexe zu bilden und so Membranfusionen zu katalysieren. Im Moment kennt man 38 verschiedene SNARE-Proteine in Säugetierzellen [157-185]. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 18–42 kDa [186] und sie setzen sich aus einer einfachen Domänen-Struktur und einem charakteristischen SNARE-Motiv zusammen [176]. Diese zentrale SNARE-Domäne besteht aus homologen sogenannten Doppelwendeln (engl.: *coiled-coils*), also einer Helix, welche ihrerseits wiederum zu einer Helix mit größerem Radius gewunden ist, mit einer Länge von ungefähr 60–70 Aminosäuren. Diese wird eingegrenzt von einer variablen Domäne am N-terminalen Ende und einer hydrophoben transmembranen Verankerung am C-terminalen Ende. Die transmembranen Segmente sind über eine kurze Verbindung an das SNARE-Motiv gekoppelt und es scheint, dass diese nicht nur die SNAREs in der Membran verankern, sondern auch an den SNARE-Interaktionen bei der Membranverschmelzung beteiligt sind [176;187].

Das Verständnis über die Anordnung verschiedener SNARE-Proteine bei der Komplexbildung führte ursprünglich zu einer strikten Trennung zwischen SNAREs auf der "Geber"- und auf der "Nehmer"- Seite [176]. Auf dieser funktionellen Lokalisation basierend, wurden SNARE-Proteine in Vesikelmembran (v)- und Ziel (target) membran (t)-SNAREs eingeteilt [188;189]. Es zeigte sich jedoch, dass diese Einteilung nicht immer eindeutig ist, da auch t-SNAREs auf Vesikeln und v-SNAREs auf der Zielmembran gefunden wurden. Eine andere Terminologie entstand durch das Verständnis des Aufbaus des SNARE-Komplexes und basiert darauf, ob der zentrale funktionelle Bereich des SNARE-Motivs aus der Aminosäure Arginin (R) oder Glutamin bzw. Aspartat (Q) besteht [190;191]. Weitere Analysen führten zu einer genaueren Einteilung in drei Q-SNARE-Subklassen: Qa, Qb und Qc [185]. Diese unterscheiden sich an ihrer N-terminalen Domäne. Qa-SNAREs und wenige Qb- und Qc-SNAREs besitzen ein Bündel aus drei antiparallelen Spiralen an ihrem N-terminalen Ende, während dieses bei Qb-, Qc- und R-SNAREs recht uneinheitlich aufgebaut ist [172]. Ein Sonderfall dieser Einteilung sind Proteine, die der als Qb,c-SNAREs bezeichneten synaptosomalen SNAP-25-Familie angehören. Im Gegensatz zu den meisten Q-SNAREs, handelt es sich dabei um randständige Membranproteine ohne transmembrane Domäne, aber mit zwei SNARE-Motiven. Es wird angenommen, dass ein funktioneller SNARE-Komplex immer aus je einem SNARE-Motiv jeder Gruppe besteht und so ein heterooligomeres paralleles Bündel aus vier Spiralen bildet. Somit ergeben sich die zwei möglichen Anordnungen: die R-Qa-Qb-Qc – und die R-Qa-Qb,c – Konfiguration [192].

SNARE	Mastzelle	Lokalisation	Strukturelle Rolle	Referenz
Syntaxin-1a,1b	+	PM	Qa	[158;160]
Syntaxin-2	+	PM	Qa	[158;161]
Syntaxin-3	+	vesicular, PM	Qa	[157;161]
Syntaxin-4	+	PM	Qa	[161]
Syntaxin-5		ER, Golgi	Qa	[162;162]
Syntaxin-7		ES, LS	Qa	[164]
Syntaxin-11		TGN	Qa	[165]
Syntaxin-13		ES	Qa	[166]
Syntaxin-16		Golgi, TGN, ES	Qa	[167]
Syntaxin-17		ER	Qa	[168]
Syntaxin-18		ER	Qa	[169]
GS27		Golgi	Qb	[170]
GS28			Qb	[163;170]
Vti1a		ES, Golgi, TGN	Qb	[171]
Vti1b	+	LS, Golgi, TGN	Qb	[171;172]
Syntaxin-6	+	TGN, ES	Qc	[158;164]
Syntaxin-8		ES, LS	Qc	[173]
Syntaxin-10		TGN	Qc	[174]
GS15			Qc	[175]
BET1			Qc	[159]
USE/SLT1		ER	Qc	[176]
SNAP-23	+	PM	Qb,c	[177;178]
SNAP-25		PM	Qb,c	[158;178]
SNAP-29		Golgi	Qb,c	[179]
SNAP-47			Qb,c	[179]
VAMP-1		vesicular	R	[180]
VAMP-2	+	vesicular	R	[158;181]
VAMP-3	+	vesicular	R	[158;161]
VAMP-4		TGN, ES	R	[180]
VAMP-5		vesicular	R	[182]
VAMP-7	+	vesicular	R	[157;161]
VAMP-8	+	vesicular	R	[158;160]
ERS24/SEC22b		ER, ERG	R	[180]
YKT6		ERG	R	[163]
D12			?	[183]
SEC20		ER	?	[184;185]
SEC22a			?	[184;185]
SEC22c			?	[184;185]

Tabelle 2: Mitglieder der SNARE-Familie in Säugetieren. Zusammengefasst ist die Lokalisation in der Zelle und die strukturelle Bedeutung aller bekannter Säugetier-SNAREs. Mit + gekennzeichnete SNAREs wurden in Mastzellen nachgewiesen. Die Klassifizierung von D12, SEC20, SEC22a und SEC22c ist noch unklar. ES, Endosom; ER, Endo-

plasmatisches Retikulum; ERG, Zwischenbereich von ER und Golgi-Apparat; LS, Lysosom; PM, Plasmamembran; TGN, trans-Golgi-Netzwerk. Aus Frank, S.P.C. und Lorentz, A. [154].

1.3.3 Die Bildung und Auflösung des SNARE-Komplexes

Die SNARE-Hypothese [193] postuliert, dass ein Protein auf der Geber-Membran mit zwei bzw. drei Proteinen auf der Zielmembran reagiert und einen sogenannten „*trans*-SNARE-Komplex“ bildet, durch den vorübergehend zwei Membranen verbunden werden. Unter inaktivierten Bedingungen sind die meisten spiralförmigen SNARE-Domänen vollständig unstrukturiert. Dies ändert sich jedoch auf dramatische Art und Weise, wenn die Proteine miteinander reagieren und bindende Strukturen ausbilden [194]. Es wird angenommen, dass die Bildung des Komplexes an der N-terminalen Seite des SNARE-Motivs beginnt und sich durch *zippering* bis zum C-terminalen Ende fortsetzt [195]. Die Struktur bestehend aus einem Bündel aus vier α -Helices scheint den konservierten SNARE-Komplex zu repräsentieren. Die Anzahl der beteiligten Proteine variiert dabei zwischen drei und vier, abhängig davon, ob ein Mitglied der SNAP-25-Familie Teil des Komplexes ist und somit zwei Helices beisteuert [196]. Diese Komplexe sind außerordentlich stabil und behalten ihre Struktur selbst unter extremen Bedingungen wie 90 °C, 8 M Harnstoff oder 2 % SDS bei, und ihre Halbwertszeit für eine spontane Auflösung wird mit 10^{10} Jahren angenommen [197]. Normal hydratisierte Membranen werden abhängig von ihren Lipidbestandteilen und ihren Membranproteinen in einem Gleichgewicht mit einem Abstand von 2–20 nm gehalten [198]. Das Zusammenspiel von R- und Q-SNAREs und das Verbinden der vier α -Helices der SNARE-Motive bringt die *Lipidbilayer* auf einen Abstand von 0,2–0,3 nm, wodurch die Membranfusion ermöglicht wird [199;200]. In dem in Folge entstehenden *cis*-SNARE-Komplex bilden die Vesikel- und die Plasmamembran eine Kontinuität, in welcher alle SNAREs des Komplexes nahe beieinander liegen [176]. Die Höhe der für die Komplexbildung benötigten Energie ist unbekannt. Es wird aber angenommen, dass eine Vielzahl von SNAREs notwendig ist, um die gegenüberliegenden Membranen zusammen zu bringen [201]. Mikroskopische Untersuchungen der Verteilung von SNAREs auf der Plasmamembran zeigten eine uneinheitliche Verteilung und eine Anhäufung in gut definierten Bereichen. Sekretorische Vesikel fusionieren selektiv mit solchen cholesterolreichen Fusions-Hotspots [202]. Diese auch als Fusionsporen oder Porosomen bezeichneten Bereiche wurden in Mastzellen in den späten 80er und frühen 90er Jahren mit Hilfe von elektrophysiologische Messungen entdeckt [203]. Später wurde durch hochauflösende Rasterkraftmikroskopie (AFM) die Existenz von Porosomen mit einem Durchmesser von 70–80 nm in lebenden Mastzellen sichtbar gemacht [204]. Im Vergleich dazu besitzen

Porosomen von Neuronalen Zellen nur einen Durchmesser von 8–10 nm, an die synaptische Vesikel mit einem Durchmesser von 40–50 nm binden [205].

Damit SNARE-Proteine für weitere Membranfusionierungs-Prozesse wiederverwendet werden können, muss der SNARE-Komplex aufgelöst werden und die SNAREs von dem Geber-Kompartiment mit Hilfe von Trägern zu ihrem Herkunftsort zurücktransportiert werden. Das Auflösen des *cis*-SNARE-Komplexes benötigt eine erhebliche Menge metabolischer Energie. Diese wird von der ubiquitär vorhandenen zytoplasmatischen ATPase *N-ethylmaleimide-sensitive-factor* (NSF) bereitgestellt. Zusätzlich sind Kofaktoren notwendig, die *soluble NSF attachment proteins* (SNAPs) genannt werden und in keinerlei Zusammenhang mit Proteinen aus der SNAP-25-Familie stehen [206]. In Säugetierzellen existieren drei Isoformen von SNAPs. Diese werden α -, β -, and γ -SNAPs genannt und wirken zusammen mit NSF auf den SNARE-Komplex ein und binden an diesen [207]. Der genaue Mechanismus der Auflösung des SNARE-Komplexes ist unbekannt. Vermutlich sind mehrere katalytische Zyklen der NSF-ATPase unter mehrfacher Hydrolyse von ATP notwendig [176]. Durch diese Art des Recyclings erhält die Zelle ihre Fähigkeit zurück, erneut sekretorische Granula zu bilden und Mediatoren zu sezernieren.

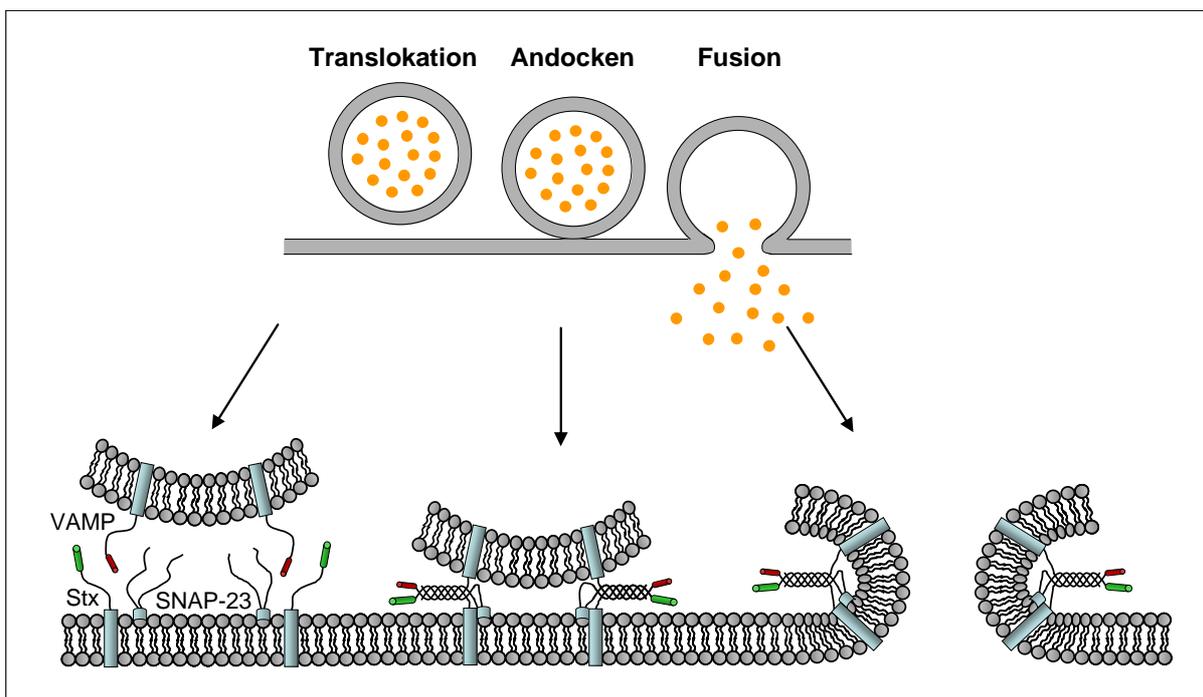


Abbildung 4: Durch SNARE-Proteine vermittelte Fusion. In Mastzellen wurde das Qb,c-SNARE SNAP-23 sowie die Qa-SNAREs Syntaxin (Stx)-3 und -4 auf der Plasmamembran gefunden. Nach Aktivierung könnten diese einen stabilen Komplex mit einem R-SNARE der VAMP-Familie bilden, um so die Fusionierung der Membran eines sekretorischen Vesikels mit der Plasmamembran und als Folge die Ausschüttung von Mediatoren zu ermöglichen. Aus Frank, S. P. C. und Lorentz, A. [154].

1.4 Ziel dieser Arbeit

Mastzellen spielen aufgrund ihrer enormen Menge an gespeicherten und bei Aktivierung neusynthetisierten Mediatoren eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl allergischer und inflammatorischer Erkrankungen. Die Behandlung dieser Erkrankungen ist in erster Linie symptomatischer Natur und zielt somit darauf ab, dem Betroffenen ein beschwerdefreies Leben zu ermöglichen. Bei bisherigen Therapieformen treten jedoch regelmäßig unerwünschte Nebenwirkungen auf. Neue Ansätze und ein besseres Verständnis über Ausschüttungsprozesse von Mastzellmediatoren könnten helfen, differenzierter in die Wirkungsprozesse dieser Mediatoren einzugreifen und neue Therapieformen zu entwickeln.

Damit es zur Freisetzung von in Vesikeln verpackten Mediatoren aus der Zelle kommt, muss die Vesikelmembran mit der Plasmamembran fusionieren. Hierbei spielen SNARE-Proteine eine entscheidende Rolle.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Schlüsselproteine zu charakterisieren, welche die Mediatorfreisetzung humaner Mastzellen steuern. Hierfür sollte zunächst mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion auf RNA-Ebene und mittels Western Blot auf Proteinebene analysiert werden, welche SNARE-Proteine von Mastzellen exprimiert werden. Durch die anschließende Markierung dieser Proteine mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern sollte deren Lokalisation in der Zelle mikroskopisch dargestellt werden, um somit auf mögliche Wechselwirkungen zwischen SNARE-Proteinen schließen zu können. Die Komplexbildung zwischen SNAREs sollte daraufhin mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation aufgezeigt werden. Der funktionelle Beweis für die Bedeutung der jeweiligen SNARE-Proteine sollte erbracht werden, indem die entsprechenden Proteine einzeln ausgeschaltet werden. Dies sollte mittels RNAi und das Blockieren einzelner SNAREs mit spezifischen Antikörpern erfolgen. Zum Schluss sollte noch geklärt werden, welche Unterschiede zwischen der Freisetzung präformierter und *de novo* synthetisierter Mediatoren besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer

Antikörper

Isotype mouse IgG	Serotec, Oxford, UK
Isotype rabbit IgG	Serotec, Oxford, UK
anti-GAPDH, monoclonal mouse antibody	antibodies-online GmbH, Aachen
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
anti-SNAP 23, polyclonal rabbit antibody	Synaptic Systems, Göttingen
anti-SNAP 25, monoclonal mouse antibody	Sternberger Monoclonals Incorp., USA
anti-Syntaxin 1a, polyclonal rabbit antibody	Synaptic Systems, Göttingen
anti-Syntaxin 1b, polyclonal rabbit antibody	Synaptic Systems, Göttingen
anti-Syntaxin 2, polyclonal rabbit antibody	StressGen Biotechnologies, Kanada
anti-Syntaxin 3, polyclonal rabbit antibody	Synaptic Systems, Göttingen
anti-Syntaxin 4, mouse antibody	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Syntaxin 6, mouse antibody	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Synaptobrevin 2/VAMP 2, polycl. rabbit Ab	Synaptic Systems, Göttingen
anti-VAMP 3, polyclonal rabbit antibody	Affinity BioReagent, USA
anti-VAMP 7/TI-VAMP, monocl. mouse antibody	T. Galli, Institut Jacques Monod, Paris
anti-VAMP 8, rabbit antibody	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
anti-Vti1b, rabbit polyclonal antiserum	Synaptic Systems, Göttingen

Zellaufarbeitung und Zellkultur

Acetylcystein (ACC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampicillin	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Amphotericin B	Gibco Life-Technologies, UK
Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion IV)	Boehringer, Mannheim
CD117 MicroBead Kit, human	Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Chymopapain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Collagenase D	Boehringer, Mannheim
Dead Cell Removal Kit	Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Dinatriumhydrogenphosphat	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
DMEM	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach
DNase I	Boehringer, Mannheim
EDTA	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Foetales Kälber-Serum (FCS)	Gibco Life Technologies, UK
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gentamycin	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach
D-Glucose Monohydrat	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
L-Glutamine 200 nM (100x)	Invitrogen, GmbH Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg
Natriumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dulbecco`s PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach
Pronase	Boehringer, Mannheim
pZerve TM Cryopreservation Solution	Protide Pharmaceuticals Inc, USA
Rekombinantes SCF	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes Human IL-4	PeptoTech, Hamburg
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, UK
StemPro-34 SFM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach
100 µm und 250 µm Nybold-Filter	Swiss Silk Bolting Manufact., Schweiz
MACS [®] Separation Columns (LS) und 96-Well-Kulturplatten	Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach6-, 24-, 48- NUNC, Wiesbaden

Tyrode-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM Na₂HPO₄, 5,55 mM D-Glucose, pH 7.4

TE-Puffer: 2 mM EDTA in Tyrode-Puffer

ACC-Lösung: 6,13 mM ACC in TE-Puffer

TEA-Puffer: 118 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM Na₂HPO₄, 5,55 mM D-Glucose, 2 mM EDTA, 20 mM Hepes, 0,05 % (v/v) Ampicillin, 0,02 % (v/v) Gentamycin, 0,02 % (v/v) Metronidazol, pH 7.4

TGMD-Puffer: 1,23 mM MgCl₂, 0,0015 % (v/v) DNAse, 0,1 % Gelatine, in Tyrode-Puffer

PCH-Lösung: 0,03 % Pronase, 0,075 % Chymopapain, in TE-Puffer

CE-Lösung: 0,015 % Collagenase D, in TGMD-Puffer

Kulturmedium: RPMI 1640, 10 % (v/v) FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Gentamycin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 0,5 µg/ml Amphotericin

MACS-Puffer: PBS pH 7.2, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA

Zelllinien

HMC-1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: J. H. Butterfield, Mayo Clinic & Mayo Foundation, Rochester, USA
LAD2	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: A. S. Kirshenbaum, National Institutes of Health, Bethesda, USA
RBL-2H3	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

Zellfärbung

Formaldehyd 37 %	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Giemsa-Lösung	Mallinckrodt Baker B.V., Burgdorf
Goat Serum	Zymed, USA
May-Grünwald-Lösung	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Saponin	Fluka BioChemika, Schweiz
Swine Serum	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Stimulation und Mediatormessung

Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Cysteinyl Leukotriene Enzyme Immunoassay Kit	Assay Designs, Inc., USA
anti-IgE-Rezeptor α -chain (mAk 22E7)	Hoffmann-La Roche, USA
humanes Myeloma-IgE	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
anti-IgE -Antikörper	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
D-Glucose Monohydrat	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Hepes	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Histamin-ELISA	IBL, Hamburg
Ionomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Calbiochem, Bad Soden
Procarta [®] Zytokinassay	Panomics, USA
Triton-X	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Stimulationspuffer: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5,6 mM Glucose, 10 mM Hepes pH 7.3, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,05 % BSA

pNAG-Lösung: 3,8 mM 4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide, 0,05 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 4.5

Glycin-Puffer: 0,2 M Glycin, pH 10.7

RNA-Isolation, Umschreiben in cDNA, PCR und Agarosegelelektrophorese

Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenolblau	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe DNase I
Desoxyribonuclease 1 U/ μ l	Promega GmbH, Mannheim

dNTP 10 mM	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
DTT 0,1 M	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 25 mM	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Essigsäure, Rotipuran® 100 %	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5x First-Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerin	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
MgCl ₂ 25 mM	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
Oligo dT Primer	MWG Biotech, Ebersberg
10x Puffer	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR®Green	Applied Biosystems, Darmstadt
TRIS Ultra Qualität	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
Xylencyanol	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Primer (Tabelle 3)	MWG Biotech, Ebersberg

Ladepuffer: 30 % (v/v) Glycerin, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol

TAE-Puffer (50 x): 242,28 g Tris-Base, 60,05 ml Essigsäure, 29,225 g EDTA, mit ddH₂O auf 1 L auffüllen, pH 8.0

SDS-PAGE und Western Blot

anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main
Ammoniumperoxidsulfat (10 %)	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Bio Rad Protein Assays	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Bovine Serum Albumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Bromphenolblau	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
DTT 0,1 M	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycerin	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Methanol, Ultra Gradient Grade	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Ponceau S solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protease inhibitor cocktail Complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Bonn
Rotiphorese® Gel 30	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Salzsäure, 37 % reinst	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
SDS Ultra pure	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
SuperSignal West Dura Extended Duration	Thermo Scientific, Bonn
Trans-Blot® Transfer Medium, NC Membrane	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TRIS Ultra Qualität	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
TRIS-HCl	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Triton-X	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween® 20	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Extraktionspuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol

Laemmli-Puffer: 20 % (v/v) Glycerin, 2 % SDS, 0,375 M Tris, 0,2 M DTT, 0,5 mg Bromphenolblau, mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen, pH 8.8

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS

Sammelgel (4 %): 0,330 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Solution (Rotiphorese® Gel 30), 1,495 ml ddH₂O, 0,625 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8, 25 μ l 10 % SDS, 25 μ l 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 3 μ l TEMED

Trenngel (12 %): 4,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Solution (Rotiphorese® Gel 30), 3,2 ml ddH₂O, 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 μ l 10 % SDS, 100 μ l 10 % Ammoniumperoxidsulfat, 6 μ l TEMED

Transferpuffer: 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8.3

TBS: 15 mM NaCl, 5 mM Tris, pH 7.6

TBST: 15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,1 % (v/v) Tween® 20, pH 7.6

Immunpräzipitation

Rabbit TrueBlot™ Set	Natu Tec GmbH, Frankfurt am Main
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co.KG, Zeven
Natriumchlorid	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
TRIS-HCl	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tween® 20	CarlRoth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 % Triton-X

Puffer A: 25 mM Tris-HCl pH 7.3, 0,15 M NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20

Transfektion

Block-it™ Transfection Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
PULSin™ Protein delivery reagent	Biomol GmbH, Hamburg
X-treme Gene siRNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Streptolysin O (from Streptococcus pyogenes)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Basic Nucleofector [®] Kit, Prim. Fibroblasts Sol.	Lonza, Köln
Cell Line Nucleofector [®] Kit V Solution Box	Lonza, Köln
ON-TARGETplus SMARTpool, Human STX4A	Dharmacon, England
pmaxGFP Vector	Lonza, Köln
siGLO Red Transfection Indicator	Dharmacon, England

FACS

BD FACSToW [™]	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS [™] Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Cell Wash	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg

2.2 Isolation von Mastzellen aus humaner Darmmukosa

Als Grundlage für die Gewinnung humaner intestinaler Mastzellkulturen diene frisch entnommene Gewebe aus Dick- und Dünndärmen, welche möglichst sofort nach Entnahme und Abtrennung von der Blutversorgung in einen mit Antibiotika versetzten Aufbewahrungspuffer (TEA-Puffer) transferiert wurden. Diese Resektate stammten von Darmtumorpatienten, wobei nur tumorfreie Bereiche ohne krankhafte Auffälligkeiten verwendet wurden, die uns freundlicherweise vom Katharinenhospital (Stuttgart), dem Klinikum Bad Cannstatt, dem Robert-Bosch-Krankenhaus (Stuttgart), dem Klinikum Esslingen und der Uniklinik Tübingen bereitgestellt wurden. Hierzu liegen positive Gutachten der Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg vor.

Das Gewebe wurde nach Eintreffen von adhärentem Mesenterium und Fett befreit, gewaschen und über Nacht in TEA-Puffer im Kühlschrank gelagert. Die im TEA-Puffer enthaltenen Antibiotika dienen dazu die im Präparat enthaltenen Bakterien abzutöten, um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination zu minimieren. Aus demselben Grund wurden alle Arbeiten unter einer *Laminar air flow*-Sterilbank durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde die *Tunica mucosa* von der submukosalen und muskulären Schicht mit einer feinen Schere abgetrennt und nur die *Tunica mucosa* für die weitere Aufarbeitung verwendet, da in ihr der höchste Anteil an Mastzellen zu finden ist (1–3%) [105]. Bis zu 10 Gramm Mukosa wurden in 50 ml ACC-Lösung überführt und für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert, um den aus den Becherzellen austretenden Mukus zu entfernen. Bei größeren Mengen an Mukosa oder vermehrter Schleimbildung wurde die Aufarbeitung in einem höheren Volumen in einer entsprechenden Anzahl von Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach Ende der Inkubation wurde das Präparat kräftig von Hand geschüttelt, um möglichst viel Schleim zu entfernen. Bei sehr großen Mengen an freigesetztem Schleim wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurde die Mukosa in 40 ml Tyrode-Puffer mit 7 mM EDTA überführt und für 20 Minuten erneut wie auch in allen folgenden Schritten unter Schütteln im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend wieder leicht von Hand geschüttelt, um Epithelzellen und verbliebenen Mukus zu entfernen. Zum besseren Verdau des Gewebes und somit einer besseren Vereinzelung der Zellen wurde die Mukosa auf eine Kunststoffpetrischale gegeben, mit 25 ml einer Pronase und Chymopapain enthaltenden Enzymlösung (PCH-Lösung) überdeckt und mit einer Schere in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Die so gewonnene Suspension wurde auf einen Nybold-Filter mit einer Porengröße von 250 µm gegeben und mit 50 ml TE-Puffer gewaschen. Das Filtrat wurde verworfen und die auf dem Filter verbleibenden Gewebestücke in 25 ml PCH-Lösung für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach einem weiteren Filtrationsschritt, wobei diesmal

mit TGMD-Lösung gewaschen wurde, verblieb das Gewebe für erneut 30 Minuten unter Schütteln im Wasserbad in einer Collagenase-Enzymlösung (CE-Lösung). Das Enzym Collagenase verursacht ein Auftrennen des Gewebes und somit die Vereinzelung der Zellen. Nach der Inkubation wurde das verbleibende Gewebe erneut filtriert und mit mindestens 50 ml TGMD-Lösung gespült, wobei der Durchfluss gesammelt und für 10 Minuten bei 300 g abzentrifugiert wurde. Die im Pellet enthaltenen Zellen wurden in 1–2 ml Kulturmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Dieser Schritt wurde mit den auf dem Filter zurückgebliebenen Gewebestücken wiederholt und die dabei erhaltenen Zellen mit den bisher gewonnenen vereinigt. Um verbliebene Zellklumpen zu entfernen, wurde die Zellsuspension mit RPMI auf 40 ml aufgefüllt und durch einen Nybold-Filter mit einer Porengröße von 100 µm filtriert, welcher mit 10 ml RPMI nachgespült wurde. Das Filtrat wurde erneut für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert, in 10 ml Kompletmedium aufgenommen und die Anzahl der lebenden und toten Zellen durch eine Trypanblaufärbung bestimmt. Außerdem wurde der prozentuale Anteil an Mastzellen an der Zellsuspension durch eine May-Grünwald – Giemsa-Färbung analysiert. Die Zellsuspension wurde in einer Dichte von 2×10^6 lebender Zellen/ml Kulturmedium in einer Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C mit 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.3 Aufreinigung und Kultivierung von Darmmastzellen

Zur weiteren Aufreinigung der Mastzellen wurde das *magnetic beads-activated cell sorting* MACS[®]-System von Miltenyi Biotec verwendet. Dieses ermöglicht eine Auftrennung verschiedener Zelltypen durch die Markierung spezifischer auf der Zelloberfläche exprimierter Antigene mit an paramagnetischen Partikeln (*MicroBeads*) gekoppelten Antikörpern.

Hierfür wurden zuerst die am Vortag isolierten Zellen erneut gezählt und der Anteil der toten Zellen bestimmt. Bei einem Anteil toter Zellen von über 30 % wurden mit dem *Dead Cell Removal Kit* von Miltenyi Biotec tote Zellen entfernt. Die Zellsuspension wurde hierfür für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet pro 10^7 Gesamtzellen in 100 µl *Dead cell removal MicroBeads* resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in 5–10 ml *Binding buffer* aufgenommen und auf eine sich im magnetischen Feld eines *MACS Separator*s platzierte, bereits mit 3 ml *Binding buffer* gespülte MACS[®]-LS-Säule gegeben. Nachdem die Suspension vollständig die Säule passiert hatte, wurde die Säule 4 Mal mit 3 ml *Binding buffer* gespült. An die *Dead cell removal MicroBeads* sind Antikörper gekoppelt, die ein spezifisches Antigen in der Plasmamembran von apoptotischen und toten Zellen

erkennen. Da die *MicroBeads* aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften im magnetischen Feld der Säule verbleiben, werden auch die an ihnen gebundenen toten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die lebenden Zellen in dem Durchfluss aufgefangen wurden.

Nach einer weiteren Zentrifugation und dem Zählen der Zellen, wurde im Anschluss entschieden, ob eine weitere Aufreinigung der Mastzellen mit dem CD117 *MicroBead Kit* durchgeführt wurde. Diese ist nur sinnvoll, wenn die Anzahl der Mastzellen hoch genug für die Durchführung der geplanten Versuche ist. Die abzentrifugierten Zellen wurden hierfür in 300 µl MACS®-Puffer je 10^8 Gesamtzellen resuspendiert, 100 µl *FcR Blocking reagent* und 100 µl CD117 *MicroBeads* zugegeben und für 15 Minuten bei 4–8 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 1–2 ml Puffer und Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 g gewaschen und in 1–5 ml Puffer aufgenommen. Entsprechend dem vorangegangenen Entfernen der toten Zellen wurde die Suspension auf eine vorgespülte, im magnetischen Feld platzierte Säule gegeben und 3 Mal mit 3 ml Puffer gespült. Im Gegensatz zu dem *Dead cell removal Kit* wurden hier jedoch die CD117-positiven Mastzellen magnetisch markiert und verblieben somit in der Säule. Durch das Entnehmen der Säule aus dem magnetischen Feld und sofortigem Spülen der Säule mit 5 ml Puffer, wurden die markierten Mastzellen aus der Säule eluiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen für die weitere Verwendung in Kulturmedium mit 25 ng/ml rekombinanten humanen SCF und 2 ng/ml IL-4 in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 6-well Gewebekulturschalen ausgesät und wie zuvor bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsbrutschrank (innova® CO-170, New Brunswick Scientific) kultiviert. Wöchentlich wurden vorsichtig 2 ml Medium abgenommen und durch 2,5 ml Kulturmedium mit der oben genannten Konzentration an SCF und IL-4 ersetzt.

2.4 Zellzählung und Differenzierung

Nach jeder Zellisolation und Aufreinigung wurde die Anzahl der lebenden und toten Zellen sowie die Mastzellreinheit der Kultur bestimmt. Es wurden hierfür 20 µl Zellsuspension abgenommen und mit 20 µl Trypan-Blau gefärbt. In einer Neubauer-Zählkammer wurden mindestens 100 Zellen gezählt und der prozentuale Anteil der lebenden und toten Zellen bestimmt. Tote Zellen nehmen aufgrund der geschädigten Zellmembran Farbstoff auf und erscheinen dunkel, während lebende Zellen hell leuchten. Anhand des Volumens eines Zählquadrates von 0,1 µl kann die Zellzahl pro Milliliter durch Multiplikation der in einem Quadrat enthaltenen Zellen - unter Einbezug der Verdünnung mit Trypan-Blau - mit dem Faktor 20.000 bestimmt werden.

Für die Differenzierung der Zellen wurde aus 20–80 µl Zellsuspension durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 500 rpm mit einer Zytocentrifuge (Cytospin 4, Shandon) ein Zytospin angefertigt. Dieser wurde nach Pappenheim für 2 Minuten in May-Grünwald-Lösung gefärbt, anschließend kurz mit ddH₂O gewaschen und für weitere 20 Minuten in einer 1:42,5 Giemsa-Wasser-Lösung zu Ende gefärbt. Das fertige Präparat wurde lichtmikroskopisch unter 1000-facher Vergrößerung ausgezählt und der Anteil von Mastzellen anhand ihrer metachromatisch gefärbten Granula bestimmt.

Direkt nach der Isolation der Zellen aus der Mukosa betrug der Anteil an Mastzellen 1–3 %. Durch das Entfernen der toten Zellen und einer Selektion von CD117⁺ Zellen, konnte der Anteil an Mastzellen auf 40–60 % erhöht werden. Durch die anschließende Kultivierung mit SCF wurde nach 2–3 Wochen eine 98–100 % reine Kultur erhalten.

2.5 Kultivierung von Mastzelllinien

Für manche Fragestellungen wurden neben den aus dem Gewebe isolierten Darmmastzellen auch Zellen der humanen Zelllinien LAD2 und HMC-1 oder der murinen Zelllinie RBL-2H3 verwendet. Der Vorteil dieser Zelllinien ist, dass mit geringem Aufwand große Mengen an Zellen gewonnen werden können.

LAD2

Die Kultur von LAD2 Zellen erfolgte in StemPro-34-Medium unter Zusatz von StemPro-34 Nutrient Supplement, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 100 ng/ml SCF in Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von 0,5 bis 1 x 10⁶ Zellen/ml bei 37 °C und 5 % CO₂. Wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums entfernt, durch neues ersetzt und 100 ng/ml SCF zugegeben. Zu beachten ist, dass LAD2 Zellen hohe Beschleunigungskräfte nicht vertragen und deshalb bei niedrigeren Geschwindigkeiten von 100–150 g zentrifugiert werden müssen. Ihre Verdopplungsrate ist für eine Zelllinie sehr langsam und dauert 10–14 Tage [100].

Des Weiteren ist das Einfrieren und Auftauen dieser Zelllinie problematisch und nur mit hohen Zellverlusten möglich. Hierfür wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand bis auf einen Rest von 50–100 µl abgenommen und die Zellen durch vorsichtiges Aufziehen und Ablassen in einer Pipette gemischt. Für die Kryokonservierung wurden für je 10⁷ Zellen 1,5 ml des serumfreien Einfrierreagenz pZerveTM mit 100–200 ng/ml SCF zugegeben und die Zellsuspension in verschraubbare Einfrierröhrchen zu je 1–1,5 ml verteilt. Unter leichtem Schütteln wurde die Suspension bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert,

anschließend für je eine Stunde in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Ebenso wichtig für das Überleben der Zellen ist das korrekte Auftauen. Die Zellen wurden hierfür für eine langsame Equilibrierung nach dem Auftauen in dem Einfrierreagenz belassen und 0,2 ml ihres Kulturmediums mit 200 ng/ml SCF hinzugegeben. In einer 6-well Platte wurde die Zellsuspension für 6 Stunden bei 60 rpm auf einer Schüttelplattform bei Raumtemperatur inkubiert und alle 15–30 Minuten auf Verklumpungen kontrolliert, welche durch vorsichtiges Mischen mit der Pipette gelöst wurden. Anschließend wurde erneut 0,5 ml Kulturmedium mit 200 ng/ml SCF zugegeben und die Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium komplett gewechselt. Bei erfolgreichem Einfrieren und Auftauen beginnen sich die Zellen nach 2–4 Wochen wieder zu verdoppeln.

HMC-1

Die ebenfalls humane Mastzelllinie HMC-1 wurde in RPMI-Medium mit 10 % FCS, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in 6-well Gewebekulturschalen kultiviert und ebenfalls wöchentlich die Hälfte des Mediums durch neues ersetzt.

RBL-2H3

RBL-2H3 Zellen wurden in einer Zelldichte von 1 bis 2×10^5 Zellen/ml in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 100 U/ml Penicillin in Zellkulturflaschen ausgesät. Alle 2–3 Tage wurde das Medium ausgetauscht. Da es sich um eine adhärent wachsende Zelllinie handelt, wurden die Zellen bei vollem Bewuchs der Bodenplatte mit 2 ml Trypsin/EDTA für 2–3 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgelöst und nach einmaligem Waschen in ihrem Kulturmedium erneut ausgesät.

2.6 Aktivierung von Mastzellen

2.6.1 Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors

Die benötigten Zellen wurden bei 300 g für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Kompletmedium aufgenommen. Durch eine Inkubation von 90 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit humanem Myeloma-IgE in einer Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ wurden die Zellen mit IgE beladen. Nach zweimaligem Waschen durch Zugabe von 500 μl PBS und Abzentrifugieren wurden die Zellen erneut in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Stimulations-Puffer aufgenommen und daraufhin mit 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-human-IgE-Antikörper (αIgE) für 1–6 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 stimuliert.

Nach erneuter Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten wurde der Überstand aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Bei jedem Versuch wurde eine zusätzliche Probe mitgeführt, bei welcher durch Zugabe von 3 µl 10 % Triton-X je 100 µl Versuchsansatz und kräftigem Vortexen die Zellen lysiert wurden. Diese Suspension wurde ebenfalls eingefroren und diente bei der späteren Mediatorenmessung als Basis für die Berechnung der prozentualen Ausschüttung. Außerdem wurde die basale Ausschüttung des Mediators von Interesse gemessen und die hierfür verwendeten Zellen den gleichen Schritten unterzogen, ohne diese jedoch zu aktivieren.

Eine Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors wurde außerdem durch den monoklonalen Antikörper 22E7 erzielt. Dieser ist gegen die α -Kette des Fc ϵ RI gerichtet und ermöglicht eine spezifische Aktivierung der Mastzellen ohne vorheriges Beladen mit IgE. Eingesetzt wurde er in einer Konzentration von 100 ng/ml.

2.6.2 Unspezifische Aktivierung

Die Stimulation erfolgte entsprechend der Stimulation über die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach der ersten Zentrifugation sofort in Stimulations-Puffer aufgenommen wurden. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µM des Kalziumionophors Ionomycin und der gleichen Konzentration des Proteinkinase C-Aktivators Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) für 1 – 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Anschließend wurde der Überstand und die Suspension der lysierten Zellen eingefroren.

Sowohl bei der Aktivierung der Mastzellen über eine Kreuzvernetzung des Fc ϵ RI, als auch bei der unspezifischen Aktivierung mit Ionomycin/PMA, wurde der Einfluss von SCF auf die Degranulation untersucht. Zu den jeweiligen Bedingungen wurde hierzu zusätzlich zum jeweiligen Stimulus 100 ng/ml SCF hinzugegeben.

2.7 Mediatorenmessung

2.7.1 β -Hexosaminidase-Messung

Das Enzym β -Hexosaminidase liegt in Mastzellen und basophilen Granulozyten gespeichert in den Granula vor und kann daher als Indikator für die Degranulation von Mastzellen fungieren [208-210]. Die Aktivitätsbestimmung der freigesetzten β -Hexosaminidase beruht auf dem enzymatischen Umsatz des in der Substratlösung enthaltenen 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (pNAG), das sich am

Ende der Reaktion durch das entstandenen gelbliche p-Nitrophenol erkennen lässt. Hierfür wurde von dem nach der Stimulation gewonnenen Überstand 25 µl in eine 96-well Platte gegeben. Jedem Ansatz wurden 50 µl pNAG-Substratlösung hinzugefügt und die Platte für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl 0,2 M Glycin-Lösung, pH 10.7 gestoppt und die Extinktion im Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Der Anteil der ausgeschütteten β -Hexosaminidase wurde in Prozent zu der Gesamt- β -Hexosaminidaseaktivität der lysierten Zellen angegeben.

2.7.2 Histamin-, Leukotrien- und Zytokinmessung

Für die Messung der Freisetzung von Histamin wurden die eingefrorenen Überstände mit Stimulationspuffer verdünnt und mittels einem kompetitiven *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) der Histamingehalt nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1,5 ng/ml. Bei der Berechnung des Gesamthistamingehaltes wurde der entsprechende Verdünnungsfaktor berücksichtigt und die Histaminausschüttung als Prozent des Gesamtgehaltes angegeben.

Das Cysteinyl Leukotrien LTC₄ wurde analog ebenfalls mit einem kompetitiven ELISA bestimmt. Die Nachweisgrenze liegt bei 26,6 pg/mL. Der LTC₄-Gehalt wurde in Prozent des Gesamtgehaltes angegeben, und auf die stimulierte Bedingung normiert, wobei diese als 100 % gesetzt wurde.

Die Messungen der Zytokine IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α und VEGF wurden als Procarta[®] Zytokinassay mit Hilfe der Luminex xMAP-Technologie (Luminex Corporation) durchgeführt. Diese Technologie erlaubt eine Bestimmung von bis zu 100 Parametern aus einer einzelnen Probe in einem Messvorgang. Die Grundlage dieser Technologie bilden uniforme, sphärische Polystyrol-Partikel, sogenannte Mikrosphären oder Beads, mit einem Durchmesser von 5,6 µm ($\pm 0,1$ µm). Diese sind mit zwei verschiedenen Farbstoffen (rot und infrarot) in 10 unterschiedlichen Konzentrationen angefärbt. Daraus resultieren 100 verschiedenen Bead-Sets mit einer genau definierten Spektralsignatur, welche als Festphase fungieren und mit verschiedensten Nachweisreagenzien gekoppelt werden können. Dies ermöglicht die Messung grundsätzlich aller analytischen Parameter, die durch eine spezifische Interaktion zweier definierter biochemischer Verbindungen nachweisbar sind. Die entsprechenden in der Probe enthaltenen Analyten binden an die Nachweisreagenzien, die sich an der Beadoberfläche befinden. Die Bindungsreaktion wird durch Fluorochrom-gekoppelte Reportermoleküle quantifiziert, indem die Bead-assoziierte Fluoreszenz im Luminex-Analysesystem gemessen wird. Dieses klassifiziert die Bead-Sets mit Hilfe eines roten Lasers, während die Quantifizierung der gebundenen Analyten mit

einem grünen Laser erfolgt. Für jeden Parameter wurden mindestens 50 Beads gemessen, um eine hohe Genauigkeit der Messwerte zu erzielen.

2.8 Gewinnung von RNA und reverse Transkription in cDNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden $0,5-1,0 \times 10^5$ Zellen in 350 μl RLT-Puffer lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Isolierung der RNA fand laut Beschreibung unter Verwendung des RNeasy Mini Kit statt.

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurde in einem ersten Schritt genomische DNA durch Zugabe von 1 U RNase-freier DNase zu 20 μl RNA mit 5 μl 5x *First strand buffer* für 15 Minuten bei 37°C enzymatisch verdaut. Dieser Vorgang wurde anschließend mit 2,5 μl 25 mM EDTA gestoppt und die RNA für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen der Probe auf Eis, wurde ein Mix bestehend aus 5 μl 5x *First strand buffer*, 2,5 μl 87 mM Oligo dT Primern, 4 μl 5 mM dNTP, 2,5 μl 0,1 M dTT und 0,25 μl Superscript III Reverse Transkriptase hinzugegeben, mit 7,25 μl RNase freiem Wasser auf 50 μl Volumen aufgefüllt und die cDNA durch Inkubation für 1 Stunde bei 50°C synthetisiert. Alle Inkubationsschritte fanden auf einem Peltier-Thermal-Cycler von MJ Research statt.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Expression des jeweiligen Gens von Interesse wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis [211] analysiert. Diese fand in einem Reaktionsvolumen von 25 μl in einem *Peltier Thermal Cycler* von Bio-Rad statt. Hierfür wurde in ein Mix, bestehend aus 2,5 μl 10x Puffer, 1 μl 2,5 mM dNTP, 1 μl 25 mM MgCl_2 , 0,25 μl Taq Polymerase, 18,15 μl H_2O , sowie je 0,3 μl 200 μM Sense- und Antisense-Primer 1,5 μl der zuvor gewonnenen cDNA gegeben. Die Amplifikation der cDNA-Fragmente fand in 35 – 37 Zyklen statt. Nach einer anfänglichen Denaturierung der DNA bei 95°C für 3 Minuten, bestand jeder Zyklus aus einer Denaturierung und somit dem Auftrennen der Wasserstoffbrückenbindungen der DNA bei 95°C für 15 Sekunden, der Primerhybridisierung an die DNA bei 56°C für 30 Sekunden und der Elongation bei 72°C für 30 Sekunden. Hierbei füllt die DNA-Polymerase vom 3'-Ende des angelagerten Primers beginnend die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Der jeweilige gebundene Primer bildet somit den Anfang des neuen Einzelstrangs.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der generierten DNA-Fragmente erfolgte nach ihrer Größe in Gelen mit einer Agarosekonzentration von 1 %. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und mit 500 ng/ml Ethidiumbromid versehen. Den Proben wurde Ladebuffer im Verhältnis 5:1 zugegeben und dann 10–15 µl der jeweiligen Probe nach Ausbilden der Gelmatrix aufgetragen. Zur späteren Bestimmung der Fragmentgröße wurde parallel ein Marker (100 bp DNA-Ladder) mit aufgetragen, der die Lage der unterschiedlich großen Fragmente im Abstand von 100 bp sichtbar macht. Durch Anlegen einer Spannung von 100–120 V für ca. 1 Stunde und anschließendem Abfotografieren unter UV-Licht konnten die einzelnen Banden sichtbar gemacht werden.

2.11 Real-time quantitative PCR

Die quantitative Expression eines Gens wurde mit Hilfe der Real-time quantitativen PCR bestimmt. Ein Mix aus 10 µl des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®]Green, 8 µl RNA- und DNA-freiem ddH₂O und je 0,25 µl 200 µM Sense- und Antisense-Primer wurde zusammen mit 1,5 µl DNA-Probe in *optical tubes* gegeben und in einem iQ[™] 5 von Bio Rad gemessen. Es wurden 35–40 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus setzte sich nach einer Initialdenaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, aus einer Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden, einer Primerhybridisierung bei 56 °C für 30 Sekunden und der Elongation bei 72 °C für 30 Sekunden zusammen. Als Kontrolle für eventuelle Verunreinigungen wurde für jeden Versuchsansatz eine Reaktionsprobe ohne DNA mitlaufen lassen. Über die Darstellung der Fluoreszenz ist eine genaue Quantifizierung der Genexpression (*Threshold cycle*) des Zielgenes möglich, welche bei der anschließenden Auswertung auf ein nicht reguliertes *housekeeping gen* bezogen werden kann, um eine Hoch- oder Runterregulierung zu ermitteln.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße [bp]
GAPDH	5'-TGG TCT CCT CTG ACT TCA AC-3'	5'-CCT GTT GCT GTA GCC AAA TT-3'	127
IL-5	5'-GGA ATA GGC ACA CTG GAG AGT CAA-3'	5'-ACT CTT GCA GGT AGT CTA GG-3'	157
IL 6	5'-GAT GGA TGC TTC CAA TCT GG-3'	5'-TGG CAT TTG TGG TTG GGT CA-3'	226
IL-8	5'-CTG AGA GTG ATT GAG AGT GG-3'	5'-ACA ACC CTG TGC ACC CAG TT-3'	113
IL-13	5'-CAT TGC TCT CAC TTG CCT TGG-3'	5'-CAG CTG TCA GGT TGA TGC TC-3'	159
IL-17A	5'-TGG GAA GAC CTC ATT GGT GT-3'	5'-GGA TTT CGT GGG ATT GTG AT-3'	84
MCP-1	5'-CTT CTG TGC CTG CTG CTC AT-3'	5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GTC-3'	272
MIP-1 α	5'-CTC TGC ATC ACT TGC TGC TGA CAC-3'	5'-CAC TCA GCT CCA GGT CGC TGA C-3'	212
MIP-1 β	5'-GCT AGT AGC TGC CTT CTG CTC TCC-3'	5'-CAG TTC CAG CTG ATA CAC GTA CTC C-3'	238
SNAP23	5'-GTA CGA GGA GAA TCC TGG GT-3'	5'-CAG ACA CAA AGG CCA CAG CA-3'	187
SNAP25	5'-AAG CCT GGG GCA ATA ATC AGG-3'	5'-CTT TGT TGC ACG TTG GTT GGC-3'	296
Stx-1a	5'-TGC CTC TGG GAT CAT CAT GG-3'	5'-ACT TGA CGG CCT TCT TGG TG-3'	239
Stx-1b	5'-TTG AGA CGA GGC ACA ATG AG-3'	5'-ATG CGG TCA ATC ATC TCT CC-3'	115
Stx-2	5'-TGC TGT CTC GGA AGT TTG TG-3'	5'-CTG TGG TGG TTC TCC CAG TT-3'	120
Stx-3	5'-GAG CCA AAA ACC AAG GAT GA-3'	5'-TTG GTC ATC ACC TCC ACA AA-3'	191
Stx-4	5'-CAG AAG GAG GAA GCT GAT GA-3'	5'-TGC GTG TCC TTC AGG ATA TT-3'	263
Stx-6	5'-TCA TCT GTG CAG GCA TTA GC-3'	5'-TGC TGC TCC TCA ATG AAA TG-3'	152
TNF- α	5'-CAA GCC TGT AGC CCA TGT TG-3'	5'-AGA GGA CCT GGG AGT AGA TG-3'	161
VAMP-2	5'-ACA GGA GAC TGC AGC AG-3'	5'-TTT GCG CTT GAG CTT GGC TG-3'	176
VAMP-3	5'-GAA GCT CTC TGA GTT AGA CG-3'	5'-GAG ACA ACC CAC ACG ATG AT-3'	174
VAMP-4	5'-AAG TTT AAG CGC CAC CTC AA-3'	5'-TCC AGA TGG TCC CCT TAG AA-3'	120
VAMP-5	5'-GAA GTG CTG GGA GAA CAT CC-3'	5'-CTG CTG TCA CTG CTC TGA GG-3'	117
VAMP-7	5'-CTT CCT GGA GGT GAC AGA GC-3'	5'-CGG GAA CGT TCA AAA TCA TC-3'	150
VAMP-8	5'-GTG CGG AAC CTG CAA AGT GA-3'	5'-GAA GGC ACC AGT GGC AAA GA-3'	261
VEGF	5'-CGA AGT GGT GAA GTT CAT GGA TG-3'	5'-TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG T-3'	470
Vti1b	5'-CGT TAT GCA CCC CTG TCT TT-3'	5'-GTG TGG CTG TCA AAG GTG TG-3'	112

Tabelle 3: Verwendete Primer.

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [212] diente der Auftrennung von Proteinen mit Hilfe eines elektrischen Feldes in einem Gel auf Polyacrylamidbasis. Im anschließenden Western Blot wurden die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Trägermembran übertragen.

Für die SDS-PAGE und den anschließenden Western Blot wurden Zelllysate hochreiner Mastzellkulturen verwendet. Hierfür wurden die Zellen für 5 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und je 10^5 Zellen in 10 μ l Extraktionspuffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren (*Protease inhibitor cocktail CompleteTM Mini*) lysiert. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 10.000 g und 4 °C wurde der proteinhaltige

Überstand abgenommen, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines Protein Assays (Bio Rad Laboratories GmbH) bestimmt. Um für jeden Versuchsansatz die gleiche Menge an Protein einzusetzen, wurden die Proben entsprechend auf eine Konzentration von $10\text{--}25\text{ }\mu\text{g}$ Protein pro Bedingung verdünnt. Das Lysat wurde 1:1 mit 2x Probenpuffer (Laemmli-Puffer) verdünnt und die Proteine bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten denaturiert. Die entsprechenden Proben und ein Proteinmarker wurden in die Geltaschen eines 4 %-igen Sammelgels aufgetragen und in einer Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, Bio-Rad) bei 120 V für ca. 1 Stunde in dem sich anschließenden 12 %-igen Trenngel aufgetrennt. Der Überschuss an SDS überdeckt die Eigenladung von Proteinen, so dass diese eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und ausschließlich in Abhängigkeit ihrer Größe durch das Gel wandern.

Nach erfolgreicher Separation der Proteine wurden diese durch Semi-Dry-Blotting [213] elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran mit $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße übertragen. Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran, sowie Whatman-Filterpapier mit Transferpuffer getränkt und zusammen mit dem Gel in folgender Anordnung in der Blot-Apparatur gestapelt: Kathode (schwarz), Wathmann-Filterpapier, Polyacrylamidgel, Nitrocellulose-Membran, Wathmann-Filterpapier, Anode (rot). Der Transfer fand nach dem Semi-Dry-Verfahren in einer Blotkammer (Fastblot B34, Biometra) bei 1 mA/cm^2 Membranfläche für 55 Minuten statt. Als Kontrolle des erfolgreichen Transfers wurden die Proteinbanden durch eine dreiminütige Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in TBST mit 2 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper in einer Konzentration von 1:500–1:2000 in TBST mit 1 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder wahlweise über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durch fünf- bis zehnmalsiges Waschen mit TBST für jeweils 5 Minuten wurden ungebundene Antikörper entfernt. Zum Nachweis entstandener Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Membran für 1 Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-mouse IgG, bzw. Anti-rabbit IgG) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Konjugat wurde durch erneutes Waschen mit TBST entfernt. Zuletzt wurde die Membran für 5 Minuten mit einem Chemilumineszenz Reagenz (*SuperSignal West Dura Extended Duration*) im Dunkeln entwickelt und die entsprechenden Chemilumineszenz-Signale unter der FluorChemTM von Biozym bei einer Belichtungszeit von 5 Minuten digitalisiert.

2.13 Fluoreszenzfärbung von SNARE-Proteinen

Um die Lokalisation verschiedener SNARE-Proteine innerhalb der Zelle sichtbar zu machen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mastzellen wurden mit 1 μ M Ionomycin/PMA stimuliert oder unstimuliert verwendet. Nach einem Fixierschritt der Zellen in 100 μ l 2% Paraformaldehyd für eine Stunde auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 50 μ l Blockierreagenz (PBS mit 1% Ziegen Serum, 1% Schweineserum und 1% humanem IgG) mit 0,3% Saponin aufgenommen. Durch die von Saponin verursachten Poren können Antikörper in die Zelle eindringen, während das Blockierreagenz unspezifische Bindungen des Primärantikörpers verhindert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden ein oder zwei Antikörper gegen die entsprechenden SNAREs in einer Konzentration von 20 μ g/ml zugegeben und die Zellen für weitere 30 Minuten inkubiert. Durch Waschen mit 1 ml PBS wurden nicht gebundene Antikörper entfernt und die Zellen erneut in 50 μ l Blockierreagenz resuspendiert. Ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (*Alexa Fluor goat anti-mouse 488*, bzw. *Alexa Fluor donkey anti-rabbit 594*), der gegen den Wirt des verwendeten anti-SNARE Antikörpers gerichtet ist, wurde ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer Konzentration von 10 μ g/ml mit der Zellsuspension inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurden die Zellen in 30 μ l PBS aufgenommen. Da das Eindeckeln der Zellen deren runde Strukturen zerstören würde, wurde die Zellsuspension auf ein dünnes Deckglas gegeben und nach Absinken der Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe der Apotom-Technik analysiert (*Axiovert 200M ApoTome microscope*, Carl Zeiss AG). Diese ermöglicht es, optische Schnitte von den fluoreszenzmarkierten Zellen anzufertigen und so die genaue Lokalisation des markierten Proteins festzustellen.

2.14 Ko-Immunpräzipitation

Um die Komplexbildung zwischen verschiedenen SNARE-Proteinen nachzuweisen, wurde die Ko-Immunpräzipitation angewandt. Diese Methode erlaubt es, mittels eines Antikörpers, der an ein festes Substrat gekoppelt wird, ein Antigen und dessen Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus zu präzipitieren. Diese können im Anschluss beispielsweise in einem Western Blot dargestellt werden.

Als Vorbereitung für die Präzipitation wurden pro Versuchsbedingung je 10^6 Mastzellen mit 1 μ M Ionomycin/PMA für 5 Minuten bei 37 °C stimuliert und als Kontrolle ebenfalls 10^6 Zellen unbehandelt gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurde

der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 500 µl kaltem Lysepuffer mit Zusatz von Proteaseinhibitoren (*Protease inhibitor cocktail CompleteTM Mini*) aufgenommen und gevortext. Zu den lysierten Zellen wurden für eine erste Voraufreinigung des Reaktionsansatzes 50 µl *anti-Rabbit Ig Beads* hinzu gegeben, um eine spätere Kontamination mit unspezifisch an die Beads gebundenen Proteinen und DNA zu reduzieren. Der Mix wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 3 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Das sich im Überstand befindende vorgereinigte Lysat wurde zusammen mit 5 µg eines anti-SNARE-Antikörpers für 1 Stunde auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet der Antikörper an das entsprechende SNARE-Protein, welches gefällt werden soll. Die erneute Zugabe von 50 µl *anti-Rabbit Ig Beads* und eine Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler führen zu einer Bindung der Beads an die Fc-Region der vorhandenen Antikörper. Diese Bindung ist reversibel und kann durch einen sauren pH-Wert oder eine Detergenzbehandlung wieder gelöst werden. Anschließend wurde nach einer einminütigen Zentrifugation bei 10.000 g der Überstand komplett entfernt und das Pellet mit den Beads 3 Mal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 50 µl 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, gut gemischt und die darin enthaltenen Proteine für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Zum Entfernen der Beads wurde erneut für 3 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und nur der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinkomplexen weiterverwendet.

Nach erfolgreichem Auftrennen der Proben in einer SDS-PAGE und Übertragen per Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler in Puffer A mit 5 % Magermilchpulver abgesättigt. Für die anschließende Färbung wurde ein als Primärantikörper fungierender anti-SNARE-Antikörper in der Konzentration von 1:1000 in Puffer A mit 5 % Magermilchpulver für 2 Stunden bei Raumtemperatur hinzugegeben. Ungebundene Antikörper wurden im Anschluß durch zehnmaliges Waschen mit Puffer A entfernt und die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (*Rabbit IgG TrueBlotTM* - Antikörper) in einer Konzentration von 1:5000 in Puffer A mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Nach erneutem zehnmaligem Waschen wurde die Membran mit einem Chemilumineszenz Reagenz für 5 Minuten entwickelt und abfotografiert.

2.15 Transfektion von LAD2 und humanen Darmmastzellen mit siRNA

Die Transfektion von LAD2 Zellen und humanen Darmmastzellen mit siRNA zur Blockade der Expression einzelner SNARE-Proteine wurde mit dem Nucleofector™ von Lonza durchgeführt. Für jede Transfektionsbedingung wurden 5×10^5 Zellen bei 90 g für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand komplett entfernt und die Zellen in 100 μ l *Nucleofector solution* aufgenommen. Die folgenden Schritte wurden zügig durchgeführt, da die Zellen nicht länger als 15 Minuten in dieser Lösung verbleiben sollen. Eine entsprechende Menge siRNA gegen das Gen, das ausgeschaltet werden sollte oder eine fluoreszenzmarkierte siRNA bzw. ein fluoreszenzkodierendes Test-Plasmid für die Optimierung des Systems wurde zu der jeweiligen Zellsuspension hinzugegeben und diese in eine Küvette überführt.

In Vorversuchen wurden anhand der Transfektion mit dem Test-Plasmid sieben verschiedene Programme getestet und davon das Programm mit der optimalen Kombination aus Transfektionsrate und Überlebensrate für die weiteren Transfektionen mit siRNA gewählt. Die elektrischen Parameter des jeweiligen Programms sind nicht einsehbar, da sie patentrechtlich geschützt sind und setzen sich aus Intensität der Stromimpulse, deren Dauer und Anzahl zusammen. Nach der Transfektion wurden die Zellen sofort in 500 μ l vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in eine 6-well Platte mit 1 ml ebenfalls vorgewärmtem Medium transferiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurde durch die Aufnahme und Vervielfältigung des Test-Plasmides erbracht, welche nach 1–3 Tagen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurde. Außerdem wurden die mit Test-Plasmid und mit fluoreszenzmarkierte siRNA transfizierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Eine funktionelle Beeinträchtigung der Zellen durch die entsprechende siRNA wurde mittels einer Zellstimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht.

2.16 Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung von Transfektionserfolgen wurden Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden je Bedingung $0,5-1 \times 10^5$ LAD2 oder Mastzellen, die zuvor mit Test-Plasmid oder fluoreszenz-siRNA transfiziert wurden, zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in 200 μ l PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer (FACS Canto™, Becton Dickinson) gemessen. Dabei durchläuft jede Zelle den Lichtstrahl eines Argonlasers

mit einer Wellenlänge von 488 nm und wird als einzelnes Ereignis erfasst. Photodetektoren registrieren das von den Zellen mit unveränderter Wellenlänge gestreute Licht und das in den langwelligen Bereich verschobene emittierte Fluoreszenzlicht. Dies ermöglicht eine Differenzierung der Zellen nach Größe (Vorwärtsstreulicht), Granularität bzw. optischer Dichte (Seitwärtsstreulicht) und Intensität der Fluoreszenz.

Die Auswertung der Daten erfolgte auf dem dazugehörigen Computerprogramm FACS Diva™. Anhand der Größe und Granularität der gemessenen Signale, konnten von der jeweils untersuchten Zellpopulation durch Festlegung eines Meßbereichs eventuell auftretende Signale ausgeschlossen werden, die von Zelltrümmern hervorgerufen wurden. Die Häufigkeit der Ereignisse und deren gemessene Fluoreszenzintensitäten innerhalb des festgelegten Bereiches wurden als zweidimensionales Punktdiagramm dargestellt.

2.17 Inhibition durch anti-SNARE Antikörper

Für weitere Untersuchungen der an der Degranulation beteiligten SNARE-Proteine sollten diese mit inhibierenden Antikörpern blockiert werden. Pro Bedingung wurden hierfür 25.000 bis 50.000 Zellen mit kalziumfreier HBSS-Lösung gewaschen und anschließend in 50 µl HBSS resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µg/ml (entspricht 1100 Units/ml) Streptolysin O (SLO), ein Toxin β -hämolyisierender Streptokokken, wurden die Zellen permeabilisiert. SLO bindet mit Hilfe von Cholesterol an die Plasmamembran. Durch die Bildung von Oligomeren entstehen Poren mit einem Durchmesser von über 12 nm, durch die Ionen, aber auch größere Moleküle wie Immunglobuline in die Zelle eindringen können. Zusammen mit dem SLO wurde der entsprechende anti (α)-SNARE Antikörper in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben und die Zellsuspension für 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 600 µl kalziumhaltigem RPMI Medium (mit 2 mM Kalziumchlorid und 10 % FCS) und eine Inkubation von einer Stunde auf Eis sind Mastzellen in der Lage die durch SLO verursachten Poren wieder zu schließen. Nach einer anschließenden Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten wurden die Zellen in Stimulationspuffer aufgenommen und entsprechend dem Versuchsaufbau mit IgE und α IgE stimuliert.

Für die Kontrolle des Erfolges der Permeabilisierung der Zellen, wurden diese mit Trypanblau angefärbt und der prozentuale Anteil der dunkel gefärbten Zellen für verschiedene Konzentrationen von SLO bestimmt. Die Kontrolle einer genügend hohen Konzentration eingedrungener Antikörper erfolgte mittels eines fluoreszenzmarkierten Maus IgG-Antikörpers.

2.18 Statistische Analysen

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Mittels des gepaarten *two tailed* t-Tests wurden signifikante Differenzen bestimmt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bewertet. Zusätzlich fand eine Unterteilung in verschiedene Signifikanzniveaus statt (* $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Mediatorfreisetzung aus Mastzellen

3.1.1 Vergleich der Wirkung verschiedener Trigger auf die Ausschüttung gespeicherter Mediatoren

Humane Mastzellen können durch eine Vielzahl von Triggern aktiviert werden. Die typische physiologische Stimulation ist die Kreuzvernetzung des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI) durch Antigene. In den durchgeführten *in vitro* Versuchen wurden Mastzellen mit IgE beladen und anschließend mit einem IgE-Antikörper eine Kreuzvernetzung verursacht. Ebenso wurde eine Kreuzvernetzung durch den Antikörper 22E7 erzielt, welcher gegen die α-Kette des FcεRI gerichtet ist und eine Aktivierung der Mastzellen ohne vorheriges Beladen mit IgE erlaubt. Eine unspezifische Stimulation der Mastzellen wurde durch Zugabe von 1 μM Ionomycin und der gleichen Konzentration PMA herbeigeführt. Der für Mastzellen überlebenswichtige Wachstumsfaktor SCF ist außerdem das bisher einzige bekannte Zytokin, das eine Mediatorfreisetzung in unterschiedlichen Mastzelltypen verursachen kann [214;215]. Es sollte deshalb der Einfluss von 100 ng/ml SCF - alleine und in Kombination mit anderen Stimulantien - auf die Aktivierung von humanen Darmmastzellen untersucht werden. Die Stimulationszeit betrug jeweils 1 Stunde. Als Indikator der Stimulierbarkeit von Mastzellen wurden die gespeichert vorliegenden Mediatoren Histamin und β-Hexosaminidase gemessen.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, betrug die spontane Freisetzung von Histamin aus unaktivierten Mastzellen $2,4 \pm 0,4\%$. Durch alleinige Zugabe von SCF erhöhte sich die Histaminausschüttung nicht signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf $10,9 \pm 6,7\%$. Eine Kreuzvernetzung mit Hilfe des 22E7-Antikörpers bewirkt eine geringe, jedoch signifikante Degranulation von $16,1 \pm 3,3\%$. Im Gegensatz dazu verursacht die Kombination aus 22E7 und SCF eine deutlich erhöhte Ausschüttung von $55,1 \pm 15,3\%$ des gesamten Histamingehaltes der Zelle. Ähnlich verhält es sich bei der Behandlung mit IgE und anschließender Stimulation mit anti-IgE Antikörper (αIgE). Während IgE/αIgE alleine eine Ausschüttung von $36,2 \pm 4,1\%$ induziert, ergab sich bei Zugabe von SCF mehr als eine Verdopplung der Ausschüttung auf $82,5 \pm 8,0\%$. Die unspezifischen Aktivierung mit Ionomycin/PMA verursacht schon ohne SCF eine starke Degranulation von $71,2 \pm 7,1\%$, die sich mit SCF nur unsignifikant auf $84,5 \pm 2,2\%$ erhöhte.

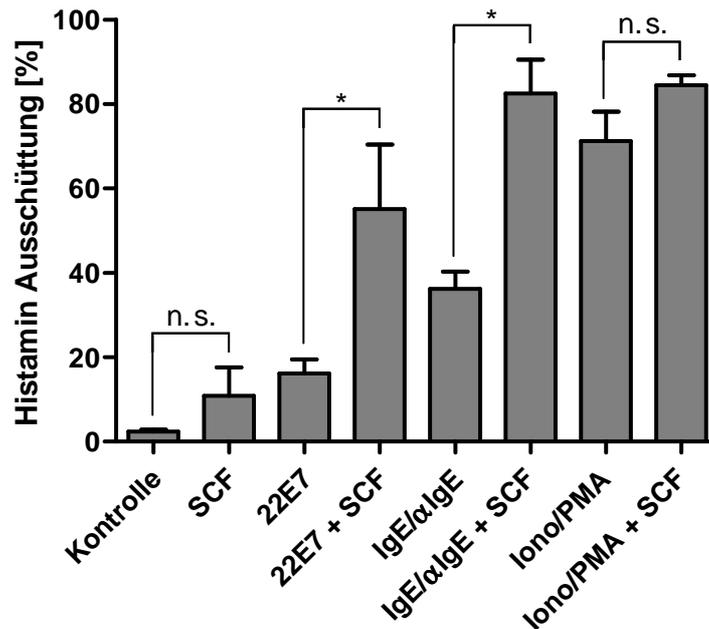


Abbildung 5: Freisetzung von Histamin aus humanen intestinalen Mastzellen nach Stimulation. Gezeigt ist die prozentuale Histamin-Freisetzung von Mastzellen nach Aktivierung mit 22E7 (100 ng/ml), IgE/αIgE (0,4 µg/ml / 1 µg/ml), Ionomycin/PMA (1 µM) und der Kombination dieser Stimulantien mit SCF (100 ng/ml), im Vergleich zur basalen Histamin-Ausschüttung der unstimulierten Kontrolle und einer alleinigen Zugabe von SCF (Mittelwerte ± SEM, n = 3-4). * p < 0,05; n. s., nicht signifikant

Das Enzym β-Hexosaminidase liegt ebenso wie Histamin präformiert in Mastzellen vor. Der Vergleich der Freisetzung beider Mediatoren ergab keinen signifikanten Unterschied der prozentualen Ausschüttung vom Gesamtgehalt in der Zelle (siehe Abbildung 6). Aufgrund der Einfachheit der Messung und der deutlich geringeren Kosten wurde in weiteren Versuchen β-Hexosaminidase als Indikator für die Freisetzung eines gespeicherten Mediators analysiert.

Sowohl die Freisetzung von Histamin, als auch β-Hexosaminidase erreichte schon nach fünf Minuten 74 % des nach einer Stunde möglichen Wertes (Ergebnisse nicht gezeigt).

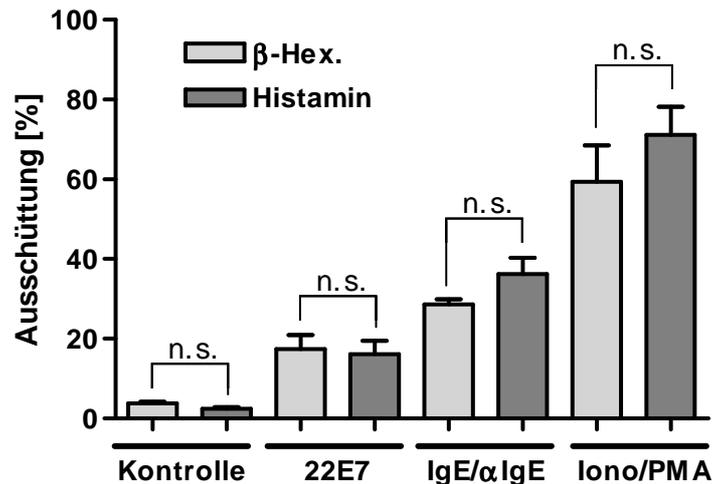


Abbildung 6: Vergleich der Freisetzung von β -Hexosaminidase und Histamin aus Mastzellen (nach Stimulation). Dargestellt ist die Ausschüttung von β -Hexosaminidase im Vergleich zu Histamin nach Stimulation von humanen intestinalen Mastzellen mit 22E7 (100 ng/ml), IgE/ α IgE (0,4 μ g/ml / 1 μ g/ml) und Ionomycin/PMA (1 μ M) im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen (Mittelwert \pm SEM, n = 3-4). n.s., nicht signifikant

Für einige Fragestellungen sollten die humanen Mastzelllinien LAD2 und HMC-1 als Modellsystem dienen und wurden ebenfalls auf ihre Stimulierbarkeit hin untersucht. Zu Vergleichszwecken wurde außerdem die Mediatorfreisetzung der murinen Mastzelllinie RBL-2H3 gemessen (siehe Abbildung 7). Die aus dem Knochenmark eines Mastozytose-Patienten gewonnene humane Mastzelllinie LAD2, exprimiert über den gesamten Zellzyklus funktionell aktivierbare Fc ϵ RI und lässt sich somit über eine Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren stimulieren. Als durchschnittliche Ausschüttung von β -Hexosaminidase wurden bei einer Grundausschüttung von $9,2 \pm 1,5$ % lediglich $16,2 \pm 4,0$ % nach der Stimulation mit IgE und α IgE-Antikörper gemessen, während nach der Aktivierung mit Ionomycin und PMA ein Release von $79,2 \pm 2,3$ % erreicht wurde. Für die aus dem peripheren Blut eines Mastozytose-Patienten isolierte humane Mastzelllinie HMC-1 ist bekannt, dass sie nicht funktionelle Fc ϵ RI exprimiert und die Ausschüttung sehr stark variieren kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte weder durch die Aktivierung über die Kreuzvernetzung des Fc ϵ RI, noch durch Ionomycin/PMA eine Erhöhung der basalen Ausschüttung erreicht werden. Eines der bekanntesten murinen Mastzell-Modellsystemen RBL-2H3, das aus Leukämiezellen einer Ratte entstand, wurde mit rattenspezifischem IgE beladen und mit dem dagegen gerichteten Antigen DNP aktiviert und unspezifisch mit Ionomycin/PMA stimuliert. Nach Stimulation mit IgE/DNP ergab sich eine Freisetzung von $32,1 \pm 8,2$ %, Ionomycin/PMA verursachten $46,5 \pm 7,8$ % β -Hexosaminidase Ausschüttung, bei einem Grundrelease von $7,6 \pm 1,7$ %.

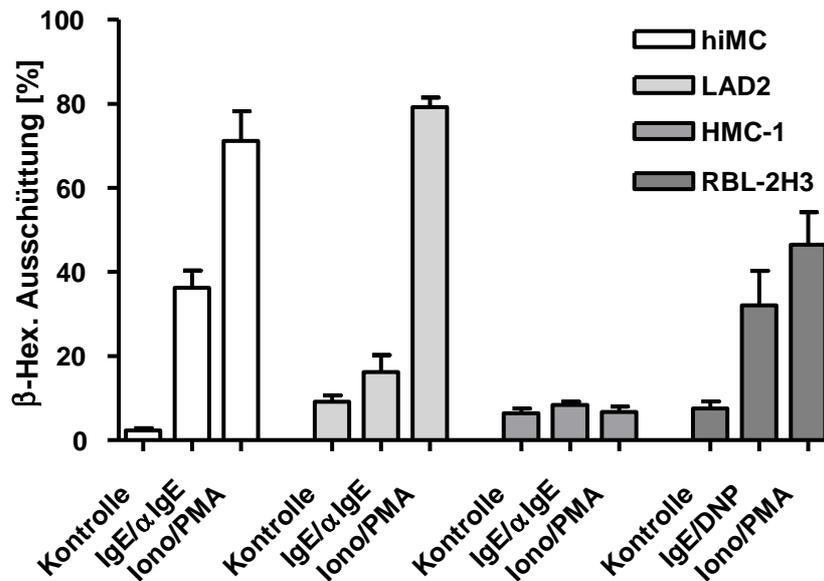


Abbildung 7: Stimulierbarkeit humaner und muriner Mastzellen. Gezeigt ist die Freisetzung von β -Hexosaminidase aus humanen intestinalen Mastzellen (hiMC), LAD2 Zellen, HMC-1 und RBL-2H3 nach Stimulation mit IgE/ α IgE (0,4 μ g/ml / 1 μ g/ml), bzw. IgE/DNP (0,4 μ g/ml / 1 μ g/ml) sowie Ionomycin/PMA (1 μ M) (Mittelwert \pm SEM, n = 6-15).

3.1.2 Expression und Freisetzung *de novo* synthetisierter Mediatoren

Bevor die Freisetzung verschiedener Zytokine aus stimulierten Mastzellen gemessen wurde, sollte zunächst geklärt werden, welche Zytokine von humanen Darmmastzellen und in welcher Intensität exprimiert werden. Hierfür wurden unstimulierte sowie mit Ionomycin/PMA und IgE/ α IgE für eine Stunde stimulierte humane Darmmastzellen lysiert, mRNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und eine Real-time quantitative PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Zytokine wurden ins Verhältnis gesetzt zur Expression von GAPDH (siehe Abbildung 8 A). Es zeigte sich eine schwächere Expression von IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, TNF- α und VEGF und eine deutlichere Expression von IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1. In Abbildung 8 B wurde die Zytokinexpression der stimulierten Zellen in Relation zur unstimulierten Kontrolle gesetzt. Es zeigte sich eine starke Erhöhung der Expression von IL-13, IL-17, TNF- α und MIP-1 α nach Stimulation mit IgE/ α IgE, die aber nicht das Niveau von z. B. IL-8, MIP-1 β und MCP-1 erreichte.

Die deutliche Expression von IL-8, MIP-1 β und MCP-1 spiegelte sich auch in der Menge des ausgeschütteten Zytokins wieder (siehe Tabelle 4). Im Überstand von humanen Darmmastzellen, welche für 6 Stunden mit IgE/ α IgE stimuliert wurden, konnte als Mittelwert aus zehn Kulturen 6244 pg/10⁶ Zellen IL-8 gemessen werden. Von MIP-1 β konnte im Mittel 356 pg/10⁶ Zellen und für MCP-1 436 pg/10⁶ Zellen gemessen werden. Hingegen war die

Freisetzung von IL-5 (112 pg/10⁶ Zellen), IL-6 (300 pg/10⁶ Zellen) und MIP-1α (174 pg/10⁶ Zellen) vergleichsweise gering und die Ausschüttung der Zytokine IL-13 (18 pg/10⁶ Zellen), IL-17 (6 pg/10⁶ Zellen), TNF-α (28 pg/10⁶ Zellen) und VEGF (8 pg/10⁶ Zellen) lag nur in einigen Kulturen über der Nachweisgrenze.

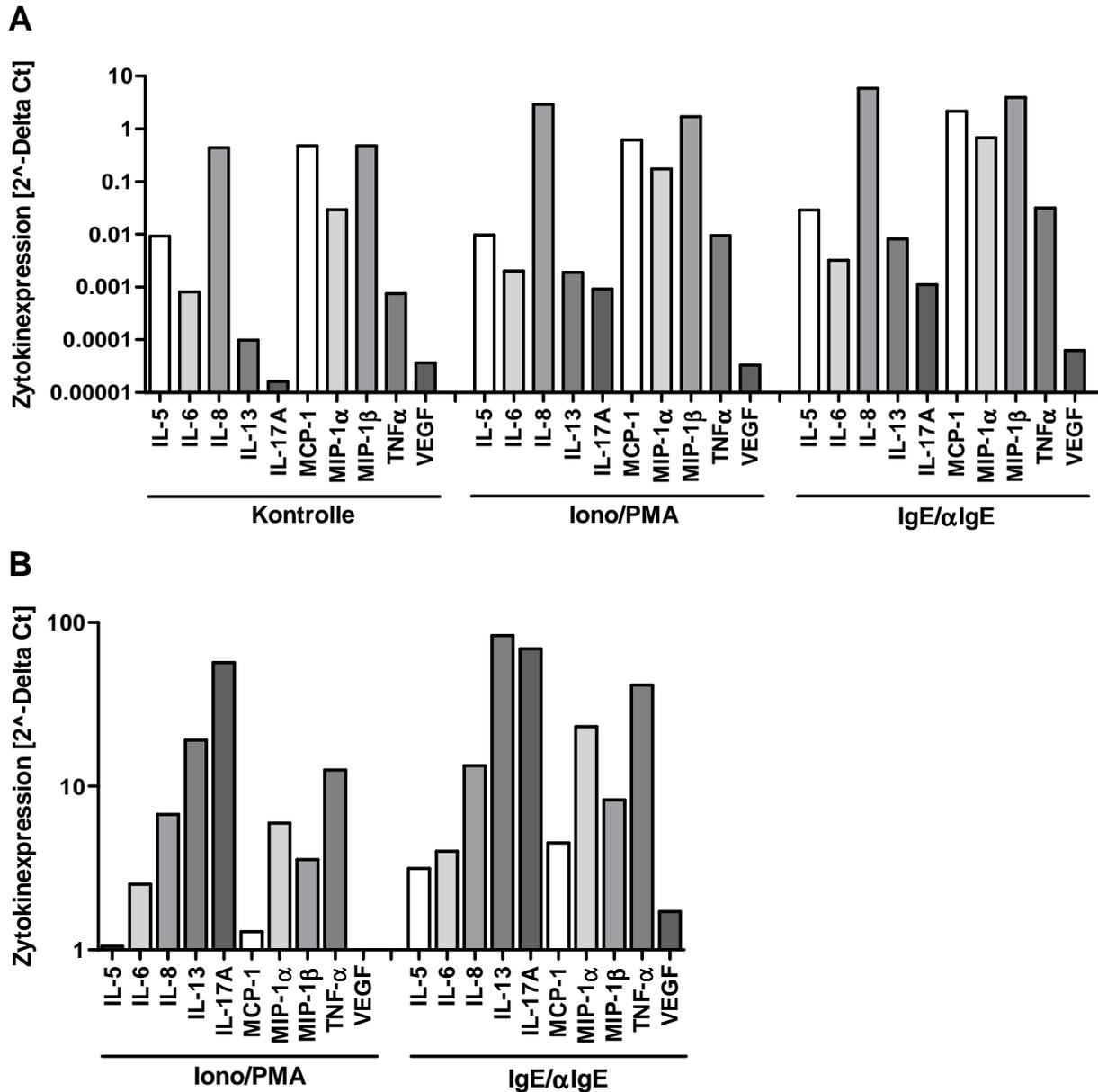


Abbildung 8: Zytokinexpression in humanen intestinalen Mastzellen. Gezeigt ist die mRNA-Expression unbehandelter und für eine Stunde stimulierter Mastzellen. **(A)** Zytokinexpression im Verhältnis zur Expression von GAPDH. **(B)** Zytokinexpression in Relation zur unstimulierten Kontrolle.

Zytokin	IL-5	IL-6	IL-8	IL-13	IL-17	MCP-1	MIP-1 α	MIP-1 β	TNF α	VEGF
Ausschüttung [pg/ml]	112 ± 46	300 ± 122	6244 ± 1986	18 ± 11	6 ± 3	436 ± 91	174 ± 30	356 ± 81	28 ± 13	8 ± 3

Tabelle 4: Zytokinfreisetzung humaner intestinaler Mastzellen. 10^6 Mastzellen wurden für sechs Stunden mit IgE/ α IgE stimuliert und anschließend die Ausschüttung verschiedener Zytokine im Überstand gemessen. (Mittelwerte \pm SEM, n = 10)

Die Freisetzung von Cysteinyl Leukotrien LTC₄ wurde ebenfalls im Überstand von 10^6 humanen Darmmastzellen/ml, die für sechs Stunden mit IgE/ α IgE stimuliert wurden, gemessen. Es ergab sich eine Durchschnittliche Ausschüttung von $25,4 \pm 3,8$ ng/ 10^6 Zellen.

3.2 Expression von SNARE-Proteinen in humanen intestinalen Mastzellen

SNARE-Proteine ermöglichen das Verschmelzen zweier Membranen und somit die Freisetzung von Mediatoren aus sekretorischen Vesikeln, indem sie die *Lipidbilayer* nahe zusammen bringen, wodurch die Membranfusion erfolgen kann. In unterschiedlichen Zelltypen wird dieser Vorgang von unterschiedlichen SNAREs gesteuert. Um den Prozess der Degranulation humaner Mastzellen besser verstehen zu können, wurde zunächst die Expression von SNARE-Proteinen in humanen Darmmastzellen auf mRNA- sowie auf Proteinebene analysiert.

3.2.1 Nachweis von mRNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion und anschließendem Auftrennen des vervielfältigten Produktes auf einem 1 %-igen Agarosegel wurde das spezifische Expressionsmuster von SNAREs in humanen intestinalen Mastzellen untersucht. Hierfür wurden 15 Vertreter aus der Familie der VAMPs, Syntaxine, der SNAP-25-Familie, sowie Vti1b analysiert. Als Vergleich dazu wurde ergänzend die Expression von SNARE-Proteinen in den Mastzelllinien LAD2 und HMC-1 untersucht.

In humanen Darmmastzellen wurde aus der SNAP-25-Familie SNAP-23 sehr deutlich exprimiert, während SNAP-25, das als neuronale Isoform des ubiquitär nachgewiesenen SNAP-23 angesehen wird, nur in zwei von zehn untersuchten Mastzellkulturen schwach

exprimiert wurde. Aus der Familie der Syntaxine konnten Syntaxin-2, -3, -4 und -6 deutlich detektiert werden. Syntaxin-1b lag schwächer exprimiert vor und Syntaxin-1a war nicht nachzuweisen. Eine klare Expression konnte außerdem für VAMP-2, -3, -5, -7 und -8 nachgewiesen werden, während VAMP-4 nur schwach exprimiert wurde. Ebenfalls eindeutig nachweisbar war Vti1b.

Ähnliche Ergebnisse wurden für LAD2 Zellen erzielt. SNAP-25 konnte in keiner von drei Proben nachgewiesen werden. Syntaxin-1a, VAMP-2 und -5 wurden nur schwach exprimiert. Für HMC-1 Zellen war eine geringe Expression von SNAP-25 sowie eine ansatzweise erkennbare Expression von Syntaxin-1a und -1b detektierbar. Lediglich für VAMP-2 konnte kein Signal dargestellt werden und für VAMP-5 zeigte sich wie schon zuvor bei den LAD2 Zellen nur eine geringe Expression.

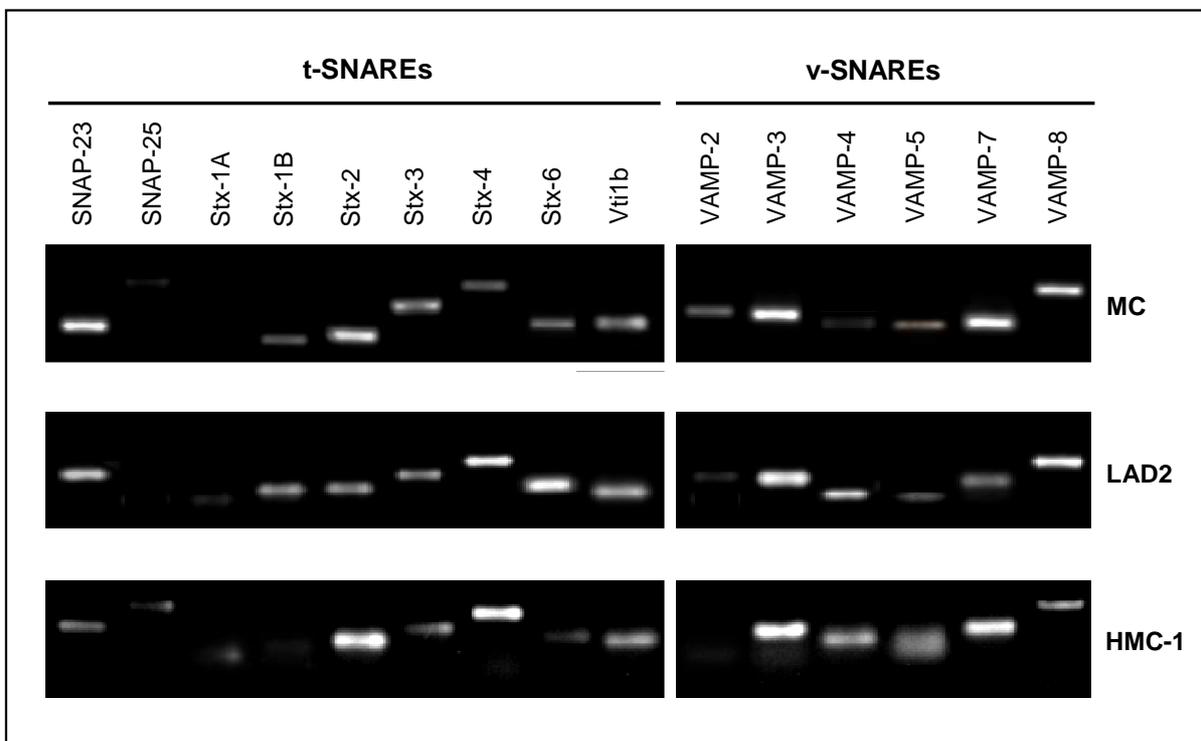


Abbildung 9: mRNA Expression von SNARE-Proteinen in Mastzellen. Mittels PCR und Auftrennen der DNA auf einem Agarosegels, wurde das Expressionsmuster von SNAREs in verschiedenen Mastzellkulturen analysiert. **(A)** SNARE-Expression in humanen intestinalen Mastzellen **(B)** SNARE-Expression in LAD2 Zellen **(C)** SNARE-Expression in HMC-1 Zellen.

3.2.2 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Die Ergebnisse der Expression von SNARE-mRNA wurden auf Proteinebene für humane Darmmastzellen mittels Western Blot überprüft. Hierfür wurden 10^5 Zellen in $10\ \mu\text{l}$ Lysepuffer gelöst, mit Ladebuffer 1:1 verdünnt, per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde das entsprechende Fragment der jeweiligen SNARE-Proteine sichtbar gemacht. Als Kontrolle der Antikörper gegen SNAP-25, Syntaxin-1a und VAMP-2 diente ein Extrakt aus dem Gehirn einer Maus.

In humanen Darmmastzellen konnte eine deutliche Bande für SNAP-23, Syntaxin-2, -3, -4 und -6, VAMP-3, -7 und -8, sowie Vti1b dargestellt werden. Wie schon zuvor auf RNA-Ebene zeigte sich für Syntaxin-1b und VAMP-2 nur eine schwache Expression. Für SNAP-25 und Syntaxin-1a konnte keinerlei Banden festgestellt werden.

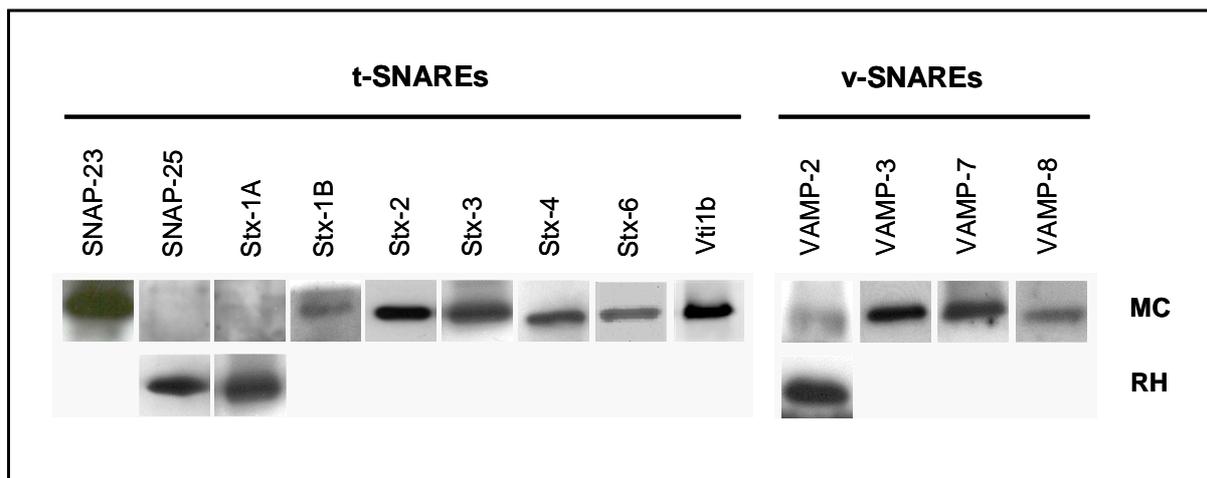


Abbildung 10: Protein Expression von SNARE-Proteinen in humanen Darmmastzellen. Zelllysate wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, per Western Blot auf eine Membran übertragen und mit den entsprechenden SNARE-Antikörpern markiert. MC, Mastzelle; RH, Rattenhirn-Extrakt.

3.3 Intrazelluläre Lokalisation von SNARE-Proteinen in Mastzellen

Um die Funktion von SNARE-Proteinen sinnvoll interpretieren zu können, wurde deren Lokalisation innerhalb der Zelle dargestellt. Hierfür wurden humane intestinale Mastzellen nach Fixierung in 2 % Paraformaldehyd mit 0,3 % Saponin permeabilisiert, um somit den Eintritt von Antikörpern in die Zelle zu ermöglichen. Die hierfür verwendeten anti-SNARE Antikörper wurden dann durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Es wurden jeweils stimulierte Zellen mit unaktivierten Zellen verglichen. Mit Hilfe der Apotom-Technologie wurden die angefärbten Strukturen zur genaueren Analyse auf verschiedenen optischen Ebenen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Dargestellt wurde jeweils die mittlere Ebene der Zelle.

Die Färbung des t-SNARE SNAP-23 ergab eine deutlich plasmamembranständige Lokalisation. Auch die ebenfalls den t-SNAREs zugerechneten Syntaxine-3, -4 und -6 befanden sich sowohl im unaktivierten, als auch im aktivierten Zustand der Zellen vorwiegend an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu wurde Syntaxin-2 im Zytoplasma verteilt gefunden, unabhängig davon, ob die Zelle stimuliert wurde, oder nicht. Die zu den v-SNAREs zählenden VAMP-3, -7 und -8 befanden sich bei unstimulierten Zellen ebenfalls im Zellinneren verteilt. Auffällig war, dass bei einigen Zellen eine deutliche granuläre Anordnung dieser SNARE-Proteine darstellbar war. Nach Aktivierung der Zellen mit 1 μ M Ionomycin/PMA für 15 Minuten, translozierte jedoch VAMP-7 und -8 größtenteils an die Plasmamembran. Auch das SNARE-Protein Vti1b konnte in unstimulierten Zellen zytoplasmatisch und mit deutlicher granulärer Verteilung dargestellt werden. Diese Anordnung blieb auch nach 15 Minuten Stimulation erhalten. Erst nach einer längeren Aktivierungszeit von 2 Stunden wurde eine Verschiebung in Richtung Plasmamembran erkennbar, die nach 6 Stunden am deutlichsten war. Es war jedoch zu erkennen, dass nicht das gesamte in der Zelle vorkommende Vti1b an die Plasmamembran wanderte, sondern ein gewisser Anteil weiterhin in zytoplasmatischen Bereichen verblieb.

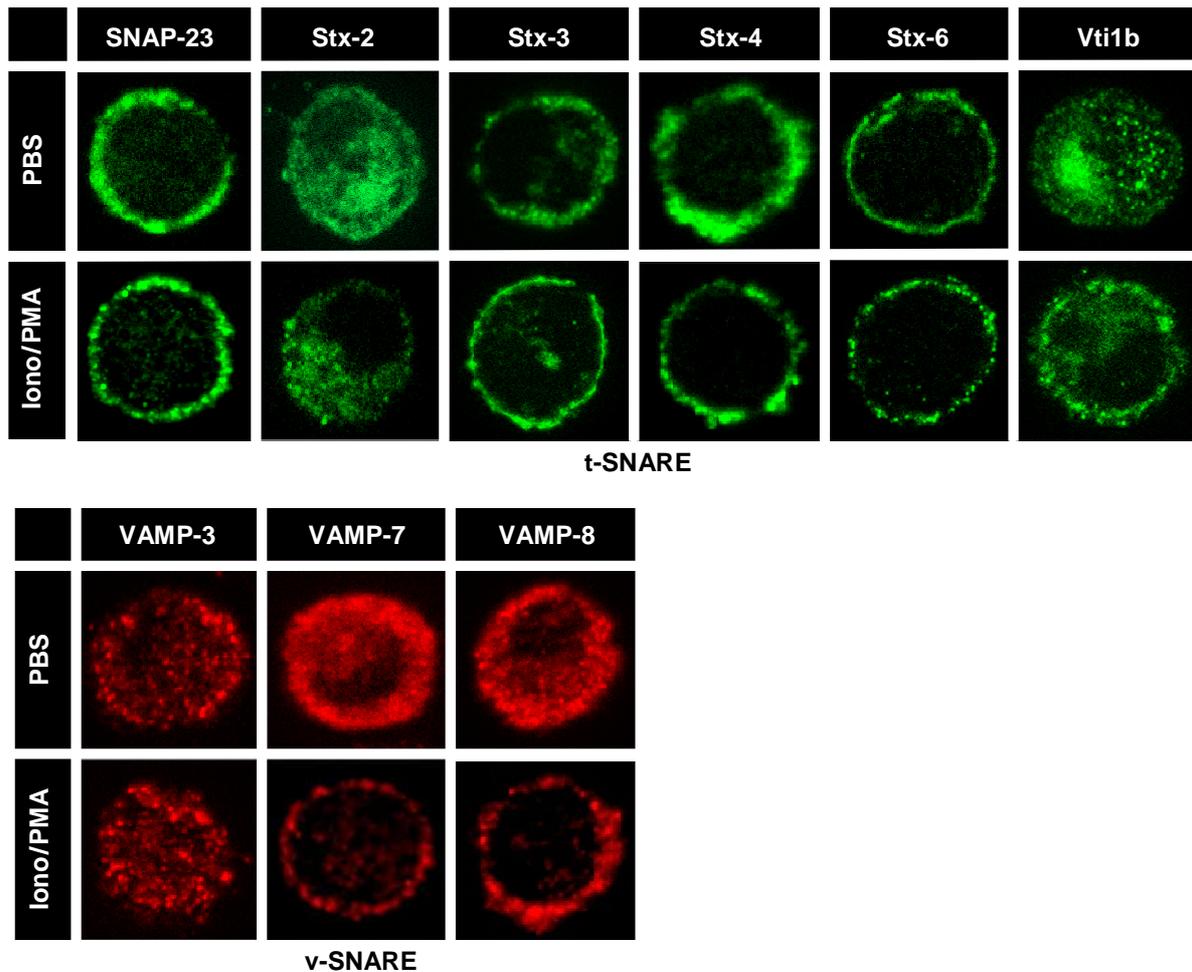


Abbildung 11: Intrazelluläre Lokalisation von SNARE-Proteinen in humanen intestinalen Mastzellen. Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen aus fünf unterschiedlichen Mastzellkulturen zeigen die Verteilung von SNARE-Proteinen in der Zelle. Verglichen wurden unbehandelte (PBS) mit stimulierten (Iono/PMA) Mastzellen. Die Stimulationszeit betrug mit Ausnahme der Vti1b-Färbung 15 Minuten. Da Vti1b erst nach längerer Stimulationszeit zur Plasmamembran translozierte, wurden die Vti1b-gefärbten Zellen 2 Stunden stimuliert.

Für einige der bereits in Einzelfärbungen dargestellten SNAREs wurden zudem Kombinationsfärbungen zweier möglicher Interaktionspartner durchgeführt. Dies war nur für jeweils zwei SNARE-Proteine möglich, für die Antikörper aus verschiedenen Spezies (Maus und Kaninchen) zur Verfügung standen, gegen die dann der entsprechende fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper gerichtet war.

Eine deutliche Kolo-kalisation konnte für SNAP-23 und Syntaxin-4 dargestellt werden, die beide unabhängig einer Stimulation an der Plasmamembran lokalisiert waren. Auch VAMP-7 und VAMP-8 kolokalisierten mit SNAP-23, bzw. Syntaxin-4 nach Aktivierung der Zellen für 15 Minuten mit Ionomycin/PMA. Das Gleiche traf auf Vti1b und Syntaxin-4 nach

einer Stimulationszeit von 2 Stunden zu. Im Gegensatz dazu ergab sich hingegen keinerlei Überlappung für VAMP-3 und Syntaxin-4.

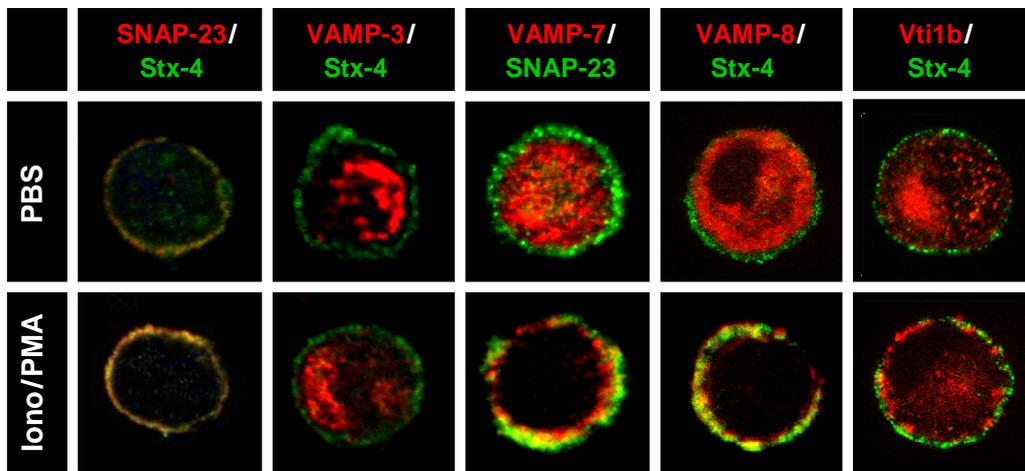


Abbildung 12: Doppelfärbung möglicher Interaktionspartner in Mastzellen. Gezeigt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Kombinationsfärbungen je zweier SNARE-Proteine. Eine deutliche Kolokalisation von SNAP-23 und Syntaxin-4, sowie VAMP-7 und -8 mit SNAP-23 bzw. Syntaxin-4 ist in stimulierten Zellen erkennbar.

3.4 Komplexbildung zwischen SNARE-Proteinen nach Aktivierung von Mastzellen

Eine Kolokalisation verschiedener SNARE-Proteine sagt noch nichts über deren funktionelles Zusammenspiel aus. Erst das Ausbilden stabiler Komplexe zwischen SNAREs ist ein deutlicher Hinweis für deren Bedeutung bei der Degranulation von Mastzellen. Diese Komplexbildung von SNAREs wurde mit Hilfe der Ko-Immünpräzipitation untersucht. Hierfür wurden unstimulierte und mit 1 μ M Ionomycin/PMA stimulierte humane Darmmastzellen lysiert und gebildete SNARE-Komplexe mit einem entsprechenden Antikörper gefällt. Da zu vermuten war, dass SNAP-23 Teil des Komplexes ist, wurde ein Antikörper gegen SNAP-23 sowie eine Isotypkontrolle (rabbit IgG₁) für die Fällung verwendet. Nach anschließendem Auftrennen der Proteine in einer SDS-PAGE und Übertragen auf eine Nitrocellulose-Membran per Western Blot wurden verschiedene SNARE-Proteine mittels Antikörpern nachgewiesen.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnte bei Fällung von Lysaten aktivierter Mastzellen mit SNAP-23 die SNARE-Proteine Syntaxin-4, VAMP-7 und -8 als Teil des SNARE-Komplexes nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte VAMP-2 und -3 nicht als Teil

des Komplexes detektiert werden. In unstimulierten Zellen ist hingegen nur eine sehr schwache Bande bei Färbung mit Syntaxin-4, VAMP-7 und -8 erkennbar. Die Isotypkontrolle zeigte keinerlei anfärbbaren Proteinbanden.

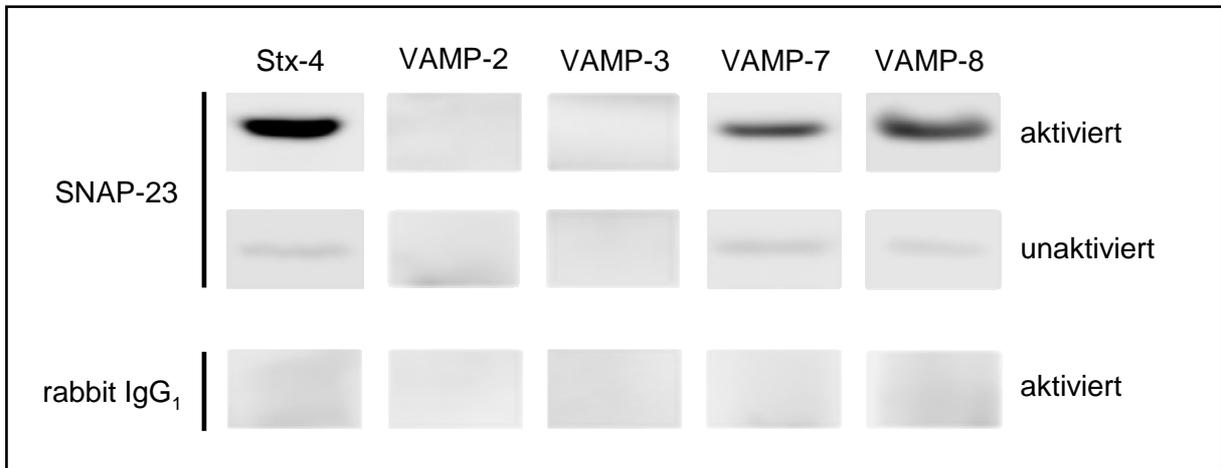


Abbildung 13: Ko-Immünpräzipitation von SNARE-Proteine in Mastzellen. Lysate unaktivierter und aktivierter Mastzellen wurden mit anti-SNAP-23 Antikörpern und einer Isotypkontrolle (rabbit IgG₁) ko-immünpräzipitiert. Nach einem anschließenden Western Blot und der Detektion von SNARE-Proteinen mit den entsprechenden Antikörpern konnte eine Komplexbildung zwischen SNAP-23, Syntaxin-4, VAMP-7 und -8 nachgewiesen werden.

3.5 Rolle von SNARE-Proteinen bei der Freisetzung von gespeicherten und *de novo* synthetisierten Mediatoren

3.5.1 Transfektion von Mastzellen mit siRNA

Komplexbildungen zwischen SNARE-Proteinen ermöglichen die Degranulation von Zellen. Welche SNAREs in humanen intestinalen Mastzellen für das Andocken und Verschmelzen der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran verantwortlich sind, sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) untersucht werden. RNAi ermöglicht das zielgerichtete Ausschalten der Expression eines einzelnen Proteins in der Zelle. Dafür ist es notwendig, siRNA (*small interfering RNA*), kleine doppelsträngige RNA-Fragmente von 21–28 Oligonukleotiden Länge, mit einem Abschnitt der Sequenz des auszuschaltenden Genes, in eine Zelle einzubringen. Ein natürlicher Abwehrmechanismus von Zellen sorgt für den Abbau von mRNA mit der gleichen Sequenz durch Enzyme (Nukleasen). Im Jahr 2001 fand diese Methode erstmals Anwendung bei menschlichen Zellen [141]. Für das Einbringen der siRNA

in die entsprechenden Zellen stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Häufig wird ein virales System verwendet, mit dem ein Plasmid in die Zelle gebracht wird. Weitere Möglichkeiten sind die Transfektion mit speziellen, dafür entwickelten Reagenzien oder die Elektroporation.

Für die Transfektion humaner intestinaler Mastzellen sowie LAD2 Zellen kamen im Rahmen der vorliegenden Arbeit die folgenden Transfektionsreagenzien zum Einsatz: *PULSinTM Protein delivery reagent*, *BLOCK-iTTM Transfection Kit*, *HiPerFect Transfection Reagent* und *X-treme Gene siRNA Transfection Reagent*. Der Transfektionserfolg wurde mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten doppelsträngigen RNA-Oligos mikroskopisch analysiert. Da sowohl die Transfektion von primären Mastzellen als auch von LAD2 Zellen nicht erfolgreich verlief, kam schließlich das NucleofectorTM System von Lonza zum Einsatz. In einer Kombination aus Elektroporation und einem spezifisch auf die jeweils verwendeten Zellen ausgelegten Reaktionspuffer wurden pro Versuchsbedingung 5×10^5 Zellen in einem ersten Schritt mit einem fluoreszenzkodierenden Plasmid (pmax GFP Vector) transfiziert. Um die bestmögliche Kombination aus Transfektionserfolg und Überlebensrate zu erreichen, wurden verschiedene Programme getestet und die Anzahl der positiv transfizierten Zellen mikroskopisch ausgezählt. Ebenso wurden Zellen, welche mit dem Testplasmid oder mit fluoreszenzmarkierter siRNA (*siGLO RED Transfection Indicator*) transfiziert worden waren, durchflusszytometrisch untersucht.

Die fluoreszenzmikroskopische Auszählung ergab für das Programm T-030 einen Tag nach der Transfektion von LAD2 Zellen mit dem Plasmid mit 70 % den höchsten Anteil an positiven Zellen. Die Viabilität lag bei allen verwendeten Programmen einen Tag nach der Transfektion um die 90 % und drei Tage nach der Transfektion noch bei 77,3 – 88,5 % (siehe Tabelle 5A). Humane Darmmastzellen ließen sich am besten mit dem Programm X-001 transfizieren, erreichten aber nur einen Anteil von 48 % positiver Zellen und die Viabilität sank nach einem Tag auf 65 % und nach drei Tagen auf 12 % (siehe Tabelle 5B).

A

Programm	positiv [%]	Viabilität [%]	
	nach 1 Tag	nach 1 Tag	nach 3 Tagen
A-020	14	93	89
D-023	23	91	85
L-029	25	91	88
T-020	43	90	77
T-030	70	92	80
X-001	31	93	88
X-005	35	90	84
Kontrolle	0	90	93

B

Programm	positiv [%]	Viabilität [%]	
	nach 1 Tag	nach 1 Tag	nach 3 Tagen
X-001	48	65	12
X-003	25	50	5
Y-001	7	56	33
W-001	26	63	14
Kontrolle	0	92	88

Tabelle 5: Transfektionsrate von LAD2 Zellen und humanen Darmmastzellen. LAD2-Zellen und humane Darmmastzellen wurden mit einem GFP-fluoreszenzkodierendem Plasmid transfiziert. Der Anteil positiver Zellen wurde für die verwendeten Programme mikroskopisch ausgezählt. **(A)** Bei der Transfektion von LAD2 erzielte das Programm T-030 die höchsten Transfektionsrate. **(B)** Für humane Darmmastzellen wurde der höchste Anteil positiver Zellen mit dem Programm X-001 erreicht.

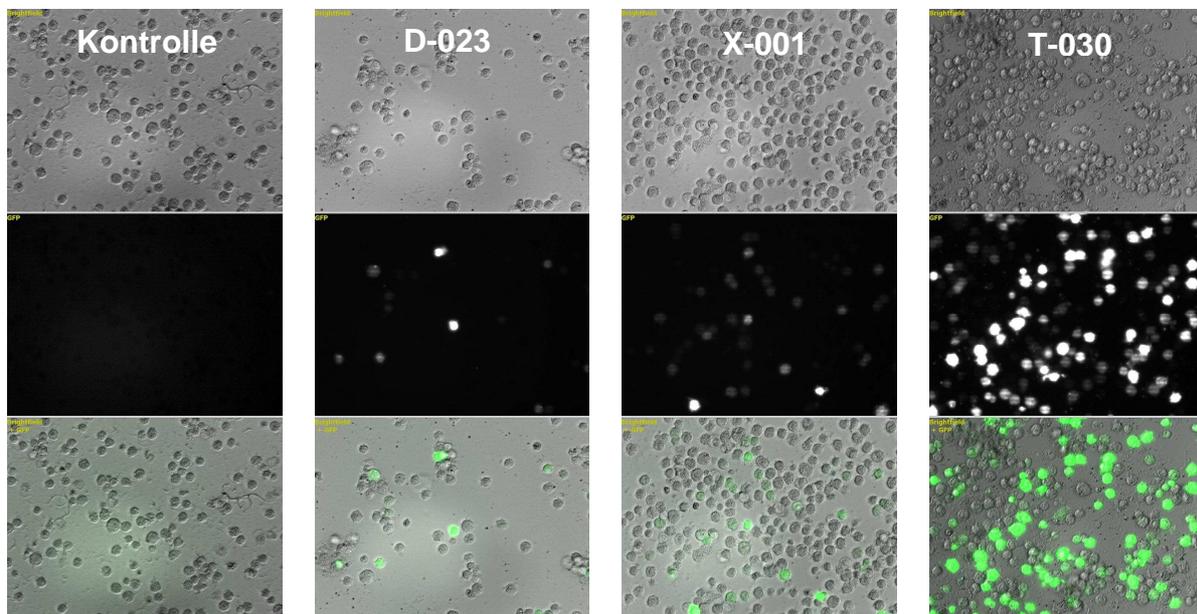


Abbildung 14: Mit GFP-fluoreszenzkodierendem Plasmid transfizierte LAD2 Zellen. Dargestellt sind exemplarische mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von transfizierten LAD2 Zellen, einen Tag nach der Transfektion mit drei unterschiedlichen Programmen sowie untransfizierte Zellen als Kontrolle. Oben: Hellfeldaufnahme, Mitte: GFP-Fluoreszenzaufnahme, Unten: Kombination aus Hellfeld- und GFP-Fluoreszenzaufnahme.

Die durchflusszytometrische Analyse ergab für LAD2 Zellen für das Programm T-030 und Transfektion mit dem Plasmid 79 % positive Zellen. Mit fluoreszenzmarkierter siRNA wurde beim Einsatz von 30 nM siRNA ein Anteil von 34 % positiver Zellen erreicht, der sich beim Einsatz von 300 nM siRNA auf 99 % erhöhte (siehe Abbildung 15). Die Analyse der humanen intestinalen Mastzellen ergab eine Transfektionsrate mit dem Programm X-001 von 49 % für das Plasmid und von 67 % für die fluoreszenzmarkierte siRNA (siehe Abbildung 16).

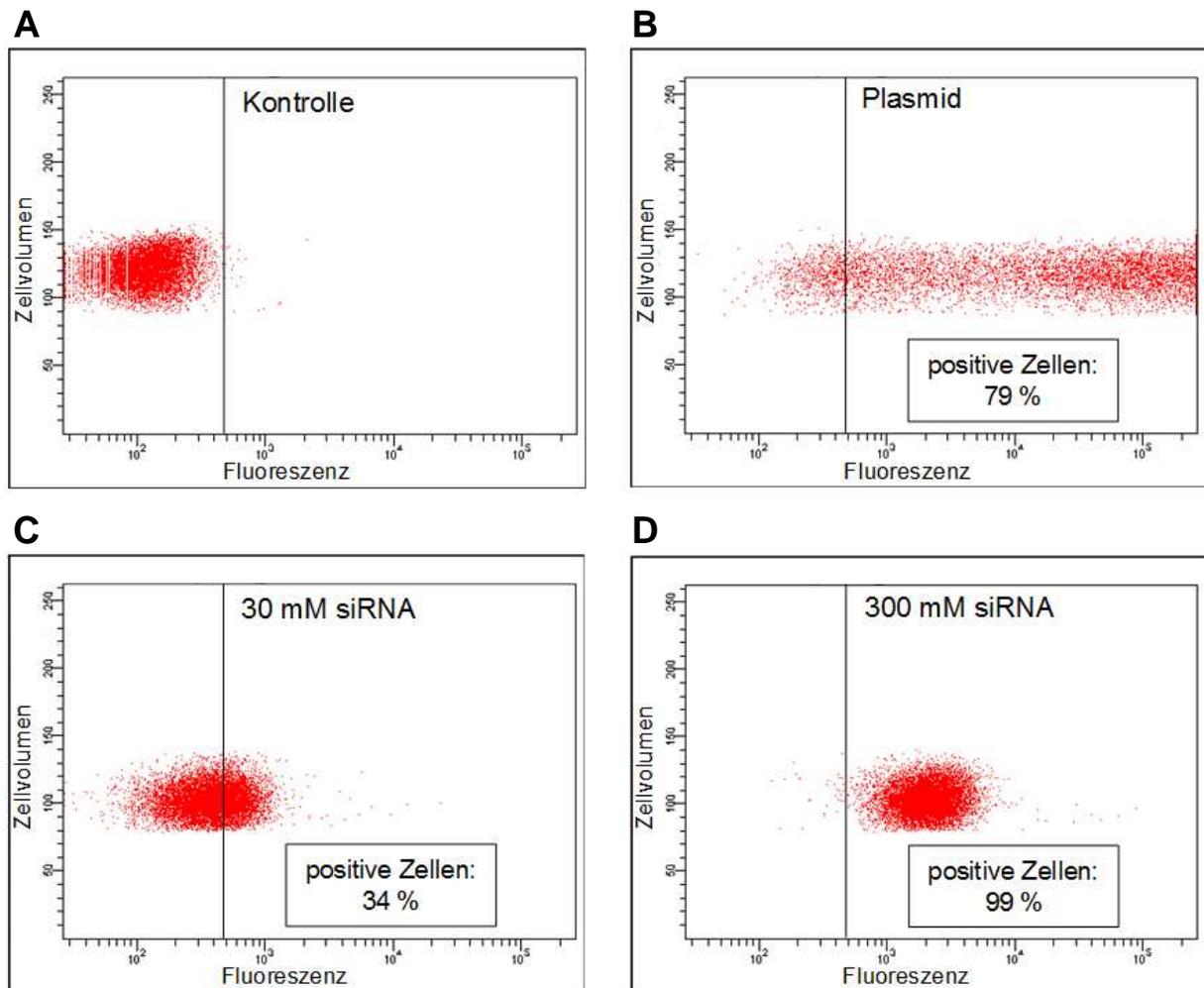


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektionsrate von LAD2-Zellen. LAD2 Zellen durchliefen das Programm T-030. **(A)** Kontrolle, ohne Plasmid oder siRNA. **(B)** Mit 2 μ g Plasmid. **(C)** Mit 30 nM siRNA. **(D)** Mit 300 nM siRNA.

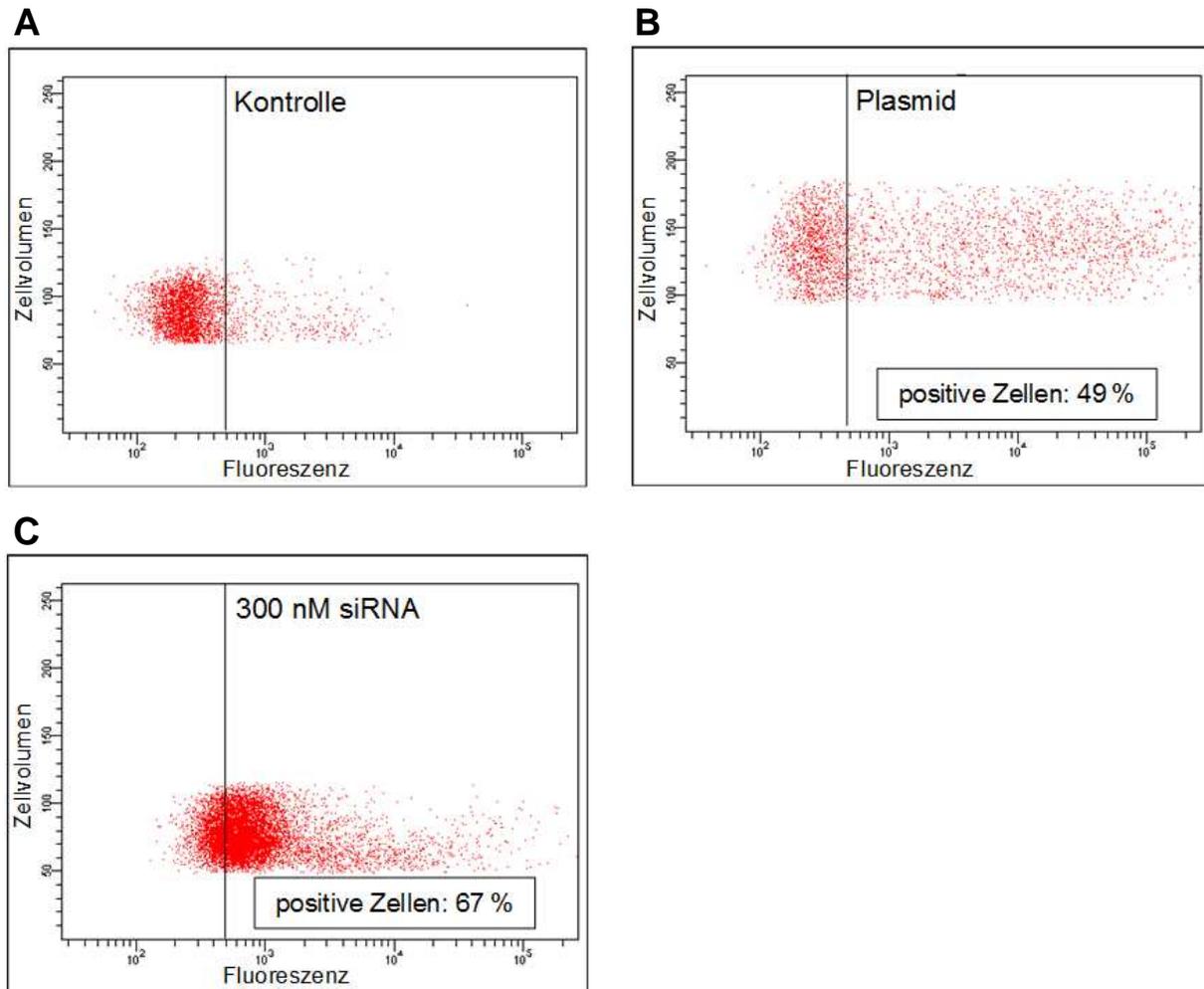


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektionsrate von humanen Darmmastzellen. Humane Darmmastzellen wurden mit dem Programm X-001 transfiziert. **(A)** Kontrolle, ohne Plasmid oder siRNA. **(B)** Mit 2 μ g Plasmid. **(C)** Mit 300 nM siRNA.

Nach erfolgreicher Transfektion mit dem Testplasmid und fluoreszenzmarkierter siRNA wurde funktionelle siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool, Human STX4A), zur Runterregulation von Syntaxin-4 in Zellen eingebracht. Diese besteht aus vier unterschiedlichen Sequenzen (GGACAAUUCGGCAGACUAU, CGUCACAGUGGUUGGAUA, GCGAGGUGUUUGUGUCCAA und CGUCAACACAAGAAUGAGA), um somit mit einer größeren Sicherheit ein Ausschalten der Expression von Syntaxin-4 zu garantieren. Ein bis zwei Tage nach der Transfektion von LAD2 Zellen bzw. humanen Darmmastzellen mit dem jeweils erfolgreichsten Programm (T-030, bzw. X-001) wurden die Zellen stimuliert und mit einer untransfizierten Kontrolle verglichen.

Es ergab sich bei der Transfektion von LAD2 Zellen mit 30 nM, bzw 300 nM Syntaxin-4 siRNA eine signifikante Verminderung der Ausschüttung von β -Hexosaminidase

nach Stimulation mit Ionomycin/PMA ($1 \mu\text{M}$) von $60,6 \pm 10,9 \%$ auf $20,0 \pm 6,0 \%$, bzw. $23,5 \pm 8,4 \%$. Ebenso verminderte die Transfektion von humanen Darmmastzellen mit Syntaxin-4 siRNA die Freisetzung von β -Hexosaminidase nach Stimulation mit IgE/ α IgE ($0,4 \mu\text{g/ml} / 1 \mu\text{g/ml}$) von $28,7 \pm 4,8 \%$ auf $2,0 \pm 4,9 \%$, bzw. $12,0 \pm 12,2 \%$ (siehe Abbildung 17A+B).

Das Einbeziehen weiterer Kontrollen, welche das entsprechende Transfektionsprogramm durchliefen, ohne dass dabei siRNA in die Zellen gebracht wurde, zeigte jedoch den gleichen Effekt der verminderten Ausschüttung von β -Hexosaminidase. Dies wurde in exemplarischen Messungen auch für die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Weitere Transfektionen mit schwächeren Programmen (V-001 und X-001) zeigten, dass diese die Fähigkeit der β -Hexosaminidase-Ausschüttung nur unsignifikant vermindern. Da die Transfektionsraten jedoch ebenfalls zu gering waren, konnte die Zugabe von Syntaxin-4 siRNA auch keinen inhibitorischen Effekt auslösen (siehe Abbildung 17C).

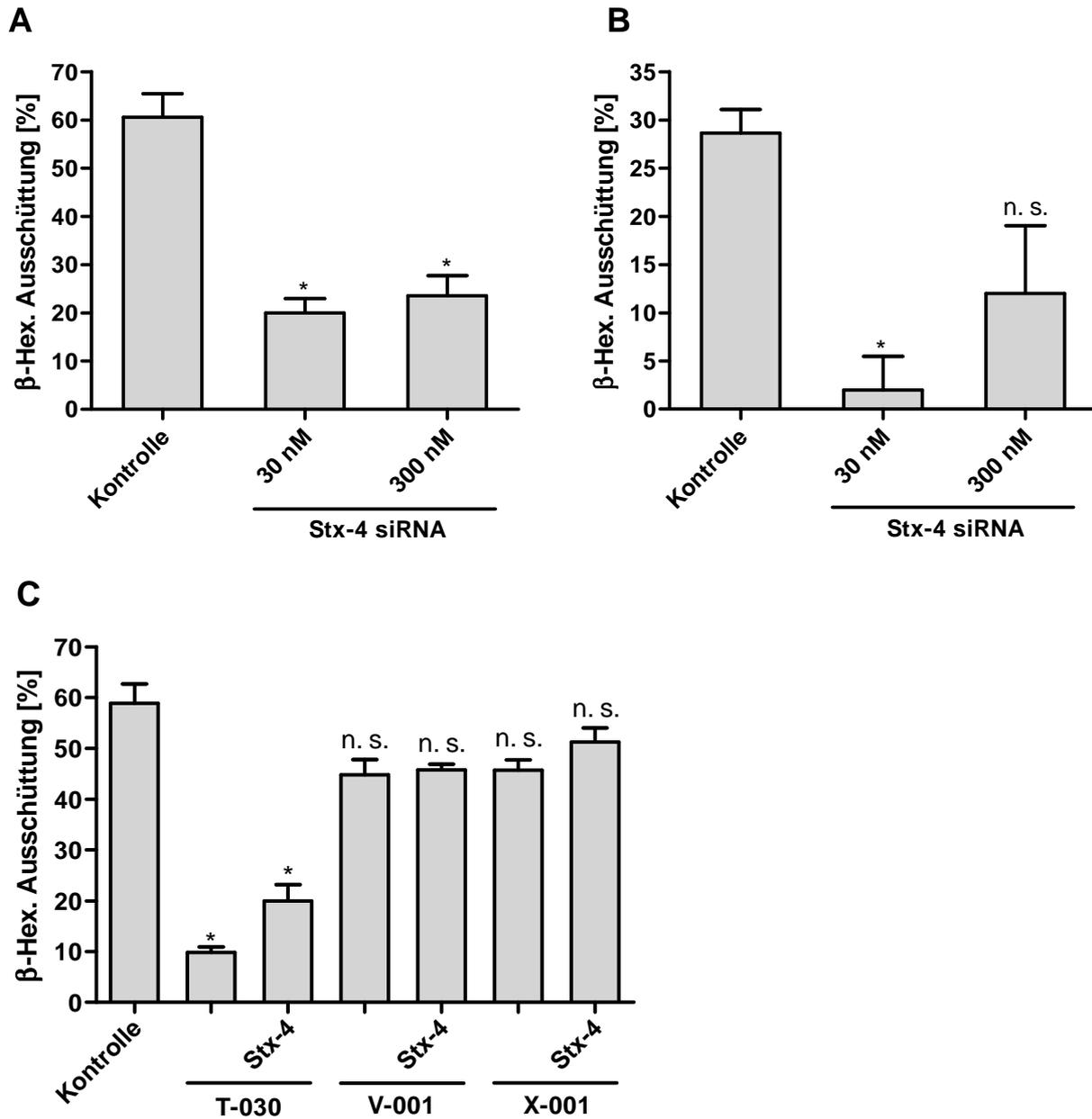


Abbildung 17: β-Hexosaminidase Freisetzung transfizierter Mastzellen. LAD2 Zellen **(A)** bzw humane Darmmastzellen **(B)** wurden mit 30 und 300 nM Syntaxin-4 siRNA transfiziert und die Ausschüttung von β-Hexosaminidase nach Stimulation mit Ionomycin/PMA bzw. IgE/αIgE mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. **(C)** Stimulierbarkeit von mit und ohne 300 nM Syntaxin-4 siRNA transfizierten LAD2 Zellen unter Verwendung verschiedener Transfektionsprogramme (Mittelwerte ± SEM, n = 3-4). * p<0,05; n. s., nicht signifikant

3.5.2 Einbringen von neutralisierenden Antikörpern in humane Darmmastzellen

Da das Ausschalten von SNARE-Proteinen mittels RNAi nicht den gewünschten Effekt erzielte, sollten im nächsten Schritt inhibitorische Antikörper in humane Darmmastzellen eingebracht werden. Diese erkennen die zytoplasmatische NH₂-terminale Region der entsprechenden SNAREs und verhindern so die Bindung an andere SNARE-Proteine. Hierfür wurden Mastzellen mit Streptolysin O permeabilisiert und für 10 Minuten bei 37 °C mit dem jeweiligen anti-SNARE-Antikörper inkubiert. Durch Zugabe eines kalziumhaltigen Mediums für eine Stunde auf Eis wurde den Zellen anschließend die Möglichkeit gegeben die Poren wieder zu schließen [216].

Als Kontrolle des Erfolges der Permeabilisierung wurde der prozentuale Anteil der mit Trypanblau anfärbaren Zellen für verschiedene Konzentrationen von Streptolysin O bestimmt. Abbildung 18A zeigt einen deutlichen Anstieg des Permeabilisierungs-Erfolges bei einer Konzentration von 20 µg/ml. Eine weitere Erhöhung der Konzentration bewirkte nur einen leichten prozentualen Anstieg der angefärbten Zellen, verminderte jedoch deutlich den Anteil vitaler Zellen (nicht gezeigt).

Anschließend wurde überprüft, ob die mit Streptolysin O behandelten Mastzellen genauso aktivierbar sind wie unbehandelte Zellen. Wie in Abbildung 18B erkennbar, ergab sich keine negative Beeinflussung in der Ausschüttung von β-Hexosaminidase bei Stimulierung mit IgE/αIgE, bzw. Ionomycin/PMA.

Um zu gewährleisten, dass genügend Antikörper in die Zelle gelangen konnten, wurde eine Kontrolle mit Alexa 594 fluoreszenzmarkiertem Maus IgG mitgeführt. Abbildung 18C zeigt eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme je einer Zelle mit und ohne Maus IgG. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine große Menge an fluoreszierendem IgG in der Zelle vorhanden war.

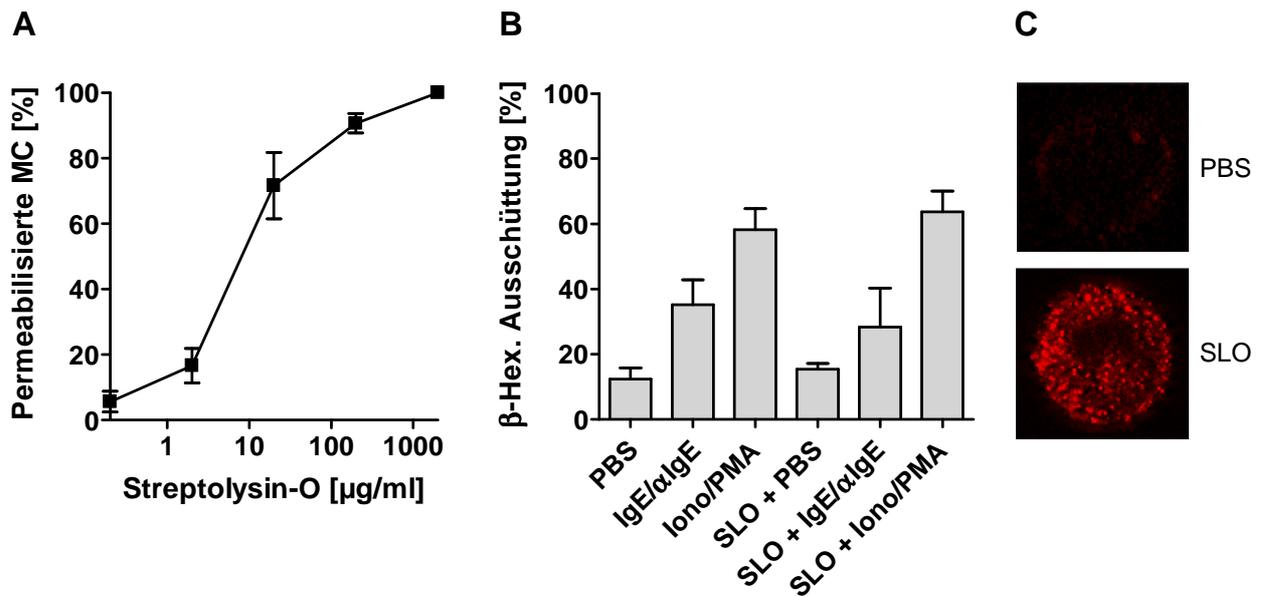


Abbildung 18: Permeabilisierung humaner intestinaler Mastzellen mit Streptolysin O. (A) Mastzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Streptolysin O behandelt. Der prozentuale Anteil permeabilisierter Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Ein hoher Prozentsatz gefärbter Mastzellen wurde bei einer Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Streptolysin O erreicht. (B) Die Aktivierbarkeit von mit Streptolysin O behandelten Zellen wurde getestet. Streptolysin O hat keinen Einfluss auf eine Stimulation mit Ionomycin/PMA bzw. IgE/ α IgE. (C) Fluoreszenzaufnahmen als Kontrolle für das Eindringen von Antikörpern in die behandelten Zellen zeigten eine ausreichend hohe Menge an aufgenommenem fluoreszenzmarkiertem Maus IgG.

3.5.3 Analyse der Freisetzung gespeicherter Mediatoren nach Inhibition von SNAREs

Um die Bedeutung des jeweiligen blockierten SNAREs für die Ausschüttung gespeicherter Mediatoren zu bestimmen, wurden die Zellen für eine Stunde mit IgE/ α IgE (0,4 $\mu\text{g/ml}$ / 1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert und der Anteil der freigesetzten β -Hexosaminidase im Überstand bestimmt. Als Kontrolle wurde nach der Permeabilisierung neben den jeweiligen Antikörpern IgG₁ aus Maus bzw. Kaninchen in die Zellen eingebracht. Es ergab sich hierdurch keinerlei Beeinflussung der Stimulierbarkeit der Mastzellen (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu verursachte anti-SNAP-23 eine signifikante Runterregulation der β -Hexosaminidase Ausschüttung um $74,6 \pm 11,6\%$. Auch Antikörper gegen Syntaxin-3, -4 und -6 verursachten eine signifikante Verminderung der Degranulation um $67,9 \pm 8,2\%$, $39,6 \pm 7,1\%$ bzw. $51,1 \pm 12,0\%$, während das Blockieren von Syntaxin-2 zu einer nur schwachen – wenn auch signifikanten – Reduktion von $20,9 \pm 6,9\%$ führte. Antikörper gegen VAMP-2 und -3 hatten keinen signifikanten Effekt. Hingegen führte die Inhibition von

VAMP-7 und -8 zu einer signifikanten Reduktion der β -Hexosaminidase Ausschüttung um $40,3 \pm 11,9\%$ und $59,8 \pm 6,1\%$ und ein Blockieren von Vti1b verhinderte diese mit einer Verminderung um $91,6 \pm 15,3\%$ fast vollständig.

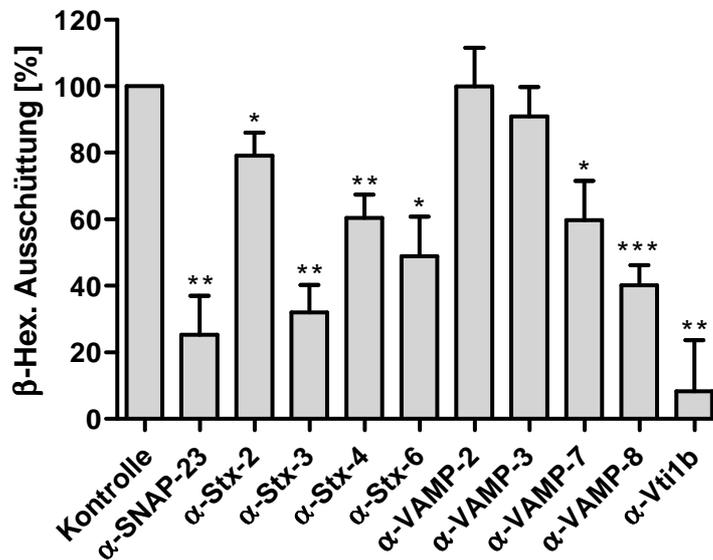


Abbildung 19: Inhibition der Freisetzung von β -Hexosaminidase durch Antikörper nach einer Stimulation von einer Stunde. Mastzellen wurden mit Streptolysin O permeabilisiert und mit verschiedenen Antikörpern, die gegen entsprechende SNAREs gerichtet sind, behandelt. In der anschließenden Stimulation mit IgE/αIgE verursachten Antikörper gegen SNAP-23, Syntaxin-2, -3, -4 und -6, VAMP-7 und -8, sowie Vti1b eine signifikante Reduktion der Ausschüttung von β -Hexosaminidase (Mittelwerte \pm SEM, n = 6). * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

3.5.4 Analyse der Freisetzung *de novo* synthetisierter Mediatoren nach Inhibition von SNAREs

Im Gegensatz zu der in den Mastzellen gespeicherten β -Hexosaminidase werden Leukotriene und Zytokine erst nach Aktivierung der Zellen exprimiert und verzögert freigesetzt. Durch eine auf sechs Stunden verlängerte Stimulationszeit mit IgE/αIgE sollte untersucht werden, welche SNARE-Proteine für die Freisetzung von Leukotrienen und insbesondere von Zytokinen im Vergleich zur β -Hexosaminidase in der Spätphase nach einer Aktivierung verantwortlich sind.

Die Ausschüttung von β -Hexosaminidase wurde wie schon bei der kurzen Stimulation durch die Blockade von SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, sowie VAMP-8 und Vti1b signifikant vermindert. Anti-SNAP-23 verminderte die Freisetzung um $69,5 \pm 10,4\%$. Auch hier führte

anti-Syntaxin-2 zu einer signifikanten, jedoch schwachen Reduktion der Degranulation um $16,7 \pm 5,8\%$. Es zeigte sich außerdem, dass VAMP-7 bei einer Stimulation von sechs Stunden keine signifikante Rolle mehr zu spielen schien, wohingegen VAMP-8 die Ausschüttung um $57,4 \pm 7,1\%$ reduzierte. Außerdem inhibierten Antikörper gegen Syntaxin-3 die β -Hexosaminidase Ausschüttung etwas schwächer ($51,8 \pm 11,9\%$), dafür Antikörper gegen Syntaxin-4 etwas deutlicher ($59,8 \pm 5,7\%$) und anti-Syntaxin-6 verursachte eine deutliche Reduktion um $80,7 \pm 5,5\%$. Durch die Inhibition von Vti1b wurde die Ausschüttung vollständig verhindert.

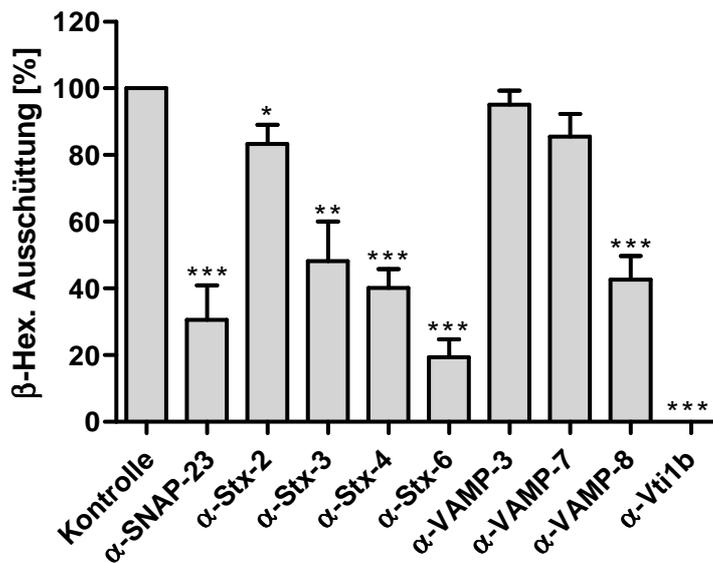


Abbildung 20: Inhibition der Freisetzung von β -Hexosaminidase durch Antikörper nach einer Stimulation von sechs Stunden. Nach der Permeabilisierung und Inkubation mit verschiedenen anti-SNARE Antikörpern, wurden Mastzellen für sechs Stunden mit IgE/ α IgE stimuliert. Eine deutliche signifikante Inhibition der Ausschüttung von β -Hexosaminidase wurde durch Antikörper gegen SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, VAMP-8, sowie Vti1b erzielt. Die Blockade von Syntaxin-2 führte nur zu einer leichten, wenn auch signifikanten Reduktion (Mittelwerte \pm SEM, n = 10). * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Ausschüttung des gemessenen Cysteinyl Leukotrien LTC₄ ließ sich durch die gleichen Antikörper wie zuvor die Ausschüttung der β -Hexosaminidase reduzieren. Anti-SNAP-23 und anti-Vti1b Antikörper blockierten fast vollständig die Freisetzung von LTC₄. Ebenso verursachten Antikörper gegen Syntaxin-3, -4 und -6 sowie VAMP-8 eine höchst signifikante Verminderung der Ausschüttung um 68,1 – 76,5 %. Die Inhibition von Syntaxin-2 führte zu einer schwachen, jedoch auch signifikanten Verminderung um 19,1 %, VAMP-3 und -7 verursachten keinen signifikanten Effekt.

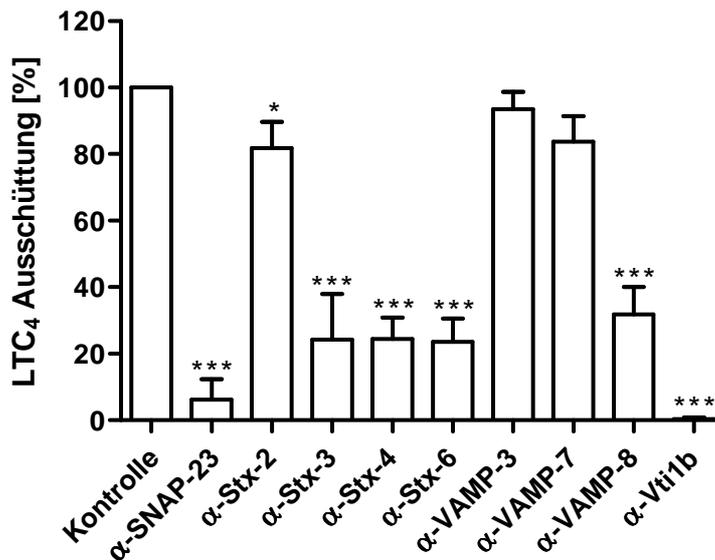


Abbildung 21: Inhibition der Freisetzung von Cysteinyl Leukotrienen durch Antikörper nach einer Stimulation von sechs Stunden. Die Ausschüttung von Cysteinyl Leukotrienen nach sechs Stunden Stimulation mit IgE/αIgE, wurde durch Antikörper gegen SNAP-23, Syntaxin-2, -3, -4 und -6, VAMP-8, sowie Vti1b signifikant inhibiert, wobei anti-Syntaxin-2 nur eine leichte Reduktion verursachte (Mittelwerte \pm SEM, n = 10). * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle

Die Messung der Zytokinausschüttung der mit spezifischen SNARE-Antikörpern inhibierten und für sechs Stunden mit IgE/αIgE stimulierten humanen Darmmastzellen erfolgte mittels eines Procarta[®] Zytokinassays. Hierdurch war es möglich die zehn in Tabelle 4 dargestellten Zytokine in jeder einzelnen Probe zu bestimmen.

Die Ausschüttung von MCP-1 und MIP-1 β wurde vollständig von Antikörpern gegen SNAP-23, Syntaxin-3, Vti1b inhibiert. Geringer war die Reduktion durch anti-Syntaxin-6, die nur für MCP-1 signifikant ausfiel. Antikörper gegen Syntaxin-2 und -4, VAMP-3, -7 und -8 hatten keinen signifikanten Effekt auf die Ausschüttung von MIP-1 β , während anti-VAMP-8 noch eine signifikante Verminderung der MCP-1-Freisetzung verursachte. Einen deutlicheren und ebenfalls signifikanten Effekt hatte die Inhibition von VAMP-8 auf die Ausschüttung von IL-5, die außerdem durch Blockade von SNAP-23, Syntaxin-3 und -6 sowie Vti1b fast

vollständig unterdrückt wurde. Die Ausschüttung des Zytokins IL-8 wurde durch Antikörper gegen SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, VAMP-8 und Vti1b gehemmt. Es war somit das einzige Zytokin, auf das die Inhibition von Syntaxin-4 einen signifikanten Einfluss hatte. Die Freisetzung der Zytokine IL-6 und MIP-1 α waren sehr uneinheitlich und mit großen Schwankungen. Dennoch wurde eine signifikante und teilweise vollständige Reduktion der Ausschüttung von IL-6 als auch MIP-1 α durch anti-VAMP-7 und anti-Vti1b erzielt. Die MIP-1 α -Freisetzung wurde außerdem signifikant durch Inhibition von SNAP-23 und Syntaxin-3 reduziert, während sich für die Ausschüttung von IL-8 eine tendenzielle Verminderung durch anti-SNAP-23, anti-Syntaxin-3, -4 und -6 ergab, die aber aufgrund der großen Schwankungen nicht signifikant war. Da die Ausschüttung von IL-13, IL-17, TNF- α und VEGF zu gering war, wird auf deren Darstellung in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

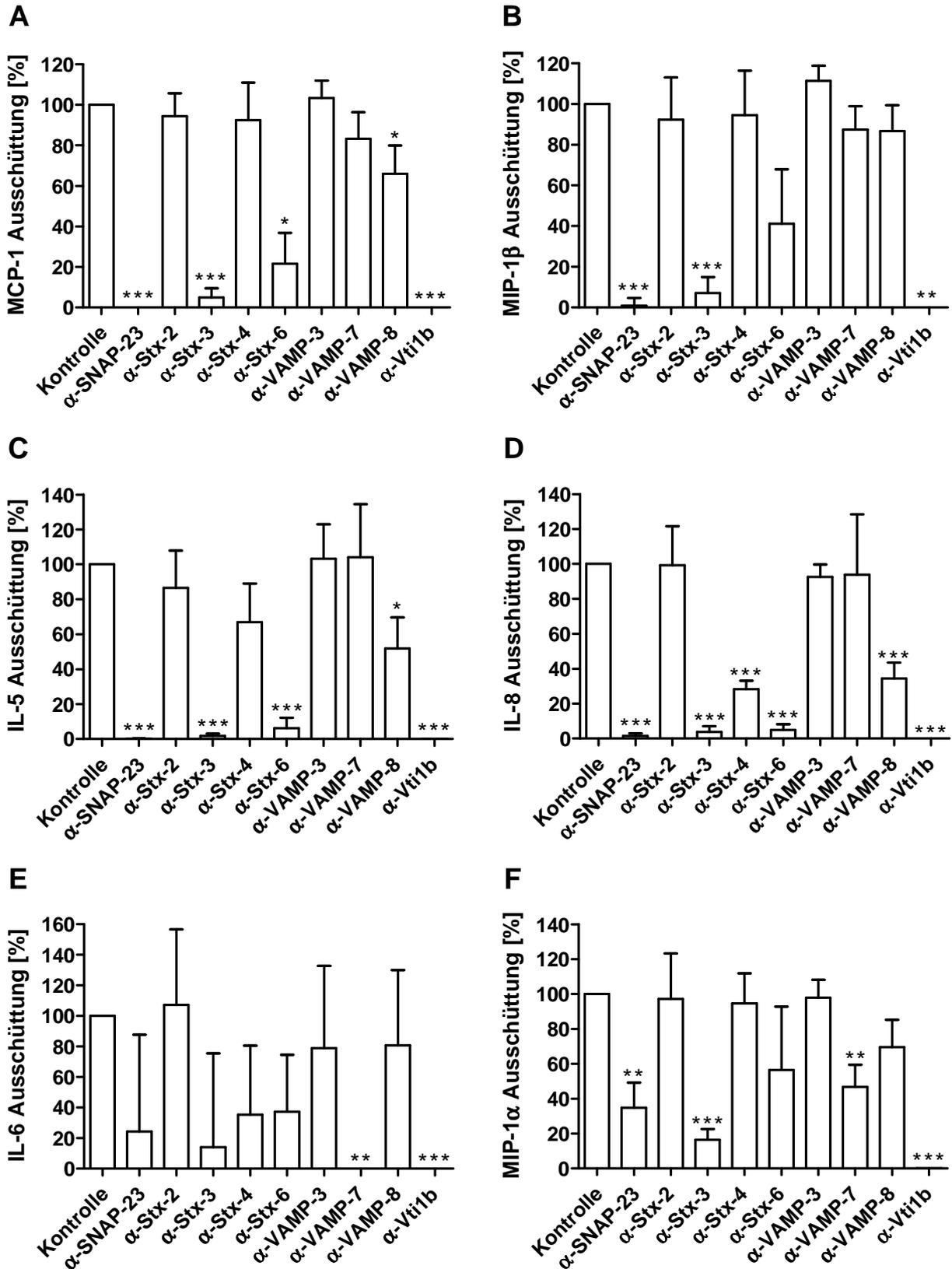


Abbildung 22: Inhibition der Freisetzung verschiedener Zytokine durch Antikörper nach einer Stimulation von sechs Stunden. (Mittelwerte ± SEM, n = 10). * p < 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001 im Vergleich zur Kontrolle

4 Diskussion

Seitdem Ausschüttungsprozesse in Mastzellen untersucht werden, wurde eine Vielzahl neuer Erkenntnisse gewonnen, die wesentlich zum Verständnis der Bildung sekretorischer Vesikel bis hin zur Ausschüttung von Mediatoren und zum Recycling der Vesikelmembran beitragen. Viele dieser Untersuchungen wurden an der leukämischen Rattenmastzelllinie RBL-2H3 durchgeführt, da diese einfach zu handhaben ist und leicht reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden können [93;161;217]. Auch die humanen Mastzelllinien HMC-1 und LAD2 finden Verwendung in der Untersuchung von Stimulations- und Ausschüttungsprozessen [218-221]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass viele Ergebnisse, die mit murinen oder humanen Mastzelllinien gewonnen wurden, nicht auf Primärzellen übertragbar sind [97]. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich daher mit aus der menschlichen Darmmukosa gewonnenen primären Mastzellen. Die Isolierung, Aufreinigung und Kultivierung dieser Mastzellen ist sehr zeit- und kostenintensiv, aber nur so ist es möglich, reife menschliche Zellen zu untersuchen.

Die Bedeutung von SNARE-Proteinen beim Andocken von sekretorischen Vesikeln an die Zellmembran mit der Folge einer Mediatorfreisetzung ist schon seit den späten Achtzigerjahren bekannt und wurde ausführlich an Nervenzellen und einer Vielzahl weiterer Zellen untersucht. Für humane Mastzellen gab es vor unseren Studien keine Information über die Beteiligung der verschiedenen SNARE-Proteine an der Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren.

4.1 Mediatorenfreisetzung und Zytokinexpression

Mastzellen lassen sich durch eine Vielzahl von Signalen aktivieren. Der physiologisch bedeutendste Mechanismus ist das Kreuzvernetzen von an dem hochaffinen IgE-Rezeptor gebundenen IgE-Molekülen durch ein spezifisches Antigen oder Allergen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kreuzvernetzung im Zellversuch durch Beladen mit humanem Myeloma-IgE und anschließender Stimulation mit anti-human IgE-Antikörper oder durch eine direkte Vernetzung mit dem monoklonalen Antikörper 22E7 erreicht. Als Kontrolle dafür, wie viel Ausstoß möglich ist, wurde eine Kombination des Kalziumionophors Ionomycin und des Proteinkinase C - Aktivators PMA verwendet. Ferner wurde der Einfluss von SCF auf die Degranulation untersucht.

Es zeigte sich, dass 22E7 oder SCF alleine eine Ausschüttung von 16,1 bzw. 10,9 % des gespeicherten Histamins verursachte. Die Kombination beider führte jedoch nicht nur zu

einem additiven Effekt, sondern mit 55,1 % zu einer weit stärkeren Degranulation. Das Gleiche gilt für die Kombination von SCF mit IgE/αlgE, bei der die Kreuzvernetzung alleine 36,2 % Freisetzung hervorrief, zusammen mit SCF jedoch mehr als eine Verdopplung auf 82,5 % stattfand. Lediglich bei der unspezifischen Aktivierung mit Ionomycin/PMA, bei der die Degranulation schon 71,2 % betrug, konnte SCF diese nicht signifikant erhöhen. Dass SCF nicht nur das Überleben von Mastzellen sichert, sondern auch deren Fähigkeit steigert, höhere Mengen an Histamin und anderen Mediatoren auszuschütten, wurde schon von Bischoff et al. [222] gezeigt. Die vorliegende Arbeit zeigt zusätzlich, dass SCF allein zwar Mastzellen nur schwach stimulieren kann, die Wirkung der Stimulation über eine Kreuzvernetzung des FcεRI jedoch drastisch verstärkt.

Die humane Mastzelllinie LAD2 exprimiert über den gesamten Zellzyklus funktionell aktivierbare FcεRI und lässt sich somit über eine Kreuzvernetzung stimulieren [100]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit über einen Zeitraum von einem Jahr durchgeführten Stimulationsversuche ergaben jedoch lediglich einen mittleren β-Hexosaminidase Release bei spezifischer Aktivierung über den IgE-Rezeptor von 16,2 % bei einer Grundausschüttung von 9,2 %, so dass für weitere Versuche nur eine unspezifische Aktivierung mit Ionomycin/PMA in Frage kam, bei der die Ausschüttung 79,2 % betrug. Erstaunlicherweise sank die prozentuale Freisetzung von β-Hexosaminidase nach IgE-Rezeptor-Kreuzvernetzung von anfänglichen 45–50 % innerhalb von acht Monaten auf 3–5 % (nicht gezeigt). Es ist bekannt, dass LAD2 Zellen abhängig vom Zellzyklus in unterschiedlicher Weise auf Stimulierung reagieren [100]. Da aber auch nach längerer Kultivierung zu den von Kirshenbaum et al. beschriebenen Kulturbedingungen keine Verbesserung der Aktivierbarkeit auftrat, kann nur vermutet werden, dass sich im Laufe der Zeit Veränderungen ergaben, durch die die Reaktivität der Zellen beeinflusst war. Eine Verminderung der SNARE-Expression konnte dabei nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Ob eine Veränderung der Telomeraseaktivität stattfand, welche die Funktionalität der Zellen beeinflussen könnte, wurde nicht untersucht. Kirshenbaum et al. beschreibt diese jedoch ähnlich hoch wie bei HMC-1 und RBL-2H3-Zellen [100;223]. Des Weiteren ist eine Verminderung der Expression des FcεRI im Laufe der Kultivierung der LAD2 Zellen möglich, wurde aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Die Zytokinexpression und -freisetzung wurde in humanen Darmmastzellen gemessen. Verglichen wurden stimulierte und unaktivierte Zellen. Es konnte nur eine schwache Expression von IL-6, IL-13, IL-17A, TNF-α und VEGF bei unstimulierten Zellen detektiert werden, während IL-8, MIP-1β und MCP-1 deutlich exprimiert wurden. Eine Stimulation mit Ionomycin/PMA, aber vor allem die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors für eine Stunde, erhöhte die Expression aller gemessenen Zytokine, jedoch unterschiedlich

stark. Von humanen Darmmastzellen war schon bekannt, dass sie die Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-16 und IL-18 sowie das Chemokin IL-8 ohne weitere Stimulation exprimieren und nach Aktivierung außerdem IL-3, IL-5, IL-9 und IL-13 exprimiert werden [110;224]. In denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen verstärkte sich die Expression von IL-13, IL-17A, MIP-1 α und TNF- α besonders deutlich. Die klare Expression von IL-8, MCP-1 und MIP-1 β – unabhängig davon, ob die Zellen aktiviert wurden oder nicht – korrelierte auch mit der Höhe der Ausschüttung nach sechsstündiger Stimulation mit IgE/αIgE. Ebenso war eine deutliche Freisetzung von IL-5, IL-6 und MIP-1 α messbar, wohingegen IL-13, IL-17A, TNF- α und VEGF trotz der gesteigerten Expression von IL-13, IL-17A und TNF- α nach Aktivierung nur von einigen Mastzellkulturen und nur in geringen Mengen ausgeschüttet wurde.

Für Maus-Mastzelllinien konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie die Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β exprimieren und freisetzen können [225]. Auch für die humane Mastzelllinie HMC-1 konnte die Freisetzung einiger Chemokine wie z. B. MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β nachgewiesen werden [226]. Die Messungen der genannten Chemokine zeigte, dass auch humanen Darmmastzellen in der Lage sind, nach Aktivierung neben IL-8 auch MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β in nicht unerheblicher Menge auszuschütten und somit neben Eosinophilen, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Keratinozyt, Monozyten und Makrophagen [227;228] eine weitere Quelle der genannten Chemokine darstellen.

4.2 SNARE-Expression

Nach der Entdeckung von SNARE-Proteinen dauerte es noch einige Zeit, bis eine der bestuntersuchten SNARE-Interaktion – die synaptische Verschmelzung sekretorischer Vesikel in Nervenzellen – vollständig verstanden wurde [229;230]. Zwei Jahre zuvor, im Jahr 1998, konnte gezeigt werden, dass SNARE-Proteine ausreichen, um die Fusion künstlicher Membranen hervorzurufen und somit die minimale Maschinerie für die Verschmelzung zweier *Lipidbilayer* darstellen [231]. Wie einleitend beschrieben, besteht jeder funktionelle SNARE-Komplex aus vier unterschiedlichen α -Helices (siehe Tabelle 2), die von drei oder vier Proteinen bereitgestellt werden [196]. Bei der Transmitterfreisetzung in der neuronalen Synapse wird dieser Komplex aus SNAP-25, VAMP-2 und Syntaxin-1a gebildet [229;230].

Von Mastzellen war bisher bekannt, dass sie eine Reihe potentiell an Exozytoseprozessen beteiligter SNARE-Proteine exprimieren. Hierzu gehören SNAP-23, Syntaxin-2, -3 und -4 sowie VAMP-2, -3, -7 und -8 [217]. Diese Daten stammten jedoch überwiegend aus der Rattenmastzelllinie RBL-2H3. Das in Mastzellen gefundene t-SNARE

SNAP-23 wird als das ubiquitär in Geweben des ganzen Körpers exprimierte Gegenstück zur neuronalen Isoform SNAP-25 angesehen [177;232]. SNAP-23 wurde nicht nur in Rattenmastzellen, sondern zusätzlich auch in einer Reihe anderer Immunzellen als wichtiger Bestandteil der Exozytose identifiziert [233;234], da es einen stabilen Komplex mit einem weiteren t-SNARE der Syntaxin-Familie und einem v-SNARE der VAMP-Familie bildet. In RBL-2H3 Zellen wurden VAMP-7 und -8 in der Membran sekretorischer Vesikel nachgewiesen [157;161]. Obwohl noch nicht vollständig geklärt werden konnte, welche SNAREs in RBL-2H3 Zellen für die Ausschüttung von Mediatoren verantwortlich sind, wird vermutet, dass SNAP-23 eine Verbindung mit Syntaxin-4 und VAMP-7 oder -8 eingeht [157;161]. Da sich humane Mastzellen erheblich von murinen unterscheiden [63], lassen sich diese Daten jedoch nur sehr bedingt übertragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane intestinale Mastzellen weit mehr unterschiedliche SNARE-Proteine als die bisher aus RBL-2H3 Zellen bekannten exprimieren. Auf mRNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene ergab sich für SNAP-23 ein deutliches Signal, während SNAP-25 nur in zwei von zehn unterschiedlichen Mastzellkulturen gerade noch detektierbar war. Dies steht wiederum im Einklang mit der Annahme, dass SNAP-23 das nicht-neurale Gegenstück zu SNAP-25 darstellt [177]. Des Weiteren wurde mRNA von Syntaxin-1b, -2, -3, -4 und -6 exprimiert, wobei das Signal für Syntaxin-1b schwächer als das der anderen war. Dies bestätigte sich auch für die Proteinexpression. Das in Nervenzellen funktionell bedeutende Syntaxin-1a konnte nicht in humanen Darmmastzellen nachgewiesen werden. Als weiteres t-SNARE konnte in humanen intestinalen Mastzellen Vti1b nachgewiesen werden. Vti1b stellt das in Säugetierzellen identifizierte Pendant des in Hefen vorkommenden Vti1p dar, mit dem es jedoch nur 30 % der Aminosäuresequenz teilt, und wurde zuvor schon in vielerlei unterschiedlichen Geweben des Säugetierkörpers nachgewiesen [235-237]. Aus der Familie der v-SNAREs fand sich VAMP-2 auf einem niedrigen mRNA-Niveau exprimiert. Auf Proteinebene war VAMP-2 mit einem polyklonalen Antikörper sehr schwach nachweisbar, wohingegen unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers keinerlei Bande detektierbar war (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wird es von RBL-2H3 Zellen und von eosinophilen Granulozyten deutlich exprimiert und wurde wiederholt mit der regulierten Exozytose von Granulozyten in Verbindung gebracht [238]. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Studien, die nur eine geringe Expression von VAMP-2 in eosinophilen Granulozyten nachweisen konnten [239]. Ebenfalls schwach exprimiert wurden VAMP-4 und -5. Starke Signale ergaben sich in humanen Darmmastzellen für mRNA und Proteine von VAMP-3, -7 und -8.

Für die humane Mastzelllinie LAD2 wurden bisher keinerlei Daten zur SNARE-Expression veröffentlicht, weshalb diese auf mRNA-Ebene mit der von humanen Darm-

mastzellen verglichen wurde. Es zeigte sich, dass LAD2 Zellen über ein sehr ähnliches Spektrum an SNARE-Proteinen verfügen. Der Unterschied zu menschlichen Darmmastzellen besteht in einer, wenn auch schwachen Expression von Syntaxin-1a, während SNAP-25 überhaupt nicht nachgewiesen werden konnte. VAMP-2 und -5 wurden ebenso wie bei den Darmmastzellen sehr schwach exprimiert, VAMP-4 hingegen etwas deutlicher.

Auch für die aus dem peripheren Blut eines Mastozytose-Patienten gewonnene humane Mastzelllinie HMC-1 wurden bisher keine Untersuchungen zur Expression von SNARE-Proteinen durchgeführt. Im Gegensatz zu humanen Darmmastzellen und LAD2 Zellen, fand sich SNAP-25 deutlicher exprimiert. Wie bei den LAD2 Zellen konnte in HMC-1 Zellen sowohl Syntaxin-1a als auch Syntaxin-1b detektiert werden, wenngleich die Signale sehr schwach und gerade noch zu erkennen waren. Syntaxin-2 und -4 sowie VAMP-3 und -7 waren die am stärksten exprimierten SNAREs.

Somit unterscheiden sich humane Darmmastzellen in ihrer spezifischen Expression von SNARE-Proteinen nicht nur von der Rattenmastzelllinie RBL-2H3 – eines der klassischen Modellsystem für Exozytoseuntersuchungen bei Mastzellen – sondern es existieren ebenfalls Unterschiede zu den humanen Mastzelllinien LAD2 und HMC-1.

4.3 Lokalisation und Interaktionen von SNARE-Proteinen

Für ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von SNARE-Proteinen in humanen Darmmastzellen wurde deren Lokalisation in ruhenden als auch aktivierten Zellen mittels Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht. Die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung des t-SNAREs SNAP-23 ergab eine fast ausschließliche Verteilung auf der Plasmamembran in ruhenden als auch aktivierten Mastzellen. In Rattenmastzellen wurde hingegen in der Vergangenheit eine Verlagerung von SNAP-23 nach Aktivierung von der Plasmamembran in das Zellinnere beobachtet, die in Zusammenhang mit *compound exocytosis* gebracht wurde [232]. Eine mögliche Erklärung für unterschiedliche Lokalisationen von SNAP-23 könnte die Tatsache sein, dass zwei Unterformen von SNAP-23 beschrieben wurden, welche funktionelle Unterschiede aufweisen. Die Isoform A setzt sich aus 211 Aminosäuren zusammen, während die Isoform B aus nur 158 Aminosäuren besteht [240]. SNAP-23A wurde z. B. in neutrophilen Granulozyten in spezifischen Granula gefunden [241]. Die Fluoreszenzfärbungen der humanen Darmmastzellen ergab auch für die t-SNAREs Syntaxin-3, -4 und -6 eine plasmamembranständige Lokalisation, welche sich nach Stimulation nicht veränderte. Im Gegensatz dazu fand sich Syntaxin-2 unabhängig von einer Stimulation im Zytoplasma der Zellen verteilt. Die Lokalisation von Syntaxin-4 an der Plasmamembran deckt sich mit Ergebnissen aus

Rattmastzellen, wohingegen Syntaxin-3 in diesen als zytoplasmatisch verteilt angefärbt werden konnte [232]. In Ratten-Nierenzellen wurden Syntaxin-2 und -3 sowohl an der Plasmamembran als auch in vesikulären Bereichen im Zytoplasma gefunden [242]. Die Verteilung von Syntaxin-6 in Säugetierzellen wird in der Literatur sehr uneinheitlich beschrieben und reicht von intrazellulären Kompartimenten z. B. in Mausmakrophagen [243;244] bis zur Plasmamembran in humanen neutrophilen Granulozyten [241]. In diesen wurde es an der Mediatorausschüttung beteiligt gefunden [241], wobei eine andere Arbeitsgruppe berichtet, Syntaxin-6 weder in neutrophilen, noch in eosinophilen Granulozyten nachweisen zu können [245]. Das SNARE-Protein Vti1b fand sich in ruhenden humanen Darmmastzellen mit erkennbarer granulärer Struktur im Zytoplasma verteilt. Dies änderte sich jedoch nach einer längeren Stimulationszeit von zwei Stunden, nach der eine deutliche Umverteilung in Richtung Zellrand festzustellen war. In anderen Arbeiten zeigten Färbungen von Vti1b Überlappungen mit Markern für den Golgi-Apparat und das *trans*-Golgi-Netzwerk [171;180]. VAMP-3, -7 und -8 zeigten ebenfalls eine granuläre Struktur im Zellinneren in unbehandelten Zellen. Nach einer Aktivierung der Zellen wanderten VAMP-7 und -8 jedoch fast komplett an die Plasmamembran, während VAMP-3 unverändert in der Zelle verteilt vorlag. SNARE-Proteine der VAMP-Familie werden allgemein als Teil sekretorischer Vesikel und somit als v-SNAREs angesehen, die mit verschiedenen t-SNAREs Komplexe bilden [246]. In RBL-2H3 Zellen findet eine stimulationsabhängige Translokation von VAMP-7 statt [247]. Im Gegensatz zu VAMP-7 und -8, die bei der Ausschüttung von Mastzellmediatoren eine Rolle zu spielen scheinen [157;161], wird VAMP-3 mit dem Recycling von Vesikeln in Verbindung gebracht [248;249]. Dies könnte auch die zytoplasmatische Verteilung in humanen Darmmastzellen erklären.

Die im Anschluss an die Einzelfärbungen durchgeführten Doppelfärbungen je zweier möglicher Interaktionspartner zeigten eine deutliche Kolo-kalisation von SNAP-23 mit Syntaxin-4 und VAMP-7 sowie Syntaxin-4 mit VAMP-8 und Vti1b in aktivierten Mastzellen. Eine Färbung von VAMP-3 und Syntaxin-4 zeigte hingegen erwartungsgemäß keinerlei Überlappung. Andere Arbeitsgruppen kamen bei Untersuchungen an eosinophilen und neutrophilen Granulozyten zu dem Ergebnis, dass SNAP-23, Syntaxin-4 und VAMP-7 eine zentrale Rolle bei der Exozytose spielen [245]. Zusammen mit den Daten aus RBL-2H3 Zellen, bei denen VAMP-7 und -8 in der Membran sekretorischer Vesikel gefunden wurden, [157;161] und den eigenen Befunden der Kolo-kalisation von SNAP-23, Syntaxin-4, VAMP-7 und -8 drängte sich der Verdacht auf, dass diese SNARE-Proteine auch in humanen Darmmastzellen einen funktionellen Komplex bilden könnten.

Mittels Ko-Immünpräzipitation konnte tatsächlich eine Komplexbildung von SNAP-23 mit Syntaxin-4 und sowohl VAMP-7 als auch VAMP-8 in aktivierten Darmmastzellen bestätigt

werden. In ruhenden Mastzellen konnte hingegen nur eine sehr schwache Bande dieser Komplexe dargestellt werden. Dies beweist, dass die Interaktion zwischen den untersuchten SNARE-Proteinen erst nach einem geeigneten Stimulus stattfindet und diese vorher weitestgehend einzeln vorliegen. VAMP-2 und -3 bildeten keinerlei Bindung zu SNAP-23 aus, was in Einklang mit den zytologischen Fluoreszenzfärbungen steht.

4.4 Funktionelle Bedeutung von SNARE-Proteinen bei der Mediatorfreisetzung

Die durch Fluoreszenzfärbungen und Ko-Immunpräzipitation veranschaulichte Komplexbildung zwischen SNARE-Proteinen sollte durch das Inhibieren einzelner SNAREs unterbunden werden, um somit die Bedeutung der jeweiligen Proteine für die Ausschüttung von Mediatoren zu untersuchen. Für das Ausschalten von SNARE-Proteinen gibt es verschiedene Möglichkeiten. In eosinophilen Granulozyten konnte durch die Spaltung von VAMP-2 mittels Tetanus Toxin (TeNT) dessen Beteiligung an der Exozytose nachgewiesen werden [239]. In Nervenzellen spaltet die bakterielle Protease Botulinum Neurotoxin (BoNT) SNAREs und hemmt somit die Exozytose. Dabei spalten verschiedene Serotypen der von Clostridien gebildeten Toxine unterschiedliche SNARE-Subtypen. BoNT-A schneidet z. B. SNAP-25, während VAMP-1, -2 und -3 durch BoNT-B geschnitten wird und BoNT-C sowohl SNAP-25 als auch Syntaxin-1a, -1b und -2 spaltet [250-252]. Im Gegensatz dazu sind VAMP-7 und -8 Neurotoxin-resistent und lassen sich weder durch BoNT noch durch TeNT spalten [161]. Da außerdem die genannten Toxine nicht nur ein einzelnes SNAREs schneiden und sich im Gegenzug einige SNAREs nicht spalten lassen, ist es nicht möglich, mit Neurotoxinen gezielt ein spezielles SNARE-Protein auszuschalten.

Aus diesem Grunde sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit RNA-Interferenz (RNAi) für die Runterregulierung einzelnen SNARE-Proteine angewandt werden. RNAi wurde erfolgreich in einer Reihe von Säugetierzellen durchgeführt [253;254]. Eine temporäre Verringerung der Genaktivität von Standard-Zelllinien und anderen kultivierten Zellen wird z. B. durch Einbringen von siRNA mithilfe von Elektroporation oder Lipofektion erreicht [141;255]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionsversuche von humanen Darmmastzellen mittels verschiedener auf Lipofektion basierender Transfektionsreagenzien schlugen alle fehl. Hingegen erzielten Versuche mit dem aus einer Kombination von Elektroporation und spezifischen Transfektionspuffern basierenden Nucleofector™ System sowohl für LAD2 Zellen als auch primären intestinalen Mastzellen hohe Transfektionsraten von bis zu 99 % mit fluoreszenzierender Test-siRNA. Das

Nucleofector™ System wurden bisher erfolgreich für die Transfektion von HMC-1 [256] und RBL-2H3 [257] verwendet. Über Transfektionen von LAD2 oder primären Mastzellen ist bisher nichts publiziert. In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Reduktion der β -Hexosaminidase-Freisetzung von Syntaxin-4-siRNA transfizierten LAD2 sowie humanen Darmmastzellen, dabei stellte sich jedoch heraus, dass die alleinige Applikation der elektrischen Parameter schon eine ebenfalls signifikante Reduktion verursacht. Im Gegensatz dazu vermindern Transfektionsprogramme, die in den Vorversuchen weniger effektive Transfektionsraten erzielten, nur minimal die Degranulation von LAD2 Zellen, unabhängig davon, ob siRNA zu der Probe gegeben wurde oder nicht. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Programme, die einen hohen Transfektionserfolg erzielten, zu einer starken Beeinträchtigung der Zellen führen, wodurch diese ihre Stimulierbarkeit verlieren. Ein eventueller Verlust der in Granula gespeicherten β -Hexosaminidase durch die Porenbildung der Elektroporation konnte ausgeschlossen werden, indem sowohl unbehandelte als auch transfizierte Zellen lysiert wurden und deren β -Hexosaminidase-Gehalt gemessen wurde. Die Menge der gespeicherten β -Hexosaminidase war bei den elektroporierten Zellen nur unsignifikant niedriger als bei unbehandelten Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei Programmen, die hingegen die Stimulierbarkeit der Zellen nicht verminderten, gelangte zu wenig siRNA in die Zellen bzw. wurde ein zu geringer Anteil der Zellen erfolgreich transfiziert, so dass keine Beeinflussung der Ausschüttung messbar war.

Nachdem sich die RNAi als ungeeignet für die Untersuchung der Funktion einzelner SNARE-Proteine in stimulationsbedingten Ausschüttungsprozessen erwies, erzielte das Blockieren einzelner SNARE-Isoformen mit Antikörpern nach Permeabilisierung mit Streptolysin O den gewünschten Effekt. Dieses Verfahren fand in der Vergangenheit auch schon für Untersuchungen von Exozytosevorgängen in Rattenmastzellen Verwendung [258]. Für die Analyse der Beteiligung der einzelnen SNARE-Proteine an der Freisetzung gespeicherter Mediatoren wurden die mit Antikörpern behandelten Mastzellen für eine Stunde stimuliert. Eine signifikante und deutliche Inhibition der β -Hexosaminidase-Ausschüttung wurde durch Antikörper gegen SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6 sowie VAMP-7 und -8 und Vti1b verursacht. Im Gegensatz dazu verursachte die Blockade von Syntaxin-2 eine nur geringe Reduktion, während Antikörper gegen VAMP-2 und -3 zu keiner signifikanten Veränderung der Degranulation führten.

Wie schon zuvor erwähnt, wird angenommen, dass ein Komplex aus SNAP-23, Syntaxin-4 und VAMP-7 oder -8 für die Degranulation von RBL-2H3 Zellen verantwortlich ist [157;161]. Außerdem wurden in RBL-2H3 Zellen Komplexbildungen zwischen Syntaxin-3 und VAMP-7 sowie eine Translokation beider nach Aktivierung an die Plasmamembran

beobachtet [157]. Interessanterweise scheint in humanen Darmmastzellen eine ganze Reihe von SNARE-Proteinen an der Ausschüttung von β -Hexosaminidase als Repräsentant eines gespeicherten Mediators beteiligt zu sein. Unter der Voraussetzung, dass ein funktioneller SNARE-Komplex immer eine Helice jeder Gruppe beinhalten muss (Qa, Qb, Qc und R, siehe Tabelle 2), ergeben sich somit mehrere Möglichkeiten in der Zusammensetzung dieses Komplexes. SNAP-23 (Qb,c) könnte zusammen mit Syntaxin-3 oder -4 (Qa) und VAMP-7 oder -8 (R) eine Bindung eingehen. Ein weiterer Komplex könnte sich aus Vti1b (Qb), Syntaxin-6 (Qc), Syntaxin-3 oder -4 (Qa) und VAMP-7 oder -8 (R) zusammensetzen.

Es wurde schon in der Vergangenheit gezeigt, dass einzelne SNAREs an mehr als nur einem Transportweg beteiligt sein können und hierbei in der Lage sind, mit verschiedenen SNARE-Partnern zu interagieren [259]. So wurde z. B. VAMP-7 in einer Reihe von exozytotischen Prozessen verschiedener Granula-Populationen in sekretorischen Zellen als beteiligt gefunden [252;260;261], während VAMP-8 sowohl am Transport von Endosomen, als auch von Granula beteiligt ist [262;263]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Syntaxin-7 mit VAMP-7 als auch mit VAMP-8 Verbindungen eingeht [164]. Des Weiteren ist es z. B. in *Drosophila melanogaster* möglich das neuronale VAMP-2 *in vivo* durch ein v-SNARE, das normalerweise an einer früheren Phase des Sekretionswegs beteiligt ist, zu ersetzen und *vice versa* [264]. Auch in Blutplättchen VAMP-8-defizienter Mäuse wurde ein kompensatorischer Effekt festgestellt, bei dem VAMP-2 und/oder VAMP-3 die Funktion von VAMP-8 übernehmen kann [265].

Es ist somit denkbar, dass sich Syntaxin-3 und -4 gegenseitig ersetzen können, wie auch VAMP-7 und -8. Dies würde auch die nie vollständige Blockade der Freisetzung von β -Hexosaminidase bei Inhibition eines SNAREs erklären. Eine andere Erklärung für die Beteiligung mehrerer verschiedener SNARE-Proteine der gleichen Isoform könnte sein, dass Mastzelldegranulation durch *compound exocytosis* abläuft, in welcher Vesikel untereinander fusionieren [149]. Somit könnte z. B. ein v-SNARE für die Verschmelzung von Vesikeln untereinander, ein anderes für die Vereinigung mit der Plasmamembran zuständig sein. Auffällig war auch, dass Vti1b erst nach einer längeren Stimulationszeit von zwei Stunden deutlich Richtung Plasmamembran wanderte. Da die Inhibition von Vti1b jedoch zu einer vollständigen Blockade der Exozytose nach einer Stimulation von einer Stunde führte, könnte dies bedeuten, dass Vti1b auch an der Ausbildung intrazellulärer Strukturen, die für die *compound exocytosis* notwendig sind, beteiligt ist. Gleichzeitig wäre es auch ein geeigneter Bindungspartner für das fast ausschließlich an der Plasmamembran gefundene Syntaxin-6, mit dem es in einer späteren Phase nach der Aktivierung interagieren könnte. Komplexbildungen zwischen Vti1b und Syntaxin-6 wurden schon in aktivierten Makrophagen nachgewiesen [244]. Ebenso wurden Interaktion von Vti1b mit VAMP-8 dokumentiert

[171;266]. Für Syntaxin-6 wurden im Gegenzug ebenfalls Komplexbildungen mit Vti1b, VAMP-7 und -8 und Syntaxin-4 beschrieben [164;243]. Erstaunlicherweise konnte ebenso nachgewiesen werden, dass Syntaxin-6 in humanen neutrophilen Granulozyten während der Exozytose an SNAP-23 bindet [241]. Dies ist umso überraschender, als das Syntaxin-6 als Qc-SNARE nicht mit dem Qb,c-SNARE SNAP-23 interagieren sollte. Die Klassifizierung von Syntaxin-6 in ein Qc-SNARE basiert auf der ausgeprägten Homologie mit der C-terminalen SNARE-Domäne von SNAP-25 [185]. Aufgrund der Interaktion mit einem Qb,c-SNARE wurde die Vermutung aufgestellt, dass Syntaxin-6 Eigenschaften von Qa- als auch Qc-SNAREs in sich vereint [243].

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Freisetzung von Cysteinyl Leukotrien LTC₄ sowie verschiedener Zytokine untersucht. Da diese typischerweise erst nach Aktivierung der Zelle synthetisiert und somit verzögert ausgeschüttet werden, wurden humane Darmmastzellen für sechs Stunden über die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors stimuliert. Als Kontrolle für eine funktionierende Inhibition diente die Messung der β -Hexosaminidase-Ausschüttung. Hierbei zeigte sich ein sehr ähnliches Muster wie schon zuvor bei der einstündigen Stimulation. Lediglich Antikörper gegen VAMP-7, der zuvor schon weniger effektiv als anti-VAMP-8 war, führte zu keiner signifikanten Reduktion mehr. Dies deutet darauf hin, dass nach einer längeren Aktivierungszeit VAMP-7 durch VAMP-8 ersetzt werden kann und somit eine Inhibition von VAMP-7 bedeutungslos wird.

Interessanterweise ließ sich die Ausschüttung von Cysteinyl Leukotrien LTC₄ durch die gleichen anti-SNARE-Antikörper inhibieren, wie schon zuvor die Freisetzung von β -Hexosaminidase. Cysteinyl Leukotrien ist an einer Reihe von Entzündungsprozessen beteiligt, indem es die bronchiale Sekretion fördert, die Gefäßpermeabilität steigert und die Kontraktionen der glatten Muskulatur in Gefäßen und im Gastrointestinaltrakt induziert. Da es durch die Lipoxygenase aus Arachidonsäure synthetisiert wird, kann es im Gegensatz zu Zytokinen schneller freigesetzt werden [267]. Besonders auffallend war die fast vollständige Blockade der LTC₄-Ausschüttung durch anti-SNAP-23 und anti-Vti1b. Da Vti1b zuvor schon in unstimulierten Zellen über das ganze Zellplasma verteilt granulär sichtbar gemacht werden konnte, ist es möglich, dass Vti1b ein fundamentaler Bestandteil in der Ausbildung intrazellulärer Fusions- und Transportprozesse sowohl bei der schnellen Mediatorfreisetzung als auch in der Spätphase von aktivierten Mastzellen darstellt. Ebenso scheint SNAP-23 essenziell für Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran zu sein, während sich Syntaxin-3 und -4 gegenseitig ersetzen könnten.

Die Messung der Zytokinfreisetzung ergab für alle gemessenen Zytokine eine sehr deutliche und häufig komplette Blockade der Ausschüttung durch die Inhibition von SNAP-23, Syntaxin-3 und Vti1b. Des Weiteren verursachte anti-Syntaxin-6 eine signifikante

Reduktion der Freisetzung von MCP-1, IL-5 und IL-8 sowie eine tendenzielle Verminderung von IL-6, MIP-1 α und MIP-1 β . Aus der Familie der v-SNAREs führte die Blockade von VAMP-8 zu einer signifikant reduzierten Ausschüttung von MCP-1, IL-5 und IL-8, während VAMP-7 für die Freisetzung von IL-6 und MIP-1 α notwendig zu sein schien. Für MIP-1 β konnte weder die Blockade von VAMP-7 noch VAMP-8 einen Effekt hervorrufen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte – wie schon zuvor erwähnt – sein, dass bei Blockade von VAMP-7 dessen Funktion von VAMP-8 übernommen wird und umgekehrt oder dass ein anderer, in der vorliegenden Arbeit nicht untersuchter Vertreter der v-SNAREs für die Freisetzung der genannten Chemokine verantwortlich ist. Die Inhibition von Syntaxin-4 führte nur für IL-8 zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der Freisetzung. Mit 6244 pg/10⁶ Zellen war IL-8 das mit Abstand in der höchsten Konzentration ausgeschüttete Zytokin. Das zu den Chemokinen gehörende IL-8 ist vor allem ein hochpotenter Mediator für die neutrophile Chemotaxis und spielt bei der Aktivierung entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle [109]. Es wurde in der Vergangenheit nachgewiesen, dass IL-8 in menschlichen Hautmastzellen zu einem gewissen Anteil präformiert vorliegt und somit zügig nach der Aktivierung der Zelle freigesetzt werden kann [108]. Da seine Ausschüttung durch die Inhibition der gleichen SNARE-Proteine wie die Freisetzung der gespeicherten β -Hexosaminidase gehemmt wurde, wäre es möglich, dass IL-8 in denselben Vesikeln vorliegt. Betrachtet man die Freisetzung der anderen gemessenen Zytokine im Vergleich mit der β -Hexosaminidase, LTC₄ und IL-8, fällt auf, dass unterschiedliche Kombinationen von SNAREs für deren Ausschüttung verantwortlich zu sein scheinen.

Von eosinophilen Granulozyten – die als weitere sekretorisch aktive Zelle des Immunsystems den Mastzellen funktionell ähnlich sind – ist bekannt, dass sie in der Lage sind, verschiedene Zytokine hoch selektiv auszuschütten [268-270], wodurch sich ihre vielfältigen Funktionen erklären lassen. Hierbei bedienen sie sich unterschiedlicher Formen der Freisetzung: der klassischen Exozytose, der *piecemeal degranulation* und der Zytolyse [270]. Das typische Merkmal der *piecemeal degranulation* ist die fortschreitende Entleerung sekretorischer Granula ohne deren Fusion mit der Plasmamembran. Hierbei scheinen sogenannte „*eosinophil sombrero vesicles*“ von besonderer Bedeutung zu sein [152]. Diese vesikulotubulären, 150–300 nm großen Strukturen sind schon seit Langem bekannt, wurden aber lange Zeit nicht beachtet und ihre Funktion blieb für 30 Jahre nur sehr wenig verstanden [271]. Inzwischen geht man davon aus, dass sich diese Transportvesikel von großen sekretorischen Granula abschnüren und die in ihnen enthaltenen Mediatoren zur Plasmamembran transportieren [268-270]. Dies deckt sich mit dem Befund, dass z. B. die Blockade von VAMP-2 die Freisetzung der eosinophilen Peroxidase (EPO), nicht aber des *Eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) inhibiert [245] und nur EPO in kleinen Vesikeln

gefunden wurde, auf denen VAMP-2 exprimiert vorlag [272]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz dazu VAMP-7 und -8, jedoch nicht VAMP-2 auf kristalloiden eosinophilen Granula zu finden sind [245].

In Makrophagen wurde der Ausschüttung des Zytokins TNF vorausgehend ein zweistufiger Transportvorgang identifiziert. In diesem wird ein Komplex der Q-SNAREs Syntaxin-6 und -7 sowie Vti1b für den Transport von TNF aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk verantwortlich gemacht [244]. Da für die Verschmelzung mit der Plasmamembran außerdem ein R-SNARE notwendig ist, translozieren TNF-haltige Carrier zu VAMP-3 enthaltenden Recycling-Endosomen, an denen sie einen *trans*-SNARE-Komplex bestehend aus Syntaxin-6 und -7, Vti1b und VAMP-3 bilden. Im zweiten Schritt binden die jetzt mit VAMP-3 ausgestatteten Vesikel an der Plasmamembran mit SNAP-23 und Syntaxin-4 und geben TNF frei [273;274].

Für Mastzellen gibt es bisher kaum Daten über die Beteiligung verschiedener SNARE-Proteine an der Zytokinfreisetzung. Es ist jedoch bekannt, dass Mastzellen in der Lage sind abhängig von der Art und Stärke ihrer Aktivierung eine große Bandbreite ihrer Mediatoren oder auch nur bestimmte Mediatoren wie z.B. spezifische Zytokine auszuschütten [55;56;113;114]. Schon im Jahr 1978 wurde die Beobachtung gemacht, dass Rattenmastzellen das Enzym Arylsulfatase A nach Stimulation im gleichen Anteil wie Histamin ausschütten, während Arylsulfatase B in lysierten Zellen in Verbindung mit Heparin und Chymase gefunden wurde [275]. Die Autoren schlossen daraus, dass verschiedene Arten von sekretorischen Vesikeln existieren müssen. Tatsächlich wurde in genetisch veränderten Mausmastzellen die Existenz verschiedenartiger sekretorischer Vesikel nachgewiesen [276]. Mastzellen, denen VAMP-8 fehlte, zeigten ein Defizit in der Exozytose von Granula, die Serotonin und Cathepsin D enthielten, wohingegen die Freisetzung von mit Histamin und TNF- α beladenen Granula normal ablief. Zusätzlich konnte konfokal-mikroskopisch gezeigt werden, dass Granula, die Serotonin beinhalten, meist positiv für VAMP-8 waren. Eine ältere Studie kam wiederum zu dem Ergebnis, dass Serotonin in Rattenmastzellen auch ohne sichtbare Exozytose sekretorischer Vesikel freigesetzt werden kann [277]. Gestützt wurde diese Aussage durch die Beobachtung einer reduzierten Histaminfreisetzung nach pharmakologischer Behandlung der Zellen, die mit einer verminderten Verschmelzung von Vesikeln mit der Plasmamembran einher ging und im Gegensatz zu der unverminderten Serotoninausschüttung stand. VAMP-8 scheint indessen keine Rolle für die Ausschüttung von Zytokinen in Mausmastzellen zu spielen [278]. In VAMP-8 defizienten Mausmastzellen war zwar die Histaminfreisetzung gestört, die Zytokinfreisetzung jedoch unbeeinflusst [278]. Da bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen Zytokinen und Chemokinen IL-6, MIP-1 α und MIP-1 β die Freisetzung

durch eine Inhibition von VAMP-8 ebenfalls unbeeinflusst blieb, stützt dies die Annahme, dass neben einem eventuellen kompensatorischem Effekt auch andere Vertreter der v-SNAREs an der Ausschüttung von Zytokinen beteiligt sind. Zusammenfassend zeigte sich sehr deutlich, dass die Ausschüttung sowohl der gespeicherten β -Hexosaminidase als auch des *de novo* synthetisierten LTC₄ sowie der gemessenen Zytokine und Chemokine von mehr als nur drei bzw. vier SNARE-Proteinen abhängt. Insgesamt sind zumindest die SNAREs SNAP-23, Syntaxin-3, -4 und -6, VAMP-7 und -8 sowie Vti1b an der Mediatorenfreisetzung beteiligt. Da von Mastzellen auch bekannt ist, dass sie Mediatoren über den Mechanismus der *piecemeal degranulation* freisetzen können [279] und in vielerlei Zelltypen die Existenz tubulärer Carrier nachgewiesen werden konnte [280;281], steigt der Verdacht der Partizipation dieses Transportweges zur kontrollierten Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren in Mastzellen.

Des Weiteren wird diskutiert, ob SNARE-Proteine alleine ausreichen, um die komplexen Vorgänge verschiedener Ausschüttungsprozesse zu steuern oder ob sie vor allem für die Bereitstellung der notwendigen Energie verantwortlich sind. Die Energie, die bei der Bildung des SNARE-Komplexes frei wird, reicht aus, um die energetische Barriere für die Vereinigung gegenüberliegender Membranen zu überwinden [194]. Diese Energie wird frei, da einzelne SNAREs, die im ruhenden Zustand als unstrukturierte Monomere vorliegen, in eine kinetisch stabilisierte, praktisch irreversible Protein – Protein Interaktion übergehen [197]. Deren Auflösung benötigt Energie in Form von ATP [189]. In *Drosophila* wird Syntaxin-1a zwar in der kompletten axonalen Plasmamembran von Nervenzellen exprimiert, sekretorische Vesikel fusionieren aber nur an der Synapse mit der Plasmamembran [282]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass SNARE-Proteine nicht die notwendige Spezifität bieten, die für die Integrität zellulärer Vorgänge notwendig ist.

Es sind jedoch eine ganze Reihe weiterer Faktoren bekannt, die auf Fusionsvorgänge Einfluss nehmen. Dazu gehören Rab GTPasen, Proteine der Sec1/Munc18-Familie, Synaptotagmin, Calmodulin, das umgebende Lipidmilieu und eine Vielzahl weiterer. Die Funktionen dieser Regulatoren sind sehr unterschiedlich. Zum einen können sie die Spezifität von Transportvorgängen noch vor der Bildung eines SNARE-Komplexes beeinflussen [283]. Des Weiteren werden auch das Recycling von SNAREs sowie die Rekrutierung und der Einbau in Vesikel von Proteinen beeinflusst, die während Transportvorgängen an die entsprechenden SNAREs binden [181;284]. Aus der Familie der Sec1/Munc18-Proteine wurden Munc18-2 und Munc18-3 in Mastzellen exprimiert gefunden und Interaktionen mit verschiedenen Syntaxinen beobachtet [285]. Es wird angenommen, dass Munc18-2 in RBL-2H3 Zellen mit Syntaxin-3 interagiert. Ein *knockdown* von Munc18-2 führt zu einer Verringerung der Degranulation [286]. Auch Mitglieder der Familie der Rab

GTPasen wurden in Mastzellen entdeckt. Rab3D wurde in RBL-2H3 Zellen stark exprimiert gefunden und kolokalisiert unter anderem mit sekretorischen Granula [287]. Über die Funktion der Kalziumsensoren Synaptotagmin und Calmodulin in Mastzellen ist wenig bekannt. Es scheint aber bewiesen, dass die Vorbereitung von Bindungen durch Synaptotagmin als Antwort auf ein Kalziumsignal eine wesentliche Rolle bei Membranfusionen spielt [288].

Trotz zusätzlicher Steuerungsmechanismen steht jedoch außer Frage, dass SNARE-Proteine essenziell für intrazelluläre Fusionsvorgänge in Eukaryoten sind, deren Funktionsweise und Zusammenspiel in Mastzellen noch längst nicht vollständig verstanden sind. Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Erkenntnisse über die Expression, die Verteilung, die Notwendigkeit und ein mögliches Zusammenspiel verschiedener SNARE-Proteine in den physiologisch und pathophysiologisch bedeutsamen humanen Darmmastzellen.

4.5 Ausblick

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Untersuchungen über die Beteiligung einzelner SNARE-Proteine an Exozytosevorgängen durchgeführt. Da die Isolierung und Aufreinigung humaner Gewebsmastzellen aufwendig ist, stammen die meisten Daten über die Degranulation von Mastzellen aus Modellsystemen wie der murinen Zelllinie RBL-2H3. Mastzellen sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge im Körper beteiligt. Gerade bei allergischen Erkrankungen, die in den letzten Jahrzehnten immer weiter auf dem Vormarsch sind, ist der Leidensdruck der Betroffenen oft sehr groß. Nur ein klares Verständnis der molekularen Vorgänge von Ausschüttungsprozessen möglichst naturgetreuer Zellsysteme kann dazu dienen, den Grundstein für zukünftige medizinische Ansätze zu legen. Schon seit Langem werden Medikamente bei Allergien eingesetzt, die auf Mastzellen und deren Ausschüttungsprodukte Einfluss nehmen. Leider sind diese oft mit unerwünschten Nebenwirkungen behaftet. Deshalb liegt der Gedanke nahe, direkt in das Geschehen der Mediatorenfreisetzung von Mastzellen einzugreifen. Ein möglicher Angriffspunkt hierfür wäre die SNARE-vermittelte Fusion von Granula mit der Plasmamembran zu unterbinden.

Schon seit einiger Zeit wird das von *Clostridium botulinum* gebildete Botulinumtoxin therapeutisch zur Behandlung einer Reihe neuronaler Erkrankungen eingesetzt, in denen es seine Wirkung durch das Schneiden von SNAP-25 entfaltet [289]. Überdies wurde kürzlich in einem Schizophrenie-Modellsystem eine Reduktion von SNAP-25 und Syntaxinen in bestimmten Regionen im Gehirn entdeckt und festgestellt, dass durch die Behandlung mit dem Antipsychotikum Haloperidol diese hochreguliert werden [290]. Daraufhin wurde

postuliert, dass eine gezielte Beeinflussung von SNARE-Proteinen neue Behandlungsmöglichkeiten aufzeigen könnten. Da jedoch bisher kein spezifisches Toxin gefunden wurde, das sich zum Schneiden der in Mastzellen beteiligten SNARE-Proteine eignet, ist diese Methode vorerst für die Beeinflussung von Mastzellfunktionen nicht vielversprechend.

Eine der zukunftssträchtesten neuartigen Therapieansätze stellt die Behandlung mit siRNA dar. Obwohl die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionsversuche nicht zum gewünschten Erfolg führten, könnten schonendere Methoden für das Einbringen von siRNA in Mastzellen gefunden werden. Auch wenn auf diesem Gebiet noch einige Hürden zu nehmen sind, befinden sich erste Medikamente mit siRNA bereits in der klinischen Testphase. Als mögliche Einsatzgebiete werden bisher vor allem Virusinfektionen, Neurodegenerative Leiden und Krebserkrankungen angesehen [291-293], aber auch der Eingriff in Mastzellfunktionen ist verlockend. Gerade bei allergischen Erkrankungen würde sich hierbei die Applikation doppelsträngiger RNA durch Inhalation, Augentropfen oder Salben anbieten, welche ein Eindringen der siRNA über oberflächenbehandelte Nanopartikel oder lentivirale Systeme ermöglichen könnten [294].

Da für eine gezielte Beeinflussung der Mediatorfreisetzung aus Mastzellen ein spezifisches SNARE-Protein gefunden werden müsste, das nicht an weiteren physiologisch wichtigen Vorgängen beteiligt ist, bleibt abzuwarten, inwiefern SNAREs einen geeigneten Ansatzpunkt für den Eingriff in den faszinierenden Mechanismus der Ausschüttungsprozesse menschlicher Mastzellen darstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Anderson HR, Gupta R, Strachan DP, Limb ES: 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. *Thorax* 2007;62:85-90.
2. Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR: Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 2007;62:91-96.
3. Rydzynski K, Palczynski C: Occupational allergy as a challenge to developing countries. *Toxicology* 2004;198:75-82.
4. Hermann-Kunz E: [Incidence of allergic diseases in East and West Germany]. *Gesundheitswesen* 1999;61 Spec No:S100-S105.
5. Deutsches Grünes Kreuz e.V.: Ärzte Merkblatt - Allergiediagnostik bei Kindern, 2001
6. Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G: Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999;353:1485-1488.
7. Sheikh A, Smeeth L, Hubbard R: There is no evidence of an inverse relationship between TH2-mediated atopy and TH1-mediated autoimmune disorders: Lack of support for the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:131-135.
8. Allen JE, Maizels RM: Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 1997;18:387-392.
9. Bonini S, Rasi G, Torre A, D'Amato M, Matricardi PM: The heterogeneity of allergic phenotypes: genetic and environmental interactions. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:48-51.
10. D'Amato G: Urban air pollution and respiratory allergy. *Monaldi Arch Chest Dis* 2002;57:136-140.
11. Lack G: Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1331-1336.
12. Milner JD, Stein DM, McCarter R, Moon RY: Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. *Pediatrics* 2004;114:27-32.
13. Black PN, Sharpe S: Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J* 1997;10:6-12.
14. Clemens P. von Pirquet: Allergie. *Münchener Medizinische Wochenschrift*. Band 30, 1906; 1457-1458
15. Brusselle G, Kips J, Joos G, Bluethmann H, Pauwels R: Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:254-259.
16. Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM: Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996;183:109-117.
17. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D: Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245:308-310.

18. Kopf M, Brombacher F, Hodgkin PD, Ramsay AJ, Milbourne EA, Dai WJ, Ovington KS, Behm CA, Kohler G, Young IG, Matthaei KI: IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 1996;4:15-24.
19. Finkelman FD, Katona IM, Urban JF, Jr., Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JV, Paul WE: IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988;141:2335-2341.
20. Rosenwasser LJ, Meng J: Anti-CD23. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;29:61-72.
21. Ying S, Barata LT, Meng Q, Grant JA, Barkans J, Durham SR, Kay AB: High-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI)-bearing eosinophils, mast cells, macrophages and Langerhans' cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *Immunology* 1998;93:281-288.
22. Wills-Karp M: Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999;17:255-281.
23. 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.
24. Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS: The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol* 2006;315:13-34.
25. Bischoff SC, Mayer JH, Manns MP: Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:270-283.
26. Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE: Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *J Pathol* 1997;182:115-122.
27. Haas N, Toppe E, Henz BM: Microscopic morphology of different types of urticaria. *Arch Dermatol* 1998;134:41-46.
28. 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.
29. 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.
30. Furuta GT, Schmidt-Choudhury A, Wang MY, Wang ZS, Lu L, Furlano RI, Wershil BK: Mast cell-dependent tumor necrosis factor alpha production participates in allergic gastric inflammation in mice. *Gastroenterology* 1997;113:1560-1569.
31. Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A: The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;49:65-76.
32. 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.
33. 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.

34. Zappulla JP, Arock M, Mars LT, Liblau RS: Mast cells: new targets for multiple sclerosis therapy? *J Neuroimmunol* 2002;131:5-20.
35. 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.
36. Galli SJ, Maurer M, Lantz CS: Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11:53-59.
37. 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.
38. Mecheri S, David B: Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity? *Immunol Today* 1997;18:212-215.
39. Grimbaldston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ: Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 2007;8:1095-1104.
40. Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ: Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* 2006;313:526-530.
41. Bradding P, Holgate ST: Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol* 1999;31:119-133.
42. Meininger CJ: Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chem Immunol* 1995;62:239-257.
43. 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.
44. Norrby K: Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 2002;110:355-371.
45. Recklinghausen Fv: Über Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchow Arch Path Anat* 28: 157-197, 1863
46. 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 und histologischer Beziehung. Leipzig, 1878. 65 S. Zgl.: Leipzig, Univ., Diss., 1878
47. Blank U, Rivera J: The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 2004;25:266-273.
48. Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, Georg Thieme Verlag, 1995
49. 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;146:1410-1415.
50. 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.

51. Grimaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ: Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 2005;167:835-848.
52. Kitamura Y, Go S, Hatanaka K: Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 1978;52:447-452.
53. Bischoff SC, Sellge G: Mast cell hyperplasia: role of cytokines. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:118-122.
54. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: Mast cells. *Physiol Rev* 1997;77:1033-1079.
55. Galli SJ, Nakae S, Tsai M: Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005;6:135-142.
56. 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.
57. Botchkarev VA, Eichmuller S, Peters EM, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, Paus R: 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.
58. Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Muller R, Hayes WC, Hovy L, Kurth AA: Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing. *Technol Health Care* 2000;8:267-275.
59. Marone G, de Crescenzo G, Florio G, Granata F, Dente V, Genovese A: Immunological modulation of human cardiac mast cells. *Neurochem Res* 1999;24:1195-1202.
60. Panula P, Lintunen M, Karlstedt K: Histamine in brain development and tumors. *Semin Cancer Biol* 2000;10:11-14.
61. Inoue T, Yoneda K, Kakurai M, Fujita S, Manabe M, Demitsu T: Alteration of mast cell proliferation/apoptosis and expression of stem cell factor in the regression of mastocytoma--report of a case and a serial immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 2002;29:305-312.
62. Kitamura Y: Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989;7:59-76.
63. Bischoff SC: Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 2007;7:93-104.
64. Bischoff SC, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP, Bektas H, Sann H, Levi-Schaffer F, Shanahan F, Schemann M: Substance P and other neuropeptides do not induce mediator release in isolated human intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:185-193.
65. Hardy WB, Westbrook FF: The Wandering Cells of the Alimentary Canal. *J Physiol* 1895;18:490-413.
66. Maximow A: Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch. mikrosk. Anat.* 67: 680-757, 1905

67. Enerback L: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966;66:289-302.
68. Enerback L: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966;66:303-312.
69. Enerback L, Svensson I: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of Percoll. *J Immunol Methods* 1980;39:135-145.
70. Kanakura Y, Thompson H, Nakano T, Yamamura T, Asai H, Kitamura Y, Metcalfe DD, Galli SJ: Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *Blood* 1988;72:877-885.
71. Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T: Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:244-248.
72. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB: Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:4464-4468.
73. Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, Schwartz LB: Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1162-1168.
74. Ozdemir O: Immunosurveillance function of human mast cell? *World J Gastroenterol* 2005;11:7054-7056.
75. Weidner N, Austen KF: Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 1990;63:63-72.
76. Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK: Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:590-597.
77. Schwartz LB: Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* 1994;6:91-97.
78. Marone G., G. De Crescenzo, V. Patella, F. Granata, L. Verga, E. Arbustini, A. Genovese. 2000. Human heart mast cells: immunological characterization in situ and in vivo. In *Mastcells and basophils*. G. Marone, L. M. Lichtenstein S: J. Galli. eds. Academic press
79. 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.
80. 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 LB: 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, and CD13 expression is reduced during differentiation. *Clin Exp Allergy* 2002;32:872-880.
81. Kaur D, Berger P, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P: Co-cultivation of mast cells and Fc epsilon RI alpha+ dendritic-like cells from human hip bone marrow. *Clin Exp Allergy* 2005;35:226-233.

82. Wang XS, Yip KH, Sam SW, Lau HY: Buffy coat preparation is a convenient source of progenitors for culturing mature human mast cells. *J Immunol Methods* 2006;309:69-74.
83. Wang XS, Lau HY: Histamine release from human buffy coat-derived mast cells. *Int Immunopharmacol* 2007;7:541-546.
84. Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, Yoshida NL, Matsui K, Nakada A, Sugita Y, Shimizu Y, Wakahara S, Nakao T, Fujii Y, Ra C, Saito H: Selective down-regulation of high-affinity IgE receptor (FcεRI) alpha-chain messenger RNA among transcriptome in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. *Blood* 2001;97:1016-1022.
85. Dahl C, Saito H, Nielsen HV, Schiotz PO: The establishment of a combined serum-free and serum-supplemented culture method of obtaining functional cord blood-derived human mast cells. *J Immunol Methods* 2002;262:137-143.
86. Dahl C, Hoffmann HJ, Saito H, Schiotz PO: Human mast cells express receptors for IL-3, IL-5 and GM-CSF; a partial map of receptors on human mast cells cultured in vitro. *Allergy* 2004;59:1087-1096.
87. Kambe N, Kambe M, Chang HW, Matsui A, Min HK, Hussein M, Oskerizian CA, Kochan J, Irani AA, Schwartz LB: An improved procedure for the development of human mast cells from dispersed fetal liver cells in serum-free culture medium. *J Immunol Methods* 2000;240:101-110.
88. Xia HZ, Du Z, Craig S, Klisch G, Noben-Trauth N, Kochan JP, Huff TH, Irani AM, Schwartz LB: Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 1997;159:2911-2921.
89. Siraganian RP, McGivney A, Barsumian EL, Crews FT, Hirata F, Axelrod J: Variants of the rat basophilic leukemia cell line for the study of histamine release. *Fed Proc* 1982;41:30-34.
90. Eccleston E, Leonard BJ, Lowe JS, Welford HJ: Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopietin. *Nat New Biol* 1973;244:73-76.
91. Buell DN, Fowlkes BJ, Metzger H, Isersky C: Cell cycle and morphological changes during growth and differentiation of a rat basophilic leukemia cell line. *Cancer Res* 1976;36:3131-3137.
92. Ortega E, Schweitzer-Stenner R, Pecht I: Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. *EMBO J* 1988;7:4101-4109.
93. Funaba M, Ikeda T, Abe M: Degranulation in RBL-2H3 cells: regulation by calmodulin pathway. *Cell Biol Int* 2003;27:879-885.
94. Ikawati Z, Wahyuono S, Maeyama K: Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells. *J Ethnopharmacol* 2001;75:249-256.
95. Froese A, Helm RM, Conrad DH, Isersky C, Ishizaka T, Kulczycki A, Jr.: Comparison of the receptors for IgE of various rat basophilic leukaemia cell lines. I. Receptors isolated by IgE-sepharose and IgE and anti-IgE. *Immunology* 1982;46:107-116.

96. Froese A, Helm RM, Conrad DH, Isersky C, Ishizaka T: Comparison of the receptors for IgE of various rat basophilic leukaemia cell lines. II. Studies with different anti-receptor antisera. *Immunology* 1982;46:117-123.
97. 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.
98. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ: Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res* 1988;12:345-355.
99. 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;108:89-97.
100. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, Rottem M, Goff JP, Beaven MA, Rao VK, Metcalfe DD: Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res* 2003;27:677-682.
101. Wierecky J, Grabbe J, Wolff HH, Gibbs BF: Cytokine release from a human mast cell line (HMC-1) in response to stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Inflamm Res* 2000;49 Suppl 1:S7-S8.
102. 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.
103. 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.
104. Benyon RC, Lowman MA, Church MK: Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. *J Immunol* 1987;138:861-867.
105. Sellge G, Bischoff SC: Isolation, culture, and characterization of intestinal mast cells. *Methods Mol Biol* 2006;315:123-138.
106. Galli SJ, Dvorak AM, Dvorak HF: Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. *Prog Allergy* 1984;34:1-141.
107. Marshall JS, Wasserman S: Mast cells and the nerves--potential interactions in the context of chronic disease. *Clin Exp Allergy* 1995;25:102-110.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Pradaliere A: Late-phase reaction in asthma: basic mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:322-325.

112. 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.
113. Rivera J, Gilfillan AM: Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:1214-1225.
114. Marshall JS: Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004;4:787-799.
115. 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.
116. Alber 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 beta subunit. *J Biol Chem* 1991;266:22613-22620.
117. Kinet JP: The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-972.
118. Malaviya R, Abraham SN: Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev* 2001;179:16-24.
119. Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, Cao J, Kempuraj D, Conti P: Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:563-568.
120. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, Piliponsky AM, Weller K, Chatterjea D, Clouthier DE, Yanagisawa MM, Tsai M, Galli SJ: Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004;432:512-516.
121. 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.
122. Lorentz A, Wilke M, Sellge G, Worthmann H, Klempnauer J, Manns MP, Bischoff SC: IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos. *J Immunol* 2005;174:6751-6756.
123. Melendez AJ, Harnett MM, Pushparaj PN, Wong WS, Tay HK, McSharry CP, Harnett W: Inhibition of Fc epsilon RI-mediated mast cell responses by ES-62, a product of parasitic filarial nematodes. *Nat Med* 2007;13:1375-1381.
124. Yazdanbakhsh M, van den BA, Maizels RM: Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol* 2001;22:372-377.
125. 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.
126. Lippert U, Welker P, Kruger-Krasagakes S, Moller A, Henz BM: Modulation of in vitro cytokine release from human leukemic mast cells (HMC-1) by glucocorticoids. *Skin Pharmacol* 1996;9:93-98.
127. 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.

128. Alton EW, Norris AA: Chloride transport and the actions of nedocromil sodium and cromolyn sodium in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S102-S105.
129. Cox JS: Disodium cromoglycate. Mode of action and its possible relevance to the clinical use of the drug. *Br J Dis Chest* 1971;65:189-204.
130. Baroody FM, Naclerio RM: Antiallergic effects of H1-receptor antagonists. *Allergy* 2000;55 Suppl 64:17-27.
131. 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.
132. 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.
133. 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.
134. 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.
135. Meinicke H, Darcan Y, Hamelmann E: Targeting allergic airway diseases by siRNA: an option for the future? *Curr Mol Med* 2009;9:483-494.
136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Kennerdell JR, Carthew RW: Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 2000;18:896-898.
140. 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.
141. 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;411:494-498.
142. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200.
143. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-366.
144. Peiser C, Groneberg D, Fischer A: Das therapeutische Arsenal - Pharmakotherapie allergischer Erkrankungen. *Kliniker* 2003; 32, Georg Thieme Verlag Stuttgart

145. Bonifacino JS, Glick BS: The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 2004;116:153-166.
146. Cohen FS, Melikyan GB: The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol* 2004;199:1-14.
147. Aravanis AM, Pyle JL, Tsien RW: Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 2003;423:643-647.
148. Alvarez dT, Fernandez JM: Compound versus multigranular exocytosis in peritoneal mast cells. *J Gen Physiol* 1990;95:397-409.
149. Pickett JA, Edwardson JM: Compound exocytosis: mechanisms and functional significance. *Traffic* 2006;7:109-116.
150. Crivellato E, Nico B, Vacca A, Ribatti D: Ultrastructural analysis of mast cell recovery after secretion by piecemeal degranulation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44:517-521.
151. Dvorak AM, Tepper RI, Weller PF, Morgan ES, Estrella P, Monahan-Earley RA, Galli SJ: Piecemeal degranulation of mast cells in the inflammatory eyelid lesions of interleukin-4 transgenic mice. Evidence of mast cell histamine release in vivo by diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Blood* 1994;83:3600-3612.
152. Melo RC, Perez SA, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF: Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 2005;6:866-879.
153. Schneider SW: Kiss and run mechanism in exocytosis. *J Membr Biol* 2001;181:67-76.
154. Frank SPC, Lorentz A: Mechanism of Mast Cell Exocytosis. Chapter 6, *Mast Cells, Interactions and Disorders*. Nova Science Publishers, Inc., 2008, ISBN 978-1-60456-879-0
155. Banfield DK: SNARE complexes--is there sufficient complexity for vesicle targeting specificity? *Trends Biochem Sci* 2001;26:67-68.
156. Jahn R, Sudhof TC: Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:863-911.
157. Hibi T, Hirashima N, Nakanishi M: Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:36-41.
158. Sander LE, Frank SP, Bolat S, Blank U, Galli T, Bigalke H, Bischoff SC, Lorentz A: Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol* 2008;38:855-863.
159. Stow JL, Manderson AP, Murray RZ: SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2006;6:919-929.
160. Hay JC, Scheller RH: SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:505-512.

161. Paumet F, Le Mao J, Martin S, Galli T, David B, Blank U, Roa M: Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol* 2000;164:5850-5857.
162. Rowe T, Dascher C, Bannykh S, Plutner H, Balch WE: Role of vesicle-associated syntaxin 5 in the assembly of pre-Golgi intermediates. *Science* 1998;279:696-700.
163. Xu Y, Martin S, James DE, Hong W: GS15 forms a SNARE complex with syntaxin 5, GS28, and Ykt6 and is implicated in traffic in the early cisternae of the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 2002;13:3493-3507.
164. Wade N, Bryant NJ, Connolly LM, Simpson RJ, Luzio JP, Piper RC, James DE: Syntaxin 7 complexes with mouse Vps10p tail interactor 1b, syntaxin 6, vesicle-associated membrane protein (VAMP)8, and VAMP7 in b16 melanoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:19820-19827.
165. Valdez AC, Cabaniols JP, Brown MJ, Roche PA: Syntaxin 11 is associated with SNAP-23 on late endosomes and the trans-Golgi network. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 6):845-854.
166. Prekeris R, Klumperman J, Chen YA, Scheller RH: Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J Cell Biol* 1998;143:957-971.
167. Simonsen A, Bremnes B, Ronning E, Aasland R, Stenmark H: Syntaxin-16, a putative Golgi t-SNARE. *Eur J Cell Biol* 1998;75:223-231.
168. Steegmaier M, Oorschot V, Klumperman J, Scheller RH: Syntaxin 17 is abundant in steroidogenic cells and implicated in smooth endoplasmic reticulum membrane dynamics. *Mol Biol Cell* 2000;11:2719-2731.
169. Hatsuzawa K, Hirose H, Tani K, Yamamoto A, Scheller RH, Tagaya M: Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J Biol Chem* 2000;275:13713-13720.
170. Bui TD, Levy ER, Subramaniam VN, Lowe SL, Hong W: cDNA characterization and chromosomal mapping of human golgi SNARE GS27 and GS28 to chromosome 17. *Genomics* 1999;57:285-288.
171. Kreykenbohm V, Wenzel D, Antonin W, Atlachkine V, von Mollard GF: The SNAREs vti1a and vti1b have distinct localization and SNARE complex partners. *Eur J Cell Biol* 2002;81:273-280.
172. Antonin W, Dulubova I, Arac D, Pabst S, Plitzner J, Rizo J, Jahn R: The N-terminal domains of syntaxin 7 and vti1b form three-helix bundles that differ in their ability to regulate SNARE complex assembly. *J Biol Chem* 2002;277:36449-36456.
173. Kasai K, Suga K, Izumi T, Akagawa K: Syntaxin 8 has two functionally distinct di-leucine-based motifs. *Cell Mol Biol Lett* 2008;13:144-154.
174. Tang BL, Low DY, Tan AE, Hong W: Syntaxin 10: a member of the syntaxin family localized to the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:345-350.
175. Xu Y, Wong SH, Zhang T, Subramaniam VN, Hong W: GS15, a 15-kilodalton Golgi soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) homologous to rbet1. *J Biol Chem* 1997;272:20162-20166.

176. Jahn R, Scheller RH: SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:631-643.
177. Ravichandran V, Chawla A, Roche PA: Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J Biol Chem* 1996;271:13300-13303.
178. Sorensen JB, Nagy G, Varoqueaux F, Nehring RB, Brose N, Wilson MC, Neher E: Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 2003;114:75-86.
179. Holt M, Varoqueaux F, Wiederhold K, Takamori S, Urlaub H, Fasshauer D, Jahn R: Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *J Biol Chem* 2006;281:17076-17083.
180. Advani RJ, Bae HR, Bock JB, Chao DS, Doung YC, Prekeris R, Yoo JS, Scheller RH: Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. *J Biol Chem* 1998;273:10317-10324.
181. Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F: Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/synaptobrevin II to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* 2003;14:4909-4919.
182. Zeng Q, Subramaniam VN, Wong SH, Tang BL, Parton RG, Rea S, James DE, Hong W: A novel synaptobrevin/VAMP homologous protein (VAMP5) is increased during in vitro myogenesis and present in the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 1998;9:2423-2437.
183. Okumura AJ, Hatsuzawa K, Tamura T, Nagaya H, Saeki K, Okumura F, Nagao K, Nishikawa M, Yoshimura A, Wada I: Involvement of a novel Q-SNARE, D12, in quality control of the endomembrane system. *J Biol Chem* 2006;281:4495-4506.
184. Burri L, Varlamov O, Doege CA, Hofmann K, Beilharz T, Rothman JE, Sollner TH, Lithgow T: A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9873-9877.
185. Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH: A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 2001;409:839-841.
186. Chen YA, Scheller RH: SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:98-106.
187. Ungermann C, Langosch D: Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* 2005;118:3819-3828.
188. Rothman JE: Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1994;29:81-96.
189. Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 1993;75:409-418.
190. Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE, Bucher P, Hofmann K: A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:3046-3051.
191. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15781-15786.

192. Fukuda R, McNew JA, Weber T, Parlati F, Engel T, Nickel W, Rothman JE, Sollner TH: Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Nature* 2000;407:198-202.
193. Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362:318-324.
194. Fasshauer D, Otto H, Eliason WK, Jahn R, Brunger AT: Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J Biol Chem* 1997;272:28036-28041.
195. Pobbati AV, Stein A, Fasshauer D: N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. *Science* 2006;313:673-676.
196. Antonin W, Holroyd C, Fasshauer D, Pabst S, von Mollard GF, Jahn R: A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. *EMBO J* 2000;19:6453-6464.
197. Fasshauer D, Antonin W, Subramaniam V, Jahn R: SNARE assembly and disassembly exhibit a pronounced hysteresis. *Nat Struct Biol* 2002;9:144-151.
198. Chernomordik LV, Kozlov MM: Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 2003;72:175-207.
199. Fasshauer D: Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2003;1641:87-97.
200. Jena BP, Cho SJ, Jeremic A, Stromer MH, Abu-Hamdah R: Structure and composition of the fusion pore. *Biophys J* 2003;84:1337-1343.
201. Pfeffer SR: Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 2007;76:629-645.
202. Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, Thiele C, Jahn R: SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J* 2001;20:2202-2213.
203. Monck JR, Oberhauser AF, Fernandez JM: The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release. *Mol Membr Biol* 1995;12:151-156.
204. Jena BP: Molecular machinery and mechanism of cell secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:307-319.
205. Jeftinija S: The story of cell secretion: events leading to the discovery of the 'porosome' - the universal secretory machinery in cells. *J Cell Mol Med* 2006;10:273-279.
206. Furst J, Sutton RB, Chen J, Brunger AT, Grigorieff N: Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 A resolution. *EMBO J* 2003;22:4365-4374.
207. Mayer A: Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:289-314.
208. 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.

209. 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.
210. 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.
211. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-350.
212. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
213. Kyhse-Andersen J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203-209.
214. Columbo M, Horowitz EM, Botana LM, Macglashan DW, Jr., Bochner BS, Gillis S, Zsebo KM, Galli SJ, Lichtenstein LM: The human recombinant c-kit receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* 1992;149:599-608.
215. Sperr WR, Czerwenka K, Mundigler G, Muller MR, Semper H, Klappacher G, Glogar HD, Lechner K, Valent P: Specific activation of human mast cells by the ligand for c-kit: comparison between lung, uterus and heart mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102:170-175.
216. Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva A, Aktories K, Bhakdi S: Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3185-3190.
217. Blank U, Cyprien B, Martin-Verdeaux S, Paumet F, Pombo I, Rivera J, Roa M, Varin-Blank N: SNAREs and associated regulators in the control of exocytosis in the RBL-2H3 mast cell line. *Mol Immunol* 2002;38:1341-1345.
218. Wang L, Ding G, Gu Q, Schwarz W: Single-channel properties of a stretch-sensitive chloride channel in the human mast cell line HMC-1. *Eur Biophys J* 2009.
219. Lee J, Oh PS, Lim KT: Allergy-related cytokines (IL-4 and TNF-alpha) are induced by Di(2-ethylhexyl) phthalate and attenuated by plant-originated glycoprotein (75 kDa) in HMC-1 cells. *Environ Toxicol* 2010.
220. Tagen M, Elorza A, Kempuraj D, Boucher W, Kepley CL, Shirihai OS, Theoharides TC: Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J Immunol* 2009;183:6313-6319.
221. Chen W, Beck I, Schober W, Brockow K, Effner R, Buters JT, Behrendt H, Ring J: Human mast cells express androgen receptors but treatment with testosterone exerts no influence on IgE-independent mast cell degranulation elicited by neuromuscular blocking agents. *Exp Dermatol* 2009.
222. Bischoff SC, Sellge G, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP: Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:104-107.

223. Chaves-Dias C, Hundley TR, Gilfillan AM, Kirshenbaum AS, Cunha-Melo JR, Metcalfe DD, Beaven MA: Induction of telomerase activity during development of human mast cells from peripheral blood CD34+ cells: comparisons with tumor mast-cell lines. *J Immunol* 2001;166:6647-6656.
224. Lorentz A, Bischoff SC: Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. *Immunol Rev* 2001;179:57-60.
225. Burd PR, Rogers HW, Gordon JR, Martin CA, Jayaraman S, Wilson SD, Dvorak AM, Galli SJ, Dorf ME: Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989;170:245-257.
226. Selvan RS, Butterfield JH, Krangel MS: Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J Biol Chem* 1994;269:13893-13898.
227. Schall TJ: Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 1991;3:165-183.
228. Miller MD, Krangel MS: Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992;12:17-46.
229. Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC: The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 1989;109:3039-3052.
230. Lin RC, Scheller RH: Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:19-49.
231. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 1998;92:759-772.
232. Guo Z, Turner C, Castle D: Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell* 1998;94:537-548.
233. Reales E, Mora-Lopez F, Rivas V, Garcia-Poley A, Brieva JA, Campos-Caro A: Identification of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor exocytotic machinery in human plasma cells: SNAP-23 is essential for antibody secretion. *J Immunol* 2005;175:6686-6693.
234. Logan MR, Lacy P, Bablitz B, Moqbel R: Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:299-306.
235. Antonin W, Riedel D, von Mollard GF: The SNARE Vti1a-beta is localized to small synaptic vesicles and participates in a novel SNARE complex. *J Neurosci* 2000;20:5724-5732.
236. Fischer vM, Stevens TH: A human homolog can functionally replace the yeast vesicle-associated SNARE Vti1p in two vesicle transport pathways. *J Biol Chem* 1998;273:2624-2630.
237. Lupashin VV, Pokrovskaya ID, McNew JA, Waters MG: Characterization of a novel yeast SNARE protein implicated in Golgi retrograde traffic. *Mol Biol Cell* 1997;8:2659-2676.
238. Hoffmann HJ, Bjerke T, Karawajczyk M, Dahl R, Knepper MA, Nielsen S: SNARE proteins are critical for regulated exocytosis of ECP from human eosinophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:194-199.

239. Lacy P, Logan MR, Bablitz B, Moqbel R: Fusion protein vesicle-associated membrane protein 2 is implicated in IFN-gamma-induced piecemeal degranulation in human eosinophils from atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:671-678.
240. Mollinedo F, Lazo PA: Identification of two isoforms of the vesicle-membrane fusion protein SNAP-23 in human neutrophils and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:808-812.
241. Martin-Martin B, Nabokina SM, Blasi J, Lazo PA, Mollinedo F: Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis. *Blood* 2000;96:2574-2583.
242. Band AM, Kuismanen E: Localization of plasma membrane t-SNAREs syntaxin 2 and 3 in intracellular compartments. *BMC Cell Biol* 2005;6:26.
243. Wendler F, Tooze S: Syntaxin 6: the promiscuous behaviour of a SNARE protein. *Traffic* 2001;2:606-611.
244. Murray RZ, Wylie FG, Khromykh T, Hume DA, Stow JL: Syntaxin 6 and Vti1b form a novel SNARE complex, which is up-regulated in activated macrophages to facilitate exocytosis of tumor necrosis Factor-alpha. *J Biol Chem* 2005;280:10478-10483.
245. Logan MR, Lacy P, Odemuyiwa SO, Steward M, Davoine F, Kita H, Moqbel R: A critical role for vesicle-associated membrane protein-7 in exocytosis from human eosinophils and neutrophils. *Allergy* 2006;61:777-784.
246. Regazzi R, Sadoul K, Meda P, Kelly RB, Halban PA, Wollheim CB: Mutational analysis of VAMP domains implicated in Ca²⁺-induced insulin exocytosis. *EMBO J* 1996;15:6951-6959.
247. Advani RJ, Yang B, Prekeris R, Lee KC, Klumperman J, Scheller RH: VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes. *J Cell Biol* 1999;146:765-776.
248. Teter K, Chandy G, Quinones B, Pereyra K, Machen T, Moore HP: Cellubrevin-targeted fluorescence uncovers heterogeneity in the recycling endosomes. *J Biol Chem* 1998;273:19625-19633.
249. McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelman L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Sudhof TC: Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein. *Nature* 1993;364:346-349.
250. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C: Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 2000;80:717-766.
251. Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C: Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 1995;270:10566-10570.
252. Galli T, Zahraoui A, Vaidyanathan VV, Raposo G, Tian JM, Karin M, Niemann H, Louvard D: A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:1437-1448.
253. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K: Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001;114:4557-4565.
254. Downward J: RNA interference. *BMJ* 2004;328:1245-1248.

255. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R: A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002;296:550-553.
256. Kajiguchi T, Lee S, Lee MJ, Trepel JB, Neckers L: KIT regulates tyrosine phosphorylation and nuclear localization of beta-catenin in mast cell leukemia. *Leuk Res* 2008;32:761-770.
257. Gaudreault E, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M: Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B4-induced neutrophil degranulation. *J Immunol* 2005;174:3617-3625.
258. Larbi KY, Gomperts BD: Practical considerations regarding the use of streptolysin-O as a permeabilising agent for cells in the investigation of exocytosis. *Biosci Rep* 1996;16:11-21.
259. Duman JG, Forte JG: What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;285:C237-C249.
260. Coco S, Raposo G, Martinez S, Fontaine JJ, Takamori S, Zahraoui A, Jahn R, Matteoli M, Louvard D, Galli T: Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: evidence for a novel membrane compartment. *J Neurosci* 1999;19:9803-9812.
261. Martinez-Arca S, Coco S, Mainguy G, Schenk U, Alberts P, Bouille P, Mezzina M, Prochiantz A, Matteoli M, Louvard D, Galli T: A common exocytotic mechanism mediates axonal and dendritic outgrowth. *J Neurosci* 2001;21:3830-3838.
262. Antonin W, Holroyd C, Tikkanen R, Honing S, Jahn R: The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol Biol Cell* 2000;11:3289-3298.
263. Polgar J, Chung SH, Reed GL: Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood* 2002;100:1081-1083.
264. Bhattacharya S, Stewart BA, Niemeyer BA, Burgess RW, McCabe BD, Lin P, Boulianne G, O'Kane CJ, Schwarz TL: Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13867-13872.
265. Ren Q, Barber HK, Crawford GL, Karim ZA, Zhao C, Choi W, Wang CC, Hong W, Whiteheart SW: Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol Biol Cell* 2007;18:24-33.
266. Mallard F, Tang BL, Galli T, Tenza D, Saint-Pol A, Yue X, Antony C, Hong W, Goud B, Johannes L: Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* 2002;156:653-664.
267. Boyce JA: Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol Rev* 2007;217:168-185.
268. Moqbel R, Coughlin JJ: Differential secretion of cytokines. *Sci STKE* 2006;2006:e26.
269. Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Weller PF: Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol* 2001;166:4813-4817.

270. Melo RC, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF: Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. *J Leukoc Biol* 2008;83:229-236.
271. Komiyama A, Spicer SS: Microendocytosis in eosinophilic leukocytes. *J Cell Biol* 1975;64:622-635.
272. Dvorak AM, Ackerman SJ, Furitsu T, Estrella P, Letourneau L, Ishizaka T: Mature eosinophils stimulated to develop in human-cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. II. Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. *Am J Pathol* 1992;140:795-807.
273. Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL: A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* 2005;310:1492-1495.
274. Pagan JK, Wylie FG, Joseph S, Widberg C, Bryant NJ, James DE, Stow JL: The t-SNARE syntaxin 4 is regulated during macrophage activation to function in membrane traffic and cytokine secretion. *Curr Biol* 2003;13:156-160.
275. Lynch SM, Austen KF, Wasserman SI: Release of arylsulfatase A but not B from rat mast cells by noncytolytic secretory stimuli. *J Immunol* 1978;121:1394-1399.
276. Puri N, Roche PA: Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2580-2585.
277. Theoharides TC, Bondy PK, Tsakalos ND, Askenase PW: Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature* 1982;297:229-231.
278. Tiwari N, Wang CC, Brochetta C, Ke G, Vita F, Qi Z, Rivera J, Soranzo MR, Zabucchi G, Hong W, Blank U: VAMP-8 segregates mast cell preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood* 2008.
279. Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D: Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;274:778-784.
280. Simpson JC, Nilsson T, Pepperkok R: Biogenesis of tubular ER-to-Golgi transport intermediates. *Mol Biol Cell* 2006;17:723-737.
281. Spencer LA, Melo RC, Perez SA, Bafford SP, Dvorak AM, Weller PF: Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3333-3338.
282. Schulze KL, Broadie K, Perin MS, Bellen HJ: Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* 1995;80:311-320.
283. Martin-Verdeaux S, Pombo I, Iannascoli B, Roa M, Varin-Blank N, Rivera J, Blank U: Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *J Cell Sci* 2003;116:325-334.
284. Mossessova E, Bickford LC, Goldberg J: SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 2003;114:483-495.

285. Tamori Y, Kawanishi M, Niki T, Shinoda H, Araki S, Okazawa H, Kasuga M: Inhibition of insulin-induced GLUT4 translocation by Munc18c through interaction with syntaxin4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1998;273:19740-19746.
286. Tadokoro S, Kurimoto T, Nakanishi M, Hirashima N: Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin-3 in RBL-2H3 cells. *Mol Immunol* 2007;44:3427-3433.
287. Tuvim MJ, Adachi R, Chocano JF, Moore RH, Lampert RM, Zera E, Romero E, Knoll BJ, Dickey BF: Rab3D, a small GTPase, is localized on mast cell secretory granules and translocates to the plasma membrane upon exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:79-89.
288. Chapman ER: Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:498-508.
289. Chen S, Barbieri JT: Engineering botulinum neurotoxin to extend therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9180-9184.
290. Barakauskas VE, Beasley CL, Barr AM, Ypsilanti AR, Li HY, Thornton AE, Wong H, Rosokilja G, Mann JJ, Mancevski B, Jakovski Z, Davceva N, Ilievski B, Dwork AJ, Falkai P, Honer WG: A Novel Mechanism and Treatment Target for Presynaptic Abnormalities in Specific Striatal Regions in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010.
291. Federici T, Liu JK, Teng Q, Yang J, Boulis NM: A means for targeting therapeutics to peripheral nervous system neurons with axonal damage. *Neurosurgery* 2007;60:911-918.
292. Kim DH, Rossi JJ: Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007;8:173-184.
293. Tripp RA, Tompkins SM: Therapeutic applications of RNAi for silencing virus replication. *Methods Mol Biol* 2009;555:43-61.
294. Geusens B, Sanders N, Prow T, Van Gele M, Lambert J: Cutaneous short-interfering RNA therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2009;6:1333-1349.

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Ernährungsmedizin/Prävention und Genderforschung der Universität Hohenheim unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Axel Lorentz und der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stephan C. Bischoff.

Mein vornehmlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Axel Lorentz für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hilfreiche Betreuung der Arbeit. Durch seine wissenschaftlichen Ratschläge und sein stetes Interesse ermöglichte er mir, mich fachlich weiterzuentwickeln und selbstständig zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Stephan C. Bischoff danke ich für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen sowie seine konstruktiven Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe in alphabetischer Reihenfolge: Anja Baumann, Carolin Brandmaier, Katrin Feuser, Sandra Lechowski, Arben Mrasori, Yvonne Soltow sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Ernährungsmedizin für die nette Zusammenarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Blank (INSERM, Paris) bedanke ich mich für die zur Verfügungstellung von humanem Myeloma-IgE, anti-IgE Antikörper sowie anti-VAMP-8 Antikörper. Herrn Dr. Thierry Galli (ebenfalls INSERM, Paris) danke ich für die freundliche Überlassung des anti-VAMP-7 Antikörpers.

Frau Dr. Katharina Feilhauer vom Katharinenhospital Stuttgart, Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Thon vom Robert-Bosch-Krankenhaus, Herrn Prof. Dr. Ludger Staib vom Klinikum Esslingen, Herrn Prof. Dr. Uwe Hesse und Herrn Dr. Klaus Münz vom Klinikum Bad Cannstatt sowie Herrn Dr. Jörg Glatzle von der Uniklinik Tübingen danke ich für die Unterstützung der Arbeit durch regelmäßiges Versorgen unserer Arbeitsgruppe mit humanen Darmresektaten.

Für die Finanzierung der vorliegenden Arbeit danke ich ganz herzlich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern Rosemarie und Günther Frank und meinen Geschwistern Christopher, Manuel und Mirjam für ihre jahrelange liebevolle Unterstützung sowie ihr offenes Ohr in allen Phasen der Arbeit.

Meiner Frau Luby Barrios de Frank danke ich für all ihr Verständnis und ihre Geduld in Zeiten, in denen ich sehr intensiv mit der Arbeit beschäftigt war.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simon Philipp Cornelius FRANK
Adresse: Leypoldtstr. 16, 70599 Stuttgart
Geburtsdatum: 06.03.1980
Geburtsort: Pforzheim
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schule und Ausbildung

1986 – 1996 Grund- und Realschule Birkenfeld, Abschluss: Mittlere Reife
1996 – 1999 Wirtschaftsgymnasium Pforzheim, Abschluss: Allg. Hochschulreife
1999 – 2000 Freiwilliges soziales Jahr in der Landwirtschaft des Kinderheims *Hogar San José de Malambo* in Panama
2000 – 2005 Biologie-Studium an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Abschluss: Diplom
2004 – 2005 Diplomarbeit an der *Universidad de Costa Rica* in San José, Costa Rica und der Eberhard Karls Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. H. Schulz-Key und Dr. E. Abrahams-Sandi.
„*Angiostrongylus costaricensis* - Infektionsverlauf in der Baumwollratte, Antigenerkennung von Wurmeiproteinen und Befallskontrolle von Nagern in Costa Rica“
2006 – 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. med. S. C. Bischoff, Institut für Ernährungsmedizin, Universität Hohenheim, Stuttgart

8 Publikationsliste

Originalarbeiten

Sander LE, **Frank SP**, Bolat S, Blank U, Galli T, Bigalke H, Bischoff SC, Lorentz A. Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol.* 2008 Mar; 38(3):855-63.

Simon P. C. Frank and Axel Lorentz. Mechanism of Mast Cell Exocytosis. Chapter 6. *Mast Cells: Roles, Interactions and Disorders.* Nova Science Publishers, Inc., 2008, Editor: Jonas F. Jung and Luca T. Scholz, pp., ISBN 978-1-60456-879-0

Kongressbeiträge

Frank S, Sander LE, Bolat S, Bischoff SC, Lorentz A. Regulation of human mast cell degranulation. Colloque Formation des jeunes chercheurs. Le défi de l'Europe, Paris 2005

Lorentz A, Sander LE, **Frank S**, Bolat S, Bischoff SC. SNAREs in mature human mast cells: VAMP-7 and VAMP-8 are involved in activation-induced degranulation. 13th International Congress of Immunology. MS-77.3, Rio de Janeiro 2007

Lorentz A, **Frank S**, Sander LE, Bischoff SC. SNARE-Proteins in human mast cell degranulation: Role of SNAP-23, Syntaxin-4, VAMP-7 and VAMP-8. 27th Symposia of the Collegium Internationale Allergologicum. 28, Curaçao 2008

Frank S. Proteins in human mast cell exocytosis. 12th Meeting of the AGMZB – Mast Cell and Basophil, Berlin 2008

Frank S, Bischoff SC, Lorentz A. SNARE-Proteins in exocytosis of pre-stored and *de novo* synthesized mediators in human mast cells. XXVIII Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. 120, Warschau 2009

9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hohenheim zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Rolle von SNARE-Proteinen bei der Mediatorfreisetzung humaner Mastzellen“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe.

Stuttgart, den 19.02.2010

Simon Frank