Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Die Regulation der Synthese und Freisetzung von FGF-2 aus humanen dermalen Mastzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctorum medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Anna Christina Krajewski
aus Kiel

Dekan: Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. T. Zuberbier

2. Prof. Dr. med. M. Ollert

3. PD. Dr. med. B. Wedi

eingereicht: 19. November 2004

Datum der Promotion: 30. Oktober 2005

Die Synthese und Freisetzung von FGF-2 aus humanen dermalen Mastzellen

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) ist ein Mitglied einer großen Familie von Wachstumsfaktoren. FGF-2 fördert das Wachstum und die Entwicklung von Blutgefäßen (Angiogenese) und nimmt somit Einfluss auf Wundheilungsprozesse, Gewebeentwicklung, als auch verschiedene pathologische Vorgänge im Organismus. Mastzellen wurden lange Zeit allein als Effektorzellen der Typ I Allergiereaktion betrachtet. Mittlerweile betrachten man sie auch als wichtige Zellen für die Gewebe Homöostase und Wundheilung. In der vorliegenden Arbeit wurden MC aus humenen dermalen Gewebe isoliert, um deren FGF-2 Synthese und –Freisetzung zu untersuchen. Die Zellen wurden mit verschiedenen proinflammatorischen Mediatoren stimuliert. FGF-2 wurde mit ELISA und PCR Methoden bestimmt. Durch Stimulationen mit a–IgE, SP, IL–4, IL–6 und IL–8 wurde eine gesteigerte FGF–2–Synthese induziert. Weiterhin zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass bei der Degranulation der MC FGF-2 freigesetzt wird, auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus für die Freisetzung weiterhin unklar bleibt. UVA_1–und $PUVA_1$–Bestrahlung hatten einen inhibieren Effekt auf die Sekretion des Proteins.

Mastzelle, Fibroblast growth factor-2, Wundheilung, Degranulation, Stimulation, Proinflammatorische Mediatoren

Synthesis and release of FGF-2 from human dermal mast cells

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is a member of a large family of proteins. FGF-2 stimulates the growth and development of new blood vessels (angiogenesis) that contribute to the pathogenesis of several diseases (i.e. atherosclerosis), normal wound healing and tissue development. Mast cells (MC) are traditionally viewed as effector cells of immediate type hypersensitivity reactions. There is, however, a growing body of evidence that the cells might play an important role in the maintenance of tissue homeostasis and repair. In this present investigation, we isolated MC from human tissue to investigate their FGF-2 synthesis and release after stimulation with different proinflammatory mediators. To detect FGF-2 we used ELISA and PCR techniques. We could show the up-regulation of FGF-2 synthesis after stimulation with a-IgE, SP, IL-4, IL-6 and IL-8. Within the degranulation of MC there was a release of FGF-2 even though the mode of release still remains unclear. Through UV-light radiation we could show a downregulation of FGF-2 release.

mast cell, fibroblast growth factor-2, wound healing, degranulation, stimulation, proinflammatory Mediators, inflammation

Inhaltsverzeichnis

DIE SYNTHESE UND -FREISETZUNG VON FGF-2 AUS HUMANEN DERMALEN MASTZELLEN 3

SYNTHESIS AND RELEASE OF FGF-2 FROM HUMAN DERMAL MAST CELLS 4

1 EINLEITUNG 4

1.1 VORKOMMEN UND ENTWICKLUNG VON MASTZELLEN 4
1.2 HETEROGENITÄT UND FUNKTION VON MASTZELLEN 5
1.2.1 Heterogentität von MC 5
1.2.2 Funktion von MC und ihre klinische Bedeutung 5
1.3 MEDIATORENGEHALT UND AKTIVIERUNG VON MASTZELLEN 6
1.3.1 Mediatoren der Mastzelle 7
1.3.2 Die Aktivierung der Mastzelle 9
1.4 FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 (FGF–2) 11
1.5 STIMULANTIEN 14
1.5.1 Substanz P (SP) 14
1.5.2 Zytokine 15
1.5.3 Transforming Growth Factor β (TGFβ) 15
1.5.4 Staphyolococcus aureus Enterotoxin B (SEB) 16
1.6 WIRKUNGSMECHANISMEN VON UV–LICHT 16

2 ZIELSETZUNG 18

3 MATERIAL UND METHODEN 19

3.1 MATERIALIEN 19
3.1.1 Puffer 23
3.1.2 Medien 24
3.2 METHODEN 25
3.2.1 Die Isolierung der Mastzellen 26
3.2.2 Histaminfreisetzung mit Histamin–Analyser 28

3.2.3 Die Stimulierung der MC mit klassischen MC–Liberatoren und proinflamatorischen Zytokinen 28
3.2.4 Die Stimulierung der MC für die PCR 30
3.2.5 Zeitkinetik mit Substanz P 30
3.2.6 Präinkubation mit Interleukin 4 31
3.2.7 Bestrahlung der MC mit UVB, UVA_1 und $PUVA_1$ 32
3.2.8 Enzymimmunoassay (ELISA) 33
3.2.9 Semiquantitative Bestimmung von FGF–2 m–RNA durch die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT–PCR) 34
3.3 STATISTIK 38

4 ERGEBNISSE 40

4.1 DIE BASALE FREISETZUNG VON FGF–2 40
4.2 DIE FGF–2–SYNTHESE IN HUMANEN MC 41
4.2.1 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit klassischen Liberatoren und mit Substanz P 41
4.2.2 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und SEB 43
4.2.3 Untersuchungen zur m–RNA Expression von FGF–2 47
4.3 DER GESAMT–FGF–2–GEHALT VON MC NACH STIMULATION MIT VERSCHIEDENEN SUBSTANZEN 50
4.4 DIE FREISETZUNG VON FGF–2 AUS HUMANEN MC 52
4.4.1 Die Wirkung klassischer MC–Liberatoren und Substanz P auf die FGF–2–Freisetzung 52
4.4.2 Die Wirkung proinflammatorischer Zytokine und SEB auf die Freisetzung von FGF–2 in MC 54
4.4.3 Der zeitliche Verlauf der FGF–2–Sekretion durch humane MC 58
4.4.4 Stimulierte FGF–2–Sekretion durch Präinkubation mit IL–4 59
4.4.5 Der Einfluss von UV–Licht auf die FGF–2–Freisetzung 61
4.5 DER EINFLUSS VON PROTEASEINHIBITOREN AUF FGF–2 UND MC 62
4.5.1 Synthese und Freisetzung von FGF–2 humaner MC nach Zugabe von Proteaseinhibitoren 63

4.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 66

5 DISKUSSION 67

5.1 DIE FGF–2–SYNTHESE UND FREISETZUNG VON HUMANEN MC 68

5.1.1 Die FGF–2–Synthese und –Freisetzung durch MC nach Inkubation mit verschiedenen Stimulantien 68

5.1.2 Untersuchungen zur m–RNA Expression von FGF–2 72

5.2 DIE FREISETZUNG VON FGF–2 DURCH DIE DEGRANULATION 74

5.2.1 Der zeitliche Verlauf der FGF–2–Sekretion durch humane MC 74

5.2.2 Stimulierte FGF–2–Sekretion 75

5.2.3 Der Einfluss von UV–Licht auf die FGF–2–Freisetzung 77

6 ZUSAMMENFASSUNG 80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 81

LITERATURVERZEICHNIS 83

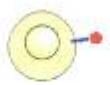
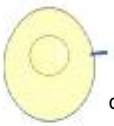
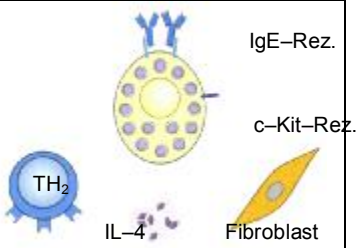
ERKLÄRUNG AN EIDES STATT 91

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und Entwicklung von Mastzellen

Mastzellen (MC) sind Effektorzellen des Immunsystems mit vielen verschiedenen Funktionen[1, 2]. Es handelt sich um große (9–17µm), mononukleäre, gewebeständige Zellen, deren Zytoplasma mit sekretorischen Granula angereichert ist. Sie kommen ubiquitär im Bindegewebe und in den Schleimhäuten des Körpers vor. In der Haut befinden sie sich in der Nähe von Gefäßen, Haarfollikeln, Talgdrüsen und Nervenzellen[3]. Ihr Anteil an dermalen Zellen beträgt 2–8%. Zum ersten Mal wurden MC von Paul Ehrlich 1878 in seiner Dissertation über histologische Färbungen beschrieben. Er fand eine Zellart, die sich mit Toluidinblau violett anfärben ließ. Diesen Zellentypus nannte er Mastzelle, da er den Granulainhalt für phagozytiertes Material hielt, die Zellen sozusagen gemästet waren[4]. Die Toluidinblaufärbung ist nach wie vor eine gängige Methode zur Detektierung von MC. MC stammen von CD34+ Zellen der myeloischen Zellreihe aus dem Knochenmark ab[5, 6, 7]. Sie verlassen das Knochenmark und zirkulieren als Vorläuferzelle im Blut[8]. Die Vorläuferzellen wandern in Ihr Zielgewebe ein und reifen dort, unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren zur MC. (siehe Abb.: 1)

Tabelle 1: Die Entwicklung von MC[1, 5, 7, 8, 9, 10, 11]

Knochenmark	Blut	Gewebe
pluripotente Stammzelle	zirkulierende Vorläuferzelle	Reife Mastzelle
 c–Kit–Rez. mit SCF	 c–Kit–Rez.	
CD34+, c–Kit+	CD34+, c–Kit+, CD13+	IgE–R+, c–Kit+, Granula
Wahrscheinlich unter dem Einfluss von SCF verlassen die Zellen das Knochenmark und zirkulieren dann im Blut als Vorläuferzelle.	Die Interaktion der MC mit extra–zellulären Matrix Proteinen (ECM) spielt eine entscheidende Rolle bei der Einwanderung der MC in Ihr Zielgewebe.	Durch verschiedene Einflüsse reifen die Zellen im Gewebe: 1. TH2–Zelle Zytokine 2. IL–4 fördert die Expression des IgE–R. 3. Zell–Kontakte zwischen MC und Fibroblasten

1.2 Heterogenität und Funktion von Mastzellen

1.2.1 Heterogentität von MC

MC variieren stark in ihrer Morphologie, ihrem Mediatorengehalt, ihrer Histochemie und ihrer Physiologie. Eine frühe Einteilung stammt aus der Untersuchung von Rattenmastzellen. Die MC der Ratten wurden entsprechend Ihrer Lokalisation in MMC (mucosal mast cells) und CTMC (connective tissue mast cells) eingeteilt. Dieses Model ist nicht auf den Menschen übertragbar, so dass man die humanen MC heute üblicherweise entsprechend ihres intrazellulären Gehalts an den Serinproteasen Tryptase und Chymase in MC_{TC} (Tryptase und Chymase), MC_T (Tryptase) und MC_C (Chymase) einteilt[12, 13]. Darüber hinaus gibt es noch viele andere Subtypen[11, 14, 15, 16, 17].

1.2.2 Funktion von MC und ihre klinische Bedeutung

MC sind als Vermittler der allergischen Reaktion vom Soforttyp [3, 18, 19, 20, 21] und vom verzögerten Typ[20] bekannt. Ihnen wird auch eine gewisse regulatorische Funktion bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen zugeschrieben[10, 22, 23]. Neben dieser maßgeblichen Funktion bei allergischen Erkrankungen spielen MC auch in verschiedenen anderen pathologischen Prozessen eine Rolle, deren Bedeutung bis heute noch nicht vollständig geklärt ist. Zu diesen gehören chronisch[1] proliferative und entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise Asthma bronchiale (sowohl vom atopischen, als auch vom nicht atopischen Formenkreis[24, 25]) die allergische Rhinitis[26, 27, 28] und die Rheumatoide Arthritis[1]. Weiterhin werden MC auch vermehrt im Gewebe von Tumoren wie dem Melanom und dem Mammakarzinom oder Basalzelltumoren gefunden[29]. Auch beim oralen Lichen planus sind die MC–Zahlen in den erkrankten Läsionen signifikant erhöht[30, 31, 32]. Die lokale Anreicherung von MC entsteht zum einen durch vermehrte Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Blut, die dann im

Gewebe reifen, zum anderen durch die Migration von reifen MC aus anderen Geweben. Eine weitere MC–assoziierte Erkrankung ist die Sklerodermie, bei der es durch entzündliche Veränderung des gefäßführenden Bindegewebes zur Fibrose der Haut kommt.
Zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses kommen MC durch ihre Funktionen bei immunologischen Vorgängen im Körper. Sie sind in der Lage Fremd–allergene zu binden, zu phagozytieren und anschließend auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Damit nehmen MC Einfluss auf die spezifische Immunabwehr. Auf ihrer Oberfläche exprimieren MC verschiedene Rezeptoren, wie z.B. MHC-I, MHC-II, ICAMs und CD40L[10]. Auch Wundheilungsprozesse werden von MC beeinflusst. Das Immunsystem des Körpers reagiert auf Verletzungen des Gewebes durch immunologische, physikalische oder chemische Reize mit einer akuten Entzündungsreaktion, gefolgt von Angiogenese und Gewebeproliferation[7, 33, 34]. Bei diesem Geschehen sind MC auf vielfältige Weise beteiligt[3, 35]. Sie setzen Zytokine frei und fördern damit die Chemotaxis von Entzündungszellen[36]. Außerdem führt Histamin zur Vasodilatation der Gefäße, wodurch die Migration von Leukozyten zum Entzündungsort begünstigt wird.
MC setzen auch Wachstumsfaktoren frei, welche die Proliferation verschiedener Zellen, beispielsweise Fibroblasten steuern[37]. So konnten Versuche zeigen, dass durch die Anwesenheit von MC die Angiogenese gefördert wird[38]. Zu den dabei eine Rolle spielenden Mediatoren gehören Tryptase, Heparin, VEGF, TGFβ und FGF–2[39, 40, 41]. FGF–2 fördert als potenter proliferativer und mitogener Wachstumsfaktor die Proliferation von Fibroblasten und so die Bildung von Narbengewebe[42, 43, 44].

1.3 Mediatorengehalt und Aktivierung von Mastzellen

Wird die MC aktiviert, werden verschiedene Mediatorstoffe durch Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt. Diesen Vorgang nennt man „Degranulation“. Die Mediatoren werden in gespeicherte bzw. präformierte Mediatoren, Enzyme, Lipidmediatoren und Zytokine unterteilt[1, 6, 7, 8, 19, 45]. (vergleiche Tabelle 1–3)

1.3.1 Mediatoren der Mastzelle

Tabelle 2: Präformierte Mediatoren und Enzyme

Produktklasse	Wirkungsweise
Histamin	- Vasodilatation - Erhöht Permeabilität von Epithelien und Gefäßen - Induziert die Kontraktion von glatter Muskulatur - Fördert Sekretion von Mucinen und Magensäure - Chemotaxe von Granulozyten
Heparin und Chondroitinsulfat	Intrazellulär: - Bindet und stabilisiert die in den Granula gespeicherten Mediatoren
	Extrazellulär: - Wichtigstes Antikoagulans - Stimuliert die Migration von Endothelzellen - Inhibiert die Komplementkaskade
Tryptase	- Erhöht die Gefäßpermeabilität - Stimuliert Fibroblastenproliferation - Steigert Bronchokonstriktion
Chymase	- Degradiert Substanz P - Degradiert Basalmembranen - Stimuliert die Mucus–Sekretion
Carboxypeptidase	- Spaltet Peptidbindungen
Cathepsin G	- Spaltet Peptidbindungen

Tabelle 3: Lipidmediatoren

Produktklasse	Wirkungsweise
Leukotrien $C_4/D_4/E_4$	- Erhöhen die Gefäßpermeabilität - Stimulieren Sekretion von Mucinen - Induzieren Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur - Modulieren Proliferation und Differenzierung von Zellen - Stimuliert die Sekretion von Mucinen
Leukotrien B_4	- Erhöht Chemotaxis u. Adhäsion von Neutrophilen - Vasodilatation
Prostaglandin D_2/	- Bronchiale Hyperaktivität
(PGD_2)	- Inhibiert die Trombozytenaggregation

Tabelle 4: Zytokine

Produktklasse	Wirkungsweise
Tumor necrosis factor α	- Fördert Entzündungsreaktionen
(TNFα)	- Stimuliert Bildung von Zytokinen in vielen Zelltypen
IL–4	- Aktiviert Endothelzellen
IL–6, IL–13	- Induziert IgE–Produktion durch B–Lymphozyten
IL–3, IL–5, GM–CSF	- Stimuliert und verstärkt Reaktion von T_H2–Zellen - Fördert Bildung und Aktivierung von Eosinophilen
FGF–2	- Proliferation von Fibroblasten (siehe Abschnitt)

1.3.2 Die Aktivierung der Mastzelle

MC können durch unterschiedliche Stimulantien aktiviert werden. Zu diesen Substanzen gehören u.a. a–IgE, das Neurokinin Substanz P und das Antibiotikum A23187 (Ca–Ionophore)[46, 47]. Bezüglich dieser Aktivierung unterscheiden sich die MC–Subtypen des Menschen untereinander erheblich[48]. Auch der Mechanismus der Aktivierung ist unterschiedlich. Klassisch bekannt ist die Aktivierung durch den hochaffinen IgE–Rezeptor, der an dieser Stelle beschrieben wird[49, 50].

Die Aktivierung des Rezeptors führt im wesentlichen zu drei Reaktionen[51].

1. Die Freisetzung präformierter Mediatoren aus den intrazellulären Vesikeln innerhalb weniger Minuten nach der Aktivierung.
2. Synthese von Mediatoren aus membranständiger Arachidonsäure, die innerhalb von etwa 30 Minuten sezerniert werden.
3. Bildung von mRNA zur Synthese von Zytokinen, deren Freisetzung erst Stunden später erfolgt.

Der IgE–Rezeptor bildet eine tetramere Struktur, bestehend aus einer IgE–bindenden α–Kette, einer β–Kette, die das Signal verstärkt, und zwei γ–Ketten, die das Signal in das Innere der Zelle weiterleiten. An diesem Rezeptor liegt IgE gebunden vor. In der Zelle sind je zwei Tyrosinkinasen an die β–und γ–Ketten angelagert. Sie heißen **Lyn** (an der β–Kette) und **Syk** (an den γ–Ketten). Abhängig vom Phosphorylierungszustand der Kinasen binden sogenannte **ITAM**s (Immunotyrosine Based Activation Motifs) an sie. Bei der Quervernetzung von dem an den Rezeptoren gebundenen IgE durch Allergen erfolgt die Aktivierung der Zelle.

Dadurch wird durch Lyn (β–Kette) erstens die γ Kette phosphoryliert, was wiederum ermöglicht, dass dort Syk gebunden wird, und zweitens eine weitere Tyrosinkinase namens **Btk** (Bruton's tyrosine kinase) phosphoryliert.

Syk und Btk phosphorylieren als Reaktion darauf die **PLCγ** (Phospholipase C). Die phosphorylierte PLCγ setzt aus membranständigem **PIP_2** (Phosphatidylinositol 4,5–bisphosphat) ,**IP_3** (Inositoltriphosphat) und **DAG** (Diacylglycerin) frei. **IP_3** setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei. Das Ca^{2+} führt über die Bindung an **CRAC**–Kanäle

(Calcium Release Activated Calcium) zu weiterem Ca^{2+} Einstrom.

Zu 1. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}–Konzentration verschmelzen die Granula mit der Zellmembran und die präformierten Mediatoren werden freigesetzt. Der genaue Mechanismus ist unklar, man geht davon aus, dass ein Ca^{2+} bindendes Protein (**C_E**) weitere Proteine aktiviert (**Rac1**, **Rac2** und **Cd429**). Diese binden GTP, was dann zur Fusion von sogenannten **SNARE**–Proteinen (Soluble N–ethylmaleimide–sensitive factor attachment protein receptor) führt. Dieses sind Proteine, die sich sowohl auf der Vesikel–, als auch auf der Zellmembran befinden. Durch das Verschmelzen der Membranen wird der Vesikelinhalt in den Extrazellulärraum entlassen.

Zu 2. Die Lipidmediatoren werden aus Arachidonsäure gebildet. Sie wird durch die Phospholipase A_2 von Membranlipiden abgespalten, wenn die Lipase aktiviert wird. Dazu kommt es durch physikalische und chemische Stimuli, aber auch durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+}–Spiegel. Arachidonsäure wird durch die Cyclooxygenase in Prostaglandine und durch die Lipooxygenase in Leukotriene umgewandelt.

Zu 3. Eine weitere Folge des erhöhten Ca^{2+}–Spiegels ist die Aktivierung von Calcineurin. Es bindet den Transkriptionsfaktor **NF–AT** (Nuclear Factor of Activated T–cells), der dann in den Zellkern wandert. **DAG** aktiviert die Proteinkinase C (**PKC**).

Die Kinase und Btk regen die **MAPK**–Kaskade (Mitogen Activated Proteinkinase) an, die zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie **AP1** (Activator Protein 1) führt. Zusammen mit NF–AT wird so im Zellkern die Transkription verschiedener Zytokine ausgelöst[52, 53].

Neben a–IgE gibt es eine Vielzahl anderer Reize, die zur Degranulation der MC führen. Zu den immunologischen Reizen gehören neben a–IgE auch a–IgG, a–IgM, a–IgA[54] und Substanz P. Aber auch nicht immunologische, wie physikalische, pharmakologische und toxische Reize können zur Aktivierung der Zelle führen. Die genauen Mechanismen sind zur Zeit unbekannt.

1.4 Fibroblast Growth Factor 2 (FGF–2)

Der Name „Fibroblast Growth Factor“ beschreibt eine Zytokinfamilie mit 23 Mitgliedern[55, 56]. Diese beeinflussen das Wachstum, die Migration und die Differenzierung verschiedener Zellen und regen so beispielsweise Endothel– und Knochenzellen zum Wachstum an. Die Mitglieder dieser Familie haben eine identische Kernregion. Das Molekulargewicht schwankt zwischen 7kDa und 38kDa.

Der „Fibroblast Growth Factor 2“ (FGF–2) oder „basic Fibroblast Growth Factor“ gehört zu dieser Familie der Fibroblasten–Wachstumsfaktoren[57]. FGF–2 ist ein Protein mit vielfältigen biologischen Funktionen und wird u.a. von Fibroblasten, Epithelzellen, Muskelzellen der Gefäße, Herzmuskelzellen und von Mastzellen gebildet[58, 59, 60, 61]. Es existiert in zwei verschiedenen Isoformen, der kleineren, zytoplasmatischen Isoform, mit einem Molekulargewicht von 18kDa, und einer größeren, kernständigen Form, mit einem Molekulargewicht zwischen 22kDa und 24kDa[56, 62].

FGF–2 bildet Komplexe mit Heparin und Chondroitinsulfat, daher ist eine andere Bezeichnung für FGF–2 Heparin–bindender Wachstumsfaktor[63, 64, 65, 66, 67, 68, 69]. Diese Komplexbildung stabilisiert die Struktur und bildet einen Schutz vor dem enzymatischen Abbau durch Proteasen[70]. Weiterhin erhöhen diese Komplexe die Affinität an den FGF–Rezeptor zu binden, wodurch dessen biologische Aktivität, reguliert wird[65, 71, 72].

Eine strukturelle Besonderheit von FGF–2 ist das Fehlen der typischen Signalsequenz[73], welche Peptide besitzen, die über den klassischen Sekretionspathway der Zelle sezerniert werden. (siehe Abb. 30 in der Diskussion) Trotzdem ist belegt, dass FGF–2 von verschiedenen Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert wird[62]. Für diesen Ausschleusungsprozess gibt es unterschiedliche Theorien. Es wird vermutet, dass die Sekretion über den klassischen Sekretionspathway vom Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi–Apparat erfolgt. Der Mechanismus, durch den FGF–2 in den Pathway gelangt, ist unklar. Eventuell bildet es einen Komplex mit einem Vesikelprotein, das zur Exozytose führt[74, 75]. Eine weitere Vorstellung ist, dass intrazellulär Sekretions–Lysosomen gebildet werden, die dann aus der Zelle geschleust werden[75].

Eine dritte Theorie behauptet, dass FGF–2 über die Degranulation der MC freigesetzt wird, denn die Komplexe aus FGF–2 und Heparin und Chondroitinsulfat sind in den Granula lokalisiert[74, 75].
Die Signaltransduktion von FGF–2 erfolgt über Interaktionen mit membranständigen Rezeptoren. Es sind vier Rezeptoren bekannt, an die FGF–2 bindet[76, 77, 78]. Diese sind Tyrosinkinase–abhängige Rezeptoren[63, 77]. Die Bindung von FGF–2 löst intrazellulär eine Signalkaskade aus[62]. MC exprimieren diese Rezeptoren nicht[75].
FGF–2 fördert das Wachstum und die Differenzierung von Endothelzellen, Fibroblasten[79], Chondrozyten und Melanozyten. Damit spielt FGF–2 eine Rolle bei Entzündungen und der Wundheilung durch Organisation des Granulationsgewebes, Chemotaxe von inflammatorischen Zellen und Induktion von Angiogenese[80]. Es blockiert apoptotische Vorgänge an Nervenzellen und hat damit Einfluss auf das Überleben von Zellen[62].
Pathogenetisch wird es mit verschiedenen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Die Polypenbildung in der Nase, eine Bindegewebsproliferation von Nasennebenhöhlen und Conchae nasales, wird durch FGF–2 gefördert[81]. Polypen kommen häufig bei Patienten mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises vor, zum Beispiel mit allergischer Rhinitis. In Biopsien des erkrankten Gewebes ist FGF–2 nachweisbar[81]. Eine weitere erwähnenswerte Erkrankung ist die circumscripte oder systemische Sklerodermie, eine entzündliche Veränderung des gefäßführenden Bindegewebes, die zur Fibrose der Haut führt. Histologisch liegt eine vermehrte Bildung von Kollagen Typ I und III vor. Die rheumatoide Arthritis ist gekennzeichnet durch die Proliferation der Synovia, die zur Zerstörung vom Gelenkknochen und Knorpel führt. FGF–2 ist in der Synovia–Flüssigkeit vorhanden und die MC–Zahl ist im erkrankten Gewebe erhöht. Die Zellen der Synovia binden FGF–2 und proliferieren als Reaktion darauf[82]. Auch hypertrophe Narbenbildung wird mit FGF–2 in Verbindung gebracht[83]. Weiterhin kann beim systemischen Lupus erythematodes das Wachstum von Fibromen durch Antikörper, die gegen FGF–2 gerichtet sind, fast vollständig inhibiert werden[84].
In der Mundschleimhaut ist FGF–2 in der Lamina propria nachweisbar. Es wird dort von Makrophagen, Mastzellen und den meisten Endothelzellen gebildet. Bei der Entstehung einer Epulis granulomatosa ist in Abhängigkeit vom Stadium der Veränderung FGF–2

histologisch nachweisbar. Sowohl zu Beginn als auch im späten Stadium der Tumorentstehung ist nur wenig FGF–2 histologisch nachweisbar. Dagegen wird im Zwischenstadium, welches von der Organisation des Granulationsgewebes und der Neubildung und Proliferation von Kapillaren geprägt ist, deutlich mehr FGF–2 synthetisiert. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die starke Förderung der Angiogenese durch FGF–2[85, 86]. Durch diese angiogenetische Wirkung und seine mitogenen Eigenschaften spielt FGF–2 auch bei der Genese anderer Tumoren und deren Metastasierung eine Rolle, deren Tragweite noch nicht abschätzbar ist[87, 88]. Zur Zeit wird bei in–vivo–Modellen versucht, durch spezifische Antikörper gegen FGF–2 das Wachstum von Tumoren zu verringern. Zudem scheinen auch andere Eigenschaften von FGF–2, beispielsweise die Induktion von Apoptose in Zellen des Ewing Sarkoms, von Bedeutung zu sein[89]. Auch Blutgefäßtumoren wie das Kaposi–Sarkom werden mit FGF–2 assoziiert[90].

1.5 Stimulantien

Um den Einfluß äußerer Faktoren auf die FGF–2 Synthese der MC zu untersuchen wurden die Zellen mit verschieden Substanzen stimuliert. Zu diese Substanzen gehörte das Neurokinin Substanz P, verschiedene Zytokine, der Wachstumsfaktor TGFβ und das Bakterientoxin SEB.

1.5.1 Substanz P (SP)

Substanz P (SP, Neurokinin 1) gehört zu den chemischen Neurotransmittern, deren Erforschung in den 20er Jahren begann. Man entdeckte 1931 im Zusammenhang mit Untersuchungen zu Darmkontraktionen einen aus dem Pferdehirn isolierten Stoff, der die Kontraktion glatter Muskelzellen induzierte. Gaddum und Schild benannten diesen Stoff 1934 als Substanz P[91].
Es handelt sich dabei um ein kurzkettiges (11 AS) Neuropeptid, das neben den Neurokininen A und B zur Familie der Tachykinine gehört[92]. Es wird in Spinalganglien gebildet und gelangt von dort sowohl ins periphere (Sensible C–Fasern) als auch ins zentrale Nervensystem. Daneben wird es von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und Endothelzellen gebildet.
SP ist in der Lage, MC zu aktivieren[93]. Der Rezeptor, über den SP mit MC interagiert, ist wahrscheinlich der NK1–Rezeptor oder der NK2–Rezeptor. Man geht davon aus, dass es sich um einen G–Protein–gekoppelten Rezeptor handelt. Die durch SP hervor gerufenen Effekte scheinen sehr vielfältig zu sein. Lymphozyten werden durch SP zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Bei MC führt die Stimulation mit SP zur Degranulation, wodurch Histamin und andere Mediatoren freigesetzt werden[94, 95]. Auch die Synthese von mRNA für verschiedener Zytokine wurde als eine Folge der Stimulierung beschrieben.

1.5.2 Zytokine

Interleukin 4 (IL–4) gehört zu der Gruppe der Hämatopoetine, dies sind Zytokine, deren Struktur aus vier Helices besteht. IL–4 wird u.a. von T–Zellen, Basophilen und einigen MC Subtypen, beispielsweise den intestinalen MC gebildet. Die Eigenschaft bestimmter MC–Subklassen, IL–4 zu synthetisieren, führte zu einer Einteilung der MC anhand dieses Mediatorgehaltes. Besonders bei Atopikern kann beobachtet werden, dass MC IL–4 beinhalten[18]. Die wichtigste Eigenschaft ist die Induktion der B–Zell–Aktivierung. Nach Antigenkontakt differenzieren B–Zellen unter Einfluss von IL–4 zu Plasmazellen und setzen spezifische Antikörper gegen das Fremdallergen frei[6, 10, 18]. Auch **Interleukin 6** gehört zu der Gruppe der Hämatopoetine. Es fördert das Wachstum und die Differenzierung von T– und B–Zellen. Weiter ist es an der Produktion von Akut–Phase–Proteinen beteiligt, welche bei der ersten Entzündungsabwehr eine Rolle spielen (unspezifische Immunantwort). IL–6 wird u.a. von T–Zellen, B–Zellen, MC, Endothelzellen und Makrophagen synthetisiert[6, 26]. Auch IL–6 wird von MC synthetisiert. Es wird vornehmlich von MC gebildet, die positiv für Tryptase, aber nicht für Chymase sind[16]. **Interleukin 8** gehört zu der Gruppe der Chemokine. Der dazu gehörende Chemokinrezeptor besteht aus sieben Helices, welche die Zellmembran durchqueren. Alle Mitglieder dieser Rezeptoren interagieren mit G–Proteinen. IL–8 wirkt chemotaktisch für neutrophile Granulozyten, die als erste Immunabwehrzellen den Ort einer Entzündung erreichen. Es ist somit maßgeblich für die Aktivierung entzündlicher Prozesse. Es wird u.a. von T–Zellen, NK–Zellen, und Makrophagen, MC gebildet[6, [26].

1.5.3 Transforming Growth Factor β (TGFβ)

Der Transforming Growth Factor β (TGFβ) ist ein Wachstumsfaktor, der keiner Zytokin–Gruppe zugeordnet ist. Strukturell besteht er aus einem homogenen oder heterogenen Trimer. Die Mitglieder der Familie der Transformig Growth Factors sind bekannt für ihre wichtige Rolle beim Gewebeumbau[37]. TGFβ hemmt das Wachstum von Zellen mit epithelialem und neuroektodermalem Ursprung und fördert das Wachstum von Mesen-

chymzellen. Er induziert die Formation von Matrix–Proteinen, zum Beispiel Kollagen Typ I und III[79]. Darüber hinaus wirkt er entzündungshemmend. Knock–out Mäuse, die kein TGFβ bilden können, sterben innerhalb weniger Wochen an tödlichen Entzündungen. Gebildet wird TGFβ u.a. von T–Zellen, Makrophagen und Epithelzellen[6]. TGFβ ist ein wichtiges Zytokin in menschlichen Nieren, da es die Matrixsynthese begünstigt. Der hierbei entscheidende Effekt ist noch nicht entgültig geklärt. Ursächlich könnten Wechselwirkungen zwischen TGFβ und FGF–2 sein. Die Stimulation renaler Fibroblasten mit TGFβ induziert die Hochregulierung der mRNA–Expression von FGF–2[96]. Auch die Freisetzung von FGF–2 ist innerhalb von 3 Stunden nach Stimulation gesteigert, was auf die Freisetzung von gespeichertem FGF–2 hindeutet[79].

1.5.4 Staphyolococcus aureus Enterotoxin B (SEB)

Bei SEB (Staphyolococcus aureus Enterotoxin B) handelt es sich um ein Toxin des Bakteriums Staphyolococcus aureus. Dieses ist ein gram–positives Bakterium, das eine Reihe von Virulenzfaktoren bildet. Zu diesen gehören die sogenannten Enterotoxine A–E, die von etwa 5% der Bakterienstämme gebildet werden können. Da sie sehr hitzestabil sind, spielen sie eine wichtige Rolle bei Lebensmittelvergiftungen.

1.6 Wirkungsmechanismen von UV–Licht

Die Wirkungsmechanismen von UV–Licht auf Zellen sind sehr vielfältig. Neben den therapeutisch gewünschten Effekten könne dosisabhängig Schäden an der Zellmembran, der DNA und an einigen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Die strukturellen Veränderungen an den Zellverbänden sind ähnlich, auch wenn sich die zugrunde liegenden Mechanismen abhängig von der jeweiligen Bestrahlungsart unterscheiden. UVB–Licht kann wegen seiner Wellenlänge direkt von der DNA absorbiert werden und kann sie daher unmittelbar schädigen[97]. Durch UVA_1–Licht Bestrahlung werden reaktive Sauerstoffmoleküle gebildet. Diese verursachen bei der Zelle den sogenannten oxi-

dativen Stress d.h. sie führen zur Oxidation von Membranlipiden, welches den Verlust der Membranintegrität und Membranfunktion zu Folge hat[98]. Weiterhin können die reaktiven Sauerstoffmoleküle die DNA schädigen und dadurch die Replikation unterbrechen.

Eine weitere Bestrahlungsform ist die $PUVA_1$–Therapie. Hierbei wird vor der Bestrahlung mit UVA_1–Licht ein Photosensibilisator, meist 8–Methoxypsoralen (8–MOP) entweder lokal aufgetragen oder oral verabreicht. Dieses führt im wesentlichen zu zwei Effekten: zum einen entstehen Quervernetzungen der DNA Stränge, zum anderen bilden sich aus dem aktivierten 8–MOP und den Pyrimidinbasen der DNA Photoaddukte. Dadurch resultiert eine Hemmung der DNA Synthese und der Zellproliferation[99]. Weiterhin ähneln die Veränderungen denen nach UVA_1–Bestrahlung.

Die aufgeführten Veränderungen betreffen nicht nur MC, sondern auch Monozyten, Keratinozyten, T–Zellen, Langerhanszellen und andere Zellen werden in Ihrer gegenseitigen Interaktion beeinflusst.

2 Zielsetzung

FGF–2 ist ein potenter proliferativer und mitogener Wachstumsfaktor. Er spielt eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, unter anderem bei der Polypenbildung in der Nase, der Sklerodermie und der rheumatischer oder rheumatoider Arthritis. Dies sind Erkrankungen, die durch die pathologischen u.a. von Fibroblasten gekennzeichnet sind. Auch bei physiologischen Abläufen, wie beispielsweise der Wundheilung, ist FGF–2 von Bedeutung. MC sind vermehrt im Gewebe dieser Proliferationsprozesse vorhanden.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der FGF–2–Synthese von MC nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen sowie Untersuchungen zur Sekretion von FGF–2 aus MC und der Sekretionsmodulation durch die Stimulantien und UV–Licht. MC wurden mit verschiedenen Substanzen inkubiert und anschließend die Menge des synthetisierten und freigesetzten FGF–2 ermittelt. Zu diesen Substanzen zählten die klassischen MC–Liberatoren (a–IgE, PMA und Ca–Ionophore), das MC aktivierenden Neurokinin Substanz P und einige proinflammatorische Zytokine (IL–4, IL–6, IL–8 und TGFβ). Für die Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von UV–Licht auf die FGF–2–Sekretion wurden die Zellen mit Licht spezifischer Wellenlängen bestrahlt und anschließend die Freisetzung ermittelt.

Durch die hier gewonnenen Ergebnisse soll der Einfluss äußerer Faktoren auf MC und deren FGF–2 Synthese und Freisetzung gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Tabelle 5: Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
AB Serum	Biotest
Amphotecerin B	Biochrom KG
Basal–Iscove Medium	Biochrom KG
Bovines Serum Albumin	Sigma // Serra
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG
Humanes Serum Albumin	Sigma
L–Glutamin	Biochrom KG
PBS Ca^{2+}/Mg^{2+}	Biochrom KG
PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}	PAA Laboratories GmbH
Toluidinblau (0,1% in 0,5 N HCl–Lösung)	Sigma
Tryptanblaulösung (0,18% in PBS w/o)	Seromed

Tabelle 6: Weitere Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Perchlorsäure ($HCLO_4$)	Merck
Pipes	Sigma
o–Phthaldialdehyd (OPDA)	Sigma
8–Methoxypsoralen (Meladinine 0,3%)	Galderma
Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA) für FGF–2	R&D Systems
Magermilchpulver	Kaisers
Kaisers Glycerine	Merck

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Hersteller
Collagenase Typ I	Worthington Biochemical Corporation
Dispase 1	Roche Molecular Biochemicals
DNase 1	Boeringer Mannheim
Hyaluronidase Type I–S	Sigma

Tabelle 8: Antikörper zur Aufreinigung und Stimulierung der Mastzellen

Antikörper / Stimulans	Hersteller
YB_5B_8 (mouse.IgG_1–anti–human–CD117)	L. Ashman, Adelaide, Australien
Microbeads (goat–anti–mouse IgG)	Miltenyi Biotech
mouse–IgM–anti–human–IgE FC Fragment (anti–IgE)	Calbiochem
Anti–FGF–2	R&D Systems
Ca–Ionophore (23187)	Calbiochem
Interleukin 4	Tebu–Peprotec
Interleukin 6	Tebu–Peprotec
Interleukin 8	Calbiochem
PMA	Sigma
Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)	Sigma
Substanz P	Sigma
Stem Cell Factor (SCF)	Tebu–Peprotec

Die Verbrauchsmaterialien wie zum Beispiel Reaktionsgefäße und Pippetenspitzen stammen von den Firmen Falcon, Eppendorf, Sarstedt und Greiner.

Tabelle 9: Reagenzien für die Polymerase–Kettenreaktion (PCR)

Reagenzien	Hersteller
β–Mercaptoethanol	SIGMA
RNeasy Mini Kit - Buffer RLT Lysis buffer - Buffer RW1 Wash buffer - Buffer RPE Wash buffer - RNeasy mini spin column	QIAGEN GmbH
abs. Ethanol	MERCK
Distilled Water (DNAse–free, RNAse–free)	GIBCO BRL
RNase–Free DNAse Set (50) - RNase–free DNase I - RNase–free DNA Digest Buffer - RNAse–free Water	QIAGEN
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT–PCR - Reaction Buffer (100mM Tris, 500mM KCl) - 25mM $MgCl_2$ - Deoxynucleotide Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; each 10mM) - Oligo–p$(dT)_{15}$Primer - Random Primer p$(dN)_6$ - RNase Inhibitor - AMV Reverse Transcriptase - Control Neo pa RNA - Sterile Water	Roche
PCR Master - Concentrated PCR Master Mix - 25 U Taq DNA polymerase in 20mM	Roche

Tris, 100mM KCl, 3mM $MgCl_2$, dNTP mix - sterile Water	
100bp DNA–Leiter	GIBCO BRL
Glycerol (87%)	MERCK
Bromphenol Blue Na–salt	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co
Agarose ultrapur (Electrophoresis Grade)	GIBCO BRL
Ethidium Bromide Solution	GIBCO BRL

Tabelle 10: Geräte

Gerät	**Hersteller**
Histaminautoanalyser	Borgwaldt Technik
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotech
Metallfilter (300, 70, 40 µm)	Sigma
Neubauer Zählkammer	Neolab
Nylongasefilter (30 µm)	Miltenyi Biotech
Petrischalen	Greiner
UVA_1–Lichtquelle	Konstruiert vom „Krankenhaus Technik Service“ der Charité
UV 800 (UVB–Lichtquelle)	Waldmann
MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories
Microtome	Bright
Gel–Elektrophoresekammer	Bio–Rad Laboratories GmbH

Tabelle 11: Leistungsbereich der UVB– und der UVA_1–Lichtquelle

Bereich		**UVB** (in mJ / cm^2xs)	**UVA_1** (in mJ / cm^2xs)
UVA	315–400 nm	0,6918	0,00538
UVA_1	340–400 nm	0,1734	0,005378
UVB	280–315 nm	0,758	6×10^{-7}
UVC	100–280 nm	0,0051	$3{,}2 \times 10^{-10}$

3.1.1 Puffer

3.1.1.1 Pipes–Stock–Puffer (10x)

- Piperazine–N,N'–bis (2–ethanesulfonic–acid)
- 69,3 g NaCl (1,19 M), 76 g Pipes (Na–Salz) (250 mM) und 3,85 g KCl (49,98 mM) mit aqua dest. ad 1000 ml
- pH–Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt

3.1.1.2 Pipes–Albumin–Glukose + Calcium + Magnesium (PAG–CM)

- Pipes–Stock–Puffer (10x) mit Aqua dest. 1 :10 verdünnt
- 0,003% Humanes Serumalbumin
- 0,1% Glucose
- 3 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$

3.1.1.3 MACS–Puffer

- PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}
- 0,5% Bovine Serum Albumin
- 2 mM EDTA

3.1.1.4 RLT–Puffer

- 1 ml RLT Buffer
- 10 µl β–Mercaptoethanol

3.1.2 Medien

3.1.2.1 24 h–Medium für die Mastzellkultur

- Basal–Iscove–Medium (500 ml)
- 10% FCS (hitze–inaktiviert)
- 1% Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B (1,25 mg)
- 4 mM L–Glutamin
- α–Monothioglycerol (10 µl)
- 3 mM Ca^{2+} (750 µl 1M $CaCl_2$)
- 1,5 mM Mg^{2+} (1100 µl 1M $MgCl_2$)

3.1.2.2 Stimulationsmedium

- Basal–Iscove–Medium (500 ml)
- 0,1 % BSA (0,5 g)
- 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5 µg Amphotericin B (1,25 mg)
- 4 mM L–Glutamin
- α–Monothioglycerol (10 µl)
- 2,8 mM Ca^{2+} (660 µl 1M $CaCl_2$)
- 1,3 mM Mg^{2+}(200 µl 1M $MgCl_2$)

3.1.2.3 Transportmedium

- Basal–Iscove–Medium (500 ml)
- 1 % FCS hitze–inaktiviert
- 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5 µg Amphotecerin B (1,25 mg)

3.1.2.4 Dispergiermedium

- 500 ml PBS
- 1 % FCS hitze–inaktiviert
- 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5 µg Amphotecerin B (1,25 mg)
- 5 mM $MgSO_4$ (2,5 ml 1M $MgSO_4$)

3.2 Methoden

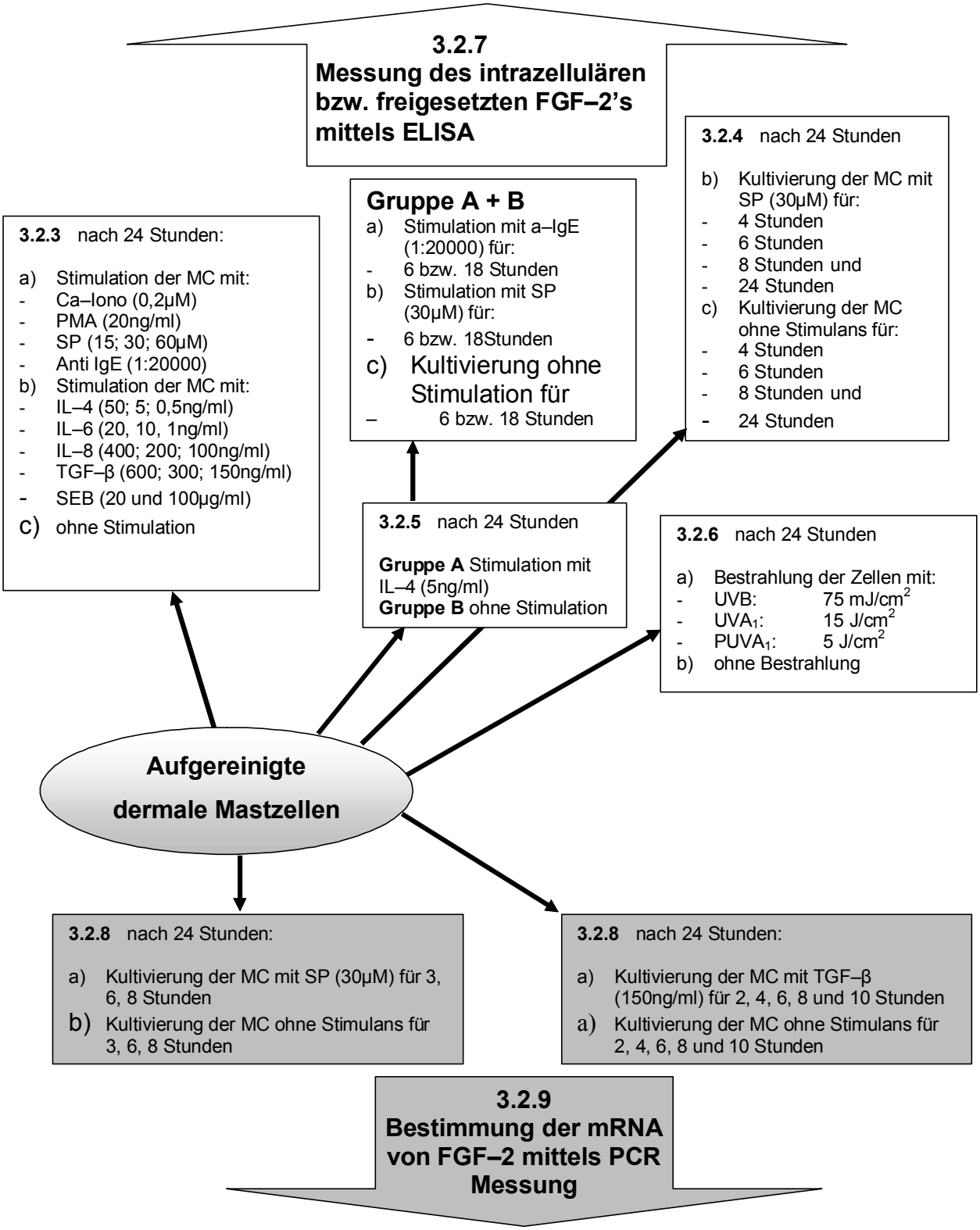


Abbildung 1: Zusammenfassung der verwendeten Methoden

3.2.1 Die Isolierung der Mastzellen

Die in den Versuchen verwendeten MC wurden aus der Dermis menschlicher Haut gewonnen. Diese Hautpräparate stammten in erster Linie von Mammareduktionsplastiken. Bei einigen Versuchen wurde auch Vorhaut verwendet. Die Isolierung der Mastzellen dauerte insgesamt drei Tage und ist im Folgenden dargestellt. Alle Verbrauchsmaterialien wie beispielsweise Falcons und Petrischalen waren vor Gebrauch steril verpackt. Arbeitsgeräte wie Pinzetten und Scheren wurden über Nacht hitzesterilisiert. Siebe, Gläser, Pipettenspitzen u.ä. wurden im Autoklaven sterilisiert.

3.2.1.1 Schneiden der Haut

Die Haut wurde in den kooperierenden Kliniken entnommen und am selben Tag in einem Transportmedium (siehe Medien) in das Labor gebracht. Dann wurde sie in kleine, etwa 1mm breite Streifen geschnitten. Diese wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in Dispase (0,5 g Dispase/ 1 ml PBS) eingelegt. Dadurch löste sich die Basalmembran zwischen Dermis und Epidermis. Die Epidermis wurde am Folgetag mechanisch von der Dermis getrennt. Das war notwendig, weil die MC später über den von MC exprimierte Rezeptor CD117 (c–Kit) aufgereinigt wurden. Dieser Oberflächenmarker ist auch bei Melanozyten vorhanden, welche ausschließlich in der Epidermis vorkommen und durch dieses Vorgehen eliminiert wurden.

3.2.1.2 Dispergieren der Haut

Zuerst wurde die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis gezupft. Die Dermis wurde dann mit einer Schere gründlich zerkleinert und anschließend in eine Flasche mit Dispergiermedium gegeben. Dann wurde das Gewebe in einem Schüttelwasserbad bei 37°C dispergiert. Durch die Enzymlösung lösten sich die Zellen aus dem Gewebeverband. Nach etwa einer Stunde wurde der Flascheninhalt durch zwei Siebe filtriert (200µm und 40µm). Die bis dahin aus dem Gewebeverband gelösten Zellen befanden

sich nun in der Flüssigkeit und konnten durch zentrifugieren von dieser getrennt werden. Während die Enzymlösung zusammen mit der restlichen Haut zurück ins Wasserbad kam, erfolgte die Weiterverarbeitung der schon gewonnenen Zellen. Die Zellen wurden insgesamt dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Erythrozyten durch eine hypotonen Schock mit 0,2% NaCl–Lösung lysiert, mit anschließender Wiederherstellung der Isotonie durch Zugabe von 1,6% NaCl. Anschließend wurden die Zellen mit Toluidin und Tryptanblau angefärbt. Die basophilen Granula der MC färben sich mit Toluidinblau lila/violett so dass identifiziert und gezählt werden konnten. Mit Trypanblau wurde eine Vitalitätsfärbung gemacht, so konnte die Zahl der toten Zellen und die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Über Nacht wurden ca. $5x10^7$ Gesamtzellen in 50ml 24h–Medium im Brutschrank kultiviert . Nach weiteren 1,5 Stunden im Wasserbad wurde mit dem noch im Schüttelwasserbad befindlichen Rest der Dermis gleichermaßen verfahren.

3.2.1.3 Aufreinigung der Mastzellen

Am dritten Tag erfolgt die Aufreinigung der MC über den o.g. Rezeptor CD117. Die Zellen wurden möglichst gründlich aus den Kulturflaschen gespült und mit kaltem MACS–Puffer zweimal gewaschen. Nach erneuter Bestimmung der Gesamtzellzahl folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper YB_5B_8. Die Menge der verwendeten Lösungen richtete sich nach der Gesamtzellzahl. Die Inkubation fand bei 4°C im Kühlschrank statt. YB_5B_8 ist ein monoklonaler Mouse–Antikörper, welcher spezifisch an den von MC exprimierten Rezeptor CD117 bindet. Nach 20 bis 30 Minuten wurden die Zellen gewaschen, worauf die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte. Hierbei handelte es sich um einen an magnetische Beads gekoppelten Goat–Anti–Mouse–Antikörper, der an den Primärantikörper bindet. So war es möglich, die Zellen in MACS–Trennsäulen, die sich in einem magnetischen Feld befinden, abzufangen und diese nach dem Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld zu eluieren. Mit diesem Verfahren wurde eine Reinheit von 80–95% erreicht, die Ausbeute betrug 50–60%.

3.2.2 Histaminfreisetzung mit Histamin–Analyser

Um die gleichbleibende Reaktionsfähigkeit der MC zu kontrollieren, wurde stichprobenartig die spontane und stimulierte Histaminfreisetzung der MC gemessen. Ein Teil der Zellen wurde gewaschen, in 1800µl PAG–CM Puffer resuspensiert und in folgende Ansätze geteilt:

Tabelle 12: Versuchsaufbau Histaminfreisetzung

Zellzahl	Stimulans	Messung
(1) 6x 10^4 MC	+ 200µl Perchlorsäure	Gesamthistamingehalt
(2) 4x 10^4 MC	+ 200µl PAG–CM–Puffer	Spontane Histaminfreisetzung
(3) 4x 10^4 MC	+ 200µl anti–IgE	Histaminfreisetzung nach a–IgE–Stimulation
(4) 4x 10^4 MC	+ 200µl 30µM SP	Histaminfreisetzung nach SP Stimulation

Die Ansätze wurden anschließend im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 600µl kaltem PAG–CM gestoppt. Danach wurden die Zellen vom Überstand durch zentrifugieren getrennt. Das Histamin im Überstand konnte mit dem Analyser gemessen werden. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen verwendet, die ein normales Verhalten hinsichtlich ihrer Histaminfreisetzung zeigten.

3.2.3 Die Stimulierung der MC mit klassischen MC–Liberatoren und proinflamatorischen Zytokinen

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Synthese und die Freisetzung von FGF–2 zu untersuchen, wurden Stimulationen der aufgereinigte MC mit verschiedenen Substanzen durchgeführt. Die MC wurden nach der Aufreinigung in einem speziellen Stimulationsmedium für eine Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Zellzahl neu bestimmt und die Zellen in frischem Stimulationsmedium aufgenom-

men. Die Zellmenge wurde auf $1x10^6$ MC/ml Medium eingestellt. Die Mindestreinheit der MC für Stimulationsversuche betrug 90%. Die Stimulation der Zellen erfolgte auf einer 96–well Platte. Es wurden Dublikatansätze mit je 200µl gebildet, die mit der entsprechenden Substanz inkubiert wurden. Für die Stimulation wurden folgende Substanzen gewählt:

3.2.3.1 Stimulation mit klassischen MC–Liberatoren und Substanz P:

- Ca–Iono (A23187, Calcium–Ionophore): Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, welches in der Konzentration von 0,2µM verwendet wurde. Eine beschriebene Wirkungsweise von Ca–Iono ist die Induktion der MC–Degranulation
- Phorbol–12–Myristat–13–Azetat (PMA): PMA ist ein Wirkstoff der die Synthese verschiedenster Proteine in Zellen induziert. Es wurde in der Konzentration 20ng/ml verwendet.
- anti–IgE: Dies ist ein physiologischer Botenstoff, der zum sogenannten Crosslinking des FcεRI Rezeptors auf der MC–Oberfläche führt und damit die Degranulation der MC einleitet. In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration zur Stimulation austitriert (1:20 000).
- Substanz P: es handelt sich um ein Neurokinin, dass zur Degranulierung von MC führt. Die Stimulation mit Substanz P erfolgte in den Konzentrationen 15, 30 und 60µM.

3.2.3.2 Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und SEB:

Als proinflammatorische Zytokine wurden IL–4, IL–6, IL–8 und der Wachstumsfaktor TGFβ verwendet. Dies sind proinflamatorische Zytokine, die gewählt wurden, da sie beim Ablauf von Wundheilung und Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Mit diesen Substanzen erfolgten getrennte Stimulationen. Die biologische Aktivität von IL–4 liegt zwischen 0,05–2ng/ml. Die Stimulationen in diesen Versuchen erfolgten bei 0,5, 5 und 50ng/ml. IL–6 wurde in Verdünnungen von 1, 10 und 20ng/ml verwendet. Die biolo-

gische Aktivität liegt bei 0,2–8ng/ml. IL–8 hat seine biologische Aktivität bei 0,15–3ng/ml und wurde in den Konzentrationen 100, 200 und 400ng/ml. Und TGFβ wurde in Konzentrationen von 150, 300 und 600pg/ml verwendet, wobei die biologische Aktivität mit 20–600pg/ml angegeben wird. Als letztes wurde mit SEB, einem Bakterientoxin vom Staphylococcus aureus stimuliert. Hier wurden die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen von 20µg/ml und 100µg/ml verwendet.
Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Simulantien inkubiert und während dieser Zeit im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Überstände abzentrifugiert, und im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Zellen wurden in 100µl 2% Triton–Puffer lysiert. Die Pellets und Überstände wurden in Aliquots zu je 110µl bei –80°C gelagert. In den Überständen und den Pellets wurde die vorhandene Menge FGF–2 mit der ELISA–Technik ermittelt.

3.2.4 Die Stimulierung der MC für die PCR

Für die Versuche, bei denen m–RNA gewonnen wurde, wurden besonders reine MC–Fraktionen verwendet. Die Mindestreinheit betrug hierbei 95%. Die Zellen wurden mit SP (30µM) bzw. TGFβ (150pg/ml) stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, in RLT–Puffer lysiert und bis Weiterverwendung eingefroren. Zusätzlich wurde jeweils eine nicht–stimulierte Kontrollprobe entnommen. Die Zeitdauer der Stimulation betrug bei SP 3, 6 und 8 Stunden, bei TGFβ 2, 4, 6, 8 und 10 Stunden

3.2.5 Zeitkinetik mit Substanz P

Um den zeitlichen Verlauf der FGF–2 Freisetzung zu beurteilen wurden Zeitkinetiken durchgeführt. Es wurde jeweils einer mit SP (30µM) stimulierten MC–Probe eine nicht stimulierte Kontrollprobe gegenübergestellt. Die Inkubation erfolgte zu gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 3.2.3. Die Zellen wurden nach Zugabe von SP 30µM im Brutschrank kultiviert und nach 0, 4, 6, 8 und 24 Stunden geerntet. Das nach dieser Zeitdauer freigesetzte FGF–2 wurde durch die Analyse der Überstände durch ELISA ermittelt.

3.2.6 Präinkubation mit Interleukin 4

In diesem Versuch sollte der Einfluß einer Präinkubation mit IL–4 auf die FGF–2–Synthese und –Freisetzung von MC untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Ein Teil der MC wurde zu Versuchsbeginn mit IL–4 (Gruppe B) präinkubiert, die Kontrollgruppe (Gruppe A) dagegen nicht. Diese beiden Gruppen wurden später zu bestimmten Zeitpunkten (nach 6 bzw. 18 Stunden) mit a–IgE bzw. SP(30µg/ml) inkubiert. So ergeben sich verschiedene Versuchsansätze die in der Abb. 3 dargestellt werden.

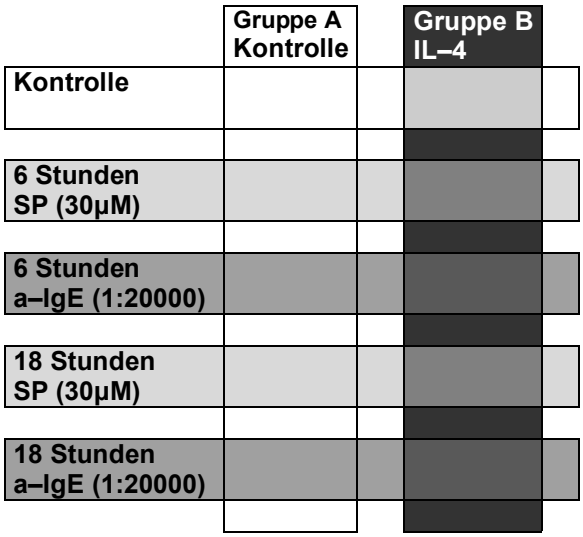


Abbildung 2: Versuchsansätze für den Versuch 3.2.5

Die Gesamtdauer des Versuches betrug 24 Stunden. Nach diesem Zeitraum wurden die Überstände abgenommen und Ihr Gehalt an FGF–2 ermittelt. Hierfür wurde der in den Abschnitt 3.2.7 beschriebene ELISA verwendet.

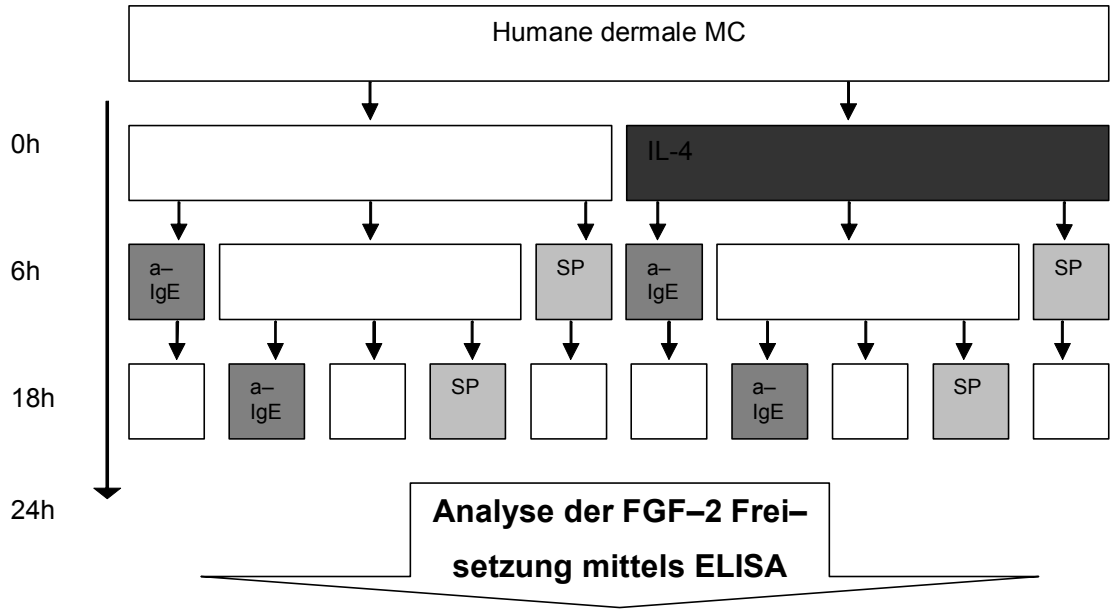


Abbildung 3: Darstellung des Versuchsablaufes von Versuch 3.2.5. Links befindet sich eine Skala, die den zeitlichen Ablauf des Versuchs darstellt, die nicht farbig unterlegten Felder zeigen Proben, denen zum gezeigten Zeitpunkt keine weiteren Zusätze hinzugefügt wurden. In die anderen Feldern ist das zugegebene Reagenz eingetragen, nach insgesamt 24 Stunden wurden die Proben analysiert.

3.2.7 Bestrahlung der MC mit UVB, UVA_1 und $PUVA_1$

Für die Bestrahlung wurden $3x10^5$ MC in 600µl Stimulationsmedium aufgenommen. Diese MC wurden in offenen Petrischale unter die entsprechenden Lichtquellen gestellt. Die Lichtquelle für die UVB–Bestrahlung stammt von der Firma Waldmann, Villingen–Schwenningen (Typ UV 800) und ist mit 10 Leuchtstoff–Röhren Typ TL12 ausgestattet. Die UVA_1–Bestrahlung erfolgte mit einer Lichtquelle die vom Technik–Service der Klinik hergestellt wurde. Sie ist mit einer UVA_1 Leuchtstoff–Röhre (Typ TL–10) der Firma Philips Beleuchtung, Hamburg ausgerüstet. Die Bestrahlungsdosis betrug für UVB: 75 mJ /cm^2 (entspricht 99s Bestrahlungsdauer), für UVA_1: 15 J/cm^2 (entspricht 46min und 30s Bestrahlungsdauer) und für $PUVA_1$: 5 J/cm^2 (entspricht 15min und 30s Bestrahlungsdauer). Der Abstand zur Bestrahlungsquelle betrug bei der UVB–Bestrahlung 50cm, bei der UVA_1–und $PUVA_1$–Bestrahlung 5cm. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde in den Überstände mittels ELISA–Technik der FGF–2 Gehalt bestimmt.

3.2.8 Enzymimmunoassay (ELISA)

Das Protein FGF–2 wurde in dieser Arbeit mit Immunoassays der Firma R&D Systems nachgewiesen und quantitativ bestimmt. Dieser ELISA funktioniert nach der herkömmlichen Sandwich Enzym Immunoassay Technik.

- 100µl der Reaktionsflüssigkeit und 100µl der Analyseproben bzw. der Standardproben wurden auf die im ELISA–Kit vorhandenen 96–well–Platte wie in der Anleitung beschrieben verteilt. Die nachzuweisende Substanz (in diesem Fall FGF–2) wird durch einen Antikörper gebunden, der am Boden der wells fixiert ist. Um bei der späteren Analyse eine genaue Zuordnung der Messwerte zu ermöglichen wird dieser Arbeitschritt durch ein sogenanntes Pipettierschema protokolliert.
- Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden werden die Proben wieder aus den wells entfernt und die Platte mit dem im Kit enthaltenen Wasch–Puffer gewaschen. Anschließend werden 200µl einer weitere Reaktionsflüssigkeit auf der Platte verteilt. Diese enthält einen zweiten spezifischer Antikörper gegen FGF–2, der mit einem Enzym markiert ist. Es folgt eine nächste Inkubationsperiode von 2 Stunden.
- Nach erneutem Waschen werden 200µl eines farblosen Substrates zugegeben, welches von dem gebundenen Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Reaktion wird nach 30min durch Zugabe von 50µl Säure (pH–Wert Verschiebung) abgebrochen. Je größer die Menge an Enzym, desto stärker wird die Lösung eingefärbt.
- Im Photometer (MRX Microplate Reader/Dynatech Laboratories) wird anschließend die optische Dichte der Lösung ermittelt. Die Quantifizierung erfolgt durch den Vergleich mit einer Standardreihe.

Die Standardreihe des ELISA's der Firma R&D Systems besteht aus Proben mit einem FGF–2–Gehalt von 640, 320, 160, 80, 49, 20, 10 und 0pg/ml. Aus diesen Standardproben berechnet der Computer eine Standardkurve, mit der die zu analysierenden Proben verglichen werden.

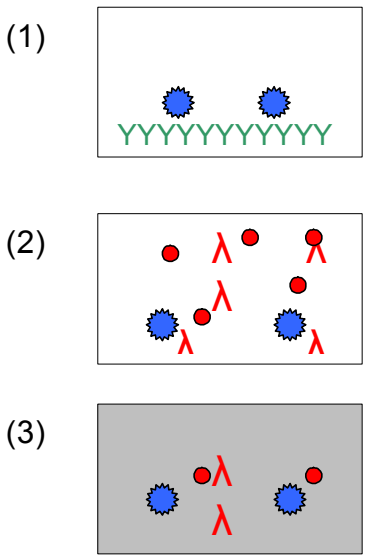


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Enzymimmunoassays
1. Das FGF–2 wird durch die am Boden der wells befindlichen Antikörper gebunden
2. Zugabe der mit dem Enzym markierten Antikörper
3. Darstellung der enzymatischen Farbreaktion nach Zugabe der Reaktionslösung

3.2.9 Semiquantitative Bestimmung von FGF–2 m–RNA durch die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT–PCR)

Die PCR wurde erstmalig 1984/1985 durch Kary B. Mullis, Kalifornien, als Verfahren beschrieben. Sie beruht auf dem helikalen Prinzip der DNA und ermöglicht die Amplifizierung beliebiger DNA–Abschnitte und damit den Nachweis bestimmter Gensequenzen bzw. auch ganzer Gene. Heute ist die RT–PCR das meistverbreitete Verfahren zur Charakterisierung und zum quantitativen Nachweis von mRNA in verschiedenen Proben. Bei einer PCR oder RT–PCR werden selektiv DNA Sequenzen vervielfältigt. Vor der PCR muss die RNA aus dem vorhandenen Zellmaterial gewonnen werden. Zuerst wird die RNA aus den Zellen isoliert, dann von den Resten genomischer DNA gereinigt und abschließend in c–DNA überschrieben.

Im ersten Schritt der PCR wird der DNA–Doppelstrang auf 94°C erhitzt und so in Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). Nach Abkühlung auf 60°C binden an diese Einzelstränge die zugegebenen Primer (= synthetische Oligonukleotide für den Start der PCR) und verhindern damit eine Rückbildung der alten Doppelstrangstruktur. Dieser

Schritt der PCR wird als Annealing bezeichnet. Durch die DNA–Polymerase (Taq–Polymerase aus dem hitzestabilen Bacterium Thermophilus aquaticus) erfolgt nun die Synthese einer Kopie der ursprünglichen DNA-Sequenz vom freien 3`–OH–Ende aus. Im weiteren Verlauf dienen sowohl die ursprüngliche DNA als auch die Kopie DNA als Template (= Matrize zur weiteren Kopie), so dass schließlich durch die Wiederholung obiger Schritte eine exponentielle Vermehrung der ursprünglich vorhandenen DNA-Sequenz erfolgt.

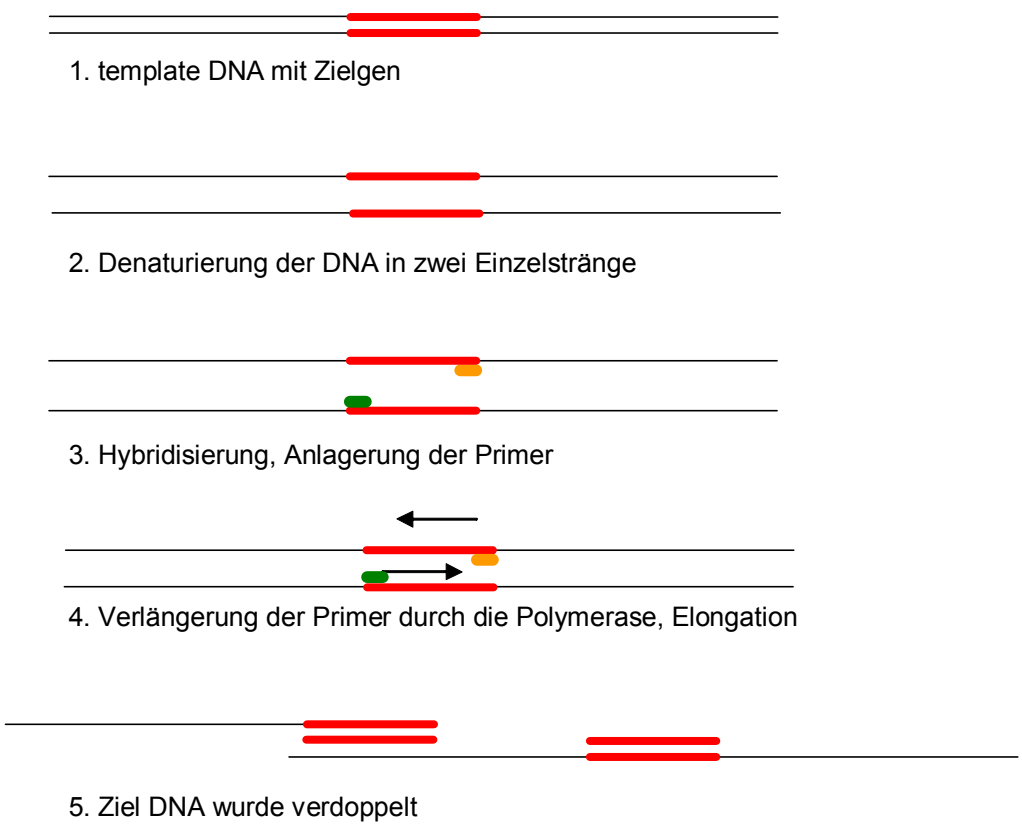


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer PCR

3.2.9.1 RNA–Extraktion / DNase Verdau

Für die RT–PCR wurde zuerst die gesamte RNA der stimulierten und nicht–stimulierten MC extrahiert. Dafür wurde der RNeasy Kit der Firma Quiagen verwendet. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten sofort in 350µl Lysis Puffer aufgenommen und durch Zentrifugation über eine Shreddersäule homogenisiert. Das Homo-

genisat wurde mit 350µl 70% Ethanol versetzt und auf Nucleinsäure bindende spezifischen Säulen beladen. Die Säulen wurden bei 10000 rpm 1 Minute zentrifugiert und mit 700µl RW-Puffer durch kurze Zentrifugation gewaschen. Nach dem ersten Waschvorgang wurden die RNA–Proben auf den Säulen mit 27 Unit DNAse bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Anschließend wieder mit 350µl RW1 Puffer gewaschen. Bei den weiteren Reinigungsschritten wurden die Säulen zweimal mit 500µl RPE Puffer gewaschen. Die Säulen wurden zu Entfernung der Restflüssigkeit 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde aus den Säulen mit 50µl RNAse freien Wasser eluiert. Weitere Reinigung der RNA von der DNAse erfolgte durch eine Phenol–Chloroform-Isoamylalcohol Extraktion der Proben. Die Phenol–Phase wurde durch Zentrifugation der Proben über ein Phase–Lock System von der wässrigen Phase quantitativ getrennt. Anschließend wurde die RNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 3 M K–Acetat und einem Co–präzipitation–System isoliert, nach Waschen mit Ethanol getrocknet und in 30µl Wasser aufgenommen. Gesamtmenge der RNA wurde spektrophotometrisch mit UV–Absorption bei 260 nm bestimmt. Auf einem mit Ethidiumbromid angefärbten 1,5 % ige-Agarosegel wurde die Qualität der RNA untersucht.

3.2.9.2 cDNA Synthese und PCR

Die Transkription der RNA in cDNA wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Fa.Roche) für RT–PCR (AMV) wie folgt durchgeführt:
Es wurde ein Mix aus 2,0µl 10x Reaction Puffer, 4,0µl 25mM MgCl2, 2,0µl Desoxynucleotide–Mix, 2,0µl Random Primer, 1,0µl RNase Inhibitor, 0,8µl Reverse Transkriptase und abhängig von der RNA Konzentration ca. 5µl RNA Proben hergestellt und mit sterilem Wasser auf 20µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden zuerst für 10min bei Raumtemperatur und anschließend für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Während der Inkubation bindet der Primer an das RNA–Template. Die reverse Transkription mit cDNA Bildung findet während der zweiten Inkubation statt. Die Synthese erfolgt an einem Primer in 5´ –3´ Richtung beginnend nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Die Denaturierung der AMV reverse Transkriptase wurde durch Erhitzen der Proben auf 95°C erreicht. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und bis

Weiterverarbeitung bei –30°C aufbewahrt. Die einzelsträngige cDNA wurde mit PCR unter Benutzung von spezifischer Primer amplifiziert. Durch die RT–PCR kann man aus geringen Mengen cDNA eine 106–107 fache Ampflizierung der untersuchten Genes erreichen. Um eine relative Quantifizierung des Transkriptionsproduktes vornehmen zu können, wird von jeder Probe eine PCR mit einem Zielgen durchgeführt, das konstant, das heißt weitgehend unabhängig von äußeren Faktoren exprimiert wird. Diese Gene nennt man Haushalts–Gene (Housekeeping–Gen). In diesen Versuchen wurde mit den Genen GAPDH (Glycerinaldehyd–3–phosphatdehydrogenase) und β–Actin gearbeitet. Amplifiziert wurde das abgeschriebene Produkt durch PCR in einem Endvolumen von 50µl mit einem Master-Mix (Fa. Roche) 25µl und spezifischen Primern 2,5µl für Gene von ß-Actin, GAPDH und FGF–2.

Für die PCR von FGF–2 wurden folgende Primer benutzt:
Forward Primer: 5’ ACG AGT GTG TGC TAA CCG TTA 3, Reverse Primer:5’ GCA GAC ATT GGA AGA AAA AAG 3’: Die Grösse der PCR-Produkte betrug 234 bp

Für die PCR von GAPDH wurden folgende Primer benutzt:
Forward Primer: 5’ GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG 3’; Reverse Primer:5’ GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC 3’: Die Grösse der PCR-Produkte betrug 190 bp

Für die PCR von ß-Aktin wurden folgende Primer benutzt:
Forward Primer: 5’ CCT TCC TGG TGG AGT CTT 3’. Reverse Primer:5’ AAT CTC ATC TTG TTT TCT GCG3’. Die Grösse der PCR-Produkte betrug 400 bp.

Die PCR wurde in einem PCR Gerät der Fa. MWG durchgeführt.
Die PCR von **FGF–2** wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt: 5 min 94°C, 39 Zyklen 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 65°C, 45 sec 72°C, anschließend 10 min bei 72°C.
Die PCR von **GAPDH** wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt: 5 min 94°C, 25 Zyklen 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 58°C, 45 sec 72°C, anschließend 10 min bei 72°C.

Die PCR von **ß-Actin** wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt: 5 min 94°C, 25 Zyklen 45 sec bei 94°C, 45 sec bei 58°C, 45 sec 72°C, anschließend 10 min bei 72°C.

3.2.9.3 Gelelektrophorese und densitometrischen Analyse

Abschließend erfolgt die Auftrennung der PCR–Produkte durch Gel–Elektrophorese. Die DNA–Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer elektrischen Ladung im elektrischen Gleichstromfeld. Dieses kann optisch dargestellt werden, indem dem Elektophorese–Gel Ethidiumbromid (EtBr) zugefügt wird. Dieses Agens lagert sich an die DNA so dass die Banden nach Bestrahlung mit UV–Licht fluoreszieren. Dieses wurde zur Dokumentation photografiert. Für die densitometrische Auswertung wurden die Photos eingescannt und mit einer speziellen Software hinsichtlich Ihrer optischen Dichte ausgewertet. Die DNA–Menge des Zielgens kann anhand der Menge des Housekeeping–Gens in den Proben berechnet werden, indem die Transkriptmenge des Ziel–Gens auf die Transkriptmenge des Haushalts–Gens normiert wird.

3.3 Statistik

Zur Untersuchung der Ergebnisse hinsichtlich ihrer Signifikanz wurde der Wilcoxon–Test angewendet. Dieser Test gehört zu den verteilungsfreien statistischen Testverfahren, die immer dort Anwendung finden, wo Merkmale nicht an das Vorliegen oder Bekanntsein bestimmter Verteilungsformen gebunden sind. Sie implizieren daher weniger oder schwächere Voraussetzungen als die parametrischen Testverfahren.
Der Wilcoxon–Test prüft ob sich zwei abhängige Stichproben in Ihrer zentralen Tendenz unterscheiden. Er legt mögliche Unterschiede zwischen den Stichproben offen, indem er die Richtung des Unterschieds unter Berücksichtigung der Größe des Unterschiedes verwertet. So bilden sich positive, negative bzw. neutrale Ränge. Für eine signifikante Aussage muss eine Versuchshäufigkeit von mindestens n=5 vorliegen.

Ein gängig in der Medizin verwendetes Testverfahren ist der T–Test. Er wird häufig für die statistische Auswertung von Ergebnissen verwendet, die eine Versuchshäufigkeit von n=3 oder n=4 haben. Dieser Test gehört zu den parametrischen Tests, die nur unter speziellen Voraussetzungen gültig und aussagekräftig sind. Zu den Voraussetzung für den T–Test gehört eine Normalverteilung der Messwerte. Diese Voraussetzung ist in dieser Arbeit nicht gegeben, aus diesem Grund wurde auf die Verwendung dieses Testes ganz verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die basale Freisetzung von FGF–2

Die extra– und intrazellulären FGF–2 Werte unterschieden sich in den einzelnen Versuchen stark. Um diese Schwankungen darzustellen, ist hier die basale Freisetzung von FGF–2 in 16 Versuchen dokumentiert. Die FGF–2 Freisetzung liegt zwischen 20 und 2000pg/ml. Vielleicht liegen diese großen Unterschiede darin begründet, das ausschließlich mit humanen isolierten MC gearbeitet wurde. Diese MC reagieren sehr individuell, da sie wie in jedem biologische System natürlichen Schwankungen unterliegen. Die Ergebnisse werden im Weiteren diese Arbeit prozentual dargestellt.

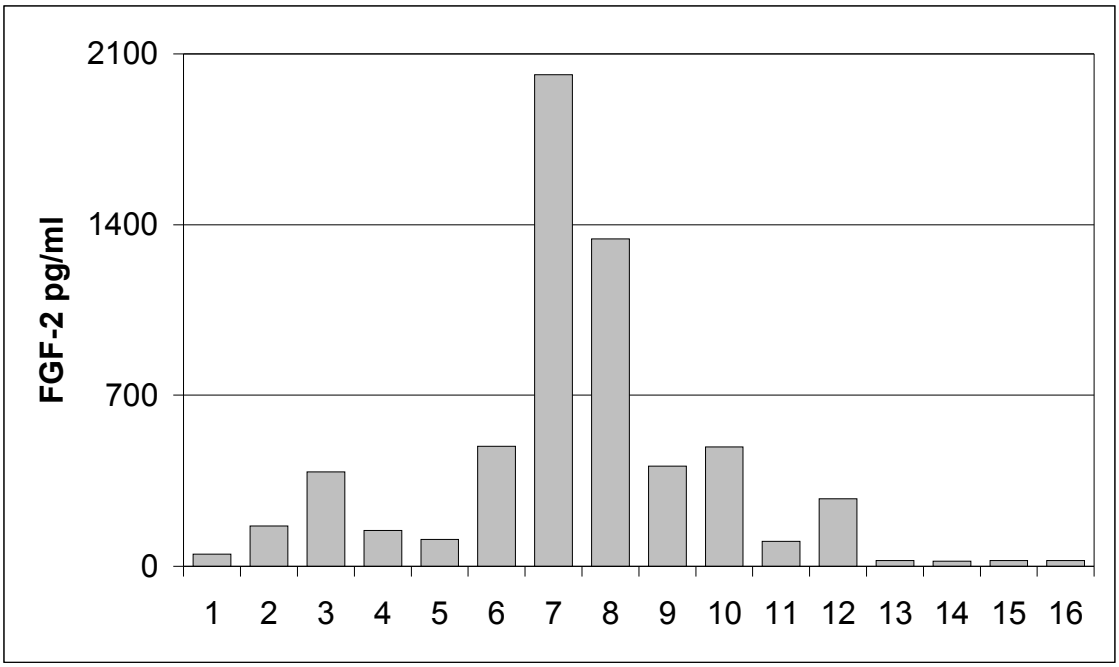


Abbildung 6: Darstellung der basalen Freisetzung von FGF–2 nach 24 Stunden; n=16

4.2 Die FGF–2–Synthese in humanen MC

Um die FGF–2–Synthese von MC zu untersuchen, wurden sie mit verschiedenen Stimulantien inkubiert (Versuchsbeschreibung siehe Abschnitt 3.2.3). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die FGF–2 Menge in den Zelllysaten ermittelt. Zur ersten Gruppe dieser Stimulantien gehören die klassischen MC–Liberatoren, die im Folgenden beschrieben werden. Weiterhin wurden die Zellen mit proinflammatorischen Zytokinen, und mit dem Bakterientoxin SEB stimuliert, um deren Reaktion auf ein verändertes Milieu zu untersuchen

4.2.1 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit klassischen Liberatoren und mit Substanz P

Erste Ergebnisse wurden anhand der Stimulation von MC mit PMA und Ca–Iono gewonnen. Nach Stimulation mit PMA enthielt die Probe 92% FGF–2 verglichen mit der Kontrollprobe. Nach Inkubation mit Ca–Iono stieg der intrazelluläre Gehalt geringfügig auf 105%. Bei der mit beiden Stimulantien inkubierten Probe war dagegen ein auf 85% verringerter Gehalt an FGF–2 feststellbar. Bei der statistischen Überprüfung der Ergebnisse zeigten sich die Unterschiede als nicht signifikant.
Weiter wurden Versuche mit den physiologischen Stimuli a–IgE und SP durchgeführt. Die Stimulierung mit a–IgE hatte einen Anstieg des intrazellulären Gehalts auf 105% zur Folge. Bei SP war bei einer Wirkungskonzentration von 15µM ein Anstieg des Gehalts auf fast 140% zu beobachten, bei 30µM ein Abfall des Gehalts auf 76% ($p<0,15$)und bei 60µM SP wurde genauso viel FGF–2 nachgewiesen, wie in der Kontrollprobe. Es ist keine direkte Dosis–Wirkungskurve ersichtlich, da bei einer Konzentration von 60µM eine mittlere, bei 30µM die kleinste und bei 15µM die größte Menge an FGF–2 zu messen war. Auch hier waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant.

4.2.1.1 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit PMA und Ca–Iono

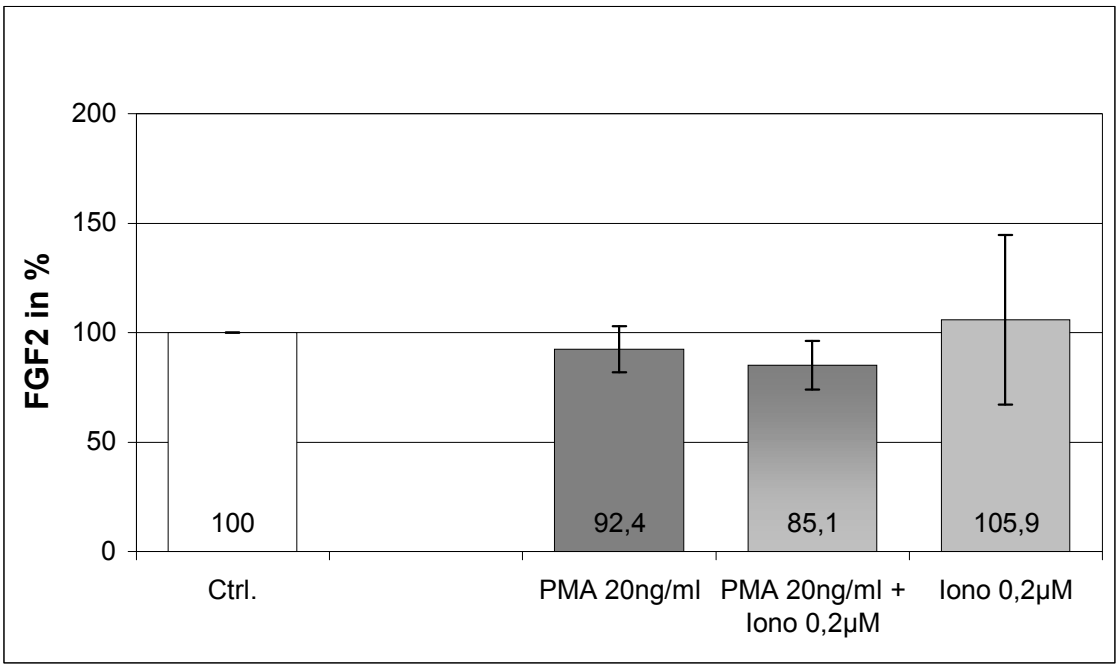


Abbildung 7: Darstellung des FGF–2–Gehalt in den Zelllysaten dermaler MC nach Stimulation mit PMA, PMA + Ca–Iono und Ca–Iono, 24h, n=6, Mittelwert+/- SEM, Ctrl.=100%, die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant

4.2.1.2 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit a–IgE und SP

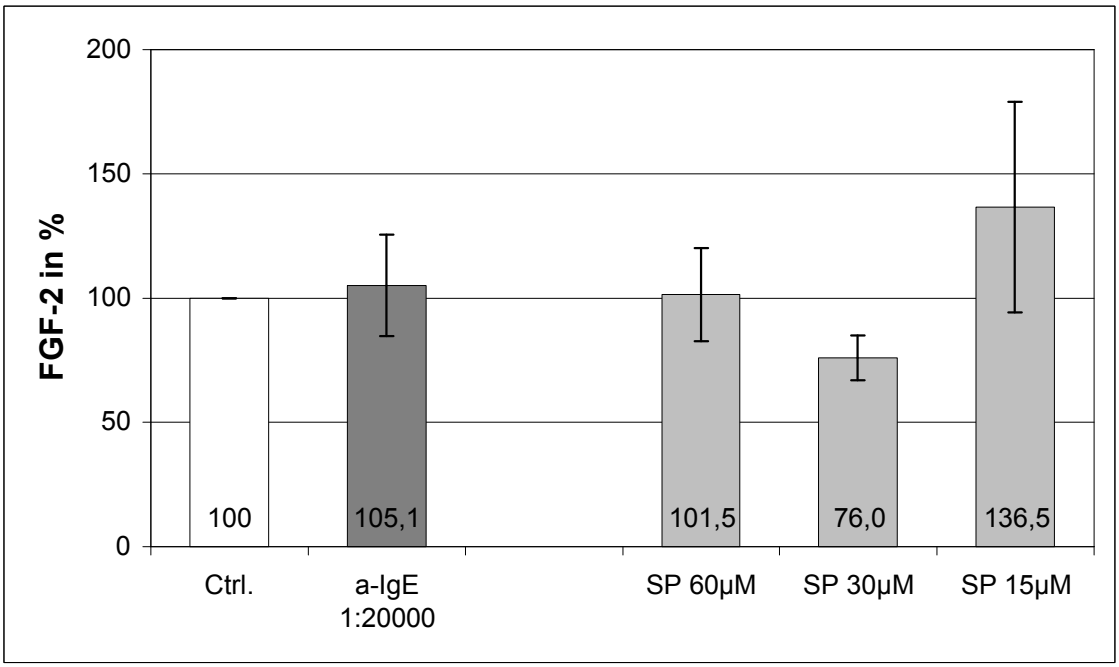


Abbildung 8: Darstellung des FGF–2–Gehalts in den Zelllysaten dermaler MC nach Stimulation mit a–IgE und SP, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant

4.2.2 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und SEB

Weiterhin wurde die Wirkung verschiedener Zytokine auf den intrazellulären FGF–2–Gehalt untersucht. Für die Stimulationen wurde IL–4, IL–6, IL–8 und TGFβ verwendet. Die in diesen Versuchen verwendeten Zytokine wurden zusammenfassend als proinflammatorisch beschrieben, da sie alle bei entzündlichen Veränderungen eine Rolle spielen. So ist IL–6 an der Produktion von Akut–Phase–Proteinen beteiligt und IL–8 chemotaktisch für neutrophile Granulozyten, die als erste Immunabwehrzellen den Ort einer Entzündung erreichen. TGFβ wirkt entzündungshemmend, was durch Versuche mit Knock–out–Mäusen gezeigt wurde.
Die mit Interleukin 4 stimulierten Proben zeigten einen deutlichen Anstieg des FGF–2–Gehalts auf bis zu 208%. Die vorliegenden Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.

4.2.2.1 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit Interleukin 4

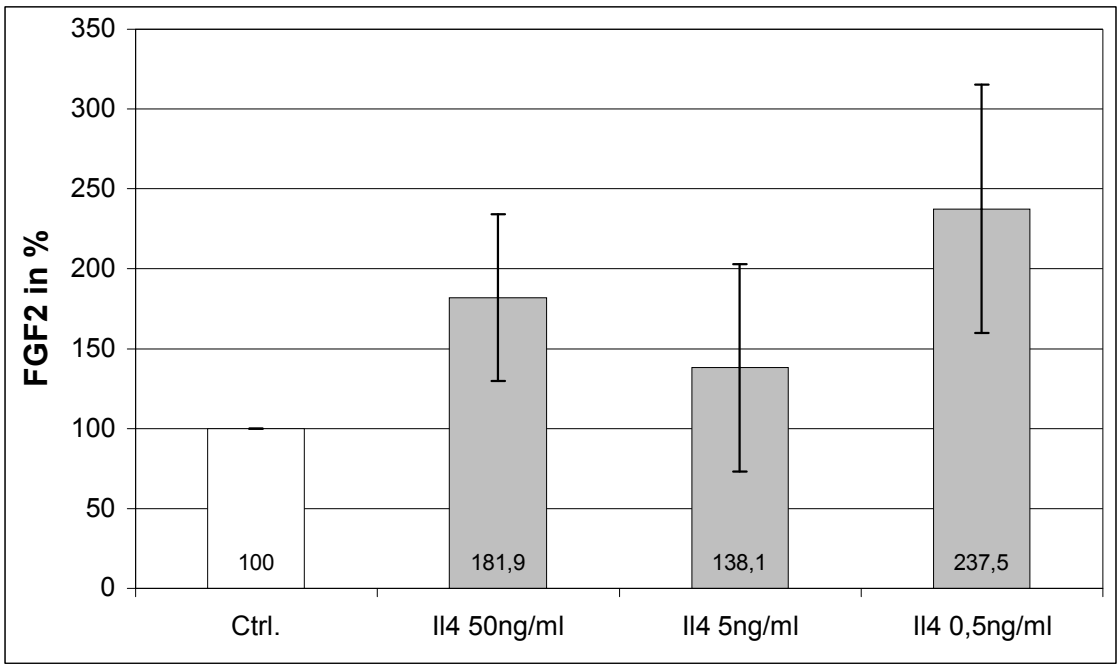


Abbildung 9: Darstellung der Zelllysate nach 24 Stunden Stimulation mit Interleukin 4, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant

Die bei der Stimulation mit Interleukin 6 und Interleukin 8 zu beobachtenden Veränderungen des FGF–2–Gehaltes ähneln denen von Interleukin 4. Nach Stimulation mit Interleukin 6 stieg der FGF–2–Gehalt auf über 200% (IL–620ng/ml = 210%). Bei einer Konzentration von IL–6 von 20ng/ml war der Anstieg des FGF–2 Gehaltes statistisch signifikant. Die mit Interleukin 8 stimulierten Zellen wiesen einen maximalen FGF–2–Gehalt von 190% auf (IL–8 100ng/ml = 190%). Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant, jedoch zeigte die statistische Auswertung für den Anstieg bei IL–8 400ng/ml eine Wahrscheinlichkeit von p<0,15.

4.2.2.2 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit Interleukin 6

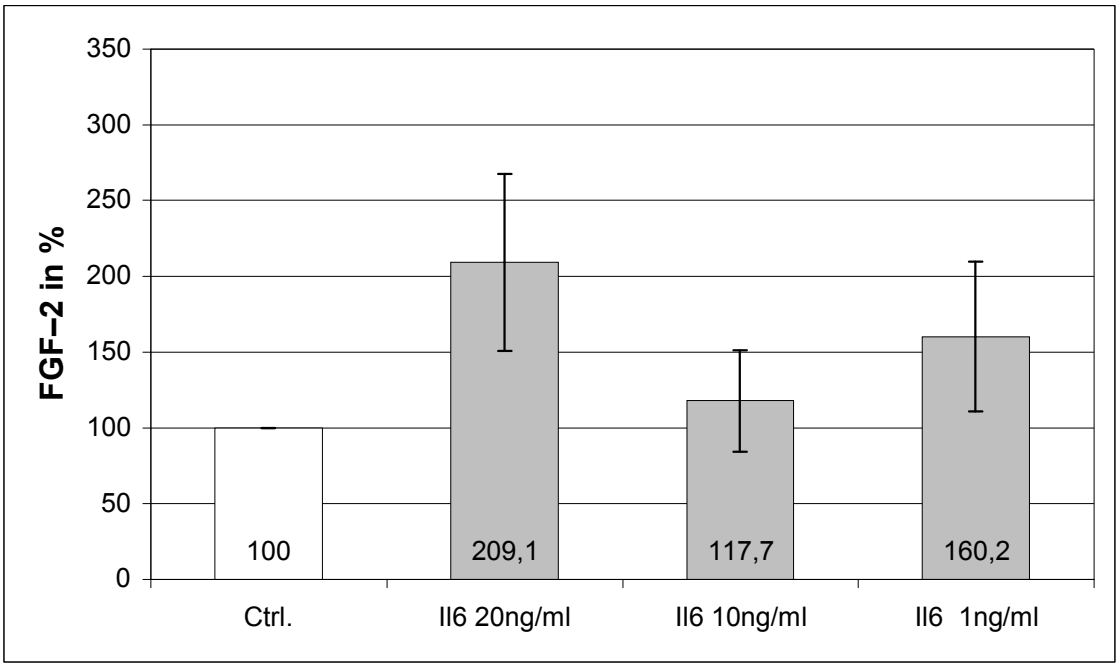


Abbildung 10: Darstellung der Zelllysate nach 24 Stunden Stimulation mit Interleukin 6, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Il6 20ng/ml = p<0,05

Auch in den Zellen, die 24 Stunden mit TGFβ inkubiert wurden, stieg der FGF–2–Gehalt. Eine Wirkungskonzentration von 600pg/ml bewirkte eine Erhöhung des FGF–2–Gehaltes auf 230%. Es zeigt sich eine Dosis–Wirkungskurve, die statistische Wahrscheinlichkeit betrug p<0,15 bei den Konzentrationen von 300pg/ml und 150pg/ml.

4.2.2.3 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit Interleukin 8

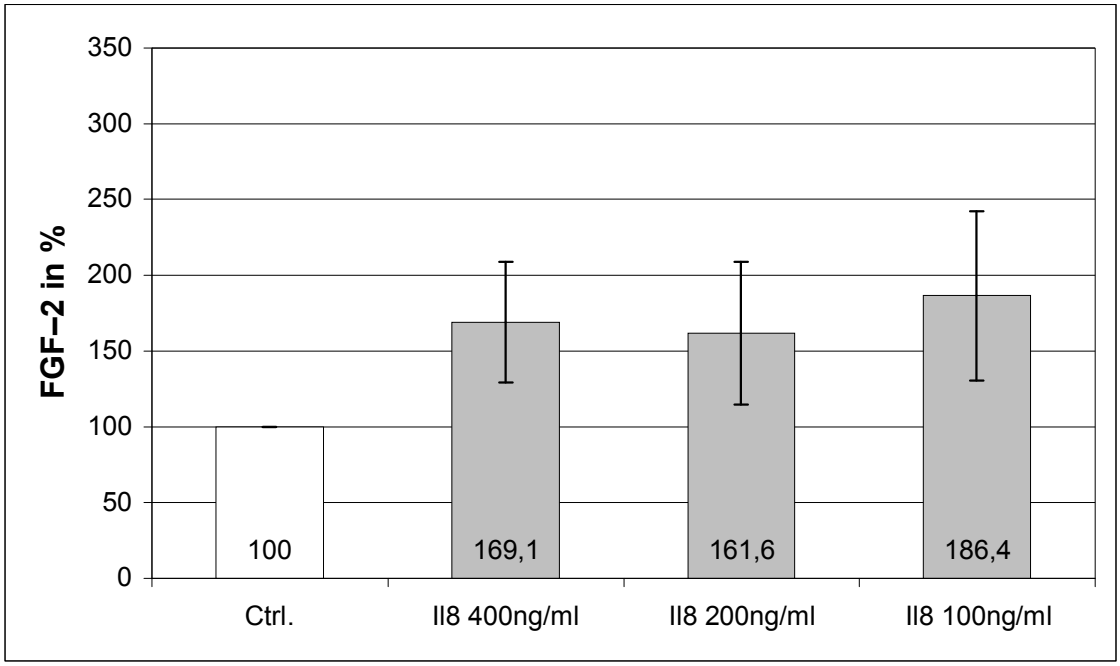


Abbildung 11: Darstellung der Zelllysate nach 24 Stunden Stimulation mit Interleukin 8, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant

4.2.2.4 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit Transforming Growth Factor β

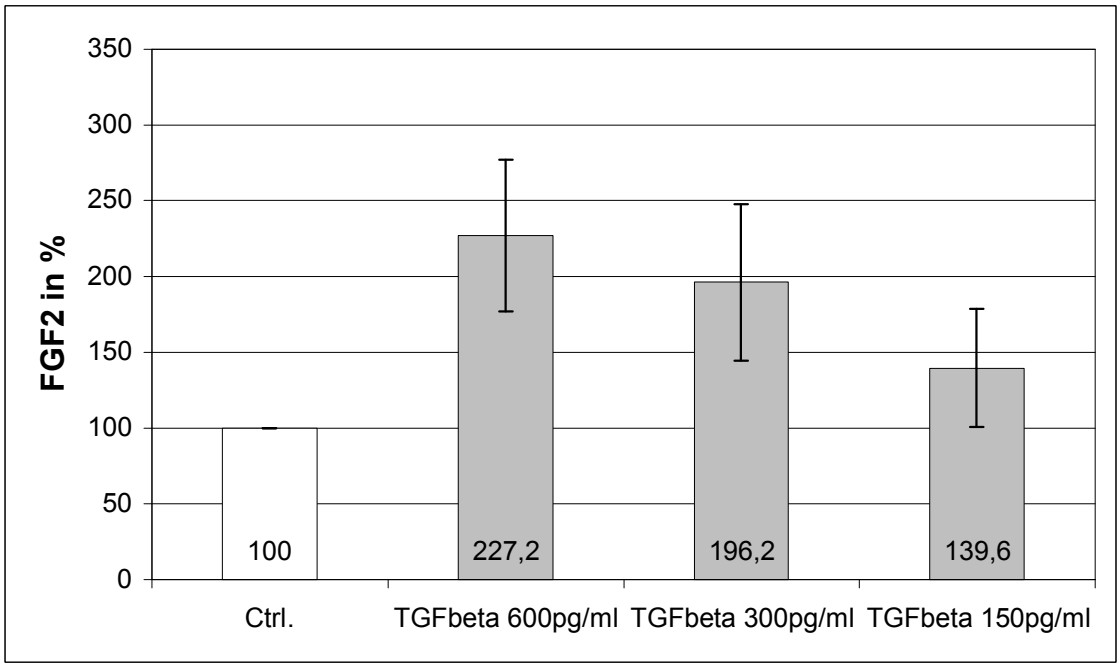


Abbildung 12: Darstellung der Zelllysate nach 24 Stunden Stimulation mit TGFβ, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant

SEB

Als letztes Stimulans wurde der Einfluß von SEB auf MC und deren FGF–2–Gehalt untersucht. Bei SEB (Staphyolococcus aureus Enterotoxin B) handelt es sich um ein Toxin des Staphylococcus aureus. Dies ist ein gram–positives Bakterium, das eine Reihe von Virulenzfaktoren bildet. Zu diesen gehören die sogenannten Enterotoxine A–E, die von etwa 5% der Bakterienstämme gebildet werden können.

Durch die Stimulation mit SEB wurde eine vermehrte FGF–2–Synthese induziert. Bei einer Konzentration des Toxins von 100µg/ml steigerte sich die Synthese auf 170%, bei einer Konzentration des Toxins von 20µg/ml noch auf etwa 110% vom Ausgangswert. Der erhöhte Messwert bei 100µg/ml erwies sich als statistisch signifikant.

4.2.2.5 Der intrazelluläre FGF–2–Gehalt nach Stimulation mit SEB

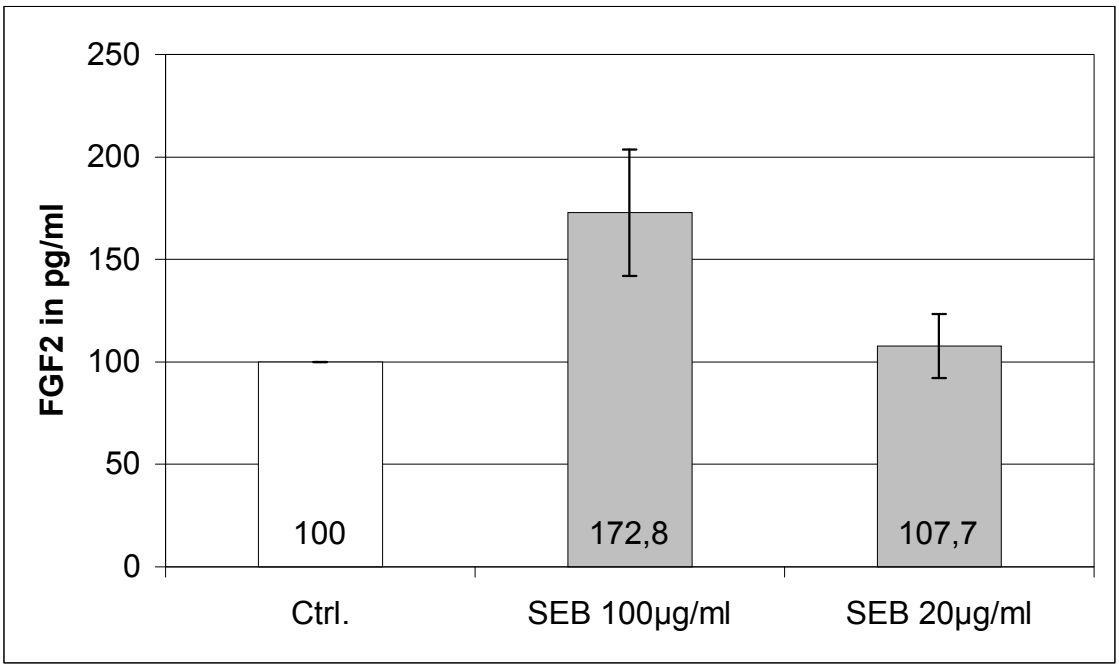


Abbildung 13: Darstellung der Zelllysate nach 24 Stunden Stimulation mit SEB, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, SEB = $p<0,05$

4.2.3 Untersuchungen zur m–RNA Expression von FGF–2

Weiterhin wurde die FGF–2 m–RNA Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit SP 30µM bzw. TGFß 150pg/ml unersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich des DNA–Produktes mit den Housekeeping–Genen GAPDH und ß–Actin.

Die Stimulation mit SP zeigte eine Hochregulation der mRNA–Expression schon nach 3 Stunden; auch nach 6 Stunden war diese noch erhöht. Nach 8 Stunden sank die Expression, es wurde weniger FGF–2 transkribiert als in der unstimulierten Kontrollprobe. Auch in den mit TGFβ inkubierten Proben konnte eine Hochregulierung der FGF–2–Expression beobachtet werden. Die maximale Expressionsrate vollzog sich nach 3–4 Stunden, sank dann langsam wieder und glich nach 10 Stunden wieder der Expressionsrate der Kontrollprobe.

Es handelt sich bei der Darstellung um einen exemplarischen Einzelversuch, aus diesem Grund konnte keine statistische Auswertung erfolgen.

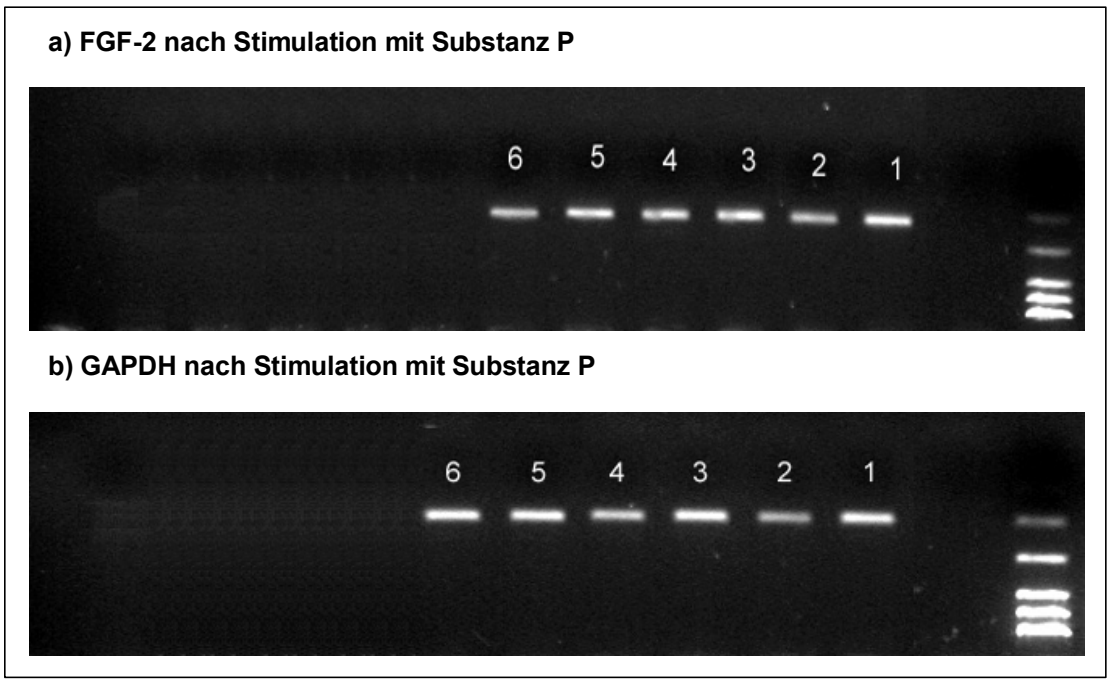


Abbildung 14: PCR nach Stimulation mit SP, Gelelektrophoretische Auftrennung des GAPDH und FGF–2–PCR–Produktes nach Stimulation mit SP (30µM) in einem Agarosegel: 1 Kontrolle nach 3h, 2 SP nach 3h, 3 Kontrolle nach 6h, 4 SP nach 6h, 5 Kontrolle nach 8h, 6 SP nach 8h

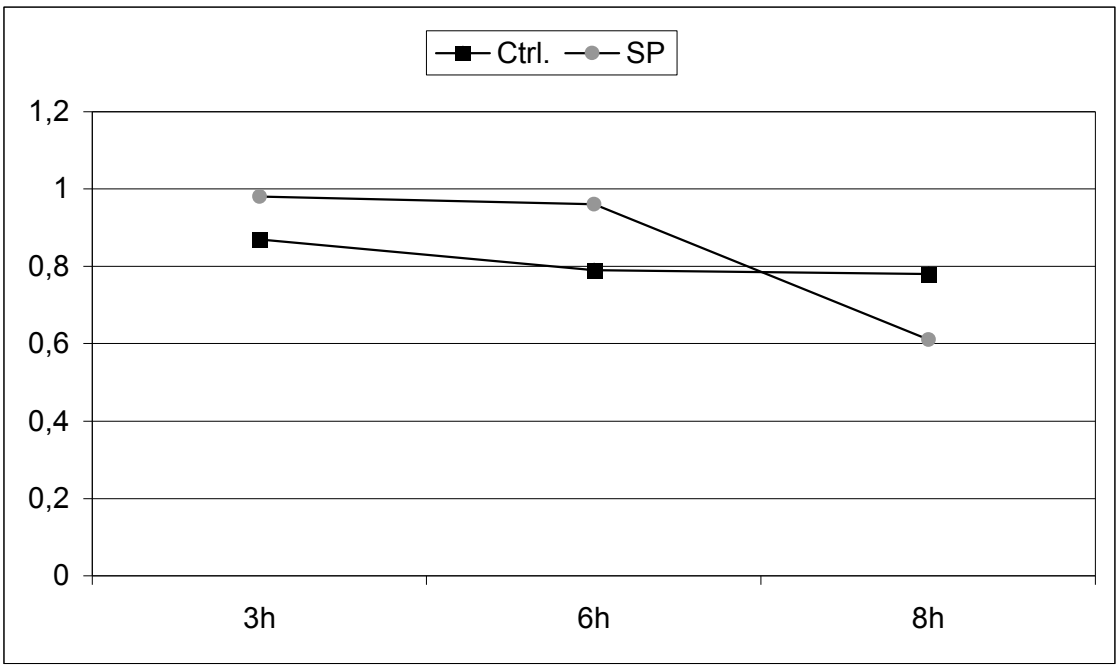


Abbildung 15: Expressionsrate von FGF–2 nach Stimulation mit SP, Darstellung der Expression von FGF–2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit SP (30µM) versus einer unstimulierten Kontrollprobe

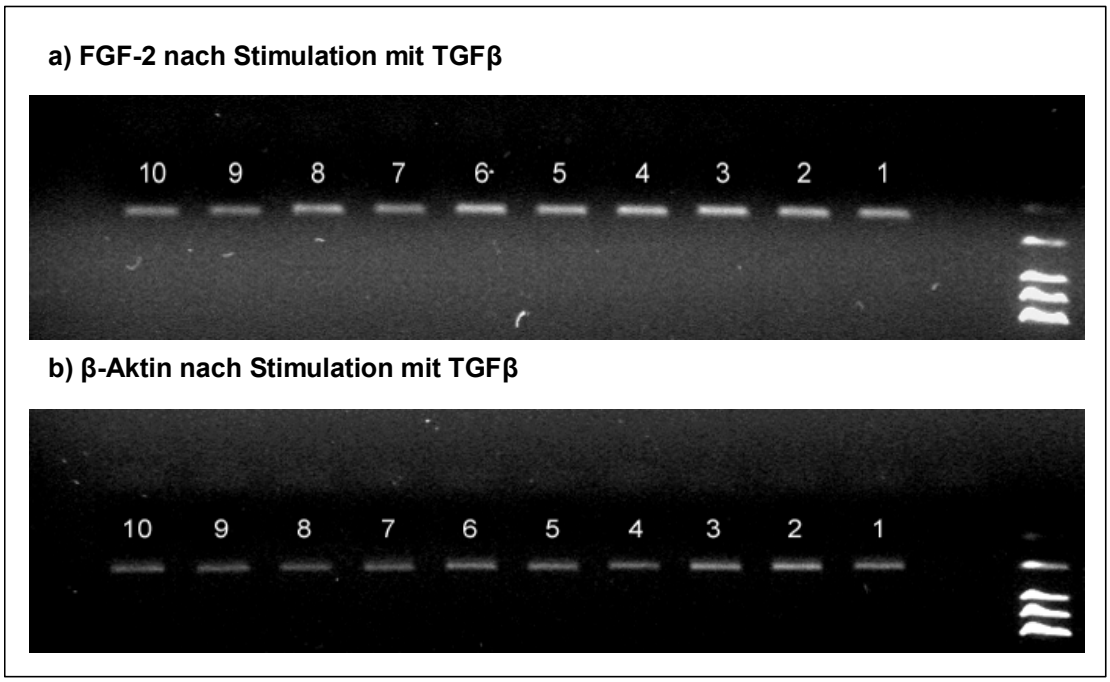


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung des β–Actin und FGF–2–PCR–Produktes nach Stimulation mit TGFβ (150pg/ml) in einem Agarosegel: 1 Kontrolle nach 2h, 2 TGFβ nach 2h, 3 Kontrolle nach 4h, 4 TGFβ nach 4h, 5 Kontrolle nach 6h, 6 TGFβ nach 6h, 7 Kontrolle nach 8h, 8 TGFβ nach 8h, 9 Kontrolle nach 10h, 10 TGFβ nach 10h

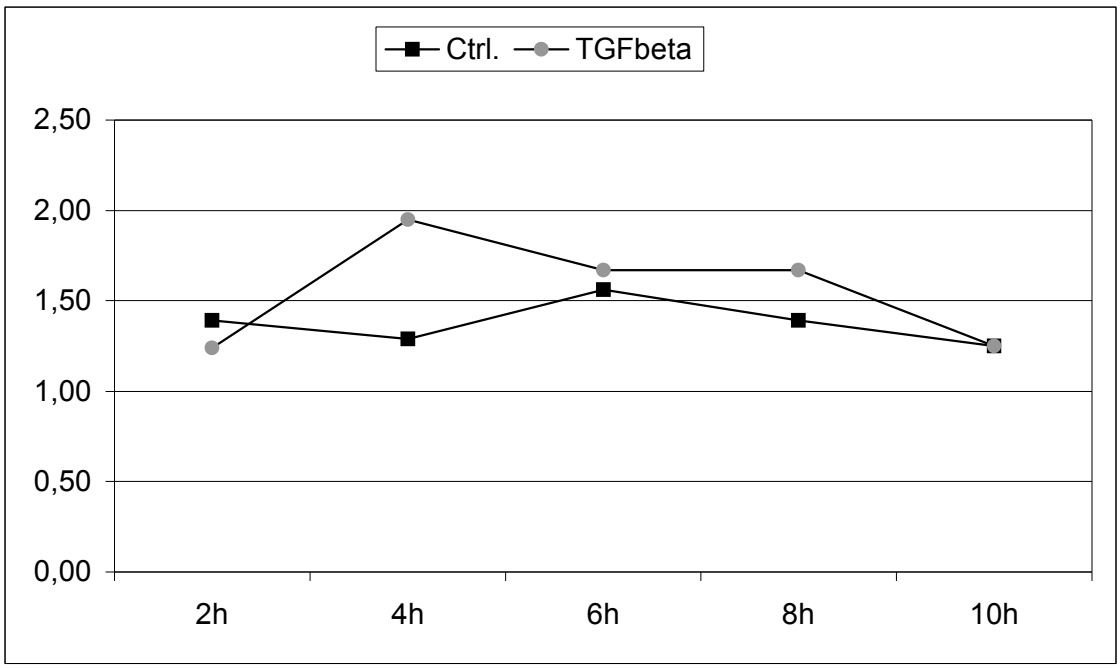


Abbildung 17: Expressionsrate von FGF–2 nach Stimulation mit TGFβ, Darstellung der Expression von FGF–2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit TGFβ (150pg/ml) versus einer unstimulierten Kontrollprobe

4.3 Der Gesamt–FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen

Um die insgesamt von den Zellen synthetisierte bzw. gespeicherte Menge an FGF–2 (Neusynthese, freigesetztes FGF–2 und Basisgehalt) zu ermitteln muss sowohl die in den vorherigen Abschnitten dargestellte intrazelluläre Menge an FGF–2, als auch die von den Zellen freigesetzte FGF–2 Menge betrachtet werden. Die FGF–2 Freisetzung wird im zweiten Teil (Abschnitt 4.4) der Ergebnisse gesondert beschrieben. Verschiedene Substanzen hatten eine Induktion der FGF–2 Synthese zur Folge. Die Stimulierung mit PMA und Iono hatte eine Synthesesteigerung auf 110% zur Folge. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Auch bei der Inkubation mit a–IgE erhöhte sich der Gesamt–FGF–2–Gehalt auf 110%. SP steigerte die FGF–2–Synthese bei einer Wirkungskonzentration von 15µM auf 125%. Jedoch waren diese Unterschiede nicht statistsich signifikant. Auch bei der Stimulierung mit den Zytokinen konnte eine Synthesesteigerung beobachtet werden. So regte auch IL–4 bei einer Konzentration von 50ng/ml die FGF–2 Synthese signifikant an. IL–6 zeigte den stärksten Effekt bei 20ng/ml mit einer Synthesesteigerung auf 113%, wobei die Unterschiede bei der Konzentration von 10ng/ml eine Wahrscheinlichkeit von $p<0,15$ aufwiesen und damit nicht statistisch signiikant waren. SEB zeigte bei einer Konzentration des Toxins von 20µg/ml eine inhibierende Wirkung, welche die Synthese auf 80% senkte. Auch dieses Ergebnis zeigte bei der statistischen Auswertung eine Signifikanz von $p<0,15$. Die Veränderungen sind in Abb.15 zusammengefasst.

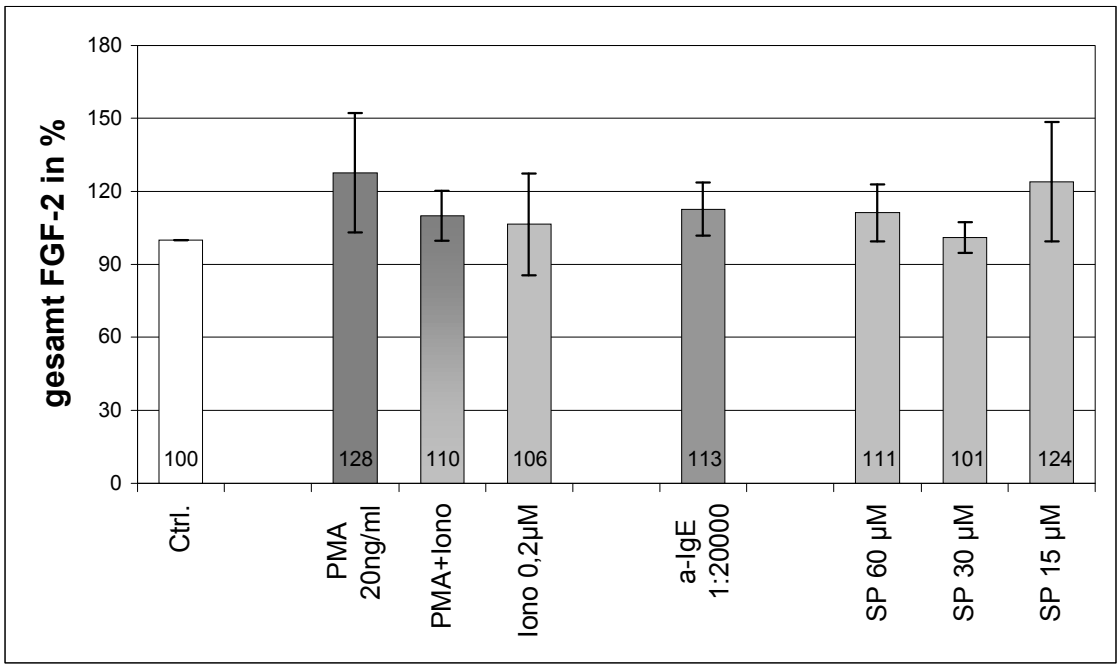


Abbildung 18: Der Gesamt–FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit PMA, Iono, a–IgE und SP, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, PMA+Iono = p<0,05

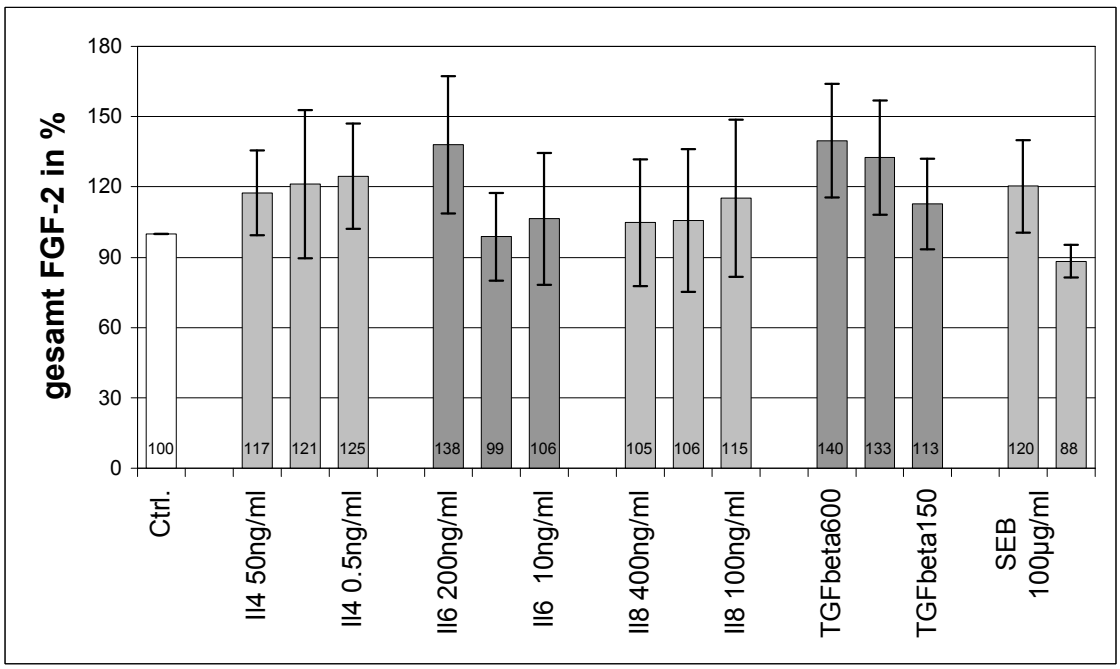


Abbildung 19: Der Gesamt–FGF–2–Gehalt von MC nach Stimulation mit IL–4, IL–6, IL–8, TGFß und SEB, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Il4 0,5 ng/ml = p<0,05

4.4 Die Freisetzung von FGF–2 aus humanen MC

Um zu sehen, wie sich die Freisetzung von FGF–2 unter den gegebenen Versuchsbedingungen entwickelt, wurden anschließend die Überstände der im Teil 4.2.1 und 4.2.2 beschriebenen Stimulationsversuche auf Ihren Gehalt an FGF2 untersucht. Die Versuchbedingungen entsprechen der im Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Versuchsanordnung.

4.4.1 Die Wirkung klassischer MC–Liberatoren und Substanz P auf die FGF–2–Freisetzung

Klassische MC–Liberatoren führen neben anderen Effekten zur Degranulation von MC. Diese Überlegung spielt eine wichtige Rolle bei der Interpretation der Daten. Nach der Inkubation der Zellen mit den unphysiologischen Stimulantien PMA, PMA + Ca–Iono und Ca–Iono war die Freisetzung von FGF–2 in allen drei Ansätzen im Vergleich zur Kontrollprobe erhöht. Die Stimulation mit PMA hatte eine Steigerung der Freisetzung auf 110% zu Folge, der Unterschied erwies sich statistisch als tendenziell signifikant ($p<0,08$), auch bei der Stimulierung mit Ca–Iono steigerte sich diese auf 110%. Die gleichzeitige Inkubierung mit beiden Stimulantien erhöhte die Freisetzung schließlich auf 125% ($p<0,15$). Auch bei den mit a–IgE und SP stimulierten Proben wurde im Überstand mehr FGF–2 gemessen als bei den Kontrollproben. (Abb. 20 und 21) Bei a–IgE betrug die Steigerung auf 115% ($p<0,05$), bei SP war die Wirkung dosisabhängig. Die höchste Freisetzung erfolgte bei einer Konzentration von 30µM mit einem Anstieg auf 125%. Die Konzentrationen von 60 und 15µM bewirkten einen Sekretionsanstieg auf 120%, wobei die Konzentration von 60µM tendenziell eine stärkere Wirkung zeigte. Die Unterschiede waren jedoch ohne statistische Signifikanz.
Die FGF–2–Freisetzung schien durch die Inkubation mit klassischen MC–Liberatoren und Substanz P beeinflusst zu werden, sie wurde gesteigert. Da die Substanzen wie oben erwähnt zur Aktivierung (Degranulation) der MC führen, ist es möglich, das die

Freisetzung bei diesem zellulären Vorgang erfolgt. Diese Überlegung wurde in weiteren Versuchen (Teil 4.4.3 und 4.4.4) dieser Arbeit weiter verfolgt.

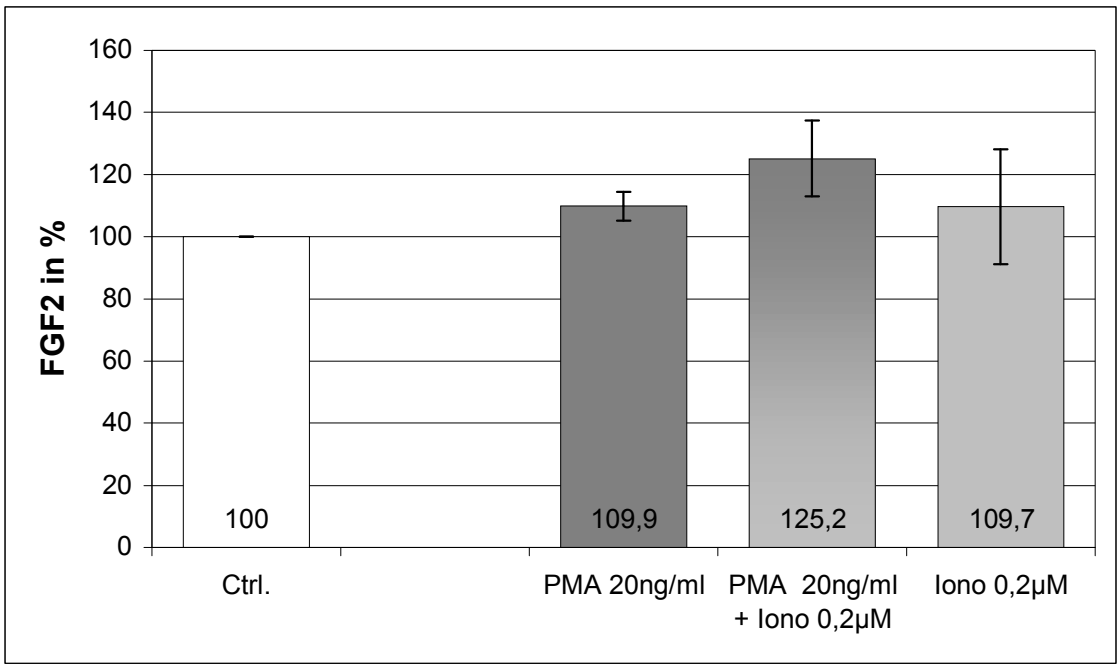


Abbildung 20: Darstellung der Freisetzung von FGF–2 nach Stimulation mit PMA und Ca–Iono, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, PMA 20ng/ml = tendentiell signifikant (p<0,08)

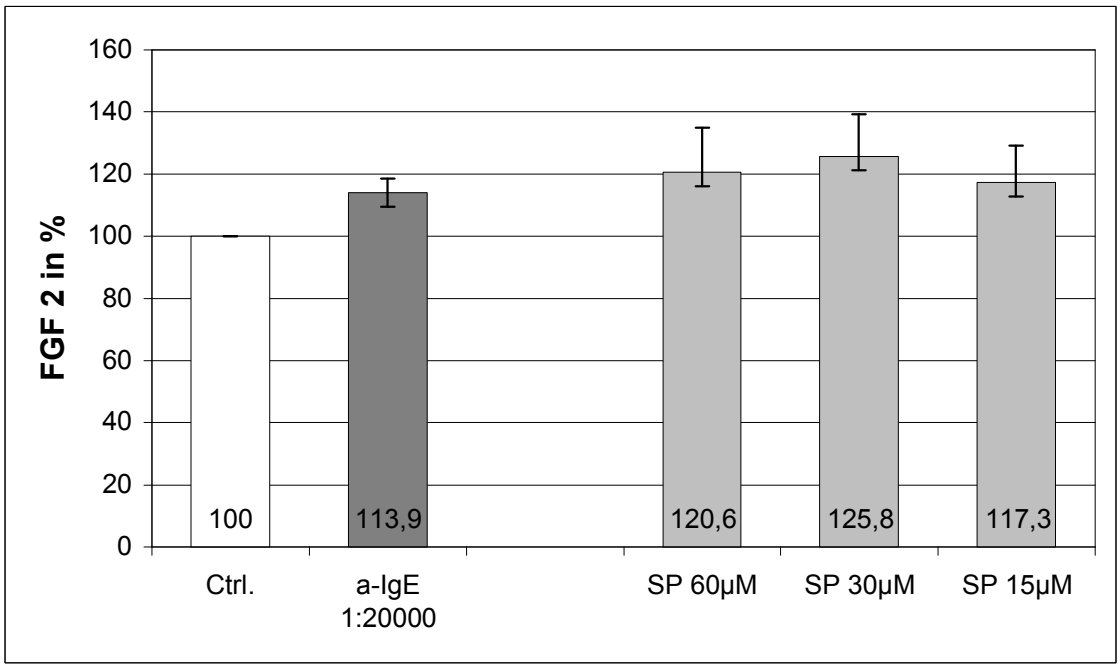


Abbildung 21: Darstellung der Freisetzung von FGF–2 nach Stimulation mit a–IgE und SP, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, a-IgE = p<0,05

4.4.2 Die Wirkung proinflammatorischer Zytokine und SEB auf die Freisetzung von FGF–2 in MC

Aus den Stimulationsversuchen mit den als proinflammatorisch beschriebenen Zytokinen ging hervor, dass nach der Stimulation mehr FGF–2 in den Zellen vorhanden war. Nun sollte auch die Freisetzung des Proteins betrachtet werden, indem die Überstände analysiert wurden. Die Analysen ergaben, dass sich nach den Stimulierungen mit den Zytokinen die Menge des freigesetzten Proteins verringerte.
Nach Inkubation mit Interleukin 4 verringerte sich die Freisetzung auf 70%. Es war eine Dosisabhängigkeit feststellbar. Diese zeigte, dass die größten Effekte durch geringe Konzentrationen von IL–4 hervorgerufen wurden. So wurde die FGF–2–Freisetzung am stärksten bei der Konzentration von 0,5ng/ml gehemmt. (50ng/ml = 85%, 5ng/ml = 80%, 0,5ng/ml = 70%). Die Unterschiede zeigten sich bei der statistischen Auswertung als signifikant.

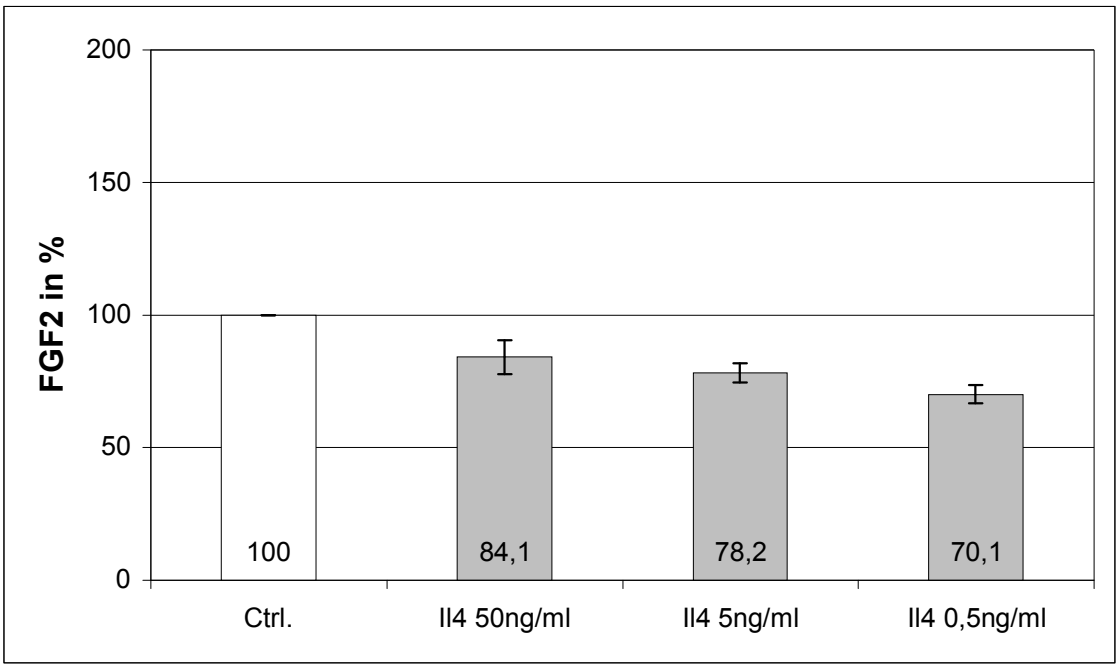


Abbildung 22: Freigesetztes FGF–2 nach Stimulation mit Interleukin 4, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Il4 (50, 5, 0.5 ng/ml) = p<0,05

Nach Inkubation mit Interleukin 6 wurde nur 70% FGF–2 freigesetzt, verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollzellen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Auch nach Inkubation mit IL–8 verringerte sich die FGF–2–Freisetzung. Die verschiedenen Konzentrationen von IL–8 hatten kaum Einfluss auf das Ausmaß der Hemmung. Die Freisetzung verringerte sich statistisch signifikant auf 80–70% verglichen mit der FGF–2 Freisetzung der nicht stimulierten Kontrollzellen.

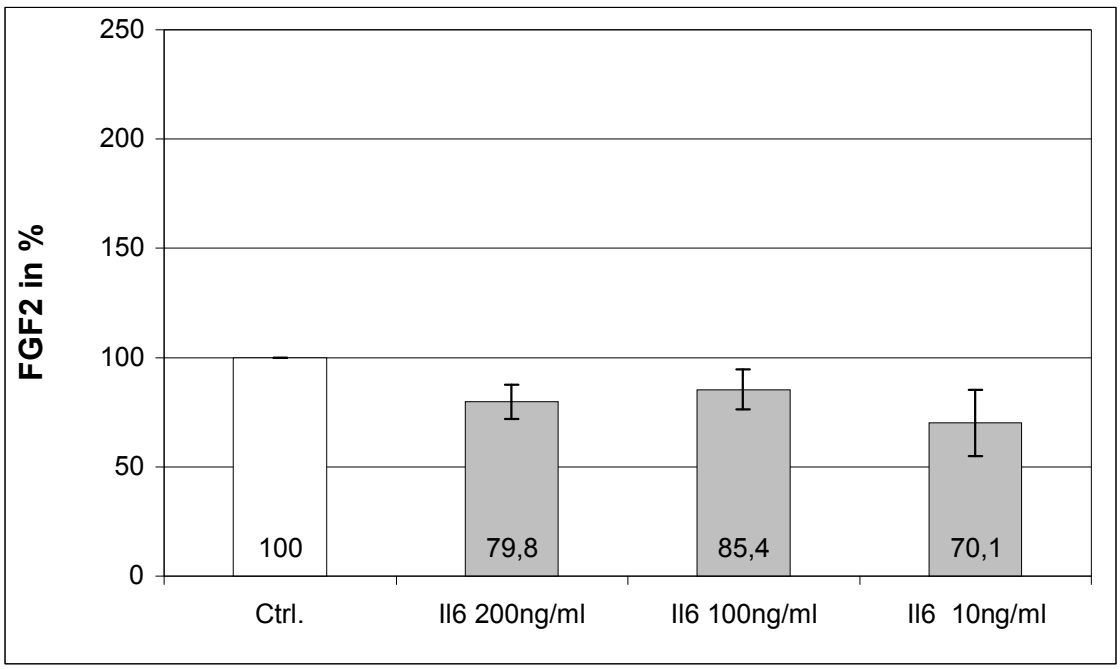


Abbildung 23: Freigesetztes FGF–2 nach Stimulation mit Interleukin 6, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Il6 10ng/ml = p<0,05

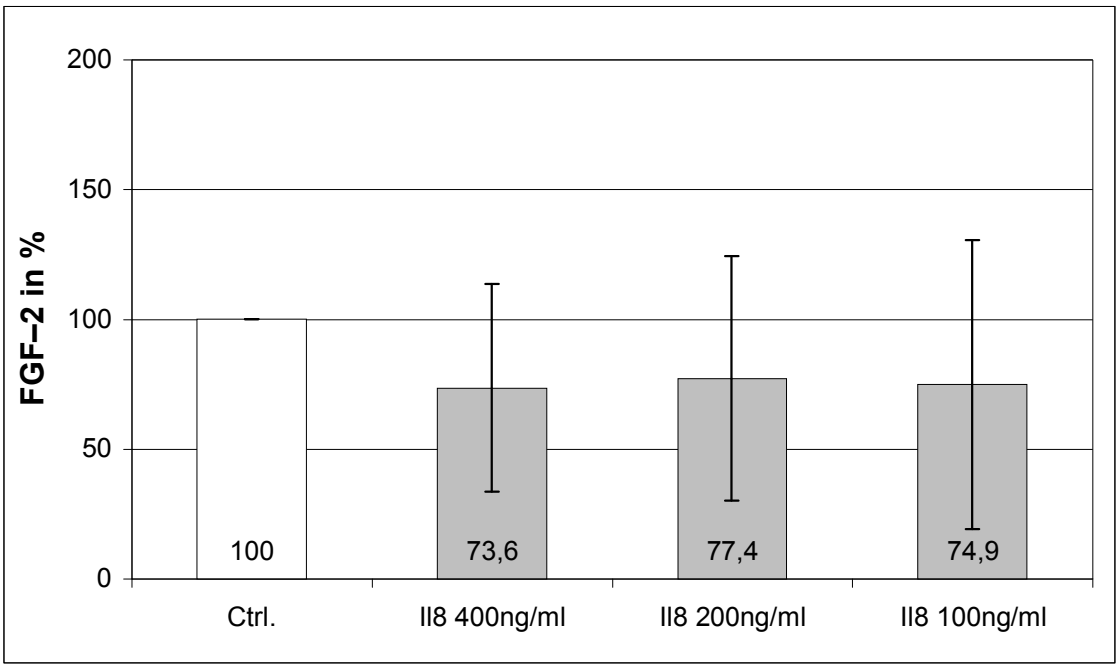


Abbildung 24: Freigesetztes FGF–2 nach Stimulation mit Interleukin 8, =6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Il8 = p<0,05

Auch die Inkubation mit TGFβ bewirkte eine Verringerung der FGF–2–Freisetzung. Diese war verglichen mit den Interleukinen etwas weniger stark ausgeprägt und schwankte um Werte zwischen 80% und 90%. Je höher die eingesetzte Konzentration, mit der die Zellen stimuliert wurden, desto stärker wurde die Freisetzung des Proteins beeinflusst. So hemmten 600pg/ml die Sekretion auf 80%, 300pg/ml auf 90% und 150pg/ml schließlich nur auf 92% verglichen mit der unstimulierten Freisetzung der Zellen.

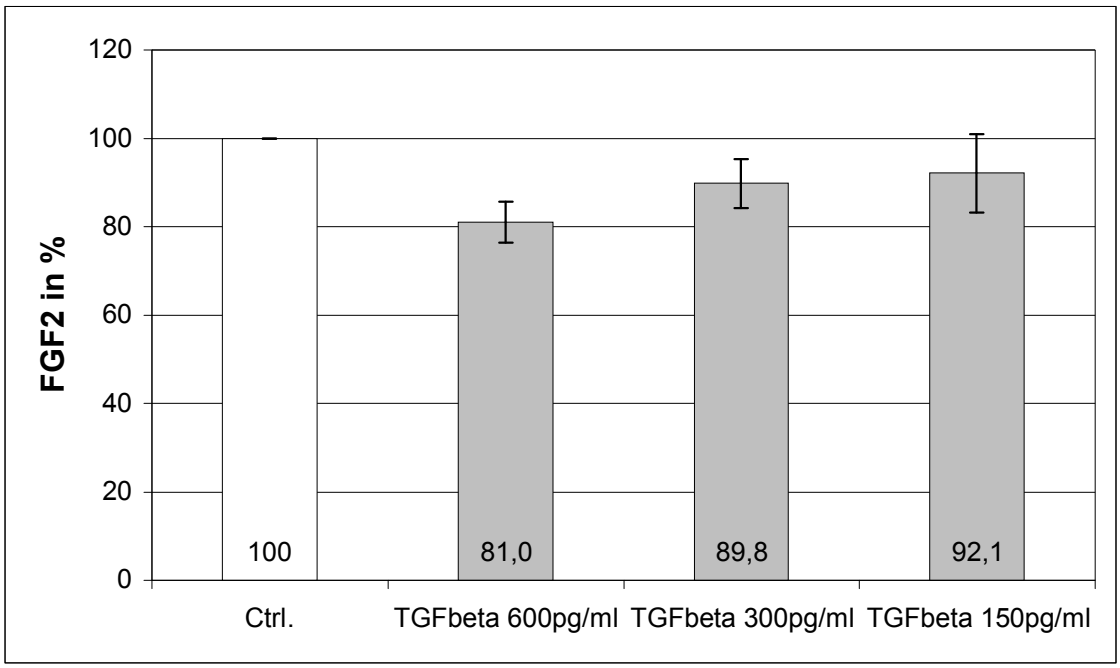


Abbildung 25: Freigesetztes FGF–2 nach Stimulation mit Transforming Growth Factor β, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, TGFbeta 600pg/ml = p<0,05

Die Wirkung von SEB auf die Freisetzung von FGF–2

Auch die mit SEB stimulierten Proben hatten weniger FGF–2 im Überstand als die Kontrollproben. Die Ergebnisse ähnelte den Proben, die mit den Zytokinen stimuliert worden waren. Nach Inkubation mit SEB in einer Verdünnung von 100µg/ml verringerte sich die Freisetzung auf 85%, bei einer Verdünnung von 20µg/ml verringerte sich die Freisetzung auf 80%.

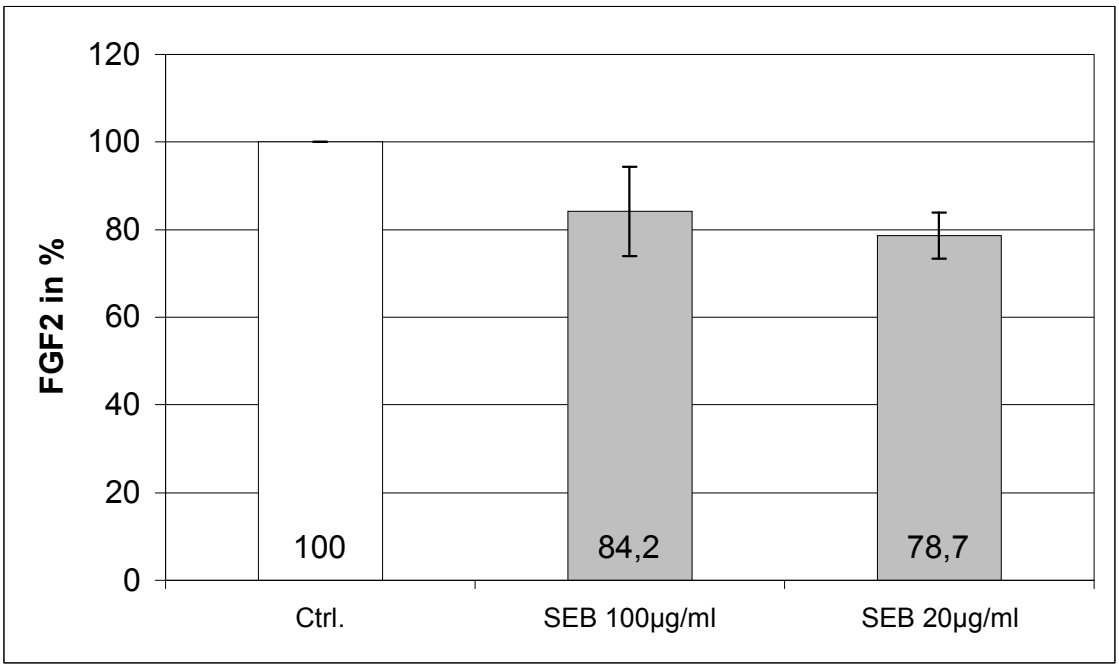


Abbildung 26: Freigesetztes FGF–2 nach Stimulation mit SEB, =6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, SEB 20µg/ml = p<0,05

4.4.3 Der zeitliche Verlauf der FGF–2–Sekretion durch humane MC

In diesem Teil der Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob MC bei der Degranulation FGF–2 freisetzen. Es wurde eine Zeitkinetik mit stimulierten und nicht stimulierten MC durchgeführt. Die Stimulierung erfolgte mit SP in einer Konzentration von 30µg/ml. Anschließend wurde der FGF–2–Gehalt der Überstände analysiert, um den Verlauf der FGF–2–Freisetzung zu beobachten. Der FGF–2–Gehalt stieg in allen Proben kontinuierlich an. Die Unterschiede waren tendentiell signifikant, bzw. nach 8h signifikant. Dieses zeigte, dass MC permanent FGF–2 sezernieren. Beim Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich, dass die FGF–2 nach der Stimulierung stärker war, als ohne Stimulierung. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, das MC bei der Degranulation FGF–2 freisetzen. Dies sollte in weiteren Versuchen bestätigt werden.

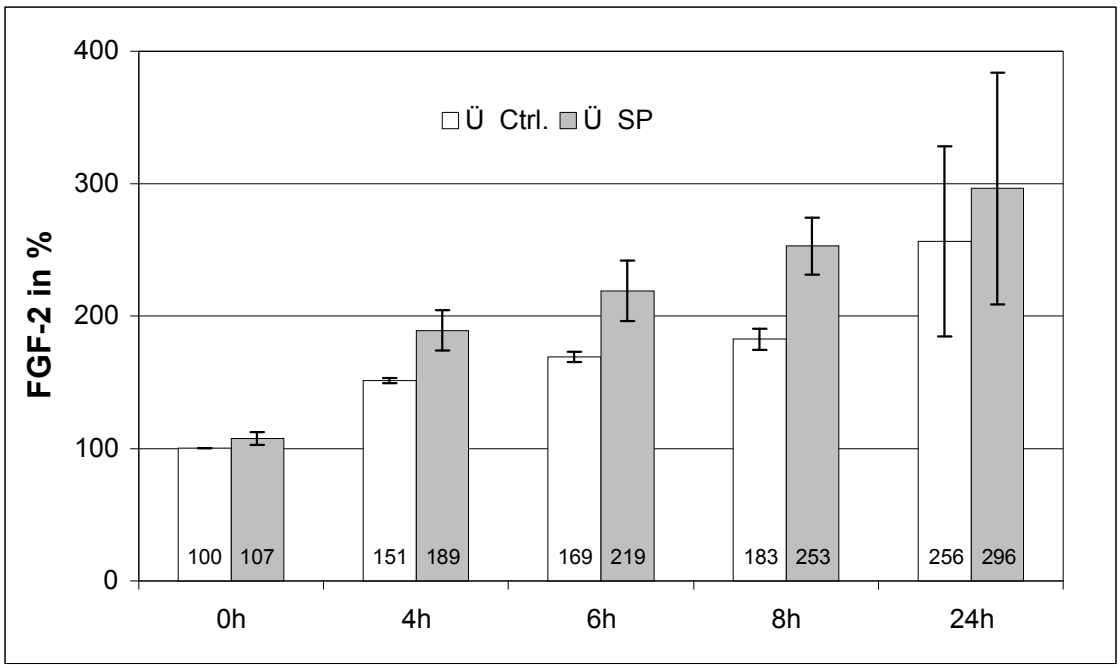


Abbildung 27: Zeitliche Darstellung der FGF–2–Sekretion von humanen MC mit/ohne SP Stimulation, n=5, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.(Zellen ohne SP/0h)=100%, 8h = p<0,05; 4h, 6h und 24h = tendentiell signifikant (p<0,08) beim Vergleich der stimulierten Probe mit der unstimulierten Probe

4.4.4 Stimulierte FGF–2–Sekretion durch Präinkubation mit IL–4

Um den Zusammenhang zwischen Degranulation und FGF–2–Freisetzung weiter zu untersuchen erfolgte folgender Versuch. Ihm lagen zwei Hypothesen zu Grunde:
Die FGF–2–Synthese von MC wird durch Stimulation mit IL–4 angeregt.
Die FGF–2–Freisetzung von MC ist nach Stimulation mit a–IgE und SP verstärkt.
Die Versuchsanordnung ist in Abschnitt 3.2.5 dieser Arbeit beschrieben. Es gab insgesamt 10 Versuchgruppen mit unterschiedlichen Stimulierungsprofilen, deren Überstände auf Ihren Gehalt an FGF–2 analysiert wurden, um die Freisetzung zu untersuchen. In den Überständen von den mit a–IgE bzw. SP stimulierten Zellen befand sich mehr FGF–2 als in den Überständen der Kontrollzellen; damit konnten die Ergebnisse aus den vorangegangenen Versuchen bestätigt werden. Lediglich der 18h Wert der mit SP inkubierten Probe wich hiervon ab, da sich hier tendenziell eine leichte Inhibition der FGF–2–Freisetzung um 5% darstellte. Die alleine mit IL–4 inkubierte Probe setzte weniger FGF–2 frei, dies entsprach den Erwartungen. Bei der Betrachtung der FGF–2 Sekretion bei den mit IL–4 präinkubierten Proben zeigte sich, dass die Freisetzung ge-

genüber den Kontrollzellen erhöht war. Verglich man die Freisetzung der mit IL–4 präinkubierten Zellen mit den nicht präinkubierten Zellen, so bleibt die Freisetzung annähernd gleich. Für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend, jedoch zeigen die Daten für folgende eine signifikante Tendenz mit p<0,15, bzw. 3 positiven Rängen bei n=3: IL–4/a–IgE 6h, IL–4/SP 6h, a–IgE 6 und 18h, SP 6 und 18h

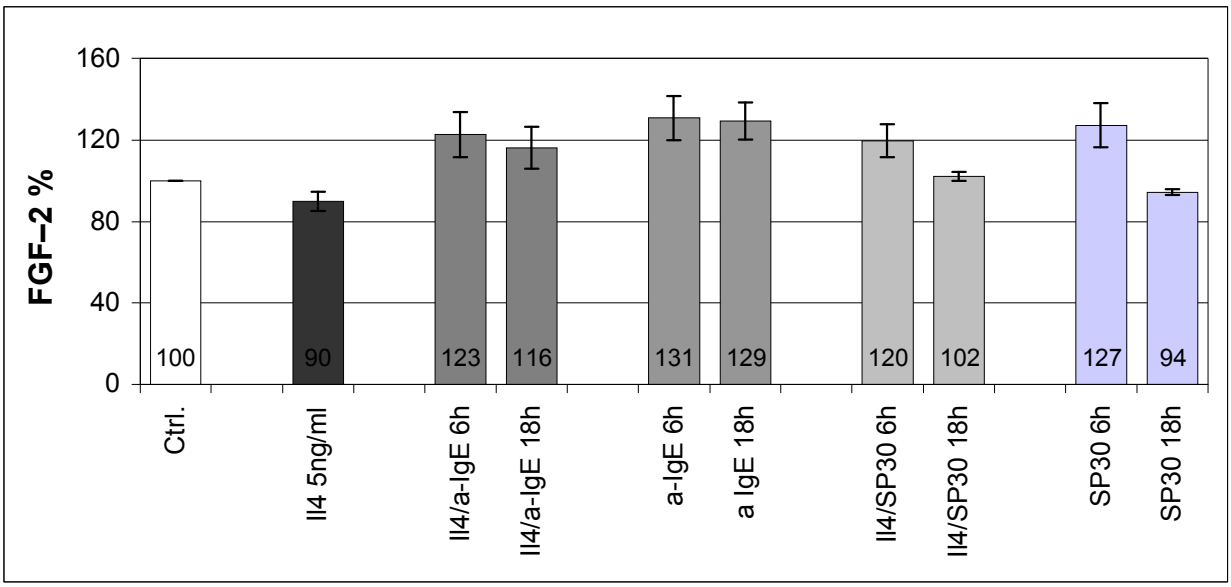


Abbildung 28: Überstände der mit IL–4 präinkubierten MC, n=3, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, Für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend, jedoch zeigen folgende Daten eine signifikante Tendenz mit p<0,15, bzw. 3 positiven Rängen bei n=3: IL–4/a–IgE 6h, IL–4/SP 6h, a–IgE 6 und 18h, SP 6 und 18h

4.4.5 Der Einfluss von UV–Licht auf die FGF–2–Freisetzung

Um den Einfluss von UV–Licht auf die Freisetzung von FGF–2 zu untersuchen, wurden aufgereinigte MC mit Licht verschiedener Wellenlängen und Intensität bestrahlt. Es wurden folgende Versuchsansätze gebildet: 75 mJ/cm^2 UVB, 15 J/cm^2 UVA–1 und 5 J/cm^2 PUVA–1. Nach 24 Stunden Kultivierungszeit wurden die Überstände auf Ihren Gehalt an FGF–2 analysiert.

Die UVB Bestrahlung scheint keinen Einfluss auf die Freisetzung zu haben. Die Freisetzung entspricht der FGF–2–Sekretion der unstimulierten Kontrollgruppe. (100% versus 101,55%) Nach der Bestrahlung mit UVA$_1$–Licht sank die Freisetzung von FGF–2 dagegen signifikant von 100%l auf 54,55%. Auch die mit PUVA–1 bestrahlten Zellen setzten signifikant weniger FGF–2 frei. (PUVA–1 43,8%).

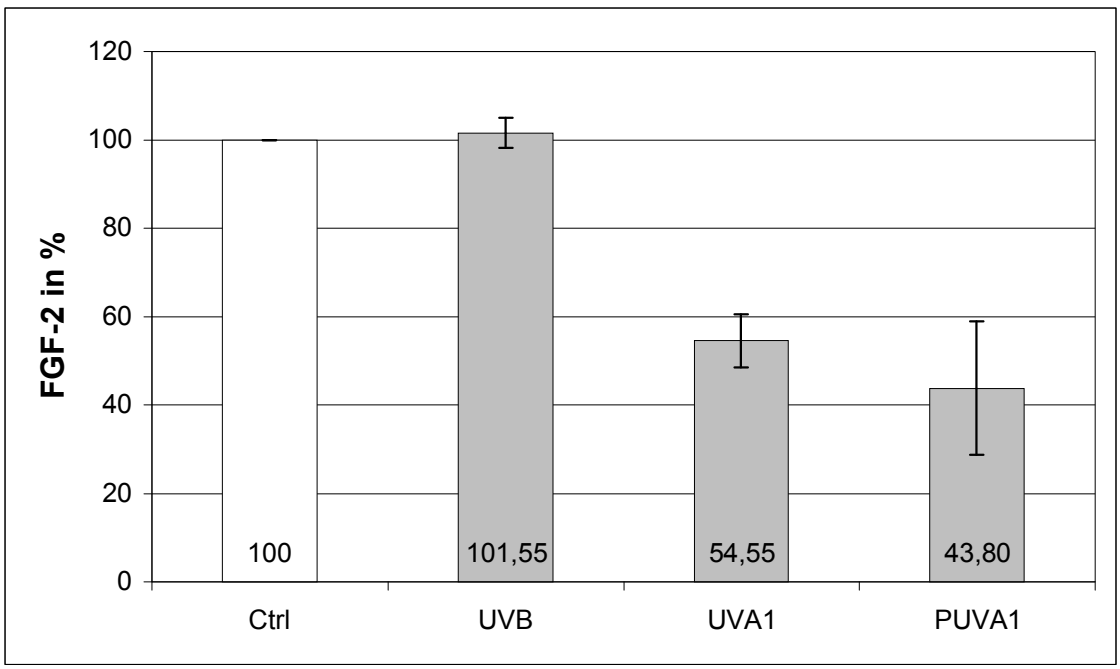


Abbildung 29: Darstellung des Einflusses von Licht verschiedener Wellenlängen (UVB: 75 mJ/cm^2, UVA–1: 15 J/cm^2, PUVA–1: 5 J/cm^2) auf die Freisetzung von FGF–2, n=6, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, UVA1 und PUVA1 = p<0,05

4.5 Der Einfluss von Proteaseinhibitoren auf FGF–2 und MC

MC speichern viele Proteasen, beispielsweise Tryptase und Chymase. Da es sich bei FGF–2 um ein Protein handelt, besteht die Möglichkeit, dass das freigesetzte FGF–2, durch ebenfalls während der Degranulation ausgeschleuste Proteasen gespalten wurde, wie beispielsweise IL–6, welches von Tryptase gespalten wird. Daher wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, in der untersucht werden sollte, ob die Inhibition von Proteasen Einfluss auf die Versuchsergebnisse hat.
In einem Vorversuch wurde die Wirkung der Proteaseinhibitoren auf Zellen der Mastzelllinie HMC–1 hinsichtlich deren Proliferation und Größe überprüft. Die Zellgröße und Proliferation wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von den Inhibitoren beeinflusst. Sowohl die Proliferation als auch die Größe der Zellen nahm mit steigender Konzentration der Proteaseinhibitoren ab.

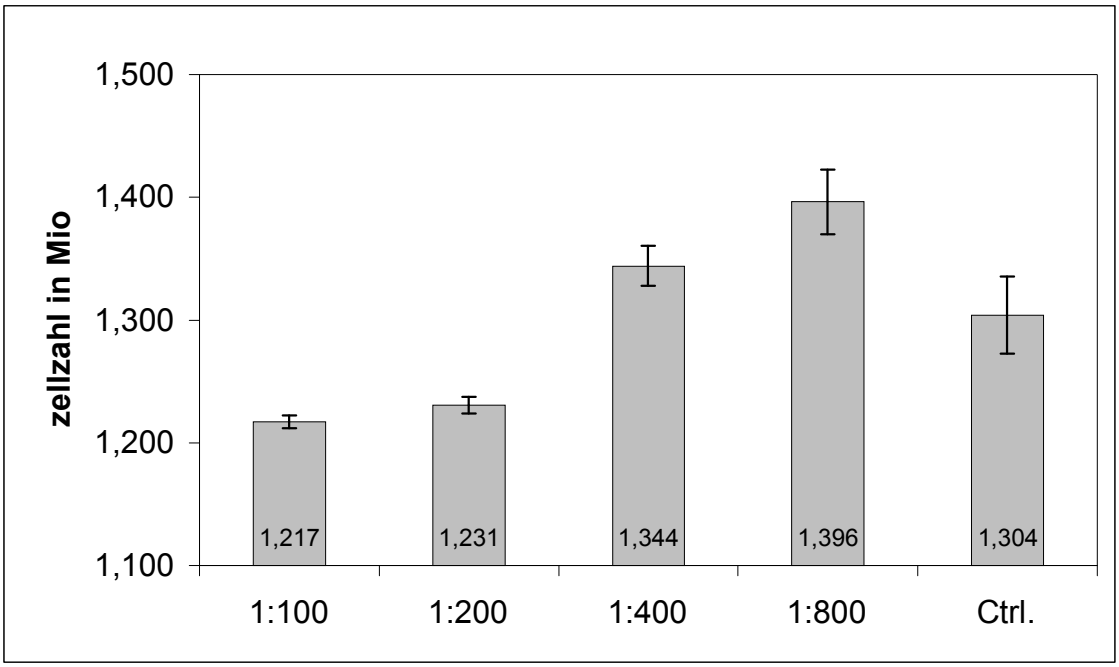


Abbildung 30: Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Proliferation von HMC–1 Zellen, Proliferation der HMC–1 Zellen nach Zugabe von Proteaseinhibitoren; n=4, Mittelwert+/-SEM

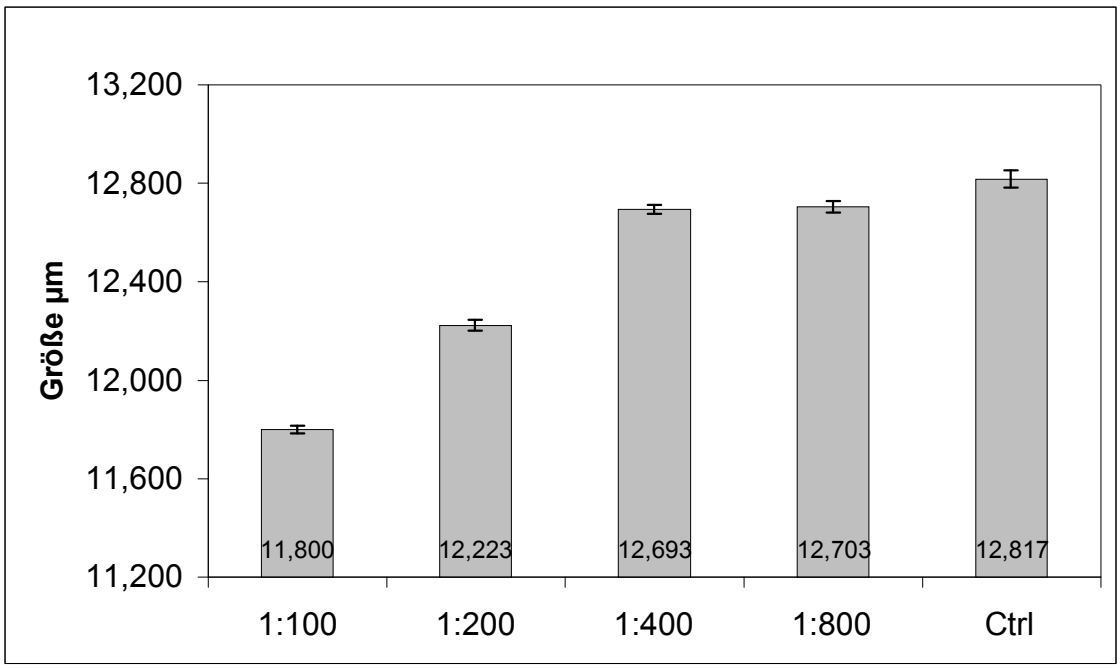


Abbildung 31: Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Größe von HMC–1 Zellen, Größe der HMC–1 Zellen nach Zugabe von Proteaseinhibitoren, n=4, Mittelwert+/-SEM

4.5.1 Synthese und Freisetzung von FGF–2 humaner MC nach Zugabe von Proteaseinhibitoren

Anhand dieser Ergebnisse wurde für den folgenden Versuch eine möglichst geringe Konzentration von 1:400 gewählt. Der Versuchsaufbau ähnelt der Zeitkinetik von Abschnitt 4.2. Die Ergebnisse zeigten bei den mit Proteaseinhibitoren behandelten Zellen eine insgesamt verringerte FGF–2 Produktion und Freisetzung. Scheinbar wirkten die Inhibitoren inhibierend auf den gesamten Stoffwechsel der Zellen.

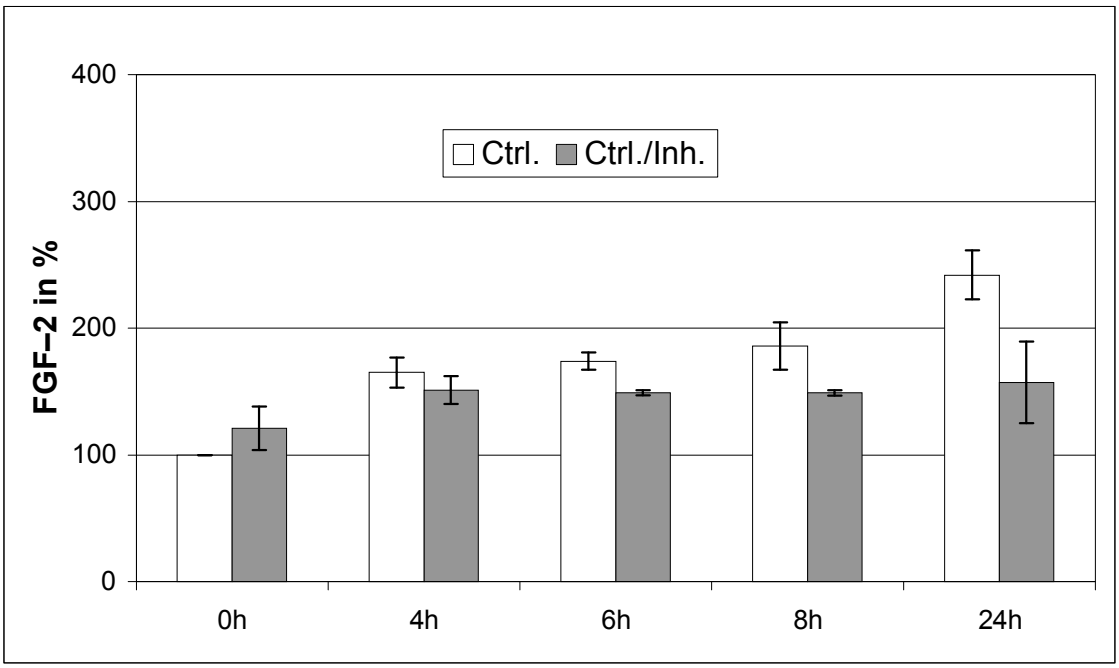


Abbildung 32: Zeitliche Darstellung der Überstände der unstimulierten MC mit bzw. ohne Proteaseinhibitoren, n=3, Mittelwert+/-SEM; Ctrl.=100%, für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend

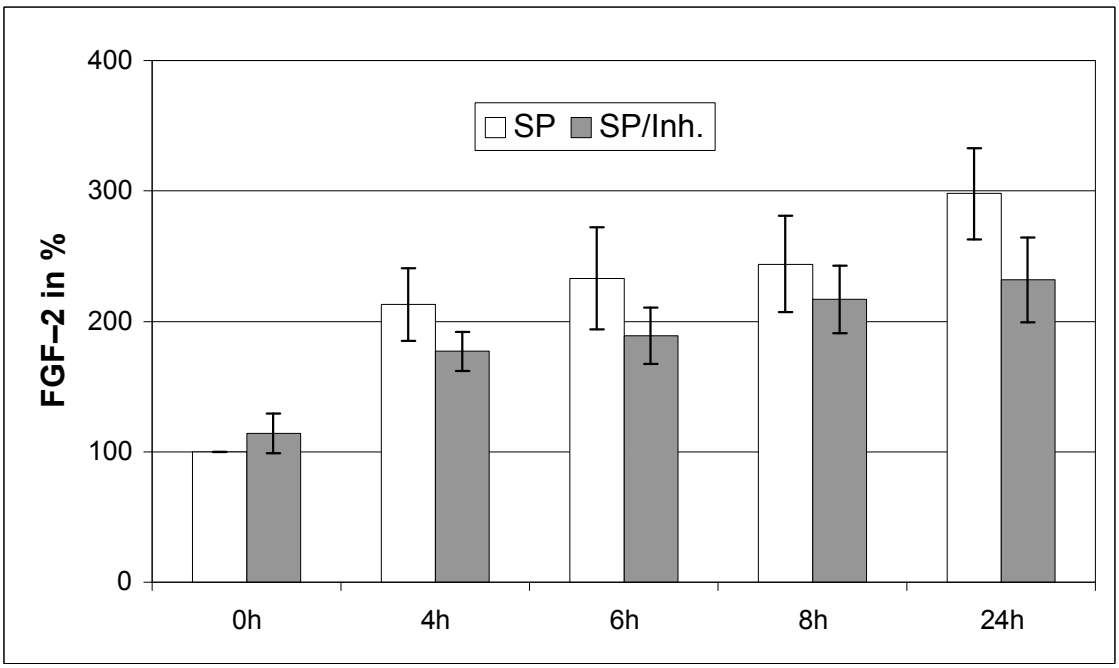


Abbildung 33: Zeitliche Darstellung der Überstände der mit SP stimulierten MC mit bzw. ohne Proteaseinhibitoren, n=3, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend

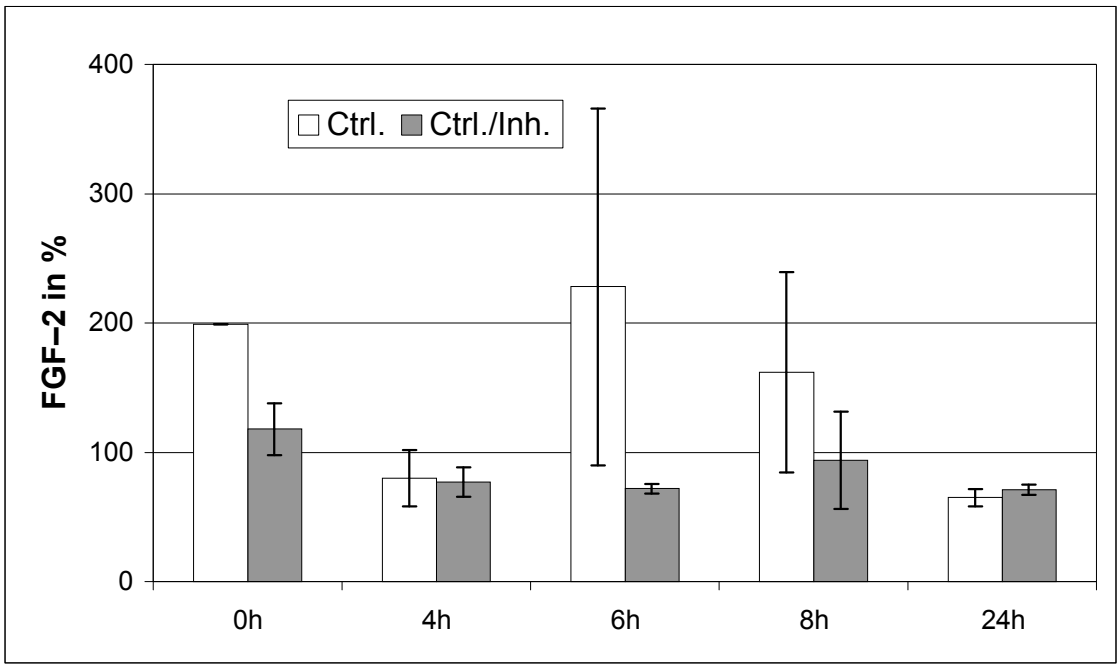


Abbildung 34: Zeitliche Darstellung der Zelllysate der unstimulierten MC mit bzw. ohne Proteaseinhibitoren, n=3, Mittelwert+/-SEM, Ctrl.=100%, für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend

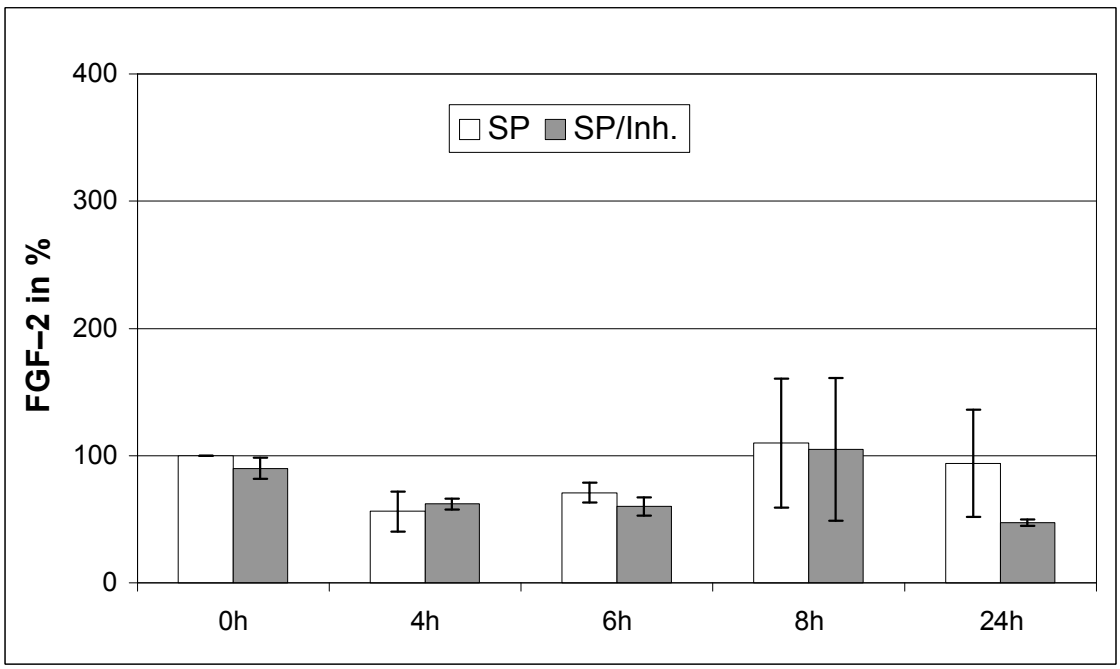


Abbildung 35: Zeitliche Darstellung der Zelllysate der mit SP stimulierten MC mit bzw. ohne Proteaseinhibitoren, n=3, Mittelwert+/-SEM, Ctrl=100%, für eine statistische Auswertung ist die Versuchanzahl von n=3 nicht ausreichend

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Die Synthese von FGF–2 in humanen MC ist durch verschiedene Stimulantien beeinflussbar. Die Substanzen PMA+Iono und IL–4 bewirken eine Hochregulierung der Synthese.

- Bei der Degranulation von MC wird neben anderen Mediatoren auch FGF–2 sezerniert.

- Zelleigene Proteasen der MC wie die Tryptase und Chymase bauen FGF–2 nicht enzymatisch im Überstand ab.

- UV–Licht beeinflusst die FGF–2–Freisetzung. Besonders UVA_1– und $PUVA_1$– Bestrahlung inhibiert die Freisetzung.

5 Diskussion

FGF–2 wird mit der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Hierzu zählt die Polypenbildung in der Nase, die rheumatische Arthritis und die Sklerodermie. In diesen pathologisch veränderten Geweben gibt es mehr MC als im gesunden Gewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde das Funktionsverhalten von MC hinsichtlich der FGF–2–Synthese und –Freisetzung untersucht, um dadurch Rückschlüsse auf deren Einfluss auf die Pathogenese der erwähnten Veränderungen ziehen zu können.

Viele gegenwärtige Erkenntnisse wurden durch Versuche an MC von Tieren oder an Mastzelllinien gewonnen. Obwohl diese Zellen menschlichen MC in vielerlei Hinsicht ähneln, können größtmögliche Rückschlüsse auf das Funktionsverhalten von MC im menschlichen Organismus doch nur an reifen humanen MC gewonnen werden. Die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse stammen ausschließlich aus Versuchen an humanen MC, die aus Gewebeproben gesunder Probanden gewonnen wurden.

Ein Teil der Versuche konzentrierte sich auf die FGF–2–Synthese in menschlichen MC. Es wurde durch Stimulierung mit immunologischen Substanzen ein physiologisch verändertes Milieu geschaffen und anschließend die Synthesemenge von FGF–2 ermittelt. Durch die Ergebnisse konnten Rückschlüsse auf das Verhalten von MC hinsichtlich ihrer FGF–2–Synthese unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen geben, um eventuell bestehende Zusammenhänge zu evaluieren. Ein anderer Teil der Versuche galt dem Freisetzungsmechanismus von FGF–2 aus menschlichen MC. Dieser ist weitgehend unbekannt und wirft einige Fragen auf. In dieser Arbeit wurde die Freisetzung von FGF–2 durch die Degranulation von MC untersucht. Des weiteren wurde die Wirkung von Licht auf die FGF–2–Freisetzung von MC untersucht.

5.1 Die FGF–2–Synthese und Freisetzung von humanen MC

Die vorliegenden Daten haben gezeigt, dass sich die FGF–2–Synthese und –Freisetzung von MC durch Inkubation mit unterschiedlichen Wirkstoffen modulieren lässt. Da FGF–2 mit der Pathogenese vieler unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert ist, kann auch den MC beim Verlauf dieser Erkrankungen eine tragende Rolle zugeschrieben werden.

5.1.1 Die FGF–2–Synthese und –Freisetzung durch MC nach Inkubation mit verschiedenen Stimulantien

MC beinhalten eine Vielzahl von Mediatoren. Ein Teil dieser Stoffe wird in den Sekretionsgranula der MC gespeichert. Einer der wichtigsten Vertreter dieser präformierten Mediatoren ist Histamin. Die anderen Mediatoren werden von de novo synthetisiert, wenn es zur Aktivierung der Zelle in Folge verschiedener Reize kommt. Bei der Degranulation der Zelle werden die Mediatoren in den Extrazellularraum sezerniert und entfalten dort ihre biologische Aktivität. FGF–2 gehört zu den Mediatoren, die von MC synthetisiert werden. Der Wachstumsfaktor ist in den Sekretionsgranula von MC lokalisiert, wie histologische Untersuchungen zeigten[75, 100].
In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde die Regulation der FGF–2–Synthese und die Freisetzung des Proteins untersucht. Dafür wurden MC mit verschiedenen Substanzen stimuliert und anschließend die FGF–2–Synthese und –Freisetzung durch herkömmliche ELISA ermittelt. Die erste Gruppe dieser Stimulantien fällt unter den Begriff „klassische MC Liberatoren“. Es handelt sich um nicht physiologische und physiologische Substanzen, bei denen die Reaktion der MC teilweise bekannt und damit vorhersagbar ist. Zu diesen bekannten Reaktionen gehört die Degranulation der MC in Folge der Inkubation. Zu den nicht physiologischen Stimuli dieser Gruppe gehören PMA und Ca–Iono. Ein Teil der Zellen wurde nur mit PMA, ein Teil nur mit Ca–Iono und ein Teil mit beiden Stimulantien inkubiert. Intrazellulär stieg die Konzentration von FGF–2 bei der mit PMA ebenso wie bei der mit Ca–Iono stimulierten Probe an. Bei den mit

beiden Stimulantien inkubierten Proben waren die intrazellulären FGF–2–Werte verringert. Extrazellulär ergaben die Messwerte in allen drei Versuchsgruppen erhöhte FGF–2 Konzentrationen. Der deutlichste Effekt trat nach Stimulation mit beiden Stoffen auf, es resultierte eine um 25% verstärkte Freisetzung. Die gesamte FGF–2–Synthese war nach Stimulation mit den Substanzen verstärkt, dieses Ergebniss erwies sich aber nur bei der Stimulation mit beiden Substanzen als signifikant. Ca–Iono ist eine Substanz, welche die Degranulation von MC induziert[101]. Da die extrazellulären FGF–2–Werte nach der Stimulation erhöht waren, kann vermutet werden, dass bei der Degranulation von MC FGF–2 sezerniert wurde. Bei der mit beiden Stoffen inkubierten Probe war der Anstieg der FGF–2 Sekretion besonders deutlich. PMA und Ca–Iono schienen hier einen synergetischen Effekt auszuüben. Bei PMA handelt es sich um einen Stoff, der die Proteinsynthese in vielen verschiedenen Zellen anregt[102, 103]. PMA scheint auch die Synthese von FGF–2 zu beeinflussen, da die intrazellulären Werte von FGF–2 in der mit PMA stimuliertem Probe erhöht waren. Gleichzeitig führte die Stimulation zu einer verstärkten FGF–2–Freisetzung, was durch die erhöhten extrazellulären Werte präsentiert wurde.

Die physiologischen Stimulantien dieser Gruppe waren a–IgE und Substanz P. Die MC reagierten in ähnlicher Weise auf die Inkubation, sie scheinen sowohl die FGF–2–Synthese als auch die Freisetzung anzuregen. SP und a–IgE kommen sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen im menschlichen Organismus vor. Sie führen zur Aktivierung und damit Degranulation der MC[46, 53].

In einer 2001 veröffentlichten Studie konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass FGF–2 bei Lungenmastzellen in den Sekretionsgranula lokalisiert ist[100]. Bei der Lokalisation von FGF–2 in den Sekretionsgranula scheint die Fähigkeit mit Heparin und Chondroitinsulfat Komplexe zu bilden, eine Rolle zu spielen. Da bekannt ist, dass diese Mediatoren in den Granula der MC gespeichert werden, kann so auch die Lokalisation von FGF–2 in den Granula erklärt werden[66, 68, 70]. Somit liegt nahe, dass FGF–2 wie andere Mediatoren auch nach Aktivierung der Zellen über Exozytose in den Extrazellulärraum gelangt. Auch die hier präsentierten Ergebnisse deuten auf diesen Zusammenhang hin.

In weiteren Versuchen wurden die MC mit verschiedenen Zytokinen inkubiert, die anhand Ihres Einflusses bei bestimmten immunologischen Reaktionen ausgewählt wur-

den. Interleukin 4 wird eine wichtige regulatorische Rolle bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen zugeschrieben. Es regt die Differenzierung von B–Zellen zu Plasmazellen an und damit die Freisetzung spezifischer Antikörper. Während der MC–Reifung in vitro führt die Stimulierung mit IgE und/oder IL–4 zur verstärkten Expression vom FcεRI Rezeptor auf der MC Oberfläche, wodurch diese auf anti–IgE Reize stärker reagieren.[104]. Humane MC setzen mehr Histamin, Leukotriene C_4 und IL–5 frei, wenn sie vor der Aktivierung mit IL–4 präinkubiert wurden[105]. Die Stimulationen die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten eine verringerte Freisetzung von FGF–2, dagegen aber deutlich erhöhte intrazelluläre Werte. Nach Stimulierung mit einer Konzentration von 50ng/ml erhöhte sich die FGF–2–Synthese auf im Vergleich zu den Kontrollproben signifikant auf 117%. Kann hierdurch die Pathogenese von Polypen in der Nase begünstigt werden? Es ist bekannt, dass sich in der Mucosa von Patienten mit allergischer Rhinitis mehr MC befinden als bei gesunden Patienten. Diese MC synthetisieren verstärkt IL–4[10]. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, das durch IL–4 die FGF–2–Synthese in MC gefördert wird, da nach der Stimulierung mehr FGF–2 in den Zellen nachgewiesen wurde. FGF–2 wiederum begünstigt die Proliferation von Fibroblasten. Das könnte bedeuten, dass bei Patienten mit allergischen Vorerkrankungen die Entwicklung von Polypen in der Nase und den Nasennebenhöhlen begünstig ist, weil durch die oben erläuterten Zusammenhänge in der Mucosa mehr FGF–2 vorhanden ist und davon die Proliferation von Fibroblasten angeregt wird. Bei diesem Pathomechanismus spielt jedoch die Freisetzung von FGF–2 eine tragende Rolle, da es erst extrazellulär seine proliferative Wirkung auf Fibroblasten entfalten kann. Die Ergebnisse präsentieren dagegen verringerte extrazelluläre Werte nach Stimulation mit IL–4. Nun muss bedacht werden, dass unter natürlichen Bedingungen IL–4 zusammen mit einer Vielzahl anderer Faktoren wirkt. So haben Patienten mit allergischen Erkrankungen erhöhte a–IgE–Titer. Es müssen also weitere Untersuchungen hinsichtlich des Freisetzungsmechanismus durchgeführt werden, um herauszufinden, welche inter– und intrazellulären Mechanismen die MC zur Sekretion des FGF–2 anregen.

Weiter wurde mit Interleukin 6 stimuliert. Die Ergebnisse zeigten ähnlich zu IL–4 erhöhte intrazelluläre Werte bei einer verringerten Konzentration von FGF–2 im Überstand. Das bedeutet, das die MC mehr FGF – 2 synthetisierten, dieses jedoch nicht freisetzten. Bei IL–6 handelt es sich um ein Zytokin, das Differenzierung und Wachstum von T–

und B–Zellen anregt und an der Produktion von Akute–Phase–Proteinen beteiligt ist und von MC exprimiert wird[26]. Dadurch spielt IL–6 bei der frühen Entzündungsphase eine Rolle. Da viele MC– und FGF–2–assoziierte Erkrankungen chronisch, entzündliche Veränderungen sind (Sklerodermie, rheumatische Arthritis, Asthma bronchiale), kann deren Verhalten im Hinblick auf die FGF–2–Synthese im entzündlich veränderten Milieu untersucht werden. Unter ähnlichen Gesichtspunkten wurden zwei weitere Stimulantien für die nächsten Versuche ausgewählt. Interleukin 8 ist ein für neutrophile Granulozyten chemotatisches Zytokin und spielt dadurch eine maßgeblich Rolle bei der Aktivierung entzündlicher Prozesse. IL–8 wird von Makrophagen, Monozyten, Endothel –und Epithelzellen exprimiert, aber nicht von MC[26]. Nach Stimulierung mit IL–8 wurde im Zelllysat vermehrt FGF–2 gemessen, wohingegen sich die extrazellulären Werte verringerten. Die statistische Auswertung der gesamt FGF–2–Synthese zeigte, das diese nicht signifikant war, und die erhöhten intrazellulären Werte wahrscheinlich nicht durch eine Synthesesteigerung, sondern durch die signifikant verringerte Freisetzung von FGF–2 bedingt waren. Diese Transforming Growth Factor β ist ein Zytokin, das den Gewebeumbau reguliert. Es unterstützt die Formation von Matrixproteinen zu denen Kollagen Typ I und III gehören. Die Stimulation renaler Fibroblasten mit TGFβ bewirkt eine vermehrte Synthese und Freisetzung von FGF–2 in renalen Fibroblasten, wodurch diese zur Proliferation angeregt werden[79]. Auch die Stimulation von MC mit TGFβ bewirkte eine gesteigerte FGF–2 Synthese, dagegen sank die Freisetzung nach der Inkubation in unseren Versuchen.

Die FGF–2–Synthese oder –Freisetzung wurde durch die Stimulantien beeinflusst. Dies zeigt, dass das Milieu in dem die MC sich befinden einen regulatorischen Einfluss auf deren FGF–2–Stoffwechsel hat. Die biologische Aktivität von FGF–2 wird mit 100 bis 3000pg/ml angeben. Die MC setzten in diesen Versuchen bis zu 2000pg/ml frei. Nach Stimulierung mit a–IgE schwankte die Freisetzung zwischen 140 und 2000pg/ml, mit einem Mittelwert von 546pg/ml +/- 172. Die FGF–2–Freisetzung liegt im biologisch wirksamen Bereich des Proteins. Zum Vergleich setzten renale Fibroblasten 24 Stunden nach Stimulation mit TGFβ 43pg/ml frei[79]. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass MC modulierend auf die schon genannten Krankheitsprozesse wirken können.

5.1.2 Untersuchungen zur m–RNA Expression von FGF–2

Die Ergebnisse der ELISA–Tests deuteten auf eine gesteigerte FGF–2–Synthese in den MC hin, da diese intrazellulär mehr FGF–2 enthielten als die unstimulierten Kontrollzellen. Die Synthese eines Proteins innerhalb einer Zelle verläuft an verschiedenen Zellorganellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ab. Sie beginnt mit der Bildung von mRNA (messenger RNA) im Zellkern, welche die Information für die AS–Sequenz des Proteins enthält. Die Produktion und der Nachweis solcher spezifischen mRNA bildet eine wichtige Quelle, um Informationen über die Regulation der Synthese eines Gens zu gewinnen. Kritisch muss in diesem Zusammenhang angemerkt werden, dass der Nachweis von mRNA alleine kein Beweis für die Synthese eines Proteins innerhalb einer Zelle ist. Auch die dann kommenden Syntheseschritte müssen erfolgen. Die vollständige Fertigstellung eines Proteins ist ein komplizierter Prozess und kann an verschiedenen Stellen gestört sein. Aus diesem Grund kommt es vor, dass die mRNA für ein Protein nachweisbar ist, ohne dass es von der Zelle synthetisiert wird. Der Nachweis von mRNA gemeinsam mit dem Nachweis des vollständigen Proteins durch Methoden wie ELISA ist jedoch ein deutlicher Hinweis für die Synthese eines Proteins von einer Zelle.
Aus diesen Gründen sollten die aus den vorangegangenen Versuchen gewonnenen Hinweise auf die Hochregulierung der FGF–2–Expression durch die verwendeten Stimulantien mit einer PCR verifiziert werden. Da für diese Versuche viele Zellen (mRNA) benötigt wurden und diese nur begrenzt zur Verfügung standen, wurden die Versuche nur einmal exemplarisch durchgeführt. Die Zellen wurden mit SP als Vertreter von klassischen MC–Liberatoren und TGFβ als Vertreter der proinflamatorischen Zytokine stimuliert. Es wurde die Expression von FGF–2–mRNA in Abhängigkeit zur Dauer der Stimulierung untersucht. Die Transkriptmenge dieser Gene wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.
Die relativen Quantifizierungen der mRNA wurden durch Vergleich der einzelnen PCR–Ansätze mit einem Housekeeping–Gen erreicht. Die Ergebnisse deuteten auf einen regulierenden Einfluss der verwendeten Stimulantien auf die mRNA–Synthese von FGF–2 hin. Es zeigt sich bei beiden Stimulantien eine maximale Induktion der FGF–2–Synthese nach 4–6 Stunden. Nach 8–10 Stunden fällt sie ab auf Werte, die auf oder unterhalb der Syntheseleistung der nicht stimulierten Kontrollzellen liegen.

Die Daten zeigten, dass durch die verwendeten Stimulantien die FGF–2–Synthese von MC beeinflussbar ist. Somit könnte deren Anwesenheit, beispielsweise in chronisch entzündlich veränderten Geweben, langfristig die Erhöhung der FGF–2–Synthese in MC zur Folge haben. Diese Veränderung kann wiederum bestimmt Krankheitsverläufe negativ beeinflussen.

5.2 Die Freisetzung von FGF–2 durch die Degranulation

Während im ersten Teil dieser Arbeit die Regulation der FGF–2–Synthese im Vordergrund stand, konzentrierten sich die folgenden Versuche auf die Freisetzung des Proteins aus den Zellen. MC haben die besondere Eigenschaft, nach immunologischen, physikalischen und chemischen Reizen zu degranulieren. Dann verschmelzen die Membranen der Sekretionsgranula mit der Zellmembran und der Granulainhalt wird in den Extrazellulärraum sezerniert. Dieser Prozess dauert etwa 30 Minuten. Auch FGF–2 befindet sich in diesen Sekretionsgranula[75, 100], so dass es eine logische Konsequenz wäre, dass es durch die Degranulation der MC in den Extrazellulärraum gelangt. Dieser Zusammenhang sollte in den folgenden Versuchen näher betrachtet werden.

5.2.1 Der zeitliche Verlauf der FGF–2–Sekretion durch humane MC

A–IgE und SP sind Substanzen, die MC aktivieren[46, 53]. Die im ersten Teil diskutierten Versuche zeigten, dass MC hinsichtlich ihrer FGF–2–Synthese und –Freisetzung ähnlich auf diese Substanzen reagieren. Sowohl der intrazellulär gemessene FGF–2–Titer als auch die FGF–2–Freisetzung stiegen in diesen Versuchen an. Da die Gewinnung der MC sehr langwierig war und diese nur begrenzt zur Verfügung standen wurden die folgenden Versuche nur an mit SP stimulierten MC durchgeführt.

Die MC wurden nach der Stimulierung kultiviert. Zu gegebenen Zeitpunkten wurde die FGF–2–Konzentration im Überstand gemessen. Die Zeitkinetik zeigte, das zu allen Zeitpunkten mehr FGF–2 im Überstand nachweisbar war als in den Kontrollproben. Die stimuierten MC hatten folglich mehr FGF–2 freigesetzt. Dies deutet auf die Freisetzung von FGF–2 durch die von SP ausgelöste Degranulation der MC. Schon früher wurde Zusammenhang zwischen der Degranulation und der Freisetzung von FGF–2 vermutet, da immunhistochemisch gezeigt wurde das FGF–2 sowohl in den Granula als auch in der Umgebung degranulierter MC nachweisbar ist[75]. Offensichtlich wird das in den Granula gespeicherte FGF–2 durch die Aktivierung der Zelle freigesetzt. Die Freiset-

zung scheint gleichmäßig zu erfolgen. Es fällt kein deutlicher Unterschied in der Intensität bei einzelnen Zeitpunkten auf. Die de novo–Synthese eines Proteins innerhalb einer Zelle dauert je nach Proteingrösse unterschiedlich lange, in jedem Fall einige Stunden. Die Degranulation erfolgt dagegen sehr schnell und ist nach etwa 30 min beendet. Da das SP gleich zu Beginn den Zellen zugeführt wurde, konnte folglich nur das schon vorher in der Zelle beziehungsweise in den Granula gespeicherte FGF–2 freigesetzt worden sein. Das durch die Stimulation neu–synthetisierte FGF–2 konnte nicht durch die Deganulation aus der Zelle gelangen, da diese vor der Fertigstellung des Proteins erfolgte. Auch kann zumindestens bei dem 4 und 6h–Wert davon ausgegangen werden, dass die Synthese noch nicht abgeschlossen war. Die Versuche bestätigen die Annahme, dass das in den Granula gespeicherte FGF–2 bei der Degranulation der Zelle aus der Zelle geschleust wird.

5.2.2 Stimulierte FGF–2–Sekretion

Im ersten Teil wurde gezeigt, dass bestimmte Zytokine die Synthese von FGF–2 in humanen MC anregen. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass FGF–2 bei der Degranulierung von MC in den Extrazellulärraum gelangt. Folglich müssten MC, die mit einem dieser Zytokin präinkubiert werden und denen dann später ein aktivierender Stoff zugegeben wurde, mehr FGF–2 freisetzen als eine nicht präinkubierte Kontrollgruppe. Die aktivierten MC setzten erwartungsgemäß mehr FGF–2 frei als die Kontrollzellen. Es war aber kein Zusammenhang zwischen der Präinkubation und der FGF–2–Freisetzung erkennbar. Das heißt die präinkubierten Zellen setzten nicht mehr FGF–2 frei als die nicht präinkubierten Zellen. Offenbar steht die Synthese von FGF–2 und dessen Freisetzung über die Degranulation nicht in direkter Beziehung. Die voran gegangenen Versuche zeigten, dass durch die Degranulation das in den Granula der Zelle gespeicherte FGF–2 freigesetzt wurde. Eine gesteigerte FGF–2–Synthese in den MC führte jedoch nicht zu einer gesteigerten Freisetzung durch die Degranulation. Beim 6–Stunden–Wert kann davon ausgegangen das die IL–4 induzierte Neusynthese von FGF–2 zum Zeitpunkt der Degranulation der Zellen noch nicht abgeschlossen war. So kann es sich bei dem freigesetzten FGF–2 nur um schon gespeichertes handeln. Auch nach 16 Stunden

setzten die präinkubierten MC nicht mehr FGF–2 frei, als die nicht präinkubierten Zellen. Vielleicht wird das neu–synthetisierte FGF–2 nicht sofort in die Sekretionsgranula der MC transportiert und verlässt die Zelle aus diesem Grund bei der Degranulation nicht. Weiterhin ist denkbar, das FGF–2 nur teilweise über die schon diskutierte Komplexbildung in den Sekretionsgranula gebunden wird und dass daneben ein Weg existiert, durch einen nicht bekannten molekularen Mechanismus das Protein in den klassischen Sekretions–Pathway der Zelle zu schleusen[75]. Diese Interpretation scheint schon aus dem Grund naheliegend, dass FGF–2 von einer Vielzahl von Zelltypen synthetisiert und freigesetzt wird, die nicht die Fähigkeit zur Degranulation besitzen. Zu diesen Zellen gehören beispielsweise Fibroblasten und die Endothelzellen von Gefäße[7]. Offenbar existiert auch bei diesen Zellen eine Möglichkeit, die Sekretion des Proteins zu veranlassen. So könnte man die vorliegenden widersprüchlichen Ergebnisse auch so interpretieren, dass FGF–2 zwar bei der Degranulation der MC freigesetzt wird, die Sekretion aber gleichzeitig auf einem anderen intrazellulären Weg erfolgt. Somit führt die durch Stimulantien veränderte Syntheseleistung nicht zu einer vermehrten Freisetzung durch die Degranulation. Hinweise auf einen solchen Mechanismus geben die Forschungsergebnisse von LaVallee et al. Sie konnten zeigen, da FGF–1 einen Komplex mit einem Protein bildet, das strukturell eine große Homologität zu Synaptotagmin–1 aufweist. Synaptotagmin–1 ist ein Vesikel–Protein, das in die Exocytose und Aufnahme von Transmittern im synaptischen Spalt involviert ist, indem es Vesikeln bei der Zielerkennung und der Fusion mit der präsynaptischen Membran hilft. Das mit FGF–2 Komplexe bildende Protein könnte eine ähnliche Funktion haben und beispielsweise den Wachstumsfaktor oder das den Wachstumsfaktor synthetisierende Ribosom zum Endoplasmatische Retikulum steuern und dort eine Fusion vermitteln[106, 107].

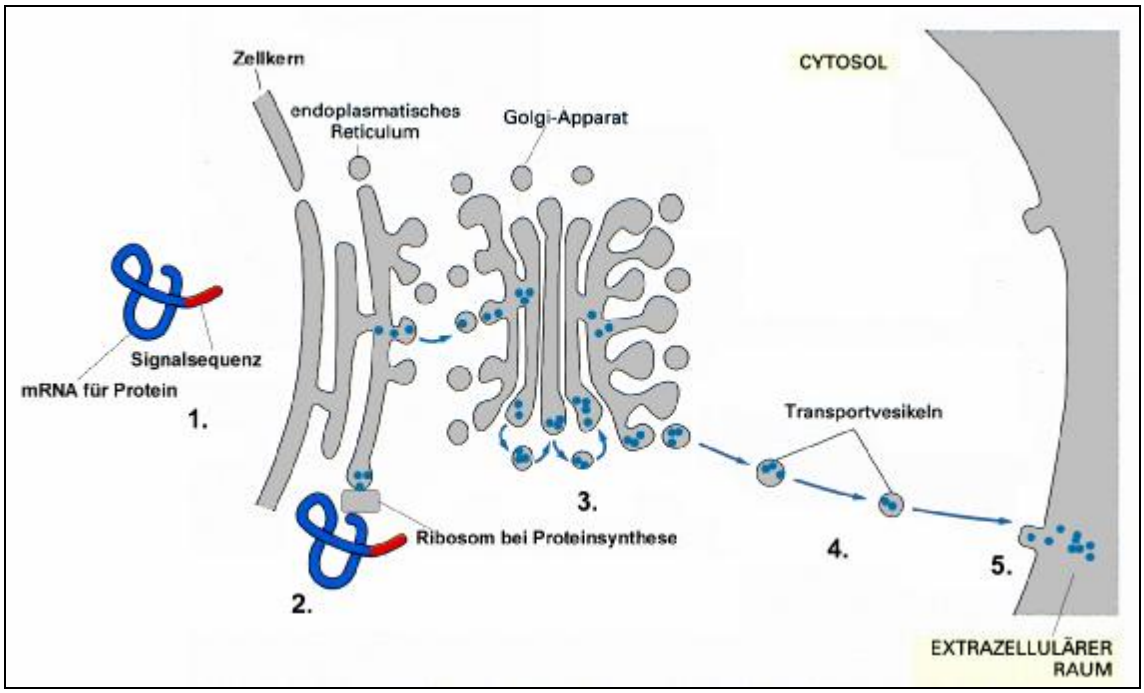


Abbildung 36: Klassischer Sekretionspathway eukarionter Zellen modifiziert nach B. Alberts[108], **1**. Bildung der mRNA im Zellkern **2**. am Ribosom wird die mRNA in die AS–Sequenz translatiert, durch die Signalsequenz erkennt das Ribosom den Bestimmungsort Endoplasmatisches Retikulum und bindet dort, die Proteine gelangen so vom Cytosol in das ER **3**. die Proteine wandern vom ER in den Golgi–Apparat **4**. durch Membranabschnürungen bilden sich Transportvesikel 4. In diesen werden die Proteine in Richtung Zellmembran transportiert **5**. die Vesikel verschmelzen mit der Zellmembran und ihr Inhalt wird in den Extrazellulärraum sezerniert

Nicht zu vernachlässigen ist die Veränderung der Zellen durch die Kulturbedingungen. Obwohl bei dieser Art von in vitro–Versuchen physiologische Bedingungen sehr gut nachgeahmt werden können, sind sie doch verändert. Besonders Zell–Zell–Kontakte haben für MC großen Einfluss auf deren Funktion. Dies zeigt auch die Entwicklung und Reifung der Zellen im Gewebe. Diese Art der Interaktionen fehlten in den durchgeführten Versuchen vollständig und sind vielleicht von Bedeutung.

5.2.3 Der Einfluss von UV–Licht auf die FGF–2–Freisetzung

Die Einflüsse von Licht auf menschliche Zellen stellen sich sehr vielfältig dar und sind sowohl von dessen Wellenlänge als auch von dessen Intensität abhängig. Schon früh

hat man die positiven Effekte von Licht bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen erkannt. Zu diesen Erkrankungen gehören die Psoriasis, die Sklerodermie und die atopische Dermatitis. Deren Symptomatik verbessert sich bei Sonnenlichtexposition und lenkte so das medizinische Interesse auf die zugrunde liegenden Mechanismen. Erst in den letzten Jahren sind wesentliche neue Erkenntnisse zur Veränderung der Histaminfreisetzung von MC unter UV–Bestrahlung und zum apoptotischen Verhalten der Zellen nach Bestrahlung gewonnen worden.

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuch evaluierte die Veränderung der Freisetzung von FGF–2 aus humanen MC nach Bestrahlung. Humane MC wurden mit Licht verschiedener Wellenlänge bestrahlt und anschließend kultiviert. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde die Menge an freigesetzten FGF–2 ermittelt, um so auf mögliche Einflüsse durch die Bestrahlung mit UV–Licht schließen zu können. Nach Bestrahlung mit UVA_1–Licht sank die Freisetzung von FGF–2 auf bis zu 50%, $PUVA_1$.verstärkte diesen Effekt noch. UVB–Licht hatte dagegen keinen Einfluss.

Als Ursachen für diese reduzierte Freisetzung kommen unterschiedliche Mechanismen in Betracht. UVA_1–Licht führt zum oxidativen Stress von Zellen. Dieser kann Schäden der DNA hervorrufen, die Transkription und Replikation unterbrechen und Proteine in Ihrer Struktur zu verändern[98, 109, 110]. So wird der gesamte Stoffwechsel der Zelle negativ beeinflusst. $PUVA_1$–Bestrahlung schädigt den DNA–Doppelstrang, durch die Bildung bestimmter Photoaddukte aus Psoralen und den Pyrimidinbasen der DNA führt[99]. Diese Veränderungen könnten das Ablesen der genetischen Erbinformation stören, was dann zu einer verminderten mRNA Bildung und damit auch zu einer verminderten Synthese des Wachstumsfaktors führt. So kann die verringerte Freisetzung sowohl aus der verringerten Syntheseleistung der Zellen, aber auch durch einen gestörten Freisetzungsmechanismus oder der Schädigung der Proteine resultieren. Beide Wirkungsweisen kommen als mögliche Begründung für die verminderte Sekretion in Betracht. Die Schädigung der Proteine durch UVA_1 in der Zelle geschieht innerhalb kürzester Zeit und ihre Auswirkungen sind unmittelbar nachweisbar. Schäden auf DNA–Ebene sind langfristiger und greifen nachhaltiger in den Stoffwechsel der Zelle ein. Sie werden auch durch UVB–Strahlen verursacht. Da aus der Bestrahlung mit UVB–Licht in diesen Versuchen kaum eine Veränderung resultierte, ist die verringerte Freisetzung des Wachstumsfaktors wahrscheinlich nicht primär durch DNA Schäden bedingt.

5.3 Der Einfluss von Proteaseinhibitoren auf FGF–2 und MC

Die MC enthält eine Fülle verschiedener Mediatoren. Zu diesen Substanzen gehören auch die Tryptase und Chymase. Sie aktivieren und inaktivieren Entzündungsmediatoren und werden zum Teil für den bei chronischen Erkrankungen erforderlichen Gewebeumbau verantwortlich gemacht. Sie gehören zu der Stoffgruppe der Proteinasen und bauen Proteine enzymatisch ab. Deshalb ist denkbar, dass auch FGF–2 durch sie verdaut wird und damit die Versuchsergebnisse verändert werden. Um auszuschließen, dass die Messwerte durch solche enzymatischen Prozesse beeinflusst werden, wurden MC mit Proteaseinhibitoren inkubiert, stimuliert und anschließend die FGF–2–Synthese und –Freisetzung gemessen. Die Vorversuche zum Verhalten der Zellen auf die Proteaseinhibitoren wurden mit HMC–1–Zellen, einer Mastzelllinie, durchgeführt. Es wurde die Proliferation und die Zellgröße der Zellen beurteilt mit dem Ergebnis, dass die Inhibitoren in Abhängigkeit von der Konzentration beides verringern. Erst bei einer Verdünnung von 1:400 blieben Zahl und Größe der Zellen nahezu unbeeinflusst. Daher wurde mit dieser Konzentrationen in den weiteren Versuchen gearbeitet. Die Ergebnisse zeigen bei allen mit Proteaseinhibitoren inkubierten Proben (sowohl bei den mit SP stimulierten als auch bei den unstimulierten Proben) deutlich verringerte FGF–2–Konzentrationen im Überstand und in den Zelllysaten. Die zelleigenen Proteasen scheinen also das FGF–2 nicht wieder abzubauen. Dabei ist wahrscheinlich von Bedeutung, dass FGF–2 als Komplex an Heparin und Chondroitinsulfat gebunden vorliegt, wodurch es vor dem enzymatischen Abbau geschützt wird. Zu diesem Ergebnis muss aber kritisch angemerkt werden, dass durch die Proteaseinhibitoren scheinbar der gesamte Stoffwechsel der Zelle verändert wird (verringerte FGF–2–Synthese), und damit nur bedingt von einem physiologischen Verhalten der MC ausgegangen werden kann.

6 Zusammenfassung

FGF–2 ist als Wachstumsfaktor an vielen verschieden Vorgängen des menschlichen Organismus beteiligt. Dazu gehören sowohl physiologische Prozesse wie die Wundheilung nach Verletzungen als auch vielfältige pathologische Prozesse, denen FGF–2 als pathogenetischer Faktor zugeordnet wird. Lange Zeit wurden Fibroblasten als Hauptproduzenten von FGF–2 angesehen, aber mittlerweile schließt die derzeitige Forschung auch MC als FGF–2–Produzenten ein. Damit gewinnen MC Einfluss auf die oben erwähnten physiologischen und pathologischen Prozesse.

In dieser Arbeit wurden MC aus menschlichen Geweben isoliert und bezüglich der FGF–2–Synthese und –Freisetzung untersucht. Es wurde besonders die Syntheseleistung nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen analysiert. Die Ergebnisse zeigten sowohl auf Protein–Ebene als auch auf mRNA–Ebene, dass die FGF–2–Synthese durch die verwendeten Substanzen moduliert wurde. Durch Stimulationen mit a–IgE, SP, IL–4, IL–6 und IL–8 wurde eine gesteigerte FGF–2–Synthese induziert. Weiterhin zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass bei der Degranulation der MC der Wachstumsfaktor freigesetzt wird. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss von UV–Licht auf die Freisetzung von FGF–2 untersucht. Hierbei zeigte besonders UVA_1–und $PUVA_1$–Bestrahlung einen inhibieren Effekt auf die Sekretion des Proteins. Zelleigene Proteasen scheinen keinen Einfluss auf den Wachstumsfaktor auszuüben.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die FGF–2–Synthese in MC von äußeren Faktoren abhängig ist. MC können dadurch auf den Verlauf von pathologischen und physiologischen Vorgänge Einfluss nehmen. Die Funktion von MC im Immunsystem scheint sehr weitreichend und wirft weitere Fragen auf. Eine Modulation der FGF–2–Freisetzung durch UV Licht ergibt insbesondere bei Hauterkrankungen mögliche Aspekte die Wirkung der UV–Therapie weiter aufzuklären.

Abkürzungsverzeichnis

8–MOP	8–Methoxypsoralen
Btk	Bruton's tyrosine kinase
Ca^{2+}	Calzium
Ca–Iono	Calzium Ionophore
CD	Cluster of Differentiation
CRAC–Kanäle	Calcium Release Activated Calcium–Kanäle
CTMC	connective tissue mast cell
DAG	Diacylglycerin
ELISA	Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF–R	Fibroblast Growth Factor Receptor
GM–CSF	Granulocyte Macrophage–Colony Stimulating Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molekule
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IP_3	Inositoltriphosphat
MAPK	Mitogen Activated Proteinkinase
MC	Mastzelle
MMC	mucosal mast cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
NaCl	Natrium Chlorid
NF–AT	Nuclear Factor of Activated T–cells
NK–Zellen	Natürliche Killer–Zellen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol–12–Myristat–13–Azetat
RT–PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SCF	Stem Cell Factor

SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
SP	Substanz P
SNARE	Soluble N–ethylmaleimide–sensitive factor attachment protein receptor
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Literaturverzeichnis

[1] Valent, P.; Schernthaner, G. H.; Sperr, W. R.; Fritsch, G.; Agis, H.; Willheim, M.; Buhring, H. J.; Orfao, A. und Escribano, L. (2001): Variable expression of activation-linked surface antigens on human mast cells in health and disease, Immunol Rev 179, Seite 74-81.

[2] (2002): Mini Symposium 3: Mast cell and basophils, Allergy 57 [Suppl 73], Seite 11-12.

[3] Henz, B. M.; Maurer, M.; Lippert, U.; Worm, M. und Babina, M. (2001): Mast cells as initiators of immunity and host defense, Exp Dermatol 10 [1], Seite 1-10.

[4] Ehrlich, Paul (1878): Beiträge zur Therapie und Praxis der histologischen Färbung, Dissertation der Universität Leipzig.

[5] Kirshenbaum, A. S.; Kessler, S. W.; Goff, J. P. und Metcalfe, D. D. (1991): Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells, Journal of Immunology 146 [5], Seite 1410-1415.

[6] Janeway, C.A. Travers, P (1997): Immunologie, 2. Auflage. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

[7] Bradding, P. und Holgate, S. T. (1999): Immunopathology and human mast cell cytokines, Crit Rev Oncol Hematol 31 [2], Seite 119-33.

[8] Gurish, M. F. und Austen, K. F. (2001): The diverse roles of mast cells, J Exp Med 194 [1], Seite F1-5.

[9] Lorentz, A.; Schuppan, D.; Gebert, A.; Manns, M. P. und Bischoff, S. C. (2002): Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on human mast cells to extracellular matrix proteins, Blood 99 [3], Seite 966-972.

[10] Pawankar, R. ; Okuda, M.; Yssel, H. ; Okumura, K. und Ra, Ch. (1997): Nasal Mast Cells in Perennial Allergic Rhinitics Exhibit Increased Expression of the FceRI, CD40L, IL-4 and IL-13, and can Induce IgE Synthesis in B Cells, J. Clin. Invest. 99 [7], Seite 1492-1499.

[11] Shelburne, C. P. und Ryan, J. J. (2001): The role of Th2 cytokines in mast cell homeostasis, Immunol Rev 179, Seite 82-93.

[12] Algermissen, B.; Hermes, B.; Feldmann-Boeddeker, I.; Bauer, F. und Henz, B. M. (1999): Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars, Exp Dermatol 8 [3], Seite 193-8.

[13] Matsunaga, Y. und Terada, T. (2000): Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases, Liver 20 [2], Seite 152-6.

[14] Beil, W. J. und Pammer, J. (2001): In situ detection of the mast cell proteases chymase and tryptase in human lung tissue using light and electron microscopy, Histochem Cell Biol 116 [6], Seite 483-93.

[15] Buckley, M. G.; McEuen, A. R. und Walls, A. F. (1999): The detection of mast cell subpopulations in formalin-fixed human tissues using a new monoclonal antibody specific for chymase, J Pathol 189 [1], Seite 138-43.

[16] Bradding, P.; Okayama, Y.; Howarth, P. H.; Church, M. K. und Holgate, S. T. (1995): Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content, J Immunol 155 [1], Seite 297-307.

[17] Ghannadan, M.; Baghestanian, M.; Wimazal, F.; Eisenmenger, M.; Latal, D.; Kargul, G.; Walchshofer, S.; Sillaber, C.; Lechner, K. und Valent, P. (1998): Phenotypic characterization of human skin mast cells by combined staining with toluidine blue and CD antibodies, J Invest Dermatol 111 [4], Seite 689-95.

[18] Saarinen, J. V.; Harvima, R. J.; Naukkarinen, A.; Horsmanheimo, M. und Harvima, I. T. (2001): Interleukin-4-positive mast cells are highly associated with the extent of immediate allergic wheal reaction in the skin, Allergy 56 [1], Seite 58-64.

[19] Bauer, O. und Razin, E. (2000): Mast Cell-Nerve Interactions, News Physiol Sci 15, Seite 213-218.

[20] Pawankar, R. (2001): Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network, Curr Opin Allergy Clin Immunol 1 [1], Seite 3-6.

[21] Saarinen, J. V.; Harvima, R. J.; Naukkarinen, A.; Horsmanheimo, M. und Harvima, I. T. (2001): The release of histamine is associated with the inactivation of mast cell chymase during immediate allergic wheal reaction in the skin, Clin Exp Allergy 31 [4], Seite 593-601.

[22] Worm, M. und Henz, B. M. (1997): Molecular mechanisms of IgE regulation, Hautarzt 48 [10], Seite 773-82.

[23] Church, M. K.; Okayama, Y. und Bradding, P. (1994): The role of the mast cell in acute and chronic allergic inflammation, Ann N Y Acad Sci 725, Seite 13-21.

[24] Bradding, P. und Conley, E. C. (2002): Human mast cell ion channels, Clin Exp Allergy 32 [7], Seite 979-83.

[25] Kraneveld, A. D.; Van Der Kleij, H. P.; Kool, M.; Van Houwelingen, A. H.; Weitenberg, A. C.; Redegeld, F. A. und Nijkamp, F. P. (2002): Key role for mast cells in nonatopic asthma, J Immunol 169 [4], Seite 2044-53.

[26] Bradding, P. ; Feather, I. H. ; Wilson, S. ; Bardin, P. G. ; Heusser, C. H.; Holgate, S. T. und Howarth, P. H. (1993): Immunolocalization of Cytokines in the Nasal Mucosa of Normal and Perennial Rhinitic Subjects, Journal of Immunology 151 [7], Seite 3853-3865.

[27] Di Lorezo, G.; Drago, A. ; Pellitteri, M. E.; Candore, G.; Colombo, A. und Caruso, C. (2001): Measurement of Inflammatory Mediators of Mast Cells and Eosinophils in Native Nasal Lavage Fluid in Nasal Polyposis, Int Arch Allergy Immunol [125], Seite 164-175.

[28] Nielsen, L. P.; Mygind, N. und Dahl, R. (2001): Intranasal corticosteroids for allergic rhinitis: superior relief?, Drugs 61 [11], Seite 1563-79.

[29] Demitsu, T.; Inoue, T.; Kakurai, M.; Kiyosawa, T.; Yoneda, K. und Manabe, M. (2002): Activation of mast cells within a tumor of angiosarcoma: ultrastructural study of five cases, J Dermatol 29 [5], Seite 280-9.

[30] Sugerman, P. B.; Savage, N. W.; Walsh, L. J.; Zhao, Z. Z.; Zhou, X. J.; Khan, A.; Seymour, G. J. und Bigby, M. (2002): The pathogenesis of oral lichen planus, Crit Rev Oral Biol Med 13 [4], Seite 350-65.

[31] Zhao, Z. Z. ; Savage, N. W. und Walsh, L. J. (1998): Associations between mast cells and laminin in oral lichen planus, J Oral Pathol Med 27 [4], Seite 163-7.

[32] Zhao, Z. Z.; Savage, N. W.; Sugerman, P. B. und Walsh, L. J. (2002): Mast cell/T cell interactions in oral lichen planus, J Oral Pathol Med 31 [4], Seite 189-95.

[33] Riede, UN (1998): Taschenatlas der allgemeinen Pathologie, Thieme.

[34] Church, M. K.; Lowman, M. A.; Rees, P. H. und Benyon, R. C. (1989): Mast cells, neuropeptides and inflammation, Agents Actions 27 [1-2], Seite 8-16.
[35] Artuc, M.; Hermes, B.; Steckelings, U. M.; Grutzkau, A. und Henz, B. M. (1999): Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders?, Exp Dermatol 8 [1], Seite 1-16.
[36] Stassen, M.; Hultner, L.; Muller, C. und Schmitt, E. (2002): Mast cells and inflammation, Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 50 [3], Seite 179-85.
[37] Hermes, B.; Welker, P.; Feldmann-Boddeker, I.; Kruger-Krasagakis, S.; Hartmann, K.; Zuberbier, T. und Henz, B. M. (2001): Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars, J Invest Dermatol 116 [3], Seite 387-93.
[38] Blair, R. J. ; Homg, M. ; Marchese, M.J.; Ren, Sh. und Gruber, B. L. (1997): Human Mast Cells Stimulate Vascular Tube Formation, J. Clin. Invest. 99 [11], Seite 2691-2700.
[39] Gruber, B. L.; Marchese, M. J. und Kew, R. (1995): Angiogenic factors stimulate mast-cell migration, Blood 86 [7], Seite 2488-93.
[40] Levi-Schaffer, F. und Pe'er, J. (2001): Mast cells and angiogenesis, Clin Exp Allergy 31 [4], Seite 521-4.
[41] Huttunen, M.; Aalto, M. L.; Harvima, R. J.; Horsmanheimo, M. und Harvima, I. T. (2000): Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializating and chronic wounds, Exp Dermatol 9 [4], Seite 258-65.
[42] Czarnetzki, B. M.; Grabbe, J.; Kolde, G.; Kruger-Krasagakes, S.; Welker, P. und Zuberbier, T. (1995): Mast cells in the cytokine network: the what, where from and what for, Exp Dermatol 4 [4 Pt 2], Seite 221-6.
[43] Hermes, B. ; Feldmann-Böddeker, I. ; Welker, P. ; Algermissen, B.; Steckelings, M. U.; Grabbe, J. und Henz, B. M. (2000): Altered Expression of Mast Cell Chymase and Tryptase and of c-Kit in Human Cutaneous Scar Tissue, J Invest Dermatol 114, Seite 51-55.
[44] Trautmann, A.; Krohne, G.; Brocker, E. B. und Klein, C. E. (1998): Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4, J Immunol 160 [10], Seite 5053-7.
[45] Gibbs, B. F.; Wierecky, J.; Welker, P.; Henz, B. M.; Wolff, H. H. und Grabbe, J. (2001): 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 10 [5], Seite 312-20.
[46] Holgate, S. T.; Benyon, R. C.; Lowman, M. A. und Church, M. K. (1989): Activation of human mast cells after immunoglobulin E-dependent and neuropeptide stimulation, Prog Clin Biol Res 297, Seite 103-12; discussion 112-3.
[47] Lowman, M. A.; Benyon, R. C. und Church, M. K. (1988): Characterization of neuropeptide-induced histamine release from human dispersed skin mast cells, Br J Pharmacol 95 [1], Seite 121-30.
[48] Lowman, M. A.; Rees, P. H.; Benyon, R. C. und Church, M. K. (1988): Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli, J Allergy Clin Immunol 81 [3], Seite 590-7.

[49] Berger, P.; N'Guyen, C.; Buckley, M.; Scotto-Gomez, E.; Marthan, R. und Tunon-De-Lara, J. M. (2002): Passive sensitization of human airways induces mast cell degranulation and release of tryptase, Allergy 57 [7], Seite 592-9.
[50] Mayr, S. I.; Zuberi, R. I.; Zhang, M.; de Sousa-Hitzler, J.; Ngo, K.; Kuwabara, Y.; Yu, L.; Fung-Leung, W. P. und Liu, F. T. (2002): IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models, J Immunol 169 [4], Seite 2061-8.
[51] Ferry, X.; Brehin, S.; Kamel, R. und Landry, Y. (2002): G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues, Peptides 23 [8], Seite 1507.
[52] Tkaczyk, C.; Metcalfe, D. D. und M., Gilfillan A. (2002): FcyRI and Other Fc Receptors on Human Mast Cells, ACI International 14 [3], Seite 109-115.
[53] Baumruker, T. und Prieschl, E.E. (2001): Mast Cells and their Activation - from the Molecular Mechanisms to Clinical Relevance, Mod. Asp. Immunobiol. 1 [6], Seite 259-262.
[54] Ohtake, H.; Ichikawa, N.; Okada, M. und Yamashita, T. (2002): Transmembrane Phosphoprotein Csk-Binding Protein/ Phosphoprotein Associated With Glycosphingolipid-Enriched Microdomains as a Negative Feedback Regulator of Mast Cell Signaling Through the FceRI, Journal of Immunology 168, Seite 2087-2090.
[55] Ornitz, D. M. und Itoh, N. (2001): Fibroblast growth factors, Genome Biol 2 [3], Seite REVIEWS3005.
[56] Klagsbrun, M. (1989): The fibroblast growth factor family: structural and biological properties, Prog Growth Factor Res 1 [4], Seite 207-35.
[57] Nugent, M. A. und Iozzo, R. V. (2000): Fibroblast growth factor-2, Int J Biochem Cell Biol 32 [2], Seite 115-20.
[58] Hamada, H.; Vallyathan, V.; Cool, C. D.; Barker, E.; Inoue, Y. und Newman, L. S. (2000): Mast cell basic fibroblast growth factor in silicosis, Am J Respir Crit Care Med 161 [6], Seite 2026-34.
[59] Qu, Z.; Huang, X.; Ahmadi, P.; Stenberg, P.; Liebler, J. M.; Le, A. C.; Planck, S. R. und Rosenbaum, J. T. (1998): Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor, Int Arch Allergy Immunol 115 [1], Seite 47-54.
[60] Reed, J. A.; Albino, A. P. und McNutt, N. S. (1995): Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor, Lab Invest 72 [2], Seite 215-22.
[61] Artuc, M.; Steckelings, U. M. und Henz, B. M. (2002): Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors, J Invest Dermatol 118 [3], Seite 391-5.
[62] Okada - Ban, M.; Thiery, J. P. und Jouanneau, J. (2000): Fibroblast growth factor - 2, The International Journal of Biochemistry & and Cell Biology 32, Seite 263-267.
[63] Loo, B. M.; Kreuger, J.; Jalkanen, M.; Lindahl, U. und Salmivirta, M. (2001): Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4, J Biol Chem 276 [20], Seite 16868-76.
[64] Brown, K. J.; Hendry, I. A. und Parish, C. R. (1995): Acidic and basic fibroblast growth factor bind with differing affinity to the same heparan sulfate proteoglycan on BALB/c 3T3 cells: implications for potentiation of growth factor action by heparin, J Cell Biochem 58 [1], Seite 6-14.

[65] Chang, Z.; Meyer, K.; Rapraeger, A. C. und Friedl, A. (2000): Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to assemble the fibroblast growth factor receptor complex in situ, Faseb J 14 [1], Seite 137-44.
[66] Moscatelli, D. (1992): Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix, J Biol Chem 267 [36], Seite 25803-9.
[67] Wong, P.; Hampton, B.; Szylobryt, E.; Gallagher, A. M.; Jaye, M. und Burgess, W. H. (1995): Analysis of putative heparin-binding domains of fibroblast growth factor-1. Using site-directed mutagenesis and peptide analogues, J Biol Chem 270 [43], Seite 25805-11.
[68] Wong, P. und Burgess, W. H. (1998): FGF2-Heparin co-crystal complex-assisted design of mutants FGF1 and FGF7 with predictable heparin affinities, J Biol Chem 273 [29], Seite 18617-22.
[69] Pellegrini, L.; Burke, D. F.; von Delft, F.; Mulloy, B. und Blundell, T. L. (2000): Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin, Nature 407 [6807], Seite 1029-34.
[70] Dowd, C. J.; Cooney, C. L. und Nugent, M. A. (1999): Heparan sulfate mediates bFGF transport through basement membrane by diffusion with rapid reversible binding, J Biol Chem 274 [8], Seite 5236-44.
[71] Nagendra, H. G.; Harrington, A. E.; Harmer, N. J.; Pellegrini, L.; Blundell, T. L. und Burke, D. F. (2001): Sequence analyses and comparative modeling of fly and worm fibroblast growth factor receptors indicate that the determinants for FGF and heparin binding are retained in evolution, FEBS Lett 501 [1], Seite 51-8.
[72] Pellegrini, L. (2001): Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view, Curr Opin Struct Biol 11 [5], Seite 629-34.
[73] D'Amore, P. A. (1990): Modes of FGF release in vivo and in vitro, Cancer Metastasis Rev 9 [3], Seite 227-38.
[74] Qu, Z.; Liebler, J. M.; Powers, M. R.; Galey, T.; Ahmadi, P.; Huang, X. N.; Ansel, J. C.; Butterfield, J. H.; Planck, S. R. und Rosenbaum, J. T. (1995): Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma, Am J Pathol 147 [3], Seite 564-73.
[75] Qu, Z.; Kayton, R. J.; Ahmadi, P.; Liebler, J. M.; Powers, M. R.; Planck, S. R. und Rosenbaum, J. T. (1998): Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in mast cell secretory granules. Morphological evidence for bfgf release through degranulation, J Histochem Cytochem 46 [10], Seite 1119-28.
[76] Neufeld, G. und Gospodarowicz, D. (1986): Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors, J Biol Chem 261 [12], Seite 5631-7.
[77] Ballinger, M. D.; Shyamala, V.; Forrest, L. D.; Deuter-Reinhard, M.; Doyle, L. V.; Wang, J. X.; Panganiban-Lustan, L.; Stratton, J. R.; Apell, G.; Winter, J. A.; Doyle, M. V.; Rosenberg, S. und Kavanaugh, W. M. (1999): Semirational design of a potent, artificial agonist of fibroblast growth factor receptors, Nat Biotechnol 17 [12], Seite 1199-204.
[78] Knox, S.; Merry, C.; Stringer, S.; Melrose, J. und Whitelock, J. (2002): Not all perlecans are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors, J Biol Chem 277 [17], Seite 14657-65.

[79] Strutz, F.; Zeisberg, M.; Renziehausen, A.; Raschke, B.; Becker, V.; van Kooten, C. und Muller, G. (2001): TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2), Kidney Int 59 [2], Seite 579-92.
[80] Facchiano, F.; Lentini, A.; Fogliano, V.; Mancarella, S.; Rossi, C.; Facchiano, A. und Capogrossi, M. C. (2002): Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo, Am J Pathol 161 [2], Seite 531-41.
[81] Powers, M. R.; Qu, Z.; LaGesse, P. C.; Liebler, J. M.; Wall, M. A. und Rosenbaum, J. T. (1998): Expression of basic fibroblast growth factor in nasal polyps, Ann Otol Rhinol Laryngol 107 [10 Pt 1], Seite 891-7.
[82] Qu, Z.; Huang, X. N.; Ahmadi, P.; Andresevic, J.; Planck, S. R.; Hart, C. E. und Rosenbaum, J. T. (1995): Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease, Lab Invest 73 [3], Seite 339-46.
[83] Akimoto, S.; Ishikawa, O.; Iijima, C. und Miyachi, Y. (1999): Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by fibroblast, macrophages and mast cells in hypertrophic scar, Eur J Dermatol 9 [5], Seite 357-62.
[84] Yamamoto, T.; Katayama, I. und Nishioka, K. (1995): Involvement of basic fibroblast growth factor in fibroblast-stimulatory serum activity of a patient with systemic lupus erythematosus and multiple dermatofibromas, Dermatology 191 [4], Seite 281-5.
[85] Murata, M.; Hara, K. und Saku, T. (1997): Dynamic distribution of basic fibroblast growth factor during epulis formation: an immunohistochemical study in an enhanced healing process of the gingiva, J Oral Pathol Med 26 [5], Seite 224-32.
[86] Norrby, K. (1994): Basic fibroblast growth factor and de novo mammalian angiogenesis, Microvasc Res 48 [1], Seite 96-113.
[87] Burchill, S. A. und Westwood, G. (2002): Mechanism of basic fibroblast growth factor-induced cell death, Apoptosis 7 [1], Seite 5-12.
[88] Strutz, F.; Zeisberg, M.; Ziyadeh, F. N.; Yang, C. Q.; Kalluri, R.; Muller, G. A. und Neilson, E. G. (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation, Kidney Int 61 [5], Seite 1714-28.
[89] Westwood, G.; Dibling, B. C.; Cuthbert-Heavens, D. und Burchill, S. A. (2002): Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway, Oncogene 21 [5], Seite 809-24.
[90] Barillari, G. ; Sgadari, C. ; Palladino, C. ; Gendelman, R. ; Caputo, A. ; Morris, C.B. ; Nair, B.C. ; Markham, P. ; Nel, A. ; Sturzl, M. und Ensoli, B. (1999): Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin., J Immunol. 163 [4], Seite 1929-35.
[91] Leeman, S. E. und Ferguson, S. L. (2000): Substance P: an historical perspective, Neuropeptides 34 [5], Seite 249-54.
[92] Fiebich, B. L. und Lieb, K. (2001): Substanz P und neurogene Entzündung, Immunologie Aktuell 1 [6], Seite 148-149.
[93] Church, M. K.; Lowman, M. A.; Robinson, C.; Holgate, S. T. und Benyon, R. C. (1989): Interaction of neuropeptides with human mast cells, Int Arch Allergy Appl Immunol 88 [1-2], Seite 70-8.

[94] Andoh, T.; Nagasawa, T.; Satoh, M. und Kuraishi, Y. (1998): Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice, J Pharmacol Exp Ther 286 [3], Seite 1140-5.

[95] Church, M. K.; Benyon, R. C.; Lowman, M. A.; Hutson, P. A. und Holgate, S. T. (1989): Allergy or inflammation? From neuropeptide stimulation of human skin mast cells to studies on the mechanism of the late asthmatic response, Agents Actions 26 [1-2], Seite 22-30.

[96] Strutz, F.; Zeisberg, M.; Hemmerlein, B.; Sattler, B.; Hummel, K.; Becker, V. und Muller, G. A. (2000): Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation, Kidney Int 57 [4], Seite 1521-38.

[97] Vinkk, AA.; Shreedhar, V.; Roza, L.; Krutmann, J. und Kripke, ML. (1998): Cellular target of UVB-induced DNA damage resulting in lokal supression of contact hypersensitivity, J Photochem Photobiol B 44 [2], Seite 107-11.

[98] Ibbotson, SH; Lampert, CR; Moran, MN; Lynch, MC und Kochevar, IE (1998): Benzoyl peroxide increases UVA-induced plasma membrane damage and lipid oxidation in murine leukemia L1210 cells., J Invest Dermatol 110 [1], Seite 79-83.

[99] Mariano, TM; Vetrano, AM; Gentile, SL; Heck, DE; Whittemore, MS; Guillon, CD; Jabin, I; Rapp, RD; Heindel, ND und Laskin, JD (2002): Cell-impermeant pyridinium derivatives of psoralens as inhibitors of keratinocyte growth., Biochem Pharmacol 63 [1], Seite 31-9.

[100] Dvorak, A. M.; Morgan, E. S. und Weller, P. F. (2001): Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells, Histochem J 33 [7], Seite 397-402.

[101] Hayashi, H; Tsuda, T; Tsurumi, N; Takai, Y; Maeda, M; Takahashi, K und Kimura, I (1987): Anticoagulant substance released from human lung mast cells by stimulation with anti-IgE or Ca-ionophore A23187, Acta Med Okayama 41 [2], Seite 85-7.

[102] Kuchtey, J und Fewtrell, C (1999): Protein kinase C activator PMA reduces the Ca(2+) response to antigen stimulation of adherent RBL-2H3 mucosal mast cells by inhibiting depletion of intracellular Ca(2+) stores., J Cell Physiol 181 [1], Seite 113-23.

[103] Okayama, Y; Uno, D; Hanawa, K und Kurosawa, M (1989): Effect of phorbol myristate acetate (PMA) on diphosphoinositide (DPI) synthesis in rat mast cells granules., Arerugi 38 [2], Seite 80-5.

[104] Yamaguchi, M; Sayama, K und Yano, K (1999): IgE enhances Fce receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fce receptor I expression and mediator release . J Immunol 162, Seite 5455-5465.

[105] Bischoff, SC; Selige, G; Lorentz, A; Sebald, W; Raab, R und Manns, MP (1999): IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells., Proc Natl Acad Sci USA 96, Seite 8080-8085.

[106] LaVallee, TM; Tarantini, F; Gamble, S; Burgess, WH und Maciag, T (1996): Synaptotagmin-1 and FGF-1 homodimer are present as a high molecular weight complex in neutral tissue, FASEB J 10 [A1377].

[107] LaVallee, TM; Tarantini, F; Gamble, S; Mouta Carreira, C; Jackson, A und Maciag, T (1998): Synaptotagmin-1 is required for fibroblast growth factor-1 release., J Biol Chem 273 [35], Seite 22217-23.
[108] B. Alberts, D. Bray, A. Johnson (1999): Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Wiley-VCH Verlag, ISBN: 3-527-30493-2.
[109] Skoog, ML; Ollinger, K und Skogh, M (1997): Microfluorometry using fluorescein diacetate reflects the integrity of the plasma membrane in UVA-irradiated cultured skin fibroblasts., Photodermatol Photoimmunol Photomed 13 [1-2], Seite 37-42.
[110] Gniadecki, R; Christoffersen, N und Wulf, HC (2002): Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species., J Invest Dermatol 118 [4], Seite 582-8.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt in keinen Teilen die Arbeit Anderer dar. Die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.