Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkungen der Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 auf das Funktionsverhalten humaner dermaler Mastzellen nach Stimulation mit anti-IgE und Substanz P

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Marc Strathmann
aus Berlin

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:
1. Herr Prof. Dr. med. T. Zuberbier
2. Herr Prof. Dr. med. M. Ollert
3. Frau Priv.-Doz. Dr. med. B. Wedi

Datum der Promotion: 17. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 DIE ENTDECKUNG DER MASTZELLE 1

1.2 DAS VORKOMMEN UND DIE DIFFERENZIERUNG DER MASTZELLE 1

1.3 DIE HETEROGENITÄT DER MASTZELLE 2

1.4 DIE STIMULATION DER MASTZELLE DURCH ANTI-IGE UND SUBSTANZ P 3

1.5 DIE MEDIATOREN DER MASTZELLE 6

1.5.1 Die erste Phase der Mediatorfreisetzung 6

1.5.2 Die zweite Phase der Mediatorfreisetzung 8

1.5.3 Die dritte Phase der Mediatorfreisetzung 8

1.6 DIE PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DER MASTZELLE 9

1.7 DIE PHOTOTHERAPIE 10

1.8 DIE WIRKMECHANISMEN DER UVB-, UVA-1- UND PUVA-1-THERAPIE 11

2 ZIELSETZUNG 14

3 MATERIAL UND METHODEN 15

3.1 MATERIALIEN 15

3.1.1 Puffer 19

3.1.2 Medien 20

3.2 METHODEN 22

3.2.1 Die Isolierung der Mastzellen 22

3.2.2 Die Aufreinigung der Mastzellen 23

3.2.3 Die Bestrahlung der Mastzellen mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 24

3.2.4 Die Untersuchung der Histaminfreisetzung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (Dosisabhängigkeit) 24

3.2.5 Die Bestimmung der Histaminfreisetzung 25

3.2.6 Die Bestrahlung dermaler Mastzellen für die Tryptase-, die Zytokin- und die LAMP-Bestimmung 26

3.2.7 Die Tryptaseaktivitätsbestimmung 26

3.2.8 Die Untersuchung der basalen Freisetzung von Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor-α bei bestrahlten dermalen Mastzellen 28

3.2.9 Die Bestimmung der Moleküle CD 63 und CD 107a auf bestrahlten und unbestrahlten dermalen Mastzellen 29

3.3 STATISTIK 31

4 ERGEBNISSE 32

4.1 DIE HISTAMINFREISETZUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BESTRAHLUNGSDOSIS 32

4.2 DIE TRYPTASEFREISETZUNG NACH UVB, UVA-1 UND PUVA-1 BESTRAHLUNG 36

4.3 DIE BASALE FREISETZUNG VON INTERLEUKIN-6, INTERLEUKIN-8 UND TUMORNEKROSEFAKTOR-α NACH BESTRAHLUNG MIT UV LICHT 38

4.4 DIE EXPRESSION DER MOLEKÜLE CD 63 UND CD 107A NACH BESTRAHLUNG MIT UV LICHT 41

4.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 46

5 DISKUSSION 48

6 ZUSAMMENFASSUNG 59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 61

LITERATURVERZEICHNIS 62

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT 71

DANKSAGUNG 72

LEBENSLAUF 73

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung der Mastzelle

Die menschliche Mastzelle wurde erstmals 1878 von Paul Ehrlich beschrieben. Im Rahmen seiner Dissertation entdeckte er diese polymorph, häufig jedoch oval bis spindelförmig, geformten Zellen, indem er sie mit Anilin behandelte und dabei einen Farbumschlag von blau nach violett feststellte. Diese als Metachromasie bezeichnete Färbeeigenschaft beruht auf der zahlreich im Zytoplasma vorliegenden basophilen Granula, die aufgrund ihres sulfatierten Glykosaminoglykangehaltes reagiert. Eben diese Granula, die bei der Entdeckung eine so wesentliche Rolle spielte, war nun auch ausschlaggebend für die Namensgebung. Denn sie liegt so dicht gedrängt um den zentralen meist rundlichen Zellkern, dass die Zelle wie gemästet erscheint und seitdem Mastzelle genannt wird.

1.2 Das Vorkommen und die Differenzierung der Mastzelle

Mastzellen haben einen Anteil von 2-8% an den dermalen Zellen. Außer in der Haut, wo sie ihre höchste Besiedlungsdichte von durchschnittlich 7000 Zellen/mm³ aufweisen, kommen sie im Gehirn, in den Alveolarwänden der Lunge, der Adventitia kleinerer Blutgefäße und den Schleimhäuten von Auge, Nase und Gastrointestinaltrakt vor. Auch eine enge Lagebeziehung zu Nervenzellen ist beschrieben worden[1, 2].
Die Vorläuferzellen der Mastzellen, pluripotente hämatopoetische Stammzellen ($CD34^+$, c-kit^+ und $CD13^-$) des Knochenmarks[3], wandern über Blutgefäße in peripheres Gewebe, wo sie transmembranäre SCF-Rezeptoren (c-kit, CD 117) exprimieren. Der Stammzellfaktor SCF (c-kit-Ligand) kann nun an die Vorläuferzellen binden, was letztendlich die Differenzierung zur reifen Mastzellen bewirkt. Auch Interaktionen mit lokal produzierten Zytokinen, sowie weitere unerforschte Mechanismen scheinen bei dem Entwicklungsprozess eine tragende Rolle zu spielen.

Eine von mehreren Möglichkeiten, mit denen sich die 6-20 µm großen, ubiquitär im Bindegewebe vorkommenden Zellen darstellen lassen, ist die saure Toluidinblaufärbung. Hierbei bewirken negativ geladene Glykosaminolglykane, besonders das in der Granula vorliegende Heparin, einen Farbumschlag nach violett.

1.3 Die Heterogenität der Mastzellen

Schon im Jahre 1960 stellte Enerback anhand von Rattenmastzellen fest, dass diese sich in ihrer Struktur, Funktion und histochemischen Eigenschaft beachtlich unterscheiden. Auch die Reaktion auf bestimmte Stimuli, hinsichtlich der Mediatorproduktion und –freisetzung, unterliegt erheblichen Schwankungen.
Angesichts einer solchen Fülle an Unterscheidungsmerkmalen verwundert es nicht, dass es mehrere Klassifikationsmodelle gibt. Bei Rattenmastzellen unterscheidet man hinsichtlich der Lokalisationsorte in CTMC (connective tissue-type mast cells) und MMC (mucosal mast cells). Für die menschlichen Mastzellen gilt als wesentliches Kriterium der unterschiedliche intrazelluläre Gehalt von Tryptase (T) und Chymase (C). So gliedert man die Mastzellen in zwei Subpopulationen, von denen die eine (MC_{TC}) hauptsächlich Tryptase und Chymase beinhaltet. Sie sind überwiegend in der Haut, den Konjunktiven, dem subkutanen Gewebe und der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes anzutreffen. Der andere Subtyp (MC_T) weist in erster Linie nur Tryptase auf und findet sich in der Mukosa von Darm und Lunge. Ferner ist bei den MC_T Mastzellen die enge Lagebeziehung zu T_2-Helferzellen (TH_2-Lymphozyten) auffällig, die sich mit dem gemeinsamen Abwehrmechanismus gegen parasitäre Erkrankungen, erklären lässt[4-7].
Der für dieses Klassifikationsmodell so ausschlaggebende unterschiedliche Gehalt zweier Serinproteasen lässt sich interessanterweise durch Umsetzen der Mastzellen in eine andere Umgebung modifizieren. Darüber hinaus gibt es Krankheiten, die durch eine Veränderung des Verhältnisses der beiden Subpopulationen zustande kommen[8].

1.4 Die Stimulation der Mastzelle durch anti-IgE und Substanz P

Die Aktivierung der Mastzelle kann durch immunologische und nicht-immunologische Stimuli (Trigger) erfolgen. Diese Trigger sind: Immunglobuline (zum Beispiel: IgE), Neuropeptide (z.B.: Substanz P), Zytokine, Peptide beziehungsweise Proteine (z.B.: Komplementsystem-Proteine), Antibiotika (z.B.: Calcium-Ionophor) aber auch Infektionen. Zu dem Aktivierungsprozess gehört per definitionem die auf die Stimulation folgende Degranulation mit der Freisetzung in Granula gespeicherter Mediatoren.
Eine Schlüsselposition bei dem Aktivierungsprozess spielt der tetramerische hochaffine IgE Rezeptor FcεRI[9], der aus einer IgE bindenden α-Kette, einer signalamplifizierenden β-Kette und zwei homologen signalübermittelnden γ-Ketten besteht[10, 11]. Letztere werden bisweilen auch als homodimere Untereinheit beschrieben. Über ITAMs (Immunotyrosine Based Activation Motifs) sind in Abhängigkeit vom Phosphorylierungszustand die Tyrosinkinasen Lyn und Syk an die β- beziehungsweise γ-Kette gebunden[12, 13]. Gehen nun die während der spezifischen Sensibilisierungsphase bei der Typ-I-Sofortreaktion von Plasmazellen produzierten Immunglobuline der Klasse E eine Bindung mit der α-Kette ein, so wird eine Signalkaskade ausgelöst[14]. Notwendige Voraussetzung hierfür ist die Quervernetzung der an Antigene gebundenen Moleküle auf der Mastzelloberfläche. Auch eine direkte Stimulation des Rezeptors, durch bivalente Antikörper kann eine Mastzellaktivierung bewirken.
Zu Beginn der Signalweiterleitung steht die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Lyn, die nun ihrerseits Syk und Btk (Bruton's tyrosine kinase) aktiviert[15-17]. Letztere sind in der Lage die Phospholipase Cγ (PLCγ) zu phosphorylieren, die so aus dem membranständigen Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2), Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) abspalten kann. IP_3 bewirkt eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, was eine Konzentrationserhöhung des Elektrolyts nach sich zieht[18]. Zusätzlich bindet Calcium an sogenannte CRAC-Kanäle (Calcium Release Activated Calcium), so dass diese geöffnet werden und Calcium entlang des Konzentrationsgefälles aus dem Extrazellulärraum einströmen kann[19]. Calcium aktiviert das frei im Zytoplasma vorliegende Calcineurin, welches so den phosphorylierten

Transkriptionsfaktor NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-Cells) durch seine Bindung dephosphorylieren kann. Dieser Komplex vermag nun in den Zellkern einzudringen, wo sich das Calcineurin von NF-AT wieder trennt und zurück ins Zytoplasma wandert[20].
Die durch das DAG aktivierte Proteinkinase C kann, wie auch die Tyrosinkinase Btk, die MAPK-Kaskade (Mitogen Activated Protein Kinase) aktivieren. Bestehend aus gestaffelt angeordneten Kinasen ist diese Kaskade in der Lage Transkriptionsfaktoren wie AP1 (Activator Protein 1) so zu modifizieren, dass eine Translokation in den Nucleus möglich ist. Dort wird dann zusammen mit dem Transkriptionsfaktor NF-AT die Zytokinproduktion, beispielsweise von TNF-α, induziert.
Wie die Sekretion der präformierten in Granula gespeicherten Mediatoren im Einzelnen funktioniert, ist noch ungeklärt. Man geht heute jedoch davon aus, dass ein Calcium bindendes Protein C_E, GTP bindende Proteine, wie Rac 1 und 2 und Cdc 42 aktiviert und so letztendlich die Fusion von Vesikel- und Zellmembran bewirkt. Eine Schlüsselrolle scheint dabei das Zusammenspiel von SNARE-Proteinen (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachement protein receptor) zu haben, die sich auf beiden Zellstrukturen befinden (vesicle SNARE und target SNARE). Durch die Fusion beider Membranen werden nicht nur die gespeicherten Mediatoren ausgeschüttet, sondern auch die auf der Vesikelmembran befindlichen LAMPs (Lysosome Associated Membrane Proteins), zu denen CD107a, CD107b und CD63 gehören, vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert[21-24]. Über die Funktion dieser erst kürzlich im Rahmen der Mastzelldegranulation entdeckten Membranproteine ist man sich noch im Unklaren.
Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass besonders Nervenendigungen die das Neuropeptid Substanz P freisetzen, Gewebe mit einer sehr hohen Mastzelldichte in ihrer Umgebung aufweisen[25-29]. Die direkte Wirkung auf Mastzellen mit der folgenden Degranulation und Histaminfreisetzung konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Es ließ sich zeigen, dass niedrige Dosen des Neuropeptids (im picomolaren Bereich) über Neurokininrezeptoren (NK-Rezeptoren; bei Substanz P besonders der Nk_1-Rezeptor) G-Proteine aktivieren und somit die Mastzelle stimulieren[30-33]. Bei Gabe höherer Dosen (im mikromolaren Bereich) erfolgt zusätzlich eine direkte Aktivierung des Pertussistoxin sensitiven G-Proteins an der Innenseite der Plasmamembran[34, 35]. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich durch die spezielle Strukturformel von Substanz P (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2) verursacht. In Untersuchungen mit modifizierten

Substanz P Molekülen konnte gezeigt werden, dass die histaminfreisetzende Aktivität bedingt ist durch die basische Nh_2 Gruppe neben hydrophobe COOH Gruppe[36].

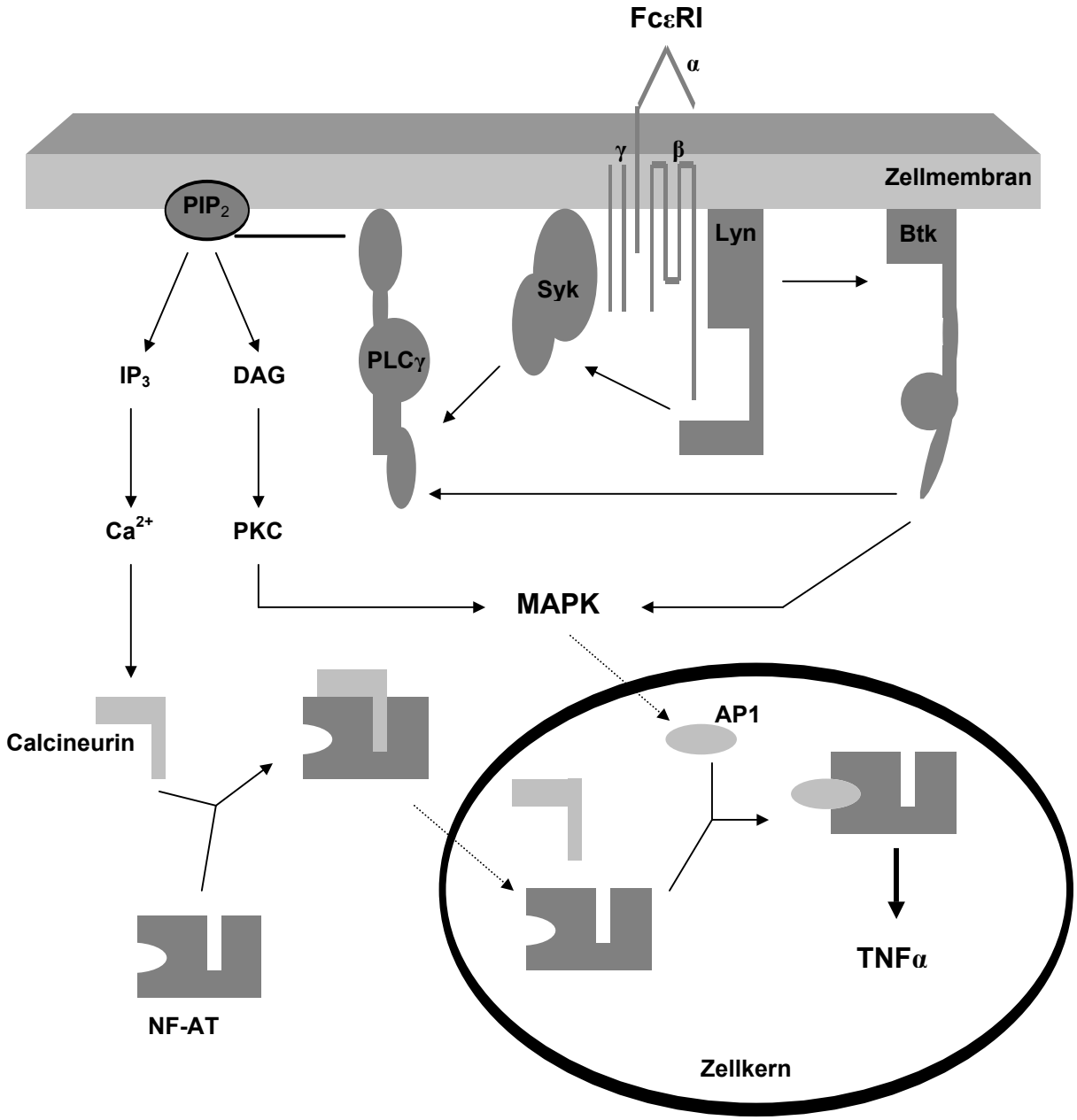

Abb.1: Schematische Darstellung zur Aktivierung der Mastzelle[37, 38]
(Abkürzungen: AP1 = Activator Protein 1; Btk = Bruton's tyrosine kinase; DAG = Diacylglyzerin; IP_3 = Inositoltrisphosphat; MAPK = Mitogen Activated Protein Kinase; NF-AT = Nuclear Factor of Activated T-cells; PIP_2 = Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PKC = Proteinkinase C; PLCγ = Phospholipase Cγ)

1.5 Die Mediatoren der Mastzelle

Neben der direkten Interaktion mit Effektorzellen vermag die Mastzelle über die Ausschüttung ihrer Mediatoren mit der näheren Umgebung zu kommunizieren. Diese Freisetzung gliedert sich in drei zeitlich aufeinander folgende Schübe, von denen der erste innerhalb von Minuten und der letzte innerhalb von Stunden stattfindet. Histamin, Proteoglykane und neutrale Proteasen liegen präformiert in der Mastzellgranula vor und können so direkt nach der Aktivierung sezerniert werden (erster Schub). Der sich anschließende zweite Schub zeichnet sich durch Lipidmediatoren aus, wobei aus membranständiger Arachidonsäure über die Cyclooxygenase Prostaglandine und über die Lipoxygenase Leukotriene synthetisiert werden. Die durch DNA Transkription gebildeten Zytokine entstehen in der Spätphase.
Gemeinsam ist den meisten Mediatoren, dass sich ihr Wirkort auf die Umgebung ihres Freisetzungsortes beschränkt, da sie im Blut relativ schnell abgebaut werden.

1.5.1 Die erste Phase der Mediatorfreisetzung

Die Granula der Mastzelle enthält Histamin, Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A, Cathepsin G, Heparin, Chondroitinsulfat E, Exoglykosidasen und TNF-α.
Das durch Decarboxylierung von Histidin entstehende Histamin liegt mit durchschnittlich 3-8 pg pro Mastzelle gebunden an Proteine oder Proteoglykane vor und kann nach Exozytose an spezifische Rezeptoren binden[7]. Dabei bewirkt die Aktivierung des sogenannten H_1- Rezeptors eine Senkung des Blutdrucks, Erweiterung und Erhöhung der Durchlässigkeit der Blutgefäße, Erregung der glatten Darmmuskulatur, Kontraktion der Bronchien und die von H_2-Rezeptoren eine Verstärkung der Magensaftsekretion und Herzfrequenzsteigerung[39]. Über die Interaktion von Histamin mit Nervenendigungen werden unerwünschte Wirkungen des biogenen Amins, wie Pruritus oder Schmerz ausgelöst.
Zu dem wichtigsten Vertreter der granulagebundenen Proteoglykane gehört Heparin, welches neben der antikoagulierenden Wirkung, Proteasen der MC stabilisiert und die biologische Aktivität vieler Enzyme beeinflusst.

Der Gehalt an Tryptase in humanen Mastzellen variiert je nach Lokalisation. So beinhaltet die dermale Mastzelle durchschnittlich 35pg[40], was einem geschätzten Anteil von 20% am Gesamtproteingehalt entspricht, die Lungenmastzelle 10pg und die Vorhautmastzelle 36pg[40, 41].

Die Tryptase greift auf unterschiedlichste Art und Weise in den Entzündungsmechanismus ein. Sie steigert die Permeabilität der dermalen Kapillaren, fördert die Adhäsion beziehungsweise die Migration von Leukozyten, inaktiviert neurogene Peptide und erleichtert über eine gerinnungshemmende Wirkung den Plasmaeinstrom ins Gewebe. Auch ein Einfluss auf den Auf- und Umbau von Gewebe wird diskutiert. So hat die Serinprotease einen stimulierenden Effekt auf die Synthese und Sekretion von Typ I Kollagen und gilt als potenter Wachstumsfaktor für Fibroblasten, Epithel- und glatte Muskelzellen. Darüber hinaus kann sie Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteasen aktivieren, die praktisch alle Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren können und in der Haut durch UV Strahlung und Zytokine reguliert werden. Im klinischen Alltag ist die Tryptase als Indikator für Mastzellaktivierung in Blut und Körperflüssigkeiten von Bedeutung, da sie eine längere Halbwertszeit als Histamin besitzt[42-46]. So kann beispielsweise bei einer anaphylaktischen Reaktion schon nach 15 Minuten ein erhöhter Tryptasespiegel nachgewiesen werden; Gipfel treten nach ein bis zwei Stunden auf und im Falle einer verzögerten Anaphylaxie sogar noch später.

Auch der Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) wird in nicht unerheblicher Weise in dieser ersten Phase freigesetzt und nimmt so eine Sonderstellung unter den Mediatoren ein, weil sein Hauptanteil in der Spätphase sezerniert wird. Seine Synthese erfolgt vorrangig in aktivierten Makrophagen, aber auch in T- und B- Lymphozyten, NK-Zellen, Endothelzellen, Mastzellen und Astrozyten[47]. Die biologisch aktive Form von TNF-α ist ein trimer strukturiertes, aus 157 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, dass durch seine pleiotropen Funktionen imponiert. Es stimuliert die Immunantwort, sowie die Synthese von Zytokinen und Lymphokinen; es aktiviert katabolische Prozesse und Endothelzellen und Fibroblasten; es führt mit Interleukin-1 zu einer Gerinnungsaktivierung und hat eine direkte toxische Wirkung für einige Tumorzellen[48-53].

Kommt es zu einer Überproduktion des Zytokins, so können daraus funktionelle Störungen in der Autoimmunantwort[54], Kachexie[55] oder ein septischer Schock[56, 57] resultieren.

1.5.2 Die zweite Phase der Mediatorfreisetzung

Die durch die Lipoxygenase aus Arachidonsäure entstehenden Leukotriene (zum Beispiel LTC_4, LTD_4, LTE_4) vermögen ebenso wie Histamin die Bronchien zu kontrahieren, allerdings mit einer 10-1000 fach potenteren Wirkung[58]. Sie fördern die bronchiale Sekretion, steigern die Gefäßpermeabilität und induzieren Kontraktionen der glatten Muskulatur in Gefäßen und im Gastrointestinaltrakt. Zusammen mit den Prostaglandinen (zum Beispiel PGD_2), die ebenfalls bei der Bronchokonstriktion und der vermehrten Schleimsekretion mitwirken, sind sie an der Chemotaxis beteiligt und können Neutrophile und Eosinophile Granulozyten aktivieren.

1.5.3 Die dritte Phase der Mediatorfreisetzung

In dieser Spätphase werden neben dem Fibroblast growth factor, dem Vascular endothelial growth factor und TNF-α auch Interleukine sezerniert, von denen IL-6 und IL-8 im Folgenden näher beschrieben werden.
Interleukin-6, auch B cell stimulatory factor -2 genannt, ist ein multifunktionales Protein, welches in seiner aktiven Form aus 184 Aminosäuren besteht und in seiner Tertiärstruktur ein Vier-Helix-Bündel zeigt. Die Synthese erfolgt beispielsweise durch Makrophagen, Monozyten, T- und B-Lymphozten, Keratinozyten und Mastzellen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, bei der es die B-Zell Differenzierung und Antikörperproduktion stimuliert. T-Lymphozyten werden zu ihrer Produktion von Interleukin-2 und Interferon-γ angeregt und die Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen wird ebenfalls gefördert. Interleukin-6 induziert die Synthese und die Sekretion der Akute-Phase-Proteine in den Hepatozyten und auch in der Hämatopoese spielt es eine nicht unwichtige Rolle. So verkürzt es gemeinsam mit IL-3 die G_0 Periode der hämatopoetischen Stammzellen und stimuliert das Wachstum von Blastenzellen[52, 59-61].

Das wegen seiner Molekülgröße (je nach Syntheseort zwischen 69 und 79 Aminosäuren) und der Konservierung von vier verschiedenen Cysteinresten zur neutrophil-spezifischen CXC-Unterfamilie der Chemokine gehörende Interleukin-8 ist in erster Linie ein potenter Mediator für die neutrophile Chemotaxis[51, 62]. Es wird synthetisiert durch Makrophagen, T-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und anderen Zellen.

Tabelle 1: Übersicht über die Mediatorenfreisetzung von dermalen Mastzellen, geordnet nach zeitlichem Verlauf
Kursiv: die in der Studie untersuchten Mediatoren

Phase der Mediatorenfreisetzung	Synthese	Mediator
Erste Phase (wenige Minuten nach der Stimulation)	Präformiert und in Granula gespeichet	*Histamin*,
		Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase,
		Heparin
		(TNF-α)
Zweite Phase (innerhalb von ungefähr 30 Minuten)	Aus Arachidonsäure über Cyclooxygenase	Prostaglandine
	Aus Arachidonsäure über Lipoxygenase	Leukotriene
Dritte Phase (innerhalb von Stunden)	Zytokinbildung über mRNA-Synthese	Interleukine: IL-4, IL-5, *IL-6, IL-8*, IL-13
		TNF-α

1.6 Die Physiologie und Pathophysiologie der Mastzelle

Physiologischerweise kann die Mastzelle phagozytieren, also Antigene aufnehmen, und diese auf ihrer Oberfläche präsentieren. Hierbei spielt insbesondere der MHC II (Major Histocompatibility Complex) Rezeptor eine wichtige Rolle, der neben dem MHC I

Rezeptor, den ICAMs (Intercellular Adhesion Molecule) und mehreren Mitgliedern der CD (Cluster of Differentiation) -Nomenklatur (zum Beispiel CD63, CD107a und CD107b) auf Mastzellmembranen vorkommt[22, 23]. Unter diesem Gesichtspunkt wird die Interaktion zwischen Mastzellen und B-Lymphozyten diskutiert, bei der direkt, also ohne Beteiligung von T-Lymohozyten, eine Differenzierung zu Plasmazellen mit folgender Antikörperproduktion angeregt wird.

In der Pathophysiologie findet man die Mastzellen als Vermittler der anaphylaktischen Reaktion, die durch Hypersensitivität im Rahmen der allergischen Reaktion vom Typ I auftreten. Neben der anaphylaktischen Reaktion sind auch die allergische Rhinitis, das allergische Asthma und die Urtikaria mastzellassoziierte Erkrankungen, denen gemeinsam der IgE und FcεRI vermittelte Auslösemechanismus ist.

Aber auch bei einer Reihe von weiteren Entzündungsreaktionen, seien sie chronischer oder proliferativer Art, kann man die Zunahme von Mastzellen am Ort des Geschehens feststellen. Die mit einer Mutation am SCF Rezeptor assoziierten systemische Mastozytose gehört zu diesen Erkrankungen, genauso wie rheumatische Erkrankungen (die chronischen Polyarthritis und die Arthritis psoriatica) und einige fibrotische Erkrankungen (Lungenfibrose und zystische Fibrose).[63]

Die typische Mastzellvermehrung am Ort der Entzündung lässt sich mit einer gesteigerten Rekrutierung von Vorläuferzellen und deren Differenzierung, sowie mit einer verstärkten Migration aus benachbartem Gewebe erklären. Außerdem sollen auch reife Mastzellen über ein gewisses Proliferationspotenial verfügen.

1.7 Die Phototherapie

Bei leichten Verläufen mastzellassoziierter Erkrankungen werden zunächst Antihistaminika verabreicht, um symptombezogen zu therapieren. In schwereren Fällen (quälender Juckreiz, Atemnot, Übelkeit, Hypotonie) sind Kortikosteroide hoher Dosierung und gegebenenfalls Adrenalin angezeigt. Jedoch ist bei länger andauernder systemischer Gabe von Kortikosteroiden der Umfang von möglichen Nebenwirkungen beachtlich. So können beispielsweise Osteoporose, Diabetes mellitus, Hypertonie,

Stammfettsucht, Muskel- und Hautatrophie, Ödemausbildung und bei Kindern Wachstumsverzögerungen auftreten. Zudem steigt wegen der allgemeinen immunsuppressiven Wirkung die Infektanfälligkeit, das Risiko für maligne Neoplasien und die Ausbreitung opportunistischer Keime.
Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen alternative Möglichkeiten, unter denen eine Kortikosteroiddosierung reduziert werden kann um so interessanter. Neben allgemeinunterstützender Maßnahmen, wie Diät, Klima, Kleidung, Wohnhygiene und Berufsberatung hat nicht selten die UV Therapie eine Besserung des Hautbefundes erzielt. Hierbei sollte neben Stadium und Schweregrad der Erkrankung auch die Art der Bestrahlung berücksichtigt werden. So zeigt sich beispielsweise, dass bei der akut exazerbierten atopischen Dermatitis[64-67] und auch bei der Sklerodermie[68] das längerwellige UVA-1 Licht (340-400 nm) seine Anwendung findet. Bei der chronischen moderatenen Verlaufsform der atopischen Dermatitis erzielt die UVB Bestrahlung (280-315 nm) die besten Ergebnisse und die PUVA-1 Therapie zeigt sich besonders wirkungsvoll bei der Bekämpfung von psoriatischen Erkrankungen. Auch polymorphe Lichtdermatosen, der Lichen ruber planus, die Mastozytose, die Urticaria pigmentosa, die Mycosis fungoides und andere niedrig maligne T-Zell-Lymphome der Haut können mit PUVA-1 behandelt werden. Man hat hierbei die Möglichkeit, den für die PUVA-1 Bestrahlung notwendigen Photosensibilisator 8-Methoxypsoralen (8-MOP) lokal und somit sehr gezielt anzuwenden oder aber systemisch zu verabreichen.

1.8 Die Wirkmechanismen der UVB-, UVA-1- und PUVA-1-Therapie

Die Wirkmechanismen der Phototherapie haben sich als äußerst vielfältig erwiesen. So können Schäden an der Zellmembran, der DNA und von einigen Transkriptionsfaktoren beobachtet werden. Des weiteren findet sich im bestrahlten Gewebe eine veränderte Zytokinzusammensetzung, die die Interaktion verschiedenster Zelltypen beeinflusst.
Die einzelnen Bestrahlungsarten verfügen über unterschiedliche Angriffspunkte. UVB mit einer Wellenlänge zwischen 290 und 315 nm erreicht vorrangig Zellverbände der

Epidermis, während das längerwellige UVA-1 mit 315 bis 400 nm verstärkt auf die Dermis einwirkt[69].

Betrachtet man die durch unterschiedliches UV Licht bestrahlten Zellverbände genauer, so sind die strukturellen Veränderungen ähnlich. Die DNA wird in Form von Pyrimidindimeren geschädigt[70], da diese Photoprodukte RNA- und DNA-Polymerasen blockieren und potentiell mutagen sind[71]. Auf diesen durch UV Belastung entstandenen Schaden kann die Zelle mit Schutzmechanismen reagieren[72-76]. Einer ist die Produktion des Tumor-Suppressor-Proteins p53, dessen Funktion darin besteht, den weiteren Verlauf der Zelle inklusive der Einleitung der Apoptose zu bestimmen.

Ein weiterer Abwehrmechanismus ist folgender: die blockierte Polymerase kann das Ausschneiden des entsprechenden Nukleotids einleiten, so dass bei rechtzeitiger Elimination der fehlerhaften DNA-Sequenz der Entstehung eines Tumors vorgebeugt werden kann (NER = Nucleotide Excision Repair)[77].

Wegen seiner Wellenlänge kann UVB direkt von der DNA absorbiert werden und sie daher unmittelbar schädigen. UVA-1 hingegen wird nur zu einem geringen Teil absorbiert und führt eher indirekt zu einer Störung des Erbgutes. Es werden reaktive Sauerstoffmoleküle wie Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff gebildet[78], die bei unzureichend vorhandener Schutzmechanismen, wie Antioxidantien, die Zelle in einen Zustand des oxidativen Stresses befördern[79]. Hierdurch kann es zur Oxidation von Membranlipiden kommen, was wiederum den Verlust der Membranintegrität und -funktion nach sich zieht. Als Nachweis dieser Störung kann die Laktatdehydrogenase (LDH) herangezogen werden, die als stabiles zytoplasmatisches Enzym in nahezu allen Zellen vorhanden ist und wegen der nicht mehr intakten Membran extrazellulär nachweisbar wird.

Der oxidative Stress kann Schäden der DNA hervorrufen, die Transkription und Replikation unterbrechen und so Mutationen induzieren[80]. Auch kann auf den oxidativen Stress eine Proteolyse des Eisenspeicherproteins Ferritin folgen[81]. Daraus resultiert eine ansteigende intrazelluläre Konzentration von freiem Eisen mit negativen Folgen für die Zelle. So kann Eisen als Katalysator in Reaktionen zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und Biomolekülen fungieren, wodurch es beispielsweise zu Lipidperoxidationen kommen kann[82-84].

Eine dritte Form der Bestrahlung stellt die PUVA-1 Therapie da. Hierbei wird vor der Bestrahlung mit UVA-1 ein Photosensibilisator, meistens 8-Methoxypsoralen (8-MOP), entweder lokal aufgetragen oder oral verabreicht. Es sind zweierlei Effekte durch die Photoaktivierung mit PUVA-1 nachgewiesen. Zum einen entstehen Quervernetzungen der einzelnen DNA Stränge und zum anderen entstehen zwischen dem aktivierten 8-MOP und den Pyrimidinbasen der DNA Photoaddukte[85-87]. Daraus resultiert eine Hemmung der DNA Synthese und der Zellproliferation. Außerdem kann PUVA-1 wie auch UVA-1 durch oxidativen Stress Schäden an der DNA herbeiführen. Für die Bestimmung des Ausmaßes der Störung kann die gebildete Menge an 8-Hydroxy-2'Desoxyguanosin herangezogen werden[88].

Die aufgeführten Veränderungen, die durch die drei Bestrahlungsarten entstehen können, zeigen sich bei einer Vielzahl unterschiedlichster Zellarten. So werden nicht nur Mastzellen, sondern auch andere immunologisch kompetente Zellen, wie Monozyten, Keratinozyten, Natürliche Killerzellen(NK-Zellen), Langerhanszellen und T-Zellen in ihrer gegenseitigen Interaktion beeinflusst[89].

Aus diesen komplexen Zusammenhängen, die einerseits die vielfältigen Wirkmechanismen und andererseits die Wechselwirkungen unterschiedlichster Zellarten umfassen, resultiert letztendlich der Erfolg der Bestrahlungstherapie.

2 Zielsetzung

Zurzeit findet die UV Therapie in der Dermatologie, insbesondere bei mastzellassoziierten Erkrankungen und psoriatischen Leiden eine vielfältige und umfangreiche Anwendung. Gemessen an dem breiten Spektrum der klinischen Einsatzmöglichkeiten, ist verhältnismäßig wenig über die Wirkmechanismen der einzelnen Bestrahlungsformen bei menschlichen Mastzellen bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von UVB, UVA-1 und PUVA-1 auf die Mediatorfreisetzung humaner, dermaler Mastzellen genauer beleuchtet. So wurde im Besonderen die sowohl durch verschiedene Stimulantien provozierte, als auch die basale Ausschüttung von Histamin, Tryptase und der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF-α untersucht.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit war die Betrachtung der Moleküle CD 107a und CD63 (diese tragen auch die Namen LAMP 1 und LAMP 3). Hier interessierte inwiefern das UV Licht bei unstimulierten und stimulierten MC die Präsentation dieser Proteine auf Membranen beeinflusst.

Letztendlich sollen die Forschungsergebnisse dazu beitragen, die Mechanismen der Phototherapie besser verstehen zu können, um so ein sinnvolles und gezieltes Einsetzen im klinischen Alltag zu ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle benötigten Standardchemikalien wurden in analytischer Reinheit von den Firmen Merck, Sigma und Biochrom KG bezogen. Besondere Chemikalien werden in Tabelle 2 gesondert aufgelistet.

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenz	*Hersteller*
α-Monothioglycerol (3-Mercapto-1,2-propandiol)	Sigma
Amphothericin B (250 µg/ml)	Biochrom KG
Basal- Iscove Medium (1x) Mit 15mg/l Phenolrot Mit 3,024 g/l $NaHCO_3$ Ohne L-Glutamin	Biochrom KG
Bovine Serum Albumine (BSA)	Sigma
BRIJ	Sigma
1-Butanol pro analysi	Merck
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) Without Calcium and Magnesium (PBS w/o)	PAA Laboratories GmbH
D-Glukose	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetal Calf Serum (FCS, hitzeinaktiviert)	Biochrom KG
Humanes AB- Serum (dialysiert)	Biotest
Humanes Serumalbumin (HSA)	Sigma
L- Glutamin	Biochrom KG
Magnesiumchlorid ($MgCL_2$)	Merck
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck
8- Methoxypsoralen (Meladinine 0,3%)	Galderma
Milli-Q Aqua (Leitfähigkeit15-18MΩ)	Millipore
Mouse- γ- globulin	Dianova
n-Heptan pro analysi	Merck

Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH) Plätzchen reinst	Merck
o- Phthaldialdehyd (OPDA)	Sigma
PBS Ca^{2+}/Mg^{2+}	Biochrom KG
Penicillin/Streptomycin (10 000 E / 10 000 µg/ml)	Biochrom KG
Perchlorsäure ($HCLO_4$) pro analysi	Merck
Pipes	Sigma
Propidiumjodid (Vybrant™ Apoptosis Assay Kit#4)	Molekular Probes
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck
Substance P (SP)	Sigma
Toluidinblau (0,1% in 0,5N HCL- Lösung)	Sigma
Trypanblaulösung (0,18 % in PBS w/o)	Seromed
Humane Tryptase (rekombinant)	Promega
Tryptase-Substrat (NCBZ-Gly-Pro-Arg-p-Nitroanilid)	Sigma

Tabelle 2 (Fortsetzung): Reagenzien

Für die Isolierung der Mastzellen wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Enzyme eingesetzt.

Tabelle 3: Enzyme

Enzym	***Hersteller***
Collagenase Type I (232 u/mg)	Worthington biochemical corporation
Dispase 1 (Neutrale Protease, Reinheitsgrad I)	Roche Molecular Biochemicals
DNase 1 (from bovine pancreas)	Roche Diagnostics GmbH
Hyaluronidase Type I – S (from bovine testes)	Sigma

Die in Tabelle 4 dargestellten Enzyme wurden für die Aufreinigung und Stimulierung der Mastzellen sowie für die Durchflusszytometrie benötigt.

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	***Hersteller***
CD63 (clone CLBGran/12)	Beckman Coulter (Immunotech)

CD107a (clone H4A3)	BD Pharmingen, Heidelberg, Germany
MACS Goat Anti-Mouse IgG Micro Beads	Miltenyi Biotech
Mouse- IgM- anti- Human- IgE, Fc- Fragment (Anti-IgE)	Calmbiochem
YB5.B8 (mouse- IgG_1- anti- human- CD117)	Freundliche Gabe von L. Ashman, Adelaide, Australien

Tabelle 4 (Fortsetzung): Antikörper

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Handschuhe und ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen. Im Rahmen der Doktorarbeit eingesetzte Laborgeräte sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Laborgeräte

Gerät	*Hersteller*
Durchflusszytometer	Beckmann Coulter (Immunotech), XL 2 - software
Histamin - Autoanalyser	Borgwaldt Technik
MACS Separation Columns LCC (Large Cell Colummns)	Miltenyi Biotech
Metallfilter (300, 70, 40 μm)	Sigma
Microplate reader Software: Revelation™ MRX Version 3.22	Life Science Technology (Dynatech Laboratories)
Neubauer Zählkammer	Neolab
Nylongasefilter (30μm)	Miltenyi Biotech
Petrischalen	Greiner
Quantikine HS (High Sensitivity) - Human IL-6 Immunoassay - Human TNFα- Immunoassay	R&D Systems Inc.
Quantikine Human IL-8 Immunoassay	R&D Systems Inc.
UVA- 1 Lichtquelle	Konstruiert vom Krankenhaus Technik Service der Charité (Technische Angaben siehe Tabelle 6)
UV 800 (UVB- Lichtquelle)	Waldmann (Technische Angaben siehe Tabelle 6)
24- well- Platte — „Suspension Culture“	Greiner
Zellkulturflasche — „Suspension Culture“	Greiner
Zellkulturflasche — „Tissue Culture“	Greiner
Zellzählgerät Casy	Scharfe System

Die Tabelle 6 dient zur näheren Information über die UVB- (UV 800, Waldmann) und die UVA- 1- Lichtquelle.

Tabelle 6: Leistungsspektrum der UVB- und der UVA- 1- Lichtquelle

Bereich		**UVB** (in mJ/cm² s)	**UVA- 1** (in J/cm² s)
UVA	315 – 400 nm	0,6918	0,00538
UVA-1	340 – 400 nm	0,1734	0,005378
UVB	280 – 315 nm	0,758	6 x 10E-7
UVC	100 – 280 nm	0,0051	3,2 x 10E-10

Bei dieser Tabelle fällt die recht hohe UVA und UVA- 1 Strahlenabsonderung der UVB Lichtquelle auf. Auswirkungen auf die Versuche hat diese Eigenschaft der UVB- Lampe jedoch nicht, da meßbare Effekte bei UVA- Bestrahlung erst im Joule Bereich auftreten, und die UVB- Bestrahlung im Millijoule Bereich stattfindet.

Für die höchste UVB Bestrahlungsdosis von 100mJ wurden die Zellen für 132 s bestrahlt (0,758 mJ/cm² s $\times$ 132 s = 100,01 mJ/cm²). Hierbei ergibt sich eine UVA und UVA-1 Strahlendosis von 91,32 mJ/cm² (0,6918 mJ/cm² s $\times$ 132 s) beziehungsweise von 22,89 mJ/cm² (0,1734 mJ/cm² s $\times$ 132 s).

3.1.1 Puffer

Pipes- Stock- Puffer (10x)

- Piperazine- N, N‘- bis (2- ethanesulfonic acid)
- 69,3g NaCl (1,19M), 76g $Pipes_{(Na\text{-}Salz)}$ (250 mM) und 3,85g KCl (49,98 mM) mit Aqua dest. ad 1000ml
- pH- Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen

Pipes- Albumin- Glucose + Calcium + Magnesium (PAG- CM)

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

MACS- Puffer

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

FACS- Puffer

- 0,05 % Na- Azid
- 2 % Fetal Calf Serum (FCS)

Tryptase- Meßpuffer

- 20 ml Trispuffer (0,15M Trsi, 0,3 M KCl = pH 7,6)
- 2,3 mg Heparin
- 4 mg α-1-Antitrypsin

3.1.2 Medien

Mastzellmedium

- Basal- Iscove- Medium
- 10 % Fetal Calf Serum,
- 2 % L- Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin,
- 0,05 % Amphotericin B
- α -Monothioglycerol
- 3 mM Ca^{2+} und 3 mM Mg^{2+}

Stimulationsmedium

- Basal- Iscove- Medium
- 2 % L-Glutamin
- 0,1% BSA
- 1 % Penicillin/Streptomycin
- 0,05 % Amphotericin B
- α -Monothioglycerol
- 2,8 mM Ca^{2+} und 1,3 mM Mg^{2+}

Dispergiermedium

- PBS w/o
- 10 % Fetal Calf Serum
- 2 % L-Glutamin
- 1 % Penicillin/Streptomycin
- 0,05 % Amphotericin B
- Dnase 1 (10 µg/ml)
- 5mM $MgSO_4$

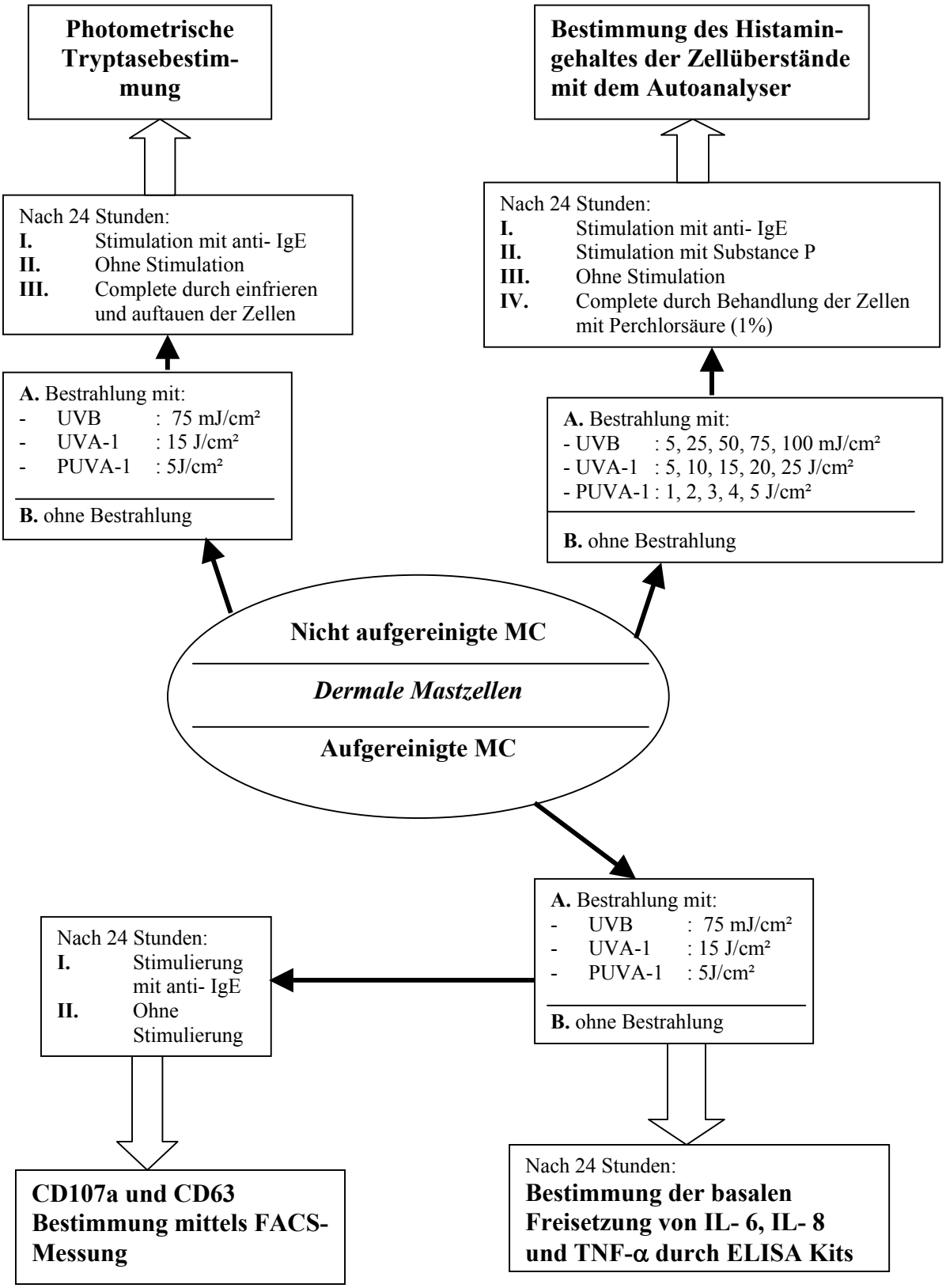

Abb. 2: Zusammenfassung der verwendeten Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 Die Isolierung der Mastzellen

Für die Versuche wurden ausschließlich dermale Mastzellen verwendet, die aus Mammareduktionsplastiken gesunder Patientinnen stammen. Ein großer Vorteil gegenüber Mastzelllinien oder peritonealen Rattenmastzellen ist die hierbei wesentlich höhere Aussagekraft in Bezug auf Auswirkungen von UV Bestrahlung auf menschliche Mastzellen.
Für einen Teil der Versuche wurden aufgereinigte MC benötigt. Bei diesem Prozess spielt der monoklonale Maus- Antikörper YB5.B8 eine wichtige Rolle, weil er spezifisch an das Oberflächenmolekül CD117 bindet. Dieser Rezeptor befindet sich nicht nur auf den Mastzellen, sondern auch auf den epidermlen Melanozyten, so dass zu Beginn der Hautbearbeitung die Epidermis von der Dermis getrennt werden muss.

Die Trennung von Epidermis und Dermis

Die Hautpräparate wurden in wenige Millimeter breite Streifen geschnitten, dann in Dispase Typ I (0,5mg/ml) eingelegt und für 24 Stunden bei 4°C verwahrt. Während dieser Zeit kann das Enzym die Bindung zwischen Epidermis und Dermis spalten, so dass die beiden Hautschichten mechanisch voneinander getrennt werden konnten.

Dispergierung der Dermis

Mit einer Schere wurde die Dermis zerkleinert, um sie dann in Dispergiermedium eingelegt, in ein Schüttelwasserbad zu geben. Hier verweilte sie für ungefähr eine Stunde bei 37°C und 200 Schütteleinheiten pro Minute und es folgte eine Filtration der dispergierten Dermis (Porengröße: 300µm, 70 µm und 40µm). Anschließend wurde das

Filtrat bei 4°C und 250g für 10 Minuten zentrifugiert, um dann den Überstand ein wiederholtes Mal, zusammen mit der restlichen Dermis, in das Schüttelwasserbad zu geben. Die durch das Zentrifugieren gewonnenen Zellen wurden mit PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und dann einer Erythrozytenlyse mittels 0,2%iger NaCl-Lösung unterzogen. Zum Wiedererlangen der Isotonie wurde unmittelbar danach 1,6%ige NaCl-Lösung hinzupipettiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Mastzellen mit saurem Toluidinblau und Trypanblau gefärbt, um Auskunft über die Zellzahl beziehungsweise über die Vialibilität zu erlangen. Schließlich wurden die Zellen in Mastzellmedium bei 37°C und 5%iger CO_2-Atmosphäre für zwölf Stunden im Brutschrank inkubiert.
Mit der für eine weiteren Stunde dispergierten Dermis wurde auf gleiche Art und Weise verfahren.

3.2.2 Die Aufreinigung der Mastzellen

Für einige Versuche war eine besonders hohe Konzentration an Mastzellen erforderlich, um eventuelle Störfaktoren, bzw. Zellen mit ähnlichen Eigenschaften auszusortieren. Zu Beginn der Mastzellaufreinigung erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit 4°C kaltem und entgasten MACS- Puffer. Eine zehnminütige Inkubation der Zellen mit AB- Serum (Verdünnung 1 : 5) und Sandoglobin (25µl für 1 10^8 Zellen) schloss sich an, um unspezifische Bindungen, wie zum Beispiel Protein-Protein-Wechselwirkungen, zu minimieren. Monoklonalen Maus- Anti- Human CD117- Antikörper (YB5.B8, Endkonzentration 0,1µg/ml) wurden hinzugegeben, um die an der Mastzelloberfläche befindlichen Rezeptoren CD117 zu binden. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit MACS- Puffer, bevor die paramagnetischen Sekundärantikörper (Ziege- Anti- Maus-IgG, Micro- Beads in einer 1 : 5 Verdünnung der gebrauchsfertigen Lösung) an die Primärantikörper binden konnten. Um diese spezifische Kopplung zu ermöglichen, wurden die Mastzellen für zwanzig Minuten bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert. Die Zellsuspension wurde abschließend auf eine MACS- Trennsäule gegeben, in der die Mastzellen mit ihrem Antikörperkomplex magnetisch binden konnten. Aufschluss über die Reinheit, die im Mittel bei 90% lag, gab eine Zellzählung, bei der die Mastzellen mit saurem Toluidinblau angefärbt wurden.

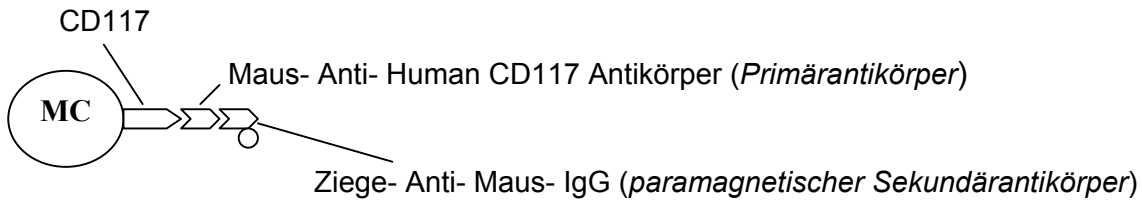

Abb. 3: Übersicht über die bei der Mastzellaufreinigung eingesetzten Antikörper

3.2.3 Die Bestrahlung der Mastzellen mit UVB, UVA- 1 und PUVA-1

Die Bestrahlung wurde durchgeführt mit entsprechender UV- Lichtquelle (s. S. 18) und je 1,8 10^5 Mastzellen in einer offenen Petrischale. In diesen betrug die Füllhöhe einheitlich 1,5 mm. Für die PUVA-1 Bestrahlung wurden die Zellen dreißig Minuten vor Beginn mit 500 ng/ml 8- Methoxypsoralen (8- MOP) bei 37°C präinkubiert.
Bis zum Zeitpunkt der Messung wurden die Zellen bei 37°C und fünfprozentiger CO_2 Atmosphäre verwahrt.

3.2.4 Die Untersuchung der Histaminfreisetzung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (Dosisabhängigkeit)

Nicht aufgereinigte Mastzellen wurden folgenden Bestrahlungsdosen ausgesetzt:

UVB :0, 5, 25, 50, 75 und 100 mJ/cm²
UVA- 1 :0, 5, 10, 15, 20 und 25 J/cm²
PUVA- 1 :0, 1, 2, 3, 4 und 5 J/cm²

Nach 24 Stunden wurde die anti- IgE, die Substanz P, die nicht stimulierte und die maximale Histaminfreisetzung bestimmt.

3.2.5 Die Bestimmung der Histaminfreisetzung

Die Mastzellen wurden mit anti- IgE und Substanz P stimuliert und das hierbei freigesetzte Histamin wurde in Bezug zum Gesamthistamingehalt gesetzt. Dieser auch als Complete bezeichneter Gesamthistamingehalt wurde ermittelt, indem die Zellen mit einprozentiger Perchlorsäure lysiert wurden. Zusätzlich wurde der Blank also die spontane Histaminfreisetzung bestimmt, indem die Zellen nur mit dem Puffer PAG- CM inkubiert wurden.
Zu Beginn der Bestimmung wurden die in Petrischalen bestrahlten Zellen aus diesen in Falcons umgefüllt, um sie dann mit 50 ml PAG-CM zu waschen. Anschließend wurden sie mit 1800µl PAG-CM resuspendiert und zu je 200µl in Einzelansätze aufgeteilt. Für jede einzelne Bestrahlungsart und -dosis ergab sich folgender Versuchsaufbau:

Tabelle 7: Versuchsaufbau zur Bestimmung der Histaminfreisetzung

3 x 200µl Zellen	+ 3 x 200µl Perchlorsäure (1%)	= 3 x complete
2 x 200µl Zellen	+ 2 x 200µl PAG-CM Puffer	= 2 x blank
2 x 200µl Zellen	+ 2 x 200µl anti- IgE (1 : 10000)	= 2 x anti- IgE stimuliert
2 x 200µl Zellen	+ 2 x 200µl Substance P (30µM)	= 2 x Substance P stimuliert

Die Einzelansätze wurden nun für dreißig Minuten in einem 37°C warmen Schüttelwasserbad inkubiert, indem die Zellen auf die hinzugefügten Substanzen reagieren konnten. Dann wurde die Stimulation mit 600 µl 4°C kaltem PAG-CM beendet. Durch anschließendes zehnminütiges Zentrifugieren bei 250g konnten die Überstände mit dem freigesetztem Histamin gewonnen werden. Bis zur Messung wurden sie bei –20°C verwahrt.
Der Histamingehalt wurde mit der automatisierten fluorometrischen Methode nach Siraganian[90] bestimmt. In der Probe wird das Histamin durch organische und anorganische Lösungsmittel extrahiert, um dann mit o- Phthaldialdehyd (OPDA) versetzt zu werden. Die Reaktion zwischen dem OPDA und dem Histamin findet bei stark basischem pH statt und das eigentlich fluoresziernde Reaktionsprodukt wird erst bei einem pH von kleiner als zwei gebildet. Es folgt eine Anregung mit Wellenlängen zwischen 355 und 360 nm, worauf die Fluoreszenz bei 450 – 460 nm gemessen werden

kann. Die Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Histaminkonzentration in den Proben. Die erwünschte Netto- Histaminfreisetzung ergibt sich, indem von der stimulierten die spontane Histaminfreisetzung abgezogen und in Relation zum Gesamthistamingehalt gesetzt wird.

3.2.6 Die Bestrahlung dermaler Mastzellen für die Tryptase-, die Zytokin- und die LAMP- Bestimmung

Durch den vorherigen Histaminversuch konnten für die drei Bestrahlungsarten Dosen ermittelt werden, die einen gleichermaßen inhibitorischer Effekt der anti-IgE Stimulation erzielten. Die Mastzellen wurden also für die anschließenden Versuche folgendermaßen bestrahlt:

sham	**UVB**	**UVA-1**	**8-MOP**	**PUVA-1**
Keine Bestrahlung	75 mJ/cm²	15 J/cm²	Keine Bestrahlung	5 J/cm²

Die unbestrahlte Kontrollpopulation für die UVB und UVA-1 behandelten Zellen wird als Sham (engl.:Täuschung, Betrug) bezeichnet. Für eine zweite Kontrolle wurden unbestrahlte Mastzellen mit 8-Methoxypsoralen inkubiert, um sie mit PUVA-1 bestrahlten Zellen vergleichen zu können.

3.2.7 Die Tryptaseaktivitätsbestimmung

Zunächst ist auf die Randbedingung hinzuweisen, dass mit Zellkonzentrationen von 8 x 10^5 bis 1 x 10^6 Mastzellen pro ml gearbeitet wurde.
Pro Ansatz wurde ein Drittel der Mastzellsuspension im Verhältnis von 1:1 mit anti-IgE (1:10 000) stimuliert; zu den restlichen zwei Dritteln wurde ebenfalls im Verhältnis von 1:1 der Puffer PAG-CM hinzugefügt. Anschließend fand eine Aufteilung der mit PAG-CM behandelten Zellen in zwei gleich große Fraktionen statt. Von diesen wurde eine für den Complete im dreimaligen Wechsel langsam eingefroren und wieder aufgetaut.

Dadurch konnten kleine Eiskristalle die Zellmembranen der MC zerstören, so dass die gesamten Botenstoffe, inklusive der Tryptase in den Extrzellulärraum gelangten. Die zweite Fraktion PAG-CM behandelter Zellen, sowie die mit anti-IgE stimulierten Mastzellen wurden für dreißig Minuten in das 37°C warme Schüttelwasserbad gegeben. Anschließendes zehnminütiges Zentrifugieren bei 250g ermöglichte, dass die Überstände in je 3 x 50µl Portionen auf eine 96 well Platte pipettiert werden konnten. In jeder dieser 50µl Portion ist nun die Mediatormenge, die von 4 bis 5 x 10^4 MC freigesetzt wurde.

Ebenfalls in 3 x 50µl Portionen wurde der Complete in je einer 1:10 er Verdünnung (entspricht in diesem Versuchsaufbau der Mediatormenge, die von 5 x 10^3 MC freigesetzt wird) und einer 1:20 er Verdünnung (2,5 x 10^3 MC) auf die Platte aufgetragen (s. Abb. 4).

Zu den 50µl Proben wurden 150µl Tryptasemeßpuffer und 20µl Tryptase Substrat hinzugefügt. Die sich nun im 90 Sekunden Takt anschließenden Messungen im Dynex MRX 96 well-Platten-Photometer wurden bei 37°C durchgeführt. Bei dieser Zeitkinetik korreliert die Tryptasekonzentration in den Proben mit der Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrates.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80 000 pg Standard			Complete1:10, sham			Complete 1:10, UVA-1			Complete 1:10,PUVA-1		
B	60 000 pg Standard			Complete1:20, sham			Complete1:20, UVA-1			Complete 1:20,PUVA-1		
C	40 000 pg Standard			Blank, sham			Blank, UVA-1			Blank, PUVA-1		
D	30 000 pg Standard			Anti-IgE, sham			Anti- IgE, UVA-1			Anti-IgE, PUVA-1		
E	20 000 pg Standard			Complete1:10, UVB			Complete1:10, 8-MOP					
F	10 000 pg Standard			Complete 1:20, UVB			Complete1:20, 8-MOP			1250 pg Standard		
G	5000 pg Standard			Blank, UVB			Blank, 8-MOP			625 pg Standard		
H	2500 pg Standard			Anti-IgE, UVB			Anti-IgE, 8-MOP			0 pg Standard		

Abb. 4: Pipettierschema zur Bestimmung der Tryptaseaktivität

Das der hier verwendeten Absorptionsphotometrie zugrundeliegende liegende Prinzip basiert im wesentlichen auf zwei Punkten. Zum einen können schon kleinste Mengen

eines Enzyms durch Messung seiner enzymatischen Aktivität nachgewiesen werden. Der Tryptase wird unter definierten Bedingungen, wie Temperatur und Konzentration der eingesetzten Substanzen ein Substrat angeboten. Je schneller es umgesetzt wird, desto höher konzentriert ist der Tryptasegehalt der Probe. Zum anderen ist das Lambert – Beersche – Gesetz eine Grundvoraussetzung (s. Abb. 5), denn das enzymatisch gespaltene Substrat verursacht einen Farbumschlag. Diese absorbierende Substanz wird von monochromatischem Licht durchstrahlt und ihre Konzentration, sowie die Schichtdicke des Probengefäßes, ist zu der Extinktion proportional. Die Extinktion einer Lösung ist definiert als der negative dekadische Logarithmus des Quotienten von austretendem geschwächten und eintretendem Licht.

$$E = -\log I/I° = \varepsilon\, c\, d$$

Abb. 5: Lambert-Beersches-Gesetz
(E = Extinktion, I = Lichtintensität des austretenden geschwächten Lichtes, I° = eingesetzte Lichtintensität, ε = Absorbtionskoeffizient, c = Konzentration des absorbierenden Stoffes, d = Schichtdicke)

3.2.8 Die Untersuchung der basalen Freisetzung von Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor-α bei bestrahlten dermalen Mastzellen

Um mögliche Störfaktoren im höheren Maße zu vermeiden, wurden für die Bestimmung der Zytokine mittels ELISA (enzyme–linked immuno sorbent assay) ausschließlich hoch aufgereinigte Mastzellen verwendet.
Nach der Bestrahlung wurden die Mastzellen für 24 Stunden bei 37°C und fünfprozentiger Kohlendioxidatmosphäre verwahrt, um dann die basale Freisetzung von IL.6, IL-8 und TNF-α in dieser Zeit untersuchen zu können. Das anschließende Zentrifugieren bei 250g und 4°C ermöglichte, dass die hierbei gewonnenen Überstände unter Berücksichtigung der Zellzahlen auf die 96- well- Mikrotiterplatte des jeweiligen Immunoassays pipettiert werden konnten. Jedes Well dieser Platte ist vorbeschichtet mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch gegen das zu bestimmende Zytokin.

Das in der Probe beziehungsweise im Standard befindliche Antigen bindet nun an den immobilisierten Antikörper. Es folgt ein Waschvorgang durch den ungebundene Substanzen entfernt werden und ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper, der an einer anderen Antikörperbindungsstelle des Antigens bindet, wird hinzupipettiert. Das zu bestimmende Zytokin ist nun an zwei unterschiedliche Antikörper gebunden und aus dieser Konstellation ergibt sich die weitläufige Bezeichnung des two-site sandwich assays für die hier verwendete Methode. Nachdem den Bindungen ausreichend Zeit gegeben wurde, werden die restlichen ungebundenen Antikörper weggewaschen. Eine Substratlösung wird in jedes Well hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit wird eine Verstärkerlösung verabreicht, die einen Farbumschlag sichtbar werden lässt. Dieser zu der Zytokinkonzentration in den Wells proportionaler Farbumschlag wird durch eine Stoplösung beendet und anschließend wird die Intensität der Farbe mit einem Microplate reader gemessen.
Um potentielle Fehler durch Einzelmessungen ausschließen zu können, bestand in diesem Versuchsaufbau jede Messung aus einer Doppelbestimmung. Der hieraus gebildete Mittelwert wurde schließlich als eigentlicher Messwert protokolliert.

3.2.9 Die Bestimmung der Moleküle CD63 und CD107a auf bestrahlten und unbestrahlten dermalen Mastzellen

Die für diesen Versuch benötigten aufgereinigten Mastzellen wurden 24 Stunden nach der Bestrahlung mit anti- IgE (1 :10 000) stimuliert oder mit PAG- CM inkubiert. So konnten zum einen bestrahlte und unbestrahlte und zum anderen stimulierte und unstimulierte Mastzellen in Bezug auf ihre CD 63 und CD107a Oberflächenexpression untersucht werden. Nach der Stimulation wurden die 1 10^5 Zellen pro Ansatz gewaschen, um anschließend mit 100µg/ml mouse gamma globulin in PBS und 20prozentigem AB Serum bei 4°C für 15 min inkubiert werden zu können. So wurden unspezifische Bindungen blockiert und auf ein erneutes Waschen der Mastzellen konnte die Inkubation mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 30 min bei 4°C erfolgen. Außer dieser monoklonalen Antikörper: CD 63 (cloneCLBGran/12) und CD107a (clone H4A3) wurde zur Kontrolle ein IgG_1 Antikörper eingesetzt. Die Analyse

der Zellen mit dem Epics XL flow cytometer (Coulter) schloss sich an und dieses Prinzip der Messung sei im Folgenden kurz geschildert.

Die Durchflusszytometrie auch Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS-Analyse) genannt, ist ein fluoreszenzoptisches Verfahren zur Epitopdetektion von Rezeptormolekülen auf Einzelzellniveau[91]. Dieses wird ermöglicht durch Antikörper, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Es folgt eine Anregung durch Laserlicht und die emittierten Fluoreszenzsignale werden von Photonenverstärkern empfangen. Sie werden von einem angeschlossenen Rechner verarbeitet und als event auf dem Monitor dargestellt. Dadurch ist eine Zellanalyse, um phänotypische Befunde zu liefern, in sicherer und schneller Weise möglich.

3.3 Statistik

Um die untersuchten Ergebnisse auf statistische Signifikanz zu untersuchen, wurde der verteilungsfreie Rangsummen-Test für zwei verbundene Variablen nach Wilcoxon eingesetzt. Dieser nicht parametrische Test überprüft die Hypothese, dass beide Stichproben dieselbe Verteilung haben, und beruht auf der Rangordnung der Absolutwerte der Differenzen zwischen den beiden Stichproben, ohne eine Aussage über die Form der Verteilung zu machen. Es wurde definiert, dass ein p-Wert $\leq 0{,}05$ als signifikant und ein p-Wert $\leq 0{,}01$ als hoch signifikant bezeichnet werden kann. Der Wilcoxon-Test fand bei der Untersuchung der stimulierten und nicht stimulierten Histaminfreisetzung, der Tryptaseausschüttung, sowie bei der basalen Freisetzung von IL-6, IL-8 und TNF-α Verwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Die Histaminfreisetzung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis

Die Mastzellstimulation kann durch zahlreiche Substanzen und auf unterschiedlichste Art und Weise erfolgen. Bei der anti-IgE Stimulation spielt der tetramerische hochaffine IgE Rezeptor FcεRI eine Schlüsselrolle. Auch Neuropeptide wie Substance P sind in der Lage Mastzellen zu aktivieren. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde eine Substance P (SP) Konzentration von 30µM eingesetzt. Bei der Stimulation mit anti-IgE ergab sich eine durchschnittliche Netto-Histaminfreisetzung von 30,1% des Gesamthistamingehaltes beziehungsweise von 8,9% bei Substance P Stimulation.
Die dermalen Mastzellen wurden mit verschiedene Dosen von UVB (Abb. 6), UVA-1 (Abb. 7) und PUVA-1 (Abb. 8) bestrahlt, um die Auswirkungen von UV Licht unterschiedlicher Intensität zu testen.
Es zeigte sich bei allen drei Bestrahlungsarten 24 Stunden nach Bestrahlung eine signifikante, dosisabhängige Inhibierung der anti-IgE induzierten Histaminfreisetzung. In stetiger Weise verringerten die bestrahlten Mastzellen ihre Fähigkeit nach anti-IgE Stimulation Histamin freizusetzen, so dass eine maximale Hemmung bei maximaler Bestrahlungsdosis erzielt wurde. Bei der UVA-1 Bestrahlung wurde die Hemmung am deutlichsten. Setzten die unbestrahlten Mastzellen noch 31,6% ihres Gesamthistamingehaltes frei, so wurden nach einer Bestrahlungsdosis von 25 J/cm² nur noch 1,5% ausgeschüttet. Die Mastzellen reduzierten folglich ihre Histaminfreisetzung um 95,3%. Bei der UVB(100mJ/cm²) und PUVA-1(5J/cm²) Bestrahlung ist die Inhibierung mit 81,1% (von 30,2% bei unbestrahlten MC auf 5,7% bei 100mJ bestrahlten MC) und 71,5% (von 28,4% auf 8,1%)zwar ebenfalls deutlich, aber weniger potent.
Ferner konnten Bestrahlungsdosen aller drei Bestrahlungsarten ermittelt werden, die eine ähnlich inhibitorische Wirkung auf die anti-IgE induzierte Histaminausschüttung aufwiesen. So wurde nach 75 mJ/cm² UVB Bestrahlung nur noch 24,3% (Inhibierung: 75,7%), nach 15 J/cm² UVA-1 Bestrahlung 25,6% (Inhibierung: 74,38%) und nach 5

J/cm² PUVA-1 Behandlung 28,9% (Inhibierung: 71,0%) Histamin freigesetzt. In den nachfolgenden Versuchen (s. Kapitel 4.2, 4.3 und 4.4) wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse diese Äquivlenzdosen eingesetzt.

Für die Substance P stimulierten Mastzellen ergab sich ein anderer Zusammenhang. Bei der UVB und PUVA-1 Bestrahlung konnte keine signifikante Veränderung der Histaminausschüttung festgestellt werden (s. Abb. 6 und 8). Durch die UVA-1 Bestrahlung hingegen wurden die SP induzierte Histaminfreisetzung der Mastzellen in stetiger und dosisabhängiger Weise inhibiert (s. Abb. 7). Wurde durch Substanz P Stimulation bei unbestrahlten Mastzellen noch 7,9% des Gesamthistamingehaltes freigesetzt, so waren es nach maximaler Bestrahlungsdosis nur noch 1,4%. Dies entspricht einer 82,3 prozentigen Inhibierung.

Es zeigte sich also, dass die UVA-1 Strahlung im Gegensatz zu UVB und PUVA-1 sowohl die anti-IgE wie auch die SP stimulierte Histaminausschüttung hemmen konnte.

Bestrahlung mit UVB – Stimulierte Histaminfreisetzung

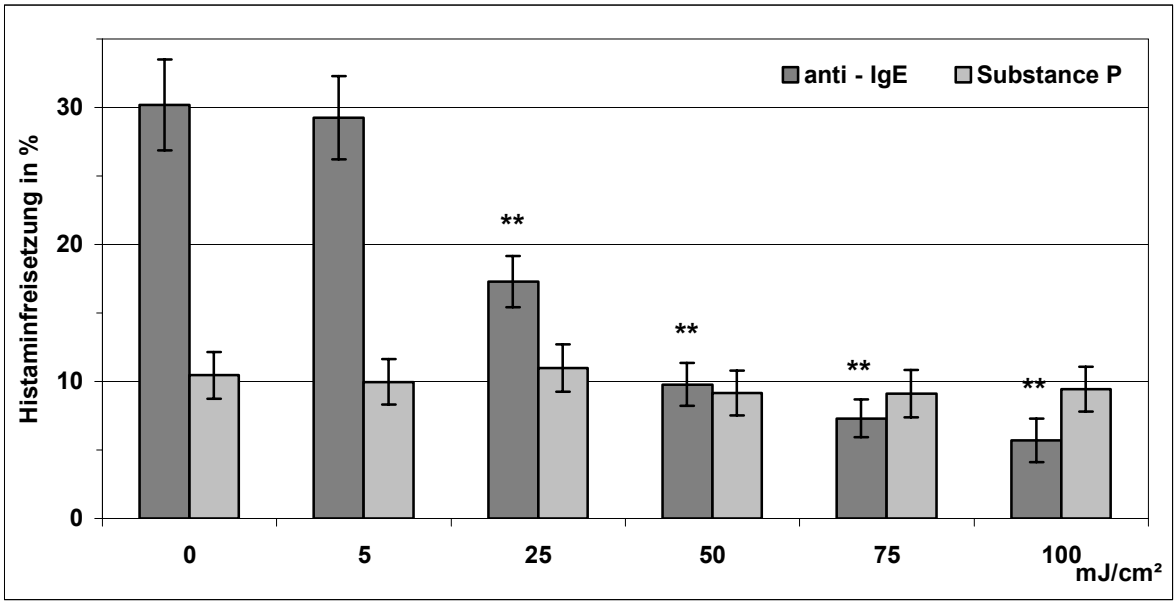

Abb. 6: Dosisabhängigkeit der anti – IgE und Substance P induzierten Histaminfreisetzung humaner dermaler Mastzellen bei UVB Bestrahlung.
Die Mastzellen wurden mit UVB bestrahlt und die Histaminfreisetzung wurde 24 Stunden später ermittelt. MW und SEM aus 11 Versuchen. **p = 0,003
(die für jede Bestrahlungsdosis maximale Histaminausschüttung entspricht 100%)

Bestrahlung mit UVA-1 – Stimulierte Histaminfreisetzung

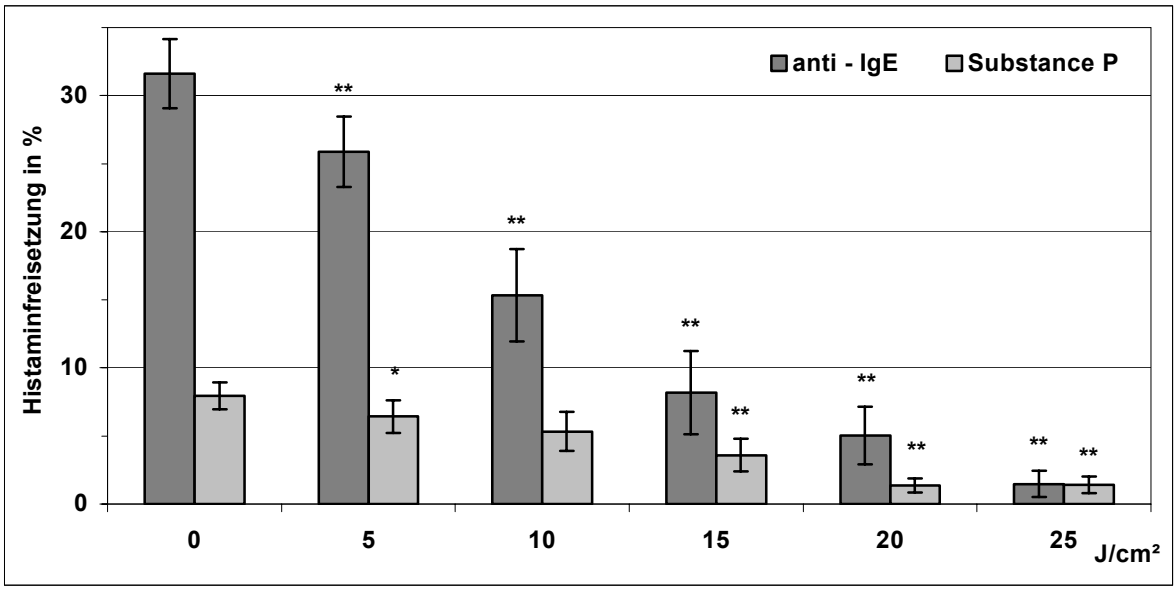

Abb. 7: Dosisabhängigkeit der anti – IgE und Substance P induzierten Histaminfreisetzung humaner dermaler Mastzellen bei UVA-1 Bestrahlung
Die Mastzellen wurden mit UVA-1 bestrahlt und die Histaminfreisetzung wurde 24 Stunden später ermittelt. MW und SEM aus 10 Versuchen. *p = 0,022; **p ≤ 0,007.
(die für jede Bestrahlungsdosis maximale Histaminausschüttung entspricht 100%)

Bestrahlung mit PUVA-1 – Stimulierte Histaminfreisetzung

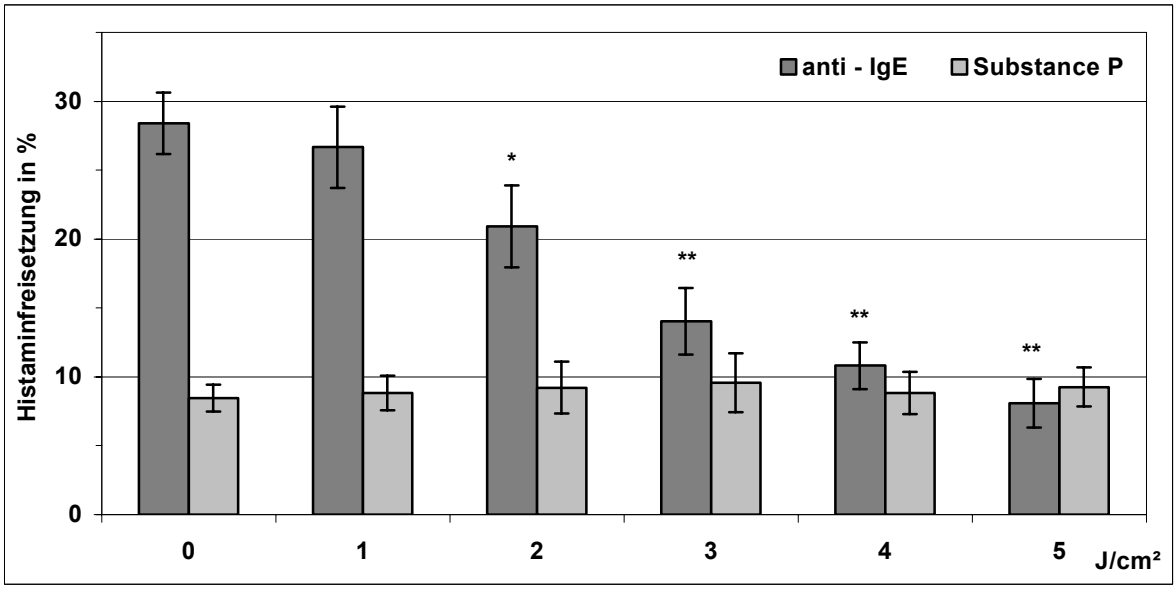

Abb. 8: Dosisabhängigkeit der anti – IgE und Substance P induzierten Histaminfreisetzung humaner dermaler Mastzellen bei PUVA-1 Bestrahlung.
Die Mastzellen wurden mit PUVA-1 bestrahlt (500ng/ml 8-MOP) und die Histaminfreisetzung wurde 24 Stunden später ermittelt. MW und SEM aus 9-8 Versuchen. *p = 0,028; **p = 0,008.
(die für jede Bestrahlungsdosis maximale Histaminausschüttung entspricht 100%)

Zusätzlich zur stimulierten Histaminfreisetzung wurde die basale, also die nicht stimulierte Histaminfreisetzung aller drei Bestrahlungsarten bestimmt (s. Abb. 9).
Im Gegensatz zu der reduzierten stimulierten Mediatorausschüttung verursachte das UV Licht im untersuchten Dosisbereich eine hochsignifikante Zunahme der spontanen Histaminfreisetzung. So stieg innerhalb der ersten 24 Stunden nach UVB Bestrahlung die Mediatorfreisetzung um 56,15%, nach UVA-1 um 52,75% und nach PUVA-1 um 60,90%.

Die nicht stimulierte Histaminfreisetzung

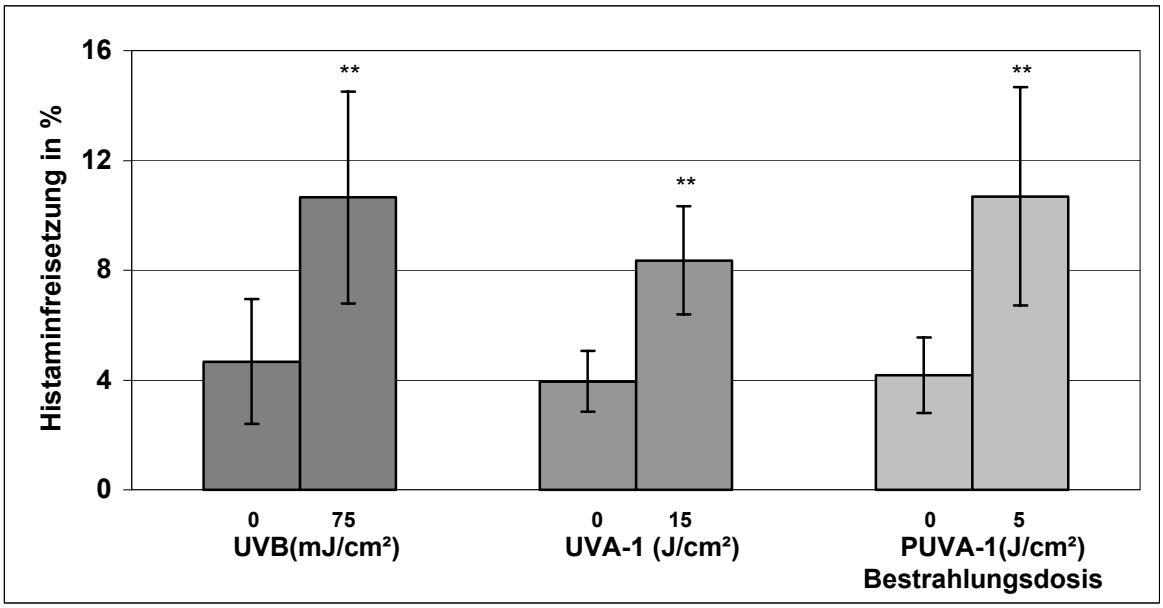

Abb. 9: Die nicht stimulierte Histaminfreisetzung humaner dermaler MC.
Die MC wurden mit UVB (0 und 75mJ/cm²), UVA-1 (0 und 15J/cm²) und PUVA-1 (0 und 5 J/cm², 500 ng/ml) bestrahlt und die Histaminfreisetzung in Bezug zum Gesamthistamingehalt wurde 24 Stunden später ermittelt. Darstellung von MW und SEM. Zahl der Versuche: UVB: 11, UVA-1: 10 und PUVA-1: 9; **$p < 0,01$

4.2 Die Tryptasefreisetzung nach UVB, UVA-1 und PUVA-1 Bestrahlung

Im vorherigen Versuch wurde die Inhibierung der anti-IgE induzierten Histaminfreisetzung durch UV Licht festgestellt. Zum Vergleich dieser Daten wurde im Folgenden untersucht, ob 24 Stunden nach UV Bestrahlung eine ähnlich inhibitorische Wirkung auf die anti-IgE provozierte Tryptasefreisetzung eintritt. Die Tryptase wurde aus folgendem Grund gewählt. Sie ist, wie auch Histamin zum einen in sekretorischer Granula gespeichert und zum anderen ein spezifischer Marker für die Mastzellstimulation.

Für die UVB Bestrahlung wurde eine Dosis von 75 mJ/cm², für UVA-1 von 15 J/cm² und für PUVA-1 von 5 J/cm² gewählt, weil sie näherungsweise ein äquivalentes Potential hinsichtlich der Reduktion der stimulierbaren Histaminfreisetzung gezeigt hatten.

Unbestrahlte, anti-IgE stimulierte Mastzellen setzten bei Präinkubation mit 8-Methoxypsoralen 17,2 beziehungsweise ohne Vorbehandlung 18,6% Tryptase frei. Die alleinige Behandlung der Zellen mit dem Photosensibilisator 8-MOP scheint keinen Einfluss auf die Tryptasefreisetzung zu haben, denn zwischen 17,2 und 18,5 besteht kein signifikanter Unterschied.

Nach UVB Bestrahlung reduzierte sich die anti-IgE induzierte Tryptasefreisetzung signifikant, auf 11,4%. Dies entspricht einer Inhibierung um 38,7% und ist damit ähnlich deutlich, wie die nach UVA-1 Bestrahlung. Sie belief sich in diesem Ansatz auf 39,2%, denn verglichen mit den freigesetzten 18,6% aus der Kontrollpopulation, wurden hier lediglich 11,3% Tryptase auf den anti-IgE Stimulus hin ausgeschüttet. Etwas deutlicher reagierten die mit PUVA-1 bestrahlten Mastzellen, denn sie konnten nur noch 8,9% der Serinprotease freisetzen. Verglichen mit den 8-Methoxypsoralen vorbehandelten Mastzellen, die auf den gleichen Stimulus mit anti-IgE noch 17,2% abgaben, entspricht dies einer Inhibierung um 48,1% (s. Abb. 10).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich für die drei Bestrahlungsarten eine signifikante Inhibierung der anti-IgE induzierten Tryptasefreisetzung zeigen ließ.

Tryptasefreisetzung von bestrahlten dermalen Mastzellen

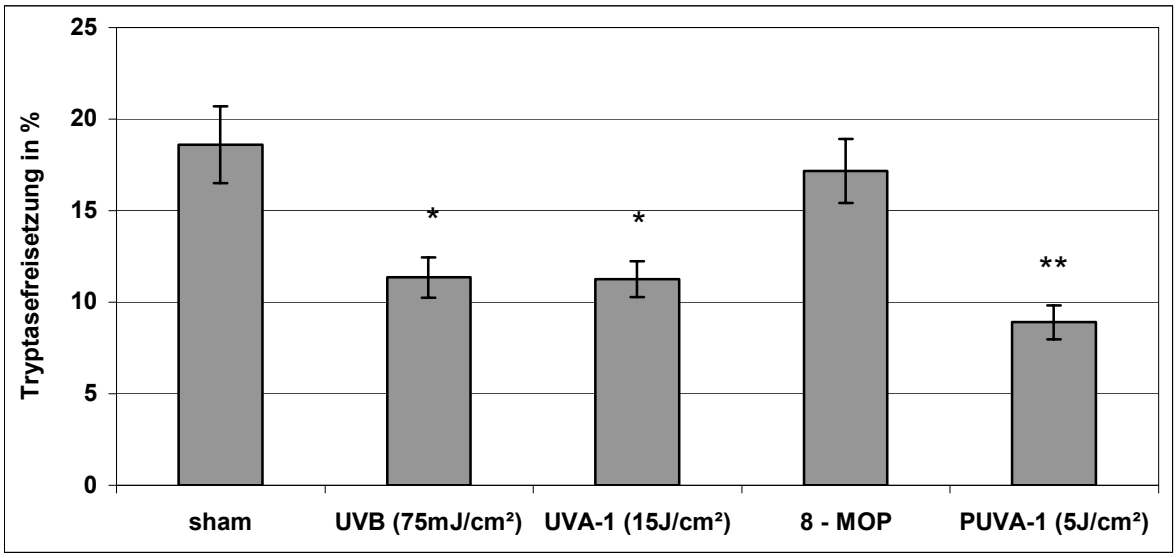

Abb. 10: Die anti-IgE induzierte Tryptasefreisetzung von humanen dermalen Mastzellen nach UVB, UVA-1 und PUVA-1 Bestrahlung.
Die MC wurden mit 75 mJ/cm² UVB, 15 J/cm² UVA-1 und 5 J/cm² PUVA-1 bestrahlt und die Tryptasefreisetzung wurde 24 Stunden später ermittelt. Für PUVA-1 und 8-MOP gilt + 500ng/ml 8-Methoxypsoralen. Sham und 8-MOP sind unbestrahlte Kontrollen. MW und SEM aus 7-9 Versuchen. *p = 0,018; **p=0,008.

4.3 Die basale Freisetzung von Interleukin-6, Interleukin-8 und Tumornekrosefaktor-α nach Bestrahlung mit UV Licht

Es wurden humane dermale Mastzellen (1 x 10^6 MC pro ml) mit UV Licht bestrahlt, um 24 Stunden später die basale Freisetzung der Interleukine-6 und –8 sowie des Tumornekrosefaktors-α bestimmen zu können. Auch bei diesem Versuch wurden für die drei Bestrahlungsarten Dosen ausgewählt, mit annähernd gleichen inhibitorischen Effekten bezüglich der Histaminausschüttung (s. Kapitel 3.2.6).

Die unbestrahlten Mastzellkontrollen gaben durchschnittlich 220,7 pg/ml beziehungsweise bei Präinkubation mit 8-MOP 219,1 pg/ml Interleukin-6 ab. Wurden die Zellen mit UVB Licht bestrahlt, so setzten sie im Laufe der 24 Stunden 86,6 pg/ml des Zytokins frei, was verglichen mit der Kontrolle nur noch 39,2% sind und einer Inhibierung um 60,8% entspricht. Um 66,9% inhibiert wurden die Zellen nach Behandlung mit PUVA-1 Licht, denn sie schütteten lediglich 72,6 pg/ml des hier untersuchten Interleukins aus. Am deutlichsten jedoch war das Resultat bei der UVA-1 Bestrahlung, da die Zellen um 82,3% ihre Fähigkeit der basalen Freisetzung von IL-6 einbüßten und nur 39,2 pg/ml abgaben (s. Abb. 11).

Verglichen mit den Interleukin-6 Daten ergab sich bei der Untersuchung des Interleukins-8 ein recht ähnliches Bild. Denn auch hier zeigten sich die inhibitorischen Auswirkungen des UV Lichtes. So setzten die Mastzellen in den 24 Stunden nach der UVB Bestrahlung nur 1244,7 pg/ml des Zytokins frei, was verglichen mit den 2953,2 pg/ml aus der unbestrahlten Kontrolle einer Inhibierung um 57,9% gleichkommt. Am deutlichsten wurden die Auswirkungen wieder bei der UVA-1 Bestrahlung, denn die Zellen waren nicht in der Lage mehr als 21,4%, dies entspricht absolut 632,3 pg/ml, des Interleukins 8 abzugeben. Durch die PUVA-1 Bestrahlung verminderte sich die basale Ausschüttung um 73,3% und zeigte so einen ebenfalls signifikanten Unterschied verglichen mit den 8-MOP vorbehandelten und unbestrahlten Mastzellen (s. Abb. 12).

Bei der Untersuchung der 24-stündigen basalen Freisetzung des Tumornekrosefaktors-α fielen zweierlei Dinge auf. Zum einen bewegte sich die Ausschüttung dieses Zytokins, verglichen mit den untersuchten Interleukinen auf einem sehr niedrigen Niveau um 6 pg/ml. Zum anderen unterlag diese geringe Menge an sezerniertem TNF-α nur gering-

fügigen nicht signifikanten Schwankungen bei der Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1. Das UV Licht hatte also auf die basale TNF-α Freisetzung keinerlei Einfluss (s. Abb. 13).

Basale Interleukin – 6 Freisetzung

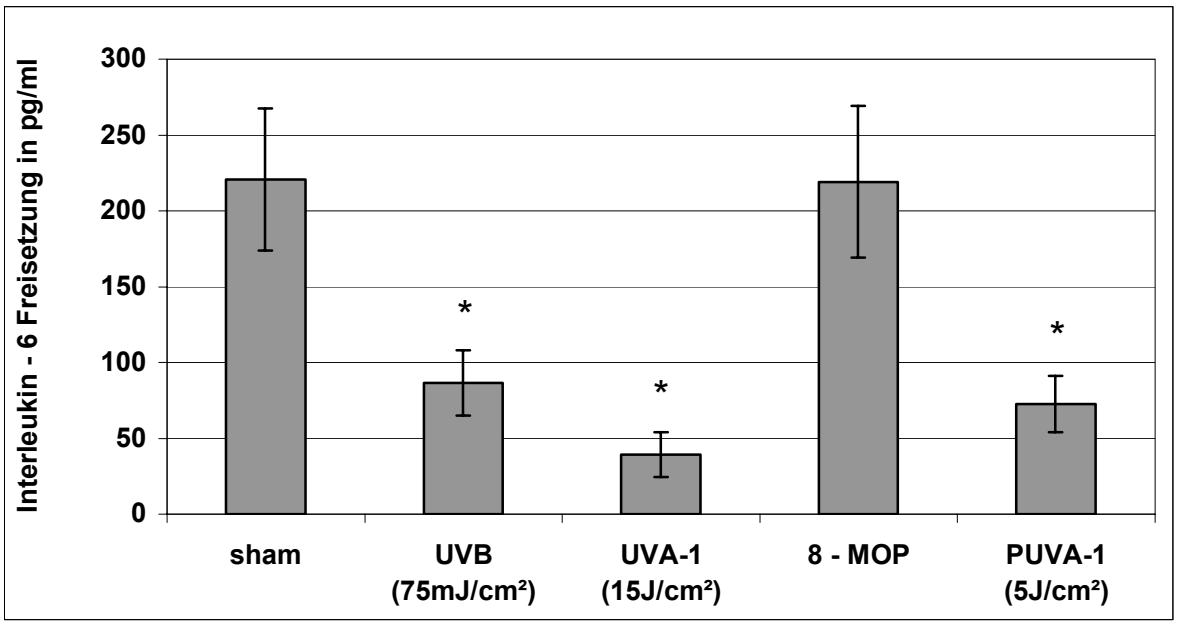

Abb. 11: Die basale Interleukin – 6 Freisetzung von humanen dermalen Mastzellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsart.
Die Mastzellen wurden mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 (500ng/ml 8 – MOP) bestrahlt und ihre unstimulierte IL-6 Ausschüttung wurde 24Stunden später ermittelt. Unbestrahlte Kontrollen sind sham und 8 – MOP (500ng/ml). MW und SEM aus 6 Versuchen. *p = 0,028.

Basale Interleukin – 8 Freisetzung

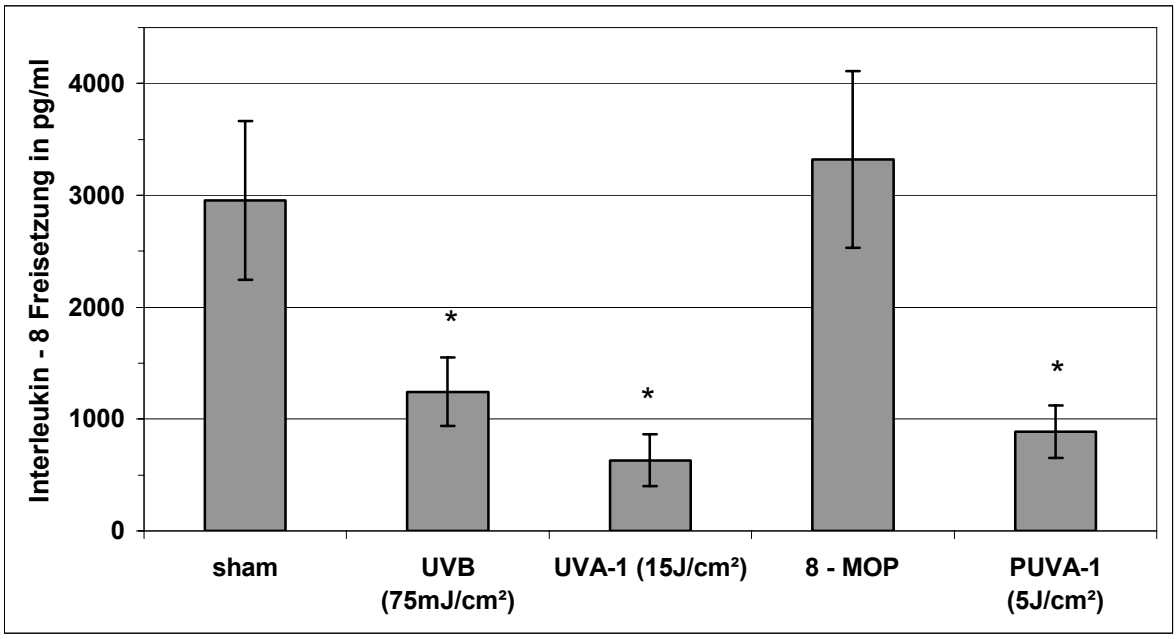

Abb. 12: Die basale Interleukin – 8 Freisetzung von humanen dermalen Mastzellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsart.
Die Mastzellen wurden mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 (500ng/ml 8 – MOP) bestrahlt und ihre unstimulierte IL-6 Ausschüttung wurde 24Stunden später ermittelt. Unbestrahlte Kontrollen sind sham und 8 – MOP (500ng/ml). MW und SEM aus 6 Versuchen. *p = 0,028

Basale Tumornekrosefaktor - α Freisetzung

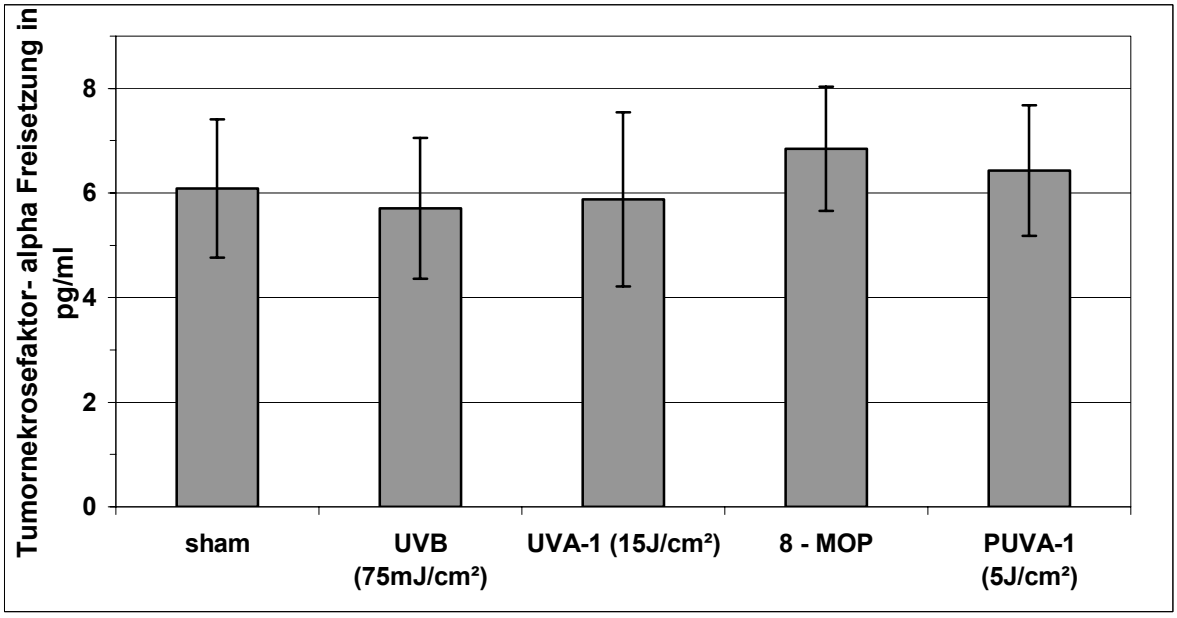

Abb. 13: Die basale Tumornekrosefaktor - α Freisetzung von humanen dermalen Mastzellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsart.
Die Mastzellen wurden mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 (500ng/ml 8 – MOP) bestrahlt und ihre unstimulierte TNF-α Ausschüttung wurde 24Stunden später ermittelt. Unbestrahlte Kontrollen sind sham und 8 – MOP (500ng/ml). MW und SEM aus 6 Versuchen.

4.4 Die Expression der Moleküle CD107a und CD63 nach Bestrahlung mit UV Licht

Die Rezeptoren CD107a und CD 63 gehören zu der Gruppe der LAMPs (lysosome - associated membrane proteins) und befinden sich auf Lysosomen und Mastzellgranula. Sie sind bei der Degranulation, also während der Verschmelzung von Mastzell- und Vesikelmembran auf der Mastzelloberfläche verstärkt nachweisbar.

An dieser Stelle wurde untersucht, inwiefern UV Licht einen Einfluss auf die anti-IgE induzierte vermehrte Expression der Moleküle CD 107a und CD63 hat. Die Versuche wurden fünfmal wiederholt und zeigten jeweils nahezu gleiche Resultate. Exemplarisch seien die folgenden Abbildungen aufgelistet.

Auf der Abb. 16 erkennt man das nur wenige, im Mittel 10±1,1% der unbestrahlten und unstimulierten Mastzellen den Rezeptor CD 107a (LAMP-1) auf ihrer Oberflächenmembran exprimieren (graue Kurve). Nach Stimulation mit anti-IgE entstehen zwei Populationen, von denen eine nach wie vor nur in geringer Weise CD 107a zeigt und eine zweite größere Gruppe von durchschnittlich 53±7,3%, die vermehrt das Oberflächenmolekül aufweist (schwarze Kurve). Gleiches Phänomen, also das nach Stimulation mit anti-IgE die Oberfläche der MC intensiver mit CD 107a besetzt ist, lässt sich auch bei den mit 8-MOP präinkubierten Zellen feststellen (s. Abb. 14). So wurden bei durchschnittlich 39±1,7% der MC (anti-IgE stimuliert versus nicht stimuliert) der anti-IgE induzierte Anstieg von CD 107a deutlich.

Diese beiden Kontrollen werden nun mit den bestrahlten Zellen verglichen. Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass eine leicht erhöhte basale Expression von LAMP-1 bei UVB und PUVA-1 und eine stark erhöhte basale Expression bei UVA-1 demonstriert werden konnte. Im Einzelnen waren dies für UVB 16±2,5%, für PUVA-1 24±2,1% und für UVA-1 50±6,2% (s. graue Kurven der Abbildungen 17, 15, 18).

Nach Stimulation mit anti-IgE lässt sich für 11±2,8% (anti-IgE stimuliert versus nicht stimuliert) bei UVB, für 10±3,1% bei UVA-1 und für 13±2,6% bei PUVA-1 die Nachweisbarkeit von CD107a zwar noch zusätzlich zur basalen Expression steigern (s. schwarze Kurven der Abbildungen 17, 18, 15), bei weitem jedoch nicht in dem Ausmaße wie bei den unbestrahlten Zellen (sham: 43±6,2% und 8-MOP: 39±1,7%).

Durch die UV Bestrahlung ließ sich die ansonsten durch anti-IgE induzierbare Mehrexpression von CD 107a auf humanen dermalen MC supprimieren.

Die Oberflächenexpression von CD107a auf humanen dermalen MC

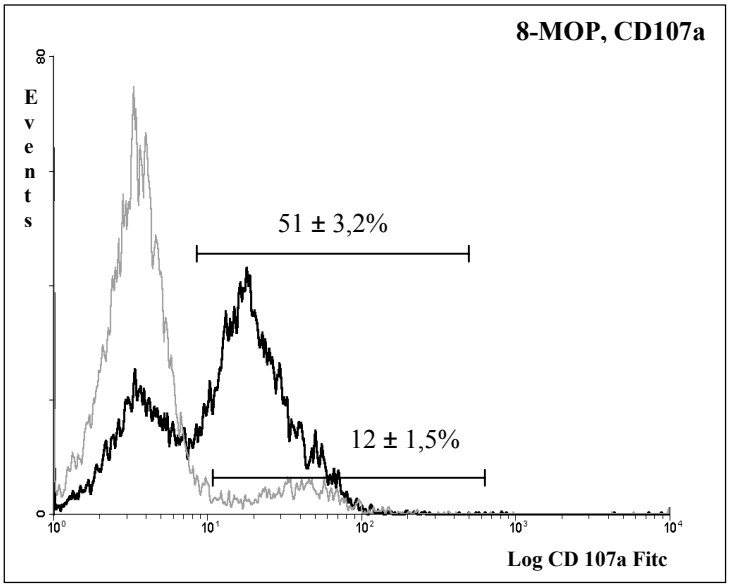

Abb. 14: Die anti-IgE induzierte Expression von CD107a auf humanen dermalen Mastzellen bei Behandlung mit 8-Methoxypsoralen.
Die MC wurden mit 8-MOP (500ng/ml) präinkubiert und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 107a bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

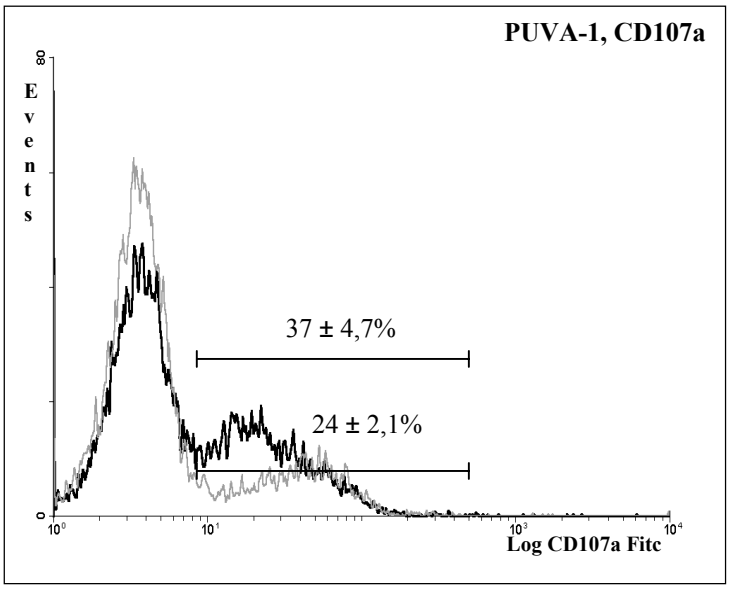

Abb. 15: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 107a auf humanen dermalen Mastzellen bei PUVA-1 Bestrahlung.
Die MC wurden mit PUVA-1 (500ng/ml) bestrahlt und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 107a bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

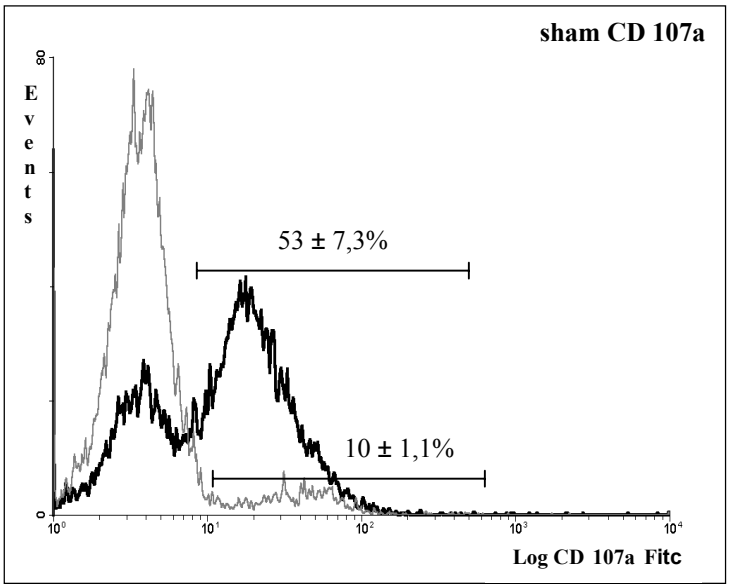

Abb. 16: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 107a auf unbestrahlten, humanen dermalen Mastzellen.
Bei unbestrahlten MC wurde die Oberflächenexpression von CD 107a bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

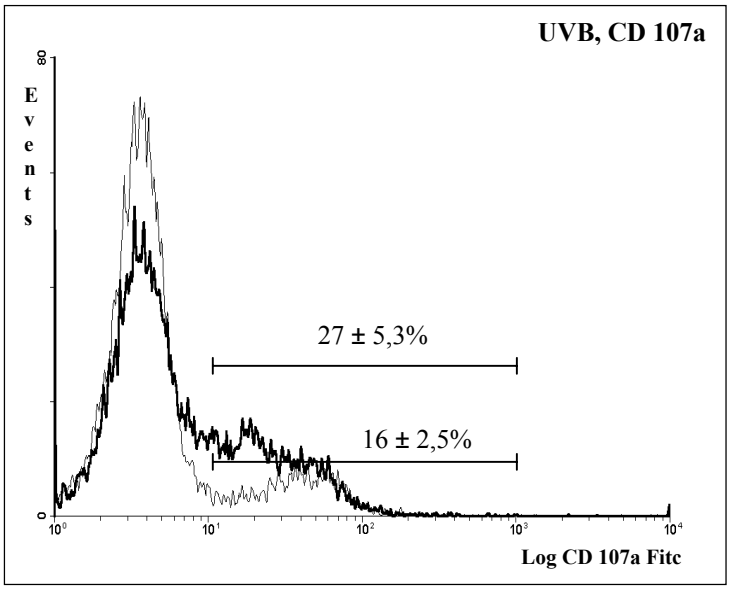

Abb. 17: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 107a auf humanen dermalen Mastzellen bei UVB Bestrahlung.
Die MC wurden mit UVB bestrahlt und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 107a bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

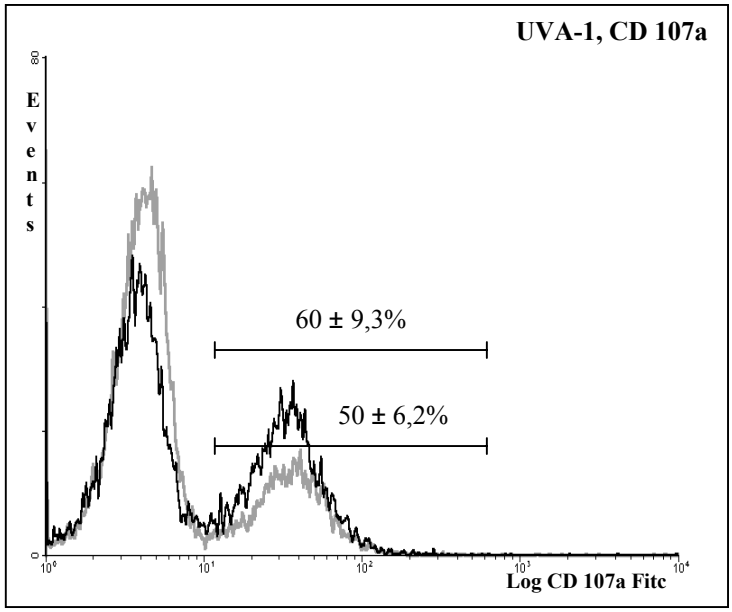

Abb. 18: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 107a auf humanen dermalen Mastzellen bei UVA-1 Bestrahlung.
Die MC wurden mit UVA-1 bestrahlt und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 107a bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

Bei dem Molekül CD63 zeigt sich ein ganz ähnliches Bild wie bei CD 107a. Die beiden unbestrahlten Kontrollen sham und 8-MOP belegen, dass unstimulierte Mastzellen in nur geringer Intensität LAMP-3 auf ihrer Oberfläche tragen (s. graue Kurven der Abbildungen 21 und 19). Werden sie mit anti-IgE stimuliert, so kommt es im Zuge der Degranulation zu einem deutlichen Anstieg der Intensität (s. schwarze Kurven der Abbildungen 21 und 19).

Bedingt durch die Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 steigt die basale Expression von CD63 auf der Mastzelloberfläche. Die auf den anti-IgE Stimulus folgende Hochregulation des Moleküls wird durch die UV Bestrahlung inhibiert, was sich graphisch durch das Angleichen der beiden Kurven zeigt. (s. Abb. 22, 23 und 20)

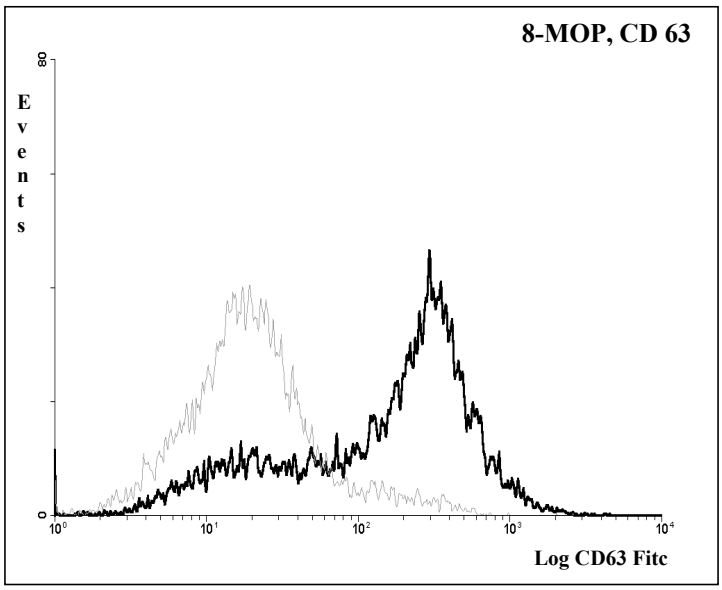

Abb. 19: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 63 auf humanen dermalen Mastzellen bei Behandlung mit 8-Methoxypsoralen.
Die MC wurden mit 8-MOP präinkubiert (500ng/ml) und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 63 bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

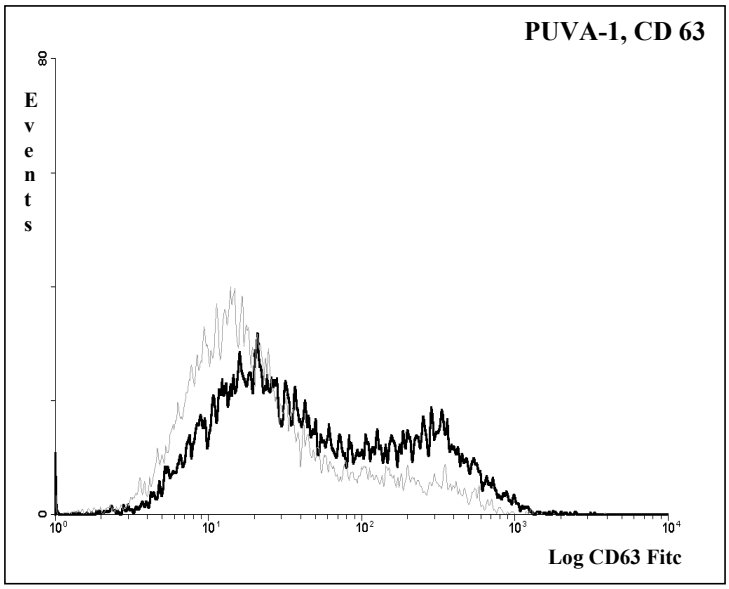

Abb. 20: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 63 auf humanen dermalen Mastzellen bei PUVA-1 Bestrahlung.
Die MC wurden mit PUVA-1 bestrahlt (500ng/ml) und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 63 bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

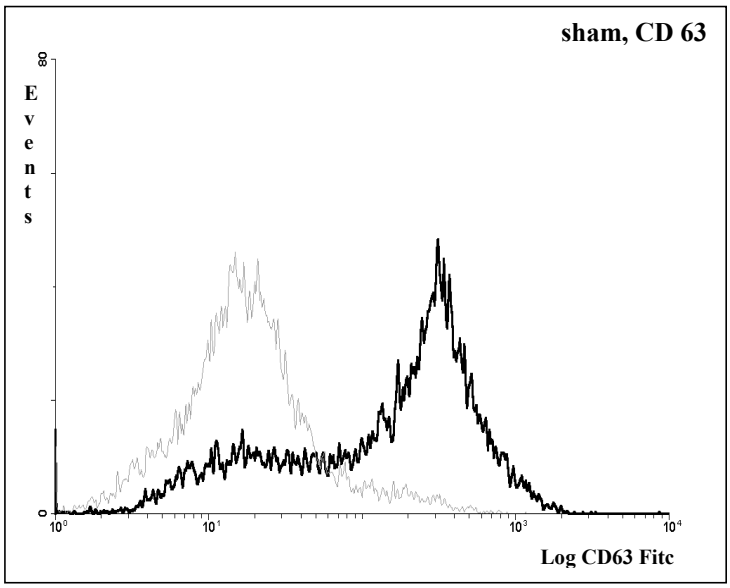

Abb. 21: Die anti-IgE induzierte Expression von CD 63 auf unbestrahlten humanen dermalen Mastzellen.
Bei unbestrahlten MC wurde die Oberflächenexpression von CD 63 bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

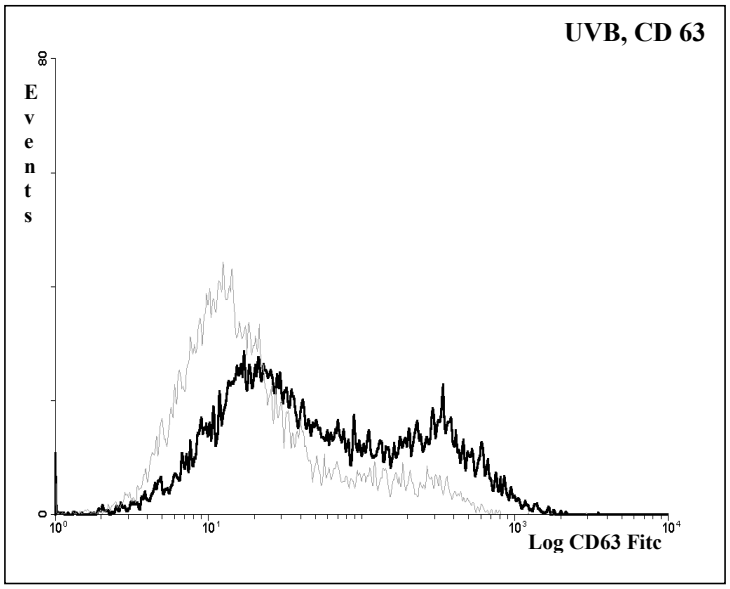

Abb. 22: **Die anti-IgE induzierte Expression von CD 63 auf humanen dermalen Mastzellen bei UVB Bestrahlung.**
Die MC wurden mit UVB bestrahlt und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 63 bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

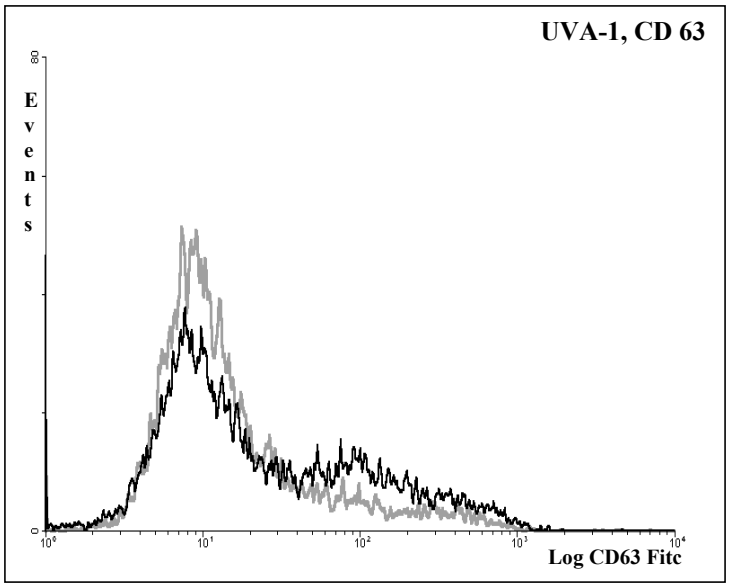

Abb. 23: **Die anti-IgE induzierte Expression von CD 63 auf humanen dermalen Mastzellen bei UVA-1 Bestrahlung.**
Die MC wurden mit UVA-1 bestrahlt und anschließend wurde die Oberflächenexpression von CD 63 bestimmt. Die graue Kurve zeigt die Expression unstimulierter und die schwarze Kurve die anti-IgE stimulierter MC.

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Histaminfreisetzung

- Die Untersuchung der anti-IgE induzierten Histaminfreisetzung bei humanen dermalen Mastzellen ergab nach Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 eine dosisabhängige und hochsignifikante Inhibition.

- Es wurde zusätzlich die dosisabhängige und signifikante Inhibition der Substanz P stimulierten Histaminfreisetzung nach UVA-1 Bestrahlung aufgezeigt.

- Des weiteren wurde festgestellt das nach Bestrahlung mit UVB und PUVA-1 keine signifikante Abweichung der Substanz P induzierten Histaminausschüttung verglichen mit den unbestrahlten Kontrollen stattfindet.

- Die nicht stimulierte Histaminfreisetzung stieg bei jeweils äquivalenter Bestrahlungsdosis (UVB: 75 mJ/cm², UVA-1: 15 J/cm², PUVA-1: 5 J/cm²) in hochsignifikanter Weise an.

Die Tryptasefreisetzung

- Analog zu der Histaminfreisetzung wurde der ebenfalls präformiert vorliegende Mediator Tryptase in seiner anti-IgE induzierten Ausschüttung signifikant sowohl nach UVB und UVA-1 als auch nach PUVA-1 Bestrahlung inhibiert.

Die Modulation der IL-6, IL-8 und TNF-α Freisetzung

- Eine signifikante Abnahme der basalen Freisetzung von Interleukin-6 konnte durch die Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 erzielt werden.
  Gleiches Resultat, also ebenfalls eine signifikante Inhibierung ergab sich für das Interleukin-8.

- Bei der basalen Tumornekrosefaktor-α Ausschüttung ließ sich demonstrieren, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten humanen dermalen Mastzellen und den unbestrahlten Kontrollen besteht.
  Zudem erwiesen sich die gemessenen Werte der basalen Freisetzung als äußerst gering.

Die Expression von CD107a und CD63

- Die Stimulation der humanen dermalen Mastzellen mit anti-IgE führt zu einer vermehrten Oberflächenpräsenz von CD63 und CD107a verglichen mit der basalen Expression.
  Ferner ließ sich zeigen, dass die basale Expression der Oberflächenrezeptoren CD107a und CD63 nachweisbar bei UVB, PUVA-1 und besonders deutlich bei UVA-1 Bestrahlung ansteigt.

- Durch Bestrahlung mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 konnte die anti-IgE induzierte Mehrexpression von CD 107a und CD 63 deutlich reduziert werden.

5 Diskussion

Es sind unterschiedlichste Effekte von UV Licht auf menschliche Zellen bekannt. So wurde in bisherigen Studien berichtet, dass UV Bestrahlung pro- oder antiinflammatorische Effekte im Bereich der Haut, insbesondere durch die Beeinflussung von Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten und Leukozyten, bewirken kann. Beispielsweise wird von UV Licht induzierter IL-10[92] und IL-6[93, 94] Freisetzung bei Keratinozyten und von UVA-1 verursachten oxidativen Schäden an Lipiden und Proteinen bei Fibroblasten[82] berichtet. Auch eine UVA-1 induzierte Apoptose von dermalen Fibroblasten ist bekannt[95].

Die Einsatzmöglichkeiten von UV Licht bei Hauterkrankungen haben sich als äußerst vielfältig erwiesen. So findet allein die PUVA-1 Therapie bei Psoriasis vulgaris, Psoriasis pustulosa, Lichen ruber planus, Mycosis fungoides und Urticaria pigmentosa seine Anwendung. Die einzelnen Wirkmechanismen des UV Lichtes, die genauen Ursachen für den therapeutischen Nutzen beziehungsweise die Unterschiede zwischen den einzelnen Bestrahlungsarten sind verglichen mit der routinemäßigen und täglichen Anwendung der Phototherapie überraschend wenig für humane dermale Mastzellen erforscht.

Bisherige Studien befassten sich größtenteils mit der Untersuchung von Ratten abstammender Mastzellen oder mit den zur Verfügung stehenden Mastzelllinien. Solche Zellen, wie beispielsweise die der HMC-1 Mastzelllinie (leukämische Mastzellen) weisen hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit und ihres Zytokinprofils Parallelen im Verhalten mit den menschlichen Mastzellen auf. Allerdings zeigen sie auch gravierende Unterschiede. So verfügen sie über ein hohes proliferatives Potential, mit der daraus resultierenden permanenten Zellteilung. Eine Eigenschaft die bei den reifen humanen Mastzellen in dem Ausmaße nicht zu finden ist. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich Unterschiede in dem Apoptoseverhalten bei UV Bestrahlung. Denn anders als die apoptosefreudigen, unreifen, leukämischen Mastzellen (HMC-1), gelten die ausdifferenzierten, menschlichen Mastzellen als äußerst langlebig und strahlenresistent, so dass ihr Zelluntergang während der Phototherapie unwahrscheinlich ist. Das dieses Verhalten der HMC-1 Zellen von der Teilungsrate und nicht von dem leukämischen Status

abhängt, zeigt sich, wenn reife humane Mastzellen mittels SCF und IL-4 zum Proliferieren gebracht werden und dann ebenso apoptosefreudig auf die UV Strahlung reagieren[96]. Genaue Auskünfte über das Verhalten von humanen Mastzellen erlangt man also nur von diesen selbst.

Ist die Apoptose bei den reifen Mastzellen eher vernachlässigbar, so wird die Inaktivierung, das heißt die verminderte Mediatorfreisetzung um so bedeutender, für die Erklärung therapeutischer Erfolge mit UV Licht. Ein ähnliches Angriffsmuster findet sich bei weiteren Therapiemaßnahmen. Antiallergika (wie zum Beispiel Cromoglycinsäure und Oxatomid) auch Mastzellstabilisatoren genannt, hemmen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen. Sie werden wegen ihrer begrenzten Wirksamkeit allerdings nur in der topischen Therapie bei Erkrankungen aus dem allergischen Formenkreis eingesetzt. Antihistaminika wie beispielsweise Dimetinden (Fenistil), Fexofenadin (Telfast) und Cetericin (Zyrtec) hemmen die Wirkung des Histamins durch reversible Blockade der H_1- Rezeptoren. Damit können sie sinnvoll gegen Urtikaria, allergische Rhinitis, atopische Dermatitis, Pruritus und Prurigo eingesetzt werden. Auch die in der Dermatologie häufig verwendeten Glukokortikoide wirken antientzündlich, allgemein immunsupprimierend sowie antiproliferativ und induzieren ebenfalls keine Apoptose.

Die Erforschung der Einwirkungen des UV Lichtes auf die Mediatorfreisetzung der dermalen Mastzellen macht unter dem Gesichtspunkt der therapeutischen Relevanz für die Fülle an Erkrankungen durchaus Sinn.

Das Histamin gilt als der wohl prominentester Vertreter aus der Gruppe der Mastzellmediatoren. Es liegt bereits präformiert in der Granula gespeichert vor und kann nach Exozytose an H_1- und H_2- Rezeptoren sowie an sensible Nervenendigungen binden, um so zu einer Senkung des Blutdruckes, einer Erweiterung und Erhöhung der Durchlässigkeit der Blutgefäße, einer Erregung der glatten Darmmuskulatur, einer Kontraktion der Bronchien, einer Herzfrequenzsteigerung und einer Steigerung der Magensekretion führen[39].

Diese Freisetzung von Histamin kann auf unterschiedlichste Art und Weise getriggert werden. Typische Stimuli der Mastzelle sind Immunglobuline (Immunglobulin E), Neuropeptide (Substanz P, Neuropeptid Y), Zytokine (Stem cell factor) und

Komplementsystem Proteine (C3a, C4a, C5a). Aber auch andere Proteine (Histamin releasing factor) und Infektionen (Parasiten, Toxine) sind in der Lage die Mastzelle zu aktivieren[97, 98]. Mit der Aktivierung ist per definitionem die Degranulation der Mastzelle und die darauf folgende Freisetzung der präformierten und in den Granula gespeicherten Mediatoren gemeint.

Bei der Stimulation mit Immunglobulinen, die beispielsweise bei der spezifischen Sensibilisierungsphase der Typ-1-Sofortreaktion gebildet werden, spielen die Fc-Rezeptoren eine herausragende Rolle. IgE bindet an FcεR und durch multivalente Antigene oder Antikörper gegen dieses Immunglobulin findet eine Quervernetzung auf der Oberfläche der Mastzelle statt. Es folgt eine Signalkaskade an deren Ende eine intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhung und damit eng verbunden eine Sezernierung der Mediatoren steht[37].

Bei der nicht-immunologischen Stimulation der Mastzelle durch Substanz P ist der genaue molekulare Mechanismus noch Gegenstand der aktuellen Forschung. Außer Frage steht, dass Substanz P prinzipiell eine Degranulation der Mastzelle provozieren kann[99]. Studien haben gezeigt, dass das Neuropeptid eine maximale histaminfreisetzende Wirkung bei einer Konzentration von 30µmol/l hat. Aber schon ab einer Konzentration von 5 pmol/l ist eine elektrophysiologische Erregung der Mastzelle feststellbar, so dass nach mehrmaliger Wiederholung dieser Stimulation eine Freisetzung von Mediatoren stattfindet[100]. Bei Nagetier-Mastzellen und auch bei der Rattenmastzelllinie RBL-2H3 konnte ein pertussistoxin-sensitiver G-Protein gekoppelter Neurokininrezeptor (NK-Rezeptor) festgestellt werden[101]. Insbesondere der NK-1-Rezeptor ließ sich durch Substanz P Dosen im mikromolaren Bereich aktivieren, so dass eine Mastzellaktivierung resultierte[102-104]. Da sich ein vergleichbarer Rezeptor auf humanen Mastzellen noch nicht nachweisen ließ, wird derzeit beim Menschen eine rezeptorunabhängige direkte G-Protein Aktivierung diskutiert[105-108]. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Strukturformel von Substanz P mit der speziellen Anordnung einer basischen NH_2-Gruppe direkt neben der hydrophoben COOH-Gruppe hierbei eine Schlüsselposition einnimmt[36]. So konnte mit einer synthetisch hergestellten Hybridtetrapeptidvariante eine fünfzigfach potentere Histaminfreisetzung erzielt werden, verglichen mit dem natürlich vorkommendem Substanz P.

Diese beiden Stimulierungsvorgänge, mit anti-IgE (Maus-Antikörper der IgM-Klasse, die sich gegen Fc-Epitope auf menschlichem IgE richten) und nativem Substanz P, wurden in dieser Arbeit in bezug auf die Histaminfreisetzung, insbesondere nach Bestrahlung, untersucht. Auch die spontane, also die nicht stimulierte Histaminausschüttung wurde erforscht. Interessanterweise hat das UV Licht zweierlei Effekte auf humane dermale Mastzellen. So provoziert es in hochsignifikanter Weise die basale Mediatorfreisetzung, um 56,15% bei UVB (75mJ/cm²), um 52,75% bei UVA-1 (15J/cm²) und um 60,90% bei PUVA-1 (5J/cm²), inhibiert jedoch die stimulierte Histaminausschüttung.
Hier ergab sich, dass unbestrahlte anti-IgE stimulierte Mastzellen eine durchschnittliche Netto-Histaminfreisetzung von 30,1% zeigten, die nach Bestrahlung dosisabhängig und signifikant verringert wurde. So konnte, nach jeweils maximaler Bestrahlungsdosis, durch UVB Licht eine Inhibierung der Histaminausschüttung um 81,1% durch PUVA-1 um 71,5% und durch UVA-1 sogar um 95,3% erzielt werden. Zeigte sich für die anti-IgE induzierte Mediatorfreisetzung nach Bestrahlung ein zumindest tendenziell einheitlich inhibitorisches Bild, so ergab sich für die Substanz P Untersuchungen ein differenzierterer Zusammenhang. Unbestrahlte dermale Mastzellen gaben netto, auf den Substanz P Stimulus hin, 8,9% vom Gesamthistamingehalt frei. Nach Behandlung mit UVB und PUVA-1 büßten die MC nicht ihre Fähigkeit ein auf den Substanz P Reiz adäquat zu reagieren und schütteten ähnlich viel Histamin aus, wie die unbestrahlten Zellen. Anders bei der UVA-1 Bestrahlung; hier konnte nach maximaler Dosis eine signifikante Inhibierung der Histaminfreisetzung um 82,3% beobachtet werden.
Das unterschiedliche Verhalten der Mastzellen bezüglich der Stimulation ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen der verwendeten Strahlungsarten zurückzuführen.
Durch UVB und PUVA-1 Behandlung werden bei humanen Mastzellen in erster Linie Störungen auf DNA-Ebene induziert. So kann UVB Licht aufgrund seiner Wellenlänge von der DNA absorbiert werden und sie daher direkt und unmittelbar schädigen[109, 110]. Durch die PUVA-1 Therapie kommt es zur Ausbildung sogenannter Photoaddukte zwischen den Pyrimidinbasen der DNA und aktiviertem 8-Methoxypsoralen[85, 86]. Daraus resultiert eine verzögerte und fehlerhafte Ablesung des Doppelstranges, was in einer Änderung von Quantität und Qualität der Transkripte münden kann. Zusammenfassend sind dieses Störungen der Zellhomöostase auf DNA-Ebene von

eher langfristigem Charakter. Bereits vorhandene, fertig synthetisierte Enzyme bleiben größtenteils ebenso unbeeinflusst, wie bereits gebildete m-RNA-Moleküle.
Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Singulett-Sauerstoffe und Hydroxylradikale wird durch das längerwellige UVA-1-Licht angeregt. Sie können an zahlreichen Punkten im Stoffwechsel der Zelle Störungen hervorrufen. So können Auswirkungen auf die verschiedenen Membranen durch Oxidation von ungesättigten Fettsäuren genauso beobachtet werden, wie Strukturveränderungen diverser Proteine[82-84]. Es werden wichtige Enzyme durch oxidative Modifikationen in ihrer Funktion beeinträchtigt und verstärkt dem Abbau durch Proteasomen-Komplexe zugeführt. Zwar sind Läsionen der DNA auch bei dieser Bestrahlungsform nicht gänzlich auszuschließen, sie sind aber definitiv nicht vordergründig.
Die Sauerstoffradikale sind extrem reaktionsfreudig und beginnen innerhalb von Sekunden bis Minuten die oxidativen Veränderungen an Proteinen und Membranen zu provozieren. Nun sind die meisten menschlichen Zellen diesen schädigenden Einflüssen nicht völlig schutzlos ausgeliefert. So besitzen sie Verteidigungsmechanismen wie beispielsweise Hitzeschockptroteine und Radikalfänger. Man kann davon ausgehen, dass auch humane Mastzellen aus diesem Arsenal einiges zur Verfügung steht[73, 111, 112]. Jedoch können die hohen Bestrahlungsdosen von bis zu 25J/cm^2 zu einer Überbelastung der Schutzmechansimen führen, was einen zumindest temporären Totalausfall der Zelle zu Folge hat. Für die Funktionslosigkeit der Zelle sprechen die drastische Inhibierung der anti-IgE und SP induzierten Histaminausschüttung nach maximaler UVA-1 Bestrahlung. Das es sich hierbei um einen reversiblen Effekt handelt, die Mastzellen sich also zu einem gewissen Teil von der Belastung wieder erholen können zeigen Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe, in denen nach 48 beziehungsweise nach 72 Stunden wieder vermehrt Histamin ausgeschüttet wurde. An dieser Stelle ist es lohnenswert, auf die im Rahmen der PUVA-1 Behandlung entstehenden Sauerstoffspezies einzugehen. Denn auch bei dieser Bestrahlungsform wird das UVA-1 Licht eingesetzt. Allerdings in einer wesentlich geringeren Dosis (maximal 5J/cm^2), so dass die Exposition der Zellen weitaus kürzer ist und die Bildung der Radikale nur auf niedrigem Niveau vollzogen wird. Die Schutzmechanismen werden bei weitem nicht in dem Maße überfordert, wie

bei UVA-1 Behandlung und somit rücken die eher längerfristigen DNA-Schäden in den Vordergrund.
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine Beeinflussung der verschiedenen Funktionen der bestrahlten Zellen wahrscheinlich auf eine Fülle unterschiedlicher kleinerer und größerer Modifikationen im komplexen Zusammenspiel der einzelnen Stoffwechselprozesse zurückzuführen ist.

Die Serinprotease Tryptase wird fast ausschließlich in Mastzellen exprimiert. Sie liegt in enzymatisch aktiver Form in der sekretorischen Granula bereit, wobei ihre Aktivität durch die Kombination von saurem pH, hoher Histaminkonzentration und hoher Konzentration von divalenten Kationen reguliert wird. Gemeinsam mit anderen Mediatoren wie Histamin wird sie während der Mastzelldegranulation in den Extrazellulärraum freigesetzt.
Bisherige in vitro Studien konnten belegen, dass Tryptase neben einer Bedeutung für die klassischen mastzellassoziierten Erkrankungen eine Funktion als Mediator bei weiteren Entzündungsreaktionen sowie bei dem Auf- und Umbau von Gewebe hat. Tryptase gilt außerdem als spezifischer Marker für die Aktivierung von Mastzellen. So ist die Konzentration der beim Gesunden kontinuierlich, in geringen Mengen ins Blut sezernierten Tryptase offensichtlich proportional zu der Anzahl im Körper zirkulierender Mastzellen. Die Konzentration der Protease steigt bei Krankheiten wie dem allergischen Asthma, der allergischen Rhinitis, dem Atopischen Ekzem, der Urtikaria, der Psoriasis, dem Lichen ruber planus, dem nummulären Ekzem, den Mastozytosen, den interstitiellen Lungenerkrankungen, der Multiplen Sklerose und bei Autoimmunerkrankungen, wie dem Bullösen Pemphigoid und dem Pemphigus vulgaris. Nicht nur unter diesem Aspekt schien es sinnvoll die anti-IgE induzierte Tryptasefreisetzung in Abhängigkeit von den drei Bestrahlungsarten zu erforschen.
Es wurde nun nach den vorangegangenen Versuchen, bei denen sich eine signifikante und dosisabhängige Inhibierung der anti-IgE induzierten Histaminausschüttung darstellen ließ mit ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Tryptasefreisetzung gerechnet. Schließlich weisen beide Mediatoren prinzipiell viele Gemeinsamkeiten auf (siehe unten).

So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die anti-IgE stimulierten und bestrahlten dermalen Mastzellen deutlich weniger Tryptase abgaben, als die unbestrahlten Kontrollgruppen. Die Tryptaseausschüttung wurde nach UVB (75mJ/cm^2) und UVA-1 (15J/cm^2) Bestrahlung um 38,7% beziehungsweise um 39,2% inhibiert und nach PUVA-1 (5J/cm^2) Bestrahlung um 48,1%. Die in den Histaminversuchen ermittelten äquivalenten Bestrahlungsdosen (s. 4.1) zeigten sich in diesem Versuch als zutreffend, denn die erzielten Effekte der einzelnen Bestrahlungsarten sind in etwa auf dem gleichen Niveau und zeigen untereinander keinen signifikanten Unterschied.
Aber auch sonst harmonieren die ermittelten Tryptasewerte gut mit den Histamindaten. Während beider Versuchabläufe hat sich gezeigt, dass eine UV Licht induzierte Inhibierung der stimulierten Mediatorausschüttung stattfindet. Aufgrund der prinzipiellen Gemeinsamkeiten von Histamin und Tryptase, beide liegen präformiert in der Mastzellgranula vor, beide werden in der ersten Phase der Mediatorfreisetzung ausgeschüttet und beide unterliegen dem Einfluss der anti-IgE Stimulation, ist das ähnliche Freisetzungsverhalten der bestrahlten MC bezogen auf Histamin und Tryptase gut nachzuvollziehen.

Neben den bereits präformiert in Sekretgranula vorliegenden Mediatoren gehören auch Zytokine zu den Botenstoffen der Mastzelle. Diese in der Spätphase also innerhalb von Stunden freigesetzten Mediatoren umfassen die Interleukine 4, 5, 6 und 8, den Fibroblast growth factor, den Vascular endothelial growth factor und teilweise den Tumornekrosefaktor-α.
Das proinflammatorische Interleukin-6 ist ein Polypeptid mit pleiotropen Funktionen. Es beeinflusst die Immunantwort, greift in den Prozess der Hämatopoese ein, fungiert als Wachstumsfaktor für verschiedene Zelllinien und als Wachstumshemmer einiger Tumorzellen.
Trotz seiner Bedeutung gibt es wenige Arbeiten, die sich mit der Freisetzung von IL-6 aus humanen dermalen Mastzellen befassen. Derzeit veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass durch Neuropeptiden stimulierte periphere Blutmonozyten und dermale Fibroblasten mit einer gesteigerten Synthese des Mediators reagierten. Andererseits ließ sich in einer Arbeit feststellen, dass Substance P einen eher inhibitorischen Effekt auf Keratinozyten ausübte, was ihre Produktion von IL-6 betraf[113].

Es zeigt sich also bei den durch Neuropeptide stimulierten Zellen ein uneinheitliches Bild bezüglich der IL-6 Synthese.

Das zu den neutrophil-spezifischen Chemokinen gehörende Interleukin-8 ist vor allem ein hochpotenter Mediator für die neutrophile Chemotaxis und spielt bei der Aktivierung entzündlicher Prozesse eine wichtige Rolle.

In bisherigen Studien ist man sich dahingehend einig, dass einer Stimulation von Mastzellen innerhalb von Stunden eine messbare Sekretion von IL-8 folgt[62]. Eine weitere Arbeitsgruppe, die zur Überprüfung der These, ob das Zytokin nicht bereits präformiert in der Mastzellgranula vorliegt, untersuchte den m-RNA Gehalt für Interleukin-8 in unstimulierten Mastzellen. Hier kam man zu dem Resultat, dass die entsprechende m-RNA und somit auch IL-8 kontinuierlich von den humanen dermalen Zellen gebildet wird[51].

TNF-α ist ein äußerst pleiotropes Zytokin. So stimuliert es die Immunantwort, moduliert Entzündungsprozesse, aktiviert katabolische Prozesse, führt zu einer Gerinnungsaktivierung und hat eine direkte zytotoxische Wirkung für einige Tumorzellen.

Zurzeit unumstritten ist, dass der Tumornekrosefaktor-α von menschlichen Mastzellen durch Stimulation innerhalb von Stunden vermehrt sezerniert wird[114]. Es konnte auch eine Freisetzung von TNF-α innerhalb der ersten dreißig Minuten nach der Stimulation beobachtet werden. Dieses spricht für eine zumindest teilweise Präformierung des Zytokins mit nachfolgender Speicherung in der Mastzellgranula[51].

In der vorliegenden Arbeit interessierte inwiefern UV Licht einen Einfluss auf die basale also unstimulierte Freisetzung dieser drei Zytokine hat.

Gaben die unbestrahlten Mastzellen innerhalb von 24 Stunden durchschnittlich 220,7 pg/ml (8-MOP: 219,1 pg/ml) IL-6 an ihre Umgebung ab, so wurde diese Freisetzung nach UVB und PUVA-1 Bestrahlung um 60,8% beziehungsweise um 66,9% inhibiert und nach UVA-1 Bestrahlung gar um 82,3%. Eine ebenso signifikante Inhibierung ergab sich bei den Versuchen zu Interleukin-8. Die von unbestrahlten Mastzellen ausgeschüttete Menge des Mediators (sham: 2953,2 pg/ml und 8-MOP: 3318,3 pg/ml) konnte nach UVB und PUVA-1 Behandlung um 57,9% beziehungsweise um 73,3% reduziert werden und nach UVA-1 sogar um 78,6%.

Anders verhielt es sich bei den Untersuchungen von TNF-α. Nur durchschnittlich 6-7 pg/ml wurden von den Mastzellen innerhalb von 24 Stunden sezerniert. Eine derart geringe Freisetzung, die auch nach Bestrahlung mit UV Licht nicht signifikant beeinflusst werden konnte.

Wie ist dieses unterschiedliche Verhalten der Mastzelle, bezüglich der Sekretion dieser drei Zytokine zu erklären? Eine Interpretationsmöglichkeit ist, dass wie oben schon erwähnt Interleukin-8 kontinuierlich in der menschlichen Mastzelle gebildet und ebenso kontinuierlich in die Umgebung freigesetzt wird. Eine Freisetzung die ähnlich intensiv auch Interleukin-6 betrifft und dafür spricht, dass die Zytokine nicht oder nur in geringem Umfang in der Sekretgranula der Mastzelle gespeichert werden. Deswegen ist die Inhibierung der Sekretion, wenn auch von unstimulierten Mastzellen gut in Einklang zu bringen mit der verminderten anti-IgE induzierten Mehrsekretion von Histamin und Tryptase nach UV Bestrahlung. Dafür sprechen auch nachfolgende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Für die beiden Interleukine konnte bezüglich ihrer innerhalb von 24 Stunden ausgeschütteten Menge demonstriert werden, dass unabhängig vom Aktivierungsgrad dermalen Mastzellen eine Suppression der Freisetzung stattfindet [115].

Der Tumornekrosefaktor-α wird wie in der Studie von Gibbs et al. berichtet zwar auch kontinuierlich also ohne besonderen Stimulus von der Zelle produziert, aber dann in der Mastzellgranula gespeichert. Ein wesentlicher Unterschied verglichen mit den Interleukinen-6 und -8 der erklärt, dass TNF-α in nur so geringer Weise von den unstimulierten Mastzellen an die Umgebung abgegeben wird. Denn dieser Zusammenhang deutet auf eine enge Kopplung zwischen TNF-α Ausschüttung und Stimulation der Mastzelle hin.

In weitergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe ließ sich zeigen, dass anti-IgE induziert eine signifikant größere Menge des Zytokins freigsetzt wird. Diese beachtliche Mehrsekretion konnte wie auch schon für Histamin und Tryptase nachgewiesen durch UV Licht inhibiert werden[115].

CD 107a, CD 107b und CD 63 lassen sich auf Membranen von Lysosomen und lysosomenähnlicher Strukturen nachweisen, was zu der Namensgebung Lysosomen-

assoziierter Membran Proteine (LAMPs) geführt hat. Es konnte in Studien bereits dargestellt werden, dass diese Klasse von Molekülen in unterschiedlichen sekretorischen Prozessen involviert ist[116, 117]. So werden sie, wenn es zu einer Fusion zwischen Zellorganell- und Oberflächenmembran kommt, deutlich vermehrt auf der Oberfläche exprimiert. Insbesondere bei Basophilen und Eosinophilen Granulozyten[118] aber auch bei humanen Mastzellen[21] konnte dieses Phänomen bereits nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mastzellen nach anti-IgE Stimulation also nach Fusion der Granula- und Zellmembran die LAMPs eins und drei in einer höheren Dichte auf ihrer Oberfläche präsentieren. Desweiteren konnte nach Bestrahlung mit UVB, PUVA-1 und besonders nach UVA-1 ein Anstieg der basalen Expression verzeichnet werden. Im eigentlichen Mittelpunkt des Interesses ist jedoch der Zusammenhang, dass nach Einwirkung von UV Licht die der Stimulation folgende deutlichere Ausprägung von CD 63 und CD 107a auf der Mastzelloberfläche geringer ausfällt als bei den unbestrahlten Zellen. Die bei anti-IgE Stimulation vermehrt auftretende Fusion von Granula- und Zellmembran wird folglich durch UV Licht inhibiert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe können sehr gut in Einklang mit den übrigen Untersuchungen gebracht werden. So kommt es durch UV Licht zu einer erhöhten spontanen Histaminfreisetzung, was sich in der vermehrten basalen Expression der LAMPs wiederspiegelt. Die verminderte Histamin- und Tryptasefreisetzung bei anti-IgE stimulierten und bestrahlten Mastzellen spricht für eine geringere Bereitschaft der Zellen zur Degranulation. Eben dieses Verhalten bestätigt sich bei denen als Marker für die Mastzelldegranulation dienenden LAMPs[21], da sie bei gleichfalls behandelten Zellen (stimuliert und bestrahlt) in geringerer Weise auf der Oberfläche exprimiert werden.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ist der Schluss zulässig, dass sowohl Produktion als auch Freisetzung der Mediatoren menschlicher Mastzellen bis zu einem gewissen Grad gehemmt werden können. Da viele mastzellassoziierten Erkrankungen mit einer verstärkten Produktion und Ausschüttung von Transmittern einhergehen, kann davon ausgegangen werden, dass durch Bestrahlung der Patienten eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes ermöglicht wird. Allerdings sollten

nicht die weiteren Auswirkungen einer Bestrahlung außer Acht gelassen werden, denn eine Behandlung isolierter Mastzellen dürfte sich als nahezu unmöglich erweisen. Erst durch das Zusammenspiel aller bestrahlten Zellverbände kann ein Rückschluss hinsichtlich des Krankheitsbildes gezogen werden.

6 Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit isolierten und hochaufgereinigten, humanen dermalen Mastzellen wurden mit UVB, UVA-1 und PUVA-1 bestrahlt und anschließend entweder mit Substanz P oder anti-IgE stimuliert. Dadurch sollten Einblicke in die unterschiedlichen Wirkmechanismen der bei zahlreichen mastzellassoziierten Erkrankungen eingesetzten UV Licht Therapie gewonnen werden.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Erforschung der Histamin-, Tryptase- und Zytokinfreisetzung von menschlichen Mastzellen. Zusätzlich wurde die Expression von Lysosomen-assoziierten Membran Proteinen (LAMPs) auf der Oberfläche dieser Zellen untersucht.

Im Gegensatz zu der durch UV Licht induzierbaren spontanen Histaminfreisetzung zeigte sich die anti-IgE stimulierte Histaminausschüttung durch UVB, UVA-1 und PUVA-1 signifikant und dosisabhängig inhibierbar. Auch die durch Substanz P stimulierten Mastzellen gaben nach UVA-1 Bestrahlung deutlich weniger Histamin ab. Demgegenüber blieb die sezernierte Menge des Mediators nach UVB und PUVA-1 konstant. Analog zu den erhobenen Histaminergebnissen konnte eine signifikante Inhibition der anti-IgE induzierten Tryptasefreisetzung nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine signifikante Verringerung, der innerhalb von vierundzwanzig Stunden basal freigesetzten Menge an Interleukin-6 und Interleukin-8, nach UV Bestrahlung. Die spontane Ausschüttung vom Tumornekrosefaktor-α verblieb in dem Untersuchungszeitraum auf sehr geringem Niveau, so dass eine relevante Beeinflussung durch UV Licht nicht stattfand. Des weiteren konnte eine vermehrte basale Expression von CD107a und CD63 auf der Mastzellmembran durch UV Bestrahlung demonstriert werden. Auch die anti-IgE induzierte Mehrexpression der LAMPs konnte bei den drei Bestrahlungsarten nachweisbar supprimiert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass die Auswirkungen der UV Licht Therapie auf Mastzellen sehr komplex sind. Zu beachten ist, dass unter physiologischen Bedingungen nicht nur isolierte Mastzellen, sondern auch weitere bestrahlte Zellverbände eine Veränderung erfahren. Erst durch das Zusammenspiel aller Zellen lassen sich Rückschlüsse auf Krankheitsbilder und die anzuwendende

Therapien ziehen. Letztendlich soll diese Arbeit dazu beitragen, dass das Verständnis der unterschiedlichen Wirkungen von UV Licht begriffen und so ein sinnvolles und gezieltes Einsetzen im klinischen Alltag ermöglicht wird.

Abkürzungsverzeichnis

8-MOP	8-Methoxypsoralen
AP1	Activator Protein 1
BSA	Bovine Serum Albumine
Btk	Bruton's tyrosine kinase
C	Chymase
CD	Cluster of Differentiation
CRAC	Calcium Release Activated Calcium
CTMC	Connective Tissue-type Mast Cell
DAG	Diazylglyzerin
FCS	Fetal Calf Serum
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IP_3	Inositoltriphosphat
ITAM	Immunotyrosine based Activation Motif
LAMP	Lysosome Associated Membrane Protein
LDH	Lactatdehydrogenase
LT	Leukotrien
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Mast Cell
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMC	Mucosal Mast Cell
MW	Mittelwert
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NGF	Nerve growth factor
NK-Rezeptor	Neurokininrezeptor
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zellen
OPDA	o-Phthaldialdehyd
p53	Tumor-Suppressor-Protein
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PUVA-1	Psoralen + UVA-1
SCF	Stem cell factor
SEM	Standard Error of the Mean
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SP	Substance P
T	Tryptase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

Literaturverzeichnis

1. **Bienenstock J, Tomioka M, et al.:** The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. Int Arch Allergy Appl Immunol 1987: 82 (3-4): 238-43.
2. **Bienenstock J, MacQueen G, et al.:** Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. Am Rev Respir Dis 1991: 143 (3 Pt 2): S55-8.
3. **Kirshenbaum AS, Kessler SW, et al.:** Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. J Immunol 1991: 146 (5): 1410-5.
4. **Henz BM, Maurer M, et al.:** Mast cells as initiators of immunity and host defense. Exp Dermatol 2001: 10 (1): 1-10.
5. **Metcalfe DD, Baram D, et al.:** Mast cells. Physiol Rev 1997: 77 (4): 1033-79.
6. **Weber S, Kruger-Krasagakes S, et al.:** Mast cells. Int J Dermatol 1995: 34 (1): 1-10.
7. **Schulman ES, Kagey-Sobotka A, et al.:** Heterogeneity of human mast cells. J Immunol 1983: 131 (4): 1936-41.
8. **Irani AM, Craig SS, et al.:** Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. J Immunol 1987: 138 (12): 4381-6.
9. **Blank U, Ra C, et al.:** Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. Nature 1989: 337 (6203): 187-9.
10. **Lin S, Cicala C, et al.:** The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. Cell 1996: 85 (7): 985-95.
11. **Ra C, Jouvin MH, et al.:** Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. J Biol Chem 1989: 264 (26): 15323-7.
12. **Kihara H, Siraganian RP:** Src homology 2 domains of Syk and Lyn bind to tyrosine-phosphorylated subunits of the high affinity IgE receptor. J Biol Chem 1994: 269 (35): 22427-32.
13. **Shiue L, Zoller MJ, et al.:** Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE. J Biol Chem 1995: 270 (18): 10498-502.
14. **Kinet JP, Jouvin MH, et al.:** IgE receptor (Fc epsilon RI) and signal transduction. Eur Respir J Suppl 1996: 22 : 116s-118s.

15. **Paolini R, Jouvin MH, et al.:** Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. Nature 1991: 353 (6347): 855-8.
16. **Paolini R, Renard V, et al.:** Different roles for the Fc epsilon RI gamma chain as a function of the receptor context. J Exp Med 1995: 181 (1): 247-55.
17. **Jouvin MH, Adamczewski M, et al.:** Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. J Biol Chem 1994: 269 (8): 5918-25.
18. **Streb H, Irvine RF, et al.:** Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature 1983: 306 (5938): 67-9.
19. **Hoth M:** Depletion of intracellular calcium stores activates an outward potassium current in mast and RBL-1 cells that is correlated with CRAC channel activation. FEBS Lett 1996: 390 (3): 285-8.
20. **Wesselborg S, Fruman DA, et al.:** Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). J Biol Chem 1996: 271 (3): 1274-7.
21. **Smorodchenko A, Lippert U, et al.:** Expression and translocation of lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) in anti IgE-activated human mast cells. Arch Derm Res 2001 abstr.: 293 : 45.
22. **Kannan K, Stewart RM, et al.:** Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. Cell Immunol 1996: 171 (1): 10-9.
23. **Chang MH, Karageorgos LE, et al.:** CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). J Biol Regul Homeost Agents 2002: 16 (2): 147-51.
24. **Bell CR, Horowitz ED, et al.:** Profound inhibition of GPIb, GPIIb/IIIa, PECAM-1, CD63, and CD107 in a chronic drug addict: selecting controls for platelet flow cytometry in the inner city hospital. Thromb Res 2001: 101 (3): 217-8.
25. **White DM:** Release of substance P from peripheral sensory nerve terminals. J Peripher Nerv Syst 1997: 2 (3): 191-201.
26. **Suzuki R, Furuno T, et al.:** Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. J Immunol 1999: 163 (5): 2410-5.
27. **Schenker C, Mroz EA, et al.:** Release of substance P from isolated nerve endings. Nature 1976: 264 (5588): 790-2.

28. **Pang X, Boucher W, et al.:** Mast cell and substance P-positive nerve involvement in a patient with both irritable bowel syndrome and interstitial cystitis. Urology 1996: 47 (3): 436-8.
29. **Nicoll RA, Schenker C, et al.:** Substance P as a transmitter candidate. Annu Rev Neurosci 1980: 3 : 227-68.
30. **Pawlak M, Schmidt RF, et al.:** The neurokinin-1 receptor antagonist RP 67580 reduces the sensitization of primary afferents by substance P in the rat. Eur J Pain 2001: 5 (1): 69-79.
31. **Piotrowski W, Devoy MA, et al.:** The substance P receptor on rat mast cells and in human skin. Agents Actions 1984: 14 (3-4): 420-4.
32. **Piotrowski W, Foreman JC:** On the actions of substance P, somatostatin, and vasoactive intestinal polypeptide on rat peritoneal mast cells and in human skin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1985: 331 (4): 364-8.
33. **de Vries A, Dessing MC, et al.:** Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor-mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. Am J Respir Crit Care Med 1999: 159 (5 Pt 1): 1541-4.
34. **Cocchiara R, Bongiovanni A, et al.:** Inhibitory effect of neuraminidase on SP-induced histamine release and TNF-alpha mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor-independent mechanism. J Neuroimmunol 1997: 75 (1-2): 9-18.
35. **Lieb K, Schaller H, et al.:** Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. J Neurochem 1998: 70 (4): 1577-83.
36. **Krumins SA, Broomfield CA:** C-terminal substance P fragments elicit histamine release from a murine mast cell line. Neuropeptides 1993: 24 (1): 5-10.
37. **Baumruker T, Prieschl E:** Mast Cells and their Activation - from the Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. Mod Asp Immunobiol 2001: 1 (6): 256-262.
38. **Moqbel R, Lacy P:** Exocytotic events in eosinophils and mast cells. Clin Exp Allergy 1999: 29 (8): 1017-22.
39. **Buckley IK, Ryan GB:** Increased vascular permeability. The effect of histamine and serotonin on rat mesenteric blood vessels in vivo. Am J Pathol 1969: 55 (3): 329-47.
40. **Schwartz L, Irani A, et al.:** Quantitation of histamine, tryptase and chymase in dispersed human T and TC mast cells. J Immunolog 1987: 138 (8): 2611-2615.

41. **Schwartz B:** Structure and function of human mast cell tryptase. Biological and Molecular Aspects of Mast Cell and Basophil Differentiation and Function - Raven Press, Ltd., NY 1995: .
42. **Abe M, Kurosawa M, et al.:** Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. Clin Exp Allergy 1998: 28 (12): 1509-17.
43. **Akimoto S, Ishikawa O, et al.:** Dermal mast cells in scleroderma: their skin density, tryptase/chymase phenotypes and degranulation. Br J Dermatol 1998: 138 (3): 399-406.
44. **Aldenborg F, Enerback L:** The immunohistochemical demonstration of chymase and tryptase in human intestinal mast cells. Histochem J 1994: 26 (7): 587-96.
45. **Harvima IT, Naukkarinen A, et al.:** Mast cell tryptase and chymase in developing and mature psoriatic lesions. Arch Dermatol Res 1993: 285 (4): 184-92.
46. **Jarvikallio A, Naukkarinen A, et al.:** Quantitative analysis of tryptase- and chymase-containing mast cells in atopic dermatitis and nummular eczema. Br J Dermatol 1997: 136 (6): 871-7.
47. **Ruddle N:** Tumor nekrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). Curr Opin Immunol 1992: 4 (3): 327-32.
48. **Brazis P, De Mora F, et al.:** IgE enhances Fc epsilon RI expression and IgE-dependent TNF-alpha release from canine skin mast cells. Vet Immunol Immunopathol 2002: 85 (3-4): 205-12.
49. **Cocchiara R, Bongiovanni A, et al.:** Substance P selectively activates TNF-alpha mRNA in rat uterine immune cells: a neuroimmune link. Neuroreport 1997: 8 (13): 2961-4.
50. **Coward WR, Okayama Y, et al.:** NF-kappaB and TNF-alpha: A Positive Autocrine Loop in Human Lung Mast Cells? J Immunol 2002: 169 (9): 5287-93.
51. **Gibbs BF, Wierecky J, et al.:** Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF-alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. Exp Dermatol 2001: 10 (5): 312-20.
52. **Gomez-Guerrero C, Lopez-Armada MJ, et al.:** Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. J Immunol 1994: 153 (11): 5247-55.
53. **Sirota L, Punsky I, et al.:** Effect of indomethacin on IL-1beta, IL-6 and TNFalpha production by mononuclear cells of preterm newborns and adults. Acta Paediatr 2000: 89 (3): 331-5.
54. **Pujol-Borrell R, Todd I, et al.:** HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. Nature 1987: 326 (6110): 304-6.

55. **Oliff A:** The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. Cell 1988: 54 (2): 141-2.
56. **Tracey K, Fong Y, et al.:** Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature 1987: 330 (6149): 662-4.
57. **Hack C, Aarden L, et al.:** Role of cytokines in sepsis. Adv Immunol 1997: 66 : 101-95.
58. **Weiss JW, Drazen JM, et al.:** Comparative bronchoconstrictor effects of histamine, leukotriene C, and leukotriene D in normal human volunteers. Trans Assoc Am Physicians 1982: 95 : 30-5.
59. **Czarnetzki BM, Grabbe J, et al.:** Mast cells in the cytokine network: the what, where from and what for. Exp Dermatol 1995: 4 (4 Pt 2): 221-6.
60. **Jehle AB, Li Y, et al.:** Endotoxin and mast cell granule proteases synergistically activate human coronary artery endothelial cells to generate interleukin-6 and interleukin-8. J Interferon Cytokine Res 2000: 20 (4): 361-8.
61. **Kruger-Krasagakes S, Moller A, et al.:** Production of interleukin-6 by human mast cells and basophilic cells. J Invest Dermatol 1996: 106 (1): 75-9.
62. **Moller A, Lippert U, et al.:** Human mast cells produce IL-8. J Immunol 1993: 151 (6): 3261-6.
63. **Grabbe J, Haas N, et al.:** [The mast cell]. Hautarzt 1994: 45 (1): 55-63; quiz 64.
64. **Krutmann J:** Ultraviolet A-1 irradiation as a tool to study the pathogenesis of atopic dermatitis. Methods Enzymol 2000: 319 : 296-302.
65. **Krutmann J:** Phototherapy for atopic dermatitis. Clin Exp Dermatol 2000: 25 (7): 552-8.
66. **Krutmann J, Schopf E:** High-dose-UVA1 phototherapy: a novel and highly effective approach for the treatment of acute exacerbation of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh) 1992: 176 : 120-2.
67. **Grabbe J, Welker P, et al.:** High-dose ultraviolet A1 (UVA1), but not UVA/UVB therapy, decreases IgE-binding cells in lesional skin of patients with atopic eczema. J Invest Dermatol 1996: 107 (3): 419-22.
68. **Morita A, Kobayashi K, et al.:** Ultraviolet A1 (340-400 nm) phototherapy for scleroderma in systemic sclerosis. J Am Acad Dermatol 2000: 43 (4): 670-4.
69. **Bruls W, Slaper H, et al.:** Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visibe wavelengths. Photochem Photobiol 1984: 40 (4): 485-94.
70. **Kripke ML, Cox PA, et al.:** Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1992: 89 (16): 7516-20.

71. **Yarosh DB:** The role of DNA damage and UV-induced cytokines in skin cancer. J Photochem Photobiol B 1992: 16 (1): 91-4.
72. **Gilchrest BA, Zhai S, et al.:** Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation. J Invest Dermatol 1993: 101 (5): 666-72.
73. **Ceccoli J, Rosales N, et al.:** Encapsulation of the UV-DNA repair enzyme T4 endonuclease V in liposomes and delivery to human cells. J Invest Dermatol 1989: 93 (2): 190-4.
74. **Kibitel JT, Yee V, et al.:** Enhancement of ultraviolet-DNA repair in denV gene transfectants and T4 endonuclease V-liposome recipients. Photochem Photobiol 1991: 54 (5): 753-60.
75. **Oh HK, Teo AK, et al.:** Conformational change in human DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase upon alkylation of its active site by SN1 (indirect-acting) and SN2 (direct-acting) alkylating agents: breaking a "salt-link". Biochemistry 1996: 35 (38): 12259-66.
76. **Wolf P, Yarosh DB, et al.:** Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation-induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice. J Invest Dermatol 1993: 101 (4): 523-7.
77. **McGregor W:** DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis. J investig Dermatol Symp Proc 1999: 4 (1): 1-5.
78. **Tada-Oikawa S, Oikawa S, et al.:** Role of ultraviolet A-induced oxidative DNA damage in apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation. Biochem Biophys Res Commun 1998: 247 (3): 693-6.
79. **Sies H:** Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 1991: 91 (3C): 31S-38S.
80. **Pacifici R, Davies K:** Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. Gerontology 1991: 37 (1-3): 166-80.
81. **Pourzand C, Watkin R, et al.:** Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. Proc Natl Acad Sci USA 1999: 96 (12): 6751-6.
82. **Vile G, Tyrell R:** UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. Free Radic Biol Med 1995: 18 (4): 721-30.
83. **Morliere P, Moysan A, et al.:** UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. Biochim Biophys Acta 1991: 1084 (3): 261-8.

84. **Punnonen K, Jansen C, et al.:** Effects of in vitro UVA irradiation and PUVA treatment on membrane fatty acids and activities of antioxidants enzymes in human keratinocytes. J Invest Dermatol 1991: 96 (2): 255-9.
85. **Cadet J, Voituriez L, et al.:** A new class of psoralen photoadducts to DNA components: isolation and characterization of 8-MOP adducts to the osidic moiety of 2'-deoxyadenosine. J Photochem Photobiol B 1988: 2 (3): 321-39.
86. **Johnston BH, Johnson MA, et al.:** Psoralen-DNA photoreaction: controlled production of mono- and diadducts with nanosecond ultraviolet laser pulses. Science 1977: 197 (4306): 906-8.
87. **Pathak MA, Kramer DM:** Photosensitization of skin in vivo by furocoumarins (psoralens). Biochim Biophys Acta 1969: 195 (1): 197-206.
88. **Liu Z, Lu Y, et al.:** PUVA (8-methoxy-psoralen plus ultraviolet A) induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation in calf thymus DNA and human epidermoid carcinoma cells. Free Radic Biol Med 1999: 27 (1-2): 127-33.
89. **Rae V, Yoshikawa T, et al.:** An ultraviolet B radiation protocol for complete depletion of human epidermal Langerhans cells. J Dermatol Surg Oncol 1989: 15 (11): 1199-202.
90. **Siraganian RP:** Refinements in the automated fluorometric histamine analysis system. J Immunol Methods 1975: 7 (2-3): 283-90.
91. **Fritsch P, Vanscheidt W:** Flowzytometrie in der Dermatologie. Hautarzt 1996: 47 : 561-578.
92. **Nishigori C, Yarosh DB, et al.:** Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1996: 93 (19): 10354-9.
93. **de Vos S, Brach M, et al.:** Post-transcriptional regulation of interleukin-6 gene expression in human keratinocytes by ultraviolet B radiation. J Invest Dermatol 1994: 103 (1): 92-6.
94. **Petit-Frere C, Clingen PH, et al.:** Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DNA damage. J Invest Dermatol 1998: 111 (3): 354-9.
95. **Bernerd F, Asselineau D:** UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. Cell Death Differ 1998: 5 (9): 792-802.
96. **Guhl S, Hartmann K:** Ultraviolet irradiation induces apoptosis in human immature, but not in skin mast cells. in press 2003: .

97. **Benyon R, Robinson C, et al.:** Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. Br J Pharmacol 1989: 97 (3): 898-904.

98. **Church M, Okayama Y, et al.:** Mediator secretion from human skin mast cells provocated by immunological and non-immunological stimulation. Skin Pharmakol 1991: 4 Suppl 1 : 15-24.

99. **Cocchiara R, Albeggiani G, et al.:** Histamine and Tumor Necrosis Factor production from purified rat brain mast cells mediated by substance P. NeuroReport 1999: 10 (3): 575-578.

100. **Janiszewski J, Bienenstock J, et al.:** Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation. Am J Physiol 1994: 267 (1 Pt 1): C138-45.

101. **Okada T, Hirayama Y, et al.:** Functional neurokinin NK-1 receptor expression in rat peritoneal mast cells. Inflamm Res 1999: 48 (5): 274-279.

102. **Andoh T, Nagasawa T, et al.:** Substance P Induction of Itch-Associated Response Mediated by Cutaneus NK1 Tachykinin Receptors in Mice. J Pharmacol Exp Ther 1998: 286 (3): 1140-1145.

103. **Brooks A, CJ. W:** Reactive oxygen species generation by mast cells in response to substance P: A NK1-receptor-mediated event. Inflamm Res 1999: Suppl 2 : S121.

104. **Holst B, Hastrup H, et al.:** Two active molecular phenotypes of the tachykinine NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis. J Biol Chem 2001: 276 (23): 19793-19799.

105. **Fiebich BL, Schleicher S, et al.:** The neuropeptide substance P activates p38 mitogen-activated protein kinase resulting in IL-6 expression independently from NF-kappa B. J Immunol 2000: 165 (10): 5606-11.

106. **Furutani K, Koro O, et al.:** Substance P- and antigen-induced release of leukotriene B4, prostaglandin D2 and histamine from guinea pig skin by different mechanisms in vitro. Arch Dermatol Res 1999: 291 (7-8): 166-473.

107. **Klinker J, Hagelüken A, et al.:** Direct and indirect receptor-independent G-protein activation by cationic-amphiphilic substances: Studies with mast cells, HL-60 human leukemic cells and purified G-proteins. Exp Dermatol 1995: 4 (4 Pt 2): 231-239.

108. **Repke H, Bienert M:** Mast-cell activation - a receptor-independent mode of substance P action? FEBS Lett 1987: 221 (2): 236-240.

109. **Vink AA, Shreedhar V, et al.:** Cellular target of UVB-induced DNA damage resulting in local suppression of contact hypersensitivity. J Photochem Photobiol B 1998: 44 (2): 107-11.

110.**Krutmann J, Morita A:** Mechanisms of ultraviolet (UV) B and UVA phototherapy. J Investig Dermatol Symp Proc 1999: 4 (1): 70-2.

111.**Vink AA, Henegouwen B, et al.:** Removal of UV-induced DNA lesions in mouse epidermis soon after irradiation. J Photochem Photobiol B 1994: 24 (1): 25-31.

112.**Vink AA, Moodycliffe AM, et al.:** The inhibition of antigen-presenting activity of dendritic cells resulting from UV irradiation of murine skin is restored by in vitro photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers. Proc Natl Acad Sci U S A 1997: 94 (10): 5255-60.

113.**Park YM, Kim CW:** The effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interleukin-6 synthesis in cultured human keratinocytes. J Dermatol Sci 1999: 22 (1): 17-23.

114.**Okayama Y, Ono Y, et al.:** Human skin mast cells produce TNF-alpha by Substance P. Int Arch Allergy Immunol 1998: 117 (Suppl 1): 48-51.

115.**Guhl S, Stefaniak R, et al.:** Bivalent and immunomodulating impact of UV-light on human skin mast cells - low level mediator release at baseline but potent suppression upon mast cell triggering. in press 2003: .

116.**Winchester B:** Lysosomal membrane proteins. Eur J Paediatr Neur Review 2001: suppl A : 11-9.

117.**Blott E, Griffiths G:** Secretory lysosomes. Nat Rev Mol Cell Biol 2002: 3 : 122-31.

118.**Monneret G, Benoit Y, et al.:** Monitoring of basophil activation using CD63 and CCR3 in allergy to muscle relaxant drugs. Clin Immunol 2002: 102 : 192-9.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Torsten Zuberbier für die immer vorhandene Gesprächsbereitschaft, die Überlassung des Themas und die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dipl.-Ing. Sven Guhl für seine hilfsbereite Unterstützung und seine konstruktive Kritik, die sowohl zur Klärung von Teilproblemen als auch zu interessanten Erweiterungen der Arbeit führte.

Ich danke auch den zahlreichen Patienten für die Bereitstellung der Hautproben. Ohne ihr freundliches Entgegenkommen wäre die Durchführung des experimentellen Teiles dieser Arbeit in der Form nicht möglich gewesen.

Dank auch den gesamten Mitarbeitern der Abteilung für Dermatologie, Venerologie und Allergologie und insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Zuberbier für ihr hilfreiches Interesse, dass sie meiner Arbeit entgegengebracht haben.

Lebenslauf

Name:	Marc Strathmann	
Geburtsdatum:	20.01.1978	
Geburtsort:	Berlin	
Eltern:	Prof. Dr.-Ing. L. Strathmann, Gabriele Strathmann	
Schulausbildung:	1984 – 1988	Grundschule Dyckburg-Gelmer, Münster
	1988 – 1997	Johann-Conrad-Schlaun-Gymnasium, Münster (Abitur)
Wehrersatzdienst:	1996 – 1997	Bundesanstalt Technisches Hilfswerk, Ortsverband Münster
	1997 – 2002	Bundesanstalt Technisches Hilfswerk, Ortsverband Berlin-Steglitz
Hochschulausbildung:	1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
	2000	Ärztliche Vorprüfung
	2000	Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin
	2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2005	Voraussichtlich Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung