

**Einfluss der IgG-Subklassen sowie der immunmodulatorischen
Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die Aktivierung menschlicher
Darmmastzellen**

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

Fakultät Naturwissenschaften

Universität Hohenheim

Institut für Ernährungsmedizin

vorgelegt von

Sandra Lechowski

aus Schönebeck/Elbe

2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: PD Dr. Axel Lorentz

2. berichtende Person: Prof. Dr. Lutz Graeve

Eingereicht am: 18.10.2011

Mündliche Prüfung am: 06.02.2012

Die vorliegende Arbeit wurde am 27.12.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Fantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein

Der menschliche Darm macht eine Fläche von 400 – 500 m² aus. Er stellt damit den größten Kontakt des Körpers zur Umwelt dar. Die Haut verfügt „lediglich“ über eine Fläche von 2 m². Die Grenzfläche des Darmes besitzt eine Vielzahl von Abwehrmechanismen, um das Körperinnere vor fremden, toxischen und pathogenen Substanzen zu schützen. An dieser Front sitzen die Mastzellen – als „Wächter des Darmes“.

Zusammenfassung

Mastzellen sind die Haupteffektorzellen in allergischen Erkrankungen, u. a. der Nahrungsmittelallergie. Die Aktivierung erfolgt dabei primär über die Kreuzvernetzung des Immunglobulin E (IgE) Rezeptors FcεRI. Die Bedeutung von Immunglobulin G (IgG) - Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ für die Stimulation von intestinalen Mastzellen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Einerseits können Mastzellen über IgG₁ sowie den Mechanismus der „IgG-Superkruzvernetzung“ aktiviert werden. Andererseits werden IgG₁ und IgG₄ im Rahmen einer Immuntherapie vermehrt gebildet und könnten daher die allergische Reaktion abschwächen. In dieser Arbeit wurde die Rolle der IgG-Subklassen auf die IgE-abhängige als auch auf die IgE-unabhängige Freisetzung von Mediatoren in menschlichen Darmmastzellen untersucht.

Mastzellen wurden aus menschlichem Darmgewebe isoliert, aufgereinigt und mit ihrem Wachstumsfaktor *stem cell factor* (SCF) in Kombination mit Interferon-γ (IFN-γ) bzw. Interleukin 4 (IL-4) kultiviert. Von IFN-γ ist bekannt, dass es die Expression des aktivierenden IgG-Rezeptors FcγRI in aus peripherem Blut hergeleiteten Mastzellen hochreguliert. IL-4 erhöht die IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung von menschlichen Darmmastzellen. Die Expression von FcγRI, FcγRII, FcγRIII und FcεRI wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Untersuchung der Wirkung von IgG-Subklassen sollten diese anhand der Affinitätschromatographie aus menschlichem Serum isoliert werden. Die erforderliche Reinheit der einzelnen IgG-Subklassen von mindestens 95 % wurde aber nicht erreicht. Daher wurden Darmmastzellen mit menschlichem myeloma IgG₁₋₄ und deren spezifischen Antikörpern anti-IgG₁₋₄ in Kombination mit IgE/anti-IgE stimuliert und die Mediatorfreisetzung gemessen. Wir konnten zeigen, dass menschliche Darmmastzellen in Kultur mit IFN-γ FcγRI exprimieren, während FcγRII und FcγRIII dagegen nur marginal nachgewiesen werden konnten. Mastzellen nach Kultur mit IL-4 exprimierten keinen FcγR. Die IgG-Subklassen allein führten weder nach Kultur mit IFN-γ noch nach Kultur mit IL-4 zu einer Aktivierung der Darmmastzellen. In Kombination mit IgE/anti-IgE zeigten IgG₁/anti-IgG₁, IgG₂/anti-IgG₂ und IgG₄/anti-IgG₄ in mit IFN-γ kultivierten Darmmastzellen einen tendenziellen, aber nicht signifikanten, Rückgang der Ausschüttung des gespeicherten Mastzellmediators β-Hexosaminidase und des *de novo* synthetisierten Lipidmediators Leukotrien C₄ (LTC₄). Somit reagieren menschliche Darmmastzellen kaum oder nur wenig

Zusammenfassung

auf IgG-Subklassen und weisen damit ein von aus peripherem Blut hergeleiteten Mastzellen abweichendes Verhalten auf, welche über IgG₁ aktivierbar sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss der immunmodulierenden Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die IgE-abhängige Aktivierung von menschlichen Darmmastzellen untersucht werden. Hintergrund war die Beobachtung, dass die Behandlung mit kombinierten pharmakologischen Dosen beider Aminosäuren anti-inflammatorische Effekte auf Darmbiopsien von Morbus Crohn Patienten ausübte. Mastzellen spielen neben allergischen Erkrankungen auch eine Rolle bei chronischen Darmentzündungen. Sie könnten daher in die beobachteten Effekte involviert sein.

Menschliche Darmmastzellen wurden über Nacht mit kombinierten physiologischen oder pharmakologischen Konzentrationen an Arginin (0,6 bzw. 2 mM/l) und Glutamin (0,6 bzw. 10 mM/l) inkubiert. Die Mastzellen wurden mit IgE/anti-IgE stimuliert und es wurde die Freisetzung von β -Hexosaminidase und LTC₄, die Induktion von Zytokinen sowie die Aktivierung von Signalmolekülen analysiert. Kombinierte pharmakologische Dosen an Arginin und Glutamin führten in mit SCF und IL-4 kultivierten menschlichen Darmmastzellen zu einer verringerten Freisetzung von LTC₄ um 40 ± 22 % sowie zu einer verringerten Induktion der Zytokine/Chemokine CCL2 (*monocyte chemotactic protein 1*), CCL4 (*macrophage inflammatory protein 1 beta*), CXCL8 (IL-8), und TNF (*tumor necrosis factor alpha*) um durchschnittlich 58 ± 35 % verglichen mit kombinierten physiologischen Dosen an Arginin und Glutamin. Die anti-inflammatorischen Effekte von Arginin und Glutamin waren verbunden mit einer verringerten Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2, p38, JNK pan und MEK1/2 um 38 ± 17 % sowie der Serin/Threonin Kinase Akt um 23 ± 20 %. Damit senkten Arginin und Glutamin die Aktivierung von Signalproteinen, welche bei der IgE-vermittelten Aktivierung von Darmmastzellen eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Arginin und Glutamin *in vitro* anti-inflammatorische Effekte auf menschliche Darmmastzellen ausüben. Untersuchungen *in vivo* sind nötig um zu überprüfen, inwiefern Arginin und Glutamin als immunfördernde Substanzen bei entzündlichen oder allergischen Erkrankungen eingesetzt werden können.

Abstract

Mast cells are key effector cells in allergic diseases, like food allergy. Activation of mast cells occurs mainly by crosslinking of immunoglobulin E (IgE) receptor FcεRI. The role of allergen specific immunoglobulin G (IgG) subclasses IgG₁, IgG₂, IgG₃, and IgG₄ in activation of intestinal mast cells is not yet fully clarified. On the one hand, mast cells can be activated via IgG₁ and by the mechanisms of “IgG-supercrosslinking”. On the other hand, IgG₁ and IgG₄ are up regulated during immunotherapy and might be able to attenuate allergic reactions. In this work, we investigated the effect of IgG subclasses on IgE dependent and IgE-independent mediator release of human intestinal mast cells.

Mast cells, isolated and purified from human intestinal tissue, were cultured with their growth factor stem cell factor (SCF) in combination with interferon γ (IFN- γ) or with interleukin 4 (IL-4). IFN- γ is known to up regulate expression of the activating IgG receptor Fc γ RI on mast cells, derived from peripheral blood. IL-4 is known to enhance IgE triggered mediator release from human intestinal mast cells. Expression of Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII and FcεRI was analysed by flow cytometry. IgG subclasses should be isolated from human sera by affinity chromatography. However, the required purity of at least 95 % for each subclass could not be achieved. Thus, intestinal mast cells were stimulated with human myeloma IgG₁₋₄ and their specific anti-IgG₁₋₄ antibodies in combination with IgE/anti-IgE and the release of inflammatory mediators was measured. We could show that human intestinal mast cells cultured with IFN- γ express Fc γ RI, while Fc γ RII and Fc γ RIII were only weakly expressed. Mast cells cultured with IL-4 do not express Fc γ R. IgG subclasses themselves did not activate intestinal mast cells neither in culture with IFN- γ , nor cultured with IL-4. In combination with IgE/anti-IgE, the IgG subclasses IgG₁/anti IgG₁, IgG₂/anti IgG₂ and IgG₄/anti IgG₄ tended to decrease the release of pre-stored β -hexosaminidase and *de novo* synthesized leukotriene C₄ (LTC₄) but the reduction was not significant. To conclude, IFN- γ induced in human intestinal mast cells the expression of Fc γ RI, but this did not result in stimulation of the cells by IgG. Thus, human intestinal mast cells do not respond or only to a small extend to IgG subclasses and differ from mast cells derived from peripheral blood which could be activated via IgG₁.

The second part of the work examines the effect of the immunomodulatory amino acids arginine and glutamine on IgE-dependent activation of human intestinal mast cells. Background was the measured anti-inflammatory effect of combined pharmacological doses of both amino acids on intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. Beside allergic

Abstract

diseases, mast cells play a role in chronic intestinal inflammation. Therefore, they could be involved in the described effect.

Human intestinal mast cells were incubated over night with combined physiological doses or pharmacological doses of arginine (0.1 mmol/L or 2 mmol/l) and glutamine (0.6 mmol/l or 10 mmol/l). Mast cells were stimulated with IgE/anti-IgE and release of β -hexosaminidase and LTC₄, induction of cytokines and activation of signaling molecules was analysed. In human intestinal mast cells, cultured in SCF and IL-4, combined pharmacological concentrations of arginine and glutamine led to decreased release of LTC₄ about 40 ± 22 % and to reduced induction of cytokines like CCL2 (monocyte chemotactic protein 1), CCL4 (macrophage inflammatory protein 1 beta), CXCL8 (IL-8), and TNF (tumor growth factor alpha) about an average of 58 ± 35 % compared to physiological doses of arginine and glutamine. The anti-inflammatory effects of arginine and glutamine were associated with decreased activation levels of MAP kinases like ERK1/2, p38, JNK pan und MEK1/2 about 38 ± 17 % as well as serine/threonine kinase Akt about 23 ± 20 %. Therewith, arginine and glutamine reduce activation levels of signaling molecules known to be involved in IgE dependent mast cell cytokine expression.

Here, the results show that arginine and glutamine exert anti-inflammatory effects on human intestinal mast cells *in vitro*. Further investigations are necessary to monitor these findings *in vivo* prior to use arginine and glutamine as immunomodulatory agents in inflammatory and allergic diseases.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Mastzellen	1
1.2.1 Morphologie und Entwicklung von Mastzellen	2
1.2.2 Mastzellmediatoren	3
1.2.3 Bedeutung von Mastzellen bei der Nahrungsmittelallergie	6
1.2.4 Aktivierung von Mastzellen über FcεRI und FcγR	7
1.2.5 Reduktion der Mastzellaktivierung durch FcγRIIB	12
1.3 IgG-Subklassen	13
1.3.1 Aufbau und Funktion der IgG-Subklassen	13
1.3.2 Bedeutung der IgG-Subklassen bei allergischen Reaktionen	15
1.4 Die immunmodulierenden Aminosäuren Glutamin und Arginin	16
1.4.1 Allgemeine und anti-inflammatorische Bedeutung von L-Glutamin	16
1.4.2 Allgemeine und anti-inflammatorische Bedeutung von L-Arginin	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Auflistung der verwendeten Reagenzien und Puffer	19
2.2 Gewinnung und Kultivierung von menschlichen Darmmastzellen	23
2.2.1 Isolation von Mastzellen aus menschlicher Darmmukosa	23
2.2.2 Aufreinigung und Kultivierung von Darmmastzellen	24
2.3 Kultivierung von Mastzelllinien	26
2.4 Zellzählung und Zelldifferenzierung	26
2.5 Behandlung von Mastzellen mit Arginin und Glutamin	27
2.6 Bestimmung der Zellvitalität	28
2.7 Aktivierung von Mastzellen über Fcε Rezeptor I und Fcγ Rezeptoren	29

Inhaltsverzeichnis

2.8	Messung der Mediatorfreisetzung in Mastzellen	31
2.9	Genexpressionsanalyse	31
2.10	Signalmolekülaktivierung	34
2.11	Rezeptorexpression auf menschlichen Darmmastzellen	35
2.12	Gewinnung von IgG-Subklassen aus menschlichem Serum	36
2.12.1	Herstellung der anti-IgG ₂ -/anti-IgG ₄ -Säulen	36
2.12.2	Affinitätschromatographie zur Gewinnung der IgG-Subklassen	37
2.12.3	Bestimmung der Reinheit der IgG-Subklassen-Fraktionen	39
2.13	Statistik	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Einfluss von IgG-Subklassen auf die Mastzellaktivierung	41
3.1.1	Affinitätschromatographie zur Gewinnung von IgG-Subklassen	41
3.1.2	Expression von Fc γ Rezeptoren und Fc ϵ RI auf Darmmastzellen	42
3.1.3	Mediatorfreisetzung in Darmmastzellen über Fc γ R/Fc ϵ RI-Aktivierung	43
3.2	Einfluss von Arginin und Glutamin auf die Mastzellaktivierung	46
3.2.1	Arginin und Glutamin beeinflussen nicht die Zellvitalität	47
3.2.2	Arginin und Glutamin senken β -Hexosaminidase-Freisetzung	48
3.2.3	Arginin und Glutamin reduzieren LTC ₄ -Ausschüttung in Darmmastzellen	49
3.2.4	Arginin und Glutamin verringern IgE-abhängige Zytokinexpression	51
3.2.5	Arginin und Glutamin senken Aktivierung von Signalmolekülen	54
4	Diskussion	56
4.1	Effekt der IgG-Subklassen auf die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung	57
4.2	Effekt von Arginin und Glutamin auf die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung	61
5	Literaturverzeichnis	65
6	Danksagung	74
7	Lebenslauf	76
8	Publikationsliste	77
9	Erklärung	78

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein
Akt	Serin/Threonin Protein Kinase
Arg	L-Arginin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
DMEM	Zellkulturmedium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymvermittelter Immunassay (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F(ab) ['] ₂	Antigen bindende Fraktion (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	kristalline Fragment eines Antikörpers (<i>Fragment crystallizable</i>)
FcεRI	hochaffine IgE-Rezeptor
FcγRI-III	IgG-Rezeptoren
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gln	L-Glutamin
h	Stunde/n
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
JNK pan	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K _a	Bindungsaffinität
M	Molar
MACS	Magnetische Zellseparation (<i>magnetic-activated cell sorting</i>)
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

mBMMC	<i>mouse bone marrow- derived mast cells</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1 (CCL2)</i>
M. Crohn	Morbus Crohn
med	Medium
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
min	Minute/n
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mM	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
n	Anzahl der Versuche
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Maß für Säure oder Alkalität
phar	pharmakologisch
phys	physiologisch
pNAG	4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
RBL-2H3	<i>rat basophil leukaemia cells</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SCF	<i>stem cell factor</i>
sec	Sekunde/n
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
tRNA	<i>total RNA</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
v/v	<i>Volume per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Motivation

Ziel intensiver Forschungen bestand und besteht im Verständnis und der Bekämpfung Mastzell-vermittelter Erkrankungen. Darunter stellt die Nahrungsmittelallergie, insbesondere bei Kindern unter 10 Jahren, ein ernstzunehmendes Problem dar. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 6-8 % auf [1]. Der Großteil der Nahrungsmittelallergien ist Immunglobulin E (IgE) vermittelt [2]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von Immunglobulin G (IgG) Subklassen auf die Aktivierung von intestinalen Mastzellen zu untersuchen. Über die Stimulation dieser Zellen anhand von IgG-Subklassen gibt es bisher widersprüchliche Aussagen. So ist IgG₁ einerseits in der Lage Mastzellen zu aktivieren, andererseits wird es neben IgG₄ im Rahmen von Immuntherapien vermehrt gebildet [3-5].

Das zweite Ziel dieser Arbeit stellt die Untersuchung der Wirkung der immunregulatorischen Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die Aktivierung von intestinalen Mastzellen dar. Arginin und Glutamin werden bereits erfolgreich in der Behandlung schwerer Erkrankungen wie Trauma oder postoperativ zur Prävention von Infektionen eingesetzt [6]. Aber auch bei Chronisch-Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn zeigten pharmakologische Dosen an Arginin und Glutamin einen anti-inflammatorischen Effekt [7]. Mastzellen werden im Zusammenhang mit CED diskutiert. Sie liegen in erhöhter Anzahl vor und gelten als Ursprung für erhöhte Mengen an Tumornekrosefaktor (TNF) in Biopsien von Patienten mit CED [8-10]. Somit könnten Mastzellen in dem von Lecleire *et al.* beobachteten anti-inflammatorischen Effekt der Aminosäuren Arginin und Glutamin auf chronische Darmentzündungen involviert sein.

1.2 Mastzellen

Mastzellen sind Immunzellen zur Verteidigung vor Pathogenen und zur Aufrechterhaltung der Immunbalance. Sie befinden sich daher zumeist in Geweben, die Kontakt zur Umwelt haben, wie zum Beispiel die Haut und die Schleimhäute des Atmungs-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes. Zusätzlich gibt es Mastzellen in der Nähe von Blut- und Lymphgefäßen,

Nerven sowie glatten Muskelfasern und schleimbildenden Drüsen [11, 12]. Eine pathologische Bedeutung kommt den Mastzellen zu, wenn sie in überschießender Weise reagieren wie dies bei der typischen Allergie wie Asthma, Heuschnupfen und atopischer Dermatitis der Fall ist. Die schwerste Form der Überreaktion mündet in die Anaphylaxie [13]. Bei der Allergie vom Soforttyp kommt es innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Allergenkontakt zum Auftreten typischer allergischer Symptome wie Schleimhautschwellung an Augen, Nase und Lungenepithelien sowie Niesen, Juckreiz und Rötung [14]. Vermittelt wird diese Reaktion durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Immunzellen wie Mastzellen und Granulozyten. Voraussetzung hierfür ist die vorherige Sensibilisierung, bei der Antikörper gegen das Allergen gebildet werden und auf Mastzellen sowie Granulozyten binden [12, 14]. Ein erneuter Allergenkontakt löst die allergische Reaktion aus.

1.2.1 Morphologie und Entwicklung von Mastzellen

Mastzellen sind mit 20 µm Durchmesser vergleichsweise große Immunzellen. Im Zellplasma befinden sich Entzündungsmediatoren, die in kleinen Vesikeln (Granula) gespeichert sind. Mikroskopisch erkennbar sind Granula durch violette Anfärbung mit Toluidinblau, der Zellkern ist dagegen blau gefärbt [15]. In Abbildung 1 ist eine mikroskopische Aufnahme einer menschlichen Darmmastzelle abgebildet. Mastzellen entwickeln sich aus pluripotenten Knochenmarkszellen, welche die Oberflächenstrukturen *cluster of differentiation* (CD) 34 und CD117 aufweisen. Vermutlich unter Einfluss des Wachstumsfaktors *stem cell factor* (SCF) verlassen sie das Knochenmark und gelangen über die Blutbahn mit Hilfe chemotaktischer Faktoren als CD34+/CD117+/CD13+ Vorläuferzellen in die Zielgewebe. Durch das von Bindegewebs- und Endothelzellen gebildete SCF sowie durch Interleukin (IL)-3 und IL-9 differenzieren die Vorläuferzellen zu funktionalen Mastzellen und bilden ihre charakteristischen membranständigen IgE-Rezeptoren (FcεRI) und SCF-Rezeptoren (c-Kit/CD117) sowie Granula aus [16, 17]. Mastzellen werden aufgrund ihres Proteasengehaltes in den Granula in zwei Subtypen eingeteilt. Mastzellen, welche Tryptase und Chymase synthetisieren, und Mastzellen, welche nur Tryptase bilden. Mastzellen vom Tryptase-Chymase Typ sind vor allem in der Haut zu finden, wo sie über 80% der Mastzellen repräsentieren [18-20]. Sie sind aber auch in der glatten Bronchialmuskulatur angesiedelt und bedingen die Allergiesymptomatik in Asthmapatienten [20]. Mastzellen vom Tryptasetyp sind

in den Epithelien der Lunge und der Alveolarwand repräsentiert und scheinen in der Tumorgenese eine Rolle zu spielen, da Tryptase mitogen wirkt [21]. Tryptase ist assoziiert mit der Pathologie von Colitis Ulcerosa und stellt einen Zielfaktor therapeutischer Anwendungen dar [22, 23].

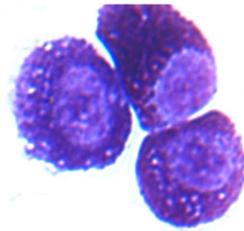


Abbildung 1: Mikroskopische Aufnahme menschlicher Darmmastzellen, angefärbt mit May-Grünwald/Giemsa-Färbelösungen.

1.2.2 Mastzellmediatoren

Mastzellen besitzen eine Vielzahl an gespeicherten Mediatoren und können durch Stimulation selektiv weitere Entzündungsstoffe synthetisieren. Zu den gespeicherten Mediatoren zählen vor allem Histamin, Proteoglykane, Proteasen und Zytokine [24]. Über FcεRI-Aktivierung werden proinflammatorische Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene sowie Zytokine und Chemokine gebildet und freigesetzt [12]. Die Mediatoren vereinen entzündliche, vasoaktive und nozizeptive Eigenschaften [25]. In Tabelle 1 sind die derzeit bekannten Mastzellmediatoren zusammengestellt.

Unter den Mediatoren ist besonders Histamin hervorzuheben. Es liegt gespeichert in den Granula vor und ist bei Freisetzung für eine Bandbreite von allergischen Effekten verantwortlich. Wirkungen von Histamin sind einerseits die Kontraktion der Atem- und Darmmuskulatur und der Gefäße. Histamin wirkt jedoch auch vasodilatatorisch und kann die Kapillarpermeabilität erhöhen [26]. Histamin spielt insbesondere eine Rolle in allergischen Atemwegserkrankungen sowie Anaphylaxie und ist an Gelenkentzündungen und Autoimmunerkrankungen beteiligt [24]. In menschlichen Darmmastzellen beeinflussen die Zytokine SCF und Interleukin 4 (IL-4) die Mediatorbildung. So bilden diese Mastzellen unter Zugabe von SCF primär proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF), IL-1β, IL-6, IL-8, IL-16, IL-18 aus [27]. Unter Einfluss von IL-4 werden in menschlichen

Einleitung

Darmmastzellen hingegen vermehrt Zytokine vom T-Helferzellen des Typ 2 (TH2) wie IL-3, IL-5 und IL-13 induziert [28]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der Mastzellaktivierung die Freisetzung bzw. Induktion unterschiedlicher Mastzellmediatoren wie die Chemokine CCL2 (*monocyte chemoattractant protein 1*), CCL4 (*macrophage inflammatory protein 1 beta*), CXCL8 (IL-8) und das Zytokin TNF, das Enzym β -Hexosaminidase und der Lipidmediator Leukotrien C₄ (LTC₄) nach Stimulation untersucht. Chemokine bilden eine Untergruppe der Zytokine und fungieren als Botenstoff zur Rekrutierung von Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten in allergischen und nicht-allergischen entzündlichen Prozessen [29]. CCL2 ist insbesondere bedeutend für die Anlockung von T-Lymphozyten und Monozyten, während CCL4 eine Rolle in der Virus-induzierten Aktivierung von T-Lymphozyten spielt [30, 31]. Mastzellen sind als einzige Immunzellen in der Lage, TNF in ihren Granula zu speichern und bei Bedarf schnell freizusetzen [10]. TNF ist u. a. an allergischen Entzündungsgeschehen in den Atemwegen beteiligt [32]. Das lysosomale Enzym β -Hexosaminidase ist ubiquitär in allen Mastzelltypen verbreitet und dient als Indikator zur Messung des Ausmaßes der Mastzelldegranulation, seine biologische Funktion ist weitestgehend unklar [24]. Die Lipidmediatorfamilie der Leukotriene ist an einer Reihe allergischer Reaktionen beteiligt, u. a. an der Hypersensibilität der Atemwege mit Bronchokonstriktion, Schleimbildung und erhöhter Kapillarpermeabilität sowie an der Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten zum Entzündungsgeschehen [33].

Mastzellmediatoren	
Biogene Amine	Histamin, Serotonin, Dopamin
Chemokine	CXCL8, CCL2,-3,-5,-7,-13
Zytokine	Interleukin (IL)-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -11, -12, -13, -15, -16, -18, -25, Interferon (IFN)- α , - β , - γ , LIF, MIF, TGF- β , Tumornekrosefaktor (TNF)
Enzyme	Arylsulfatasen, Carboxypeptidase A, Cathepsin G, Pro-Caspase 3, -4, Chymase, Granzym B, Heparanase, β -Hexosaminidase, Kinogenase, MC-CPA, Metalloproteinase, MMP-9, Nitridoxid-Synthase, Peroxidasen, Phospholipasen, Renin, Tryptase
NO (Stickstoffmonoxid)	
Phospholipid-Metabolite	Leukotrien (LT) B ₄ , LTC ₄ , PAF, Prostaglandin (PG) D ₂ , PGE ₂
Polypeptide	CRH, Endorphin, Endothelin, Kinine, Somatostatin, Substanz P, Urocortin, VEGF, Vasoaktives intestinales Peptid
Proteoglykane	Chondroitinsulfat, Heparin, Hyaluronsäure, Serglycin
Wachstumsfaktoren	SCF, GM-CSF, Gn-RH-1, b-FGF, NGF, VEGF
Sonstige	MBP, LL-37

Tabelle 1: Zusammenstellung der bekannten Mastzellmediatoren. Übersicht nach Theoharides *et al.*, Galli *et al.* sowie Lundequist und Pejler [12, 24, 25].

In der vorliegenden Arbeit sollte auch der Einfluss von allergenspezifischen IgG-Subklassen von Patienten mit Nahrungsmittelallergie auf die Aktivierung von Darmmastzellen untersucht werden. Im folgenden Kapitel wird daher ein kurzer Überblick über die Rolle von Mastzellen bei Nahrungsmittelallergie gegeben.

1.2.3 Bedeutung von Mastzellen bei der Nahrungsmittelallergie

Nahrungsmittelallergie beschreibt die Abwehrreaktion des Körpers gegen ein fremdes Nahrungsbestandteil (Antigen/Allergen) [34]. Sie ist immunologisch vermittelt [1]. Nahrungsmittelallergien betreffen vor allem Kinder unter 10 Jahren mit einer Prävalenz von 6-8 %, Erwachsene leiden deutlich weniger unter NA (1-4 %) [1]. Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Nahrungsmittel betreffen hauptsächlich den Darmtrakt, jedoch kann auch das Atmungs- und Herz-Kreislaufsystem sowie die Haut betroffen sein [1, 35]. Primäre Auslöser sind insbesondere Milch, Hühnerei, Erdnuss, Fisch und Meeresfrüchte. Weitere Allergiequellen stellen Soja, Weizen sowie verschiedene Obst- und Gemüsesorten wie Sellerie, Karotte, Tomate, Apfel, Kiwi und Pfirsich dar [36, 37]. Sekundär können sogenannte Kreuzallergien gegen Lebensmittel entstehen, wenn bereits eine Allergie gegen Pollen oder Latex vorliegt [1, 38]. Als Ursache werden verschiedene Faktoren diskutiert, wobei nachweislich der genetische Hintergrund und das Auftreten von anderen atopischen Erkrankungen wie Allergie, Astma, Ekzeme und Heuschnupfen eine Rolle spielen. Die Diagnose erfolgt hauptsächlich über den *Prick*-Hauttest, die Messung des spezifischen IgE-Titers, Provokationstests und Eliminationsdiäten [39]. Ferner wird postuliert, dass eine gesteigerte Aufnahme von Makromolekülen wie Ovalbumin, die Entwicklung einer Nahrungsmittelallergie begünstigt. Ursache ist meist eine erhöhte Darmpermeabilität aufgrund von Entzündungsgeschehen und Infektionen oder die nicht vollständig ausgebildete kindliche Darmmukosa [1]. Therapeutische Ansätze bilden die Immuntherapie, Eliminationsdiäten, anti-anaphylaktische Medikationen, anti-IgE-Antikörper, spezielle Impfungen sowie alternative medizinische Verfahren [40]. Eliminationsdiäten während der Schwangerschaft, Stillzeit und in der frühen Kindheit scheinen sich zudem positiv auf eine gesunde Entwicklung auszuwirken [41].

Die IgE-vermittelte allergische Reaktion erfolgt typischerweise in drei Phasen: der Sensibilisierungs-, der Effektor- und der chronischen Phase. Es wird angenommen, dass die allergische Reaktion im Darmtrakt in ähnlicher Weise stattfindet [1]. Während der Sensibilisierungsphase wird das Allergen von antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten aufgenommen. Proteinstrukturen des Allergens werden auf der Oberfläche der genannten Zellen präsentiert. Naive CD4 positive T-Lymphozyten erkennen die Allergenfragmente und differenzieren zu TH2-Zellen aus. Diese führen über die freigesetzten Zytokine IL-4 und IL-13 zum sogenannten *Isotype*-

switch von B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Diese Plasmazellen produzieren große Mengen an allergenspezifischem IgE, welches an den hochaffinen FcεRI auf Mastzellen, Basophilen und aktivierten Eosinophilen bindet [42, 43]. Erneuter Allergenkontakt führt zur Vernetzung benachbarter IgE-Moleküle und es kommt zur Degranulation der Zellen. Die freigesetzten Mediatoren sorgen für die typischen allergischen Effekte = Effektorphase.

Die mukosale Abwehr und Toleranz bilden die Grundlage eines intakten Immunsystems. Neben Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als Haupteffektorzellen des mukosalen Abwehrsystems, scheinen Mastzellen die allergische Reaktion zu unterstützen. So sind nach Stimulation mit IgE und Antigen freigesetzte Mastzellchymasen in der Lage, die *tight junction* Proteine Occludin und Claudin abzubauen. Die gestörte Integrität der Darmbarriere gilt als Hauptfaktor für die Auslösung von entzündlichen und allergischen Darmerkrankungen [44]. Mastzellzytokine wie TNF, IL-13 und IL-4 können ebenfalls zu einer erhöhten Darmpermeabilität beitragen [45, 46].

1.2.4 Aktivierung von Mastzellen über FcεRI und FcγR

Die Aktivierung von Mastzellen über Kreuzvernetzung von FcεRI gilt als Schlüsselereignis in der Auslösung allergischer Reaktionen. Dabei binden Allergen-spezifische IgE Antikörper an diesen Rezeptor, was auch als Sensibilisierung bezeichnet wird [12, 13]. Die Vernetzung der an FcεRI-gebundenen IgE-Antikörper auf der Oberfläche der Mastzellen durch ein spezifisches Antigen oder Allergen, bewirkt die Auslösung aktivierender Signalkaskaden in der Zelle [47]. Neben der FcεRI-gekoppelten Aktivierung von Mastzellen existieren Rezeptoren, die die Mastzelldegranulation auslösen oder unterstützen können [48]. So fördern die Aktivierung des c-kit Rezeptors über SCF und der Zytokin-Rezeptoren für IL-3 und IL-4 die FcεRI-abhängige Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie LTC₄, Histamin, diversen Zytokinen, Chemokinen und Mastzellproteasen [27, 48, 49]. Neben dem Haupttrigger IgE können Mastzellen durch eine Reihe weiterer Faktoren wie, bakterielle und virale Antigene, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone sowie Adenosin, Anaphylatoxin, leichte Ketten von Antikörpern, Endothelin und Neuropeptide aktiviert werden [50].

1.2.4.1 Aktivierung über FcεRI

Der FcεRI besteht aus 4 Untereinheiten. Seine Struktur ist in Abbildung 2 dargestellt. Die transmembrane α-Kette, welche im extrazellulären Abschnitt die IgE-Bindestelle besitzt; 2 Disulfid-verknüpfte γ-Ketten, die als Homodimer vorliegen und die Zellmembran 1-fach durchspannen. Sie besitzen im zytosolischen Abschnitt am COOH-Ende jeweils ein zellaktivierendes Motiv, das sogenannte *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM). Diese Sequenz spielt eine essentielle Rolle bei der Einleitung von Signalkaskaden, die in die Ausschüttung sowie der Bildung von Entzündungsmediatoren wie Arachidonsäuremetaboliten, Zytokinen und Chemokinen münden [51]. Zwischen beiden Untereinheiten befindet sich die 4-fach membran-spannende β-Kette, welche im intrazellulären Bereich am COOH-Ende ebenfalls ein ITAM enthält [47, 48]. Den γ-Ketten kommt die Hauptaufgabe in der Signalweiterleitung zu, die β-Kette scheint die Signale der γ-Ketten zu verstärken [51]. Im Zuge der FcεRI-Kreuzvernetzung kommt es zur Aktivierung von Tyrosin-Kinasen der *src* Familie. Diese sind in der Lage, Tyrosin-Reste im ITAM zu phosphorylieren und führen damit zur Ausbildung einer Bindungsstelle für *src* homologe (SH₂) Domän-enthaltende Proteine [51]. Im Falle von FcεRI scheint *Lyn* die Haupt-*src*-Kinase für diesen Prozess zu sein [52]. In Abbildung 3 ist die FcεRI-abhängige Aktivierung von Mastzellen dargestellt.

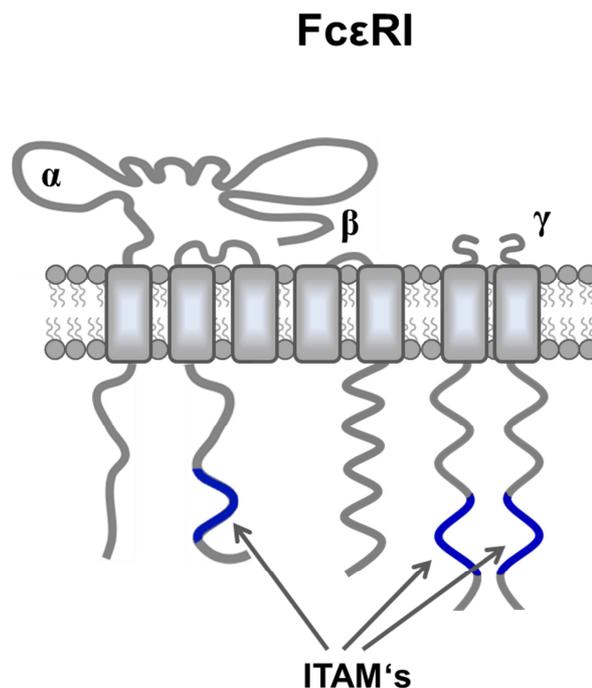


Abbildung 2: Aufbau von FcεRI

Einleitung

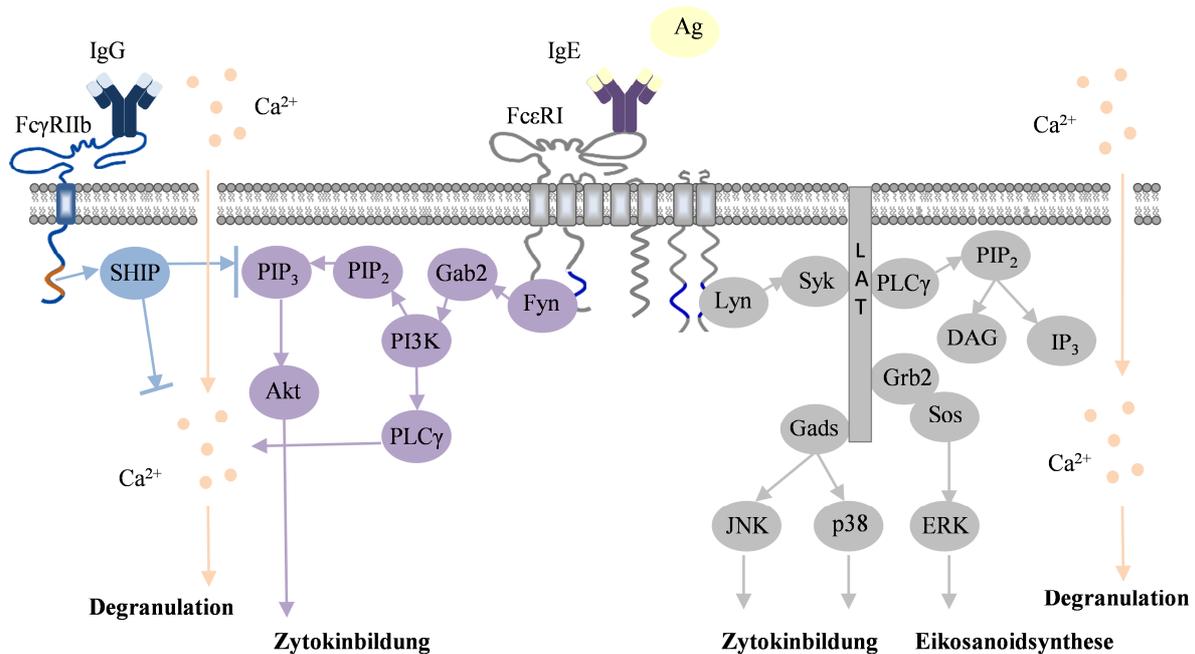


Abbildung 3: Vereinfachter Lyn/Fyn-abhängiger Signalweg durch FcεRI-Kreuzvernetzung in Mastzellen und die Hemmung durch FcγRIIB. Über die Aktivierung von Adaptormolekülen werden durch Lyn MAPK sowie JNK phosphoryliert und es kommt zur Transkription von Zytokingenen- sowie Enzymgenen für die Synthese von Lipidmediatoren. Ferner wird über PLCγ die Ca²⁺-abhängige Degranulation vermittelt. Die Aktivierung von FcγRIIB führt über SHIP zur Hemmung des Fyn Signalweges. Die Akt vermittelte Zytokininduktion sowie der Kalzium-Einstrom werden verhindert.

Lyn ist eine *non-receptor protein tyrosine kinase* (PTK), welche in der Plasmamembran innerhalb der *lipid rafts* verankert ist und sich im Zuge der FcεRI-Aktivierung in Richtung dieses Rezeptors bewegt [53]. Dort phosphoryliert *Lyn* das ITAM der β-Kette und der γ-Kette. Die Phosphorylierung der β-Kette fördert die Rekrutierung weiterer *Lyn*-Kinasen. Die Phosphorylierung der γ-Kette dient als Bindungsstelle für die Tyrosin-Kinase *Syk* (*spleen tyrosine kinase*). *Syk* ist ebenfalls eine PTK der *Src*-Familie. *Syk* phosphoryliert Tyrosin-Reste des membran-lokalisierten Adaptorprotein *linker of activation for T cells* (LAT), was zu einer komplexen Bindung und Aktivierung einer Reihe weiterer Adaptorproteine führt wie Gads, Grb2/Sos und Phospholipase C γ (PLCγ). Gads vermittelt über die MAP Kinase *c-Jun N-terminale Kinase* (JNK) sowie über p38 die Transkription von Zytokingenen. Die Adaptorproteine Grb2/Sos greifen über *extracellular signal regulated kinase* (ERK) regulierend in den Arachidonsäuremetabolismus ein. ERK und p38 gehören zur Familie der *mitogen activated protein kinases* (MAPK). Die Aktivierung von PLCγ1 und PLCγ2 führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Diazylglyzerol (DAG) und

Inositol-3-Phosphat (IP_3), welche über die Regulation der Kalzium-Konzentration an der Mastzelldegranulation beteiligt sind [14, 53]. $PLC\gamma$ liegt in den Isoformen $PLC\gamma 1$ und $PLC\gamma 2$ in der Mastzelle vor.

Alternativ existiert ein weiterer Signalweg, bei dem *Fyn*, ebenfalls eine *Src* Kinase, an $Fc\epsilon RI$ phosphoryliert wird. Dies fördert die Aktivierung eines Adaptormoleküls zur Rekrutierung von Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K). PI3K phosphoryliert zum einen PIP2 zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphat (PI3P), welches bei der Induktion von Zytokinen eine Rolle spielt. Zum anderen ist PI3K über $PLC\gamma$ an der Kalzium-Mobilisierung beteiligt [14, 53]. Diese Signalkaskade ist ebenfalls in Abbildung 3 gezeigt.

1.2.4.2 Aktivierung über *Fc\gamma RI* und *Fc\gamma RIII*

Neben IgE können Mastzellen über IgG bindende Rezeptoren, den $Fc\gamma$ Rezeptoren ($Fc\gamma R$), aktiviert werden. Es existieren insgesamt drei $Fc\gamma R$ Varianten: $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$ und $Fc\gamma RIII$. Während aggregierte $Fc\gamma RI$ und $Fc\gamma RIII$ zellaktivierende Signale auslösen, vermittelt $Fc\gamma RIIB$ bei gleichzeitiger Aktivierung von $Fc\epsilon RI$ oder *c-kit* hemmende Eigenschaften. Die unterschiedlichen Funktionen resultieren aus dem Vorhandensein von aktivierenden ITAMs in $Fc\gamma RI$ und $Fc\gamma RIII$ und dem hemmenden Motiv *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) im zytosolischen Abschnitt des menschlichen $Fc\gamma RIIB$ bzw. der murinen $Fc\gamma RIIB1$ und $Fc\gamma RIIB2$.

$Fc\gamma RI$ besteht aus einer IgG-bindenden α -Kette und einem γ -Homodimer, welcher für die Signalweiterleitung von Bedeutung ist. Die Strukturen von $Fc\gamma RI$ und $Fc\gamma RIII$ sind in Abbildung 4 veranschaulicht. Es existieren drei Gene für $Fc\gamma RI$, die mindestens sechs Gentranskripte bilden, wovon jedoch nur $Fc\gamma RIa1$ in der Lage ist, IgG mit hoher Affinität zu binden ($K_a 10^{-8} - 10^{-9} M$) [51]. Menschliche und murine Mastzellen exprimieren $Fc\gamma RI$ nicht konstitutiv auf ihrer Oberfläche. Das Zytokin Interferon γ ($IFN-\gamma$) ist in der Lage, $Fc\gamma RI$ auf der Oberfläche menschlicher Mastzellen, die aus peripheren Blut hergeleitet wurden, zu induzieren [54]. Woolhiser *et al.* konnten zeigen, dass Mastzellen aufgrund der Induktion von $Fc\gamma RI$ durch $IFN-\gamma$ auf Stimulation mit myeloma $IgG_1/anti-IgG_1$ reagierten [5]. Es kam zur Freisetzung von β -Hexosaminidase sowie der Bildung von Prostaglandin D_2 (PGD_2), LTC_4 und weiterer Zytokine, insbesondere TNF. Dieser Effekt konnte von den Autoren für die

Einleitung

restlichen IgG-Subklassen IgG₂, IgG₃ und IgG₄ nicht beobachtet werden. Eine simultane Aktivierung von FcγRI/IgG₁ und FcεRI/IgE bewirkte eine additive Freisetzung an β-Hexosaminidase [5].

Die Aktivierung von Mastzellen über FcγRIII konnte bisher nur in *bone marrow-derived* Mausmastzellen (mBMMC) des serosalen Typs erfolgreich nachgewiesen werden [55]. Über die Ko-Kultur mit 3T3 Fibroblasten unter SCF-Gabe konnte FcγRIII auf IL-3 hergeleiteten mBMMC hochreguliert werden [56]. FcγRIII besteht ebenso wie FcγRI aus einer IgG-bindenden α-Kette und dem FcRγ Homodimer. Es bindet IgG mit einer vergleichsweise geringen Affinität ($K_a < 10^{-7} M$) [51]. Die Kreuzvernetzung des FcγRIII auf mBMMC führt zur Freisetzung von Lipidmediatoren [55]. FcγRIII-Aktivierung über IgG₁ unterstützt Immunantworten gegen Parasiten und ist beteiligt an experimentell induzierter aktiver und passiver systemischer Anaphylaxie [12].

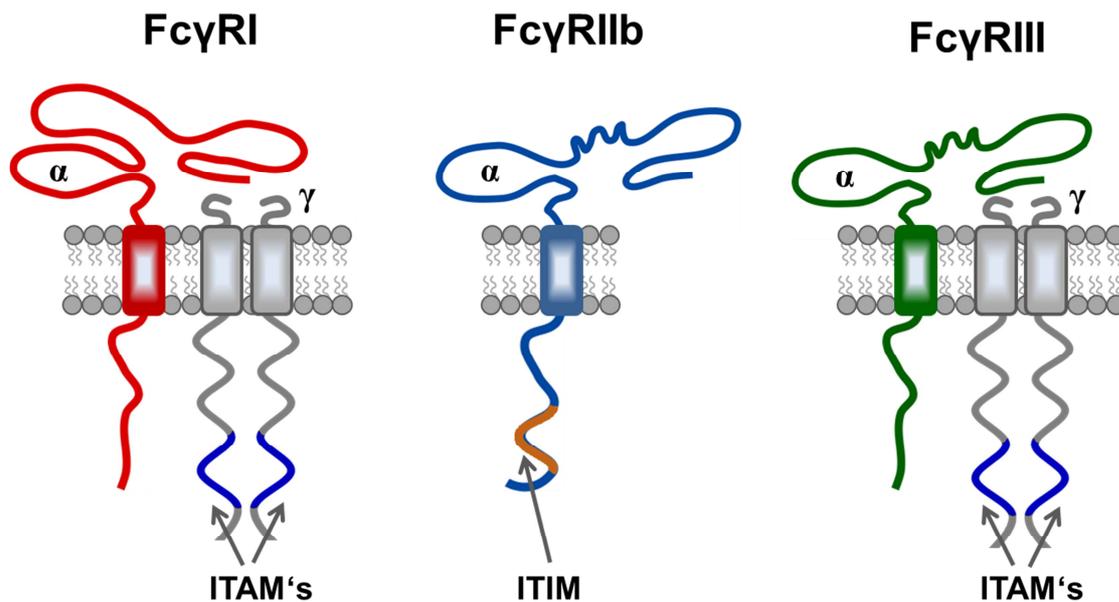


Abbildung 4: Aufbau von FcγRI, FcγRIIb und FcγRIII auf menschlichen und murinen Mastzellen.

1.2.5 Reduktion der Mastzellaktivierung durch FcγRIIB

In vivo Experimente mit murinen Mastzellen zeigen eine Reduktion der IgE-abhängigen Mastzellaktivierung bei Co-Ligation des FcεRI mit Fcγ Rezeptor IIb (FcγRIIb) [57, 58]. Der FcγRII besteht im Gegensatz zu FcγRI, FcγRIII und FcεRI nur aus der transmembranen IgG-bindenden α-Kette ohne dem γ-Homodimer. Die Rezeptorstruktur ist in Abbildung 4 gezeigt. Dafür besitzt der zytosolische Abschnitt der FcγRII-α-Kette spezifische Bindungsstellen für Signalmoleküle, die sogenannte ITIM-Sequenz [51]. Die Aktivierung der ITIM-Sequenz an Tyrosinresten durch *src*-Kinasen fördert die Rekrutierung von Tyrosin- und Inositolphosphatasen, welche in den Signalweg der aktivierten FcεRI/FcγRI hemmend eingreifen [51]. Es existieren drei Genvarianten für FcγRII, wovon jedoch nur FcγRIIB das gesamte Protein codiert. In der Maus kommen von FcγRIIb die Isoformen FcγRIIb1 und FcγRIIb2 vor. Die Bindungsaffinität von FcγRIIB für IgG ist im Vergleich zu den anderen Fcγ-Rezeptoren gering ($K_a \sim 10^{-6} M$) [51]. FcγRIIB wird auf einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen exprimiert [59].

Die simultane Aktivierung von FcγRIIB durch IgG-Immunkomplexe mit FcεRI, FcγRI und FcγRIII, führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten in der ITIM-Sequenz. Die verantwortlichen *src* Kinasen phosphorylieren gleichzeitig Tyrosinreste im ITAM des aktivierenden Rezeptors [60]. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt. Aus diesem Grund wirken FcγRIIB nicht hemmend in inaktivierten Zellen und sind nur aktiv, wenn die Zellaktivierung eingeleitet wurde. Durch die Phosphorylierung von FcγRIIB bildet sich eine Andockstelle für Src Homologe 2-Domän-enthaltende Inositol-5'-Phosphatasen (SHIP1 und SHIP2), wobei FcγRIIB fähig ist SHIP1 und/oder SHIP2 selektiv anzulocken [59]. Die Phosphatasen SHIP1 und SHIP2 dephosphorylieren 5'-Phosphatgruppen wie sie in PI3P vorkommen. PI3P ist ein Produkt von PI3K. Beide Signalproteine spielen eine Rolle bei der *Fyn*-vermittelten Zellaktivierung über FcεRI. Über eine Hemmung der Ras-Aktivierung greift SHIP auch blockierend in den Signalweg von MAPK ein, welche die Induktion von Zytokinen vermitteln [61, 62].

Neben FcγRIIB können auch andere Rezeptoren wie gp49b1, das *mast cell function-associated antigen* (MAFA) und PECAM-1 (CD31) sowie Enzyme wie die Protein Tyrosin Phosphatasen, die Serin/Threonin Phosphatasen und *Lyn* selbst die FcεRI-abhängige Aktivierung von Mastzellen hemmen [51, 53].

1.3 IgG-Subklassen

1.3.1 Aufbau und Funktion der IgG-Subklassen

Die Geschichte der Antikörper geht auf die Beobachtung von Kitasato und von Behring aus dem Jahre 1890 zurück [63]. Sie berichten von einer Substanz im Blut, die das Diphtherie-Toxin neutralisieren könne. Erst 1939 identifizierten Tiselius und Kabat die γ -Globulin-Fraktion aus immunisiertem Serum als die strukturelle Grundlage für die Antikörper. Über Größenauftrennung konnten die Ig-Varianten IgM, IgA, IgE, IgD und IgG bestimmt werden, wobei IgG 75 % der Gesamt-Immunglobulinfraktion ausmacht [63, 64].

Antikörper bestehen in ihrer y-förmigen Grundstruktur aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten, welche über kovalente Schwefelbrücken und nicht kovalente Kräfte verbunden sind. Die leichten und schweren Ketten besitzen jeweils eine variable, antigenbindende und ein oder drei konstante, Rezeptor-bindende Domänen. Antikörper lassen sich durch Trennung an der Verbindungsstelle *hinge*-Region in zwei funktionelle Einheiten einteilen: in zwei Fab (*fragment antigen binding*) -Fragmente und ein Fc (*fragment crystallizable*) -Fragment.

Zu Beginn der 60er Jahre entdeckten Forscher, dass menschliches IgG in vier Klassen eingeteilt werden kann, welche sie anhand ihrer Konzentrationen im Serum nummerierten [64, 65]. Die vier IgG-Subklassen unterscheiden sich morphologisch in ihrer konstanten C-Region der schweren Kette hinsichtlich Größe, Aminosäuresequenz, Auftreten von Hinge-Regionen und Anzahl der Disulfidbrücken. Dadurch weisen sie unterschiedliche biologische Funktion auf, wie die Bindung an das Komplementsystem und an Fc Rezeptoren. Allgemein üben IgG antibakterielle, antivirale und toxinneutralisierende Wirkungen aus. Gemeinsam ist allen IgG-Subklassen die plazentagängige Eigenschaft. Aufgrund ihrer Strukturvariabilitäten ist die Bildung der IgG-Subklassen zum Teil allergenspezifisch [65, 66]. In Tabelle 2 ist eine Übersicht über Serumkonzentrationen und Rezeptorbindungseigenschaften der vier IgG-Subklassen angegeben. Abbildung 5 zeigt die Struktur der vier IgG-Subklassen [67].

Einleitung

Eigenschaften	Antikörper				
	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	IgE
Serumkonzentration [g/l]	5-12	2-6	0,5-1	0,2-1	0,05 mg/l*
Bindung an FcγRI	++	+	++	+	-
Bindung an FcγRII	++	+	++	+	-
Bindung an FcγRIII	++	+	++	+	-

Tabelle 2: Eigenschaften der IgG-Subklassen: Serumkonzentrationen und Bindungseigenschaften der IgG-Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ an FcγR in gesunden Erwachsenen. Hamilton, Bruhns et al., * Burton und Oettgen [14, 64, 68].

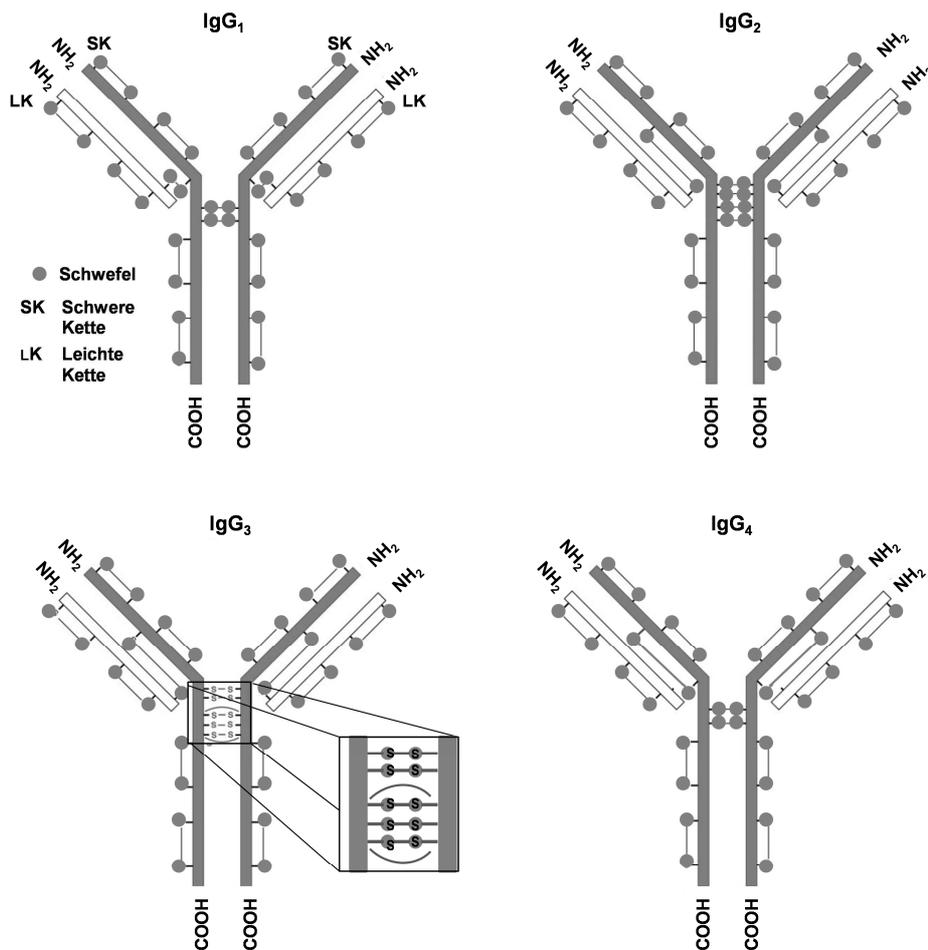


Abbildung 5: Struktur der IgG-Subklassen

1.3.2 Bedeutung der IgG-Subklassen bei allergischen Reaktionen

Die Fähigkeit der IgG-Subklassen, Mastzellen zu aktivieren, war lang vor der Entdeckung von IgE bekannt. Forscher fanden Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre heraus, dass IgG, insbesondere IgG₁ zur Degranulation von Mausmastzellen führt [60]. IgG lag dabei als polyklonaler (gegen mehrere Epitope gerichteter) Antikörper vor oder konnte monoklonal (gegen ein Epitop gerichtet) im Komplex mit einem multivalentem Antigen die allergische Reaktion auslösen. Neuere Forschungen zeigen, dass IgG₁ in der Lage ist, menschliche Mastzellen über FcγRI (CD64) zu aktivieren [5]. Das sogenannte „*Supercross-Linking*“ stellt eine weitere *in vitro* Anwendung dar, wie IgG-Antikörper Mastzellen aktivieren können. Dabei werden zwei benachbarte an IgE gebundene Chimere verbunden, welche für sich allein keine Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle ausgelöst hatten [69]. Demgegenüber deuten Studien darauf hin, dass die im Rahmen einer Immuntherapie gebildeten Allergenspezifischen IgG₁- und -IgG₄-Antikörper für den Rückgang der allergischen Symptome eine bedeutende Rolle spielen könnten [3, 4, 70]. Erhöhte IgG₄-Level gegen Kuhmilch und Hühnereiweiß in der Kindheit indizieren eine Toleranz gegenüber diesen Allergenen im Erwachsenenalter [71]. In einem Mausmodell hemmen die, während der Immunisierung gebildeten oder verabreichten IgG-Antikörper, komplett die IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion [70]. Voraussetzung hierfür ist eine hinreichend hohe Konzentration an IgG und eine vergleichsweise niedrige Allergen-Exposition. Hohe Allergendosen fördern die Bildung von IgG-Antigen-Komplexen, welche über Bindung an FcγRIII zellaktivierend wirken können [72]. Eine protektive Wirkung von IgG-Antikörpern basiert primär auf deren kompetitiven Verhalten, indem sie das Allergen abfangen, bevor es an IgE binden kann [70, 73, 74]. Ein weiterer Mechanismus stellt die simultane Aktivierung von FcγRIIB durch IgG dar, in dem die durch FcεRI-Kreuzvernetzung ausgelöste Immunantwort reduziert wird [60].

Neben der Wirkung der IgG-Subklassen wurde in dieser Arbeit der Effekt von immunmodulatorischen Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die Aktivierung menschlicher Darmmastzellen untersucht.

1.4 Die immunmodulierenden Aminosäuren Glutamin und Arginin

Glutamin und Arginin werden als halb-essentielle Aminosäuren angesehen, da sie vom Körper synthetisiert werden können, in kritischen und v.a. katabolen Stoffwechselsituationen wie im Falle traumatischer und infektiöser Geschehen aber massiv vom Körper verbraucht werden. Diese Eigenschaft und der Umstand, dass beide im Zellstoffwechsel und in der Organfunktion bedeutend sind, machen die beiden Aminosäuren als „Pharmakonutrient“ interessant [75]. Hinsichtlich Glutamin konnte in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass es die Genesung von schweren Erkrankungen beschleunigen und die Folgeerscheinungen vermindern kann. Ein supplementativer Einsatz von Arginin hingegen ergab bisher widersprüchliche Aussagen. Die Strukturformeln sind jeweils in Abbildung 6 gezeigt.

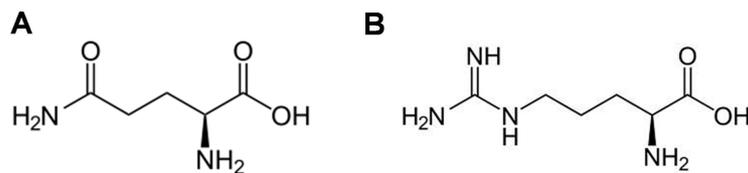


Abbildung 6: Strukturformel von L-Glutamin (A) und L-Arginin (B).

1.4.1 Allgemeine und anti-inflammatorische Bedeutung von L-Glutamin

Glutamin ist die häufigste frei verfügbare Aminosäure im menschlichen Körper, wobei 50 % des freien Glutamins im Skelettmuskel vorliegen [76]. In katabolen Stresssituationen wie Trauma, Sepsis, schweren Verbrennungen und Schock besteht ein hoher Bedarf an Glutamin [77]. Der Muskel liefert einen schnell generierbaren Vorrat an protektiven und den Krankheitsverlauf positiv beeinflussendem Glutamin [76]. In verschiedenen Studien mit kritisch Kranken sowie bei post-operativen Patienten senkte die enterale oder parenterale Gabe erhöhter Dosen an Glutamin die Häufigkeit, die Schwere und die Folgen systemischer und nosokomialer Infektionen [6].

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Glutaminwirkung basieren auf seinen antioxidativen, nutritiven und immunprotektiven Eigenschaften. Als Vorstufe für das Antioxidans Glutathion hilft Glutamin freie Radikale abzufangen. Als Nährstoff für sich

schnell teilende Zellen sowie durch Induktion von *tight junction* Proteinen wie Zonula occludens-1 trägt Glutamin zur Integration der Darmbarriere bei [77].

Glutamin übt auch als Regulator der Proteinsynthese und inflammatorischer Signalkaskaden in Immunzellen positive Effekte auf das Immunsystem aus. So reagierten menschliche und murine Immunzellen wie *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) und Makrophagen auf die Gabe von Glutamin mit einem Anstieg immunprotektiver Zytokine wie IFN γ , IL-2, IL-4 und IL-10 und dem Rückgang inflammatorischer Mediatoren wie TNF [78, 79]. In Monozyten induzierte Glutamin die Expression der Leukozytenantigen-Einheit *human leukocyte antigen* (HLA)-DR, einer Oberflächenstruktur zur Präsentation körperfremder Antigene [80].

In-vitro-Studien an menschlichen Darmbiopsien bei Vorhandensein und unter Abwesenheit von Entzündungsprozessen, bestätigen die Wirkung von Glutamin anhand von reduzierten proinflammatorischem IL-6- und IL-8- und erhöhten anti-inflammatorischen IL-10-Gehalten [81, 82]. Pharmakologische Konzentrationen an Glutamin in Kombination mit Arginin senken ferner die Level an IL-6, IL-8 und TNF in Biopsien von Patienten mit M. Crohn [7]. In Tierstudien mit induzierter Darmentzündung senkt die prophylaktische Gabe von Glutamin die bakterielle Ausbreitung und Fehlbesiedlung, das Auftreten von Darmläsionen und die Bildung von Zytokinen [83, 84]. Glutamin stellt damit einen interessanten Regulator von Entzündungszellen dar.

1.4.2 Allgemeine und anti-inflammatorische Bedeutung von L-Arginin

L-Arginin entsteht aus der Umwandlung von Glutamin zu Ornithin, welches im Darm zu Citrullin verstoffwechselt wird. In der Niere wird Citrullin zu Arginin umgeformt. Eine Supplementation mit Arginin bewirkte in gesunden und schwer kranken Patienten das Anlocken von Lymphozyten und Monozyten sowie die Aktivierung von T-Helferzellen, Makrophagen und natürlicher Killerzellen [85]. Diese Eigenschaften führten zum Einsatz von Arginin als immunförderndes Nahrungsergänzungsmittel bei der Behandlung von Infektionen in kritisch kranken Patienten [85].

Die immunmodulatorische Wirkung von Arginin wird bedingt durch die Aktivität der kompetitiven Enzyme NO-Synthase und Arginase. Die Umsetzung von Arginin durch NO-

Einleitung

Synthese führt zur Bildung von NO. NO ist beteiligt an Darmprozessen wie Absorption, Sekretion und Motilität [86]. Die Bedeutung von NO in Zusammenhang mit immunregulatorischen Prozessen ist bisher nicht eindeutig geklärt und scheint von der Dosis und dem Wirkort abzuhängen [77, 87]. NO scheint anti-inflammatorische Wirkung auszuüben durch Senkung der Zytokininduktion [88]. Übermäßige Mengen an NO bzw. NO-Abkömmlingen sind eindeutig mit pathologischen Prozessen assoziiert [85]. Arginase führt über die Umwandlung von Arginin in Ornithin zur Bildung von Polyaminen und Prolin. Polyamine sind bedeutend zur Erhaltung und Neubildung von Gewebe. Die unterschiedlichen Stoffwechselwege von Arginin sind im Überblick in Abbildung 7 dargestellt.

TH2-Zytokine wie IL-4, IL-10, TGF (*transforming growth factor*) - β sowie das Auftreten von Hypoxämie begünstigen die Aktivität von Arginase. NO-Synthase hingegen wird bevorzugt in einem von T-Helferzellen 1 (TH1)-dominierten Immunstatus aktiviert. Die TH1-assoziierten Zytokine wie IL-1, TNF und IFN γ induzieren die Expression von iNOS, welche NO aus Arginin generieren [6, 89]. Bei Erkrankungen mit schweren Schockzuständen wie Sepsis, Ischämie und dem Auftreten eines hämorrhagischen Schocks geben Tier- und Humanstudien widersprüchliche Aussagen über den Einsatz von Arginin [90-93]. Dies mag zum einen durch die unterschiedliche Aktivität der Arginin-Enzyme NO-Synthase und Arginase bedingt sein, wie Sepsis zum Beispiel TH1-geprägt ist und TH2-Zytokine in Traumen prädominant sind. Weiterhin wird angenommen, dass auch die Schwere und das Stadium der Erkrankung bzw. der Zeitpunkt und die Applikationsform von Arginin eine Rolle spielen [6].

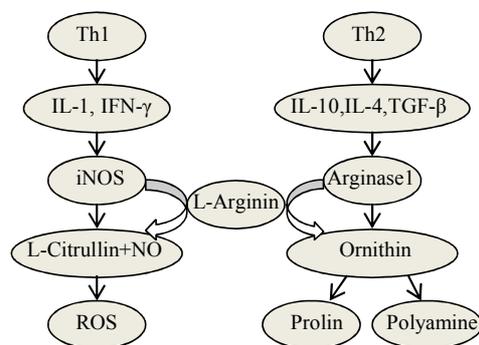


Abbildung 7: Stoffwechselwege von Arginin. TH1-Zytokine induzieren die Bildung von NO und ROS aus Arginin über iNOS. TH2-Zytokine führen durch Arginase zur Umwandlung von Arginin zur Bildung von Polyaminen und Prolin. T-Helferzellen Typ 1 (TH1), Interleukin 1 (IL-1), Interferon gamma (IFN- γ), induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), Nitroxid (NO), Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), *transforming growth factor beta* (TGF- β). Abbildung aus Santora und Kozar [69].

2 Material und Methoden

2.1 Auflistung der verwendeten Reagenzien und Puffer

Antikörper

Alexa Fluor® 488 IgG, goat anti-mouse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-CD16, Maus-Antikörper	AbD Serotec, Düsseldorf
Anti-CD32, Maus-Antikörper	AbD Serotec, Düsseldorf
Anti-CD64, Maus-Antikörper	AbD Serotec, Düsseldorf
Anti-FcεRI α-Kette, mouse Antikörper (22E7)	Hoffmann-La Roche, USA
Anti-IgE, rabbit Antikörper	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
Anti-IgG ₁ , Maus-Antikörper	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Anti-IgG ₂ , Maus-Antikörper	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Anti-IgG ₃ , Maus-Antikörper	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Anti-IgG ₄ , Maus-Antikörper	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
DNP	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
IgG ₁ , myeloma Antikörper	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
IgG ₂ , myeloma Antikörper	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
IgG ₃ , myeloma Antikörper	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
IgG ₄ , myeloma Antikörper	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
IgE, DNP-spezifischer Antikörper	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris
IgE, myeloma Antikörper	U. Blank, INSERM Unite 699, Paris

IgG-Subklassen Isolation

Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
HiTrap™ Protein A Säule	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
HiTrap™ Protein G Säule	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
IgG Subclass Profile ELISA	Invitrogen, Darmstadt
Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumcitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dulbecco`s PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
pH Indikatorpapier Tritest	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren
Pierce® Zentrifugen Säulen	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Steril Filter, 0,45 µM	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht
Tris	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ultralink Biosupport Medium	Thermo Fischer Scientific, Bonn

Pufferlösungen:

Glycin-HCl-Puffer: 0.1 M Glycin, 1M HCl, pH 2.7
Glycin-NaCl-Puffer: 0,15 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 7.0/pH 3.0
Glycin-Puffer: 0,15 M Glycin, pH 7.0
NaCl-Puffer: 1 M NaCl
Tris-HCl-Puffer: 1M Tris, 1 M HCl, pH 9.0
Tris-Puffer: 1 M Tris, pH 8.0

Signalproteinbestimmung

Bio-Rad Protein Assay
Proteome Profiler™ Array
Super Signal® Substrate
Rinderserumalbumin

Bio-Rad Laboratories GmbH, München
R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Thermo Scientific, Dreieich
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Zellaufreinigung und Zellkultur

Acetylcystein (ACC)
Ampicillin
Amphotericin B
L-Arginin
CD117 MicroBead Kit, human
Chymopapain
Collagenase D
Dead Cell Removal Kit
Dinatriumhydrogenphosphat
DNase I
EDTA
Foetales Kälber-Serum (FCS)
Foetales Kälber-Serum, dialysiert
Gelatine
Gentamycin
D-Glucose Monohydrat
DMEM
L-Glutamine 200 nM
HEPES
Kaliumchlorid
L-Lysin
Metronidazol
Penicillin / Streptomycin
Pronase
Rekombinantes IFN γ
Rekombinantes SCF
Rekombinantes Human IL-4
Rinderserumalbumin
RPMI 1640
SILAC-RPMI 1640

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gibco® Life-Technologies, UK
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Serva Electrophoresis, Amstetten, Österreich
Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Boehringer, Ingelheim am Rhein
Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Gibco® Life Technologies, UK
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
Fresenius, Bad Homburg
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
Boehringer, Ingelheim am Rhein
Boehringer, Ingelheim am Rhein
PeproTech, Hamburg
PeproTech, Hamburg
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Gibco® Life Technologies, UK
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

100 μ m und 250 μ m Nybold-Filter
MACS® Separator
MACS® Separation Columns (LS)
6-, 24-, 48- und 96-Well-Kulturplatten

Swiss Silk Bolting Manufact., Schweiz
Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mitenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
NUNC, Wiesbaden

Pufferlösungen:

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

TE-Puffer: 2 mM EDTA in Tyrode-Puffer

ACC-Lösung: 6,13 mM ACC in TE-Puffer

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

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

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

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

Material und Methoden

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

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

Stimulation und Mediatormessung

Cysteinyl Leukotriene Enzyme Immunoassay Kit	Assay Designs, Inc., USA
D-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Histamin-ELISA	IBL, Hamburg
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rinderserumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Triton-X	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

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

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

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

Zellfärbung

Giemsa-Lösung	Mallinckrodt Baker B.V., Burgdorf
May-Grünwald-Lösung	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

RNA-Isolation, Umschreiben in cDNA, PCR und Agarosegelelektrophorese

Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
DNase I Desoxyribonuclease 1 U/µl	Promega GmbH, Mannheim
dNTP 10 mM	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
DTT 0,1 M	Invitrogen, Darmstadt
EDTA 25 mM	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Essigsäure, Rotipuran® 100 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
5x First-Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Oligo dT Primer	MWG Biotech, Ebersberg
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Primer (Tabelle 4)	MWG Biotech, Ebersberg

Material und Methoden

RLT-Lysispuffer: RLT-Puffer, 1% β -Mercaptoethanol

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

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

FACS

BD FACSTTMFlow

BD FACSTM Shutdown Solution

Cell Wash

FACS Clean

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

2.2 Gewinnung und Kultivierung von menschlichen Darmmastzellen

2.2.1 Isolation von Mastzellen aus menschlicher Darmmukosa

Die Mastzellen wurden aus menschlicher Darmschleimhaut aus Darmabschnitten wie Dün- und Dickdarm, Sigma und Rektum gewonnen. Die Resektate stammen zum größten Teil von Darm- bzw. Pankreaskopftumorpatienten und zum geringen Teil von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (M. Crohn) und Colitis ulcerosa. Sie wurden uns freundlicher Weise von umliegenden Kliniken wie dem Katharinenhospital (Stuttgart), dem Robert-Bosch-Krankenhaus (Stuttgart) und dem Klinikum Esslingen zur Verfügung gestellt. Es wurde streng darauf geachtet tumorfreie Abschnitte ohne krankhafte Auffälligkeiten für die Mastzellgewinnung zu verwenden. Positive Gutachten der Ethikkommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg liegen vor. Sofort nach der Gewebeentnahme und nach der Abtrennung von der Blutversorgung wurden die Resektate in einen mit Antibiotika versetzten Puffer (TEA-Puffer) überführt.

Das eingetroffene Resektat wurde ggf. aufgeschnitten, in Tyrode-Puffer gewaschen, von anhängendem Mesenterial- sowie Fettgewebe befreit und zur Aufbewahrung in TEA-Puffer bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert. Die im Puffer enthaltenen Antibiotika sorgten für eine Abtötung anhaftender Keime im Darm und damit zu einer Verringerung der mikrobiellen Kontamination. Aus diesem Grund wurden sämtliche Schritte der Mastzellgewinnung unter einer *Laminar air-flow*-Sterilwerkbank durchgeführt.

Am darauffolgenden Tag wurde die Tunica mucosa mit Hilfe einer chirurgischen Schere von der darunter liegenden Tunica submucosa und der Tunica muscularis abpräpariert. Die Tunica mucosa besitzt mit 1-3 % im Vergleich zu den tieferliegenden Darmwandabschnitten den höchsten Anteil an Mastzellen [94]. Bis zu 10 g Mukosa wurden zunächst in 50 ml ACC-Lösung im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln für 10 min inkubiert, um den aus den Becherzellen austretenden Schleim zu lösen. Bei höheren Mengen an Mukosa wurde die gesamte Aufarbeitung in entsprechend mehr Volumen an Lösung bzw. Reaktionsgefäßen durchgeführt. Um weiteren Schleim zu entfernen, wurde das Präparat nach der Inkubation kräftig von Hand geschüttelt und ggf. in frischer ACC-Lösung erneut inkubiert. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde die Mukosa in 40 ml Tyrode-Puffer mit 7 mM EDTA für 20 min inkubiert, welches neben der Entfernung restlichen Schleims dazu diente, Epithelzellen abzutragen. Im darauffolgenden Schritt wurde die Mukosa durch eine Enzym-Lösung

bestehend aus Pronase und Chymopapain (PCh) anverdaut, um eine Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Nach der Inkubation wurden zunächst ca. 30 ml Tyrode-Puffer mit 7 mM EDTA dekantiert und die Mukosa in der verbleibenden Puffer-Lösung mit einer chirurgischen Schere in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten. Dies diente der Vergrößerung der Oberfläche und führte damit zu einer besseren Zugänglichkeit der Enzyme. Die zerkleinerte Mukosa wurde über einem Nybold-Filter mit einer Porengröße von 250 µm gegeben, mit Tyrode-Puffer gespült und in 25 ml PCh-Lösung für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Suspension im selben Filter mit TGMD-Pufferlösung gespült und in 25 ml Collagenase-Lösung für 30 min inkubiert. Collagenase sorgt für einen Abbau von Bindegewebszellen und fördert damit die Vereinzelung der Zellen. Nach der Inkubation wurde die Collagenase-Lösung mit den enthaltenen Gewebestücken erneut über einen Filter gegeben und mit TGMD-Lösung gespült bis ein klares Filtrat entstand. Das Filtrat wurde bei 300 g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1-2 ml RPMI resuspendiert und auf Eis gestellt. Mit dem auf dem Filter verbliebenen Gewebe wurde der Schritt wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit der auf Eis gelagerten Suspension vereint und mit RPMI auf 40 ml aufgefüllt. Zur Entfernung von Zellklumpen wurde die Zellmischung in einem Filter mit 100 µm großen Poren aufgetrennt und der Filter mit ca. 10 ml RPMI nachgespült. Von dem Filtrat wurde über eine Trypanblau-Färbung die Anzahl an lebenden und toten Zellen ermittelt sowie über die May-Grünwald/Giemsa Färbung der prozentuale Anteil an Mastzellen an der Zellsuspension bestimmt, welcher zumeist bei 1 – 3 % lag (Methode siehe Kap. 2.2.3). Nach Abzentrifugation bei 300 g für 10 min wurden die Zellen mit 4×10^6 Zellen/ml Kulturmedium in einer Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht im CO₂ Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.2 Aufreinigung und Kultivierung von Darmmastzellen

Zur Isolierung der Mastzellen aus der am Vortag gewonnenen Einzelzellkultur wurde das Zelltrennsystem von Miltenyi Biotec verwendet. Dabei binden an magnetische-Beads-gekoppelte-Antikörper spezifisch an Oberflächenantigene der Zielzellen. In einer Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, werden die Antikörper-gebundenen Zellen von ungebundenen Zellen getrennt.

Zunächst wurde in der vom Vortag gewonnenen und über Nacht kultivierten Einzelzellsuspension die Anzahl an toten Zellen bestimmt und anschließend die toten Zellen

Material und Methoden

mit dem *Dead Cell Removal Kit* von Miltenyi entfernt. Dabei erkennen an magnetische-Beads-gekoppelte Antikörper ein spezifisches Antigen in der Plasmamembran von apoptotischen und toten Zellen. Die Zellsuspension wurde zunächst bei 300 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 300 g für 10 min durchgeführt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100 µl *Dead Cell Removal MicroBeads* pro 10^7 Gesamtzellen resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit 10 ml *binding buffer* gemischt und auf eine mit *binding buffer* vorgespülte *MACS[®]-LS* Säule gegeben, welche sich in einer Halterung des *MACS[®] Separators* in einem starkem magnetischem Feld befand. Nach Passieren der Zellsuspension durch die Säule wurde diese 4-mal mit 3 ml *binding buffer* gespült. Die Antikörper-gebundenen Zellen blieben aufgrund der Wechselwirkung der Antikörper-gekoppelten Beads mit dem magnetischen Feld in der Säule hängen, die lebenden Zellen gelangten hindurch und wurden aufgefangen. Nach deren Zentrifugation wurde die Zellzahl und Zelldichte bestimmt, um sicher zu gehen, dass sich eine weitere Aufreinigung der Zellen lohnt. Parameter wie die Größe des Darmpräparates, die Dicke der Mukosa sowie die Anzahl und Empfindlichkeit der enthaltenen Mastzellen als auch die Vorgeschichte des Patienten, dem das Präparat entnommen wurde, beeinflussen den Erfolg der Zellisolation. Wenn die Anzahl an lebenden Mastzellen hoch genug war, wurde mit der Isolation der Mastzellen fortgefahren. Hierfür wurden die abzentrifugierten Zellen in 300 µl *MACS[®]-Puffer* je 10^8 Gesamtzellen resuspendiert und mit 100 µl *FcR Blocking Reagent* und 100 µl *CD117 MicroBeads* gemischt und für 15 min bei 4 - 8 °C inkubiert. *FcR Blocking Reagent* diente der erhöhten Bindungsspezifität der *MACS[®]-Antikörper CD117 MicroBeads* an das Zielantigen, in diesem Fall dem *stem cell growth factor receptor* (c-Kit oder CD117). Dieser wird von Mastzellen stark exprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch 1 - 2 ml *MACS[®]-Puffer*-Zugabe und Zentrifugation gewaschen und in ca. 1 - 5 ml *MACS[®]-Puffer* aufgenommen. Die Suspension wurde auf eine *MACS[®]-MS*-Säule gegeben, welche sich am *MACS[®] Separator* im magnetischen Feld befand und mit *MACS[®]-Puffer* vorgespült worden war. Nach dem Passieren der Suspension durch die Säule wurde diese 3-mal gespült. Anschließend wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen und die enthaltenen Zellen wurden mit 5 ml *MACS[®]-Puffer* eluiert. Nach Abzentrifugation wurden die Zellen mit einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in Kulturmedium mit 25 ng/ml rekombinatem humanen SCF und 2 ng/ml IL-4 in einer 6-well Gewebekulturschale ausgesät. Die Mastzellreinheit betrug zu diesem Zeitpunkt 40 – 60 % und erhöhte sich nach 2 - 3 Wochen in Kultur mit SCF auf 97 – 100 %. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO₂ Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in gesättigter

Luftfeuchtigkeit. Durch den wöchentlichen Austausch von 2 ml Medium mit 2,5 ml frischem Kulturmedium unter Zugabe der oben genannten Konzentrationen an SCF und IL-4 wurden die Zellen versorgt. Für Versuche mit IgG-Subklassen wurden die Zellen zusätzlich zu SCF für 48 h mit 100 ng/ml IFN- γ inkubiert.

2.3 Kultivierung von Mastzelllinien

Für manche Fragestellungen wurden in dieser Arbeit die Mastzelllinie RBL-2H3 eingesetzt, da sie den Vorteil einer kurzen Vermehrungsrate aufweisen.

RBL-2H3 Zellen stammen aus Ratten, denen das Karzinogen β -Chlorethylamin verabreicht wurde. Dabei entstanden basophile Leukämiezellen, welche charakteristische Eigenschaften der Basophilen aufweisen [95]. Dies macht die Zellen interessant für die Mastzellforschung, da Mastzellen und Basophile ähnliche Morphologien und Funktionen aufweisen. Darunter zählt u.a. die Ausbildung von Granula und dem IgE-Rezeptor sowie die Bildung von Histamin [95]. In Kultur können diese Zellen jedoch einen abweichenden Phänotyp entwickeln. Daraus resultierend können sich Funktionsunterschiede entwickeln, welche die Experimente beeinflussen [96]. Diese Eigenschaften sollten bei Versuchen mit RBL-2H3 Zellen als Mastzellmodell berücksichtigt werden.

Die Mastzelllinie RBL-2H3 wurde in DMEM Medium (10 % FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) nach Aussaat mit $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml bis zur Konfluenz in der Kulturflasche kultiviert. Um die Zellen nach Wachstum neu auszusäen, wurden diese mit Trypsin-EDTA für 2-3 min bei 37°C inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Boden abzulösen. Die Zugabe von PBS stoppte die Reaktion und vermied, dass Trypsin die Zellen beschädigte. Die Zellen konnten dann mit frischem Medium ausgesät werden. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage.

2.4 Zellzählung und Zelldifferenzierung

Im experimentellen Arbeiten mit Mastzellen und bereits während der Aufreinigung ist eine Zellzählung und Zelldifferenzierung nötig. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen wurde durch Anfärben mit Trypanblau und dem Auszählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dabei penetriert der Farbstoff Trypanblau durch die defekte Zellmembran toter Zellen in das

Zellinnere und lässt die Zellen unter dem Mikroskop dunkelblau erscheinen. Die vitalen Zellen erschienen leuchtend. Es wurden 20 µl von der Zellsuspension entnommen und mit 20 µl Trypanblau gemischt. Nach dem Zählen von insgesamt 100 Zellen wurde die Menge an Zellen pro ml ermittelt: Mittlere Anzahl der Zellen pro Großquadrat $\times 2 \times 10.000$. Der Faktor 2 entstammt der Zugabe von gleichen Anteilen Trypanblau zur Zellsuspension. Pro Großquadrat besitzt die Zählkammer ein definiertes Volumen von 0,1 µl (1mm^2 Eckquadratfläche $\times 0,1$ mm Kammerhöhe), welches mit 10.000 multipliziert die Anzahl der Zellen pro ml ergab.

Die Zelldifferenzierung erfolgte zunächst durch Anfertigung eines Zytopins. Dabei wurden ca. 40 – 80 µl Zellsuspension bei 550 U/min für 3 min. in einer Zytozentrifuge (Cytospin 4, Shandon) auf einen Objektträger appliziert. Der Objektträger wurde anschließend in Färbelösung nach Pappenheim inkubiert. Die angefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop mit einer 1000-fachen Vergrößerung anhand ihrer unterschiedlichen Färbung differenziert.

Der erste Färbeschritt in gefilterter May-Grünwald-Färbelösung für 2 min. diente dem Fixieren der Zellen und dem Anfärben der Granula aufgrund der darin enthaltenen Unterschiede im pH-Wert. Nach kurzem Eintauchen des Objektträgers in ddH₂O erfolgte der zweite Färbeschritt in Giemsa-Färbelösung. Giemsa-Gebrauchslösung wurde zunächst 1:42,5 mit ddH₂O verdünnt. Anschließend wurde das Präparat darin für 20 min. inkubiert und erneut kurz in ddH₂O gespült. Giemsa-Färbelösung führte aufgrund der enthaltenen Farbstoffe zu einer Anfärbung des Zellkerns. Im Lichtmikroskop unter einer 1000-fachen Vergrößerung konnten die Mastzellen aufgrund ihrer dunkelblau-violett gefärbten Granula und ihrer Größe von restlichen Zellen unterschieden werden und ihr Anteil an der Zellsuspension bestimmt werden.

2.5 Behandlung von Mastzellen mit Arginin und Glutamin

Um den Einfluss von pharmakologischen Konzentrationen an L-Arginin und L-Glutamin auf Mastzellen zu untersuchen wurden diese für 18 h mit hohen Dosen an Arginin und Glutamin inkubiert. Im Vergleich wurden Zellen mit physiologischen Dosen an beiden Aminosäuren kultiviert.

Da das Kulturmedium mit RPMI 1640 bereits Arginin und Glutamin enthält wurde spezielles SILAC-RPMI verwendet, bei dem beide Aminosäuren sowie L-Lysin fehlten. Zunächst wurde die benötigte Menge an Zellen entnommen und für 10 min. bei 300 g abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und nach zwei maligen Waschen der Zellen in PBS wurden die Zellen in SILAC-Medium resuspendiert und gleichmäßig in einer 24-*well* Gewebekulturschale mit 1×10^5 Zellen/*well* verteilt. Den entsprechenden Bedingungen wurden kombiniert $\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$, $\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$, $\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$, $\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$ sowie $\text{Arg}^{\text{med}}/\text{Gln}^{\text{med}}$ hinzugesetzt. In der Tabelle 3 sind die entsprechenden Konzentrationen angegeben. L-Lysin wurde mit 0,274 mM/l ergänzt. Nach Auffüllen des Mediums auf 1 ml wurden die Zellen für 18 h im CO₂ Inkubator inkubiert.

Konzentration [mM/l]	L-Arginin (Arg)	L-Glutamin (Gln)
physiologisch (phys)	0,1	0,6
Kulturmedium (med)	1,15	2,06
pharmakologisch (phar)	2	10

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Konzentrationen an L-Arginin und L-Glutamin.

2.6 Bestimmung der Zellvitalität

Um zu testen, ob pharmakologische und physiologische Konzentrationen an Arginin und Glutamin einen Einfluss auf die Zellvitalität ausüben, wurde das *xCELLigence System* von *Roche Applied Science* eingesetzt. Die adhärenzte Mastzelllinie RBL-2H3 wurden dabei in *Zell plates* ausgesät, welche am Boden eine Vielzahl an Elektroden besaßen. Ein Stromfluss wurde in regelmäßigen Abständen initiiert. Die Elektroden erfassten den elektrischen Widerstand, welcher aufgrund der gebundenen Zellen auftrat. Die Variation des elektrischen Widerstandes ist eine Größe für die Zellzahl, die Zellvitalität und die Zellmorphologie. Die *plates* befanden sich dabei durchgängig im CO₂ Inkubator. Zunächst wurden 5000 Zellen/100 µl Kulturmedium pro *well* in der *impedance-based E-Plate 16-well* Platte für 24 h ausgesät. In dieser Zeit senkten sich die Zellen ab und adhärtierten am Boden. Anschließend wurde das

Medium komplett entfernt und die Zellen mit vorgewärmten PBS 2x gespült. Daraufhin wurde SILAC-Medium mit Arginin und Glutamin in folgenden Konzentrationen auf die Zellen gegeben: $\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$, $\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$, $\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$, $\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$ sowie $\text{Arg}^{\text{med}}/\text{Gln}^{\text{med}}$. In Tabelle 3 sind die verwendeten Konzentrationen der Aminosäuren aufgeführt. L-Lysin wurde mit 0,274 mM/l hinzugefügt. Als Referenz dienten RBL-2H3 Zellen in Kulturmedium. Der Versuch wurde nach dem Erreichen der Plateau Phase und der Einleitung der Apoptose Phase abgebrochen. Dies war nach ca. 45 h nach Applikation der unterschiedlichen Aminosäure Konzentrationen der Fall.

2.7 Aktivierung von Mastzellen über Fcε Rezeptor I und Fcγ Rezeptoren

Mastzellen sind neben anderen Möglichkeiten primär aktivierbar über die Vernetzung von IgE-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Diese binden mit ihrem Fc-Abschnitt an den hoch-affinen IgE-Rezeptor FcεRI auf Mastzellen und können dann über einen Sekundärantikörper miteinander gekoppelt werden. Dies löst das Signal zur Zellaktivierung aus.

Die benötigte Anzahl an Zellen wurde bei 300 g für 10 min abzentrifugiert und anschließend mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in Stimulationspuffer resuspendiert. Die jeweiligen Zellen wurden mit 0,4 µg/ml myeloma-IgE bei einer Konzentration für 90 min bei 37 °C beladen. Bei jedem Versuch wurden zwei unbehandelte Kontrollen mitgeführt. Die erste Kontrolle diente der Bestimmung der IgE-unabhängigen Stimulation. Mit der zweiten Kontrolle wurde das maximale Ausschüttungspotential an Mastzellmediatoren ermittelt. Darüber konnte der prozentuale Anteil an freigesetzten Mediatoren durch die Aktivierung des FcεRI berechnet werden ($TC = \text{total content}$). Nach Zugabe von PBS und Zentrifugation bei 300 g für 5 min in einer Zentrifuge wurde durch vorsichtige Abnahme des Überstandes ungebundenes IgE entfernt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, wobei besonders darauf zu achten ist, den gesamten Überstand abzunehmen. Dies ist wichtig um einheitliche Stimulationsvolumina zu gewährleisten, daher ist es ratsam in 1,5 ml Eppendorf-Tubes zu arbeiten. Zur Kreuzvernetzung der gebundenen IgE-Moleküle wurden die Zellen in derselben Zellkonzentration wie oben beschrieben in Stimulationspuffer aufgenommen und mit 1 µg/ml anti-human IgE-Antikörper (α -IgE) für 1 – 6 h bei 37 °C inkubiert. Bis auf den TC wurden bei den Proben durch erneute Zentrifugation der Überstand gewonnen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Zellpellet wurde mit 350 µl RLT-Lysispuffer unter kräftigen Vortexen lysiert und bis zur Genexpressionsanalyse bei -20°C aufbewahrt. Durch

Material und Methoden

Zugabe von 10 %iger Triton-X-Lösung wurden die Zellen lysiert und anschließend bis zur Verwendung eingefroren.

RBL-2H3 wurden wie oben beschrieben aktiviert, jedoch wurden sie mit 0,4 µg/ml DNP-spezifischen IgE beladen und mit 1 µg/ml DNP aktiviert. Da es sich um adhärenzte Zellen handelt, fand die gesamte Stimulation in einer 96-well Platte statt. Die Konzentration betrug 3×10^5 Zellen/ml.

Für die Bestimmung der Aktivierung von Signalmolekülen wurden 1×10^6 Zellen pro 500 µl Stimulationspuffer mit 0,4 µg/ml humanem Myeloma-IgE für 90 min bei 37 °C beladen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Stimulationspuffer mit 0,1 µg/ml anti-human IgE für lediglich 10 min bei 37 °C stimuliert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis zur Verwendung bei -20 °C verwahrt. Das Zellpellet wurde unter kräftigen Vortexen in 340 µl Lysis-Puffer lysiert, welcher bereits im *Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit* zur Bestimmung der Signalmolekülaktivierung enthalten ist. Zur Ermittlung des Proteingehaltes des Lysats wurde ein Aliquot von 5 µl entnommen und die Lysate bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Mastzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Fcγ Rezeptoren. Über Kreuzvernetzung mit IgG-Molekülen oder anti-FcγR F(ab')₂ spezifischen Fragmenten werden in der Zelle aktivierende und hemmende Signalwege ausgelöst.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, im Unterschied dazu aber mit IgG-Antikörpern, allein oder in Kombination mit IgE, stimuliert. Dabei wurden die Zellen mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml Stimulationspuffer mit jeweils 1 µg/ml menschlichem *myeloma* IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ mit oder ohne IgE für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Kreuzvernetzung der gebundenen IgG-Moleküle erfolgte durch jeweils 1 µg/ml monoklonalem anti-human IgG₁, anti-human IgG₂, anti-human IgG₃ und anti-human IgG₄ bei gleichbleibenden Zellkonzentrationen und Stimulationsvolumina für 1 h bei 37 °C in Kombination mit oder ohne anti-human IgE. Der Überstand wurde nach Zentrifugation abgenommen und das Zellpellet in RLT-Lysispuffer lysiert, beides wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8 Messung der Mediatorfreisetzung in Mastzellen

2.8.1.1 β -Hexosaminidase

Die Aktivität an β -Hexosaminidase wurde anhand des optisch aktiven p-Nitrophenol bestimmt, welches durch den enzymatischen Umsatz des Substrates 4-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (pNAG) durch β -Hexosaminidase entstand. Hierzu wurden 25 μ l des nach der Stimulation gewonnenen Überstandes in eine 96-well Platte gegeben und jedem Ansatz 50 μ l pNAG-Substratlösung hinzugefügt. Nach der Inkubation für 90 min bei 37 °C wurde der enzymatische Substratumsatz durch Zugabe von 150 μ l Glycin-Lösung gestoppt und die Extinktion im Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Der Anteil an freigesetzter β -Hexosaminidase wurde ins Verhältnis gesetzt zu der Gesamt- β -Hexosaminidase-Aktivität in den lysierten Zellen.

2.8.1.2 Leukotrien C₄

Die Bestimmung an Cysteinyl Leukotrien LTC₄ erfolgte mit einem *kompetitiven Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und wurde anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Bei der Vorbereitung der Proben wurden diese mit Stimulationspuffer verdünnt. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Berechnung der LTC₄-Werte berücksichtigt. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 26,6 pg/ml. Die LTC₄-Ausschüttung wurde bezogen auf die Konzentration der eingesetzten Zellen bezogen und in ng/ 1 x 10⁶ Zellen angegeben.

2.9 Genexpressionsanalyse

Zur Untersuchung der Wirksamkeit der Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die IgE-abhängige Induktion von Zytokinen von Darmmastzellen wurde die Genexpression bestimmt. Hierbei wurde die bei der Gentranskription synthetisierte *total RNA* (tRNA) zunächst aus den Zellen isoliert und in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Zielgen wurde unter Verwendung der quantitativen *Real-time* RT-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert. Die Menge an amplifizierter DNA repräsentierte die Intensität der Genexpression im Vergleich zum *housekeeping* Gen.

2.9.1.1 Gewinnung von RNA und deren reverse Transkription in cDNA

Die zuvor im Stimulationsansatz verwendeten Zellen wurden nach Abnahme des Überstandes bei einer Zellzahl von $0,5 - 1,0 \times 10^5$ in $350 \mu\text{l}$ RLT-Puffer unter kräftigem Vortexen lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt. Die Isolation der tRNA erfolgte in RNeasy Mini Spin Säulen mit dem RNeasy Mini Kit. Die erhaltenen tRNA-Eluate wurden sofort auf Eis gestellt und bis zum nächsten Gebrauch bei -80°C gelagert.

Zunächst wurde die gewonnene Proben-RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde im ersten Schritt die enthaltene DNA abgebaut durch die Zugabe von 1 U *RNase-freier DNase* zusammen mit $5 \mu\text{l}$ *5x first strand buffer* in $20 \mu\text{l}$ der isolierten tRNA. Dies wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von $2,5 \mu\text{l}$ 25mM EDTA für 10 min bei 70°C wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die RNA denaturiert. Zur Synthese des komplementären cDNA-Stranges wurde eine Mischung aus $5 \mu\text{l}$ *5x first strand buffer*, $2,5 \mu\text{l}$ 87 mM Oligo dT Primern, $4 \mu\text{l}$ 5 mM dNTP, $2,5 \mu\text{l}$ 0,1 M dTT und $0,25 \mu\text{l}$ Superscript III Reverse Transkriptase hinzugegeben und mit $7,25 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser auf $50 \mu\text{l}$ Volumen aufgefüllt. Die cDNA wurde bei 50°C für 1 Stunde synthetisiert und anschließend bei -20°C gelagert. Sämtliche Inkubationsschritte wurden auf einem *Peltier-Thermal-Cycler* von MJ Research durchgeführt.

2.9.1.2 Real time RT-Polymerase-Kettenreaktion

Zur quantitativen Bestimmung des Zielgens wurden $1,5 \mu\text{l}$ cDNA-Probe mit $10 \mu\text{l}$ des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®Green mit enthaltender DNA Polymerase, $8 \mu\text{l}$ RNA- und DNA-freiem ddH₂O und je $0,25 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ Sense- und Antisense-Primer in *optical tubes* gemischt und in einem iQ™ 5 von BioRad amplifiziert. SYBR®Green interkaliert in die DNA und fluoresziert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zum Anstieg des synthetisierten PCR-Produktes zu. In Tabelle 4 sind sämtliche in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primerpaare aufgelistet.

Nach einer Initialphase von 3 min wurde die cDNA bei 95°C denaturiert und anschließend in 35 – 40 wiederkehrenden Zyklen vermehrt. Ein Zyklus bestand aus der Denaturierung der cDNA für 15 Sek. bei 95°C , der Primerhybridisierung für 30 sec bei $56^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$ und der Elongation für 30 sec bei 72°C . Die Temperatur zur Primerhybridisierung ist primerspezifisch. Der *threshold cycle* gibt den Zyklus an, bei dem zum ersten Mal eine

messbare Fluoreszenz aufgrund der amplifizierten cDNA-Fragmente zu verzeichnen ist. Als Referenzgen wurde das universale und kaum regulierte Enzym der Glykolyse, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet um Variationen in der Ausgangsmenge an RNA auszugleichen. Um eine semi-quantitative Aussage über die Zielgenexpression zu machen, wurde eine Standardreihe von $10^0 - 10^{-9}$ bereits amplifizierter Genfragmente des Ziel- und Referenzgens mitgeführt. Die Menge amplifizierter DNA wird anhand der Standards als *starting quantity* SQ ausgegeben. Die Expression des Zielgens wurde als Quotient SQ Zielgen / SQ Referenzgen angegeben. Als Kontrolle diente in jedem Versuchsansatz eine Probe ohne cDNA, um eventuelle Verunreinigungen aufzudecken. Der Standard 10^0 für Ziel- und Referenzgen wurde generiert aus einer bereits amplifizierten cDNA-Probe, welche erneut eine PCR durchlief und zur Überprüfung der Reinheit und zur Identifikation des Fragments auf ein Agarosegel mit DNA-Standard aufgetragen wurde.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße [bp]
GAPDH	5'-TGG TCT CCT CTG ACT TCA AC-3'	5'-CCT GTT GCT GTA GCC AAA TT-3'	127
CXCL8	5'-CTG AGA GTG ATT GAG AGT GG-3'	5'-ACA ACC CTG TGC ACC CAG TT-3'	113
CCL2	5'-CTT CTG TGC CTG CTG CTC AT-3'	5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GTC-3'	272
CCL4	5'-GCT AGT AGC TGC CTT CTG CTC TCC-3'	5'-CAG TTC CAG CTG ATA CAC GTA CTC C-3'	238
TNF	5'-CAA GCC TGT AGC CCA TGT TG-3'	5'-AGA GGA CCT GGG AGT AGA TG-3'	161

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare.

2.9.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifizierung der generierten DNA-Fragmente wurde 10 µl PCR-Produkt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Anlegen einer Spannung führte zur Auftrennung der Fragmente anhand ihrer Größe.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst, anschließend mit 500 ng/ml Ethidiumbromid versetzt und ausgegossen. Anschließend wurde die Probe mit Ladepuffer vermischt, in die verfestigten Agarosegeltaschen aufgetragen und für ca. 1 h einer Spannung von 100 – 120 V ausgesetzt. Parallel lief ein Marker mit, welcher DNA-Banden im Abstand von 100 bp anzeigte. Daran ließen sich die Probenbanden identifizieren. Nach dem Lauf wurden die Banden unter UV-Licht-Exposition sichtbar gemacht.

2.10 Signalmolekülaktivierung

Die durch die Inkubation und Stimulation der Zellen hervorgerufene Aktivierung von Signalmolekülen wie Kinasen und deren Substrate wurde anhand des *Human Phospho-Kinase Antibody Array* nach Herstellerangaben bestimmt.

Dazu wurden zunächst die in den Proben enthaltenen Proteingehalte anhand der Bradford-Methode ermittelt.

2.10.1.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde 2 µl Zelllysat 1:200 mit ddH₂O verdünnt und mit 100 µl Bio-Rad Protein Assay-Lösung unter kräftigen Vortexen gemischt und in einer 96-well Platte doppelt aufgetragen. Die Protein Assay-Lösung enthält den roten Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau G-250, welcher in saurer Lösung an basische und aromatische Aminosäurereste bindet. Dabei kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm. Der Farbstoff wird blau. Über die Messung der Absorption im Photometer bei 595 nm wurde mit Hilfe einer mitgeführten Standardreihe der Proteingehalt der Probe ermittelt, welche aus Rinderserumalbumin mit einer Endkonzentration von 0 – 16 µg/ml bestand. Es wurde darauf geachtet, dass der Proteingehalt der Probe im Standardbereich lag. Die Berechnung der Proteingehalte erfolgte unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnungen.

2.10.1.2 Bestimmung der Signalmolekülaktivierung mit dem Proteome Profiler™ Array

Unter Verwendung des Verdünnungspuffer *array buffer 1* aus dem *Phospho-Kinase Antibody Array* wurden die Proteingehalte der zu untersuchenden Proben auf den niedrigsten Gehalt angeglichen, um eine Vergleichsgrundlage der *array* Resultate zu gewährleisten. Die Durchführung des *array* erfolgte anhand der Angaben des Herstellers. Das Prinzip des *Proteome Profiler Array* beruht auf der Bindung von phosphorylierten Signalmolekülen der lysierten Proben an membran-gekoppelte Antikörper, welche spezifisch gegen ein bestimmtes Signalmolekül gerichtet sind. Über die Bindung phospho-spezifischer und chemolumineszenz-aktiver Antikörper können die phosphorylierten Proteine als *spots*

„sichtbar“ gemacht werden. Die Fluoreszenzintensität dieser Antikörper wurde anhand der Bestrahlung mit UV-Licht ermittelt. Die Angabe der Phosphorylierung erfolgte anhand der Pixelintensität der gemessenen *spots*.

2.11 Rezeptorexpression auf menschlichen Darmmastzellen

Zur Messung der Expression des Fcε Rezeptor I sowie der Fcγ Rezeptoren FcγI-III auf humanen Darmmastzellen wurden die Zellen mit monoklonalen rezeptorspezifischen Primärantikörpern beladen. Im Durchflusszytometer wurde anhand der Fluoreszenzintensität des gebundenen Sekundärantikörpers die relative Rezeptorexpression bestimmt.

Die Zellen wurden zunächst mit $0,5 - 1 \times 10^5$ Zellen pro Bedingung 2 x mit PBS gewaschen und anschließend in PBS resuspendiert. Die Primärantikörper Maus anti-*human* CD16, Maus anti-*human* CD32, Maus anti-*human* CD64, welche jeweils an FcγRIII, FcγRII, FcγRI binden, wurden mit einer Konzentration von 4 µg/ml hinzugefügt. Um FcεRI zu markieren wurde der monoklonale Primärantikörper Maus anti-*human* 22E7 mit einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet. Er ist gegen die α-Kette des FcεRI gerichtet. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Durch Zugabe von 40 µg/ml Alexa Fluor® 488-markierten Ziege anti-Maus IgG für 30 min bei Dunkelheit wurden die gebundenen Primärantikörper fluoreszenzmarkiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS aufgenommen und bis zur Messung bei Dunkelheit gelagert.

Im Durchflusszytometer wurden die Zellen anhand ihrer morphologischen Eigenschaften und ihrer charakteristischen Proteinstrukturen, den sogen. CD-Oberflächenmarker (engl.: *cluster of differentiation* = CD) differenziert. Dabei passieren die in einem Flüssigkeitsstrom befindlichen Zellen einen Laserstrahl definierter Wellenlänge. Durch die Messung des Vorwärtsstreulichtes wurde die Größe und durch das Seitwärtsstreulicht die Komplexität der Zellen bestimmt. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Alexa Fluor® durch den Laser führte zur Emission von Fluoreszenzlicht höherer Wellenlänge, welches von Photoelektroden registriert wurde. Über die Software FACS Diva™ wurden die gemessenen Signale in digitale Daten umgewandelt und in Form von Histogrammen dargestellt.

2.12 Gewinnung von IgG-Subklassen aus menschlichem Serum

Um den Einfluss allergenspezifischer IgG-Subklassen von Patienten mit und ohne Nahrungsmittelallergie auf Darmmastzellen zu untersuchen, sollten die IgG-Subklassen anhand der Methode nach Soundararajan S *et al.* aus Serum isoliert und aufgereinigt werden [97]. Prinzip der Methode ist die Affinitätschromatographie. Dabei diente eine Protein G Säule zur Isolation von IgG aus menschlichem Serum. Die Aufreinigung der IgG-Subklassen aus dem gewonnenen IgG erfolgte für IgG₃ an einer Protein A Säule und für IgG₂ und IgG₄ entsprechend an präparierten anti-IgG₂ bzw. anti-IgG₄ Säulen. Der Ablauf der Aufreinigung ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

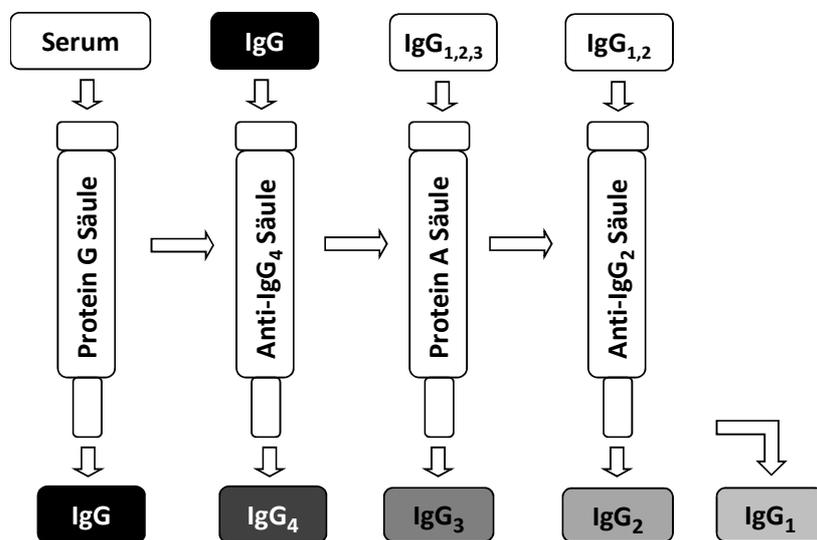


Abbildung 8: Schema zur Aufreinigung von IgG Subklassen aus menschlichem Serum nach Soundarajan *et al.* [96].

2.12.1 Herstellung der anti-IgG₂-/anti-IgG₄-Säulen

Um die IgG-Subklassen IgG₂ und IgG₄ aufzureinigen zu können, wurden anti-IgG₂- bzw. anti-IgG₄-Affinitätssäulen anhand spezifischer Antikörper hergestellt. Das Prinzip beruht auf der Kopplung von anti-IgG₂ bzw. anti-IgG₄ an ein geeignetes Säulenmaterial. Nicht besetzte Bindungsplätze wurden mit Tris-Puffer blockiert um die Bindung unerwünschter Serumverbindungen zu verhindern.

Hierfür wurden zunächst 2 mg zu koppelnder Antikörper (monoklonal anti-IgG₄/anti-IgG₂) in ein 2 ml Eppendorf *tube* überführt. Der Antikörper lag in einer Konzentration von 1 mg/ml

Boratpuffer vor. Diesem wurde 50 mg Säulenmaterial, bestehend aus Polyacrylamid Agaroseharz in Form von *beads* zugegeben. Der Zusatz von 20 % Natriumcitrat diente der Verbesserung der Anti-Antikörper-Bindung. Das *tube* wurde anschließend für 1 h im Intelli-Mixer bei RT geschwenkt. Dabei wurde das *tube* langsam mit 5 U/min rotiert. Nach dem Zentrifugieren bei 1200 g für 10 min wurde der Überstand entfernt, 1 ml Tris-Puffer hinzugefügt und die Beads mit den Antikörpern ebenfalls für 2 h bei RT geschwenkt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C verwahrt. Er diente der Bestimmung des Anteils an ungebundenem Antikörper. Tris-Puffer sorgte für die Belegung nicht besetzter Bindungsplätze. Anschließend wurden die *beads* abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde sanft in PBS resuspendiert und für 15 min im Schüttler gespült. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Pellet in NaCl-Puffer aufgenommen und für weitere 15 min im Schüttler geschwenkt. NaCl diente dazu ungebundenes Protein zu entfernen. Das *tube* wurde im Anschluss 2 x mit PBS für 15 min im Schüttler gewaschen. Das erhaltende Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und in eine Zentrifugen Säule überführt, welche zuvor mit Glycin-Puffer gespült wurde. Die Säule wurde verschlossen und bei 4°C gelagert.

2.12.2 Affinitätschromatographie zur Gewinnung der IgG-Subklassen

Die IgG-Subklassen wurden in folgender Reihenfolge aus menschlichem Serum aufgereinigt: IgG, IgG₄, IgG₃, IgG₂ und IgG₁. Zur Etablierung der Methode nach Soundararajan *et al.* wurden zunächst Seren von gesunden Probanden verwendet, um daraus die IgG-Subklassen aufzureinigen. Blut wurde in einer Serum Gel Monovette mit 9 ml Fassungsvermögen abgenommen und bei 3000 U/min für 15 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in mehrere Eppendorf *tubes* überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Zur weiteren Aufreinigung wurden dann zwei Seren verwendet, die einen vergleichsweise hohen Gehalt an IgG₄ aufwiesen. Die IgG₄-Subklasse stellte aufgrund ihrer geringen Konzentration im Blut den kritischen Faktor während der Aufarbeitung dar. Zur Aufreinigung der IgG-Subklassen aus dem Serum wurde zunächst der pH Wert anhand des pH Indikatorpapiers überprüft und ggf. mit 0.15 M Glycin-Lösung auf einen pH von 7.0 -8.0 eingestellt. Dies gewährleistet eine optimale Bindung des IgGs an die aus Protein G bestehende Säulenmatrix und verhindert das Ausfallen von im Serum enthaltenen Salzen. Im

Material und Methoden

Anschluss wurde das Serum durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und mit 0,02 % Natriumazid versetzt, um eine Kontamination der Probe zu vermeiden. Das filtrierte Serum wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Aufreinigung von IgG erfolgte an der 1 ml Protein G Säule von GE Healthcare. Das Protein G wird von Streptokokken der Gruppe G gebildet und besitzt die Eigenschaft, IgG mit hoher Affinität zu binden. Bevor die Protein G Säule zur Isolation eingesetzt werden konnte, wurde der zur Lagerung enthaltene 70%ige Ethanol durch mehrmaliges Spülen mit ddH₂O entfernt. Ethanol diente dazu die Säulenmatrix vor dem Austrocknen und einer Kontamination zu schützen. Dabei wurde das Wasser mit einer 2 ml Einmalspritze (B. Braun) aufgezogen, diese auf die Säule gesteckt und das ddH₂O mit sanftem Druck von Hand in die Säule gepresst. Diese Form der Einbringung von Flüssigkeiten in die Säule galt für sämtliche Arbeitsschritte an den verwendeten Säulen, wobei eine maximale Fließgeschwindigkeit von ca. 1 ml/min eingehalten wurde. Die Säulenmatrix wurde anschließend durch Spülen mit 0.15 M Glycin-Lösung, pH 7.0 auf den Probenauftrag vorbereitet. Um die Probe aufzufangen, wurden mehrere Eppendorf *tubes* unter der Säule bereitgestellt und mit einer basischen 1 M Tris-HCl-Lösung, pH 9.0 mit ca. 70-90 µl Tris-HCl-Lösung / 1 ml Eluat vorgelegt. Die Probe wurde aufgetragen und mit neutraler 0.15 M Glycin-Lösung, pH 7.0 gewaschen, um Unreinheiten und ungebundenes Material zu entfernen. Die Elution des gebundenen IgG von der Säulenmatrix erfolgte mit ca. 10 ml saurer 0,1 M Glycin-HCl-Lösung, pH 2.7. Das aufgefangene saure Eluat wurde sofort mit der basischen Tris-HCl-Lösung gemischt um ein Ausfallen der Proteine zu vermeiden. Die Neutralisation wurde ggf. mit pH Indikatorpapier überprüft, der pH sollte bei 7.0 -8.0 liegen. Die Säule wurde zügig mit neutraler 0.15 M Glycin-Lösung, pH 7.0 gespült und in Ethanol bei 4°C verwahrt. Die erhaltenen Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C verwahrt.

Zunächst wurden die Proteingehalte sämtlicher Fraktionen der IgG-Isolation anhand der Bradford Methode gemessen. Dies diente der Bestimmung des Proteingehalts in den IgG-enthaltenden Eluat sowie der Überprüfung der Reinigung der Säule. Das Eppendorf *tube* der eluierten Fraktion mit dem höchsten Proteingehalt wurde zur weiteren Auftrennung von IgG in die einzelnen Subklassen verwendet, da hier die Subklassen in Menge und Konzentration maximal vorliegen.

Der nächste Schritt der IgG-Subklassen-Aufreinigung bestand in der Isolation von IgG₄, da es den geringsten Anteil an den IgG-Subklassen im Serum ausmacht. Hierzu wurden Eppendorf

tubes mit 1 M Tris-Lösung, pH 8.0 vorgelegt. Das Eluat aus der IgG-Isolation mit dem höchsten Proteingehalt wurde auf die Anti-IgG₄ Säule aufgetragen und analog zum Vorgehen an der Protein G Säule gewaschen, eluiert und gereinigt. Die Eluate sollten nach dem Mischen mit 1 M Tris-Lösung einen pH von 7.0 – 8.0 aufweisen. Der Durchfluss wurde in mehreren Eppendorf *tubes* aufgefangen und zusammen mit den Eluaten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Säule wurde in PBS bei 4°C gelagert.

Im Folgenden erfolgte die Aufreinigung von IgG₃ aus dem Durchfluss, welcher bei der Gewinnung von IgG₄ erhalten wurde. Über die Bradford Methode wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinmenge bestimmt wurde. IgG₃ wurde an der Protein A Säule eluiert. Protein A ist ein Zellwandprotein des Bakterienstammes *Staphylococcus aureus*. Es besitzt die Eigenschaft, IgG mit hoher Affinität zu binden, mit Ausnahme von IgG₃. Dieser Umstand wird bei der Abtrennung von IgG₃ von den noch verbliebenen IgG-Subklassen IgG₂ und IgG₁ ausgenutzt. Zusätzlich weist Protein A eine hohe pH Stabilität auf. Die Protein A Säule wurde zunächst mit ddH₂O und dann mit 0.15 M Glycin-Lösung, pH 7.0 gewaschen, um enthaltenen Ethanol zu entfernen und eine optimale Voraussetzung zur Bindung von IgG₃ zu gewährleisten. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 0.15 M Glycin plus 0.5 M NaCl, pH 7.0 gespült und der Durchfluss à 1 ml aufgefangen. Er enthielt IgG₃. Die gebundenen IgG-Antikörper wurden über die Erniedrigung des pH-Wertes der sauren Lösung 0.15 M Glycin plus 0.5 M NaCl, pH 3.0 eluiert und in mit Tris-HCl, pH 8.0 gefüllten Eppendorf *tubes* aufgefangen. Die Eluate sollten noch IgG₁ und IgG₂ enthalten. Für die Auftrennung dieser beiden IgG-Fraktionen wurde die Anti-IgG₂-Säule eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte analog zur Isolation von IgG₄. Im Eluat sollte sich nun IgG₂ befinden, während IgG₁ im Durchfluss war. Die gewonnenen Fraktionen wurden bei -20°C verwahrt.

2.12.3 Bestimmung der Reinheit der IgG-Subklassen-Fraktionen

Die Überprüfung der Reinheit der per Affinitätschromatographie aufgereinigten IgG-Subklassen erfolgte anhand des *Human IgG Subclass Profile* ELISA von Invitrogen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die unteren Nachweisgrenzen lagen für die Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ in gleicher Reihenfolge bei 0,43; 0,17; 0,042; 0,024 µg/ml. Die Verdünnung der Proben erfolgte anhand des enthaltenen *diluent buffer* und wurde bei der Auswertung der IgG-Subklassen Konzentrationen berücksichtigt.

2.13 Statistik

Die Ergebnisse wurden in Form des Mittelwertes \pm Standardfehler dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden anhand des gepaarten zweiseitigen t-Tests berechnet und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von IgG-Subklassen auf die Mastzellaktivierung

Neben der bedeutendsten Aktivierung von Mastzellen über die Quervernetzung von an FcεRI-gebundenem IgE, kann eine Vielzahl weiterer Stimuli die Ausschüttung von Mediatoren bewirken oder beeinflussen. Daten von murinen und menschlichen Mastzellen zeigen, dass die Stimulation von IgG (Fcγ) Rezeptoren allein oder in Kombination mit FcεRI, die Freisetzung von Entzündungsstoffen unterstützen oder hemmen kann. Dies ist auf das Vorhandensein von aktivierenden ITAM bzw. hemmenden ITIM in den einzelnen FcγR zurückzuführen [47, 51, 54, 60]. IgG-Antikörper können die Mastzellstimulation neben der Aktivierung von FcγRIIB auch über das Abfangen von Allergen-spezifischem IgE hemmen, was im Rahmen einer Hyposensibilisierung stattfindet [70].

In den durchgeführten *in vitro* Versuchen wurde untersucht, welchen Einfluss menschliche myeloma IgG-Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ allein bzw. FcεRI-abhängig auf die Freisetzung von Mediatoren in humanen Darmmastzellen ausüben.

3.1.1 Durchführung von Affinitätschromatographie zur Gewinnung von IgG-Subklassen aus menschlichem Serum

Die IgG-Subklassen IgG₁ und IgG₄ werden in der Therapie allergischer Erkrankungen vermehrt gebildet und sind assoziiert mit einem Rückgang der allergischen Symptome und der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz [3, 4]. Ihre Funktion als *blocking antibody* durch Abfangen von Allergenen wird in diesem Zusammenhang diskutiert [70]. IgG-Antikörper können aber auch allergische Reaktionen induzieren oder verstärken [5, 69]. Dabei spielt die Aktivierung von Fcγ Rezeptoren auf Mastzellen eine Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst IgG-Subklassen aus menschlichem Serum isoliert werden. Hierfür wurde die Methode zur Aufreinigung von IgG-Subklassen aus Serum nach Soundararajan *et al.* zu Grunde gelegt [97]. Diese beruht auf der Affinitätschromatographie, wobei IgG mit einer Protein G Säule und IgG₃ mit einer Protein A Säule isoliert werden sollte. Die Isolation von IgG₂ und IgG₄ erforderte die Präparation von Anti-IgG₂- und Anti-IgG₄-Säulen. Die Ergebnisse der

Ergebnisse

Affinitätschromatographie sind in Tabelle 5 dargestellt. Dabei konnte die gewünschte Reinheit der Subklassen-Fractionen von mindestens 95 % nicht erreicht werden. Es erfolgte lediglich eine Anreicherung der IgG-Subklassen mit 80 % für IgG₁, 42 % für IgG₂, 13 % für IgG₃ und 10 % für IgG₄.

		IgG-Subklassen Fraktionen				
	Serum [mg/l]	IgG [mg/l]	IgG₁ [mg/l]	IgG₂ [mg/l]	IgG₃ [mg/l]	IgG₄ [mg/l]
IgG₁	10835	15920	154	1,9	0,7	640
IgG₂	3900	2895	31	1,6	3,3	122
IgG₃	730	735	4	0,2	0,6	32
IgG₄	470	370	0	0,1	0,1	72

Tabelle 5: Reinheit der IgG-Subklassen-Fractionen: Anteil der IgG-Subklassen in den IgG-Subklassen-Fractionen IgG₁₋₄ in mg/l. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Aufreinigung von zwei Probandenseren.

3.1.2 Expression von Fcγ Rezeptoren und FcεRI auf Darmmastzellen

Um den Einfluss der IgG-Subklassen auf menschliche Darmmastzellen zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von FcεRI und der Fcγ Rezeptoren FcγRI, FcγRII und FcγRIII auf diesen Zellen bestimmt. Die Kultivierung der Darmmastzellen erfolgte mit dem Wachstumsfaktor SCF in Kombination mit dem TH1-Zytokin IFN-γ sowie SCF in Kombination mit IL-4. Dies hat den Hintergrund, dass IFN-γ in menschlichen aus peripherem Blut hergeleiteten Mastzellen den aktivierenden FcγRI induziert, so dass diese Mastzellen durch IgG-Stimulation degranulieren [5, 54]. Als Anhaltspunkt für den Einsatz von 100 ng IFN-γ/ml, dienten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit IFN-γ auf das Proliferationsverhalten intestinaler Mastzellen [98]. IL-4 ist ein wesentlicher Mastzellregulator und verstärkt in Kombination mit SCF die Mastzellproliferation und die IgE-abhängige Mediatorfreisetzung in humanen Darmmastzellen [27, 99, 100]. Für die Messung der Rezeptorexpression wurden die Zellen mit Maus anti-human CD16

Ergebnisse

(Fc γ RIII), anti-*human* CD32 (Fc γ RII) und anti-*human* CD64 (Fc γ RI) sowie einem Antikörper gegen Fc ϵ RI (22E7) beladen und über einen fluoreszenz-gekoppelten anti-Maus IgG-Antikörper markiert. Die Fluoreszenzintensität wurde im Durchflusszytometer bestimmt und ist ein Maß für die Rezeptorexpression.

In Abbildung 9 ist gezeigt, dass humane Darmmastzellen unter beiden Kulturbedingungen SCF+IFN- γ und SCF+IL-4 wie erwartet Fc ϵ RI exprimierten (A,E). Mastzellen, die mit IFN- γ kultiviert wurden, trugen auch Fc γ RI und Fc γ RII auf ihrer Oberfläche (B,C). Fc γ RIII konnte dagegen nicht detektiert werden (D). Auf Darmmastzellen, die mit IL-4 kultiviert wurden, wurde kein Fc γ R exprimiert (F-H).

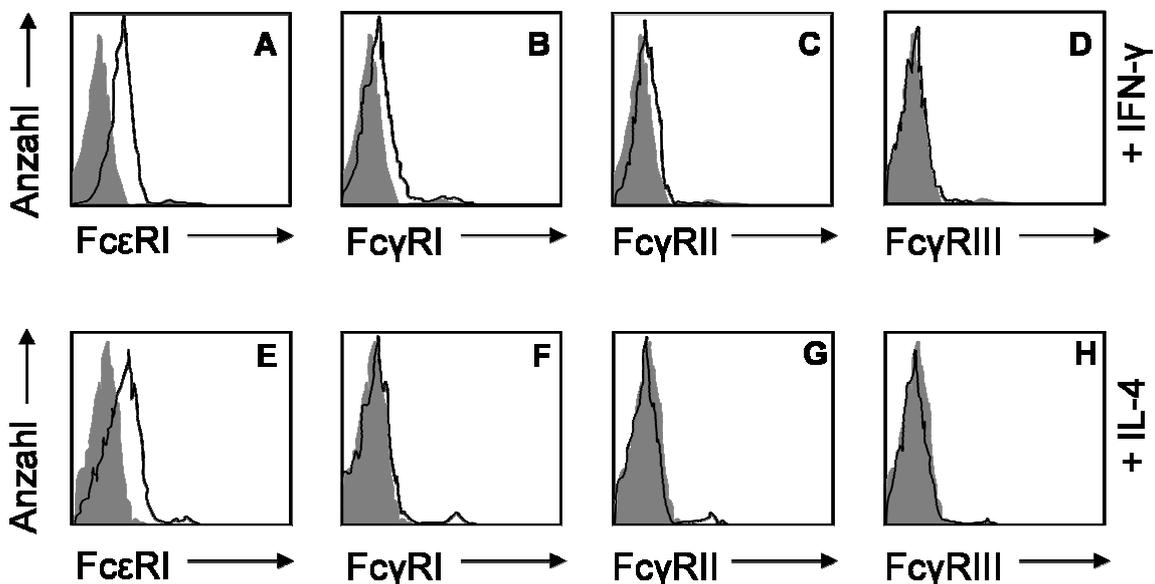


Abbildung 9: Expression von Fc ϵ RI und Fc γ RI,II,III auf humanen Darmmastzellen. Menschliche Darmmastzellen wurden zusätzlich zu SCF für 48 h mit IFN- γ (+IFN- γ) oder für 10 Tage mit IL-4 (+IL-4) kultiviert. Die Messung der Rezeptoren erfolgte mit den Antikörpern: anti-*human* CD16 (Fc γ RIII), anti-*human* CD32 (Fc γ RII), anti-*human* CD64 (Fc γ RI) bzw. anti-*human* Fc ϵ RI.

3.1.3 Mediatorfreisetzung in Darmmastzellen über Fc γ R/Fc ϵ R-Aktivierung

In Mastzellen, die aus CD34 positiven peripheren Blutzellen hergeleitet wurden, führte die Kultivierung mit IFN- γ zur Hochregulation von Fc γ RI [5]. Die anschließende Stimulation mit monomerem IgG₁ über die Aktivierung von Fc γ RI bewirkte die Freisetzung von β -Hexosaminidase sowie die Bildung von PGD₂, LTC₄ und TNF [5]. Die Stimulation mit IgG₂, IgG₃ und IgG₄ führte in diesen Mastzellen zu keiner Aktivierung. Die Aggregation von humanen Fc γ RII bewirkte keine Freisetzung von Histamin, Fc γ RIII ist auf humanen Mastzellen nur schwach vorhanden [101].

Um den Einfluss der IgG-Subklassen auf humane Darmmastzellen zu testen, wurden Darmmastzellen zunächst mit IFN- γ inkubiert, da die durchflusszytometrischen Analysen die Induktion von Fc γ RI und Fc γ RII durch IFN- γ auf humanen Darmmastzellen belegten. Im Vergleich wurden Darmmastzellen untersucht, welche mit IL-4 zusätzlich zu SCF kultiviert wurden. Für die Stimulation wurden humane Mastzellen mit menschlichen myeloma IgG₁-IgG₄ oder zum Vergleich mit myeloma IgE beladen. Die Stimulation erfolgte jeweils über Maus-anti *human* IgG₁-IgG₄ bzw. Hase anti-*human* IgE. Wie in Abbildung 10 dargestellt, bewirkten die IgG-Subklassen sowohl in den mit IFN- γ (A), als auch in den mit IL-4 (B) kultivierten menschlichen Mastzellen keine Induktion der Freisetzung an gespeicherter β -Hexosaminidase. Dargestellt ist der Anteil der freigesetzten β -Hexosaminidase im Vergleich zum Gesamtgehalt an β -Hexosaminidase in den Zellen. Dem gegenüber setzten über IgE-stimulierte Mastzellen nach IFN- γ -Kultur 25 ± 20 % (A) und nach IL-4-Kultur 35 ± 19 % (B) β -Hexosaminidase frei. Die Ergebnisse zeigen, dass IgG₁ im Gegensatz zu Mastzellen, welche aus CD34 positiven Blutzellen abgeleitet wurden, in humanen Darmmastzellen keine Mediatorfreisetzung bewirkte.

Um den Effekt der IgG-Subklassen auf die IgE-abhängige Mediatorfreisetzung zu untersuchen, wurden die Mastzellen gleichzeitig zu den einzelnen IgG-Subklassen mit IgE beladen und anschließend zeitgleich über die spezifischen Antikörper kreuzvernetzt. Die freigesetzte Menge an gespeicherter β -Hexosaminidase und *de novo* synthetisiertem LTC₄ wurde bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. In mit IFN- γ kultivierten Darmmastzellen konnte eine nicht signifikante Verringerung der Ausschüttung von β -Hexosaminidase und LTC₄ durch IgG₁, IgG₂ und IgG₄ beobachtet werden (A,C). Die Menge an LTC₄ aus diesen mit IgE stimulierten Zellen lag bei 137 ± 156 ng/10⁶ Zellen (C). IgG₃ wies im Vergleich zur Stimulation mit IgE allein keine

Ergebnisse

Veränderung in der Freisetzung an β -Hexosaminidase und LTC₄ auf. In mit IL-4 kultivierten Mastzellen blieb die Freisetzung sowohl von gespeicherter β -Hexosaminidase, als auch von *de novo* synthetisiertem LTC₄ durch die Behandlung mit den IgG-Subklassen gegenüber den Zellen, die nur über Fc ϵ RI aktiviert wurden, unverändert (B,D). Der freie Gehalt an LTC₄ lag hier in den mit IgE stimulierten Zellen bei 109 ± 81 ng/10⁶ Zellen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die vier IgG-Subklassen keine signifikante Veränderung der Fc ϵ RI-vermittelten Reaktion in menschlichen Darmmastzellen zur Folge hatten.

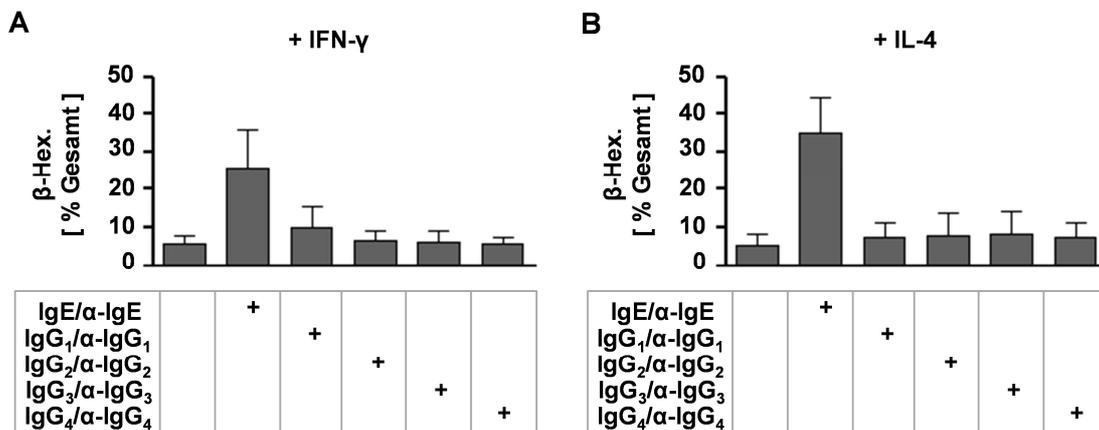


Abbildung 10: Freisetzung von β -Hexosaminidase (β -Hex.) in IgG₁-, IgG₂-, IgG₃- und IgG₄-abhängig stimulierten Darmmastzellen. Humane Darmmastzellen wurden zusätzlich zu SCF mit IFN- γ (+ IFN- γ) für 48 h (A) oder mit IL-4 (+ IL-4) für 10 Tage (B) behandelt. Die Stimulation der Mastzellen erfolgte durch Beladung mit IgE, IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄ und anschließender Stimulierung mit anti-*human* IgE, anti-*human* IgG₁, anti-*human* IgG₂, anti-*human* IgG₃ und anti-*human* IgG₄. n=6

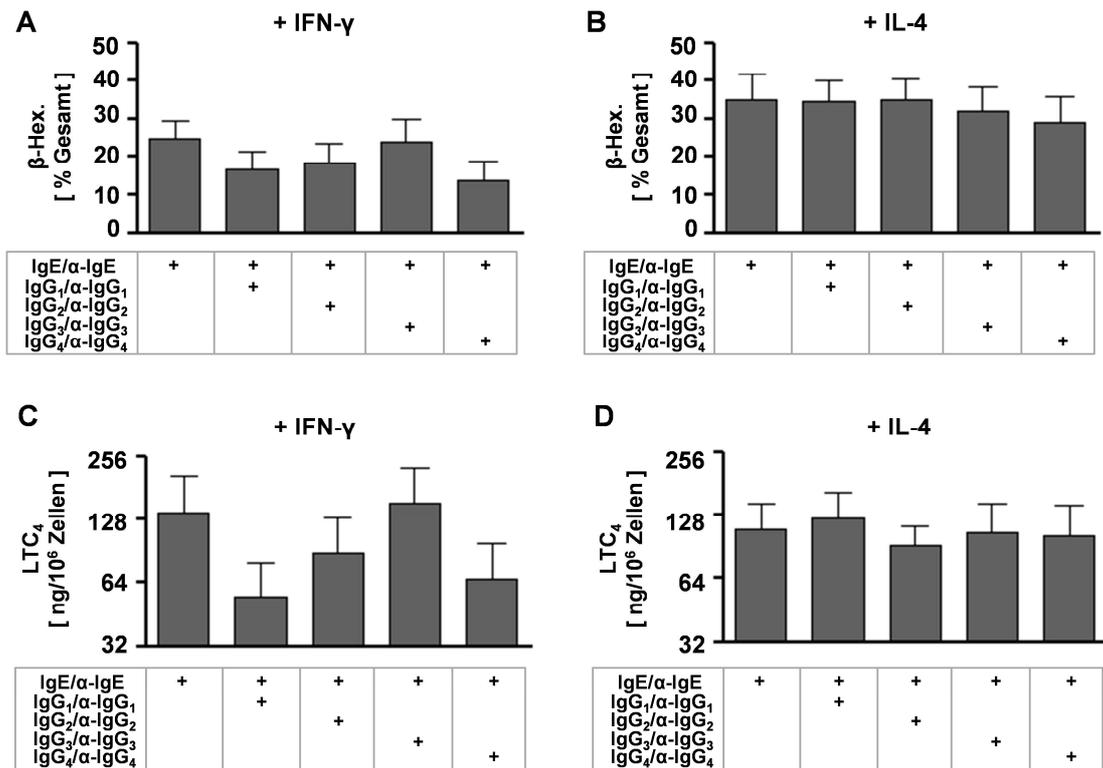


Abbildung 11: Mediatorfreisetzung in Darmmastzellen nach IgE und IgG₁-, IgG₂-, IgG₃- oder IgG₄-abhängiger Kostimulation. Humane Darmmastzellen wurden mit SCF und IFN-γ (+ IFN-γ) für 48 h oder mit SCF und IL-4 (+ IL-4) für 10 Tage behandelt. Die Stimulation der Mastzellen erfolgte durch Kombination von IgE und IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄ und anschließender Aktivierung mit anti-human IgE und anti-human IgG₁, anti-human IgG₂, anti-human IgG₃ oder anti-human IgG₄. Die Freisetzung von β-Hexosaminidase (β-Hex.) und LTC₄ mit IFN-γ kultivierten Mastzellen (A, C) und mit IL-4 kultivierten Mastzellen (B, D) ist gezeigt. n=6

3.2 Einfluss von Arginin und Glutamin auf die Mastzellaktivierung

Die immunregulierende Wirkung der Aminosäuren Arginin und Glutamin ist seit langen bekannt und führte bereits zum Teil zum erfolgreichen klinischen Einsatz bei schweren traumatischen und infektiösen Erkrankungen. Während sich Glutamin im Tiermodell hemmend auf die Entwicklung einer Darmentzündung auswirkte, konnte diese Wirkung im Menschen *in vivo* bisher nicht bestätigt werden [77]. Jedoch zeigten *in vitro* Studien an menschlichen Darmbiopsien einen anti-inflammatorischen Effekt von in pharmakologischen Dosen eingesetztem Glutamin und dies insbesondere in Kombination mit Arginin. Die Kombination beider Aminosäuren führte zu reduzierten Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, CXCL8 und TNF und erhöhten den Gewebespiegel an anti-inflammatorischem IL-10 [81, 102]. In den folgenden Versuchen

untersuchten wir den Effekt pharmakologischer Dosen von Arginin und Glutamin auf die IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung in menschlichen Darmmastzellen. Mastzellen im Darm sind neben ihrer zentralen Rolle in allergisch-vermittelten Erkrankungen auch in Entzündungsgeschehen wie CED involviert [9, 103].

3.2.1 Arginin und Glutamin beeinflussen nicht die Zellvitalität von RBL-2H3 Zellen

Um einen zelltoxischen Effekt von pharmakologischen Konzentrationen an Arginin und Glutamin auszuschließen, wurde die Zellvitalität anhand der *xCELLigence* Technologie ermittelt. Dabei messen Elektroden am Boden von Kulturplatten den elektrischen Widerstand aufgrund von anhaftenden Zellen. Tote Zellen lösen sich vom Boden und verringern den elektrischen Widerstand. Für die durchgeführten Versuche wurde die adhärenzte Mastzelllinie RBL-2H3 verwendet. Diese Zellen wurden aus basophilen Leukämiezellen generiert und weisen eine hohe Teilungsrate sowie morphologische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit Mastzellen auf.

Die Zellen wurden in Kulturmedium in die speziellen *E plates* für 24 h kultiviert. Nach der kompletten Entnahme des Kulturmediums erfolgte die Applikation von frischem SILAC Medium, welches die verschiedenen Aminosäuren in folgenden Konzentrationen enthielt: physiologisch: Arginin 0,1 mM/l (Arg^{phys}) und Glutamin 0,6 mM/l (Gln^{phys}), pharmakologisch: Arginin 2 mM/l (Arg^{phar}) und Glutamin 10 mM/l (Gln^{phar}), entsprechend den Dosen im Kulturmedium: Arginin 1,15 mM/l (Arg^{med}) und Glutamin 2,06 mM/l (Gln^{med}). Als Vergleich dienten RBL-2H3 Zellen, welche mit frischem Kulturmedium versorgt worden. In Abbildung 12 ist das Zellverhalten in Abhängigkeit von der Zeit erfasst. Deutlich sichtbar war die Zunahme des Elektrischen Widerstandes innerhalb der ersten 10 h, in denen die Zellen adhärtierten. Nach ca. 18 h stieg der elektrische Widerstand gleichmäßig aufgrund von Zellteilung an. Das Zellsterben durch Platz- und Nährstoffmangel setzte nach ca. 45 h ein. Lediglich bei den RBL-2H3 Zellen, welche ausschließlich in SILAC Medium ohne Arginin, Glutamin und Lysin kultiviert wurden, verringerte sich wie erwartet der elektrische Widerstand bereits ab dem Zeitpunkt des Einsatzes von SILAC Medium. Ein Indiz für das Absterben dieser Zellen. Arginin und Glutamin sind lebensnotwendig für die Zellen.

Ergebnisse

Toxische Effekte durch pharmakologische Konzentrationen an Arginin und Glutamin konnten nicht festgestellt werden.

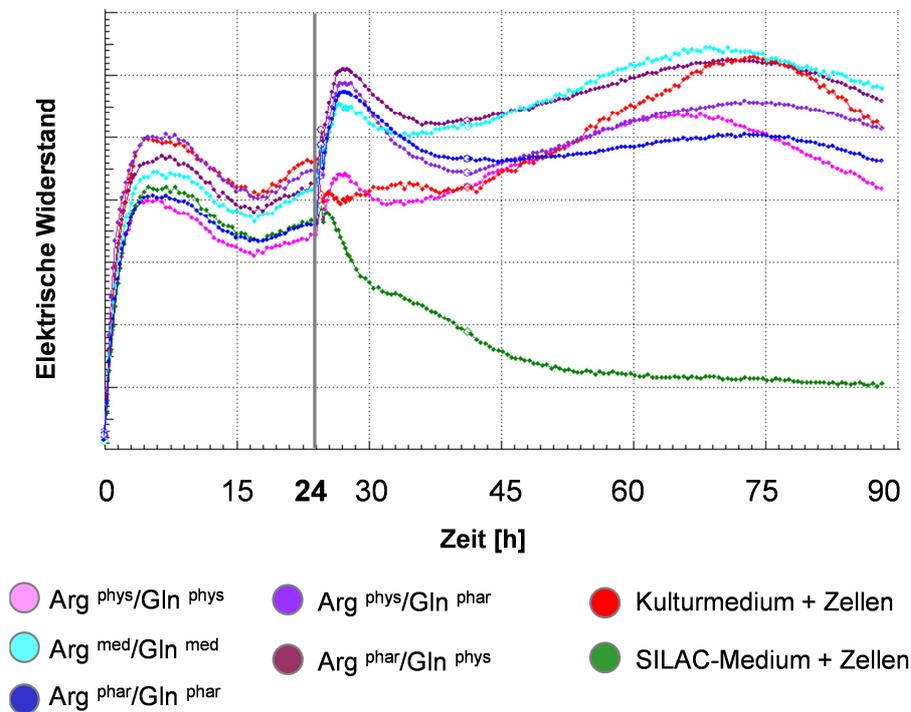


Abbildung 12: Messung der Zellvitalität in mit Arginin und Glutamin behandelten Zellen. RBL-2H3 Zellen wurden in speziellen, mit Elektroden ausgestatteten *E-plates* ausgesät. Durch Anlegen eines Stromflusses kann der elektrische Widerstand aufgrund anhaftender Zellen gemessen werden. Nach 24 h erfolgte die Zugabe der Aminosäuren in folgenden Konzentrationen: physiologisch: Arginin 0,1 mM/l (Arg^{phys}) und Glutamin 0,6 mM/l (Gln^{phys}); pharmakologisch: Arginin 2 mM/l (Arg^{phar}) und Glutamin 10 mM/l (Gln^{phar}); Konzentration im Kulturmedium: Arginin 1,15 mM/l (Arg^{med}) und Glutamin 2,06 mM/l (Gln^{med}).

3.2.2 Arginin und Glutamin senken die β -Hexosaminidase-Freisetzung in RBL-2H3 Zellen

Für die durchgeführten Versuche wurden konfluente RBL-2H3-Zellen für 18 h mit pharmakologischen Konzentrationen an Arginin (2 mM/l) und Glutamin (10 mM/l) gegenüber physiologischen Konzentrationen beider Aminosäuren inkubiert (entsprechend 0,1 bzw. 0,6 mM/l). Um einen Effekt des SILAC-Mediums auf die Mastzellaktivierung auszuschließen, wurden RBL-2H3-Zellen mit Kulturmedium (KM)-spezifischen kombinierten Dosen an Arginin (1,15 mM/l) und Glutamin (2,06 mM/l) ($\text{Arg}^{\text{med}}/\text{Gln}^{\text{med}}$) in SILAC-Medium über Nacht kultiviert und mit RBL-2H3 Zellen, welche in Kulturmedium gehalten wurden, verglichen. Wie in Abbildung 13 gezeigt, lag die Freisetzung an β -Hexosaminidase unter Einsatz von physiologischen

Ergebnisse

Konzentrationen an Arginin und Glutamin in mit DNP-spezifischem IgE/DNP stimulierten RBL-2H3-Zellen bei 50 ± 14 %. Pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin verringerten diese Freisetzung von β -Hexosaminidase um 23 ± 33 %. Der Einsatz von SILAC-Medium zeigte keinen Einfluss auf die Mediatorfreisetzung. Interessanterweise senkten pharmakologische Dosen beider Aminosäuren die Ausschüttung von β -Hexosaminidase gegenüber den Konzentrationen an Arginin und Glutamin wie im Kulturmedium ($\text{Arg}^{\text{med}}/\text{Gln}^{\text{med}}$) um 29 ± 26 %. Im Kulturmedium betrug der Anteil an Arginin 1/2 und an Glutamin 1/5 des Mediums mit pharmakologischen Dosen der beiden Aminosäuren.

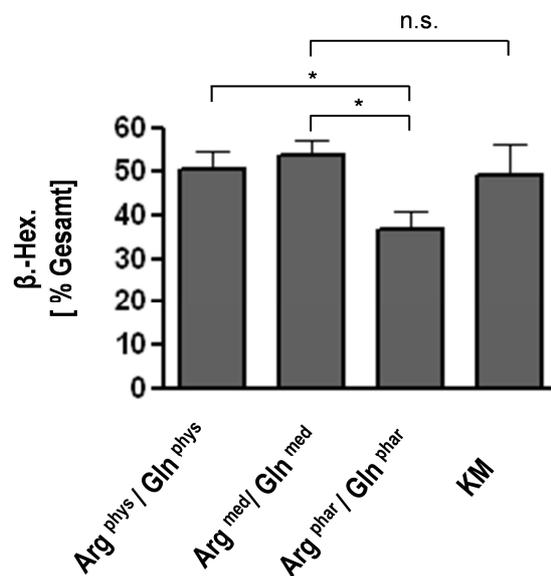


Abbildung 13: Freisetzung an β -Hexosaminidase (β -Hex.) in RBL-2H3 Zellen. Die Zellen wurden über Nacht mit physiologischen (entsprechend 0,1 mM/l bzw. 0,6 mM/l) ($\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$) versus pharmakologischen (entsprechend 2 mM/l bzw. 10 mM/l) ($\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$) Konzentrationen an Arginin und Glutamin inkubiert und mit DNP-spezifischem IgE/DNP aktiviert. Der Einfluss des SILAC-Mediums wurde überprüft durch Verwendung von Arginin und Glutamin in Konzentration, wie sie im Kulturmedium (KM) vorliegen ($\text{Arg}^{\text{med}}/\text{Gln}^{\text{med}}$) (entsprechend 1,15 mM/l bzw. 2,06 mM/l). (n=6), n.s. bedeutet keine signifikante Differenz, * gibt eine signifikante Differenz an ($P < 0,05$).

3.2.3 Arginin und Glutamin reduzieren die Leukotrien C_4 -Ausschüttung in mit IgE-stimulierten Darmmastzellen

Aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs, wurde der Effekt von pharmakologischen Konzentrationen versus physiologischen Konzentrationen an Arginin und Glutamin auf die Freisetzung gespeicherter β -Hexosaminidase und *de novo* synthetisiertem LTC_4 auf mit IgE-stimulierten humanen Darmmastzellen untersucht.

Ergebnisse

Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die IgE-abhängige Mediatorfreisetzung in Gewebsmastzellen durch IL-4 deutlich erhöht wird [27, 28, 99]. Der Effekt von Arginin und Glutamin wurde daher auf menschlichen Darmzellen untersucht, welche mit SCF sowie mit SCF und IL-4 kultiviert wurden. Diese erhielten über Nacht kombinierte pharmakologische Konzentrationen an Arginin und Glutamin ($\text{Arg}^{\text{pharm}}/\text{Gln}^{\text{pharm}}$). Als Kontrolle wurden Mastzellen mit physiologischen Konzentrationen an Arginin und Glutamin ($\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$) unter gleichen Kulturbedingungen verwendet.

In Abbildung 14 ist dargestellt, dass kombinierte pharmakologische Konzentrationen an Arginin und Glutamin die Ausschüttung an LTC_4 aus mit SCF kultivierten Darmmastzellen um $40 \pm 15 \%$ sowie aus SCF und IL-4 kultivierten Darmmastzellen um $40 \pm 22 \%$ im Vergleich zum physiologischen Einsatz beider Aminosäuren senkten (B). Die Freisetzung an β -Hexosaminidase wurde durch die Anwendung von pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin nicht beeinflusst (A).

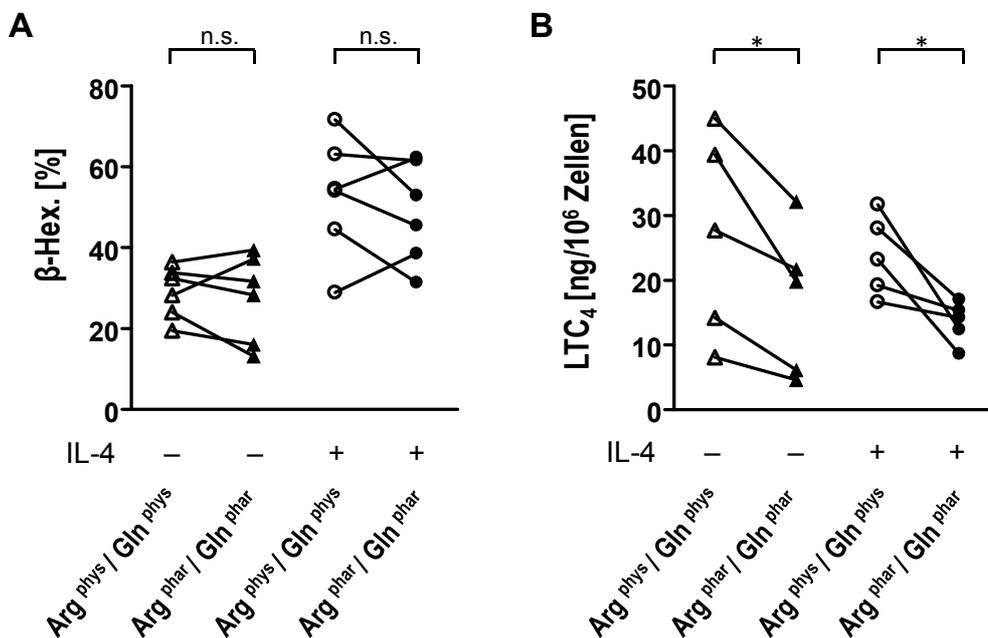


Abbildung 14: IgE-vermittelte Freisetzung an gespeicherter β -Hexosaminidase (β -Hex.) (A) und neu synthetisiertem LTC_4 (B) in menschlichen Darmmastzellen nach Inkubation mit Arginin (Arg) und Glutamin (Gln). Mastzellen, nach Kultur mit SCF allein und in Kombination mit IL-4, wurden für 18 h mit physiologischen Dosen an Arginin und Glutamin (entsprechend 0,1 mM/I und 0,6 mM/I) ($\text{Arg}^{\text{phys}}/\text{Gln}^{\text{phys}}$) gegenüber pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin (entsprechend 2 mM/I und 10 mM/I) ($\text{Arg}^{\text{phar}}/\text{Gln}^{\text{phar}}$) inkubiert und mit IgE und anti/IgE für 90 min stimuliert. (n=4-5); n.s. zeigt keine und * gibt eine signifikante Differenz ($P < 0,05$) an.

3.2.4 Arginin und Glutamin verringern die Zytokinexpression in mit IgE-stimulierten Darmmastzellen

Im Folgenden wurde der Einfluss von pharmakologischen Konzentrationen von Arginin und Glutamin auf die FcεRI-vermittelte Induktion von Zytokinen in Darmmastzellen untersucht.

Mastzellen synthetisieren eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen. Die hier untersuchten Zytokine/Chemokine CCL2, CCL4, CXCL8 sowie TNF wurden ausgewählt, da sie zum einen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen [9, 103, 104]. Zum anderen zeigen vorangegangene Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, dass diese Chemokine von menschlichen Darmmastzellen nach FcεRI-Kreuzvernetzung induziert bzw. gebildet und freigesetzt werden [28, 105]. Trigger wie SCF und IL-4 können die Ausschüttung an Zytokinen deutlich anheben [27, 48].

In den Abbildung 15 und 16 ist dargestellt, dass die Expression der untersuchten proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL4 und CXCL8 und des Zytokins TNF in mit SCF und IL-4 kultivierten Darmmastzellen sich signifikant verringerte durch die Inkubation mit kombinierten hohen Dosen an Arginin und Glutamin im Vergleich zu physiologischen Mengen beider Aminosäuren. Die Induktion von CCL2 reduzierte sich um 56 ± 23 % (15A,16A), während die Expression von CCL4 um 56 ± 28 % (15B,16B) und die von CXCL8 um 58 ± 36 % (15C,16C) zurückging. Die Induktion des Zytokins TNF war um 46 ± 34 % (15D,16D) vermindert durch die Behandlung mit kombinierten pharmakologischen Konzentrationen an Arginin und Glutamin. Mastzellen, welche nur mit SCF kultiviert wurden, reagierten mit Ausnahme für TNF, nicht auf pharmakologische Konzentrationen an Arginin und Glutamin (15A-D).

Zur Untersuchung der Wirkung von pharmakologischen Dosen der einzelnen Aminosäure wurden menschlichen Darmmastzellen mit SCF und IL-4 kultiviert und über IgE/anti-IgE stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Die Anwendung von pharmakologischen Dosen an Glutamin bewirkte die Reduktion der vier untersuchten Zytokine, jedoch nicht signifikant (16A-D). Hingegen zeigte Arginin in pharmakologischen Dosen keinen eindeutigen Effekt auf die Zytokinexpression (16A-D).

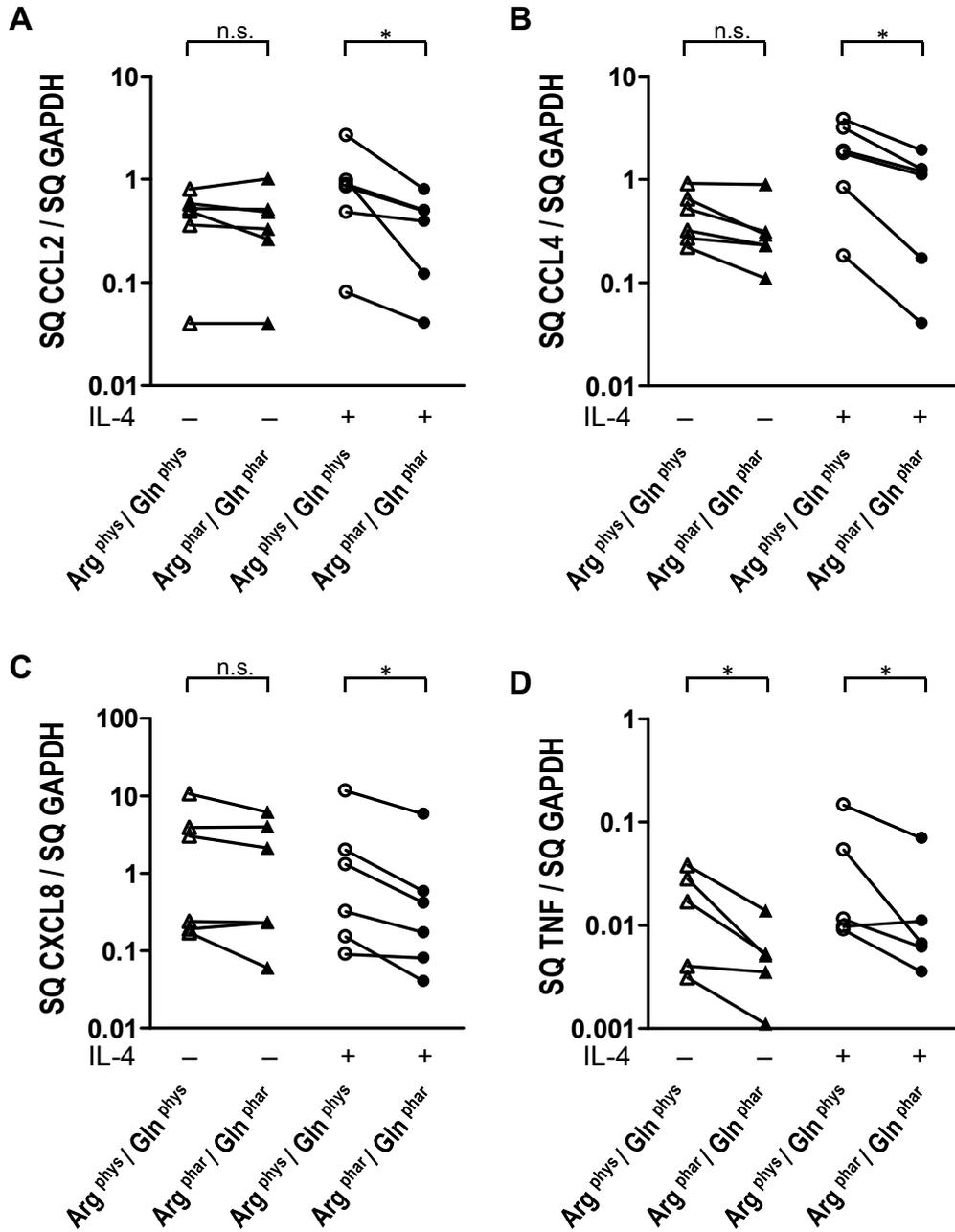


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von CCL2 (A), CCL4 (B), CXCL8 (C) und TNF (D) in menschlichen Darmmastzellen. Die Mastzellen wurden kultiviert mit SCF ohne IL-4 (-) sowie in Kombination mit IL-4 (+) für 10 Tage und für 18 h mit physiologischen (phys) Dosen von Arginin (Arg) und Glutamin (Gln) (entsprechend 0,1 mM/l und 0,6 mM/l) gegenüber pharmakologischen (phar) Dosen an Arginin und Glutamin (entsprechend 2 mM/l und 10 mM/l) inkubiert. Anschließend wurden die Mastzellen mit IgE und anti-IgE für 90 min stimuliert. (n=5-6); n.s. indiziert keine signifikante Differenz, * gibt eine signifikante Differenz an ($P < 0,05$).

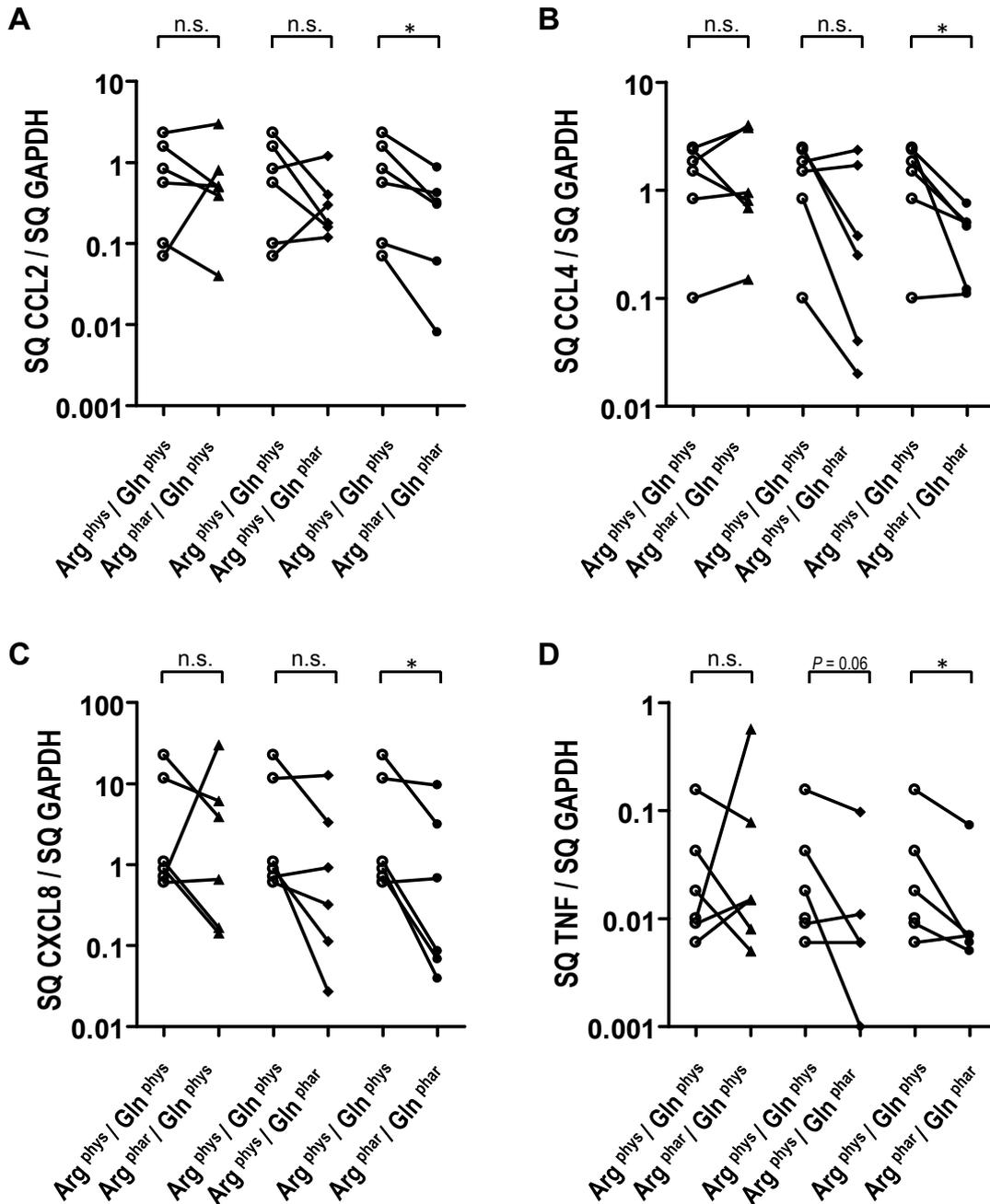


Abbildung 16: Relative mRNA-Expression von CCL2 (A), CCL4 (B), CXCL8 (C) und TNF (D) in menschlichen Darmmastzellen. Die Mastzellen wurden kultiviert mit SCF und IL-4 für 10 Tage und für 18 h mit physiologischen (phys) Dosen von Arginin (Arg) und Glutamin (Gln) (entsprechend 0,1 mM/l und 0,6 mM/l) gegenüber pharmakologischen (phar) Dosen von Arginin und Glutamin (entsprechend 2 mM/l und 10 mM/l) inkubiert. Anschließend wurden die Mastzellen mit IgE und anti-IgE für 90 min stimuliert. (n=6); n.s. indiziert keine signifikante Differenz, * gibt eine signifikante Differenz an ($P < 0,05$).

3.2.5 Arginin und Glutamin verringern die Aktivierung von MAPK und anderen Signalmolekülen in mit IgE-stimulierten Darmmastzellen

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Signalmoleküle untersucht, die in Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Hintergrund ist die beobachtete Reduktion der IgE-abhängigen Zytokinexpression in mit IL-4 kultivierten Darmmastzellen durch den kombinierten Einsatz pharmakologischer Konzentrationen von Arginin und Glutamin. Hierzu wurde der Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Antibody Array verwendet.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass MAP Kinasen wie ERK und p38 sowie die Serin/Threonin Kinase Akt bei der FcεRI-vermittelten Expression von Zytokinen in menschlichen Darmmastzellen eine Rolle spielen [100, 105]. Wie in Abbildung 17 dargestellt, waren in den mit IgE stimulierten Mastzellen signifikant die Phosphorylierung der MAP Kinasen ERK1/2, p38, JNK pan sowie MEK1/2 um 38 ± 17 % durch die Inkubation mit kombinierten pharmakologischen Konzentrationen an Arginin und Glutamin reduziert (A,B). Ferner zeigte Akt und sein nachfolgendes Signalmolekül p70S6Kinase reduzierte Phosphorylierungslevel um 26 ± 21 % durch die Behandlung mit Arginin und Glutamin (A,C). Neben der Untersuchung der MAP Kinasen und Akt wurde die Aktivierung der Signalmolekülfamilie STAT (*Signal transducer and activator of transcription*) erfasst. Dabei verringerte sich signifikant die Aktivierung von STAT2, STAT3 und STAT6 um 26 ± 9 % durch die Behandlung der Mastzellen mit Arginin und Glutamin (D).

Ergebnisse

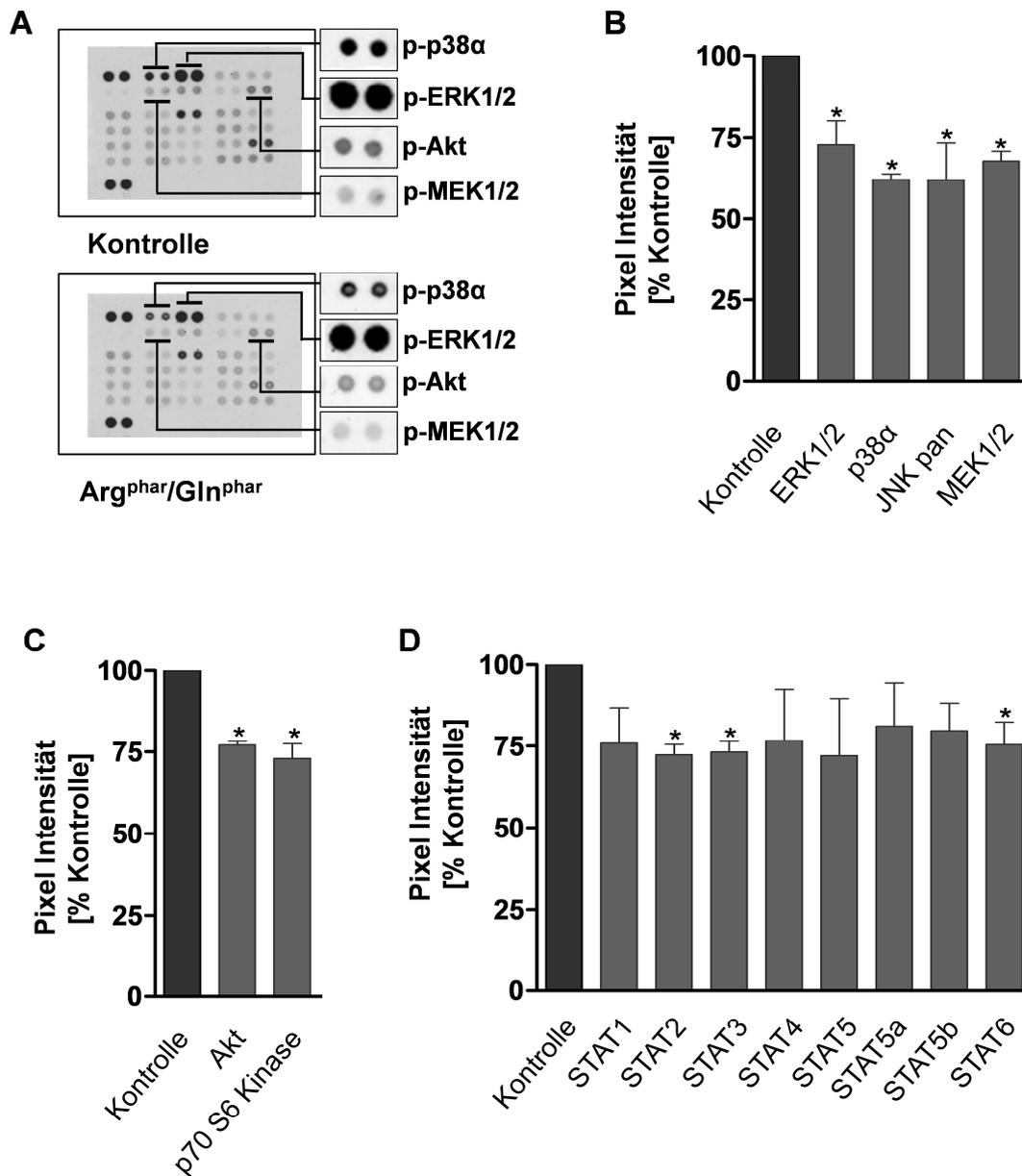


Abbildung 17: Phosphorylierung von MAPK Mitgliedern (A,B) sowie Akt (A,C) und STATs (D) in menschlichen Darmmastzellen. Mastzellen in Kultur mit SCF und IL-4 wurden für 18 h mit kombinierten physiologischen Dosen an Arginin und Glutamin (Kontrolle) (entsprechend 0,1 mM/l und 0,6 mM/l) gegenüber pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin (Arg^{phar}/Gln^{phar}) (entsprechend 2 mM/l und 10 mM/l) inkubiert und mit IgE und anti-IgE für 10 min stimuliert. (n=4), * gibt eine signifikante Differenz an (P<0,05).

4 Diskussion

Darmmastzellen spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Nahrungsmittelallergie. Die Quervernetzung von Allergen-spezifischem IgE auf der Oberfläche der Mastzellen durch die Bindung von Nahrungsmittelallergen löst die Freisetzung einer Vielzahl von meist proinflammatorischer Entzündungsmediatoren aus, welche die allergische Sofort- und Spätreaktion vermitteln und/oder auslösen. Typische Symptome der Nahrungsmittelallergie sind Kopfschmerzen, ein niedriger Blutdruck, Erytheme sowie gastrointestinale Beschwerden [106]. Zahlreiche Untersuchungen in Mastzellen zielen darauf ab, die Mechanismen der Mastzelldegranulation zu erforschen, mit dem Ziel geeignete Hemmstoffe zu entwickeln, welche die allergische Reaktion abschwächen. Die Rolle von IgG-Subklassen ist in diesem Zusammenhang bisher nicht eindeutig geklärt. Einerseits können sie die IgE-abhängige Mastzellaktivierung stimulieren, andererseits können sie die allergische Reaktion abschwächen [3-5, 69, 70]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von IgG-Subklassen auf die IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung in menschlichen Darmmastzellen untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin auf die IgE-abhängige Mastzellaktivierung untersucht. Studien über Glutamin belegen einen immunstimulierenden und anti-inflammatorischen Effekt besonders in Stadien schwerer Erkrankung wie Trauma, Sepsis, Infektionen aber auch bei CED in Kombination mit Arginin [7, 77]. Ferner übt Glutamin auf Immunzellen wie PBMC's und Makrophagen anti-inflammatorische Wirkung aus, indem es proinflammatorische Entzündungsmediatoren wie TNF verringert und immunprotektive Mediatoren erhöht [78, 79]. Die Wirkung von Arginin und Glutamin wurde bisher auf menschlichen Darmmastzellen nicht untersucht. Mastzellen sind neben allergischen Prozessen in entzündlichen Darmerkrankungen wie CED involviert und gelten hier insbesondere als Quelle für die erhöhten Spiegel an TNF [103]. Mastzellen stellen daher weitere Immunzellen dar, die auf die anti-inflammatorischen Effekte von Arginin und Glutamin reagieren könnten.

4.1 Effekt der IgG-Subklassen auf die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung

Lang bevor die aktivierende Rolle von IgE in Mastzellen bekannt war, wusste man von aktivierenden Eigenschaften von IgG-Antikörpern *in vivo* und *in vitro* [60]. Die IgG-Moleküle binden an IgG-spezifische Rezeptoren auf Immunzellen und deren Kreuzvernetzung durch ein Allergen kann die Immunantwort auslösen. Fc γ R besitzen unterschiedliche Eigenschaften, Immunzellen wie Mastzellen oder B-Zellen zu aktivieren. Fc γ RIIB ist aufgrund des hemmenden ITIM im zytosolischen Abschnitt des Rezeptors in der Lage, die allergische Reaktion abzuschwächen [51, 53, 60, 107]. Dagegen besitzen Fc γ RI und Fc γ RIII im zytosolischen Abschnitt ein aktivierendes ITAM. So zeigen Studien in Mastzellen, welche aus CD34-positiven peripheren Blutvorläuferzellen generiert wurden, dass humanes myeloma IgG₁ unter Einwirkung von IFN- γ in der Lage ist, die Ausschüttung von β -Hexosaminidase, Lipidmediatoren und Zytokinen wie TNF zu induzieren [5]. Hintergrund stellt die Beobachtung dar, dass IFN- γ den Fc γ RI auf humanen Mastzellen hochreguliert, wodurch die Zellen aktivierbar sind [54]. Damit stellt auch monoklonales IgG₁ ein Potential dar, Mastzellen zu aktivieren. In dieser Arbeit sollte die Wirkung der IgG-Subklassen IgG₁-IgG₄ auf die Aktivierung humaner Darmmastzellen untersucht werden. Hierzu sollten auch Allergen-spezifische IgG-Subklassen aus Seren von Patienten mit Nahrungsmittelallergien eingesetzt werden. Dazu sollten die IgG-Subklassen anhand der Affinitätschromatographie nach Soundararajan *et al.* aufgereinigt werden. Die erforderliche Reinheit von mindestens 95 % konnte mit dieser Methode jedoch nicht erreicht werden, sondern lediglich eine Anreicherung der einzelnen Subklasse. Ein wesentlicher Grund dafür könnten die aus finanziellen Gründen verwendeten 2 mg statt der von Soundararajan *et al.* eingesetzten 10 mg Anti-IgG₂-/Anti-IgG₄-Antikörper zur Herstellung der Chromatographiesäulen sein. Modifikationen in der Anfertigung dieser Säulen wie die Variation der Inkubation hinsichtlich Dauer, Temperatur und Art der Durchmischung des Säulenmaterials, die Menge an Agaroseharz sowie die Verwendung von Ethanolamin als Blockierreagenz zur Besetzung von freien Bindungsstellen, brachten keine Verbesserungen. Zusätzlich war die Haltbarkeit der Antikörper an dem Säulenmaterial unklar und Kreuzreaktionen der gebundenen Anti-IgG₂/Anti-IgG₄ mit IgG-Subklassen konnten nicht ausgeschlossen werden. Weetman *et al.* veröffentlichten bereits 1989 eine Methode zur Aufreinigung von IgG Subklassen aus menschlichem Serum anhand der negativen statt der in der vorliegenden Arbeit verwendeten positiven Selektion an Affinitätssäulen [108]. Damit verringerten sie die Gefahr von Kreuzreaktionen, jedoch war bei dieser Methode eine zusätzliche positive Selektion nötig, um die erforderliche Reinheit zu erreichen. Erfolgreich konnte bisher IgG₂ anhand

unterschiedlicher Techniken aus menschlichem Serum isoliert werden [109, 110]. IgG₄ stellt aufgrund seiner geringen Menge im Serum eine große Herausforderung dar. Skvaril und Morell nutzten bereits 1970 die Tatsache, dass IgG₄ im Vergleich zu den restlichen Subklassen, einen geringeren isoelektrischen Punkt aufweist, um IgG₄ über Ionenaustauschchromatographie zu isolieren [111]. Inzwischen stellt jedoch die Immunoaffinitätschromatographie die gängigste Methode dar, um IgG Subklassen zu fraktionieren [97, 108, 112, 113]. Diese Technik erfordert mehrere und zum Teil sich wiederholende Schritte, zeigt eine hohe Anfälligkeit aufgrund der pH-Abhängigkeit und weist geringe Proteinwiederfindungsraten auf [109]. Sie gilt allgemein als kompliziert. Zur Untersuchung der Wirkung von IgG-Subklassen auf menschlichen Darmmastzellen wurden in dieser Arbeit menschliche *myeloma* IgG-Subklassen IgG₁₋₄ und deren spezifische Antikörper anti-IgG₁₋₄ verwendet. Humane Darmmastzellen wurden mit SCF und IFN- γ sowie mit SCF und IL-4 kultiviert. Wir konnten zeigen, dass IFN- γ die Expression von Fc γ RI auf menschlichen Darmmastzellen induziert. Ferner wurde nach Kultur mit IFN- γ Fc γ RII auf Darmmastzellen exprimiert, Fc γ RIII hingegen nicht. IL-4 induzierte Fc γ RI nur marginal, die Rezeptoren Fc γ RII und Fc γ RIII wurden nicht ausgebildet. Damit konnte die Beobachtung von Tkaczyk *C et al.* bestätigt werden, dass mukosale im Gegensatz zu serosalen Mastzellen keinen Fc γ RIII exprimieren und daher nicht über IgG aktivierbar sind [51].

Wir testeten ferner die Wirkung der myeloma IgG-Subklassen IgG₁-IgG₄ auf das Degranulationsverhalten in Darmmastzellen. Die von Woolhiser *et al.* beobachtete Aktivierung von Mastzellen durch IgG₁ konnten wir an Darmmastzellen nicht bestätigen [5]. Hier führte keine der vier Subklassen zur Aktivierung der Mastzellen. Ursache dafür könnte die vergleichsweise geringe Induktion von Fc γ RI durch IFN- γ in den von uns verwendeten Zellen sein. Fc γ RI besitzt 2 ITAM und damit die Fähigkeit zellaktivierende Signale weiterzuleiten. Menschliche Mastzellen exprimieren unter IFN- γ auch Fc γ RII, dessen funktionsfähige Genvariante Fc γ RIIB hemmende Eigenschaften aufgrund des enthaltenen ITIM ausübt. Dies könnte eine weitere Ursache darstellen, für die nicht beobachtete Zellaktivierung über IgG₁. Die Bindungsaffinitäten von Fc γ RI für IgG liegen in murinen und menschlichen Mastzellen mit K_a $10^{-8} - 10^{-9}$ M, jedoch höher als jene von Fc γ RII mit K_a 10^{-6} M, sodass in der Summe eher eine aktivierende Reaktion durch die IgG-Antikörper zu erwarten gewesen wäre [51]. Auf Darmmastzellen, die mit IL-4 kultiviert wurden, übten die IgG-Subklassen ebenfalls keinen Effekt aus, was durch die geringe Expression der Fc γ R auch eher erwartet wurde.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin die Wirkung der IgG-Subklassen auf die IgE-abhängige Freisetzung von Mastzellmediatoren untersucht. Dabei war in den mit IFN- γ kultivierten Mastzellen eine nicht signifikante verringerte Freisetzung an β -Hexosaminidase und LTC₄ durch IgG₁/anti-IgG₁, IgG₂/anti-IgG₂ und IgG₄/anti-IgG₄ im Vergleich zur Stimulation mit IgE/anti-IgE allein zu verzeichnen. Somit konnte der von Woolhiser *et al* beobachtete additive Effekt der simultanen Stimulation von Mastzellen mit IgE und IgG₁ für menschliche Darmmastzellen nicht bestätigt werden [5]. Einen möglichen Erklärungsansatz stellt auch hier die hemmende Eigenschaft des Fc γ RIIB dar. Die Co-Ligation von Fc γ RIIB mit Fc ϵ RI verringerte die Mediatorausschüttung in aus Knochenmark generierten Mausmastzellen und basophilen Granulozyten [57, 114, 115]. Über die Rekrutierung von SHIP hemmt ITIM den PI-3 Kinase Signalweg, welcher bei der Fc ϵ RI-vermittelten Aktivierung von Mastzellen eine Rolle spielt [53]. Die negative Regulation von Fc γ RIIB/b ist in Fc γ RIIB-defizienten Mäusen gut untersucht, welche erhöhte IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktionen aufweisen [60, 107]. Die blockierenden Eigenschaften von Fc γ RIIB/b wurden ausgenutzt, indem Moleküle konstruiert wurden, die als Therapiemöglichkeit gegen Allergien eingesetzt werden könnten. So verbindet das bispezifische Molekül F(ab')₂ von anti-human Fc γ RIIB + F(ab')₂ anti-human IgE beladenes IgE mit Fc γ RIIB und hemmt in Mastzellen und B-Zellen erfolgreich die Allergen-induzierte Histamin-Freisetzung [116]. Dies stellt einen Vorteil gegenüber anderen Fusionsmolekülen dar, da IgE bei den meisten Allergieklienten bereits Zell-gebunden vorliegt.

Neben der Bindung an Fc γ RII ist der Mechanismus des Abfangens von IgE bzw. Allergen (Kompetition) durch IgG-Moleküle zu berücksichtigen. So konnte in immunisierten Mäusen gezeigt werden, dass durch Fremdallergenexposition gebildete oder direkt verabreichte IgG-Antikörper die IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion komplett aufhoben [70]. Dieser Vorgang ist besonders wirksam, wenn die Allergendosis gering und die IgG-Menge vergleichsweise hoch ist. In Immuntherapien könnte dieser Mechanismus eine Rolle spielen, da hier hohe Titer an allergenspezifischem IgG₄ assoziiert sind mit einem Schutz gegen Allergene und dem Rückgang allergischer Symptome [3, 4, 70].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Allergen-spezifischen IgG-Subklassen von Patienten mit Nahrungsmittelallergie auf menschliche Darmmastzellen untersucht werden. Ziel war dabei auch, mögliche kompetitive Mechanismen zu analysieren. Da die aus Patientenserum isolierten IgG-Subklassen keine ausreichende Reinheit aufwiesen, konnten

Diskussion

keine Versuche mit allergenspezifischen IgG-Subklassen aus Seren von Allergiepateinten an menschlichen Darmmastzellen durchgeführt werden.

In diesem Zusammenhang käme IgG₄ eine besondere Bedeutung zu. Es besitzt die Fähigkeit jeweils eine schwere und eine leichte Kette auszutauschen [3]. Damit kann es zwei unterschiedliche Allergen-Bindungsstellen ausbilden. Diese Eigenschaft wird in Zusammenhang mit seiner immunprotektiven Wirkung diskutiert. Die Rolle von IgG₄ bei Nahrungsmittelallergie ist dennoch nicht eindeutig. Zum einen wird berichtet, dass hohe IgG₄-Level gegen Nahrungsmittelallergene wie Kuhmilch und Hühnereiweiß in der frühen Kindheit mit einer Toleranz zu den entsprechenden Nahrungsmitteln im späteren Leben assoziiert sind [33]. Andererseits wird für IgG₄ eine besondere Rolle bei der verzögerten, nicht IgE-vermittelten Kuhmilchallergie beschrieben [34]. Zukünftige Forschungen könnten das Ziel haben, Allergen-spezifische IgG-Subklassen aus Seren von Patienten mit Nahrungsmittelallergie mit einer Mindestreinheit von 95 % zu isolieren, diese auf Mastzellen mit unterschiedlicher Herkunft zu testen und die Ergebnisse mit den IgE/IgG₄-Titer im Blut zu vergleichen. Insbesondere IgG₄ als bivalentes Molekül lässt hemmende Effekte erahnen. Alternativ sind Versuche mit rekombinaten Allergen-spezifischen IgG-Subklassen und rekombinantem Allergen-spezifischem IgE denkbar.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass menschliche Darmmastzellen nicht bzw. nur in geringem Umfang auf IgG-Subklassen reagieren. Auch die Wirkung von IFN- γ auf die Expression von Fc γ R in den untersuchten Zellen ist abweichend bzw. verringert. In diesen Punkten unterscheiden sich menschliche Darmmastzellen von Mastzellen anderer Herkunft. Weitere Studien sind nötig, um mehr über die Rolle von Allergen-spezifischen IgG-Subklassen bei Nahrungsmittelallergie zu erfahren.

4.2 Effekt von Arginin und Glutamin auf die IgE-vermittelte Mastzellaktivierung

Studien über Arginin und Glutamin geben Hinweise über immunmodulatorische und darmschützende Eigenschaften beider Aminosäuren [77]. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie M. Crohn senkten kombinierte pharmakologische Dosen an Arginin und Glutamin *in vitro* die Entzündungsreaktion [7]. Mastzellen als Vermittler von darmassoziierten Entzündungen spielen eine Rolle bei CED [103]. Die Konzentration an TNF in Darmmastzellen von CED Patienten ist deutlich erhöht und es wird angenommen, dass Darmmastzellen die Quelle für das Auftreten von vermehrtem TNF im entzündeten Gewebe sind [117].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass menschliche Darmmastzellen auf die kombinierte Gabe an pharmakologischen Dosen an Arginin und Glutamin mit einem Rückgang der IgE-vermittelten Freisetzung des Entzündungsmediators LTC₄ sowie der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie CCL2, CCL4, CXCL8 und TNF reagierten. Dieser Effekt war für pharmakologische Konzentrationen an Glutamin allein ebenfalls zu beobachten, jedoch erreichte dies nicht ganz statistische Signifikanz. Lecleire *et al.* beschreiben, dass Darmbiopsien von Patienten mit CED verringerte Level an IL-6, CXCL8 und TNF aufwiesen, wenn die Biopsien mit pharmakologischen Konzentrationen an beiden Aminosäuren behandelt wurden [7]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass Mastzellen in den von Lecleire *et al.* beobachteten Effekt von Arginin und Glutamin involviert sein könnten.

Um den beobachteten anti-inflammatorischen Effekt von Arginin und Glutamin genauer zu untersuchen, wurde die Aktivierung von 46 Signalmolekülen analysiert. Dabei zeigte sich in mit IL-4-kultivierten und mit IgE-stimulierten Darmmastzellen eine Reduktion der Phosphorylierungslevel von 16 Signalproteinen durch kombinierte hohe Dosen an Arginin und Glutamin. Dies betraf insbesondere MAPK Mitglieder wie ERK, p38 α , JNK pan und MEK sowie die Serin/Threonin Kinase Akt.

Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass ERK und p38 die über Fc ϵ RI-Kreuzvernetzung ausgelöste Induktion und Freisetzung von Mediatoren in menschlichen Darmmastzellen vermitteln [105]. Akt spielt in diesem Prozess keine Rolle. Erst durch *priming* der Darmmastzellen mit IL-4 wird Akt IgE-abhängig aktiviert mit der Folge einer erhöhten Induktion von Mastzellmediatoren [105]. So wird das Mastzellchemokin CXCL8 in

menschlichen Darmmastzellen ERK- und Akt-abhängig reguliert und die Freisetzung des Lipidmediators LTC₄ wird nachweislich über Akt gesteuert [105]. Die Akt-vermittelte Wirkung von Glutamin kann auch von Kretzmann *et al.* in TNBS-induzierter Darmentzündung bestätigt werden [118]. Die Ergebnisse zeigen damit eine ERK-/Akt-vermittelte anti-inflammatorische Wirkung von Arginin und Glutamin in menschlichen Darmmastzellen an.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Reduktion einer weiteren MAPK p38 durch pharmakologische Konzentrationen von Arginin und Glutamin beobachtet. Dieses Signalprotein ist in Darmbiopsien verringert, welche mit kombinierten hohen Gaben an Arginin und Glutamin behandelt wurden und zu einer verringerten Freisetzung an TNF, IL-6 und IL-1 β führte [7]. Feuser *et al.* bestätigen die Abhängigkeit der Expression von IL-6 von p38 in menschlichen Darmmastzellen [105]. Weiterhin werden CCL2 und TNF in mit IgE-stimulierten *bone marrow-derived* Mausmastzellen p38-abhängig induziert [119]. Die Reduktion der Aktivierung von p38 könnte damit eine Ursache für die in menschlichen Darmmastzellen verringerte Induktion von CCL2 und TNF durch Arginin und Glutamin darstellen.

Auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren zur Kontrolle der Genregulation geben Studien an, dass Glutamin *in vivo*- und *in vitro* über den NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) -Signalweg anti-inflammatorisch wirkt [7, 83, 118, 120]. NF- κ B ist beschrieben für seine Rolle in der Aktivierung von Zytokingenen im Zuge entzündlicher Prozesse [121]. Studien mit CED Patienten zeigen die Induktion von IL-1, IL-6 und TNF in Abhängigkeit von NF- κ B [122]. Über eine verringerte Aktivierung von NF- κ B senkte Glutamin CXCL8 *in vitro* in der menschlichen Epithelzelllinie HCT-8 [120]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von NF- κ B in der Wirkung von Glutamin auf Darmmastzellen nicht untersucht. Wir konnten jedoch einen Einfluss der Aminosäuren auf die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie verdeutlichen. Entzündungsprozesse sind oftmals über NF- κ B/STAT und iNOS gesteuert und unter anderem über Akt als Bindeglied reguliert [123, 124]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion von STAT2, STAT3 und STAT6 durch Arginin und Glutamin gezeigt werden. STATs sind bei der Aktivierung einer Reihe von Genen involviert, welche für unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Wachstum und Immunabwehr bedeutsam sind [125]. STAT6 stellt beispielsweise den Hauptmediator in Allergen-induzierten Atemwegserkrankungen dar und fungiert als Vermittler der Chemokin-Expression [126]. STATs spielen auch eine Rolle in entzündlichen Erkrankungen wie CED

[127, 128]. So ist STAT3 in T-Lymphozyten des Darms von Patienten mit M. Crohn aktiviert [129]. Auch bei der TNBS-induzierten Colitis in Mäusen kam es zu einer signifikanten Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 [118]. Dies war verbunden mit der Induktion von iNOS und dem Enzym Cyclooxygenase 2, welches an der Bildung von Prostaglandinen beteiligt ist [128]. Die Anwendung von Glutamin in diesem Mausmodell führt zur verringerten Aktivierung von STAT1 und STAT5 und damit zur Reduktion von iNOS und Cyclooxygenase 2. STAT3 fungiert in der Zelle als Regulator von STAT1, welches die Induktion proinflammatorischer Gene vermittelt [126, 128].

Zusammenfassend zeigte Glutamin *in vitro* anti-inflammatorische Wirkungen, welche über Signalmoleküle wie ERK, p38, Akt und STATs reguliert werden. Diese Signalproteine spielen eine Rolle in entzündlichen oder allergischen Prozessen. Der protektive Effekt von Glutamin ließ sich jedoch *in vivo* bisher nicht bestätigen. In Patienten mit CED führte Glutamin weder oral, noch parenteral verabreicht zu einer Verbesserung der Symptome [77]. Die Autoren nehmen an, dass dies auf einen mangelnden Zugang von Glutamin zum Wirkort zurückzuführen ist. Bei CED sind besonders die hinteren Dünndarmabschnitte sowie der Dickdarm betroffen und Glutamin wird bereits im vorderen Dünndarmabschnitt resorbiert [130].

Die Bedeutung von Arginin als immunmodulatorisches Nahrungsergänzungsmittel wird kontrovers diskutiert. Einerseits übt Arginin protektive Wirkungen aus durch die Bildung von wachstumsfördernden Polyaminen und stoffwechselaktiven Hormonen sowie den zell- und immunfördernden Eigenschaften von NO. Andererseits kommen überschießendem NO und NO-Abkömmlingen pathologische Bedeutungen zu [85]. Kontrollierte Dosen an Arginin oder NO scheinen *in vitro* anti-inflammatorische Wirkung auszuüben. In Epithelzellen senkt Arginin die Freisetzung von CXCL8 über den NO-Signalweg [131]. In Mastzellen hemmt NO die IgE-induzierte Bildung von IL-4, IL-6 und TNF [88]. Dieser Rückgang ist verbunden mit einer Senkung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Fos und Jun, unabhängig von p38 und NF- κ B. In entzündlichen Darmbiopsien weist Arginin nur in Kombination mit Glutamin anti-inflammatorische Effekte auf [7, 102]. Andererseits zeigt Arginin *in vivo*, einem Tiermodell mit einer induzierten Colitis, einen schädlichen Einfluss [132]. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von Arginin *in vivo* von multiplen Faktoren abhängig ist. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang die Art, das Stadium und die Schwere der Erkrankung sowie der Zeitpunkt und die Applikationsform von Arginin [6]. Eine mögliche Ursache stellt die Bildung von NO dar, welches in massiven Mengen zur systemischen Vasodilatation und

Diskussion

damit zu einem niedrigen Blutdruck führt [85]. Ferner fördert NO den unspezifischen Zelltod und die Gewebeschädigung über die Ausbildung von Peroxynitriden [6, 85]. Die Mechanismen von NO werden insbesondere in Zusammenhang mit schweren Erkrankungen wie Sepsis diskutiert. Indiz hierfür ist das erhöhte Vorkommen von TH1-Zytokinen, welche die Expression von iNOS induzieren, die wiederum NO aus Arginin generieren [6, 89]. Im Gegensatz dazu waren die iNOS-Transkription und der NO-Gehalt in menschlichen Endothelzellen mit CED deutlich reduziert und gleichzeitig die Arginase-Aktivität erhöht [89]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Arginin in CED auch in den Arginase-Stoffwechselweg eingehen könnte. Die Aktivität der Arginase resultiert in die Bildung von Zell- und Gewebeaufbau fördernden Polyaminen und Prolin. TH2 Zytokine wie IL-4 begünstigen die Aktivität von Arginase [6].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Arginin in Kombination mit Glutamin *in vitro* anti-inflammatorische Effekte aufweist. Den Haupteffekt scheint dabei Glutamin auszuüben. Diese Beobachtung wird unterstützt durch Ergebnisse der Studien von Coeffier *et al.* und Lecleire *et al.*, welche für Glutamin, jedoch nicht für Arginin, anti-inflammatorische Wirkungen im menschlichen Darm *in vitro* zeigen konnten [102, 133].

Untersuchungen *in vivo* sind nötig, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu überprüfen und zu klären, inwiefern Arginin und Glutamin als immunfördernde Substanzen in Diäten bei entzündlichen oder auch allergischen Darmerkrankungen eingesetzt werden könnten. Hierbei sollten die Applikationsform, die Dosis-Wirkungsbeziehungen sowie kinetische Studien Berücksichtigung finden.

5 Literaturverzeichnis

1. Bischoff S, Crowe SE: **Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives.** *Gastroenterology* 2005, **128**(4):1089-1113.
2. Kraneveld AD, Sagar S, Garssen J, Folkerts G: **The two faces of mast cells in food allergy and allergic asthma: The possible concept of Yin Yang.** *Biochim Biophys Acta* 2011.
3. Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T: **Immunoglobulin G4: an odd antibody.** *Clin Exp Allergy* 2009, **39**(4):469-477.
4. Kemeny DM, Lessof MH, Patel S, Youlten LJ, Williams A, Lambourn E: **IgG and IgE antibodies after immunotherapy with bee and wasp venom.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989, **88**(1-2):247-249.
5. Woolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, Metcalfe DD: **IgG-dependent activation of human mast cells following up-regulation of FcγRI by IFN-γ.** *Eur J Immunol* 2001, **31**(11):3298-3307.
6. Santora R, Kozar RA: **Molecular mechanisms of pharmaconutrients.** *J Surg Res* 2010, **161**(2):288-294.
7. Leclaire S, Hassan A, Marion-Letellier R, Antonietti M, Savoye G, Bole-Feysot C, Lerebours E, Ducrotte P, Dechelotte P, Coeffier M: **Combined glutamine and arginine decrease proinflammatory cytokine production by biopsies from Crohn's patients in association with changes in nuclear factor-κB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways.** *J Nutr* 2008, **138**(12):2481-2486.
8. Rijniere A, Koster AS, Nijkamp FP, Kraneveld AD: **TNF-α is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, **291**(5):G969-976.
9. Rijniere A, Nijkamp FP, Kraneveld AD: **Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome.** *Pharmacol Ther* 2007, **116**(2):207-235.
10. Valitutti S, Espinosa E: **Cognate interactions between mast cells and helper T lymphocytes.** *Self Nonsel* 2010, **1**(2):114-122.
11. Arock M, Valent P: **Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives.** *Expert Rev Hematol* 2010, **3**(4):497-516.
12. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M: **Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:749-786.
13. Grimaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ: **Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses.** *Curr Opin Immunol* 2006, **18**(6):751-760.
14. Burton OT, Oettgen HC: **Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases.** *Immunol Rev* 2011, **242**(1):128-143.

15. Kühnel W: **Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.** Georg Thieme Verlag 1995.
16. Jamur MC, Oliver C: **Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2011, **3**:1390-1406.
17. Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD: **IgE, mast cells, basophils, and eosinophils.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S73-80.
18. Hallgren J, Pejler G: **Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator.** *FEBS J* 2006, **273**(9):1871-1895.
19. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB: **Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(12):4464-4468.
20. Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, Schwartz LB: **Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell.** *J Allergy Clin Immunol* 2005, **115**(6):1162-1168.
21. Ozdemir O: **Immunosurveillance function of human mast cell?** *World J Gastroenterol* 2005, **11**(44):7054-7056.
22. He SH, Xie H: **Inhibition of tryptase release from human colon mast cells by protease inhibitors.** *World J Gastroenterol* 2004, **10**(3):332-336.
23. Hamilton MJ, Sinnamon MJ, Lyng GD, Glickman JN, Wang X, Xing W, Krilis SA, Blumberg RS, Adachi R, Lee DM *et al*: **Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(1):290-295.
24. Lundequist A, Pejler G: **Biological implications of preformed mast cell mediators.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**(6):965-975.
25. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D: **Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation.** *Immunol Rev* 2007, **217**:65-78.
26. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: **Mast cells.** *Physiol Rev* 1997, **77**(4):1033-1079.
27. Lorentz A, Bischoff SC: **Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4.** *Immunol Rev* 2001, **179**:57-60.
28. Bischoff SC, Sellge G, Manns MP, Lorentz A: **Interleukin-4 induces a switch of human intestinal mast cells from proinflammatory cells to Th2-type cells.** *Int Arch Allergy Immunol* 2001, **124**(1-3):151-154.
29. Kaplan AP: **Chemokines, chemokine receptors and allergy.** *Int Arch Allergy Immunol* 2001, **124**(4):423-431.
30. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA: **Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(9):3652-3656.
31. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O: **Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection.** *Science* 1995, **269**(5230):1583-1585.
32. Thomas PS: **Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma.** *Immunol Cell Biol* 2001, **79**(2):132-140.

33. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A: **Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics.** *Pharmacology* 2010, **85**(6):336-349.
34. Bischoff SC: **Mucosal allergy: role of mast cells and eosinophil granulocytes in the gut.** *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996, **10**(3):443-459.
35. Sicherer SH, Sampson HA: **9. Food allergy.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, **117**(2 Suppl Mini-Primer):S470-475.
36. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J *et al*: **The prevalence of food allergy: a meta-analysis.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **120**(3):638-646.
37. Sampson HA: **Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders.** *J Allergy Clin Immunol* 1999, **103**(5 Pt 1):717-728.
38. Ballmer-Weber BK, Hoffmann-Sommergruber K: **Molecular diagnosis of fruit and vegetable allergy.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011, **11**(3):229-235.
39. **American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines for the evaluation of food allergies.** *Gastroenterology* 2001, **120**(4):1023-1025.
40. Sicherer SH, Sampson HA: **Food allergy.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S116-125.
41. Lack G: **Epidemiologic risks for food allergy.** *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**(6):1331-1336.
42. Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G, Barkans J, Ying S, Kay AB: **High-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **153**(6 Pt 1):1931-1937.
43. Sihra BS, Kon OM, Grant JA, Kay AB: **Expression of high-affinity IgE receptors (Fc epsilon RI) on peripheral blood basophils, monocytes, and eosinophils in atopic and nonatopic subjects: relationship to total serum IgE concentrations.** *J Allergy Clin Immunol* 1997, **99**(5):699-706.
44. Groschwitz KR, Hogan SP: **Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis.** *J Allergy Clin Immunol* 2009, **124**(1):3-20; quiz 21-22.
45. Groschwitz KR, Ahrens R, Osterfeld H, Gurish MF, Han X, Abrink M, Finkelman FD, Pejler G, Hogan SP: **Mast cells regulate homeostatic intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(52):22381-22386.
46. Perrier C, Corthesy B: **Gut permeability and food allergies.** *Clin Exp Allergy* 2011, **41**(1):20-28.
47. Gilfillan AM, Rivera J: **The tyrosine kinase network regulating mast cell activation.** *Immunol Rev* 2009, **228**(1):149-169.
48. Gilfillan AM, Tkaczyk C: **Integrated signalling pathways for mast-cell activation.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**(3):218-230.
49. Gebhardt T, Sellge G, Lorentz A, Raab R, Manns MP, Bischoff SC: **Cultured human intestinal mast cells express functional IL-3 receptors and respond to IL-3 by enhancing growth and IgE receptor-dependent mediator release.** *Eur J Immunol* 2002, **32**(8):2308-2316.

50. Theoharides TC, Cochrane DE: **Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress.** *J Neuroimmunol* 2004, **146**(1-2):1-12.
51. Tkaczyk C, Okayama Y, Metcalfe DD, Gilfillan AM: **Fc gamma receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release.** *Int Arch Allergy Immunol* 2004, **133**(3):305-315.
52. Kovarova M, Tolar P, Arudchandran R, Draberova L, Rivera J, Draber P: **Structure-function analysis of Lyn kinase association with lipid rafts and initiation of early signaling events after Fc epsilon receptor I aggregation.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(24):8318-8328.
53. Roth K, Chen WM, Lin TJ: **Positive and negative regulatory mechanisms in high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2008, **56**(6):385-399.
54. Okayama Y, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD: **Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma.** *J Immunol* 2000, **164**(8):4332-4339.
55. Katz HR, Raizman MB, Gartner CS, Scott HC, Benson AC, Austen KF: **Secretory granule mediator release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-IgG receptor bridging in mouse mast cells.** *J Immunol* 1992, **148**(3):868-871.
56. Katz HR, Lobell RB: **Expression and function of Fc gamma R in mouse mast cells.** *Int Arch Allergy Immunol* 1995, **107**(1-3):76-78.
57. Daeron M, Malbec O, Latour S, Arock M, Fridman WH: **Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors.** *J Clin Invest* 1995, **95**(2):577-585.
58. Fong DC, Malbec O, Arock M, Cambier JC, Fridman WH, Daeron M: **Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation.** *Immunol Lett* 1996, **54**(2-3):83-91.
59. Isnardi I, Lesourne R, Bruhns P, Fridman WH, Cambier JC, Daeron M: **Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor Fc gammaRIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap.** *J Biol Chem* 2004, **279**(50):51931-51938.
60. Malbec O, Daeron M: **The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation.** *Immunol Rev* 2007, **217**:206-221.
61. Pelaia G, Cuda G, Vatrella A, Gallelli L, Caraglia M, Marra M, Abbruzzese A, Caputi M, Maselli R, Costanzo FS *et al*: **Mitogen-activated protein kinases and asthma.** *J Cell Physiol* 2005, **202**(3):642-653.
62. Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daeron M, Cambier JC: **The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory Fc gammaRIIB signals in B cells.** *Immunity* 2000, **12**(3):347-358.
63. Schroeder HW, Jr., Cavacini L: **Structure and function of immunoglobulins.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S41-52.
64. Hamilton RG: **Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory.** *Clin Chem* 1987, **33**(10):1707-1725.

65. Lucas AH: **IgG subclass-restricted immune responses to allergens.** *Springer Semin Immunopathol* 1990, **12**(4):385-400.
66. Jefferis R, Kumararatne DS: **Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance.** *Clin Exp Immunol* 1990, **81**(3):357-367.
67. Wypych J, Li M, Guo A, Zhang Z, Martinez T, Allen MJ, Fodor S, Kelner DN, Flynn GC, Liu YD *et al*: **Human IgG2 antibodies display disulfide-mediated structural isoforms.** *J Biol Chem* 2008, **283**(23):16194-16205.
68. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M: **Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses.** *Blood* 2009, **113**(16):3716-3725.
69. Sellge G, Laffer S, Mierke C, Vrtala S, Hoffmann MW, Klempnauer J, Manns MP, Valenta R, Bischoff SC: **Development of an in vitro system for the study of allergens and allergen-specific immunoglobulin E and immunoglobulin G: Fcε receptor I supercross-linking is a possible new mechanism of immunoglobulin G-dependent enhancement of type I allergic reactions.** *Clin Exp Allergy* 2005, **35**(6):774-781.
70. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD: **IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and FcγRIIb cross-linking.** *J Clin Invest* 2006, **116**(3):833-841.
71. Tomicic S, Norrman G, Falth-Magnusson K, Jenmalm MC, Devenney I, Bottcher MF: **High levels of IgG4 antibodies to foods during infancy are associated with tolerance to corresponding foods later in life.** *Pediatr Allergy Immunol* 2009, **20**(1):35-41.
72. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD: **Pathways of anaphylaxis in the mouse.** *J Allergy Clin Immunol* 2002, **109**(4):658-668.
73. Wachholz PA, Durham SR: **Induction of 'blocking' IgG antibodies during immunotherapy.** *Clin Exp Allergy* 2003, **33**(9):1171-1174.
74. Wachholz PA, Soni NK, Till SJ, Durham SR: **Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy.** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **112**(5):915-922.
75. Labow BI, Souba WW: **Glutamine.** *World J Surg* 2000, **24**(12):1503-1513.
76. Mizock BA: **Immunonutrition and critical illness: an update.** *Nutrition* 2010, **26**(7-8):701-707.
77. Coeffier M, Marion-Letellier R, Dechelotte P: **Potential for amino acids supplementation during inflammatory bowel diseases.** *Inflamm Bowel Dis* 2010, **16**(3):518-524.
78. Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, Chang EB: **Glutamine attenuates tumor necrosis factor-α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells.** *Nutrition* 2003, **19**(1):1-6.
79. Yang C, Wang XY, Li WQ, Li N, Li JS: **[Effects of glutamine on the cytokine expression of peripheral blood mononuclear cells].** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008, **88**(7):449-452.

80. Boelens PG, Houdijk AP, Fonk JC, Nijveldt RJ, Ferwerda CC, Von Blomberg-Van Der Flier BM, Thijs LG, Haarman HJ, Puyana JC, Van Leeuwen PA: **Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients.** *J Nutr* 2002, **132**(9):2580-2586.
81. Coeffier M, Marion R, Leplingard A, Lerebours E, Ducrotte P, Dechelotte P: **Glutamine decreases interleukin-8 and interleukin-6 but not nitric oxide and prostaglandins e(2) production by human gut in-vitro.** *Cytokine* 2002, **18**(2):92-97.
82. Coeffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoinnie A, Lerebours E, Dechelotte P: **Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro.** *Cytokine* 2001, **13**(3):148-154.
83. Giris M, Erbil Y, Dogru-Abbasoglu S, Yanik BT, Alis H, Olgac V, Toker GA: **The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on TNBS-induced colitis. The effect of glutamine on TNBS colitis.** *Int J Colorectal Dis* 2007, **22**(6):591-599.
84. Israeli E, Berenshtein E, Wengrower D, Aptekar L, Kohen R, Zajicek G, Goldin E: **Prophylactic administration of topical glutamine enhances the capability of the rat colon to resist inflammatory damage.** *Dig Dis Sci* 2004, **49**(10):1705-1712.
85. Suchner U, Heyland DK, Peter K: **Immune-modulatory actions of arginine in the critically ill.** *Br J Nutr* 2002, **87 Suppl 1**:S121-132.
86. Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE: **Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease.** *J Investig Med* 2002, **50**(4):272-283.
87. Ghosh S, Erzurum SC: **Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology.** *Biochim Biophys Acta* 2011.
88. Davis BJ, Flanagan BF, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Coleman JW: **Nitric oxide inhibits IgE-dependent cytokine production and Fos and Jun activation in mast cells.** *J Immunol* 2004, **173**(11):6914-6920.
89. Horowitz S, Binion DG, Nelson VM, Kanaa Y, Javadi P, Lazarova Z, Andrekopoulos C, Kalyanaraman B, Otterson MF, Rafiee P: **Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292**(5):G1323-1336.
90. Heyland DK, Samis A: **Does immunonutrition in patients with sepsis do more harm than good?** *Intensive Care Med* 2003, **29**(5):669-671.
91. Mailman D: **Modulation of hemorrhagic shock by intestinal mucosal NG-nitro-L-arginine and L-arginine in the anesthetized rat.** *Shock* 1999, **12**(2):155-160.
92. Sato N, Moore FA, Kone BC, Zou L, Smith MA, Childs MA, Moore-Olufemi S, Schultz SG, Kozar RA: **Differential induction of PPAR-gamma by luminal glutamine and iNOS by luminal arginine in the rodent postischemic small bowel.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, **290**(4):G616-623.
93. Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, Conner WC, Shea-Donohue T: **Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion.** *J Surg Res* 2000, **89**(1):13-19.
94. Sellge G, Bischoff SC: **Isolation, culture, and characterization of intestinal mast cells.** *Methods Mol Biol* 2006, **315**:123-138.

95. Buell DN, Fowlkes BJ, Metzger H, Isersky C: **Cell cycle and morphological changes during growth and differentiation of a rat basophilic leukemia cell line.** *Cancer Res* 1976, **36**(9 pt.1):3131-3137.
96. Passante E, Frankish N: **The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell.** *Inflamm Res* 2009, **58**(11):737-745.
97. Soundararajan S, Kikuchi Y, Joseph K, Kaplan AP: **Functional assessment of pathogenic IgG subclasses in chronic autoimmune urticaria.** *J Allergy Clin Immunol* 2005, **115**(4):815-821.
98. Barkowsky M: **Die Wirkung des IFN- γ auf Proliferation und Fc γ Rezeptorexpression von humanen intestinalen Mastzellen.** 2008.
99. Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, Manns MP: **IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(14):8080-8085.
100. Lorentz A, Wilke M, Sellge G, Worthmann H, Klempnauer J, Manns MP, Bischoff SC: **IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos.** *J Immunol* 2005, **174**(11):6751-6756.
101. Okayama Y, Hagaman DD, Woolhiser M, Metcalfe DD: **Further characterization of Fc γ RII and Fc γ RIII expression by cultured human mast cells.** *Int Arch Allergy Immunol* 2001, **124**(1-3):155-157.
102. Lecleire S, Coeffier M, Leblond J, Hubert A, Lemoulan S, Petit A, Ducrotte P, Dechelotte P, Marion R: **Modulation of nitric oxide and cytokines production by L-arginine in human gut mucosa.** *Clin Nutr* 2005, **24**(3):353-359.
103. Bischoff SC: **Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells.** *Semin Immunopathol* 2009, **31**(2):185-205.
104. Bouguen G, Chevaux JB, Peyrin-Biroulet L: **Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases.** *World J Gastroenterol* 2011, **17**(5):547-556.
105. Feuser K, Feilhauer K, Staib L, Bischoff SC, Lorentz A: **Akt cross-links IL-4 priming, stem cell factor signaling, and IgE-dependent activation in mature human mast cells.** *Mol Immunol* 2011, **48**(4):546-552.
106. Bischoff SC: **Food allergies.** *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007, **10**(1):34-43.
107. Ravetch JV, Bolland S: **IgG Fc receptors.** *Annu Rev Immunol* 2001, **19**:275-290.
108. Weetman AP, Black CM, Cohen SB, Tomlinson R, Banga JP, Reimer CB: **Affinity purification of IgG subclasses and the distribution of thyroid auto-antibody reactivity in Hashimoto's thyroiditis.** *Scand J Immunol* 1989, **30**(1):73-82.
109. Wang L, Ghosh R: **Feasibility study for the fractionation of the major human immunoglobulin G subclasses using hydrophobic interaction membrane chromatography.** *Anal Chem* 2010, **82**(1):452-455.
110. Yavuz H, Akgol S, Say R, Denizli A: **Affinity separation of immunoglobulin G subclasses on dye attached poly(hydroxypropyl methacrylate) beads.** *Int J Biol Macromol* 2006, **39**(4-5):303-309.
111. Skvaril F, Morell A: **The G4 subclass in IgG fractions prepared by ion-exchange chromatography.** *J Immunol* 1970, **104**(5):1310-1312.

112. Bird P, Lowe J, Stokes RP, Bird AG, Ling NR, Jefferis R: **The separation of human serum IgG into subclass fractions by immunoaffinity chromatography and assessment of specific antibody activity.** *J Immunol Methods* 1984, **71**(1):97-105.
113. Persson MA: **Preparation of human sera containing one single IgG subclass using affinity chromatography.** *J Immunol Methods* 1987, **98**(1):91-98.
114. Daeron M, Vivier E: **Biology of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing molecules.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1999, **244**:1-12.
115. Kepley CL, Cambier JC, Morel PA, Lujan D, Ortega E, Wilson BS, Oliver JM: **Negative regulation of FcepsilonRI signaling by FcgammaRII costimulation in human blood basophils.** *J Allergy Clin Immunol* 2000, **106**(2):337-348.
116. Tam SW, Demissie S, Thomas D, Daeron M: **A bispecific antibody against human IgE and human FcgammaRII that inhibits antigen-induced histamine release by human mast cells and basophils.** *Allergy* 2004, **59**(7):772-780.
117. Lilja I, Gustafson-Svard C, Franzen L, Sjodahl R: **Tumor necrosis factor-alpha in ileal mast cells in patients with Crohn's disease.** *Digestion* 2000, **61**(1):68-76.
118. Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ: **Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis.** *Inflamm Bowel Dis* 2008, **14**(11):1504-1513.
119. Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, Hobson JP, Martinez ME, Oliveira-Dos-Santos A, Barra L, Spiegel S, Penninger JM, Rivera J: **Preferential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells.** *J Exp Med* 2003, **197**(11):1453-1465.
120. Hubert-Buron A, Leblond J, Jacquot A, Ducrotte P, Dechelotte P, Coeffier M: **Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting IkappaBalpha ubiquitination.** *J Nutr* 2006, **136**(6):1461-1465.
121. Coskun M, Olsen J, Seidelin JB, Nielsen OH: **MAP kinases in inflammatory bowel disease.** *Clin Chim Acta* 2011, **412**(7-8):513-520.
122. Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Buschenfelde KH: **Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease.** *Ann N Y Acad Sci* 1998, **859**:149-159.
123. Lockyer HM, Tran E, Nelson BH: **STAT5 is essential for Akt/p70S6 kinase activity during IL-2-induced lymphocyte proliferation.** *J Immunol* 2007, **179**(8):5301-5308.
124. Ruiz PA, Haller D: **Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells.** *J Nutr* 2006, **136**(3):664-671.
125. Levy DE, Darnell JE, Jr.: **Stats: transcriptional control and biological impact.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(9):651-662.
126. Chen W, Khurana Hershey GK: **Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **119**(3):529-541; quiz 542-523.

127. Mudter J, Neurath MF: **IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance.** *Inflamm Bowel Dis* 2007, **13**(8):1016-1023.
128. Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kuhbacher T, Hamling J, Folsch UR, Seegert D: **Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease.** *Gut* 2002, **51**(3):379-385.
129. Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft K, Svejgaard A, Eriksen KW, Woetmann A, Odum N: **Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease.** *J Biol Chem* 2003, **278**(19):16777-16781.
130. Coeffier M, Hecketsweiler B, Hecketsweiler P, Dechelotte P: **Effect of glutamine on water and sodium absorption in human jejunum at baseline and during PGE1-induced secretion.** *J Appl Physiol* 2005, **98**(6):2163-2168.
131. Marion R, Coeffier M, Lemoulan S, Gargala G, Ducrotte P, Dechelotte P: **L-Arginine modulates CXC chemokines in the human intestinal epithelial cell line HCT-8 by the NO pathway.** *Biochimie* 2005, **87**(12):1048-1055.
132. Mane J, Fernandez-Banares F, Ojanguren I, Castella E, Bertran X, Bartoli R, Alvarez M, Gassull MA: **Effect of L-arginine on the course of experimental colitis.** *Clin Nutr* 2001, **20**(5):415-422.
133. Coeffier M, Marion R, Ducrotte P, Dechelotte P: **Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut.** *Clin Nutr* 2003, **22**(4):407-413.

6 Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Ernährungsmedizin an der Universität Hohenheim unter der Betreuung von PD Dr. Axel Lorentz entstanden.

Ihm gilt mein besonderer Dank für die Ausstellung und die fachliche Betreuung meiner Arbeit. Danken möchte ich Dr. Axel Lorentz auch für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung vielfältiger Aufgabenbereiche sowie die Anregung und Ermöglichung zur Teilnahme an Kongressen.

Dem Institutsleiter Prof. Dr. Stephan C. Bischoff möchte ich für die fachlichen Anregungen danken.

Prof. Dr. Lutz Graeve danke ich für die offene Bereitschaft, die Zweitkorrektur der vorliegenden Arbeit zu übernehmen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie allen Institutsmitarbeitern möchte herzlich ich für die nette Zusammenarbeit und den anregenden Gesprächen danken.

Den Ansprechpartnern und Mitarbeitern des Katharinenhospital, des Robert-Bosch-Krankenhauses sowie dem Klinikum Esslingen, möchte ich für die Bereitstellung der Darmresektate danken.

Mein verbundener Dank gilt auch der französischen Arbeitsgruppe Dr. Moïse Coëffier für die interessanten Daten, welche zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Danksagung

Dem Zentrum für Ernährungsmedizin danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich allen nahestehenden Menschen danken, die mich auf dem Weg der Doktorarbeit unterstützt und aufgefangen haben, insbesondere meinen Eltern Dagmar und Uwe Lechowski, meinem Bruder Nico Lechowski sowie engen Freunden.

Ganz besonders möchte ich Prof. Dr. Cornelius P. Dullemond, Prof. Dr. Kurt Roth und Dr. Frithjof Brauer danken, die meine Begeisterung für die Forschung geweckt haben und mir in Gedanken oft zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bei Herrn Volker Türk. Er hat mich Weitsicht und Beharrlichkeit gelehrt.

Mein tief verbundener Dank gilt meinem Freund Dr. Holger Gerhards für seine unerschöpfliche Geduld, seine fachlichen Anregungen und seine Diskussionsfreudigkeit. Er hat mich stets ermutigt neue Wege zu gehen.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandra Lechowski

Geburtsdaten: 09.04.1983 in Schönebeck/Elbe

Nationalität: deutsch

Ausbildung und Schule

- | | |
|--------------------|---|
| 2008 – 2011 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ernährungsmedizin
Universität Hohenheim, Stuttgart |
| 2002 – 2008 | Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich Schiller
Universität Jena,
Abschluss: Diplom |
| 2006 – 2007 | Auslandssemester an der Universität Blaise Pascal und der Hochschule
für Landwirtschaft ENITA (école nationale d'ingénieurs de travaux
agricoles) in Clermont Ferrand, Frankreich |
| 1993 – 2002 | Gymnasium Herman Matern in Schönebeck/Elbe,
Abschluss: Abitur |
| 1989-1993 | Grundschule Eggersdorf |

8 Publikationsliste

Originalarbeiten

Lechowski S, Bischoff SC, Lorentz A: Rolle von IgG-Subklassen bei der Aktivierung von menschlichen Darmmastzellen. *Aktuel Ernährungsmed* 2010, **35**:295-300

Lechowski S, Feilhauer K, Staib L, Coëffier M, Bischoff SC, Lorentz A: Combined arginine and glutamine decrease release of *de novo* synthesised leukotrien C₄ and expression of proinflammatory cytokines in activated human intestinal mast cells. *Br J Nutr* 2011, *submitted*

Kongressbeiträge

Lechowski S, Bischoff SC, Lorentz A: Arginine and glutamine decrease IgE-dependent cytokine expression in human mucosal mast cells. *International Congress of Mucosal Immunology*, Paris 2011

Lechowski S, Bischoff SC, Lorentz A: IgE-dependent cytokine expression in human mucosal mast cells is decreased by arginine and glutamine. *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism*, Nizza 2010

Lechowski S, Bischoff SC, Lorentz A: IgE-dependent cytokine expression in human mucosal mast cells is decreased by arginine and glutamine. *International Mast cell and basophil meeting*, Berlin 2010

Lechowski S, Bischoff SC, Lorentz A: Rolle von allergenspezifischen IgG bei Nahrungsmittelallergie. 1. Tagung des Zentrum für Ernährungsmedizin, Tübingen 2009

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Einfluss der IgG-Subklassen sowie der immunmodulatorischen Aminosäuren Arginin und Glutamin auf die Aktivierung menschlicher Darmmastzellen“ selbständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Stuttgart, den 18.10.2011

Sandra Lechowski