

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr.med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bei erhöhter
Mastzelltryptasekonzentration im Serum**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Patrick Mehrle

aus

München

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Bernhard Przybilla

Mitberichterstatter: PD Dr.med. David Vöhringer

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr.med. Franziska Rueff, Dr.med. Carolyn Bauer

Dekan: Prof. Dr.med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACP

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2008

Nie kann die Wissenschaft das Irrationale bewältigen. Darum hat sie auf dieser Welt auch keine Zukunft.

Oscar Wilde

Inhaltsverzeichnis

<u>1 Einleitung</u>	1
<u>2 Stand der Wissenschaft</u>	
2.1 Basophile Granulozyten	
2.1.1 Entdeckung und Bedeutung	2
2.1.2 IgE-abhängige Aktivierung	2
2.1.3 IgE-unabhängige Aktivierung	4
2.1.4 Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten in der Allergologie	5
2.2 Mastzelltryptase	
2.2.1 Struktur und Freisetzung	7
2.2.2 Biologische Aktivität und physiologische Wirkung	9
2.2.3 Klinische Bedeutung	
2.2.3.1 Anaphylaxie	10
2.2.3.2 Mastozytose	12
2.3 Fragestellung der Arbeit	14
<u>3 Patienten, Material und Methoden</u>	
3.1 Patienten	15
3.2 Material	
3.2.1 Reagenzien	15
3.2.2 Geräte	16
3.3 Histaminfreisetzungstest aus basophilen Granulozyten	
3.3.1 Blutentnahme und Sedimentation	17
3.3.2 Aufbereitung der Leukozyten	17
3.3.3 Stimuli und deren Konzentrationen	17
3.3.4 Stimulation der Leukozyten	18
3.4 Berechnung der Histaminfreisetzung	19
3.5 Statistische Auswertung	20

<u>4 Ergebnisse</u>	
4.1. Klinische Patientendaten	21
4.2 Histaminfreisetzung im Gruppenvergleich	
4.2.1 IgE-unabhängige Aktivierung	
4.2.1.1 C5a	23
4.2.1.2 FMLP	24
4.2.1.3 Calciumionophore	25
4.2.2 IgE-abhängige Aktivierung mit Anti-IgE	26
4.3 Gesamthistamingehalt im Gruppenvergleich	29
4.4 Gesamt-IgE-Konzentration im Gruppenvergleich	30
<u>5 Diskussion</u>	
5.1 Variabilität der Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten	32
5.2 Histaminfreisetzung nach Stimulation mit C5a	33
5.3 Histaminfreisetzung nach Stimulation mit FMLP, Calciumionophore und Anti-IgE	36
5.4 Gesamthistamingehalt im Gruppenvergleich	38
5.5 Gesamt-IgE-Gehalt im Gruppenvergleich	39
5.6 Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten und Mastzellen im Vergleich	40
<u>6 Zusammenfassung</u>	42
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	44
<u>8 Danksagung</u>	53
<u>9 Lebenslauf</u>	54

1 Einleitung

Das biogene Amin Histamin wird in Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert und gespeichert. Über spezifische Rezeptoren, die ubiquitär im Körper verteilt sind, übt es unterschiedliche Wirkungen aus. Neben der Erregung nozizeptiver Nervenfasern kommt es unter anderem zu einer Permeabilitätserhöhung des Gefäßendothels, zu einer Konstriktion glatter Muskelzellen, zu einer Sekretion von Schleim und Prostaglandinen sowie zu einer Hemmung der Leukozytenfunktion. Damit trägt es als Mediators substanz entscheidend zu Pathologie und Symptomatik von Krankheitsbildern wie Allergie, Anaphylaxie und Mastozytose bei.

In der Diagnostik oben genannter Krankheitsbilder bedient man sich der Bestimmung der Mastzelltryptase. Dieses Enzym wird hauptsächlich von Mastzellen freigesetzt und spiegelt damit die Beteiligung jenes Zelltyps bei systemischen Reaktionen im Serum wider. Auf dieser Grundlage war es möglich, eine nicht-invasive und zugleich aufschlußreiche und verlässliche Testmethode zu etablieren, um den Schweregrad dieser Prozesse repräsentativ quantifizieren zu können.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Basophile Granulozyten

2.1.1 Entdeckung und Bedeutung

Die basophilen Granulozyten repräsentieren die kleinste Fraktion (< 1%) der peripheren Blutleukozyten. Mit einem Durchmesser von 8 - 11 µm sind sie kleiner als die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Ihre Granula (0,2 – 1 µm) lassen sich aufgrund des hohen Gehalts an negativ geladenen, sulfatierten Polysacchariden wie Heparin mit positiv geladenen, basophilen Farbstoffen sichtbar machen (88). Dies trug entscheidend zu ihrer Entdeckung und Benennung durch Paul Ehrlich im Jahr 1879 bei.

Jener hatte ein Jahr zuvor einen morphologisch ähnlichen, aber gewebeständigen Zelltyp als Mastzellen identifiziert. Lange Zeit betrachtete man die basophilen Granulozyten als minderwertige oder möglicherweise überflüssige „zirkulierende Mastzellen“. Diese Ansicht gilt heute als längst überholt. Denn beide Zelltypen besitzen neben weiteren Rezeptoren den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI. Dieser vermittelt die Freisetzung einer Reihe von proinflammatorischen Mediatoren, die maßgeblich für die Symptome der allergischen Entzündung verantwortlich sind.

Es wurde inzwischen auch evident, daß basophile Granulozyten nicht nur auf eine große Anzahl von Stimuli und Zytokinen ansprechen, sondern auch letztere (i.e. IL-4 und IL-13) selbst produzieren können. Damit können sie als Zellen mit immunmodulatorischer Kompetenz gelten, die einen entscheidenden Einfluß auf die Pathogenese allergischer Krankheitsprozesse ausüben (36; 105). Daneben unterstrich die Entdeckung, daß sie zusammen mit eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten selektiv allergisch entzündete Gewebe infiltrieren und dort direkt Histamin und Zytokine freisetzen können, die Bedeutsamkeit dieses Zelltyps weiter (19).

2.1.2 IgE-abhängige Aktivierung

Der exakte Mechanismus der Histaminfreisetzung stellt sich als äußerst komplex heraus. Er soll an dieser Stelle nur in einer für die Arbeit relevanten und vereinfachten Weise dargestellt werden, zur Vertiefung sei auf entsprechende Arbeiten hingewiesen (19; 88).

Die IgE-abhängige Form der Stimulierung findet dann statt, wenn zwei IgE-Moleküle an dem spezifischen FcεRI-Rezeptor brückenartig miteinander verbunden werden. Dies kann

entweder durch ein als spezifisches Allergen wirksames Antigen oder durch IgE-Antikörper erfolgen. Letztere setzt man *in vitro* ein, da sie die Fähigkeit haben, die Situation der allergischen Antigenstimulation bei allergischen wie nicht-allergischen Spendern in gleichem Maße nachzuahmen.

Die besagte Vernetzung führt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung rezeptorassoziierter Tyrosinkinasen, vor allem p53/56lyn und p72syk. Eine fehlende Expression derselben soll für den sogenannten Nonreleaser-Phänotyp bei basophilen Granulozyten verantwortlich sein (40).

Die IgE-abhängige Stimulation aktiviert mittels besagter Tyrosinkinasen die Phospholipase C. Diese bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) die beiden Second Messenger Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Während IP₃ durch Entleerung der intrazellulären Speicher (endoplasmatisches Retikulum, ER) den zytosolischen Kalziumspiegel erhöht, aktiviert DAG die kalziumabhängige Proteinkinase C (PKC). Insbesondere die Charakteristik der Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels spielt eine entscheidende Rolle bei der Histaminfreisetzung: die IgE-abhängige Stimulation führt zu einer langfristigen Erhöhung des Spiegels. Dies geschieht sowohl mittels Entleerung des ER als auch mittels Einstrom extrazellulären Kalziums durch geöffnete Kanäle. Beides resultiert in einer Freisetzung von Histamin und Leukotrienen, zusätzlich ist es auch die Voraussetzung für die Synthese der Zytokine IL-4 und IL-13. Es wird dabei vorsynthetisiertes und in den Granula gespeichertes Histamin ausgeschüttet (etwa 1 pg pro Zelle). Unter optimalen Bedingungen ist die Histaminfreisetzung nach nahezu 20 Minuten abgeschlossen.

Weiterhin erfolgt die Neusynthese von Leukotrien C₄ (LTC₄), welches in einem ähnlichen Zeitfenster wie Histamin ausgeschüttet wird (88). Es handelt sich hierbei nur um einen winzigen Bruchteil (ca. 10 - 100 fg) der freigesetzten Histaminmenge. LTC₄ besitzt im Vergleich zu Histamin eine potenzierte Wirksamkeit, die eine bis zu 6.000fach stärkere Konstriktion an glatten Muskelzellen auslöst (4).

Wie bereits erwähnt kommt es außerdem zur Ausschüttung von IL-4 und IL-13, die den Gesamtprozeß der Pathogenese von allergischen Entzündungen entscheidend beeinflussen. Man geht davon aus, daß basophile Granulozyten die Hauptproduzenten dieser Mediatoren sind (7; 26; 46; 57; 39; 69; 83; 16).

IL-4 wird nach IgE-abhängiger Stimulation in einem Zeitraum von zwei (halbmaximale Reaktion) bis vier Stunden (komplette Reaktion) ausgeschüttet (57; 83; 87). Die IL-13-Antwort beginnt hingegen erst nach einigen Stunden mit einem Maximum nach etwa 20 Stunden (46; 73).

Es seien an dieser Stelle unter zahlreichen lediglich drei wichtige Eigenschaften von IL-4 und IL-13 hervorgehoben: Erstens veranlassen die beiden Zytokine eine vermehrte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (14). Zum zweiten sind sie die einzig bekannten Zytokine, die einen Isotypen-Wechsel von IgM zu IgE bei B-Lymphozyten auslösen können (14; 104; 72; 103). Drittens können sie das Gefäßendothelium zur Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 veranlassen, welches die selektive transendotheliale Migration von eosinophilen und basophilen Granulozyten und T-Lymphozyten bewirkt (5; 82).

2.1.3 IgE-unabhängige Aktivierung

Seit vielen Jahren weiß man, daß basophile Granulozyten auf eine ganze Reihe von verschiedensten Substanzen ansprechen, die unabhängig von der Kreuzvernetzung und der Anwesenheit von IgE zu einer Mediatorfreisetzung führen können (85). Der Komplementfaktor C5a, das Bakterienpeptid f-Met-Leu-Phe (FMLP) und das Calciumionophore A23187 wurden als erste Stimuli dieser Art entdeckt (47; 95; 96).

Nach IgE-unabhängiger Stimulierung ist die komplette Histaminausschüttung innerhalb von zwei Minuten abgeschlossen, also erheblich schneller als IgE-vermittelt. Dies läßt somit auf alternative Signalkaskaden schließen: IgE-unabhängige Stimuli aktivieren ebenfalls die Phospholipase C. Sie tun das jedoch auf direktem Wege und unter Umgehung des durch die Vernetzung zweier IgE-Moleküle ausgelösten Mechanismus.

Im Fall von C5a geht man von CD88 als dem entsprechenden Rezeptor aus (19), im Fall von FMLP von einem G-Protein-assoziierten Rezeptortypen (88). Beide Stimuli sind zur Freisetzung von Histamin und Leukotrienen befähigt (107), jedoch nicht zur Ausschüttung von IL-4 und IL-13 (46; 69; 73; 83). Diese Tatsache begründet man damit, daß sie lediglich eine kurzfristige Erhöhung des zytosolischen Kalziumspiegels herbeiführen können.

Die Stimulation mit Calciumionophore führt dagegen direkt und unvermittelt zu einem anhaltend hohen intrazellulären Kalziumspiegel. Dies wird einerseits durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher mittels IP₃ und andererseits durch Öffnung von Kalziumkanälen und nachfolgendem Ioneneinstrom erreicht. Damit ahmt es hinsichtlich seiner Wirkung auf die Zelle den Effekt der IgE-abhängigen Aktivierung nach. Daraus folgt, daß Calciumionophore, zusätzlich zur Histamin- und Leukotrienfreisetzung, die Synthese und Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-13 bewirken kann (19). Daraus wird ersichtlich, daß eine langfristige Erhöhung des intrazellulären Kalziums eine unbedingte Voraussetzung für die Zytokinfreisetzung darstellt. Somit nimmt die Konzentration dieses Ions - intra- wie extrazellulär - eine zentrale Position in der Signalkaskade basophiler Granulozyten ein.

Schließlich sei der Vollständigkeit halber noch der Stimulus IL-3 erwähnt, der in der vorliegenden Untersuchung jedoch keine Anwendung fand. Dieses Zytokin tritt als zusätzlicher Verstärker anderer Mediatoren bei IgE-abhängiger wie IgE-unabhängiger Aktivierung auf und führt zu einer erheblich gesteigerten Mediatorfreisetzung. Anders ausgedrückt: die Zellen werden durch das Zytokin sensibilisiert. Das legt die Vermutung nahe, daß basophile Granulozyten von Allergieklienten auf eben diese Weise beeinflußt sein könnten. Die Tatsache, daß basophile Granulozyten nach Inkubation mit C5a zusammen mit IL-3 ebenfalls die Zytokine IL-4 und IL-13 ausschütten, deutete man dahingehend, daß diese Zellen auch bei bakteriellen Entzündungen eine Bedeutung haben könnten (19).

2.1.4 Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten in der Allergologie

Seit nunmehr über 30 Jahren nutzt man in der allergologischen Diagnostik die Fähigkeit der basophilen Granulozyten, nach IgE-abhängiger wie IgE-unabhängiger Stimulation Histamin und weitere Mediatoren auszuschütten. Dabei beruhen die gewonnenen Erkenntnisse wesentlich auf In-vitro-Studien mit Zellen aus peripherem Blut. Der enge Zusammenhang mit dem klinischen Status rechtfertigt jedoch die Anwendung in vitro (84). Diese In-vitro-Testung wurde in unterschiedlichen Varianten beschrieben, darunter auch für Zellen im Vollblut (96). Am häufigsten und gebräuchlichsten ist die Testung mit gewaschenen Blutleukozyten.

Die Histaminfreisetzung folgt einer glockenförmigen Dosiswirkungskurve, wenn die basophilen Granulozyten einer dosisabhängigen Stimulation ausgesetzt sind (Abbildung 1). Die niedrigste Dosis des Allergens bzw. des Stimulus, auf welche die Zellen mit einer

Histaminfreisetzung reagieren, spiegelt die Zellsensitivität wieder und ist dahingehend definiert worden (97).

Die maximale Histaminfreisetzung, bezogen in Prozent auf das Gesamthistamin der Zellen und auch als Zellreaktivität bezeichnet (97), ist offenbar eine Funktion der intrazellulären Signalübertragung. Sie verhält sich unabhängig vom Sensibilisierungsgrad der Zellen (56).

Der abfallende Teil der Dosiswirkungskurve im Bereich höherer Allergen- bzw. Stimulusdosen wird durch eine Überschußhemmung verursacht, das heißt es bestehen durch Stimulusüberschuß keine optimalen Bedingungen mehr für die Überbrückung zweier IgE-Moleküle. Dieser Bereich der Kurve ist für die Auswertung nur von theoretischem Interesse (44).

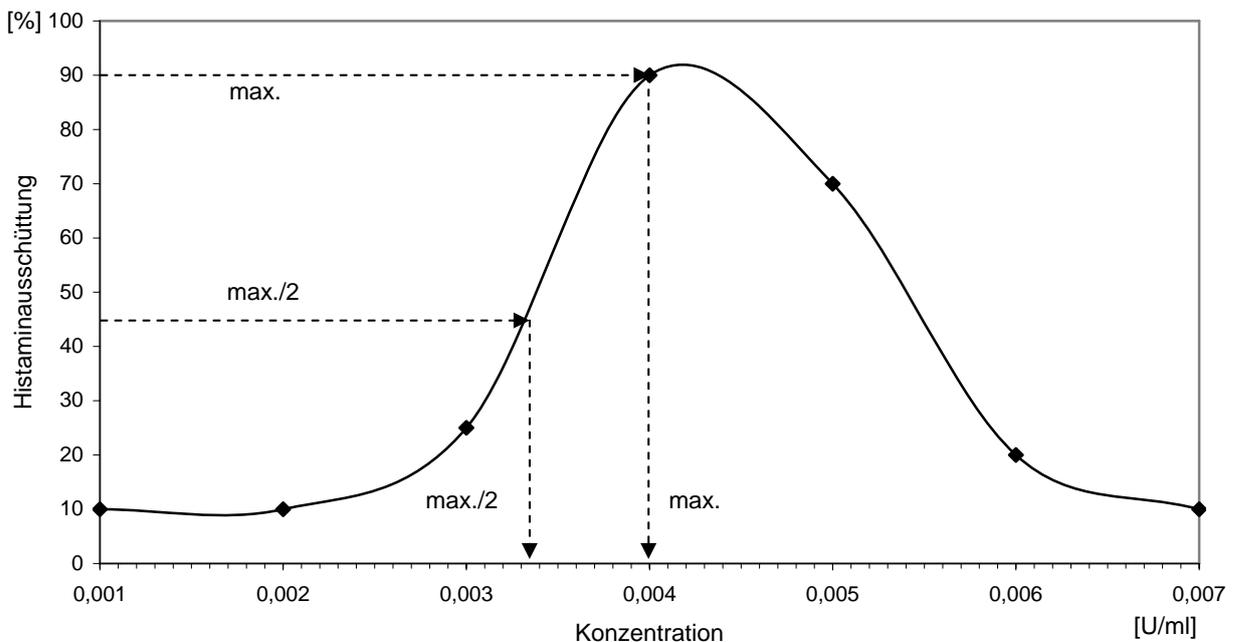


Abb.1: Dosiswirkungskurve der Histaminfreisetzung mit beliebigem Stimulus (44)

Ungefähr 10-15% der Bevölkerung sind sogenannte „Non-Releaser“, d.h. die Signalübertragung ist dahingehend verändert, daß es trotz erfolgreicher Kreuzvernetzung der membrangebundenen IgE-Moleküle zu keinerlei Ausschüttung kommt. In diesen Fällen schließt die ausbleibende Histaminfreisetzung nach optimaler Stimulation mit Anti-IgE (< 5% vom Gesamthistamin) a priori eine Auswertung der induzierten Zellantwort aus (66).

Die Histaminfreisetzung weist eine enorme Variabilität der individuellen Reaktionsmuster auf: die Zellsensitivität kann zwischen Individuen und unterschiedlichen Allergenen bzw. Stimuli über das 100-fache variieren (97). Die Zellreaktivität kann zwischen 0 und 100% des Gesamthistamins schwanken.

Diese Streuung ist dadurch zu erklären, daß man derzeit fünf unabhängige Variablen kennt, welche die Histaminausschüttung maßgeblich beeinflussen. Das Zusammenspiel dieser Variablen entscheidet über den individuellen Verlauf der Dosiswirkungskurven (44).

1. Die zelluläre Rezeptorendichte (Anzahl der Rezeptoren pro Zelle (13; 15; 61)).
2. Die absolute Zellsensitivität der Zelle (Anzahl der IgE- bzw. Stimulus-Moleküle für 50% der maximal möglichen Zellantwort (53; 56)).
3. Der Anteil der allergen- bzw. stimuluspezifischen IgE-Antikörper (Anzahl der spezifischen Moleküle pro Zelle (67; 13; 56)).
4. Die zelluläre Reaktivität der Zelle (maximale Histaminausschüttung nach optimaler Stimulation (61; 66; 56)).
5. Die charakteristischen Eigenschaften der Allergene bzw. Stimuli (z.B. Konzentration der Einzelmoleküle und potentiellen Bindungsstellen, physikalische und chemische Eigenschaften).

Die Histaminfreisetzung läßt sich außerdem durch eine Reihe von pharmakologischen Substanzen beeinflussen (64): Außer H1- (89) und H2-Agonisten (41) können - in geringerem Ausmaß - auch H1- bzw. H2-Antagonisten (75; 42) die IgE-vermittelte Histaminausschüttung unterdrücken, ebenso langwirksame β 2-Sympathomimetika (43). Die erwähnten Ergebnisse sind jedoch nicht ohne weiteres auf die In-vivo-Situation übertragbar, weil die zur Inhibition erforderlichen Medikamentenkonzentrationen im menschlichen Organismus oftmals gar nicht erreicht werden (44).

2.2 Mastzelltryptase

2.2.1 Struktur und Freisetzung

Die Granula der Mastzellen und – zu einem sehr geringeren Anteil - auch der basophilen Granulozyten enthalten neben Histamin und Heparin sowie weiteren Proteasen das Enzym Mastzelltryptase (91) Das Enzym wird bei der Degranulation nach IgE-abhängiger wie IgE-unabhängiger Aktivierung freigesetzt. Aus diesem Grund kommt der Messung des

Tryptasespiegels als Parameter eine wesentliche Bedeutung bei der Diagnostik und der Verlaufsbestimmung von Erkrankungen wie Allergie, Anaphylaxie, Mastozytose und weiteren Erkrankungen zu (90).

Die Tryptase ist eine neutrale Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 134 kDa. Die entsprechenden Gene, die sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 befinden, kodieren eine α -, β - und γ -Form des Enzyms (10). Bisher ging man davon aus, daß die α -Form den Hauptanteil der Tryptasen bei der Grundkonzentration im Serum bzw. bei der Mastozytose bildet (71).

Quantitativ vorherrschend sind die α - und die β -Form der Mastzelltryptase, die zwar zu fast 90% der Sequenzen identisch sind, sich aber erheblich in Aktivierung, Freisetzung und Aktivität unterscheiden. Die α -Tryptase besitzt eine Mutation ihres Propeptids, was eine Abspaltung vom Enzym unmöglich macht. Dies hat zur Folge, daß die α -Tryptase als inaktives Proenzym konstitutiv sezerniert und nicht in den Granula gespeichert wird. Zusätzlich besteht ein funktioneller Defekt des aktiven Zentrums (94).

Für die β -Form existieren zwei Freisetzungswege: zum einen konstitutiv als inaktives Proenzym, zum anderen nach Abspaltung des Propeptids und Bildung eines katalytisch aktiven Tetramers, welches in den Granula gespeichert und auf Stimulation hin ausgeschüttet wird, wie zum Beispiel bei anaphylaktischen oder anderen allergischen Reaktionen. Durch ihre tetramerische und durch Heparin stabilisierte Struktur mit vier nach innen gerichteten Monomeren bleibt die Mastzelltryptase gegenüber Inaktivierung durch Inhibitoren von Serinproteasen wie α -Proteinase-Inhibitor, α 2-Makroglobulin oder Aprotinin weitgehend resistent (74).

Den quantitativ kleinsten Anteil nimmt die γ -Tryptase ein. Sie wird ebenfalls durch Abspaltung des Propeptids aktiviert, bleibt aber stets membranständig gebunden, sowohl während der Speicherung an der Granulamembran als auch nach Freisetzung an der extrazellulären Oberfläche der Zellmembran (11).

Unter physiologischen Bedingungen bestimmen somit die Pro- α - und die Pro- β -Tryptase die Höhe der messbaren Gesamtkonzentration im Serum, wobei die Pro- β -Tryptase den Hauptteil ausmacht. Dies kann man daraus ersehen, daß ein Fehlen der kodierenden α -Gene nur zu

einer minimalen Abnahme der basalen Konzentration im Serum führt (94). Auf diese Weise repräsentiert der Pro- β -Tryptase-Spiegel weitestgehend die Last an Mastzellen im Organismus und kann sich dementsprechend bei Vorliegen einer Mastozytose erhöht zeigen. Ein erhöhter Spiegel der reifen β -Tryptase kann hingegen einen Hinweis auf allergische bzw. anaphylaktische Reaktionen geben.

2.2.2 Biologische Aktivität und physiologische Wirkung

Die Mastzelltryptase bindet an die sogenannten proteaseaktivierten Rezeptoren (PAR), die G-Protein gekoppelt sind. Mittlerweile wurden vier unterschiedliche Rezeptoren identifiziert (38). Dabei aktiviert die β -Tryptase den PAR2-Rezeptor, der daraufhin einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels durch Entleerung der Depots verursacht (3). Dieser Vorgang der Kalziumerhöhung ist - wie bereits erwähnt - auch bei der Signalkaskade zur Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten von Wichtigkeit. PAR befinden sich unter anderem auf Epithel- und Muskelzellen der Atemwege, auf terminalen Bronchialepithelzellen, Typ-II-Pneumozyten, Mastzellen innerhalb des Respirationstraktes sowie auf Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen (45).

In früheren Arbeiten betrachtete man die Mastzelltryptase hauptsächlich unter dem Gesichtspunkt der Enzymfunktion und hob dabei die Fähigkeit zur Spaltung extrazellulärer Substrate wie vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Fibronectin oder Kininogenen hervor (49; 101; 106).

Dann machte man die Entdeckung, daß Tryptase einen äußerst potenten Wachstumsfaktor für Epithelzellen, Fibroblasten und glatte Muskulatur der Atemwege darstellt. So bewirkt sie die Freisetzung von IL-8 und die vermehrte Expression von ICAM-1 auf Epithelzellen (6; 8; 9; 28; 79). Außerdem regt sie die Produktion von IL-1 β -mRNA an, die bei der Rekrutierung von Entzündungszellen in Geweben mit aktivierten Mastzellen eine gewisse Rolle spielt (12).

Die Mastzelltryptase ist weiterhin in der Lage, die mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität im Entzündungsgebiet zu steigern und so den Entzündungsprozeß maßgeblich aufrechtzuerhalten (31; 71). Dies unterstreicht ihre Wichtigkeit für die Pathogenese der allergischen Immunantwort. In diesem Zusammenhang wurde sie in broncho-alveolärer Lavage-Flüssigkeit bei Asthmatikern (108), in nasaler Lavage-Flüssigkeit bei allergischer Rhinitis (34) oder im Serum von anaphylaktischen Patienten (90) nachgewiesen.

Zusätzlich analysierte man die Rolle der Mastzelltryptase bei der Vermittlung der Neuropeptidfreisetzung von sensorischen Neuronen: etwa 60% der Neurone exprimieren den PAR2-Rezeptor, und bis zu 40% davon setzen Substanz P und CGRP (calcitonine gene-related peptide) frei, zwei proinflammatorische Neuropeptide (2; 100). Die Tryptase veranlaßt über den PAR2-Rezeptor eine Erregung von sensorischen Neuronen, was sich in der Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels äußert. Dies wiederum führt zur Ausschüttung der Mediatoren Substanz P und CGRP. Das legt die Schlußfolgerung nahe, daß die PAR2-Rezeptoren der sensorischen Neurone einen nicht zu unterschätzenden Einfluß auf die Pathogenese der neurogenen Entzündung haben. (71).

Unlängst hat sich herausgestellt, daß auch basophile Granulozyten im Blut die Mastzelltryptase in nicht unerheblichen Mengen enthalten. Man hat tryptaseproduzierende Zellen im peripheren Blut - sowohl von gesunden Patienten als auch von Asthmatikern - phänotypisch als basophile Granulozyten identifiziert. Dabei variiert der Gehalt an Tryptase zwischen den Zellen erheblich und kann sogar das Niveau von Mastzellen erreichen. Jedoch kann man den Tryptasegehalt der basophilen Granulozyten nicht mit der Anwesenheit pathologischer Zustände (allergisches Asthma oder Mastozytose) korrelieren (23; 37).

2.2.3 Klinische Bedeutung

2.2.3.1 Anaphylaxie

Zur quantitativen Bestimmung der Mastzelltryptase wird in der allergologischen Diagnostik seit etwa zehn Jahren das kommerzielle in vitro-System UniCAP Tryptase verwendet (Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Uppsala, Schweden). Dabei wird die Gesamtkonzentration der Tryptase im Serum mittels Immunfluoreszenz gemessen, die Nachweisgrenze des Tests liegt unter 1 ng/ml (102). Eine Untersuchung des Testherstellers bezüglich der durchschnittlichen Mastzelltryptasekonzentration im Serum ergab einen Mittelwert von 3,8 µg/ml bei einer 95. Perzentile von 11,4 µg/ml. Letztere diente als oberer Grenzwert für die Kontrollgruppe der vorliegenden Untersuchung.

Die Serumkonzentration der Mastzelltryptase steigt bei der Mehrzahl der Patienten mit systemischer Anaphylaxie an (90). In diesem Zusammenhang ergab eine Studie, daß die Bestimmung der Gesamt-Tryptase eine Spezifität von 92% aufweist, bei einer Sensivität von 35% (18). Da die Mastzellen bei einer systemischen Reaktion - neben Histamin und anderen

Mediatoren - reife β -Tryptase ausschütten, kann eine größere Spezifität durch die selektive Messung dieses Subtyps erreicht werden. Bei einer anaphylaktischen Reaktion im Rahmen einer vorbestehenden Mastozytose kann außerdem eine gesonderte Bestimmung des Pro- β -Tryptasespiegels hilfreich sein (22).

Eine andere Studie untersuchte das Verhältnis zwischen dem Ausmaß allergischer Reaktionen nach Insektenstich und der Mastzellkonzentration im Serum. Dabei beobachtete man, daß Wespengiftallergiker mit konstitutionell erhöhter Tryptasekonzentration ($> 13,5$ ng/ml) stärker zu einer schweren systemischen Anaphylaxie neigen als Patienten mit niedrigem Spiegel. Zudem haben insektengiftallergische Patienten mit Mastozytose ein erhöhtes Risiko für eine schwere anaphylaktische Reaktion nach Insektenstich (51). Dieser Zusammenhang konnte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden (50; 77). Deswegen ist bei diesem Patientenkollektiv eine Hyposensibilisierung von besonderer Bedeutung. Ob oben genannten Beobachtungen nun ein Anstieg an Effektorzellen oder eine gesteigerte Mediatorfreisetzung als pathogenetischem Mechanismus zugrunde liegt, ist ungeklärt und läßt Raum für weitere Untersuchungen.

Die Tryptase hat aufgrund ihrer Assoziation mit einem Proteoglykankomplex die Eigenschaft, sich langsamer im Organismus zu verteilen als das Histamin (88). So erreicht der Tryptasespiegel nach 15 - 120 Minuten seinen Höchststand, bei einer Halbwertszeit von eineinhalb bis zweieinhalb Stunden. Das Histamin hingegen erreicht schon nach etwa fünf Minuten seinen Spitzenwert und kehrt bereits nach 15 - 30 Minuten wieder zum Basiswert zurück (71). Die klinische Relevanz dieser Tatsache liegt in dem stark vergrößerten Zeitfenster für die Akutdiagnostik. Beispielsweise kann ein Anstieg der Tryptase in Blutproben nachgewiesen werden, welche bis zu sechs Stunden nach Beginn einer anaphylaktischen Reaktion gewonnen wurden, verglichen mit einem nur 15 Minuten langen Intervall für den Histaminnachweis. So ist es möglich, nach bis zu drei Tagen eine erhöhte Tryptasekonzentration bei verstorbenen Patienten zu ermitteln (21). Jedoch ist zu beachten, daß die Tryptasekonzentration auch unspezifisch erhöht sein kann, zum Beispiel nach Tod durch Trauma (17). Somit muß eine post mortem gewonnene Blutprobe, die eine erhöhte Tryptasekonzentration aufweist, stets mit dem vorliegenden klinischen Bild abgeglichen werden, um die Diagnose Anaphylaxie stellen zu können.

2.2.3.2 Mastozytose

Der Begriff Mastozytose faßt ein heterogenes Spektrum von Krankheitsbildern zusammen (Tabelle 1). Sie sind charakterisiert durch eine Vermehrung von – zum Teil morphologisch veränderten - Mastzellen. Man muß die Mastozytose dabei von einer reaktiven Vermehrung von Mastzellen abgrenzen. Die Mastzellhyperplasie findet sich am häufigsten in der Haut (kutane Mastozytose), bei systemischer Mastozytose sind zusätzlich oder ausschließlich innere Organe infiltriert, am häufigsten Knochenmark, lymphatische Organe (Lymphknoten, Milz), Gastrointestinaltrakt, Leber und Lunge (27).

Tab. 1: WHO-Klassifikation der Mastozytosen (103).

Kutane Mastozytose
Urticaria pigmentosa (makulopapulöse kutane Mastozytose)
Diffuse kutane Mastozytose
Mastozytom der Haut
Indolente systemische Mastozytose =>“Smoldering” Mastozytose => Isolierter Befall des Knochenmarks
Systemische Mastozytose assoziiert mit einer klonalen, nicht mastzellbezogenen hämatologischen Erkrankung
Aggressive systemische Mastozytose
Mastzell-Leukämie
Mastzellsarkom (MCS)
Extrakutanes Mastozytom

Die Pathogenese der Mastzellhyperplasie bleibt bislang weitgehend unklar. Jedoch findet man bei systemischer Manifestation im Erwachsenenalter eine Mutation des aktivierenden KIT-Rezeptors. Es sind bereits zehn Mutationen von c-kit, dem kodierenden Gen des KIT-Rezeptors, identifiziert. Die häufigste Mutation ist auf Kodon Nummer 816 (D816V) zu finden, ein Austausch von Asparagin gegen Valin. Die Mutation des Rezeptors führt zu seiner Aktivierung unabhängig von der Anwesenheit eines Liganden. Dies hat eine Vermehrung und Verlängerung der Überlebenszeit der Mastzellen zur Folge. Eine c-kit-Mutation ist zwar Voraussetzung, aber anscheinend kein alleiniger Faktor für die Pathogenese der Mastozytose.

Denn diese Mutation ist – unabhängig von der Mastozytose - auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen nachweisbar (103).

Ein zweiter entscheidender Aspekt könnte die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von neoplastischen Mastzellen sein, die auf gesunden Mastzellen nicht zu finden sind, so zum Beispiel CD2 (LFA-2). Da die Zellen ebenfalls CD58 (LFA-3), den physiologischen Liganden von CD2, exprimieren, kann man davon ausgehen, daß so entstehende CD2-CD58-Bindungen einen erheblichen Beitrag zur pathologischen Anhäufung und Verklumpung der Zellinfiltrate leisten. Da die Mastozytosebehandlung bislang ausschließlich symptomatisch erfolgt, könnten diese Erkenntnisse ein Ansatzpunkt für kausale Therapien der Zukunft sein (103).

Man hat sich unlängst auf international gültige WHO

O-Kriterien geeinigt, welche die Diagnose der systemischen Mastozytose eindeutig definieren (Tabelle 2). Die Kriterien sind in Haupt- und Nebenkriterien unterteilt, wobei mindestens ein Haupt- und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien erfüllt sein müssen.

Tab. 2: WHO-Kriterien für die Diagnostik der systemischen Mastozytose (103).

Hauptkriterien	Multifokale, dichte Mastzellinfiltrate (Zellhaufen > 15 Zellen) → im Knochenmark → in anderen extrakutanen Organen
Nebenkriterien	→ Mastzellen im Knochenmark oder anderen extrakutanen Organen mit abnormaler Morphologie (z.B. > 25 % spindelförmige Mastzellen) → Mastzellen in extrakutanen Organen mit c-kit-Mutation auf Kodon 816 (meistens D816V) → Mastzellen im Knochenmark CD2- und/oder CD25-positiv → Mastzelltryptasekonzentration >20 µg/ml

Eine Mastzelltryptasekonzentration im Serum > 20 µg/l stellt in den WHO-Kriterien ein Nebenkriterium für die systemische Mastozytose dar. Somit ist das Enzym als wichtiger Parameter zur Diagnose und Verlaufskontrolle zu sehen. Dies bestätigt eine Untersuchung, die zusätzlich feststellte, daß die Höhe des Serumspiegels auch bei der Differenzierung der

Manifestationsformen sowie deren Prognose eine wertvolle Hilfestellung leistet (98). Um aber die Tryptasewerte interpretieren zu können, ist die auch Beurteilung des klinischen Bildes für die Diagnose notwendig. So stellte eine andere Untersuchung heraus, daß bei einem Viertel der untersuchten Patienten mit systemischer Mastozytose der basale Spiegel unter 20 µg/l lag. Von diesen blieb noch einmal ein Viertel unter der 95. Perzentile von 11,4 µg/l, was definitionsgemäß einer physiologischen Konzentration entspricht (78).

2.3 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation wurde die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bei Patienten mit erhöhter Mastzelltryptasekonzentration im Serum untersucht. Dabei wurde die Histaminausschüttung nach IgE-abhängiger Stimulation mit Anti-IgE sowie nach IgE-unabhängiger Stimulation mit C5a, FMLP und Calciumionophore im Histaminfreisetzungstest gemessen und vor dem Hintergrund der Tryptasekonzentration im Patientenserum verglichen.

Zusätzlich erfolgte der Vergleich des Gesamthistamingehalts und der Gesamt-IgE-Konzentration zwischen den drei Patientengruppen.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

Die Probanden stellten sich in der Allergologischen Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München vor. Sie wurden entsprechend der basalen Mastzelltryptasekonzentration im Serum konsekutiv und zufällig ausgewählt.

Alle Probanden wurden auf das Vorliegen einer atopischen Disposition hin überprüft: dafür mußte anamnestisch mindestens ein positives Prick-Testergebnis für Katze, Milbe oder Gras oder eine bereits bekannte Erkrankung des atopischen Formenkreises (Asthma, atopisches Ekzem, allergische Rhinitis) vorbekannt sein. Eine zusätzliche Charakterisierung der atopischen Diathese erfolgte durch die Messung der Gesamt-IgE-Konzentration im Serum.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit systemischer Einnahme von Glukokortikoiden oder Antihistaminika sowie Patienten mit aktuellen viralen/bakteriellen Infekten bzw. Begleiterkrankungen in der Anamnese.

3.2 Material

3.2.1 Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden verwendet:

- Calciumchlorid (CaCl_2) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- D-Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt)
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Perchlorsäure (H_2SO_4 ; 2%)
- PIPES: Piperazine-N,N'-bis-2-Ethane Sulfonic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Humanes Serumalbumin (HSA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Thomaedex 60 (Sedimentationslösung; Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland)

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden verwendet:

- 10 x PIPES-Puffer (250 PIPES; 1,1 M NaCl; 50 mM KCl): 64,3 g NaCl, 3,85 g KCl, 83,83 g PIPES, ad ca. 900 ml ddH₂O, pH auf 7,4 (mit 10 M NaOH), ad 1000 ml ddH₂O
- PAG (PIPES-Albumin-Glukose)-Puffer: 100 ml 10 x PIPES, 1g Dextrose, 10 ml 0,3% HSA-Lösung, ad 900 ml ddH₂O, pH auf 7,4 (mit 10 M NaOH), ad 1000 ml ddH₂O
- PAG/EDTA-Puffer: 100 ml 10 x PIPES, 40 ml 100 mM EDTA, 1 g Dextrose, 10 ml 0,3% HSA-Lösung, ad 900 ml ddH₂O, pH auf 7,4 (mit 10 M NaOH), ad 1000 ml ddH₂O
- PAG-CM-Puffer: 100 ml 10 x PIPES, 20 ml 0,1 mM CaCl₂, 5 ml 0,1 M MgCl₂, 1 g Dextrose, 10 ml 0,3% HSA-Lösung, ad 900 ml ddH₂O, pH auf 7,4 (mit 10 M NaOH), ad 1000 ml ddH₂O
- TCM-Puffer: 35,0 g NaCl, Tris 15,0 g, 1,5 g KCl, 1,0 g MgCl₂ x 6H₂O, 0,735 g CaCl₂ x 2H₂O, ad 5000 ml ddH₂O (pH auf 7,4)
- Magnesium-Lösung: 0,1 M MgCl₂-Lösung, 2,03 g MgCl₂ (kristallin), ad 100 ml ddH₂O
- Calcium-Lösung: 0,1 M CaCl₂-Lösung, 2,03 g CaCl₂ (kristallin), ad 100 ml ddH₂O
- HSA-Lösung (3%): 1 g HSA auf 33,34 ml ddH₂O -
- Sedimentationslösung Thomaedex 60 (6% mit 0,9% NaCl): 60 g Dextran 60.000 9 g NaCl, ad 1.000 ml ddH₂O

3.2.2 Geräte

- Spritzen 5 ml, 10 ml, 20 ml (Braun, Melsungen)
- Combitips 2,5 ml, 5ml (Eppendorf, Hamburg)
- eppT.I.P.S. 2 – 200 µl, 50 – 1000 µl, 2 – 500 µl (eppendorf Totally Integrated Pipetting System, Eppendorf, Hamburg)
- Analysenröhrchen Polystyrol, , Nr. 12-55 (Greiner, Nürtingen)
- Multiflyset 21 G (Sarstedt, Nümbrecht)
- Falcon 50 ml (Polypropylene Round Bottom Tube, Franklin Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
- Zentrifuge Hettich Rotixa KS Hettich, Tübingen)
- AutoAnalyzer II (α -alpha laval, Bran und Luebbe, Norderstedt) mit Fluorometer flouromonitor TMIII (LDC Analytical, Riviera Beach, Florida, USA)

3.3 Histaminfreisetzungstest aus basophilen Granulozyten

3.3.1 Blutentnahme und Sedimentation

Es wurde dem jeweiligen Probanden insgesamt 40 ml peripheres Vollblut in zwei heparinisierten (Heparin Gehalt je ca. 2 ml) 20-ml-Spritzen entnommen. Dieses wurde anschließend mit 5 ml einer Sedimentationslösung (Thomaedex 60) vermischt. Die Spritzen wurden nun verschlossen bei Raumtemperatur etwa 90 Minuten in vertikaler Position aufgestellt, sodaß eine Sedimentation der Erythrozyten erfolgen konnte. Der dabei entstandene gelb-trübe, leukozytenreiche Überstand wurde daraufhin in ein 50-ml-Röhrchen abgezogen, das Sediment verworfen.

3.3.2 Aufbereitung der Leukozyten

Das 50 ml-Röhrchen wurde bei Raumtemperatur zehn Minuten lang bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der entstehende serumhaltige Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension durch vorsichtiges Schütteln wieder gelöst. Dann wurde die Zellsuspension mit 2 – 3 ml eines PAG/EDTA-Puffers langsam resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt, durchgemischt und nochmals bei 1200 Umdrehungen pro Minute zehn Minuten lang zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurden die Zellen nach dem oben beschriebenen Schema mit PAG-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einem letzten Dekantieren wurden die Zellen mit etwa 10 ml eines PAG-CM-Puffers aufgefüllt. Dieses Gemisch stellte die in den Versuchsreihen verwendete Leukozytensuspension dar.

3.3.3 Stimuli und deren Konzentrationen

Die IgE-abhängige Aktivierung erfolgte mit Anti-IgE (DAKO A/S, Dänemark).

Aus der Ausgangskonzentration von 8,3 g/l (= 8,3 mg/ml = 8300 µl/ml) wurden insgesamt drei Verdünnungen hergestellt, jeweils unter Zugabe von PAG-CM-Puffer: die erste im Verhältnis 1:100 (83 µg/ml), zwei weitere jeweils im Verhältnis 1:10 (8,3 µg/ml bzw. 0,83 µg/ml). Somit wurde in der Versuchsreihe Anti-IgE in den Konzentrationen 83 µg/ml, 8,3 µg/ml und 0,83 µg/ml verwendet.

Die IgE-unabhängige Aktivierung erfolgte mit den folgenden Stimuli: Komplementfaktor C5a, Bakterienpeptid f-Met-Leu-Phe (FMLP) und Calciumionophore A23187 (alle Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

Die Ausgangskonzentration von C5a ($10 \mu\text{g/ml} = 10.000 \text{ ng/ml}$) wurde zunächst unter Zugabe von PAG-CM-Puffer im Verhältnis 1:10 auf 1.000 ng/ml verdünnt. Die in der Versuchsreihe verwendete Konzentration von 120 ng/ml wurde wie folgt erreicht:

$120 \mu\text{l} (1.000 \text{ ng/ml}) \text{ C5a} + 880 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 1.000 \mu\text{l} \text{ C5a} (120 \text{ ng/ml})$

Die Ausgangskonzentration von FMLP 10 mg ($\text{MW: } 438 \text{ g/mol} = 438 \text{ g/l} = 438 \text{ mg/ml}$) wurde unter Zugabe von PAG-CM-Puffer wie folgt verdünnt, um die in der Versuchsreihe verwendete Konzentration von $0,876 \mu\text{g/ml}$ zu erreichen:

$10.000 \mu\text{g} \text{ FMLP} + 22,8 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 10.022,8 \mu\text{l} \text{ FMLP} (438 \text{ mg/ml})$

$10.000 \mu\text{g} \text{ FMLP} (438 \text{ mg/ml}) + 228 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 10.228 \mu\text{l} \text{ FMLP} (43,8 \text{ mg/ml})$

$10.000 \mu\text{l} \text{ FMLP} (43,8 \text{ mg/ml}) + 114 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 10.114 \mu\text{l} \text{ FMLP} (87,6 \text{ mg/ml})$

$10.000 \mu\text{l} \text{ FMLP} (87,6 \text{ mg/ml}) + 1140 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 11.140 \mu\text{l} \text{ FMLP} (8,76 \text{ mg/ml})$

$10 \mu\text{l} \text{ FMLP} (8,76 \text{ mg/ml}) + 990 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 1.000 \mu\text{l} \text{ FMLP} (87,6 \mu\text{g/ml})$

$10 \mu\text{l} \text{ FMLP} (87,6 \mu\text{g/ml}) + 990 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 1.000 \mu\text{l} \text{ FMLP} (0,876 \mu\text{g/ml})$

Die Ausgangskonzentration von Calciumionophore A23187 ($5 \text{ mg/ml} = 5000\mu\text{g/ml}$) wurde zunächst unter Zugabe von PAG-CM-Puffer im Verhältnis 1:100 auf $50 \mu\text{g/ml}$ verdünnt. Die in der Versuchsreihe verwendete Konzentration von 500 ng/ml wurde wie folgt erreicht:

$10 \mu\text{l} \text{ Ca-Io} (50 \mu\text{g/ml}) + 990 \mu\text{l} \text{ PAG-CM} \rightarrow 1.000 \mu\text{l} \text{ Ca-Io} (0,5 \mu\text{g/ml} = 500 \text{ ng/ml})$

3.3.4 Stimulation der Leukozyten

Für jeden Stimulus und den 100%- bzw. Leerwert erfolgte dabei eine Doppelbestimmung in jeweils zwei Sarstedt-Röhrchen. Die Methode der Doppelbestimmung stellt einen wichtigen Kontrollmechanismus bei der Auswertung des Histaminfreisetzungstests dar. Beispielsweise kann eine auffällige Abweichung der Einzelwerte oder eine zu hohe Spontanfreisetzung auf einen Fehler beim Versuchsablauf bzw. bei der Meßgenauigkeit hinweisen.

Für den Histaminfreisetzungstest wurden je $300 \mu\text{l}$ Zellsuspension zu je $300 \mu\text{l}$ der aufgeführten Stimuluskonzentrationen gegeben (Tab. 3). Für den Gesamthistamingehalt (100%-Wert) wurde Perchlorsäure (2%) zur Suspension gegeben (Zellyse). Außerdem wurde ein Leerwert durch Zugabe von PAG/CM-Puffer bestimmt.

Tab. 3: Versuchsreihe des Histaminfreisetzungstests

Zellsuspension (je 300 µl) mit Probennummer	Beschriftung	Stimulus (je 300µl) mit Konzentration
1, 2	Leerwert	PAG-CM-Puffer
3, 4	100%-Wert	H ₂ SO ₄ (2%)
5, 6	C5a	C5a (120 ng/ml)
7, 8	FMLP	FMLP (0,876 µg/ml)
9, 10	Ca-Io	Ca-Io (500 ng/ml)
11, 12	Anti-IgE I	Anti-IgE (83 µg/ml)
13, 14	Anti-IgE II	Anti-IgE (8,3 µg/ml)
15, 16	Anti-IgE III	Anti-IgE (0,83 µg/ml)

Die Röhrchen wurden anschließend unter beständiger Bewegung bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der 40-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen bei 4°C erneut zehn Minuten lang bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Überstände, die das freigesetzte Histamin enthielten, wurden in Sarstedt-Röhrchen dekantiert. Die Proben wurden dann maximal eine Woche im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, um einen eventuellen Abbau durch Histaminasen zu vermeiden.

Die Bestimmung der Histaminkonzentration erfolgte im AutoAnalyzer. Um einen möglichst fehlerfreien und exakten Ablauf zu garantieren, wurde zu Beginn eine Kontrolle durchgeführt, bei der vier Histaminstandards nacheinander gemessen und erst bei Nachweis gleicher Konzentrationshöhe mit der Messung der eigentlichen Proben begonnen wurde.

3.4 Berechnung der Histaminfreisetzung

Beim Durchlauf der Proben durch den AutoAnalyzer wurden Kurven [cm] erstellt, die in eine Konzentration [ng/ml] umgerechnet werden mußten.

Zur Berechnung der Histaminkonzentration wurde die Kurvenhöhe zur jeweiligen Probe mit 10 ng/ml multipliziert und dieser Wert durch die Kurvenhöhe des Histaminstandards (standardisierte Kontrollgröße) geteilt. Die Kurvenhöhe der Probe wurde dabei als

arithmetischer Mittelwert der experimentell bestimmten Histamineinzelwerte einer Doppelbestimmung ermittelt.

Zur Umrechnung in einen Prozentwert wurde vom Histamingehalt der Probe der Leerwert abgezogen und durch den Histamingehalt des 100%-Werts (ebenfalls abzüglich Leerwert) geteilt und anschließend mit 100% multipliziert.

$$\text{Histaminfreisetzung [\%]} = \frac{(\text{Histamingehalt} - \text{Leerwert})[\text{ng/ml}] \times 100}{100\text{-Wert} - \text{Leerwert} [\text{ng/ml}]}$$

Es handelt sich hierbei um eine Relativmessung, die den jeweiligen Anteil der Histaminfreisetzung in Relation zum Gesamthistamingehalt (100%-Wert) der Zelle mißt.

3.5 Statistische Auswertung

Um signifikante Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen zu ermitteln, wurde der Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse für $k > 2$ unverbundene Stichproben), beim Vergleich von nur zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test (Varianzanalyse für $k = 2$ unverbundene Stichproben) verwendet. Das Signifikanzniveau der beiden Tests liegt bei $p > 0,05$ (nicht signifikant, mit $< 95\%$ Wahrscheinlichkeit), $p < 0,05$ (signifikant, mit $> 95\%$ Wahrscheinlichkeit) und $p < 0,01$ (sehr signifikant, mit $> 99\%$ Wahrscheinlichkeit). Die Fragestellung wurde als zweiseitig definiert.

Die Untersuchung eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei stetigen Merkmalen wurde mit Hilfe des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten r als Maßzahl untersucht.

Alle statistischen Tests wurden mit den Softwareprogrammen MS Excel und SPSS 13.0 für MS Windows durchgeführt.

Die statistische Beratung erfolgte durch Prof. Dr. rer. hum. biol. Dieter Hölzel, Institut für Medizinische Informationsberatung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten der Patienten

Insgesamt wurden 38 Probanden in der Untersuchung erfaßt, darunter acht Non-Releaser (Freisetzung nach optimaler Stimulation mit Anti-IgE < 5% vom Gesamthistamin). Das entspricht einem Anteil von 20% und damit in etwa dem bereits erwähnten Durchschnittswert von 10 – 15% in der Gesamtbevölkerung. Die entsprechenden Proben wurden nachträglich ausgeschlossen, da eine relevante Auswertung der jeweiligen Ergebnisse nicht möglich ist.

Das gesamte Probandenkollektiv (Tab. 7) wurde anhand der vorbekannten Mastzelltryptasekonzentration im Serum folgendermaßen gegliedert: in Patientengruppe I (Tab. 4) befinden sich zehn Probanden mit einer physiologischen Tryptasekonzentration 1 - 11,4 µg/ml (Kontrollgruppe), in Patientengruppe II (Tab. 5) zehn Probanden mit einer Tryptasekonzentration zwischen 20 und 40 µg/ml und in Patientengruppe III (Tab. 6) zehn Probanden mit einer Tryptasekonzentration > 50 µg/ml.

Tab. 4: Patientengruppe I (Kontrollgruppe)

Geschlecht	Alter (Jahre)	MZT (µg/ml)	Atopie	Klinische Diagnose
m	33	7,1	+	Urtikaria; RCA
w	26	4,7	+	MA; RCA
m	57	5,7	-	MA
w	50	8,3	-	MA
m	36	9,3	-	HGA
w	62	5,0	-	HGA
w	30	4,5	-	MA
w	65	5,8	-	HGA
m	26	3,1	+	RCA
w	33	2,6	-	MA
Non-Releaser				
w	48	4,5	+	Urtikaria
w	62	7,8	-	HGA
m	48	3,2	-	MA
m	51	3,0	-	HGA
w	47	6,5	+	RCA

m = männlich; w = weiblich; MZT = Mastzelltryptase; HGA = Hymenopterenallergie; MA = Medikamentenallergie;
RCA = Rhinoconjunctivitis allergica

Tab. 5: Patientengruppe II

Geschlecht	Alter (Jahre)	MZT ($\mu\text{g/ml}$)	Atopie	Klinische Diagnose	
				Mastozytose	HGA
m	68	20,8	-	CM; KM(-)	+
w	80	23,7	-	CM; KM(0)	+
m	40	35,0	-	SM; KM(+)	+
m	53	31,5	-	CM; KM(0)	+
w	37	26,5	-	SM; KM(+)	+
w	67	34,3	-	CM; KM(-)	-
m	63	22,5	-	CM; KM(0)	-
w	60	38,8	-	SM; KM(+)	+
w	80	21,9	-	CM; KM(-)	-
w	68	19,6	-	SM; KM(+)	-
Non-Releaser					
m	67	34,0	-	CM; KM(-)	-
w	50	45,7	-	SM; KM(+)	-

m = männlich; w = weiblich; MZT = Mastzelltryptase; HGA = Hymenopterenallergie; CM = kutane Mastozytose; SM = systemische Mastozytose; KM(+) = histologischer Nachweis im Knochenmark; KM(-) = kein histologischer Nachweis im Knochenmark; KM(0) = Knochenmarksbiopsie nicht durchgeführt

Tab. 6: Patientengruppe III

Geschlecht	Alter (Jahre)	MZT ($\mu\text{g/ml}$)	Atopie	Klinische Diagnose	
				Mastozytose	HGA
m	79	59,0	-	SM; KM(+)	+
m	45	197,0	-	SM; KM(+)	+
w	42	60,7	+	CM; KM(-)	-
w	68	131,0	-	SM; KM(+)	-
w	53	84,6	-	SM; KM(+)	-
m	35	58,2	+	SM; KM(+)	+
w	51	71,2	+	SM; KM(+)	-
w	55	143,0	-	SM; KM(+)	-
m	44	226,0	+	SM; KM(+)	-
w	53	115,0	-	SM; KM(+)	-
Non-Releaser					
w	32	50,6	-	SM; KM(+)	+

m = männlich; w = weiblich; MZT = Mastzelltryptase; HGA = Hymenopterenallergie; CM = kutane Mastozytose; SM = systemische Mastozytose; KM(+) = histologischer Nachweis im Knochenmark; KM(-) = kein histologischer Nachweis im Knochenmark; KM(0) = Knochenmarksbiopsie nicht durchgeführt

Tab. 7: Übersicht zum Patientenkollektiv

Patientenkollektiv (n = 30)	Geschlecht (n)	Alter in Jahren (Spannweite)	Median der Mastzelltryptase ($\mu\text{g/ml}$)	Atopische Patienten (n)
Patientengruppe I (1 – 11,4 $\mu\text{g/ml}$)	männlich: 4 weiblich: 6	34 (26 – 65)	5,36 (2,6 – 9,3)	4
Patientengruppe II (20 – 40 $\mu\text{g/ml}$)	männlich: 4 weiblich: 6	66 (38 – 81)	25,1 (19,6 – 38,8)	0
Patientengruppe III (> 50 $\mu\text{g/ml}$)	männlich: 4 weiblich: 6	53 (35 – 80)	99,8 (58,2 – 226)	4

4.2 Histaminfreisetzung im Gruppenvergleich

4.2.1 IgE-unabhängige Aktivierung

4.2.1.1 C5a

Nach C5a-Stimulation (Abb. 2) war der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 9,0% (Spanne: 2,3% – 45,2%), in Patientengruppe II bei 1,36% (Spanne: 0% – 10,65%) und in Patientengruppe III bei 1,4% (Spanne: 0% – 6,1%). In Gruppe II und III blieb bei jeweils vier Proben eine Histaminfreisetzung vollständig aus, die übrigen zeigten eine minimale Ausschüttung.

Es zeigte sich damit ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0,01$): sowohl im Vergleich der Gruppen I und II ($p = 0,007$) als auch der Gruppen I und III ($p = 0,002$) sowie beim Vergleich aller drei Gruppen ($p = 0,004$).

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach C5a-Aktivierung und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

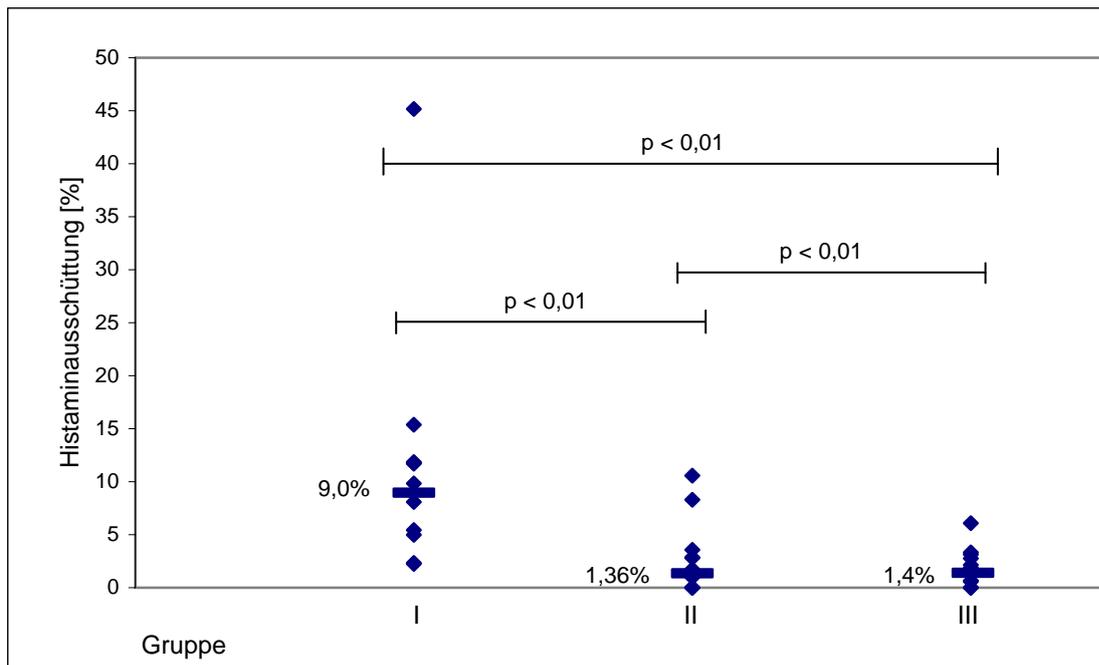


Abb. 2: Zellreaktivität bei Stimulation mit C5a; Balken: Mediane.

4.2.1.2 FMLP

Nach FMLP-Stimulation (Abb. 3) war der Median der Histaminfreisetzung in Patientengruppe I bei 40,3% (Spanne: 17,4% - 60,1%), in Patientengruppe II bei 28,1% (Spanne: 16,1% - 43,4%) und in Patientengruppe III bei 32,5% (Spanne: 5,6% - 51,3%).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,363$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach FMLP-Aktivierung und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

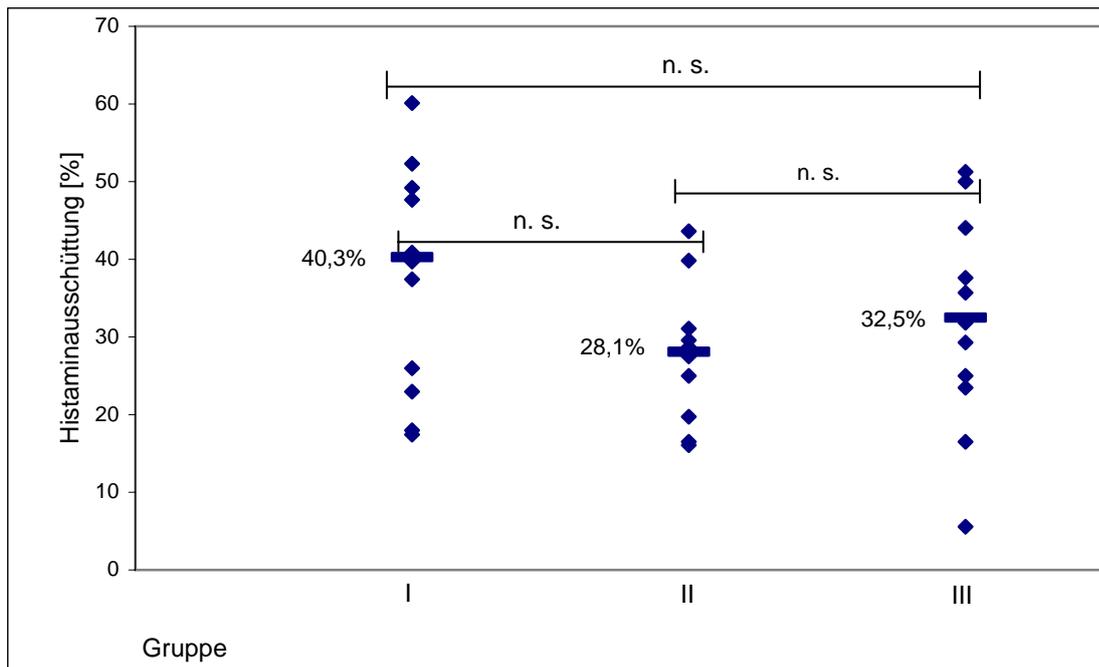


Abb.3: Zellreaktivität bei Stimulation mit FMLP: Balken: Mediane.

4.2.1.3 Calciumionophore

Nach Calciumionophore-Stimulation (Abb. 4) war der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 33,7% (Spanne: 0% – 78,7%), in Patientengruppe II bei 26,8% (Spanne: 1,92% – 74,45%) und in Patientengruppe III bei 32,5% (Spanne: 2,27% – 65,0%).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,929$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach Calciumionophore-Aktivierung und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

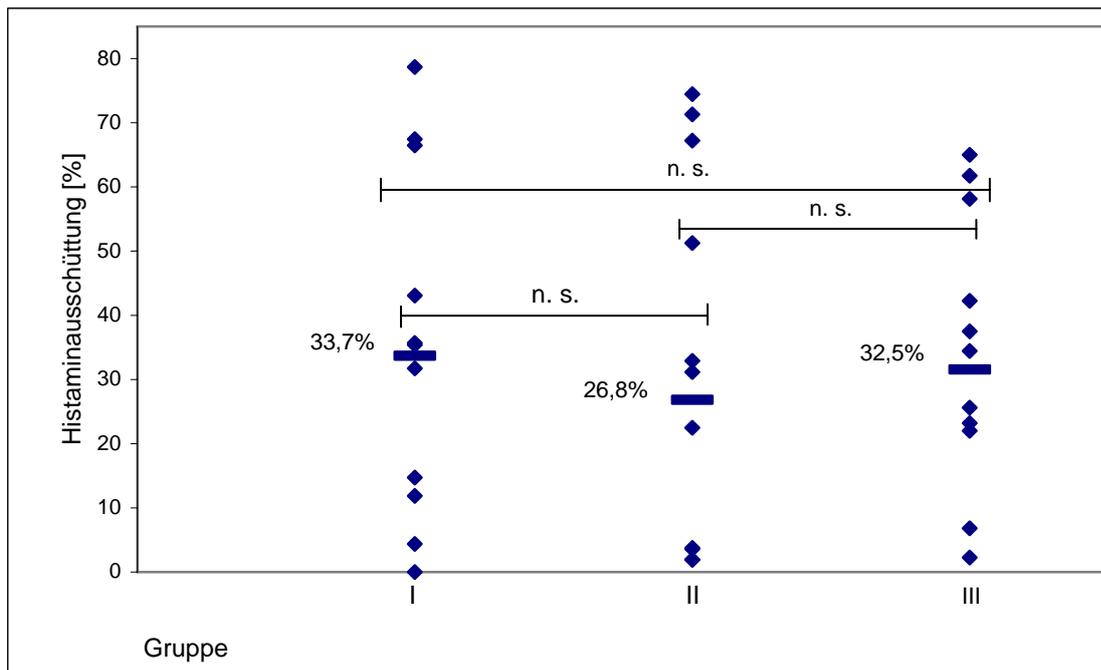


Abb.4: Zellreaktivität bei Stimulation mit Calciumionophore: Balken: Mediane.

4.2.2 IgE-abhängige Aktivierung mit Anti-IgE

Nach Anti-IgE-Stimulation mit der Konzentration 83 µg/ml (Abb. 5) war der Median der Histaminfreisetzung in Patientengruppe I bei 24,0% (Spanne: 5,5% – 68,5%), in Patientengruppe II bei 27,1% (Spanne: 8,7% – 61,4%) und in Patientengruppe III bei 20,8% (Spanne: 2,8% – 40,8%).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,442$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach Anti-IgE-Aktivierung (83 µg/ml) und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

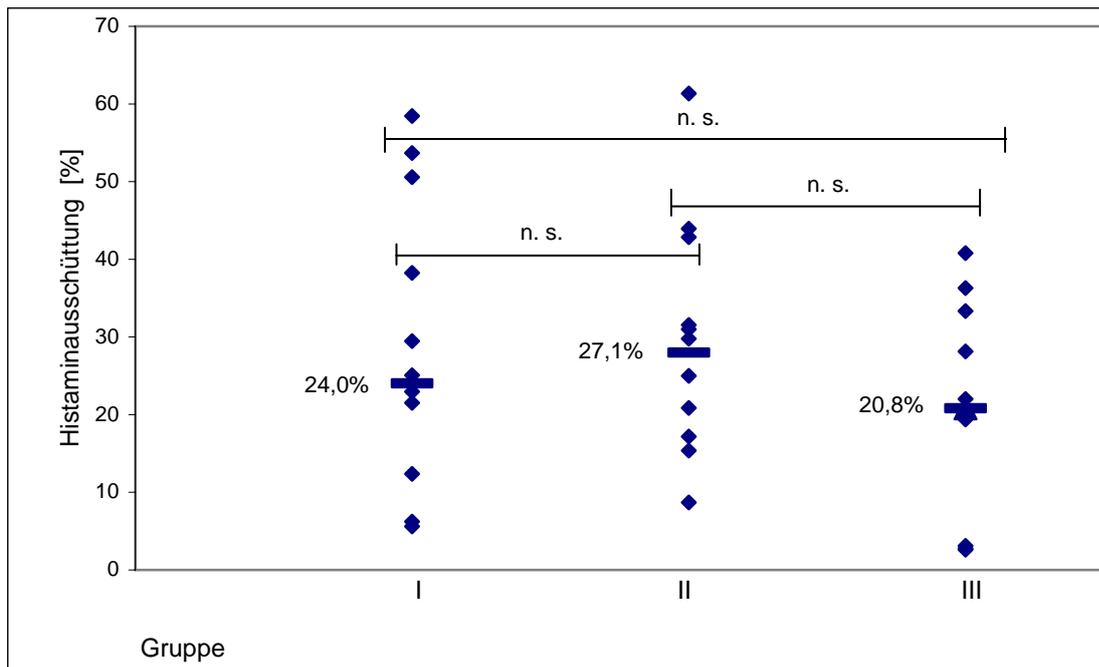


Abb.5: Zellreaktivität bei Stimulation mit Anti-IgE (83 µg/ml); Balken: Mediane.

Nach Anti-IgE- Stimulation mit der Konzentration 8,3 µg/ml (Abb. 6), welche die optimale Anti-IgE-Konzentration mit maximaler Histaminfreisetzung darstellt, war der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 54,7% (Spanne: 5,6% – 80,1%), in Patientengruppe II bei 48,8% (Spanne: 8,7% – 64,6%) und in Patientengruppe III bei 38,5% (Spanne: 6,6% – 57,3%).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,393$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach Anti-IgE-Aktivierung (8,3 µg/ml) und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

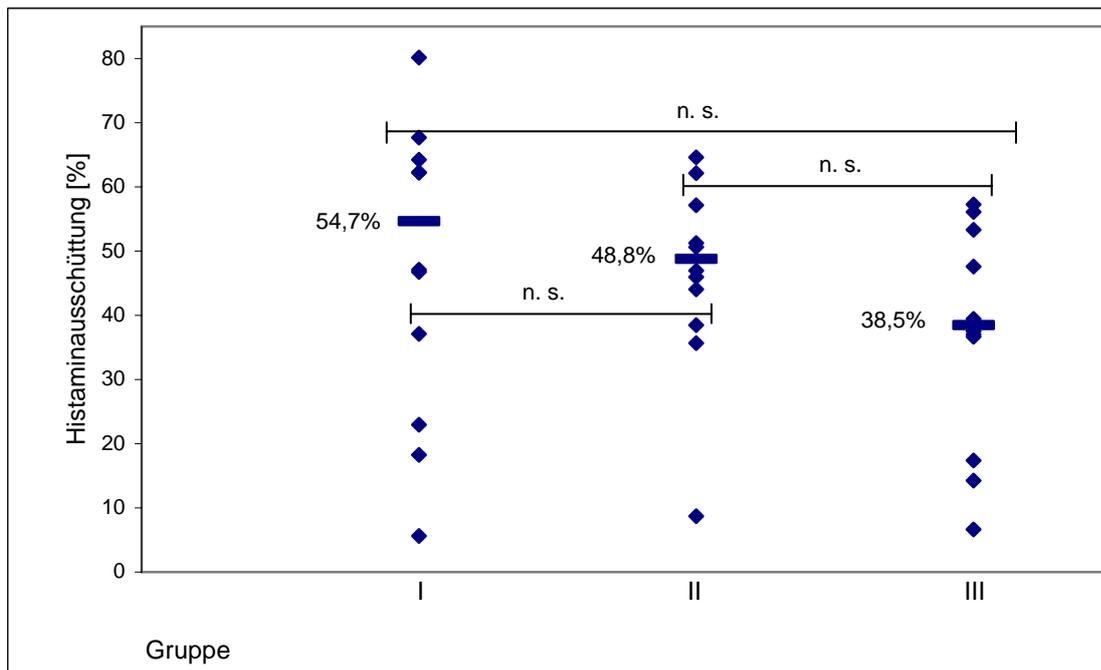


Abb.6: Zellreaktivität bei Stimulation mit Anti-IgE (8,3 µg/ml); Balken: Mediane.

Nach Anti-IgE-Stimulation in der Konzentration 0,83 µg/ml (Abb. 7) war der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 21,0% (Spanne: 0% – 49,7%), in Patientengruppe II bei 24,3% (Spanne: 1,7% – 42,7%) und in Patientengruppe III bei 18,5% (Spanne: 3,2% – 41,6%).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,817$) zwischen den einzelnen Gruppen.

Eine signifikante Korrelation zwischen der Histaminfreisetzung nach Anti-IgE-Aktivierung (0,83 µg/ml) und dem Gesamthistamingehalt bzw. der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

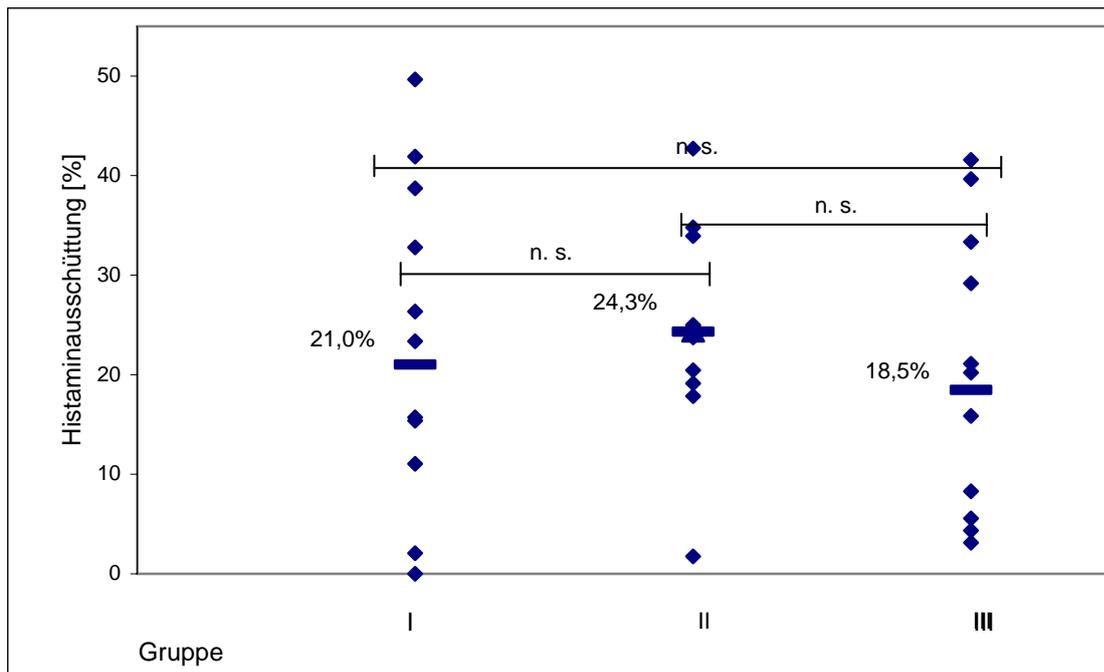


Abb.7: Zellreaktivität bei Stimulation mit Anti-IgE (0,83 µg/ml); Balken: Mediane.

4.3 Gesamthistamingehalt im Gruppenvergleich

Beim Gesamthistamingehalt (Abb. 8) war der Median in Patientengruppe I bei 23,6 ng (Spanne: 3,8 ng – 44,1 ng), in Patientengruppe II bei 14,9 ng (Spanne: 3,0 ng– 43,1 ng) und in Patientengruppe III bei 17,4 ng (Spanne: 3,9 ng– 28,9 ng).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen ($p = 0,336$).

Eine signifikante Korrelation zwischen dem Gesamthistamingehalt und der Tryptasekonzentration im Serum wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

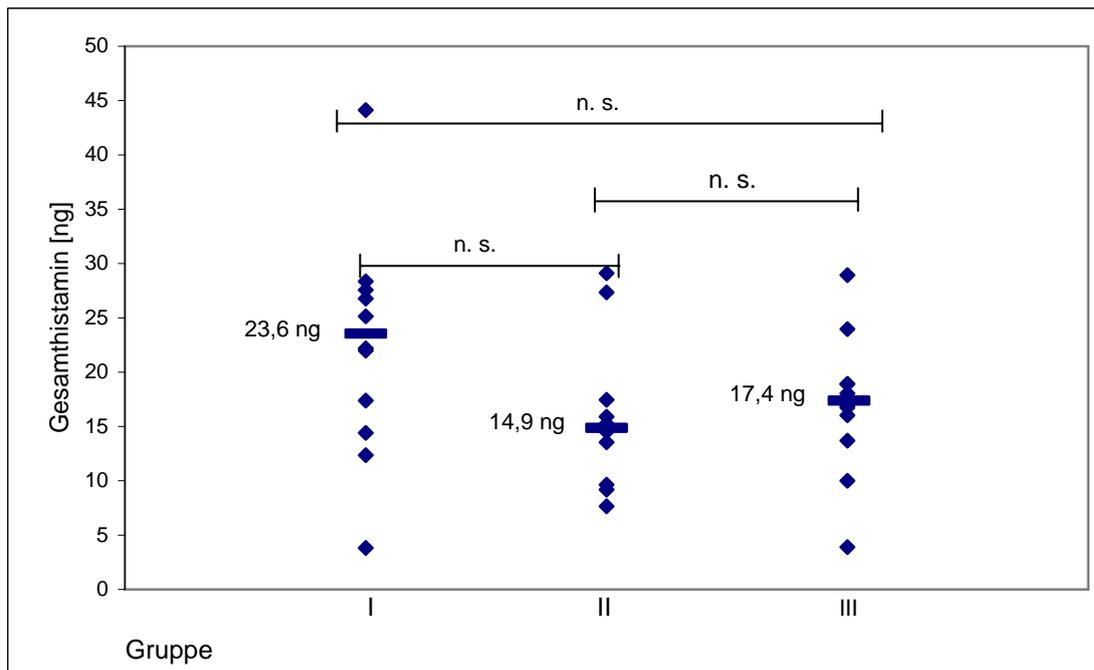


Abb.8: Gesamthistamingehalt [ng]; Balken: Mediane.

4.4 Gesamt-IgE-Konzentration im Gruppenvergleich

Bei der Gesamt-IgE-Konzentration (Abb. 9) war der Median in Patientengruppe I bei 32,7 kU/l (Spanne: 9,4 kU/l – 67,2 kU/l), in Patientengruppe II bei 18,6 kU/l (Spanne: 3,0 kU/l – 43,1 kU/l) und in Patientengruppe III bei 15,8 kU/l (Spanne: 2,0 kU/l – 126,0 kU/l).

Es zeigten sich damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen ($p = 0,246$).

Eine signifikante Korrelation zwischen der Gesamt-IgE-Konzentration und der Tryptasekonzentration im Serum bzw. der Histaminfreisetzung mit den Stimuli der kompletten Versuchsreihe wurde ebenfalls nicht gefunden (Daten nicht dargestellt).

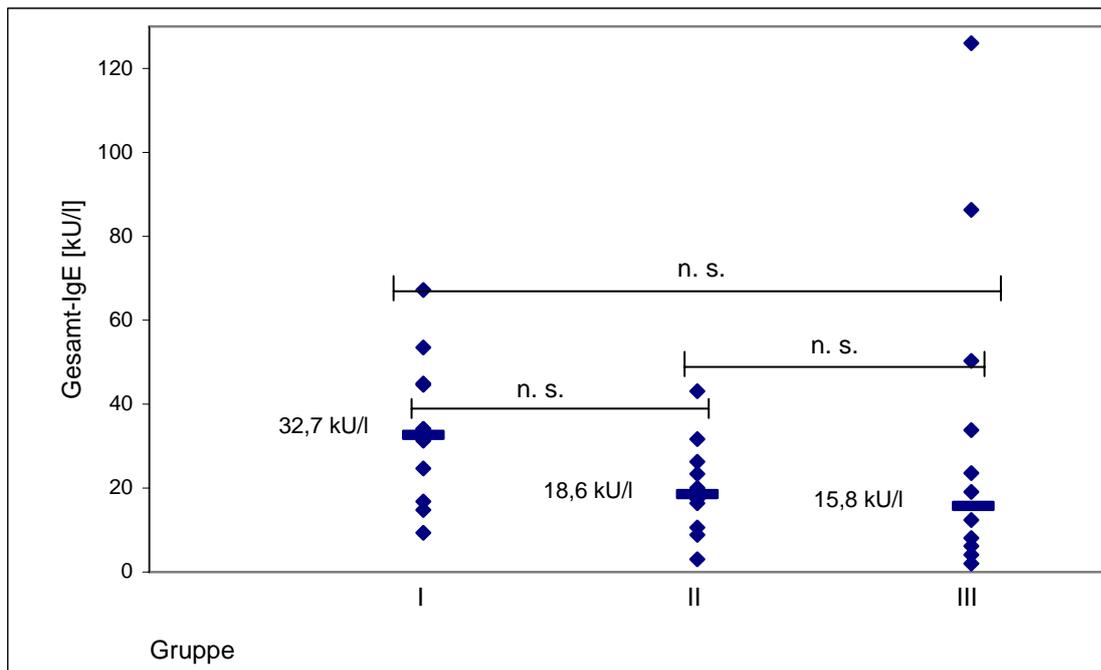


Abb.9: Gesamt-IgE-Konzentration [kU/l]; Balken: Mediane.

5 Diskussion

5.1 Variabilität der Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten

Es gibt einige wesentliche Einflußfaktoren auf zellulärer Ebene, die für eine Untersuchung zur Zellreaktivität von Wichtigkeit sind. Wie aus dem Ergebnisteil ersichtlich zeigen die basophilen Granulozyten in den meisten Versuchsreihen eine enorme Variabilität hinsichtlich der Histaminausschüttung, die von 0% bis teilweise über 70% des Gesamthistamingehalts reicht. Im folgenden werden deshalb einige der dafür verantwortlichen Variablen besprochen.

Man weiß, daß die Dichte der IgE-Rezeptoren pro Zelle zwischen 500 und 1.000.000 betragen kann (53). Es ist klar, daß diese Variable für die IgE-abhängige Aktivierung eine entscheidende Bedeutung hat, bei IgE-unabhängiger Stimulation (C5a, FMLP, Ca-Io) jedoch zu vernachlässigen ist. Eng damit verbunden scheint der IgE-Spiegel zu sein. Dieser ist unter anderem in der Lage, die FcεRI-Expression in vitro und in vivo hoch zu regulieren und die Überlebensdauer der basophilen Granulozyten in vitro zu verlängern (80).

Die nächste wichtige Einflußgröße, obwohl nicht Gegenstand der Untersuchung, repräsentiert die Zellsensitivität, d.h. die Stimulusmenge für eine halbmaximale Zellantwort (50% der maximalen Zellantwort). Sie verhält sich interindividuell äußerst variabel. Dies zeigt sich an der für die Zellaktivierung erforderlichen Rezeptorvernetzung, die im Bereich von 200 bis 30.000 Rezeptoren liegen kann (54).

Unabhängig vom Sensibilisierungsgrad, und auch vom Gesamthistamingehalt, verhält sich die zelluläre Reaktivität, d.h. die maximale Histaminfreisetzung nach optimaler Stimulation, bezogen in Prozent auf den Gesamthistamingehalt der Zellen. Sie wird als Funktion der intrazellulären Signalübertragung angesehen (56) und besitzt einen Variabilitätsgrad von 0% bis 100% vom Gesamthistamingehalt (97). Dieser Umstand erklärt die großteils beträchtlichen Spannweiten bei der Freisetzung.

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Altersabhängigkeit bei der Zellreaktivität (62). Diese beruhen auf Untersuchungen, die eine positive Korrelation des Alters sowohl mit der Reaktivität als auch der Sensivität feststellten (63). Dabei ist die Histaminfreisetzung nach Anti-IgE-Stimulation in der Gruppe der unter 20jährigen signifikant geringer als in den anderen Altersgruppen (21 – 40 Jahre, 41 – 60 Jahre, > 60 Jahre). Zwischen letzteren Gruppen war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

In diesem Zusammenhang soll auch die Altersverteilung im vorliegenden Patientenkollektiv betrachtet werden. Dabei ist ein Altersunterschied zwischen den drei Patientengruppen zu erkennen, der aber allein zwischen Patientengruppe I und III signifikant war ($p < 0,05$). Allerdings gehörte keiner der im Patientenkollektiv eingeschlossenen Probanden zur Gruppe der unter 20jährigen. Dagegen sollte bei Studien, die zusätzlich Kinder und Jugendliche im Probandenkollektiv aufweisen, gesondert auf diesen Faktor geachtet werden, weil dann die Ergebnisse durch die Altersverteilung des Probandenkollektivs beeinflusst werden.

Schließlich sollten noch die charakteristischen Eigenschaften der verwendeten Stimuli als Variable erwähnt werden. Sie sind aufgrund ihrer potentiellen Bindungsstellen sowie ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften mit einer unterschiedlich großen Potenz zur Histaminfreisetzung ausgestattet.

5.2 Histaminfreisetzung nach Stimulation mit C5a

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß Patienten mit einer Tryptasekonzentration unter 11,4 µg/ml im Serum eine höhere Histaminfreisetzung nach C5a-Inkubation zeigten als solche mit erhöhtem oder hohem Tryptasespiegel. Es handelt sich dabei um einen sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$).

Zunächst sei erwähnt, daß unter den verwendeten Stimuli C5a eine Sonderstellung einnimmt, da es als einzige der Substanzen unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Organismus vorhanden ist. Das C5a-Anaphylatoxin ist ein wesentlicher Bestandteil des Komplementsystems, welches ein bedeutsames, unspezifisches Immunabwehrsystem gegen Mikroorganismen und Antigen-Antikörper-Komplexe darstellt. Nach Aktivierung und nachfolgender Spaltung des fünften Komplementfaktors entsteht C5a, welches einerseits zum Membranangriffskomplex gehört (zelluläre Immunabwehr) und andererseits chemotaktisch auf neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten wirkt (humorale Immunabwehr). C5a bewirkt eine Histaminausschüttung aus basophilen Granulozyten, nicht aber aus Mastzellen, ausgenommen Hautmastzellen (25). Weitere biologische Funktionen umfassen die glatte Muskelzellkontraktion, Vasodilatation oder gesteigerte Gefäßpermeabilität (30). Auf diese Weise ist es an einer Vielzahl von entzündlichen und auch allergischen Prozessen beteiligt, z.B. wird von erhöhten C5a-Konzentrationen bei

Anaphylaxie nach Wespenstich, Sepsis, systemischem Lupus erythematoses oder rheumatoider Arthritis berichtet (29).

Die Aktivierung der Zellen erfolgt über einen eigenen Rezeptor (CD88) und damit unabhängig von den übrigen Stimuli. Dieser löst - genauso wie nach FMLP-Stimulation - via G-Protein-Koppelung (IP3, DAG, PKC) eine kurzfristige Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels aus, im Gegensatz zur langfristigen Erhöhung bei Calciumionophore und Anti-IgE (19; 88).

Der beschriebene, signifikante Unterschied könnte auch direkt mit der Rezeptordichte oder -charakteristik von CD88 zusammenhängen. Genau dieser Fragestellung sind zwei Studien nachgegangen. Die eine Veröffentlichung stellte die vermehrte CD88-Expression im Respirationstrakt von an Asthma verstorbenen Patienten heraus und auf diese Weise die damit verbundene Bedeutung des Komplementsystems (24). Die andere Untersuchung hatte die gesteigerte CD88-Expression von Mastzellen bei Patienten mit systemischer Mastozytose zum Thema (68).

Diese Resultate stehen jedoch entgegengesetzt zu der eigenen Beobachtung, daß Zellen der Patientengruppen II und III, welche ausschließlich Mastozytosepatienten enthalten (davon neun Patienten mit zusätzlicher Hymenoptereingiftallergie), nach CD88-abhängiger Stimulation signifikant weniger Histaminausschüttung zeigten, obwohl sie eigentlich eine erhöhte Rezeptordichte aufweisen müßten. Als plausible Erklärung kann sicherlich der Umstand gelten, daß es sich bei den verwendeten Zellen um basophile Granulozyten handelt, also einen unabhängigen Zelltyp, der keinen unmittelbaren Vergleich zuläßt. Da aber in der vorliegenden Arbeit weder eine Quantifizierung noch Charakterisierung von CD88 auf zellulärer Ebene vorgenommen wurde, kann über die Bedeutung des Rezeptors für die Histaminfreisetzung nach C5a-Aktivierung allenfalls spekuliert werden. Denn ob die Zellen von Patienten mit erhöhter Tryptasekonzentration im Serum tatsächlich weniger Rezeptoren besitzen oder ob sie aufgrund anderer unbekannter Faktoren, rezeptorabhängig wie – unabhängig, eine abweichende Reaktivität zeigten, bedürfte genauerer Abklärung auf zellulärer Ebene.

Ebenso könnte man von einer veränderten intrazellulären Signalverarbeitung der Zellen ausgehen, so beispielsweise bei der erwähnten Kalziumerhöhung. Dagegen spricht aber zum

einen, daß die kurzfristige intrazelluläre Kalziumerhöhung nur bei Stimulation mit C5a, aber nicht bei FMLP zu einer signifikanten Differenz zwischen den Gruppen führte. Zum anderen scheint es auch bei den Stimuli, die eine längerfristige Kalziumerhöhung bewirken (Calciumionophore, Anti-IgE), keinen klaren Hinweis auf eine Beeinträchtigung dieser Ionenkonzentration zu geben, weil auch hier kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Histaminfreisetzung nachzuweisen war. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit weder die intrazelluläre Ionenkonzentration noch sonstige für die Histaminfreisetzung relevante Parameter (IP3, DAG, PKC) der Signalkaskade quantifiziert. Diese durchaus plausible Erklärungsmöglichkeit gibt somit Anlaß für zukünftige Untersuchungen auf molekularer Ebene.

Und obwohl basophile Granulozyten von Patienten mit erhöhter bzw. hoher Mastzelltryptasekonzentration im Serum nach C5a-Stimulation eine äußerst geringe Reaktivität aufwiesen, so leitet sich diese Differenz nicht von einer generellen oder konstitutionellen Beeinträchtigung der intrazellulären Signalkaskade ab. Denn diese Zellen reagierten auf die übrigen Stimuli, die unabhängig vom CD88-Rezeptor aktivieren, mit einer, der Kontrollgruppe vergleichbaren, und damit ungleich höheren Histaminausschüttung.

Als potentiell ursächlich für die signifikante Differenz nach C5a-Stimulation sollte man noch eine letzte Tatsache berücksichtigen. Der signifikante Abfall hinsichtlich der Zellreaktivität wurde maßgeblich dadurch bedingt, daß in den Patientengruppen II und III jeweils vier Proben überhaupt keine Reaktion zeigten. Dieses kumulierte Auftreten in den beiden Gruppen läßt sich nur schwer interpretieren. Denn welcher der vorher aufgeführten Gesichtspunkte, d.h. CD88-Rezeptordichte, intrazellulärer Kalziumspiegel oder andere Parameter der Signalkaskade, für diese Verteilung verantwortlich sein könnte, läßt sich nicht beurteilen. In einer ähnlichen Studie (52) wurden zwar vergleichbare Ergebnisse erzielt, die sich gleichermaßen in einer Größenordnung im niedrigen einstelligen Prozentbereich bewegten. Es handelte sich aber bei dem Probandenkollektiv mit signifikant erniedrigter Histaminfreisetzung nach C5a-Aktivierung um chronische Urtikaria-Patienten und nicht um Mastozytose-Patienten.

5.3 Histaminfreisetzung nach Stimulation mit FMLP, Calciumionophore und Anti-IgE

Zu Beginn kann man festhalten, daß die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse hinsichtlich der Histaminfreisetzung mit denen in der Literatur weitgehend übereinstimmen (86).

Dies trifft zum ersten auf die relative quantitative Zellreaktivität in jeder einzelnen der drei Patientengruppen nach IgE-unabhängiger wie IgE-abhängiger Stimulation zu, wie sie in der untenstehenden Tabelle abgebildet ist (Tab. 8).

Weiterhin trifft es auch auf die konzentrationsabhängige Dosiswirkungskurve nach Anti-IgE-Inkubation zu (44; 88). Die höchste Zellreaktivität präsentiert sich dabei in mittlerer Verdünnung (Anti-IgE 8,3 µg/ml). Das läßt auf ein optimales Mischungsverhältnis zwischen Stimuluskonzentration und Zellzahl in der Suspension schließen, welches bei stärkerer Verdünnung unterschritten und bei schwächerer Verdünnung aufgrund einer Überschußhemmung beeinträchtigt wird. Es bleibt anzumerken, daß in der vorliegenden Untersuchung wesentlich höhere Anti-IgE-Konzentrationen (83 µg/ml, 8,3 µg/ml und 0,83 µg/ml) für die Stimulation verwendet wurden als in unterstehender Tabelle aufgeführt.

Tab. 8: Relative Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten nach Inkubation mit unterschiedlichen Stimuli (86).

Stimulus	Histaminfreisetzung
C5a	+
FMLP	++
Calciumionophore	++
Anti-IgE (10 ng/ml)	+
Anti-IgE (100 ng/ml)	++

Im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit bleibt festzuhalten, daß sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Histaminausschüttung nach Stimulation mit FMLP, Calciumionophore und Anti-IgE herausstellte. Es deutete sich lediglich nach FMLP- sowie nach Anti-IgE-Aktivierung eine Tendenz an, nach welcher Patienten mit erhöhter und hoher

Tryptasekonzentration erkennbar weniger Histamin freisetzen als die mit niedrigem Tryptasespiegel. Dies schlug sich jedoch nicht statistisch signifikant nieder.

Die beschriebene Tendenz kann mit entsprechender Literatur nur schwierig belegt oder verglichen werden. Es gibt nämlich trotz zahlloser Veröffentlichungen zum Thema Histaminfreisetzung keine Untersuchungen mit einer vergleichbaren Unterteilung des Patientenkollektivs, sodaß ein direkter Vergleich mit der gegebenen Studienlage unzulässig ist. In diesem Zusammenhang wäre es lediglich möglich, Studien zum Thema Histaminausschüttungsverhalten aus basophilen Granulozyten heranzuziehen, die Patienten mit Erkrankungen des allergischen bzw. atopischen Formenkreises einer Kontrollgruppe gegenüberstellen. Man beobachtet dabei die klinische Beziehung zwischen der Krankheit und der Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen (85).

Eine Studie, bei der zwar die Reaktivität basophiler Granulozyten von Urtikaria-Patienten gegenüber einer Kontrollgruppe nach Anti-IgE-Stimulation signifikant erniedrigt war, konnte aber nach Inkubation mit FMLP und Calciumionophore keine signifikanten Unterschiede nachweisen, ebenso wenig mit Platelet-activating Factor (PAF). Eine Aktivierung mit C5a wurde hier nicht durchgeführt (110).

Dieses Ergebnis bestätigte eine weitere Untersuchung, die ebenfalls Urtikaria-Patienten mit gesunden Kontrollprobanden verglich. Dabei war die Zellreaktivität der Urtikaria-Patienten nicht nur nach Anti-IgE-Stimulation signifikant erniedrigt, sondern auch nach C5a-Stimulation. Nach Inkubation mit monocyte chemoattractant proteine-1 (MCP-1) und Bradykinin konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. FMLP und Calciumionophore wurden nicht getestet (52).

Beide Studien kamen zu der Schlußfolgerung, daß sich basophile Granulozyten von Urtikaria-Patienten gegenüber Zellen gesunder Probanden hinsichtlich ihres Freisetzungsverhaltens unterscheiden und führten dies auf eine abweichende Regulierung der zellinternen Signalkaskade zurück. Aus welchem Grund sich die Zellreaktivität ausschließlich oder ausgerechnet nach C5a- bzw. Anti-IgE-Stimulation signifikant unterschied, und nicht auch bei den übrigen Stimuli, blieb in beiden Studien unbeantwortet.

Obwohl es sich dabei um zwei unterschiedliche Krankheitsentitäten handelt und dies einen unmittelbaren Vergleich nicht möglich macht, ist die Parallele zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit doch auffällig. Denn auch hier fand sich nach Stimulation mit FMLP und Calciumionophore kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellreaktivität. Dieser zeigte sich aber deutlich nach C5a-Aktivierung. Nach Anti-IgE-Stimulation war immerhin eine Tendenz zu erniedrigter Reaktivität erkennbar, wenn auch nicht statistisch signifikant.

Daraus läßt sich abschließend folgern: die Reaktivität der basophilen Granulozyten scheint einerseits von der Mastzelltryptasekonzentration im Serum unabhängig zu sein. Andererseits scheint sie jedoch vom verwendeten Stimulus, d.h. der Art der Zellaktivierung durch verschiedene Rezeptoren sowie der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskade, abhängig zu sein. Welche Ursachen und Mechanismen den genannten Beobachtungen zugrunde liegen, darüber kann man im Rahmen dieser Untersuchung lediglich spekulative Aussagen treffen. Die zugrunde liegenden Zusammenhänge bedürften daher weiterer Abklärung in der Zukunft, insbesondere auf dem Gebiet intrazellulärer Kaskaden und molekularer Mechanismen.

5.4 Gesamthistamingehalt im Gruppenvergleich

Der Gesamthistamingehalt der basophilen Granulozyten läßt im Vergleich der drei Patientengruppen keinen signifikanten Unterschied erkennen. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz, nach welcher die Zellen von Patienten mit erhöhter und hoher Tryptasekonzentration weniger Histamin enthielten als diejenigen von Patienten mit niedrigem Tryptasespiegel.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem aus der oben erwähnten Untersuchung, die basophile Granulozyten von Urtikaria-Patienten mit denen einer Kontrollgruppe verglich (52). Dabei unterschied sich der Gesamthistamingehalt der beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant voneinander. Die zweite, im Zusammenhang bereits erwähnte Urtikaria-Studie untersuchte den Gesamthistamingehalt als Vergleichsparameter nicht (110).

Dieses Ergebnis deckt sich außerdem mit der Tatsache, daß basophile Granulozyten unter verschiedenen Spenderpopulationen eine verhältnismäßig konstante Menge von ungefähr 1 pg Histamin in ihren Granula speichern (88). Dies unterstreicht zusätzlich die These, daß die Höhe der Histaminfreisetzung basophiler Granulozyten nicht von einem unterschiedlichen

hohen Gesamthistamingehalt der Zellen abhängt. Die Ausschüttung wird vielmehr durch die bereits oben erwähnten fünf unabhängigen Variablen maßgeblich bestimmt:

1. Die zelluläre Rezeptorendichte (Anzahl der Rezeptoren pro Zelle)
2. Die absolute Zellsensitivität der Zelle (Anzahl der IgE- bzw. Stimulus-Moleküle für 50% der maximal möglichen Zellantwort)
3. Der Anteil der allergen- bzw. stimulusspezifischen IgE-Antikörper (Anzahl der spezifischen Moleküle pro Zelle)
4. Die zelluläre Reaktivität der Zelle (maximale Histaminausschüttung nach optimaler Stimulation)
5. Die charakteristischen Eigenschaften der Allergene bzw. Stimuli (z.B. Konzentration der Einzelmoleküle und potentiellen Bindungsstellen, physikalische und chemische Eigenschaften)

5.5 Gesamt-IgE-Konzentration im Gruppenvergleich

Bei der Gegenüberstellung der Gesamt-IgE-Konzentrationen zeichnete sich eine Tendenz ab, nach der Patienten mit erhöhter und hoher Tryptasekonzentration eine erkennbar geringere IgE-Konzentration im Serum aufwiesen als Patienten mit niedrigem Tryptasespiegel.

In diesem Zusammenhang sei noch einmal erwähnt, daß die Histaminausschüttung nach optimaler Stimulation mit Anti-IgE (8,3µg/l) eine parallele Tendenz zeigte: Patienten mit erhöhter und hoher Tryptasekonzentration setzten erkennbar weniger Histamin frei als diejenigen mit niedrigem Tryptasespiegel.

Zunächst muß man bei der Beurteilung der IgE-Konzentration im Serum berücksichtigen, daß sie verschiedenen Einflußfaktoren wie Alter, Geschlecht, ethnischer Abstammung, Rauchen oder Jahreszeit unterworfen ist (81). Bei der klinischen Beurteilung geht man ab einer Konzentration > 100 kU/l von einem erhöhten Wert aus, wobei eine fehlende Erhöhung eine Erkrankung des atopischen Formenkreises nicht ausschließt.

Eine Studie zu diesem Thema unterteilte ein Patientenkollektiv in vier verschiedene Serum-IgE-Kategorien: in Kategorie I und II (< 10 kU/l bzw. > 10 < 100 kU/l) gesunde Probanden, in Kategorie III (> 100 < 1000 kU/l) vornehmlich Patienten mit Parasitosen und in Kategorie IV (> 1000 kU/l) hauptsächlich Patienten mit atopischem Ekzem. Dabei ergaben sich

signifikante Unterschiede bei der Histaminfreisetzung, wobei die höchsten Freisetzungsraten mit den höchsten IgE-Spiegeln vergesellschaftet waren (67). Daraus schloß man, daß die IgE-Konzentration mit der Zellreaktivität von basophilen Granulozyten in Korrelation zu bringen sein könnte.

In der Folge stellte sich dann tatsächlich heraus, daß der IgE-Spiegel die FcεRI-Expression auf basophilen Granulozyten reguliert (80), und zwar in Form einer positiven Korrelation (60).

Eine Reihe von Studien befaßte sich mit der Beziehung zwischen IgE und FcεRI in vitro und in vivo (35; 58; 59; 48; 70). In einer Untersuchung zur möglichen Therapie allergischer Erkrankungen wurde nachgewiesen, daß die Gabe monoklonaler Anti-IgE-Antikörper bei Patienten mit Hausstaubmilben-Allergie eine Senkung der IgE-Spiegel im Serum um mehr als 90% zur Folge hatte. In der Folge war die Histaminfreisetzung aus den basophilen Granulozyten drastisch reduziert (20). Man führt diese Abnahme aber nicht allein auf die Eliminierung der IgE-Moleküle zurück, sondern auch auf die Reduzierung der Rezeptorzahl. Die intra- oder extrazellulären Vorgänge dieses Vorgangs sind noch unklar, aber es wird angenommen, daß grundsätzlich ein Mechanismus existiert, der den FcεRI in unbesetztem Zustand registriert und ihn dann für die Entfernung markiert (80).

Diese in der Literatur beschriebene, positive Korrelation zwischen der Gesamt-IgE-Konzentration und der Zellreaktivität bzw. konnte somit in der vorliegenden Arbeit tendenziell bestätigt werden. Denn hier zeigte die Patientengruppe I mit höheren Gesamt-IgE-Konzentrationen ebenfalls eine tendenziell höhere Zellreaktivität nach Anti-IgE-Stimulation als die Patientengruppen II und III mit niedrigeren IgE-Spiegeln.

5.6 Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten und Mastzellen im Vergleich

Eine Untersuchung ergab, daß die Ausschüttung von Tryptase aus aktivierten Mastzellen benachbarte Mastzellen zur Histaminfreisetzung anregte (32). Die Tryptase fungierte damit als eine Art Verstärkungssignal bereits bei physiologischen Konzentrationen. Dieser Prozeß ist nicht zytotoxisch, wird durch das Kalzium- und Magnesiummilieu beeinflusst und durch Hitze inhibiert, die offenbar zur Denaturierung der erforderlichen katalytischen Enzymbindungsstelle führt. Eine wichtige Rolle spielen dabei Tryptaseinhibitoren wie

APC366 oder Leupeptin, die eine inhibitorische und somit regulierende Funktion haben. Sie verhindern konzentrationsabhängig die Histaminfreisetzung nach Inkubation mit Anti-IgE oder Calciumionophore. Aufgrund dieser Eigenschaft könnten Tryptaseinhibitoren als potentielle Mastzellstabilisatoren bei der Therapie allergischer Erkrankungen zukünftig eine Rolle spielen. Allerdings wurde das bislang lediglich für Mastzellen aus dem Respirationstrakt nachgewiesen (33).

Weiterhin stellte man fest, daß die Vor-Inkubation der Zellen mit Tryptasekonzentrationen, die für die Histaminausschüttung suboptimal waren, kaum einen Effekt auf die Zellreaktivität nach Anti-IgE- bzw. Calciumionophore-Stimulation hatte. Bei höheren Konzentrationen hingegen war die nachfolgende Aktivierung blockiert (32).

In der vorliegenden Arbeit läßt sich somit ein Aspekt der in der Literatur vorbeschriebenen Ergebnisse bestätigen: Basophile Granulozyten von Patienten mit erhöhter und hoher Tryptasekonzentration im Serum, anders ausgedrückt, mit Mastzelltryptase vor-inkubierte Zellen, zeigten tendenziell eine verminderte Histaminausschüttung, im Falle von C5a-Stimulation sogar signifikant erniedrigt.

In Hinblick auf einen direkten Analogieschluß müssen jedoch zwei wesentliche Gesichtspunkte berücksichtigt werden: Erstens handelt es sich bei den in der Vergleichsstudie verwendeten Zellen nicht um basophile Granulozyten, sondern um gewebeständige Mastzellen, die einen in Eigenschaft und Funktion eigenständigen Zelltyp darstellen.

Zweitens besteht ein fundamentaler Unterschied hinsichtlich des experimentellen Versuchsansatzes. In der Literatur wurde die Mastzelltryptase als exakt dosierter Stimulus zu den Zellsuspensionen gegeben und inkubiert. In der vorliegenden Arbeit stellte die Mastzelltryptase lediglich einen Parameter dar, nach welchem die Einteilung des Probandenkollektivs erfolgte. Die Tryptasekonzentration im Serum wurde separat bestimmt, die Zellsuspensionen wurden gereinigt und ohne Tryptasezugabe inkubiert. Die vorliegende Gruppeneinteilung gibt lediglich einen Anhaltspunkt für die gemessenen Tryptasekonzentrationen, denen die Zellen vor Versuchsbeginn im peripheren Blut ausgesetzt waren.

6 Zusammenfassung

Mastzellen und basophile Granulozyten synthetisieren und speichern Histamin. Bei Freisetzung bewirkt es unter anderem eine Permeabilitätserhöhung des Gefäßendothels, eine Konstriktion glatter Muskelzellen und die Erregung nozizeptiver Nervenfasern. Damit trägt es entscheidend zu Pathologie und Symptomatik von Krankheitsbildern wie Anaphylaxie oder Mastozytose bei. In der Diagnostik dieser Krankheitsbilder bedient man sich unter anderem der Bestimmung der Mastzelltryptase im Serum. Das Enzym wird ganz überwiegend von Mastzellen freigesetzt und spiegelt damit die Beteiligung dieses Zelltyps bei pathologischen Reaktionen wider.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bei Patienten mit erhöhter Mastzelltryptasekonzentration im Serum untersucht. Dabei wurde die Histaminausschüttung nach IgE-abhängiger Stimulation sowie nach IgE-unabhängiger Stimulation im Histaminfreisetzungstest gemessen und vor dem Hintergrund der Tryptasekonzentration im Patientenserum verglichen.

Die Probanden wurden anhand der basalen Mastzelltryptasekonzentration konsekutiv und zufällig ausgewählt und folgendermaßen aufgeteilt: Patientengruppe I (Kontrollgruppe) mit zehn Probanden (Tryptasekonzentration 1 - 11,4 µg/ml), Patientengruppe II mit zehn Probanden (Tryptasekonzentration 20 - 40 µg/ml) und Patientengruppe III mit zehn Probanden (Tryptasekonzentration > 50 µg/ml).

Der Histaminfreisetzungstest wurde mit gewaschenen Blutleukozyten aus peripherem Blut durchgeführt. Die Messung des freigesetzten Histamins erfolgte im Autoanalyzer. Die Testansätze mit den basophilen Granulozyten wurden mit folgenden Stimuli inkubiert: zur IgE-unabhängigen Aktivierung mit C5a, FMLP und Calciumionophore, zur IgE-abhängigen Aktivierung mit Anti-IgE in drei Konzentrationsstufen.

Nach C5a-Stimulation war der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 9,0%, in Patientengruppe II bei 1,36% und in Patientengruppe III bei 1,4%. Es zeigten sich somit signifikante Unterschiede sowohl im Vergleich der Gruppen I und II ($p = 0,007$) als auch der Gruppen I und III ($p = 0,002$) sowie beim Vergleich aller drei Gruppen ($p = 0,004$).

Signifikante Unterschiede konnten beim Vergleich der übrigen Versuchsreihen nach IgE-unabhängiger Stimulation dagegen nicht gefunden werden. Nach FMLP-Stimulation lag der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 40,3%, in Patientengruppe II bei 28,1% und in Patientengruppe III bei 32,5% ($p=0,363$). Nach Calciumionophore-Stimulation lag der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 33,7%, in Patientengruppe II bei 26,8% und in Patientengruppe III bei 32,5% ($p=0,929$).

Ebensowenig konnten beim Vergleich der Versuchsreihen nach IgE-abhängiger Stimulation signifikante Unterschiede gefunden werden. Nach Anti-IgE-Stimulation mit der Konzentration $83\mu\text{g/ml}$ lag der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 24,0%, in Patientengruppe II bei 27,1% und in Patientengruppe III bei 20,8% ($p=0,442$). Nach Anti-IgE-Stimulation mit der Konzentration $8,3\mu\text{g/ml}$ lag der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 54,7%, in Patientengruppe II bei 48,8% und in Patientengruppe III bei 38,5% ($p=0,393$). Nach Anti-IgE-Stimulation mit der Konzentration $0,83\mu\text{g/ml}$ lag der Median der Histaminausschüttung in Patientengruppe I bei 21,0%, in Patientengruppe II bei 24,3% und in Patientengruppe III bei 18,5% ($p=0,817$).

Die Aktivierung der Zellen nach C5a-Stimulation erfolgt über einen eigenen Rezeptor (CD88) und damit unabhängig von den übrigen Stimuli. Dieser löst über G-Protein-Koppelung eine kurzfristige Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels aus, im Gegensatz zur langfristigen Erhöhung nach Calciumionophore- und Anti-IgE-Stimulation. Somit könnte der beschriebene, signifikante Unterschied zwischen den Gruppen nach C5a-Stimulation direkt mit der Rezeptordichte oder -charakteristik von CD88 bzw. nachgeschalteten Mechanismen zusammenhängen.

Die Ergebnisse zeigen, daß in Abhängigkeit von der basalen Mastzelltryptasekonzentration im Serum die Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten nach Stimulation mit C5a, nicht aber nach Stimulation mit FMLP, Calciumionophore und Anti-IgE signifikant unterschiedlich ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedeutung von CD88 für diese Beobachtung zu klären.

7 Literaturverzeichnis

1. Alter, S.C., Kramps, J.A., Janoff, A., Schwartz, L.B. (1990). Interactions of human mast cell tryptase with biological protease inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys* 276: 26-31
2. Berger, A. (2000). PAR-2 antagonists – the next generation of anti-inflammatories? *Brit. Med. J.* 320: 334
3. Berger, P, Tunon-de-Lara, J.M., Savineau, J.P., Marthan, R. (2001). Selected contribution: Tryptase-induced PAR2-induced calcium signaling in human airway smooth muscle. *J. Appl. Physiol.* 91: 995-1003
4. Bochner, B. (1995). Basophils. In „Samters Immunological Diseases“ (M.M. Frank, K.F. Austen, H.N. Clamen, and E.R. Unanue, eds.), 5th ed., 259-266, Little, Brown, Boston
5. Bochner, B., Klunk, D., Sterbinsky, S.A., Coffman, R.L., Schleimer, R.P. (1995). IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J. Immunol.* 154: 799-803
6. Brown, J.K., Tyler, C.L., Jones, C.A., Ruoss, S.J., Hartmann, T., Caughey, G.H. (1995). Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 227-236
7. Brunner, T., Heusser, C.H., Dahinden, C.A. (1993). Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL3) produce IL4 in response to immunoglobulin receptor stimulation. *J. Exp. Med.* 177: 605-611
8. Cairns, J.A. and Walls, A.F (1996). Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells: stimulation of IL8-production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Immunol.* 156: 275-283
9. Cairns, B.L. and Walls, A.F. (1997). Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 99: 1313-1321
10. Caughey, G.H. (2002). New developments in the genetics and activation of mast cell proteases. *Mol. Immunol.* 38: 1353-1357
11. Caughey, G.H. (2006). Tryptase genetics and anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 1411-1414
12. Compton, S.J., Cairns, J.A., Holgate, S.T., Walls, A.F. (1998). The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 β and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J. Immunol.* 161. 1939-1946

13. Conroy, M.C., Adkinson, N.F. Jr., Lichtenstein, L.M. (1977). Measurement of IgE on human basophils: relation to serum IgE and anti-IgE-induced histamine release. *J. Immunol.* 118: 1317-1321
14. Defrance, T., Carayon, P., Billian, G., Guillemot, J.C., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P. (1994). Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. *J. Exp. Med.* 179: 135-143
15. Dembo, B., Goldstein, B., Sobotka, A.K., Lichtenstein, L.M. (1978). Histamine release due to bivalent penicilloyl haptens. Control by the number of cross-linked IgE antibody on the basophil plasma membrane. *J. Immunol.* 121: 354-358
16. Devouassoux, G., Foster, G., Scott, L.M., Metcalfe, D.D., Prussin, C. (1999). Frequency and characterization of IL4- and IL13-producing basophils and T-cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 811-819
17. Edston, E. and van Hage-Hamsten, N. (2003). Mast cell tryptase and hemolysis after trauma. *Forensic Sci. Int.* 131: 8-13
18. Enrique, E., Garcia-Ortega, P., Sotorra, O., Gaig, P., Richart, C. (1999). Usefulness of UniCAP Tryptase fluorescence assay in the diagnosis of anaphylaxis. *Allergy* 54: 602-606
19. Falcone, F.H., Haas, H., Gibbs, B.F. (2000). The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96: 4028-4038
20. Fick, R.J. (1999). Anti-IgE as a novel therapy for the treatment of asthma. *Opin. Pulm. Med.* 5: 76-80
21. Fisher, M.M. and Baldo, B.A. (1994). Anaphylaxis during anaesthesia. Current aspects of diagnosis and prevention. *Europ. J. Anaesth.* 4: 263-284
22. Florian, S., Krauth, M.T., Simonitsch-Klupp, I., Sperr, W.R., Fritsche-Polanz, R., Sonneck, K. (2005). Indolent systemic mastocytosis with elevated serum tryptase, absence of skin lesions, and recurrent severe anaphylactoid episodes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136: 273-280
23. Foster, B., Schwartz, L.B., Devouassoux, G., Metcalfe, D.D., Prussin, C. (2001). Characterization of mast-cell tryptase-expressing blood cells as basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109: 287-293
24. Fregonese, L., Swan, F.J., van Schadewijk, A., Dolhnikoff, M., Santos, M.A., Dahan, M.R., Stolk, J., Tschernig, T., Sterk, P.J., Hiemstra, P.S., Rabe, K.F., Mauad, T. (2005). Expression of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is increased in fatal asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 1148-54
25. Füreder, W., Agis, H., Willheim, M., Bankl, H.C., Maier, U., Kishi, K., Müller, M.R., Czerwenka, K., Radaszkiewicz, T., Butterfield, J.H., Klappacher, G.W., Sper, W.R., Oppermann, M., Lechner, K., Valent, P. (1995). Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. *J. Immunol.* 155, 3152-3160

26. Gibbs, B., Haas, H., Falcone, F.H., Albrecht, C., Vollrath, I.B., Noll, T., Wolff, H.H., Amon, U. (1996). Purified human peripheral blood basophils release interleukin 13 and preformed interleukin 4 following immunological activation. *Eur. J. Immunol.* 26: 2493-2498
27. Golkar, L. and Bernhard, J.D. (1997). Mastocytosis. *Lancet* 349: 1379- 1385
28. Gruber, B.L., Kew, R.R., Jelasky, A., Marchese, M.J., Garlick, J., Ren, S., Schwartz, L.B., Korn, J.H. (1997). Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J. Immunol.* 158: 2310-2317
29. Hartmann, K., Henz, B.M., Krüger-Krasagakes, S., Köhl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U., Zuberbier, T. (1997). C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood* 89: 2863-2870
30. Haviland, D.L., McCoy, R.L., Whitehead, W.T., Akama, H., Molmenti, E.P., Brown, A., Haviland, J.C., Parks, W.C., Perlmutter, D.H., Wetzsel, R.A. (1995). Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and the lung. *J. Immunol.* 154: 1861-1869
31. He, S. and Walls, A.F. (1997). Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Europ. J. Pharm.* 328: 89 - 97
32. He, S., Gaca, M.D.A., Walls, A.F. (1998). A role for tryptase in the activation of human mast cells: modulation of histamine release by tryptase and inhibitors of tryptase. *J. Pharm. Exp. Therap.* 286: 289-297
33. He, S., Aslam, A., Gaca, M.D.A., He, Y., Buckley, M.G., Hollenberg, M.D., Walls, A.F. (2003). Inhibitors of tryptase as mast cell-stabilizing agents in human airways: effects of tryptase and other agonists of proteinase-activated receptor 2 on histamine release. *J. Pharm. Exp. Ther.* 309: 119-126
34. Hochstrasser, G.R.K. (1993). Tryptase in nasal fluid is a useful marker of allergic rhinitis. *Allergy* 48: 72 – 74
35. Hsu, C. and MacGlashan, D.W. Jr. (1996). IgE antibody up-regulates high affinity IgE binding on murine bone marrow-derived mast cells. *Immunol. Lett.* 52: 129-134
36. Huang, S.K., Xiao, H.Q., Kleine-Tebbe, J., Paciotti, G., Marsh, D.G., Lichtenstein, L.M., Liu, M.C. (1995). IL-13 at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J. Immunol.* 155: 2688-2694
37. Jogie-Brahim S., Min, H.K., Fukoka, Y., Xia, H.Z., Schwartz, L.B. (2004). Expression of α -tryptase and β -tryptase by human basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 1086-1092
38. Kawabata, A. and Kuroda, R. (2000). Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G-protein-coupled seven transmembrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles. *Jap. J. Pharm.* 82: 171-174

39. Kasaian, M., Clay, M., Happ, M.P., Garman, R.D., Hirani, S., Luqman, M. (1996). IL-4 production by allergen-stimulated primary cultures: identification of basophils as the major IL4-producing cell type. *Int. Immunol.* 8: 1287- 1297
40. Kepley, C., Youssef, L., Andrews, R.P., Wilson, B.S., Oliver, J.M. (1999). Syk deficiency in nonreleaser basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 279-284
41. Kleine-Tebbe, J., Buschauer, A., Friese, A., Schunack, W., Kunkel, G. (1992). Modulation of IgE-mediated histamine release from human leukocytes by a new class of H2-agonists. *Agent actions* 35: 185-191
42. Kleine-Tebbe, J., Josties, C., Frank, G., Stalleicken, D., Buschauer, A., Schunack, W., Kunkel, G., Czarnetzki, B. (1994). Inhibition of IgE- and non IgE-mediated histamine release from human basophil leukocytes in vitro by a histamine H1-antagonist, desethoxycarbonyl-loratadine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93: 494-500
43. Kleine-Tebbe, J., Frank, G., Josties, C., Kunkel, G. (1994). Influence of salmeterol, a long acting beta 2-adrenoreceptor agonist, on IgE-mediated histamine release from human basophils. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 4: 12-17
44. Kleine-Tebbe, J. and Kunkel, G. (1995). Die Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten in der Allergologie. In: „Allergologie in der Praxis. 2. Asthma bronchiale – Neurodermitis – Provokationsteste – Milben.“ (Jorde, W., ed.), Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München – Deisenhofen, 34-36
45. Lan, R.S., Stewart, G.A., Henry, P.J. (2002). Role of protease-activated receptors in airway function: a target for therapeutic intervention? *Pharm. Therap.* 95: 239-257
46. Li, H., Sim, T., Alam, R. (1996). IL13 released by and localized in human basophils. *J. Immunol.* 156: 4833-4838
47. Lichtenstein, L.M. (1975). The mechanism of basophil histamine release induced by antigen and by the calcium ionophore A23187. *J. Immunol.* 114: 1692-1699
48. Lin, H., Boesel, K.M., Griffith, D.T., Prussin, C., Foster, B., Romero, F.A., Townley, R., Casale, T.B. (2004). Omalizumab rapidly decreases nasal allergic response and FcεRI on basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 297-302
49. Lohi, J., Harvima, I., Keski-Oja, J. (1992). Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72000 Dalton gelatinase and fibronectin. *J. Cell. Biochem.* 50: 337-349
50. Ludolph-Hauser, D., Rueff, F., Schöpf, P., Przybilla, B. (2001). Okkulte kutane Mastozytose. *Hautarzt* 52: 390-393
51. Ludolph-Hauser, D., Rueff, F., Fries, C., Schöpf, P., Przybilla, B. (2001). Constitutively raised serum concentration of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings. *Lancet* 357: 361-362
52. Luquin, E., Kaplan, A.P., Ferrer, M. (2005). Increased responsiveness of basophils of patients with chronic urticaria to sera but hypo-responsiveness to other stimuli. *Clin. Exp. Allergy* 35: 456-460

53. MacGlashan, D.W. Jr. and Lichtenstein, L.M. (1983). Studies of antigen-binding on human basophils. I. Antigen binding and functional consequences. *J. Immunol.* 150: 980-991
54. MacGlashan, D.W. Jr., Mogowski, M., Lichtenstein, L.M. (1983). Studies of antigen-binding on human basophils. II. Continued expression of antigen-specific IgE during antigen induced desensitization. *J. Immunol.* 130: 2237-2242
55. MacGlashan, D.W. Jr., Peters, S.P., Warner, J., Lichtenstein, L.M. (1986). Characteristics of human basophil sulfidopeptide leukotriene release: releasability defined as the ability of the basophil to respond to dimeric cross-linking. *J. Immunol.* 136: 2231-2239
56. MacGlashan, D.W. Jr. (1993). Releasability of human basophils: cellular sensitivity and maximal histamine release are independent variables. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91: 605-615
57. MacGlashan, D.W. Jr., White, J.M., Huang, S.K., Ono, S.J., Schroeder, J.T., Lichtenstein, L.M. (1994). Secretion from IL-4 of human basophils. The relationship between IL-4 mRNA and protein in resting and stimulated basophils. *J. Immunol.* 152: 3006-3016
58. MacGlashan, D.W. Jr., Bochner, B.S., Adelman, D.C., Jardieu, P.M., Torgias, A., McKenzie-White, J., Sterbinsky, S.A., Hamilton, R.G., Lichtenstein, L.M. (1997). Down-regulation of Fc ϵ RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J. Immunol.* 158: 1438-1445
59. MacGlashan, D.W. Jr., McKenzie-White, J., Chichester, K., Bochner, B.S., Davis, F.M., Schroeder, J.T., Lichtenstein, L.M. (1998). In vitro regulation of Fc ϵ RI α expression on human basophils by IgE antibody. *Blood*, 91: 1633-1643
60. MacGlashan, D.W. Jr., Xia, H.Z., Schwartz, L.B., Gong, J. (2001). IgE-regulated loss, not IgE-related synthesis, controls expression of Fc ϵ RI in human basophils. *J. Leukoc. Biol.* 70: 207-218
61. Malveaux, F.J., Conroy, M.C. Adkinson, N.F. Jr., Lichtenstein, L.M. (1978). IgE receptors on human basophils. Relationship to serum IgE concentration. *J. Clin. Invest.* 62: 176-181
62. Marone, G., Poto, S., Colombo, M., Quattrin, S., Condorelli, M. (1983). Histamine release from human basophils in vitro: effects of age of cell donor. *Monogr. Allergy* 18: 139-143
63. Marone, G., Poto, S., di Martino, L., Condorelli, M. (1986). Human basophil releasability. I. Age-related changes in basophil releasability. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77: 377-383
64. Marone, G., Spadaro, G., Patella, V., Genovese, A. (1994). The clinical relevance of basophil releasability. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94: 1293-1303

65. Middelkamp-Hup, M.A., Heide, R., Tank, B., Mulder, P.G., Oranje, A.P. (2002). Comparison of mastocytosis with onset in children and adults. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 16: 115-120
66. Nguyen, K.L., Gillis, S., MacGlashan, D.W. Jr. (1990). A comparative study of releasing and nonreleasing human basophils: nonreleasing basophils lack an early component of the signal transduction pathway that follows IgE-crosslinking. *J. Allergy Clin. Immunol.* 85: 1020-1029
67. Norman, P.S., Lichtenstein, L.M., Ishizaka, K. (1973). Diagnostic tests in ragweed hay fever; a comparison of direct skin test, IgE antibody measurements, and basophil histamine release. *J. Allergy Clin. Immunol.* 52: 210-224
68. Nunez-Gomez, R., Escribano, L., Scherthaner, T.H., Prados, A., Rodriguez-Gonzalez, R., Diaz-Agustin, B., Lopez, A., Hauswirth, A., Valent, P., Almeida, J., Bravo, P., Orfao, A. (2003). Overexpression of complement receptors and related antigens on the surface of bone marrow mast cells in patients with systemic mastocytosis. *Br. J. Haematol.* 120: 257-265
69. Ochensberger, B., Daepf, G.C., Rihs, S., Dahinden, C.A. (1996). Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and – independent activation. *Blood* 88: 3028-3037
70. Ong, Y.E., Menzies-Gow, A., Barkans, J., Benyahia, F., Ou, T.T., Ying, S., Kay, A.B. (2004). A randomized double-blind, placebo-controlled study to assess the effects of omalizumab (a humanized monoclonal anti-IgE antibody) on early- and late-phase skin reactions and cellular infiltrate after multiple intradermal allergen challenges. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 84
71. Payne, V. and Kam, P.C.A. (2004). Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 59: 695-703
72. Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R., de Vries, J.E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin-4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3730-3734
73. Redrup, A., Howard, B.P., MacGlashan, D.W. Jr., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M., Schroeder, J.T. (1998). Differential regulation of IL-4 and IL-13 secretion by human basophils: their relationship to histamine release in mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 160: 1957-1964
74. Ren, S., Sakai, K., Schwartz, L.B. (1998). Regulation of human mast cell β -tryptase: conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH. *J. Immunol.* 160: 4561-4569
75. Ring, J. and Behrendt, H. (1990). H1- and H2-antagonists in allergic and pseudoallergic diseases. *Clin. Exp. Allergy* 20: Suppl. 2, 43-49

76. Rosbotham, J.L., Malik, N.M., Syrris, P., Jeffery, S., Bedlow, A., Gharraie, S., Murday, V.A., Holden, C.A., Carter, N.D. (1999). Lack of c-kit mutation in familial urticaria pigmentosa. *Br. J. Dermatol.* 140: 849-852
77. Rueff, F., Dugas-Breit, S., Bauer, C., Schöpf, P., Albert, K., Marx, R., Przybilla, B. (2005). Diagnose und Therapie der Insektengiftallergie bei Mastozytose. *Allergo. J.* 14: 514-515
78. Rueff, F., Dugas-Breit, S., Bauer, C., Placzek, M., Przybilla, B. (2006). Mastozytose – klinisches Bild und Diagnostik. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131: 1616-1621
79. Ruoss, S.J., Hartman, T., Caughey, G.H. (1991). Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 88: 493-499
80. Saini, S.S. and MacGlashan, D.W. Jr. (2002). How IgE upregulates the allergic response. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 694-697
81. Salkie, M.L. and Weimer, N. (1984). The influence of season and of sex on the serum level of total IgE and on the distribution of allergen-specific IgE. *Clin. Biochem.* 17: 362-366
82. Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Luscinskas, F.W., Gimbrone, M.A. Jr., McIntyre, B.W. (1992). IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* 148: 1086-1092
83. Schroeder, J.T., MacGlashan, D.W. Jr., Kagey-Sobotka, A., White, J.M., Lichtenstein, L.M. (1994). IgE-dependent IL-4 secretion by human basophils: the relationship between cytokine production and histamine release in mixed leukocyte cultures. *J. Immunol.* 153: 1808-1817
84. Schroeder, J.T., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M. (1995). The role of the basophil in allergic inflammation. *Allergy* 50: 463-472
85. Schroeder, J.T., Kagey-Sobotka, A., MacGlashan, D.W. Jr., Lichtenstein, L.M. (1995). The interaction of cytokines with human basophils and mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107: 79-81
86. Schroeder, J.T. and MacGlashan, D.W. Jr. (1997). New concepts: the basophil. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 429-433
87. Schroeder, J.T., Howard, B.P., Jenkins, M.K., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M., MacGlashan, D.W. Jr., (1998). IL-4 secretion and histamine release by human basophils are differentially regulated by protein kinase C activation. *J. Leukocyte Biol.* 63: 692-698
88. Schroeder, J.T., MacGlashan, D.W. Jr., Lichtenstein, L.M. (2001). Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv. Immunol.* 77: 93-122

89. Schroeder, J.T., Schleimer, R.P., Lichtenstein, L.M., Kreutner, W. (2001). Inhibition of cytokine generation and mediator release by human basophils treated with desloratadine. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1369-1377
90. Schwartz, L.B., Metcalfe, D.D., Miller, J.S., Earl, H., Sullivan, T. (1987). Tryptase levels as an indicator of mast cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N. Engl. J. Med.* 316: 1622-1626
91. Schwartz, L.B., Irani, A.-M.A., Roller, K., Castells, M.C., Schechter, N.M. (1987). Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J. Immunol.* 138: 2611-2615
92. Schwartz, L.B., Bradford, T.R., Rouse, C., Irani, A.M., Rasp, G., van der Zwan, J.K., van der Linden, P.W. (1994). Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systemic anaphylaxis. *J. Clin. Immunol.* 14: 190-204
93. Schwartz, L.B. (2001). Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders. *Leukemia Research* 25: 553-562
94. Schwartz, L.B., Min, H.K., Ren, S., Xia, H.Z., Hu, J., Zhao, W. et al. (2003). Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 Cells, Mono-Mac-6 Cells, and human skin-derived mast cells. *J. Immunol.* 170: 5667-5673
95. Siraganian, R.P. and Hook, W.A. (1976). Complement-induced histamine release from human basophils. II. Mechanism of the histamine release reaction. *J. Immunol.* 116: 639-646
96. Siraganian, R.P. and Hook, W.A. (1977). Mechanism of histamine release by formyl methionine-containing peptides. *J. Immunol.* 119: 2078-2083
97. Siraganian, R.P. and Hook, W.A. (1980). Histamine release and assay methods for the study of human allergy. In "Manual of clinical immunology." (Rose, N.R., Friedman, H., eds.), American Society for Microbiology, Washington 1980, 808-821
98. Sperr, W., Yordan, J.H., Fiegl, M., Escribano, L., Bellas, C., Dirnhofer, S., Semper, H., Simonitsch-Klupp, I., Horny, H.P., Valent, P. (2002). Serum tryptase levels in patients with mastocytosis: correlation with mast cell burden and implication for defining the category of disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128: 136-141
99. Stankovic K., Sarrot-Reynauld, F., Puget, M., Massot, C., Ninet, J., Lorcerie, B., Dupond, J.L., Salles, G., Durieu, I., Vital-Durand, D., Rousset, H. (2005). Systemic mastocytosis: predictable factors of poor prognosis present at the onset of the disease. *Eur. J. Intern. Med.* 16: 387-390
100. Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A., Bunnett, N.W. (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat. Med.* 6: 151-158

101. Tam, E.K. and Caughey, G.H. (1990). Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 27-32
102. UniCAP Tryptase Fluoroenzymeimmunoassay Instruction Manual (2001). Pharmacia and Upjohn, Uppsala, Sweden, 2-3
103. Valent, P., Akin, C., Sperr, W.R., Mayerhofer, M., Fodinger, M., Fritsche-Polanz, R., Sotlar, K., Escribano, L., Arock, M., Horny, H.P., Metcalfe, D.D. (2005). Mastocytosis: pathology, genetics and current options for therapy. *Leuk. Lymph.* 46: 35-48
103. Vercelli, G. and Geha, R.S. (1993). Regulation of IgE synthesis: from the membrane to the genes. *Springer Semin. Immunopathol.* 15: 5-16
104. de Vries, J.T. and Zurawski, G., (1995). Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 106: 175-179
105. Walker, C., Bode, E., Boer, L., Hansel, T.T., Blaser, K., Virchow, J.C. Jr. (1992). Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 109-115
106. Walls, A.F., Brain, S.D., Desai, A., Jose, P.J., Hawkings, E., Church, M.K., Williams, T.J. (1992). Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonine gene related peptide. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1243-1248
107. Warner, J.A., Peters, S.P., Lichtenstein, L.M., Hubbard, W., Yancey, K.B., Stevenson, H.C., Miller, P.J., MacGlashan, D.W. Jr. (1989). Differential release of mediators by human basophils: differences in arachidonic acid metabolism following stimulation by unrelated stimuli. *J. Leukocyte Biol.* 45: 558-571
108. Wenzel, S.E., Fowler, A.A., Schwartz, L.B. (1988). Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with or without asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137: 1002 – 1008
109. Windelborg Nielsen, B., Hansen, B., Damsgaard, T.M., Herlin, T., Soderberg, U., Bjerke, T., Thestrup-Petersen, K., Schiøtz, P.O. (1993). Basophil histamine release induced by anti-IgE and concanavalin A. Relation to the total plasma IgE content. *Allergy* 48: 54-61
110. Zuberbier, T., Schwarz, S., Hartmann, K., Pfrommer, C., Czarnetzki, B.M. (1996). Histamine releasability of basophils and skin mast cells in chronic urticaria. *Allergy*, 51: 24-28

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c.mult. Gerd Plewig und Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. Thomas Ruzicka für die Möglichkeit zur Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Przybilla für die Überlassung des Themas und die hilfreichen Anregungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau PD Dr. Franziska Rueff für das beharrliche Engagement und Interesse bei der Akquirierung der Patienten.

Frau Dr. Carolyn Bauer für die Anregung zum Thema und die Betreuung des praktischen Teils der Arbeit.

Frau Gabriele Weimer, Frau Anika Versec und Frau Sonja Gassner für die tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.

Den Schwestern der Allergologischen Ambulanz für das Verständnis und Entgegenkommen beim klinischen Teil der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. hum. biol. Dieter Hölzel vom Institut für Medizinische Informationsberatung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München für die statistische Beratung.

9 Lebenslauf

Name: Patrick Christopher Walter Mehrle

Geburtsdatum: 7. Oktober 1979

Geburtsort: München

1986 – 1990: Grundschule Partenkirchen

1990 – 1999: Benediktinergymnasium und –internat Ettal:
Abschluß mit Abitur

07/1999 – 04/2000: Grundwehrdienst

10/2000 – 05/2007: Studium der Humanmedizin an der LMU München

09/2002: Physikum

09/2003: Erstes Staatsexamen

04/2006: Zweites Staatsexamen

04/2006 – 03/2007: Praktisches Jahr

04/2006 – 08/2006: Chirurgie: Universität Bern, Inselspital, Notfallzentrum

08/2006 – 10/2006: Innere Medizin: University of Toronto, The Scarborough
General Hospital, Emergency Room

10/2006 – 12/2006: Innere Medizin: Krankenhaus München–Schwabing,
Nephrologie

12/2006 – 03/2007: Gynäkologie und Geburtshilfe: Klinikum Großhadern

04/2007: Drittes Staatsexamen

seit 03/2008: Rotkreuzklinikum München, Frauenklinik, I.Gynäkologische
Abteilung