

Herz-Kreislauf-Medikamente als Kofaktoren der Anaphylaxie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Maria Nassiri

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. R. Lucius
2. Prof. Dr. W. Uckert
3. Prof. Dr. M. Worm

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2015

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei (1564-1642)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 7 |
| 2. ZUSAMMENFASSUNG | 10 |
| 3. SUMMARY | 11 |
| 4. EINLEITUNG | 12 |
| 4.1 ALLERGISCHE REAKTION..... | 12 |
| 4.2 DIE MASTZELLE | 12 |
| 4.2.1 Aktivierungsweg der Mastzelle..... | 13 |
| 4.2.2 Mediatoren der Mastzelle..... | 17 |
| 4.3 AUSLÖSER UND KOFAKTOREN DER ANAPHYLAXIE | 18 |
| 4.4 HERZ-KREISLAUF-MEDIKAMENTE | 20 |
| 4.4.1 Ramipril und Metoprolol | 20 |
| 4.4.2 Acetylsalicylsäure | 22 |
| 4.5 PROSTAGLANDIN E ₂ UND SEINE REZEPTOREN | 24 |
| 5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 27 |
| 6. MATERIAL UND METHODEN | 28 |
| 6.1 MATERIAL | 28 |
| 6.1.1 Reagenzien und Chemikalien | 28 |
| 6.1.2 Antikörper..... | 29 |
| 6.1.3 Verbrauchsmaterialien | 30 |
| 6.1.4 Laborgeräte..... | 30 |
| 6.1.5 Software..... | 31 |
| 6.1.6 Kits..... | 32 |
| 6.1.7 Puffer und Lösungen..... | 33 |
| 6.2 METHODEN..... | 34 |
| 6.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen | 34 |
| 6.2.1.1 Mäuse | 34 |
| 6.2.1.2 Passive Anaphylaxie | 34 |

| | | |
|----------|---|----|
| 6.2.1.3 | <i>Die passiv kutane Anaphylaxie (PCA)</i> | 34 |
| 6.2.1.4 | <i>Die passiv systemische Anaphylaxie (PSA)</i> | 35 |
| 6.2.1.5 | <i>Vorbehandlung der Mäuse mit Ramipril und Metoprolol und Induktion der PCA</i> | 35 |
| 6.2.1.6 | <i>Vorbehandlung der Mäuse mit Ramipril und Metoprolol und Induktion der PSA</i> | 35 |
| 6.2.1.7 | <i>Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und Induktion der PCA</i> | 36 |
| 6.2.1.8 | <i>Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und Induktion der PSA</i> | 36 |
| 6.2.1.9 | <i>Behandlung der Mäuse mit Leukotrienantagonisten</i> | 37 |
| 6.2.1.10 | <i>Behandlung der Mäuse mit EP-Agonisten</i> | 37 |
| 6.2.1.11 | <i>Auslösen der Anaphylaxie durch Compound 48/80</i> | 38 |
| 6.2.1.12 | <i>Auslösen der Anaphylaxie durch Histamin</i> | 38 |
| 6.2.2 | <i>Zellbiologische Methoden</i> | 39 |
| 6.2.2.1 | <i>Generierung von Mastzellen aus dem Knochenmark der Maus</i> | 39 |
| 6.2.2.2 | <i>Isolierung und Kultivierung von Mastzellen aus dem Peritoneum der Maus</i> | 40 |
| 6.2.2.3 | <i>Vorbehandlung von Mastzellen mit Ramipril/Metoprolol und Analyse der Histaminfreisetzung</i> | 41 |
| 6.2.2.4 | <i>Vorbehandlung von Mastzellen mit Acetylsalicylsäure und Analyse der Histaminfreisetzung in vitro</i> | 42 |
| 6.2.2.5 | <i>Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und ex vivo Stimulation der Mastzellen</i> | 42 |
| 6.2.3 | <i>Analytische Verfahren</i> | 43 |
| 6.2.3.1 | <i>Quantitative Bestimmung von Histamin mittels Autoanalyser</i> | 43 |
| 6.2.3.2 | <i>Der „enzyme immunosorbent assay“ (EIA)</i> | 43 |
| 6.2.3.3 | <i>Quantifizierung von Mastzellmediatoren über „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)</i> | 43 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 6.2.3.4 | <i>Durchflusszytometrie</i> | 44 |
| 6.2.3.5 | <i>Durchflusszytometrische Analyse der Mastzellen</i> | 44 |
| 6.2.3.6 | <i>Gewebepräparation und Mastzellfärbung mit Toluidinblau</i> | 45 |
| 6.2.4 | Molekular biologische Methoden..... | 45 |
| 6.2.4.1 | <i>Isolierung von Ribonukleinsäure</i> | 45 |
| 6.2.4.2 | <i>Synthese von komplementärer DNA</i> | 46 |
| 6.2.4.3 | <i>Quantitative Polymerase Kettenreaktion</i> | 46 |
| 6.2.5 | Statistische Auswertung..... | 48 |
| 7. | ERGEBNISSE | 49 |
| 7.1 | ETABLIERUNG DER ANAPHYLAXIEMODELLE IN DER MAUS | 49 |
| 7.2 | RAMIPRIL UND METOPROLOL VERSTÄRKEN DIE SYMPTOME DER ANAPHYLAXIE IM MAUSMODELL | 50 |
| 7.2.1 | Ramipril und Metoprolol erhöhen die Ausschüttung von Mastzellmediatoren durch direkte Kostimulation der Mastzelle..... | 51 |
| 7.3 | ACETYLSALICYLSÄURE VERSTÄRKT DIE ANAPHYLAXIE IM MAUSMODELL | 55 |
| 7.3.1 | Acetylsalicylsäure erhöht die Mastzellmediatorausschüttung in vivo trotz inhibierender Wirkung auf die Mastzelle in vitro..... | 56 |
| 7.3.2 | Die pro-anaphylaktische Wirkung von Acetylsalicylsäure ist mastzellabhängig | 59 |
| 7.3.3 | Die orale Gabe eines Leukotrienantagonisten hat keinen Einfluss auf die pro-anaphylaktische Wirkung von Acetylsalicylsäure | 60 |
| 7.3.4 | Die PGE ₂ Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 werden von murinen Mastzellen exprimiert | 61 |
| 7.3.5 | Die subkutane Injektion von EP3 und EP4-Agonist verringert den pro-anaphylaktischen Effekt von Acetylsalicylsäure..... | 62 |
| 8. | DISKUSSION | 64 |
| 8.1 | RAMIPRIL UND METOPROLOL VERSTÄRKEN DIE PASSIV SYSTEMISCHE ANAPHYLAXIE..... | 64 |
| 8.2 | ASS VERSTÄRKT DIE PASSIV SYSTEMISCHE ANAPHYLAXIE | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 9. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 72 |
| 10. REFERENZEN | 74 |
| 11. DANKSAGUNG..... | 84 |
| 12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 86 |

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|--|
| AC | Adenylatcyclase |
| ACE | <i>Angiotensin converting enzyme</i> (Angiotensin konvertierendes Enzym) |
| ANA | Anaphylaxie |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| bp | <i>Base pair</i> (Basenpaar) |
| BMcMCs | <i>Bone marrow cultured mast cells</i> (knochenmarks-generierte, kultivierte Mastzellen) |
| BSA | Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin) |
| Brad | Bradykinin |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| DMEM | Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| cDNA | <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre DNA) |
| COX | Cyclooxygenase |
| CTMC | <i>Connective tissue mast cell</i> (Bindegewebsmastzelle) |
| ΔTmax. | Maximale Temperaturdifferenz |
| DAG | Diacylglycerol |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EIA | <i>Enzyme immunosorbent assay</i> (Enzym Immunadsorptionstest) |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym gekoppelter Immunabsorptionstest) |
| EP1-4 | PGE ₂ -Rezeptoren |
| etc. | <i>Et cetera</i> |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zytometrie) |
| FcεRI | Fcε-Rezeptor I |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> (Fötales Rinderserum) |
| FSC | <i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht) |
| Glc | Glucose |
| Gln | Glutamin |
| GPCRs | <i>G protein-coupled receptors</i> (G Protein-gekoppelte Rezeptoren) |

| | |
|-------------------|--|
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | <i>Hour(s)</i> (Stunde(n)) |
| HPRT | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| i.d. | Intradermal |
| InsP ₃ | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| IMDM | Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium |
| ITAM | <i>Immunoreceptor tyrosin-based activation motif</i> (Aktivierendes Motiv) |
| ITIM | <i>Immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif</i> (Inhibierendes Motiv) |
| LAT | <i>Linker for activation of T cell</i> |
| LT | Leukotrien |
| M | Metoprolol |
| MACS | <i>magnetic cell separation</i> (Magnetische Zellseparation) |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MMC | <i>Mucosal mast cell</i> (Mukosale Mastzelle) |
| mrIL | Murines, rekombinantes Interleukin |
| mrSCF | Muriner, rekombinanter <i>stem cell factor</i> (Stammzellfaktor) |
| MTG | Monothioglycerol |
| MZ | Mastzelle(n) |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NEAA | <i>Nonessential amino acids</i> (nicht essentielle Aminosäuren) |
| NTAL | <i>Non T cell activation linker</i> |
| OD | Optische Dichte |
| OPA | O-Phthaldialdehyd |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepuffertes Natriumchlorid) |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PE | Phycoerythrin |
| Pen/Strep | Penicillin/ Streptomycin |
| PG | Prostaglandin |
| PI3K | Phosphoinositol-3 Kinase |

| | |
|--------------------|---|
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat |
| PIPES | Piperazine-N,N-bis[2-ethanesulfonic acid] |
| PK | Proteinkinase |
| PL | Pphospholipase |
| PLC | <i>peritoneal lavage cell</i> (Zelle aus der peritonealen Lavage) |
| PMC | <i>peritoneal mast cells</i> (Peritoneale Mastzellen) |
| PcMC | <i>peritoneal cultured mast cells</i> (Kultivierte, peritoneale Mastzellen) |
| qPCR | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion |
| R | Ramipril |
| Ra | Ramiprilat |
| rpm | <i>Rotation per minute</i> (Rotation pro Minute) |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| s.c. | <i>Sub cutis</i> (subkutan) |
| SSC | <i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht) |
| t | <i>Time</i> (Zeit) |
| t _{An} | Anlagerungszeit |
| t _{Den} | Denaturierungszeit |
| t _{Elong} | Elongationszeit |
| T | Temperatur |
| T _{An} | Anlagerungstemperatur |
| T _{Den} | Denaturierungstemperatur |
| T _{Elong} | Elongationstemperatur |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TMB | Tetramethylbenzidin |

2. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anaphylaxie, eine potentiell lebensbedrohliche Reaktion, kann durch Kofaktoren beeinflusst werden. ACE-Inhibitoren, β -Blocker und Acetylsalicylsäure (ASS) werden häufig in der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob diese anaphylaktische Reaktionen begünstigen. Das Modell der passiv systemischen Anaphylaxie (PSA) wurde speziell angepasst, um die Behandlung einer Herz-Kreislauf-Therapie nachzubilden. Die orale Gabe von Metoprolol oder Ramipril verstärkte die Anaphylaxie geringfügig. Die Kombination der Medikamente steigerte die Anaphylaxie deutlich, was im Modell der passiv kutanen Anaphylaxie (PCA) bestätigt werden konnte. Gleichzeitig waren Mastzellmediatoren im Serum der Tiere erhöht. Die Inkubation muriner Mastzellen (MZ) mit den Medikamenten, steigerte die Fc ϵ RI-vermittelten Histaminfreisetzung *in vitro*. ASS-Vorbehandlung der Mäuse verstärkte die Ausprägung der PSA und der PCA, was mit einer Steigerung von MZ-Mediatoren im Serum assoziiert war. Die Fc ϵ RI-induzierte Histaminfreisetzung muriner MZ wurde hingegen nach ASS-Inkubation gehemmt, was auf einen indirekten Mechanismus hinweist. Die Reduktion der Prostaglandine (PG) durch ASS ist mit einer gesteigerten Leukotriensynthese verbunden. Der Leukotrienantagonist Montelukast konnte die, durch ASS verstärkte, PSA nicht mildern, was zeigt, dass dieser Effekt unabhängig von Leukotrienen ist. PGE₂ kann die MZ-Degranulation über EP1-EP4-Rezeptoren modulieren. Tatsächlich schwächten EP3- und EP4-Rezeptoragonisten die durch ASS gesteigerte Anaphylaxie ab. PGE₂ nimmt somit eine wichtige Rolle in der pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS ein.

Zusammenfassend wurde erstmals gezeigt, dass Metoprolol und Ramipril die Anaphylaxie über eine Steigerung der MZ-Reaktivität verstärken. ASS hingegen erhöht anaphylaktische Reaktionen über einen indirekt steigernden Effekt auf die MZ. PGE₂ ist zumindest teilweise an der pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS beteiligt.

3. SUMMARY

Cofactors contribute to the severity of anaphylaxis, a potential life-threatening hypersensitivity reaction. ACE-inhibitors, β -blockers and acetylsalicylic acid (asa) are frequently used drugs in cardiovascular therapy. Whether they affect systemic anaphylactic reactions has been addressed within this thesis. To this aim, the passive systemic anaphylaxis model (PSA) was employed here and specially designed to mimic a long term treatment in cardiovascular therapy. The data demonstrate that oral treatment of mice with ramipril or metoprolol alone slightly aggravated anaphylaxis. However, the combination clearly potentiated anaphylactic reactions, which was also confirmed in the passive cutaneous anaphylaxis model (PCA). In line with this, elevated amounts of mast cell (MC) mediators were detected in mice sera upon combined drug treatment. *In vitro*, Fc ϵ RI-mediated histamine release of murine MCs was likewise enhanced by the respective drugs. Pre-treatment of mice with asa aggravated the symptoms of PSA and PCA; simultaneously MC-mediators in sera were elevated. In contrast, Fc ϵ RI-mediated histamine release of MCs was reduced by asa *in vitro*, pointing to an indirect mechanism. Asa reduces prostaglandins (PGs) and increases leukotriene synthesis. The leukotriene antagonist montelukast failed to attenuate PSA, aggravated by asa, suggesting that the pro-anaphylactic effect of asa might be independent of leukotrienes. PGE₂ can modulate MC degranulation via EP1-EP4 receptor. Indeed, EP3 and EP4 receptor agonists alleviated anaphylaxis enhanced by asa. Therefore PGE₂ might play an important role in the pro-anaphylactic effect of asa.

In conclusion, the data demonstrate for the first time that metoprolol and ramipril exacerbate anaphylactic symptoms by a direct increase in MC reactivity. In contrast, asa aggravates anaphylactic reactions by priming MCs through an indirect mechanism. PGE₂ is at least partly involved in this process.

Schlagwörter:

Anaphylaxie, Kofaktoren, Herz-Kreislaufkrankungen, Mastzellen

Keywords:

Anaphylaxis, cofactors, cardiovascular diseases, mast cells

4. EINLEITUNG

4.1 Allergische Reaktion

Allergische Reaktionen beruhen auf einer Hypersensitivität des Immunsystems¹. Zu den klassischen Immunglobulin (Ig) E vermittelten Sofortreaktionen (Typ I Reaktionen) gehören allergische Erkrankungen wie Asthma, Rhinitis, Urtikaria, Nahrungsmittelallergien oder Anaphylaxie², welche die schwerste Manifestation³ einer allergischen Erkrankung darstellt. Beim Erstkontakt mit dem Allergen erfolgt durch eine TH2-spezifische Immunantwort die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle, welche daraufhin antigenspezifische IgE Antikörper bildet⁴. Diese binden an hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen (MZ) oder Basophilen. Durch erneuten Kontakt mit dem Allergen erfolgt eine Quervernetzung der IgE-Rezeptoren und in Folge dessen die Aktivierung von Effektorzellen. Diese setzen pro-inflammatorische Mediatoren (siehe 4.2.2) frei, welche die Symptome der allergischen Reaktion bedingen^{1, 4, 5}. Die Prävalenz der Allergieerkrankungen nimmt weltweit kontinuierlich zu^{6, 7}.

4.2 Die Mastzelle

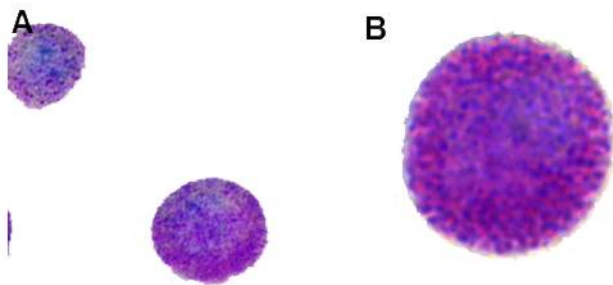


Abb. 1 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle. Murine Mastzellen wurden 4-6 Wochen kultiviert und mit Toluidinblau angefärbt. (A) zeigt die MZ in 400-facher und (B) in 1000-facher Vergrößerung.

Die Bezeichnung „Mastzelle“ wurde 1878 erstmals von dem Wissenschaftler Paul Ehrlich geprägt, der dafür 1908 den Nobelpreis erhielt⁸. Nach histologischer Färbung der Zellen mit Anilin entdeckte er zahlreiche Granula innerhalb der Zellen^{9, 10} und grenzte sie aufgrund ihrer Morphologie und ihres Färbeverhaltens gegenüber Anilin von Plasmazellen ab^{10, 11}: „Bei chronischen Entzündungen findet man außerordentlich häufig eine bedeutende Vermehrung der granulierten Zellen...Man

kann von diesem Standpunkt aus die granulierten Zellen gewissermaßen als Produkte der Mästung der Bindegewebszellen und sie dementsprechend als Mastzellen bezeichnen.“¹¹ Des Weiteren beschrieb Ehrlich, eine intensive Lokalisation dieser Zellen in der Nähe von Blutgefäßen^{10, 11}. 1966 konnte Lennart Enerbäck durch spezifische Färbungen von MZ im Bindegewebe und im Darm der Ratte zeigen, dass MZ abhängig von ihrer Lokalisation Heterogenitäten im Phänotypen aufweisen^{12, 13}. Basierend auf diesen Untersuchungen werden MZ bis heute in Bindegewebsmastzellen (engl. *connective tissue mast cell*, CTMC) und in mukosale MZ (engl. *mucosal mast cell*, MMC) eingeteilt, welche sich aufgrund ihrer Größe, Lokalisation und ihrer Granulazusammensetzung unterscheiden^{14, 15}. Histologisch lassen sich CTMCs durch eine Färbung mit Safraninrot von MMCs abgrenzen^{12, 13}. Alle MZ leiten sich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Sie zirkulieren als Vorläuferzellen im Blut und wandern schließlich zu ihrem Zielgewebe, wo die Differenzierung zu CTMCs oder MMCs erfolgt¹⁶⁻²⁰. Von besonderer Bedeutung für die Ausdifferenzierung der MZ ist der Stammzellfaktor (engl. *stem cell factor*, SCF)^{21, 22}, welcher unter anderem von Fibroblasten oder Stromazellen gebildet wird. Dieser bindet an den Rezeptor Kit (CD117) auf der MZ-Oberfläche und garantiert so die Reifung und die Homöostase der MZ^{23, 24}.

MZ sind sowohl an einer Immunantwort des nativen als auch des adaptiven Immunsystems beteiligt²⁵⁻²⁹. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Erkrankungen und entzündlichen Reaktionen²⁵⁻²⁹. Zahlreiche tierexperimentelle Studien belegen eine Rolle von MZ bei der Abwehr von Pathogenen³⁰⁻³². Im Zuge der Immunantwort kommt es zu einer erhöhten MZ-Dichte in den peripheren Geweben, welche zum einen durch die Proliferation der MZ im Gewebe und zum anderen durch die Rekrutierung von MZ-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zustande kommt³³⁻³⁵. Die Expression von Kit^{8, 22} und FcεRI^{28, 36} ist charakteristisch für MZ.

4.2.1 Aktivierungsweg der Mastzelle

Der sogenannte klassische Aktivierungsweg wird über IgE und seinen hochaffinen Rezeptor FcεRI ausgelöst^{7, 24}. Dieser Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten: Die α-Untereinheit bindet IgE, während die β-Untereinheit und γ-Untereinheiten für die Signaltransduktionen verantwortlich sind^{7, 24}. Zu diesem Zweck weisen die β- und die γ-Untereinheiten Aktivierungsmotive (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation*

motifs, ITAMs)²⁴ auf. Durch Bindung eines Allergens an rezeptorgebundenen IgE erfolgt die Quervernetzung des Rezeptors. Dies hat eine Aktivierung der Tyrosinkinase Lyn zur Folge, welche eine Phosphorylierung der ITAMs der β - und γ -Untereinheiten des Rezeptors bewirkt. Daraufhin kommt zur Bindung und Aktivierung der Kinasen Fyn und Syk³⁷, welche die nachfolgende Immunantwort modulieren können, indem sie entweder das Adaptermolekül LAT (*engl. linker for activation of T cell*) oder NTAL (*non T cell activation linker*) phosphorylieren²⁸. In der Zellmembran bedingt die Aktivierung von Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3), welches die Phospholipase (PL) C rekrutiert²⁸. LAT aktiviert die PLC, welche daraufhin Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert²⁸. InsP₃ bindet an seinen Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum und vermittelt so den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, während DAG die Translokation der Proteinkinase (PK) C bewirkt²⁸. Beides sind Schlüsselmerkmale für die Degranulation der MZ²⁸.

Neben dem klassischen Aktivierungsweg durch IgE und Fc ϵ RI, kann die MZ auch durch IgE-unabhängige Faktoren aktiviert werden. Dies geschieht beispielsweise durch Bindung von SCF an seinen Rezeptor Kit³⁸, durch Pathogene über "Toll like Rezeptoren", oder über Aktivierung von Zytokinrezeptoren, Komplementrezeptoren und Neuropeptidrezeptoren^{23, 39}. Zudem sind einige basische oder polybasische Substanzen (Bradykinin, Substanz P), Medikamente (Codein, Morphin) oder synthetische Peptide (Compound 48/80) in der Lage, MZ-Degranulationen zu induzieren^{38, 40}. Im Fall von Compound 48/80, welches im Zuge dieser Arbeit in einer tierexperimentellen Untersuchung eingesetzt wird, erfolgt dies über eine direkte Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Diese zeichnen sich durch ihre sieben Transmembrandomänen aus und sind mit GTP-regulierten Signalmolekülen (G-Proteinen) verbunden, welche aus einer membrangebundenen α - und γ -Untereinheit und einer zytosolischen β -Untereinheit bestehen⁴¹. In Folge der Aktivierung wird GTP an die α -Untereinheit gebunden, woraufhin diese von der β/γ -Untereinheit dissoziiert. Sowohl die α -Untereinheit als auch die β/γ -Untereinheit können die Immunantwort der MZ regulieren⁴¹. Basierend auf Sequenzhomologien und funktionalen Ähnlichkeiten wird die Familie der G α -Untereinheiten in vier Klassen (G α_i , G α_q , G α_s und G $\alpha_{12/13}$) unterteilt. G α_q und G $\alpha_{12/13}$ können unter anderem die PLC aktivieren⁴¹, was über einen Anstieg der Calciumkonzentration und über eine

Translokation der PKC eine MZ-Degranulation bewirkt²⁴. Die cAMP-Konzentration in der Zelle kann über Aktivierung von $G\alpha_i$ und $G\alpha_s$ moduliert werden. $G\alpha_i$ hemmt die Adenylatcyclase (AC), während $G\alpha_s$ diese stimuliert⁴¹. Eine Akkumulation von cAMP induziert die Aktivierung von PKA, welche inhibierend auf die MZ-Degranulation wirkt^{42, 43}. Welcher Mechanismus hinter der inhibierenden Wirkung von PKA auf die MZ-Degranulation steht, ist nicht genau bekannt. Für humane neutrophile Zellen konnte gezeigt werden, dass PKA die Aktivierung von PI3K unterbindet⁴⁴. Durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren kann die Degranulation der MZ reguliert werden⁴¹.

Beispiele für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind unter anderem der Beta-adrenerge Rezeptor (siehe 4.4.1) oder auch die vier Rezeptoren des Prostaglandins E_2 (siehe 4.5)⁴¹, welche im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher erläutert werden.

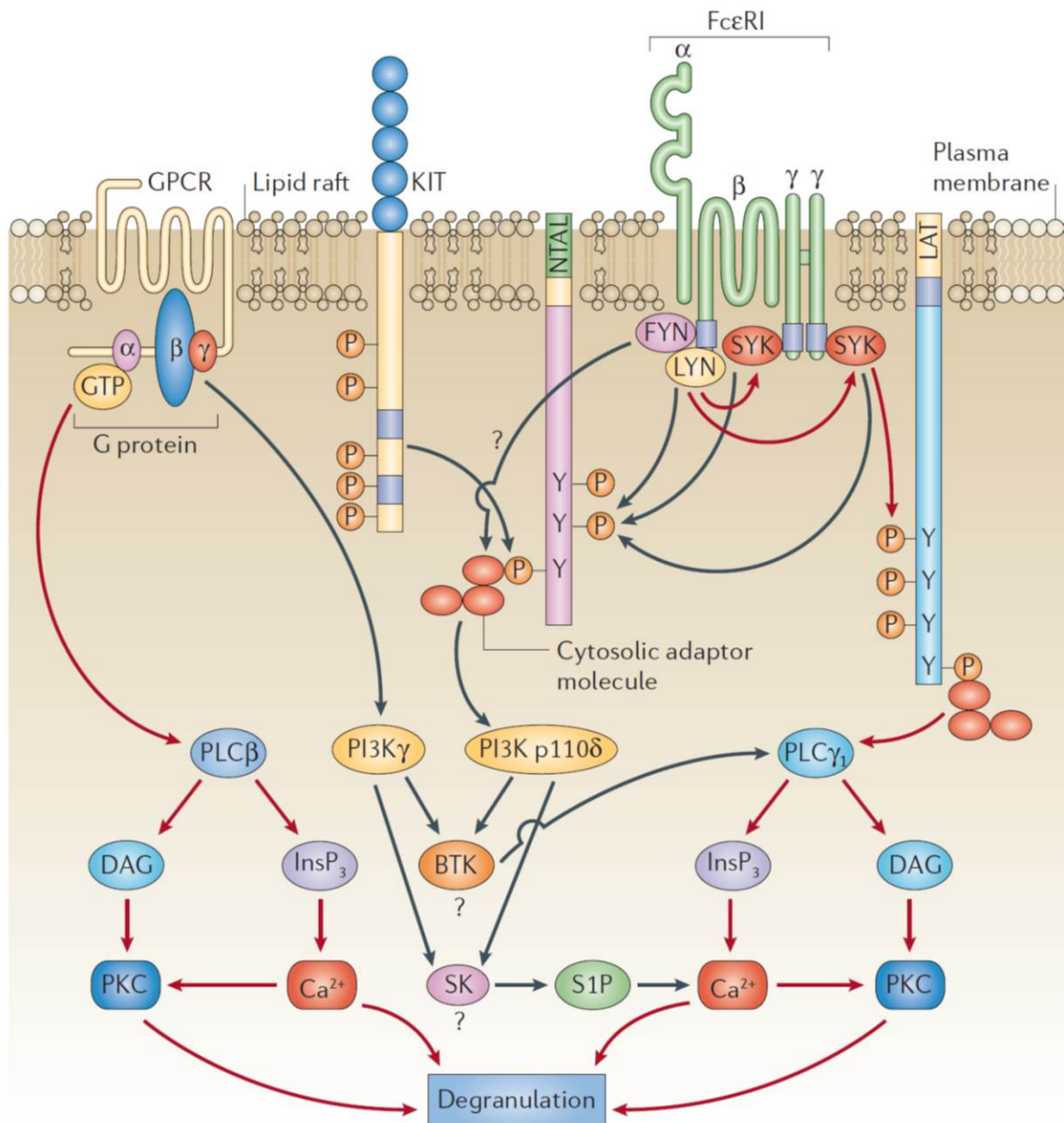


Abb.2 Aktivierungswege der Mastzelle, entnommen aus⁴¹. Allergenbedingte Quervernetzung des FcεRI hat eine Aktivierung der ITAMs durch Lyn zur Folge. Durch Rekrutierung der Kinase Syk kommt es zur Aktivierung des Adaptermoleküls LAT, welches wiederum PLC aktiviert. Durch anschließende Hydrolyse kommt es zur Bildung von InsP₃ und DAG, welche durch Auslösung eines Calciuminfluxes und Translokation von PKC die MZ-Degranulation induzieren, woraufhin es zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren kommt. Die Degranulation der MZ kann zudem über KIT und G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) erfolgen bzw. reguliert werden.

Es existieren zahlreiche Mechanismen, die der Immunantwort von MZ entgegenwirken können⁴⁰. Zum einen trägt die relativ kurze Halbwertszeit der MZ-Mediatoren selbst dazu bei, die akute Phase der Reaktion zu beenden, zum anderen kommt es zur Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 oder TGF-β⁴⁰.

Zusätzlich exprimieren MZ auch Rezeptoren, die inhibierende Motive (engl. *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, ITIMs) enthalten⁴⁵ wie beispielsweise den niedrig affinen IgG-Rezeptor FcγRIIB oder CD300a⁴⁰. Aktivierungen dieser Motive führen zur Rekrutierung der Tyrosin-Phosphatase SHIP, welche durch Dephosphorylierung von InsP₃ den Calciueinstrom ins Cytoplasma unterbricht³⁹, wodurch die MZ-Aktivierung inhibiert wird⁴⁶. Die MZ-Stimulierung kann zudem durch Rekrutierung weiterer Tyrosinphosphatasen (SHP-1/2) negativ reguliert werden. Diese dephosphorylieren die β- und γ-Untereinheiten des FcεRI sowie die Syk-Kinase und verhindern auf diese Weise eine MZ-Aktivierung^{37, 47}.

4.2.2 Mediatoren der Mastzelle

Während der MZ-Degranulation werden zahlreiche pro-inflammatorische Mediatoren ausgeschüttet, welche in 3 Klassen unterteilt werden können: 1) Präformierte Mediatoren⁴⁸ wie Histamin, Serotonin (letzteres wird überwiegend von MZ der Maus und Ratte produziert⁴⁹) oder Proteasen (Tryptase, Chymase), die in den cytoplasmatischen Granula gespeichert vorliegen. 2) De novo produzierte Lipidmediatoren⁴⁸ wie Leukotriene und Prostaglandine, die aus Arachidonsäure gebildet werden. Prostaglandin D₂ wird in großer Menge von MZ freigesetzt, während unter den Leukotrienen vorwiegend LTC₄ gebildet wird, welches zu LTD₄ und LTE₄ metabolisiert wird⁸. Zu der letzten Klasse gehören 3) Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren⁴⁸. Während die ersten beiden Klassen innerhalb von Minuten nach Antigenkontakt ausgeschüttet werden, erfolgt die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen erst mehrere Stunden nach der MZ-Aktivierung^{8, 23, 47}. Die inflammatorischen Mediatoren erhöhen unter anderem die vaskuläre Permeabilität und führen zu Vasodilatation, was in Angioödemem und Urtikaria resultiert^{5, 50-52}. Zudem können sie Bronchokonstriktion und Hypotension bewirken und im schlimmsten Fall zum anaphylaktischen Schock führen^{5, 50-52}. In nachfolgender Tabelle ist eine Auswahl an MZ-Mediatoren dargestellt, welche hauptsächlich nach Aktivierung von MZ sezerniert werden.

| Mediatorklasse | Mediatoren | Physiologischer Effekt |
|--|--|--|
| Präformierte Mediatoren | Histamin, Serotonin, Tryptase, Chymase | -Vasodilatation -Erhöhung der vaskulären Permeabilität -Inflammatorische Prozesse -Bronchokonstriktion |
| De novo synthetisierte Lipidmediatoren | LTC ₄ , PGD ₂ | -Kontraktion der Bronchien -Erhöhung der vaskulären Permeabilität -Vasokontraktion der Atem- und Koronargefäße -Periphere Vasodilatation -Verengung der Arterien und intestinalen glatten Muskulatur |
| Cytokine/Chemokine/Wachstumsfaktoren | TNF- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 | Inflammatorische Prozesse |

Tabelle 1 Murine und humane Mastzellmediatoren. Diese Mediatoren werden überwiegend nach MZ-Aktivierung freigesetzt. Neben diesen Mediatoren werden noch weitere Mediatoren sezerniert, welche in dieser Tabelle nicht dargestellt werden. Die Tabelle basiert auf^{8, 23, 28, 47, 53}.

Wie bereits erwähnt unterscheiden sich MZ je nach Lokalisation und Spezies²³, weshalb auch das Mediatorprofil der Zellen variiert. So wird der präformierte Mediator Serotonin beispielsweise in großen Mengen von murinen MZ ausgeschüttet, während humane MZ nur eine geringe Konzentration an Serotonin enthalten⁴⁹. Auch im Gehalt der Tryptasen und Chymasen unterscheiden sich die MZ beider Spezies. Bei der Maus sind eine Vielzahl an Tryptasen und Chymasen (mMCP-1 bis mMCP-14) bekannt²³, während humane MZ nur 3 Tryptasen und eine Chymase freisetzen⁵⁴. Humane und murine MZ unterscheiden sich zudem in der Sekretion einiger Zytokine wie beispielsweise dem Interleukin (IL)-4, welches unter physiologischen Bedingungen nur von murinen MZ gebildet wird^{8, 23, 28, 47}.

4.3 Auslöser und Kofaktoren der Anaphylaxie

Das Phänomen der Anaphylaxie wurde erstmals 1902 von Portier und Richet⁵⁵ beschrieben, die schwere allergische Reaktionen mit fatalem Ausgang während ihrer

Immunisierungsstudien an Hunden beobachteten. Der Begriff Anaphylaxie ist aus dem griechischen abgeleitet und bedeutet so viel wie „das Gegenteil von Schutz“ (*ana*= gegen; *phylaxis*= Schutz)⁵⁶. Die Anaphylaxie stellt die schwerwiegendste Manifestation einer allergischen Erkrankung dar. Bislang liegt keine einheitliche Definition der Anaphylaxie vor⁵⁷. Laut verschiedener Konsensustreffen aus den Jahren 2004 und 2005 wird sie als eine „schwere und potenziell lebensbedrohliche allergische Sofortreaktion“ definiert⁵⁸. Dabei handelt es sich vorwiegend um IgE-vermittelte Typ-I Reaktionen, welche sich in multiplen Organsystemen manifestieren. Neben kutanen und gastrointestinalen Symptomen können auch der Respirationstrakt und das Herz-Kreislaufsystem involviert sein^{3, 28, 58-60}. Anhand der Ausprägung der klinischen Symptome und involvierten Organsysteme werden anaphylaktische Reaktionen in Schweregrade eingeteilt, wobei es keine einheitliche Regelung für die Klassifizierung der Schweregrade gibt⁶¹. MZ und ihre Mediatoren spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Anaphylaxie^{48, 62}. So konnte anhand muriner Studien gezeigt werden, dass Mäuse, die MZ defizient sind, keine Symptome der passiv induzierten Anaphylaxie entwickeln⁶². Mäuse bei denen die Histidindecaboxylase ausgeschaltet ist und die somit kein Histamin produzieren können, zeigen ebenfalls keine anaphylaktischen Symptome im Vergleich mit ihren Wildtypkontrollen⁶². Zu den häufigsten Auslösern der Anaphylaxie gehören Nahrungsmittel, Medikamente und Insektengifte^{28 52, 63-65}. Die Ausprägung der anaphylaktischen Reaktion hängt dabei nicht nur von der Menge des Allergens ab, sondern kann durch Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht, sowie durch Vorerkrankungen wie allergisches Asthma oder Mastozytose verstärkt werden^{3, 66}. Zudem treten 30%⁶⁷ aller anaphylaktischer Reaktionen nur in Gegenwart eines sogenannten Kofaktors auf. Dabei löst ein Allergen allein keine Reaktion aus, während die Kombination aus Allergen und Kofaktor zur Ausprägung einer Anaphylaxie führt⁶⁷. Welche Mechanismen hinter diesem Effekt stehen, ist bisher nicht genau bekannt⁶⁶. Es wird jedoch vermutet, dass der Kofaktor die Bioverfügbarkeit des Allergens erhöht und/oder den Schwellenwert für die Auslösung der allergischen Reaktion senken kann^{66, 68, 69}. In Abbildung 3 ist die Ausprägung einer Anaphylaxie in Abhängigkeit eines Kofaktors schematisch dargestellt. Zu den häufigsten Kofaktoren gehören körperliche Anstrengung, Alkohol und Medikamente⁶⁷, wobei letztere im Fokus der vorgelegten Arbeit stehen.

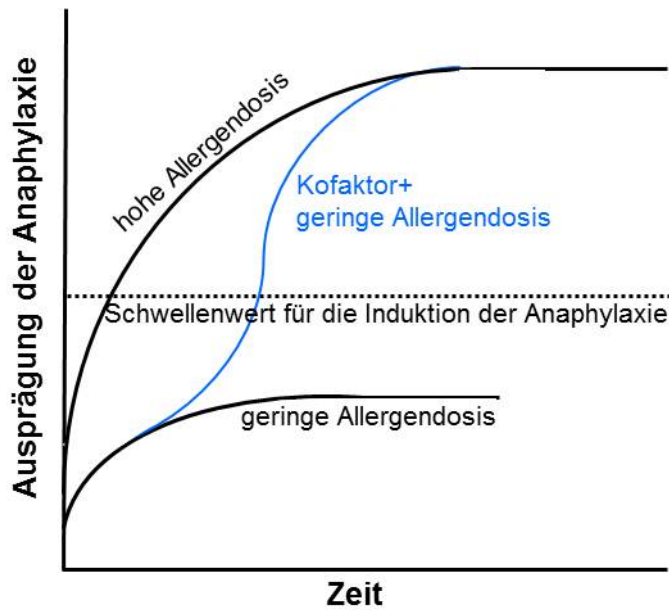


Abb. 3 Induktion der Anaphylaxie in Abhängigkeit eines Kofaktors. Eine geringe Dosis des Allergens reicht nicht aus, um eine Anaphylaxie zu induzieren, während eine hohe Allergendosis eine starke Immunantwort auslöst. Ein Allergen, welches allein unterhalb des Schwellenwertes für die Induktion einer Anaphylaxie bleibt, kann in Gegenwart eines Kofaktors schwere allergische Reaktionen induzieren. Die Darstellung basiert auf⁶⁷.

4.4 Herz-Kreislauf-Medikamente

Bei schweren anaphylaktischen Reaktionen mit Hypotension und Schock ist das Herz-Kreislaufsystem involviert⁷⁰. Einige Studien weisen darauf hin, dass koronare Herzerkrankungen Risikofaktoren für die Ausprägung einer Anaphylaxie darstellen⁶⁰. Betroffene Patienten müssen meist täglich mit Antihypertensiva wie β -Blockern, ACE-Inhibitoren oder Acetylsalicylsäure behandelt werden⁷¹⁻⁷³. Die Einnahme dieser Medikamente wird in der Literatur in einigen Fällen mit dem Auftreten anaphylaktischer Symptome assoziiert^{74, 75} und ihr Gebrauch ist während der letzten Jahre stetig angestiegen^{76, 77}.

4.4.1 Ramipril und Metoprolol

β -Blocker inhibieren die β -Adrenozeptoren und verhindern dadurch die aktivierende Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin^{78, 79}. Der β -Adrenozeptor ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der in einen β_1 und β_2 Subtypen unterteilt ist^{80, 81}. Die Aktivierung des β_1 Subtyps wirkt sich positiv inotrop und chronotrop auf das Herz aus und steigert den Blutdruck, während der β_2 Subtyp eine Vasodilatation der Bronchialmuskulatur, der Muskeln der Gebärmutter und der Blutgefäße nach sich

zieht^{80, 81}. Beide Subtypen können über eine Aktivierung der AC den cAMP-Spiegel erhöhen und dadurch die PKA aktivieren^{42, 78}. Diese führt über mehrere nachfolgende Signalkaskaden zu der positiv inotropen und chronotropen Wirkung auf das Herz⁸². Durch β -Blocker wird dieser Effekt inhibiert und es kommt in Folge dessen zur Senkung der Ruheherzfrequenz und des Blutdrucks. Der in dieser Arbeit verwendete β -Blocker Metoprolol inhibiert selektiv den β 1- Adrenozeptor⁷⁵.

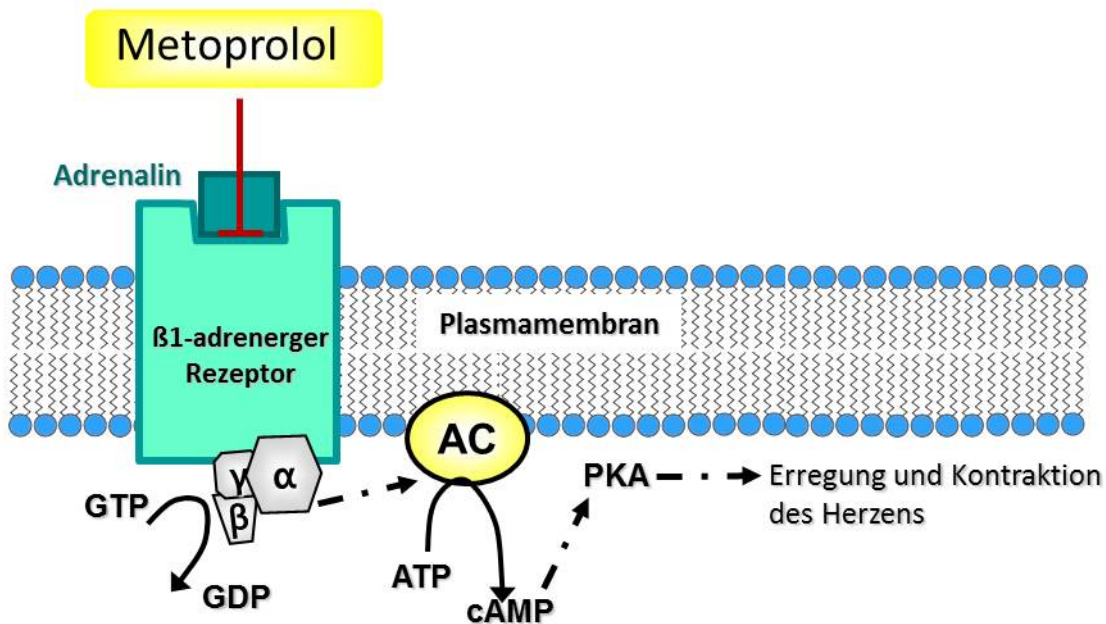


Abb. 4 Wirkmechanismus des selektiven β 1-Antagonisten Metoprolol. Aktivierung des β -Adrenozeptors bewirkt durch Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) eine Akkumulation von cAMP, welche die PKA induziert. Diese Aktivierung bewirkt über mehrere Signalkaskaden die Erregung und Kontraktion des Herzens. Durch Metoprolol wird dieser Effekt unterbunden und es kommt zur Senkung des Blutdrucks. Die Darstellung basiert auf^{80, 81}.

Eine Herz-Kreislauf-Therapie besteht überwiegend aus Kombinationen von Medikamenten aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen, da eine Monotherapie oft nicht ausreicht, um den Blutdruck hinreichend zu kontrollieren^{83, 84}.

Zusammen mit Metoprolol wird häufig der ACE-Inhibitor (engl. *Angiotensin converting enzyme*, ACE) Ramipril verschrieben. Dieser hemmt das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE), welches Angiotensin I zu Angiotensin II metabolisiert. Angiotensin II bindet an seine Rezeptoren und vermittelt so eine Kontraktion der Blutgefäße, wodurch der Blutdruck und auch die Herzfrequenz steigen. ACE-Inhibitoren bewirken demnach eine Senkung des Blutdrucks, da weniger Angiotensin II vorhanden ist⁸⁵. Als Nebeneffekt der ACE-Blockade kommt es zu einer Anhäufung

des vasoaktiven Kinins Bradykinin, welches im Körper zur Bildung von Angioödemem führen kann⁸⁶.

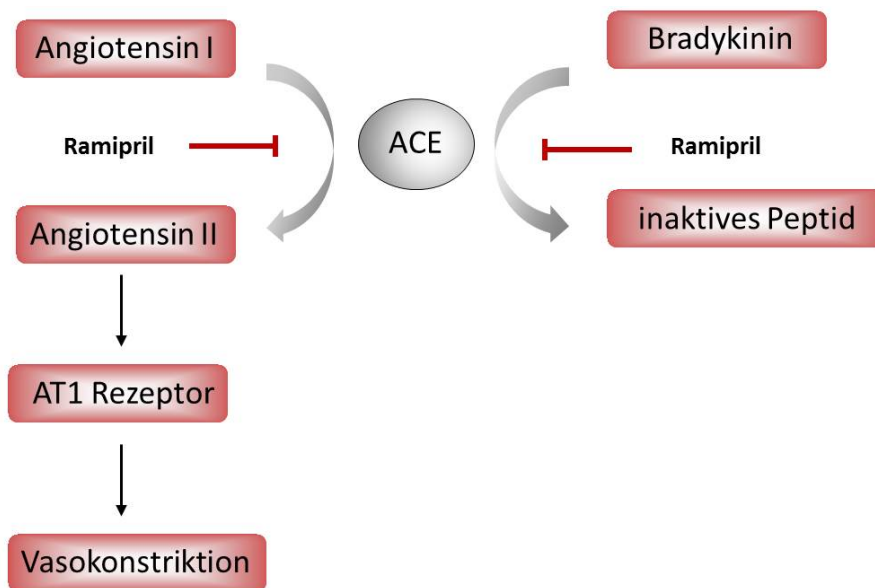


Abb. 5 Wirkmechanismus des ACE-Inhibitors Ramipril. Ramipril hemmt das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE). In Folge dessen kommt es zu einer Verringerung von Angiotensin II und konsequenterweise zur Senkung des Blutdrucks. Ramipril verhindert zudem den Abbau des vasoaktiven Bradykinins, welches im Körper akkumuliert wird. Die Darstellung basiert auf⁸⁷.

Ob eine Therapie mit β -Blockern und ACE-Inhibitoren anaphylaktische Reaktionen verstärken kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So sind mehrere Fallstudien beschrieben worden, in denen nach Einnahme der Medikamente anaphylaktischer Symptome aufgetreten sind^{75, 88}, jedoch gibt es auch gegenteilige Berichte, die zeigen, dass diese Medikamente keinen Einfluss auf die Anaphylaxie haben⁸⁹.

4.4.2 Acetylsalicylsäure

ASS gehört zu den nicht steroidal Antiphlogistika (NSAIDs) und ist beim Menschen ein weit verbreitetes Schmerzmittel^{90, 91}. In geringer Dosierung wird sie in der Prophylaxe von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt. Die Einnahme kann bei empfindlichen Individuen MZ-abhängige Reaktionen, wie Asthma oder Urtikaria auslösen^{90, 92-97}. Bei Patienten mit Aspirin induziertem Asthma wurden erhöhte Werte an LTC₄ im Serum und in der bronchoalveolären Lavage gefunden. Dies basiert auf der Hemmung der Cyclooxygenase (COX), wodurch die Prostaglandinsynthese

vermindert wird und sich das Gleichgewicht vermutlich zugunsten des Lipoxygenase-Weges verschiebt. Dadurch wird die Arachidonsäure zur verstärkten Bildung von Leukotrienen herangezogen, die in akute und chronische Entzündungsreaktionen involviert sind (siehe Abb.6). Es wird vermutet, dass die Leukotriene zu einem großen Teil für die Symptome des Aspirin induzierten Asthmas verantwortlich sind^{94, 98-101}. Tatsächlich belegen einige Studien, dass die Bronchokonstriktion, induziert durch die Einnahme von ASS, nach Gabe von Leukotrienantagonisten verbessert werden kann^{102, 103, 104}. Im Gegensatz dazu stehen andere Untersuchungen, die belegen, dass Leukotriene nicht für die Symptome des Aspirin induzierten Asthmas verantwortlich sind^{105, 106}. Vielmehr favorisieren sie die Hypothese, dass durch Hemmung der COX unter anderem die Bildung des Prostaglandins E₂ inhibiert wird, welchem eine regulatorische Funktion in der Immunantwort zugesprochen wird⁹⁸.

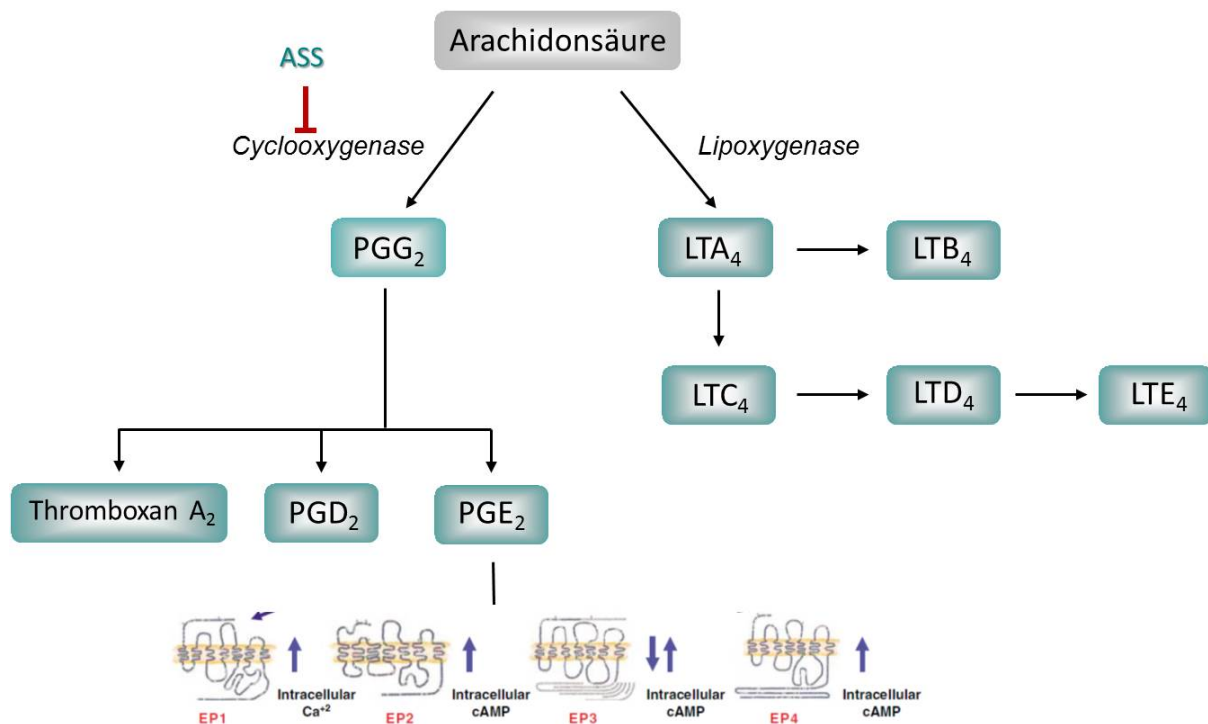


Abb. 6 Biosynthese von Prostaglandinen und Leukotrienen. Arachidonsäure wird entweder durch die Lipoxygenase zu Leukotrienen oder über die Cyclooxygenase zu Prostaglandinen und Thromboxan A₂ metabolisiert. ASS hemmt die Cyclooxygenase, was zur Reduktion von Prostaglandinen führt. Im Zuge dessen kommt es auch zur Reduktion von PGE₂, welches die Immunantwort modulieren kann. Als Nebenwirkung von ASS kommt es zu einer Akkumulation von Leukotrienen. Diese Darstellung basiert auf¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

4.5 Prostaglandin E₂ und seine Rezeptoren

Prostaglandine gehören zu den Eicosanoiden¹¹⁰. Sie bestehen aus mehrfach ungesättigten 20-Carbonfettsäuren, welche aus Arachidonsäure gebildet werden¹¹⁰. Dabei sind 3 Enzyme¹¹¹ beteiligt: Die Phospholipase A₂ katalysiert den Abbau von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden. Im Anschluss erfolgt die Oxidation zum PGG₂¹¹² durch die Cyclooxygenase (COX), welche in zwei Isoformen exprimiert wird. Die COX-1 wird konstitutiv exprimiert und ist ubiquitär verteilt^{113, 114}, während die COX-2 erst durch inflammatorische Prozesse induziert werden muss¹¹⁵. Durch spezifische Synthesen werden im letzten Schritt die Endprodukte PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α}¹¹¹ und das verwandte Molekül Thromboxan A₂ gebildet¹¹⁶. Die Prostaglandine nehmen eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Homöostase ein und sind zudem an verschiedenen entzündlichen Reaktionen beteiligt^{117, 118}.

Das Prostanoid PGE₂ ist das meistproduzierte Prostanoid des Körpers¹⁰⁸ und ist unter anderem bei der Entstehung von Schmerzen und Fieber^{73, 119, 120} sowie bei der Mukussekretion und entzündlichen Prozessen beteiligt¹²¹. Dieses Prostaglandin wird

unter anderem von Epithelzellen, Fibroblasten, überwiegend jedoch von Monozyten und Makrophagen gebildet^{113, 122}. Im Immunsystem werden PGE₂ sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Funktionen zugesprochen. So vermittelt es beispielsweise den Anstieg von Th1 und Th17 Zellen^{113, 123} und kann auf B-Zell Ebene den Klassenwechsel zu IgE verstärken¹²⁴. Im Gegensatz dazu besitzt es auch eine anti-inflammatorische Funktion, da es unter anderem die MZ-Freisetzungsfähigkeit herabsetzen kann^{94, 98 125, 126}.

Seine ambivalente Wirkung entfaltet PGE₂ über vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (EP1, EP2, EP3, EP4), wobei es abhängig vom Rezeptor zu unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden kommt^{108, 127, 128}. Eine Aktivierung des EP1 Rezeptors erhöht die PLC und bewirkt dadurch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in der Zelle. Der EP2 und der EP4 Rezeptor vermitteln einen Anstieg der zellulären AC, wodurch die Konzentration an cAMP steigt¹²⁹. Über den EP3 Rezeptor kann die AC sowohl inhibiert als auch aktiviert werden und infolgedessen die cAMP-Konzentration der Zelle moduliert werden¹²⁹. Da die meisten Zellen mehr als einen Rezeptor für PGE₂ exprimieren, hängt seine Wirkung von der Expressionsrate der Rezeptoren und ihrem Expressionsverhältnis zueinander ab^{128, 130}. Zudem bindet PGE₂ je nach Spezies mit unterschiedlicher Affinität an seine Rezeptoren¹⁰⁸.

Viele Studien weisen einen Zusammenhang zwischen der Inhibierung der COX und einer erhöhten MZ-Aktivität auf^{98, 99, 131}. Ein Abfall von PGE₂, induziert durch die Hemmung der COX, kann somit zu einer erhöhten Mediator-Ausschüttung aus MZ führen, was in zahlreichen in vitro-Experimenten bereits demonstriert wurde^{105, 129, 132}. Tatsächlich ließ sich für das Aspirin induzierte Asthma zeigen, dass die Gabe von PGE₂ oder seines Analogons Misoprostol betroffene Patienten gegen Asthmaanfälle schützen und Bronchokonstriktion verhindern kann^{105, 129}. Zudem wurden bei diesen Patienten geringere Basalwerte von PGE₂ detektiert, verglichen mit Asthmatikern, welche keine Symptome bei ASS-Einnahme zeigten¹³³. Zusätzlich konnte eine verringerte Expressionsrate des EP2 Rezeptors festgestellt werden¹³⁴. Bei Patienten mit Aspirin induzierter Urtikaria wurde eine genetische Variation im EP4 Rezeptor detektiert, welche ebenfalls in einer reduzierten Expressionsrate resultiert¹³⁵. Diese Studien sprechen für eine überwiegend anti-inflammatorische Rolle von PGE₂ in Hypersensitivitätsreaktionen, welche durch die Inhibierung der COX aufgehoben wird. NSAIDs, welche selektiv die COX-2 inhibieren, werden von ASS-intoleranten

Patienten gut vertragen¹³⁶. Daher wird vermutet, dass überwiegend die COX-1 für den protektiven Effekt von PGE₂ verantwortlich ist^{102, 107}. Dafür spricht auch, dass die COX-1 sensitiver gegenüber einer Hemmung durch ASS ist¹⁰⁷.

5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Anaphylaxie, eine potentiell lebensbedrohliche Reaktion, stellt die schwerste Manifestation einer allergischen Erkrankung dar. Die Einnahme von Herz-Kreislauf-Medikamenten ist in der Vergangenheit mit dem Auftreten anaphylaktischer Reaktionen assoziiert worden. Ob diese Medikamente tatsächlich Kofaktoren für die Anaphylaxie darstellen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Ramipril (ACE-Inhibitor), Metoprolol (β -Blocker) und ASS auf die Ausprägung einer anaphylaktischen Reaktion zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst zwei Anaphylaxiemodelle in der Maus etabliert, welche die Behandlung während einer medikamentösen Therapie nachahmen. Folgende Fragen wurden mit Hilfe der beiden Modelle beantwortet:

1. Wird die Ausprägung der Anaphylaxie durch Ramipril und/oder Metoprolol beeinflusst?
2. Welche Auswirkung hat eine Kombination beider Medikamente auf die Stärke der Anaphylaxie?
3. Welche Wirkung hat ASS auf die Anaphylaxie?

Die Aktivierung von MZ stellt eine Schlüsselfunktion bei der Auslösung einer Anaphylaxie dar. Welche Bedeutung MZ bei dem Einfluss von Antihypertensiva auf die Anaphylaxie haben, ist bisher nicht bekannt. Um dies näher zu charakterisieren wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen beantwortet:

4. Beeinflussen die Medikamente die Ausschüttung von MZ-Mediatoren nach einer anaphylaktischen Reaktion?
5. Welche Auswirkungen haben die Medikamente auf die Fc ϵ RI induzierte Histaminausschüttung muriner MZ *in vitro*?
6. Welche Mechanismen sind maßgeblich beteiligt?

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Reagenzien und Chemikalien

| Reagenzien/Chemikalien | Hersteller |
|--|-----------------------------------|
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | Sigma-Aldrich, D |
| 100 bp DNA Leiter | New England BiolabsR Inc., USA |
| α - Monothioglycerol (α MTG) | Sigma-Aldrich, D |
| Acetylsalicylsäure | Sigma-Aldrich, D |
| Agarose | Biozym, D |
| Aqua steril | Braun, D |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, D |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | PAA, A |
| Bradykinin | Sigma-Aldrich, D |
| Butanol | Merck, D |
| Compound 48/80 | Sigma-Aldrich, D |
| DNase | Macherey-Nagel, D |
| Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4 | Merck, D |
| Ethidiumbromid | Invitrogen, D |
| EDTA | PAA, A |
| Ethanol | J.T. Baker, D |
| <i>Evans Blue</i> Farbstoff | Sigma, D |
| FCS | PAA, A |
| Glucose | Sigma-Aldrich, D |
| Heptan | Merck, D |
| Histamin | Sigma-Aldrich, |
| Hydrogenperoxid, H_2O_2 | Merck, D |
| Isoflurane (Forane) | Abott |
| Kaliumchlorid, KCL | Merck, D |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 | Merck, D |
| Kaiser's Glycerol Gelantine | Merck, D |
| Magnesiumchlorid, MgCl_2 | Merck, D |
| Metoprolol | Sigma-Aldrich, D |
| mrIL-3 | Immunotools, D |
| mrSCF | Immunotools, D |

| Reagenzien/Chemikalien | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Natriumchlorid, NaCl | Merck, D |
| 0,9% NaCl (physiologische Lösung) | Braun, D |
| ONO-DI-004 EP1 | ONO Pharmaceutical Co., JP |
| ONO-AE1-259-01 EP2 | ONO Pharmaceutical Co., JP |
| ONO-AE-248 EP3 | ONO Pharmaceutical Co., JP |
| ONO-AE1-329 EP4 | ONO Pharmaceutical Co., JP |
| o-Phthaldialdehyd | Sigma-Aldrich, D |
| PIPES | Sigma-Aldrich, D |
| P/S | Biochrom, D |
| Ramipril | Sanofi Aventis, D |
| Ramiprilat | Sanofi Aventis, D |
| Salzsäure, HCL | Merck, D |
| Schwefelsäure, H ₂ SO ₄ | Merck, D |
| TAE-Puffer (50x) | Genaxxon, D |
| TNP-BSA | Biocat, D |
| Toluidinblau | Merck, D |
| TritonX-100 | Merk, D |
| Trypsin/EDTA-Lösung | Gibco, D |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, D |
| Zitronensäure | Sigma-Aldrich, D |

6.1.2 Antikörper

| Antikörper | Hersteller |
|---|-------------------|
| Ratte anti-Maus CD117 (Kit)-FITC | BD Pharmingen, D |
| Ratte anti-Maus FcεRI-PE | eBiosciences, USA |
| Fc Block (anti-CD16/CD32) | eBiosciences, USA |
| Maus anti-TNP-IgE | BD Pharmingen, D |
| Ratte anti-Maus-IgE | BD Pharmingen, D |
| Ratte anti-Maus IgG _{2b,κ} Isotypenkontrolle | BD Pharmingen, D |
| Ratte anti-Maus IgG _{2a} Isotypenkontrolle | R&D Systems, USA |
| Ratte anti-Maus IgG _{2b} -FITC, Istotypenkontrolle | eBioscience, USA |
| Ratte anti-Maus IgG _{2b} -PE Isotypenkontrolle | eBioscience, USA |

6.1.3 Verbrauchsmaterialien

| Material | Typ | Hersteller |
|-------------------------------|--|------------------------|
| Zellkulturplatten, steril | 12, 48, 96 Kavitäten | Nunc, D |
| Biosphere Filter Tips | 0.5-20 µL 2-100 µL 100-1000 µL | Sarstedt, D |
| Hautstanze, steril | 5 mm Durchmesser | Stiefel, D |
| Combitips Plus | 0,5 ml, 5 ml, 10 ml, 12,5 ml | Eppendorf, D |
| Deckgläser | Peha-haft, 6 cm width | Hartmann, D |
| Descosept AF | | Dr. Schumacher GmbH, D |
| Einwegrasierer | | Wilkinson, D |
| FACS Röhrchen | | Sarstedt, D |
| Falcon | 15ml, 50 ml | BD, Pharmingen, D |
| Kanülen, steril | 21G, 25G, 26G, 27G, 30G | BD, Pharmingen, D |
| Kryokassette (Einweg) | | Sakura, NL |
| Kryo-Spray (Einfrierspray) | Instant freezing spray | Bio-Optica, I |
| <i>LightCycler</i> Kapillaren | 20 µl | Roche, D |
| Objekträger | Superfrost plus | Langenbrinck, D |
| O.C.T. Kryoeinbettmedium | Tissue-Tek | Sakura, NL |
| Petrischale | | Greiner Bio-One, D |
| Pipettenspitzen, steril | | Eppendorf /Sarstedt |
| Reagiergefäße, steril | 0,5 ml, 1,5ml, 2 ml | BD Pharmingen, D |
| Skalpell, steril | No. 20 | Feather, D |
| Spritzen, steril | 1, 10, 20, 60 ml | BD Pharmingen, D |
| Zellkulturflaschen, steril | 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² | Greiner Bio-One, D |

6.1.4 Laborgeräte

| Technische Geräte | Modell | Hersteller |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|
| Autoanalyser II | | Borgwald Technik, D |
| Autoklav | | Melag, D |
| <i>CASY Technology</i> | Casy 1, Model TT | Roche, D |
| <i>Cell Counter</i> | | |
| Digitalkamera | EOS20D | Canon, D |
| <i>Dynatech MRX Microplate Reader</i> | Version 1.33 | Dynex Technologies, D |

| Technische Geräte | Modell | Hersteller |
|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Elektronische Waagen | LA 4200 und PT120 | Sartorius, D |
| FACS | MACSQuant Analyzer | Miltenyi Biotec, D |
| Gelkammer | | Bio-Rad Laboratories, D |
| Gradiententhermocycler | Px2 Thermo Cycler | Thermo Technologies, D |
| Heizblock | Thermomixer 5436 | Eppendorf, D |
| Inkubator | HERA cell | Heraeus, D |
| Kryostat | Jung frigocut 2800N | Leica Biosystems, D |
| Lichtmikroskop | Axiovert 10 | Carl Zeiss AG, D |
| <i>LightCycler</i> | LightCycler 1.5 | Roche, D |
| Magnetrührer | Magnetmix 2070 | Hecht-Assistent, D |
| Mehrkanalpipette | | Eppendorf |
| Mikroskop und | AxioPlan 2 | Carl Zeiss AG, D |
| Kamera | AxioCam HRC | Carl Zeiss AG, D |
| <i>NanoDrop</i> | 1000 | Thermo Fisher Scientific, US |
| <i>Spectrophotometer</i> | | |
| pH-Elektrode | | NeoLab GmbH, D |
| pH-Meter | MV 870 Digital | Präcitronic, D |
| Pipetten | 10µl, 100µl, 200µl; 1000µl | Eppendorf, D |
| Pipettierhilfe | Pipetus | Hirschmann Laborgeräte. D |
| <i>Precellys 24 lysis</i> | | Berlin Technologies, D |
| <i>Homogenisator</i> | | |
| Schüttler | IKA-Vibrax-VXR | IKA Werke GmbH & Co. KG, D |
| Sicherheitswerkbank | HeraSafe | Heraeus, D |
| Thermocycler | Primus 96 plus | Thermo Technologies, D |
| Tischzentrifuge | 5417 C 5417R | Eppendorf, D |
| Wasserbad | U3 | Julabo, D |
| Vortexer | Reax 2000 | Heidolph, D |
| Zentrifuge | Varifuge RF Megafuge 1.0R | Heraeus, D Heraeus, D |

6.1.5 Software

| Software | Version | Hersteller |
|-------------------|----------------|-------------------|
| <i>AxioVision</i> | 4.6.3 | Carl Zeiss AG, D |
| CASY-Messgerät | 1.5 | Schärfe System, D |

| | | |
|------------------------------|-------|--|
| <i>Excel</i> 2003, 2007,2010 | | Microsoft Corporation |
| <i>FlowJo</i> | 7.6.1 | Tree Star, US |
| <i>LightCycler Software</i> | 3.00 | Roche, D |
| <i>NCBI Databases</i> | | National Center for Biotechnology Information |
| <i>ND-1000</i> | V3.7 | NanoDrop, US |
| <i>GraphPad Prism</i> | 5.00 | GraphPad Software USA |
| <i>Primer 3</i> | 4.0.0 | SourceForge |
| <i>ELISA Reader Software</i> | G3.2 | Dynex Technologies GmbH, D |
| <i>Dynex Revelation</i> | | |
| <i>UCSC Databases</i> | | UCSC Genome Bioinformatics Group |

6.1.6 Kits

| Kits | Hersteller |
|---|---------------------------|
| Histamin ELISA | Labor Diagnostika Nord, D |
| LTC ₄ EIA | Cayman, USA |
| PGD ₂ EIA | Cayman, USA |
| PGE ₂ EIA | ENZO |
| mMCP-1 ELISA | eBioscience, USA |
| Serotonin-ELISA | IBL, D |
| NucleoSpin RNA II Kit | Macherey-Nagel, D |
| <i>TaqMan Reverse Transcriptions Reagents</i> | InvitrogenTM, D |
| <i>LightCycler Fast Start DNA</i> | Roche, D |
| <i>Master SYBR Green</i> | |

6.1.7 Puffer und Lösungen

| Puffer/Lösungen | Zusammensetzung | Hersteller |
|---|--|----------------|
| PBS, pH 7,4 | 137 mM NaCl 7,7 mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ | |
| TMB, pH 5 | 0,05 M Na ₂ HPO ₄ 0,02 M Zitronensäure | |
| PBS mit Mg ₂ ⁺ und Ca ₂ ⁺ | | PAA, A |
| PBST | 0,05% Tween /1x PBS | |
| 50x PIPES, pH 7,4 | 1,1 M NaCl 50 mM KCl 250 mM PIPES | |
| PAG-CM | 1x Pipes 0,1% Glucose 0,1% BSA | |
| FACS Puffer | 1% BSA/ 1x PBS | |
| MACS Puffer | 0,2% BSA/ 1x PBS 20 mM EDTA | |
| IMDM | | PAA, A |
| Medium BMcMCs | IMDM Medium 10% FCS 1% P/S 0,002% αMTG 10 ng/ml IL-3 | |
| Medium PcMCs/PMCs | RPMI Medium 5% FCS 0,002% αMTG 10 ng/ml IL-3 30 ng/ml SCF | |
| RPMI | IMDM-Medium | PAA, A |
| Transportmedium | 10% P/S | |
| FACS Flow | | BD, Pharmingen |

6.2 Methoden

6.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

6.2.1.1 Mäuse

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden weibliche Balb/c Mäuse (10-12 Wochen alt) von der Firma Charles River bezogen. Balb/c Mäuse sind durch eine TH₂ dominierende Immunantwort charakterisiert¹³⁷. Die Tiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Wasser und Futter. Sämtliche, in dieser Arbeit durchgeführten, tierexperimentellen Untersuchungen wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt (G0035/08, G0200/11).

6.2.1.2 Passive Anaphylaxie

Um die pro-anaphylaktische Wirkung von Herz-Kreislauf-Medikamenten *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei Mausmodelle verwendet, die beide den IgE-abhängigen Signalweg nutzen, um anaphylaktische Reaktionen hervorzurufen. Hierbei werden die Effektorzellen initial mit einem Antikörper sensibilisiert und die Anaphylaxie 24 Stunden (h) später durch ein Antigen ausgelöst. Die Dosen von Antikörper und Antigen für die Induktion der passiven Anaphylaxie mussten zunächst durch Dosis-Wirkungskurven für die vorliegenden Untersuchungen optimiert werden.

6.2.1.3 Die passiv kutane Anaphylaxie (PCA)

Die PCA ist ein passives, lokal auf das Ohr beschränktes Anaphylaxie-Modell¹³⁸ und wird häufig angewandt um anaphylaktische Reaktionen zu untersuchen. Hierbei wurde den Tieren intradermal in ein Ohr anti-TNP-IgE injiziert und zur Kontrolle in das zweite Ohr PBS. Nach 24 h erfolgte eine intravenöse Gabe von TNP-BSA zusammen mit 1% des Farbstoffes Evans Blue. Dies ist ein Marker für die vaskuläre Permeabilität und somit ein Parameter für die Stärke einer anaphylaktischen Reaktion. Nach 30 min wurden die Tiere euthanasiert, der Farbstoff aus den Ohren mittels Dimethylformamid extrahiert und die Intensität anschließend photometrisch bei 600 nm bestimmt.

6.2.1.4 *Die passiv systemische Anaphylaxie (PSA)*

Im Unterschied zur PCA führt die PSA zu einer systemischen Anaphylaxie. Die MZ wurden dabei intravenös mit anti-TNP-IgE sensibilisiert und am folgenden Tag durch intravenöse Gabe von TNP-BSA stimuliert. Die systemische Anaphylaxie ist durch eine Hypothermie gekennzeichnet. Die Abnahme der Körpertemperatur gilt hierbei als wichtigster Parameter^{51, 139} und wurde über einen Zeitraum von 70 min in 10 min Intervallen nach Auslösung der Reaktion bestimmt. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert und Serumproben sowie verschiedene Organe für weitere Analysen entnommen.

6.2.1.5 *Vorbehandlung der Mäuse mit Ramipril und Metoprolol und Induktion der PCA*

Nach erfolgreicher Etablierung der Methode, wurden die Tiere jeweils für 14 Tage mit 2,5 mg/kg Ramipril (freier Zugang über das Trinkwasser), 30 mg/kg Metoprolol (Gabe über Schlundsonde) oder mit einer Kombination aus beiden Medikamenten behandelt. Ein Behandlungszeitraum von 14 Tagen wurde gewählt, um eine Langzeitmedikation während einer Herz-Kreislauf-Therapie, zu imitieren. Die hier verwendeten Konzentrationen der Medikamente wurden so gewählt wie sie üblicherweise in einer Herz-Kreislauf-Therapie eingesetzt werden und wurden nach einer Formel von *Reagan-Shaw et. al.*¹⁴⁰ für die Maus berechnet. Um zu gewährleisten, dass die Tiere die korrekte Menge Ramipril erhalten, wurde die tägliche Flüssigkeitsaufnahme pro Käfig zwei Wochen vor Beginn und während der Untersuchungen jeden Tag bestimmt. Als Kontrolle wurde Trinkwasser über eine Schlundsonde appliziert. An Tag 14 wurden 3 ng anti-IgE-TNP oder PBS in je ein Ohr der Mäuse injiziert und die passiv kutane Anaphylaxie an Tag 15 durch intravenöse Injektion von 7 µg TNP-BSA, zusammen mit 1% Evans Blue ausgelöst.

6.2.1.6 *Vorbehandlung der Mäuse mit Ramipril und Metoprolol und Induktion der PSA*

Nach erfolgreicher Etablierung der PSA, erhielten die Tiere 14 Tage Ramipril (freier Zugang über das Trinkwasser), Metoprolol (Gabe über Schlundsonde) oder eine Kombination aus beiden Medikamenten. An Tag 14 wurden die MZ intravenös mit 7 µg anti-IgE-TNP sensibilisiert und die PSA am darauffolgenden Tag durch

intravenöse Gabe von 7 µg TNP-BSA ausgelöst. Anschließend wurde die rektale Körpertemperatur über 70 min in 10 min Intervallen bestimmt.

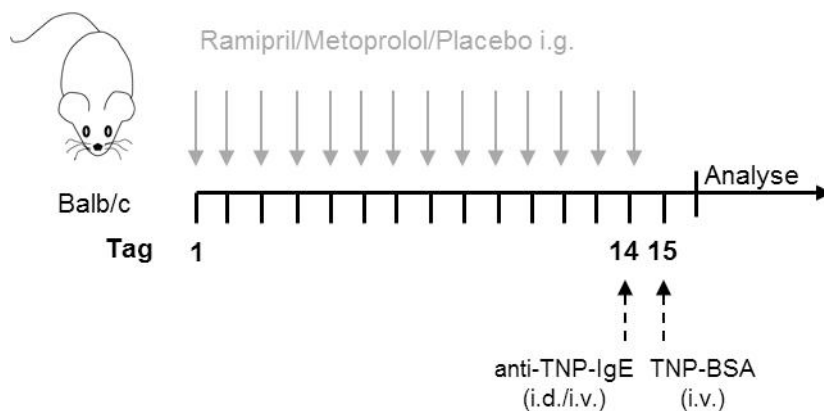


Abbildung 7 Experimentelles Modell zur Vorbehandlung der Mäuse mit Ramipril und Metoprolol und anschließendem Auslösen der PCA oder PSA. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten über 14 Tage eine orale Gabe von Ramipril und/oder Metoprolol oder Trinkwasser (Placebo) als Kontrolle. An Tag 14 erfolgte eine Sensibilisierung der MZ mittels anti-TNP-IgE (i.d. bei der PCA und i.v. bei der PSA) und 24 h später wurde die PSA durch intravenöse Applikation von TNP-BSA induziert. Zum Auslösen der PCA wurde TNP-BSA zusammen mit 1% Evans Blue in die Schwanzvene injiziert.

6.2.1.7 Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und Induktion der PCA

Die Behandlung mit ASS erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen, da längerfristige orale Gaben bei Mäusen zu einer Schädigung der Magenschleimhaut führen können¹⁴¹. Die Tiere erhielten über 3 Tage ASS (50 mg/kg) oder Trinkwasser als Kontrolle (Placebo) per os. Die hier verwendete Konzentration von ASS wurde so gewählt wie sie üblicherweise während einer Herz-Kreislauf-Therapie eingesetzt wird und wurde nach einer Formel von *Reagan-Shaw et. al.*¹⁴⁰ für die Maus berechnet. An Tag 3 wurden 3 ng anti-TNP-IgE oder PBS i.d. in je ein Ohr der Maus injiziert und die PCA durch intravenöse Gabe von TNP-BSA, zusammen mit 1% Evans Blue 24 h später ausgelöst. Die Extravasation des Farbstoffes wurde photometrisch bei einer OD von 600 bestimmt.

6.2.1.8 Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und Induktion der PSA

Nach 3-tägiger Vorbehandlung der Tiere mit ASS (50 mg/kg) oder Trinkwasser (Placebo) mit Hilfe einer Schlundsonde, wurden die MZ an Tag 3 mit 7 µg anti-TNP-IgE intravenös sensibilisiert und am darauffolgenden Tag durch intravenöse Injektion von 7 µg TNP-BSA aktiviert. Die rektale Körpertemperatur wurde über einen

Zeitraum von 70 min in 10 min Intervallen bestimmt. Die Parameter für dieses Modell (Applikationsroute/Konzentration von ASS sowie die Dosisangaben des Antigens/Antikörpers und die Bestimmung der rektalen Körpertemperatur) waren, wenn nicht explizit im Text erwähnt, gleichbleibend in allen Folgeexperimenten.

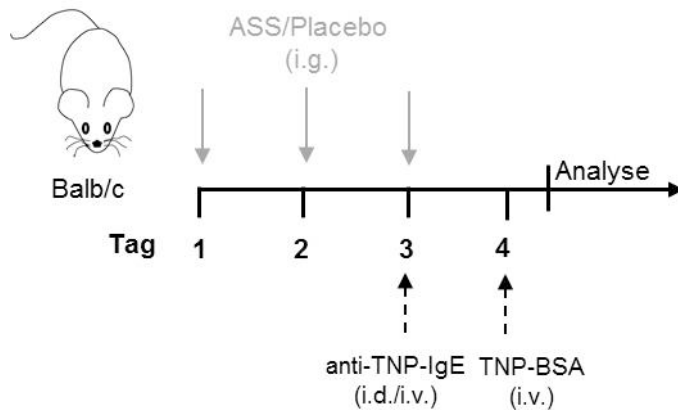


Abbildung 8 Experimentelle Modell für die Vorbehandlung der Mäuse mit ASS und Auslösen der PCA und PSA. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten über 3 Tage eine orale Gabe von ASS oder Trinkwasser (Placebo) als Kontrolle. An Tag 3 wurden die MZ mittels anti-TNP-IgE sensibilisiert (i.d. bei der PCA und i.v. bei der PSA) und nach 24 h erfolgte die Induktion der PSA durch intravenöse Applikation von TNP-BSA. Für das Auslösen der PCA wurde TNP-BSA zusammen mit 1% Evans Blue in die Schwanzvene injiziert.

6.2.1.9 Behandlung der Mäuse mit Leukotrienantagonisten

Nach 3-tägiger Applikation von ASS oder Trinkwasser über eine Schlundsonde, wurden die MZ wie oben beschrieben an Tag 3 sensibilisiert. An Tag 4 wurde den Tieren 20 min vor Auslösen der PSA der selektive Leukotrienantagonist Montelukast (10 mg/kg^{142}) über eine Schlundsonde verabreicht und die PSA wie oben beschrieben ausgelöst. Zur Kontrolle erfolgte eine orale Applikation von Trinkwasser mittels Schlundsonde.

6.2.1.10 Behandlung der Mäuse mit EP-Agonisten

Die Tiere erhielten eine 3-tägige orale Gabe von ASS oder Trinkwasser. An Tag 4, erfolgte 30 min vor dem Auslösen der Anaphylaxie eine subkutane Gabe von je einem EP-Rezeptoragonisten ($10 \text{ } \mu\text{g/kg}^{143}$), welche hochspezifisch an die PGE_2 -Rezeptoren EP1-EP4 binden¹⁴⁴. Zur Kontrolle wurde PBS injiziert.

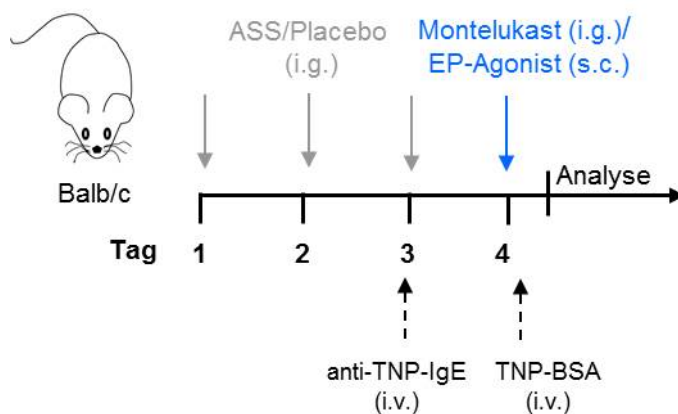


Abbildung 9 Experimentelles PSA-Modell zur Vorbehandlung der Mäuse mit ASS und Applikation von Montelukast oder eines EP-Agonisten. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten über 3 Tage eine orale Gabe von ASS oder Trinkwasser (Placebo) als Kontrolle. Vor Induktion der Anaphylaxie, erfolgte eine orale Gabe von Montelukast (20 min vor Auslösen der PSA) oder eine subkutane Applikation spezifischer EP-Rezeptoragonisten (30 min vor Auslösen der PSA).

6.2.1.11 Auslösen der Anaphylaxie durch Compound 48/80

Nach 3-tägiger oraler Applikation von ASS oder Trinkwasser (Placebo), wurde am folgenden Tag der MZ-Liberator Compound 48/80 [5 mg/kg¹⁴⁵] i.p. injiziert. Dieser ersetzt die durch anti-TNP-IgE/TNP-BSA ausgelöste Anaphylaxie. Die rektale Körpertemperatur wurde für 70 min bestimmt.

6.2.1.12 Auslösen der Anaphylaxie durch Histamin

Nach 3-tägiger oraler Gabe von ASS oder Trinkwasser (Placebo), wurde am folgenden Tag die Anaphylaxie durch intravenöse Gabe von Histamin ausgelöst. Dieser Weg ist unabhängig von Effektorzellen¹⁴⁶ und gibt Aufschluss darüber, ob durch die ASS-Gabe die Ansprechbarkeit des umliegenden Gewebes (Fibroblasten, Endothelzellen) auf Mediatoren der MZ verändert ist. An Tag 4 wurden 4 mg/kg Histamin in die Schwanzvene der Tiere injiziert und die Temperaturabnahme über einen Zeitraum von 70 min bestimmt.

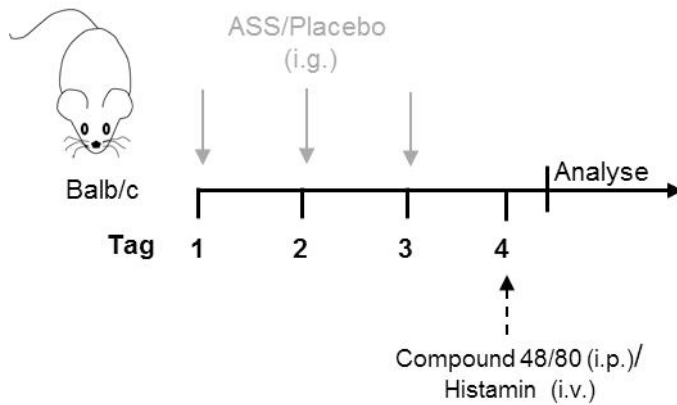


Abbildung 10 Experimentelles Modell zur Vorbehandlung der Mäuse mit ASS und Induktion der Anaphylaxie durch Histamin oder Compound 48/80. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten 3 Tage eine orale Gabe von ASS oder Trinkwasser (Placebo) als Kontrolle. Die Induktion der Anaphylaxie erfolgte durch intraperitoneale Gabe von Compound 48/80 oder durch intravenöse Applikation von Histamin an Tag 4.

6.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zellen bei 37 °C und 5% CO₂ in humider Atmosphäre kultiviert.

6.2.2.1 Generierung von Mastzellen aus dem Knochenmark der Maus

Die Gewinnung muriner MZ (engl. *bone marrow-derived cultured mast cells*, *BMcMCs*) erfolgte nach dem Protokoll von *Mrabet-Dahbi et al.*¹⁴⁷. *BMcMCs* können als MZ-Progenitor-Zellen¹⁴⁸ bezeichnet werden. Sie gehören zu den unreifen MZ¹⁴⁹ und werden den mukosalen MZ zugeordnet¹⁵⁰. *BMcMCs* wurden aus murinen Knochenmarkszellen in einer 4-6-wöchigen Kultur unter Zusatz von murinem, rekombinanten Interleukin 3 (mrlL-3) generiert, welches die Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierung fördert⁴⁷.

Femora und Tibiae einer Maus wurden sorgfältig von Geweberesten befreit und bis zur weiteren Verwendung in 50 ml Transportmedium aufbewahrt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kondylen wurden abgeschnitten, das Knochenmark mit einer 25 Gauge Kanüle herausgespült und mit einer 10 ml Pipette durch mehrmaliges Resuspendieren aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen bei 1300 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert, in 20 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Gewebezellkulturflasche überführt. Um die adhärensten Stromazellen von den suspensiven MZ zu separieren, wurde an Tag 5, 8, 10 und 15 der Kultur ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt. Ab Tag 19

wurde das Medium zweimal wöchentlich gewechselt, wobei einmal ein 50%iger Mediumwechsel und einmal ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt wurde. Der Wachstumsfaktor mrIL-3, wurde bei jedem Mediumwechsel in einer Endkonzentration von 10 ng/ml frisch hinzugegeben. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung mikroskopisch überprüft und zusätzlich über den *CASY Cell Counter* bestimmt. Um die Reinheit der Zellen zu überprüfen, erfolgte eine Färbung mit Toluidinblau, welches die Granula der MZ metachromatisch anfärbt. Zusätzlich wurde die Reinheit der Zellen über die Expression von FcεRI und Kit im Durchflusszytometer (siehe 6.2.3.5) bestimmt.

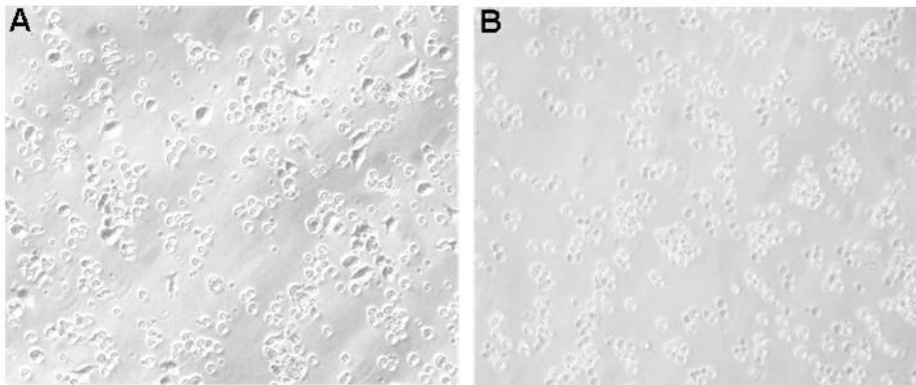


Abbildung 11 Lichtmikroskopische Aufnahme einer murinen Mastzellkultur. Isolierte Knochenmarkszellen (A) 5 Tage nach Kultivierung (B) Mastzellkultur nach 4-wöchiger Kultivierung bei einer 200-fachen Vergrößerung.

6.2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Mastzellen aus dem Peritoneum der Maus

Die Isolierung von MZ aus dem Peritoneum wurde ebenfalls nach Protokoll von *Mrabet-Dahbi et al.* durchgeführt¹⁴⁷. Im Gegensatz zu BMcMCs ähneln peritoneale MZ phänotypisch den Bindegewebsmastzellen^{147, 150}.

Frisch isolierte Zellen aus der peritonealen Lavage (engl. *peritoneal lavage cells*, PLC) bestehen zu maximal 5% aus MZ¹⁵⁰. Um eine möglichst reine MZ-Population zu erhalten ist die Kultivierung mit den Zytokinen mrIL-3 und murinem, rekombinantem SCF (mrSCF) erforderlich^{147, 150}. Zu diesem Zweck wurde die Maus zunächst durch zervikale Dislokation euthanasiert, das Peritoneum freigelegt und sofort desinfiziert. Mit einer 26 Gauge Kanüle wurden 5 ml 2 mM EDTA/PBS zusammen mit 5 ml Luft in den Bauchraum der Maus injiziert ohne das Gewebe zu verletzen. Um die peritonealen Zellen zu lösen, wurde die Maus für 3 min hin und her bewegt und die Suspension mit einer 20 Gauge Kanüle aus dem Bauchraum der Maus in ein Falcon überführt, was bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert

wurde. Alle weiteren Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 1300 rpm für 10 min bei 4 °C pelletiert, in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine Gewebekulturflasche mit 25 cm² Wachstumsfläche überführt. Um die Ausbeute der MZ zu erhöhen, wurden für die Herstellung einer Kultur 2-3 Mäuse genutzt. Die Zellen wurden frisch mit mrlL-3 (10 ng/ml) und mrSCF (30 ng/ml) versetzt¹⁵⁰. Am 2. Tag wurden die Suspensionszellen abgenommen und die Kultur mit 5 ml frischem Medium und Zytokinen versorgt. Am 5. Tag wurden erneut 5 ml Medium hinzugefügt und die Kultur erneut mit Zytokinen versetzt. Nach 8-9-tägiger Kultivierung konnten die Zellen für Experimente genutzt werden. Unter diesen Kultivierungsbedingungen ist es möglich eine Reinheit der Kultur von 95% zu erreichen¹⁴⁷

6.2.2.3 Vorbehandlung von Mastzellen mit Ramipril/Metoprolol und Analyse der Histaminfreisetzung

Eine häufig angewandte Methode zur Überprüfung einer MZ- Degranulation ist die Quantifizierung des MZ-Mediators Histamin. Dafür wurden pro Reaktionsansatz mindestens 2×10^5 BMcMCs verwendet. Die Zellen wurden über Nacht mit IgE (1 µg/ml) beladen, am folgenden Tag mit PAG-CM Puffer gewaschen und mit verschiedenen Konzentrationen Ramiprilat (die aktive Form von Ramipril), Metoprolol oder Bradykinin (akkumuliert während der Einnahme von Ramipril im Organismus) allein und in unterschiedlichen Kombinationen für 20 min bei 37° C vorinkubiert. Die verwendeten Konzentrationen der Medikamente basieren auf klinischen Plasmakonzentrationen, welche bei Einnahme der Medikamente während einer Herz-Kreislauf-Therapie entstehen können¹⁵¹⁻¹⁵³. Je 3 unbehandelte Reaktionsansätze dienten als Kontrolle und wurden für die Analyse gemittelt. Die MZ wurden für weitere 25 min bei 37 °C mit 0,4 µg/ml oder 4 µg/ml anti-IgE aktiviert (= Stimulierte Histaminfreisetzung). Der entsprechende Isotyp wurde mitgeführt und Calcium Ionophor A23187 (2 µM) diente in allen *in vitro* Experimenten als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Degranulation. Um die spontane Histaminfreisetzung zu bestimmen, wurden die Zellen nicht mit anti-IgE stimuliert, sondern für 25 min in PAG-CM belassen. Der Gesamtgehalt von Histamin wurde durch Zellyse mit 1% Perchlorsäure bestimmt. Alle Reaktionsansätze wurden nach 25-minütiger Inkubation mit kaltem PIPES abgestoppt, bei 1300 rpm, 4 °C für 10 min

zentrifugiert und die Histaminfreisetzung in den Überständen der Zellen im Histamin-Autoanalyser bestimmt^{154, 155}. Die Net Histaminfreisetzung wurde nach folgender Formel berechnet: Net Histaminfreisetzung (%) = [(Stimulierte Histaminfreisetzung - spontane Histaminfreisetzung) / Gesamthistamingehalt] * 100.

6.2.2.4 *Vorbehandlung von Mastzellen mit Acetylsalicylsäure und Analyse der Histaminfreisetzung in vitro*

BMcMCs oder PcMCs wurden über Nacht mit IgE (1 µg/ml) beladen, am folgenden Tag mit PAG-CM gewaschen und für 20 min bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen ASS inkubiert. Je 3 unbehandelte Reaktionsansätze dienten als Kontrolle und wurden für die Analyse gemittelt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit anti-IgE (4 µg/ml) für weitere 25 min bei 37 °C, während die Zellen für die spontane Histaminfreisetzung in PAG-CM belassen wurden. Um den Gesamthistamingehalt zu bestimmen wurden die Zellen mit Triton X-100 aufgeschlossen. Die Überprüfung der Histaminfreisetzung im Histamin-Autoanalyser und im Histamin-ELISA zeigte, dass die Detektion des Histamins mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse lieferte. Da die Ausbeute von PcMCs gering war, musste die Bestimmung des Histamingehalts mit dem sensitiveren Histamin ELISA durchgeführt werden. Die Net-Histaminfreisetzung wurde nach obiger Formel berechnet und auf den unbehandelten Zellansatz normiert.

6.2.2.5 *Vorbehandlung der Mäuse mit Acetylsalicylsäure und ex vivo Stimulation der Mastzellen*

Bei diesem Experiment wurden nicht die Zellen, sondern die Mäuse direkt mit ASS (50 mg/kg) für 3 Tage behandelt. Am 3. Tag wurden die Zellen des Peritoneums wie in 6.2.2.2 beschrieben isoliert und die Mischzellkultur (MZ, Fibroblasten, Leukozyten, Makrophagen)¹⁵⁶ direkt nach Entnahme unter sterilen Bedingungen mit 10 µg/ml anti-IgE stimuliert, um eine möglichst hohe MZ Degranulation zu erzielen. Die Net Histaminfreisetzung wurde mittels Histamin ELISA nach Herstelleranweisungen bestimmt und auf den unbehandelten Zellansatz normiert.

6.2.3 Analytische Verfahren

6.2.3.1 *Quantitative Bestimmung von Histamin mittels Autoanalyser*

Im Autoanalyser kann Histamin quantitativ bestimmt werden^{155, 157}. Hierbei erfolgt zunächst eine Reinigung der Lösung durch Butanol. Aufgrund der geringen Molekülgröße wird Histamin anschließend in einem alkalischen Milieu an o-Phthaldialdehyd gekoppelt und anschließend in einem sauren Milieu zum fluoreszieren angeregt. Die relative Fluoreszenz verhält sich proportional zum Histamingehalt in der Probe und wird von einem Schreiber aufgezeichnet^{155, 157}. Mit Hilfe einer Referenzreihe aus bekannten Histaminkonzentrationen wird der Histamingehalt in der Probe bestimmt.

6.2.3.2 *Der „enzyme immunosorbent assay“ (EIA)*

Zur Quantifizierung der MZ-Mediatoren PGD₂, PGE₂, und LTC₄ wurden kompetitive „enzyme immunosorbent assays“ durchgeführt. Hierbei wird das nachzuweisende Antigen einer Probe in Konkurrenz zu einem enzymmarkierten Antigen von einem spezifischen Antikörper auf einer Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats, kommt es zum Farbumschlag, welcher photometrisch detektiert werden kann. Die quantitative Bestimmung der nachzuweisenden Probe erfolgte durch den Vergleich der optischen Dichte mit einer Referenzkurve aus bekannten Antigenkonzentrationen, wobei die Farbintensität umgekehrt proportional zur Konzentration ist¹⁵⁸. Alle in dieser Arbeit verwendeten EIAs sind kommerziell erhältlich und wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller durchgeführt.

6.2.3.3 *Quantifizierung von Mastzellmediatoren über „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)*

Zur Quantifizierung von Histamin, Serotonin und der mukosalen Mastzellprotease-1 (mMCP-1) im Serum wurde ein „Sandwich“-ELISA durchgeführt. Hierbei bindet das nachzuweisende Antigen aus der Probe an einen spezifischen Antikörper auf einer Mikrotiterplatte. Ein 2. Antikörper, der an ein Reporterenzym gekoppelt ist, bindet spezifisch an das bereits gebundene Antigen. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats, kommt es zum Farbumschlag, der photometrisch bestimmt werden kann. Die Quantifizierung des nachzuweisenden Antigens erfolgte durch den Vergleich der

optischen Dichte mit einer Referenzkurve aus bekannten Antigenkonzentrationen¹⁵⁸. Die ELISAs sind kommerziell erhältlich und wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Einzelzellen in Zellsuspensionen. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelt und an zwei Lasern vorbeigeführt. Das dabei entstehende Streulicht ist für jede Zelle spezifisch und wird detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*, FSC) gibt Auskunft über die Größe und das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle¹⁵⁹. Somit wird eine Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Die Durchflusszytometrie bietet zusätzlich die Möglichkeit Fluoreszenzen zu detektieren. Auf diese Weise kann man die Expression spezifischer intrazellulärer und extrazellulärer Antigene von Einzelzellen untersuchen, die zuvor mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert wurden. Die Fluorochrome werden dabei durch einen Laserstrahl angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches detektiert werden kann¹⁵⁹.

6.2.3.5 Durchflusszytometrische Analyse der Mastzellen

Um die Reinheit der BMcMCs zu bestimmen, wurden 1×10^6 Zellen pro Reaktionsansatz verwendet, mit MACS-Puffer gewaschen und bei 2400 rpm, 4 °C für 10 min pelletiert. Um eine spezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper zu gewährleisten, wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C mit einer FcR-Block-Lösung versetzt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit den spezifischen Antikörpern für 30 min gefärbt, wobei je ein Reaktionsansatz gegen CD117 (Kit-Rezeptor), FcεRI (IgE-Rezeptor) und CD117/ FcεRI in Kombination gerichtet war. Die entsprechenden Isotypen sowie ein Ansatz mit ungefärbten Zellen wurden zur Kontrolle mitgeführt. Nach der Färbung wurden die Zellen gewaschen und sofort am *MACSQuant Analyzer* gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der *FlowJo Software*.

6.2.3.6 Gewebepräparation und Mastzellfärbung mit Toluidinblau

Hautproben vom rasierten Bauch der Maus wurden mit einer Hautstanze (5 mm Durchmesser) entnommen, in Kryomedium eingebettet und vorsichtig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zunge und das Herz wurden entnommen, mit einem Skalpell zerteilt und ebenfalls, eingebettet in Kryomedium, in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe eines Kryotoms wurden bei -30 °C $5\text{ }\mu\text{M}$ Semidünnschnitte angefertigt und sofort auf einen Objektträger überführt. Die Schnitte wurden getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Um die MZ-Granula sichtbar zu machen, wurden die Proben mit 0,1% Toluidinblau in 0,5 N HCl für 1 h inkubiert und anschließend kurz mit Leitungswasser gewaschen. Die Präparate wurden mit Glycin-Lösung eingedeckelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Quantifizierung der MZ wurden die Präparate mit Hilfe des *Axioplan* Lichtmikroskops fotografiert und die Anzahl an MZ bestimmt.

6.2.4 Molekular biologische Methoden

Um die Expressionsrate der EP-Rezeptoren zu bestimmen wurde eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Dafür musste Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA) zunächst isoliert werden und in komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) transkribiert werden, welche dann in der qPCR bestimmt werden konnte.

6.2.4.1 Isolierung von Ribonukleinsäure

1×10^6 murine Zellen (BMcMCs oder PMCs) wurden mit 1x PBS gewaschen und bei 1300 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 350 μl Lyse-Puffer (*RA1, NucleoSpin RNA II*) aufgenommen, welcher frisch mit 3,5 μl β -Mercaptoethanol (β -ME) versetzt wurde und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Als Positivkontrolle wurde die Niere einer Maus in 500 μl Lyse-Puffer (*RA1, NucleoSpin RNA II*) aufgenommen, frisch mit β -ME versetzt und mit Hilfe eines Homogenisators bei 5000 rpm für 2x30 sec lysiert. Die Isolierung der RNA wurde unter Verwendung des *NucleoSpin RNA II Kits* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Eluation der RNA muriner MZ erfolgte mit 30 μl RNase freiem Wasser und wurde zweimal mit demselben Eluat durchgeführt. Die RNA der Niere wurde in 60 μl RNase freiem Wasser eluiert.

6.2.4.2 Synthese von komplementärer DNA

Die Synthese der cDNA erfolgte mit Hilfe von *TaqMan reverse Transkriptase* Reagenzien, welche eine *MultiScribe reverse Transkriptase* beinhalten. Dabei wurde maximal 1 µg RNA in einem Volumen von 7,7 µl mit 12,3 µl Reaktionsansatz (Tabelle 3) versetzt und in einem Thermocycler nach Anweisung des Herstellers zu cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

| Reagenz | Volumen [µl] | Endkonzentration |
|--|--------------|------------------|
| 10x TaqMan RT Puffer | 2,0 | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ (oder vorverdünnt) | 4,4 | 3-6 mM |
| 10 µM desoxyNTPs | 4 | 2 µM |
| 50 µM RandomHexamer Primer | 0,5 | 1,25 µM |
| 50 µM Oligo d(T) ₁₆ Primer | 0,5 | 1,25 µM |
| 20 U/µl RNase Inhibitor | 0,4 | 0,4 U/µl |
| 50 U/µl <i>Multiscribe reverse Transkriptase</i> | 0,5 | 1,25 U µl |

Tabelle 3 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription.

6.2.4.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Bei der quantitativen PCR (qPCR) kann die Expressionsrate von Genen auf RNA-Ebene bestimmt werden. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welcher sich mit hoher Spezifität an doppelsträngige DNA anlagert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm¹⁶⁰ emittiert. Die Fluoreszenz wird während der PCR in jedem Zyklus gemessen und nimmt proportional mit der Menge der amplifizierten DNA zu, was in Echtzeit (engl. *Real-Time*) detektiert werden kann. Alle Proben wurden als Doppelbestimmung gemessen und Wasser als Negativkontrolle verwendet. Die qPCR wurde mit Hilfe des *QuantiTect SYBR green PCR Kits* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Alle verwendeten Primer waren Oligo (dt)-Primer und wurden mit Hilfe der *Primer3 Software*¹⁶¹ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) hergestellt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL bezogen. Je nach Primerspezifität wurde die Magnesium-Konzentration im qPCR-Mix, die Anlagerungstemperatur sowie die Elongationszeit der Primer während der Amplifikation angepasst. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch eine

Schmelzpunktanalyse überprüft. Hierbei wird kontinuierlich die Temperatur erhöht, was zur Strangtrennung der DNA und zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR green* führt. Die Temperatur, bei der es zur Strangtrennung kommt, ist für jedes PCR-Produkt spezifisch, wodurch sich unspezifische Nebenprodukte ausschließen lassen¹⁶².

Für die qPCR wurden 2 µl verdünnte cDNA (1: 4) mit 3 µl Reaktionsansatz (Tabelle 4) in einer Glaskapillare vermischt und im LightCycler gemessen. Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

| Reagenz | Volumen [µl] | Endkonzentration |
|--|--------------|------------------|
| 10x <i>FastStart DNA Master SYBR Green I</i> | 0,5 | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 0,8 | 3-5 mM |
| 10 µM Primer, vorwärts | 0,25 | 100-500 nm |
| 10 µM Primer, revers | 0,25 | 100-500 nm |
| H ₂ O | 1,20 | |

Tabelle 4 Reaktionsansatz für eine qPCR.

Die Primersequenzen sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

| Gen | Sequenz (5´-3´) | Größe | Amplifikation | |
|-------|--|--------|---|---|
| | | | T _{Den} :/T _{An} :/T _{Elong} | t _{Den} :/t _{An} :/t _{Elong} |
| mEP1 | vor: ATCCATCACTTCAGCCACAG rev: GCGTACAGCCAGAAAGAGTG | 214 bp | 95/65/72 [°C] | 10/10/9 [sec] |
| mEP2 | vor: GACGGACCACCTCATTCTC rev: CTAAGTATGGCAAAGACCCAAG | 180 bp | 95/64/72 [°C] | 10/10/6 [sec] |
| mEP3 | vor: GTGTGTGCTGTCCGTCTGTT rev: TCCTTCTCCTTTCCCATCTGT | 108 bp | 95/65/72 [°C] | 10/10/5 [sec] |
| mEP4 | vor: ATCTTACTCATCGCCACCTCTC rev: ATCTGGGTTTCTGCTGATGTCT | 120 bp | 95/63/72 [°C] | 10/10/5 [sec] |
| mHPRT | vor: CGTCGTGATTAGCGATGATG rev: AATCCAGCAGGTCAGCAAAG | 221 bp | 95/65/72 [°C] | 10/10/15 [sec] |

Tabelle 5 Murine Primersequenzen für die qPCR.

Die relative Genexpression wurde auf das Referenzgen Hypoxanthin-

Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normiert und nach der Effizienzkorrekturmethode^{163, 164} berechnet.

6.2.5 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Bei Normalverteilung wurde ein ungepaarter T-Test oder eine One way Anova-Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney *U* Test oder eine One way Anova-Varianzanalyse mit anschließendem Dunns Test durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Waren die Ergebnisse statistisch signifikant, wurden die Signifikanzen in den Graphen angegeben.

7. ERGEBNISSE

7.1 Etablierung der Anaphylaxiemodelle in der Maus

Um den Einfluss von Herz-Kreislauf-Medikamenten auf die Anaphylaxie zu untersuchen, wurden das passiv kutane, sowie das passiv systemische Anaphylaxiemodell eingesetzt. Ziel war es in beiden Modellen eine suboptimale Anaphylaxie zu induzieren, um eventuelle pro-anaphylaktische Effekte der Medikamente messen zu können. Zu diesem Zweck mussten die Dosen von Antigen und Antikörper zunächst für beide Modelle optimiert werden (Daten für die Etablierung des PCA Modells sind nicht dargestellt). Für das PSA-Modell wurde eine gleichbleibende Menge von anti-TNP-IgE injiziert, 24 h später folgte die Applikation verschiedener Dosen von TNP-BSA. Wie in Abbildung 13 dargestellt folgte die anaphylaktische Reaktion (dargestellt als Temperaturabnahme) dem Verlauf einer Gaußschen Glockenkurve. Die anaphylaktische Reaktion nahm dabei mit steigender Allergendosis zu, erreichte ein Maximum bei 50 µg und fiel anschließend wieder ab (Abb. 13 B). Geringe Unterschiede in der Dosis des Allergens führten zu deutlich sichtbaren Differenzen im Abfall der Körpertemperatur. So führten 4 µg des Allergens zu einer maximalen Temperaturdifferenz von 2,4 °C, während 7 µg TNP-BSA die Temperatur um 3 °C verringerte. Die größte Temperaturabnahme von 5,8 °C wurde mit 50 µg des Allergens erreicht. Eine Temperaturdifferenz von 3-4 °C ist ausreichend, um den potentiell steigernden Einfluss von Kofaktoren auf die Anaphylaxie bestimmen zu können. Daher wurde die Dosis von 7 µg TNP-BSA in allen weiteren Untersuchungen zur PSA verwendet.

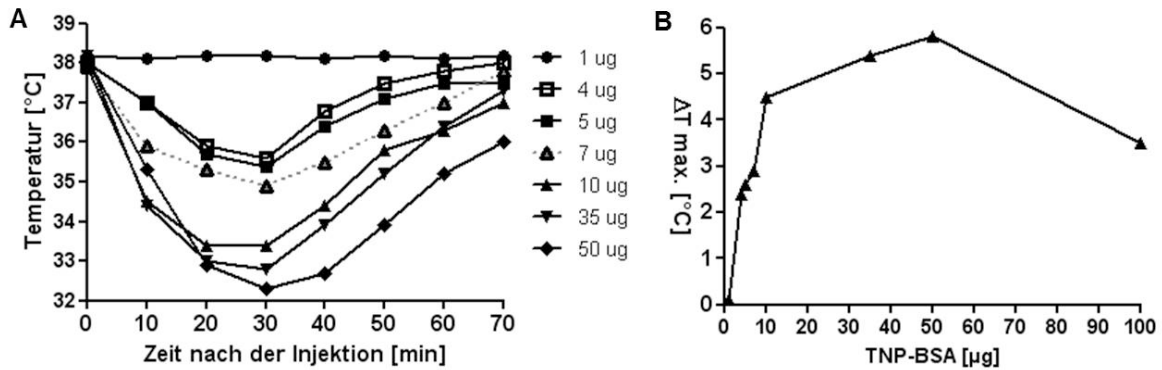


Abbildung 13 Dosiswirkungskurve von TNP-BSA. Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit anti-TNP-IgE sensibilisiert und am folgenden Tag wurde die PSA durch Gabe verschiedener Dosen TNP-BSA induziert. (A) Die rektale Körpertemperatur wurde über einen Zeitraum von 70 min bestimmt. (B) Die maximale Temperaturabnahme wurde für jede Dosis berechnet.

7.2 Ramipril und Metoprolol verstärken die Symptome der Anaphylaxie im Mausmodell

Um zu untersuchen, ob die Anaphylaxie durch die Einnahme von Herz-Kreislauf-Medikamenten beeinflusst wird, wurden weibliche Balb/c Mäuse für 14 Tage mit Ramipril und/oder Metoprolol oral behandelt, bevor die PSA an Tag 15 ausgelöst wurde. Anhand der Graphik (Abb. 14A) ist eine geringfügig stärkerer Temperaturabnahme (um 0,75 °C) nach Einnahme von Ramipril im Vergleich zur Placebo-Gruppe zu verzeichnen, während die Einnahme von Metoprolol zu einer signifikanten Temperaturabnahme um 1,18 °C führte. Die größte Steigerung der Temperaturabnahme (um 2,22 °C) war nach Kombination beider Medikamente zu beobachten. Auch im PCA-Modell verstärkte die kombinierte Gabe von Ramipril und Metoprolol das Ausmaß der Anaphylaxie deutlich, was anhand der erhöhten Farbintensität zu erkennen und photometrisch messbar war.

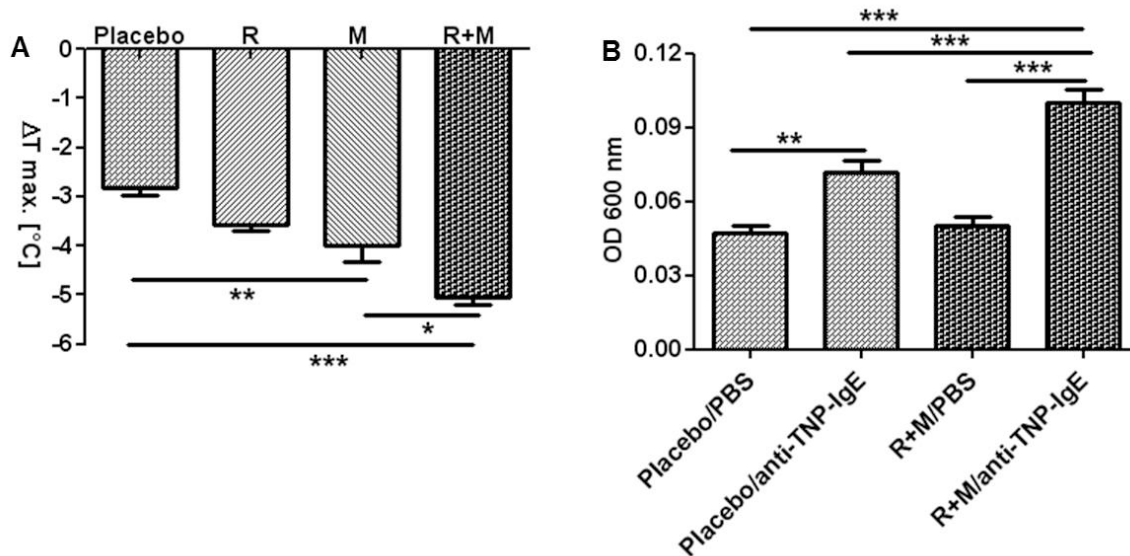


Abbildung 14: Kombinierte Gaben von Ramipril und Metoprolol verstärken die PSA und die PCA. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten 14 Tage eine orale Gabe von Ramipril (R), Metoprolol (M) oder beide Medikamente in Kombination (R+M), während die Kontrollgruppe Trinkwasser (Placebo) erhielt. (A) Die PSA wurde wie beschrieben ausgelöst und die rektale Körpertemperatur für 70 min bestimmt. (B) Die PCA wurde wie beschrieben induziert und die Extravasation des Farbstoffes bei 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n= 4-6, *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001).

7.2.1 Ramipril und Metoprolol erhöhen die Ausschüttung von Mastzellmediatoren durch direkte Kostimulation der Mastzelle

Während einer anaphylaktischen Episode kommt es zur Ausschüttung verschiedener MZ-Mediatoren, die im Serum bestimmt werden können. Die Analyse des Serums ergab, dass die präformierten Mediatoren Histamin und Serotonin nach Auslösen der PSA (Placebo) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, bei der keine Anaphylaxie ausgelöst wurde, erhöht vorlagen (ohne ANA, Abb. 15 A,B). Der Arachidonsäuremetabolit LTC₄ war nur geringfügig erhöht, während die Prostaglandine PGD₂ und PGE₂ deutlich verstärkt im Serum messbar waren. Die kombinierte Gabe von Ramipril und Metoprolol führte zu einer verstärkten Ausschüttung der MZ-Mediatoren, wobei sowohl die präformierten Mediatoren, also auch die de novo synthetisierten Mediatoren erhöht im Serum messbar waren. mMCP-1, eine MZ-Protease, welche primär von MZ des Darms produziert wird, war nach Behandlung mit Ramipril und Metoprolol vermindert messbar.

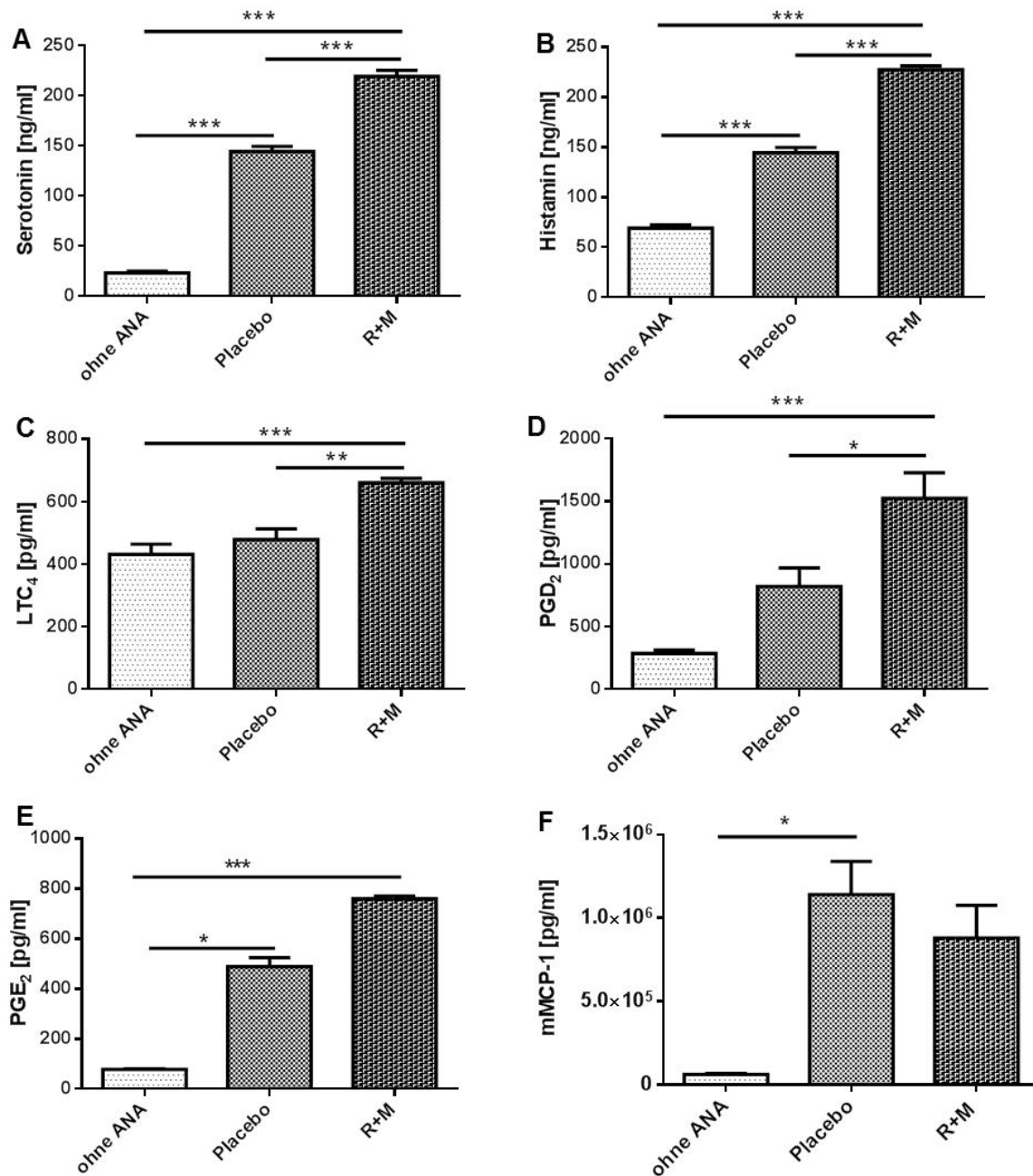


Abbildung 15 Kombinierte Gaben von Ramipril und Metoprolol führen zu einer Akkumulation von Mastzellmediatoren im Serum während einer Anaphylaxie. (A-F) Weibliche Balb/c Mäuse wurden für 14 Tage mit einer Kombination von Ramipril und Metoprolol (R+M) behandelt und anschließend wurde die PSA induziert. Die Mastzellmediatoren wurden im Serum der Tiere bestimmt. Tiere ohne anaphylaktische Symptome dienten als Referenz. Als Kontrolle erhielten die Tiere Trinkwasser (Placebo). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n= 4-6, *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001).

Da die MZ-Mediatoren nach Vorbehandlung mit den Medikamenten erhöht vorlagen, sind wir der Frage nachgegangen, ob die Medikamente direkten Einfluss auf die MZ ausüben. Zu diesem Zweck wurden BMcMCs mit Metoprolol, Ramiprilat (der aktiven Form von Ramipril) oder Bradykinin behandelt. Die Reinheit der verwendeten

Mastzellen wurde vor jeder Untersuchung durchflusszytometrisch über die Expression von Kit (CD 117) und FcεRI bestimmt und betrug mindestens 90% (Abb. 16).

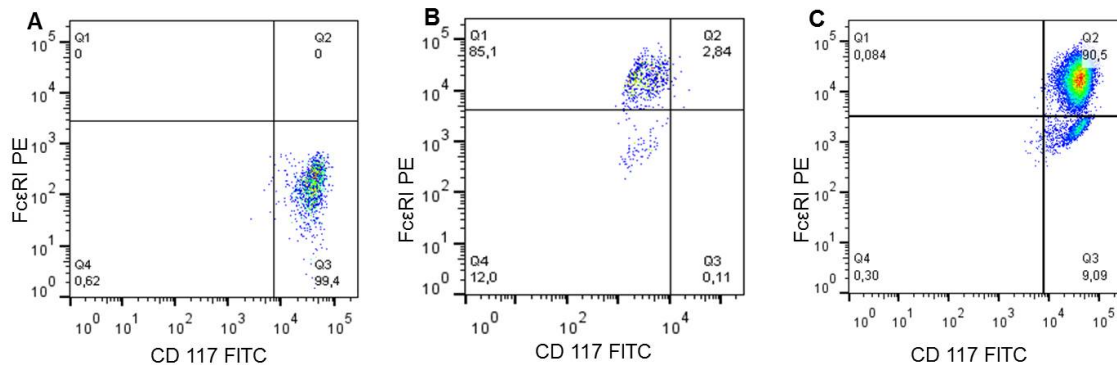


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Überprüfung der Reinheit von BMcMCs. 4 bis 5 Wochen nach Kultivierung wurden BMcMCs mit (A) einem Antikörper gegen KIT (anti-CD 117-FITC), (B) gegen den FcεRI (anti-FcεRI-PE) oder (C) mit einer Kombination aus anti-CD 117-FITC und anti-FcεRI-PE gefärbt und durchflusszytometrisch überprüft. Zellen, die sowohl KIT als auch FcεRI exprimieren, sind Mastzellen. Die hier gezeigte Kultur bestand zu 90,5% aus Mastzellen.

Um das Ausmaß der MZ-Degranulation zu bestimmen, wurden die Zellen mit Calcium Ionophor stimuliert. Die induzierte Histaminausschüttung lag in allen durchgeführten Experimenten zwischen 31,4 und 42,3%. Wie aus Abbildung 17 deutlich wird, führten steigende Konzentrationen der Medikamente und auch Bradykinin zu einer geringen Erhöhung der Histaminausschüttung im Vergleich zu unbehandelten Zellen, welche jedoch statistisch nicht signifikant war.

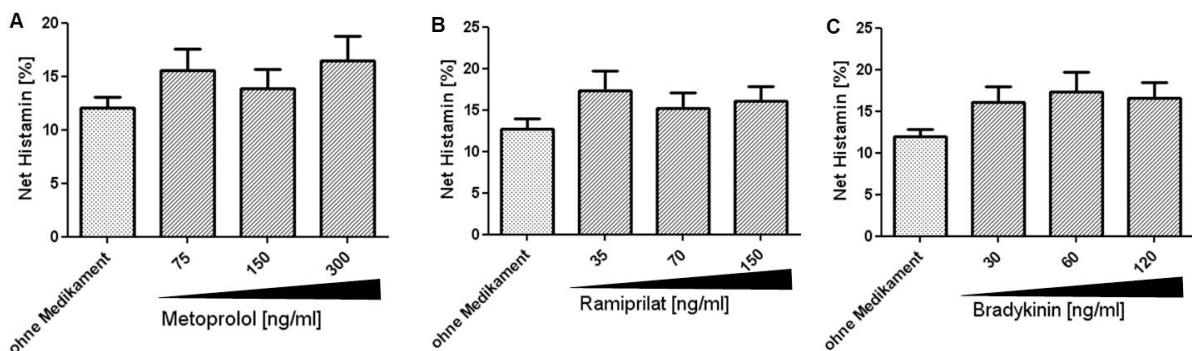


Abbildung 17 Metoprolol, Ramiprilat oder Bradykinin als Einzelbehandlung verändern die FcεRI-induzierte Histaminfreisetzung geringfügig. BMcMCs wurden für 24 h mit IgE sensibilisiert und am folgenden Tag für 20 min mit den angegebenen Reagenzien inkubiert. Die Mastzellen wurden mit 4 µg/ml anti-IgE für weitere 25 min stimuliert und die Histaminfreisetzung im Überstand der Zellen bestimmt. Der Net-Histamingehalt ist auf den Gesamthistamingehalt der Zellen normiert und als Mittelwert ± SEM dargestellt (n= 10-14). Die Daten weisen keine statistischen Signifikanzen auf.

Wurden die Zellen mit einer Konzentration von 150 ng/ml Metoprolol bei gleichzeitiger Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen Ramiprilat oder Bradykinin behandelt, führte dies zu einer deutlichen Erhöhung der FcεRI-induzierten MZ-Degranulation im Vergleich zu einer Kontrolle ohne medikamentöse Behandlung. Eine Aktivierung der MZ mit 0,4 µg/ml IgE führt zu einer maximalen Steigerung der Histaminfreisetzung um 92% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während eine IgE Konzentration von 4 µg/ml eine maximale Erhöhung um 69% erzielt (Abb.18 A+B).

Ähnliche Ergebnisse wurden beobachtet, wenn die Konzentrationen von Metoprolol und Ramiprilat variiert wurden. Auch hier zeigte sich der größte Einfluss auf die Histaminfreisetzung nach Kombination beider Medikamente (Abb. 18 C+D). Eine Aktivierung der MZ mit 0,4 µg/ml anti-IgE steigerte die Histaminausschüttung um maximal 156% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und war entsprechend niedriger (111%) nach Stimulation mit 4 µg/ml anti-IgE.

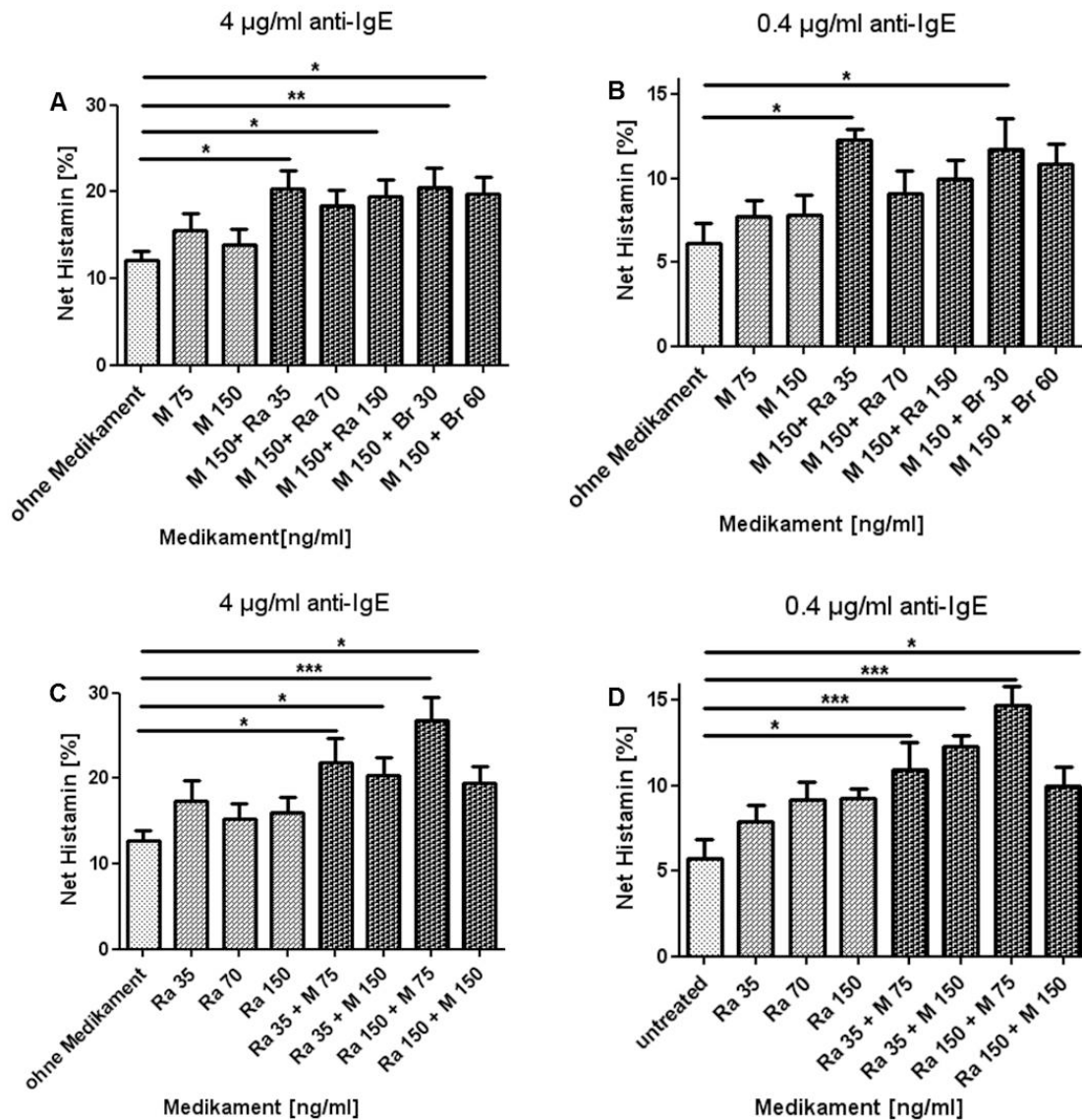


Abbildung 18: Die kombinierte Gabe von Ramipril und Metoprolol erhöht die FcεRI-induzierte Histaminfreisetzung. BMCs wurden mit IgE sensibilisiert und nach 24 h für 20 min mit den angegebenen Reagenzien inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit 4 µg/ml anti-IgE (A, C) oder mit 0,4 µg/ml anti-IgE (B, D) für weitere 25 min. Die Histaminfreisetzung wurde im Überstand der Zellen bestimmt. Der Net-Histamingehalt ist auf den Gesamthistamingehalt der Zellen normiert und als Mittelwert ± SEM dargestellt (n= 10-14, *P< 0,05, **P< 0,01, ***P< 0,001).

7.3 Acetylsalicylsäure verstärkt die Anaphylaxie im Mausmodell

Das Auslösen der PSA führte zur Abnahme der Körpertemperatur um maximal 3,9 °C im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Auslösen der Anaphylaxie. Nach 3-tägiger Vorbehandlung mit ASS konnte eine gesteigerte Hypothermie mit einer maximalen Temperaturdifferenz von 5,3 °C detektiert werden (Abb. 19A). Auch im PCA-Modell

war die Intensität des Farbstoffes und somit die Stärke der anaphylaktischen Reaktion nach Vorbehandlung mit ASS deutlich höher als in der Placebogruppe.

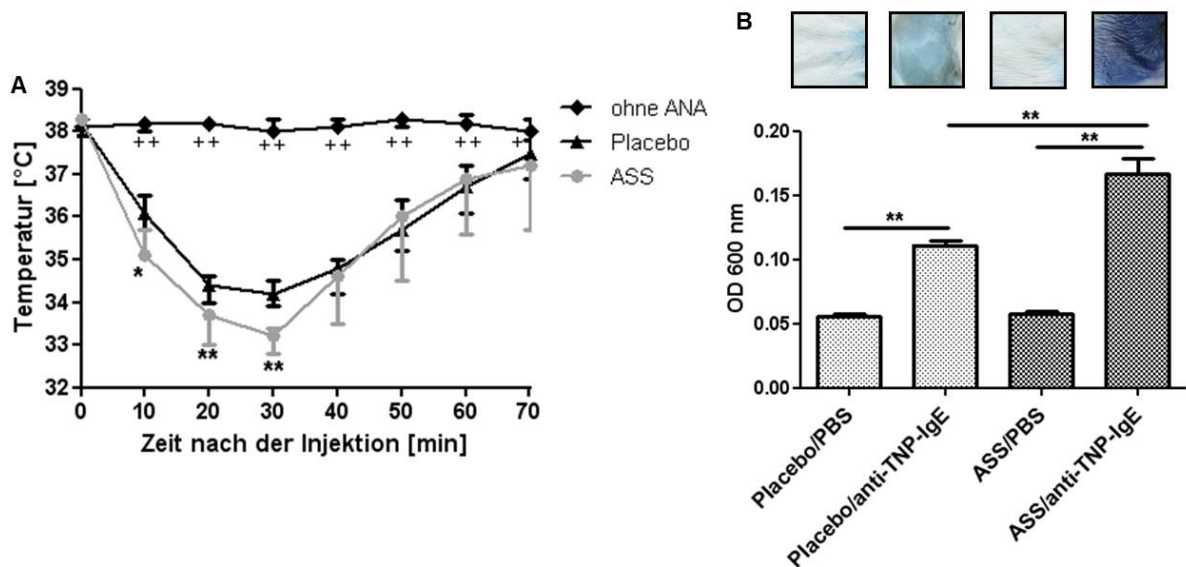


Abbildung 19 ASS verstärkt die Symptome der PSA und der PCA. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten 3 Tage eine orale Gabe von ASS oder Trinkwasser (Placebo). Am 4. Tag wurde die (A) PSA ausgelöst und die rektale Körpertemperatur für 70 min bestimmt. (B) Die PCA wurde an Tag 4 induziert und die Extravasation des Farbstoffes bei einer OD von 600 nm bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, Placebo versus ASS, ** $P < 0,01$, ohne ANA versus Placebo).

7.3.1 Acetylsalicylsäure erhöht die Mastzellmediatorausschüttung *in vivo* trotz inhibierender Wirkung auf die Mastzelle *in vitro*

Während der PSA konnten, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Auslösen der Anaphylaxie, erhöhte Mengen der präformierten Mediatoren Histamin und Serotonin im Serum der Tiere gemessen werden (Abb. 20A, B). Die Arachidonsäuremetaboliten LTC_4 und PGD_2 blieben jedoch während der anaphylaktischen Episode unverändert, wohingegen die Serumwerte von PGE_2 deutlich anstiegen (Abb. 20 C-D). Nach 3-tägiger Vorbehandlung der Tiere mit ASS waren Serum-Histamin und -Serotonin gegenüber der Placebogruppe deutlich erhöht. Auch LTC_4 und PGD_2 waren vermehrt im Serum messbar, während PGE_2 geringfügig niedriger im Serum vorlag als in der Placebogruppe.

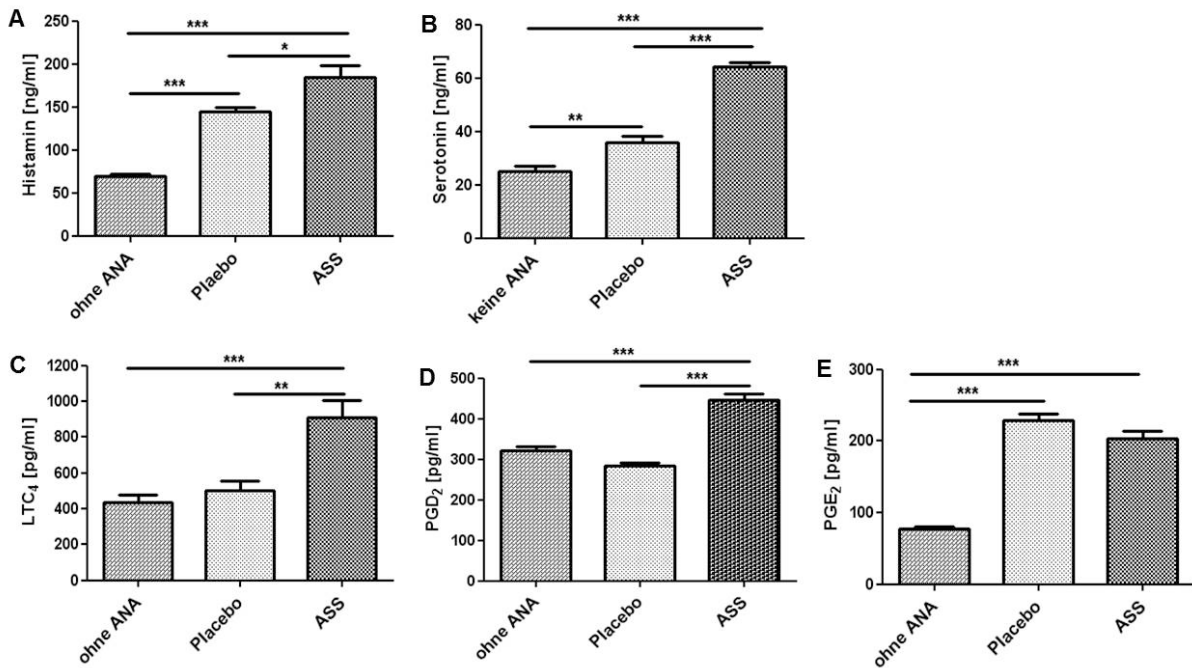


Abbildung 20 ASS führt zu einer Erhöhung der Mastzellmediatoren im Serum nach einer Anaphylaxie. (A-E) Weibliche Balb/c Mäuse wurden für 3 Tage mit ASS oder Trinkwasser (Placebo) behandelt, bevor die PSA ausgelöst wurde. Die Mastzellmediatoren im Serum der Tiere wurden mittels ELISA bestimmt. Tiere ohne anaphylaktische Symptome dienten als Referenz. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=5$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Um zu überprüfen, ob ASS die MZ direkt stimuliert, wurden BMcMCs und PcMCs mit ASS behandelt, mittels anti-IgE stimuliert und die MZ-Degranulation durch Analyse der Histaminfreisetzung bestimmt. Wie der Abbildung 21 A+B zu entnehmen ist, nahm die Histaminausschüttung mit steigender ASS-Konzentration ab.

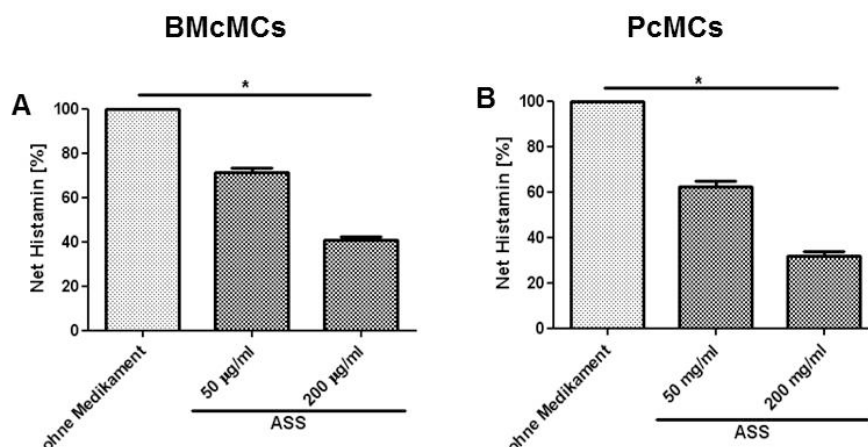


Abbildung 21 ASS vermindert die Fc ϵ RI-induzierte Histaminfreisetzung *in vitro*. (A,B) BMcMCs und PcMCs wurden mit IgE sensibilisiert und nach 24 h für 20 min wie in der Graphik angegeben inkubiert. Die Mastzellaktivierung erfolgte mit 4 μ g/ml anti-IgE für weitere 25 min. Anschließend wurde die Histaminfreisetzung im Überstand der Zellen bestimmt. Der Net-Histamingehalt ist auf den unbehandelten Zellansatz normiert und als Mittelwert \pm SEM dargestellt ($n=3$, * $P < 0,05$).

Um das gegensätzliche Verhalten der Ergebnisse der *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen näher zu charakterisieren, wurden Balb/c Mäuse über 3 Tage mit ASS oder Trinkwasser behandelt und die Zellen des Peritoneums direkt nach Entnahme mit anti-IgE stimuliert. Dies führte wiederum zu einem Anstieg der Histaminfreisetzung im Vergleich zur Placebo-Kontrolle und spiegelt die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen wider (Abb. 22).

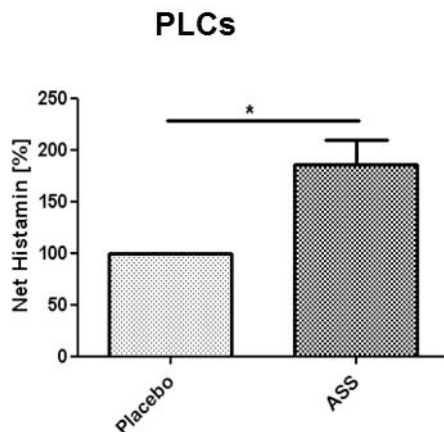


Abbildung 22 ASS erhöht die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung *ex vivo*. Weibliche Balb/c Mäuse wurden für 3 Tage mit ASS (50 mg/kg) behandelt und PLCs isoliert. Die Zellen wurden direkt nach Entnahme mit 10 µg/ml anti-IgE stimuliert und die Histaminfreisetzung im Überstand der Zellen bestimmt. Der Net-Histamingehalt ist auf den unbehandelten Zellansatz normiert und als Mittelwert ± SEM dargestellt (n= 5, *P< 0,05).

Da ASS die Histaminfreisetzung *in vitro* hemmt, wurde überprüft, ob die Vorbehandlung der Mäuse mit ASS die MZ-Dichte verändert und somit eine Steigerung von MZ-Mediatoren im Serum der Tiere bewirkt wird. Zu diesem Zweck erfolgte eine Quantifizierung der MZ in verschiedenen Organen der Tiere. Abbildung 23 zeigt je ein repräsentatives Exemplar einer Mauszunge nach Auslösen einer Anaphylaxie ohne ASS-Vorbehandlung (23 A) und mit ASS-Vorbehandlung (23 B). Die MZ sind in violett zu sehen. Die MZ-Dichte blieb durch die ASS-Vorbehandlung unverändert, was in allen analysierten Organen der Tiere der Fall war. Abbildung 23 C zeigt eine degranulierende MZ, während in Abbildung 23 D die MZ nicht degranuliert vorliegen. Abbildung 23 E demonstriert, dass die Vorbehandlung mit ASS keinen Einfluss auf die MZ-Dichte aufweist. Zudem ist deutlich zu sehen, dass die MZ-Dichte je nach Lokalisation unterschiedlich ist. So weist die Zunge mehr MZ als die Haut auf.

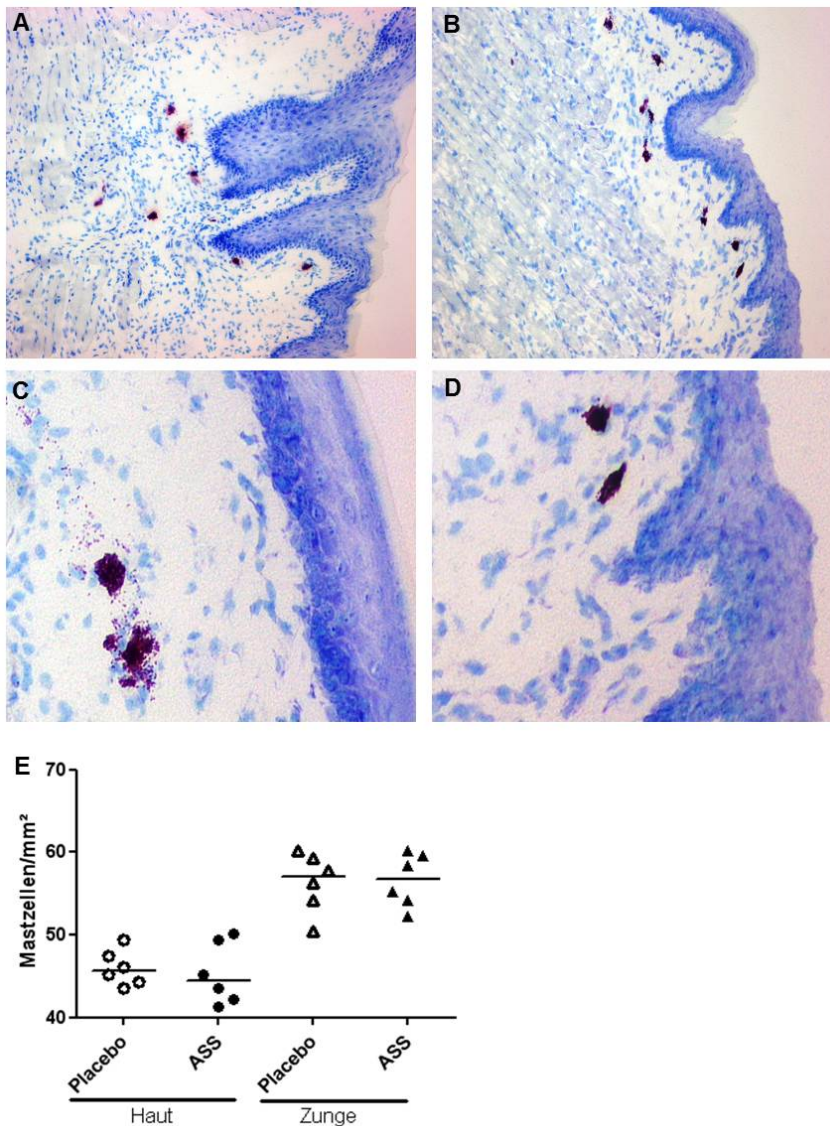


Abbildung 23 ASS hat keinen Einfluss auf die Mastzellichte. (A-D) Nach der PSA wurden die Organe der Tiere entnommen und mit einem Kryostaten Semidünnschnitte angefertigt. Die Mastzellen wurden mit Toluidinblau sichtbar gemacht (violette Färbung) und mikroskopisch analysiert. (A) Dargestellt ist ein repräsentatives Exemplar einer Mauszunge für die Placebogruppe mit einer Auflösung von 100 µM und in (B) für die ASS vorbehandelte Gruppe. (C) Dargestellt ist eine degranulierende Mastzelle mit einer Auflösung von 200 µM und in (D) nicht degranulierte Mastzellen. (E) Die Anzahl an Mastzellen pro mm² von Haut und Zunge der Tiere sind als Einzel- und Mittelwerte dargestellt. Die Daten weisen keine statistischen Signifikanzen auf.

7.3.2 Die pro-anaphylaktische Wirkung von Acetylsalicylsäure ist mastzellabhängig

Um zu untersuchen ob die pro-anaphylaktische Wirkung von ASS auf eine gesteigerte Mediatorfreisetzung von MZ zurückzuführen ist oder ob die Ansprechbarkeit des umliegenden Gewebes (Endothelzellen, Fibroblasten, Muskel- und Nervenzellen...etc.) auf MZ-Mediatoren verändert wird, wurde die PSA neben

dem klassischen IgE-vermittelten Weg zusätzlich durch Compound 48/80 (FcεRI-unabhängige Aktivierung) und über die exogene Applikation von Histamin induziert. Abbildung 24 zeigt, dass die Anaphylaxie nur dann durch ASS verstärkt wird, wenn die MZ über eine FcεRI-vermittelte Kreuzvernetzung stimuliert wurde. Bei der Induktion der Anaphylaxie durch Histamin hatte ASS keinen Einfluss auf die Temperatur, während bei der Anaphylaxie durch Compound 48/80 die anaphylaktischen Symptome sogar signifikant abgeschwächt wurden.

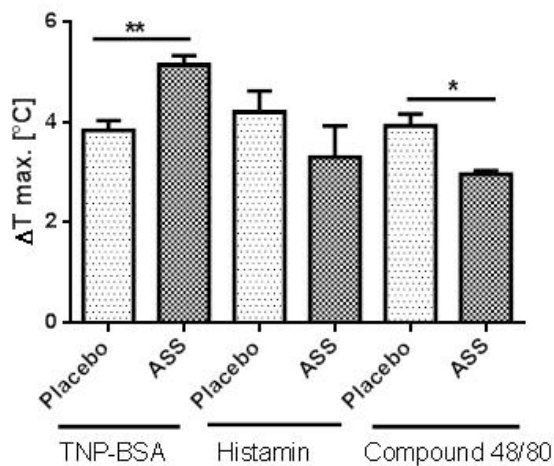


Abbildung 24 ASS verstärkt die Symptome der Anaphylaxie über die Mastzelle. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten für 3 Tage ASS oder Trinkwasser (Placebo) über eine Schlundsonde. Die Anaphylaxie wurde durch Injektion von TNP-BSA, Histamin oder Compound 48/80 ausgelöst. Dargestellt sind die maximalen Temperaturabnahmen als Mittelwerte \pm SEM ($n=5$, $*P<0,05$, $**P<0,01$).

7.3.3 Die orale Gabe eines Leukotrienantagonisten hat keinen Einfluss auf die pro-anaphylaktische Wirkung von Acetylsalicylsäure

ASS führt neben einer Reduktion der Prostaglandine auch zu einer Akkumulation von LTC₄. Um zu überprüfen in wie weit diese Anhäufung für die aggravierte Symptomatik des pro-anaphylaktischen Effekts von ASS verantwortlich ist, wurde den Mäusen vor Auslösen der Anaphylaxie der selektive LTC₄-Rezeptorantagonist Montelukast verabreicht. Montelukast hatte keinen Einfluss auf die PSA und konnte dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS nicht entgegenwirken.

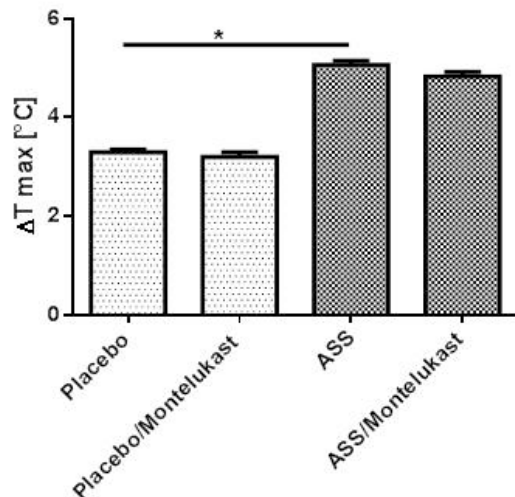


Abbildung 25 Der selektive Leukotrienantagonist Montelukast kann die durch ASS aggravierte Symptomatik der Anaphylaxie nicht vermindern. Weibliche Balb/c Mäuse erhielten für 3 Tage ASS oder Trinkwasser (Placebo) per os. Am 4. Tag wurde 20 min vor Induktion der PSA der selektive Leukotrienantagonist Montelukast mittels einer Schlundsonde appliziert. Die rektale Körpertemperatur wurde für 70 min bestimmt. Dargestellt sind die maximalen Temperaturabnahme als Mittelwerte \pm SEM (n=5, *P< 0,05).

7.3.4 Die PGE₂ Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 werden von murinen Mastzellen exprimiert

Da ASS in die Prostaglandinsynthese eingreift, sollte im nächsten Schritt die Wirkung von PGE₂ auf die MZ genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst untersucht, ob murine MZ-Subtypen Rezeptoren für PGE₂ exprimieren. Abbildung 26 zeigt deutlich, dass weder BMcMCs noch PcMCs den EP1 Rezeptor exprimieren. Dieser war in der Positivkontrolle deutlich sichtbar (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsrate des EP3 Rezeptors war in BMcMCs um etwa 32-fach höher als bei PcMCs, während der EP2 und der EP4 Rezeptor von beiden MZ Subtypen zu etwa gleichen Teilen exprimiert wurden.

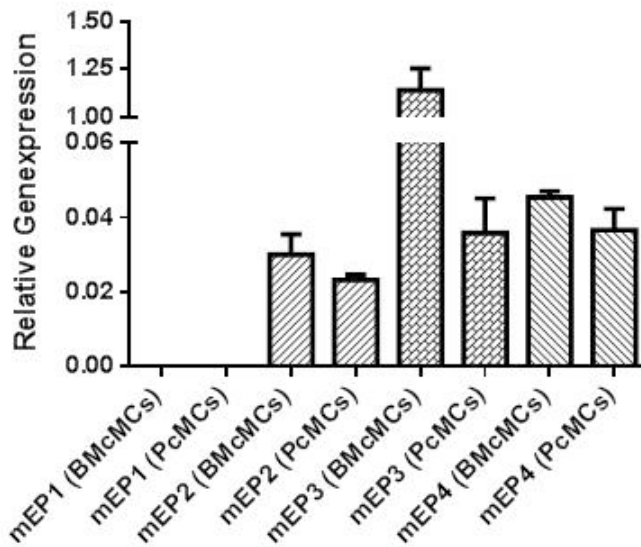


Abbildung 26 Genexpressionsprofil muriner Mastzellen. BMcMCs und PMCs wurde auf die Expression der EP-Rezeptoren mittels quantitativer PCR untersucht. Die relative Genexpression wurde auf das Referenzgen HPRT normiert. Als Positivkontrolle wurde eine Mausniere verwendet (Daten nicht gezeigt, $n \geq 6$). Die Daten waren statistisch nicht signifikant.

7.3.5 Die subkutane Injektion von EP3 und EP4-Agonist verringert den pro-anaphylaktischen Effekt von Acetylsalicylsäure

Da murine MZ die PGE₂- Rezeptoren EP2, EP3 und EP4 exprimieren, sollte zunächst der Einfluss von spezifischen EP3- und EP4-Agonisten auf den pro-anaphylaktischen Effekt von ASS untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden weibliche Balb/c Mäuse 3 Tage mit ASS oder Placebo behandelt und erhielten vor Auslösen der PSA eine subkutane Gabe des EP3 oder EP4 Agonisten. Die Induktion der Anaphylaxie (Placebo) führte zu einer Temperaturabnahme um ca. 3,3 °C, während eine Vorbehandlung mit ASS diese noch um 1,5 °C verstärkte. Weder der EP3- noch der EP4-Agonist hatten Einfluss auf die Anaphylaxie ohne ASS-Vorbehandlung. Die Gabe des EP3-Rezeptoragonisten vor der ASS-Behandlung, führte jedoch zu einer verminderten Ausprägung der Anaphylaxie. Die Gabe des Rezeptoragonisten EP4 war sogar noch effektiver. Die pro-anaphylaktische Wirkung von ASS wurde aufgehoben und lag mit 3,1 °C im Bereich der Placebogruppe.

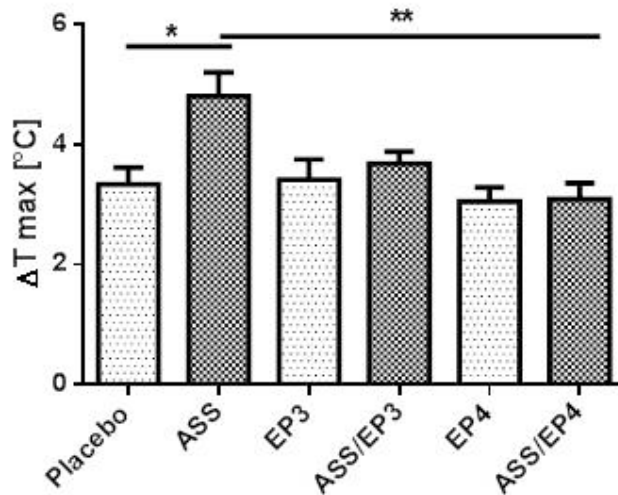


Abbildung 27 Die spezifischen EP-Rezeptoragonisten EP3 und EP4 vermindern den pro-anaphylaktischen Effekt von ASS. Weibliche Balb/c Mäuse wurden für 3 Tage mit ASS oder Trinkwasser (Placebo) oral behandelt und erhielten 30 min vor der Induktion der PSA eine einmalige, subkutane Gabe von EP3 oder EP4. Als Negativkontrolle wurde NaCl subkutan injiziert. Die rektale Körpertemperatur wurde für 70 min bestimmt. Dargestellt ist die maximale Temperaturabnahme als Mittelwerte \pm SEM, (n= 5, *P< 0.05, **P< 0,01).

8. DISKUSSION

Die Anaphylaxie stellt die schwerwiegendste Manifestation einer allergischen Erkrankung dar⁵⁷, welche sich in multiplen Organsystemen manifestiert und lebensbedrohliche Folgen haben kann⁵⁸. Das Auftreten einer anaphylaktischen Reaktion kann sowohl durch Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht als auch durch Kofaktoren beeinflusst werden⁶⁶. Tatsächlich treten etwa 30% aller anaphylaktischen Reaktionen nur in Gegenwart eines Kofaktors auf⁶⁷. Neben physischer Belastung und Alkohol gehören Medikamente zu den häufigsten Kofaktoren¹⁶⁵. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Herz-Kreislauf-Medikamente das Auftreten anaphylaktischer Reaktionen begünstigen können^{72, 88, 166}. Es sind jedoch auch gegenteilige Studien beschrieben⁸⁹. Der Einsatz dieser Medikamente ist im Laufe der letzten Jahre stetig gestiegen^{76, 77}, wobei überwiegend Kombinationen aus verschiedenen Wirkstoffgruppen verschrieben werden^{71, 72}, da eine Einzelmedikation oft nicht ausreicht, um die Beschwerden zu verringern^{83, 84}. Welche Bedeutung die Einnahme der Medikamente beim Auftreten anaphylaktischer Reaktionen einnimmt, ist bisher nicht detailliert untersucht worden und sollte Gegenstand der vorgelegten Arbeit sein. Zu diesem Zweck wurden zwei Anaphylaxiemodelle in der Maus etabliert, welche die medikamentöse Behandlung während einer Herz-Kreislauf-Therapie beim Menschen widerspiegeln. Dafür war es wichtig, zunächst eine suboptimale anaphylaktische Reaktion zu induzieren, welche in Gegenwart der Medikamente potentiell verstärkt werden konnte. Mit Hilfe dieser Modelle wurde der Einfluss des ACE-Inhibitors Ramipril, des β -Blockers Metoprolol und von ASS auf die Anaphylaxie untersucht. Die Medikamente werden effektiv in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt^{83, 167}.

8.1 Ramipril und Metoprolol verstärken die passiv systemische Anaphylaxie

Die Ergebnisse der passiv systemischen Anaphylaxie zeigen eine geringfügige Verstärkung der anaphylaktischen Reaktion durch Einzelmedikation von Ramipril oder Metoprolol. Die Kombination beider Medikamente konnte diesen Effekt deutlich intensivieren. Die Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen, die demonstrieren, dass ein Zusammenspiel mehrerer Kofaktoren nötig sein kann, um eine Anaphylaxie zu induzieren⁶⁷. Im Zentrum der weiteren Untersuchungen stand daher die

Kombination beider Medikamente in Abhängigkeit der Ausprägung einer Anaphylaxie zu analysieren. Die pro-anaphylaktische Wirkung von Ramipril und Metoprolol konnte durch das passiv kutane Modell bestätigt werden. Gestützt werden die Ergebnisse von Daten aus dem Anaphylaxieregister (www.anaphylaxie.net), die belegen, dass durch die gleichzeitige Einnahme beider Medikamente das relative Risiko für das Auftreten schwerer anaphylaktischer Symptome erhöht wird¹⁶⁸. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die IgE-vermittelte passive Anaphylaxie MZ-abhängig ist¹⁶⁹⁻¹⁷¹. So konnten *Ohnmacht et al.*¹⁷⁰ beispielsweise zeigen, dass Mäuse, die MZ-defizient sind, keine passive Anaphylaxie entwickeln, während eine Depletierung von Basophilen keinen Einfluss auf den Verlauf der Anaphylaxie hatte. Im nächsten Schritt sollte daher die Bedeutung von MZ für die pro-anaphylaktische Wirkung der Medikamente überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde die Menge an MZ-Mediatoren im Serum der Tiere, welche typischerweise während einer anaphylaktischen Episode ausgeschüttet werden bestimmt²⁸. Wie in der Literatur beschrieben^{28, 47}, lagen die präformierten Mediatoren Histamin und Serotonin nach Anaphylaxie deutlich erhöht vor, verglichen mit einer Kontrollgruppe ohne anaphylaktische Symptome. Diese Daten bestätigen, dass das Modell der PSA trotz suboptimaler Ausprägung der Anaphylaxie das typische MZ-Mediatorprofil nach Aktivierung zeigt und somit für weitere Untersuchungen geeignet war. Da MZ nach Aktivierung auch Lipidmediatoren freisetzen^{23, 47}, wurde zusätzlich die Akkumulation von Prostaglandinen und Leukotrienen im Serum der Tiere bestimmt. PGD₂ und PGE₂ waren nach Auslösen der Anaphylaxie ebenfalls erhöht, während das LTC₄ unverändert blieb. Lipidmediatoren sind sehr instabil *in vivo*, weshalb sie bisher im Zusammenhang mit Anaphylaxie nur im Urin bestimmt wurden^{133, 172}. Dies lässt vermuten, dass LTC₄ zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits zu seinen Metaboliten (LTD₄, LTE₄) umgewandelt worden ist^{28, 172}. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Ramipril und Metoprolol steigerte die Menge an MZ-Mediatoren gegenüber der Placebogruppe deutlich, wobei nun auch eine Akkumulation von LTC₄ im Serum detektiert werden konnte. Dies lässt auf eine generelle Steigerung der MZ-Reaktivität durch Vorbehandlung mit den Medikamenten schließen. Die Chymase mMCP-1 wird ebenfalls während einer anaphylaktischen Episode ausgeschüttet und stellt einen Marker für MZ-Aktivierungen dar¹⁷³. Nach Induktion der PSA lag die mMCP-1 deutlich erhöht im Serum vor verglichen mit der Gruppe ohne anaphylaktische Symptome. Dies steht im Einklang zu vorherigen Studien, welche nach Auslösen der

PSA ebenfalls eine Erhöhung von mMCP-1 detektieren konnten^{174, 175}. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Ramipril und Metoprolol und anschließendem Auslösen der Anaphylaxie führte zu einer tendenziellen Verminderung von mMCP-1. mMCP-1 wird im Gegensatz zu den übrigen bestimmten Mediatoren überwiegend von MZ des Intestinums gebildet¹⁷⁶. Das kontroverse Verhalten dieses Mediators kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass sich MZ je nach ihrer Lokalität unterscheiden und somit auch unterschiedlich auf eine Substanz reagieren können^{23, 150, 177}. Um zu überprüfen, ob Ramipril und Metoprolol die Freisetzungsfähigkeit von MZ steigern können, wurden kultivierte MZ aus dem Knochenmark (BMcMCs) *in vitro* mit unterschiedlichen Kombinationen der Medikamente inkubiert. Da ACE-Inhibitoren aufgrund ihres Wirkmechanismus zu einer Steigerung von Bradykinin führen¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, wurde auch der Einfluss von Bradykinin auf die MZ-Degranulation analysiert. Die verwendeten BMcMCs wurden anhand der Expression von FcεRI und Kit als MZ definiert und das Ausmaß der MZ-Degranulation über die Histaminfreisetzung bestimmt. Steigende Konzentrationen der Medikamente oder Bradykinin allein führten zu einer geringfügigen Erhöhung der IgE-vermittelten MZ-Degranulation, während die Kombination der Medikamente zu einem deutlichen Anstieg führte, der signifikant war. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die Kombination von Ramipril und Metoprolol die Anaphylaxie signifikant verstärkte. Zudem war ein größerer Effekt auf die MZ-Degranulation zu verzeichnen, wenn die Stimulation mit anti-IgE gering war. Dies wird von klinischen Beobachtungen gestützt, die belegen, dass geringe Mengen eines Allergens in Kombination mit einem Kofaktor schwere allergische Reaktionen auslösen können⁶⁷. Eine Verstärkung der Histaminfreisetzung durch die Medikamente war nur möglich, wenn die MZ zuvor durch FcεRI-Aggregation stimuliert worden waren, was zeigt, dass weder die Medikamente noch Bradykinin, in den hier verwendeten Konzentrationen, eine MZ-Degranulation auslösen konnten (Daten nicht gezeigt). Auch in den durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen löste die orale Gabe von Ramipril und/oder Metoprolol ohne Induktion der Anaphylaxie keine Hypothermie aus (Daten nicht gezeigt), was beweist, dass eine vorherige MZ-Aktivierung nötig ist, um die Symptome zu verstärken. MZ exprimieren β-Adrenozeptoren, welche bei Aktivierung zu einer Anhäufung von cAMP führen, wodurch wiederum die cAMP/PKA Signalkaskade aktiviert wird. Dies führt zur Inhibierung von PKC und somit zu einer Verminderung der MZ -Degranulation^{42, 43, 81}. Durch Anlagerung des β-Blockers

Metoprolol an den β -Adrenozeptor würde diese Signalkaskade inhibiert, so dass die negative Regulation auf die MZ wegfällt. Dies könnte die pro-anaphylaktische Wirkung von Metoprolol auf die MZ erklären. Neben der Translokation von PKC^{181, 182}, hängt die MZ-Degranulation auch vom Calciumeinstrom in das Zytosol ab¹⁸³. Für den ACE-Inhibitor Captopril konnte gezeigt werden, dass dieser die Permeabilität der MZ für Calcium erhöht und auf diese Weise die Degranulation der MZ steigert^{184, 185}. Demnach kann vermutet werden, dass die pro-anaphylaktische Wirkung von Ramipril auf einem ähnlichen Wirkmechanismus basiert. Zudem ist bekannt, dass das vasoaktive Peptid Bradykinin, welches bei der Einnahme von Ramipril im Organismus angehäuft wird^{178-180, 183}, MZ Degranulationen verstärken kann^{186, 187}. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine kombinierte Gabe von Ramipril und Metoprolol die IgE-vermittelte passive Anaphylaxie verstärkt. Dies beruht zumindest zum Teil auf einer erhöhten MZ-Reaktivität, welche vermutlich durch Modulation des cAMP-Haushalts und der Calciumkonzentration in der Zelle verursacht wird.

8.2 ASS verstärkt die passiv systemische Anaphylaxie

Im Fokus der weiteren Untersuchungen stand die Charakterisierung von ASS als möglicher Kofaktor der Anaphylaxie. ASS ist in geringer Dosierung ein weltweit eingesetztes Medikament in der Herz-Kreislauf-Therapie¹⁸⁸. Eine Vorbehandlung der Mäuse mit ASS verstärkt sowohl die PSA als auch die PCA. Nach Auslösen der PSA lagen die MZ-Mediatoren Histamin und Serotonin wie zu erwarten erhöht im Serum der Tiere vor. Die Arachidonsäuremetaboliten LTC₄ und PGD₂ blieben weitgehend unverändert, was wahrscheinlich wie oben beschrieben durch die rasche Metabolisierung dieser Moleküle zu erklären ist^{133, 172}. Diese Hypothese wird dadurch untermauert, dass im Serum von Patienten (maximal 2 h) nach einer anaphylaktischen Episode ebenfalls kein Anstieg von LTC₄ oder PGD₂ detektiert werden konnte. Ihre Metaboliten (LTD₄ und LTE₄ für LTC₄ und 9 α ,11 β -PGF₂ für PGD₂) hingegen waren nach einer anaphylaktischen Reaktion deutlich erhöht (Daten nicht gezeigt). Für weiterführende Untersuchungen wäre es daher sinnvoll die Metabolite von LTC₄ und PGD₂ im Serum der Tiere zu bestimmen. Eine Vorbehandlung der Tiere mit ASS hatte eine Steigerung von Histamin und Serotonin sowie auch von LTC₄ und PGD₂ zur Folge. Der Anstieg an LTC₄ war zu erwarten, da

der Wirkmechanismus von ASS durch Hemmung der COX eine Steigerung der Leukotrienproduktion verursacht⁹⁸. Diese sind auch in der bronchoalveolären Lavage und im Urin von Patienten mit Aspirin induziertem Asthma erhöht^{98, 189}. Interessanterweise war PGD₂ nach ASS-Vorbehandlung verstärkt im Serum messbar. Der erhöhte Serumspiegel von PGD₂ deckt sich mit vorherigen Studien, die zeigen, dass der PGD₂-Metabolit 9 α ,11 β -PGF₂ im Urin von Patienten mit Aspirin induziertem Asthma erhöht vorlag¹³³. Es ist nicht bekannt, warum ASS zu einer Erhöhung und nicht zu einer Reduktion von PGD₂ führt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass PGE₂ eine höhere Sensitivität gegenüber der COX-Inhibierung aufweist als PGD₂^{73, 190}. PGE₂ steigt nach Auslösen der Anaphylaxie im Serum deutlich an, wird jedoch durch ASS-Vorbehandlung tendenziell gesenkt. Dies ist durch den Wirkmechanismus von ASS bedingt⁹⁸, da die Senkung von PGE₂ die analgetische und antipyretische Wirkung von ASS induziert^{73, 119}. Der maximale Plasmaspiegel von ASS wird nach oraler Gabe innerhalb von 30-60 min erreicht⁷³. Dass der PGE₂-Gehalt im Serum nach ASS Vorbehandlung nicht stärker gesenkt wurde, kann vermutlich mit dem späten Zeitpunkt der Blutentnahme (24 h nach ASS-Gabe) erklärt werden.

Um zu überprüfen, ob ASS die Reaktivität der MZ steigert, wurden BMcMCs *in vitro* mit zwei verschiedenen Konzentrationen ASS inkubiert, welche während der medikamentösen Behandlung auch im Serum von Patienten erreicht werden können⁷³. Die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung *in vitro* wurde durch ASS jedoch inhibiert. Um Heterogenitäten von MZ-Subtypen als Ursache zu berücksichtigen, wurde der Effekt von ASS auf die Histaminfreisetzung der reiferen PcMCs überprüft und auch hier war eine Hemmung der MZ-Degranulation nach Behandlung mit ASS zu sehen. Die hemmende Wirkung von ASS auf die MZ-Degranulation steht im Einklang mit Ergebnissen vorangegangener Studien^{100, 191}. Die Reduktion der Histaminfreisetzung steht jedoch im Gegensatz zu der gesteigerten Freisetzung von MZ-Mediatoren im Rahmen der durch ASS verstärkten Anaphylaxie. Dies legt die Vermutung nahe, dass der pro-anaphylaktische Effekt von ASS durch eine indirekte Aktivierung der MZ zu erklären ist. Um dies zu überprüfen, wurden Mäuse mit ASS behandelt und peritoneale Zellen entnommen, ohne zuvor eine Anaphylaxie zu induzieren. Diese peritoneale Zellpopulation besteht hauptsächlich aus B-Lymphozyten, Makrophagen und zu ca. 5% aus MZ^{147, 156, 192}. Sie reflektiert die Situation der Zellen *in vivo*. Tatsächlich führte die *ex vivo* Stimulation dieser Zellpopulation mit anti-IgE zu einer Steigerung der Histaminfreisetzung nach ASS-

Vorbehandlung gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe. Somit konnten die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen reproduziert werden. Diese Daten könnten zum einen damit erklärt werden, dass ASS auf umliegende Zellen wirkt, die stimulierend auf MZ wirken können. Dass die MZ-Mediatoren im Serum der ASS-vorbehandelten Tiere erhöht waren, lässt auf eine bedeutende Rolle von MZ in dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS schließen. Die Hemmung der MZ-Aktivierung durch ASS *in vitro* und die Tatsache, dass die MZ-Dichte der Tiere von der ASS-Behandlung unbeeinflusst blieb, stehen dem wiederum entgegen. Um die Rolle von MZ genauer zu charakterisieren, wurde die passive Anaphylaxie neben dem klassischen IgE-vermittelten Weg auch über alternative Wege induziert. Hierbei wurde ein Aktivierungsweg gewählt, der unspezifisch über die Einlagerung von Compound 48/80 in die Plasmamembran mit anschließender Induktion bestimmter G-Proteine operiert¹⁹³ und zusätzlich wurde die Anaphylaxie über die exogene Applikation von Histamin ausgelöst, welches das Symptomprofil der Anaphylaxie imitieren kann^{62, 145}. Lediglich bei der FcεRI-vermittelten MZ-Degranulation war ein aggravierender Effekt in der Symptomstärke der Anaphylaxie durch ASS zu beobachten, während eine Induktion der Anaphylaxie durch Gabe von Histamin oder Compound 48/80 die Symptome nach ASS-Gabe sogar reduzierte. Diese Ergebnisse bestätigen erneut, dass MZ für die pro-anaphylaktische Wirkung von ASS von großer Bedeutung sind. MZ der Haut sind maßgeblich an einer allergischen Episode beteiligt, was sich auch in der Manifestation klinischer Symptome wie Angioödemem oder Urtikaria widerspiegelt^{3, 194}. Daher wurde die Reaktivität von MZ in der Haut allergischer Patienten nach Allergenapplikation mittels Hautpricktests bestimmt, wobei die Größe der entstehenden Quaddel die Wahrscheinlichkeit für eine Sensibilisierung angibt¹⁹⁵. Diese Untersuchungen demonstrierten eine verstärkte Lokalreaktion (vergrößerte Quaddel) nach Allergenapplikation unter ASS-Einnahme (Daten nicht gezeigt), was nochmals die bedeutende Rolle von MZ bei der pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS unterstreicht. Hierbei spielt vermutlich ein indirekter Mechanismus von ASS auf die MZ eine Rolle, der noch weiterer Aufklärung bedarf.

In den folgenden Untersuchungen sollte überprüft werden, in wieweit der Wirkmechanismus von ASS für die pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS verantwortlich ist. Da Leukotrienantagonisten erfolgreich bei Patienten mit Aspirin induziertem Asthma verwendet werden⁹⁸, wurde der Einsatz von Montelukast in

Bezug auf die Ausprägung der Anaphylaxie. Dieser inhibiert selektiv den LTC₄ Rezeptor cysLTR1¹⁰³. Montelukast konnte die aggravierende Wirkung von ASS bei der Anaphylaxie nicht vermindern, was darauf hindeutet, dass LTC₄ nicht maßgeblich an der pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS beteiligt ist. Ein weiterer Mediator, der durch ASS beeinflusst wird ist PGE₂, was durch ASS reduziert wird⁷³. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass eine Reduktion von PGE₂ in einer verstärkten MZ-Aktivierung resultieren kann^{98, 131}. Beispielsweise bewirken verminderte PGE₂-Werte bedingt durch die Hemmung der COX bei Patienten mit Aspirin induziertem Asthma eine Aktivierung von MZ¹⁹⁶. Zudem kann die Gabe von exogenem PGE₂ Bronchokonstriktion bei diesen Patienten verhindern⁹⁸. Dies wirft die Frage auf, ob PGE₂ auch dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS entgegenwirken kann. Da PGE₂ seine Funktionen über vier verschiedene Rezeptoren (EP1-EP4) vermittelt, wurden hochselektive PGE₂-Agonisten eingesetzt, die jeweils einen der Rezeptoren spezifisch aktivieren können und bereits in zahlreichen Studien charakterisiert wurden^{143, 144, 197}. Die Analyse der Rezeptorexpression zeigte, dass murine MZ die PGE₂-Rezeptoren EP2-EP4, jedoch nicht den EP1-Rezeptor exprimieren, was sich mit Daten aus der Literatur deckt¹⁹⁸. Zudem war der EP2-Rezeptor nur gering exprimiert, weshalb zunächst die orale Gabe eines spezifischen EP3- und EP4-Agonisten auf die Anaphylaxie überprüft wurde. Tatsächlich konnte eine einmalige Gabe des EP3- oder EP4-Agonisten das Ausmaß der Anaphylaxie, aggraviert durch ASS, deutlich verringern. In einer vorherigen Studie von *Kunikata*¹⁴³ und Kollegen mit Mäusen, die eine Defizienz für den EP3-Rezeptor aufwiesen, konnte bereits gezeigt werden, dass diese Tiere eine stärkere lokale Anaphylaxie entwickelten als ihre Wildtypkontrollen. Eine weitere Studie belegt, dass ein selektiver Agonist für den EP3-Rezeptor die Histamin- und Leukotrienfreisetzung von MZ der Lunge inhibiert und bei Mäusen, das durch Ovalbumin induzierte, Asthma verringert¹⁴³. Von einer Hemmung allergischer Reaktionen über Aktivierung des EP3-Rezeptors wurde auch bei murinen Modellen der allergischen Konjunktivitis und Kontakthypersensitivitätsreaktionen berichtet^{199, 200}. Die hier in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der PSA weisen ebenfalls auf eine protektive Wirkung des EP3-Rezeptors im Zusammenhang mit der Anaphylaxie hin. Die Gabe des EP4-Agonisten konnte die gesteigerte Hypothermie durch ASS sogar auf das gleiche Ausmaß wie in der Placebokontrolle reduzieren. Dies wird von Studien unterstützt, die belegen, dass die effektive Wirkung von PGE₂ bei Patienten mit Aspirin

induziertem Asthma durch Aktivierung des EP4-Rezeptors vermittelt wird, was bei diesen Patienten zu einer Bronchodilatation führt²⁰¹. Bei Patienten mit Aspirin induziertem Asthma oder Aspirin induzierter Urtikaria konnte zudem eine genetische Variation des EP4 Gens identifiziert werden, die in einer reduzierten Expression von EP4 resultiert¹³⁵. Dies unterstützt die Hypothese einer protektiven Rolle dieses Rezeptors bei allergischen Erkrankungen. Auch die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen weisen auf eine anti-inflammatorische Funktion dieses Rezeptors hin. Inwieweit die exogene Gabe eines spezifischen EP2-Agonisten die durch ASS aggravierte Anaphylaxie beeinflussen kann, soll in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

PGE₂ stellt eine Möglichkeit dar, die in dieser Arbeit nachgewiesene Verstärkung der Anaphylaxie durch ASS zu erklären. Folgende Hypothese wäre möglich:

ASS reduziert den Basalwert von PGE₂. In der Tat wurden reduzierte Basalwerte von PGE₂ auch bei Patienten mit Aspirin induziertem Asthma detektiert¹³³. Da PGE₂ die MZ-Responsivität vermindern kann^{202, 203}, erhöht das kontinuierliche Fehlen von PGE₂ die Ansprechbarkeit von MZ auf einen aktivierenden Impuls (wie die Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors), so dass bei Auslösen der anaphylaktischen Reaktion MZ verstärkt reagieren und somit erhöhte Mengen von Mediatoren in das Gewebe und die Zirkulation abgeben. Um den Mechanismus genauer zu charakterisieren Bedarf es noch weiterer Untersuchungen, welche im Folgenden näher erläutert werden.

9. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals in detaillierten *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden, dass die Herz-Kreislauf-Medikamente Ramipril, Metoprolol und ASS den Verlauf einer anaphylaktischen Reaktion verstärken können. Ramipril und Metoprolol stellen besonders in Kombination Risikofaktoren für die Ausprägung einer Anaphylaxie dar. Mit Hilfe von *in vitro*-Untersuchungen konnte belegt werden, dass diese Medikamente die Reaktivität FcεRI-aktivierter MZ über eine direkte Wechselwirkung mit der MZ beeinflussen können. Dies geschieht vermutlich über ein Eingreifen in die cAMP/PKA-Signalkaskade und über eine Modulation des Calciumhaushalts. Gleichzeitig kann Bradykinin, was bei der Einnahme von ACE-Inhibitoren akkumuliert, zu einer erhöhten MZ-Degranulation beitragen. Die pro-anaphylaktische Wirkung der Medikamente sollte beachtet werden, wenn sich sensible Individuen einer Herz-Kreislauftherapie unterziehen müssen. Wenn möglich sollte der β-Blocker durch ein Herz-Kreislauf-Medikament einer anderen Wirkstoffgruppe ersetzt werden, da dieser auch die Wirkung von Adrenalin hemmt, was als Notfalltherapie zur Behandlung der Anaphylaxie eingesetzt wird.

Der Mechanismus, der dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS zugrunde liegt, ist weitaus komplexer und bedarf noch weiterer Untersuchungen. Die *in vivo*-Studien im Mausmodell demonstrieren, dass die pro-anaphylaktische Wirkung von ASS MZ-abhängig ist, da eine ASS-Vorbehandlung der Tiere weder auf die Auslösung der Anaphylaxie mit Compound 48/80 noch auf die exogene Gabe von Histamin einen Einfluss hatte. Die Behandlung kultivierter, muriner MZ-Subtypen mit ASS hemmte die IgE-vermittelte MZ-Degranulation. Dies führte zu der Hypothese, dass die *in vivo* zu beobachtende Wirkung von ASS auf indirekten Mechanismen beruht. Vermutlich wirkt ASS auf umliegende Gewebszellen, welche die Freisetzungsfähigkeit der Effektorzellen durch Erhöhung aktivatorischer oder Inhibition suppressorischer Mediatoren erhöhen können. PGE₂ stellt einen möglichen Kandidaten dar, um die pro-anaphylaktische Wirkung von ASS zu erklären. Um die Rolle von PGE₂ bei dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS genauer zu charakterisieren, gibt es mehrere Herangehensweisen: Zur Identifikation der EP-Rezeptoren, welche für den pro-anaphylaktischen Effekt von ASS maßgeblich von Bedeutung sind, könnte der Einsatz von Mäusen, bei denen jeweils einer der Rezeptoren für PGE₂ ausgeschaltet wurde, zur Aufklärung beitragen. Dadurch würde die Frage beantwortet, in wieweit der pro-anaphylaktische Effekt von ASS durch das Fehlen des Rezeptors revidiert

werden kann. Weiterhin könnte man beispielsweise Reagenzien einsetzen, welche die Prostaglandinhydroxygenase inhibieren und so einen Abbau von PGE₂ verhindern²⁰⁴. Auf diese Weise würde das endogene PGE₂ stabilisiert. Sollte dies dem pro-anaphylaktischen Effekt von ASS entgegenwirken, wäre dies ein weiterer Hinweis für die Bedeutsamkeit dieses Mediators. *In vitro*-Untersuchungen mit verschiedenen MZ-Subtypen könnten zusätzlich die Ergebnisse der oben beschriebenen *in vivo*-Experimente untermauern. Eine Behandlung muriner MZ mit PGE₂, sowie mit den spezifischen EP-Agonisten sollte die IgE-induzierte Histaminfreisetzung sowohl positiv als auch negativ beeinflussen, da PGE₂ je nach Rezeptoraktivierung die Histaminfreisetzung sowohl stimulieren^{132, 205} als auch inhibieren^{129, 206} kann. Ist der Rezeptor, der maßgeblich an der pro-anaphylaktischen Wirkung von ASS beteiligt ist, identifiziert, könnte der Einsatz des entsprechenden EP-Rezeptoragonisten dazu dienen das Risiko betroffener Individuen eine (schwere) allergische Reaktion zu entwickeln, abzuschwächen. Die in dieser Arbeit prä-optimierten Mausmodelle zur Anaphylaxie können zukünftig dazu genutzt werden, andere Medikamente bezüglich ihrer anaphylaktischen Wirkung zu untersuchen und somit mögliche Risiken für betroffene Patienten frühzeitig zu erkennen. Auf diese Weise könnte der Einsatz bei bestimmten Risikopersonen (beispielsweise bei Patienten, die genetisch bedingt vermehrt MZ aufweisen) verhindert werden. Zudem können mit Hilfe der Modelle weitere Kofaktoren der Anaphylaxie identifiziert werden und ihre zugrundeliegenden Mechanismen aufgedeckt werden. Da die Anaphylaxie potentiell lebensbedrohlich verlaufen kann, ist die Kenntnis der Kofaktoren von großer Bedeutung.

10. REFERENZEN

1. Corry DB, Kheradmand F. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 1999; 402:B18-23.
2. Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. White Book on Allergy. World Allergy Organization (WAO) 2013:11-6.
3. Worm M, Edenharter G, Rueff F, Scherer K, Pfohler C, Mahler V, et al. Symptom profile and risk factors of anaphylaxis in Central Europe. *Allergy* 2012; 67:691-8.
4. Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:721-32.
5. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012; 18:693-704.
6. Devereux G. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:869-74.
7. Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:205-17.
8. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112:946-56.
9. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv fuer mikroskopische Anatomie* 1877; 13:263-78.
10. Crivellato E, Beltrami C, Mallardi F, Ribatti D. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol* 2003; 123:19-21.
11. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. *Archiv fuer Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung* 1879:166-9.
12. Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66:303-12.
13. Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 66:289-302.
14. Bienenstock J, Befus AD, Pearce F, Denburg J, Goodacre R. Mast cell heterogeneity: derivation and function, with emphasis on the intestine. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:407-12.
15. Dvorak AM, Ishizaka T. Ultrastructural analysis of the development of human basophils and mast cells in vitro. *Int J Clin Lab Res* 1995; 25:7-24.
16. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 1991; 146:1410-5.
17. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:59-76.
18. Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, Matsuda H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 1993; 306:185-91.
19. Kitamura Y, Sonoda T, Nakano T, Hayashi C, Asai H. Differentiation processes of connective tissue mast cells in living mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 77:144-50.
20. Ihle JN, Keller J, Oroszlan S, Henderson LE, Copeland TD, Fitch F, et al. Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 1983; 131:282-7.
21. Jarboe DL, Huff TF. The mast cell-committed progenitor. II. W/Wv mice do not make mast cell-committed progenitors and S1/S1d fibroblasts do not support development of normal mast cell-committed progenitors. *J Immunol* 1989; 142:2418-23.
22. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994; 55:1-96.
23. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:93-104.
24. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:218-30.

25. Beaven MA. Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *Eur J Immunol* 2009; 39:11-25.
26. Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev* 2007; 217:8-18.
27. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; 9:1215-23.
28. Metcalfe DD, Peavy RD, Gilfillan AM. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:639-46; quiz 47-8.
29. Rao KN, Brown MA. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:83-104.
30. Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:31-8.
31. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med* 2000; 192:1849-56.
32. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996; 381:77-80.
33. Jones TG, Hallgren J, Humbles A, Burwell T, Finkelman FD, Alcaide P, et al. Antigen-induced increases in pulmonary mast cell progenitor numbers depend on IL-9 and CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* 2009; 183:5251-60.
34. Gurish MF, Tao H, Abonia JP, Arya A, Friend DS, Parker CM, et al. Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J Exp Med* 2001; 194:1243-52.
35. Pennock JL, Grecis RK. In vivo exit of c-kit+/CD49d(hi)/beta7+ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Blood* 2004; 103:2655-60.
36. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999; 402:B24-30.
37. Gilfillan AM, Rivera J. The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev* 2009; 228:149-69.
38. Piliponsky AM, Gleich GJ, Nagler A, Bar I, Levi-Schaffer F. Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor. *Blood* 2003; 101:1898-904.
39. Rocha-de-Souza CM, Berent-Maoz B, Mankuta D, Moses AE, Levi-Schaffer F. Human mast cell activation by *Staphylococcus aureus*: interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha release and the role of Toll-like receptor 2 and CD48 molecules. *Infect Immun* 2008; 76:4489-97.
40. Karra L, Levi-Schaffer F. Down-regulation of mast cell responses through ITIM containing inhibitory receptors. *Adv Exp Med Biol* 2011; 716:143-59.
41. Kuehn HS, Gilfillan AM. G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *Immunol Lett* 2007; 113:59-69.
42. Peachell P. Regulation of mast cells by beta-agonists. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31:131-42.
43. Weston MC, Peachell PT. Regulation of human mast cell and basophil function by cAMP. *Gen Pharmacol* 1998; 31:715-9.
44. Burelout C, Thibault N, Harbour D, Naccache PH, Bourgoin SG. The PGE2-induced inhibition of the PLD activation pathway stimulated by fMLP in human neutrophils is mediated by PKA at the PI3-Kgamma level. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:730-41.
45. Kraft S, Kinet JP. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:365-78.
46. Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11330-5.
47. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77:1033-79.

48. Williams CM, Galli SJ. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:847-59.
49. Kushnir-Sukhov NM, Brown JM, Wu Y, Kirshenbaum A, Metcalfe DD. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:498-9.
50. Arumugam M, Ahrens R, Osterfeld H, Kottyan LC, Shang X, MacLennan JA, et al. Increased susceptibility of 129SvEvBrd mice to IgE-Mast cell mediated anaphylaxis. *BMC Immunol* 2011; 12:14.
51. Finkelman FD. Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:506-15; quiz 16-7.
52. Wang J, Sampson HA. Food anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:651-60.
53. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004; 103:147-66.
54. Pejler G, ABrtink M, Ringvall M, Wernersson S. *Advances in Immunology*. Elsevier Inc. 2007; 95:167-77.
55. Portier P, Richet C. De l'action anaphylactique de certains venins [The anaphylactic reaction to certain venoms]. *C R Seances Soc Biol* 1902; 54:170.
56. Cohen SG, Zelaya-Quesada M, Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:331-6.
57. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Bock SA, Schmitt C, Bass R, Chowdhury BA, et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:584-91.
58. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, Adkinson NF, Jr., Bock SA, Branum A, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:391-7.
59. Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:341-8.
60. Triggiani M, Patella V, Staiano RI, Granata F, Marone G. Allergy and the cardiovascular system. *Clin Exp Immunol* 2008; 153 Suppl 1:7-11.
61. Brown SG. Clinical features and severity grading of anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:371-6.
62. Makabe-Kobayashi Y, Hori Y, Adachi T, Ishigaki-Suzuki S, Kikuchi Y, Kagaya Y, et al. The control effect of histamine on body temperature and respiratory function in IgE-dependent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:298-303.
63. Ben-Shoshan M, Clarke AE. Anaphylaxis: past, present and future. *Allergy* 2011; 66:1-14.
64. Beyer K, Eckermann O, Hompes S, Grabenhenrich L, Worm M. Anaphylaxis in an emergency setting - elicitors, therapy and incidence of severe allergic reactions. *Allergy* 2012; 67:1451-6.
65. Helbling A, Hurni T, Mueller UR, Pichler WJ. Incidence of anaphylaxis with circulatory symptoms: a study over a 3-year period comprising 940,000 inhabitants of the Swiss Canton Bern. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:285-90.
66. Worm M, Babina M, Hompes S. Causes and risk factors for anaphylaxis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013; 11:44-50.
67. Wölbing F, Fischer J, Koberle M, Kaesler S, Biedermann T. About the role and underlying mechanisms of cofactors in anaphylaxis. *Allergy* 2013; 68:1085-92.
68. Brockow K, Jofer C, Behrendt H, Ring J. Anaphylaxis in patients with mastocytosis: a study on history, clinical features and risk factors in 120 patients. *Allergy* 2008; 63:226-32.
69. Hompes S, Kohli A, Nemat K, Scherer K, Lange L, Rueff F, et al. Provoking allergens and treatment of anaphylaxis in children and adolescents--data from the anaphylaxis registry of German-speaking countries. *Pediatr Allergy Immunol* 2011; 22:568-74.

70. Worm M, Eckermann O, Dolle S, Aberer W, Beyer K, Hawranek T, et al. Triggers and treatment of anaphylaxis: an analysis of 4,000 cases from Germany, Austria and Switzerland. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111:367-75.
71. Lopez-Sendon J, Swedberg K, McMurray J, Tamargo J, Maggioni AP, Dargie H, et al. Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:1454-70.
72. Mueller UR. Cardiovascular disease and anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7:337-41.
73. Schrör K. Acetylsalicylsäure. Dr. Schrör Verlag, Frechen 2011; 2. überarbeitete Auflage:118-32.
74. Moneret-Vautrin DA, Latarche C. [Drugs as risk factors of food anaphylaxis in adults: a case-control study]. *Bull Acad Natl Med* 2009; 193:351-62; discussion 62-3.
75. Lang DM. Anaphylactoid and anaphylactic reactions. Hazards of beta-blockers. *Drug Saf* 1995; 12:299-304.
76. Poulos LM. Trends in hospitalization for anaphylaxis, angioedema, and urticaria in Australia, 1193-1994 to 2004-2005. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology* 2007; 120:878-84.
77. Siegel D, Lopez J. Trends in antihypertensive drug use in the United States: do the JNC V recommendations affect prescribing? Fifth Joint National Commission on the Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Jama* 1997; 278:1745-8.
78. Audet M, Bouvier M. Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure. *Nat Chem Biol* 2008; 4:397-403.
79. de Lucia C, Femminella GD, Gambino G, Pagano G, Allocca E, Rengo C, et al. Adrenal adrenoceptors in heart failure. *Front Physiol* 2014; 5:246.
80. Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; 459:356-63.
81. Xiao RP. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE* 2001; 2001:re15.
82. Leineweber K, Bohm M, Heusch G. Cyclic adenosine monophosphate in acute myocardial infarction with heart failure: slayer or savior? *Circulation* 2006; 114:365-7.
83. Liu H, Xing X, Huang L, Huang Z, Yuan H. The expression level of myocardial beta1-adrenergic receptor affects metoprolol antihypertensive effects: a novel mechanism for interindividual difference. *Med Hypotheses* 2013; 81:71-2.
84. Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, Braniff BA, Brooks NH, Califf RM, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 1996; 94:2341-50.
85. Schweitzer N. What is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor. *Circulation* 2003; 108:16-8.
86. Kaplan AP. Kinins, airway obstruction, and anaphylaxis. *Chem Immunol Allergy* 2010; 95:67-84.
87. Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:621-36.
88. TenBrook JA, Jr., Wolf MP, Hoffman SN, Rosenwasser LJ, Konstam MA, Salem DN, et al. Should beta-blockers be given to patients with heart disease and peanut-induced anaphylaxis? A decision analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:977-82.
89. Stoevesandt J, Hain J, Kerstan A, Trautmann A. Over- and underestimated parameters in severe Hymenoptera venom-induced anaphylaxis: cardiovascular medication and absence of urticaria/angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:698-704 e1.
90. Szczeklik A, Sanak M, Nizankowska-Mogilnicka E, Kielbasa B. Aspirin intolerance and the cyclooxygenase-leukotriene pathways. *Curr Opin Pulm Med* 2004; 10:51-6.

91. Jones R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *Am J Med* 2001; 110:4S-7S.
92. Samter M, Beers RF, Jr. Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis. *Ann Intern Med* 1968; 68:975-83.
93. Stirling RG, Chung KF. Severe asthma: definition and mechanisms. *Allergy* 2001; 56:825-40.
94. Hamad AM, Sutcliffe AM, Knox AJ. Aspirin-induced asthma: clinical aspects, pathogenesis and management. *Drugs* 2004; 64:2417-32.
95. Knox A, Szczeklik A, Patriarca G. Aspirin intolerance and related syndromes: a multidisciplinary approach. Proceedings Of an international symposium organised by the catholic university of the sacred heart and the european network on aspirin induced asthma (aiane), rome, 11-13 november 1999. *Thorax* 2000; 55 Suppl 2:S1-2.
96. Knox AJ. How prevalent is aspirin induced asthma? *Thorax* 2002; 57:565-6.
97. Sanchez-Borges M, Acevedo N, Vergara C, Jimenez S, Zabner-Oziel P, Monzon A, et al. The A-444C polymorphism in the leukotriene C4 synthase gene is associated with aspirin-induced urticaria. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19:375-82.
98. Babu KS, Salvi SS. Aspirin and asthma. *Chest* 2000; 118:1470-6.
99. Farooque SP, Lee TH. Aspirin-sensitive respiratory disease. *Annu Rev Physiol* 2009; 71:465-87.
100. Suzuki Y, Ra C. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: aspirin modulation of IgE-dependent mast cell activation: role of aspirin-induced exacerbation of immediate allergy. *J Pharmacol Sci* 2009; 110:237-44.
101. Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy* 2001; 56 Suppl 66:7-11.
102. Pang L, Pitt A, Petkova D, Knox AJ. The COX-1/COX-2 balance in asthma. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1050-8.
103. Dahlen SE, Malmstrom K, Nizankowska E, Dahlen B, Kuna P, Kowalski M, et al. Improvement of aspirin-intolerant asthma by montelukast, a leukotriene antagonist: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:9-14.
104. Dahlen B, Nizankowska E, Szczeklik A, Zetterstrom O, Bochenek G, Kumlin M, et al. Benefits from adding the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton to conventional therapy in aspirin-intolerant asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1187-94.
105. Wang XS, Wu AY, Leung PS, Lau HY. PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leucotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy* 2007; 62:620-7.
106. Peebles RS, Jr., Hashimoto K, Sheller JR, Moore ML, Morrow JD, Ji S, et al. Allergen-induced airway hyperresponsiveness mediated by cyclooxygenase inhibition is not dependent on 5-lipoxygenase or IL-5, but is IL-13 dependent. *J Immunol* 2005; 175:8253-9.
107. Pettipher R, Hansel TT, Armer R. Antagonism of the prostaglandin D2 receptors DP1 and CRTH2 as an approach to treat allergic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6:313-25.
108. Dey I, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 2006; 149:611-23.
109. Funk CD. Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:664-72.
110. Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem* 2007; 7:311-40.
111. Kudo I, Murakami M. Prostaglandin E synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38:633-8.
112. Medeiros A, Peres-Buzalaf C, Fortino Verdán F, Serezani CH. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Mediators Inflamm*; 2012:327568.

113. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; 188:21-8.
114. Furuyashiki T, Narumiya S. Stress responses: the contribution of prostaglandin E(2) and its receptors. *Nat Rev Endocrinol*; 7:163-75.
115. Regan JW. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* 2003; 74:143-53.
116. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004; 56:387-437.
117. Narumiya S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87:1015-22.
118. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994; 46:205-29.
119. Cao C, Matsumura K, Yamagata K, Watanabe Y. Cyclooxygenase-2 is induced in brain blood vessels during fever evoked by peripheral or central administration of tumor necrosis factor. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 56:45-56.
120. Ivanov AI, Romanovsky AA. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci* 2004; 9:1977-93.
121. Konya V, Marsche G, Schuligoi R, Heinemann A. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther*; 138:485-502.
122. Olson CE, Chen MC, Amirian DA, Soll AH. Oxygen metabolites modulate prostaglandin E2 production by isolated gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1989; 256:G925-30.
123. Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 2009; 15:633-40.
124. Fedyk ER, Phipps RP. Prostaglandin E2 receptors of the EP2 and EP4 subtypes regulate activation and differentiation of mouse B lymphocytes to IgE-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:10978-83.
125. Grattan CE. Aspirin sensitivity and urticaria. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:123-7.
126. Morwood K, Gillis D, Smith W, Kette F. Aspirin-sensitive asthma. *Intern Med J* 2005; 35:240-6.
127. Legler DF, Bruckner M, Uetz-von Allmen E, Krause P. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:198-201.
128. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282:11613-7.
129. Kay LJ, Yeo WW, Peachell PT. Prostaglandin E2 activates EP2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. *Br J Pharmacol* 2006; 147:707-13.
130. Rundhaug JE, Simper MS, Surh I, Fischer SM. The role of the EP receptors for prostaglandin E2 in skin and skin cancer. *Cancer Metastasis Rev*; 30:465-80.
131. Szczeklik A, Nizankowska E, Bochenek G, Nagraba K, Mejza F, Swierczynska M. Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:219-25.
132. Gomi K, Zhu FG, Marshall JS. Prostaglandin E2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. *J Immunol* 2000; 165:6545-52.
133. Higashi N, Mita H, Ono E, Fukutomi Y, Yamaguchi H, Kajiwara K, et al. Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 125:1084-91 e6.
134. Ying S, Meng Q, Scadding G, Parikh A, Corrigan CJ, Lee TH. Aspirin-sensitive rhinosinusitis is associated with reduced E-prostanoid 2 receptor expression on nasal mucosal inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:312-8.
135. Palikhe NS, Sin HJ, Kim SH, Sin HJ, Hwang EK, Ye YM, et al. Genetic variability of prostaglandin E2 receptor subtype EP4 gene in aspirin-intolerant chronic urticaria. *J Hum Genet* 2012; 57:494-9.

136. Picado C. Aspirin-intolerant asthma: role of cyclo-oxygenase enzymes. *Allergy* 2002; 57 Suppl 72:58-60.
137. Noguchi J, Kuroda E, Yamashita U. Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *J Leukoc Biol* 2005; 78:605-11.
138. Inagaki N, Nagai H. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment: mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis. *J Pharmacol Sci* 2009; 110:251-9.
139. Strait RT, Morris SC, Yang M, Qu XW, Finkelman FD. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:658-68.
140. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* 2008; 22:659-61.
141. Tanaka T, Morito K, Kinoshita M, Ohmoto M, Urikura M, Satouchi K, et al. Orally administered phosphatidic acids and lysophosphatidic acids ameliorate aspirin-induced stomach mucosal injury in mice. *Dig Dis Sci* 2013; 58:950-8.
142. Shimbori C, Shiota N, Okunishi H. Effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist, on the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Eur J Pharmacol*; 650:424-30.
143. Kunikata T, Yamane H, Segi E, Matsuoka T, Sugimoto Y, Tanaka S, et al. Suppression of allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nat Immunol* 2005; 6:524-31.
144. Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, et al. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10501-6.
145. Li GZ, Chai OH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Inhibitory effects of *Houttuynia cordata* water extracts on anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1864-8.
146. Oskeritzian CA, Price MM, Hait NC, Kapitonov D, Falanga YT, Morales JK, et al. Essential roles of sphingosine-1-phosphate receptor 2 in human mast cell activation, anaphylaxis, and pulmonary edema. *J Exp Med*; 207:465-74.
147. Mrabet-Dahbi S, Metz M, Dudeck A, Zuberbier T, Maurer M. Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands. *Exp Dermatol* 2009; 18:437-44.
148. Funaba M, Ikeda T, Ogawa K, Murakami M, Abe M. Role of activin A in murine mast cells: modulation of cell growth, differentiation, and migration. *J Leukoc Biol* 2003; 73:793-801.
149. Matsuda H, Kannan Y, Ushio H, Kiso Y, Kanemoto T, Suzuki H, et al. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 1991; 174:7-14.
150. Malbec O, Roget K, Schiffer C, Iannascoli B, Dumas AR, Arock M, et al. Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells. *J Immunol* 2007; 178:6465-75.
151. Ahimastos AA, Natoli AK, Lawler A, Blombery PA, Kingwell BA. Ramipril reduces large-artery stiffness in peripheral arterial disease and promotes elastogenic remodeling in cell culture. *Hypertension* 2005; 45:1194-9.
152. Dayer P, Leemann T, Marmy A, Rosenthaler J. Interindividual variation of beta-adrenoceptor blocking drugs, plasma concentration and effect: influence of genetic status on behaviour of atenolol, bopindolol and metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28:149-53.
153. Grafe M, Bossaller C, Graf K, Auch-Schwelk W, Baumgarten CR, Hildebrandt A, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on bradykinin metabolism by vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; 264:H1493-7.
154. Guhl S, Stefaniak R, Strathmann M, Babina M, Piazena H, Henz BM, et al. Bivalent effect of UV light on human skin mast cells-low-level mediator release at baseline but potent suppression upon mast cell triggering. *J Invest Dermatol* 2005; 124:453-6.
155. Siraganian RP. Automated histamine release. A method for in vitro diagnosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1975; 49:108-10.

156. Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp*.
157. Siraganian RP. Automated histamine analysis for in vitro allergy testing. II. Correlation of skin test results with in vitro whole blood histamine release in 82 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 59:214-22.
158. Luttmann W, Bratke K., Küpper M., Myrtek D. *Der Experimentator Immunbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag 2009; 3. Auflage:115-21.
159. Radbruch A. Immunofluorescence: Basic Considerations. In: Radbruch A., *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin, Heidelberg. Springer Verlag 2000:38-52.
160. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:209-19.
161. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-86.
162. Yeh SH, Tsai CY, Kao JH, Liu CJ, Kuo TJ, Lin MW, et al. Quantification and genotyping of hepatitis B virus in a single reaction by real-time PCR and melting curve analysis. *J Hepatol* 2004; 41:659-66.
163. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-8.
164. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29:e45.
165. Hompes S, Dolle S, Grunhagen J, Grabenhenrich L, Worm M. Elicitors and co-factors in food-induced anaphylaxis in adults. *Clin Transl Allergy* 2013; 3:38.
166. Pfeffer I, Fischer J, Biedermann T. Acetylsalicylic acid dependent anaphylaxis to carrots in a patient with mastocytosis. *J Dtsch Dermatol Ges*; 9:230-1.
167. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342:145-53.
168. Nassiri M., Babina M., Dölle S., Edenharter G., Ruëff F., Worm M. Ramipril and metoprolol intake aggravate human and murine anaphylaxis: Evidence for direct mast cell priming. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014.
169. Miyajima I, Dombrowicz D, Martin TR, Ravetch JV, Kinet JP, Galli SJ. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 1997; 99:901-14.
170. Ohnmacht C, Schwartz C, Panzer M, Schiedewitz I, Naumann R, Voehringer D. Basophils orchestrate chronic allergic dermatitis and protective immunity against helminths. *Immunity* 2010; 33:364-74.
171. Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, Shindou H, Yoshida M, Nishikado H, et al. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 2008; 28:581-9.
172. Ono E, Taniguchi M, Mita H, Fukutomi Y, Higashi N, Miyazaki E, et al. Increased production of cysteinyl leukotrienes and prostaglandin D2 during human anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:72-80.
173. Strait RT, Morris SC, Finkelman FD. IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIB cross-linking. *J Clin Invest* 2006; 116:833-41.
174. Knoop L, Louahed J, Van Snick J, Renaud JC. IL-9 promotes but is not necessary for systemic anaphylaxis. *J Immunol* 2005; 175:335-41.
175. Diesner SC, Olivera A, Dillahunt S, Schultz C, Watzlawek T, Forster-Waldl E, et al. Sphingosine-kinase 1 and 2 contribute to oral sensitization and effector phase in a mouse model of food allergy. *Immunol Lett* 2012; 141:210-9.
176. Knight PA, Brown JK, Wright SH, Thornton EM, Pate JA, Miller HR. Aberrant mucosal mast cell protease expression in the enteric epithelium of nematode-infected mice lacking the integrin alpha v beta 6, a transforming growth factor-beta 1 activator. *Am J Pathol* 2007; 171:1237-48.

177. Gurish MF, Boyce JA. Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 22:107-18.
178. MacGlashan DW, Jr., Schleimer RP, Peters SP, Schulman ES, Adams GK, 3rd, Newball HH, et al. Generation of leukotrienes by purified human lung mast cells. *J Clin Invest* 1982; 70:747-51.
179. Schleimer RP, MacGlashan DW, Jr., Peters SP, Pinckard RN, Adkinson NF, Jr., Lichtenstein LM. Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:614-7.
180. Schleimer RP, Schulman ES, MacGlashan DW, Jr., Peters SP, Hayes EC, Adams GK, 3rd, et al. Effects of dexamethasone on mediator release from human lung fragments and purified human lung mast cells. *J Clin Invest* 1983; 71:1830-5.
181. Kato T. Role of protein kinase A in the inhibition of human mast cell histamine release by β -adrenergic receptor agonists. *Allergology International* 2002:197-203.
182. White JR, Pluznik DH, Ishizaka K, Ishizaka T. Antigen-induced increase in protein kinase C activity in plasma membrane of mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:8193-7.
183. Bristow MR. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101:558-69.
184. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Ca^{2+} and protein kinase C signaling for histamine and sulfidoleukotrienes released from human cultured mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:895-900.
185. Razin E. *Signal Transduction in Mast Cells and Basophils*. New York: Springer-Verlag 1999.
186. Chakravarty N, Yu WJ. Role of intracellular calcium in histamine release from rat mast cells. *Agents Actions* 1984; 14:386-91.
187. Pearce FL, Ennis M, Truneh A, White JR. Role of intra- and extracellular calcium in histamine release from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 1981; 11:51-4.
188. Ridker PM, Cook NR, Lee IM, Gordon D, Gaziano JM, Manson JE, et al. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2005; 352:1293-304.
189. Togo K, Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, Terui T, Ochiai T, et al. Aspirin and salicylates modulate IgE-mediated leukotriene secretion in mast cells through a dihydropyridine receptor-mediated Ca^{2+} influx. *Clin Immunol* 2009; 131:145-56.
190. Szczeklik A. Mechanism of aspirin-induced asthma. *Allergy* 1997; 52:613-9.
191. Mortaz E, Redegeld FA, Nijkamp FP, Engels F. Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of pro-inflammatory cytokines. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:1049-57.
192. Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 107:2568-73.
193. Ferry X, Brehin S, Kamel R, Landry Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides* 2002; 23:1507-15.
194. Brockow K, Metcalfe DD. Mastocytosis. *Chem Immunol Allergy* 2010; 95:110-24.
195. Position Paper, skin prick testing for allergy diagnosis. http://www.allergy.org.au/images/stories/ascia_spt_manual_2009.pdf. Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy (ASCI) 2008.
196. Gyllfors P, Bochenek G, Overholt J, Drupka D, Kumlin M, Sheller J, et al. Biochemical and clinical evidence that aspirin-intolerant asthmatic subjects tolerate the cyclooxygenase 2-selective analgetic drug celecoxib. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:1116-21.
197. Kay LJ, Gilbert M, Pullen N, Skerratt S, Farrington J, Seward EP, et al. Characterization of the EP receptor subtype that mediates the inhibitory effects of prostaglandin E2 on IgE-dependent secretion from human lung mast cells. *Clin Exp Allergy* 2013; 43:741-51.
198. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822:21-33.

199. Ueta M, Matsuoka T, Narumiya S, Kinoshita S. Prostaglandin E receptor subtype EP3 in conjunctival epithelium regulates late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:466-71.
200. Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S. Prostaglandin E(2)-EP(3) signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:809-18 e2.
201. Benyahia C, Gomez I, Kanyinda L, Boukais K, Danel C, Leseche G, et al. PGE(2) receptor (EP(4)) agonists: potent dilators of human bronchi and future asthma therapy? *Pulm Pharmacol Ther* 2012; 25:115-8.
202. Serra-Pages M, Olivera A, Torres R, Picado C, de Mora F, Rivera J. E-prostanoid 2 receptors dampen mast cell degranulation via cAMP/PKA-mediated suppression of IgE-dependent signaling. *J Leukoc Biol* 2012; 92:1155-65.
203. Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. Subcutaneous prostaglandin E(2) restrains airway mast cell activity in vivo and reduces lung eosinophilia and Th(2) cytokine overproduction in house dust mite-sensitive mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 149:323-32.
204. Wanders A, Tufveson G, Gerdin B. Effects of prostaglandin E2 (PGE2) and drugs affecting PGE2 degradation on acute rejection of rat cardiac allografts. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 26:33-7.
205. Nguyen M, Pace AJ, Koller BH. Age-induced reprogramming of mast cell degranulation. *J Immunol* 2005; 175:5701-7.
206. Chan CL, Jones RL, Lau HY. Characterization of prostanoid receptors mediating inhibition of histamine release from anti-IgE-activated rat peritoneal mast cells. *Br J Pharmacol* 2000; 129:589-97.

11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt in erster Linie **Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm** für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Weiterhin möchte ich mich für ihre Unterstützung und gute fachliche Betreuung während des gesamten Zeitraums bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Richard Lucius** für die Bereitschaft meine Arbeit zu betreuen.

Ein besonderer Dank gebührt **Frau Dr. rer. nat. Magda Babina** für ihre Einführung in die spannende Welt der Mastzellen, für unermüdliches Korrigieren meiner Texte, ihre konstruktive Kritik und ihre gute fachliche Unterstützung.

Ein großes Dankeschön geht an **Laura Linstroem**, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Von ganzem Herzen danke ich **Vandana Kumari** für die schöne gemeinsame Zeit in unserem Büro und im Labor, ihre stets aufmunternden Worte, die gegenseitige Hilfestellung bei der Datenanalyse und ihr offenes Ohr. Des Weiteren danke ich Ihr für viele Unternehmungen außerhalb des Arbeitsalltags, für kulinarische Köstlichkeiten und für Ihre Freundschaft.

Der **gesamten Arbeitsgruppe** und ihren **ehemaligen Mitgliedern** möchte ich für das sehr angenehme Arbeitsklima, ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und den vielen lustigen Momenten in den Laborpausen danken. Mein besonderer Dank geht hierbei an **Dennis Ernst**, der selbst das Unmöglichste möglich macht und für jedes Problem eine Lösung parat hat. Weiterhin danke ich **Dr. rer. nat. Christin Weise** für zahlreiche fachliche Tipps bei methodischen Schwierigkeiten, für geduldiges Zuhören und ihren Humor, der den Laboralltag immer wieder aufgelockert hat. **Dr. rer. medic. Sabine Dölle** und **Josefine Grünhagen** danke ich für geduldiges Beantworten meiner Fragen rund um das Anaphylaxieregister.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinen Histamingefährten **Sven Guhl** für die Erlaubnis meine Histaminmessungen an seinem „heiligen“ Histamin-Autoanalyzer durchzuführen und seine Unterstützung bei zahlreichen, zeitaufwändigen Analysen. Des weiteren danke ich Ihm für methodische Tipps rund um die Mastzelle.

Bei **Sarah Brix** und **Dr. rer. nat. Anna Rohde** möchte ich mich für Ihre moralische Unterstützung in den Zeiten meiner Doktorarbeit bedanken.

Simon Weber danke ich besonders für sportliche Auszeiten, seinen Rückhalt und seine Zuversicht sowie für seine motivierenden Worte und schöne Stunden, in denen ich viel gelacht habe.

Meinen „**La Famiglia**“-**Mädelz** danke ich von Herzen für viele tolle Gespräche und vor allem für die schöne Zeit.

Abschließend bedanke ich mich bei **meinen Eltern** und vor allem bei **meiner Mutter** für Nervennahrung, weiße Kügelchen und wunderschöne, entspannte Auszeiten auf der schönsten Insel der Welt, Langeoog.

12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Maria Nassiri, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich habe in keinem früheren Verfahren einen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.