Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der medizinischen Hochschule Hannover

Betreuerin: **Prof. Dr. Ulrike Raap** (Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie)

Kobetreuer: **Prof. Dr. Evgeni Ponimaskin** (Institut für Neurophysiologie)

DISSERTATION

Der funktionelle Einfluss von Serotonin auf basophile Granulozyten

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

vorgelegt

von

Sylvia Maria Tosca Groen (geb. Eisel)

aus Gießen

Angenommen vom Senat der der Medizinischen Hochschule Hannover am

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Christopher Baum

Betreuer: Prof.'in Dr. med. Ulrike Raap

Kobetreuer: Prof. Dr. Evgeni Ponimaskin

1. Referent: Prof.'in Dr. rer. nat. Britta Eiz-Vesper

2. Referent: PD Dr. med. Thomas Skripuletz

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Promotionsausschussmitglieder:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Reinhold Ernst Schmidt

1. Prüfer: Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt

2. Prüfer: Prof.'in Dr. med. Bettina Wedi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

Abbildungsverzeichnis X

Tabellenverzeichnis XII

1 Einleitung 1

1.1 Der basophile Granulozyt 1

1.1.1 Diffenzierung 2

1.1.2 Der basophile Granulozyt und seine Rezeptoren 3

1.1.3 Oberflächenmarker und der Zeitpunkt ihrer Expression 6

1.1.4 Rekrutierung 7

1.1.5 Immunologische Reaktion 9

1.1.6 Der basophile Granulozyt und Serotonin 11

1.2 Serotonin 11

1.2.1 Herkunft, Vorkommen, Funktion und Wirkweise 11

1.2.2 Serotoninrezeptoren 12

1.2.3 G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren 13

1.2.4 Der 5-HT_3-Rezeptor – ein Ionenkanal 21

1.2.5 Serotonin bei Entzündungsreaktionen 22

2 Fragestellung und Ziel dieser Dissertationsarbeit 23

3 Material und Methoden 24

3.1 Material, Geräte und Hilfsmittel 24

3.1.1 Puffer und Lösungen 24

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien 25

3.1.3 Zellkulturmedium 25

3.1.4 Zytokine und Stimuli 25

3.1.5 Antikörper/ Isotypen 26

3.1.6 Primer 26
3.1.7 Kits 27
3.1.8 Geräte und Hilfsmittel 27
3.1.9 Software 29
3.2 Methoden 29
3.2.1 Blutspender 29
3.2.2 Basophil Activation Test (BAT) 29
3.2.3 Durchflusszytometrie 31
3.2.4 Isolation basophiler Granulozyten aus Leukozytenfilmen 32
3.2.5 Apoptose-Nekrose-Test 36
3.2.6 ELISA (= enzyme-linked immunosorbent assay) 36
3.2.7 RNA-Extraktion 38
3.2.8 Umschreibung der RNA in cDNA 38
3.2.9 RTqPCR (= real time quantitative polymerase chain reaction) 39
4 Ergebnisse 40
4.1 Einfluss von Serotonin auf die Expression basophiler Oberflächenmarker 40
4.1.1 Identifizierung der basophilen Granulozyten im Vollblut 40
4.1.2 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - Der Oberflächenmarker CD63 42
4.1.3 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - Der Oberflächenmarker CD203c 45
4.1.4 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - FcεRI-Expression 47
4.2 Apoptose 48
4.3 ELISA 50
4.4 PCR 51
5 Diskussion 53

6 Zusammenfassung 57

Quellenverzeichnis 60

Lebenslauf 0

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover 0

Danksagung 1

Notizen 0

Notizen 0

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knock-out
5-CT	5-Carboxamidotryptamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
AAD	Aromatische-L-Aminosäuren-Decarboxylase
AC	Adenylatcyclase
AD	Atopische Dermatitis
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Basophil activation test (Basophilenaktivierungstest)
bcl	B cell lymphoma
BMCP	Basophil/mast cell precursor (Basophilen/Mastzellenvorläuferzelle)
BPC	Basophil precursor cell
BTK	Brutons Tyrosinkinase
C	Komplementfaktor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Ca^{2+}	Kalzium
cDNA	Komplementäre DNA
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CCE	Counterflow Centrifugal Elutriation (Gegenstromelutriation)

c/EBPα	CAAT/enhancer-binding protein
CD	Cluster of differentiation, Bsp. CD40 = cluster of differentiation Protein 40, CD40L = cluster of differentiation Protein 40 Ligand
cGMP	cyclisches Guanosinmono-Phosphat
CIS	Cytokine-inducible SH2-domain-containing protein
CMP	Common myeloid precursor cell (Myeloide Vorläuferzelle)
COMT	Cathechol-O-Methyltransferase
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormons
CRTH	Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper cells
CTZ	Chemorezeptortriggerzone
CXCR	CXC motif chemokine receptor
Cy5	Cyanine dye label 5
CYP	Cytochrom P
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DNBS	Dinitrobenzenesulfonsäure
DSS	Dextransodiumsulfat
DOB	2,5-Dimethoxy-4-bromamphetamin
DOM	2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamin
DOI	2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamin

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Crystallisable fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
For	Forward
FSC	Forward scatter
GABA	γ-Aminobuttersäure
GATA	GATA (DNA motif) binding protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Common granulocyte macrophage precursor (Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzelle) oder Guanosinmonophosphat
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IL-3RA	Interleukin-3-Rezeptor-alpha
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat

IRF	Interferon regulatory factor
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JAK	Janus-Kinase
K+	Kalium
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
LH	Luteinisierendes Hormon
LT	Leukotrien
LTD	long-term depression (Langzeit-Depression)
LTP	long-term potentiation (Langzeit-Potenzierung)
LSD	Lysergsäurediethylamid
MK212	6-Chloro-2-(l-piperazinyl)pyrazin
Mcl	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP	monocyte-specific chemokine
m-CPP	meta-Chlorphenylpiperazin
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Neuronal growth-factor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLRP3	nucleotide-binding domain, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3
NO	Stickstoffmonoxid
OCT	Organic cation transporter

OX	Orexin
PAF	Thrombozyten/Plättchen-aktivierender Faktor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate buffered Saline = Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PGD	Prostaglandin
PIP_2	Phosphatidylinositol-3,4-biphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PL	Phospholipase
PNS	Peripheres Nervensystem
PGD	Prostaglandin
PK	Proteinkinase
RANTES	Regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RTqPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SB	1 (6-((R)-2-[2-[4-(4-Chloro-phenoxy)-piperidin-1-yl]-ethyl]-pyrrolidine-1-sulphonyl)-1H-indole hydrochloride), eigentlich SB-656104-A
SERT	Serotonintransporter

SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SOCS	suppressor of cytokine signaling
Src	Sarcoma
SSC	Sideward scatter
SSRI	Selective Serotonin reuptake inhibitor (selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAC	Tetrameric Antibody Complex
Tat	Trans-activator of transcription
TFMPP	Trifluormethylphenylpiperazin
Th	T-Helfer
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPH	Tryptophanhydroxylase
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
UV	Ultraviolett
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ein basophiler Granulozyt im peripheren Blut. Giemsa-Färbung..... 1

Abbildung 2: Entwicklung basophiler Granulozyten aus pluripotenten CD34+ Stammzellen im Knochenmark 3

Abbildung 3: Oberflächenrezeptoren basophiler Granulozyten und ihre Signalwege bei Th2 Immunantworten. 4

Abbildung 4: Chemokinese basophiler Granulozyten. 8

Abbildung 5: Funktion von basophilen Granulozyten bei Th2-Immunantworten..... 9

Abbildung 8: 5-HT_1-Rezeptorfamilie 15

Abbildung 9: Schematischer Ablauf des Protokolls für den Basophilen Aktivierungstest..... 30

Abbildung 10: Zellkultur-Ansatz 35

Abbildung 11: Punktwolkendiagramm der peripheren Blutzellen..... 40

Abbildung 12: Punktwolkendiagramm der peripheren Blutzellen Ansteuerungsschritt 2 41

Abbildung 13: zweiter Gating-Schritt..... 42

Abbildung 15: CD63-Expression nach Vorstimulierung mit 5-HT und Folgestimulierung mit a-IgE 44

Abbildung 16: Histogramme: CD63-Expression nach Vorstimulierung mit 5HT und anschließender Stimulierung mit anti-IgE 45

Abbildung 17: CD203c-Expression nach Stimulierung mit 5-HT oder anti-IgE..... 46

Abbildung 18: CD203c-Expression nach Stimulierung mit anti-IgE und Kostimulierung mit 5-HT 47

Abbildung 19: FcεRI -Expression nach Stimulierung mit 5-HT oder anti-IgE..... 47

Abbildung 20: FcεRI -Expression nach Stimulierung mit anti-IgE und Kostimulierung mit 5-HT (MFI)..... 48

Abbildung 21: Der Einfluss von 5-HT auf die Apoptose von basophilen Granulozyten nach 21 Stunden in Kultur..... 49

Abbildung 22: Der Einfluss von anti-IgE und anti-IgE + 5-HT auf die IL-4-Sekretion

basophiler Granulozyten. 50

Abbildung 23: Der Einfluss von anti-IgE und 5-HT auf die IL-3-Sekretion basophiler Granulozyten. 51

Abbildung 24: mRNA Verhältnis der Zielgene zu den Referenzgenen 52

Abbildung 25: Einfluss von 5-HT und anti-IgE auf die IL-4- und IL-3-Sekretion aus basophilen Granulozyten. 56

Abbildung 26: Einfluss von anti-IgE und 5-HT auf basophile Granulozyten 58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 5-HT_2-Rezeptorfamilie 17

Tabelle 2: 5-$HT_{4,6\ und\ 7}$-Rezeptor 19

Tabelle 3: 5-HT_5-Rezeptorfamilie 20

Tabelle 4: 5-HT_3-Rezeptor 21

Tabelle 5: Puffer und Lösungen 24

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien 25

Tabelle 7: Zellkulturmedium 25

Tabelle 8: Zytokine und Stimuli 26

Tabelle 9: Antikörper/ Isotypen 26

Tabelle 10: Primer/Sonden 27

Tabelle 11: Kits 27

Tabelle 12: Geräte und Hilfsmittel 29

Tabelle 13: Software 29

Tabelle 14: In der Durchflusszytometrie verwendete Farben 31

Tabelle 15: ELISA: Standardreihen 37

Tabelle 16: PCR LightCycler Programm 39

1 Einleitung

1.1 Der basophile Granulozyt

Der basophile Granulozyt wurde das erste Mal 1879 von Paul Ehrlich aufgrund der charakteristischen Färbung mit basischen Anilinfarbstoffen beschrieben (1). Die drei verschiedenen Arten der im peripheren Blut vorkommenden granulierten Blutleukozyten können aufgrund ihrer Zellstruktur mit Hilfe verschiedener Färbeverfahren (Hämatoxylin-Eosin Färbung, May-Grünwald Färbung) unterschieden werden. Die Blaufärbung von basophilen Strukturen, wie DNA und Ribosomen, bzw. die Rotfärbung von basischen bzw. eosinophilen Strukturen, wie Zellplasmaproteinen und Mitochondrien, führt zu der Namensgebung der Zellen. In einem mit Hämatoxylin-Eosin angefärbten Blutausstrich sind basophile Granulozyten anhand ihrer blauen Färbungen zu erkennen, während eosinophile Granulozyten eine rötliche Färbung und neutrophile Granulozyten keine Färbung aufweisen. Bei den basophilen Strukturen der basophilen Granulozyten handelt es sich um kleine mit verschiedenen Effektorsubstanzen gefüllte Granula.

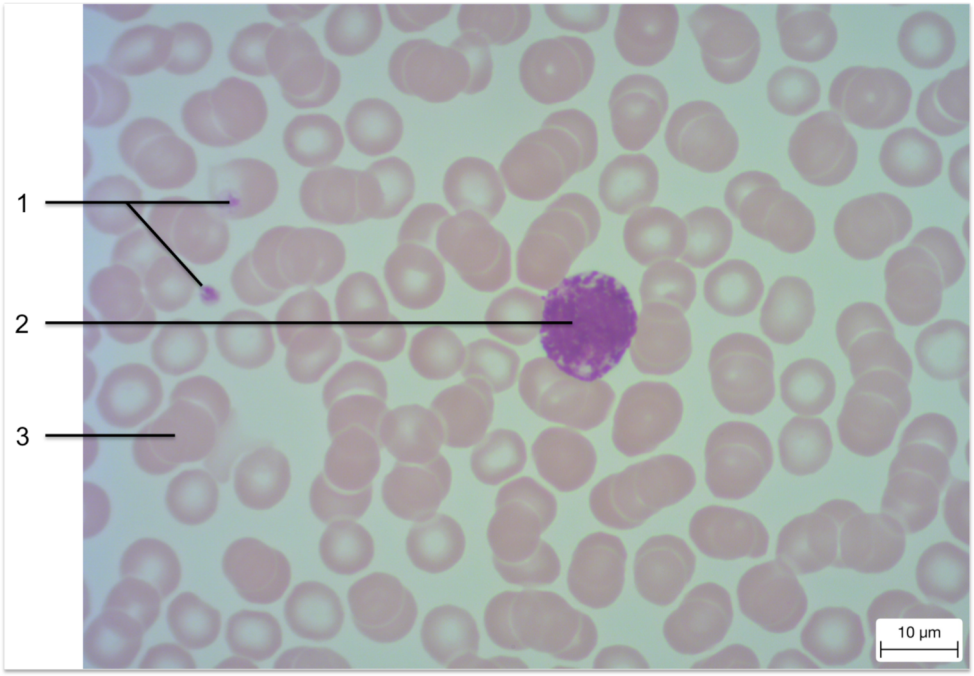

Abbildung 1: Ein basophiler Granulozyt im peripheren Blut. Giemsa-Färbung.
1. Thrombozyten, 2. Basophiler Granulozyt mit sauren Granula, 3. Erythrozyt

Der basophile Granulozyt weist im gesunden Organismus eine durchschnittliche Lebensspanne von 60 min auf (4) und macht 0,5 - 1 % der peripheren Blutleukozyten aus. In einem Differentialblutbild liegt der Referenzbereich bei 10 - 100 Zellen pro µl Blut. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle für das humane adaptive Immunsystem als Effektorzelle, namentlich bei der Abwehr von Parasiten und allergischen Reaktionen, fallen sie in die Kategorie der Th2-Immunreaktionen. Basophile Granulozyten können bei Entzündungsprozessen wesentlich schneller rekrutiert werden als die gewebeständigen Mastzellen, weshalb sie bei der Vermittlung allergischer Reaktionen von großer Bedeutung sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die basophilen Granulozyten auch an der Immunabwehr parasitärer Infektionen und Zeckenbissen maßgeblich beteiligt sind (5-7). Sie sind die bedeutsamste Quelle für IL-4, welches das dominierende Zytokin bei der Initiierung von Th2-Immunreaktionen darstellt (8,9).

Außerdem findet man basophile Granulozyten in Hautbiopsaten betroffener Regionen von Patienten mit atopischer Dermatitis (10), allergischer Kontaktdermatitis (11), Prurigo, Urtikaria, bullösem Pemphigoid, Arzneimittelexanthem, eosinophiler pustulärer Follikulitis, Insektenstichen, Skabies, Purpura Schönlein-Henoch und Dermatomyositis (12).

1.1.1 Diffenzierung

Basophile Granulozyten entstehen im Knochenmark aus pluripotenten $CD34^+$ Stammzellen (13), die, im Gegensatz zu den Mastzellen, erst im ausdifferenzierten Zustand in den Blutkreislauf gelangen.

Die genaue Entwicklungsgeschichte von der Makrophagen-Granulozyten-Vorläuferzelle (GMP = common granulocyte macrophage precursor) zum ausgereiften Basophilen ist noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass dafür drei in GMPs exprimierte Transkriptionsfaktoren benötigt werden: STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) (14), c/EBPα (CAAT/enhancer-binding protein) und GATA-2 (Zinkfinger-Transkriptionsfaktor) (15). Eine schwache Expression von c/EBPα und simultan eine erhöhte Expression von GATA-2 führt zur Entstehung einer bipotenten Basophilen/Mastzell-Vorläufer-Population (BMCP = basophil/mast cell precursor). Durch die anschließende Re-Expression von c/EBPα in BMCPs entwickeln sich diese zu basophilen Granulozyten, während eine konstant schwache Expression von c/EBPα die Entwicklung der Mastzellen bedingt (3,16).

STAT5 induziert die c/EBPα- und reguliert die GATA-2- Expression in GMPs und ist somit entscheidend an ihrer Differenzierung zu BMPs beteiligt (17,18).

Neben diesem Signalweg ist es ebenfalls möglich, dass sich GMPs in der Anwesenheit von TSLP und IL-3 direkt zu BPCs differenzieren können, welche sich dann zu basophilen Granulozyten weiterentwickeln (Abb. 2) (14,19).

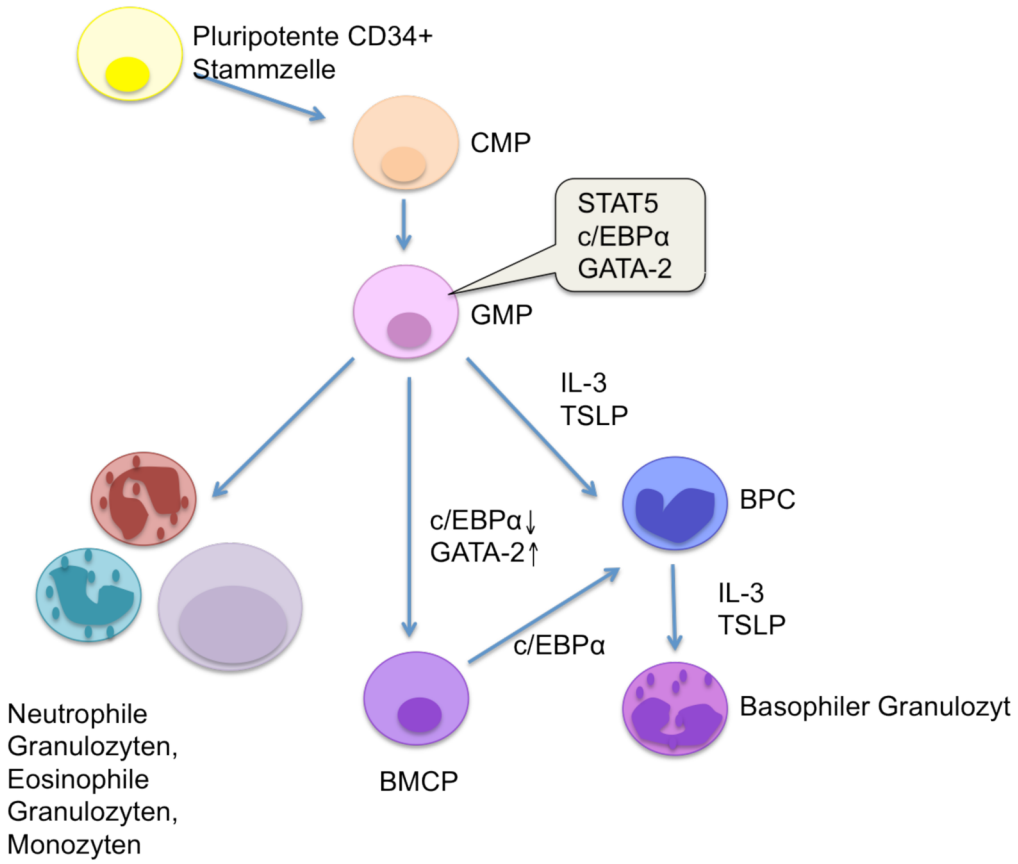

Abbildung 2: Entwicklung basophiler Granulozyten aus pluripotenten CD34+ Stammzellen im Knochenmark

Pluripotente $CD34^+$ Stammzellen im Knochenmark entwickeln sich zu myeloiden Vorläuferzellen (CMPs = common myeloid precursor cells = allgemeine myeloide Vorläuferzellen), die sich weiter zu GMPs (= granulocyte/monocyte precursor cells = Ganulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen) differenzieren können. Je nach Kombination der Transkriptionsfaktoren, differenzieren GMPs zu neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Monozyten, oder BMPCs (= basophil/mast cell precursor cells = Basophilen-Mastzellen-Vorläuferzellen) bzw. BPCs (= basophil precursor cells = Basophilen-Vorläuferzellen). Eine verminderte Expression von c/EBPα und gleichzeitige verstärkte Expression von GATA-2 in GMPs führt zu einer Entwicklung zu BMCPs. STAT5 induziert die Expression von c/EBPα, reguliert die GATA-2-Expression in GMPs, und trägt somit zur Weiterentwicklung zu basophilen Granulozyten aus GMPs über BPCs bei. Die anschließende Re-Expression von c/EBPα bedingt eine Differenzierung der BMCPs zu BPCs, aus denen durch IL-3 und TSLP zu basophilen Granulozyten entstehen. IL-3 und TSLP können eine direkte Differenzierung der GMPs zu basophilen Granulozyten bewirken.

1.1.2 Der basophile Granulozyt und seine Rezeptoren

Die basophilen Granulozyten exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die für die jeweiligen Funktionen wichtig sind. Die Vermittlung der zwei

Signalkaskaden der Anaphylaxie erfolgt über die hochaffinen Rezeptoren für IgE, $Fc_{\varepsilon}RI$, und dem niederaffinen Rezeptor für IgG, $Fc_{\gamma}RIII$. Zur Rekrutierung von basophilen Granulozyten an Orte der Inflammation ist besonders der IL-3-Rezeptor zu nennen.

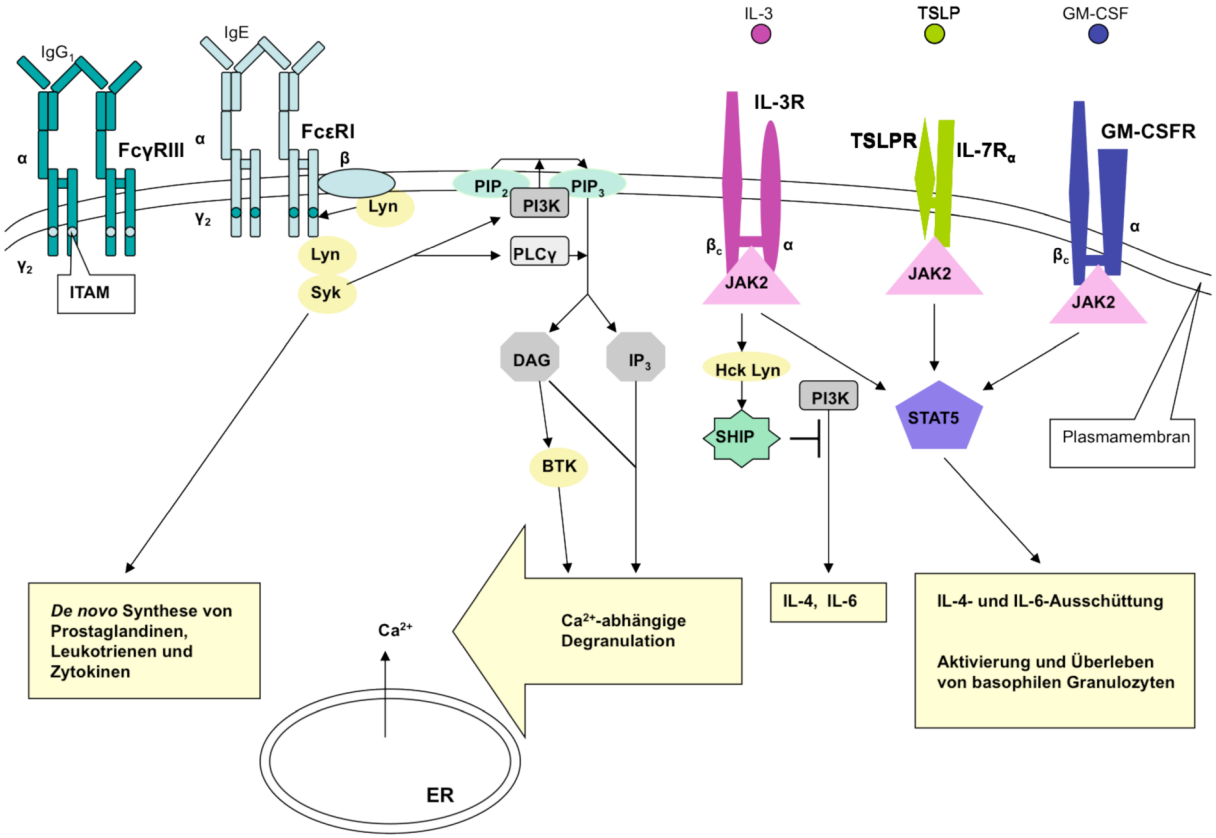

Abbildung 3: Oberflächenrezeptoren basophiler Granulozyten und ihre Signalwege bei Th2 Immunantworten.

Adaptiert nach (3) Voehringer, D., Eur. J. Immunol. 2012.

Fc-Rezeptoren: Die Quervernetzung der Fc-Rezeptoren nach Ligandenbindung führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase Lyn und zur Phosphorylierung der ITAMs in den β- und γ-Untereinheiten. Lyn und Syk werden zum Rezeptor herangezogen und phosphoryliert. Diese Phosphorlyierungen führen zur Aktivierung der PI3K, welche die Umwandlung von PIP_2 in PIP_3 benötigt wird, und der PLCγ, die positiv die Spaltung von PIP_3 in DAG in IP_3 beeinflusst. Im folgenden bedingen IP_3, DAG und BTK eine Degranulation der Basophilen durch den Einstrom von Ca^{2+}- aus dem endoplasmatischem Retikulum und dem extrazellulären Raum. Daneben finden *de novo* Synthesen von Prostaglandinen, Leukotrienen und Zytokinen durch von Syk initiierte Signalwege statt. IL-3-Rezeptor: Die phosphorylierte JAK2 aktiviert STAT5 und PI3K, was zur Ausschüttung von IL-4- und IL-6 führt. Desweiteren vermittelt JAK2 die Aktivierung der Src-Kinasen Hck und Lyn, welche SHIP phosphorylieren. SHIP inhibiert die PI3K-mediierte Ausschüttung von IL-4 und IL-6. TSLP-Rezeptor: STAT5-Aktivierung wird durchgeführt durch JAK1 und JAK2. GM-CSF-Rezeptor: JAK2-mediierte STAT5-Aktivierung, nach Ligandenbindung des IL-3-, TSLP- und GM-CSF-Rezeptors, führt zu IL-4- und IL-6-Ausschüttung, wie auch zu Aktivierung und verlängertem Überleben von basophilen Granulozyten.

Der heterotetramere $Fc_{\varepsilon}RI$ (20,21) besteht aus den vier Untereinheiten $\alpha\beta\gamma_2$, wobei sich die α-Untereinheit extrazellulär und die beiden γ-Untereinheiten und die β-Untereinheit intrazellulär und transmembran befinden (20) (Abb. 3). Sobald IgE an

die α-Untereinheit bindet, wird die an die β-Untereinheit gekoppelte Tyrosinkinase Lyn aktiviert. Diese phosphoryliert anschließend die in den β- und γ-Untereinheiten befindlichen ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) (22), wodurch weitere Lyn- und Syk-Moleküle zum Rezeptor herangezogen und durch Phosphorylierung aktiviert werden (23,24). Die aktivierte, für die Basophilen-Degranulation essentielle, Syk (25) phosphoryliert die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Phospholipase C_γ (PLC_γ), was schlussendlich zu Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat (PIP_2) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP_3) führt (26) (Abb. 3). Diese Signalkaskade führt zur Ca^{2+}-abhängigen Degranulation des basophillen Granulozyten, aber auch zur *de novo* Synthese von Leukotrienen, Prostaglandinen und Zytokinen (27,28) (Abb. 3).

Der niederaffine Rezeptor für IgG, Fc_γRIII, spielt eine Schlüsselrolle im alternativen Weg der Anaphylaxie. Ähnlich wie bei dem Fc_εRI-Rezeptor, erfolgt die Signaltransduktion auf den Stimulus der Quervernetzung durch die Bindung der Liganden (Abb.3). Danach erfolgt, ebenso wie bei Fc_εRI-Aktivierung, die Phosphorylierung von ITAMS und die durch Syk ausgelöste Signalkaskade, die zu Ca^{2+}-Einstrom und Degranulation führt (29-35). Nur wird in diesem Fall PAF freigesetzt statt IL-4, IL-13 und CD-40L (36) (Abb.5).

Der IL-3-Rezeptor besteht aus der α-Kette, IL-$3R_\alpha$ (CD123), und einer allgemeinen β-Kette. Die aus vier Fibronektin-Domänen bestehendende ß-Kette ist für die hohe Affinität von IL-3 an seinen Rezeptor verantwortlich (37,38). Die Bindung von IL-3 an seinen Rezeptor führt zur Phosphorylierung der an den Rezeptor gebunden Janus-Kinase 2 (JAK2), wodurch drei verschiedene Signalwege initiiert werden (Abb. 3).

1. Die Aktivierung von STAT5 (39), die zu einer IL-4- (40,41) und IL-6-Ausschüttung der basophilen Granulozyten führt und deren Überleben und Aktivierung fördert (3,42).

2. Die Aktivierung der PI3K, die ebenfalls in einer verstärkten Ausschüttung von IL-4 und IL-6 resultiert (43).

3. Die Inhibierung des PI3K Signalweges durch JAK2 geschieht, indem Hck und Lyn, zwei Src-Familien-Kinasen, die Phosphatase SHIP phosphorylieren, die dann wiederum PI3K inaktiviert (43).

Die Kopplung der β-Untereinheit des IL-3-Rezeptors an die γ-Untereinheiten des Fc_εRI bewirkt eine unterstützende Aktivierung des Fc_εRI vermittelten Signalweges,

namentlich die Basophilen-Aktivierung und -Degranulation (40). Die Bindung von IL-3 an seinen IL-3R bewirkt, ebenso wie die Bindung von IgE an seinen hochaffinen Rezeptor, die Aktivierung der STAT5-induzierten Signalkaskade (39,41), die neben der Aktivierung und verlängerten Lebensdauer basophiler Granulozyten auch zu IL-6 und IL-4- Sekretion führt (40,44) (Abb. 3).

Bei Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) handelt es sich um ein Zytokin der Hämatopoietin-Familie (45). Sein hochaffiner Rezeptor besteht aus der α-Kette des IL-7 Rezeptors und dem TSLP-Rezeptor (46) (Abb. 3). Die Bindung von TSLP auf basophilen Granulozyten verringert die Apoptoserate, führt aber nicht zu einer erhöhten Gesamtzellzahl an Basophilen im Blut (19). Durch die Bindung des Liganden TSLP an den Rezeptor wird JAK2 phosphoryliert, was zur Aktivierung von STAT5 und im folgenden zur Ausschüttung von IL-4 und IL-6 führt (47-49) (Abb. 3).

Ähnlich wie TSLP führt auch die Bindung von GM-CSF an seinen Rezeptor zur Aktivierung von STAT5, was die Ausschüttung verschiedener Zytokine zu Folge hat wie IL-4 und IL-6 (3).

1.1.3 Oberflächenmarker und der Zeitpunkt ihrer Expression

Vom basophilen Granulozyten wurde bereits erwähnt, dass er den $Fc_{\varepsilon}RI$ konstitutiv exprimiert, dasselbe gilt für den niederaffinen IL-3RA (Interleukin-3-Rezeptor-alpha) (50,51). Ein weitereres Oberflächenprotein ist das Ektoenzym CD203c aus der Familie der Ektonukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterasen, welches ausschließlich auf der Oberfläche von inaktiven und aktiven basophilen Granulozyten im peripheren Blut und von gewebeständigen Mastzellen lokalisiert ist. CD203c hydrolysiert ATP, wodurch eine exzessive Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren aus basophilen Granulozyten in chronischen allergischen Entzündungen eingedämmt wird. ATP wird nach der Quervernetzung von FcεRI aus basophilen Granulozyten und Mastzellen freigesetzt und kann beide Zellarten in einer autokrinen Art und Weise aktivieren (52). CD203c wird infolge der Quervernetzung des FcεRI bei Antigenkontakt und durch IL-3-Bindung verstärkt auf der Zelloberfläche exponiert und dient somit auch als Aktivierungsmarker der basophilen Granulozyten (53,54). Ein weiterer bekannter Aktivierungs- und Degranulationsmarker für basophile Granulozyten ist CD63, das sich in der Membran der Histamin-haltigen Granula der basophilen Granulozyten befindet (55). Die verstärkte Integration von CD63 auf der Zelloberfläche bei anti-IgE-Stimulation scheint jedoch durch andere Signalkaskaden

ausgelöst zu werden als bei CD203c (54,56). Die genauen Unterschiede sind noch nicht bekannt. Es zeigt sich, dass durch den p38-MAP-Kinasen-Inhibitor SB203580 in anti-IgE stimulierten basophilen Granulozyten die Integration von CD63 in der Zelloberfläche und Hinstamin-Ausschüttung konkordant inhibiert wurde, während die Exponierung von CD203c auf der Zelloberfläche unbeeinflusst blieb. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Behandlung von anti-IgE stimulierten basophilen Granulozyten mit Actin-Polymerisierungs-Inhibitoren eine Exponierung von CD63 auf der Zelloberfläche, verbunden mit einer Degranulation, jedoch keine Exponierung von CD203c auf der Zelloberfläche (57). Eine Gemeinsamkeit ihrer Signalkaskaden scheint die Ca^{2+}-Abhängigkeit zu sein (51,56). Die Unterschiede der Signaltransduktion scheinen v.a. in der Frühphase ihrer Signalwege zu liegen, da die Desensibilisierung durch den Syk-Inhibitor NVP-QAB205 stärker und schneller auf die CD63-Expression als auf die CD203c-Expression wirkt (57).

1.1.4 Rekrutierung

Wie auch andere Leukozyten haben basophile Granulozyten die Fähigkeit zwischen Endothelzellen aus dem Blutkreislauf auszutreten, um an die Orte der Inflammation zu gelangen. Dieser Vorgang nennt sich Diapedese. Dort angekommen, schütten sie unter anderem Histamin und Heparin aus, welche durch Vasodilatation und Gerinnungshemmung für eine ausreichende Blutversorgung des entzündeten Gewebes sorgen.

Die Basophilie, also die stark ausgeprägte Repräsentation von basophilen Granulozyten im peripheren Blut während parasitärer Infektionen und allergischer Reaktionen, kommt durch einerseits verstärkte Produktion im Knochenmark und andererseits durch eine verlängerte Lebensspanne zustande (4).

Die Rekrutierung basophiler Granulozyten an einen Ort der Entzündung erfolgt durch Botenstoffe (endogene Zytokine (IL-1β, IL-3)) und Chemokine, wie Eotaxin (CCL11 = C-C motif chemokine ligand) (58,59), die in der Regel von gewebeständigen Zellen der betroffenen Areale ausgesendet werden. Während Zytokine wie IL-3 oder IL-1ß größtenteils aus aktivierten T-Zellen bzw. Makrophagen stammen (60-62), wird Eotaxin von glatten Muskelzellen und Epithelzellen ausgeschüttet (2,63,64). Desweiteren trägt Prostaglandin D_2 (PGD_2), welches von den Verwandten der Basophilen, den Mastzellen, freigesetzt werden kann, über die Bindung an den CRTH2-Rezeptor ebenfalls zur Chemokinese basophiler Granulozyten bei (65,66).

Von großer Bedeutung für die Chemotaxis bei allergischen Reaktionen ist der Chemokinrezeptor CCR3, der die Chemokine Eotaxin, RANTES (regulated on activation, normal T cell-expressed and secreted = CCL5), MCP-8 (monocyte-specific chemokine 8 = CCL7) und MCP-4 (CCL13) bindet (64,67,68). Daneben exprimieren basophile Granulozyten noch eine Vielzahl weiterer Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR2, CCR3, CXCR1, CXCR3 und CXCR4 (59,69).

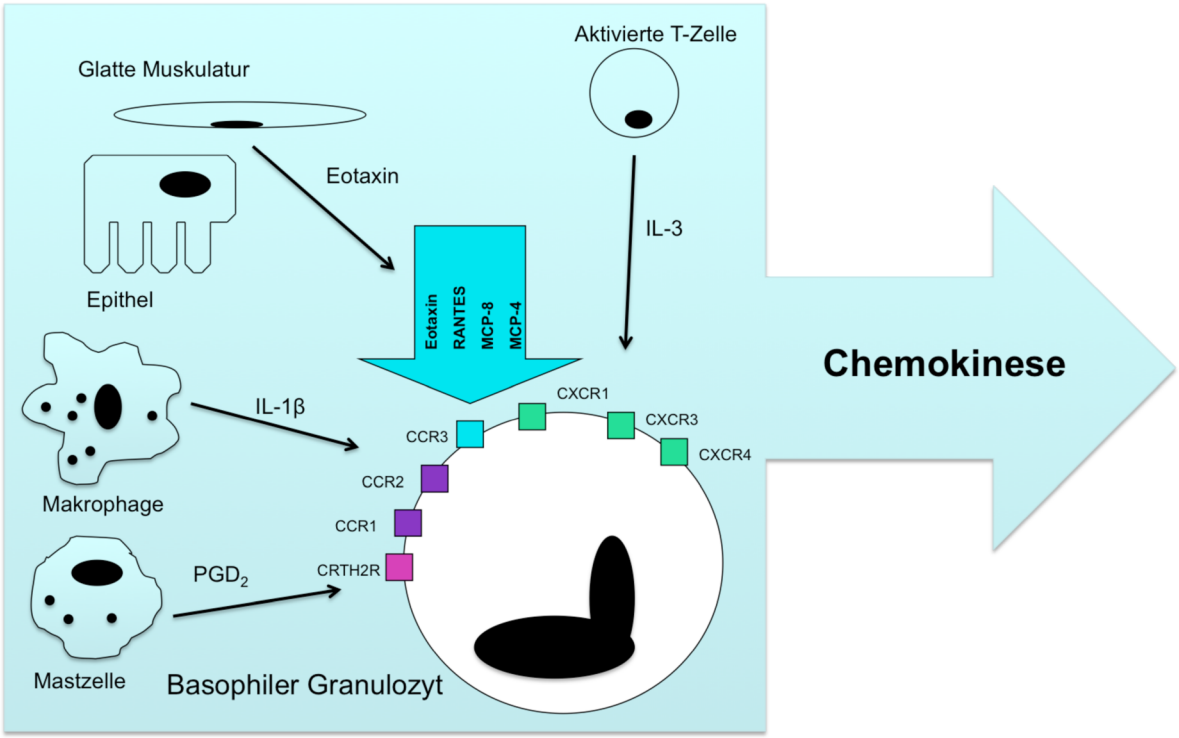

Abbildung 4: Chemokinese basophiler Granulozyten.

IL-3 aus aktivierten T-Zellen, Eotaxin aus glatten Muskelzellen und Epithelzellen, sowie IL-1β aus Makrophagen vermitteln die Chemokinese basophiler Granulozyten. Es findet eine Sensibilisierung basophiler Granulozyten für diese Chemotaxis über den CCR3 durch Eotaxin, RANTES, MCP-3 und -4 statt. Zusätzliche Sensibilisierung bewirkt PGD_2 über den CRTH2R. Weitere Chemokinrezeptoren auf basophilen Granulozyten sind CCR-1, -2, CXCR-1, -3 und -4.

Darüber hinaus gibt es außerdem eine selektive Chemokinese von basophilen Granulozyten, vermittelt durch IGF-1 und IGF-2 (insulin-like growth factors), die in der Leber und vielen anderen Geweben und Zellen, wie Fibroblasten, produziert werden (70,71). Sie verstärken Eotaxin-1 in seiner Funktion und die IgE-vermittelte Mediatorausschüttung (70,72). Auch IL-33 induziert eine erhöhte Ansprechrate auf Eotaxin und bereitet somit basophile Granulozyten auf die Migration in infiziertes Gewebe vor (73).

Ein weiterer Schritt in der Rekrutierung basophiler Granulozyten ist die

transendotheliale Migration, bei der Chemokine auf der Endotheloberfläche dafür sorgen, dass die basophilen Granulozyten an das Endothel kleinster Gefäße adhärieren. Durch Integrine wird diese Bindung gefestigt, damit die Basophilen durch das Endothel austreten können. Adhäsionsmoleküle, die während der basophilen Aktivierung auf der Endotheloberfläche vermehrt exprimiert werden, sind VCAM-1, ICAM-1, P-Selektin und E-Selektin (8,74).

1.1.5 Immunologische Reaktion

Basophile Granulozyten sind beteiligt an den Th2-Typ-immunologischen Reaktionen, wie allergischen Reaktionen und der Reaktion zur Bekämpfung von Parasitosen (8,9,75-77).

Die Freisetzung von Zytokinen wie IL-4 und IL-13 durch Th2-Zellen führt zum Start der Th2-Immunantwort. Diese Zytokine bewirken in B-Zellen einen Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu IgE und IgG_4 und erhöhen durch Förderung der VCAM-1-Expression auf Endothelzellen und Verstärkung der Eotaxin-Synthese die Rekrutierung neuer Leukozyten wie basophiler und eosinophiler Granulozyten (78-84).

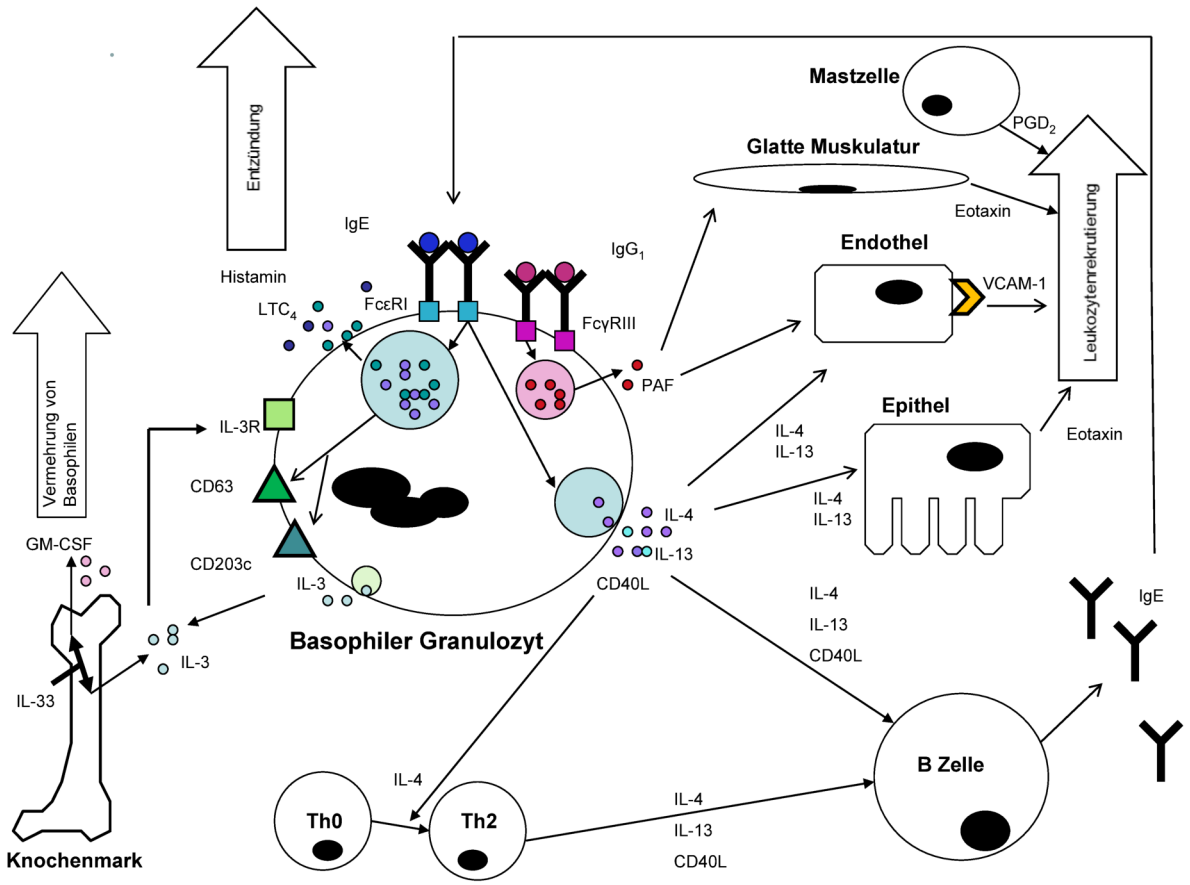

Abbildung 5: Funktion von basophilen Granulozyten bei Th2-Immunantworten.

Adaptiert nach (2 Gibbs, BF., Clin. Exp. Med. 2005).

Klassische Anaphylaxie: Durch die IgE vermittelte Aktivierung der basophilen Granulozyten, kommt es zu einer verstärkten Expression der Aktivitätsmarker CD63 und CD203c und einer Ausschüttung von IL-4, IL-13 und CD40L, sowie von Histamin und LTC_4. IL-4, IL-13 und CD40L bewirken einem Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu IgE in B-Zellen. IL-4 aktiviert die Differenzierung der Th0-Zellen zu Th2-Zellen und vermittelt gemeinsam mit IL-13, Histamin und LTC_4 eine Entzündungsreaktion. Alternative Anaphylaxie: IgG_1- abhängige Ausschüttung von PAF führt zu einer PAF-vermittelten Entzündungsreaktion. Migration zu Orten der Inflammation: Differenzierung basophiler Granulozyten aus Vorläufern durch GM-CSF und IL-3 aus dem Knochenmark, induziert durch IL-33 (85) und weiterem IL-3 aus aktivierten basophilen Granulozyten selbst. Das ausgeschüttete IL-4, Il-13 bzw. PAF führt zur Aktivierung von Epithel und glatter Muskulatur, die Eotaxin ausschütten, und von Endothelzellen, die VCAM-1 exprimieren, was zum Anlocken der basophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung bewirkt. Das von gewebeständigen Mastzellen ausgeschütte PGD_2 führt ebenfalls zur Basophilennrekrutierung. Das von den B-Zellen produzierte IgE führt zu einer erneuten Degranulation und damit zu einer Verstärkung des Entzündungsprozesses.

Basophile Granulozyten sind an beiden Signalwegen der Anaphylaxie beteiligt - der klassische IgE-vermittelten und der IgG_1-vermittelten Anaphylaxie. Sobald Antigen-bindendes IgE an seinen hochaffinen Rezeptor auf der Oberfläche der basophilen Granulozyten bindet, erfolgt die Quervernetzung zwischen den ligandenbindenden Untereinheiten des $Fc_\varepsilon RI$-Rezeptoren, die zur Aktivierung des Signalweges führt (Abb. 3, 1.1.2). Dies führt zur Ausschüttung der in der Granula enthaltenen Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin, Leukotriene, Prostaglandine) und verschiedenen Zytokinen (z.B. IL-4 und IL-13). Die IgE-abhängige Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-13 von basophilen Granulozyten (44) erfolgt nach der Aktivierung sehr schnell und erreicht für IL-4 innerhalb der ersten vier Stunden das Maximum (86). Ebenso wird auch der CD40-Ligand IgE-abhängig von basophilen Granulozyten ausgeschüttet, der zusammen mit IL-4 und IL-13 eine verstärkte Proliferation von B-Zellen und einen Immunglobulin-Klassenwechsel der B-Zellen von IgM zu IgE und IgG_4 bewirkt (79,86,87). Neben der Induktion des Klassenwechsels in B-Zellen ist IL-4 an der Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen zu Th2-Zellen beteilgt. Diese Th-2 Zellen schütten ebenfalls Zytokine wie IL-4 und IL-13 aus (84,88-92), was folglich zu einer Selbstverstärkung der Th2-Immunantwort führen kann.

Die Bindung eines Immunglobulin G_1-Antigen-Komplexes an seinen niederaffinen $Fc_\gamma RIII$-Rezeptor führt ebenfalls zur Quervernetzung der Rezeptoren und zur Freisetzung des Thrombozyten/Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF = platelet activation factor). Durch die Entzündungsmediatoren werden die glatte Muskelzellen stimuliert, was zu einem Blutdruck- und Temperaturabfall, Tachykardie, pulmonaler Dysfunktion und weiteren Symptomen führen kann, die letztendlich tödlich ausgehen

können (93-96).

Basophile Granulozyten spielen also eine wesentliche Rolle in der Immunabwehr. In neueren Studien zeigte sich für basophile Granulozyten ein möglicher Zusammenhang zwischen Allergologie bzw. Immunologie und Neuroendokrinum. So zeigten beispielsweise Böhm et al. 2012, dass das Neuropeptid α-Menalozyten-stimulierendes Hormon (αMSH) die Sekretion proallergischer Zytokine, wie IL-4 und IL-13, in anti-IgE-stimulierten basophilen Granulozyten supprimiert (97,98).

1.1.6 Der basophile Granulozyt und Serotonin

Schneider et al. fanden 2011 heraus, dass Serotonin die IL-4-Produktion in IL-3- und anti-IgE-stimulierten murinen basophilen Granulozyten signifikant reduziert. Sie vermuteten, dass Serotonin hierbei über den unspezifischen organischen Kationen Transporter OCT3 (organic cation transporter 3) in die basophilen Granulozyten aufgenommen wird und über den CYP450-Signalweg die IL-4-Produktion hemmt (99).

1.2 Serotonin

1.2.1 Herkunft, Vorkommen, Funktion und Wirkweise

Die Entdeckung des Serotonins (= 5-Hydroxytryptamin = 5-HT) geschah im Jahr 1948 durch Maurice Rapport, Arda Green und Irvine Page (100) und war mit dem bereits in den 1930er Jahren von Vittorio Erspamer identifizierten Enteramin identisch (101,102). Während initial die kontraktile Funktion des Serotonins in Gefäßen und im Darm im Fokus stand (103-105), konnte im Laufe der Zeit gezeigt werden, dass Serotonin im Zentralen Nervensystem (ZNS) an der Regulation von Stimmung (106,107), Körpertemperatur (108,109), Schlaf (110), Appetit und Metabolismus (111,112) beteiligt ist.

Neben der Produktion im ZNS werden geschätzte 90% des Serotonins in enterochromaffinen Zellen im Darm produziert (102,113). Dort spielt es eine Rolle bei der Kontraktion und Relaxation glatter Muskulatur, sowie der Peristaltik und der sekretorischen Reflexe (114,115).

Der Grundbaustein von Serotonin ist die essentielle Aminosäure Tryptophan (116), welche von Pflanzen in Chloroplasten synthetisiert wird (117,118). Im Säugetierplasma kommt Tryptophan in freier Form oder in seiner L-Isoform (nicht-

kovalent an Serum-Albumin gebunden) vor (119,120). Nur die freie Form kann die Blut-Hirn-Schranke passieren (120-122). Die Serumkonzentration des freien Serotonins wird durch Faktoren wie tägliche und jahreszeitliche Schwankungen (123), Ernährung (124,125), Stress (126), oder Alter und Geschlecht (127-129) beeinflusst.

Die Serotoninsynthese aus L-Tryptophan kann durch verschiedene Faktoren verstärkt werden, wie Neutrotrophine (z.b. Neuronal Growth Factor (NGF)) (130), Zytokine (z.B. IL-6) (131), UV-Exposition (132,133) und Steroide (129,134).

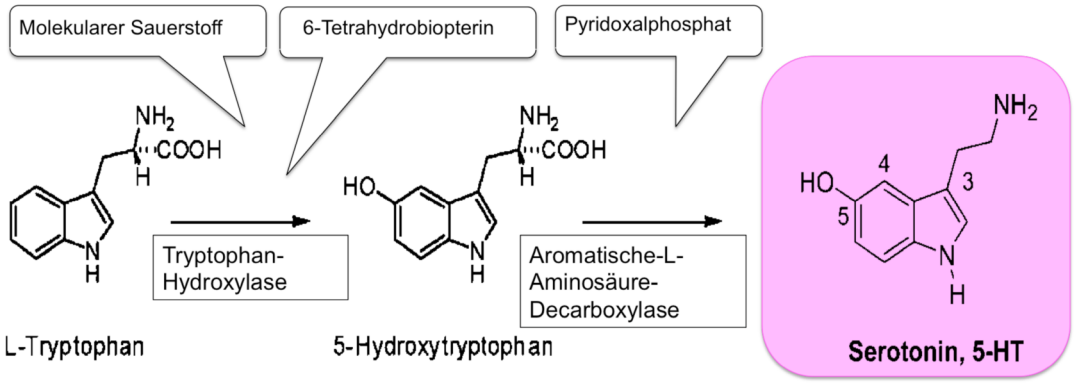

Abbildung 6:Serotoninsynthese aus Tryptophan.

1. Schrittmacherreaktion: Die Hydroxylierung des Indolrings des Tryptophans an der 5. Position durch TPH (Tryptophanhydroxylase) führt zur Synthese von 5-Hydroxytryptophan. Dafür werden molekularer Sauerstoff und 6-Tetrahydrobiopterin benötigt. 2. Die anschließende Decarboxylierung des 5-Hydroxytryptophans durch AAD (Aromatischen-L-Aminosäure-Decarboxylase) mit Pyridoxalphosphat führt zur Synthese von 5-Hydroxytryptamin (135).

Die Synthese beginnt durch die Hydroxylierung des Tryptophans zu 5-Hydroxytryptophan. Für diese Reaktion sind drei Faktoren notwending: 1. Molekularer Sauerstoff, 2. Der Reduktionsfaktor 6-Tetrahydrobiopterin und 3. Das Schrittmacher-Enzym der Serotoninsynthese, Tryptophanhydroxylase (TPH). Das Protein TPH wird von den Genen TPH1 und TPH2 codiert, von denen ersteres ubiquitär und das zweite vorwiegend im Gehirn vorkommt. Nach der Hydrolyse von L-Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan wird dies im Anschluß von der ubiquitär vorkommenden Aromatischen-L-Aminosäuren-Decarboxylase dekarboxyliert. Dafür wird der Co-Faktor Pyridoxalphosphat benötigt. (116,136)

1.2.2 Serotoninrezeptoren

Bis in die 1980er Jahre wurden die Serotoninrezeptoren in zwei Subtypen

unterschieden: D‘ und M‘ Serotoninrezeptoren (137). Rezeptoren, die direkt an glatten Muskelzellen ansetzen und dort eine Vasokonstriktion auslösen, wurden als D‘ Serotoninrezeptoren zusammengefasst, während die auf parasympathischen Ganglien befindlichen und die Ausschüttung von Acetylcholin induzierenden Rezeptoren, als M‘ Serotoninrezeptoren (M‘ für muskarinerg) bezeichnet wurden (137). Diese Klassifikation wurde durch eine neue, funktionelle ersetzt, bei der zunächst zwischen 5-HT_1-, 5-HT_2- und 5-HT_3-Rezeptoren unterschieden wurde (138-140).

Heute sind 7 Subfamilien von 5-HT-Rezeptoren bekannt (141-143), von denen sechs 13 verschiedene Gene für G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren aufweisen (144). Durch post-genomische Modifikation (145-148) können zusätzlich noch weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entstehen, wodurch insgesamt ein Minimum von 30 unterschiedlichen 5-HT-Rezeptoren entstehen, die ihre Signale über G-Protein-Kopplung vermitteln.

1.2.3 G-Protein-gekoppelte 5-HT-Rezeptoren

Durch die Form des Guanylnukleotids, welches die 5-HT_1-, 5-HT_2-, 5-HT_4-, 5-HT_5-, 5-HT_6-, 5-HT_7-Rezeptoren gebunden haben, wird der Aktivierungszustand bestimmt. Während der Rezeptor im GTP-gebundenen Zustand aktiv ist, ist er, sobald dieses durch Dephosphorylierung in GMP umgewandelt wurde, wieder inaktiv.

Die G-Proteine werden in vier Klassen unterteilt: $G_{i/o}$-Proteine („i“ für „inhibitorisch“) und G_s-Proteine („s“ für „stimulierend“) sowie G_q und $G_{12/13}$. Während die 5-HT_1-Rezeptoren meist über $G_{i/o}$-Protein wirken (149,150), sind 5-$HT_{4,6,7}$-Rezeptoren meist mit G_s-Proteinen gekoppelt (151,152). Die inhibierende bzw. stimulierende Funktion bezieht sich auf die Wirkweise des G-Proteins in Bezug auf die Adenylylcyclase, welche in der Zielzelle ATP oder GTP in cAMP bzw. cGMP umwandelt. Bei der Bindung eines Agonisten dissoziieren die α- und βγ-Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins voneinander, wobei die α-Einheit der $G_{i/o}$- und G_s-Proteine die Adenylylcyclase inhibiert bzw. aktiviert, während die βγ-Einheit der $G_{i/o}$-Proteine die Öffnung der nach innen gerichteter K^+-Kanäle (GIRK = G-protein-gated inwardly rectifying K^+ channels) bewirken kann. Deren Aktivierung sorgt für einen K^+-Einstrom in die Zelle, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Zelle kommt, was eine Verringerung der Signalrate der Zelle mit sich führt (153-155). G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren können außerdem die Proteinkinase A (PKA) aktivieren, was zu einer

erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration und zu verschiedenen, vom jeweiligen Zelltyp und vom Zellkompartiment abhängigen, nachfolgenden Effekten führen kann (Abb. 7). Dazu zählen u.a. positive ino-, chrono- und lusitropische Effekte an den Vorhöfen (156), Förderung der Dopaminausschüttung im Striatum (157), sowie Relaxation der glatten Kolonmuskulatur (158).

Allerdings wirken nicht alle G-Proteine über die Adenylylcyclase. $G_{q/11}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie die 5-HT_2-Rezeptoren (159,160)beispielsweise, wirken über das Enzym Phospholipase C_β (PLC_β). Die aktivierte PLC_β spaltet Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) auf. IP_3 wirkt dann als sekundärer Vermittler und setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum, frei. DAG wieder aktiviert die Phosphokinase C (PKC). $G_{q/11}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren können, abhängig vom jeweiligen Agonisten, neben der PLC_β auch andere Phospholipasen, wie PLA_2 und PLD, aktivieren (161,162).

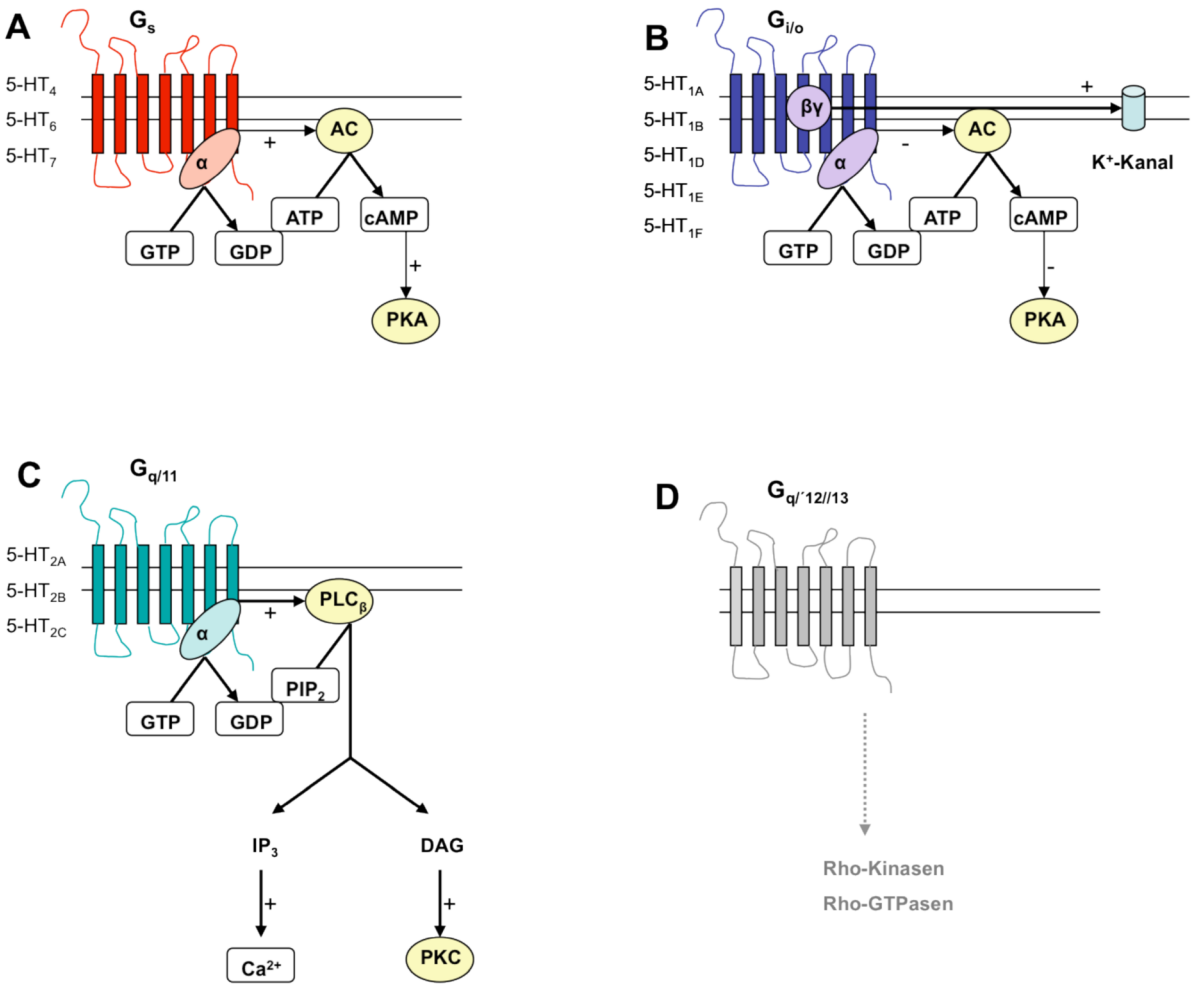

Abbildung 7: 5-HT-Rezeptoren und G-Protein-Kopplung.

A: G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren (5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7): Die Aktivierung der α-Untereinheit (UE) des Rezeptors durch Dephosphorylierung von GTP führt zur Aktivierung der AC (Adenylylcyclase). Die Umwandlung von ATP in cAMP durch AC (Adenylylcyclase) induziert die Aktivierung der PKA. B: $G_{i/o}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}): Die AC-Inhibierung durch die aktivierte α-UE inhibiert die Auslösung des nachfolgenden Signalwegs. Die Öffnung von K^+-Kanälen erfolgt durch die von der α-UE dissoziierte β-UE der 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren. C: $G_{q/11}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}): Die PLC_β-Aktivierung erfolgt durch die aktivierte α-UE. Die Umwandlung von PIP_2 in IP_3 und DAG findet durch aktivierte PLC_β statt. Die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} wird erhöht durch IP_3 und durch die Aktivierung der Ca^{2+}- und Phospholipid-abhängigen PKC. D: $G_{12/13}$-Protein-gekoppelte Rezeptoren: aktivieren Rho-Kinasen und Rho-GTPasen.

5-HT_1R	Der 5-HT_1-Rezeptorfamilie gehören fünf Mitglieder an, der 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}-, 5-HT_{1E}- und 5-HT_{1F}-Rezeptor. Die 5-HT_1-Rezeptoren signalisieren hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich über $G_{i/o}$-Proteine.				
	5-HT_{1A}R	**5-HT_{1B}R**	**5-HT_{1D}R**	**5-HT_{1E}R**	**5-HT_{1F}R**
Expression	Gehirn (v.a. Amygdala, Hippocampus, Raphe Kerne) , Magen	Gehirn (v.a. Basalganglien), Glatte Muskulatur cerebraler Arterien	Gehirn (v.a. Basalganglien)	Gehirn (v.a. Subiculum und enterorhinaler Kortex, außerdem Ncl. caudatus, Putamen, Amygdala, Gyrus dentatus)	Gehirn (Substantia nigra Globus pallidus, Kortex, Putamen, Hippocampus) RM, Ncl. spinalis nervi trigmini, Trigeminus-Ganglien, Blutgefäße
Wirkung	AC-Inhibierung (tlw. auch –Aktivierung)	AC-Inhibierung, Vasorelaxation über NO-Anstieg	AC-Inhibierung	AC-Inhibierung in niedr. Konz., -Aktivierung in hohen Konz.	AC-Inhibierung
Funktion	Migräne, Gedächtnisleistung, Sexualfunktion, Depression, Thermoregulation uvm.	als Autorezeptor: Verringerung der nachfolgenden Serotoninausschüttung im Hippocampus	als Autorezeptor: Verringerung der nachfolgenden 5-HT- u. Glutamatausschüttung in Hirnregionen als Hetereorezeptor: Verringerung der nachfolgenden NA-Ausschüttung im rechten Herzohr	Gedächtnisprozesse	Schmerzvermittlung der Migräne
Therapeutische Bedeutung	Angstzustände: Arylpiperazin-Anxiolytika (z.B. Buspiron) Depressionen: SSRI Schizophrenie: atypische Antipsychotika (z.B. Clozapin)	Migräne: Triptane (NW: Vasokonstriktion der A. carotis)	Migräne: Triptane		Migräne: Triptane

Abbildung 8: 5-HT_1-Rezeptorfamilie

Der 5-HT_1-Rezeptorfamilie gehören fünf Mitglieder an, der 5-HT_{1A}-, 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1D}-, 5-HT_{1E}- und 5-HT_{1F}-Rezeptor. Die 5-HT_1-Rezeptoren signalisieren hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich über $G_{i/o}$-Proteine (143). 5-HT_{1A}R: Expression: Hirn (Hippocampus, der Amygdala und den Raphe Kernen) {{ 2771 McAllister-Williams, RH 2014; 2772 Kumar JS 2013;}}, Magen {{ 2757 Kirchgessner,A.L. 1993;}}. Wirkung: 5-HT_{1A}R wirkt über Aktivierung (163), aber vorrangig über Inhibierung der Adenylatcyclase (164). Funktion: Migräne (165), Gedächtnisleistungen (166), Sexualverhalten (167), Depressionen (106) und Thermoregulation (109). Therapeutische Bedeutung: Angstzustände (168,169): Arylpiperazin-Anxiolytika der zweiten Generation zum Einsatz, die HT_{1A}-Rezeptoren als Zielstruktur haben, z.B. Buspiron (170); Depressionen: Zielstruktur der Selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRIs= selective serotonin reuptake inhibitors). Schizophrenie: atypische Antipsychotika, wie Clozapin (171). 5-HT_{1B}R: Expression: Gehirn (v.a. Basalganglien) (172,173), glatte Muskulatur cerebraler Arterien (174,175). Wirkung: Vasorelaxation über NO-Anstieg, Inhibition der Adenylylcyclase (AC) über Pertussistoxin-senstive-G-Protein-Kopplung (176,177). Funktion: als Autorezeptoren Verringerung der Serotoninausschüttung im Hippocampus (178,179). Therapeutische Bedeutung: Migräne: Triptane (174,175) (NW: Vasokonstriktion der A. carotis) (180,181). 5-HT_{1D}R: Expression: Gehirn (v.a. Basalganglien) (182,183). Wirkung: AC-Inhibierung (184). Funktion: als Autorezeptor: Verringerung der nachfolgenden 5-HT- (185) u. Glutamatausschüttung (186,187) in Hirnregionen, als Hetereorezeptor: Verringerung der nachfolgenden Noradrenalin-Ausschüttung im rechten Herzohr (188). Therapeutische Bedeutung: Migräne: Triptane (180,181). 5-HT_{1E}R: Expression: Gehirn (v.a. Subiculum und enterorhinaler Kortex, außerdem Ncl. caudatus, Putamen, Amygdala, Gyrus dentatus) (183,190) Wirkung: AC-Inhibierung in niedrigen Konzentrationen (149,189), -Aktivierung in hohen Konzentrationen (149). Funktion: Lokalisation weist auf mögliche Funktion in Gedächtnisprozessen hin (135,183,190). 5-HT_{1F}R: Expression: Gehirn (Substantia nigra Globus pallidus, Kortex, Putamen, Hippo- campus) (150,191), RM, Ncl. spinalis nervi trigmini (192), Trigeminus-Ganglien (193), Blutgefäße (175). Wirkung: AC-Inhibierung (184). Funktion: Schmerzvermittlung der Migräne (193). Therapeutische Bedeutung: Migräne: Triptane (194).

5-HT$_2$R	5-HT$_2$-Rezeptoren kommen ubiquitär vor. Sie lösen hauptsächlich über $G_{q/11}$-gekoppelte Rezeptoren den PLC$_\beta$-vermittelten Signalweg aus, können jedoch zellspezifisch auch weitere Signalwege auslösen.		
	5-HT$_{2A}$R	**5-HT$_{2B}$R**	**5-HT$_{2C}$R** Besitzt die Fähigkeit des mRNA-Editierens.
Expression	Gehirn (v.a. Kortex, Ncl. caudatus, Tuberculus olfactorius, Ncl. accumbens u. Hippocampus), Skelett-u. glatte Muskulatur, Nieren, Thrombozyten, kardiovaskul. System	Leber, Nieren, Magenfundus und Darm > Lunge und kardiovaskuläres Gewebe > ZNS Cochlea und Colliculus inferior	Gehirn (Plexus choroideus, Hypothalamus, Limbisches System und Regionen, die mit der Motorik assoziiert sind, wie Kortex, Amygdala, Hippocampus, Substantia nigra und Ncl. accumbens)
Wirkung	Aktivität sowohl durch Agonisten als auch durch Antagonisten herunterregulierbar, abhängig von Länge der Exposition; PLC$_\beta$-Aktivierung	PLC$_\beta$-Aktivierung produziert NO in humanen Koronararterien-Endothelien, induziert so Vasorelaxation	PLC$_\beta$-Aktivierung
Funktion	Darmperistaltik, Vermittlung der halluzinogenen Effekte der psychogenen Substanz LSD (Lysergsäure-diethylamid), Proliferation von Fibroblasten, arterielle Vasokonstriktion, Chemotaxis eosinophiler Granulozyten, u.v.m.	Hohlorgankonstriktion (Magenfundus), Koordination der Formation von Herz und Gehirn während der Embryonalentwicklung (LEBENSNOTWENDIG), Auditorisches System	Regulierung von Volumen und Zusammensetzung des Liquors, Steuerung des Ionenaustauschs zwischen Hirngewebe und Liquor , Anorexia nervosa, Migräne, Angstzustände, Zwangsneurosen
Therapeutische Bedeutung	Arterielle Hypertonie: Ketanserin Wahnhafte Erkrankungen: atypische Antipsychotika Thrombozytenaggregationshemmung: Sarpogrelat	Kardiale Hypertrophie: 5-HT$_{2B}$-Antagonisten als mögliche Therapieoption	Psychostimulanzienabusus: potentielle Zielstruktur Angstzustände: selektive Antagonisten als potentielle Zielstruktur

Tabelle 1: 5-HT$_2$-Rezeptorfamilie

5-HT$_2$-Rezeptoren kommen ubiquitär vor (143). Sie lösen hauptsächlich über $G_{q/11}$-gekoppelte Rezeptoren den PLC$_\beta$-vermittelten Signalweg aus (195,196), können jedoch zellspezifisch auch weitere Signalwege auslösen (197). 5-HT$_{2A}$R: Expression: Gehirn (v.a. Kortex, Ncl. caudatus, Tuberculus olfactorius, Ncl. accumbens u. Hippocampus) (198), Skelett- (199,200) u. glatte Muskulatur (201,202), Nieren (203), Thrombozyten (204), kardiovaskuläres System (205,206).

Wirkung: Aktivität sowohl durch Agonisten als auch durch Antagonisten herunterregulierbar, abhängig von Länge der Exposition (207); PLC_{β}-Aktivierung (159,195,196). Funktion: Darmperistaltik (208), Vermittlung der halluzinogenen Effekte der psychogenen Substanz LSD (Lysergsäure-diethylamid) (209,210), Proliferation von Fibroblasten (211), arterielle Vasokonstriktion (212), Chemotaxis eosinophiler Granulozyten(213) , u.v.m.. Therapeutische Bedeutung: Arterielle Hypertonie: Ketanserin (214), Wahnhafte Erkrankungen: atypische Antipsychotika (215), Thrombozytenaggregationshemmung: Sarpogrelat (216). $\underline{5\text{-}HT_{2B}R}$: Expression: Leber, Nieren, Magenfundus und Darm > Lunge und kardiovaskuläres Gewebe > ZNS (217-220), Cochlea und Colliculus inferior (221). Wirkung: PLC_{β}-Aktivierung (222), produziert NO in humanen Koronararterien-Endothelien, induziert so Vasorelaxation (223,224). Funktion: Hohlorgankonstriktion (Magenfundus) (225-227), Koordination der Formation von Herz und Gehirn während der Embryonalentwicklung (lebensnotwendig) (228,229), auditorisches System (221). Therapeutische Bedeutung: kardiale Hypertrophie: $5\text{-}HT_{2B}$-Antagonisten als mögliche Therapieoption (230). $\underline{5\text{-}HT_{2C}R}$: Besitzt die Fähigkeit des mRNA-Editierens (231). Expression: Gehirn (Plexus choroideus (198,232), Hypothalamus, Limbisches System und Regionen, die mit der Motorik assoziiert sind, wie Kortex, Amygdala, Hippocampus, Substantia nigra und Ncl. accumbens) (198,233). Wirkung: PLC_{β}-Aktivierung (234). Funktion: Regulierung von Volumen und Zusammensetzung des Liquors (235), Steuerung des Ionenaustauschs zwischen Hirngewebe und Liquor (236,237), Anorexia nervosa, Migräne, Angstzustände, Zwangsneurosen (238-241). Therapeutische Bedeutung: Psychostimulanzienabusus: potentielle Zielstruktur (242,243); Angstzustände: selektive Antagonisten als potentielle Zielstruktur (244,245).

5-HT$_{4,6,7}$R	G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren		
	5-HT$_4$R bis zu zehn verschiedene Spleiß-Varianten	**5-HT$_6$R**	**5-HT$_7$R** vier Spleißvarianten, 5-HT$_{7a-d}$
Expression	ZNS (Basalganglien, Kortex, Hippocampus, Substantia nigra) und PNS (enterochromaffine Zellen, enterisches Nervensystem, Vorhof-Myozyten)	Gehirn (Striatum, Nucleus accumbens, Kortex und Tuberculus olfactorius, sowie im Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Amygdala) Nebenniere und Magen	ZNS (v.a. Hippocampus, Hypothalamus, Neocortex, Thalamus, Kortex, Ncl. suprachiasmaticus), gl. Muskelzellen (Blutgefäße, Kolon), Gliazellen, Milz
Wirkung	AC-Aktivierung	AC-Aktivierung	AC-Aktivierung
Funktion	Darmperistaltik, positiv ino-, chrono- und lusitropische Effekte auf Vorhöfe, jedoch nicht auf Ventrikel, Sensibilisierung hippocampaler Neurone	Lern- und Gedächtnisprozesse (cholinerge Neurotransmission im Gehirn), Glutamat-Freisetzung (verstärkt durch Antagonisten , vermindert durch Agonisten), Dopamin-, GABA- und Noradrenalin-Freisetzung	Regulierung der zirkadianen Rhythmik, Vasorelaxation, Schlafregulierung und Regulierung der Körpertemperatur
Therapeutische Bedeutung	Obstipation und Obstipations-betontes Reizdarmsyndrom: 5-HT$_4$-Rezeptoragonisten (jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Herzinfarkten und Schlaganfällen durch 5-HT$_4$-Rezeptorwirkung an atrialen Myozyten des Herzens) Verstärkung von Lern- und Gedächtnisvorgängen: spezifische Agonisten	Depression: 5-HT$_6$-Rezeptorantagonisten blockieren die Effekte von SSRI Wahnhafte Erkrankungen: hohe Affinität für atypische Antipsychotika Adipositas-Therapie: potentielle Zielstruktur	Depression: immobilisierender Effekt von Antidepressiva wird durch Antagonisierung der 5-HT$_7$-Rezeptors begünstigt

Tabelle 2: 5-HT$_{4,6 \text{ und } 7}$-Rezeptor

G_s-Protein-gekoppelte Rezeptoren (246). 5-HT$_4$R: bis zu zehn verschiedene Spleiß-Varianten (147). Expression: ZNS (Basalganglien, Kortex, Hippocampus, Substantia nigra) (247,248) und PNS (enterochromaffine Zellen, enterisches Nervensystem, Vorhof-Myozyten) (249-251). Wirkung: AC-Aktivierung (252). Funktion: Darmperistaltik (158), positiv ino-, chrono- und lusitropische Effekte auf Vorhöfe, jedoch nicht auf Ventrikel (156), Sensibilisierung hippocampaler Neurone (253). Therapeutische Bedeutung: Obstipation und Obstipations-betontes Reizdarmsyndrom: 5-HT$_4$-Rezeptoragonisten (254) (jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen, wie Herzinfarkten und

Schlaganfällen durch 5-HT_4-Rezeptorwirkung an atrialen Myozyten des Herzens (255)) Verstärkung von Lern- und Gedächtnisvorgängen: spezifische Agonisten (256,257). 5-HT_6R: Expression: Gehirn (Striatum, Nucleus accumbens, Kortex und Tuberculus olfactorius, sowie im Hippocampus, Thalamus, Hypothalamus, Cerebellum, Amygdala) (258,259), Nebenniere und Magen (260,261). Wirkung: AC-Aktivierung (246). Funktion: Lern- und Gedächtnisprozesse (cholinerge Neurotransmission im Gehirn) (262), Glutamat-Freisetzung (verstärkt durch Antagonisten , vermindert durch Agonisten) (263) (264), Dopamin-, GABA- und Noradrenalin-Freisetzung (265). Therapeutische Bedeutung: Depression: 5-HT_6-Rezeptorantagonisten blockieren die Effekte von SSRI (266,267), Wahnhafte Erkrankungen: hohe Affinität für atypische Antipsychotika (268); Adipositas-Therapie: potentielle Zielstruktur (269). 5-HT_7R: vier Spleißvarianten, 5-HT_{7a-d} (270-275). Expression: ZNS (v.a. Hippocampus, Hypothalamus, Neocortex (274,276), Thalamus, Kortex (277,278), Ncl. suprachiasmaticus (274,276)), glatte Muskelzellen (Blutgefäße, Kolon) {{2688 Irving,Helen R. 2007;}}, Gliazellen (279,280), Milz (275). Wirkung: AC-Aktivierung (246). Funktion: Regulierung der zirkadianen Rhythmik (274,276), Vasorelaxation, Schlafregulierung und Regulierung der Körpertemperatur (281). Therapeutische Bedeutung: Depression: immobilisierender Effekt von Antidepressiva wird durch Antagonisierung der 5-HT_7-Rezeptors begünstigt (282,283).

5-HT_5R	Nur der 5-HT_{5A}-Rezeptor in funktionsfähiger Form in Menschen identifiziert werden. 5-HT_{5B} fand man bisher nur in Mäusen und Ratten, das humane Gen beinhaltet ein frühzeitiges Stopp-Kodon, was die Entstehung eines funktionsfähigen Rezeptos verhindert.
	5-HT_{5A}R
Expression	Gehirn (v.a. Bulbus olfactorius, Neocortex und mediale Habenula, außerdem Kortex, Hippocampus und Cerebellum) Neuronen im Glomus caroticum
Wirkung	$G_{i/o}$-gekoppelter Rezeptor AC-Inhibierung
Funktion	Kontrolle der zirkadianen Rhythmik, der Stimmung und kognitiver Funktionen

Tabelle 3: 5-HT_5-Rezeptorfamilie

Nur der 5-HT_{5A}-Rezeptor in funktionsfähiger Form in Menschen identifiziert werden. 5-HT_{5B} fand man bisher nur in Mäusen und Ratten, das humane Gen beinhaltet ein frühzeitiges Stopp-Kodon, was die Entstehung eines funktionsfähigen Rezeptos verhindert (284). 5-HT_{5A}R: Expression: Gehirn (v.a. Bulbus olfactorius, Neocortex und mediale Habenula, außerdem Kortex, Hippocampus und Cerebellum), Neuronen im Glomus caroticum (285,286). Wirkung: $G_{i/o}$-gekoppelter Rezeptor, AC-Inhibierung (287,288). Funktion: Kontrolle der zirkadianen Rhythmik, der Stimmung und kognitiver Funktionen (289-291).

1.2.4 Der 5-HT_3-Rezeptor – ein Ionenkanal

5-HT_3R	große Ausnahme, sowohl unter den Serotoninrezeptoren, als auch unter Mono- und Diamin-Neurotransmitterrezeptoren: **Kationen-selektiver Ionenkanal**; Teil der Cystein-Loop-Transmitter-gesteuerten Superfamilie Liganden-gesteuerter Ionenkanäle, wie der nicotinerge Acetylcholinrezeptor, der anionenselektive $GABA_A$-Rezeptor und der Glycinrezeptor
	5-HT_3R
Expression	prä- und postsynaptisch Gehirn (v.a. Hirnstammkerne, wie der spinalen Trigeminuskern, Area postrema (und die darin gelegenen Chemorezeptortriggerzone = CTZ) und Ncl. tractus solitarius, außerdem Hippocampus, Amygdala, Ncll. caudatus und accumbens und Putamen)
Wirkung	bei Rezeptoraktivierung Kationen-Ein- und Anionen-Ausstrom
Funktion	Chemotherapeutika sorgen für die Ausschüttung von Serotonin aus enterochromaffinen Zellen im Duodenum. Das aktiviert primäre afferente Nerven, die im Brechzentrum des ZNS Übelkeit induzieren. Die Neurotransmission an diesen Nerven erfolgt über 5-HT_3-Rezeptoren.
Therapeutische Bedeutung	Antiemese bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen: Setrone, wie Odansetron, Tropisetron und Ganisetron (5-HT_3-Antagonisten) Durchfall-betontes Reizdarmsyndrom: Setrone Obstipations-betonte Reizdarmsyndrom: Setrone cholestatischer Pruritus: Setrone Neuropathischer Schmerz: Setrone wirken analgetisch bei intravenöser Applikation entzündlichen Gelenkerkrankungen: Setrone Antiinflammatorisch: Setrone senken die Lipopolysaccharid-induizierte Sekretion des Zytokins Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) dosisabängig

Tabelle 4: 5-HT_3-Rezeptor

5-HT_3R: große Ausnahme, sowohl unter den Serotoninrezeptoren, als auch unter Mono- und Diamin-Neurotransmitterrezeptoren (292): Kationen-selektiver Ionenkanal (293). Teil der Cystein-Loop-Transmitter-gesteuerten Superfamilie Liganden-gesteuerter Ionenkanäle an, wie der nicotinerge Acetylcholinrezeptor, der anionenselektive $GABA_A$-Rezeptor und der Glycinrezeptor (292,294,295). Expression: ZNS (zentralen Nervensystem) (296), als auch im PNS (peripheren Nervensystem) prä- und postsynaptisch (135,297). ZNS (v.a. Hirnstammkerne, wie der spinale Trigeminuskern, Area postrema (und die darin gelegenen Chemorezeptortriggerzone = CTZ) und im Nucleus tractus solitarius.(298), außerdem Hippocampus, Amygdala, Nucleus caudatus und accumbens und Putamen (298). Funktion: Chemotherapeutika sorgen für die Ausschüttung von Serotonin aus enterochromaffinen Zellen im Duodenum. Das aktiviert primäre afferente Nerven, die im Brechzentrum des ZNS Übelkeit induzieren. Die Neurotransmission an diesen Nerven erfolgt über 5-HT_3-Rezeptoren, daher wirken die 5-HT_3-Antagonisten antiemetisch (299,300). Therapeutische Bedeutung: Antiemese bei Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Erbrechen: Setrone, wie Odansetron, Tropisetron und Ganisetron (5-HT_3-Antagonisten); Durchfall-betontes Reizdarmsyndrom:

Setrone (301,302); Obstipations-betonte Reizdarmsyndrom: Setrone (303); cholestatischer Pruritus: Setrone (304); Neuropathischer Schmerz: Setrone wirken analgetisch bei intravenöser Applikation (305); entzündlichen Gelenkerkrankungen: Setrone (306,307); Antiinflammatorisch: Setrone senken die Lipopolysaccharid-induizierte Sekretion des Zytokins Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) dosisabängig (308).

1.2.5 Serotonin bei Entzündungsreaktionen

Serotonin ist besonders bekannt für sein Mitwirken in der Pathogenese der weit verbreiteteten Erkrankung Depression, die nicht selten auch Komorbidität oder Nebenwirkung einer Therapie ist. Bei der durch IFNα-induzierten Depression der Hepatitis C Therapie zeigte sich, dass bestimmte Allele des 5-HT_{1A}-Rezeptortes in Verbindung mit bestimmten Allelen der Cathechol-O-Methyltransferase (COMT) vermutlich eine entscheidene Rolle spielen (309). Die Rolle der Inflammation bei der Pathogenese von Depressionen wird verstärkt diskutiert, seitdem in Invdividuen mit Depressionen elevierte Konzentrationen von proinflamatorischen Zytokinen wie TNFα und IL-6 nachgewiesen wurden (310). In Mäusen mit Stress-induziert depressivem Verhalten wurde im Serum eine erhöhte Konzentration von IL-1β und in den Hippocampi erhöhte Mengen des NLRP3-Inflammosoms gefunden. Durch die Behandlung dieser Mäuse mit einem Antagonisten des NLRP3-Inflammosoms reduzierte sich das stressbedingte depressive Verhalten und die IL-1ß Konzentration in Serum und Hippocampi entsprachen den Konzentrationen der Kontrollmäuse (311).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der 5-HT_{2A}-Rezeptor bei Aktivierung inhibierend auf TNFα-mediierte Entzündungsprozesse wirkt, welche z.B. bei der Alzheimer Erkrankung, rheumatoider Arthritis oder Psoriasis vorkommen (312).

2 Fragestellung und Ziel dieser Dissertationsarbeit

Kürzlich konnten Kleiner et al. zeigen, dass α-MSH die Oberflächenexpression von CD203c auf basophilen Granulozyten inhibiert (326). Schneider et al. hatten bereits herausgefunden, dass Serotonin die IL-4-Sekretion aus murinen basophilen Granulozyten verringert (99). Ziel meiner Dissertation war nun herauszufinden, ob Serotonin auch einen Einfluss auf die Degranulation humaner basophiler Granulozyten und somit auf Th2-Immunreaktionen hat. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf die IL-3- und IL-4-Sekretion aus basophilen Granulozyten gelegt werden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob Serotonin einen Einfluss auf die Apoptose basophiler Granulozyten hat.

Im weiteren Verlauf sollte sich der Antwort auf die Frage genähert werden, über welche Rezeptoren das Serotonin auf basophile Granulozyten wirkt, um herauszufinden, was eine mögliche Zielstrukur für einen therapeutischen Ansatz bei Th2-Immunreaktionen sein könnte.

3 Material und Methoden

3.1 Material, Geräte und Hilfsmittel

3.1.1 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	Firma
PBS		BIOCHROM
BSA		BIOCHROM
MACS-Puffer	autoMACS Rinsing Sol. + 0,5% MACS BSA Stock Sol.	Miltenyi Biotec
Elutriationspuffer	PBS + 0,1% BSA	BIOCHROM
Erythrozyten-Lysepuffer	0,1mM EDTA	Merck
	10mM $KHCO_3$	Sigma
	0,8% NH_4Cl	Sigma
Kimuralösung (25ml)	11 ml Toluidinblau (Stocklösung: 0.05%)	SERVA
	5 ml Phosphatpuffer A + B (Puffer A: 1/15 M Kaliumhydrogenphosphat, Puffer B: 1/15 M Di-Natriumhydrogenposphat)	Sigma
	0,8 ml Light Green (Stocklösung: 0,03%)	Sigma
	0,5 ml Saponin (In 50% Etanol gelöst)	Fluka (Sigma)
Ficoll/Percoll (Dichte 1,08)	500 ml Ficoll = Pancoll 30 ml Percoll	PAN Sigma
PBS/0,05% Tween	Tween 20 PBS	ROTH BIOCHROM

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Firma
RNAse Away	Molecular BioProducts
Nuclease-freies Wasser, DEPT-behandeltes Wasser	Invitrogen
PerfeCta® SYBR® Green Fast Mix	Quanta Bioscience

Tabelle 6: Chemikalien und Reagenzien

3.1.3 Zellkulturmedium

Hauptbestandteil	Zusätze	Firma
RPMI-1640-Medium		BIOCHROM
	5ml L-Glutamin (2mM)	BIOCHROM
	5ml Pen/Strep (2mM)	BIOCHROM
	5ml nicht essentielle Aminosäuren	BIOCHROM
	2,5ml Gentamicin	BIOCHROM
	50ml FCS (hitzeinaktiviert, Endkonz. 10%)	Gibco

Tabelle 7: Zellkulturmedium

3.1.4 Zytokine und Stimuli

Zytokine/ Stimulus	Firma
Anti-Human IgE (ε-Ketten spezifisch)	Sigma
fMLP (formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin)	Sigma
Serotonin hydrochlorid	Sigma
rh IL-3	R&D Systems
Dexamethason	Sigma
5-CT (5-Carboxamidotryptamin maleat)	Tocris
SR 57227 hydrochloride (5H3 Agonist)	Tocris

CP 94253 (5HT1B Agonist)	Tocris

Tabelle 8: Zytokine und Stimuli

3.1.5 Antikörper/ Isotypen

Antikörper	Klon	Isotyp	Firma
Maus anti-Human CD203c PE	NP4D6	IgG1, κ	eBioscience
Maus Anti-Human CD63 FITC	H5C6	IgG_1, κ	BD Pharmingen
Anti-Human FcεReceptor I α APC	AER-37	IgG2b, κ	eBioscience
Anti-Human CD123 PE/Cy5	9F5	IgG_{2b}, κ	BD Pharmingen

Tabelle 9: Antikörper/ Isotypen

3.1.6 Primer

Primer	Sequenz 5`-> 3`	Firma
hHTR2A* _For	GCAAGCTTTGTGCAGTCTGG	Sigma Aldrich
hHTR2A* _Rev	ATGGGATTCTGGATGGCGAC	Sigma Aldrich
hHTR3A* _For	GGAGAGAATCGCCTGGCTAC	Sigma Aldrich
hHTR3A* _Rev	ATCAGTCTTGGTGGCTTGGG	Sigma Aldrich
hHTR1A_For	GGCAACAACACCACATCACC	Sigma Aldrich
hHTR1A_Rev	GACGGTCACGTCGGAGATAC	Sigma Aldrich
hHTR1B_For	TGGTGAACACCGACCACATC	Sigma Aldrich
hHTR1B_Rev	GTAGATGCGGCCATAGAGGG	Sigma Aldrich
hHTR6_For	AGCCTGCCTTTTGTCCTTGT	Sigma Aldrich
hHTR6_Rev	AGGTGAAGCATATGGCACCC	Sigma Aldrich
hHTR5A_For	GACCGCTACTGGTCCATCAC	Sigma Aldrich
hHTR5A_Rev	ATGACGTTGGAGACGCACTT	Sigma Aldrich
hHTR4* _for	CAACAAGCCCTACGCCATCA	Sigma Aldrich
hHTR4* _rev	CGGTAATAGGCCAGCACCAT	Sigma Aldrich

hHTR7* _for	TCTCGTGCTCTGAAGGGTCT	Sigma Aldrich
hHTR7* _rev	AACGCAGTTGGGTACCACTT	Sigma Aldrich
hOCT3_For	CTTCCAGAGGCGCGTGTTTT	Sigma Aldrich
hOCT3_Rev	CACGCCGACGAAGAGGAAG	Sigma Aldrich
hβ-Actin_For	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	Sigma Aldrich
hβ-Actin_Rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	Sigma Aldrich
hPPIB_For	CTCTTCCGGCCTCAGCTGTC	Sigma Aldrich
hPPIB_Rev	ACCTTCATGTTGCGTTCGGA	Sigma Aldrich
hRPL0_For	GTTGCTGGCCAATAAGGTGC	Sigma Aldrich
hRPL0_Rev	AAAAGGAGGTCTTCTCGGGC	Sigma Aldrich

Tabelle 10: Primer/Sonden

3.1.7 Kits

Kit:	**Firma**
Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen
EasySep Negative Selection Human Basopil Enrichment Kit	StemCell
Human IL-4 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience
Human IL-3 ELISA Development Kit	Peprotech
RNEasy Micro Kit	Qiagen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen

Tabelle 11: Kits

3.1.8 Geräte und Hilfsmittel

Material/Gerät	**Firma**
50ml/ 15ml Röhrchen	Greiner
Agitateur Top-Mix 11118	Bioblock Scientific
Biofuge 15R	Heraeus
EasySep magnet	StemCell

Elutriationsfuge Avanti-J-25	Beckman
Eppendorf Multipette	Eppendorf
Eppendorf Research Pipette (0,5-10µl/10-100µl/100-1000µl)	Eppendorf
Eppendorf Tips Pipettenspitzen (0,5-10µl/10-100µl/100-1000µl)	Eppendorf
FACS Röhrchen, 5ml, 75x12mm, PS	Sarstedt
FACSCalibur	Becton Dickinson
FLUOstar Optima Microplate Reader	BMG Labtech
Gefrierschrank	Liebherr
Heamacytometer Deckgläschen	Assistent
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop	Carl Zeiss
LightCycler 480	Roche
MACS LS-Columns	StemCell
Megafuge 1.0R	Heraeus
MicroAmp TM Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 ml	Applied Biosystems
Mikrowelle	TEC
Model 200/2.0 Power Supply	Sarstedt
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
NuAire Class II, Biological Safety Cabinet	Integra Biosciences
Pipetboy acu	Integra Biosciences
Plattenwaschgerät Elx50	Biotek
Reaktionsgefäße (0,5ml/ 1,5ml/ 2,0ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (5ml/10ml/25ml)	Sarstedt
Tiefkühlschrank -80°C	GFL
Vakuumpumpe mniport W73 KN.18	KFN Neuberger
Waage Europe 500	Gibertini

Tabelle 12: Geräte und Hilfsmittel

3.1.9 Software

Software	Firma
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Cell Quest Pro	Becton Dickinson
Graph Pad Prism	Graph Pad Software Inc.

Tabelle 13: Software

3.2 Methoden

3.2.1 Blutspender

Für die Untersuchungen von basophilen Granulozyten wurden zwei verschiedene Bezugsquellen für Blutproben genutzt. Zum einen wurden von Spendern mit bekanntem Phänotyp Vollblutproben in Lithium-Heparin-Monovetten entnommen und zum anderen wurden - zur Isolation basophiler Granulozyten - Leukozytenreduktionsfilter nach Thrombozytenapharese von anonymen Spendern verwendet, deren Phänotyp daher unbekannt ist.

3.2.2 Basophil Activation Test (BAT)

Für den Basophilen-Aktivierungstest (BAT) wurde Vollblut aus Lithium-Heparin-Monovetten verwendet, welches nicht älter als 24 Stunden war.

Zu Beginn wurden 100 µl Vollblut in ein FACS Röhrchen mit 20 µl rh IL-3 (Endkonzentration 2 ng/mL) vermischt. Dieser Ansatz wurde für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Serotonin oder PBS vorstimuliert, um dann die basophilen Granulozyten mit human a-IgE (Endkonzentration 100 ng/ml) zu aktivieren. Beide Inkubationen erfolgten für 20 Minuten bei 37°C.

Der Dosis – Wirkungansatz wurde wie folgt durchgeführt:

1. Negativ-Kontrolle: PBS
2. Positiv-Kontrolle: a-IgE
3. 5-HT (10 µM)
4. 5-HT (0,1 µM) + a-IgE
5. 5-HT (1 µM) + a-IgE
6. 5-HT (10 µM) + a-IgE
7. 5-HT (50 µM) + a-IgE
8. 5-HT (100 µM) + a-IgE

Um die Degranulation anzuhalten, wurden die Proben für fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Daraufhin erfolgte die Färbung für die anschließende Durchflusszytometrie. Nach kurzem Vermischen der Proben mit dem Antikörpermix, wurden diese für 20 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von je 2ml Erythrozyten-Lysepuffer. Nach einer Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz bei 250 xg für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Überstände dekantiert, die Pellets mit 2ml PBS gewaschen und erneut bei 250 xg für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Zellen in 150 µl Waschpuffer aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer gemessen.

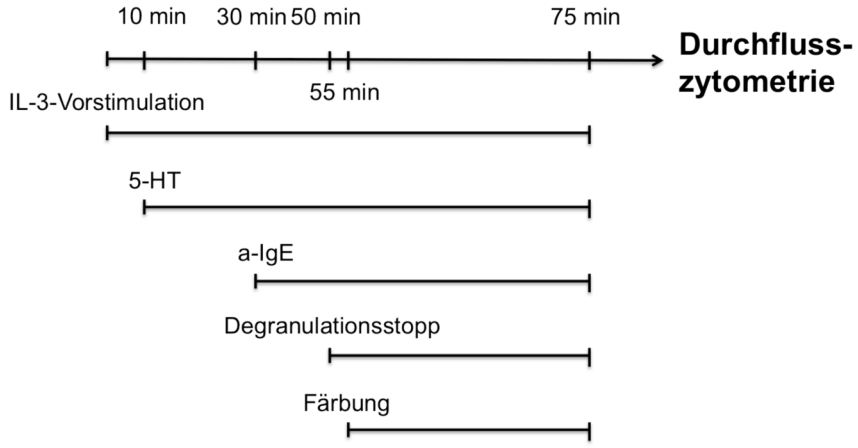

Abbildung 9: Schematischer Ablauf des Protokolls für den Basophilen Aktivierungstest

3.2.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen auf die Expression bestimmter Oberflächenmarker und intrazellulären Proteinen untersucht werden.

Der durch den Überdruck erzeugte laminare Zellstrom wird durch die Anregung von monochromatischem Laserlicht analysiert. Dies geschieht im sogenannten Analysepunkt, durch den zwei Laserstrahlen gehen. Mit dem Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter = FSC) kann die Zellgröße und mit dem Seitwärtsstreulicht (engl. Sideward scatter = SSC) die Granularität der Zelle bestimmt werden. Je nach Zahl der Einschlüsse und Oberflächenunebenheiten der Zelle, streut der SSC stärker und Zellen können anhand dieser Merkmale unterschieden werden.

Da die Größe und Granularität von basophilen Granulozyten bekannt ist, konnte im Vorwärtsstreulicht und im Seitwärtstreulicht eine Population markiert werden, die neben anderen Zellen die basophilen Granulozyten enthält.

Anschließend wurde aus dieser Population mit Hilfe spezifischer Marker die basophilen Granulozyten identifiziert und die Quantität der zu untersuchenden Oberflächenmarker analysiert.

Die Expression von Oberflächenantigenen kann durch Fluoreszenzmarkierung der Antikörper nachgewiesen werden. Der Fluoreszenzfarbstoff gebundener Antikörper wird durch den Laser angeregt und das ausgesendete Licht wird dann von Photodetektoren erfasst.

Farbstoff	Anregungslicht	Emission
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	488 nm	519 nm
Phycoerythrin (PE)	488 nm	575 nm
Allophycocyanin (APC)	633 nm	660 nm
Phycoerytrin/ cyanine dye label 5 (PE/Cy5)	488 nm, 532 nm	564 nm

Tabelle 14: In der Durchflusszytometrie verwendete Farben

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an dem Gerät FACSCalibur der

Firma Becton Dickinson. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte über die Software CellQuestPro.

3.2.4 Isolation basophiler Granulozyten aus Leukozytenfilmen

2.2.4.1 Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Aufschichtung des Leukozytenfilm-Blutes auf ein Ficoll/Percoll-Gemisch erfolgte unter sterilen Bedingungen, ebenso die Abnahme der Interpasen im Anschluss.

Zunächst wurde das Blut eines Spenders im Verhältnis 1:10 mit PBS gemischt und anschließend vorsichtig auf 15 ml Ficoll/Percoll - Gemisch in einem 50 ml Plastikgefäß geschichtet. Der Gradient wurde bei 500 xg für 25 Minuten bei 4°C mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation konnte die zwischen der Ficolle/ Percoll- und Serum/PBS Phase befindlichen Interpase, in der sich die PBMC's (= Peripheral Blood Mononuclear Cells) und basophilen Granulozyten befinden, mit Hilfe eine Pasteurpipette abgenommen werden. Die im Pellet sich befindenden Erythrozyten und der sich in der Ficoll/Percoll-Phase befindlichen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurden verworfen. Alle Interphasen eines Spenders wurden in einem neuen 50ml Plastikgefäß zusammengeführt und bei 535 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände dekantiert, die Pellets in 50ml PBS resuspendiert und erneut bei 535 xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und das Zellgemisch für die Elutriation luftblasenfrei in eine 10 ml Spritze aufgezogen.

2.2.4.2 Elutriation

Die Gegenstrom-Elutriation (CCE = Counterflow Centrifugal Elutriation) ermöglicht die genaue Auftrennung von Zellen nach Größe und Sedimentationseigenschaft ohne die Zellen unnötig großem Stress auszusetzen, wie es bei der Verwendung von Gradienten oder Sedimentation der Fall wäre.

Das Prinzip beruht auf dem ständigen Kräftegleichgewicht zwischen Zentrifugalkaft und Flüssigkeitsstrom in der Kammer, wodurch die Zellen sich ihrer Größe und

ihrem Gewicht nach verteilen können. Diese unterschiedlichen Zellpopulationen bilden Zonen innerhalb der Kammer und werden durch sukzessive Erhöhung des Flüssigkeitsstroms oder der Zentrifugationsgeschwindigkeit der Größe nach herausgespült, da nun das Gleichgewicht zugunsten des Flüssigkeitsstroms verschoben wird. Die kleinsten Zellen werden zuerst herausgespült. Die Elutriation zur Isolierung unserer Zellen erfolgte bei gleichbleibender Zentrigualgeschwindigkeit (3500 rpm, Rotor JE6b).

Die Zellsuspension wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min mit einer Spritze über einen Dreiwegehahn in eine Füllkammer eingespeist, die über ein Schlauchsystem mit Elutriationspuffer (PBS und 0,1% MACS BSA) durchströmt wurde. Sobald die Flüssigkeit in der Füllkammer klar war, wurde die Durchflussrate auf 30 ml/min erhöht und ab diesem Zeitpunkt der Flüssigkeitsstand im Auffangbehältnis beobachtet. Sobald 200ml aufgefangen worden waren, wurde die Durchflussrate auf 35 ml/min erhöht. Nachdem der Flüssigkeitsstand um weitere 300 ml gestiegen war, wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/min die ersten 100 ml in 50ml Plastikgefäßen aufgefangen, weitere 100 ml wurden schließlich bei der Stromstärke 45ml/min aufgefangen. Die aufgefangene Zellsuspension wurde danach bei 400 xg und 4°C für sechs Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert, die Pellets gesammelt und mit PBS gewaschen und erneut bei 353 xg und 4°C für sechs Minuten in eine Zentrifuge gegeben. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1ml Waschpuffer aufgenommen und 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Kimura - Lösung vermischt. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde unter einem Lichtmikroskop die Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil an basophilen Granulozyten des Zell-PBS-Kimura-Gemisch ermittelt.

2.2.4.3 Magnetische Isolation

Bei der verwendeten Methode handelte es sich um eine negative Selektion. Diejenigen Zellen, die nicht zur Weiterarbeit verwendet werden sollten (in diesem Falle alle außer basophilen Granulozyten), wurden magnetisch markiert. Sie wurden dadurch in einem magnetischen System festgehalten, während alle nicht-markierten Zellen herausgespült und aufgefangen werden konnten.

Zu der Zellsuspension (Kapitel 2.2.4.2) wurden 50 µl Basophil Enrichment Cocktail

pro 5 x 10^7 Zellen hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Basophil Enrichment Cocktail enthielt mehrere bispezifische monoklonale Antikörper (TACs = Tetrameric Antibody Complexes), die Oberflächenantigene auf humanen hämatopoetischen Zellen, namentlich CD2, CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD24, CD34, CD36, CD45RA, CD56 und Glycophorin A, ebenso wie Dextran binden. Danach wurden 100 µl/ 5 x 10^7 Zellen magnetisch markierte Nanopartikel, welche an die TAC's binden, hinzugegeben und ebenfalls für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit MACS-Puffer auf 5 ml aufgefüllt, in ein Röhrchen überführt, das sich in einem EasySep-Magneten befand, und darin für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension vorsichtig aus dem Röhrchen mithilfe einer Pasteurpipette entnommen und weiter mit einer in einem MACS-Magneten befindliche MACS-Säule aufgereinigt. Das sich im EasySep-Magneten befindliche Röhrchen wurde zweimal gewaschen und diese Supension ebefalls auf die MACS-Säule gegeben. Anschließend wurden die MACS-Säulen zwei Mal mit MACS-Puffer gespült. Der gesamte Durchfluss der MACS-Säulen, in dem die Zellen sind, wurde aufgefangen und für sechs Minuten mit 353 xg bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1ml Kulturmedium aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 10 µl mit 90 µl Kimura – Lösung vermischt und das gefärbte Zellgemisch in einer Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop auf Zellpopulationsgröße und mittels Durchflusszytometrie auf Reinheit überprüft.

2.2.4.4 Zellkultur

Bei ausreichender Reinheit wurden die Zellen in Kultur gegeben und stimuliert. Folgende Ansätze wurden durchgeführt:

1. Negativ-Kontrolle: Medium
2. Positiv-Kontrolle: a-IgE (100 ng/ml)
3. 5-HT (0,1 µM)
4. 5-HT (1 µM)
5. 5-HT (10 µM)
6. 5-HT (50 µM)
7. 5-HT (100 µM)
8. 5-HT (0,1 µM) + a-IgE (100 ng/ml)
9. 5-HT (1 µM) + a-IgE (100 ng/ml)
10. 5-HT (10 µM) + a-IgE (100 ng/ml)
11. 5-HT (50 µM) + a-IgE (100 ng/ml)
12. 5-HT (100 µM) + a-IgE (100 ng/ml)
13. Dexamethason (1 µM)
14. IL-3 (10 ng/ml)

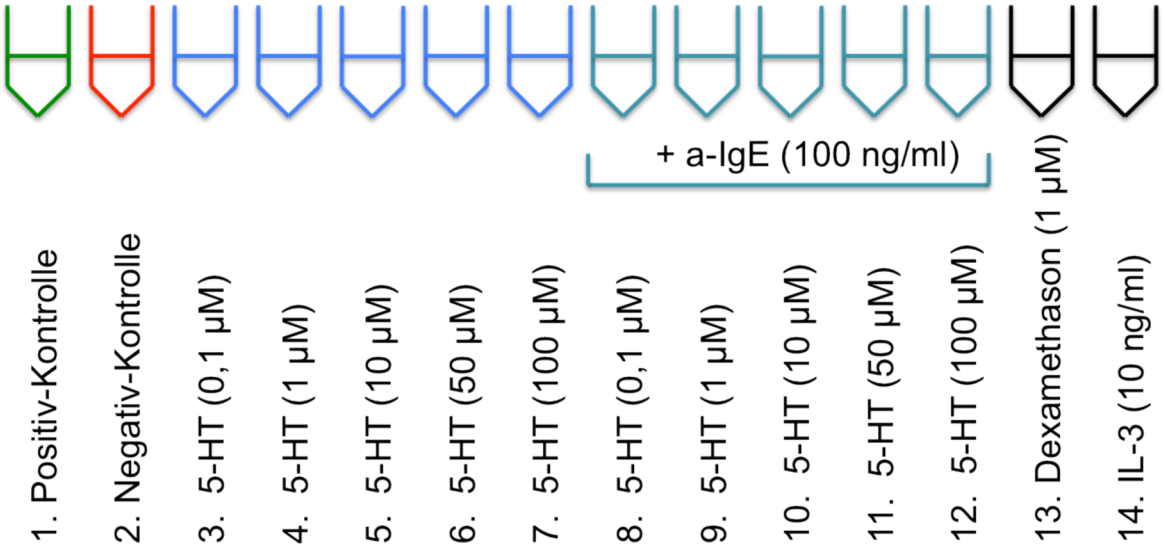

Abbildung 10: Zellkultur-Ansatz

1.Negativ-Kontrolle: Medium, 2. Positiv-Kontrolle: a-IgE (100 ng/ml), 3. 5-HT (0,1 µM), 4. 5-HT (1 µM), 5. 5-HT (10 µM), 6. 5-HT (50 µM), 7. 5-HT (100 µM), 8. 5-HT (0,1 µM) + a-IgE (100 ng/ml), 9. 5-HT (1µM) + a-IgE (100 ng/ml), 10. 5-HT (10 µM) + a-IgE (100 ng/ml), 11. 5-HT (50 µM) + a-IgE (100 ng/ml), 12. 5-HT (100 µM) + a-IgE (100 ng/ml), 13. Dexamethason (1 µM), 14. IL-3 (10 ng/ml). (Quelle: Template: http://www.cellsignet.com/media/templ.html)

Zunächst wurden die basophilen Granulozyten für 20 Minuten bei 37°C mit Serotonin vorstimuliert und anschließend für 24 Stunden (21 Stunden für Apoptose-Nekrose-Tests) bei 37°C mit a-IgE aktiviert.

3.2.5 Apoptose-Nekrose-Test

Nach 21 Stunden Kultivierung wurde die basophilen Granulozyten in einer 96 Loch Platte bei 353 xg bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert und die Pellets zwei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in je 100 µl Annexin V 1 x Binding Buffer pro Loch aufgenommen. Direkt danach wurden je 5 µl FITC-markiertes Annexin V und 10 µl Propidiumiodid pro Loch hinzugefügt und das Ganze bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 200 µl Annexin Binding Puffer wurden die basophilen Granulozyten sofort am FACS-Gerät analsyiert.

3.2.6 ELISA (= enzyme-linked immunosorbent assay)

Bei dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay, kurz ELISA, handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem durch eine enzymatische Farbreaktion Proteine, Toxine, Hormone und dergleichen aus beispielsweise Blutserum oder Urin nachgewiesen werden können. Das nachzuweisende Antigen bindet an einen in einer Mikrotiterplatte adsorptiv gebundenen Erstantikörper und wird darüber angereichert. Im Folgenden werden weitere spezifische, mit einem Enzym markierte, Antikörper hinzugegeben, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. Ein enzymspezifisches Substrat wird hinzugegeben und die dadurch katalysierte Reaktion bewirkt einen Farbumschlag. Mit einem Photometer kann die optische Dichte der Lösung nach dem Farbumschlag gemessen und somit das Antigen quantitativ bestimmt werden.

Als Analysat wurden die zuvor bei -80°C gelagerten Zellkulturüberstände der Basophilen genommen. Dabei handelte es sich um den Ansatz in Abb. 9.

Es wurden die Konzentration der folgende Zytokine per ELISA gemessen:

- IL-3
- IL-4

Bei dieser Messung wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA genutzt, in dem nach

der Adsorption des Fängerantikörper das Analysat und schließlich ein Detektionsantikörper in die 96-Loch-Platte aufgetragen wird, und das Analysat also zwischen zwei Antikörpern liegt.

IL-3- und IL-4-ELISA

Bei beiden ELISA's wurden die Waschschritte fünfmal mit 0,05% Tween (Sigma) versetztem PBS mit Hilfe eines Plattenwaschgerätes (Elx50 Biotek) durchgeführt.

Die Standardreihen sahen wie folgt aus:

Standardreihen	IL-4	IL-3
1.	200 pg/ml	4000 pg/ml
2.	100 pg/ml	2000 pg/ml
3.	50 pg/ml	1000 pg/ml
4.	25 pg/ml	500 pg/ml
5.	12,5 pg/ml	250 pg/ml
6.	6,25 pg/ml	125 pg/ml
7.	3,1 pg/ml	72,5 pg/ml
8.	nur Reagenzlösung als Nullkontrolle	

Tabelle 15: ELISA: Standardreihen

Die in PBS gelösten Fängerantikörper (entsprechend den Angaben des Herstellers) wurden zu je 100 µl in die Einbuchtungen der Platte pipettiert. Die Platte wurde dann über Nacht bei 4°C gelagert. Nach dem Waschen der Platte wurden die freien Bindungsstellen mit 300 µl Blockpuffer pro Einbuchtung durch eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur blockiert. Vor Zugabe der Standards und Analysaten wurde ein weiterer Waschschritt vorgeschaltet.

Nun wurden 100 µl Standards bzw. Analysat auf die Einbuchtungen der 96-Loch-Platte verteilt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem erneuten Waschschritt wurde 100 µl Detektionsantikörper pro Einbuchtung hinzugefügt, welcher entsprechend der Angaben des Herstellers gelöst wurde. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte gewaschen und 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, in die einzelnen Einbuchtungen der Platte pipettiert. Die Bindung von Strepativin-HRP erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Nach einem Waschschritt, erfolgte die Zugabe von 100 µl Substratlösung, mit der die von der Meerrettichperoxidase katalysierte Reaktion gestartet werden konnte. Der Umsatz des Substrats bewirkte einen Farbumschlag ins Blaue, wobei die

Farbintensität einen Hinweis auf die Konzentration des nachzuweisenden Antigens in der jeweiligen Probe gibt. Nach 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 50 µl 2N H_2SO_4 (Sigma) gestoppt, was einen gelben Farbumschlag bewirkte. Anschließend wurde die optische Dichte im FLUOstar Optima (BMG Labtech) bei 450 nm photometrisch gemessen.

3.2.7 RNA-Extraktion

Alle Zentrifugationschritte, solange nicht anders erwähnt, erfolgten für 15 Sekunden bei 8000 xg.

Zu Beginn wurden 150 µl RLT Puffer zu 5 x 10^5 basophilen Granulozyten gegeben, sowie dieselbe Menge Ethanol (70%). Die Suspension wurde in einen RNEasy MinElute Säule gegeben und zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 350 µl RW-1 Puffer gespült und zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugationen wurden die Durchflüsse verworfen.

Als nächstes erfolgte ein DNAse-Verdau, wofür ein Mix aus 10 µl DNAse-1 Stocklösung und 70 µl RDD Puffer auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Darauf folgte ein weiterer Waschschritt mit 350 µl RW-1 Puffer und anschließender Zentrifugation, sowie ein Waschschritt mit 500 µl RPE-Puffer. Nach Verwerfen des Durchflusses erfolgte die Zugabe von 500 µl Ethanol (80%) auf die Säule mit anschließender Zentrifugation.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zum Trocknen der Säule wurde diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Eluierung der RNA wurden 22 µl RNAse-freies Wasser auf die Membran der Säule pipettiert und die Säule für eine Minute bei 13000 xg zentrifugiert.

Die Konzenration der RNA im Eluats wurde mit Hilfe des Nanodrops gemessen. Die Proben, deren Absorptionsquotient (OD260/OD280) > 1,9 war, wurden für die cDNA Synthese verwendet.

3.2.8 Umschreibung der RNA in cDNA

Für die PCR wurde die RNA mit Hilfe des QuantiTect® reverse Transkriptions Kit in cDNA umgeschrieben.

Hierfür wurden 1 µg RNA mit 4 µl qScript Reaktionsmix, 1 µl qScript reverse Transkriptase versetzt und mit Nuklease freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20

µl aufgefüllt. Die cDNA Synthese erfolgte für 30 Minuten bei 42°C und wurde durch eine Hitzeinaktivierung bei 85 °C für fünf Minuten beendet.

Bis zum weiteren Einsatz erfolgte die Lagerung der Proben bei – 80 °C.

3.2.9 RTqPCR (= real time quantitative polymerase chain reaction)

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 25 µl. Dieses beinhaltete 2 µl cDNA (1:10 verdünnt), 400 nM jedes Primers, 12,5 µl PerfeCta® SYBR® Green Fast Mix (Quanta Bioscience) und Nuklease-freies Wasser. Alle Proben wurden in Douplets gemessen. Als Referenzgen wurden β-Actin, PPIB und RPL0 verwendet.

Die qPCR und die Schmelzkurve wurden im LightCycler 480 (Roche) durchgeführt:

1.) Zyklen	1	Modus	Hitzeaktivierung	
Ziel (°C)	Aufnahmemodus	Dauer (hh:mm:ss)	Ram Rate (°C/s)	Aufnahmen
95	keiner	00:05:00	4.4	(pro °C)
2.) Zyklen	40	Analyse	Quantifizierung	
Ziel (°C)	Aufnahmemodus	Dauer (hh:mm:ss)	Ram Rate (°C/s)	Aufnahmen
95	keiner	00:00:10	4.4	(pro °C)
55	keiner	00:00:10	2.2	
72	einfach	00:00:10	4.4	
3.) Zyklen	1	Analyse	Schmelzkurven	
Ziel (°C)	Aufnahmemodus	Dauer (hh:mm:ss)	Ram Rate (°C/s)	Aufnahmen
95	keiner	00:00:05	4.4	(pro °C)
65	keiner	00:01:00	2.2	
97	kontinuierlich		0.11	5
4.) Zyklen	1	Modus	Abkühlung	
Ziel (°C)	Aufnahmemodus	Dauer (hh:mm:ss)	Ram Rate (°C/s)	Aufnahmen
40	keiner	00:00:30	2.2	(pro °C)

Tabelle 16: PCR LightCycler Programm

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Serotonin auf die Expression basophiler Oberflächenmarker

4.1.1 Identifizierung der basophilen Granulozyten im Vollblut

1. Granulariät versus Größe der Zellen im Vollblut

Mit Hilfe von Punktwolkendiagrammen, in denen Zellen entsprechend ihre Größe (Vorwärtstreulicht, FSC, x-Achse) und Granularität (Seitwärststreulicht, SSC, y-Achse) als Punkte dargestellt werden können, ist es möglich, die einzelnen Zellpopulationen des Blutes zu identifizieren. Basophile Granulozyten weisen bei unseren Einstellungen eine Granularität von ca. 100 – 300 und eine Größe von 200 – 500 auf und befinden sich in der derselben Region wie Lymphozyten. Durch eine Markierung dieser Zellpopulation (Abb.11) können in dieser Population befindlichen Zellen weiter analysiert werden.

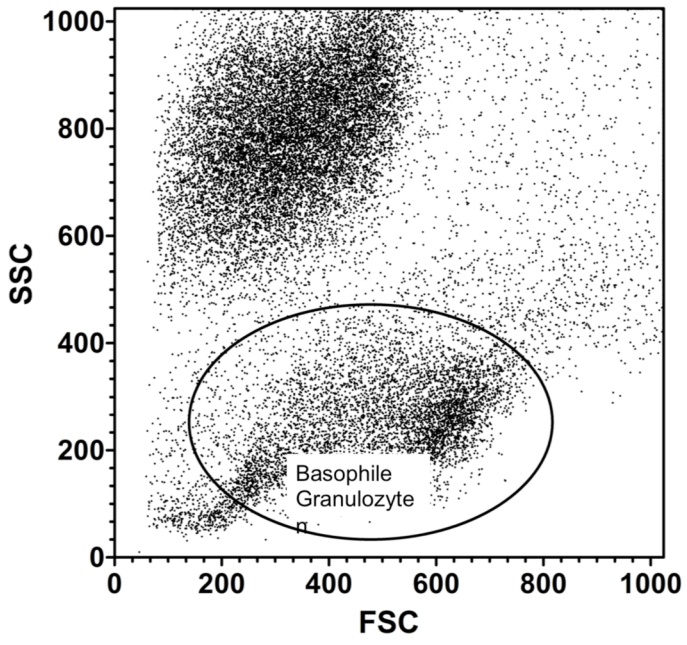

Abbildung 11: Punktwolkendiagramm der peripheren Blutzellen

Vollblutbild: Bestimmung der Zellpopulation nach Größe (gemessen im Vorwärtsstreulicht (FSC)) und Granularität (gemessen im Seitwärtsstreulicht (SSC)), Markierung liegt auf der Lymphozytenpopulation, in der sich ebenfalls die Basophilenpopulation befindet.

2. Identifizierung der basophilen Granulozyten aus Vollblut

Die im Puntkwolkendiagramm im Abschnitt 1 markierte Zellpopulation wurde im Folgenden auf die Expression des Oberflächenproteins CD123 untersucht, welches von basophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert wird (313). Dabei wurde die Fluoreszenzeintensität von CD123 auf der y-Achse und die Granularität (SSC) auf der x-Achse aufgetragen. Zellen mit einer starken CD123 Fluoreszenzintensität und der entsprechenden Granularität (100 – 300) wurden weiter analysiert.

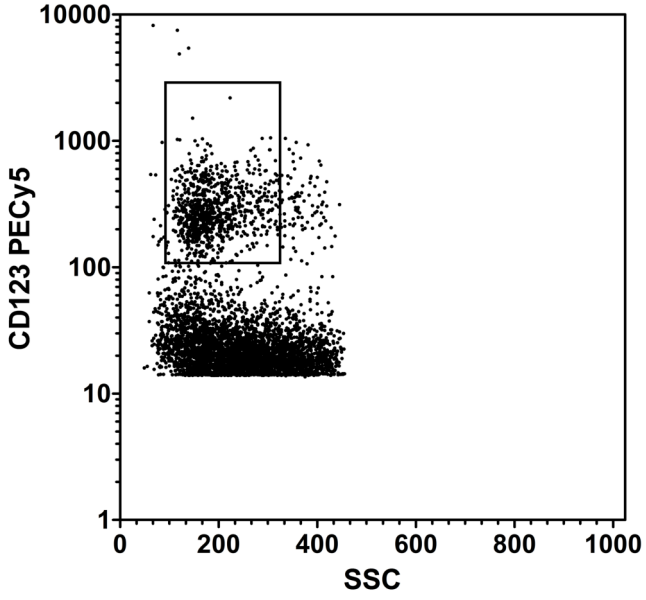

Abbildung 12: Punktwolkendiagramm der peripheren Blutzellen Ansteuerungsschritt 2

Gate 1: CD123/ SSC: Markierung der CD123-positiven Population (basophile Granulozyten und dendritische Zellen) mit einer Granularität (SSC) von 100-500 (nur basophile Granulozyten)

Die im oben beschriebenen Puntkwolkendiagramm (Abb. 12) markierte Zellpopulation wurde weiter auf die Expression des Oberflächenproteins und Aktivierungsmarkers basophiler Granulozyten, CD203c, und des Rezeptors FcεRI untersucht. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von FcεRI auf der y-Achse und von CD203c auf der x-Achse aufgetragen und die für beide Obeflächenmarker positive Zellpopulation markiert. Mit dieser Strategie konnten basophile Granulozyten angesteuert werden, da nur basophile Granulozyten im peripheren Blut sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustande CD203c auf der Zelloberfläche präsentieren (56).

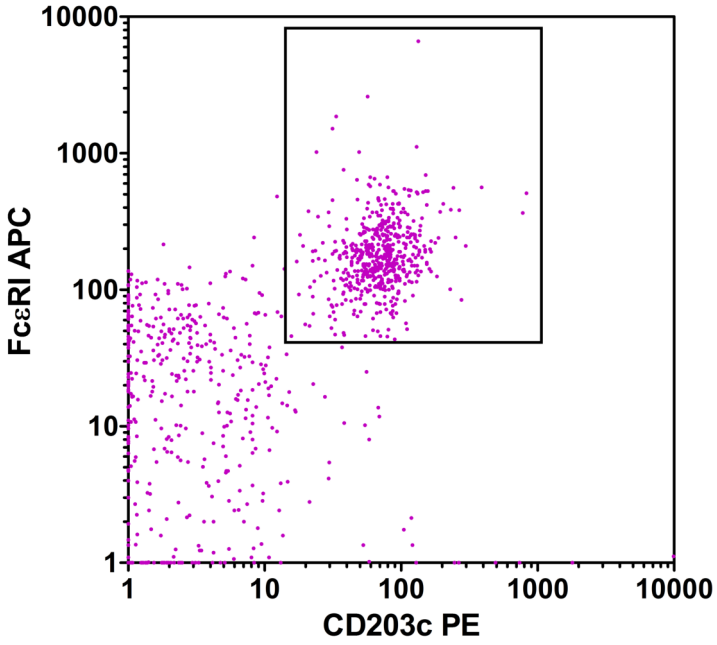

Abbildung 13: zweiter Gating-Schritt

Gate 1: anti-IgE/ CD203c: Markierung um die FcεR1- und CD203c-positive Population (ausschließlich Basophilenpopulation)

4.1.2 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - Der Oberflächenmarker CD63

Schneider *et al.* haben 2011 an murinen basophilen Granulozyten gezeigt, dass die Behandlung von basophilen Granulozyten mit 5-HT zu einer Verringerung der IL-4 Produktion führt (99). Um zu untersuchen, ob Serotonin einen Einfluss auf die klassische IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion hat, wurde die Exponierung des Degranulationsmarkers CD63 der FcεR1α^+/ CD203c$^+$ basophilen Granulozytenpopulation (Abb. 13) ermittelt.

Dafür wurden die Zellen im Vollblut mit IL-3 vorstimuliert, für 20 Minuten mit Serotonin behandelt und anschließend erfolgte die Aktivierung der basophilen Granulozyten mit anti-IgE.

Die Analyse der CD63 Expression auf basophilen Granulozyten zeigte keine Regulierung des Markers nach Stimulierung mit 10 µM 5-HT(Abb. 14). Die Stimulation mit anti-IgE, im Vergleich zu unstimulierten basophilen Granulozyten, führte zu einer signifikant erhöhten Expression des Transmembranproteins (Abb. 14,

p < 0,001).

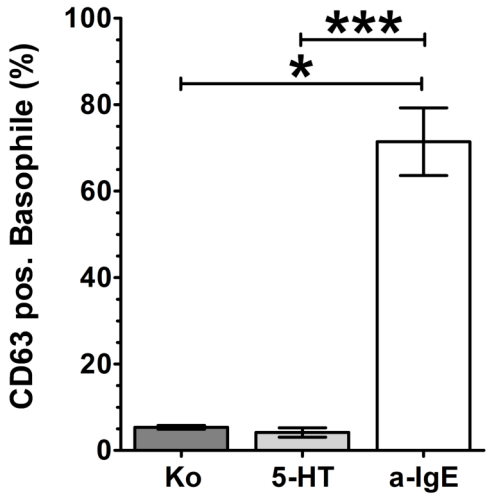

Abbildung 14:CD63-Expression nach Stimulierung mit 5-HT oder anti-IgE

Die mit IL-3 (2 ng/ml) vorstimuliertern Zellen des Vollblutes wurden mit 5HT (10 µM) bzw. mit a-IgE (100 ng/ml) für je 20 Minuten inkubiert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden $Fc_{\varepsilon}R1\alpha^{+}$/ $CD203c^{+}$ basophilen Granulozyten auf ihre CD63 Expression untersucht. Ko: Kontrolle (Medium) a-IgE: anti-IgE, * p < 0,05; *** p<0,001 Kruskal Wallis Statistik 17.78, p = 0,0001

Folgend untersuchten wir, ob durch die Kostimulation mit 5-HT in unterschiedlichen Konzentrationen die Degranulation von anti-IgE-stimulierten basophilen Granulozyten beeinflusst wird.

Durch die Vorstimulierung mit 1 µM (p < 0,05) und 50 µM (p < 0,05) 5-HT konnte eine signifikante schwächere Expression von CD63 bei den anti-IgE aktivierten basophilen Granulozyten beobachtet werden (Abb. 14A). Bei der Analyse der mittleren Floureszenzintensität von CD63 zeigt sich bei den mit 5-HT vorbehandelten basophilen Granulozyten eine geringere Dichte des CD63 auf der Zelloberfläche (Abb.14B).

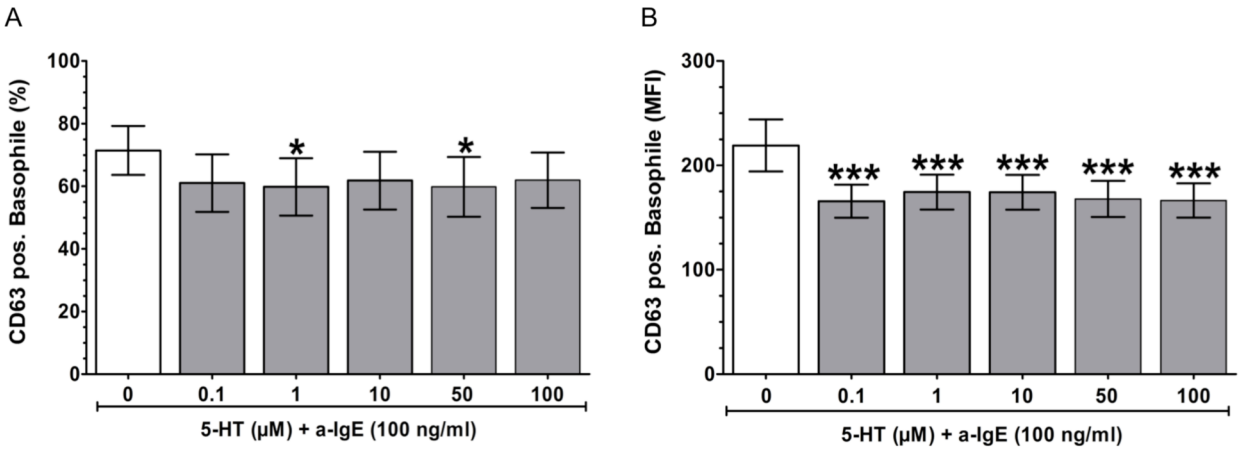

Abbildung 15: CD63-Expression nach Vorstimulierung mit 5-HT und Folgestimulierung mit a-IgE

Die im Vollblut befindlichen mit IL-3 behandelten basophile Granulozyten wurden mit verschieden Konzentration 5-HT stimuliert und anschließend mit a-IgE aktiviert. Nach dem Stopp der Degranulation wurde die CD63 Expression der basophilen Granulozuyten in der Durchflusszytometrie analysiert. A: %: * $p < 0.05$; Friedman Statistik: 13.36, $p = 0{,}0203$, B: MFI (mittlere Fluorezenzintensität): * $p < 0{,}05$; *** $p < 0{,}001$; repeated measures ANOVA: $F_{(5,47)} = 12.26$, $p < 0.001$

Die verstärkte Expression von CD63 durch die Stimulierung mit anti-IgE und die durch Serotonin bedingte verringerte Expression von CD63 in a-IgE stimulierten basophilen Granulozyten sind deutlich in der Histogramm-Statistik der Durchflusszytometrie zu sehen (Abb.15)

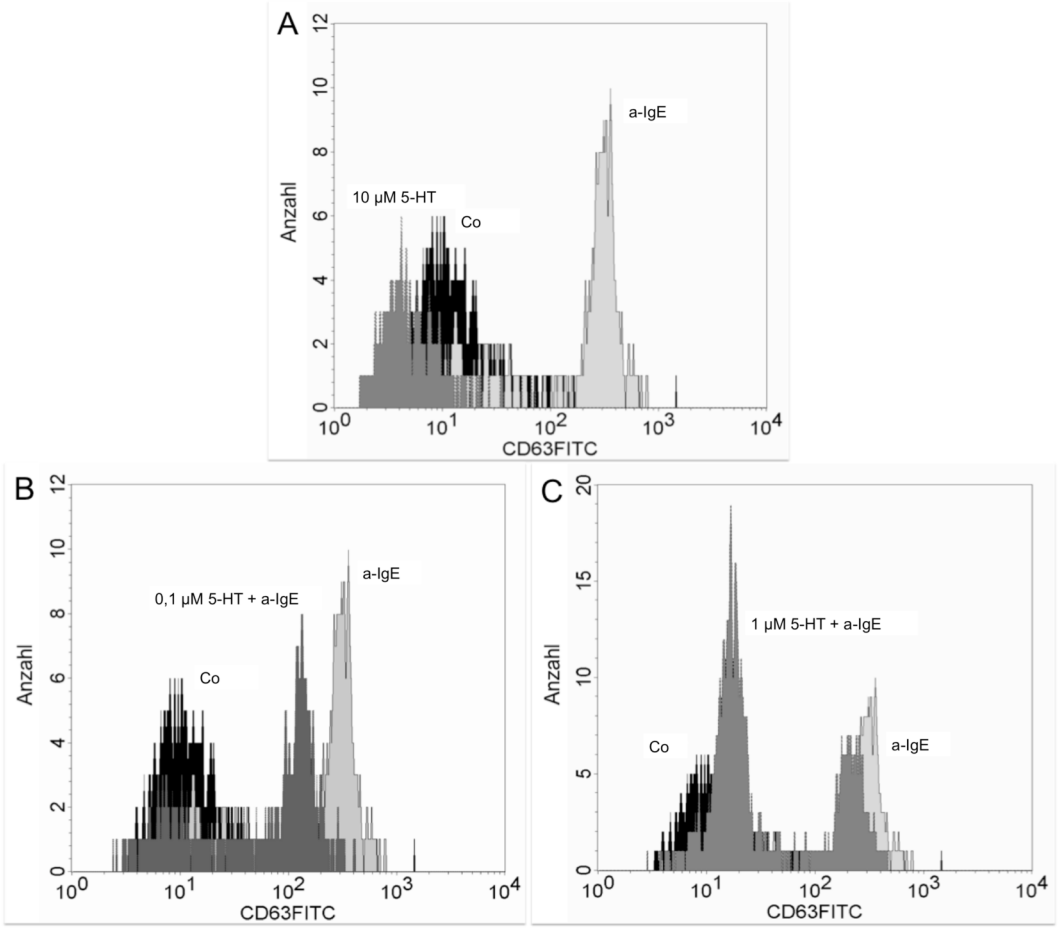

Abbildung 16: Histogramme: CD63-Expression nach Vorstimulierung mit 5HT und anschließender Stimulierung mit anti-IgE

A: Die CD63-Expression auf basophilen Granulozyten aus humanem heparinisiertem Vollblut wird bei Vorstimulierung mit anti-IgE für 20 min im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrollprobe signifikant erhöht. Bei Vorstimulation mit 5-HT, wird die Expression, im Vergleich zur Kontrolle, kaum verändert.

B und C: Die mit 5-HT (Histogramm für 0,1 µM und 1 µM) für 20 min vorinkubierten basophilen Granulozyten aus heparinisiertem Vollblut, wurden anschließend für 20 min mit a-IgE kostimuliert. Dabei wurde die Expression des Degranulationsmarkers CD63 auf den basophilen Granulozyten herabreguliert, im Vergleich zu den mit anti-IgE allein stimulierten basophilen Granulozyten.

4.1.3 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - Der Oberflächenmarker CD203c

Parallel zum Degranulationsmarker CD63 wurde ebenfalls der Aktivierungsmarker CD203c untersucht. Wie bereits oben beschreiben wurden die IL-3 vorstimulierten Zellen des Vollblutes mit 5-HT inkubiert und anschließend mit anti-IgE aktiviert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die mittlere Floureszenzintensität von CD203c der FcεRIα$^+$/ CD203c$^+$ basophlien Granulozyten analysiert. CD203c wird schwach auf unstimulierten basophilen Granulozyten exprimiert (51,314). Ähnlich wie bei CD63 zeigt sich keine verstärkte Expression von CD203c bei 5-HT vorbehandelten Zellen

(Abb. 17). Im Vergleich zur Negativkontrolle, wurde der Aktivierungsmarker CD203c, ebenfalls wie CD63, bei Stimulation mit anti-IgE signifikant verstärkt exprimiert (Abb. 16, $p < 0{,}001$).

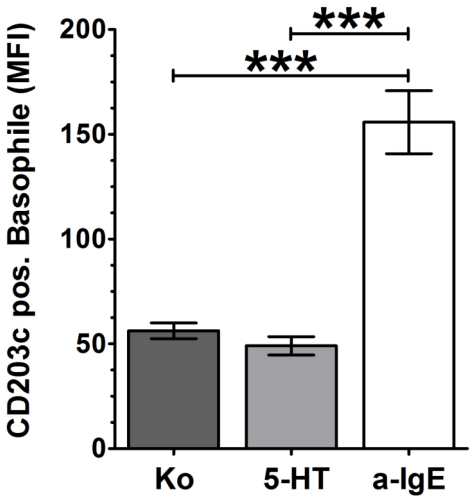

Abbildung 17: CD203c-Expression nach Stimulierung mit 5-HT oder anti-IgE

Mit IL-3 (2 ng/ml) vorstimulierten basophilen Granulozyten im Vollblut wurden für 20 Minuten mit 5-HT oder a-IgE stimuliert und anschließend mt FACS die CD203c Expression gemessen: Ko (= Kontrolle), 5-HT (10 µM), anti-IgE (100 ng/ml) *** $p < 0.001$; repeated measures ANOVA: $F_{(2,23)} = 35.90$, $p < 0.0001$ MFI: mittlere Fluoreszenzintensität.

Durch die Vorstimulierung der basophilen Granulozyten mit 5-HT findet eine signfikant geringere a-IgE induzierte Exponierung von CD203c statt.

In weiteren Experimenten führten wir eine Vorstimulierung mit 5-HT und anschließend Stimulierung mit anti-IgE zur Analyse der CD203c-Expression durch.

Durch die Vorstimulierung mit 0,1µM ($p<0.001$), 1µM ($p<0.001$), 10µM($p<0.001$), 50µM ($p < 0{,}05$) und 100µM ($p<0.001$) 5-HT konnte eine signifikante geringere Dichte von CD203c auf der Zelloberfläche der anti-IgE aktivierten basophilen Granulozyten beobachtet werden (Abb.18).

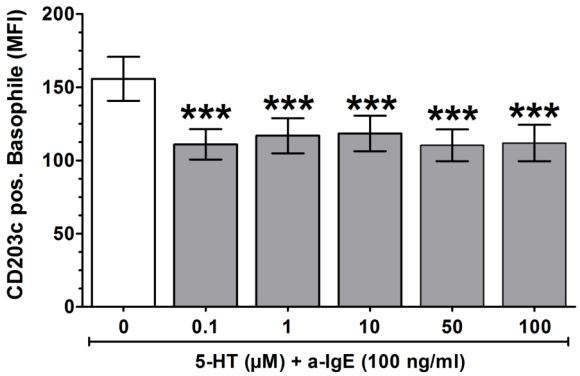

Abbildung 18:CD203c-Expression nach Stimulierung mit anti-IgE und Kostimulierung mit 5-HT

Die im Vollblut befindlichen und mit IL-3 behandelten basophilen Granulozyten wurden für 20 Minuten mit verschiedenen Konzentration von 5-HT (0,1 – 100µM) stimuliert und anschließend mit a-IgE aktiviert. *** $p < 0.001$; repeated ANOVA: $F_{(5,47)} = 11.42$, $p < 0.0001$ MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

4.1.4 Der Einfluss von Serotonin auf die IgE vermittelte Aktivierung basophiler Granulozyten - FcεRI-Expression

Es wurde bereits beschrieben, dass die FcεRI-Dichte auf basophilen Granulozyten nach Inkubation mit anti-IgE abnimmt (315). Daher untersuchten wir die Expression dieses Rezeptors auf basophilen Granulozyten nach Inkubation mit Serotonin und im Vergleich zu anti-IgE. Dabei ergab sich kein signifkanter Unterschied der Expression des Rezeptors auf basophilen Granulozyten zwischen der Mediumkontrolle, den 5-HT stimulierten Basophilen und den anti-IgE-stimulierten Basophilen (Abb. 19).

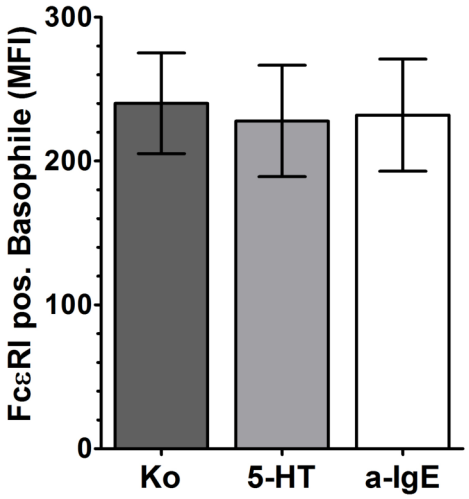

Abbildung 19: FcεRI -Expression nach Stimulierung mit 5-HT oder anti-IgE

Die im Vollblut befindlichen Zellen wurden zunächst mit IL-3 und anschließend mit 5-HT oder anti-IgE stimuliert. Mit Hilfe des FACS wurden die basophilen Granulozyten identifiziert und auf ihre FcεRI expression hin untersucht. Ko (Kontrolle), 5-HT (10µM), anti-IgE (100ng/ml) repeated measures ANOVA: $F_{(2,20)} = 0{,}3165$, $p = 0{,}7346$ MFI: mittlere Fluoreszenzintensität

Durch die Vorstimulierung der basopilen Granulozyte mit 0,1µM ($p < 0{,}01$), 1µM ($p < 0{,}05$), 10µM ($p < 0{,}001$), 50µM ($p < 0{,}01$) und 100µM ($p < 0{,}001$) 5-HT konnte jedoch eine signifikante geringere Dichte von FcεRI auf der Zelloberfläche der anti-IgE aktivierten basophilen Granulozuyten nachgewiesen werden (Abb.20).

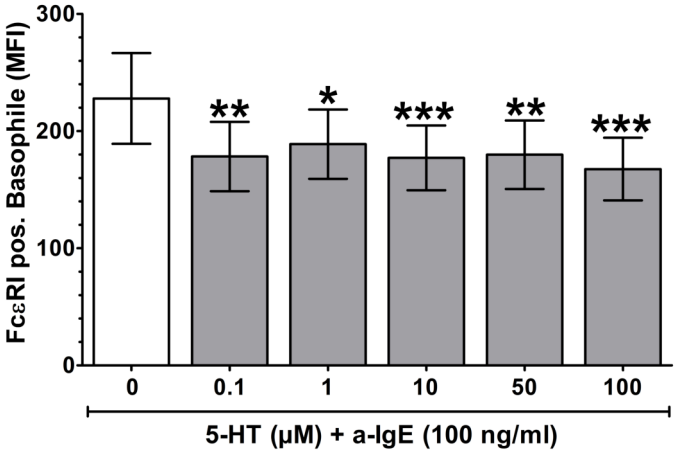

Abbildung 20: FcεRI -Expression nach Stimulierung mit anti-IgE und Kostimulierung mit 5-HT (MFI)

Die sich im Vollblut befindlichen, mit IL-3 stimulierten Granulozyten wurden zunächst mit verschiedenen Konzentration von 5-HT (0,1 – 100µM) vorstimuliert und anschließend mit anti-IgE aktiviert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die basophilen Granulozyten identifiziert und die Expression des FceR1 untersucht * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; repeated measures ANOVA: $F_{(5,41)} = 7.563$, $p = 0.0001$

4.2 Apoptose

Verschiedene Zytokine oder Hormone wie IL-3, TSLP oder Leptin erhöhen die Lebensdauer der basophilen Granulozyten. (316-318). Da Serotonin ebenfalls in Abhängigkeit der Serotoninkonzentration und der 5-HT-Rezeptoren auf der Zelloberfläche Apoptose inhibieren oder induzieren kann, (319,320) wurde im folgenden der Effekt von Serotonin auf die Lebensdauer von basophilen Granulozyten untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von Serotonin auf die Apoptose basophiler Granulozyten wurden primäre isolierte basophile Granulozyten für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Serotonin kultiviert. Als Kontrollen dienten das anti-apoptotische IL-3 (316) und das aktivierende anti-IgE.

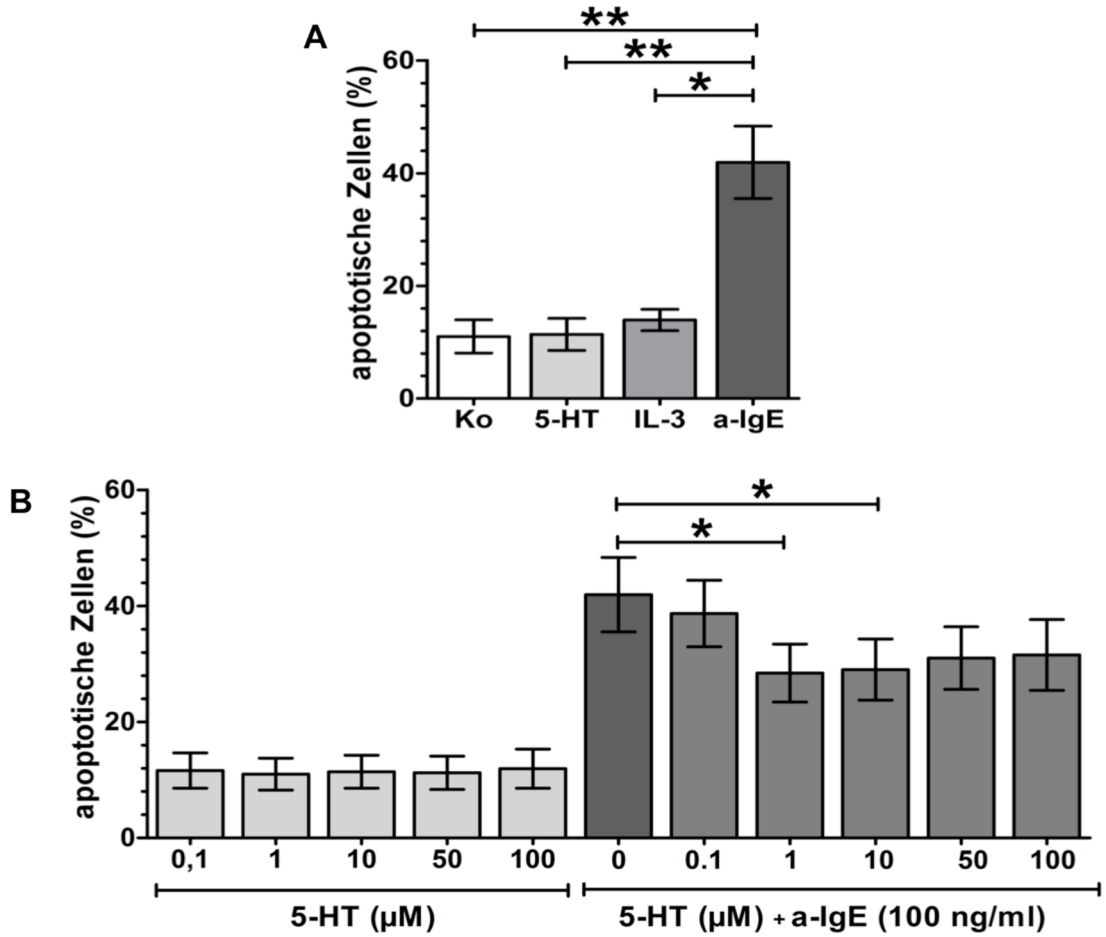

Abbildung 21: Der Einfluss von 5-HT auf die Apoptose von basophilen Granulozyten nach 21 Stunden in Kultur.

Die isolierten basophilen Granulozyten wurden für 21 Stunden mit verschiedenen Konzentration von 5HT (A) 10µM; B) 0,1-100µM), IL-3 (10ng/ml) und a-IgE (100ng/ml) kultiviert. Als Kontrolle (Ko) dient Zellkulturmedium. Nach der Kultivierung wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodide gefärbt und die Zellen im FACS analysiert. Die Annexin V positive/ propidioum negative Zellen wurden als apoptotische Zellen definiert. (A: Friedmann test: p=0,0007, Friedmannstatistik:17,13; B: Friedmanntest: p=0,0009; Friedmannstatistik: 20,81)

Es zeigte sich, dass Serotonin unabhängig von der Konzentration (0,1µM – 100µM) keinen pro-apoptotischen Effekt auf basophile Granulozyten hat. Die anti-IgE induzierte Apoptose konnte durch eine Präinkubation der basophilen Granulozyten mit Serotonin in den Dosierungen 1µM ($p < 0,05$) und 10µM ($p < 0,05$) signifikant inhibiert werden.

4.3 ELISA

Mit Serotonin stimulierte murine basophile Granulozyten weisen eine reduzierte IL-4 Sekretion auf (99), was auf eine verringerte Degranulation hindeutet. In meinen Daten zeigte sich eine verringerte Exponierung des Degranulationsmarkers CD63 und des Aktivierungsmarkers CD203c auf der Zelloberfläche der mit anti-IgE und anschließend 5-HT vorstimulierten basophilen Granulozyten, weswegen im Folgenden der Einfluss von Serotonin auf die IL-3 und IL-4 Sekretion von humanen basophilen Granulozyten mithilfe eines ELISA untersucht wurde. Dafür wurden primäre frisch isolierte basophile Granulozyten für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Serotonin sowohl alleine, als auch in Kombination mit anti-IgE (100ng/ml) kultiviert. Als Kontrollen wurden IL-3 und Dexamethason eingesetzt. Von IL-3 ist bekannt, dass es die IL-4-Produktion in basophilen Granulozyten induziert (321,322). Dexamethason hingegen hat einen inhibitorischen Effekt auf die Histaminausschüttung von basophilen Granulozyten (323,324).

Die Kultivierung der basophile Granulozyten mit Serotonin allein hatte keinen positiven Effekt auf die Sezernierung von IL-4, während die Kontrollen, a-IgE, Dexmathason und IL-3, eine Sezernierung von IL-4 bewirkten (Abb. 22A). Basophile Granulozyten, welche vor der a-IgE-Stimulierung mit Serotonin vorbehandelt wurden, sezernierten weniger IL-4 (Abb. 22B).

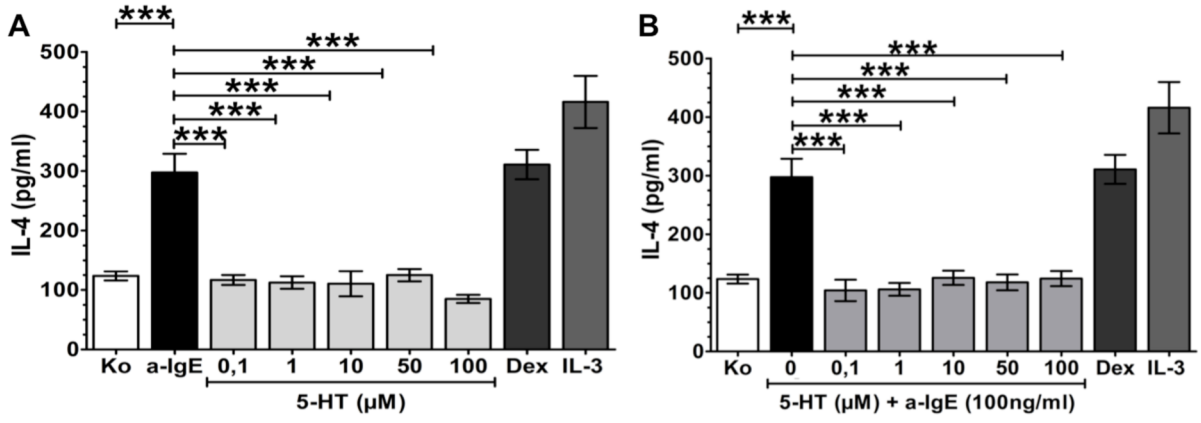

Abbildung 22:Der Einfluss von anti-IgE und anti-IgE + 5-HT auf die IL-4-Sekretion basophiler Granulozyten.

In (A) ist die IL-4 Sekretion der frisch isolierte basophile Granulozyten dargestellt, die für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Serotonin (0,1 – 10µM), a-IgE (100ng/ml), Dexamethason (Dex, $1x10^{-6}$M) und IL-3 (10ng/mL) kultiviert wurden (Ko: Medium; *** $p < 0.001$; one-way ANOVA $F(6/43)=18,97$ $p<0,0001$).

In (B) ist neben den Kontrollen (Medium (Ko), IL-3, Dex, und a-IgE) die IL-4 Sekretion der basophilen Granulozyten dargestellt, die zunächst mit verschiedenen Konzentration von Serotonin (0,1 – 100µm) vorbehandelt und dann mit a-IgE aktiviert wurden.(*** $p < 0.001$; one-way ANOVA $F(6/40)=15,53$ $p<0,0001$).

Bei der Behandlung der basophilen Granulozyten mit 10 µM Serotonin konnte eine signifikant verringerte Ausschüttung von IL-3 beobachtet werden (Abb. 23A), welche bei Vorstimulierung der basophilen Granulozyten mit Serotonin und anschließender anti-IgE-Stimulierung nicht gezeigt werden konnte (Abb. 23B).

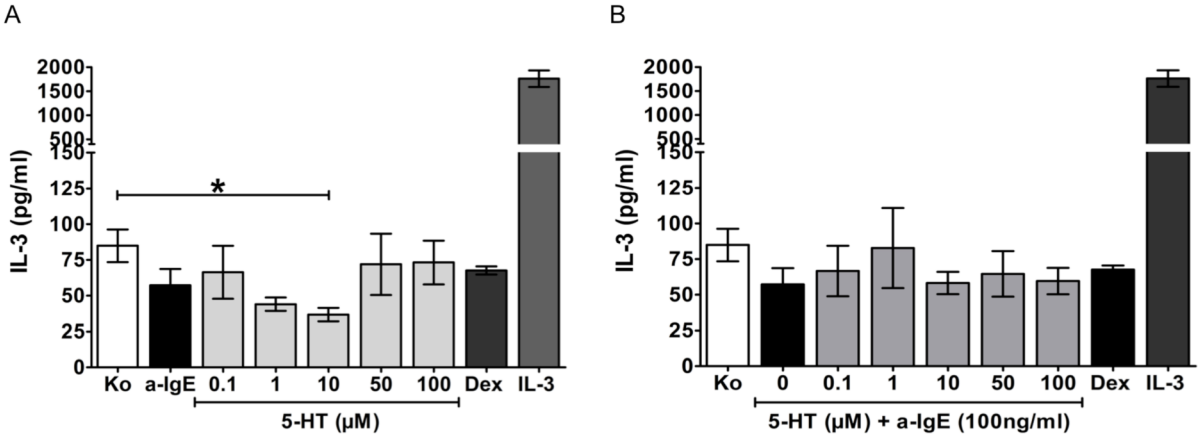

Abbildung 23:Der Einfluss von anti-IgE und 5-HT auf die IL-3-Sekretion basophiler Granulozyten.

In (A) ist die IL-3 Sekretion der frisch isolierten basophilen Granulozyten dargestellt, die für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Serotonin (0,1 – 10µM), a-IgE (100ng/ml), Dexamethason (Dex, $1x10^{-6}$M) und IL-3 (10ng/mL) kultiviert wurden (Ko: Medium; * $p < 0.05$; Kruskal Wallis Test p=0,4487 Kruskal Wallis Statistik:5,784).
In (B) ist neben den Kontrollen (Medium (Ko), IL-3, Dex, und a-IgE) die Il-4 Sekretion der basophilen Granulozyten dargestellt, die zunächst mit verschiedenen Konzentration von Serotonin (0,1 – 100µm) vorbehandelt und dann mit a-IgE aktiviert wurden.(Kruskal Wallis Test p=0,0268 Krukal Wallis Statistik:14,27).

4.4 PCR

Da die Wirkung von Serotonin stark von dem auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptor abhängt (319,320) wurde im Folgenden die Expression verschiedener 5-HT Rezeptoren in frisch isolierten basophilen Rezeptoren untersucht. Dafür wurde direkt nach der Isolierung die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der qPCR die Expression der Rezeptoren untersucht. Die Expression der Rezeptoren war sehr variabel. Es konnte eine schwache Expression des 5-HT_{3A}-Rezeptor in vier Spendern nachgewiesen werden (Abb. 24). In zwei von vier Spendern konnte eine schwache Expression des 5-HT_7R (Abb. 24) und in einem von vier Spendern der 5-HT_6R nachgewiesen werden.

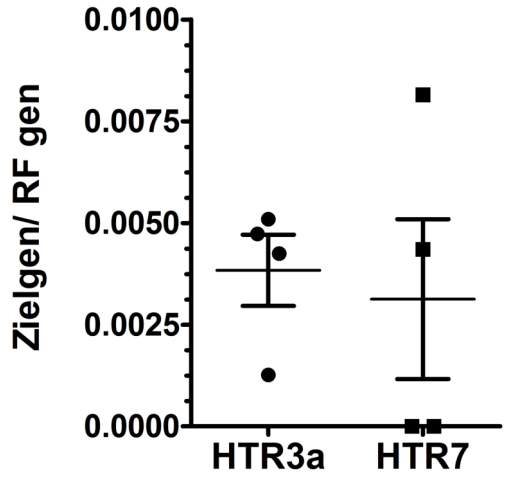

Abbildung 24: mRNA Verhältnis der Zielgene zu den Referenzgenen

Gesamt RNA von frisch isolierten basophilen Granulozyten wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dargestellt ist das Verhätlnis der Ct-werte der Zielgene 5-HT_{3a}R (HT3aR) und 5-HT_7R (HTR7) zu den drei Referenzgenen.

Nicht nachgwiesen werden konnte in drei Spendern die 5-HT_{1A}R, 5-HT_{1B}R, 5-HT_{5A}R und in zwei getesteten Spendern die 5-HT_{2A}R, 5-HT_4R.

5 Diskussion

Basophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von Th2-Immunantworten, wie z.B. beim allergischen Asthma (8). Die Aktivierung von basophilen Granulozyten bewirkt eine Degranulation, bei der verschiedene pro-inflammatorische Substanzen wie Histamin, Leukotriene und Zytokine, wie IL-4 und IL-13, freigesetzt werden (93).

Viele Studien in den letzten Jahren zeigten, dass Neurotrophine und Neuropetide eine Rolle in allergischen Immunreaktionen spielen. So konnte gezeigt werden, dass das Neuropeptid neuronaler Wachstumsfaktor (NGF = neuronal growth factor) die IgE vermittelte Aktivierung von basophilen Granulozyten beeinflusst (325) und α-MSH die anti-IgE-induzierte vermehrte Expression von CD203c auf basophilen Granulozyten reduziert (326).

Ein weiterer interessanter Neurotransmitter ist Serotonin, welches bislang vor allem aufgrund seiner pro-inflammatorischen Wirkung bekannt ist (327,328). Katoh et al. zeigten jedoch, dass Monozyten in der Anwesenheit von Serotonin zu dendritischen Zellen mit einer verstärkten CD14 Expression differenzierten und diese Zellen eine verstärkte Zytokinproduktion einschließlich des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 aufwiesen (329).In murinen basophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass Serotonin die IL-4-Produktion in IL-3-stimulierten murinen basophilien Granulozyten inhibiert (99).

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass durch eine Vorstimulierung mit Serotonin die anti-IgE vermittelte Sekretion von IL-4 von frisch isolierten humanen basophilen Granulozyten inhibiert wurde. Interessanterweise konnte dieser Effekt sowohl bei sehr geringen Konzentrationen (0,1µM und 1µM), als auch bei sehr hohen Konzentration (10 - 100µM) beobachtet werden. Serotonin selbst hat keinen Effekt auf die Sekretion des IL-4 von basophilen Granulozyten.

Wie bereits beschrieben, ist IL-4 an der Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen zu Th2-Zellen und an der Induktion des Immunglobulin-Klassenwechsels in B-Zellen beteiligt, was vermutlich zu einer Aufrechterhaltung und Verstärkung der Th2-Immunantwort führt (84,88-90). IL-4 spielt folglich eine Schlüsselrolle in der Vermittlung allergischer und parasitärer Immunreaktionen. Durch die Inhibierung der Ausschüttung dieses Interleukins aus basophilen Granulozyten, kann Serotonin

allergische Reaktionen vermindern. Dies könnte in der zukünftigen Therapie allergischer Erkrankungen von Bedeutung sein.

IL-3 wird von Th2-Zellen ausgeschüttet und hat einen differenzierenden, chemokinetischen und anti-apoptotischen Effekt auf basophile Granulozyten (14,19,58,316,330,331). Da basophile Granulozyten auch in der Lage sind selbst nach IgE-abhängiger Aktivierung IL-3 zu produzieren und somit einen selbstverstärkenden Mechanismus einzuleiten (322), wurde der Einfluss von Serotonin auf die IL-3 Produktion der basophilen Granulozyten untersucht. In unserem experimentellen Aufbau zeigt sich eine signifikant reduzierte IL-3 Sekretion der basophilen Granulozyten bei einer Serotoninkonzentration von 10µM. Bei anti-IgE-stimulierten basophilen Granulozyten führte die Vorbehandlung mit Serotonin jedoch zu keiner Veränderung der IL-3 Produktion (Abb. 23).

Da die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine in der Regel über die Degranulation der sauren Granula der basophilen Granulozyten (44,93,332,333) erfolgt, wurde die Exponierung der Oberflächenmarker CD63 und CD203c untersucht, die bei einer anti-IgE vermittelten Aktivierung verstärkt an der Zelloberfläche beobachtet werden können. Durch eine Vorbehandlung mit Serotonin zeigte sich nach der anti-IgE vermittelten Aktivierung der basophilen Granulozyten eine verringerte Expression von CD63 und CD203c an der Zelloberfläche. Serotonin alleine hatte keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression der beiden Marker. Es ist sowohl eine reduzierte CD63-Oberflächenexpression als auch eine Reduktion der IL-4-Sekretion zu beobachten.
Obwohl wir die in der Literatur beschriebene verringerte Expression des FcεRIa nach der Stimulation mit anti-IgE (334) in unserem experimentellen Aufbau nicht nachweisen konnten, zeigte sich eine verringerte Expression des Rezeptors bei basophilen Granulozyten, die vor der anti-IgE Stimulierung mit Serotonin vorbehandelt wurden.

Ein wichtiger Prozess bei allergischen Reaktionen ist die Apoptose, bei dem Zellen in kleine Vesikeln zerfallen, die von Makrophagen aufgenommen werden. Dieser Prozess gewährleistet ein Zugrundegehen der Zellen ohne Schädigung des Nachbargewebes, was wesentlich zum korrekten Ablauf der Immunantwort beiträgt. Bei der Untersuchung des apoptotischen Verhaltens der basophilen Granulozyten unter Einfluss von Serotonin konnte keine verstärkte Apoptose beobachtet werden. Bei der durch anti-IgE-stimulierten Apoptose konnte jedoch durch die

Vorbehandlung der Basophilen mit Serotonin die Anzahl der apoptotischen Zellen signifikant reduziert werdent.

IL-3 wirkt bekanntermaßen aktivierend auf basophile Granulozyten, wie auch anti-IgE (40,44), die γ-Untereinheiten des $Fc_{\varepsilon}RI$ sind an die β-Untereinheit des IL-3-Rezeptors gekoppelt, wodurch eine IL-3-Stimulierung die Effekte von anti-IgE auf basophile Granulozyten verstärkt (40). Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass IL-3 anti-apoptotisch auf basophile Granulozyten wirkt (316,317). Wir konnten hingegen nachweisen, dass anti-IgE pro-apoptotisch auf basophile Granulozyten wirkt und IL-3 und anti-IgE auf basophilen Granulozyten demnach nicht vollständig synergistisch wirken.

Nun könnte man hypothetisieren, dass IL-3 die aktivierende Wirkung von anti-IgE auf basophile Granulozyten unterstützt und nicht nur damit, sondern auch über eine zusätzliche lebensverlängernde Wirkung auf basophile Granulozyten Th2-Immunantworten verstärkt. Dies könnte bedeuten, dass IL-3 die apoptotische Wirkung des anti-IgEs auf basophile Granulozyten, möglicherweise vermittelt durch die Degranulation, ausgleicht. Damit würde IL-3 synergistisch zu seiner Funktion in der Differenzierung (14) und Rekrutierung (58) basophiler Granulozyten wirken.

Um das Zusammenwirken von anti-IgE und IL-3 in Th2-Immunantworten und den Einfluss von Serotonin auf diese Mechanismen näher zu verstehen, untersuchten wir den Einfluss von anti-IgE und Serotonin auf die IL-3 und IL-4 Produktion in basophilen Granulozyten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Serotonin-Stimulierung alleine, ohne anti-IgE, die IL-3, jedoch nicht die IL-4-Sekretion in basophilen Granulozyten verringert. Anti-IgE hat mit und ohne Serotonin-Präinkubation scheinbar keinen Einfluss auf die IL-3-Sekretion aus basophilen Granulozyten, jedoch eine deutlich verstärkende Wirkung auf die IL-4-Sekretion. Letztere konnte durch Präinkubation mit Serotonin signifikant gesenkt werden, es ließ sich jedoch bei Präinkubation mit Serotonin kein Einfluss auf die IL-3-Sekretion in anti-IgE-stimulierten basophilen Granulozyten feststellen. Die anti-apoptotische Wirkung des Serotonins auf basophile Granulozyten muss also IL-3-unabhängig vermittelt werden.

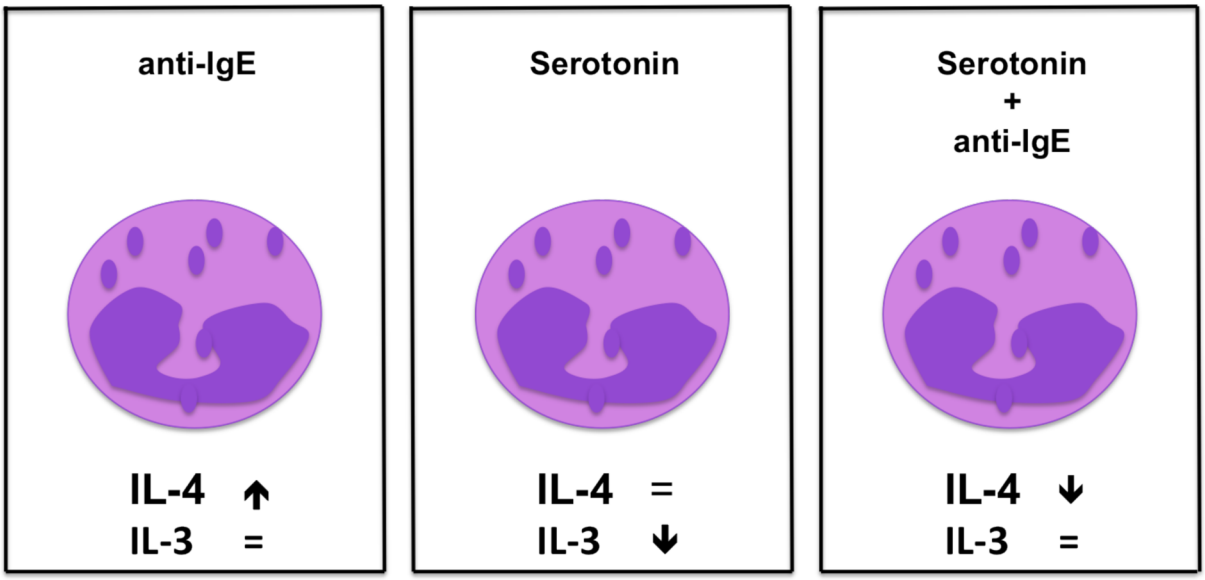

Abbildung 25: Einfluss von 5-HT und anti-IgE auf die IL-4- und IL-3-Sekretion aus basophilen Granulozyten.

Anti-IgE scheint die IL-4-Sekretion in basophilen Granulozyten zu verstärken, wohingegen diese durch Serotonin-Präinkubation verringert zu werden scheint. Die IL-3-Sekretion scheint durch anti-IgE-Stimulation nicht signifikant beeinflusst, auch nicht bei Präinkubation duch Serotonin. Lediglich die alleinige Serotonin-Stimulation scheint die IL-3-Sekretion in basophilen Granulozyten signifikant reduzieren zu können.

6 Zusammenfassung

Serotonin ist ein Neurotransmitter, welcher vornehmlich in enterochromaffinen Zellen im Darm und im ZNS produziert wird. Es sind sieben Subfamilien von Serotonin-Rezeptoren bekannt, die meisten von ihnen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, nur der 5-HT_3-Rezeptor ist ein Kationen-selektiver Ionenkanal.

Basophile Granulozyten machen 0,5 - 1 % der peripheren Blutleukozyten aus. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des adaptiven Immunsystems und spielen als bedeutsame Quelle für Interleukin-4 eine Rolle in der Vermittlung allergischer Reaktionen und in der Parasitenabwehr. Interleukin-4 ist ein Zytokin, welches bekannt ist für die Initiierung von Th2-Immunreaktionen.

In humanen basophilen Granulozyten wird durch Kontakt mit anti-IgE eine Degranulation proinflammatorischer Botenstoffe (u.a. IL-4) ausgelöst, was zu allergischen Reaktionen führt.

In dieser Arbeit wurde in Vollblut und an isolierten basophilen Granulozyten untersucht, wie Serotonin jene Degranulation, aber auch die Apoptose humaner basophiler Granuloyten und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine beeinflusst.

Die Isolierung der Zellen erfolgte in drei Schritten. Zunächst erfolgte eine Dichtegradienten-Zentrifugation, gefolgt von einer Gegenstrom-Elutriation und schließlich einer magnetischen Isolation (negative Selektion mittels monoklonaler Antikörper, welche Oberflächenanigene auf hämtopoetischen Zellen binden).

Die Degranualtion der basophilen Granulozyten wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurden die Oberflächenmarker CD123 (auch IL-3-Rezeptor), FcεR1α (hochaffiner IgE-Rezeptor) und CD203c sowie die bekannte Zellgröße und Granularität zur Identifizierung der basophilen Granulozyten in Vollblut genutzt. Um zu untersuchen, ob Serotonin einen Einfluss auf die klassische IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion hat, wurde die Exponierung des Degranulationsmarkers CD63 der basophilen Granulozytenpopulation ermittelt.

Zur Untersuchung der Apoptose wurde ebenfalls die Durchflusszytometrie genutzt, jedoch erfolgte die Untersuchung an isolierten basophilen Granulozyten. Hierbei wurden Annexin V zur Markierung apoptitischer Zellen und Propidiumiodid zur Markierung toter Zellen genutzt.

Weiterhin wurde mittels ELISA, einem antikörperbasierten Verfahren, mittels ezymatischer Farbreaktion Interleukin-4 und -3 quantitativ in Zellkulturüberständen der basophilen Granulozyten nachgewiesen.

Schließlich erfolgte die Untersuchung der auf basophilen Granulozyten exprimierten Serotonin-Rezeptoren mittels qPCR. Hierfür wurde die mRNA aus isolierten Basophlien Granulozyten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Schwierigkeit hierbei lag darin, dass sich immer nur geringe Mengen an mRNA isolieren ließen und die Expression der Rezeptoren recht variabel war.

Zusammenfassend besagen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Serotonin die proinflammatorischen Effekte der anti-IgE-Stimulierung auf basophile Granulozyten, namentlich die Verstärkung der Degranulation und IL-4-Sekretion, reduziert. Desweiteren wirkt es hemmend auf die pro-apoptotische Wirkung des anti-IgEs auf basophile Granulozyten.

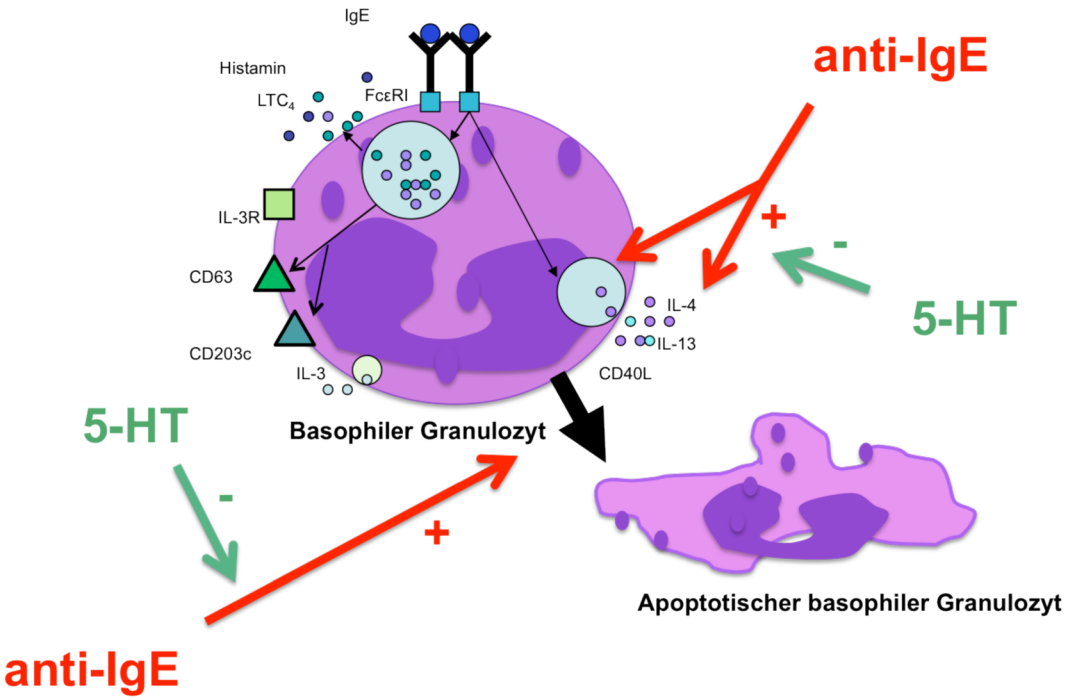

Abbildung 26: Einfluss von anti-IgE und 5-HT auf basophile Granulozyten

Anti-IgE wirkt verstärkend auf die Degranulation und IL-4-Sekretion in basophilen Granulozyten, außerdem wirkt es pro-apoptotisch. 5-HT-Präinkubation kann all diese Effekte verringern.

Um diese Erkenntnisse über den Einfluss von Serotonin auf die Effekte des anti-IgEs auf basophile Granulozyten eventuell für den medizinischen Fortschritt nutzen zu können, müssten die Signalwege, über die diese Effekte vermittelt werden, näher

untersucht werden. Der nächste notwendige Schritt wäre eine genauere Untersuchung der Expressionsregulation der Serotonin-Rezeptoren, die sich in der mRNA der basophilen Granulozyten nachweisen ließen, 5-HT_{3A}R und 5-HT_7R. Eine Veränderung des Rezeptorprofils vor und nach Serotonin-Stimulation, sowie vor und nach anti-IgE-Stimulation wären sinnvoll. Dabei wäre besonders interessant, ob die Rezeptoren bei bestimmten Stimulationsansätzen herauf- oder herunterreguliert werden. Es könnte dabei z.B. folgender Ansatz verfolgt werden:

Nachdem festgestellt wurde, welcher Rezeptor für die antiinflammatorischen Effekte des Serotonins auf basophile Granulozyten verantwortlich ist, wäre es sinnvoll nähere Untersuchungen zu den beteiligten Signalwegen vorzunehmen.

Sollte Serotonin weiterhin in seiner antiinflammatorischen Wirkung bestätigt werden, wäre es denkbar, Serotonin in Zukunft als Therapeutikum bei allergischen Entzündungsreaktionen einzusetzen.

Quellenverzeichnis

(1) Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Archiv fuer Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung 1879:166-169.

(2) Gibbs BF. Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. Clin Exp Med 2005;5(2):43-49.

(3) Voehringer D. Basophil modulation by cytokine instruction. Eur J Immunol 2012;42(10):2544-2550.

(4) Ohnmacht C, Voehringer D. Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. Blood 2008 American Society of Hematology;113(12):2816-2825.

(5) Otavio FS, Bechara GH. Guinea pigs develop cutaneous basophilia after repeated infestations by nymphs of the tick Amblyomma triste. Ann N Y Acad Sci 2008 Dec;1149:226-229.

(6) Brown SJ, Galli SJ, Gleich GJ, Askenase PW. Ablation of immunity to Amblyomma americanum by anti-basophil serum: cooperation between basophils and eosinophils in expression of immunity to ectoparasites (ticks) in guinea pigs. The Journal of Immunology 1982 August 01;129(2):790-796.

(7) Allen J. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. Int J Parasitol. 1973;Mar;3(2):195-200.

(8) Nouri-Aria KT, Irani AA, Jacobson MR, O'Brien F, Varga EM, Till SJ, et al. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. J Allergy Clin Immunol 2001 8;108(2):205-211.

(9) Devouassoux G, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD, Prussin C. Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13- producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol 1999 Oct;104(4 Pt 1):811-819.

(10) Mitchell E. Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. Lancet. 1982;Jan 16;1(8264):127-130.

(11) Dvorak HF, Mihm MC,Jr. Basophilic leukocytes in allergic contact dermatitis. J Exp Med 1972 Feb 1;135(2):235-254.

(12) Ito Y, Satoh T, Takayama K, Miyagishi C, Walls AF, Yokozeki H. Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. Allergy 2011;66(8):1107-1113.

(13) Gauvreau GM, Denburg JA. Human mast cell and basophil/eosinophil progenitors. Methods Mol Biol 2015;1220:59-68.

(14) Ohmori K, Luo Y, Jia Y, Nishida J, Wang Z, Bunting KD, et al. IL-3 Induces Basophil Expansion In Vivo by Directing Granulocyte-Monocyte Progenitors to Differentiate into Basophil Lineage-Restricted Progenitors in the Bone Marrow and by Increasing the Number of Basophil/Mast Cell Progenitors in the Spleen. The Journal of Immunology 2009 March 01;182(5):2835-2841.

(15) Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, Ozawa H, Mori Y, Shigematsu H, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. Genes Dev 2006 Nov 1;20(21):3010-3021.

(16) Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 Dec 13;102(50):18105-18110.

(17) Qi X, Hong J, Chaves L, Zhuang Y, Chen Y, Wang D, et al. Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBPalpha and MITF specifies basophil and mast cell fates. Immunity 2013 Jul 25;39(1):97-110.

(18) Li Y, Qi X, Liu B, Huang H. The STAT5–GATA2 Pathway Is Critical in Basophil and Mast Cell Differentiation and Maintenance. The Journal of Immunology 2015 May 01;194(9):4328-4338.

(19) Siracusa MC, Saenz SA, Hill DA, Kim BS, Headley MB, Doering TA, et al. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. Nature 2011 Aug 14;477(7363):229-233.

(20) Metzger H. A tetrameric model for the structure of the mast cell receptor with high affinity for IgE. Progress in Immunology (Yamamura, Y. and Tada, T., eds) , Academic Press, Orlando, FL 1983;Vol. V:493-501.

(21) Pang J, Taylor GR, Munroe DG, Ishaque A, Fung-Leung WP, Lau CY, et al. Characterization of the gene for the human high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha-chain. J Immunol 1993 Dec 1;151(11):6166-6174.

(22) Cambier JC. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). The Journal of Immunology 1995 October 01;155(7):3281-3285.

(23) El-Hillal O, Kurosaki T, Yamamura H, Kinet JP, Scharenberg AM. Syk Kinase Activation by a Src Kinase-Initiated Activation Loop Phosphorylation Chain Reaction. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Mar 4;94(5):1919-1924.

(24) Kimura T, Sakamoto H, Appella E, Siraganian RP. Conformational changes induced in the protein tyrosine kinase p72syk by tyrosine phosphorylation or by binding of phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motif peptides. Mol Cell Biol 1996 Apr;16(4):1471-1478.

(25) Kepley CL, Youssef L, Andrews RP, Wilson BS, Oliver JM. Multiple Defects in FcεRI Signaling in Syk-Deficient Nonreleaser Basophils and IL-3-Induced Recovery of Syk Expression and Secretion. The Journal of Immunology 2000 November 15;165(10):5913-5920.

(26) Luskova P, Draber P. Modulation of the Fcepsilon receptor I signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. Curr Pharm Des 2004;10(15):1727-1737.

(27) Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. Nat Rev Immunol 2002;2(10):773-786.

(28) Liu Y, Barua D, Liu P, Wilson BS, Oliver JM, Hlavacek WS, et al. Single-Cell Measurements of IgE-Mediated FcεRI Signaling Using an Integrated Microfluidic Platform. PLoS ONE 2013;8(3).

(29) Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. Journal of Biological Chemistry 1994 March 25;269(12):8878-8884.

(30) Wang AV, Scholl PR, Geha RS. Physical and functional association of the high affinity immunoglobulin G receptor (Fc gamma RI) with the kinases Hck and Lyn. The Journal of Experimental Medicine 1994 September 01;180(3):1165-1170.

(31) Kiener PA, Rankin BM, Burkhardt AL, Schieven GL, Gilliland LK, Rowley RB, et al. Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. Journal of Biological Chemistry 1993 November 15;268(32):24442-24448.

(32) Odin JA, Edberg JC, Painter CJ, Kimberly RP, Unkeless JC. Regulation of phagocytosis and [Ca2+]i flux by distinct regions of an Fc receptor. Science 1991 Dec 20;254(5039):1785-1788.

(33) Rankin BM, Yocum SA, Mittler RS, Kiener PA. Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45. The Journal of Immunology 1993 January 15;150(2):605-616.

(34) Liao F, Shin HS, Rhee SG. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1992 Apr 15;89(8):3659-3663.

(35) Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol 2008;8(1):34-47.

(36) Khodoun MV, Kucuk ZY, Strait RT, Krishnamurthy D, Janek K, Clay CD, et al. Rapid desensitization of mice with anti-FcγRIIb/FcγRIII mAb safely prevents IgG-mediated anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 2013 12;132(6):1375-1387.

(37) Liu K, Zhu M, Huang Y, Wei S, Xie J, Xiao Y. CD123 and its potential clinical application in leukemias. Life Sci 2015 2/1;122:59-64.

(38) Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF Signaling: Crystal Structure of the Human Beta-Common Receptor. Vitamins & Hormones 2006;74:1-30.

(39) Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. EMBO J 1995 Mar 15;14(6):1166-1175.

(40) Hida ,Shigeaki, Yamasaki ,Sho, Sakamoto ,Yuzuru, Takamoto ,Masaya, Obata ,Kazushige, Takai ,Toshiyuki, et al. Fc receptor [gamma]-chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. Nat Immunol. 2009.

(41) Barnstein BO, Li G, Wang Z, Kennedy S, Chalfant C, Nakajima H, et al. Stat5 Expression Is Required for IgE-Mediated Mast Cell Function. The Journal of Immunology 2006 September 01;177(5):3421-3426.

(42) O'Farrell A, Ichihara M, Mui A, Miyajima A. Signaling pathways activated in a unique mast cell line where interleukin-3 supports survival and stem cell factor is required for a proliferative response. Blood 1996 American Society of Hematology;87(9):3655-3668.

(43) Kuroda E, Antignano F, Ho VW, Hughes MR, Ruschmann J, Lam V, et al. SHIP Represses Th2 Skewing by Inhibiting IL-4 Production from Basophils. The Journal of Immunology 2011 January 01;186(1):323-332.

(44) Eskandari N, Bastan R, Ahmadi M, Peachell PT. Evaluation of the correlation and reproducibility between histamine, IL-4, and IL-13 release from human basophils. Iran J Allergy Asthma Immunol 2014 Jun;13(3):190-197.

(45) Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, Garka K, Foxworthe D, Price V, et al. Molecular Cloning and Biological Characterization of a Novel Murine Lymphoid Growth Factor. The Journal of Experimental Medicine 2000 September 05;192(5):671-680.

(46) Pandey A, Ozaki K, Baumann H, Levin SD, Puel A, Farr AG, et al. Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. Nat Immunol 2000 Jul;1(1):59-64.

(47) Wohlmann A, Sebastian K, Borowski A, Krause S, Friedrich K. Signal transduction by the atopy-associated human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor depends on Janus kinase function. Biol Chem 2010 Feb-Mar;391(2-3):181-186.

(48) Isaksen DE, Baumann H, Trobridge PA, Farr AG, Levin SD, Ziegler SF. Requirement for Stat5 in Thymic Stromal Lymphopoietin-Mediated Signal Transduction. The Journal of Immunology 1999 December 01;163(11):5971-5977.

(49) Rochman Y. Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;Nov 9;107(45):19455-19460.

(50) Valent P, Bettelheim P. Cell Surface Structures on Human Basophils and Mast Cells: Biochemical and Functional Characterization. Adv Immunol 1992;52:333-423.

(51) Bühring H, Simmons PJ, Pudney M, Müller R, Jarrossay D, van Agthoven A, et al. The Monoclonal Antibody 97A6 Defines a Novel Surface Antigen Expressed on Human Basophils and Their Multipotent and Unipotent Progenitors. Blood 1999 American Society of Hematology;94(7):2343-2356.

(52) Tsai SH, Takeda K. Regulation of allergic inflammation by the ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) on basophils and mast cells. Semin Immunopathol 2016 Sep;38(5):571-579.

(53) Bühring H, Seiffert M, Giesert C, Marxer A, Kanz L, Valent P, et al. The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. Blood 2001 American Society of Hematology;97(10):3303-3305.

(54) Hauswirth A. Interleukin-3 promotes the expression of E-NPP3/CD203c on human blood basophils in healthy subjects and in patients with birch pollen allergy. Int J Immunopathol Pharmacol. 2007 Apr-Jun;20(2):267-78.

(55) Knol EF, Mul FPJ, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. J Allergy Clin Immunol 1991 9;88(3, Part 1):328-338.

(56) Bühring H. The Basophil-Specific Ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a Marker for Cell Activation and Allergy Diagnosis. International Archives of Allergy and Immunology 2004 Apr;133(4):317-29.

(57) Macglashan D. Marked differences in the signaling requirements for expression of CD203c and CD11b versus CD63 expression and histamine release in human Basophils. Int Arch Allergy Immunol 2012;159(3):243-252.

(58) Iikura M, Ebisawa M, Yamaguchi M, Tachimoto H, Ohta K, Yamamoto K, et al. Transendothelial Migration of Human Basophils. The Journal of Immunology 2004 October 15;173(8):5189-5195.

(59) Forssmann U, Uguccioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, et al. Eotaxin-2, a Novel CC Chemokine that Is Selective for the Chemokine Receptor CCR3, and Acts Like Eotaxin on Human Eosinophil and Basophil Leukocytes. The Journal of Experimental Medicine 1997 June 16;185(12):2171-2176.

(60) Ihle JN, Pepersack L, Rebar L. Regulation of T cell differentiation: in vitro induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes from athymic mice by a unique lymphokine. The Journal of Immunology 1981 June 01;126(6):2184-2189.

(61) Ihle JN, Lee JC, Rebar L. T cell recognition of Moloney leukemia virus proteins. III. T cell proliferative responses against gp70 are associated with the production of a lymphokine inducing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in splenic lymphocytes. The Journal of Immunology 1981 December 01;127(6):2565-2570.

(62) Stein EV, Miller TW, Ivins-O'Keefe K, Kaur S, Roberts DD. Secreted Thrombospondin-1 Regulates Macrophage Interleukin-1beta Production and Activation through CD47. Sci Rep 2016 Jan 27;6:19684.

(63) Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda EA, et al. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. J Clin Invest 1997 Apr 1;99(7):1767-1773.

(64) Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. Eur J Immunol 1997;27(12):3507-3516.

(65) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, et al. Prostaglandin D2 Selectively Induces Chemotaxis in T Helper Type 2 Cells, Eosinophils, and Basophils via Seven-Transmembrane Receptor Crth2. The Journal of Experimental Medicine 2001 January 15;193(2):255-262.

(66) Yoshimura-Uchiyama C. Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D2 receptors DP and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells/DP2. - Clinical & Experimental Allergy 2004(- 8):-1283.<

(67) Ying S, Robinson DS, Meng Q, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, et al. C-C Chemokines in Allergen-Induced Late-Phase Cutaneous Responses in Atopic Subjects: Association of Eotaxin with Early 6-Hour Eosinophils, and of Eotaxin-2 and Monocyte Chemoattractant Protein-4 with the Later 24-Hour Tissue Eosinophilia, and Relationship to Basophils and Other C-C Chemokines (Monocyte Chemoattractant Protein-3 and RANTES). The Journal of Immunology 1999 October 01;163(7):3976-3984.

(68) Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, et al. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-

phase allergic reactions in the lung and skin. J Allergy Clin Immunol 2000 Jan;105(1 Pt 1):99-107.

(69) Romagnani P, De Paulis A, Beltrame C, Annunziato F, Dente V, Maggi E, et al. Tryptase-Chymase Double-Positive Human Mast Cells Express the Eotaxin Receptor CCR3 and Are Attracted by CCR3-Binding Chemokines. The American Journal of Pathology 1999 10;155(4):1195-1204.

(70) Hartnell A, Heinemann A, Conroy DM, Wait R, Sturm GJ, Caversaccio M, et al. Identification of Selective Basophil Chemoattractants in Human Nasal Polyps as Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor-2. The Journal of Immunology 2004 November 15;173(10):6448-6457.

(71) Liu Y, Guo W, Pu Z, Li X, Lei X, Yao J, et al. Developmental changes of Insulin-like growth factors in the liver and muscle of chick embryos. Poult Sci 2016 Mar 4.

(72) Hirai K, Miyamasu M, Yamaguchi M, Nakajima K, Ohtoshi T, Koshino T, et al. Modulation of human basophil histamine release by insulin-like growth factors. The Journal of Immunology 1993 February 15;150(4):1503-1508.

(73) Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, Nagase H, Tamura C, Komiya A, et al. An IL-1 Cytokine Member, IL-33, Induces Human Basophil Activation via Its ST2 Receptor. The Journal of Immunology 2008 November 01;181(9):5981-5989.

(74) Bochner BS, Sterbinsky SA, Briskin M, Saini SS, MacGlashan DW. Counter-receptors on human basophils for endothelial cell adhesion molecules. The Journal of Immunology 1996 July 15;157(2):844-850.

(75) Luccioli S, Brody DT, Hasan S, Keane-Myers A, Prussin C, Metcalfe DD. IgE+, Kit−, I-A/I-E- myeloid cells are the initial source of Il-4 after antigen challenge in a mouse model of allergic pulmonary inflammation. J Allergy Clin Immunol 2002 7;110(1):117-124.

(76) Kim S, Prout M, Ramshaw H, Lopez AF, LeGros G, Min B. Cutting Edge: Basophils Are Transiently Recruited into the Draining Lymph Nodes during Helminth Infection via IL-3, but Infection-Induced Th2 Immunity Can Develop without Basophil Lymph Node Recruitment or IL-3. The Journal of Immunology 2010 February 01;184(3):1143-1147.

(77) Perrigoue J,G., Saenz S,A., Siracusa M,C., Allenspach E,J., Taylor B,C., Giacomin P,R., et al. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote TH2 cytokine-dependent immunity. Nature immunology 2009 Jul;10(7):697-705.

(78) Yanagihara Y, Kajiwara K, Basaki Y, Ikizawa K, Ebisawa M, Ra C, et al. Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation. Clin Exp Immunol 1998 Jan;111(1):136-143.

(79) Gauchat ,Jean-Francois, Henchoz ,Sybille, Mazzei ,Gonzalo, Aubry ,Jean-Pierre, Brunner ,Thomas, Blasey ,Horst, et al. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. Nature. 1993 Sep 23;365(6444):340-3.

(80) Moore PE, Church TL, Chism DD, Panettieri RA, Shore SA. IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells: a role for ERK. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 2002 American Physiological Society;282(4):L847-L853.

(81) Li L, Xia Y, Nguyen A, Lai YH, Feng L, Mosmann TR, et al. Effects of Th2 Cytokines on Chemokine Expression in the Lung: IL-13 Potently Induces Eotaxin

Expression by Airway Epithelial Cells. The Journal of Immunology 1999 March 01;162(5):2477-2487.

(82) Ying S, Meng Q, Barata LT, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Associations between IL-13 and IL-4 (mRNA and protein), vascular cell adhesion molecule-1 expression, and the infiltration of eosinophils, macrophages, and T cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. The Journal of Immunology 1997 May 15;158(10):5050-5057.

(83) Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the Interleukin (IL)-12R β2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells. The Journal of Experimental Medicine 1997 March 03;185(5):817-824.

(84) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol 1989;7:145-173.

(85) Schneider E, Petit-Bertron AF, Bricard R, Levasseur M, Ramadan A, Girard JP, et al. IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. J Immunol 2009 Sep 15;183(6):3591-3597.

(86) Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T, et al. Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. Eur J Immunol 1996 Oct;26(10):2493-2498.

(87) Okayama Y, Petit-Frére C, Kassel O, Semper A, Quint D, Tunon-de-Lara MJ, et al. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. The Journal of Immunology 1995 August 15;155(4):1796-1808.

(88) Noben-Trauth N, Shultz LD, Brombacher F, Urban JF,Jr, Gu H, Paul WE. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Sep 30;94(20):10838-10843.

(89) Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. Immunity 1996 Mar;4(3):313-319.

(90) Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. Nature 1996 Apr 18;380(6575):630-633.

(91) Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. Immunity 1998 Dec;9(6):765-775.

(92) Szabo SJ, Glimcher LH, Ho I. Genes that regulate interleukin-4 expression in T cells. Curr Opin Immunol 1997 12;9(6):776-781.

(93) Castells MC editor. Anaphylaxis and Hypersensitivity Reactions. Humana Press. New York; 2011.

(94) Shibamoto T, Liu W, Cui S, Zhang W, Takano H, Kurata Y. PAF, rather than histamine, participates in mouse anaphylactic hypotension. Pharmacology 2008;82(2):114-120.

(95) Bussolino F, Camussi G, Aglietta M, Braquet P, Bosia A, Pescarmona G, et al. Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. J Immunol 1987 Oct 1;139(7):2439-2446.

(96) Ro JY, Kim KH. Effects of epithelium on the mechanism of mediator release from guinea pig tracheal tissues sensitized by IgG1 versus IgE antibody*. Yonsei Med J 1995 /4/;36(2):161-174.

(97) Böhm M, Zmijewski MA, Wasiewicz T, Straub RH, Raap U, Luger TA, et al. KU812 basophils express urocortin, CRH-R, MC1R and steroidogenic enzymes and secrete progesterone. Exp Dermatol 2012;21(7):541-543.

(98) Böhm M, Apel M, Sugawara K, Brehler R, Jurk K, Luger TA, et al. Modulation of basophil activity: A novel function of the neuropeptide a-melanocyte-stimulating hormone. J Allergy Clin Immunol 2012;129(4):1085-1093.

(99) Schneider E, MacHavoine F, Bricard-Rignault R, Levasseur M, Petit-Bertron AF, Gautron S, et al. Downregulation of basophil-derived IL-4 and in vivo T H2 IgE responses by serotonin and other organic cation transporter 3 ligands. J Allergy Clin Immunol 2011;128(4):864-871.e2.

(100) RAPPORT MM, GREEN AA, PAGE IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. J Biol Chem 1948 Dec;176(3):1243-1251.

(101) ERSPAMER V. Pharmacology of indole-alkylamines. Pharmacol Rev 1954 Dec;6(4):425-487.

(102) Erspamer V, Asero B. Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. Nature 1952;169(4306):800-801.

(103) Saxena PR. Serotonin receptors: Subtypes, functional responses and therapeutic relevance. Pharmacol Ther 1995;66(2):339-368.

(104) Gaddum J. Tryptamine receptors. J Physiol. 1953;Feb 27;119(2-3):363-368.

(105) PAGE IH, McCUBBIN JW. Modification of vascular response to serotonin by drugs. Am J Physiol 1953 Sep;174(3):436-444.

(106) Blier P. Selective Activation of Postsynaptic 5-HT1A Receptors Induces Rapid Antidepressant Response. 1997(- 5):- 333.

(107) Shiah I. Cortisol, hypothermic, and behavioral responses to ipsapirone in patients with bipolar depression and normal controls. 1998(- 0302-282X (Print); - 0302-282X (Linking)).

(108) Goodwin G. The pharmacology of the hypothermic response in mice to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). A model of presynaptic 5-HT1 function. Psychopharmacology (Berl). 1987;91(4):506-11.

(109) Hjorth S. Hypothermia in the rat induced by the potent serotoninergic agent 8-OH-DPAT. J Neural Transm. 1985;61(1-2):131-5.

(110) Thomas DR, Melotto S, Massagrande M, Gribble AD, Jeffrey P, Stevens AJ, et al. SB-656104-A, a novel selective 5-HT7 receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. Br J Pharmacol 2003;139(4):705-714.

(111) Berthoud H. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 2002 6;26(4):393-428.

(112) Tecott L. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT2c serotonin receptors. 1995(- 6522):- 542.

(113) Gross S, Garofalo DC, Balderes DA, Mastracci TL, Dias JM, Perlmann T, et al. Lmx1a functions in intestinal serotonin-producing enterochromaffin cells downstream of Nkx2.2. Development 2016 The Company of Biologists Ltd.

(114) Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, et al. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 Mar 3;106(9):3408-3413.

(115) BULBRING E, CREMA A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. Br J Pharmacol Chemother 1958 Dec;13(4):444-457.

(116) Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science 2004 Jul 9;305(5681):217.

(117) Hirasawa M, Nakayama M, Kim SK, Hase T, Knaff DB. Chemical modification studies of tryptophan, arginine and lysine residues in maize chloroplast ferredoxin:sulfite oxidoreductase. Photosynth Res 2005 Dec;86(3):325-336.

(118) Barone P, Zhang XH, Widholm JM. Tryptophan and indole analog mediated plastid transformation. Methods Mol Biol 2014;1132:187-203.

(119) Blomstrand E, Møller K, Secher NH, Nybo L. Effect of carbohydrate ingestion on brain exchange of amino acids during sustained exercise in human subjects. Acta Physiol Scand 2005;185(3):203-209.

(120) McMenamy RH, Oncley JL. The Specific Binding of l-Tryptophan to Serum Albumin. Journal of Biological Chemistry 1958 December 01;233(6):1436-1447.

(121) Curzon G, Knott PJ. Effects on plasma and brain tryptophan in the rat of drugs and hormones that influence the concentration of underestified fatty acid in the plasma. Br J Pharmacol 1974;50(2):197-204.

(122) Knott PJ, Curzon G. Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. Nature 1972 Oct 20;239(5373):452-453.

(123) Piesiewicz A, Kedzierska U, Turkowska E, Adamska I, Majewski PM. Seasonal postembryonic maturation of the diurnal rhythm of serotonin in the chicken pineal gland. Chronobiol Int 2015 Feb;32(1):59-70.

(124) Tohmola N, Johansson A, Sane T, Renkonen R, Hämäläinen E, Itkonen O. Transient elevation of serum 5-HIAA by dietary serotonin and distribution of 5-HIAA in serum protein fractions. Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine 2015 July 01;52(4):428-433.

(125) Fernstrom JD. Diet-induced changes in plasma amino acid pattern: effects on the brain uptake of large neutral amino acids, and on brain serotonin synthesis. J Neural Transm Suppl 1979;(15)(15):55-67.

(126) Sachs BD, Rodriguiz RM, Siesser WB, Kenan A, Royer EL, Jacobsen JP, et al. The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress. Int J Neuropsychopharmacol 2013 Oct;16(9):2081-2094.

(127) Bethea CL, Coleman K, Phu K, Reddy AP, Phu A. Relationships between androgens, serotonin gene expression and innervation in male macaques. Neuroscience 2014 Aug 22;274:341-356.

(128) Hiroi R, Handa RJ. Estrogen receptor-beta regulates human tryptophan hydroxylase-2 through an estrogen response element in the 5' untranslated region. J Neurochem 2013 Nov;127(4):487-495.

(129) Nordlind K, Azmitia EC, Slominski A. The skin as a mirror of the soul: exploring the possible roles of serotonin. Exp Dermatol 2008;17(4):301-311.

(130) Hong YP, Lee HC, Kim HT. Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. J Exerc Nutrition Biochem 2015 Mar;19(1):11-18.

(131) Buras A, Waszkiewicz N, Szulc A. Depression and inflammation in rheumatic diseases. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2016 Mar 4;70:162-168.

(132) Slominski A, Wortsman J, Tobin DJ. The cutaneous serotoninergic/melatoninergic system: securing a place under the sun. The FASEB Journal 2005 February 01;19(2):176-194.

(133) Patrick RP, Ames BN. Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behavior. FASEB J 2015 Jun;29(6):2207-2222.

(134) Hasan M, Seo JE, Rahaman KA, Kang MJ, Jung BH, Kwon OS. Increased levels of brain serotonin correlated with MMP-9 activity and IL-4 levels resulted in severe experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in obese mice. Neuroscience 2016 Jan 25.

(135) Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. Chem Rev 2008;108(5):1614-1641.

(136) Mockus SM, Vrana KE. Advances in the molecular characterization of tryptophan hydroxylase. J Mol Neurosci 1998 Jun;10(3):163-179.

(137) GADDUM JH, PICARELLI ZP. TWO KINDS OF TRYPTAMINE RECEPTOR. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy 1957;12(3):323-328.

(138) Peroutka SJ, Snyder SH. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. Mol Pharmacol 1979 Nov;16(3):687-699.

(139) Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL. Discrimination of Multiple [3H]5-Hydroxytryptamine Binding Sites by the Neuroleptic Spiperone in Rat Brain. J Neurochem 1981;36(1):220-226.

(140) Middlemiss DN, Fozard JR. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT1 recognition site. Eur J Pharmacol 1983 20 May 1983;90(1):151-153.

(141) Zifa E, Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. Pharmacological Reviews 1992 September 01;44(3):401-458.

(142) Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine Receptors. J Neurochem 1993;60(2):408-416.

(143) Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). Pharmacol Rev 1994;46(2):157-203.

(144) Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacol Ther 2001;92(2-3):179-212.

(145) Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, et al. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. Nature 1997 May 15;387(6630):303-308.

(146) Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: Fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell Tissue Res 2006;326(2):553-572.

(147) Bender E, Pindon A, Van Oers I, Zhang Y, Gommeren W, Verhasselt P, et al. Structure of the Human Serotonin 5-HT4 Receptor Gene and Cloning of a Novel 5-HT4 Splice Variant. J Neurochem 2000;74(2):478-489.

(148) Hiroi T, Hayashi-Kobayashi N, Nagumo S, Ino M, Okawa Y, Aoba A, et al. Identification and Characterization of the Human Serotonin-4 Receptor Gene Promoter. Biochem Biophys Res Commun 2001 11/30;289(2):337-344.

(149) Adham N. The cloned human 5-HT1E receptor couples to inhibition and activation of adenylyl cyclase via two distinct pathways in transfected BS-C-1 cells. Neuropharmacology. 1994 Mar-Apr;33(3-4):403-10.

(150) Adham N. Cloning of another human serotonin receptor (5-HT1F): a fifth 5-HT1 receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993(- 2):- 408.

(151) Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, Bockaert J. A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. Molecular Pharmacology 1988 December 01;34(6):880-887.

(152) Bockaert J, Sebben M, Dumuis A. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine4(5-HT4) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives. Molecular Pharmacology 1990 March 01;37(3):408-411.

(153) Zgombick JM, Beck SG, Mahle CD, Craddock-Royal B, Maayani S. Pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein(S) couple adenosine A1 and 5-hydroxytryptamine1A receptors to the same effector systems in rat hippocampus: biochemical and electrophysiological studies. Mol Pharmacol 1989 Apr;35(4):484-494.

(154) Doupnik CA, Davidson N, Lester HA, Kofuji P. RGS proteins reconstitute the rapid gating kinetics of gbetagamma-activated inwardly rectifying K+ channels. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Sep 16;94(19):10461-10466.

(155) Doupnik CA, Dessauer CW, Slepak VZ, Gilman AG, Davidson N, Lester HA. Time resolved kinetics of direct G beta 1 gamma 2 interactions with the carboxyl terminus of Kir3.4 inward rectifier K+ channel subunits. Neuropharmacology 1996;35(7):923-931.

(156) Kaumann AJ. A 5-HT4-like receptor in human right atrium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1991 Aug;344(2):150-9.

(157) Steward LJ, Ge J, Stowe RL, Brown DC, Bruton RK, Stokes PRA, et al. Ability of 5-HT4 receptor ligands to modulate rat striatal dopamine release in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 1996;117(1):55-62.

(158) Irving HR, Tan YY, Tochon-Danguy N, Liu H, Chetty N, Desmond PV, et al. Comparison of 5-HT4 and 5-HT7 receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. Life Sci 2007 3/6;80(13):1198-1205.

(159) Tamir H. Serotonergic signalling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT2 receptors in the secretion and action of serotonin. Synapse. 1992;Oct;12(2):155-168.

(160) Wainscott DB, Cohen ML, Schenck KW, Audia JE, Nissen JS, Baez M, et al. Pharmacological characteristics of the newly cloned rat 5-hydroxytryptamine2F receptor. Molecular Pharmacology 1993 March 01;43(3):419-426.

(161) Berg KA, Maayani S, Clarke WP. 5-hydroxytryptamine2C receptor activation inhibits 5-hydroxytryptamine1B-like receptor function via arachidonic acid metabolism. Molecular Pharmacology 1996 October 01;50(4):1017-1023.

(162) Kurscheid-Reich D. Serotonin activates phospholipase D in rat mesangial cells. American Journal of Physiology. 1995;Jun;268(6 Pt 2):997-1003.

(163) Cadogan AK, Kendall DA, Marsden CA. Serotonin 5-HT1A Receptor Activation Increases Cyclic AMP Formation in the Rat Hippocampus In Vivo. J Neurochem 1994;62(5):1816-1821.

(164) Weiss S, Sebben M, Kemp DE, Bockaert J. Serotonin 5-HT1 receptors mediate inhibition of cyclic AMP production in neurons. Eur J Pharmacol 1986 1/21;120(2):227-230.

(165) Leone M. 5-HT1A receptor hypersensitivity in migraine is suggested by the m-chlorophenylpiperazine test. 1998(- 0959-4965 (Print); - 0959-4965 (Linking)).

(166) Edagawa Y, Saito H, Abe K. 5-HT1A receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. Eur J Pharmacol 1998 5/22;349(2–3):221-224.

(167) Ahlenius S, Larsson K. Antagonism by pindolol, but not betaxolol, of 8-OH-DPAT-induced facilitation of male rat sexual behavior. 1989.

(168) Parks C. Increased anxiety of mice lacking the serotonin(1A) receptor. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998(- 18):- 10734.

(169) Ramboz S. Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998(- 24):- 14476.

(170) Tunnicliff G. Molecular Basis of Buspirone's Anxiolytic Action. Pharmacol Toxicol 1991;69(3):149-156.

(171) Bantick RA, Deakin JFW, Grasby PM. The 5-HT1A receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? Journal of Psychopharmacology 2001 January 01;15(1):37-46.

(172) Morin N, Morissette M, Grégoire L, Rajput A, Rajput AH, Di Paolo T. Contribution of brain serotonin subtype 1B receptors in levodopa-induced motor complications. Neuropharmacology 2015 12;99:356-368.

(173) Riahi G, Morissette M, Samadi P, Parent M, Di Paolo T. Basal ganglia serotonin 1B receptors in parkinsonian monkeys with L-DOPA-induced dyskinesia. Biochem Pharmacol 2013 10/1;86(7):970-978.

(174) Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Olesen IJ, Edvinsson L. Contractile 5-HT1B receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry. Br J Pharmacol 1999;128(6):1133-1140.

(175) Bouchelet I, Cohen Z, Case B, Séguéla P, Hamel E. Differential expression of sumatriptan-sensitive 5-hydroxytryptamine receptors in human trigeminal ganglia and cerebral blood vessels. Molecular Pharmacology 1996 August 01;50(2):219-223.

(176) Schoeffter P. Functional serotonin 5-HT1D receptors and 5-HT1D beta receptor mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells. 1995(- 0028-1298 (Print); - 0028-1298 (Linking)).

(177) Bouhelal R, Smounya L, Bockaert J. 5-HT1B receptors are negatively coupled with adenylate cyclase in rat substantia nigra. Eur J Pharmacol 1988 7 July 1988;151(2):189-196.

(178) Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ. Opposing roles for 5-HT1B and 5-HT3 receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. Br J Pharmacol 1992;106(1):139-142.

(179) Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith DG. 5-HT1 agonists reduce 5-hydroxytryptamine release in rat hippocampus in vivo as determined by brain microdialysis. Br J Pharmacol 1989;96(2):283-290.

(180) Hoskin KL, Lambert GA, Donaldson C, Zagami AS. The 5-hydroxytryptamine1B/1D/1F receptor agonists eletriptan and naratriptan inhibit trigeminovascular input to the nucleus tractus solitarius in the cat. Brain Res 2004 2/13;998(1):91-99.

(181) Amrutkar D. mRNA expression of 5-hydroxytryptamine 1B, 1D, and 1F receptors and their role in controlling the release of calcitonin gene-related peptide in the rat trigeminovascular system. 2012(- 1872-6623 (Electronic); - 0304-3959 (Linking)).

(182) Waeber C. Visualization of a novel serotonin recognition site (5-HT1D) in the human brain by autoradiography. 1988(- 0304-3940 (Print); - 0304-3940 (Linking)).

(183) Bruinvels A. Localization of 5-HT1B, 5-HT1D alpha, 5-HT1E and 5-HT1F receptor messenger RNA in rodent and primate brain. Eur J Pharmacol. 1992 Nov 2;227(3):357-9.

(184) Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS. Differential coupling of 5-HT1 receptors to G proteins of the Gi family. Br J Pharmacol 2002;136(7):1072-1078.

(185) Davidson C, Stamford JA. Serotonin efflux in the rat ventral lateral geniculate nucleus assessed by fast cyclic voltammetry is modulated by 5-HT1B and 5-HT1D autoreceptors. Neuropharmacology 1996;35(11):1627-1634.

(186) Raiteri M, Maura G, Bonanno G, Pittaluga A. Differential pharmacology and function of two 5-HT1 receptors modulating transmitter release in rat cerebellum. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1986 May 01;237(2):644-648.

(187) Maura G. Glutamate release in human cerebral cortex and its modulation by 5-hydroxtryptamine acting at h 5-HT(1D) receptors. - British Journal of Pharmacology 1998 Jan;123(1):45-50.

(188) Molderings G. Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT1D alpha receptors in human atrium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1996 Feb;353(3):272-80.

(189) Lovenberg T. Molecular cloning and functional expression of 5-HT1E-like rat and human 5-hydroxytryptamine receptor genes. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993(- 6):- 2184.

(190) Barone P, Jordan D, Atger F, Kopp N, Fillion G. Quantitative autoradiography of 5-HT1D and 5-HT1E binding sites labelled by [3H]5-HT, in frontal cortex and the hippocampal region of the human brain. Brain Res 1994 28 February 1994;638(1):85-94.

(191) Pascual J. [3H]Sumatriptan binding sites in human brain: regional-dependent labelling of 5-HT1D and 5-HT1F receptors. Eur J Pharmacol. 1996 Jan 11;295(2-3):271-4.

(192) Castro M. Differential distribution of [3H]sumatriptan binding sites (5-HT1B, 5-HT1D and 5-HT1F receptors) in human brain: focus on brainstem and spinal cord. Neuropharmacology. 1997 Apr-May;36(4-5):535-42.

(193) Adham N. Cloning and characterization of the guinea pig 5-HT1F receptor subtype: a comparison of the pharmacological profile to the human species homolog. Neuropharmacology. 1997 Apr-May;36(4-5):569-76.

(194) Ramadan N, Skljarevski V, Phebus L, Johnson K. 5-HT1F Receptor Agonists in Acute Migraine Treatment: A Hypothesis. Cephalalgia 2003 October 01;23(8):776-785.

(195) Conn PJ, Sanders-Bush E. Selective 5HT-2 antagonists inhibit serotonin stimulated phosphatidylinositol metabolism in cerebral cortex. Neuropharmacology. 1984;Aug;23(8):993-996.

(196) Pritchett D. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. - The EMBO Journal 1988(- 13):- 4135.

(197) Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Clarke WP. Pleiotropic behavior of 5-HT2A and 5-HT2C receptor agonists. Ann N Y Acad Sci 1998 Dec 15;861:104-110.

(198) Pazos A, Cortés R, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res 1985 4 November 1985;346(2):231-249.

(199) Guillet-Deniau I, Burnol A, Girard J. Identification and Localization of a Skeletal Muscle Secrotonin 5-HT2A Receptor Coupled to the Jak/STAT Pathway. Journal of Biological Chemistry 1997 June 06;272(23):14825-14829.

(200) Hajduch E, Dombrowski L, Darakhshan F, Rencurel F, Marette A, Hundal HS. Biochemical Localisation of the 5-HT2A(serotonin) Receptor in Rat Skeletal Muscle. Biochem Biophys Res Commun 1999 4/13;257(2):369-372.

(201) Ellwood AJ, Curtis MJ. Involvement of 5-HT1B/1D and 5-HT2A receptors in 5-HT-induced contraction of endothelium-denuded rabbit epicardial coronary arteries. Br J Pharmacol 1997;122(5):875-884.

(202) Kuemmerle JF, Murthy KS, Grider JR, Martin DC, Makhlouf GM. Coexpression of 5-HT2A and 5-HT4 receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. Gastroenterology 1995 12;109(6):1791-1800.

(203) Garnovskaya MN, Nebigil CG, Arthur JM, Spurney RF, Raymond JR. 5-Hydroxytryptamine2A receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. Molecular Pharmacology 1995 August 01;48(2):230-237.

(204) Cook EH, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan S, Leventhal BL. Primary Structure of the Human Platelet Serotonin 5-HT2A Receptor: Identity with Frontal Cortex Serotonin 5-HT2A Receptor. J Neurochem 1994;63(2):465-469.

(205) Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T. Functions of 5-HT2A receptor and its antagonists in the cardiovascular system. Pharmacol Ther 2004 10;104(1):59-81.

(206) Kaumann A. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. Pharmacol Ther. 2006;Sep;111(3):674-706.

(207) Gray JA, Roth BL. Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT2A receptors by agonists and antagonists. Brain Res Bull 2001 11/15;56(5):441-451.

(208) Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Possible involvement of 5-HT and 5-HT2 receptors in acceleration of gastrointestinal transit by escin Ib in mice. Life Sci 2000 4/28;66(23):2233-2238.

(209) Brandt SD, Kavanagh PV, Westphal F, Stratford A, Elliott SP, Hoang K, et al. Return of the lysergamides. Part I: Analytical and behavioural characterization of 1-propionyl-d-lysergic acid diethylamide (1P-LSD). Drug Testing and Analysis 2015:n/a-n/a.

(210) Buchborn T, Schröder H, Höllt V, Grecksch G. Repeated lysergic acid diethylamide in an animal model of depression: Normalisation of learning behaviour and hippocampal serotonin 5-HT2 signalling. Journal of Psychopharmacology 2014 June 01;28(6):545-552.

(211) Welsh D. Proliferation and signaling in fibroblasts: role of 5-hydroxytryptamine2A receptor and transporter. - Am J Respir Crit Care Med 2004(- 3):- 252.

(212) Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeño L, Tamargo J, et al. Serotonin Inhibits Voltage-Gated K+ Currents in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells: Role of 5-HT2A Receptors, Caveolin-1, and KV1.5 Channel Internalization. Circulation Research 2006 April 14;98(7):931-938.

(213) Boehme SA, Lio FM, Sikora L, Pandit TS, Lavrador K, Rao SP, et al. Cutting Edge: Serotonin Is a Chemotactic Factor for Eosinophils and Functions Additively with Eotaxin. The Journal of Immunology 2004 September 15;173(6):3599-3603.

(214) Delaney C, Gien J, Roe G, Isenberg N, Kailey J, Abman SH. Serotonin contributes to high pulmonary vascular tone in a sheep model of persistent pulmonary hypertension of the newborn. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology 2013 American Physiological Society;304(12):L894-L901.

(215) Sullivan L. Atypical antipsychotics and inverse agonism at 5-HT_2 receptors. - Current Pharmaceutical Design 2015(- 26):- 3732.

(216) Tullis B. Sarpogrelate, a 5-HT2A Receptor Antagonist, Protects the Retina From Light-Induced Retinopathy. - Cerebrovascular Diseases 2015(- 2-3):- 264.

(217) Duxon MS, Flanigan TP, Reavley AC, Baxter GS, Blackburn TP, Fone KCF. Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system. Neuroscience 1997 1;76(2):323-329.

(218) Choi D, Maroteaux L. Immunohistochemical localisation of the serotonin 5-HT2B receptor in mouse gut, cardiovascular system, and brain. FEBS Lett 1996 8/5;391(1–2):45-51.

(219) Bonhaus DW, Bach C, DeSouza A, Salazar FHR, Matsuoka BD, Zuppan P, et al. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamine2B (5-HT2b) receptor gene products: comparison with 5-HT2a and 5-HT2c receptors. Br J Pharmacol 1995;115(4):622-628.

(220) Borman RA, Tilford NS, Harmer DW, Day N, Ellis ES, Sheldrick RLG, et al. 5-HT2B receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. Br J Pharmacol 2002;135(5):1144-1151.

(221) Tadros SF, D'Souza M, Zettel ML, Zhu X, Lynch-Erhardt M, Frisina RD. Serotonin 2B receptor: Upregulated with age and hearing loss in mouse auditory system. Neurobiol Aging 2007 7;28(7):1112-1123.

(222) Day M, Olson PA, Platzer J, Striessnig J, Surmeier DJ. Stimulation of 5-HT2 Receptors in Prefrontal Pyramidal Neurons Inhibits Cav1.2 L-Type Ca2+Currents Via a PLCŒ≤/IP3/Calcineurin Signaling Cascade. J Neurophysiol 2002 American Physiological Society;87(5):2490-2504.

(223) Ishida T. Nitric oxide is produced via 5-HT1B and 5-HT2B receptor activation in human coronary artery endothelial cells. Kobe J Med Sci. 1998;Apr;44(2):51-63.

(224) Florian JA, Watts SW. Integration of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Activation in Vascular 5-Hydroxytryptamine2A Receptor Signal Transduction. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1998 January 01;284(1):346-355.

(225) Vane JR. The relative activities of some tryptamine analogues on the isolated rat stomach strip preparation. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy 1959;14(1):87-98.

(226) Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, et al. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. The EMBO Journal. 1992;11(9):3481-3487.

(227) Foguet M. Structure of the mouse 5-HT1C, 5-HT2 and stomach fundus serotonin receptor genes. Neuroreport. 1992;Apr;3(4):345-348.

(228) Nebigil C. Serotonin 2B receptor is required for heart development. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000(- 17):- 9508.

(229) Choi DS, Ward SJ, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. 5-HT2B receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardiac cells. Development 1997 The Company of Biologists Ltd;124(9):1745-1755.

(230) Jaffre F, Callebert J, Sarre A, Etienne N, Nebigil CG, Launay JM, et al. Involvement of the serotonin 5-HT2B receptor in cardiac hypertrophy linked to sympathetic stimulation: control of interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha cytokine production by ventricular fibroblasts. Circulation 2004 Aug 24;110(8):969-974.

(231) Fitzgerald L,W., Iyer ,Geeta, Conklin D,S., Krause C,M., Marshall ,Anne, Patterson J,P., et al. Messenger RNA Editing of the Human Serotonin 5-HT2C Receptor. 1999.

(232) Yagaloff KA, Hartig PR. 125I-lysergic acid diethylamide binds to a novel serotonergic site on rat choroid plexus epithelial cells. J Neurosci 1985 Dec;5(12):3178-3183.

(233) Abramowski D, Rigo M, Duc D, Hoyer D, Staufenbiel M. Localization of the 5-hydroxytryptamine2C receptor protein in human and rat brain using specific antisera. Neuropharmacology 1995 Dec;34(12):1635-1645.

(234) Chang M, Zhang L, Tam JP, Sanders-Bush E. Dissecting G Protein-coupled Receptor Signaling Pathways with Membrane-permeable Blocking Peptides: Endogenous 5-HT2c receptors in choroid plexus epithelial cells. Journal of Biological Chemistry 2000 March 10;275(10):7021-7029.

(235) Pazos A. The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterization of a new type of serotonin recognition site. European Journal of Pharmacology 1984;Nov 27(106(3)):539-546.

(236) Pasqualetti M, Ori M, Castagna M, Marazziti D, Cassano GB, Nardi I. Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain. Neuroscience 1999 5;92(2):601-611.

(237) Hung BCP, Loo DDF, Wright EM. Regulation of mouse choroid plexus apical Cl− and K+ channels by serotonin. Brain Res 1993 7/23;617(2):285-295.

(238) Kennett GA, Whitton P, Shah K, Curzon G. Anxiogenic-like effects of mCPP and TFMPP in animal models are opposed by 5-HT1C receptor antagonists. Eur J Pharmacol 1989 May 30;164(3):445-454.

(239) Kennett GA, Curzon G. Evidence that mCPP may have behavioural effects mediated by central 5-HT1C receptors. Br J Pharmacol 1988;94(1):137-147.

(240) Curzon G, Kennett GA. m-CPP: a tool for studying behavioural responses associated with 5-HT1c receptors. Trends Pharmacol Sci 1990 May;11(5):181-182.

(241) Brewerton TD, Murphy DL, Mueller EA, Jimerson DC. Induction of migrainelike headaches by the serotonin agonist m-chlorophenylpiperazine. Clinical Pharmacology & Therapeutics 1988;43(6):605-609.

(242) Bubar MJ, Cunningham KA. Serotonin 5-HT2A and 5-HT2C receptors as potential targets for modulation of psychostimulant use and dependence. Curr Top Med Chem 2006;6(18):1971-1985.

(243) Muller CP, Carey RJ. Intracellular 5-HT 2C-receptor dephosphorylation: a new target for treating drug addiction. Trends Pharmacol Sci 2006 Sep;27(9):455-458.

(244) Hackler EA, Turner GH, Gresch PJ, Sengupta S, Deutch AY, Avison MJ, et al. 5-Hydroxytryptamine2C Receptor Contribution to m-Chlorophenylpiperazine and N-Methyl-β-carboline-3-carboxamide-Induced Anxiety-Like Behavior and Limbic Brain Activation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2007 March 01;320(3):1023-1029.

(245) Harada K, Aota M, Inoue T, Matsuda R, Mihara T, Yamaji T, et al. Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT2C receptor antagonist FR260010: A comparison with diazepam and buspirone. Eur J Pharmacol 2006 12/28;553(1–3):171-184.

(246) Hamblin MW, Guthrie CR, Kohen R, Heidmann DE. Gs protein-coupled serotonin receptors: receptor isoforms and functional differences. Ann N Y Acad Sci 1998 Dec 15;861:31-37.

(247) Varnas K, Halldin C, Pike VW, Hall H. Distribution of 5-HT4 receptors in the postmortem human brain--an autoradiographic study using [125I]SB 207710. Eur Neuropsychopharmacol 2003 Aug;13(4):228-234.

(248) Suwa B, Bock N, Preusse S, Rothenberger A, Manzke T. Distribution of serotonin 4(a) receptors in the juvenile rat brain and spinal cord. J Chem Neuroanat 2014 Jan;55:67-77.

(249) Hoffman JM, Tyler K, MacEachern SJ, Balemba OB, Johnson AC, Brooks EM, et al. Activation of colonic mucosal 5-HT(4) receptors accelerates propulsive motility and inhibits visceral hypersensitivity. Gastroenterology 2012 Apr;142(4):844-854.e4.

(250) Takaki M, Goto K, Kawahara I. The 5-hydroxytryptamine 4 Receptor Agonist-induced Actions and Enteric Neurogenesis in the Gut. J Neurogastroenterol Motil 2014 Jan;20(1):17-30.

(251) Ouadid H, Seguin J, Dumuis A, Bockaert J, Nargeot J. Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine4 receptors. Molecular Pharmacology 1992 February 01;41(2):346-351.

(252) Lefebvre H. Effect of serotonin4 (5-HT4) receptor agonists on aldosterone secretion in idiopathic hyperaldosteronism. 2000(- 0743-5800 (Print); - 0743-5800 (Linking)).

(253) Kemp A, Manahan-Vaughan D. The 5-Hydroxytryptamine4 Receptor Exhibits Frequency-dependent Properties in Synaptic Plasticity and Behavioural Metaplasticity in the Hippocampal CA1 Region In vivo. Cerebral Cortex 2005 July 01;15(7):1037-1043.

(254) Lee MJ, Cho KH, Park HM, Sung HJ, Choi S, Im W. Pharmacological profile of DA-6886, a novel 5-HT4 receptor agonist to accelerate colonic motor activity in mice. Eur J Pharmacol 2014 Jul 15;735:115-122.

(255) Lezoualc'h F, Steplewski K, Sartiani L, Mugelli A, Fischmeister R, Bril A. Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT4 receptor isoforms, calcium handling proteins and ion channels in human atrial fibrillation. Biochem Biophys Res Commun 2007 5/25;357(1):218-224.

(256) Lelong V, Dauphin F, Boulouard M. RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. Neuropharmacology 2001 9;41(4):517-522.

(257) Lamirault L, Simon H. Enhancement of place and object recognition memory in young adult and old rats by RS 67333, a partial agonist of 5-HT4 receptors. Neuropharmacology 2001 12;41(7):844-853.

(258) Gerard C. Quantitative RT-PCR distribution of serotonin 5-HT6 receptor mRNA in the central nervous system of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. 1996(- 0887-4476 (Print); - 0887-4476 (Linking)).

(259) Meneses A, Manuel-Apolinar L, Castillo C, Castillo E. Memory consolidation and amnesia modify 5-HT6 receptors expression in rat brain: an autoradiographic study. Behav Brain Res 2007 Mar 12;178(1):53-61.

(260) Monsma FJ, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR. Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. Molecular Pharmacology 1993 March 01;43(3):320-327.

(261) Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivellacombe J, Diaz J, Leurs R, et al. A Novel Rat Serotonin (5-HT6) Receptor: Molecular Cloning, Localization and Stimulation of cAMP Accumulation. Biochem Biophys Res Commun 1993 5/28;193(1):268-276.

(262) Bourson A, Boess FG, Bös M, Sleight AJ. Involvement of 5-HT6 receptors in nigro-striatal function in rodents. Br J Pharmacol 1998;125(7):1562-1566.

(263) Schechter L. Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT6 receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. 2008(- 6150):- 746.

(264) Dawson LA, Nguyen HQ, Li P. In vivo effects of the 5-HT6 antagonist SB-271046 on striatal and frontal cortex extracellular concentrations of noradrenaline, dopamine, 5-HT, glutamate and aspartate. Br J Pharmacol 2000;130(1):23-26.

(265) Mitchell ES, Neumaier JF. 5-HT6 receptors: a novel target for cognitive enhancement. Pharmacol Ther 2005 12;108(3):320-333.

(266) Wesołowska A, Nikiforuk A. Effects of the brain-penetrant and selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885 in animal models of anxiety and depression. Neuropharmacology 2007 4;52(5):1274-1283.

(267) Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, Witkin JM, Nomikos GG, et al. Biochemical and Behavioral Evidence for Antidepressant-Like Effects of 5-HT6 Receptor Stimulation. The Journal of Neuroscience 2007 April 11;27(15):4201-4209.

(268) East SZ, Burnet PW, Leslie RA, Roberts JC, Harrison PJ. 5-HT6 receptor binding sites in schizophrenia and following antipsychotic drug administration: autoradiographic studies with [125I]SB-258585. Synapse 2002 Sep 1;45(3):191-199.

(269) Fisas A, Codony X, Romero G, Dordal A, Giraldo J, Mercé R, et al. Chronic 5-HT6 receptor modulation by E-6837 induces hypophagia and sustained weight loss in diet-induced obese rats. Br J Pharmacol 2006;148(7):973-983.

(270) Ruat M. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT7) activating cAMP formation. - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993(- 18):- 8547.

(271) Erdmann J. The human serotonin 7 (5-HT7) receptor gene: genomic organization and systematic mutation screening in schizophrenia and bipolar affective disorder. 1996(- 1359-4184 (Print); - 1359-4184 (Linking)).

(272) Heidmann DEA, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-Hydroxytryptamine7 (5-HT7) Receptor Isoforms in Human and Rat Produced by Alternative Splicing: Species Differences Due to Altered Intron-Exon Organization. J Neurochem 1997;68(4):1372-1381.

(273) Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. Journal of Biological Chemistry 1993 November 05;268(31):23422-23426.

(274) Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, et al. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. Neuron 1993 9;11(3):449-458.

(275) Shen Y, Monsma FJ, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine7 serotonin receptor subtype. Journal of Biological Chemistry 1993 August 25;268(24):18200-18204.

(276) Stowe RL, Barnes NM. Selective labelling of 5-HT7 receptor recognition sites in rat brain using [3H]5-carboxamidotryptamine. Neuropharmacology 1998 12/1;37(12):1611-1619.

(277) Bickmeyer U, Heine M, Manzke T, Richter DW. Differential modulation of Ih by 5-HT receptors in mouse CA1 hippocampal neurons. Eur J Neurosci 2002;16(2):209-218.

(278) Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M. Localization of 5-HT7 receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. J Chem Neuroanat 2001 1;21(1):63-73.

(279) Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP. Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. Br J Pharmacol 1997;120(3):509-515.

(280) Shimizu M, Nishida A, Zensho H, Yamawaki S. Chronic antidepressant exposure enhances 5-hydroxytryptamine7 receptor-mediated cyclic adenosine monophosphate accumulation in rat frontocortical astrocytes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 1996 December 01;279(3):1551-1558.

(281) Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, Sutcliffe JG. No hypothermic response to serotonin in 5-HT7 receptor knockout mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003 February 04;100(3):1375-1380.

(282) Wesołowska A, Tatarczyńska E, Nikiforuk A, Chojnacka-Wójcik E. Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT7 receptor antagonist in the forced swimming test in mice. Eur J Pharmacol 2007 1/19;555(1):43-47.

(283) Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K, Rosahl TW, Beer MS, Stanton JA, et al. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT7 receptor suggest therapeutic potential in depression. Neuropharmacology 2005 3;48(4):492-502.

(284) Francken BJB, Jurzak M, Vanhauwe JFM, Luyten WHML, Leysen JE. The human 5-ht5A receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. Eur J Pharmacol 1998 11/20;361(2–3):299-309.

(285) Grailhe R, Waeber C, Dulawa SC, Hornung JP, Zhuang X, Brunner D, et al. Increased Exploratory Activity and Altered Response to LSD in Mice Lacking the 5-HT5A Receptor. Neuron 1999 3;22(3):581-591.

(286) Pasqualetti M. Distribution of the 5-HT5A serotonin receptor mRNA in the human brain. 1998(- 0169-328X (Print); - 0169-328X (Linking)).

(287) Carson M. The 5HT5A serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. Glia. 1996;Aug;17(4):317-326.

(288) Francken BJB, Josson K, Lijnen P, Jurzak M, Luyten WHML, Leysen JE. Human 5-Hydroxytryptamine5A Receptors Activate Coexpressed Gi and Go Proteins inSpodoptera frugiperda 9 Cells. Molecular Pharmacology 2000 May 01;57(5):1034-1044.

(289) Gannon RL, Peglion JL, Millan MJ. Differential influence of selective 5-HT5A vs 5-HT1A, 5-HT1B, or 5-HT2C receptor blockade upon light-induced phase shifts in circadian activity rhythms: interaction studies with citalopram. Eur Neuropsychopharmacol 2009 Dec;19(12):887-897.

(290) Kassai F, Schlumberger C, Kedves R, Pietraszek M, Jatzke C, Lendvai B, et al. Effect of 5-HT5A antagonists in animal models of schizophrenia, anxiety and depression. Behav Pharmacol 2012 Aug;23(4):397-406.

(291) Yamazaki M, Harada K, Yamamoto N, Yarimizu J, Okabe M, Shimada T, et al. ASP5736, a novel 5-HT5A receptor antagonist, ameliorates positive symptoms and cognitive impairment in animal models of schizophrenia. Eur Neuropsychopharmacol 2014 Oct;24(10):1698-1708.

(292) Derkach V, Suprenant A, North RA. 5-HT3 receptors are membrane ion channels. Nature 1989;339(6227):706-708.

(293) Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, Dougherty DA. Cation-p interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT3A) and nicotinic acetylcholine receptors: The anomalous binding properties of nicotine. Biochemistry 2002;41(32):10262-10269.

(294) Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. Science 1991;254(5030):432-437.

(295) Miyazawa A. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. 2003(- 6943):- 949.

(296) Yakel JL, Jackson MB. 5-HT3 receptors mediate rapid responses in cultured hippocampus and a clonal cell line. Neuron 1988;1(7):615-621.

(297) Kilpatrick G. Identification and distribution of 5-HT3 receptors in rat brain using radioligand binding. 1987(- 6150):- 746.

(298) Parker RMC, Barnes JM, Ge J, Barber PC, Barnes NM. Autoradiographic distribution of [3H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT3 receptors in human brain. J Neurol Sci 1996;144(1-2):119-127.

(299) Nitta Y, Nishibori M, Iwagaki H, Yoshino T, Mori S, Sawada K, et al. Changes in serotonin dynamics in the gastrointestinal tract of colon-26 tumour-bearing mice: effects of cisplatin treatment. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2001 Oct;364(4):329-334.

(300) Hawthorn J, Ostler KJ, Andrews PL. The role of the abdominal visceral innervation and 5-hydroxytryptamine M-receptors in vomiting induced by the cytotoxic drugs cyclophosphamide and cis-platin in the ferret. Q J Exp Physiol 1988 Jan;73(1):7-21.

(301) Jones, Holtmann, Rodrigo, Ehsanullah, Crompton, Jacques, et al. Alosetron relieves pain and improves bowel function compared with mebeverine in female nonconstipated irritable bowel syndrome patients. Aliment Pharmacol Ther 1999;13(11):1419-1427.

(302) Delvaux M, Louvel D, Mamet J-, Campos-Oriola R, Frexinos J. Effect of alosetron on responses to colonic distension in patients with irritable bowel syndrome. Aliment Pharmacol Ther 1998;12(9):849-855.

(303) Kale-Pradhan PB, Wilhelm SM. Tegaserod for constipation-predominant irritable bowel syndrome. Pharmacotherapy 2007;27(2):267-277.

(304) O'Donohue JW, Pereira SP, Ashdown AC, Haigh CG, Wilkinson JR, Williams R. A controlled trial of ondansetron in the pruritus of cholestasis. Aliment Pharmacol Ther 2005;21(8):1041-1045.

(305) McCleane GJ, Suzuki R, Dickenson AH. Does a single intravenous injection of the 5HT3 receptor antagonist ondansetron have an analgesic effect in neuropathic pain? A double-blinded, placebo-controlled cross-over study. Anesth Analg 2003 Nov;97(5):1474-1478.

(306) Motavallian-Naeini A, Minaiyan M, Rabbani M, Mahzuni P. Anti-inflammatory effect of ondansetron through 5-HT 3 receptors on TNBS-induced colitis in rat. EXCLI J 2012;11:30-44.

(307) Hrycaj P. Serotonin type 3 receptor antagonist tropisetron in the treatment of chronic inflammatory rheumatic conditions--preliminary clinical experience. Scand J Rheumatol Suppl 2004;119:55-58.

(308) Fiebich BL, Akundi RS, Lieb K, Candelario-Jalil E, Gmeiner D, Haus U, et al. Antiinflammatory effects of 5-HT3 receptor antagonists in lipopolysaccharide-stimulated primary human monocytes. Scand J Rheumatol Suppl 2004;119:28-32.

(309) Udina M, Navines R, Egmond E, Oriolo G, Langohr K, Gimenez D, et al. Glucocorticoid Receptors, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Serotonin and Dopamine Neurotransmission are Associated with Interferon-Induced Depression. Int J Neuropsychopharmacol 2015 Dec 30.

(310) Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. Biol Psychiatry 2010 3/1;67(5):446-457.

(311) Zhang Y, Liu L, Liu YZ, Shen XL, Wu TY, Zhang T, et al. NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-Induced Depression in Mice via Neuroinflammation. Int J Neuropsychopharmacol 2015 Jan 20;18(8):10.

(312) Yu B, Becnel J, Zerfaoui M, Rohatgi R, Boulares AH, Nichols CD. Serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor activation suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced inflammation with extraordinary potency. J Pharmacol Exp Ther 2008 Nov;327(2):316-323.

(313) Duriancik DM, Hoag KA. Mistaken identity: Purified basophils likely contaminated with dendritic cells. Cytometry Part A 2014;85(7):570-572.

(314) Chirumbolo S. Commentary: The Expression of CD123 Can Decrease with Basophil Activation: Implications for the Gating Strategy of the Basophil Activation Test. Front Immunol 2016;7:10.3389/fimmu.2016.00260.

(315) MacGlashan DW, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, et al. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. The Journal of Immunology 1997 February 01;158(3):1438-1445.

(316) Didichenko SA, Spiegl N, Brunner T, Dahinden CA. IL-3 induces a Pim1-dependent antiapoptotic pathway in primary human basophils. Blood 2008 American Society of Hematology;112(10):3949-3958.

(317) Zheng X, Karsan A, Duronio V, Chu F, Walker DC, Bai TR, et al. Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits

apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. Immunology 2002 Nov;107(3):306-315.

(318) Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, et al. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation, and cytokine synthesis of human basophils. J Immunol 2011 May 1;186(9):5254-5260.

(319) Liu Y, Tian HY, Yan XL, Fan FL, Wang WP, Han JL, et al. Serotonin inhibits apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell by pERK1/2 and PDK through 5-HT1B receptors and 5-HT transporters. Cardiovascular Pathology 2013 0;22(6):451-457.

(320) Cerulo G, Tafuri S, De Pasquale V, Rea S, Romano S, Costagliola A, et al. Serotonin activates cell survival and apoptotic death responses in cultured epithelial thyroid cells. Biochimie 2014 Oct;105:211-215.

(321) Schroeder JT, MacGlashan DW,Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. Adv Immunol 2001;77:93-122.

(322) Schroeder JT, Chichester KL, Bieneman AP. Human Basophils Secrete IL-3: Evidence of Autocrine Priming for Phenotypic and Functional Responses in Allergic Disease. J Immunol 2009 Feb 15;182(4):2432-2438.

(323) Schleimer RP, MacGlashan DW,Jr, Gillespie E, Lichtenstein LM. Inhibition of basophil histamine release by anti-inflammatory steroids. II. Studies on the mechanism of action. J Immunol 1982 Oct;129(4):1632-1636.

(324) Schleimer RP, Derse CP, Friedman B, Gillis S, Plaut M, Lichtenstein LM, et al. Regulation of human basophil mediator release by cytokines. I. Interaction with antiinflammatory steroids. J Immunol 1989 Aug 15;143(4):1310-1317.

(325) Gibbs BF, Zillikens D, Grabbe J. Nerve growth factor influences IgE-mediated human basophil activation: functional properties and intracellular mechanisms compared with IL-3. Int Immunopharmacol 2005 Apr;5(4):735-747.

(326) Kleiner S, Braunstahl GJ, Rudrich U, Gehring M, Eiz-Vesper B, Luger TA, et al. Regulation of melanocortin 1 receptor in allergic rhinitis in vitro and in vivo. Clin Exp Allergy 2016 Aug;46(8):1066-1074.

(327) Ghia JE, Li N, Wang H, Collins M, Deng Y, El-Sharkawy RT, et al. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. Gastroenterology 2009 Nov;137(5):1649-1660.

(328) Shajib MS, Wang H, Kim JJ, Sunjic I, Ghia J-, Denou E, et al. Interleukin 13 and Serotonin: Linking the Immune and Endocrine Systems in Murine Models of Intestinal Inflammation. PLoS ONE 2013;8(8).

(329) Katoh N, Soga F, Nara T, Tamagawa-Mineoka R, Nin M, Kotani H, et al. Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. Clin Exp Immunol 2006 Nov;146(2):354-361.

(330) Lantz C,S., Boesiger ,Jurg, Song C,Ho, Mach ,Nicolas, Kobayashi ,Takahiko, Mulligan R,C., et al. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites.

(331) Lantz C,S., Min ,Booki, Tsai ,Mindy, Chatterjea ,Devavani, Dranoff ,Glenn, Galli S,J. IL-3 is required for increases in blood basophils in nematode infection in mice and can enhance IgE-dependent IL-4 production by basophils in vitro.

(332) Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA. Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. The Journal of Experimental Medicine 1993 March 01;177(3):605-611.

(333) Li H, Sim TC, Alam R. IL-13 released by and localized in human basophils. J Immunol 1996 Jun 15;156(12):4833-4838.

(334) MacGlashan DW,Jr, Bochner BS, Adelman DC, Jardieu PM, Togias A, McKenzie-White J, et al. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. J Immunol 1997 Feb 1;158(3):1438-1445.

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Der funktionelle Einfluss von Serotonin auf basophile Granulozyten“ unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Ulrike Raap in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Evgeni Ponimaskin vom Institut für Neurophysiologie der Medizinischen Hochschule Hannover ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Oldenburg, den 05.01.2019

Danksagung

Ich möchte gerne einigen wunderbaren Menschen danken, ohne die diese Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst einmal danke ich meiner Doktormutter **Prof. Dr. med. Ulrike Raap** für die ausgezeichnete Betreuung und konstante Motivation bei der Forschungsarbeit. Außerdem danke ich meinem Ko-Betreuer **Prof. Dr. Evgeni Ponimaskin** für seine Expertise und Beratung, sowie seiner technischen Assistentin **Beate Kaune** für die Einarbeitung in der qPCR.

Mein Dank gilt weiterhin dem **gesamten Team des Forschungslabors** des Instituts für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der MHH, insbesondere **Dr. Urda Rüdrich** für die Hilfe bei statistischer Auswertung und Editierung der Dissertation sowie ständige Ansprechbarkeit bei Fragen und **Manuela Gehring** für die Einarbeitung in die Laborarbeit und der technischen Methoden, ständige Ansprechbarkeit und seelischen Beistand. Desweiteren danke ich **Svea Kleiner**, meiner Freundin und Ko-Doktorandin, für die Einführung in den BAT und ihren Optimismus, sowie **Nicole Komrowski** für ihre technische Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt außerdem euch, meinen Großeltern Christa und Dieter Orlik, meinen Eltern Gabriele Orlik-Eisel und Ulrich Eisel, meinem Patenonkel Joachim Orlik, meinen Brüdern Richard und Paul Eisel, meinem Liebsten Jan Hendrik Groen, Familie Groen und allen meinen Freunden für eure stetige Unterstützung und den festen Glauben an mich.

Notizen

Notizen