

# **Die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Sebastian Reuter**

geb. 14.07.1978 in Wiesbaden

Aus der  
**III. Medizinischen Klinik**  
**Schwerpunkt Pneumologie**  
Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009

## Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden:

a) bereits Veröffentlicht in:

**Mast cell-derived tumor necrosis factor is essential for allergic airway disease**

**Reuter S**, Heinz A, Sieren M, Wiewrodt R, Gelfand EW, Stassen M, Buhl R, Taube C

European Respiratory Journal 2008 Apr;31(4):739-750

b) bereits zur Veröffentlichung eingereicht:

**Mast cell induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease**

weitere Publikationen:

**Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression**

Bopp T, Dehzad N, **Reuter S**, Klein M, Ulrich N, Stassen M, Schild H, Buhl R, Schmitt E, Taube C

Journal of Immunology 2009 Apr 1;182(7):4017-24

**Divergent effects of biolistic gene transfer in a mouse model of allergic airway inflammation**

Zindler E, Gehrke N, Luft C, **Reuter S**, Taube C, Finotto S, Reske-Kunz AB, Sudowe S

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2008 Jan;31(1):38-46

**Mast cells and the development of allergic airway disease**

**Reuter S**, Taube C

Journal of Occupational and Toxicology Medicine 2008, Feb 27;3 Suppl 1:S2

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Mastzelle.....	1
1.2 Mastzellen in der angeborenen Immunität.....	6
1.3 Mastzellen und ihre Funktion in der adaptiven Immunität.....	8
1.4 Asthma bronchiale.....	11
1.5 T-Zellen im Asthma bronchiale.....	14
1.6 Dendritische Zellen im Asthma bronchiale.....	15
1.7 Mastzellen im Asthma bronchiale.....	16
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	21
<b>2. Material und Methode</b>	<b>24</b>
2.1 Material.....	24
2.1.1 Laborgeräte.....	24
2.1.2 Verbrauchsgegenstände.....	25
2.1.3 Steuerungs- und Analysesoftware.....	27
2.1.4 Antikörper.....	27
2.1.4.1 FACS.....	27
2.1.4.2 ELISA.....	29
2.1.4.3 weitere Antikörper.....	29
2.1.5 ELISA-Kits.....	29
2.1.6 Chemikalien.....	29
2.1.7 Betäubungsmittel.....	31
2.1.7.1 Grundlösungen.....	31
2.1.7.2 Verbrauchsansätze.....	31
2.1.8 Puffer, Lösungen und Kulturmedien.....	31
2.1.9 Enzyme und Reagenzien.....	33
2.1.10 Zytokine.....	33
2.1.11 Histologische Reagenzien.....	34
2.1.11 Mäuse.....	34
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 ELISA.....	35
2.2.1.1 Zytokin-ELISA.....	36
2.2.1.2 Antikörper-ELISA.....	38
2.2.2 Bestimmung der lebend Zellzahl.....	39
2.2.3 Gewinnung von Seren.....	40
2.2.4 Entnahme der bronchoalveolären Lavage.....	40
2.2.5 Präparation von Lymphknoten für FACS-Analysen.....	41
2.2.6 Durchflusszytometrie.....	42
2.2.7 Zellkultur.....	45
2.2.7.1 Generierung von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark.....	45
2.2.7.2 Generierung von Mastzellen aus dem Knochenmark.....	47
2.2.8 In vitro Mastzellaktivierungsassay.....	48

2.2.9	In vitro Restimmulationsassay von Milzzellen.....	49
2.2.9.1	Präparation von Milzen.....	49
2.2.9.2	In vitro Restimmulationsassay.....	50
2.2.10	Histologie.....	51
2.2.10.1	Fixierung.....	51
2.2.10.2	Paraffin-Einbettung.....	52
2.2.10.3	Anfertigen von Schnitten.....	52
2.2.10.4	Färbungen.....	53
2.2.10.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	53
2.2.10.4.2	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung).....	54
2.2.10.4.3	Fluoreszenzfärbung von Mastzellen.....	55
2.2.10.5	Erstellen und Färben von Zytospins.....	56
2.2.11	Lungenfunktionsmessung.....	57
2.2.11.1	Invasive Messung mittels flexiVent-System.....	59
2.2.12	Versuchsmodelle.....	62
2.2.12.1	Systemisches Sensibilisierungsmodell.....	62
2.2.12.2	Mastzellrekonstitution.....	64
2.2.12.3	DC-Sensibilisierungsmodell.....	65
2.2.12.4	Migrationsversuch der Dendritischen Zellen.....	66
2.2.13	Statistische Analyse.....	67
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>68</b>
3.1	Analyse der allergischen Atemwegsentzündung nach Sensibilisierung ohne Adjuvans.....	68
3.1.1	Messung der Atemwegsüberempfindlichkeit.....	69
3.1.2	Analyse der bronchoalveolären Lavage.....	69
3.1.3	Histologische Untersuchung des Lungengewebes.....	72
3.1.4	Analyse der Sensibilisierung.....	74
3.2	Die Unterschiede in der Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung zwischen Wildtypen und mastzelldefizienten Tieren sind abhängig von Mastzellen und mastzellproduziertem TNF.....	77
3.2.1	Analyse der in vitro generierten Mastzellen.....	78
3.2.2	Untersuchung des Rekonstitutionserfolges.....	79
3.2.3	Analyse der Atemwegsinflammation.....	81
3.3	Ist in mastzelldefizienten Tieren die Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten beeinflusst?.....	85
3.3.1	Kinetikversuch.....	85
3.3.2	Analyse der Migration nach Rekonstitution.....	88
3.4	Können Mastzellen eine adaptive Immunantwort, die durch antigenbeladene DC induziert wird beeinflussen?.....	90
3.4.1	Analyse der Entzündungsreaktion.....	91
3.4.2	Analyse der trachealen Lymphknoten auf konventionelle DC.....	97
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>99</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>

<b>6. Anhang</b>	116
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	125
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	139
<b>9. Lebenslauf</b>	141

### 1. Einleitung

In Enzyklopädien, aber auch in vielen Fachbüchern, werden Mastzellen hauptsächlich als Effektorzellen einer Immunglobulin E vermittelten Wirtsabwehr gegenüber Parasiten und allergischen Reaktion gegenüber „harmlosen“ Antigenen beschrieben.

Neue Studien zeigen, dass die Mastzelle darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Modulation von angeborenen und adaptiven Immunantworten spielt. Aufgrund ihres großen Repertoires an Rezeptoren und ihrer Lokalisation in allen der Umwelt exponierten Geweben hat die Mastzelle eine wichtige Funktion als Wächterzelle der angeborenen Immunität. Untersuchungen an Modellen der Kontaktallergie und von allergischen Atemwegserkrankungen bestätigen, dass die Mastzelle entscheidend an der Initiierung dieser adaptiven Immunantworten beteiligt ist. Über die große Bandbreite an Mediatoren, die sowohl über IgE- abhängige als auch IgE- unabhängige Mechanismen freigesetzt werden, kann die Mastzelle immunologische Prozesse verstärken oder auch regulieren. Die Rezeptoren- und Mediatorenvielfalt lassen sie zu einem Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort werden. Die Analyse von mastzellspezifischen Funktionen bei der Entstehung allergischer Immunantworten kann daher zur Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungen beitragen.

#### *1.1 Die Mastzelle*

Mastzellen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab [1]. Sie zirkulieren als CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen im Körper, bis sie ihr Zielgewebe erreicht haben. Dort angekommen reifen sie vollkommen aus und werden zu langlebigen Zellen, die in den Zellzyklus eintreten und proliferieren können [2;3]. Mastzellen kommen in allen vaskularisierten Geweben und innerhalb des Epithels vor, dort liegen sie oft in der Nähe von Blutgefäßen, mukusproduzierenden Drüsen, Nerven und Haarfollikeln. Wie auch die Dendritischen Zellen kommen sie in großer Anzahl in allen der Umwelt exponierten Geweben, wie der Haut, dem Darm und der Lunge vor. Sie stellen gemeinsam mit der DC die ersten Zellen des Immunsystems dar, die mit Allergenen und Pathogenen in Kontakt treten.

In Mäusen lassen sich anhand von biochemischen, strukturellen und funktionellen Merkmalen zwei Subtypen von Mastzellen unterscheiden [4;5]. Mastzellen des Bindegewebes werden als Bindegewebsmastzellen, die Mastzellen der Lamina Propria der Lunge und des Darms hingegen als Schleimhautmastzellen bezeichnet [4]. Sie sind vor allem durch die verschiedene Zusammensetzung der Proteasen und Glycosaminoglycane in den Granula sowie durch die unterschiedliche Produktion von Lipidmediatoren voneinander zu differenzieren. Bindegewebsmastzellen zeichnen sich durch die Produktion von Heparin, der Mukosalenmastzellprotease [6] und Carboxypeptidase [7] aus. Schleimhautmastzellen synthetisieren Mausmastzellprotease-1 (MMCP1) und 2, Chondroitinsulfat [8], sowie große Mengen an Leukotrien C<sub>4</sub> nach IgE-abhängiger Aktivierung [9]. Beim Menschen wird zwischen den Subtypen MC<sup>T</sup> und MC<sup>CT</sup> unterschieden. Diese Mastzellen werden anhand der Proteasen innerhalb der Granula unterschieden, Tryptase beim MC<sup>T</sup> oder Tryptase/Chymase beim MC<sup>CT</sup>-Subtyp [10]. Der Subtypus ist bereits in der Vorläuferzelle festgelegt oder kann durch epigenetische Einflüsse im Gewebe induziert werden [11]. Die Proliferation und das Überleben der Mastzelle sind streng reguliert. Stammzellfaktor (SCF oder Kit-Ligand), der Ligand für CD117/c-Kit stellt den wichtigsten Überlebens- und Entwicklungsfaktor der Mastzelle da. Ebenso spielen IL-3 und die Th<sub>2</sub>-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-9 eine wichtige Rolle für die Mastzellentwicklung und Homeostase [2;3;5;12].

Mastzellen können eine große Bandbreite an Mediatoren in bereits präsynthetisierter Form in ihren Granula speichern oder nach Aktivierung de novo synthetisieren. Diese biologisch sehr potenten Produkte können in drei Klassen unterteilt werden; präsynthetisierte Mediatoren die in den Granula gespeichert werden, Lipidmediatoren und Zytokine und Chemokine. Die *Proteoglykane* Heparin und Serotonin (nur in Nagetieren) wie auch die Proteasen Chymase, Tryptase und Carboxipeptidase A und Amine wie Histamin werden in präsynthetisierter Form in den Granula gespeichert. Für diese Mediatoren konnte gezeigt werden, dass sie an Gewebsveränderungen, der Chemoattraktion gegenüber Effektorzellen und einer erhöhten vaskulären Permeabilität beteiligt sind [13;14]. *Lipidmediatoren*, wie z.B. Prostaglandin D<sub>2</sub> oder Leukotrien C<sub>4</sub>, Metabolite der Arachidonsäure werden de novo synthetisiert [3;13;15-18]. Mastzellen stellen außerdem eine Quelle für viele Zytokine und Chemokine dar. Tumornekrosefaktor-α (TNF) liegt neben den Proteoglykanen bereits präsynthetisiert in ruhenden Mastzellen gespeichert vor [19;20]. Abhängig von der Art und Stärke des



Stimulus und dem Aktivierungsweg kann die Mastzelle unterschiedlichste Mediatoren und Zytokine innerhalb kürzester Zeit [16;21-23] freisetzen (Abb 1.1). Die Kreuzvernetzung von membrangebundenem IgE durch Antigene stellt zurzeit den genauesten untersuchten Aktivierungsmechanismus der Mastzelle dar. Mastzellen und Basophile exprimieren auf ihrer Oberfläche den für IgE hochaffinen Rezeptor (FcεRI) [24;25]. Das von B-Zellen produzierte IgE bindet an den Rezeptor. Kommt es zu einer Kreuzvernetzung von IgE Molekülen durch bi- oder multivalente Antigene, wird die Aktivierung und Degranulation der Mastzelle induziert [26;27]. Innerhalb von Minuten werden die präsynthetisierten Mediatoren wie Proteoglykane oder auch TNF freigesetzt, gefolgt von den Lipidmediatoren, die 5 bis 30 Minuten nach Antigenkontakt entstehen. Die Zytokine und Chemokine werden nach etwa einer Stunde nach Aktivierung neu synthetisiert [28].

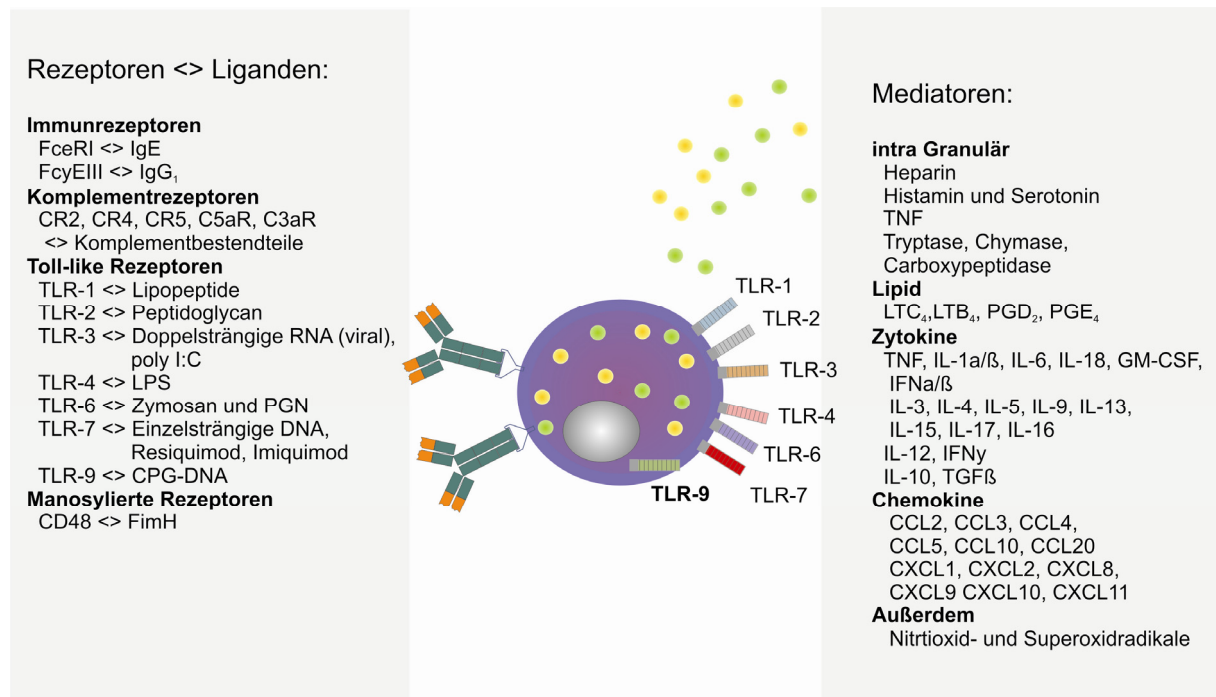
Noch kontrovers diskutiert wird die Aktivierung von Mastzellen durch IgE ohne Kreuzvernetzung. Einzel gebundene IgE-Moleküle sollen die Mastzelle in einen zytokinproduzierenden Zustand versetzen, wobei die berichteten Aktivierungszustände zwischen stark bis schwach zytokinproduzierend schwanken [2;24].

FcεRI wird früh nach der Ausreifung der Mastzelle exprimiert [29]. Mature Mastzellen können über  $5 \cdot 10^5$  Kopien des Rezeptors auf ihrer Oberfläche exprimieren [30]. Die Expression von FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen wird durch die IgE-Konzentrationen reguliert [31]. IgE scheint durch positiven Feedback die Aktivität von Mastzellen zu verstärken. Die IgE abhängige Aktivierung der Mastzelle führt zur Produktion und Freisetzung von IL-4 [32], IL-13 [31] und MIP-1α [33], die alle einen IgE Klassenswitch in B-Zellen induzieren können.

Neben der IgE-abhängigen Aktivierung können Mastzellen auch durch IgE-unabhängige Mechanismen aktiviert werden. Mastzellen exprimieren eine große Bandbreite an Rezeptoren die Pathogen assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen, zu diesen Rezeptoren gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), Komplementrezeptoren und CD48 [22;34]. Die Aktivierung über diese Rezeptoren führt ebenfalls zur Freisetzung von Mediatoren, die eine adaptive Immunantwort induzieren können.

Die Fähigkeit auf Gefahrensignale, wie mikrobielle Bestandteile zu reagieren, kombiniert mit der großen Vielfalt an Mediatoren, die Zellen der adaptiven

Immunantwort beeinflussen können, lassen die Mastzelle zu einer Schlüsselzelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität werden.



**Abb. 1.1: Das Rezeptoren- und Mediatorenrepertoire von Mastzellen.** Auf der linken Seite sind die Subtypen an Rezeptoren der Mastzelle dargestellt und welche Stimuli der angeborenen und adaptiven Immunität sie erkennen. Auf der rechten Seite sind Mediatoren aufgelistet, die Mastzellen nach Aktivierung sofort freisetzen, oder de novo produzieren können.

Um die Rolle der Mastzelle an immunologischen Prozessen untersuchen zu können stehen der Wissenschaft die so genannten mastzelldefizienten- oder auch Mastzell-Knock in-Mäuse zur Verfügung. Durch eine natürliche Mutation im *Dominant Spotting* (W) Locus auf Chromosom 5 oder dem *Steel* (Sl) auf Chromosom 10 kommt es in diesen Mäusen zu einer gestörten Mastzellentwicklung [35;36]. Die WBB6F<sub>1</sub>-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> Maus (W/W<sup>v</sup>) wird zurzeit am häufigsten für die Untersuchung mastzellspezifischer Effekte eingesetzt. Aufgrund der geringeren Nebeneffekte kommt es jedoch in den letzten Jahren zum verstärkten Einsatz der C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> Maus (Sash). Beide Mutationen beeinflussen die Expression von cKit [37] dem Rezeptor für Stammzellfaktor, welcher für die Mastzellentwicklung notwendig ist.

Bei Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> handelt es sich um eine heterozygote Mutation. Die Kit<sup>W</sup> Mutation ist eine Punktmutation an einem Exon/Intron Übergang, die zur Folge hat, dass dem Rezeptor die transmembrane Region fehlt und er daher nicht auf der Zelloberfläche expremiert werden kann [12]. Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> ist ebenfalls eine Punktmutation, die dazu führt,

dass der Rezeptor zwar auf der Zelloberfläche expremiert wird, seine Kinaseaktivität jedoch deutlich gestört ist [38]. Die Mutationen auf beiden Kopien für c-Kit führen neben dem Fehlen der Mastzellen im Gewebe zu einer Anämie, Sterilität und der Abwesenheit von Keimzellen, Melanozyten sowie spezifischer neuroendokriner Zellen im Darm [5;12;39]. Bei der Kit<sup>W<sup>sh</sup></sup>-Mutation handelt es sich um eine homozygote Mutation, die nur die Pigmentierung und die Gewebsmastzellen betrifft. Es handelt sich um eine Inversion die regulatorische Elemente betrifft und ~70 kb vor dem Kit Gen liegt [40]. Im Gegensatz zu den W/W<sup>V</sup> Mäusen haben die Sash Mäuse den Vorteil, dass sie fertil [41], nicht anämisch [42] und auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt sind. Für die genaue Untersuchung der Rolle der Mastzelle oder der von ihr produzierten Mediatoren ist es möglich sowohl W/W<sup>V</sup>, als auch Sash Mäuse mit genetisch kompatiblen Mastzellen zu rekonstituieren [43]. Diese als "Bone marrow derived Mast cells" (BMMC) bezeichneten Zellen, können aus Knochenmark der fetalen Leber oder aus Stammzellen [11] in vitro generiert werden.

Die Vorläufer Zellen können von congenen Wildtyp-Tieren stammen, oder auch, um Effekte einzelner Mediatoren zu untersuchen, von transgenen- oder genetisch defizienten Mäusen [44]. Die in vitro generierten Zellen können intradermal, intravenös oder intraperitoneal zur Rekonstitution der Tiere appliziert werden [5;43;44]. In den bisher untersuchten Geweben zeigte es sich, dass die in vitro generierten und in die mastzelldefizienten Tiere transferierten Mastzellen denen von Wildtyp-Tieren phänotypisch ähneln [44-46]. Die Anzahl der Mastzellen kann je nach Gewebe variieren. Um zu gewährleisten, dass die Mastzellen von ihrer Anzahl und ihrem Phänotyp möglichst genau dem Wildtyp entsprechen ist es notwendig 4 bis 6 Wochen nach adoptiven Transfer der Zellen zu warten bevor mit Experimenten begonnen werden kann.

Mit den mastzelldefizienten Tieren und den "Knock-in" Tieren stehen gute Systeme zur Verfügung um Effekte der Mastzelle in der angeborenen und adaptiven Immunität zu untersuchen. Nachteile dieser Systeme sind zu erwähnen, denn bei chronischen Entzündungsmodellen zeigte es sich, dass sich in den eigentlich mastzelldefizienten Tieren am Ende der Studien an den Entzündungsherden Mastzellpopulationen entwickeln konnten. [47;48].

### 1.2 Mastzellen in der angeborenen Immunität

Die angeborene Immunität stellt die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende Pathogene und Toxine dar. Anhand von bestimmten Erkennungsmerkmalen werden Bestandteile von Pathogenen von Keimbahn-codierten Rezeptoren erkannt, die von Makrophagen, DC, Natürlichen Killerzellen aber auch von Mastzellen expremiert werden [49]. Zu diesen Rezeptoren gehören auch die so genannten Toll-like-Rezeptoren (TLR), diese Rezeptorenfamilie wird je nach dem welcher Bestandteil von Pilzen, Parasiten, Bakterien oder Viren erkannt wird in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Bisher sind zehn humane und zwölf murine TLR bekannt, die die unterschiedlichsten mikrobiellen Gefahrensignale detektieren und eine entsprechende Immunantwort initiieren können [50]. In vielen in vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass Mastzellen ein großes Spektrum der TLR expremieren. Für murine und humane Mastzellen ist die funktionelle Expression der TLR-1; -2; -3; -4; -6; -7 und -9 nachgewiesen worden [51]. Je nach Stimuli wird über die TLR in der Mastzelle ein spezifisches Zytokin- und Mediatorenprofil induziert. Die Mastzelle spielt daher eine wichtige Rolle bei der Einleitung einer schnellen und effektiven Immunantwort. Leal-Berumen et al konnten zeigen, dass Mastzellen nach Kontakt mit dem gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* TNF, IL1 $\beta$  und IL-6 produzieren, ohne dabei zu degranulieren [52]. Die Mastzelle wird durch Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil der Bakterien der an den TLR-4 bindet, aktiviert. In vivo führt diese Aktivierung zu einer Neutrophilie am Entzündungsherd [53]. Im Gegensatz hierzu führt die Behandlung mit Peptidoglycan (PGN) einem Bestandteil gram-positiver Bakterien zu einer Degranulation der Mastzelle und der Produktion der Th<sub>2</sub> induzierenden Zytokine IL-4, IL-5 sowie IL-6 und GM-CSF. Dies führt zur Bildung von Ödemen und einer erhöhten vaskulären Permeabilität in vivo [53].

Neben den TLR verfügen Mastzellen über weitere Rezeptoren um Pathogene direkt oder indirekt zu erkennen und so aktiviert zu werden. So können über das Glykosylphosphatidylinositol-gekoppelte Protein CD48 FimH Proteine gram-negativer Bakterien erkannt werden. Eine Aktivierung von CD48 führt zur Mastzelldegranulation und einer verstärkten Produktion von TNF und Leukotrienen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mastzellen FimH expremierende Bakterien phagozytieren und

abtöten können [14;54;55]. Mastzellen exprimieren auch eine Vielzahl von Komplementrezeptoren. Da das Komplementsystem bei vielen Infektionen aktiviert wird, wird auch eine komplementvermittelte Aktivierung der Mastzelle vermutet. Eine weitere Möglichkeit Mastzellen zu aktivieren stellen die B-Zell-Superantigene dar. Diese Immunglobulin-bindenden Proteine können Zellen durch antigenunspezifische Kreuzvernetzung der Ig-Rezeptoren aktivieren [56]. Patella et al. konnten zeigen, dass das virale Glykoprotein 120 (gp120) in der Lage ist Mastzellen Fc-Rezeptor abhängig, jedoch Antigen unabhängig zu aktivieren [57]. Untersuchungen von Echtenacher und Malavia bestätigten, dass Mastzellen auch eine wichtige Funktion in vivo in der angeborenen Immunität besitzen. In einer Studie über septische Peritonitis konnte Echtenacher et. al demonstrieren, dass mastzelldefiziente Mäuse innerhalb kürzester Zeit an einer Sepsis verstarben, wohingegen entsprechende Wildtypen eine deutlich höhere Überlebensrate hatten. Die Arbeitsgruppe verdeutlichte, dass hierbei TNF eine besondere Rolle für das Überleben der Tiere spielt [58;59]. Dass die Mastzelle eine wichtige Funktion bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen spielt, konnte durch Arbeiten von Malaviya et. al bestätigt werden. Diese zeigten, dass die Mastzelle für eine effektive Beseitigung der Bakterien und die dazu notwendige Neutrophilie wichtig ist. Die abgeschwächte Immunantwort in mastzelldefizienten Tieren konnte durch eine Rekonstitution der Tiere mit Wildtyp-Mastzellen wieder normalisiert werden [60].

Mastzellen besitzen, wie bereits beschrieben, die Fähigkeit präsynthetisiertes TNF zu lagern und innerhalb von Minuten freizusetzen [19]. Die schnelle Freisetzung von mastzell-produziertem TNF ermöglicht die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Entzündungsort [61]. Die lokale Freisetzung von mastzellproduzierten Mediatoren, die die Rekrutierung von Effektorzellen unterstützen, ist wahrscheinlich die wichtigste Effektorfunktion der Mastzelle in der Pathogenabwehr. Neben TNF konnte auch für LTB<sub>4</sub> und Proteasen (MCP6) gezeigt werden, dass sie für eine effektive Rekrutierung von Neutrophilen notwendig sind [62;63]. Neben der Rekrutierung von Neutrophilen konnte in einigen Parasiten und Virusmodellen gezeigt werden, dass Mastzellen an der Anlockung von eosinophilen Granulozyten beteiligt sind [64;65]. Neuere Studien belegen, dass Mastzellen auch das Migrationsverhalten von T-Zellen beeinflussen können und somit bei der Entstehung der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. In einer in vivo Studie konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle nach Stimulation mit Poly I:C

(einer synthetischen doppelsträngigen RNA) an der Rekrutierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beteiligt ist [66].

Durch ihre Fähigkeit eine große Bandbreite an Pathogenen zu erkennen und daraufhin schnell und selektiv Mediatoren freizusetzen, wodurch protektive Immunantworten induziert, reguliert und verstärkt werden, trägt die Mastzelle effektiv zur angeborenen Immunität bei. Ihre Lokalisierung in der Nähe von Blutgefäßen begünstigt die Rekrutierung von Effektorzellen. Da die Mastzelle auch Zellen der adaptiven Immunantwort modifizieren, beeinflussen und regulieren kann, stellt sie ein effektives Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar.

### *1.3 Mastzellen und ihre Funktion in der adaptiven Immunität*

Aufgrund ihrer Fähigkeit Antigene effektiv aufzunehmen, zu prozessieren und anderen Zellen des Immunsystems zu präsentieren, ist die Dendritische Zelle wahrscheinlich einer der wichtigsten Zellen für die Induktion einer adaptiven Immunantwort. Langerhanszellen in der Haut, aber auch andere immature DC der Peripherie haben die Fähigkeit sowohl endogene als auch exogene Antigene aufzunehmen. Ohne zusätzlichen Stimulus bleiben sie jedoch immatur und sind nur minder befähigt Antigene zu präsentieren. Kommt es jedoch zu einem adäquaten zusätzlichen Reiz reifen die DC aus und migrieren aufgrund veränderter Expression von Chemokinrezeptoren aus den Geweben in die Lymphknoten. Während der Migration wird die Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80, CD86, CD40 und des MHCII auf der Oberfläche der Zelle hochreguliert. Die DC maturiert zu einer potenten antigenpräsentierenden Zelle aus [67]. In den Lymphknoten können die DC antigenspezifische naive T-Zellen aktivieren und somit T-Effektorzellen induzieren. Diese tragen zur Verteidigung des Wirtes gegenüber Pathogenen bei, sind aber auch an der Entwicklung von allergischen Reaktionen oder Autoimmunantworten beteiligt. Der Kontakt zwischen B-Zellen und aktivierten T-Zellen ist auch für den Isotypenwechsel der B-Zelle wichtig [68], welcher wiederum zur Induktion der humoralen Immunität notwendig ist.

Studien an Modellen der angeborenen aber auch adaptiven Immunität belegen, dass die Mastzelle einen Einfluss auf viele Prozesse, die zur Induktion einer adäquaten adaptiven Immunantwort beitragen, hat.

Mastzellen und deren Mediatoren können die Migration, Ausreifung und Polarisierung von antigenpräsentierenden Zellen beeinflussen. In einem Kontaktallergiemodell konnten Bryce et al. zeigen, dass IgE-beladene Mastzellen für eine effektive Sensibilisierung gegenüber dem Hapten Ozalon notwendig sind [69]. Über einen antigenunabhängigen Mechanismus trägt die Mastzelle in ihrem Modell zu einer verstärkten Emigration von Langerhanszellen aus der Haut bei Wildtyp-Tieren bei, diese war sowohl bei mastzell- als auch IgE-defizienten Tieren gestört. Durch die Blockade des Histaminrezeptors H2 konnte gezeigt werden, dass unter anderem mastzellproduziertes Histamin an der Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die Lymphknoten beteiligt ist [70]. Mastzellproduziertes TNF scheint ebenfalls auf die Migration von DC zu wirken. So konnte nach Behandlung mit Petidoglycan eine TNF-abhängige Migration von Langerhanszellen beobachtet werden [70]. In einer Kontaktallergiestudie gegenüber FITC konnte bestätigt werden, dass mastzellproduziertes TNF zu einer verstärkten DC Migration beiträgt. Die Studie zeigte jedoch auch, dass mastzellspezifische Unterschiede nur innerhalb der ersten 24 Stunden zu beobachten waren. Nach 48 Stunden war die Anzahl an DC in den Lymphknoten der WT und mastzelldefizienten Tiere vergleichbar. DC von beiden Gruppen waren in der Lage eine vergleichbar starke antigenspezifische T-Zell-Antwort zu generieren. Die entstehende Kontaktallergie war jedoch in mastzelldefizienten Tieren deutlich abgeschwächt und konnte durch Rekonstitution mit BMMC aus Wildtyp-Tieren vollständig, durch die Rekonstitution mit BMMC aus TNF-defizienten Spendern jedoch nur teilweise induziert werden [71]. Die Studien verdeutlichen, dass Mastzellen die Entstehung von adaptiven Immunantworten begünstigen können, indem sie die Migration von DC aus den Geweben in die regionalen Lymphknoten beeinflussen. Je nach Modell können hierbei unterschiedlich starke Effekte der Mastzelle beobachtet werden. Die Mastzelle scheint vor allem durch ihre Fähigkeit in kürzester Zeit nach Aktivierung eine große Bandbreite an entzündungsfördernden Mediatoren freisetzen zu können die Induktion einer adaptiven Immunantwort zu beschleunigen.

Heib et al. zeigten, dass auch die entstehende adaptive Immunantwort in ihrem Modell mastzellabhängig war. Nach Applikation von SIINFEKEL, einer MHC-I restringierten Peptidsequenz von Ovalbumin in Kombination mit Imiquimod, einem TLR-7 Ligand, konnten sie zeigen, dass Mastzellen an der Induktion einer adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Mastzellen, die über TLR-7 aktiviert wurden induzieren

eine verstärkte Emigration von Langerhanszellen in die regionalen Lymphknoten und eine Lymphknotenhyperplasie. Die Migration der Langerhanszellen war in diesem Modell IL-1, die Hyperplasie TNF abhängig. Die Einwanderung der Langerhanszellen führt zur Induktion einer SIINFEKEL spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Die entstehende zytotoxische T-Zellantwort war in mastzelldefizienten Mäusen gemindert.

Wurden zur Immunisierung bereits maturierte peptidbeladene DC benutzt konnten keine Unterschiede zwischen Wildtypen und mastzelldefizienten Tieren bezüglich der induzierten T-Zellantwort beobachtet werden [72]. Die Arbeit verdeutlicht, dass Mastzellen zu der Entstehung von adaptiven Immunantworten beitragen, zeigt aber auch, dass je nach gewähltem Modell mastzellspezifische Effekte "überlagert" werden können.

Mastzellmediatoren können nicht nur die Migration sondern auch die Polarisierung von DC beeinflussen. Mastzellproduziertes TNF und Exosome können die Hochregulation von Integrinen, kostimulatorischen Molekülen und MHCII-Komplexen induzieren und somit die Ausreifung der DC fördern [73;74]. Histamin und Prostaglandin D<sub>2</sub> können einen Th<sub>2</sub>-Antwort unterstützenden DC-Phänotyp induzieren, indem sie die IL-12 Produktion der DC hemmen [75;76]. Mastzellen könnten auch über die Produktion von TSLP (lymphic stromal lymphopoietin), einem IL-7 ähnlichem Zytokin oder IL-17 zur Beeinflussung der DC beitragen. TSLP induziert die Migration von DC und fördert deren Produktion von CCL17, einem Th<sub>2</sub>-Zellen Chemokin [77]. Mastzellproduziertes IL-17E kann die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 in einigen DC Subpopulationen einleiten [78]. Welchen Stellenwert die Mastzelle als Quelle für die beiden Zytokine in vivo einnimmt ist aber bisher unklar.

Neben der Beeinflussung von DC konnten auch mastzellspezifische Effekte auf T-Zellen beobachtet werden. In einer Kontakallergiestudie gegen Dinitrofluorbenzol konnte gezeigt werden, dass Mastzellen in die regionalen Lymphknoten migrieren und chemoattraktiv auf T-Zellen wirken, indem sie MIP-1 $\beta$  sezernieren [79;80]. McLachlan et al. bestätigten diese Beobachtung, in ihrer Studie konnten sie eine mastzellabhängige Lymphknotenhyperplasie nach bakterieller Infektion sehen, bei der die Rekrutierung von zirkulierenden T-Zellen von mastzellproduziertem TNF abhängig war [81]. Auch mastzellproduziertes Histamin kann auf die Polarisierung der T-Zelle einwirken. So kann über die Aktivierung des H1-Rezeptors eine Th<sub>1</sub>-Differenzierung gefördert und durch Histaminbindung an den H2-Rezeptor die



Aktivierung von Th<sub>1</sub> und Th<sub>2</sub> Zellen unterdrückt werden [82]. Da T-Zellen umgekehrt auch die Funktion von Mastzellen beeinflussen können, scheint es zwischen diesen beiden Zelltypen einen komplexen Steuerungsmechanismus zu geben [83].

Maurer et al zeigten, dass Mastzellen in vivo adaptive Immunantworten induzieren und für eine entsprechende Polarisierung wichtig sind. In ihrem Infektionsmodell beobachtete die Arbeitsgruppe, dass mastzelldefiziente Mäuse anfälliger für eine Infektion mit *Leishmania major* waren. Diese Mäuse entwickelten im Vergleich zu Wildtypen größere Hautläsionen und zeigten eine reduzierte Anzahl an inflammatorischen Zellen am Entzündungsort. Des Weiteren war der Influx von antigenspezifischen T-Zellen verzögert und die T-Zellen zeigten einen Th<sub>2</sub>-, statt den schützenden Th<sub>1</sub>-Phänotyp. Mastzellen scheinen in diesem Modell die geeignete Aktivierung von DC zu induzieren und somit die Entstehung einer effektiven Immunantwort zu beeinflussen [84]. Die vorgestellten Studien verdeutlichen, dass Mastzellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen können. Ihre genaue Beteiligung an der Entstehung und Exazerbation von komplexen immunologischen Erkrankungen, wie z.B. Asthma, wird diskutiert ist aber noch ungeklärt.

### 1.4 Asthma bronchiale

Bei Asthma bronchiale handelt es sich um eine komplexe chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die viele klinische Phänotypen besitzt. Etwa 5% der Erwachsenen und 10% der Kinder leiden an Asthma, was es zu der weltweit am weitesten verbreiteten chronischen Krankheit macht. Bei den meisten Patienten manifestiert sich die Krankheit bereits in der Kindheit. Sowohl genetische Prädisposition als auch exogene Auslöser tragen zur ihrer Entstehung bei. Die klassischen Symptome der Krankheit sind Kurzatmigkeit, Husten, Schleimproduktion und anfallsweise Luftnot. Pathophysiologisch wird Asthma durch drei Merkmale charakterisiert; einer *bronchialen Entzündung*, einer *bronchialen Hyperreaktivität* und einer *Obstruktion*. Die bronchiale Entzündung zeichnet sich durch den Influx von inflammatorischen Zellen, wie T-Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten aus und kann durch Allergene und Infekte ausgelöst werden. Am Entzündungsort können vermehrt degranulierte Mastzellen detektiert werden. Die Entzündung führt zu Schädigung des Atemwegsepithels, sowie zur Hyperplasie und Hypertrophie der

bronchialen glatten Muskulatur. In Asthmatikern ist daneben eine Metaplasie der Becherzellen zu beobachten, die mit einer erhöhten Mukusproduktion einhergeht [85]. An Asthma leidende Personen reagieren im Vergleich zu Gesunden auf Bronchokonstriktoren (wie Methacholin, Adenosin usw.), dieses Phänomen wird als bronchiale Hyperreaktivität oder auch Atemwegsüberempfindlichkeit bezeichnet [86]. Zum Nachweis der bronchialen Hyperreagibilität dient der Methacholin-Provokationstest. Hierbei werden dem Patienten steigende Konzentrationen von Methacholin verabreicht während parallel der pulmonale Widerstand gemessen wird. Die bronchiale Obstruktion ist ein Resultat der entstehenden Bronchospasmen, Schleimhautödeme und der Hypersekretion des zähen Schleims.

Asthma bronchiale kann sich vom Schweregrad und Erscheinungsbild unterschiedlich ausprägen. Im Allgemeinen werden zwei Typen von Asthma unterschieden, das allergische und das nicht allergische Asthma. Ersteres ist der am weitesten verbreitete Asthmatyp. Hier entsteht durch die Inhalation eines eigentlich "harmlosen" Antigens eine von eosinophilen Granulozyten dominierte Inflammation der Atemwege mit der Bildung von Ödemen und der verstärkten Produktion von Schleim. Weiterhin wird die glatte Muskulatur überempfindlich und reagiert auf eine große Anzahl von unspezifischen Reizen mit Bronchokonstriktionen [87]. Im allergischen Asthma ist die Rolle der Mastzelle bisher als Effektorzelle der akuten Reaktion festgelegt. Epidemiologische Studien zeigten, dass es eine Verbindung zwischen der Konzentration von antigenspezifischen Antikörpern und dem Schweregrad des Asthmas gibt [88]. Nach wiederholtem Kontakt mit Antigen, kommt es zur Kreuzvernetzung von an der Oberfläche gebundenem IgE was zur Degranulation der Mastzellen führt. Diese setzen daraufhin Mediatoren frei, die die akute endobronchiale Obstruktion hervorrufen. Die Funktion der Mastzelle bei der Entstehung der Krankheit ist bisher jedoch ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Das nicht allergische Asthma ist durch eine verstärkte Neutrophilie gekennzeichnet, welche durch IgE unabhängige Aktivierungswege induziert wird.

Um die Entstehung von Asthma zu verstehen ist es notwendig, sich die Rolle und Funktionen der Zellpopulationen, die für die Pathogenese essentiell sind, genauer zu beschreiben. Dazu gehören Dendritische Zellen, T-Zellen und Mastzellen. Anhand von klinischen Untersuchungen und epidemiologischen Studien konnte bereits viel zur Charakterisierung von Asthma beigetragen werden. Aus ethischen Gründen, ist der Mensch jedoch nur eingeschränkt zur genaueren Aufklärung der

Pathophysiologie der Erkrankung geeignet. Die Etablierung von Mausmodellen in den verschiedenen Charakteristiken des Asthma bronchiale nachgeahmt werden können, erlaubt dagegen einen genaueren Einblick in die Vielzahl der pathophysiologischen Vorgänge, die bei der Entstehung von Asthma bronchiale eine Rolle spielen. Hierbei ist es immer wichtig zu bedenken, dass die Ergebnisse, die im murinen Organismus gefunden werden, immer nur einen Anhaltspunkt auf die humane Situation geben und durch Studien an Patienten mit Asthma bronchiale erst überprüft werden müssen.

Unter natürlichen Lebensbedingungen entwickeln Mäuse kein Asthma, nach Sensibilisierung und Provokation mit Antigenen kann in Nagern jedoch ein "Asthma"-ähnliches Krankheitsbild induziert werden. Die Tiere werden hierzu systemisch oder lokal mit Antigen sensibilisiert und folgend wiederholt mit demselben Antigen lokal provoziert. Zur Sensibilisierung wird das Antigen meist in klassischer Kombination mit einem Adjuvans intraperitoneal appliziert. Durch die Applikation des Antigens in die Lunge, z.B. durch Verneblung oder intranasale bzw. intratracheale Verabreichung werden die Tiere provoziert. Sensibilisierte Tiere entwickeln hierauf eine allergische Entzündung der Atemwege, die durch Eosinophilie, Atemwegsüberempfindlichkeit und Becherzellmetaplasie sowie der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-5 und IL-13) charakterisiert ist. Die Sensibilisierung und Provokation führt zu einer verstärkten Produktion von antigenspezifischen IgE-, IgG1-Antikörpern und antigenspezifischen T-Zellpopulationen [89]. Wie auch bei Asthmatikern kann eine Früh- und Spätphasenantwort auf das inhalierte Antigen detektiert werden [90;91]. Je nach Provokationsart müssen die Applikationen unterschiedlich oft durchgeführt werden, Verneblungen z.B. müssen deutlich häufiger hintereinander durchgeführt werden, um Asthma zu induzieren, als dies durch die direkte intranasale Gabe des Antigens nötig ist, wo eine einzige Behandlung reicht.

Auch zur Sensibilisierung wurden weitere unterschiedliche Modelle entwickelt, so können Tiere auch ohne den starken zusätzlichen Stimulus eines Adjuvans durch alleinige intraperitoneale Verabreichung des Antigens oder durch wiederholte Gabe des Antigens allein oder in Kombination mit einem Stimulus direkt in die Lunge sensibilisiert werden. Lambrecht et al. konnten demonstrieren, dass auch eine intranasale Applikation von in vitro generierten und Antigen beladenen DC zur Sensibilisierung von naiven Mäusen führt. Das Ausmaß der entstehenden

Entzündung und bronchialen Überempfindlichkeit kann je nach "Potenz" des gewählten Provokations- und Sensibilisierungsprotokolls schwanken [92].

### *1.5 T-Zellen im Asthma bronchiale*

Studien in Tiermodellen konnten zeigen, dass Asthma bronchiale eine Th<sub>2</sub>-assoziierte Erkrankung der Atemwege ist. Auch humane Studien bestätigten, dass Th<sub>2</sub>-spezifische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 in den Atemwegen von Asthmatikern hoch reguliert sind. Adoptive T-Zell-Transfermodelle in der Maus verdeutlichen, dass Th<sub>2</sub>-Zellen und die von ihnen sezernierten Zytokine essentiell sind für die Entstehung der Eosinophilie und Atemwegsüberempfindlichkeit. Untersuchungen, in denen ein für die Th<sub>2</sub>-Differenzierung notwendiger Transkriptionsfaktor nach der Sensibilisierung geblockt wurde, zeigen, dass Th<sub>2</sub>-Zellen oder zumindest ihre Zytokine eine wichtige Funktion in der Provokationsphase besitzen [93]. In CD4<sup>+</sup> T-Zell defizienten Tieren [94] und Tieren in denen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor der Provokation depletiert wurden [95], konnte nur eine deutlich verminderte allergische Atmwegsentzündung induziert werden. Diese Studien belegen die wichtige Rolle der T-Zelle bei der Entstehung von Asthma. Die genaue Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei der Induktion von Asthma ist noch ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Es gibt Studien, die keine aktive Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung zeigen. Diese Untersuchungen stehen jedoch im Widerspruch zu Studien, die eine Population an IL-13 produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Lunge charakterisiert haben. Ein Transfer dieser Zellen von einem sensibilisiertem, jedoch nicht von einem naiven Donor, vor der Provokation in CD8 defiziente Mäuse führte zu der Entwicklung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit. Der adoptive Transfer von CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer sensibilisierten IL-13 knockout Maus konnte jedoch keine Entzündung der Lunge einer Wildtyp Maus induzieren. Die Versuche verdeutlichen, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, zumindest Subpopulationen an der Entstehung von Asthma beteiligt sind [92].

### 1.6 Dendritische Zellen im Asthma bronchiale

Für die Entstehung einer antigenspezifischen Th<sub>2</sub>-Antwort sind DC essentiell. DC haben, als effektivste antigenpräsentierende Zelle, eine wichtige Funktion in der Induktion und der Modulation allergischer Antworten.

Die Lunge kann in zwei funktionell unterschiedliche Kompartimente unterteilt werden, die Atemwege und das Lungengewebe. Das Atemwegsepithel wird aus zilienträgenden Zellen und Schleim produzierenden Becherzellen gebildet, die zusammen zur Beseitigung von Pathogenen und inhalierten Antigenen beitragen. Unterhalb des Atemwegsepithels sitzt ein dichtes Netzwerk von DCs. Diese sind hauptsächlich vom myeloiden Phänotyp, es kommen aber auch plasmocytoide DCs vor [96]. Die DCs können mit ihren Fortläufern zwischen den Epithelzellen hindurch in das Atemwegslumen reichen und so nach Antigenen "fischen". Unter gesunden Bedingungen kommt es zu einer ständigen Aufnahme von Antigenen durch DCs, deren Migration in die drainierenden Lymphknoten und zur dortigen Expression des Antigens. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass hierbei Toleranz induziert wird. Es wird davon ausgegangen, dass DC, wenn sie ohne weiteren Stimulus, "harmlose" Antigene aufnehmen, nicht vollständig aktiviert werden und somit nicht in der Lage sind eine effektive T-Zell-Antwort zu induzieren [97]. Kommt es jedoch zu einem zusätzlichen Stimulus, kann die Toleranz gebrochen werden, die DCs maturieren und werden zu potenten antigenpräsentierenden Zellen. Je nach Art und Stärke des Stimulus kann der Phänotyp der durch die DC induzierten adaptiven Immunantwort variieren. Bottomly et al zeigen, dass LPS, das in Kombination mit OVA appliziert wurde effektiv war die DC-Toleranz zu brechen und eine T-Zellantwort in Mäusen zu induzieren. Je nach Konzentration des eingesetzten TLR-4 Liganden wurde die Entstehung einer Th<sub>1</sub>-spezifischen (hohe LPS-Dosen) oder einer Th<sub>2</sub>-spezifischen T-Zellantwort (niedrige LPS-Dosen) gefördert [98;99]. Neben mikrobiellen Bestandteilen konnte auch für biologische aktive Antigene gezeigt werden, dass sie Toleranz brechen und gegen sich selbst aber auch als Beiständer gegen "harmlose" Antigene wie OVA eine adaptive Immunantwort in der Lunge induzieren können [100]. Neben direkter Aktivierung durch Antigene oder mikrobiellen Bestandteilen, können DC auch durch Mediatoren die von benachbarten Zellen wie Epithelzellen oder der Mastzelle aktiviert und moduliert werden. Für die Entstehung einer effektiven Th<sub>2</sub>-Antwort ist es notwendig, dass die DC Antigen

aufnehmen und es prozessieren. Im Zuge dieser Prozessierung müssen die DC aktiviert werden um zu Potenten antigenpräsentierenden Zellen zu maturieren.

Nach einer erfolgreichen Sensibilisierung führt ein wiederholter Antigenkontakt schnell zu einer Verschlimmerung der allergischen Atemwegsentzündung. Wie bereits beschrieben werden Mastzellen über IgE Kreuzvernetzung aktiviert, was zu der Freisetzung von Mediatoren zur Folge hat. Diese induzieren die frühe asthmatische Antwort, die Mediatoren locken inflammatorische Zellen in die Lunge und führen zu Atemwegsödemen und Bronchokonstriktion. DC der Atemwege nehmen das Antigen auf migrieren in die Lymphknoten und präsentieren es dort naiven und Memory-T-Zellen. Aktivierte T-Zellen wandern in die Lunge ein und sezernieren Zytokine. Die Freisetzung der Th<sub>2</sub>-spezifischen Zytokine führt zur Entstehung der späten Asthmareaktion. Eosinophile wandern in die Lunge ein, die glatte Muskulatur wird überempfindlich, Becherzellen produzieren Schleim und bei einer chronischen Entzündung kommt es zu einer Umstrukturierung der Atemwege durch verstärkte Kollageneinlagerung in das Atemwegsepithel [87].

### *1.7 Mastzellen im Asthma bronchiale*

Die Rolle der Mastzelle als Effektorzelle bei der frühen akuten asthmatischen Reaktion ist bereits gut geklärt und wurde über Jahrzehnte als einzige Funktion der Mastzelle im Asthma bronchiale angesehen. Studien der letzten Jahre verdeutlichen jedoch, dass die Mastzelle anhand ihrer großen Anzahl von Rezeptoren und Mediatoren ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort ist. Sie hat das Potenzial viele Prozesse die zur Entstehung einer adaptiven Immunantwort führen zu initiieren und zu modulieren. Die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung von Asthma ist noch kontrovers diskutiert, jedoch sprechen viele Indizien für ihre Beteiligung.

Zur Aufklärung mastzellspezifischer Effekte bei der Induktion von Asthma wurden im letzten Jahrzehnt viele Mausmodelle entwickelt, hierbei wurden vor allem die beiden bereits vorgestellten Mausstämme WWB6F<sub>1</sub>-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> Maus (W/W<sup>v</sup>) und C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> Maus (Sash) verwendet, um mastzellabhängige Unterschiede bei der Entstehung von Asthma zwischen WT und mastzelldefizienten Tieren direkt aufzeigen zu können. Je nach Sensibilisierungs- und Provokationsmodell welches der Tiere verwendet wurde konnte eine unterschiedlich große Relevanz der

Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit festgestellt werden. Studien in denen eine "klassische" Sensibilisierung der Tiere durch intraperitoneale Applikation des Antigens in Kombination mit einem Adjuvans (wie Aluminiumhydroxid) durchgeführt wurde konnten keine Beteiligung der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung aufzeigen. In solchen Sensibilisierungsmodellen konnten keine Unterschiede in der sich bildenden Th<sub>2</sub>-Antwort, der Atemwegsentszündung und Atemwegsüberempfindlichkeit zwischen mastzell-defizienten und Wildtyp-Tieren entdeckt werden [101-103]. Studien die weniger "potente" Sensibilisierungsmethoden verwendeten, konnten jedoch eine essentielle Beteiligung der Mastzelle an der Entstehung von Asthma aufzeigen. Williams et al. beschrieben in ihrer Studie von 2000, dass mastzelldefiziente Tiere nach Sensibilisierung ohne zusätzliches Adjuvans eine deutlich verminderte Entzündung der Atemwege und Atemwegsüberempfindlichkeit im Vergleich zu Wildtyp-Tieren entwickeln [104]. Untersuchungen, die in FcεRI-defizienten Tieren durchgeführt wurden unterstreichen die Beteiligung von Mastzellen an der Entstehung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit. Nach einer einmaligen Applikation von OVA in Kombination mit Adjuvans und wiederholten intranasalen Provokationen, war es nicht möglich in FcεRI-defizienten Tieren eine allergische Atemwegsentszündung zu initiieren [105]. Nach wiederholter inhalativer Exposition mit Antigen ohne zusätzliches Adjuvans reagierten mastzelldefiziente und FcεRI-defizienten Tiere im Vergleich zu Wildtypen mit einer deutlich verminderten Reaktion der Atemwege nach elektrischer Stimulation [106]. In den defizienten Tieren war zusätzlich die Atemwegsentszündung, Becherzellmetaplasie und IL-13 Konzentration reduziert. Durch adoptiven Transfer von WT Mastzellen und anschließende Sensibilisierung und Provokation konnte ein zum Wildtyp vergleichbares Asthma typisches Krankheitsbild induziert werden. Yu et al bestätigten, dass die funktionelle Expression des FcεRI Rezeptors für die mastzellvermittelten Effekte essentiell ist [107]. Die Studien verdeutlichen, dass Mastzellen an der Entstehung von Asthma beteiligt sind. In anderen Sensibilisierungsmodellen unter Verwendung von Alum als Adjuvans scheinen mastzellspezifische Effekte überbrückt zu werden. In weniger starken Sensibilisierungsprotokollen scheinen die Mastzelle dafür notwendig zu sein, Prozesse, die zur Entstehung einer adaptiven Immunantwort führen zu verstärken. In den beschriebenen Studien scheint die Mastzelle hauptsächlich über die FcεRI-vermittelte Aktivierung, Degranulation und Freisetzung von Mediatoren die

Entstehung der allergischen Immunantwort einzuwirken. Bryce et al konnten demonstrieren, dass mastzellproduziertes Histamin die Migration von T-Zellen in die Lunge und mit der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung assoziiert ist [108]. Auch mastzellproduziertes TNF könnte ein wichtiger Botenstoff für die Induktion einer allergischen AHR sein. Mastzellen speichern TNF in bereits präsynthetisierter Form intragranulär und können es bei Aktivierung innerhalb kürzester Zeit freisetzen. Wie bereits beschrieben konnte im Kontaktallergiemodell der Haut dargestellt werden, dass mastzellproduziertes TNF die Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die regionalen Lymphknoten beeinflusst und somit die Entstehung einer adaptiven Immunantwort [72]. Kim et al demonstrieren, dass TNF auch in der Lunge eine Rolle spielen könnte, so zeigen sensibilisierte mastzelldefiziente Tiere eine geringere TNF Konzentration in der bronchoalveolären Lavage als entsprechend behandelte WT-Tiere [109]. Die Rekonstitution der mastzelldefizienten Tiere mit WT-Mastzellen führte zu TNF Konzentrationen in der BAL die mit den WT-Tieren vergleichbar waren.

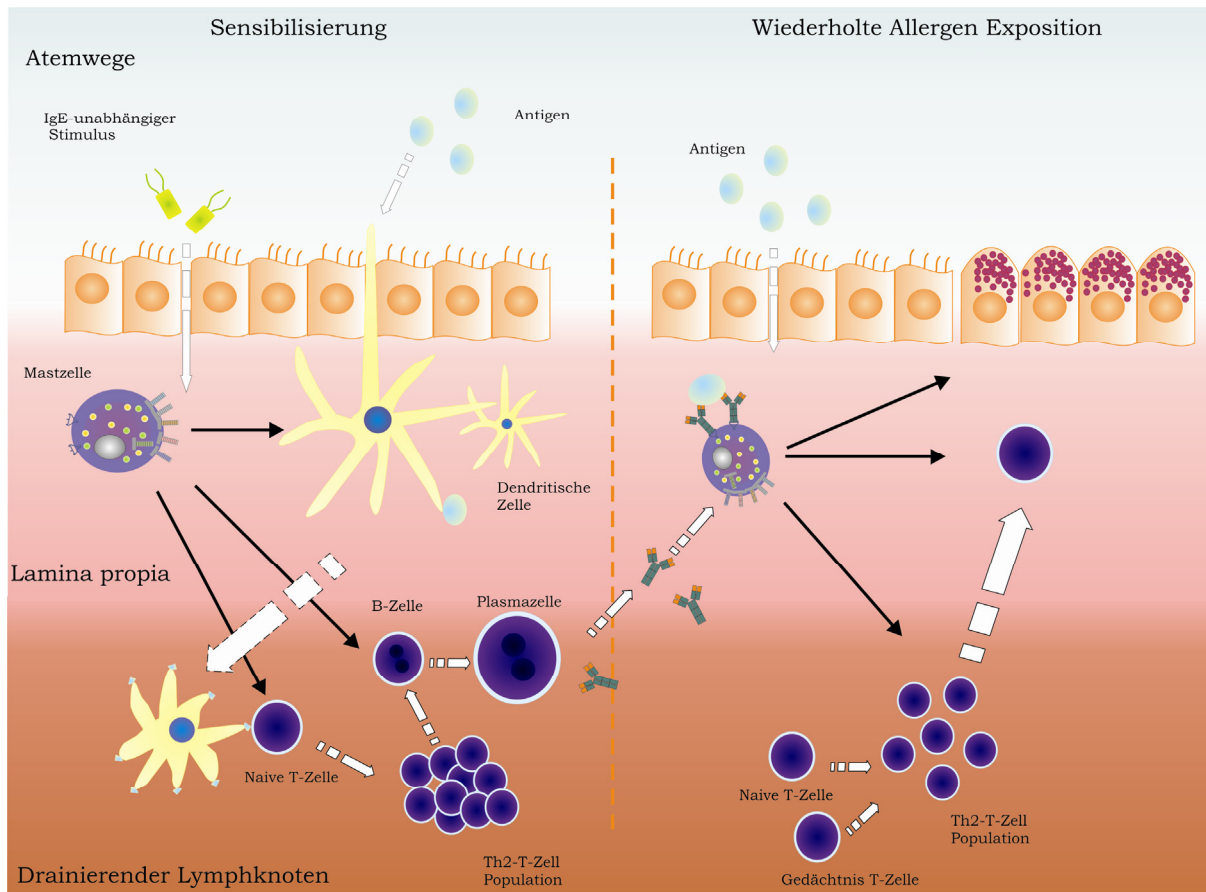
Durch die Verabreichung von TNF konnte die Toleranz gegenüber inhaliertem Antigen gebrochen werden, indem DC in der Lunge aktiviert wurden [98].

Auch Beobachtungen aus humanen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass TNF eine wichtige Funktion im Asthma hat. TNF kann bei nicht Asthmatikern zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge und zu einer erhöhten Atemwegsüberempfindlichkeit führen [110]. Die Konzentration von TNF im Serum [111] und die Anzahl an TNF produzierenden Zellen, vor allem Mastzellen, in Biopsien [112] ist in Asthmatikern deutlich erhöht.

Durch die Freisetzung der Mediatoren auf unterschiedlichste Stimuli kann die Mastzelle viele immunologische Prozesse zu unterschiedlichen Zeitpunkten beeinflussen. Neue Studien deuten darauf hin, dass die Mastzelle auch im Sensibilisierungsprozess eine wichtige Funktion hat. Die Mastzelle könnte durch Aktivierung das Mikromillieu in der Lunge soweit verändern, dass eine Aktivierung der DC stattfindet und somit die inhalative Toleranz gegenüber einem harmlosen Antigen gebrochen wird. In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass mastzellproduziertes Histamin und Prostaglandin DCs aktivieren und einen Th<sub>2</sub>-induzierenden DC-Phänotyp fördern [75;113]. Studien von Eisenbarth et al. lassen darauf schließen, dass die Mastzelle bei der Induktion von allergenspezifischen adaptiven Immunantworten, die durch Koadministration von TLR-Liganden



eingeleitet werden, beteiligt ist. In ihren Studien wurde gezeigt, dass die Applikation von Antigen in Kombination mit niedrigen Dosen an LPS, dem Liganden für TLR-4 zu einer Sensibilisierung gegenüber dem Antigen in Mäusen führt und eine allergische Entzündung der Atemwege hervorruft. Die Tiere sezernieren verstärkt TNF, was zur Migration der DCs aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten führt [98;99]. Da Mastzellen auf LPS Stimulus präformiertes TNF freisetzen können, stellen sie für das oben beschriebene Modell eine mögliche Effektorzelle dar [34]. Nach intranasaler Sensibilisierung mit Antigen in Kombination mit LPS und anschließender intranasaler Provokation mit Antigen entwickeln mastzelldefiziente Mäuse eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren abgeschwächte allergische Entzündung der Atemwege [114]. Die Daten lassen darauf schließen, dass die Mastzelle auch über IgE-unabhängige Aktivierungswege an der Entstehung von Asthma beteiligt sein könnte.



**Abb. 1.2: Funktion der Mastzelle bei der Entstehung einer adaptiven Immunantwort.** Mastzellen sind wie Dendritische Zellen in allen der Umwelt exponierten Geweben lokalisiert. Anhand ihrer großen Bandbreite an Rezeptoren können sie durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden und innerhalb kürzester Zeit Mediatoren freisetzen. Diese können das Mikromillieu verändern und somit die Funktion von Zellen des Immunsystems, z.B. von Dendritischen Zellen, T-Zellen und B-Zellen, beeinflussen. Die Mastzelle kann somit die Entstehung einer adaptiven Immunantwort fördern und deren Phänotyp modulieren.

Durch die Kreuzvernetzung von antigenspezifischem IgE auf der Mastzelle und daraufhin folgende Aktivierung und Degranulation der Zelle spielt die Mastzelle auch eine Rolle für die Entstehung einer Immunantwort bei sekundärem Antigenkontakt. Die schnelle Freisetzung der Mediatoren könnte auch hier zu einer adäquaten Auswanderung und Aktivierung von antigenbeladenen Dendritischen Zellen und zu einer effektiven Induktion von antigenspezifischen T-Zellpopulationen führen. Weiterhin konnte gezeigt werden dass Mastzellen die Migration der T-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten in die Zielgewebe beeinflussen und somit Entzündungsreaktionen verstärken können.

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit soll die Rolle der Mastzelle und der von ihr sezernierten Mediatoren bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit analysiert werden. Zur Untersuchung von mastzellspezifischen Effekten wurden die beiden mastzelldefizienten Mausstämme WBB6F<sub>1</sub>-Kit<sup>W<sup>W</sup>-v</sup> (W/W<sup>v</sup>) und C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> (Sash) verwendet. Die Tiere wurden ohne zusätzliches Adjuvans gegen Ovalbumin sensibilisiert und provoziert. Die entstehende allergische Entzündung der Atemwege wurde durch die Messung der Atemwegsüberempfindlichkeit, der Analyse der bronchoalveolären Lavage, der Untersuchung von Lungenschnitten auf den Influx von inflammatorischen Zellen und der Entstehung einer Becherzellmetaplasie, charakterisiert und mit entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren verglichen. Um den Erfolg der Sensibilisierung zu überprüfen, wurden die Konzentrationen an antigenspezifischen Antikörpern im Serum, sowie die Zytokinproduktion von restimulierten Milzzellen untersucht. Wir konnten zeigen, dass mastzell-defiziente Mäuse nach einer Sensibilisierung ohne Adjuvans eine schwächere allergische Atemwegserkrankung entwickeln, als vergleichbar behandelte Wildtyp-Tiere. Um zu überprüfen, dass diese Beobachtung auf die Mastzelle zurückzuführen ist und es sich nicht um Nebeneffekte der Mutation handelt, wurden mastzelldefiziente C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> Mäuse mit Mastzellen, die in vitro aus dem Knochenmark von Wildtyp-Tieren generiert wurden, rekonstituiert. Nach der Sensibilisierung und Provokation entwickelten rekonstituierte mastzell-defiziente Tiere eine zu den Wildtypen vergleichbare allergische Entzündung in den Lungen.

In einer weiteren Untersuchung überprüften wir welche Rolle mastzellproduziertes TNF für die Entstehung der allergischen Atemwegsentzündung spielt. Hierzu wurden Mastzellen in vitro aus dem Knochenmark von TNF defizienten Tieren generiert und anschließend intravenös mastzell-defizienten Mäusen zur Rekonstitution injiziert. Die Tiere wurden ohne zusätzliches Adjuvans mit OVA sensibilisiert und provoziert und anschließend die Entstehung einer Atemwegsentzündung untersucht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mastzellproduziertes TNF eine Funktion bei der Ausbildung eines Asthma-ähnlichem Krankheitsbildes bei Mäusen spielt.

Zusätzlich wurden weitere Mechanismen untersucht, die zur Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung führen, und die durch Mastzellen beeinflusst

werden könnten. Einer der zentralen Schritte für die Entstehung einer adaptiven Immunantwort ist die effektive Präsentation von Antigen in den Lymphknoten durch spezialisierte Zellen (vor allem DC). DC müssen Antigen aufnehmen, es prozessieren und selbst maturieren, um zu einer potenten antigenpräsentierenden Zelle zu werden. Im "Steady-state" nehmen DC der Lunge ständig Antigen auf prozessieren es und präsentieren es T-Zellen im Lymphknoten. Sie maturieren hierbei jedoch nicht und nehmen einen semi-maturen Phänotyp an, der Toleranz induziert. Die Mastzelle könnte durch Koaktivierung und der Freisetzung von Mediatoren, wie z.B. TNF, aber auch Histamin und Prostaglandin, das Mikromillieu in der Lunge verändern. Durch die gleiche Lokalisation in der Lunge wie die DC, könnte das veränderte Mikromillieu, die Antigenaufnahme, Antigenprozessierung, die Migration und die Aktivierung von DC beeinflussen und somit einen die allergische Entzündung fördernden DC-Phänotyp induzieren.

In der Arbeit untersuchten wir die Migration von antigenbeladenen DC nach Sensibilisierung aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten in mastzelldefizienten und entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren. In Lymphknoten von Wildtyp-Tieren konnte 24 Stunden der Behandlung eine deutlich größere Anzahl an antigentragenden DC mittels FACS-Analyse detektiert werden als in vergleichbar behandelten mastzell-defizienten Tieren. In der letzten Untersuchung, die im Rahmen dieser Doktorarbeit vorgestellt werden soll, sollte die Frage beantwortet werden, ob Mastzellen die adaptive Immunantwort die durch antigenbeladene DC induziert wird beeinflussen können. Hierzu wurden DC in vitro aus Knochenmark generiert und mit Antigen beladen. Anschließend wurden die Zellen intranasal zur Sensibilisierung mastzelldefizienten und Wildtyp-Tieren appliziert und die Tiere später mit Antigen provoziert. Sowohl Wildtypen als auch mastzelldefiziente Tiere entwickelten hierdurch eine vergleichbare allergische Entzündung der Atemwege.

Ziel dieser Arbeit ist es neue Einblicke in die komplexe Pathophysiologie von Asthma zu gewinnen. Der klassische Blick auf die Mastzelle als reine Effektorzelle der akuten Reaktion soll gelockert und ihre Bedeutung als modulatorische Zelle bei der Entstehung von adaptiven Immunantworten verdeutlicht werden. Man muss berücksichtigen, dass die Untersuchungen im murinen Modell durchgeführt wurden und ihre Bedeutung erst auf den humanen Organismus übertragen werden muss. Durch seine komplexe Pathophysiologie und die vielen Phänotypen ist es noch offen in welchem Ausmaß die Mastzelle zu der Entstehung der unterschiedlichen

Krankheitsbilder beiträgt. Die Arbeit soll jedoch ein Indiz auf ihre Beteiligung geben und somit einen möglichen pharmakologischen Interventionspunkt anbieten der zur Behandlung von Asthma genutzt werden könnte.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Tubus für BAL-Gewinnung		Eigenherstellung
Durchflusszytometer	FacsCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Digitalwaage	Sartorius BP310S Sartorius Acculab Vicon	Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen
Infrarot-Lampe		Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel
Sterilbank	Tecnoflow	Integra Biosciences, Ruhberg
Magnetrührer	IKAMAG®RH	Janke & Kungel, Staufen
Mehrkanalpipetten	12-Kanal	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Inkubator, CO <sub>2</sub> begaßt	Hera Cell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Mikroskop mit Kamera	Olympus BX 40 Colorview	Olympus, Hamburg
Mikrotiterplatten- Wascheinheit	Nunc-Immuno-Wash 12	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Privileg 7020	Privileg, Fürth
pH-Meter	pH 100	VWR, Darmstadt
Lungenfunktionsmeßgerät	flexiVent-System	Scyreq, Montreal, Kanada
Photometer	Gene Quant pro	GE Healthcare, Freiburg
Ausgießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek USA
Einbettstation	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek USA
Dispenser	Handys Step	Brand, Wertheim
Halbautomatisches Rotationsmikrotom	Cut 5056	SLEE, Mainz
Wärmeplatte	MST	SLEE, Mainz
Kühlplatte	MPS/C	SLEE, Mainz

## Material & Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Pipetten	Eppendorf-Pipetten: 1-10 µl; 10-100 µl; 50-200 µl, 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Maus Fixierungskammer		FMI, Seenheim/Ober-Beerbach
Pipettierhilfe	Pipettus Akku	ICN Flow, Meckenheim
Präparierbesteck	Feine Schere, Splitterpinzette, geknöpft Gefäßschere, anat. Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	Anthos Lucy 2	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
Reaktionsgefäß-Rüttler	Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Vernebler	Ultrasonic Nebuliser Modell NE-U17	Omron, Mannheim
Verneblungskammer		Eigenherstellung
Wasserbad	ED 5A	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zählhilfe	Handstückzähler	Roth, Karlsruhe
Zytofuge	Cytospin 4	Thermo Electron Corporation; .....
Zählkammer	Neubauer	VWR, Darmstadt
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Centrifuge 5415D Minifuge GL	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heraeus Christ, Osterode

### 2.1.2 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Bezeichnung	Hersteller
Einmalspritzen	Omnican, 1ml	Braun, Melsungen
Spritzen	1 ml Injekt® 2 ml Injekt® 10 ml Discardit™ II	Braun, Melsungen Braun, Melsungen Becton Dickinson,

## Material & Methoden

Verbrauchsgegenstand	Bezeichnung	Hersteller
		Erembodegen, Belgien
Polystyrol Rundboden-Röhrchen 5 ml	BD Falcon™	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Polystyrol Rundboden-Röhrchen 5 ml mit in der Kappe integriertem Zellsieb	BD Falcon™	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Zentrifugenröhrchen	15 ml, steril 50 ml, steril	Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen
Kanülen	0,4*12 mm Sterican 0,9*40 mm Microlance™ III	Braun, Melsungen Becton Dickinson
Zellsieb	70 µm BD Falcon™	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Petrischale, plastik	60 mm Ø Cellstar 90 mm Ø Cellstar	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	12 Vertiefungen mit Deckel 24 Vertiefungen mit Deckel 96 Vertiefungen Flachboden mit Deckel	Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Mikrotiter-Platten	96-Loch-Flachbodenplatte	Nunc, Wiesbaden
Filterkarten, Zytospin		Thermo, Pittsburgh, USA
Deckgläser	24*32 mm 24*24 mm	Menzel, Saarbrücken Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektträger	Mattrand Superfrost®Plus	Diagonal, Münster Menzel, Saarbrücken
Untersuchungshandschuhe aus Latex	Micro-Touch® Ultra PF SemperCare®	Ansell, München Semperit, Wien, Österreich
Stabpipetten	Cellstar®, steril 5, 10 und 25 ml	Greiner, Frickenhausen



Verbrauchsgegenstand	Bezeichnung	Hersteller
96-Well Reaktionsplatte	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitsreaktionsgefäße	0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Parafilm	Parafilm N	Nationalcan™, Chicaco, USA
Reaktionsgefäß	1,5 ml, 2ml	Eppendorf

### 2.1.3 Steuerungs und Analysesoftware

Name	Version	Funktion	Hersteller
FlowJo	7.2.2	FACS Analyse-Software	Tree Star Inc, Ashland, USA
Cellquest Pro		FACS Steuer/Analyse-Software	BD, Becton Dickinson, Erembodegen, Belgien
Scireq flexiVent	5.0	flexiVent Steuer/Analyse-Software	Scireq, Montreal, Kanada
ADAP	1.2	ELISA Steuer/Mess-Software	Beckman Coulter, Krefeld
analySiS®	3.2	Mikroskopkamera Steuer-Software	Soft Imaging System GmbH
Sigma Plot 2001	7.0	Diagramm-Software	SPSS Inc.
Microfost® Office 2003	SP3	Kalkulation/Schreib-Software	Microsoft

### 2.1.4 Antikörper

#### 2.1.4.1 FACS-Antikörper

Epitop	Reaktivität	Fluoreszenz-Chromophor	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller
CD3e	Hamster Anti-Maus	PerCP-Cy5.5	145-2C11	armenischer Hamster IgG1	0,2 mg/ml	BD Bioscience

## Material & Methoden

Epitop	Reaktivität	Fluoreszenz-Chromophor	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller
CD4	Ratte Anti-Maus	FITC	RM4-4	Ratte (SD) IgG2b	0,5 mg/ml	BD Bioscience
CD4	Ratte Anti-Maus	PE	RM4-5	Ratte (DA) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD4	Ratte Anti-Maus	Alexa Fluor® 647	RM4-5	Ratte (DA) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD8	Ratte Anti-Maus	Alexa Fluor® 647	53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD8	Ratte Anti-Maus	FITC	53-6.7	Ratte (LOU/Ws1/M) IgG2a	0,5 mg/ml	BD Bioscience
CD11c	Hamster Anti-Maus	APC	HL3	armenischer Hamster IgG1	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD11c	Hamster Anti-Maus	PE	HL3	armenischer Hamster IgG1	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD19	Ratte Anti-Maus	PE	1D3	Ratte (LOU/Ws1/M) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD45	Ratte Anti-Maus	PE	30-F11	Ratte IgG2b		NatuTec
CD45R/B220	Ratte Anti-Maus	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	Ratte IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD40	Ratte Anti-Maus	PE	3/23	Ratte (LOU) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD80	Hamster Anti-Maus	PE	16-10A1	armenischer Hamster IgG2	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD83	Ratte Anti-Maus	PE	Michel-19	Ratte IgG1	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD86	Ratte Anti-Maus	PE	GL1	Ratte (Louvain) IgG2a	0,2 mg/ml	BD Bioscience
CD117 (cKIT)	Ratte Anti-Maus	FITC	2B8	Ratte (Wistar) IgG2b	0,5 mg/ml	BD Bioscience
CD117 (cKIT)	Ratte Anti-Maus	APC	2B8	Ratte (Wistar) IgG2b	0,2 mg/ml	BD Bioscience
FcεRI	Hamster Anti-Maus	PE	MAR-1	armenischer Hamster IgG	0,2 mg/ml	BD Bioscience
MHCII	Ratte Anti-Maus	FITC	M5/114.15.2	Ratte IgG2b	0,5 mg/ml	NatuTec
CD16/CD32	Ratte Anti-Maus		2.4G2	Ratte Ig2b	0,5 mg/ml	BD Bioscience

### 2.1.4.2 ELISA Einzelantikörper

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
IgG1	Biotin Ratte Anti-Maus IgG <sub>1</sub>	A85-1	Rat(LOU) IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
IgG2b	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgG <sub>2b</sub> Monoklonaler Antikörper	R12-3	Rat(LOU) IgG <sub>2a</sub>	BD Pharmingen
IgG2a	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgG <sub>2a</sub> Monoklonaler Antikörper	R19-5	Rat(LOU) IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen
IgE	Biotin konjugierter Ratte Anti-Maus IgE Monoklonaler Antikörper	R35-118	Rat(LOU) IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen

### 2.1.4.3 weitere Antikörper

Epitop	Bezeichnung	Klon	Isotyp	Hersteller
IgE- $\alpha$ -DNP	Monoklonaler muriner Antikörper	SPE-7	IgE	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe M. Stassen, Immunologie Mainz
Anti-IgE				Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe M. Stassen, Immunologie Mainz

### 2.1.5 ELISA Kits

Zytokin	Immunglobulin	Kit-Bezeichnung	Firma
IL-5		Mouse IL-5 ELISA Set	BD Biosciences
IL-6		Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences

### 2.1.6 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Albumin, Chicken Egg (Ovalbumin) Grade VI	Sigma, Deisenhofen

## Material & Methoden

Substanz	Hersteller
Ovalbumin-Alexa Fluor 647	Mobitec Goettingen
Acetyl- $\beta$ -Methylcholine	Sigma, Deisenhofen
2- $\beta$ Mercaptoethanol	Gibco, Grand Island, USA
Aqua dest.	Braun, Melsungen
D(+)-Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Roth, Karlsruhe
Ethanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Applichem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, Na <sub>2</sub> -Salz* 2 H <sub>2</sub> O (EDTA) (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> x Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Formalin (4%)	Roth, Karlsruhe
Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> )	Fluka, Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
L-Tryptophan (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (NaCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Fluka
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 1M	Roth, Karlsruhe
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Applichem, Darmstadt

### 2.1.7 Betäubungsmittel

#### 2.1.7.1 Grundlösungen

Name	Wirkstoff	Konzentration	Hersteller
Narcoren®	Pentobarbital-Natrium	160 mg/ml	Merial, Halbermoos
Rompun 2%	Xylazin, als Xylazinhydrochlorid	20 mg/ml	Bayer, Leverkusen
Ketamin-ratiopharm®	Ketamin, als Ketaminhydrochlorid	50 mg/ml	Ratiopharm, Ulm

#### 2.1.7.2 Verbrauchsansätze

Name	Verwendung	Gebrauchsansatz	Applikation
Pentobarbital-Natrium	Lungenfunktion, Suprimiert Eigenatmung und Schmerzempfinden	1:5 v/v mit PBS verdünnen  z.B. 200 µl Narcoren + 800 µl PBS	100 µl pro 20 g intra peritoneal
Ketamin/Rompun	Intra nasal Gabe, Suprimiert Schmerzempfinden	52,6 Vol.% Ketaminratiopharm + 21 Vol.% Rompun 2% + 26,3 Vol.% PBS  z.B. 2 ml Ketaminratiopharm + 0,8 ml Rompun 2% + 1 ml PBS	50 µl pro 20 g intra peritoneal

### 2.1.8 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Name	spezieller Einsatz	Zusammensetzung / Hersteller
1*PBS		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Gey'scher Lysepuffer	Einzelzellpräparationen	10 mM Kaliumhydrogencarbonat 155 mM Ammoniumchlorid 100 µM Ethylendiamintetraessigsäure in Aqua dest. , pH 7,5
ELISA-Stopplösung	ELISA	1 M Schwefelsäure
ELISA-Substratlösung	ELISA	TMB Substratreagenz-Set, BD Bioscience
ELISA-Waschpuffer	ELISA	1 Packung PBS Dulbecco (9,55 g/l) + 10 l Aqua dest. + 5 ml Tween
PBS Dulbecco (9,55 g/l)	ELISA-Waschpuffer	Biochrom, Berlin
FACS-Fixierungspuffer	FACS	PBS 1% (v/v) FCS 1% (w/v) Natriumazid
FACS-Waschpuffer	FACS	PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd

## Material & Methoden

Name	spezieller Einsatz	Zusammensetzung / Hersteller
ELISA-Beschichtungspuffer II	IL-10, -12 TNF –ELISA	0,2 M Natriumphosphat , pH 6,5 z.B. 11,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 16,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l Aqua dest.
ELISA-Beschichtungspuffer I	IL-4, -5, -6, IFN $\gamma$ IgE –ELISA	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5 z.B. 8,4 g NaHCO <sub>3</sub> + 3,56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 1 l Aqua dest.
HBSS	Lymphknoten- zellpräparation	Gibco, Grand Island, USA
L-Glutamin (200mM)	Medienzusatz	Gibco, Grand Island, USA
ELISA-Beschichtungspuffer III	OVA-spezifischer IgE -ELISA	0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat pH 9,3 z.B. 17,78 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1 L Aqua dest.
Ovalbumin- Verneblungslösung	Provokation	1% (w/v) Ovalbumin in PBS z.B. 0,5 g in 500 ml PBS
Ovalbumin- Sensibilisierungslösung	Sensibilisierung	Stammlösung: 100 mg OVA in 10 ml PBS sterilfiltriert. Verbrauchslösung: Stammlösung 1:50 (v/v) in PBS verdünnt.
DC Kulturmedium	Zellkultur	IMDM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin-Stammlösung 1 % (v/v) $\gamma$ MerCaptoethanol 1 % (v/v) Pen/Strep-Stammlösung 5 % (v/v) GM-CSF
DMEM (Minimal Essential Medium)	Zellkultur	Lovza, Verviers, Belgien
Fetales Kälber Serum (FCS)	Zellkultur	PAA, Cölbe
IMDM (Iscove´s modified Essential Medium)	Zellkultur	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

## Material & Methoden

Name	spezieller Einsatz	Zusammensetzung / Hersteller
Mastzellkulturmedium	Zellkultur	IMDM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin-Stammlösung 1 % (v/v) $\gamma$ Mercaptoethanol 1 % (v/v) Pen/Strep-Stammlösung 20 U/ml IL-3 50 U/ml IL-4 200 ng/ml Kit-Ligand
Penicilin-Streptomycin Stammlösung 10000 U/ml Penicilin 10 mg/ml Streptomycin	Zellkultur	SIGMA, Deisenhofen
Zellkulturmedium	Zellkultur	IMDM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin-Stammlösung 1 % (v/v) $\gamma$ Mercaptoethanol 1 % (v/v) Pen/Strep-Stammlösung
Zellwaschmedium	Zellkultur	DMEM + 2 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) Pen/Strep steril

### 2.1.9 Enzyme und Reagenzien

Enzym/Reagenz	Konzentration	Hersteller
Kollagenase Typ IA (von Clostridium histolyticum)	513 U/mg	Sigma, Steinheim
Kollagenase Typ 2	248 U/mg	Worthington, Lakewood, USA
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase		BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.10 Zytokine

Name	Quelle	Hersteller
GM-CSF	GM-CSF ist in den Überständen der Zelllinie X63-GM-CSF enthalten.	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Reske-Kunz, Hautklinik Mainz
muriner rekombinanter Kit Ligand	cDNA für den Kit Ligand wurde in E. Coli kloniert, exprimiert und aufgereinigt.	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe M. Stassen, Immunologie Mainz

Name	Quelle	Hersteller
murines rekombinantes IL-3	Das murine IL-3 wurde aus Überständen der Tumorzelllinie WEHI-3B gewonnen. Die Überstände wurde über eine DEAE-Säule gereinigt. Eine Unit wurde als die Konzentration festgelegt, die bei der Indikatorzelllinie DA-1 eine halbmaximale Proliferation induziert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe M. Stassen, Immunologie Mainz
murines rekombinantes IL-4	Das murine IL-4 wurde aus der transformierten Zelllinie X63Ag8-653 gewonnen. Mittels Affinitätschromatographie wurde es aufgereinigt. Eine Unit wurde als die Konzentration festgelegt, die bei der Zelllinie F4/4K.6 eine halbmaximale Proliferation induziert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe M. Stassen, Immunologie Mainz

### 2.1.11 Histologische Reagenzien

Name	Hersteller
Avidin Alexa-Fluor 488	Invitrogen, Karlsruhe
Eosin	Merck, Darmstadt
Gewebefixierungslösung	Roti®-Histofix 4,5%, Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Hemacolor® Schnelfärbung	Merck, Darmstadt
Liquid-Barrieren-Marker	Roth, Karlsruhe
Roti Histokit	Roth, Karlsruhe
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt
Trypan Blau Lösung (0,4 %)	Sigma, Steinheim

### 2.1.12 Mäuse

Stamm	Erhalten von	Zucht
WB/ReJ-W <sup>+</sup>	Jackson Laboratory	
C57BL/6J-W <sup>v/+</sup>	Jackson Laboratory	
WBB6F <sub>1</sub> -Kit <sup>W<sup>W</sup>v</sup> WBB6F <sub>1</sub> -Kit <sup>+/+</sup>		Zentrale Tierzuchtanstalt Johannes Gutenberg Klinik Mainz
C57BL/6-Kit <sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> C57BL/6-Kit <sup>+/+</sup>	Marcus Maurer Charité, Berlin	Eigenzucht durch Verkreuzen von C57BL/6-Kit <sup>W<sup>sh</sup>/+</sup>
TNF $\alpha$ -KO-C57BL/6	Kerstin Steinbrink, Hautklinik Mainz	



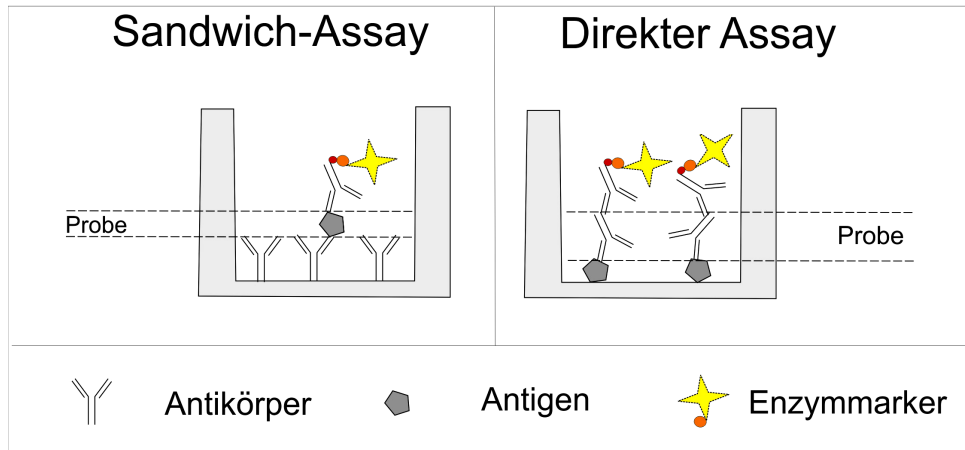
### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 ELISA - Photometrische Bestimmung von Protein und Immunglobulin Konzentrationen mittels Enzyme-linked Immunosorbant Assay

Der "Enzyme-linked Immunosorbant Assay" (ELISA) wird verwendet, um Biomoleküle wie Zytokine und Immunglobuline in Proben (z.B. BAL, Seren, Gewebehomogenaten, Zellkulturüberstände) nachzuweisen. Dieses Testsystem basiert auf einer hochspezifischen Antigen-Antikörper Reaktion, die mit einer empfindlichen nachweisbaren enzymatischen Farbreaktion gekoppelt ist. Im Allgemeinen werden zwei unterschiedliche Versuchskonzepte verwendet; der Sandwich-Assay und der direkte Assay.

Der Sandwich-Assay (s. Kasten) dient dazu die Konzentrationen von Antigenen in Proben nachzuweisen. Hierbei bindet das Epitop eines Antigens an das Paratop eines Detektionsantikörpers, der vorab an die polymere Matrix einer Mikrotiterplatte adsorbiert wurde. Durch das Waschen werden unspezifische Antigene entfernt. Folgend wird ein biotinylierter Detektionsantikörper, der spezifisch ein anderes Epitop des nachzuweisenden Antigens erkennt, dem Versuchsansatz zugegeben. An den Biotinrest des Detektionsantikörper bindet hochspezifisch ein an Streptavidin gekoppeltes Enzym (z.B. Meeretich-Peroxidase). Dieses setzt ein Substrat in einer Farbreaktion um. Durch Abstoppen der Reaktion mittels einer Stopplösung kann eine Endpunktbestimmung durchgeführt werden. Mittels Photometer wird die optische Dichte bei einer entsprechenden Wellenlänge bestimmt. Diese korreliert mit der Zahl der gebundenen Antikörper-Antigen-Enzym-Komplexe. Durch parallele Testung eines definierten Standards kann die exakte Konzentration des nachzuweisenden Antigens in der Probe ermittelt werden.

Im Gegensatz zu dem Sandwich-ELISA werden im direkten ELISA Antigen spezifische Antikörper-Titer der Proben bestimmt. Hierzu wird das zu untersuchende Antigen an die feste Phase adsorbiert. An dieses binden Antikörper der Probe die dessen Epitop erkennen. Diese Antikörper werden mittels gegen sie gerichtete biotinylierte Detektionsantikörper erkannt. Die Enzyymbindung, Reaktion und der photometrische Nachweis sind mit dem Sandwich-ELISA vergleichbar.



**Abb 2.1: Schematischer Aufbau eines Sandwich- und Direktem ELISA.** Im Sandwich ELISA wird ein gegen das zu untersuchende Protein gerichteter primärer Antikörper an die feste Phase adsorbiert. Dieser bindet das Protein aus der untersuchten Probe. Mit einem biotinylierten sekundären Antikörper, an den über eine Biotin/Streptavidin Bindung ein Enzym gekoppelt wird, wird über eine Farbreaktion die Konzentration des Proteins bestimmt. Im Gegensatz hierzu wird im direkten Assay die Konzentration von antigenspezifischen Immunglobulinen in Proben bestimmt. Hierzu wird das Antigen an die feste Phase adsorbiert. Antigen spezifische Ig binden an das Antigen. In einem Folgeschritt werden die Ig mit spezifischen gegen sie gerichtete biotinylierte Antikörper detektiert. Die Farbreaktion ist identisch mit dem Sandwich-Assay.

### 2.2.1.1 Zytokin-ELISA

Der Zytokin-ELISA basiert auf dem Sandwich-Assay. Der ELISA wurde verwendet, um Zytokine in der BAL oder in Zellüberständen nachzuweisen. Für die Versuche wurden ELISA-Kits der Firma (BD Biosciences) verwendet. Proben, Puffer und Standards wurden nach den Versuchsanleitungen der entsprechenden Kits gelagert, vorbereitet und behandelt, die Versuche wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. In Vorversuchen wurden Verdünnungsbereiche der Proben bestimmt in denen eine serielle Abnahme der OD nachgewiesen werden konnte.

Versuchsdurchführung:

Im ersten Schritt des ELISA wurde der Abfang-Antikörper des zu untersuchenden Zytokins an die feste Phase adsorbiert (coaten). Hierzu wurde der Abfang-Antikörper 1:250 im entsprechenden Beladungspuffer (s. 2.1.8) verdünnt. 50 µl des verdünnten Antikörpers wurden in jede Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipetiert und über

Nacht (10-18 Stunden) bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließendes trocken klopfen wurden ungebundene Antikörper entfernt.

Um eine durch unspezifisch adsorbierte enzymmarkierte Antikörper entstehende Hintergrundaktivität zu vermeiden ist das Abblocken freier Bindungsstellen essentiell. Hierzu wurden nach dem Waschen 100 µl Blockpuffer (PBS/10%FCS) in jede Kavität der Mikrotiterplatten pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte wiederum dreimal mittels ELISA-Wascher gewaschen und trocken geklopft.

Im folgenden Schritt kam es zum Auftrag der Proben und des entsprechenden Zytokinstandards. Proben wurden, wie in Vortest ermittelt in Versuchspuffer verdünnt und in Duplikaten aufgetragen. Die Duplikate wurden in mindestens vier Verdünnungsstufen auf der Platte seriell 1:2 verdünnt. Aliquotierte Standards wurden kurz vor Auftrag aufgetaut und zur benötigten Versuchskonzentration in Versuchspuffer verdünnt (nach Hertelleranweisung). Die Standards wurden ebenfalls in Duplikaten aufgetragen und über mindestens sechs Stufen seriell 1:2 verdünnt. Die aufgetragenen Proben und Standards wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anzahl der Platten und Plattenbelegung variierte je nach Anzahl der zu untersuchenden Proben je Versuch. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten fünf- bis siebenmal gewaschen und trocken geklopft. Der jeweilige Detektionsantikörper wurde 1:250 in Versuchspuffer verdünnt und anschließend Streptavidin-Meerettich-Peroxidase ebenfalls in einer Verdünnung von 1:250 der Antikörper-Pufferlösung zupipettiert. In jede Kavität der Platte wurden 50 µl des Antikörper-Enzym-Puffers pipettiert und die Platten anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde Substratlösung A und B auf RT gebracht. Die Platten wurden fünf- bis siebenmal gewaschen und trocken geschlagen. Substratlösung A wurde 1:2 mit Lösung B gemischt und 50 µl der Substratlösung in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert. Um die Farbreaktion abzustoppen wurde in jedes Loch der Platte 50 µl Stopplösung pipettiert.

Die OD bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde mittels ELISA-Photometer bestimmt. Die Antigenkonzentration wurde mittels linearer Regression und Vergleich mit den Standardkurven berechnet.

### 2.2.1.2 Antikörper-ELISA

Der Antikörper-ELISA basiert auf dem direkten Assay und diente zum Nachweis von Antigen-spezifischen Immunglobulinen im Serum. Mit diesem ELISA wurden die Titer von Antigen-spezifischem IgE, IgG1 sowie IgG2a/b detektiert. In Vorversuchen wurden Verdünnungsbereiche des Serums ermittelt, in denen eine serielle Abnahme der OD zu bestimmen ist.

Versuchsdurchführung:

Im Gegensatz zum Zytokin-ELISA wurde beim Antikörper-ELISA im ersten Schritt das Antigen, für welches die spezifischen Immunglobuline nachgewiesen werden sollten, an die feste Phase adsorbiert. Hierfür wurde Ovalbumin auf eine Konzentration von 25µg/ml in Bindungspuffer verdünnt. 50 µl der Antigen-Puffer-Lösung wurden in jede Kavität einer 96-Loch Mikrotiter Platte pipettiert und über Nacht (10-18 Stunden) bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden anschließend dreimal gewaschen und ausgeklopft. Um freie Bindungsstellen zu blockieren und somit eine unspezifische Enzymaktivität zu minimieren, wurde 100 µl Blockpuffer in jedes Loch der Platte pipettiert. Die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und folgend wie bereits beschrieben gewaschen. Anschließend wurden Seren aufgetaut und geeignete Startverdünnungen mit Versuchspuffer angesetzt. Jedes Serum wurde als Duplikat auf die Platte aufgetragen und die Duplikate über mindestens vier Verdünnungsstufen seriell 1:2 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten fünfmal wie bereits beschrieben gewaschen. Der entsprechende Detektionsantikörper wurde 1:250 in Versuchspuffer verdünnt und 50 µl in jede Kavität pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte fünfmal gewaschen. An Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase wurde 1:1000 in Versuchspuffer verdünnt und 50 µl in jedes Loch der Mikrotiterplatte pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei Raumtemperatur wurde die Platte siebenmal gewaschen und ausgeklopft um überschüssiges Enzym zu entfernen. In jedes Loch wurde 50 µl Substratlösung pipettiert, die vorab in einem Mischungsverhältnis von 1:2 bei Raumtemperatur aus Substratlösung A und B angesetzt wurde. Mittels Stopplösung wurde die Farbreaktion beendet. Die OD bei

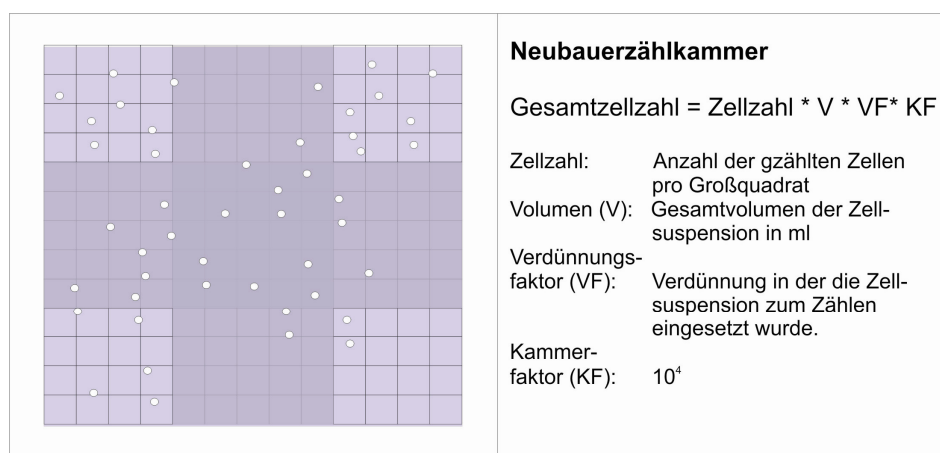
einer Wellenlänge von 450 nm konnte nun mittels ELISA-Photometer bestimmt werden. Unter Durchführung der linearen Regression wurde der antigenspezifische Antikörpertiter der Seren der bei einer optischen Dichte von 0,2 vorliegt errechnet.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl von Zellsuspensionen wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zählkammer zeigt eine Gitterstruktur, die vier Großquadrate aufweist. Nach sorgfältigem abdecken der Kammer mittels Deckgläschen entsteht über den Großquadraten ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ . 10  $\mu\text{l}$  einer geeignet vorverdünnten Zellsuspension wurden (1:2 oder 1:10) in die Zählkammer pipettiert. Um die Zellen besser zu erkennen und lebende von toten Zellen zu differenzieren wurden die Zellen mit Trypanblau verdünnt.

Trypanblau, ein Azofarbstoff, kann in tote Zellen eindringen und bindet dort an cytosolische Proteine. Tote Zellen erscheinen hierdurch als blaue Zellen, wohingegen lebende Zellen als ungefärbt erscheinen.

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden die Zellen von zwei bis vier Großquadraten ausgezählt. Anschließend wurde die ermittelte Zellzahl durch die Anzahl der gezählten Großquadrate dividiert und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  (errechnet sich aus dem Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ /Großquadrat) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Wenn man nun die Zellzahl/ml mit dem Gesamtvolumen in dem die Zellen aufgenommen sind multipliziert erhält man die absolute Zellzahl (Abb 2.1).



**Abb 2.1**

Schematische Darstellung der Zählquadrate einer Neubauer-Zählkammer.  
Formel zur Berechnung der Gesamtzellzahl

### 2.2.3 Gewinnung von Seren

Während jeden Versuchs wurde den Tieren Blut entnommen, um in den Seren antigenspezifische Antikörper und/oder Zytokine mittels ELISA (s. 2.2.1) nachzuweisen.

#### Durchführung

Die Mäuse wurden durch das Durchtrennen der *Vena cava inferior* geblutet. Das sich in der Brusthöhle ansammelnde Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min konnte mittels einer Pinzette der Blutkuchen entfernt werden. Das restliche Blut wurde folgend bei 10000 U/min und RT für 10 min abzentrifugiert. Überstände wurden anschließend mittels Pipette in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.4 Entnahme der bronchoalveolären Lavage

Um die zelluläre Zusammensetzung und die Zytokinsekretion in den Atemwegen zu untersuchen wurde eine bronchoalveoläre Lavage bei den Versuchstieren durchgeführt.

#### Durchführung:

Zunächst wurde betäubten Tieren ein Tubus in die Luftröhre gelegt. Hierzu wurde das Fell mit Ethanol befeuchtet und ein Schnitt vom Kinn bis zum Schlüsselbein durchgeführt. Die Haut wurde stumpf zur Seite wegpräpariert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen, sowie der Musculus sternohyoideus vorsichtig mit Hilfe zweier stumpfer Pinzetten auseinander gezogen, bis die Luftröhre sichtbar wurde. Mittels einer spitzen Präparierschere wurde das Gewebe, welches die Trachea umschließt aufgeritzt und entfernt. Folgend wurde unter der Trachea, ohne sie zu verletzen, eine spitze Pinzette durchgeführt und somit die Trachea leicht angehoben. Mittels einer spitzen Schere wurde unterhalb des Kehlkopfes ein Querschnitt gesetzt und die Trachea somit zur Hälfte eröffnet. In die Öffnung wurde der Tubus eingeführt und dieser mit einem Faden, an dem ein chirurgischer Knoten durchgeführt wurde, fixiert.

Um die BAL zu gewinnen, wurde 1 ml PBS mittels einer 1 ml Spritze langsam über den Tubus in die Lunge gespritzt und wieder langsam herausgezogen. Die BAL etwa 800-900 µl wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei 1200 U/min und 4 °C wurde sie für 10 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Das Zellpelet wurde in 200 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung (Cytospins und/oder FACS-Analyse) auf Eis gelagert.

### 2.2.5.1 Präparation der Lymphknoten für FACS-Analysen

Für die FACS-Analyse wurden tracheale und inguinale Lymphknoten präpariert. Die Lymphknoten wurden bis zur weiteren Bearbeitung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml HBSS auf Eis aufbewahrt. Die inguinalen Lymphknoten liegen unter der Haut im Bereich des äußeren Leistenrings. Die Lymphknoten wurden mittels einer spitzen Pinzette von der linken und rechten Körperhälfte aus dem sie umgebenden Fettgewebe präpariert. Der tracheale Lymphknoten befindet sich auf der dorsalen Seite hinter der Lunge und liegt der Trachea an.

Pro Lymphknoten wurde in eine 6-Loch-Zellkulturplatte 2 ml HBSS pro Kavität vorgelegt. Die Lymphknoten wurden folgend in die entsprechende Kavität überführt und mittels zweier Spritzenspitzen (0,9\*40 mm) zerrupft. Anschließend wurden sie zwischen den rauen Seiten zweier Objektträger zerkleinert. Die Zellsuspension wurde mit einem weiteren ml HBSS über ein Zellsieb in ein 3 ml Reaktionsröhrchen überführt. Dieses wurde bei 1200 U/min für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpelet aufgebrochen und die Zellen in 1 ml FACS-Waschpuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl (s. 2.2.2) bestimmt und die Zellen auf  $2 \cdot 10^7$  pro ml für die FACS-Färbung in FACS-Waschpuffer eingestellt.

### 2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder auch "Fluorescence-activated-cell-sorting" (FACS) ist ein Verfahren, Zellen anhand ihrer Größe und Granularität, als auch an besonderen Oberflächenstrukturen und intrazellulären Eigenschaften zu differenzieren.

Die Messung beruht darauf, dass von einer Zellsuspension mittels einer Kanüle ein laminarer Probenstrom erzeugt wird. Einzelne Zellen werden dabei an einem Laser vorbeigeleitet. Je nach Größe und Granularität wird das auf die Zelle treffende Licht des Lasers unterschiedlich stark gestreut. Streuung die nach vorne abgeleitet wird ist hierbei ein Maß an Größe, und wird als Vorwärtsstreulicht oder Forwardscatter (FSC) detektiert. Je höher die Granularität einer Zelle ist, desto mehr des auf die Zelle treffenden Lichtes wird in einem 90° Winkel reflektiert, dieses Seitwärtsstreulicht wird als Sidescatter bezeichnet und aufgezeichnet. Allein mittels Größe und Granularität lassen sich in einem Zellgemisch einzelne Zellpopulationen voneinander unterscheiden. Will man eine Zellsuspension jedoch genauer analysieren und zwischen Subpopulationen unterscheiden, sowie die intrazelluläre Zusammensetzung einzelner Zelltypen analysieren, kommt es zum Einsatz spezifischer Antikörper. Diese Antikörper können direkt mit einem fluoreszierenden Molekül markiert sein (direkte Färbung) oder mit einem sekundären fluoreszenzgekoppeltem Antikörper detektiert werden (indirekte Färbung). Die Fluorochrome werden durch das monochromatische Licht des Lasers angeregt, ein Teil der Energie wird adsorbiert der Rest wird emittiert und mittels Detektor erfasst. Je nach gewähltem Fluorochrom variieren die Wellenlängen der Emission. In einem komplexen System aus Spiegeln, Linsen und Filtern werden die einzelnen Wellenlängen voneinander getrennt und unterschiedlich detektiert. Je nach verwendetem Durchflusszytometer ist es so möglich eine Zellprobe parallel mit bis zu acht verschiedenen Fluorochromen zu markieren und somit eine sehr exakte Zellanalyse durchzuführen.

Am meisten sind jedoch noch Geräte in Gebrauch die vier Fluoreszenzen (FL1-FL4), sowie SSC und FSC detektieren können.

Es gibt eine große Bandbreite an Fluorochromen mit einer ebenso großen Bandbreite an Emissionsspektren. Die am häufigsten in der Forschung verwendeten Antikörper gekoppelten Farbstoffe, sind FITC, PE, PerCP und APC. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist ein gelbgrüner Farbstoff der ein Absorptionsmaximum von 495



nm hat und Fluoreszenzlicht bei 519 nm emittiert, er wird im ersten Fluoreszenzkanal detektiert. Phycoerithrin (PE) wird bei gleicher Wellenlänge angeregt, emittiert jedoch Fluoreszenzlicht in einer längeren Wellenlänge (578 nm) und kann mit dem zweiten Fluoreszenzkanal gemessen werden. Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) hat ein Emissionsmaximum von 678 nm und wird häufig verwendet um Moleküle zu markieren, die im dritten Fluoreszenzkanal detektiert werden sollen. Abschließend ist noch Allophycocyanin (APC) zu erwähnen, dass ein Emissionsmaximum von 660 nm hat und im vierten Kanal gemessen wird. Sollten mehrere Farbstoffe in einer Probe parallel verwendet werden, ist es wichtig zu beachten, dass es sich in den angegebenen Wellenlängen um Maxima handelt. Jeder Farbstoff hat einen größeren Emissionsbereich und so kann es vorkommen, dass sich Emissionen zweier Farbstoffe überlappen. Es ist daher notwendig eine Kompensation am Gerät durchzuführen. Ziel einer Kompensation ist es falsch positive Signale zu unterdrücken, Überlappen sich z.B. die Emissionen von Fluoreszenz A und B, ist es notwendig Detektor A so zu justieren, das er nur Signale von Fluoreszenz A erkennt und umgekehrt. Sind diese Hürden überwunden können Einzelzellsuspensionen auf ihre Zellzusammensetzung und Eigenschaften in relativer kurzer Zeit analysiert werden. Für die Detektion und Auswertungen stehen verschiedene Programme zur Verfügung, die je nach Hersteller unterschiedlich aufgebaut sind.

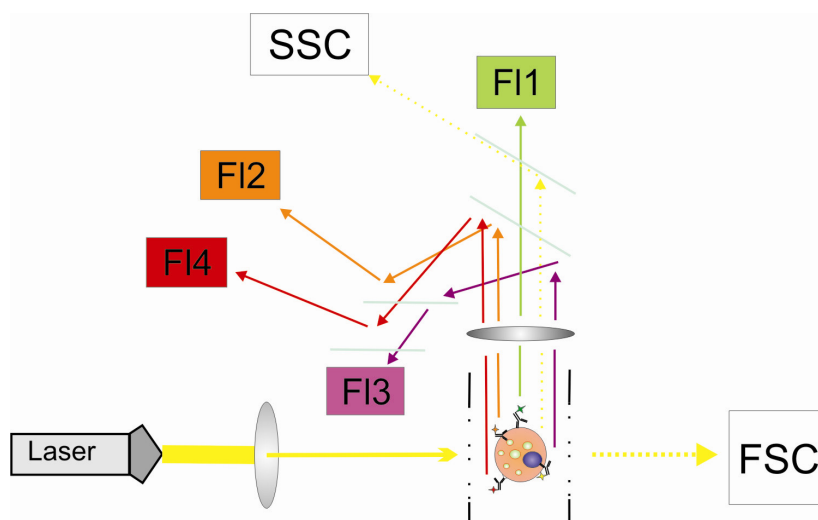


Abb 2.2: **Schematische Darstellung des optischen Systems eines Durchflußzytometers.** Ein durch einen Laser produzierter Lichtstrahl wird fokussiert und trifft in einer Meßküvette auf den Probenfluss. Durch die Zellen wird das Licht dort gestreut und reflektiert. Außerdem werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht in ihrer spezifischen Wellenlänge. Über ein Spiegel und Filtersystem werden die einzelnen Wellenlängen voneinander getrennt und von Detektoren erfasst.

Durchführung:

Für jede Färbung wurden 25 µl der vorab auf  $2 \cdot 10^7$  Zellen eingestellten Zellsuspensionen pro Probe in ein FACS-Zentrifugenröhrchen überführt. Zu den Zellen wurde 25 µl FACS Blockpuffer pipettiert. In diesem Puffer sind anti-Maus CD16/CD32 Antikörper enthalten, die 1:100 in PBS vorab verdünnt wurden. Diese Antikörper binden an die Fcγ-Rezeptoren (II und III) und verhindern somit, dass die Fluoreszenz-markierten Antikörper dort unspezifisch erkannt und gebunden werden. Die Zellen wurden gerüttelt und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Die Fluoreszenzantikörper wurden in den Konzentrationen (siehe Tabelle 2.1), die in Vorversuchen bestimmt wurden verwendet. Für die Färbungen wurden Mastermixe erstellt und 50 µl in das FACS-Zentrifugenröhrchen, dass für die entsprechende Färbung vorgesehen war zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen wieder kurz gerüttelt und für 15 min bei RT im Dunklen inkubiert. Folgend wurde 2 ml FACS-Waschpuffer zu den Zellen pipettiert und die Zellen für 5 min bei 1200 U/min bei RT abzentrifugiert. Überstände wurden verworfen, das Zellpellet aufgebrochen und die Zellen erneut mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation, wurde der Überstand erneut verworfen, das Zellpelet aufgebrochen und die Zellen in 100 µl FACS-Fixierungspuffer aufgenommen. FACS-Messungen wurden an einem vier Farben Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson in der FACS-Fascilität der Uniklinik Mainz vorgenommen. Das Gerät wurde mittels der Software Cell Quest pro angesteuert und bedient. Von Zellkulturen wurden zwischen 10000 und 25000 Zellen gemessen, von Organzellsuspensionen zwischen 150000 und 200000 Zellen. Die Auswertungen wurden z.T. auf der bereits erwähnten Cell Quest pro Software, als auch mittels FlowJo der Firma Tree Star durchgeführt.

Fluoreszenz-Chromophor	Epitop	Absorptionsmaximum (nm)	Emmissionsmaximum (nm)	Eingesetzte Verdünnung	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
FITC	CD4	495	519	1:200	0,25 µg	BD Bioscience
	CD8	495	519	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD117 (cKIT)	495	519	1:200	0,25 µg	BD Bioscience
	MHCII	495	519	1:800	0,0625 µg	NatuTec
PE	CD4	480; 565	575	1:200	0,1 µg	BD Bioscience
	CD11c	480; 565	575	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD19	480; 565	575	1:200	0,1 µg	BD Bioscience
	CD45	480; 565	575	1:1000	0,015 µg	NatuTec
	CD40	480; 565	575	1:100	0,1 µg	BD Bioscience
	CD80	480; 565	575	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD83	480; 565	575	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD86	480; 565	575	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
PerCP-Cy5.5	FcεRI	480; 565	575	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD3e	482	695	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
Alexa Fluor® 647	CD45R/B220	482	695	1:200	0,1 µg	BD Bioscience
	CD4	401	660	1:200	0,1 µg	BD Bioscience
APC	CD8	401	660	1:100	0,1 µg	BD Bioscience
	CD11c	650	660	1:100	0,2 µg	BD Bioscience
	CD117 (cKIT)	650	660	1:200	0,1 µg	BD Bioscience

**Tabelle 2.1:** Übersicht der in den Versuchen verwendeten FACS-Antikörpern

### 2.2.7. Zellkultur

#### 2.2.7.1 Generierung von Dendritischen-Zellen aus Knochenmark

Um eine Atemwegsüberempfindlichkeit mittels antigenbeladenen DC, die intranasal appliziert wurden, zu induzieren (siehe 2.2.12.3), wurden Dendritische-Zellen aus Knochenmarkszellen generiert. Alle Präparations- und Kultivierungsarbeiten fanden hierbei unter sterilen Bedingungen statt.

Durchführung:

Präparation der Knochenmarkszellen

Vor der Präparation wurde eine Petrischale mit EtOH (70%), sowie wie zwei Petrischalen mit Waschmedium (MEM + 2% FCS) vorbereitet. Für den Versuch wurden weiterhin zwei sterile Fellpinzetten, eine sterile Fellschere (Knopfschere), zwei sterile Feinpinzetten und eine spitze sterile Präparationsschere benötigt.

Eine Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet. Das Tier wurde anschließend in Rückenlage fixiert und das Fell leicht befeuchtet. Von der Beckenmitte ausgehend wurde ein Schnitt zum linken und rechten Fuß durchgeführt und die Haut stumpf wegpräpariert. Unter- und Oberschenkelknochen des Tieres wurden vorsichtig herauspräpariert und mittels Pinzette und Schere die Muskeln entfernt. Muskelreste können durch das Reiben zwischen alkohol- getränkter Gaze beseitigt werden. Die Knochen wurden kurz zur Desinfektion in eine mit EtOH gefüllte Petrischale getaucht und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung in die erste mit Waschmedium befüllte Petrischale gelegt.

Einzelne Knochen wurden aus Waschschale 1 herausgenommen und vorsichtig mittels einer Schere der obere und untere Gelenkkopf abgeschnitten. Eine sterile Spritze (5-10 ml) wurde mit Waschmedium aus Waschschale 2 befüllt und mittels einer Kanüle (0,7\*30 mm) wurde anschließend das Knochenmark aus dem Knochen in die Waschschale 2 gespült. Dieser Vorgang wurde mit allen Knochen wiederholt. Folgend wurden die Zellen in Schale 2 fünfmal mit der Spritze resuspendiert. Mittels einer Stabpipette wurden die Zellen über einen sterilen Filter (0,7 µm Porengröße) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Petrischale wurde mit weiteren 10 ml Waschpuffer gespült und diese ebenfalls über das Zellsieb in das Reaktionsröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden bei 1200 U/min (800\*g) bei 4°C für 8-10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aufgebrochen. Um störende Erythrozyten zu beseitigen, wurde eine Gey´sche Lyse durchgeführt. Hierzu wurde auf die Zellen 1 ml Gey´scher Lysepuffer pipettiert und unter leichtem Schütteln für eine Minute inkubiert. Die Lyse wurde mit 10 ml Waschpuffer abgestoppt und die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet sollte nun weiß sein, falls nicht wurde die Lyse wiederholt. Bei weißem Pellet wurde der Überstand verworfen, das Pellet aufgebrochen und 10 ml Waschpuffer zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Waschpuffer aufgenommen und mittels Zählkammer die Zellzahl bestimmt (2.2.2). Die Zellen wurden auf  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml mit DC-Kulturmedium eingestellt.

Zellkultur:

Um eine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Dendritischen-Zellen zu induzieren wurden die Zellen in Gegenwart des Differenzierungsmoleküls GM-CSF (Granulocyten-Monocyten-Kolonie-Stimulations-Faktor) kultiviert.

Zur Kultivierung der Zellen wurden 8 cm Petrischalen verwendet. Pro Platte wurden  $2 \cdot 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von 10 ml KM + 5 % GM-CFS eingestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank für eine Woche (8 Tage) inkubiert. An Tag 3 und Tag 6 wurden die Zellen gefüttert und täglich auf Größe und Dichte unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Am ersten Tag der Fütterung (Tag 3) wurden 10 ml KM (37°C) + 10 % GM-CSF zu den Zellen pipettiert. An Tag 6 wurde die Hälfte des Kulturmediums der Zellen mit neuem KM ersetzt, hierzu wurden 10 ml KM pro Kulturschale in einem 50 ml Reaktionsröhrchen gesammelt. Die Röhrchen wurden für 10 min bei 1200 U/min und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im gleichen Volumen an frischem KM (37°C) + 5 % GM-CSF aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend wieder zurück auf die Kulturschalen verteilt. An Tag 8 war die Kultur bereit für Versuche. Mittels FACS Analyse wurde der Reinheitsgrad überprüft und die aus Knochenmark generierten DC konnten für Folgeversuche eingesetzt werden.

### 2.2.7.2 Generierung von Mastzellen aus Knochenmark

Für in vitro Versuche und für die Rekonstitution mastzell-defizienter Mäuse wurden Mastzellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks generiert.

Durchführung:

Die Präparation der Knochenmarkszellen erfolgte wie in dem Abschnitt „Generierung von Dendritischen Zelle“ (2.2.7.1) beschrieben. Nach dem Bestimmen der Zellzahl wurden die Zellen auf  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro ml in Mastzell-Kulturmedium eingestellt.

Zellkultur:

Die Knochenmarkszellen wurden in einem Volumen von 1 ml pro Kavität auf eine 24-Loch-Zellkulturplatte ausplattiert. Die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Mastzellen dauert etwa drei bis vier Wochen. Die Platten wurden im Brutschrank bei

37 °C und 10 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gefüttert. Hierzu wurde von jeder Kavität etwas KM von der Seite abgesaugt, das restliche Medium samt Zellen wurde resuspendiert und in eine neue Kulturplatte überführt. Zu jeder Kavität wurde 500 µl frisches MZ-Kulturmedium pipettiert. Sollten die Zellen zu dicht gewachsen sein, Überprüfung mittels Lichtmikroskops, wurden die Zellen expandiert. Hierzu wurden die Zellen jeder Kavität gut resuspendiert und jeweils 500 µl auf zwei neue Kulturplatten verteilt. Zu jeder Kavität wurde zusätzlich 500 µl frisches Kulturmedium pipettiert.

Nach drei bis vier Wochen wurde die Reinheit der Zellen mittels FACS analysiert. Zellen der Kultur wurden auf die Expression von CD117 (cKIT) und FcεRI hin untersucht. Für Versuche wurden Kulturen verwendet in denen über 90 % der Zellen doppelt positiv für diese Mastzellmarker waren. In einem in vitro Assay wurde zusätzlich die Funktionalität der aus Knochenmark generierten Mastzellen getestet.

### 2.2.8 In vitro Mastzell-Aktivierungsassay

Um zu überprüfen, ob die in vitro generierten Mastzellen funktionell sind, wurde ein Degranulationsassay durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem IgE-Antikörper inkubiert, der an den hochspezifischen FcεRI-Rezeptor bindet. Durch anschließende Inkubation mit einem α-IgE-Antikörper wurden die an die Mastzelle gebundenen IgE-Antikörper kreuzvernetzt. Dieser Impuls führt zur Aktivierung der Mastzelle, die Zelle degranuliert und präsynthetisierte Zytokine werden freigesetzt. Diese Zytokine können mittels ELISA (2.2.1) nachgewiesen werden.

#### Durchführung

Mastzellen aus der Kultur wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bei 1200 U/min für 10 min bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem definiertem Volumen aufgenommen und die Zellzahl (siehe Punkt 2.2.2) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml in Mastzellmedium eingestellt. In die Kavitäten einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension pipettiert. Es wurden drei Gruppen erstellt von denen jeweils Duplikate erstellt wurden; 1. unstimuliert: Zellen wurden nicht weiter behandelt; 2. Antikörper beladen jedoch nicht kreuzvernetzt: zu den Zellen wurde nur der IgE-Antikörper pipettiert; 3.

Antikörper beladen und kreuzvernetzt: Mastzellen wurden mit dem IgE-Antikörper inkubiert und dieser anschließend mittels eines  $\alpha$ -IgE-Antikörpers kreuzvernetzt. Zu den Mastzellen der Gruppe 2 und 3 wurde IgE- $\alpha$ DNP (2  $\mu$ g/ml) Antikörper pipettiert. Die Zellen wurden 48-72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen wurden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäßchen gesammelt und bei 1200 U/min für 5 min bei RT abzentrifugiert. Überstände wurden verworfen und Zellen in 1 ml Testmedium aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml in Testmedium eingestellt. Zu den Zellen der Gruppe 3 wurde  $\alpha$ -IgE-Antikörper (2  $\mu$ g/ml) pipettiert und somit die Kreuzvernetzung induziert. Die Platten wurden für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Abschließend wurden die Zellkulturüberstände in 1,5 ml Reaktionsgefäßchen gesammelt und bis zum Nachweis von IL-6 mittels ZytokinELISA bei -20° gelagert.

### 2.2.9 In vitro Restimulationsversuch von Milzzellen

Um zu überprüfen, ob die Sensibilisierung erfolgreich war wurde neben der Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen im Serum auch die OVA-spezifische Sekretion von IL-5 von in vitro restimulierten Milzzellen untersucht. Hierzu wurden Milzzellen in Gegenwart von OVA für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend die Konzentration an IL-5 in den Überständen der Zellkultur mittels Zytokin-ELISA bestimmt.

#### Durchführung

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

##### 2.2.9.1 Präparation von Milzen

Als erstes wurde ein Querschnitt der Haut unterhalb des Brustkorbs des Tiers durchgeführt, gefolgt von einem zentralen Schnitt Richtung Schambein. Die Haut wurde stumpf auseinander gezogen und fixiert. Mittels einer spitzen Schere wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Milz, die sich auf der linken Seite unterhalb der

Leber befindet, mit Hilfe einer stumpfen Pipette und der Präparierschere entnommen. Pankreasreste, die der Milz anhängen, wurden entfernt und das Organ in ein 15 ml Reaktionsröhrchen, das mit 3 ml Waschmedium gefüllt war überführt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Milzen auf Eis gelagert.

In den Boden einer 8 cm Petrischale wurde 5 ml Waschmedium und ein 70 µm Nygonsieb vorgelegt. Die Milz wurde in das Sieb überführt und durch reibende Bewegungen mit dem Stempel einer 10 ml Spritze vorsichtig zerkleinert. Das Sieb wurde anschließend auf ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellsuspension mit weiteren 5 ml Waschmedium über das Zellsieb in das Röhrchen gespült. Folgend wurde die Zellsuspension bei 1200 U/min bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Durch Zugabe von 1 ml Gey'schem Lyse Puffer und anschließender Inkubation für 1 Minute bei RT wurde die Lyse von Erythrozyten durchgeführt. Die Reaktion wurde durch das Zufügen von 20 ml Waschmedium gestoppt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben abzentrifugiert, zweimal mit 10 ml Waschmedium gewaschen und zur Bestimmung der Zellzahl (s. 2.2.2) in 10 ml Waschmedium aufgenommen. Für den Restimmulationsassay wurden die Zellen final auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro ml Kulturmedium eingestellt.

### 2.2.9.2 Restimmulationsassay:

Je Gruppe wurden vier Kavitäten einer 24-Loch Kulturplatte mit bzw. ohne OVA Protein angelegt. Hierzu wurden in die entsprechenden Löcher 500 µl OVA-Lösung (50 µg/ml Kulturmedium → Endkonzentration von 25 µg/ml), bzw. 500 µl Kulturmedium pipettiert. Zu den vorgelegten Medien wurde jeweils 500 µl der auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellten Zellsuspension pipettiert, so dass die absolute Zellzahl pro Loch  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Loch betrug. Die Platten wurden anschließend für 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Überstände auf eine neue Kulturplatte überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.



### 2.2.10 Histologie

Um pathologische Veränderungen in den Lungen nachweisen zu können, wurden Lungen in Formalin überführt und anschließend in Paraffin eingebettet um Schnitte des Gewebes anzufertigen. Mittels unterschiedlicher Färbetechniken konnten in den Lungen Entzündungen, Mukusproduktion und Mastzellrekonstitution analysiert werden.

Die Aufarbeitung der Gewebe erfolgte in den folgenden Schritten: Fixierung, Einbettung, Schnitt, Detektion und Eindeckung.

#### 2.2.10.1 Fixierung:

Um eine möglich homogene und entfaltete Gewebestruktur in der Histologie zu erhalten, wurden die Lungen vor der Entnahme mittels Histofix (Roth) aufgefüllt. Histofix enthält Formaldehyd, welches eine Fixierung des Gewebes bewirkt, indem es zwischen den basischen Aminogruppen von Proteinen Hydroxymethylbrücken bildet.

#### Durchführung:

In die Trachea von anästhetisierten Mäusen wurde wie in Abschnitt (2.2.4) beschrieben ein Tubus gelegt. Zur Präparation der Lunge wurde ein Querschnitt mittels der Knopfschere unterhalb des Brustkorbs durchgeführt, gefolgt von einem graden Schnitt vom Kinn ausgehend bis zum Brustkorbschnitt. Das Fell wurde stumpf zu Seite wegpräpariert. Mit einer spitzen Schere wurde die Bauchhöhle unterhalb des Brustkorbs bis zur Körpermitte aufgeschnitten. Auf Höhe des Herzens wurde anschließend das Diaphragma (Zwerchfell) vorsichtig durchstoßen, und nach Kollabierung der Lunge, vollständig entlang des Rippenbogens aufgeschnitten. Links und rechts wurde nun ein Schnitt mittels Knopfschere durch den Brustkorb geführt, der am Brusteingang endete. Vorsichtig, ohne die Trachea zu verletzen, wurde der Brustkorb herauspräpariert.

Mittels einer 10 ml Spritze wurde nach Entnahme der BAL vorsichtig über den Tubus Histofix® in die Lunge gespritzt. Nach dem sich die Lunge vollständig entfaltet hatte wurde die Trachea unterhalb des Tubus mit chirurgischen Garn abgebunden. Der

Tubus wurde entfernt und die Lunge vorsichtig aus der Brusthöhle herauspräpariert. Die Lunge wurde bis zu weiteren Verarbeitung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dort vollständig in Histofix bedeckt.

### 2.2.10.2 Paraffin-Einbettung

#### Durchführung

Um stabile Schnitte mit einer geringen Schichtdicke von Organen erstellen zu können, wurden diese nach der Fixierung in Paraffin eingebettet. Hierzu wurden die fixierten Schnitte

zunächst aus dem Histofix entnommen und auf eine beschriftete Eindeckkapsel gelegt. Die Kapseln wurden in einem Automaten über Nacht entwässert. Die Eindeckkapseln wurden samt der entwässerten Lungen am nächsten morgen auf eine Wärmeplatte gelegt. Der Boden eines Ausgießförmchen wurde mit warmem Paraffin bedeckt. Anschließend wurde die Lunge in das weiche Paraffin überführt und dort ausgerichtet. Die beschriftete Eindeckkapsel wurde auf das Ausgießförmchen gelegt und durch deren Löcher die Lunge vollständig mit Paraffin bedeckt. Zum Aushärten des Paraffins wurde das Förmchen auf eine Kühlplatte (-20°C) gestellt. Nach etwa 30 min war das Paraffin ausgehärtet und die Blöcke konnten aus den Förmchen herausgenommen werden. Überschüssiges Paraffin wurde mittels entsprechenden Werkzeugs entfernt.

### 2.2.10.3 Anfertigen von Schnitten

Die Paraffinblöcke wurden vor dem Anfertigen von Schnitten auf einer Kühlplatte bei -15 °C für 30 min abgekühlt. Anschließend wurden sie in ein halbautomatisches Rotationsmikrotom eingespannt. Bei einem Vorschub von 20 µm wurden die Schnitte so lange geschnitten bis eine geeignete Schnittebene erreicht wurde. Die Paraffinblöcke wurden erneut kurz bei -15 °C abgekühlt und die Blöcke wiederholt in das Mikrotom eingespannt. Der Vorschub wurde auf 4 µm reduziert und die Blöcke geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden in ein Miniwasserbad überführt, was zu einer Streckung der Schnitte führt. Im Wasserbad wurden die Schnitte auf einen vorab beschrifteten Objektträger geschwemmt. Auf jeden Objektträger wurden zwei

Schnitte gelegt. Die Objektträger wurden anschließend auf einer Wärmeplatte für 30 min bei 50 °C getrocknet. Abschließend wurden die Schnitte in einem Trockenschrank bei 60 °C für 20 min inkubiert und anschließend abgekühlt.

### 2.2.10.4 Färbungen

#### 2.2.10.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden entparafinierte Gewebeschnitte der Lunge eingefärbt um krankhafte Veränderungen, wie inflammatorische Infiltrate, sichtbar zu machen. Hämatoxylin, das zur Färbung zum basischen Hämalaun aufbereitet wird, färbt alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen blau. Vorallem werden Zellkerne mit der darin enthaltenen DNA sowie das raue Endoplasmatische Retikulum gefärbt. Eosin färbt hingegen alle acidophilen Strukturen, wie das Zellplasma und dessen Proteine rot.

Durchführung:

Entparafinierung:

Vor der Färbung wurden die parafinierten Schnitte entparafiniert. Hierzu wurden sie zweimal für 5 min in Xylol inkubiert und anschließend in der alkoholischen Reihe gewaschen. Hierzu wurden sie jeweils zweimal in 100 %igen Alkohol, 96 %igen und einmal in 70 %igen Alkohol für jeweils 2 min inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal für 2 min in Aqua dest. gewaschen.

Für die Färbung wurden die Schnitte in ein Färbegestell für 10 Objektträger einsortiert. Hämalaun Stammlösung (Merck) wurde 1:5 mit Aquadest. verdünnt und anschließend ein Färbegestell mit ihr befüllt. Die Schnitte wurden in der Hämalaunverdünnung für 5 bis 7 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einen neuen mit Aqua dest. gefüllten Färbegestell überführt. Dieser wurde unter fließendem Wasser für 5 min gewässert. Folgend wurden die Schnitte für 40 sek. in Eosin (Stammlösung + 6 Tropfen Eisessig) in ein Färbegestell gestellt. Nach kurzem Abspülen unter Leitungswasser wurden die gefärbten Schnitte wieder eingedeckt.

Hierzu wurden die Schnitte in aufsteigender Ethanolischerreihe entwässert. Die Schnitte wurden kurz in 70 % Alkohol, 96 und 100 % Alkohol gehalten. Zwischen den Alkoholbädern wurden sie gut abtropfen gelassen. Abschließend wurden sie noch zweimal in Xylol getaucht und dann eingedeckt. Zum eindecken wurde Entelan verwendet.

### 2.2.10.4.2 Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung (PAS-Färbung)

Um eine Becherzellularhyperplasie und die Mukusproduktion von Lungenepithelzellen nachzuweisen, wurde an Lungengewebschnitten die so genannte PAS-Färbung (Abk. für engl. Periodic Acid-Schiff stain) durchgeführt. Durch die in der Reagenz vorkommende Periodsäure werden freie Glycolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert. Fuchsin-schweflige Säure der Schiff'schen Reagenz bindet an diese Aldehydgruppen wodurch rot-violette komplexe Gebildet werden.

Mit der Färbetechnik werden somit Glykogen, Cellulose, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteide sowie Glykolipide gefärbt.

Durchführung:

Zunächst wurden die Schnitte wie bereits beschrieben (2.2.10.4.1) entparafiniert. Die Schnitte wurden anschließend in ein Färbegestell überführt und für 10 min in 2 %iger Periodsäure inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gespült und kurz in einen Färbegestell mit Aqua dest. gestellt. Anschließend wurden die Schnitte in einen Färbegestell mit Schiff's-Reagenz für 20 min inkubiert. Folgend wurden sie zweimal für 1 min in SO<sub>2</sub>-Wasser gewaschen und 10 min fließend gewässert. Die Schnitte wurden kurz in den Färbegestell mit Aqua dest. gestellt. Abschließend wurden sie noch 45 sek. in einem Färbegestell mit Hämalaun inkubiert und unter fließendem Wasser für 5 min gebläut. Nach dem Färben wurden die Schnitte entwässert, hierzu wurden sie zweimal in absoluten Alkohol und zweimal in Xylol für 2 min inkubiert. Im finalen Schritt wurden die Schnitte in Entelan eingedeckt.

### 2.2.10.4.3 Fluoreszenzfärbung von Mastzellen

Um zu überprüfen, ob die Rekonstitution einer mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Maus mit Mastzellen erfolgreich war, wurden entparafinierte Lungenschnitte solcher Tiere mittels Avidin-Alexa 488 gefärbt. Wie von Bussalti et. al beschrieben, bindet das positiv geladene Avidin an die sulfatierten Gruppen des Heparins in Mastzellgranula. Durch die Kopplung des Fluorchroms Alexa-488 an das Avidin können die Mastzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes als grün-fluoreszierende Zelle detektiert werden.

Durchführung:

Entparafinierung:

Die Schnitte mussten vor Durchführung der Färbung entparafiniert. Hierzu wurden sie 15 min in Xylol gestellt und anschließend in einer Alkoholischen Reihe über die Stufen absolutes EtOH, 95%, 70%, 50% für jeweils 5 min gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte nochmals 5 min in Aqua dest. gewaschen.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte 1 Std. bei RT in Blockpuffer (PBS + 10% FCS + + 1% BSA) inkubiert. Der Blockpuffer wurde gut abtropfen gelassen, Ränder um das Gewebe wurden mit einem Zellstofftuch getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in einer dunklen feuchten Kammer aufgereiht. Mittels eines Barriere Markers wurde ein Ring um den Gewebeschnitt gezogen und dieser kurz antrocknen gelassen. 200 µl verdünntes Avidin-Alexa 488 (1:1000 in Blockpuffer) wurden auf die Mitte jeden Schnittes pipettiert. In der abgedunkelten Feuchtekammer inkubierten die Proben für eine Stunde. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden final mit Eindeckmedium für Fluoreszenzfärbungen (Dako Cytomation) eingedeckt. Hierzu wurde ein bis zwei Tropfen des Mediums auf den Schnitt gegeben und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Um die Verdunstung des Eindeckmediums zu reduzieren wurden die Randbereiche des Deckgläschens mit Lack versiegelt.

Am Tag der Färbung wurden die Mastzellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes detektiert und ausgezählt. Hierzu wurde die Schnitte bei einer Wellenlänge von 470-490 nm angeregt. Mastzellen waren als grün fluoreszierende Zellen deutlich

detektierbar. Unter Verwendung der dem Mikroskop beiliegenden Steuerungssoftwares (analySiS®) Software wurden Bilder aufgenommen.

### 2.2.10.5 Erstellen von Zytospins

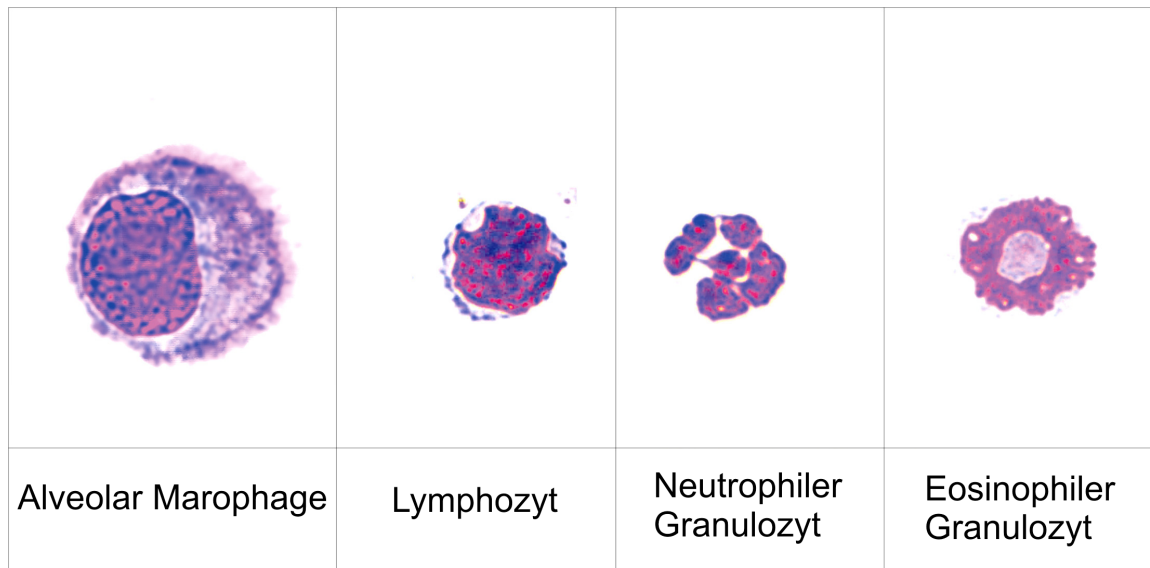
Um eine mikroskopische Analyse der Zellzusammensetzung einer Lavage durchzuführen wurden Zytospins angefertigt. Hierbei wird unter Ausnutzung der Zentrifugalkraft eine Zellsuspension auf einen Objektträger fixiert. Es sollten hierbei, um eine spätere Differenzierung zu gewährleisten, max.  $1 \cdot 10^5$ -Zellen pro 100  $\mu\text{l}$  verwendet werden. Die fixierten Zellen können anschließend mit entsprechenden Färbungen behandelt und mikroskopisch ausgewertet werden.

#### Durchführung

Objektträger wurden samt Filterpapier und Trichter auf einem Zytofugenhalter befestigt und entsprechend in der Zytofuge (eine Zentrifuge mit besonderen Vorrichtungen am Rotor) angebracht. 100  $\mu\text{l}$  der BAL-Probe wurden in den Trichter pipettiert. Folgend wurden die Proben für 10 min bei 900 U/min zentrifugiert. Nachdem die Zellen auf diese Art auf den Objektträger "gespottet" wurden, wurden die Objektträger für 10 min bis 24 Std. bei RT getrocknet.

Mittels des Hemacolor® (IVD)-Kit wurden die Zellen auf den Zytospins fixiert und eine HE-Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden für jeweils eine Sekunde fünfmal in Lösung 1, 2 und 3 gehalten. Zwischen den Schritten wurden sie ordentlich abtropfen gelassen. Abschließend wurden die Schnitte kurz mit Puffer nach Weise abgespült.

Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes wurde die zelluläre Zusammensetzung der BAL analysiert, hierbei wurden die aufgrund ihrer Morphologie deutlich voneinander differenzierbaren alveolar Makrophagen, Lymphozyten, neutrophile sowie eosinophile Granulozyten ausgezählt (siehe Abb. 2.3). Es wurden mindestens 200 Zellen gezählt und mittels Excel absolute und relative Zusammensetzung der BAL errechnet.



**Abb 2.3:** Mikroskopische Zelldifferenzierung der BAL.

### 2.2.11 Lungenfunktionsmessung

Ein murines Modell für eine humane Krankheit wie Asthma bronchiale hat immer gewisse Einschränkungen. Daher ist es wichtig, dass das Modell einen adäquaten Phänotyp aufweist um nützliche Informationen über die Pathogenese der Krankheit sammeln zu können. Neben der Analyse der Inflammation in der Lunge und bronchoalveolären Lavage mittels Histologie wurden auch Methoden etabliert um die Lungenfunktion von Mäusen zu bestimmen und somit den Phänotyp der allergischen Atemwegsentzündung besser charakterisieren zu können. Hierbei wurden sowohl invasive Methoden als auch nicht-invasive Techniken entwickelt, die beide Vor- und Nachteile bieten.

Nicht-invasiven Techniken haben den großen Vorteil, dass wiederholte Messungen am gleichen Tier möglich sind, sie sind außerdem recht einfach in der Handhabung und es ist möglich eine größere Tierzahl parallel zu messen. Änderungen der Lungenfunktion werden in dieser Technik mittels Plethysmographen analysiert. Weit verbreitet sind Messungen im Ganzkörper-Plethysmographen, hierbei werden unbetäubte Mäuse in eine geschlossene Kammer gesetzt und die Druckveränderungen, die während eines Atemzyklus auftreten aufgenommen. Mittels Vergleich mit einer leeren Druckkammer können so Atemfrequenz, Ein- und Ausatmungsdauer sowie der maximale Kammerdruck während Ein- und Ausatmung bestimmt werden. Mittels des Kammerdrucks während Ein- und Ausatmung und der

Zeitmessung zwischen früher und später Ausatmung kann der dimensionslose Parameter "enhanced Pause" (PenH) determiniert werden. Um die Überempfindlichkeit der Mäuse zu analysieren werden sie steigenden Dosen eines Bronchokonstriktors (z.B. Methacholin) ausgesetzt. Für jede Dosis wird die Änderung in PenH für 2-5 min gemessen. Die Atemwegsüberempfindlichkeit wird dann im Allgemeinen als x-facher Anstieg des PenH jeder Methacholindosis im Vergleich zu einer PBS Probe angegeben. Der Nachteil des Vollkörper-Plethismographen ist die Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen. Es konnte gezeigt werden, dass Befeuchten und Erwärmen des eingeatmeten Gases, Hyperoxie und der Zeitpunkt der Beatmung, alles Effekte, die nichts mit der Lungenmechanik zu tun haben, eine große Einwirkung auf die Messergebnisse haben. Da es nur zu einer äußeren Messung kommt haben die nicht-invasiven Methoden außerdem den Nachteil, dass keine direkte Messung der Lungenmechanik vorgenommen werden kann. Es ist somit unklar in welchem Ausmaß die Widerstände der oberen Atemwege (z.B. die Kehlkopföffnung und nasale Passagen) zur Änderungen des Atemwegwiderstandes beitragen. Weiterhin können die genaue Stärke und Lokalisierung der Bronchokonstriktion nicht analysiert werden.

Um direkte Änderungen der Atemwegsmechanik analysieren zu können sind die invasiven Techniken die Methode der Wahl. Im Gegensatz zu den nicht-invasiven Methoden wird hierbei anästhetisierten Tieren ein Tubus in die Trachea eingeführt und Änderungen der Lungenfunktion können somit direkt in der Lunge analysiert werden. Es ist möglich physikalische Messgrößen wie den pulmonalen Widerstand ( $R_L$ ) oder die dynamische Compliance ( $C_{dyn}$ ) zu bestimmen und somit reproduzierbare und aussagekräftige Daten zu produzieren.

Unter dem pulmonalen Widerstand versteht man die Summe des Atemwegwiderstandes ( $R_{aw}$ ) und des Gewebewiderstandes ( $R_{ti}$ ), welche bei normaler Atemrate vergleichbar sind. Er gibt somit Verengung der Atemwege und die Viskosität des Lungengewebes wieder. Der Lungenwiderstand  $R_L$  ist als Quotient der Druckdifferenz zur Flussdifferenz definiert:

$$R_L = \Delta P_{TP} / \Delta F$$

Mit der dynamischen Compliance wird die elastische Dehnbarkeit der Lunge beschrieben. Sie gibt das Verhältnis einer definierten Änderung des



Lungenvolumens ( $\Delta V$ ) bei einer Änderung des transpulmonalen Drucks ( $\Delta P_{TP}$ ) wieder:

$$C_{dyn} = \Delta V_T / \Delta P_{TP}$$

Um  $R_L$  und  $C_{dyn}$  bestimmen zu können ist es notwendig den transpulmonalen Druck und Fluss zu messen. Durch geeignete Umformung einer Gleichung aus Bewegung zu Druckmessung, Fluss und Volumen lassen sich dynamische Compliance und Lungenwiderstand errechnen.

$$P_{TP} = V \cdot R_L + V_T / C_{dyn}$$

$P_{TP}$  = transpulmonaler Druck (in der Maus: transrespiratorischer Druck)

$V_T$  = Tidalvolumen

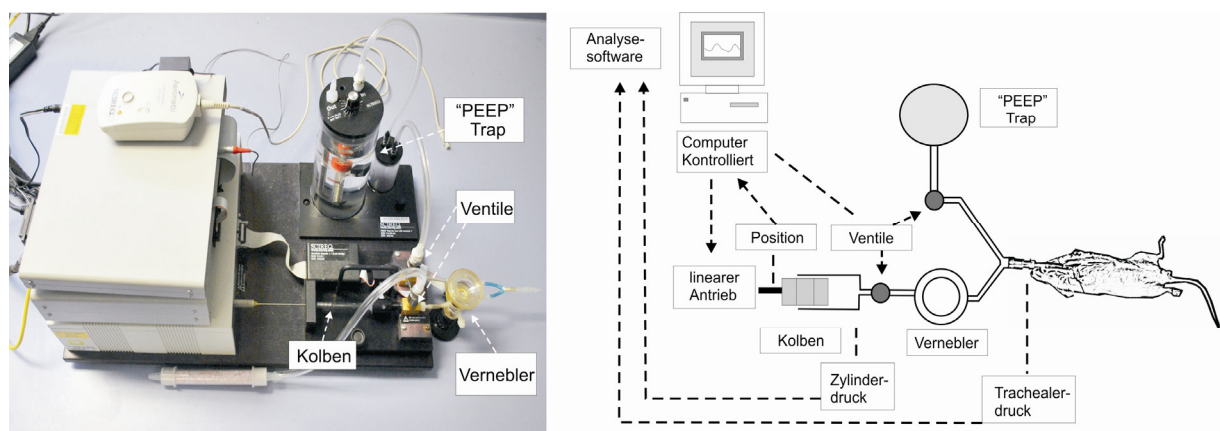
$V$  = Tidalatemfluss

Mit der invasiven Messung ist es möglich geringste Änderungen in der Lungenmechanik auf reproduzierbare und präzise Art zu überprüfen. Durch die Messung über den intra-trachealen Tubus werden Änderungen in den oberen Atemwegen umgangen und somit Fehlanalysen vermieden. Die Nachteile der Methode sind, dass die Durchführung der Tracheostomie chirurgische Expertise Bedarf und wiederholte Messungen nicht durchführbar sind. Für die Messung an sich ist es notwendig, dass die Tiere von erfahrenen Experimentatoren anästhetisiert und mechanisch beatmet werden.

### 2.2.11.1 Invasive Messungen mittels flexiVent-System

Die Atemwegsüberempfindlichkeit wurde mittels invasiver Messung, die mit Hilfe des flexiVent der Firma Scireq (Montreal, Kanada) durchgeführt wurde, bestimmt. Bei dem flexiVent handelt es sich um eine Kombination aus mechanischer Beatmung und ständiger online Analyse der Atemmechanik. Mittels der "Forced Oscillation"-Technik (FOT) werden Meßparameter wie Lungenwiderstand und Compliance bestimmt. In der FOT wird mittels eines computer-gesteuerten Kolbens ein oszillierendes Signal generiert. Durch das Signal wird in der Lunge ein charakteristisches messbares Schwingungsmuster erzeugt. Setzt man den absoluten Druckunterschied mit dem absoluten Volumenunterschied ins Verhältnis, erhält man

die Impedanz. Der Druck wird mittels Druckfühler gemessen, das Volumen wird durch den computergesteuerten Ventilator vorgegeben. Applikation von Bronchoskonstriktoren (z.B. Methacholin) führt zu einem Druckanstieg und somit auch zur Zunahme der Impedanz. Mittels der Impedanz lässt sich eine komplexe Lungenfunktionsgleichung erstellen, das so genannte Konstante-Phase-Modell, mit dem sich detailliert Veränderungen der Lungenmechanik berechnen lassen. Der Frequenzraum der Impedanz besteht aus zwei Größen; dem Widerstand (R) und der Reaktanz (X), diese beschreibt die Compliance (1/Elastanz), die die Dehnbarkeit des Lungengewebes widerspiegelt.



**Abb 2.4: flexiVent-Meßapparatur/schematische Darstellung der Lungenfunktionsmessung**

links: flexiVent-Meßapparatur; Darstellung des Gerätes nach Aufbau  
rechts: schematische Darstellung der Lungenfunktionsmessung; Über einen Computer wird die Ventilation und Datenerfassung/Analyse gesteuert. Der Computer kontrolliert die Anzahl und Druck des Kolbens. Über die Ventile werden Druckunterschiede erfasst, über welche die Meßparameter errechnet werden können, gemessen. Über die „PEEP-Trap“ kann der Positivenexpiratorischedruck eingestellt werden.

Durchführung:

Starten des Gerätes

Zu Beginn einer Lungenfunktionsmessung wurde die Steuerungssoftware geöffnet. Über diese werden Ventilationsparameter eingestellt, Verneblung und Messung gesteuert und die Datenpunkte gesammelt. Mittels eines Hilfsprogramms wurden alle Routineeinstellungen vorgenommen. Hierzu gehören, die Auswahl des Templates, Eingabe des Experimentators und der Versuchsreihe, Bezeichnung des zu analysierenden Tieres und die Kalibrierung des Zylinder- und Atemwegsdruckmessers. In den Templates werden Grundeinstellungen

festgehalten wie; Art des Tieres, Beatmungseinstellungen, Messoptionen und Skriptfunktionen. Für die Versuche wurde ein auf die Messung von Mäusen optimierte Programmvorlage verwendet.

Zur Eichung des Zylinder- und Atemwegsdrucks wurde einmalig vor Experimentbeginn durchgeführt. Mittels eines Barometers wurden zwei definierte Druckpunkte dem Gerät vorgegeben. Für ersten Punkt wurden 0 cmH<sub>2</sub>O gewählt. Zur Festlegung des zweiten Meßpunktes wurde das Barometer an die Apparatur angeschlossen und eine Wassersäule von 20 cmH<sub>2</sub>O eingestellt. Darauf folgend wurde der Tubus geeicht. Um auszuschließen, dass Widerstände die durch den Tubus bedingt sind in die Analyse einkalkuliert werden, wurde diese Eichung vor der Messung jeder Maus durchgeführt. Der Tubus wurde hierzu an die Apparatur angeschlossen und den Aufforderungen des Hilfsprogramms gefolgt.

Nach Durchführung dieser Voreinstellungen wurde die Messung begonnen.

### Messung

Um die Lungenfunktion von Mäusen messen zu können müssen sie anästhetisiert, intubiert und folgend künstlich beatmet werden. Zur Narkose wurde ein Barbiturat (Pentobarbital) verwendet, welches das Tier sediert, das Schmerzempfinden des Tieres unterdrückt und die Eigenatmung blockiert. Das Betäubungsmittel wurde vor jedem Versuchstag frisch angesetzt, hierzu wurde die Stocklösung 1 zu 5 in PBS verdünnt. Den Mäusen wurde das Betäubungsmittel in einer Dosis von 5 ml/kg Körpergewicht intra peritoneal appliziert. Den betäubten Tieren wurde ein Tubus in die Trachea gelegt (2.2.4). und anschließend an die Meßapparatur angeschlossen. Die Mäuse wurden mit einer Frequenz von 120 Atemzügen/min und einem Tidalvolumen von 10 ml/kg in der Standardeinstellung beatmet. Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) wurde auf 5 cm/H<sub>2</sub>O eingestellt. Alle 15 Sekunden wurde mittels "Snapshot-150"-Analyse der Lungenwiderstand und die Compliance bestimmt. Die Werte wurden so lange bestimmt, bis ein Maximalwert oder eine Plateauphase erreicht wurde. Nach dem Messen des Leerwertes kam es zur ersten Verneblung der Tiere. Hierzu wurde 1 ml PBS als Kontrolle und später Methacholin in seriell aufsteigenden Dosen in den Vernebler pipettiert. Zum Vernebeln wurde die Beatmungsfrequenz auf 60 Züge/min reduziert und das Tidalvolumen auf 30 ml/kg erhöht. Die Lunge wurde kurzfristig gebläht und folgend das Tier über 10 s vernebelt.

Nach der Verneblung wurde wieder auf Standardbeatmung umgeschaltet und bis zum Erreichen der maximalen Werte der Widerstand und die Compliance analysiert. Methacholin wurde wie bereits erwähnt in seriell steigenden Dosen von 6,25 mg/ml PBS bis 100 mg/ml eingesetzt. Nach der Messung jedes Tieres wurde der Vernebler mit Aqua dest. gewaschen und die Verbindungsstücke unter Druckluft ausgeblasen.

Auswertung:

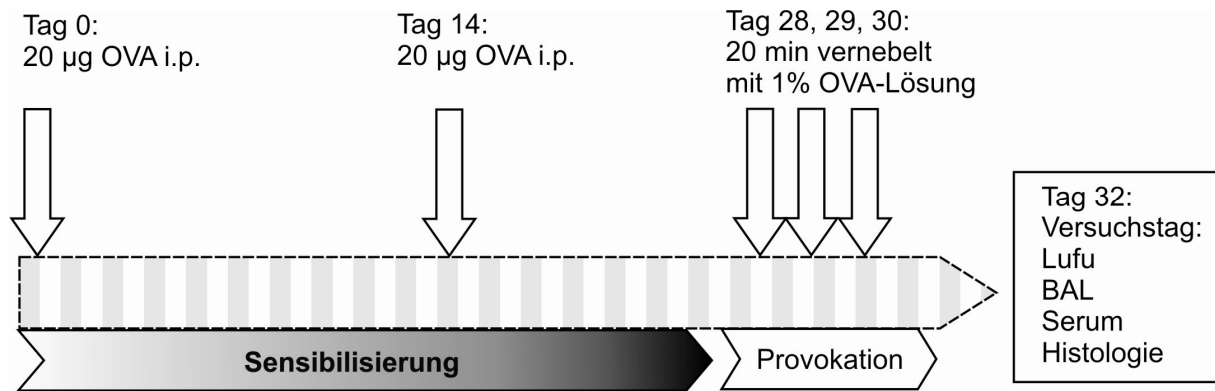
Die Auswertung der Experimente wurde mittels Excel durchgeführt. Aus den Rohdaten wurde der maximale Widerstandswert, bzw. minimalste Compliancewert zu jeder PBS-Kontrolle und Methacholindosis bestimmt und in eine Tabelle übertragen. Anhand dieser Werte wurde der prozentuale Anstieg des Widerstandes, bzw. der prozentuale Abfall der Compliance auf Reizung mit Methacholin im Vergleich zur PBS-Kontrolle bestimmt.

### **2.2.12 Versuchsmodelle**

Die in den Experimenten untersuchten allergische Entzündungen der Atemwege wurden durch Sensibilisierungs-/Provokationsprotokolle induziert. Die Tiere wurden mit einem Modellallergen (Ovalbumin) je nach Experiment systemisch oder lokal sensibilisiert. Ovalbumin ist ein klassisches, gut etabliertes Modellallergen. Es ist leicht zu handhaben und es steht eine große Bandbreite an Werkzeugen zur Verfügung, die eine detaillierte und weitreichende immunologische Untersuchung ermöglichen.

#### **2.2.12.1 Systemisches Sensibilisierungsprotokoll**

Dieses Protokoll wurde als Standardprotokoll für die Untersuchung der Funktion der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung eingesetzt. Die Tiere wurden systemisch durch die intraperitoneale Applikation von Ovalbumin sensibilisiert. Bei der Sensibilisierung wurde auf die zusätzliche Applikation von Adjuvansien wie Freund's Adjuvans oder Alum verzichtet. Die Provokation der Tiere wurde lokal durchgeführt. Um die Tiere in der Lunge zu provozieren, wurden sie in eine Kammer gesetzt und dort mit einer Ovalbuminlösung vernebelt.



Durchführung:

Sensibilisierung:

Die OVA Stammlösung wurde kurz vor Gebrauch 1:50 in PBS gemischt. 100 µl der Verbrauchslösung wurden den Versuchstieren an Tag 0 und 14 intraperitoneal appliziert.

Provokation

An Tag 28, 29 und 30 wurden die Tiere mit Allergen provoziert. Hierzu wurden sie an jedem Tag in eine Verneblungskammer gesetzt, die an einen Vernebler angeschlossen war.

In die Applikationsschale des Verneblers wurde pro Verneblung 25 ml Ovalbumin-Verneblungslösung gefüllt. Der Vernebler wurde nach Anleitung des Herstellers betriebsbereit gemacht. Nebulisierungs- und Luftstrom-Volumen wurden jeweils auf Stufe 4 eingestellt.

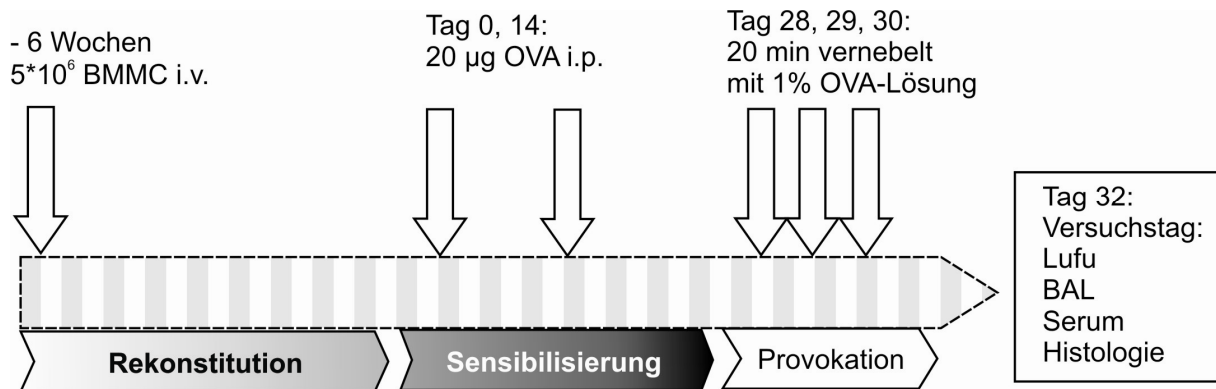
Die Verneblungskammer wurde mit trocknen Zellstofftüchern ausgelegt und anschließend die Tiere hineingesetzt. Die Kammer wurde geschlossen und der Vernebler für 20 min gestartet.

Versuchstag:

48 Stunden nach der letzten Provokation wurden Untersuchungen an den Tieren vorgenommen.

### 2.2.12.1 Rekonstitution

Um zu überprüfen, ob die in den Experimenten beobachteten Unterschiede zwischen mastzelldefizienten Tieren und Wildtyp Tieren mastzellspezifische Effekte sind und nicht auf Seiteneffekten der Mutation beruhen, wurden die mastzelldefizienten Tiere mit Mastzellen rekonstituiert. Die Mastzellen wurden wie in 2.2.7.2 beschrieben aus dem Knochenmark von Wildtyp- oder TNF-defizienten Tieren generiert. Zur Rekonstitution wurden die Zellen den Tieren intravenös in die Schwanzvene appliziert. Um zu gewährleisten, dass alle Gewebe mit Mastzellen repopuliert sind, wurden die Experimente 6 bis 8 Wochen nach Rekonstitution begonnen.



### Durchführung

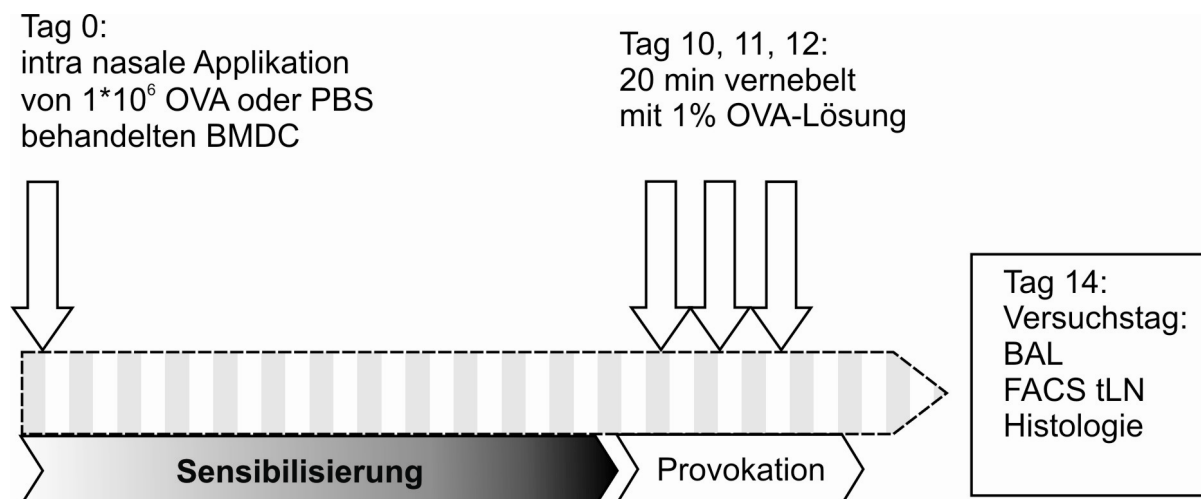
Die in Versuch 2.2.7.2 beschriebenen aus Knochenmark generierten Mastzellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 1200 U/min bei RT für 8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal in 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die absolute Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $5 \cdot 10^7$  Zellen pro ml mit PBS eingestellt. Ein Teil der BMMC wurde wie beschrieben für die FACS-Färbung vorbereitet. Bei einer Reinheit von mehr als 90% BMMCs wurden die Zellen zur Rekonstitution verwendet. 100  $\mu\text{l}$  der eingestellten Zellsuspension wurden den mastzelldefizienten Tieren intravenös appliziert. Hierzu wurden die Tiere in eine Haltevorrichtung gesetzt und diese kurzzeitig unter eine Wärmelampe gehalten. 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde in eine 1 ml Einwegspritze, die mit einer Kanüle (0,45\*13 mm) versehen war, aufgezogen und vorsichtig in die Schwanzvene appliziert. Die Venen befinden sich auf der linken oder rechten Seite des Tieres. Die

so behandelten Tiere wurden für die nächsten 6 bis 8 Wochen weiter im Tierstall versorgt. Nach diesem Zeitraum, der für eine komplette Rekonstitution der Tiere mit Mastzellen notwendig ist [43] wurden die Tiere wie unter 2.2.12.1 beschrieben sensibilisiert und provoziert.

### 2.2.12.3 DC Sensibilisierungs-Assay

Die dendritische Zelle ist die kompetenteste antigenpräsentierende Zelle des Immunsystems. Lambrecht et al. konnten zeigen, dass DCs für die Induktion einer allergischen Inflammation der Atemwege notwendig sind [115].

In diesem alternativen Sensibilisierungsansatzes sollte überprüft werden, ob die Mastzelle einen direkten Einfluss auf die Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung hat, die durch allergenbeladene DC induziert wird.



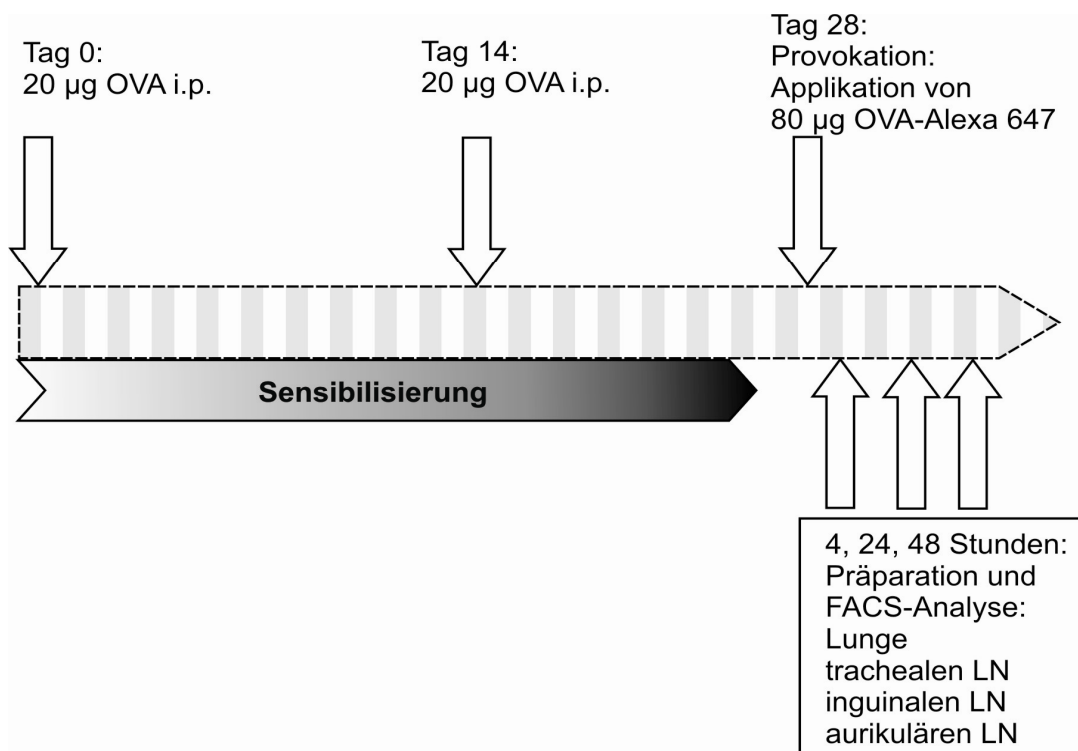
### Durchführung

Wie unter 2.2.7.1 beschrieben wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Tieren DC herangereift. An Tag 9 der Kultur wurde ein Teil der Zellen in Kulturmedium aufgenommen dem Ovalbumin (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgendem Tag wurden die OVA stimulierten und unbehandelten Zellen getrennt voneinander in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei RT für 8 min bei 1200 U/min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpelet aufgebrochen und die Zellen mit 20 ml PBS zwei mal durch erneutes

abzentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet aufbrechen gewaschen. Die Zellen wurden anschließend gezählt und mittels PBS auf  $1,25 \cdot 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Mäuse wurden mit einer Ketamin/Rompun-Mischung (2.1.7.2) betäubt und zweimal  $40 \mu\text{l}$  der Zellsuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen) intra nasal appliziert. 10 Tage nach der Behandlung wurden die Tiere provoziert, hierzu wurden sie an drei aufeinander folgenden Tagen für jeweils 20 min in einer 1%igen OVA-Lösung vernebelt. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Tiere auf eine allergische Entzündung der Atemwege hin untersucht.

### 2.2.12.4 Migrationsassay der Dendritischen Zellen

Mittels dieses Versuchs wurde analysiert, ob die Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten nach Sensibilisierung in mastzelldefizienten Tieren beeinträchtigt ist.



### Durchführung

Wie in Punkt 2.2.12.1 beschrieben, wurden Wildtyp- und mastzelldefiziente Tiere durch eine intra-peritoneale Applikation von OVA an Tag 0 und 14 sensibilisiert. Zur Provokation wurde den Tieren an Tag 28 eine fluoreszierende Modifikation von OVA (OVA-Alexa Fluor 687) intra-nasal appliziert. Hierzu wurde die Tiere durch i.p. Gabe



einer Ketamin-Rompun Mischung betäubt. Das OVA (2 mg/ml) wurde in zwei Schüben a 40 µl in die Nase der Versuchstiere pipettiert. 4, 24 bzw. 48 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere durch eine Überdosis des Betäubungsmittels getötet. Lunge, tracheale Lymphknoten und inguinale Lymphknoten wurden präpariert (2.2.5.1) und eine Einzelzellsuspension erstellt. Diese wurde mit den Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11c, MHCII und B220 gefärbt (2.2.6). Mittels FACS-Analyse konnten so konventionelle dendritische Zellen die OVA positiv waren charakterisiert und analysiert werden.

### **2.2.13 Statistische Analyse**

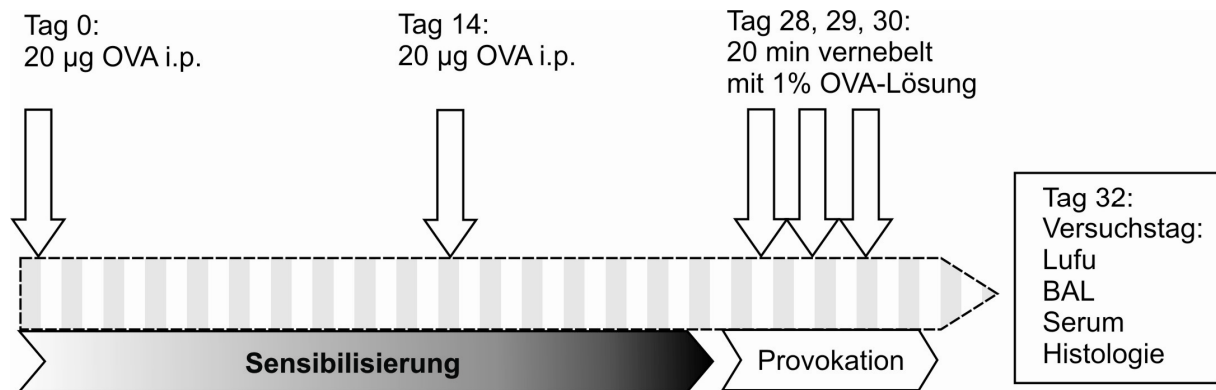
Um Unterschiede zwischen allen unterschiedlich behandelten Gruppen zu ermitteln, wurde ANOVA eingesetzt. Die Gruppen wurden mittels des Tukey-Kramer Signifikanztests verglichen. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant gewertet. Werte für alle Messungen sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Etablierung eines murinen Modells zur Untersuchung der Rolle der Mastzelle und derer Mediatoren bei der Induktion einer allergischen Atemwegserkrankung. Dazu wurden die Versuchstiere mit dem Modellantigen Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und im Anschluss inhalativ provoziert. Die Sensibilisierungen wurden durch intraperitoneale Applikation des Antigens ohne zusätzliches Adjuvans durchgeführt. Durch inhalative Exposition mit dem Antigen wurden die Tiere provoziert und die allergische Atemwegsentzündung induziert. Die Ausbildung eines asthmatischen Krankheitsbildes wurde durch einen erhöhten Atemwegwiderstand auf Bronchokonstriktoren, eine Eosinophilie der bronchoalveolären Lavage, den Influx von inflammatorischen Zellen in die Lunge und die Entstehung einer Becherzellmetaplasie charakterisiert. Weiterhin wurden die Konzentrationen an antigenspezifischen Antikörpern im Serum der Tiere ermittelt. Um die Rolle der Mastzelle im vorliegenden Modell zu ermitteln wurden mastzelldefiziente Mäuse der Stämme WBB6F1-Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> und C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup></sup> bei den Versuchen eingesetzt. Mastzellspezifische Effekte wurden durch Rekonstitution der Tiere mit aus dem Knochenmark von Wildtyp-Tieren in vitro generierten Mastzellen validiert.

#### 3.1 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung nach Sensibilisierung ohne Adjuvans

Um die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit zu untersuchen wurden Mäuse der Stämme Sash bzw. WW<sup>v</sup> gegen OVA sensibilisiert und provoziert. Zur Sensibilisierung wurde mastzelldefizienten und entsprechenden WT-Tieren an Tag 0 und 14 OVA in einer Konzentration von 20 µg/100 µl PBS intraperitoneal appliziert. Tieren, die als Negativkontrolle dienten, wurde nur PBS verabreicht. Um eine allergische Atemwegsentzündung in den Tieren zu induzieren wurden sie an Tag 28, 29 und 30 jeweils für 20 Minuten inhalativ mit OVA exponiert. An Tag 32 wurden die Versuche, die zur Charakterisierung der Entzündung der Atemwege dienten durchgeführt (siehe Abbildung 3.1)



**Abb. 3.1: Sensibilisierungs- und Provokationsmodell der allergischen Atemwegsentzündung.** Durch intraperitoneale Applikation von 20 µg Ovalbumin an Tag 0 und 14 wurden die Versuchstiere gegen das Antigen sensibilisiert. An Tag 28,29 und 30 wurden die Tiere jeweils für 20 Minuten mit einer 1%igen OVA Lösung vernebelt, um eine allergische Entzündung der Atemwege zu induzieren. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden Versuche durchgeführt um die Entstehung eines asthmatischen Krankheitsbildes zu analysieren.

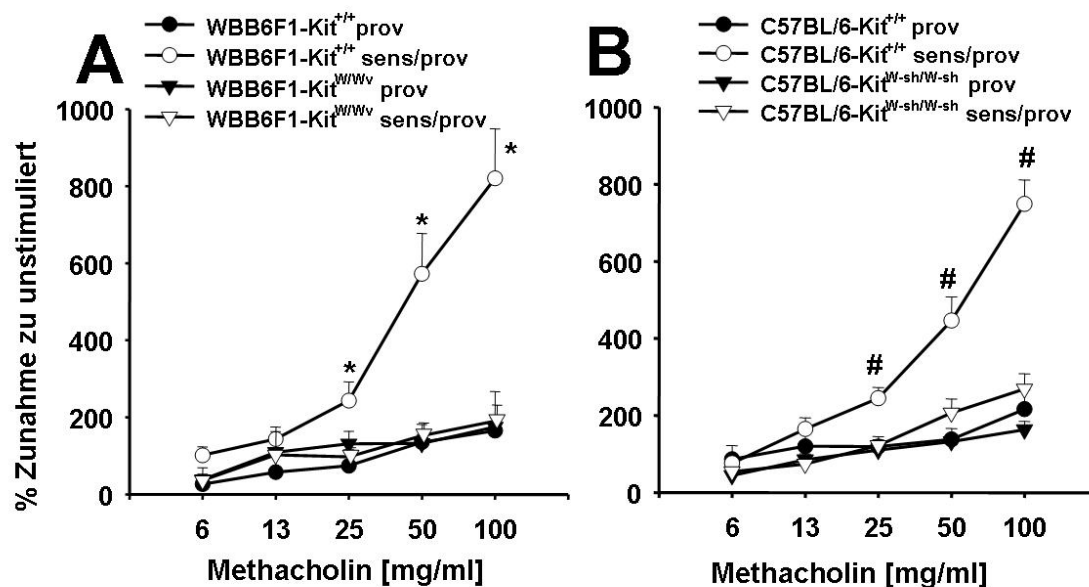
### 3.1.1 Messung der Atemwegsüberempfindlichkeit

Sensibilisierte und provozierte Wildtyp Tiere reagierten auf steigende inhalative Dosen von Methacholin mit einer Zunahme des Atemwegwiderstandes. Im Vergleich zu den Wildtypen entwickelten mastzelldefiziente Mäuse nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA keine Atemwegsüberempfindlichkeit. Dieser Effekt war zu sowohl bei sensibilisierten WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> als auch bei C57BL6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> Mäusen zu beobachten (siehe Abb 3.2). Sowohl unsensibilisierte Wildtyp als auch mastzelldefiziente Tiere reagierten nur mit einem schwachen Anstieg des Atemwegwiderstandes auf die Provokation mit den steigenden Dosen des Bronchokonstriktors.

### 3.1.2 Analyse der bronchoalveolären Lavage

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage ist eine weitere Methodik zur Charakterisierung einer asthmatischen Pathophysiologie. In Lungenspülungen von Asthmatikern kann, im Falle des allergischen Asthmas, eine

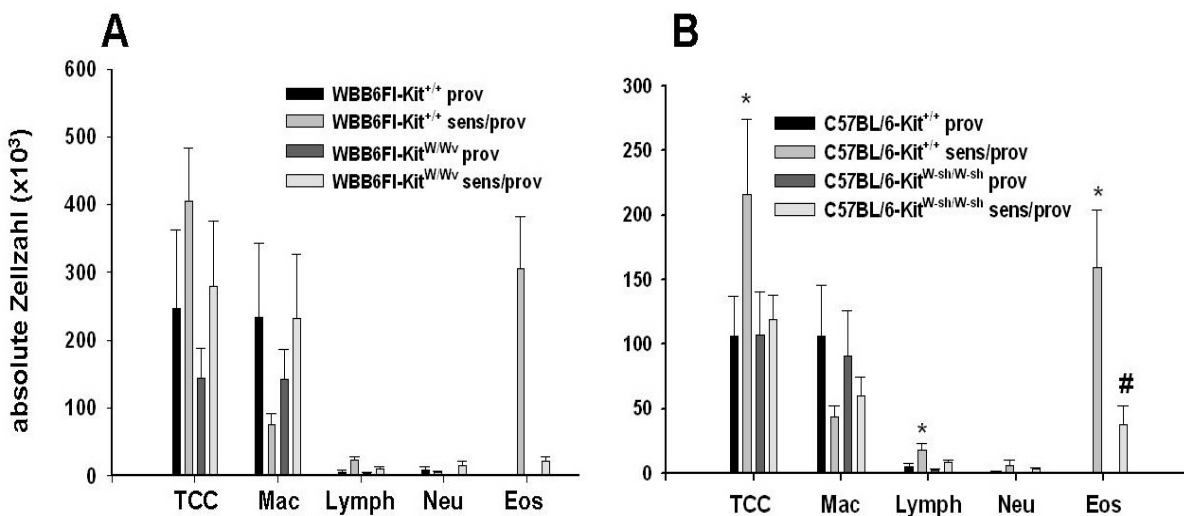
erhöhte Anzahl an inflammatorischen Zellen, wie z.B. eosinophilen Granulozyten und T-Zellen detektiert werden. Die Untersuchung der BAL zeigte, dass bei Wildtyp-Mäusen nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA eine erhöhte Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der BAL vorkommt. Im Vergleich zu den Wildtypen war die Anzahl an Eosinophilen in der BAL von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Tieren signifikant reduziert. In unsensibilisierten Tiere, sowohl Wildtypen als auch mastzelldefiziente Mäuse, war keine Eosinophilie nach Provokation mit OVA in der BAL nachweisbar.



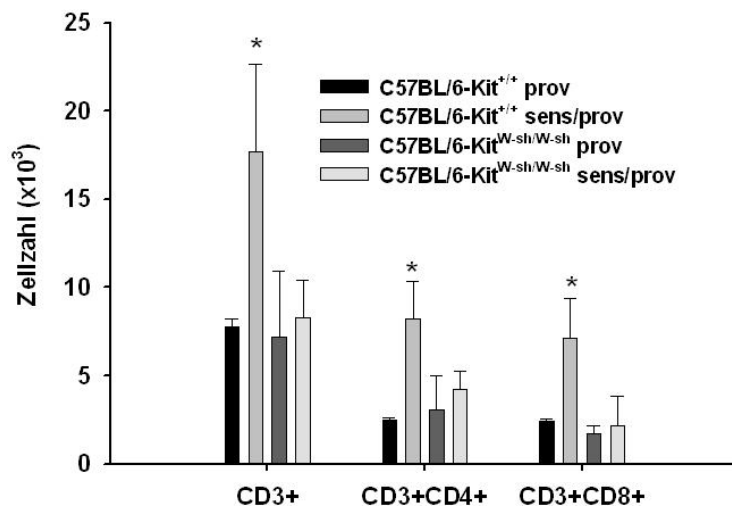
**Abb. 3.2: Messung des Atemwegwiderstandes bei mastzelldefizienten  $W^V$  und Sash und entsprechenden Wildtyp Mäusen.** Die Lungenfunktion von Wildtyp und mastzelldefizienten Mäusen wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation invasiv gemessen. Anhand der gemessenen Daten wurde der Prozentuale Anstieg des Atemwegwiderstandes provoziert durch Methacholin im Vergleich zur Provokation mit PBS bestimmt. **Bild A** zeigt die Resultate der Atemwegwiderstandsmessung von nur provozierten (prov) WBB6F1-Kit<sup>W<sup>W</sup>V</sup> und entsprechenden Wildtyp-Mäusen und von sensibilisiert und provozierten WBB6F1-Kit<sup>W<sup>W</sup>V</sup> und Wildtyp-Tieren. Pro Gruppe wurden n=7-10 Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu allen anderen Gruppen **Bild B** zeigt die Ergebnisse der Atemwegwiderstandsmessung von nur provozierten (prov) C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> und entsprechenden Wildtyp-Mäusen und von sensibilisiert und provozierten mastzelldefizienten und Wildtyp- Tieren. Pro Gruppe wurden n=7-10 Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. #  $p < 0,05$  im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

Die BAL dieser Tiere zeigte wie eine von Alveolar- makrophagen dominierte, zelluläre Zusammensetzung auf (s. 3.3). Die Analyse der BAL mittels FACS zeigte,

dass sensibilisierte und provozierte mastzelldefiziente Tiere auch eine im Vergleich zu gleich behandelten Wildtyp-Tieren geringere Anzahl an T-Zellen 48 Stunden nach der letzten Provokation aufweisen. Sowohl die Anzahl an CD4<sup>+</sup> T-Helfer als auch an CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen war in der BAL von sensibilisierten und provozierten Wildtyp Tieren deutlich höher als in entsprechend behandelten mastzelldefizienten Tieren. In unsensibilisierten Tieren war eine vergleichbare geringe Anzahl an T-Zellen detektierbar (s.3.4).



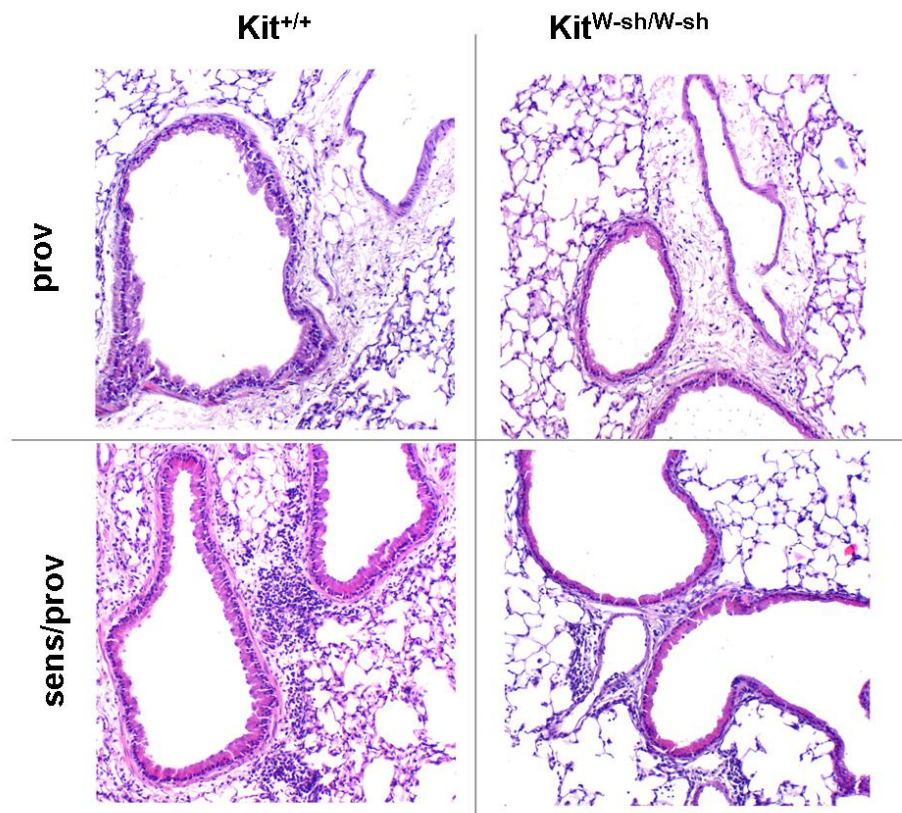
**Abb. 3.3: Analyse der zellularen Zusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage.** 48 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurde eine bronchoalveolare Lavage durchgeführt. Die Zellen der Lavage wurden fixiert, eine Differentialfärbung durchgeführt und mittels Lichtmikroskops die zelluläre Zusammensetzung bestimmt. **Bild A** zeigt die Zellszusammensetzung der BAL von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W<sup>W</sup>W<sup>v</sup></sup>- und Wildtyp-Tieren, sowie von nur provozierten Tieren. n = 8-11 Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. **Bild B** zeigt die Zelldifferenzierung der BAL von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>W<sup>sh</sup></sup> und Wildtyp-Tieren, sowie von provozierten Tieren. n = 8-12. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. \* p < 0,05 im Vergleich zu allen anderen Gruppen. # p < 0,05 im Vergleich zu C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> prov und C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>W<sup>sh</sup></sup> prov.



**Abb.3.4: Analyse der T-Zellpopulationen in der bronchoalveolaren Lavage mittels FACS.** 48 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurde eine bronchoalveolare Lavage durchgeführt. Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der Lymphozyten und die der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen bestimmt. Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl an CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen in der BAL von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und Wildtypen, sowie von provozierten Tieren. n = 8-12. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. \* p < 0,05 im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

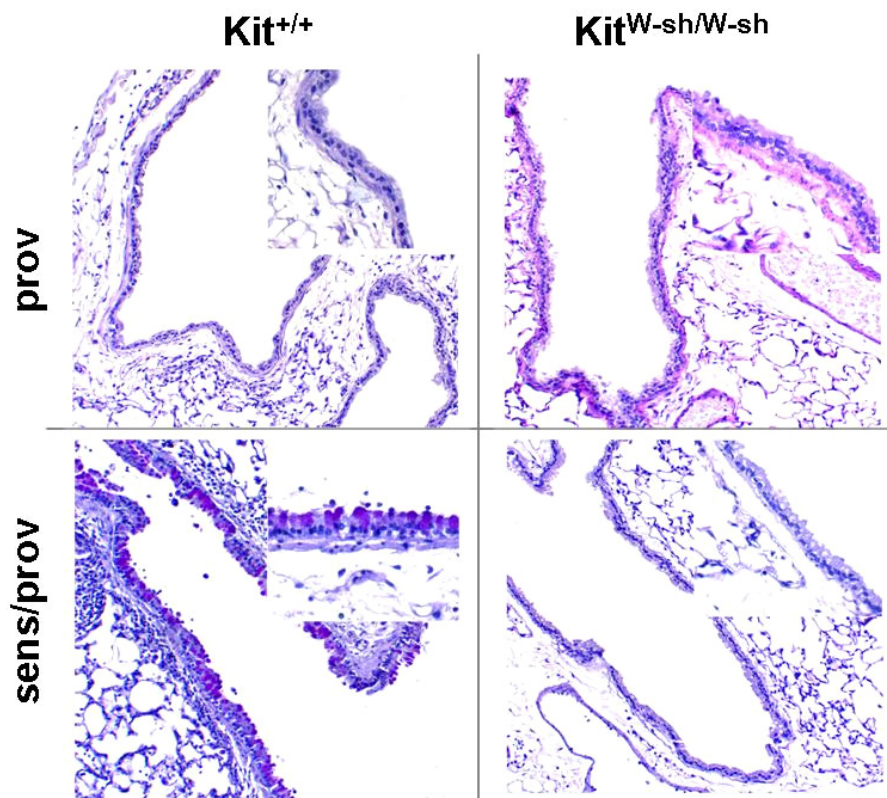
### 3.1.3 Histologische Untersuchung des Lungengewebes

Die histologische Untersuchung von Lungenquerschnitten erlaubte weitere Rückschlüsse auf die induzierte allergische Atemwegsentzündung. Die Analyse von HE gefärbten Lungen zeigte, dass es in Wildtyp-Tieren nach Sensibilisierung und Provokation zu einem Influx von inflammatorischen Zellen kam. Zellinfiltrate waren sowohl im peribronchialen als auch im perivaskulären Raum detektierbar. In ebenso behandelten mastzelldefizienten Tieren zeigten die Lungenquerschnitte ein schwächeres Inflammationsbild. Peribronchial und perivaskulär waren nur vereinzelt Infiltrate detektierbar, bei einem Großteil der Tiere waren die Lungenschnitte frei von Infiltraten und waren mit den Schnitten von nur provozierten Tieren vergleichbar. Auf Lungenschnitten von Tieren die nur provoziert wurden waren keine Zellinfiltrate detektierbar (Abb 3.5).



**Abb. 3.5: Analyse der Inflammation des Lungengewebes.** Die Entzündung des Lungengewebes wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation untersucht. Mittels Hämatoxylin und Eosinfärbung (HE) konnte eine Differenzierung des Lungengewebes vorgenommen und Zellinfiltrate hervorgehoben werden. Die abgebildeten Bilder geben exemplarisch die Situation in Wildtyp-Tieren und mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäusen nach Sensibilisierung und Provokation (sens/prov) sowie in den provozierten Tieren wieder. 100 fache Vergrößerung.

Die Metaplasie von Becherzellen ist ein weiteres Charakteristikum von Asthma. Die verstärkte Mukusproduktion dieser Zellen konnte mittels PAS Färbung auf Lungenquerschnitten sichtbar gemacht werden. Die Lungenquerschnitte von Wildtyp-Tieren zeigten im Vergleich zu mastzelldefizienten Mäusen, nach Sensibilisierung und Provokation einen höheren Anteil an PAS-positiven Zellen des Atemwegsepithels. Die Zellen waren im Vergleich zu Zellen von unbehandelten Tieren außerdem deutlich vergrößert. PAS-positive Zellen konnten hauptsächlich in zentralen Atemwegen detektiert werden. In Tieren die nur provoziert wurden, waren keine PAS positiven Zellen auf den Lungenquerschnitten detektierbar (Abb 3.6).



**Abb. 3.6: Analyse der Entstehung einer Becherzellmetaplasie.** Die Entstehung einer Becherzellmetaplasie und der Nachweis von mukusproduzierenden Zellen wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation mittels PAS-Färbung von Lungenquerschnitten untersucht. Die dargestellten Bilder geben exemplarisch die Situation in Wildtyp-Tieren und mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nach Sensibilisierung und Provokation, sowie den nur provozierten Tieren wieder. 100 fache Vergrößerung; Ausschnitte sind 400 fach vergrößert.

Im Bezug auf die histologische Auswertung zeigten die Lungenschnitte von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten Wildtyp Tieren eine verminderte Infiltration von inflammatorischen Zellen und eine reduzierte Anzahl von PAS positiven Zellen (Anhang 6.1).

### 3.1.4 Analyse der Sensibilisierung

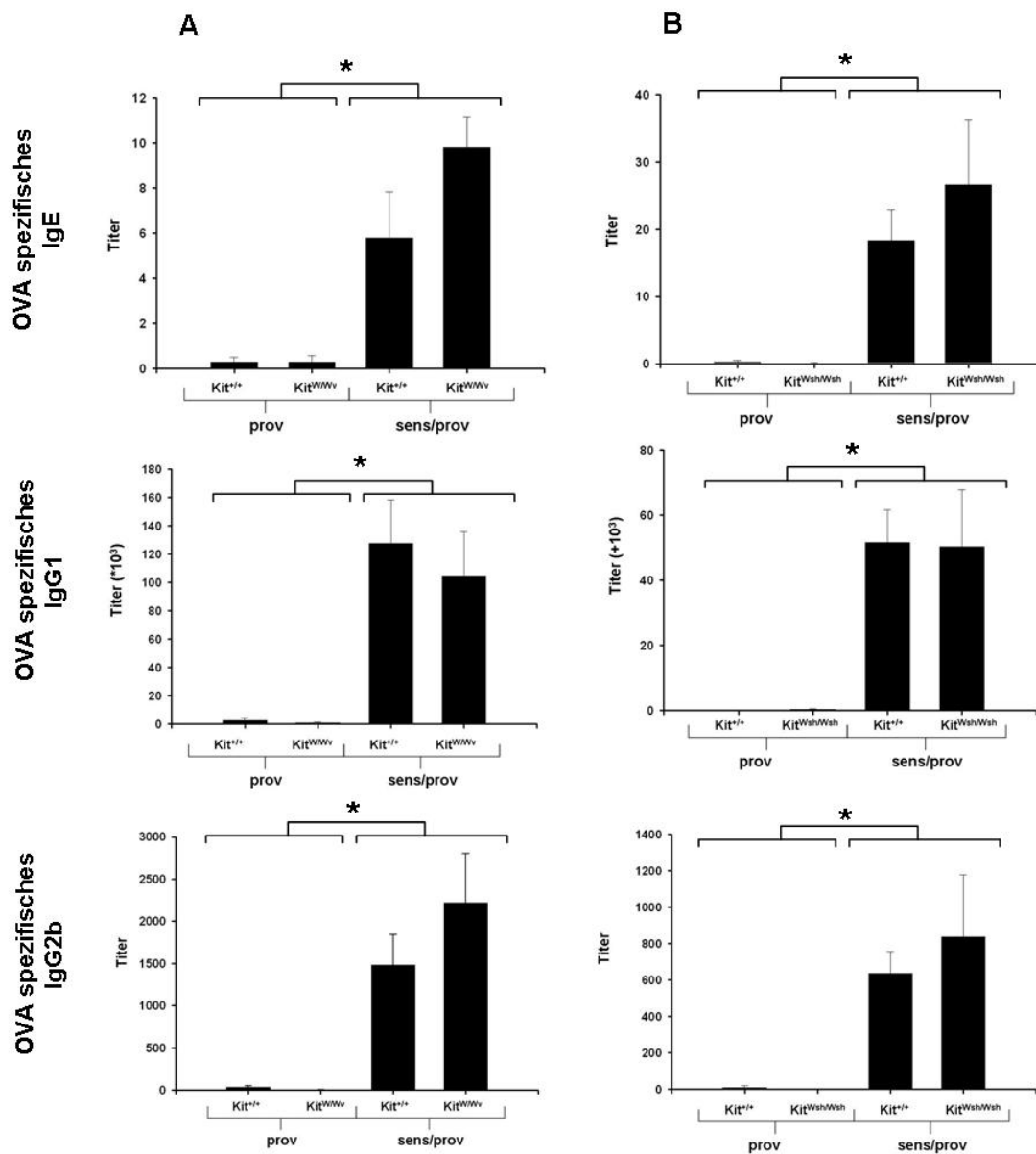
Um zu überprüfen, ob mastzelldefiziente und Wildtyp-Tiere vergleichbare systemische B- und T-Zellantworten nach der Sensibilisierung mit Antigen ohne zusätzliches Adjuvans entwickeln, wurden antigenspezifische Immunglobuline in den



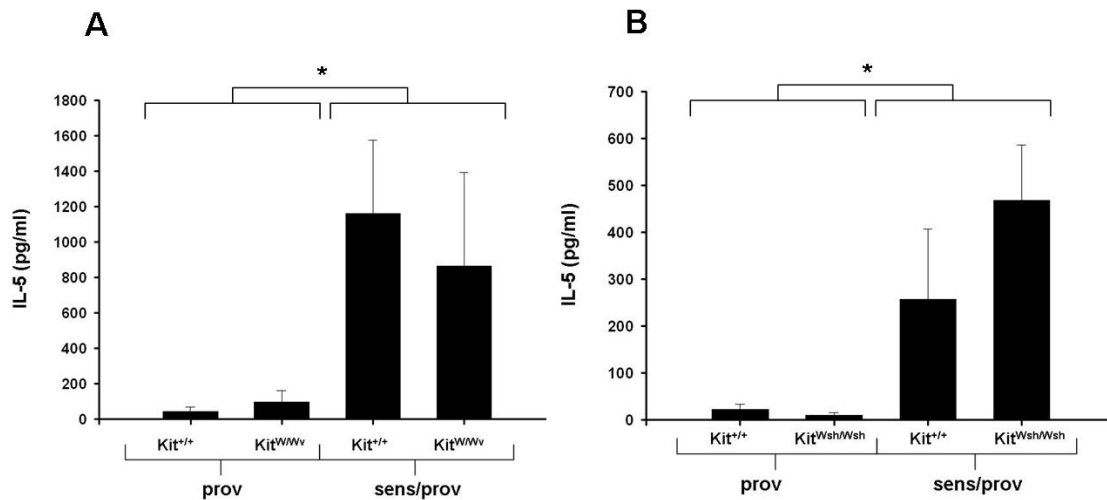
Seren und antigenspezifische Zytokinproduktion in restimulierten Milzzellen analysiert.

Die Untersuchung der Seren der Tiere auf die antigenspezifische Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2b zeigte, dass die Applikation von Ovalbumin zu einer Sensibilisierung der Tiere führte. Sowohl in mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> als auch in Mäusen des Stammes WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> konnten nach Sensibilisierung und Provokation mit Antigen deutlich erhöhte Titer von OVA-spezifischen IgE, IgG1 und IgG2b gemessen werden. Die Titer der Immunglobuline in mastzelldefizienten Mäusen waren vergleichbar zu entsprechenden sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren. In den Seren von Tieren, sowohl mastzelldefizient als auch Wildtyp, die nur mit PBS sensibilisiert und anschließend mit OVA provoziert wurden, konnten weder für IgE, IgG1 noch für IgG2b antigenspezifische Titer ermittelt werden. Die höchsten Titer konnten vom Immunglobulin Isotyp IgG1 in den Seren von sensibilisierten und provozierten Tieren detektiert werden. Sowohl in den Seren von sensibilisierten mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> als auch WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> und entsprechend behandelten Wildtyp-Mäusen waren dessen Titer im Durchschnitt ~100-fach höher als die OVA-spezifischen IgG2b Titer (Anhang 6.2). OVA-spezifische IgE-Titer konnten in allen sensibilisierten Mäusen detektiert werden, jedoch waren die ermittelten Titer deutlich niedriger im Vergleich zu den anderen beiden Isotypen (Abb 3.7).

Um zu überprüfen, ob die Sensibilisierung eine antigenspezifische T-Zellantwort induziert, wurden 48 Stunden nach der letzten Provokation Milzzellen der Tiere mit OVA restimuliert und nach weiteren 72 Stunden die OVA-spezifische Produktion von IL-5 in den Überständen gemessen. Sowohl in sensibilisierten mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> als auch WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> als auch in entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren konnten im Vergleich zu unsensibilisierten Tieren erhöhte Konzentrationen des Zytokins detektiert werden. Zwischen sensibilisierten mastzelldefizienten- und Wildtyp-Tieren waren hierbei keine Unterschiede in der OVA-spezifischen IL-5 Konzentration messbar (Abb. 3.8).



**Abb. 3.7: Titer von antigenspezifischen Immunglobulinen.** 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden mit Hilfe eines ELISA die OVA spezifischen Titer der Immunglobuline IgE, IgG1 und IgG2b in den Seren bestimmt. **Reihe A** zeigt die Titer von OVA spezifischem IgE, IgG1 und IgG2b von mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> und entsprechenden Wildtyp-Tieren die nur mit OVA provoziert (prov) wurden und von Tieren, die mit Ovalbumin sensibilisiert und provoziert wurden (sens/prov). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> sens/prov mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> nur prov. **Reihe B** zeigt die Titer von OVA spezifischem IgE, IgG1 und IgG2b von mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup>- und entsprechenden Wildtyp-Tieren, die nur mit OVA provoziert (prov) wurden bzw. von Tieren die mit Ovalbumin sensibilisiert und provoziert wurden (sens/prov). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. n=8-12 Tiere pro Gruppe. \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> sens/prov mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nur prov.



**Abb. 3.8: Titer OVA-spezifischem IL-5 nach Restimulation.** 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Milzen der Versuchstiere präpariert und Einzelzellsuspensionen erstellt. Die Milzzellen wurden für drei Tage in Gegenwart von OVA bzw. PBS inkubiert und anschließend die antigenspezifischen IL-5 Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. **Bild A** zeigt die Konzentration von antigenspezifischen IL-5 in den Überständen von mastzelldefizienten WBB6F1-Kit<sup>W/Wv</sup> und entsprechenden Wildtyp-Tieren, die nur mit OVA provoziert (prov) wurden und von Tieren, die mit Ovalbumin sensibilisiert und provoziert wurden (sens/prov). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. n=7-8 Tiere pro Gruppe. **Bild B** zeigt die Konzentration von antigenspezifischen IL-5 in den Überständen von mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und entsprechenden Wildtyp-Tieren, die nur mit OVA provoziert (prov) wurden und von Tieren, die mit Ovalbumin sensibilisiert und provoziert wurden (sens/prov). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. n=5 Tiere pro Gruppe.

### 3.2 Die Unterschiede in der Induktion einer der allergischen Atemwegsentzündung zwischen Wildtyp Tieren und mastzelldefizienten Tieren sind abhängig von Mastzellen und mastzellproduziertem TNF

Um zu bestätigen, ob die beobachteten Effekte in mastzelldefizienten Mäusen mastzellspezifisch sind und es sich nicht um Nebeneffekte der Mutation handelt, wurden die sogenannten Mastzell-"Knock-in" Mäuse verwendet. Bei diesen Tieren handelt es sich um mastzelldefiziente Tiere, die durch intravenöse Applikation von Mastzellen rekonstituiert wurden. Die Mastzellen werden hierzu aus Knochenmark in vitro kultiviert. Bereits durchgeführte Studien zeigten, dass Mastzellfunktionen auf diese Weise in den mastzelldefizienten Tieren wieder hergestellt werden konnten [104;107].

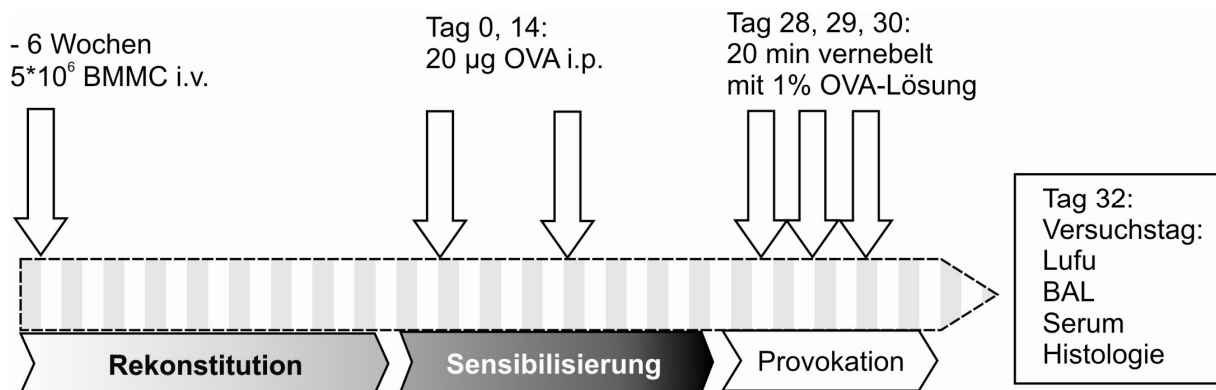
Um zu bestätigen, dass die unterschiedliche Entwicklung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit in sensibilisierten und provozierten Wildtypen im Vergleich zu den gleich behandelten mastzelldefizienten Mäusen auf mastzellspezifische Effekte rückzuführen ist, wurden mastzelldefiziente Tiere mit in vitro generierten Mastzellen rekonstituiert. Weiterhin nutzten wir das Rekonstitutionsmodell um zu überprüfen, ob mastzellproduziertes TNF eine Rolle bei der Induktion der allergischen Entzündung der Atemwege spielt.

Um diese Punkte zu überprüfen wurden in vitro Mastzellen aus dem Knochenmark von C57BL/6-TNF<sup>+/+</sup> bzw. C57BL/6-TNF<sup>-/-</sup> Tieren generiert. Die Zellen wurden mastzelldefizienten Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> intravenös appliziert. Um zu gewährleisten, dass die Anzahl der Mastzellen und ihr Phänotyp vergleichbar mit dem Wildtyp sind, wurden die Tiere erst 6 Wochen nach der Rekonstitution mit Mastzellen sensibilisiert und provoziert. Wildtyp, mastzelldefiziente, sowie mastzelldefiziente Tiere rekonstituiert mit Wildtyp bzw. TNF<sup>-/-</sup> Mastzellen wurden wie in Abbildung 3.9 dargestellt sensibilisiert und provoziert. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden Charakteristika, die für eine allergische Entzündung der Atemwege sprechen analysiert.

### 3.2.1 Analyse der in vitro generierten Mastzellen

Nach 3 bis 4 Wochen wurden die in vitro kultivierten Mastzellen auf ihre Reinheit und Funktionalität hin überprüft. Mittels FACS Analyse wurde die Expression des für IgE hochspezifischen Rezeptors FcεRI und des cKit-Rezeptors (CD117) analysiert. Zellpopulationen die zur Rekonstitution verwendet wurden wiesen eine Reinheit von >90% auf (Anhang 6.3).

Mastzellen, die aus dem Knochenmark von Wildtyp und TNF<sup>-/-</sup> generiert wurden exprimierten die beiden Rezeptoren vergleichbar stark. Hinsichtlich der Funktionalität konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den in vitro generierten Mastzellen von Wildtyp und TNF<sup>-/-</sup> festgestellt werden. Nach Beladung der Zellen mit IgE-Antikörpern und der anschließenden Kreuzvernetzung mittels α-IgE-Antikörpern sezernierten sowohl Mastzellen von Wildtyp, als auch von TNF<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbare Konzentrationen des Zytokins IL-6 in den Kulturüberstand. Weder bei unbehandelten noch bei nur mit IgE beladenen in vitro generierten Mastzellen war IL-6 in den Kulturüberständen nachweisbar.

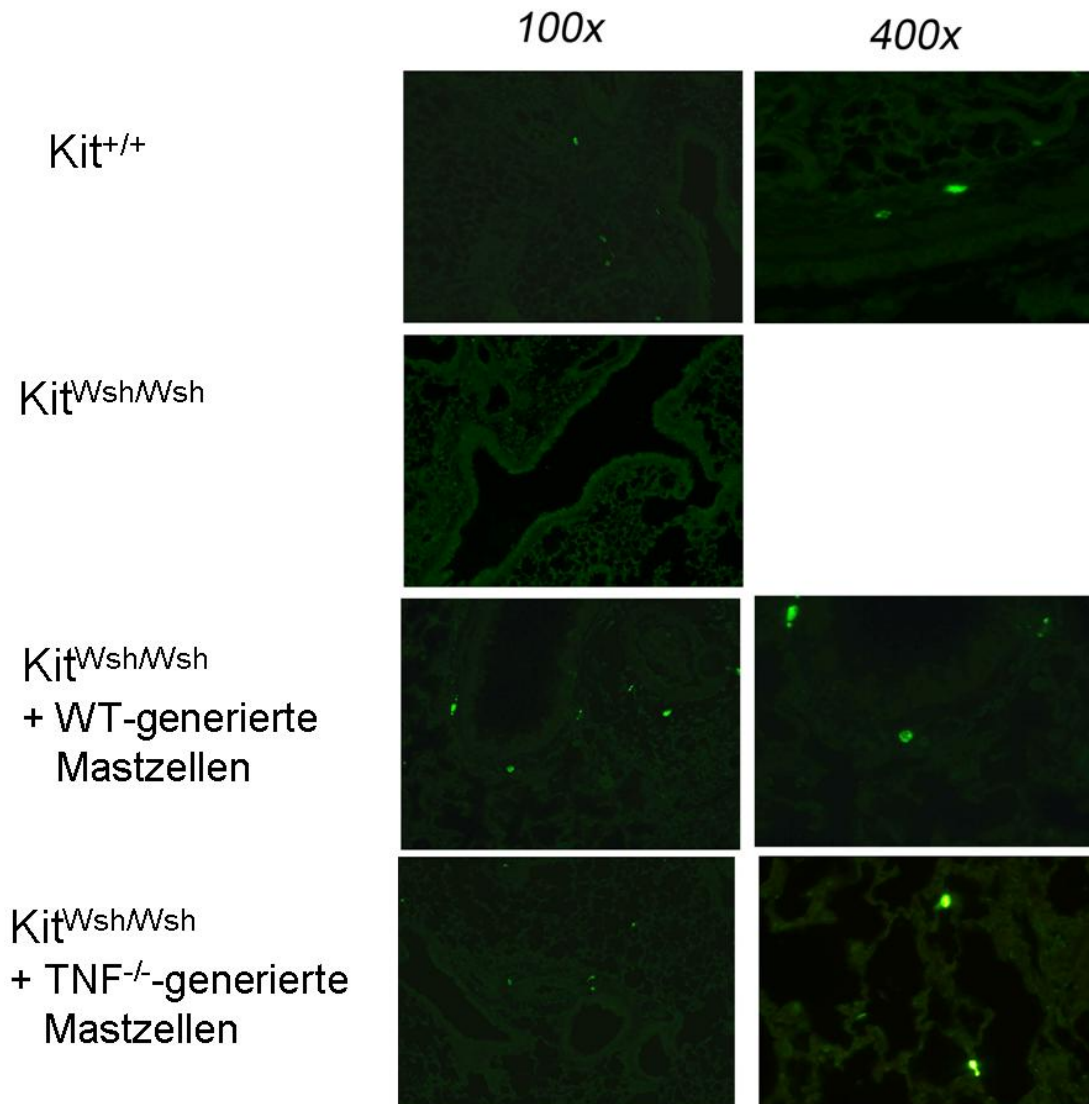


**Abb. 3.9: Rekonstitutions & Sensibilisierungs- und Provokationsmodell der allergischen Atemwegsentzündung.** Mastzelldefiziente Mäuse des Stammes C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> wurden durch intravenöse Applikation von  $5 \cdot 10^6$  in vitro aus dem Knochenmark generierten Mastzellen von C57BL/6-TNF<sup>+/+</sup> bzw. C57BL/6-TNF<sup>-/-</sup> rekonstituiert. Um eine vollständige Rekonstitution der Tiere zu gewährleisten wurde 6 Wochen bis zur Fortführung des Experimentes gewartet. Nach den 6 Wochen wurden die Versuchstiere gegen das Antigen durch intraperitoneale Applikation von  $20 \mu\text{g}$  Ovalbumin an Tag 0 und 14 sensibilisiert. An Tag 28, 29 und 30 wurden die Tiere jeweils für 20 Minuten mit einer 1%igen OVA Lösung vernebelt, um eine allergische Entzündung der Atemwege zu induzieren. 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Versuche zur Charakterisierung der allergischen Atemwegsentzündung durchgeführt.

Nur Zellen, die einen Mastzellphänotyp aufzeigten und durch IgE-Kreuzvernetzung aktivierbar waren, wurden zur Rekonstitution der mastzelldefizienten Tiere verwendet.

### 3.2.2 Analyse der allergischen Atemwegsentzündung nach Rekonstitution, Sensibilisierung und Provokation mit OVA ohne zusätzliches Adjuvans

Die Rekonstitution der mastzelldefizienten Tiere führte sowohl bei Tieren, die mit Wildtyp, als auch mit TNF<sup>-/-</sup> Mastzellen rekonstituiert wurden zu einer Migration der Mastzellen in die Lunge. Die histologische Analyse von Lungenschnitten zeigte, dass die Anzahl an Mastzellen, die in der Lunge von rekonstituierten Tieren gefunden werden konnte mit der Anzahl der Mastzellen in Wildtyp-Tieren vergleichbar war. In sensibilisierten und provozierten Wildtyp Tieren ( $n=9$ ) konnten  $30 \pm 12$  Mastzellen (im Durchschnitt  $\pm$  Standardfehler pro  $\text{cm}^2$ ), in mastzelldefizienten Mäusen rekonstituiert mit WT-generierten Mastzellen  $35 \pm 12$  und in Tieren, die mit TNF<sup>-/-</sup>-generierten Mastzellen rekonstituiert wurden  $20 \pm 5$  Mastzellen pro  $\text{cm}^2$  detektiert werden (siehe Abb 3.10).

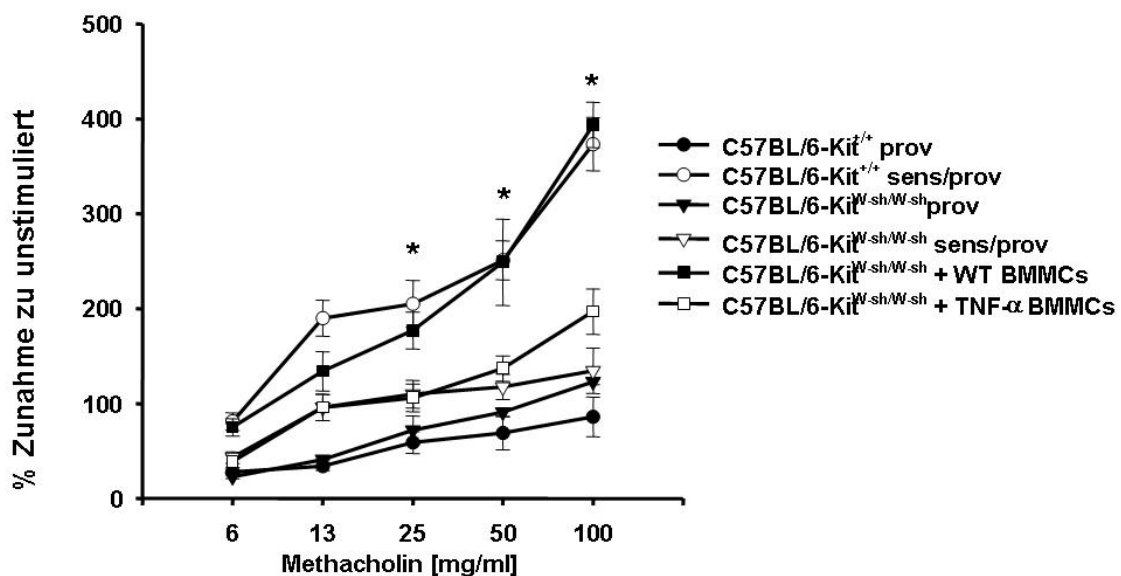


**Abb 3.10 Mastzellnachweis in Lungenschnitten mittels Avidin-Heparin-Nachweis.** 48 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Lungen der Versuchstiere präpariert und in Formalin fixiert. Entparafinierte Lungenschnitte wurden mit Avidin-Alexa488 inkubiert, das hochaffin für das hauptsächlich in Mastzellen vorkommende Heparin ist. Fluoreszierende Mastzellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert und ausgezählt. In Lungenschnitten von Wildtyp-Tieren, mastzelldefizienten Tieren und mastzelldefizienten Tieren, die mit Mastzellen von Wildtyp oder TNF<sup>-/-</sup>-Mäusen rekonstituiert waren wurde die Anzahl an Mastzellen pro cm<sup>2</sup> bestimmt.

In Wildtyp-Tieren waren die Mastzellen hauptsächlich in der Nähe von Atemwegen und Gefäßen detektierbar. In rekonstituierten Tieren konnte man ebenfalls Mastzellen in diesen Regionen finden, sie wiesen jedoch auch Zellen im Gewebe auf.

## 3.2.2.1 Analyse der Atemwegsentzündung

Nach Sensibilisierung und Provokation konnte in mastzelldefizienten Mäusen, die mit Wildtyp-generierten Mastzellen rekonstituiert worden waren eine erhöhte Sensibilität der Atemwege gemessen werden. Auf Reizung mit Methacholin in steigenden Dosen reagierten diese Tiere mit einer Zunahme des Atemwegwiderstandes. Der Anstieg des Atemwegwiderstandes war vergleichbar mit sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren. Im Vergleich zu den beiden Gruppen war der Anstieg des Atemwegwiderstandes in mastzelldefizienten Tieren geringer. Mastzelldefiziente Tiere, die mit in vitro generierten Mastzellen von  $TNF^{-/-}$  Mäusen rekonstituiert worden waren reagierten mit einem Anstieg des Atemwegwiderstandes, der mit mastzelldefizienten Tieren und unsensibilisierten Tieren vergleichbar war (Abb. 3.11).



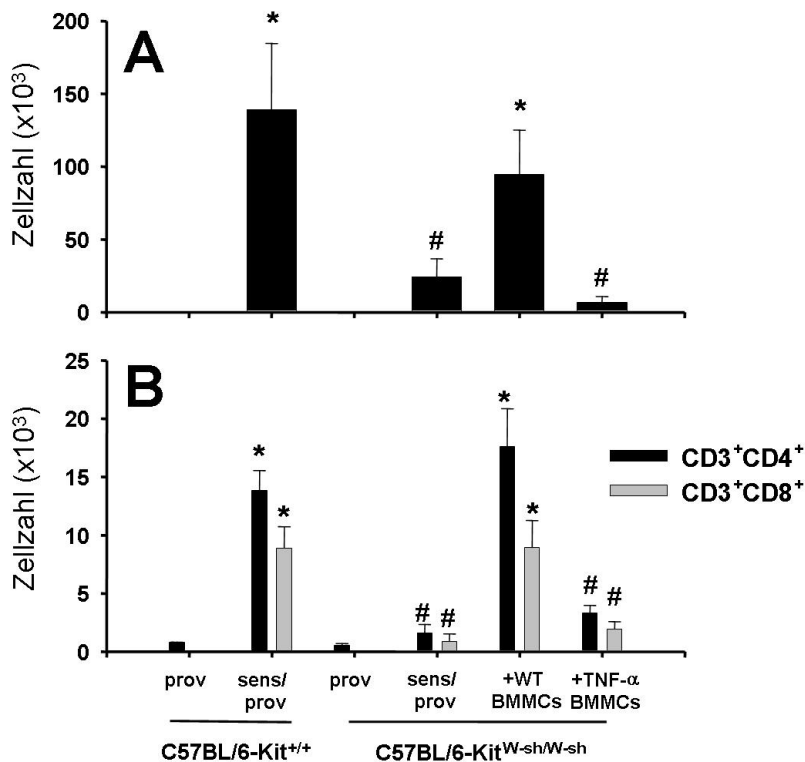
**Abb. 3.11: Messung des Atemwegwiderstandes nach Rekonstitution mit Mastzellen bei mastzelldefizienten  $Kit^{Wsh/Wsh}$  und entsprechenden Wildtyp-Mäusen.** Die Lungenfunktion von Wildtyp- und rekonstituierten mastzelldefizienten Mäusen wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation invasiv gemessen. Anhand der gemessenen Daten wurde der prozentuale Anstieg des Atemwegwiderstandes provoziert durch Methacholin im Vergleich zur Provokation mit PBS bestimmt. Die Abbildung zeigt die Resultate der Atemwegwiderstandsmessung von nur provozierten (prov)  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh}$  und entsprechenden Wildtyp-Mäusen, von sensibilisierten und provozierten  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh}$  und Wildtyp-Tieren, sowie von sensibilisiert und provozierten  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh}$  Mäusen die mit in vitro generierten Mastzellen von Wildtyp bzw.  $TNF^{-/-}$  Mäusen rekonstituiert wurden. Pro Gruppe wurden  $n=7-10$  Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. \*  $p < 0,05$  im Vergleich von  $C57BL/6-Kit^{+/+}$  und  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh} + WT$  BMMC sens/prov mit  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh} + TNF^{-/-}$  BMMC,  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh}$  sens/prov und  $C57BL/6-Kit^{+/+}$  und  $C57BL/6-Kit^{Wsh/Wsh}$  nur prov.

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage zeigte, dass mastzelldefiziente Tiere, die mit Wildtyp generierten Mastzellen rekonstituiert wurden eine erhöhte Anzahl an Eosinophilen in der BAL aufweisen. Die Anzahl an Eosinophilen in der BAL ist in diesen Tieren vergleichbar zu sensibilisierten und provozierten Wildtyp Tieren. Die Rekonstitution mit TNF<sup>-/-</sup> generierten Mastzellen führte nicht zu einem Eosinophilen-Influx in die BAL. In Tieren die mit Mastzellen von TNF<sup>-/-</sup> Spendern rekonstituiert wurden war der Anteil an Eosinophilen an der zellulären Zusammensetzung der BAL sehr niedrig und mit dem von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Mäusen vergleichbar Abb 3.12. In unsensibilisierten und provozierten Mäusen konnten keine inflammatorischen Zellpopulationen in der BAL detektiert werden. Hier waren Zellzahlen der BAL niedrig und die zelluläre Zusammensetzung von alveolar Makrophagen (>90%) dominiert. Die Analyse der BAL mittels FACS zeigte, dass Wildtyp Mäuse und mastzelldefiziente Mäuse die mit Wildtyp generierten Mastzellen rekonstituiert wurden eine im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten aufweisen. Sowohl die Anzahl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen waren in den beiden Gruppen erhöht, wobei der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen höher war als der der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Im Vergleich zu den unsensibilisierten Tieren, in deren BAL nur wenige CD4<sup>+</sup> T-Zellen und keine CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden konnten, konnten in sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten nicht rekonstituierten oder mit TNF<sup>-/-</sup> generierten Mastzellen rekonstituierten Mäusen nur ein geringer Anstieg der T-Zellpopulationen analysiert werden (Abb 3.12 B).

Die Analyse der PAS- und HE-Färbungen der Lungenschnitte bestätigte die Entwicklung einer starken Entzündung in sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren, sowie in mit Wildtyp-Mastzellen rekonstituierten mastzelldefizienten Mäusen. Auf den HE gefärbten Schnitten war ein Influx von inflammatorischen Zellen in den perivaskulären und peribronchialen Raum detektierbar. Auf den Schnitten waren diese Entzündungsherde an einer Vielzahl von Gefäßen und Bronchien detektierbar. Auf Lungenschnitten von Mäusen, die mit TNF<sup>-/-</sup>-Mastzellen rekonstituiert worden waren konnte hingegen nur ein geringer Anzahl von entzündungsfördernden Zellen detektiert werden, welcher vergleichbar mit den sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Mäusen war. Auf den Schnitten konnten nur vereinzelt Gefäße und Atemwege detektiert werden, die eine schwache Infiltration von Zellen ins

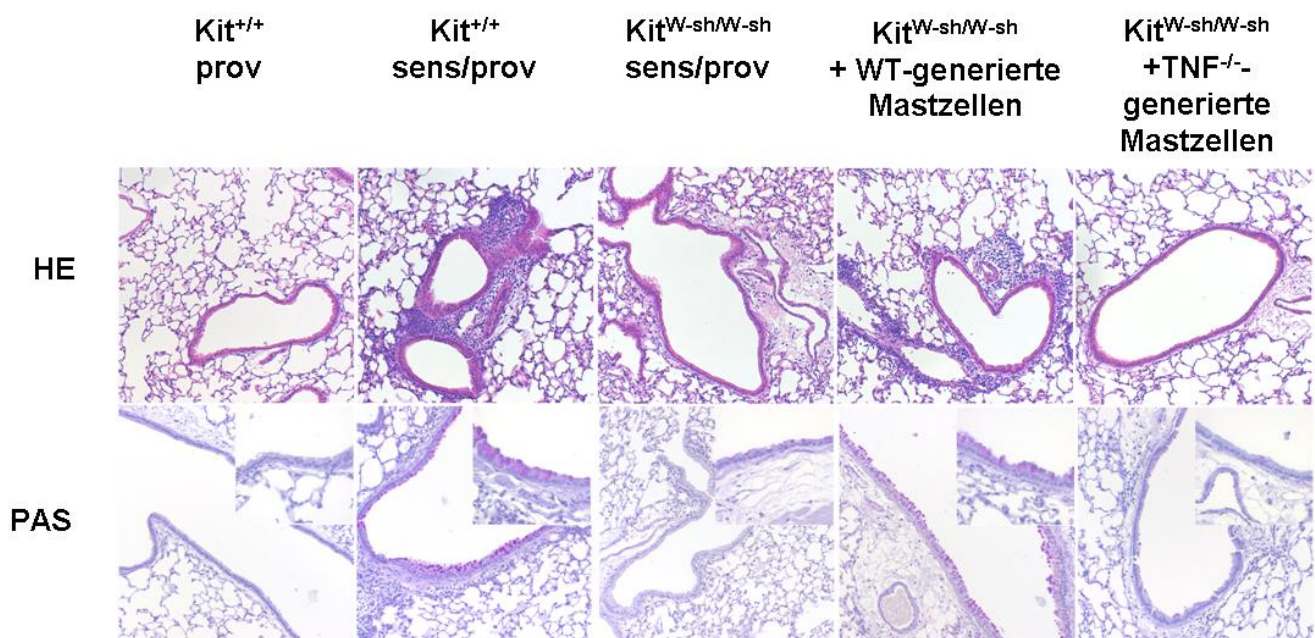


Gewebe aufwiesen (Abb 3.13). Lungenschnitte von unsensibilisierten und provozierten Tieren waren komplett frei von Zellinfiltraten.



**Abb. 3.12: Analyse der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage.** 48 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurde eine bronchoalveolare Lavage durchgeführt. **Bild A:** Die Zellen der Lavage wurden fixiert, eine Differentialfärbung durchgeführt und mittels Lichtmikroskop die zelluläre Zusammensetzung bestimmt. Auf Bild A ist die absolute Anzahl der eosinophilen Granulozyten in der BAL von nur provozierten (prov) C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und entsprechenden Wildtyp-Mäusen, von sensibilisierten und provozierten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und Wildtyp-Tieren, sowie von sensibilisierten und provozierten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäusen die mit Wildtyp- bzw. TNF<sup>-/-</sup>-Mastzellen rekonstituiert wurden dargestellt. Pro Gruppe wurden n=7-10 Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. **Bild B:** zeigt die Analyse der T-Zellpopulationen mittels FACS. T-Helferzellen wurden als CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen, T-Effektorzellen als CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen charakterisiert. Dargestellt ist die absolute Zellzahl der beiden Populationen in der BAL von nur provozierten (prov) C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und entsprechenden Wildtyp-Mäusen, von sensibilisierten und provozierten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und Wildtyp-Tieren sowie von sensibilisierten und provozierten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäusen, die mit Wildtyp- bzw. TNF<sup>-/-</sup>-Mastzellen rekonstituiert wurden. Pro Gruppe wurden n=7-10 Tiere gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> + WT BMMC sens/prov mit C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> + TNF<sup>-/-</sup> BMMC, C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> sens/prov und C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nur prov. # p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> + TNF<sup>-/-</sup> BMMC, C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> sens/prov mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nur prov.

Die Analyse der PAS-gefärbten Schnitte zeigte, dass die Rekonstitution mit Wildtyp-Mastzellen und anschließende Sensibilisierung und Provokation zu einer Becherzellmetaplasie führt. Auf Schnitten von diesen Mäusen war eine erhöhte Anzahl von PAS-positiven Zellen pro mm Basalmembran detektierbar. Die Anzahl der Mukus-produzierenden Zellen war vergleichbar zu der auf Schnitten von sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren. Auf den Schnitten von mastzelldefizienten Mäusen und Mäusen, die mit  $TNF^{-/-}$  Mastzellen rekonstituiert worden waren, waren deutlich weniger PAS-positive Zellen detektierbar. In nur provozierten Tieren waren keine Anzeichen einer Becherzellmetaplasie detektierbar (Abb 3.13).



**Abb. 3.13: Histologie von Lungenschnitten.** 48 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurden die Lungen in Parafin fixiert und anschließend Schnitte erstellt, die mittels Hämatoxylin/Eosin (HE) oder PAS Behandlung gefärbt wurden. Die HE-Färbung hebt Unterschiede von einzelnen Lungenbereichen hervor und dient zur Detektion von Zellinfiltraten und somit zur histologischen Charakterisierung einer Inflammation der Lunge. Die Bilder in der oberen Reihe geben exemplarisch die Situation in nur provozierten (prov) Mäusen, in sensibilisierten und provozierten C57BL/6- $Kit^{Wsh/Wsh}$  und Wildtyp-Tieren, sowie in sensibilisierten und provozierten C57BL/6- $Kit^{Wsh/Wsh}$  Mäusen die mit Wildtyp- bzw.  $TNF^{-/-}$ -Mastzellen rekonstituiert wurden, wieder. 100 fache Vergrößerung.

Mittels PAS-Färbung wurden mukusproduzierende Zellen hervorgehoben, dies diente zur Auswertung und Analyse der Becherzellmetaplasie. Die dargestellten Bilder in der unteren Reihe geben exemplarisch die Situation in nur provozierten (prov) Mäusen, in sensibilisierten und provozierten C57BL/6- $Kit^{Wsh/Wsh}$  und Wildtyp-Tieren, sowie in sensibilisierten und provozierten C57BL/6- $Kit^{Wsh/Wsh}$  Mäusen die mit Wildtyp- bzw.  $TNF^{-/-}$ -Mastzellen rekonstituiert wurden, wieder. 100 fache Vergrößerung; Ausschnitte sind 400 fach vergrößert.

### **3.3 Ist in mastzelldefizienten Tieren die Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten beeinflusst?**

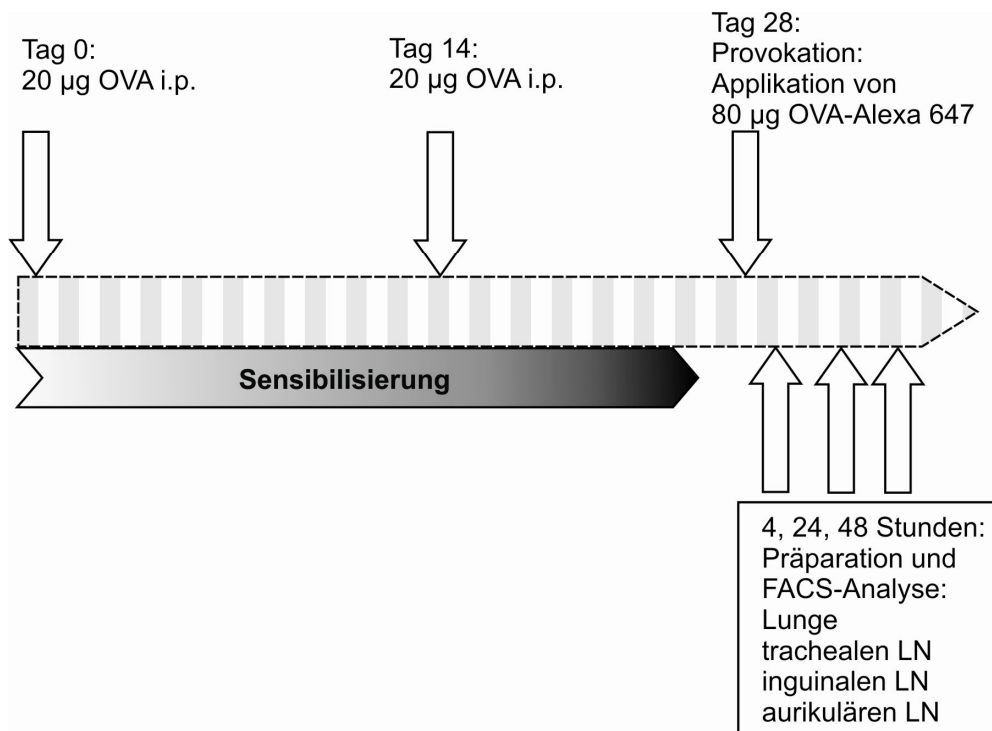
Zur Induktion einer adaptiven Immunantwort ist es notwendig, dass Antigene durch spezialisierte Zellen, die so genannten antigenpräsentierenden Zellen (APC) in den Lymphknoten präsentiert werden. Durch die potente Präsentation des Antigens werden Folgeprozesse wie Aktivierung von naiven und Gedächtnis T-Zellen, aber auch Isotypenwechsel von B-Zellen induziert. Die dendritische Zelle stellt die effektivste antigenpräsentierende Zelle des Immunsystems dar. Mastzellen könnten durch die rapide Freisetzung von Mediatoren das Mikromillieu der Lunge verändern und somit das Migrationsverhalten von DC aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten beeinflussen was zu einer effektiveren Induktion einer adaptiven Immunantwort führen könnte.

Um zu überprüfen, ob Mastzellen die Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten beeinflussen, wurden sensibilisierte und unsensibilisierte mastzelldefiziente Mäuse mit fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin intranasal provoziert (Abb. 3.14). Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl an OVA-positiven konventionellen DC in den drainierenden Lymphknoten analysiert. Konventionelle DC wurden als CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> Zellen im FACS charakterisiert ("FACS-Gating" Strategie siehe Anhang 6.4).

#### 3.3.1 Kinetikassay

Um die Migration von antigenbeladenen DC zwischen Wildtyp- und mastzelldefizienten Mäusen vergleichen zu können, wurde mittels eines Kinetikversuch der Zeitpunkt ermittelt, zu dem die größte Anzahl an Alexa-positiven DC in den regionalen Lymphknoten nachzuweisen war. 4 Stunden nach Provokation war der relative Anteil an OVA positiven DC innerhalb der DC Population in allen untersuchten Gruppen noch relativ gering (~30 %). Die Lymphknoten von den Tieren waren vergleichbar groß und es waren keine Unterschiede in der absoluten Anzahl Alexa-positiver DC zu erkennen. 24 Stunden nach der intranasalen Applikation des markierten OVA zeigten sich deutliche Unterschiede in dem Migrationsverhalten der DC zwischen den einzelnen Gruppen. In sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren war der Anteil an Alexa positiven DC signifikant angestiegen (~60%). In

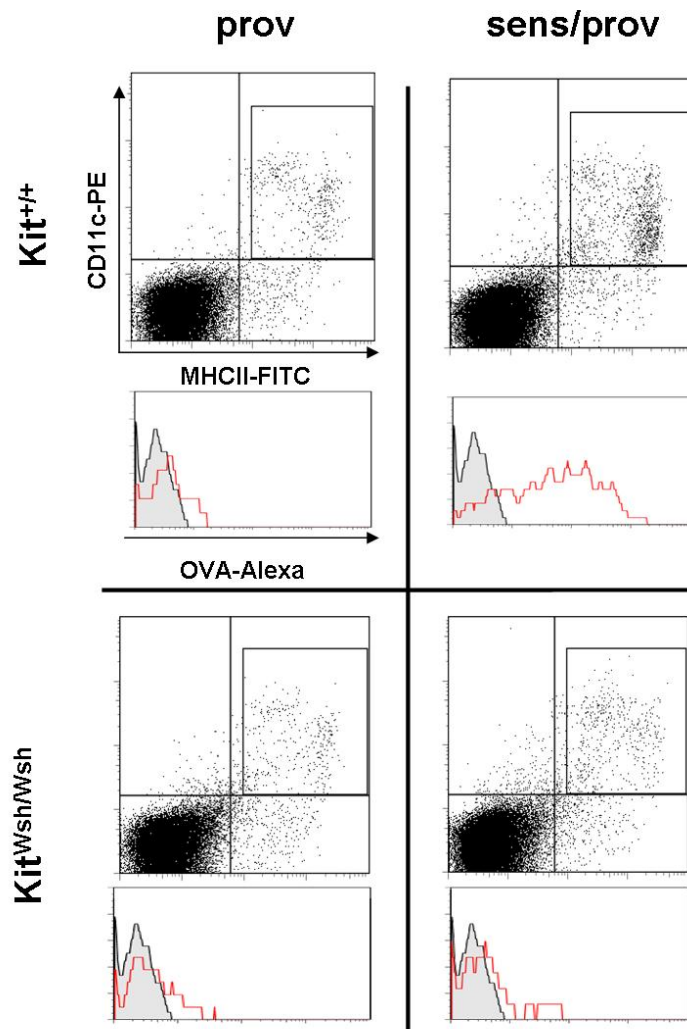
mastzelldefizienten sensibilisierten und provozierten Tiere und in nur provozierten Tieren war keine Veränderung des Anteils an Alexa positiven DC innerhalb der DC Population detektierbar. Die Analyse der absoluten Anzahl an Alexa-positiven DC innerhalb des trachealen Lymphknotens bestätigte



**Abb. 3.14: Untersuchung der Migration von antigenbeladenen DC.** Mastzelldefiziente Mäuse des Stammes C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und entsprechende Wildtypen wurden gegen das Antigen Ovalbumin durch intraperitoneale Applikation von 20 µg Ovalbumin an Tag 0 und 14 sensibilisiert. An Tag 28 wurden die Tiere durch eine intranasale Applikation mit fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin provoziert. In einem Kinetikassay wurde die maximale Anzahl an OVA positiven DC in den regionalen Lymphknoten bestimmt. Hierzu wurden 4, 24 und 48 Stunden nach der Provokation die drainierenden Lymphknoten präpariert und mittels FACS die DC- Populationen bestimmt.

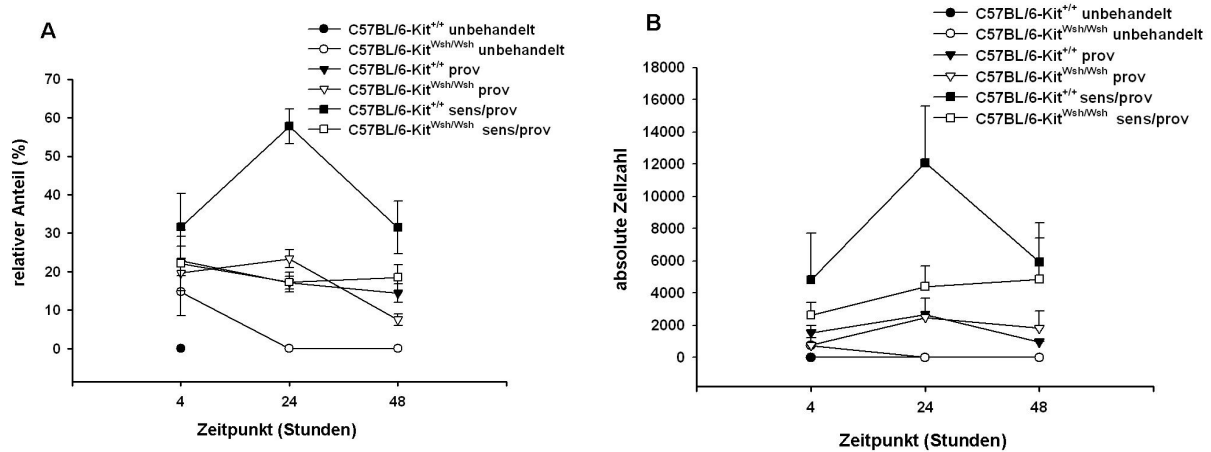
eine starke Zunahme an antigenbeladenen DC in sensibilisierten und provozierten Wildtypen. Im Vergleich zu den Wildtypen konnten in mastzelldefizienten Tieren nach Sensibilisierung und Provokation deutlich weniger Alexa positive DC in den Lymphknoten detektiert werden. Die absolute Anzahl der fluoreszierenden DC war in den Lymphknoten von nur provozierten Wildtyp und mastzelldefizienten Mäusen vergleichbar. In nur provozierten Tieren konnte kein Anstieg der Alexa positiven DC beobachtet werden (Abb. 3.16). Die Analyse der drainierenden Lymphknoten nach 48 Stunden verdeutlichte, dass nach 24 Stunden die maximale Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die Lymphknoten der Mäuse detektiert

werden kann. Sowohl der relative Anteil als auch die absolute Anzahl an OVA-positiven DC war in sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Tieren wieder reduziert. Ebenso konnte in allen anderen Gruppen kein weiterer Anstieg im relativen Anteil und der absoluten Zellzahl detektiert werden (Abb 3.17).



**Abb. 3.15: FACS-Analyse der trachealen Lymphknoten.** Von trachealen Lymphknoten wurde eine Einzelzellsuspension erstellt und mittels FACS die Expression von CD11c, MHCII, B220 und OVA auf den Zellen untersucht. Im Dot-Plot sind die CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> Zellen dargestellt, die als konventionelle DC charakterisiert wurden. Im Histogramm ist die Expression von OVA-Alexa 467 innerhalb der cDC-Population abgebildet. Die roten Kurven stellen die Expression der einzelnen Gruppen dar, die grau unterlegte Kurve stammt von einer Maus, die nur mit PBS intranasal behandelt wurde und ist als Negativkontrolle anzusehen. Die FACS-Bilder geben exemplarisch die Situation in nur mit OVA-Alexa provozierten (prov) Mäusen sowie in sensibilisierten und provozierten (sens/prov) C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und Wildtyp Tieren wieder.

In inguinalen Lymphknoten konnte zu keinem Zeitpunkt und in keiner Gruppe OVA-Alexa positive DC detektiert werden (Anhang 6.5)

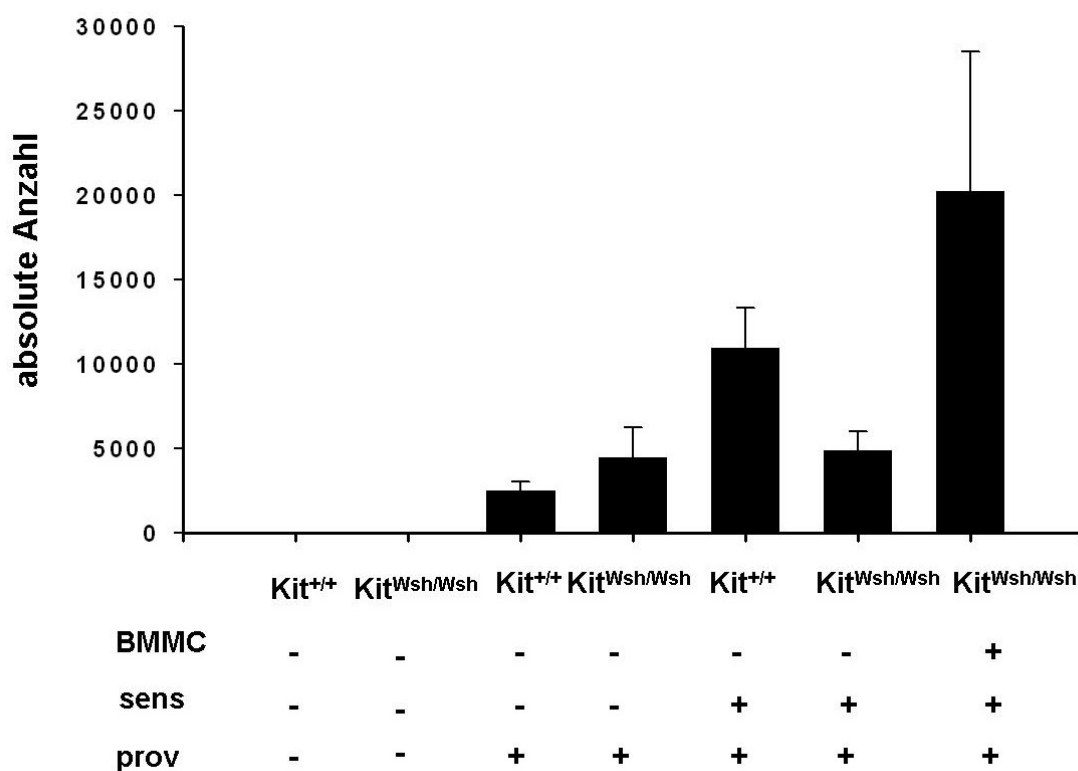


**Abb.3.16: Kinetik der Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten.** 4, 24 und 48 Stunden nach der Applikation von fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin wurden die Lymphknoten präpariert. **Bild A** zeigt den relativen Anteil an OVA-positiven Zellen innerhalb der Population von konventionellen DC (CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>). Die Lymphknoten wurden nach 4, 24 und 48 Stunden von unbehandelten, mit OVA-Alexa 647 provozierten (prov) sowie von sensibilisierten und provozierten (sens/prov) mastzelldefizienten und entsprechend behandelten Wildtyp Tieren untersucht. n=4-6 pro Zeitpunkt. **Bild B** zeigt den Verlauf der absolute Anzahl an OVA positiven konventionellen DC (CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>). Lymphknoten wurden nach 4, 24 und 48 Stunden von unbehandelten, mit OVA-Alexa 647 provozierten (prov) sowie von sensibilisierten und provozierten (sens/prov) mastzelldefizienten und entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren untersucht. n=4-6 pro Zeitpunkt.

### 3.3.2 Analyse der Migration nach Rekonstitution

Um zu überprüfen, ob die Unterschiede in der Migration von antigenbeladenen DC zwischen Wildtyp- und mastzelldefizienten Mäusen von Mastzellen abhängen, wurden mastzelldefiziente Tiere mit in vitro generierten Mastzellen von Wildtyp-Tieren rekonstituiert. 6 Wochen nach Rekonstitution wurde das in Abbildung 3.9 beschriebene Rekonstitutions- und Sensibilisierungsmodell an den Tieren durchgeführt. Zur Provokation wurde den Tieren fluoreszenzmarkiertes OVA intranasal appliziert. 24 Stunden nach der Gabe des Antigens wurde die Anzahl an OVA-Alexa positiven DC in den drainierenden Lymphknoten der Tiere bestimmt.

Wie im Kinetik Versuch bereits beschrieben, konnte in Wildtypen nach Sensibilisierung und Provokation eine im Vergleich zu unsensibilisierten Tieren erhöhte Anzahl an OVA-Alexa positiven DC detektiert werden. In sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Tieren war die Anzahl an OVA-Alexa positiven DC vergleichbar mit den unsensibilisierten und nur provozierten Tieren. Im Gegensatz hierzu konnten in rekonstituierten Mäusen nach Sensibilisierung und Provokation eine erhöhte Anzahl der antigenbeladenen DC detektiert werden, die mit der Anzahl von OVA-positiven DC in den Lymphknoten von sensibilisierten und provozierten Wildtyp-Mäusen vergleichbar war.

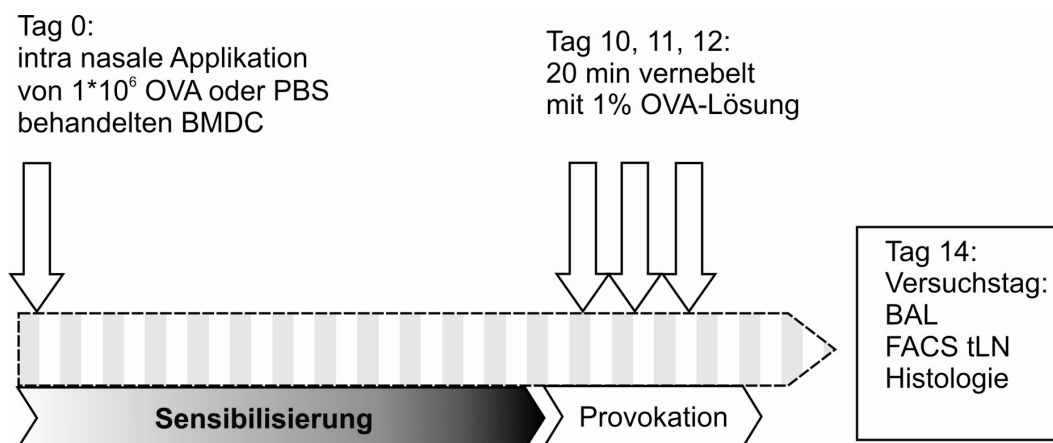


**Abb.3.17: Analyse der Anzahl der OVA-Alexa 647 positiven cDC in den drainierenden Lymphknoten 24 Stunden nach Provokation.** 24 Stunden nach der Applikation von fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin wurden Lymphknoten präpariert und OVA-positive cDC mittels FACS analysiert. Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl an OVA positiven konventionellen DC (CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>) in den Lymphknoten von unbehandelten, mit OVA-Alexa 647 provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) mastzelldefizienten und entsprechend behandelten Wildtyp Tieren untersucht. Außerdem ist die absolute Anzahl an OVA-Alexa positiven cDC in den Lymphknoten von sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Tieren, die vorab mit in vitro generierten Mastzellen rekonstituiert (BMMC) wurden dargestellt. n=6-12

### 3.4 Können Mastzellen eine adaptive Immunantwort die durch antigenbeladene DC induziert wird beeinflussen?

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Mastzellen eine Rolle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung spielen. Mastzell-produziertes TNF scheint hierbei eine Funktion zu besitzen. Die Mastzelle ist für die effektive Migration von DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten wichtig. Mastzellen scheinen daher für eine potente Präsentation von Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (DC) in den Lymphknoten und somit für die Entstehung einer adaptiven Immunantwort notwendig zu sein.

In den folgend beschriebenen Experimenten versuchen wir die Frage zu beantworten, ob Mastzellen die Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung, die durch antigenbeladene DC induziert wird, beeinflussen können. Um diese Frage zu beantworten wurde ein von Bart Lambrecht et. al. etabliertes Sensibilisierungs- und Provokationsmodell verwendet [116]. Lambrecht et al zeigten, dass die intranasale Applikation von antigenbeladenen DCs und die anschließende Provokation mit Antigen zu der Entstehung einer Entzündung der Atemwege führt. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt wurden Wildtyp- und



**Abb. 3.18: Untersuchung der Migration von antigenbeladenen DC.** Mastzelldefiziente Mäuse des Stammes C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und WBB6F1-Kit<sup>W/Wv</sup> und entsprechende Wildtypen wurden intranasal invitro generierte DC appliziert. Die DC wurden vorab 24 Stunden mit PBS bzw. Ovalbumin inkubiert. 10 Tage nach der Applikation wurden die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen mit Antigen provoziert. Hierzu wurden sie jeweils für 20 min mit OVA vernebelt. 24 Stunden nach der letzten Provokation wurden die Tiere auf die Entwicklung einer Entzündung der Atemwege hin untersucht.



mastzelldefizienten Mäusen in vitro generierte DC intranasal appliziert. Die Zellen wurden 24 Stunden vor Applikation mit PBS bzw. Ovalbumin über Nacht inkubiert. Zehn Tage nach der DC Gabe wurden die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen mit Antigen provoziert. Nach 24 Stunden nach wurden die Tiere auf die Induktion einer Entzündung der Atemwege untersucht.

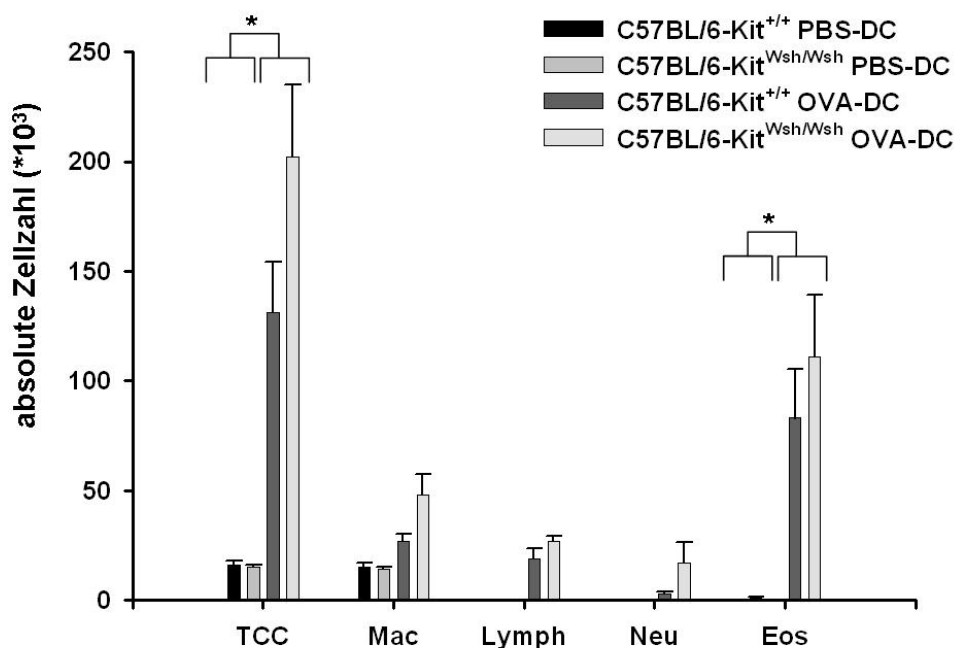
Vor Applikation der DC wurden diese auf Reinheit und Expression von kostimulatorischen Molekülen hin analysiert. Hierzu wurde mittels FACS-Analyse die Expression von CD11c und MHCII, sowie von CD80, CD83, CD86 und CD40 ermittelt. Die in vitro generierten Zellen waren CD11c und MHCII positiv. Auf Zellen, die mit Ovalbumin über Nacht inkubiert worden waren konnte eine erhöhte Expression von MHCII, CD86 CD80, CD83, CD86 und CD40 im Vergleich zu PBS behandelten Zellen gemessen werden (Anhang 6.6).

### 3.4.1 Analyse der Entzündungsreaktion

24 Stunden nach der letzten Provokation mit Ovalbumin wurde die Entzündung in den Lungen der Tiere analysiert. Hierzu wurde die zelluläre Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage mittels Zytospin- und FACS-Analyse untersucht, Zellinfiltrate und Becherzellmetaplasie wurden an Lungenschnitten histologisch untersucht. Ausserdem wurden die drainierenden Lymphknoten auf Unterschiede in der Anzahl von konventioniellen Dendritischen Zellen hin untersucht.

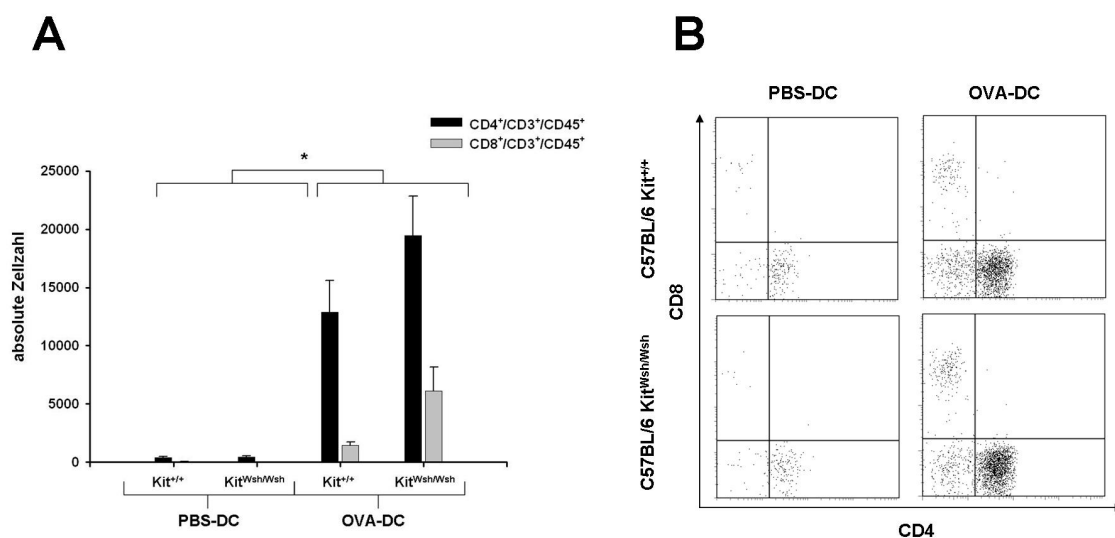
Im Vergleich zur Applikation von PBS behandelten DC führte die intranasale Gabe OVA behandelten in vitro generierten DC und die darauf folgende Provokation mit OVA sowohl in Wildtyp- als auch in mastzelldefizienten Mäusen zu einer erhöhten Zellzahl in der BAL. Die Analyse der Zytospins zeigte, dass bei Mäusen, die mit OVA inkubierten DC behandelt wurden, das zelluläre Profil der BAL überwiegend aus Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten bestand. Eosinophile Granulozyten waren dabei in der BAL dieser Tiere der dominierende Zelltyp. Sowohl bei Wildtypen als auch bei mastzelldefizienten Mäusen, die mit PBS behandelten DC sensibilisiert und anschließend mit OVA provoziert wurden, war nur eine geringe Anzahl an inflammatorischen Zellen in der BAL detektierbar. In der BAL dieser Tiere waren Alveolarmakrophagen der überwiegend auftretende Zelltyp. Diese Ergebnisse waren für mastzelldefiziente Mäuse des Stammes C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> (Abb. 3.19) und des Stammes WBB6FI-Kit<sup>W<sup>Wv</sup></sup> und deren entsprechende Wildtypen vergleichbar

(Anhang 6.7). Die Analyse der bronchoalveolären Lavage mittels FACS bestätigte, dass die intranasale Behandlung von Tieren mit OVA inkubierten DC und die anschließende Provokation zu einer erhöhten Einwanderung von T-Zellen in den bronchoalveolären Raum führt. Überwiegend sind diese T-Zellen CD4 positiv (~63%), CD8 positive T-Zellen sind zu einem deutlich geringeren Prozentsatz in der BAL der Tiere detektierbar (~8,5%). Im Vergleich zu den Tieren, die mit OVA behandelten DC sensibilisiert wurden, war in der BAL von Mäusen, die mit PBS behandelten DC sensibilisiert wurden, nach Provokation mit OVA nur eine sehr geringe Anzahl an T-Zellen detektierbar. Das Verhältnis zwischen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ist in diesen Tieren vergleichbar mit den OVA-DC behandelten Tieren (Abb. 3.20). Die FACS Analyse der BAL von entsprechend behandelten mastzelldefizienten WBB6F1-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> und deren Wildtypen erbrachte vergleichbare Ergebnisse (Anhang 6.8).



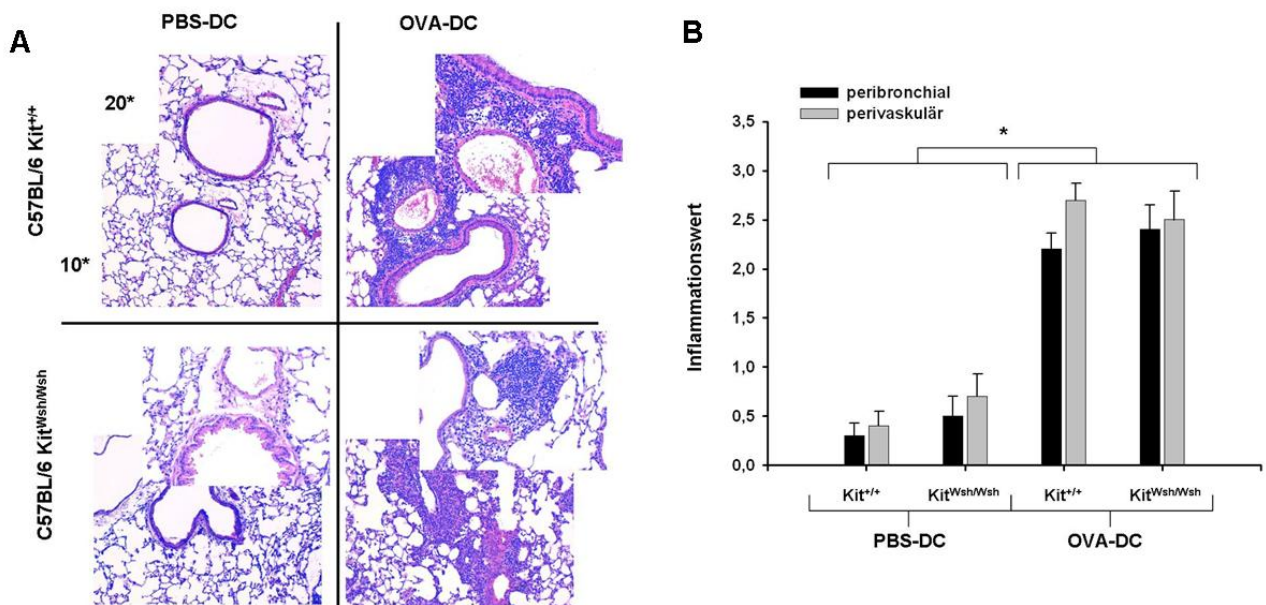
**Abb. 3.19: Analyse der zellularen Zusammensetzung der bronchoalveolären Lavage.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurde eine bronchoalveolare Lavage durchgeführt. Die Zellen der Lavage wurden fixiert, eine Differentialfärbung durchgeführt und mittels Lichtmikroskop die zelluläre Zusammensetzung bestimmt. Auf dem Bild ist die absolute Zellzahl (TCC) sowie die absolute Anzahl der in der BAL differenzierten Zellpopulationen dargestellt. Die Zelldifferenzierung wurde für mastzelldefiziente C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> die entweder mit OVA-DC oder mit PBS-DC intranasal sensibilisiert wurden, bzw. für entsprechend behandelte Wildtyp-Tiere durchgeführt. n= 6-10 \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> OVA-DC mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> PBS-DC.

Die Entstehung einer Entzündung in der BAL konnte durch die histologische Analyse von Lungenquerschnitten bestätigt werden. Auf HE-gefärbten Lungenschnitten von Wildtyp- und mastzelldefizienten Tieren, die mit OVA-DC sensibilisiert und anschließend mit OVA provoziert wurden, konnten Zellinfiltrate im Lungengewebe detektiert werden. Diese Zellinfiltrate waren sowohl im perivaskulären als auch im peribronchialen Raum ausgeprägt. Die Einwanderung von Zellen in das Lungengewebe war sowohl in den peripheren als auch zentralen Lungenarealen nachweisbar. Die Untersuchung der Entzündung auf Lungenschnitten bestätigte die Inflammation des Lungengewebes und verdeutlichte den Schweregrad der Entzündung. In OVA-DC behandelten Wildtypen war ein Inflammationswert von 2,7 für die perivaskulären und 2,2 für die peribronchialen Bereiche nachweisbar. Auf Lungenschnitten von mastzelldefizienten Mäusen die mit OVA-DCs sensibilisiert wurden war eine zu den Wildtypen vergleichbare Entzündung zu beobachten (Inflammationswert: perivaskulär 2,5 und peribronchial 2,4). Die intranasale Applikation von PBS-DC und die anschließende Provokation mit OVA führte sowohl in mastzelldefizienten



**Abb. 3.20: Analyse der T-Zellpopulationen in der bronchoalveolaren Lavage mittels FACS.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurden die T-Zellpopulationen der bronchoalveolaren Lavage mittels FACS bestimmt. Lymphozyten wurden als CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen charakterisiert, T-Helfer Zellen wurden durch die zusätzliche Expression von CD4, T-Effektorzellen durch die Expression von CD8 bestimmt. Anhand der FACS-Daten wurde die absolute Anzahl von T-Helfer und T-Effektorzellen in der Lavage von Wildtyp-Tieren und mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Tieren nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA bestimmt. n= 5-10 \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> OVA-DC mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> PBS-DC.

C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> als auch in Wildtyp-Tieren zu keinen pathologischen Veränderungen im Lungengewebe. Atemwege und Gefäße waren frei von Zellinfiltraten. Der Inflammationswert bei diesen Tieren war peribronchial bei Wildtypen 0,3, bei mastzelldefizienten Tieren 0,7. Perivaskulär waren vereinzelt schwache Zellinfiltrate nachweisbar, der Inflammationswert in diesen Bereichen war bei Wildtypen 0,4 und mastzelllosen Mäusen 0,7 (Abb 3.21). Die Analyse der HE gefärbten Lungenschnitte von mastzelldefizienten WBB6F1-Kit<sup>W/Wv</sup> und entsprechenden Wildtyp-Tieren erbrachte zu den C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäusen vergleichbare Resultate. In Lungen von Mäusen, die mit OVA-DC intranasal sensibilisiert wurden, konnte eine Einwanderung von Zellen in den perivaskulären und peribronchialen Raum detektiert werden. Der Inflammationswert, der für die Lungen von wildtyp Tieren ermittelt wurde, betrug im Durchschnitt 2,6 für den peribronchialen und 3,0 für den perivaskulären Raum. Auf Lungenschnitten von mastzelldefizienten Mäusen, die mit OVA-DC sensibilisiert wurden, konnte ein Inflammationswert von 2,9 für den peribronchialen und 3,0 für den perivaskulären Raum bestimmt werden. In Lungen von Mäusen, sowohl von mastzelldefizienten als auch von Wildtypen, denen PBS-DC zur Sensibilisierung appliziert wurden, waren nur vereinzelt perivaskuläre Zellinfiltrate in den Lungen nachweisbar. Der Inflammationswert dieser Tiere betrug im Mittel peribronchial 0 und perivaskulär 0,3 bei Wildtypen und 0,2 bei mastzelldefizienten Mäusen (Anhang 6.9).



**Abb. 3.21: Histologische Analyse von Lungenschnitten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere mit OVA wurden die Lungen der Tiere in Parafin fixiert und Gewebsschnitte angefertigt.

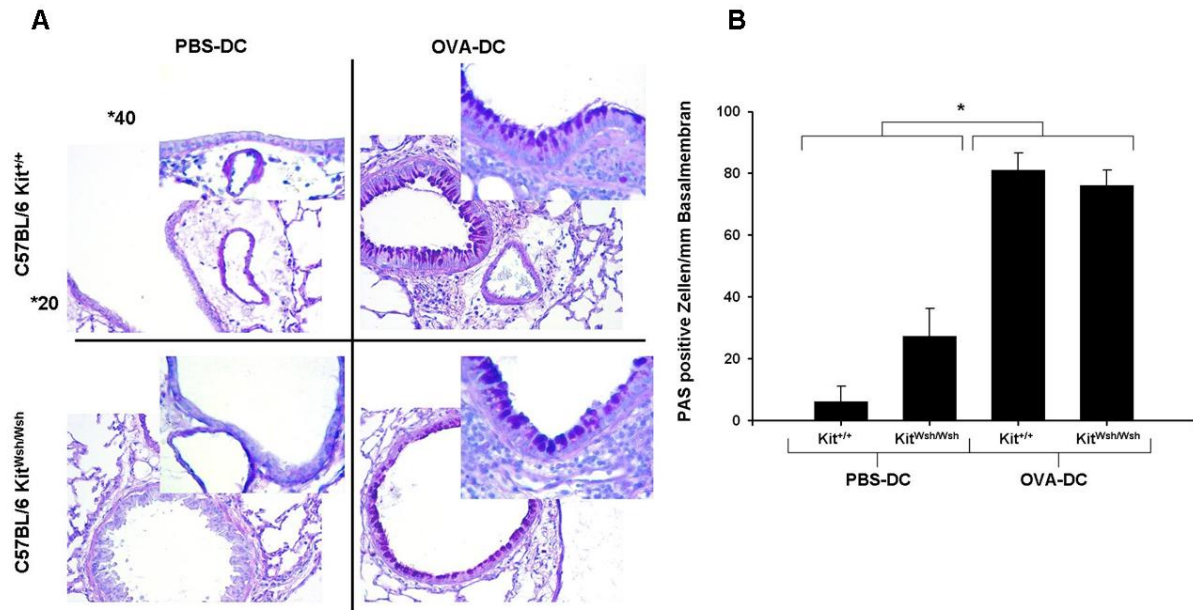
**Bild A** zeigt exemplarisch HE gefärbte Lungenschnitte von Wildtypen und mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. Von jeder Gruppe sind zwei unterschiedliche Vergrößerungen (100\*/200\*) dargestellt. Zellinfiltrate sind auf den Lungenschnitten von OVA-DC behandelten Tieren peribronchial und perivaskulär als dunkle Zellansammlungen detektierbar.

**Bild B** zeigt die Inflammationswerte der analysierten Lungengewebe. Der Inflammationswert stellt eine objektivierbare Größe für das Ausmaß der Inflammation dar und nimmt Werte zwischen null und vier an. Dabei steht null für keine nachweisbaren inflammatorischen Zellinfiltrate und vier für die Infiltration aller auf dem Lungenschnitt vorhandenen Atemwege und Gefäße. Der Inflammationswert wurde für Wildtypen und mastzelldefiziente C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA analysiert und daraus die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. n=5-8 \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> OVA-DC mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> PBS-DC.

Als weiteres Charakteristikum einer allergischen Atemwegsentzündung wurde die Entstehung einer Becherzellmetaplasie untersucht. Mittels PAS-Färbung wurde die Anzahl an Mukus-produzierenden Zellen pro Millimeter Basalmembran auf den Lungenschnitten der Versuchstiere bestimmt. Sowohl mastzelldefiziente C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> als auch Wildtyp-Tiere, die mit OVA-DC intranasal sensibilisiert wurden, entwickelten nach der Provokation mit dem Antigen eine Becherzellmetaplasie. Die Anzahl der PAS-positiven Zellen/mm Basalmembran war in den beiden Gruppen

vergleichbar. Auf Lungenschnitten von Wildtypen, die mit OVA-DCs sensibilisiert wurden, konnten im Durchschnitt 81 PAS-positive Zellen/mm detektiert werden, bei mastzelldefizienten Tieren 76 Zellen/mm. Die Behandlung mit PBS-DC und die anschließende Provokation mit OVA führte sowohl in mastzelldefizienten als auch in Wildtyp Tieren nur zu einer schwachen Becherzellmetaplasie

Mit im Durchschnitt 13 PAS positiven Zellen/mm Basalmembran bei Wildtpen und 20 PAS-positiven Zellen bei mastzelldefizienten Tieren war die Anzahl an Mukusproduzierenden Zellen im Vergleich zu den OVA-DC behandelten Tieren deutlich reduziert (siehe Abbildung 3.22). In mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> Mäusen und den entsprechenden Wildtyp- Tieren war die Entstehung einer Becherzellmetaplasie vergleichbar mit den ebenso behandelten mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup> Mäusen. Auf Lungenschnitten von sowohl mastzelldefizienten- als auch Wildtyp-Tieren waren nach Sensibilisierung mit OVA- DC und Provokation mit OVA im Vergleich zu den Mäusen die mit PBS-DC behandelt wurden, deutlich erhöhte Zahlen von PAS-positiven Zellen/mm Basalmembran detektierbar. Die zwischen den beiden OVA-DC behandelten Gruppen konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden (Anhang 6.10)



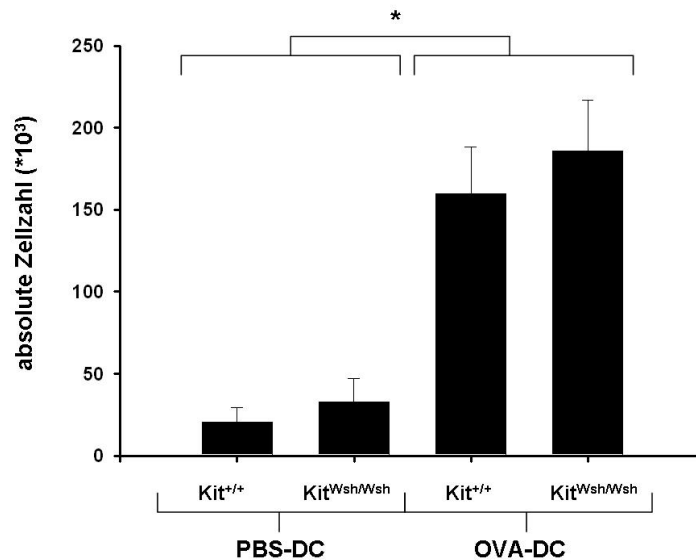
**Abb. 3.22: Histologische Analyse von Lungenschnitten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere mit OVA wurden die Lungen der Tiere in Parafin fixiert und Gewebsschnitte angefertigt.

**Bild A** zeigt exemplarisch PAS-gefärbte Lungenschnitte von Wildtypen und mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. Von jeder Gruppe sind zwei unterschiedliche Vergrößerungen (20\*/40\*) dargestellt. PAS-positive Zellen sind auf dem Atemwegsepithel als lila gefärbte Zellen dargestellt. **Bild B** zeigt die Anzahl an PAS-positiven Zellen pro mm Basalmembran von allen analysierten Lungengewebe. Die Anzahl der Mukus-produzierenden Zellen wurde mit Hilfe einer speziellen Software auf die Länge der Basalmembran bezogen. Die Anzahl an PAS-positiven Zellen/mm Basalmembran wurde für Wildtypen und mastzelldefiziente C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA analysiert und daraus die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. n=5-8 \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> OVA-DC mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> PBS-DC.

### 3.4.2 Analyse der trachealen Lymphknoten auf konventionelle DC

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede am Anteil von konventionellen Dendritischen Zellen in den drainierenden Lymphknoten nach Applikation von OVA-DC zwischen mastzelldefizienten- und Wildtyp-Tieren gibt, wurden Einzelzellsuspensionen der Lymphknoten mittels FACS analysiert. 24 Stunden nach der letzten Provokation konnten sowohl in den Lymphknoten von mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> (Abb. 3.24) und WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> (Anhang 6.11) als auch den entsprechenden Wildtyp-Mäusen, die mit OVA-DC behandelt wurden, eine im Vergleich zu PBS-DC behandelten Tieren erhöhte Anzahl an konventionellen DC detektiert werden. In

mastzelldefizienten- und Wildtyp-Tieren die mit OVA-DC sensibilisiert wurden ist die Anzahl der CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>-Zellen vergleichbar hoch.



**Abb. 3.24: FACS Analyse der trachealen Lymphknoten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation mit OVA wurden die drainierenden Lymphknoten präpariert und mittels FACS die Anzahl an konventionellen DC untersucht. Dargestellt ist die absolute Anzahl von CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> konventionellen Dendritischen Zellen in den drainierenden Lymphknoten von mastzelldefizienten C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und Wildtyp-Tieren, nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. n=4-7 \* p < 0,05 im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> OVA-DC mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> PBS-DC.



### 4. Diskussion

Über 300 Millionen Menschen leiden weltweit unter Asthma bronchiale. Es wird geschätzt, dass innerhalb der nächsten zwei Jahrzehnte die Zahl der betroffenen Patienten um weitere 100 Millionen ansteigen wird [117]. Ca. 80-90% der Patienten reagieren gut auf die aktuellen Therapieoptionen wie inhalative Kortikosteroide oder  $\beta_2$ -Agonisten, jedoch 10% der Patienten, hierunter vor allem solche mit starkem Asthma, antworten nicht auf diese klassischen Therapieansätze [118]. Es ist daher wichtig die genaue Funktion und Mechanismen die zur Entstehung von der multifaktoriellen Erkrankung Asthma bronchiale beitragen zu analysieren. Das Wissen welche Zellpopulationen wann und wie zur Ausbildung der chronischen Erkrankung der Atemwege beitragen bietet die Möglichkeit neue Therapieansätze zur Behandlung zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde die Rolle und Funktion der Mastzelle von ihr produzierten Mediatoren bei der Entstehung von einer allergischen Atemwegsentzündung untersucht.

Im letzten Jahrzehnt konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die immunologischen Funktionen der Mastzelle weit komplexer sind als nur Effektorzelle der IgE vermittelten allergischen Sofortreaktion oder in der Helminthenabwehr. Die große Bandbreite an Rezeptoren und Mediatoren, die von der Mastzelle exprimiert werden, lässt die Zelle zu einem wichtigen Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort werden.

Die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung einer allergischen Erkrankung wie Asthma bronchiale wird noch kontrovers diskutiert. Studien der letzten Jahre verdeutlichen, dass die richtige Wahl des Sensibilisierungs- und Provokationsmodells wichtig ist, um mastzellspezifische Effekte bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung zu identifizieren. Sowohl mastzelldefiziente- als auch entsprechende Wildtyp-Tiere entwickeln nach systemischer Sensibilisierung mit Antigen in Kombination mit einem Adjuvans (Aluminiumhydroxid) und inhalativer Provokation mit dem Antigen eine vergleichbar starke allergische Entzündung der Atemwege [102]. Aluminiumhydroxid (Alum) wird in vielen adaptiven Immunisierungsmodellen als Adjuvans in der Sensibilisierungsphase eingesetzt. Der exakte Wirkmechanismus konnte bisher jedoch nur im Ansatz geklärt werden. Alum scheint als Gefahrensignal zu wirken und so die Aktivierung und Antigenaufnahme von Dendritischen Zellen zu beeinflussen [119]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Alum über IL-4 und IL-13 unabhängige Wege Th<sub>2</sub>-spezifische Immunantworten

induzieren und verstärken kann [120]. Es ist daher anzunehmen, dass Alum in Sensibilisierungsmodellen die Funktion wichtiger physiologischer Mediatoren kompensiert und somit maskiert. Williams et al. bestätigten in ihrer Arbeit, dass bei Koapplikation von Alum keine mastzellspezifischen Effekte bei der Entstehung einer allergischen Lungenerkrankung nachgewiesen werden können. Die Gruppe konnte aber auch demonstrieren, dass Mastzellen für die Entstehung einer chronischen allergischen Atemwegsentzündung notwendig sind, wenn die Sensibilisierung mit Antigen ohne zusätzliches Adjuvans durchgeführt wird. Nach Behandlung mit diesem schwächeren Sensibilisierungsprotokoll entwickeln Wildtyp-Mäuse eine im Vergleich zu mastzelldefizienten Tieren deutlich verstärkte allergische Entzündung der Atemwege [104]. In vielen weiteren Studien, die unterschiedliche weniger potente Sensibilisierungsprotokolle verwendeten, konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer nicht-allergischen [121], aber auch einer allergischen Atemwegsentzündung spielt [92;107;122;123]. Die vorliegende Arbeit bestätigt, dass Mastzellen an der Entwicklung einer allergischen Atemwegsüberempfindlichkeit beteiligt sind. Nach systemischer Sensibilisierung und Provokation mit dem Modellallergen OVA entwickelten sowohl Wildtyp als auch mastzelldefiziente Tiere vergleichbar hohe Konzentrationen an OVA spezifischen Immunglobulinen der Isotypen IgE, IgG1 und IgG2b. In den Tieren konnten deutlich höhere Titer des Immunglobulins IgG1 im Vergleich zu IgG2b detektiert werden. Die erhöhte systemische Freisetzung von IgG1, dessen Isotypenwechsel durch IL-4 induziert wird, lässt auf die Entstehung einer Th<sub>2</sub>-spezifischen Immunantwort schließen. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten vorheriger Arbeiten [107] überein und führen zu dem Schluss, dass die Sensibilisierung in mastzelldefizienten Mäusen nicht gestört ist. Im Gegensatz hierzu konnte weder in sensibilisierten und provozierten mastzelldefizienten Tieren des Stammes C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> noch in Tieren des Stammes WBB6F1-Kit<sup>W<sup>v</sup></sup> ein asthmaähnliches Krankheitsbild induziert werden, welches mit ebenso behandelten Wildtyp-Tieren vergleichbar wäre. Die Atemwegsüberempfindlichkeit, Atemwegsentzündung, charakterisiert unter anderem durch die Eosinophilie der BAL und die Becherzellmetaplasie waren in den mastzelldefizienten Mausstämmen deutlich schwächer ausgeprägt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Mastzellen auch an der Induktion der allergischen Atemwegserkrankung im akuten Asthma-Modell beteiligt sind.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte auf das Fehlen von Mastzellen bei diesen Tieren zurückzuführen sind oder allgemein mit der gestörten Signalgebung über den c-Kit Rezeptor zusammenhängen, ist es wichtig eine Rekonstitution der Tiere mit Mastzellen durchzuführen. Durch intravenöse, intraperitoneale aber auch intradermale Applikation von Mastzellen, die in vitro aus dem Knochenmark von Wildtyp-Tieren generiert wurden, ist es möglich mastzelldefiziente Tiere mit Mastzellen zu rekonstituieren. Um eine Besiedlung der Lunge mit Mastzellen in mastzellosen Tieren zu erreichen, die Vergleichbar mit Wildtyp-Tieren ist, ist es notwendig die Tiere 8-12 Wochen nach Applikation sitzen zu lassen [45].

Yu [107] und Williams [104] zeigten ihrem chronischen Asthmodell, dass der Transfer von Mastzellen in mastzelldefiziente Tiere zur Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung nach entsprechender Sensibilisierung und Provokation führt. Die Rekonstitution von mastzelldefizienten Mäusen führte auch in dem hier vorgestellten akuten Asthmodell zur Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung in sensibilisierten und provozierten Mäusen. Die intravenöse Applikation mit BMDC führte zu einer Anzahl an Mastzellen in der Lunge, die mit Wildtyp-Tieren vergleichbar war. Nach Sensibilisierung und Provokation entwickelten mastzelllose Mäuse, die mit Wildtyp-Mastzellen rekonstituiert wurden ein Asthma-ähnliches Krankheitsbild, dass mit dem von sensibilisierten und provozierten Wildtypen vergleichbar war. Wie die Wildtypen reagierten die rekonstituierten Mäuse auf steigende Dosen mit Methacholin mit einem erhöhten Atemwegswiderstand. Auch ist eine vergleichbar starke Eosinophilie in der BAL und Entzündung in der Lunge zu beobachten. Die Ergebnisse bestätigen, dass die beobachteten Unterschiede in der Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung zwischen Wildtypen und mastzelldefizienten Tieren auf Mastzellen zurückzuführen sind. Da nur Mastzellen rekonstituiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass weitere Nebeneffekte der Mutation keine wesentliche Rolle spielen.

Die Mastzelle kann über eine große Bandbreite an Rezeptoren aktiviert werden. Abhängig von der Art und Stärke des Stimulus können unterschiedliche Aktivierungswege initiiert werden. Die Aktivierung über Rezeptoren, die mikrobielle Bestandteile erkennen (z.B. TLR) führt zur Freisetzung von Mediatoren die unabhängig von der Degranulation der Mastzelle ist. Je nach Art des Reizes werden hierbei unterschiedliche Mediatorenprofile freigesetzt.

Die Kreuzvernetzung von membrangebundenem IgE durch Antigen und die darauf folgende Degranulation der Zelle ist der am besten analysierte Aktivierungsweg der Mastzelle. Präsynthetisierte Botenstoffe wie Histamin und TNF werden innerhalb von Minuten freigesetzt und die de novo Synthese von Lipidmediatoren, Zytokinen und Chemokinen induziert. Dieser Prozess ist für Ausbildung einer allergischen Reaktion vom Typ I bereits weit reichend beschrieben. Auch im Zusammenhang mit der Entstehung allergischer Erkrankungen der Atemwege konnte bereits gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung von membrangebundenem IgE auf Mastzellen wichtig ist [2;24]. Die mastzellspezifische Expression der Fc $\gamma$  Rezeptorkette, welche essentiell für die funktionelle Ausbildung der Rezeptoren Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIII und Fc $\epsilon$ RI ist, zeigte sich als wichtig für die Induktion vieler Charakteristika einer allergischen Atemwegsentzündung [107]. Taube et al bestätigten die wichtige Funktion des Fc $\epsilon$ RI Rezeptors bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung. In der Studie konnten sie unter Verwendung eines Adjuvans-freien Sensibilisierungsmodells demonstrieren, dass die Expression des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors wichtig für die Ausbildung eines asthmatypischen Krankheitsbildes ist. Das Vorhandensein des Rezeptors, der vor allem von Mastzellen und Basophilen expremiert wird, scheint essentiell bei der Entstehung einer erhöhten Reaktivität der Atemwege zu sein [106].

Unser Modell, aber auch die bereits vorgestellten Modelle anderer Arbeitsgruppen können bestätigen, dass Mastzellen an der Entstehung akuter und chronischer allergischer Erkrankungen der Atemwege beteiligt sind. Es ist jedoch noch unklar welche mastzellproduzierten Mediatoren eine Rolle bei der Induktion der Erkrankung spielen. Wie bereits erwähnt können Mastzellen nach Aktivierung eine große Bandbreite an Effektormolekülen, wie Histamine, Lipidmediatoren, Zytokine und Chemokine, freisetzen. Diese können das Immunsystem indirekt oder direkt beeinflussen. Indirekt kann die Mastzelle durch die Aktivierung und Regulierung von nicht immunologischen Zellen, wie Endothel-, Epithel-, Nerven- oder Muskelzellen auf die Entstehung einer angeborenen oder adaptiven Immunantwort einwirken.

Für eine große Anzahl der Mediatoren konnte jedoch auch eine direkte immunologische Wirkung, also direkte Regulation von Zellen des Immunsystems, wie Dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Granulozyten aufgezeigt werden. Mastzellproduzierte Botenstoffe können die Migration, Polarisierung und Aktivierung sowie weitere biologische Effekte der Zellen des Immunsystems beeinflussen. Histamin, welches in präsynthetisierter Form in den Granula

gespeichert und nach Aktivierung innerhalb von Minuten freigesetzt werden kann ist wahrscheinlich der am besten untersuchte Mediator der Mastzelle. Die Freisetzung nach IgE Kreuzvernetzung in der Typ I Allergie führt zu den klassischen Symptomen vieler allergischer Krankheitsbilder wie Heuschnupfen und Asthma. Histamin wirkt auf die glatte Muskulatur, die Bronchien und die Gefäße, was zu Bronchospasmen, Krämpfen, Durchfall, Hautröteln, Fieberreaktionen und im systemischen Fall zu einem anaphylaktischem Schock führen kann. All diese Symptome finden innerhalb kürzester Zeit nach Freisetzung statt und werden als Sofortreaktion der allergischen Reaktion bezeichnet. Histamin kann aber auch direkt auf Zellen des Immunsystems einwirken, was für Makrophagen, Dendritische Zellen, T Zellen und B-Zellen gezeigt werden konnte. Histamin wirkt auf diese Zelltypen über die Histaminrezeptoren H1-4 welche von diesen Zellen unterschiedlich stark exprimiert werden [124]. Für Dendritische Zellen konnte gezeigt werden, dass Histamin eine wichtige Rolle bei der Ausreifung und Modulation der DC Vorläuferzellen zu Th1 oder Th2 induzierenden muren DC spielt [76;125]. Neben der indirekten Beeinflussung durch DC konnten auch direkte Effekte von Histamin auf T-Zellen beobachtet werden. Je nach Expressionsmuster der Rezeptoren H1 bzw. H2 induziert Histamin die Produktion von Th1 spezifischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$  oder Th2 spezifischen Zytokinen wie IL-4 und IL-13 [126]. In vivo konnte Bryce et al. interessanterweise demonstrieren, dass H1R-defiziente Mäuse nicht in der Lage waren eine allergische Entzündung der Atemwege gegenüber OVA auszubilden. In ihrem Modell war die Migration von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Ort der Antigenpräsentation und somit auch die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung gestört [108]. Die Gruppe zeigte damit, dass Histamin und die Expression des H1-Rezeptors für die Entstehung einer T-Zell-spezifischen adaptiven Immunantwort wichtig ist. Neben Histamin konnten auch für weitere mastzellproduzierten Mediatoren wichtige immunmodulatorische Funktionen aufgezeigt werden. Prostaglandin D<sub>2</sub> kann ebenfalls DC, und somit auch die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen [75]. Die Funktion für die Entstehung einer allergischen Erkrankung der Atemwege ist hierfür jedoch noch unklar. Ein weiteres mastzellproduziertes Effektmolekül, welches bei der Induktion von Asthma eine Rolle spielt ist TNF. Für mastzellproduziertes TNF konnte bereits in einer Vielzahl von in vivo Studien gezeigt werden, dass es einen wichtigen immunmodulatorischen Effekt sowohl in der angeborenen als auch adaptiven Immunität besitzt. Echtenacher et al. zeigten in einem Modell der

bakteriellen Sepsis, dass mastzellproduziertes TNF wichtig für die Abwehr der Bakterien und das Überleben der Versuchstiere ist [59;127]. TNF scheint hierbei für den Influx von neutrophilen Granulocyten an den Entzündungsort notwendig zu sein [60]. McLachlan et al. unterstreichen in ihrer Studie, dass mastzellproduziertes TNF nach einer bakteriellen Infektion auch für die Entstehung einer adäquaten T-Zellantwort notwendig ist. Nur in Wildtyp-Mäusen, bzw Mäusen, die mit Wildtyp-Mastzellen rekonstituiert wurden konnten sie eine Hypertrophie der Lymphknoten nach bakterieller Infektion detektieren, die auf eine Zunahme von T-Zellen rückzuführen war. Weder in mastzelldefizienten, noch in mastzelldefizienten Tieren, die mit TNF<sup>-/-</sup>-Mastzellen Rekonstituiert waren, war dieser Effekt zu beobachten [81]. Dass Mastzellen ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen, konnte in der Arbeit von Heib et al. bestätigt werden. In ihrer Veröffentlichung zeigte die Gruppe, dass über den TLR-7 aktivierte Mastzellen für die Sensibilisierung und die Induktion einer adaptiven Immunantwort gegenüber OVA notwendig sind. Mastzellproduziertes TNF und IL-1 $\beta$  zeigten sich hierbei als wichtige Botenstoffe für die effektive Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die regionalen Lymphknoten und adäquate Induktion einer CD8<sup>+</sup>-spezifischen Immunantwort [72]. In einem Kontaktallergiemodell gegenüber dem Hapten FITC waren Mastzellen und mastzellproduziertes TNF ebenfalls für die effiziente Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die regionalen Lymphknoten notwendig [71]. In der Arbeit konnte in mastzelldefizienten Tieren eine deutlich verminderte Migration von antigenbeladenen DC im Vergleich zu Wildtyp Tieren über die ersten 24 Stunden nach FITC-Applikation beobachtet werden. Zu späteren Zeitpunkten war die Anzahl der FITC-positiven Zellen in den Lymphknoten der Tiere jedoch vergleichbar. Die vorgestellten Studien zeigen, dass mastzellproduziertes TNF ein wichtiger Mediator für angeborene und adaptive Immunantworten ist. Mastzellen stellen zwar nicht die einzige zelluläre Quelle für TNF dar, besitzen jedoch die einzigartige Fähigkeit es in präsynthetisierter Form zu speichern und es innerhalb von Minuten freizusetzen [19;128;129].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten bestätigen die wichtige Rolle für mastzellproduziertes TNF bei der Entstehung einer allergischen Erkrankung. Mastzelldefiziente Mäuse, die mit TNF<sup>-/-</sup> Mastzellen rekonstituiert wurden entwickelten nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA keine Atemwegsüberempfindlichkeit. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren oder mit Wildtyp-

Mastzellen rekonstituierten mastzelldefizienten Tieren waren in diesen Tieren auch weitere asthmatypische Charakteristika, wie Becherzellmetaplasie, verstärkte Mukusproduktion, Eosinophilie der BAL und inflammatorischer Influx in das Lungengewebe deutlich schwächer ausgeprägt. Die Daten lassen darauf schließen, dass mastzellproduziertes TNF eine wichtige Funktion für die Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung hat. In anderen Krankheiten, wie Immunkomplex-induzierter Inflammation, akuter septischer Peritonitis, Kolitis, Hautentzündung und pulmonalen Überempfindlichkeitsreaktionen konnte bereits gezeigt werden, dass mastzellproduziertes TNF eine wichtige Funktion bei der Initiierung primärer Entzündungsreaktionen hat. Humane aber auch murine Studien gaben bereits Indizien, dass TNF eine wichtige Funktion bei der Initiierung einer allergischen Atemwegserkrankung besitzt. Protein und mRNA Konzentrationen sind in den Atemwegen von Asthmatikern im Vergleich zu Gesunden erhöht [112;130]. Die intratracheale Applikation von rekombinanten TNF führt bei gesunden Probanden zur Ausbildung einer Atemwegsüberempfindlichkeit und Neutrophilie [110;131]. In humanem Lungengewebe kann durch Behandlung mit IgE die Sekretion von biologisch aktiven Konzentrationen von TNF nachgewiesen werden [132]. Im murinen Modell konnte bestätigt werden, dass die intratracheale Applikation von TNF- $\alpha$  zu einer verstärkten Expression von Mukusgenen [133] und für die Ausbildung einer späten Atemwegsreaktion notwendig ist [134]. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass TNF<sup>-/-</sup> Tiere nicht dazu in der Lage sind nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA ohne zusätzliches Adjuvans eine allergische Atemwegserkrankung auszubilden. Unabhängig von unserer Arbeitsgruppe konnten Nakae et al. ebenso bestätigen, dass mastzellproduziertes TNF wichtig für die Entstehung einer Atemwegsüberempfindlichkeit ist [135]. In ihrem chronischen Asthmodell waren mastzelldefiziente Mäuse, die mit TNF defizienten Mastzellen rekonstituiert wurden, nicht in der Lage waren ein asthmatypisches Krankheitsbild auszubilden. Diese Ergebnisse konnten in dem hier beschriebenen akuten Asthmodell bestätigt werden, was die wichtige Rolle von mastzellproduziertem TNF bei der Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung unterstreicht.

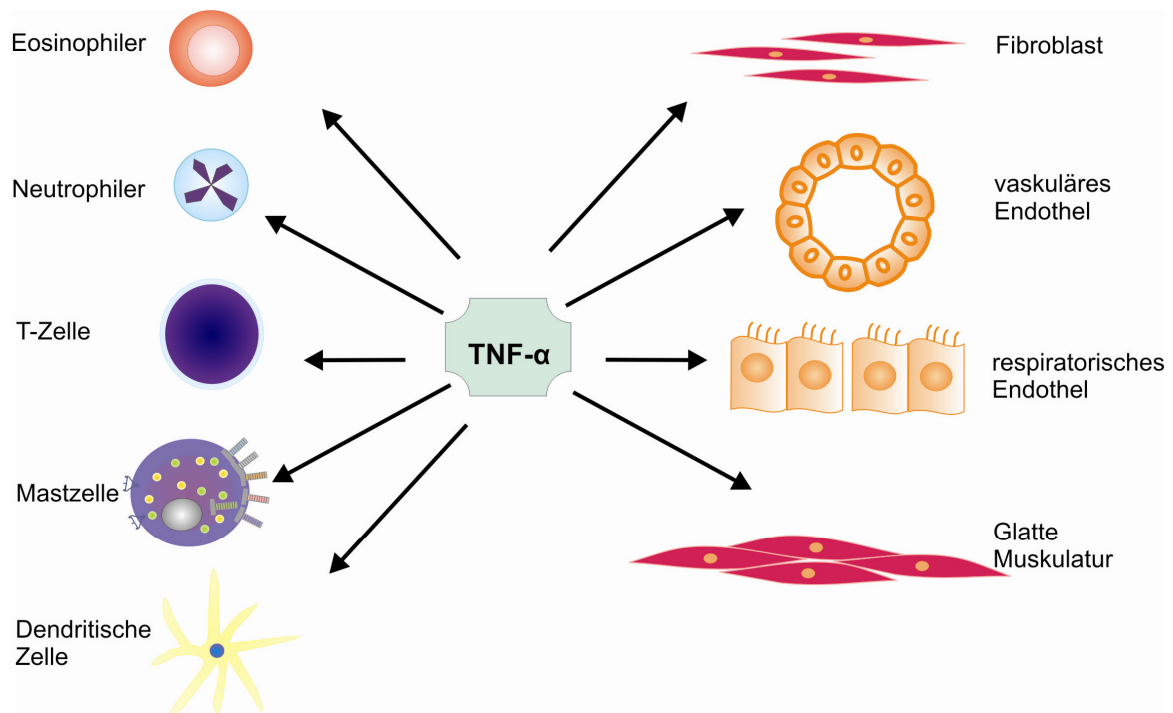
Die Mechanismen, über die TNF zur Induktion einer allergischen Atemwegserkrankung beitragen konnten noch nicht im Detail geklärt werden. Als proinflammatorisches Molekül kann es über eine große Bandbreite an Rezeptoren wirken. Immunmodulatorische Effekte werden hauptsächlich über die beiden

Rezeptoren TNF-R1 (CD120a) und TNF-R2 (CD120b) vermittelt. Die anderen Rezeptoren tragen größtenteils eine Todesdomäne und ihre Aktivierung ist mit TNF vermittelter Cytotoxizität assoziiert [136;137]. Die Expression dieser Rezeptoren konnte in der BAL auf Monozyten, Macrophagen, Lymphozyten und Granulozyten bestätigt werden [138]. TNF kann je nach Zelltyp auf den es einwirkt eine große Bandbreite von Mechanismen induzieren, die die Entstehung einer proinflammatorischen Immunantwort fördern. In der Lunge führt TNF zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin, dem Vaskulären-Zell-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1) und dem Interzellulären-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1) auf Lungenepithelzellen erhöht [139;140]. Die erhöhte Expression dieser Adhäsionsmoleküle ist wichtig für die Immigration von Eosinophilen, Neutrophilen und vermutlich auch aktivierten T-Zellen in das Lungengewebe [141;142]. Diese Arbeiten bestätigten erste Beobachtungen über die chemotaktische Funktion von TNF von Ming et al.[143]. In vitro konnte gezeigt werden, dass TNF auf die Reaktivität von sowohl humaner als auch muriner glatter Muskulatur einwirkt. Nach Inkubation in TNF reagierten tracheale Ringe der Maus aber auch humane Bronchi mit einer verstärkten Kontraktion bei Stimulation im elektrischen Feld oder gegenüber Bronchokonstriktoren [144;145]. Es wird vermutet, dass TNF durch indirekte und direkte Mechanismen die Umstrukturierung der Atemwege, ein typisches Charakteristikum von chronischem Asthma, beeinflussen kann. TNF ist beteiligt an der Induktion der Proliferation von Myofibroblasten [146] und kann in Eosinophilen die Freisetzung von Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) auslösen [147]. Beide Prozesse können zur Entstehung einer subepithelialen Atemwegsfibrose beitragen. Zusammengefasst zeigen die erwähnten Studien, dass TNF auf viele Arten zur Entstehung einer proinflammatorischen Antwort beitragen kann. Die direkte Beeinflussung von Zellen der adaptiven Immunität ist jedoch die effektivste Art die Induktion und Modulation einer allergischen Immunantwort zu steuern. Cumberbatch et al. konnten zeigen, dass exogen appliziertes TNF die Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten beeinflussen kann [148]. Die Migration von antigenbeladenen DC in die drainierenden Lymphknoten ist ein essentieller Schritt für die Induktion einer adaptiven Immunantwort. Neuere Studien spezifizierten, dass mastzellproduziertes TNF hierbei eine wichtige Rolle spielt. Suto et al. konnten in ihrer Kontaktallergie Studie zeigen, dass mastzellproduziertes TNF wichtig für eine adäquate Migration von antigenbeladenen



DC aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten ist [71]. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse die bereits für die Rolle von mastzellproduziertem TNF für die Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die regionalen Lymphknoten gemacht wurden. Neben der Modulation von DC konnte auch gezeigt werden, dass Mastzellen und mastzellproduziertes TNF T-Zellen aktivieren können. Nakae et al. zeigten in zwei in vitro Studien, dass Mastzellen über Zellkontakt-abhängige und -unabhängige Mechanismen in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren. Dies war sowohl über IgE abhängige, als auch über unabhängige Funktionen möglich. Sowohl die Proliferation von CD4<sup>+</sup> als auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen war durch Mastzellen induzierbar. Versuche mit TNF<sup>-/-</sup>-defizienten Mastzellen zeigten, dass die beobachteten Effekte hauptsächlich von mastzellproduziertem TNF abhängig waren [149;150]. Die dargestellten Studien verdeutlichen, dass TNF eine wichtige Funktion in der Induktion inflammatorischer Immunantworten spielt. TNF kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden, jedoch nur Mastzellen besitzen die Fähigkeit es in bereits präsynthetisierter Form zu speichern. Mastzellen können nach Aktivierung TNF innerhalb von Minuten freisetzen. Sie sind somit in der Lage ihr Mikromillieu zu verändern und die Entstehung von angeborenen und adaptiven Immunantworten zu induzieren und modulieren. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Mastzellen und mastzellproduziertes TNF eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer adaptiven Immunantwort besitzt.

Der wohl wichtigste Prozess zur Induktion einer adaptiven Immunantwort ist die Aufnahme und Präsentation von Antigen durch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen. Die Dendritische Zelle stellt zurzeit die effizienteste professionelle antigenpräsentierende Zelle des Immunsystems dar. DC bilden im Atemwegsepithel ein dichtes Netzwerk aus und fungieren als eine Art Wächterzelle [151;152]. Sie sind in der Lage Antigen, das das Epithel nicht durchdringen kann, aus dem Atemwegslumen aufzunehmen [153;154]. Unter homeostatischen Bedingungen, also bei Kontakt mit harmlosen Antigenen, wandern die in der Peripherie noch immaturen DC in die regionalen Lymphknoten. Dort angekommen präsentieren sie das prozessierte Antigen T-Zellen. Bei Kontakt mit antigenspezifischen T-Zellen wird durch diese Präsentation zwar Proliferation induziert, jedoch führt diese zu einer immunologischen Toleranz [155]. In Gegenwart eines zusätzlichen Gefahrensignals

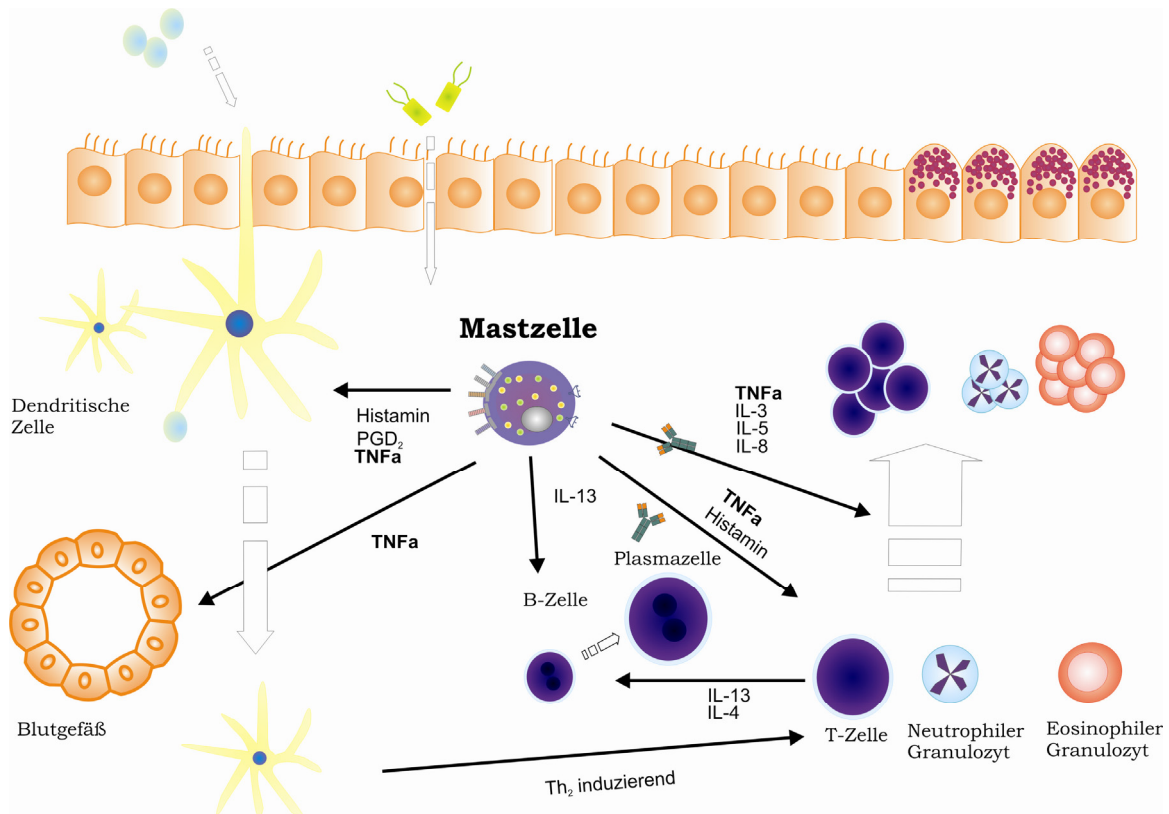


**Abb 4.1: Wirkung von TNF im respiratorischen Trakt.** TNF kann als Chemokin auf Granulocyten wie Eosinophile und Neutrophile und auf Monozyten wie Makrophagen wirken. Es fördert die Aktivierung und Zytokinfreisetzung von T-Zellen und induziert indirekt und mittels autokriner Aktivierung die Histaminfreisetzung von Mastzellen. TNF ist an der Emigration von Dendritischen Zellen und Langerhanszellen beteiligt. Außerdem stimuliert es die Proliferation von Fibroblasten und die Kontraktion der glatten Muskulatur. TNF induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf respiratorischen und vaskulären Endothelzellen.

nehmen DC während der Migration in den Lymphknoten einen muren Phänotyp an. Die Expression von MHC II-Komplexen und costimulatorischen Molekülen wird hochreguliert und die Zellen sind in der Lage antigenspezifische T-Zellantworten zu induzieren.[155]. In Abwesenheit von starken polarisierenden Signalen (z.B. hohe Dosen LPS) entstehen durch DC der Lunge vorwiegend Th<sub>2</sub>-spezifische Immunantworten [156]. Lambrecht et al konnten demonstrieren, dass die Dendritische Zelle eine essentielle Rolle bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung hat [115;116]. Die Depletion von DC während der Provokationsphase verhindert die Ausbildung eines asthmatischen Krankheitsbildes in Mäusen [157]. Die Studien verdeutlichen die wichtige Funktion der DC bei der Entstehung einer allergischen Entzündung der Atemwege. Die Migration der antigenbeladenen Zelle in die drainierenden Lymphknoten und die

effektive Präsentation des Antigens gegenüber antigenspezifischen T-Zellen ist hierbei ein Schlüsselpunkt in der Induktion einer adaptiven Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation von fluoreszenzmarkierten Antigen die Migration von antigenbeladenen Dendritischen Zellen aus den Lunge in die drainierenden Lymphknoten in sensibilisierten Wildtyp-Tieren erhöht. In mastzelldefizienten Mäusen war die Anzahl an antigenpositiven Dendritischen Zellen in den regionalen Lymphknoten jedoch deutlich niedriger. Vermaelen et al. demonstrierten, dass fluoreszenzmarkiertes Antigen nach intratrachealer Applikation überwiegend von Dendritischen Zellen der Lunge in die regionalen Lymphknoten transportiert wird. Das Antigen wird dabei in Granula der DC befördert und ein passiver Transport von fluoreszenzmarkiertem Antigen fand nicht statt. Die Dendritische Zelle war der einzige Zelltyp, der mit Antigen in die Lymphknoten migrierte und die DC waren in der Lage eine antigenspezifische T-Zellantwort zu initiieren [153]. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte Vermaelen, den stärksten Anstieg an OVA-positiven DC 24 Stunden nach Applikation des Antigens detektieren. Die Anzahl der OVA-positiven Zellen fällt danach wieder deutlich ab. Nakae et al. fanden entsprechend dieser Studie in ihrem chronischen Modell ebenfalls 24 Stunden nach Applikation von OVA den höchste Anzahl an positiven Zellen in den trachealen Lymphknoten, parallel konnten auch sie zu diesem Zeitpunkt den größten Unterschied zwischen Wildtyp und mastzelldefizienten Mäusen detektieren [135]. Nach Rekonstitution mit Wildtyp-Mastzellen war die Anzahl der OVA-positiven DC in den regionalen Lymphknoten vergleichbar mit Wildtyp-Tieren. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Mastzelle in sensibilisierten Mäusen zu einer verstärkten Migration von antigenbeladenen DC aus der Lunge in die regionalen Lymphknoten beiträgt. Die Fähigkeit Antigen aufzunehmen und es zu prozessieren ist in sensibilisierten Tieren erhöht. Die Aufnahme ist hierbei antigenspezifisch und konnte durch passive Immunisierung mit Immunglobulinen auf naive Tiere übertragen werden [158]. Diese Daten lassen auf eine wichtige Funktion von IgE und auf die Beteiligung von Mastzellen an der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung schließen. Mastzellen exprimieren wie bereits beschrieben den für IgE hochaffinen Rezeptor FcεRI auf ihrer Oberfläche. Taube et al konnten zeigen, dass die Expression des FcεRI und Mastzellen wichtig für die Entstehung einer erhöhten Atemwegsreaktivität sind [106]. Zusammengefasst kann durch diese Ergebnisse und die Beobachtungen in der

vorliegenden Arbeit folgende Hypothese für die Rolle der Mastzelle bei der verstärkten Migration von Dendritischen Zellen entwickelt werden; durch die systemische Sensibilisierung wird das Immunsystem sensitiver gegenüber dem Antigen. Bei Erstkontakt in der Lunge kommt es zur Aktivierung der Mastzelle, die daraufhin präsynthetisierte Mediatoren freisetzt. Diese verändern das Mikromillieu des Atemwegsepithels und fördern eine verstärkte Antigenaufnahme und Prozessierung der Dendritischen Zellen. Die DC der Lunge wandern verstärkt in die regionalen Lymphknoten und treffen dort auf antigenspezifische T-Zellen. Durch das verstärkte Signal der Mastzelle könnte eine verstärkte Aktivierung der Dendritischen Zellen induziert werden. Ein Schwellenwert in der Aktivierung der DC wird überschritten und statt der Induktion von Toleranz werden T-Zellen aktiviert und eine Th<sub>2</sub>-spezifische Polarisierung induziert. Diese wiederum fördert die Entstehung eines asthmatypischen Krankheitsbildes in den Mäusen. Wie beschrieben ist diese Hypothese bereits in Teilen bestätigt, einzelne Punkte sind jedoch noch unklar bzw. kontrovers diskutiert und müssen noch im Detail geklärt werden. Die Mastzelle kann nach Aktivierung eine große Bandbreite an Effektormolekülen freisetzen. Je nach Art und Stimulus ist das sezernierte Mediatorenprofil unterschiedlich. Die Botenstoffe können allein aber auch synergistisch auf unterschiedliche Zelltypen einwirken wodurch meist ein proinflammatorisches Millieu induziert wird, welches die Entstehung allergischer Antworten fördern kann. Neue Studien zeigen jedoch auch, dass die Mastzelle antiinflammatorische Mediatoren freisetzen und somit auch zur Regulierung einer Entzündungsantwort beitragen kann [159]. Inwieweit die Mastzelle als zentrale Quelle einzelner Mediatoren wichtig ist bedarf noch Klärung. Es ist jedoch bestätigt, dass die Mastzelle die einzige residente Zelle ist die präsynthetisierte Mediatoren innerhalb von Minuten nach Aktivierung freisetzen kann und somit für die schnelle Induktion und Modulation einer adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielt. Durch Verwendung schwacher Stimuli, die eher physiologischen Bedingungen widerspiegeln, konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle bei der Entstehung einer Immunantwort eine Rolle spielt.



**Abb 4.2: Die Funktion der Mastzelle bei der Induktion einer allergischen Erkrankung der Atemwege:** Durch die große Bandbreite an Botenstoffen können Mastzellen indirekt und direkt das Immunsystem beeinflussen. Für mastzellproduzierte Mediatoren konnte demonstriert werden, dass sie nicht immunologische Zellen, wie z.B. Endothel-, Epithel-, Nerven- und Muskelzellen aktivieren und regulieren können. Diese setzen daraufhin Moleküle frei, die die Ausbildung von angeborenen und adaptiven Immunantworten beeinflussen können. Für eine große Anzahl von mastzellproduzierten Mediatoren konnte aber auch gezeigt werden, dass sie direkt die Aktivierung, Migration und Modulation von Zellen der adaptiven Immunität, wie T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen beeinflussen können. Mastzellen sind somit in der Lage adaptive Immunantworten zu induzieren und zu modulieren.

Starke Stimuli scheinen mastzellspezifische Effekte jedoch umgehen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation von bereits in vitro antigenbeladenen und aktivierten Dendritischen Zellen zu einer mastzellunabhängigen Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung führen. Die Ergebnisse stärken auch die Beobachtungen von Lambrecht et al, dass allergenbeladene Dendritische Zellen wichtig für die Ausbildung eines astmaähnlichen Krankheitsbildes sind [115]. Die intranasale Applikation von in vitro generierten und antigenbeladenen Dendritischen Zellen führte nach inhalativer Provokation sowohl in Wildtyp- als auch mastzelldefizienten Tieren zu einer Eosinophilie und erhöhter Anzahl an T-Zellen in der BAL, zu einem

inflammatorischen Influx in den peribronchialen und perivaskulären Raum des Lungengewebes und zu einer verstärkten Mukusproduktion von Becherzellen. Die Ergebnisse unterstreichen die wichtige Funktion der Dendritischen Zelle, zeigen aber auch das bereits voll aktivierte Dendritische Zellen mastzellunabhängig eine Entzündung der Atemwege induzieren können.

Diese Beobachtung konnte von Heib et al bestätigt werden, in ihrem die bereits beschriebenen Modell der mastzellabhängigen Langerhanszellmigration und Induktion adaptiver CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antworten konnten mastzellspezifische Effekte maskiert werden, wenn zur Sensibilisierung in vitro generierte und antigenbeladene Dendritische Zellen in die Haut appliziert wurden [72].

Die Wahl des richtigen Protokolls, welches zur Sensibilisierung und Provokation verwendet wird, ist somit ein essentieller Punkt um mastzellspezifische Effekte darstellen zu können.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Mastzelle und mastzellproduziertes TNF bei der Entstehung einer allergischen Atemwegsentzündung beteiligt sind. Mastzellen scheinen hierbei für die effektive Präsentation von Antigen durch Dendritische Zellen in den Lymphknoten wichtig zu sein. Da diese Beobachtungen in murinen Modellen gemacht wurden, ist es wichtig die gewonnen Erkenntnisse auf das humane System zu übertragen. Die bereits beschriebenen Studien konnten zeigen, dass der Mastzelle eine wichtige Funktion in der Pathogenese von humanem Asthma bronchiale zugesprochen wird. Im Vergleich zwischen murinen und humanen Mastzellen lassen sich viele Übereinstimmungen jedoch auch einige Unterschiede finden. Humane Mastzellen stammen ebenso wie murine von myeloiden Vorläuferzellen ab. Sie differenzieren unter dem Einfluss von SCF und IL-4, im Gegensatz zu der Maus jedoch unabhängig von IL-3 in den Zielgeweben aus [160;161]. Wie murine Mastzellen können auch humane über die Kreuzvernetzung von IgE, aber auch über mikrobielle Bestandteile aktiviert werden. Dabei können sie bereits präsynthetisierte Mediatoren freisetzen, aber auch Botenstoffe de novo synthetisieren. In ihrer Zusammensetzung an Mediatoren unterscheiden sich humane Mastzellen je nach Gewebe. Im Gegensatz zur Maus sind in humanen Mastzellen zwar mehrere Tryptasetypen bekannt, jedoch nur einen Chymasetyp [162]. Wie für die Maus konnte auch für humane Mastzellen gezeigt werden, dass sie die Sofort- und Spätreaktion einer allergischen Entzündung beeinflussen können. Humane Mastzellen können die Migration und Aktivierung von

Eosinophilen durch IL-5 abhängige Mechanismen und die Migration von Neutrophilen mittels TNF und IL-8 induzieren [163;164]. Im Gegensatz zur murinen haben humane Mastzelle geringere Mengen an präsynthetisiertem TNF in den Granula gespeichert [164], können dieses jedoch ebenso innerhalb von Minuten freisetzen und somit die Induktion und Modulation von adaptiven Immunantworten beeinflussen. In vitro Studien bestätigten, dass auch humane Mastzellen anhand ihrer Mediatoren Zellen des Immunsystems beeinflussen können. So konnte gezeigt werden, dass mastzellproduziertes IL-13 den Isotypenwechsel von B-Zellen Richtung IgE induzieren kann. T-Zellfunktionen können durch Prostaglandin D<sub>2</sub> reguliert werden, welches hauptsächlich von Mastzellen freigesetzt wird [163;165]. Für diesen Lipidmediator konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es eine chemoatktische Wirkung auf Th<sub>2</sub>-Zellen, Basophile und Eosinophile hat [166;167]. Die beschriebenen Daten verdeutlichen, dass viele Beobachtungen, die im murinen System gemacht wurden auch auf die humane Situation übertragbar sind. Das humane System ist aus ethischen und funktionellen Gründen nur begrenzt für die Untersuchung von komplexen Abläufen die zur Entstehung einer allergischen Atemwegserkrankung führen einsetzbar. Daher ist es wichtig Tiermodelle zu entwickeln, die es ermöglichen einen genauen Einblick in Mechanismen und funktionelle Abläufe zu gewinnen. Das murine System, mit seinen vielen unterschiedlichen Mausstämmen und der großen Bandbreite an etablierten Methoden zur Analyse immunologischer Prozesse bietet daher ein gutes Werkzeug, die Wirkung einzelner Mediatoren und Zelltypen bei der Entstehung von Asthma zu untersuchen. Da es große Unterschiede zwischen dem humanen und murinen Immunsystem gibt und in murinen Modellen zwar viele, jedoch nicht alle klinischen Syndrome eines humanen Asthmas nachzubilden sind, ist es wichtig die gewonnenen Hypothesen auf das humane System zu transferieren. Nur so ist es möglich neue therapeutische Ansätze zu entwickeln und auf ihre klinische Wirksamkeit hin zu überprüfen.

### 5. Zusammenfassung

Innerhalb des letzten Jahrzehnts hat es sich gezeigt, dass die Mastzelle neben ihrer klassischen Funktion als Effektorzelle der IgE vermittelten Typ I Allergie und Wirtsabwehr gegenüber Helminthen über ein weitaus größeres Wirkspektrum verfügt. So konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität besitzt, aber auch für die Induktion und Modulation adaptiver Immunantworten wichtig ist. Anhand des großen Repertoires an Mediatoren die über IgE abhängige aber auch unabhängige Mechanismen freigesetzt werden kann die Mastzelle pro- und antiinflammatorisch auf das Immunsystem einwirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Mastzelle und mastzellproduzierter Mediatoren bei der Entstehung einer allergischen Erkrankung der Atemwege untersucht. Unter Verwendung der beiden mastzelldefizienten Mausstämme C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W<sup>v</sup>W<sup>v</sup></sup> konnte demonstriert werden, dass Mastzellen für die Entstehung asthmatischer Symptome notwendig sind. Nach Sensibilisierung und Provokation mit dem Modellantigen Ovalbumin, zeigte es sich, dass in diesem akutem Asthmodell nur Wildtyp-Tiere eine erhöhte Atemwegsreaktivität, eine Eosinophilie der BAL, einen inflammatorischen Influx in den perivaskulären und peribronchialen Lungenraum und eine Becherzellmetaplasie entwickelten. Die wichtige Rolle der Mastzelle in diesem System wurde durch Rekonstitution mastzelldefizienter Tiere mit aus dem Knochenmark von Wildtyp Tieren generierten Mastzellen bestätigt. Mastzelldefiziente Tiere entwickelten nach Rekonstitution und Sensibilisierung und Provokation ein asthmaähnliches Krankheitsbild, dass mit Wildtyp Tieren vergleichbar war. Durch die Rekonstitution der mastzelldefizienten Tiere mit Mastzellen die von TNF<sup>-/-</sup> Tieren stammten konnte demonstriert werden, dass mastzellproduziertes TNF eine wichtige Funktion als Botenstoff in dem hier verwendeten akuten Asthmodell hat. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und mastzelldefizienten Tieren die mit Wildtyp-Mastzellen rekonstituiert wurden, konnte in den mastzelllosen Tieren, die mit TNF<sup>-/-</sup> Mastzelle rekonstituiert wurden nur eine abgeschwächte allergische Entzündung der Atemwege induziert werden. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass Mastzellen und mastzellproduziertes TNF eine wichtige Funktion bei der Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung haben.

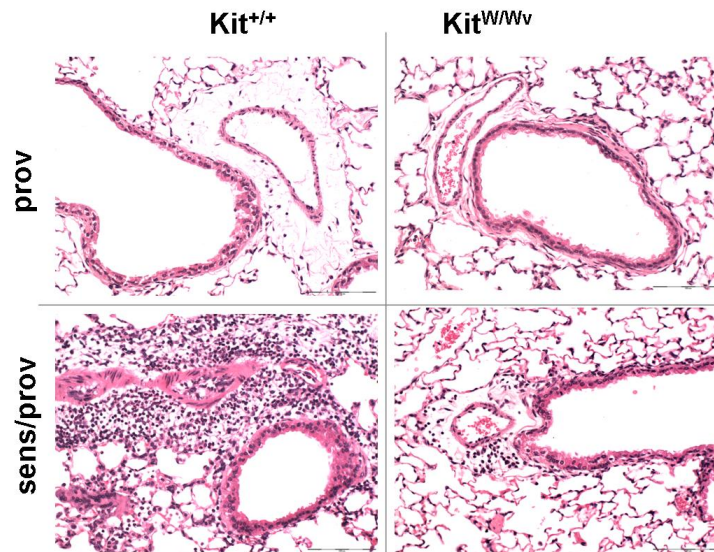


Um zu klären welche Prozesse durch Mastzellen beeinflusst werden, die zu diesen Unterschieden in der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort führen, wurde die Migration von antigenbeladenen Dendritischen Zellen aus der Lunge in die drainierenden Lymphknoten untersucht. 24 Stunden nach intra nasaler Applikation von fluoreszenzmarkierten OVA konnten sowohl in sensibilisierten Wildtyp Tieren als auch in mastzelldefizienten Tieren die mit WT-Mastzellen rekonstituiert wurden eine im Vergleich zu sensibilisierten mastzelldefizienten oder nur provozierten Tieren erhöhte Anzahl an antigentragenden Dendritischen Zellen festgestellt werden. Die Daten lassen darauf schließen, dass Mastzellen eine wichtige Funktion bei der Modulation der Migration Dendritischer Zellen haben, die für die Ausbildung adaptiver Immunantworten essentiell ist.

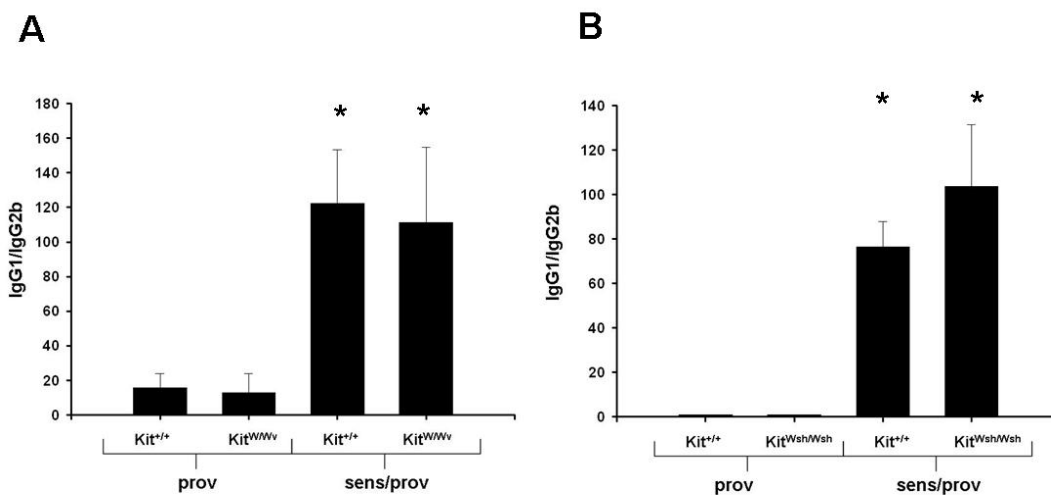
Nach intra nasaler Applikation von invitro generierten und antigenbeladenen Dendritischen Zellen konnten jedoch keine Unterschiede zwischen mastzelldefizienten und Wildtyp-Tieren detektiert werden. Die Sensibilisierung mit bereits in vitro antigenbeladenen und aktivierten DC und die anschließende Provokation mit Antigen führt sowohl in mastzelldefizienten als auch Wildtyp-Tieren zu einer Eosinophilie, einer entzündlichen Infiltrat im Lungengewebe und einer Becherzellmetaplasie. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die richtige Wahl des Sensibilisierungs und Provokationsmodells wichtig ist um mastzellspezifische Effekte bei der Entstehung von Immunantworten aufzeigen zu können. Zu potente können Effekte körpereigener Aktivierungswege umgehen und somit maskieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt die wichtige Rolle der Mastzelle und von mastzellproduziertem TNF bei der Ausbildung einer allergischen Entzündung der Atemwege. Die Mastzelle und deren Mediatoren stellen somit mögliche Angriffsziele für die therapeutische Behandlung der chronischen Entzündung der Atemwege dar.

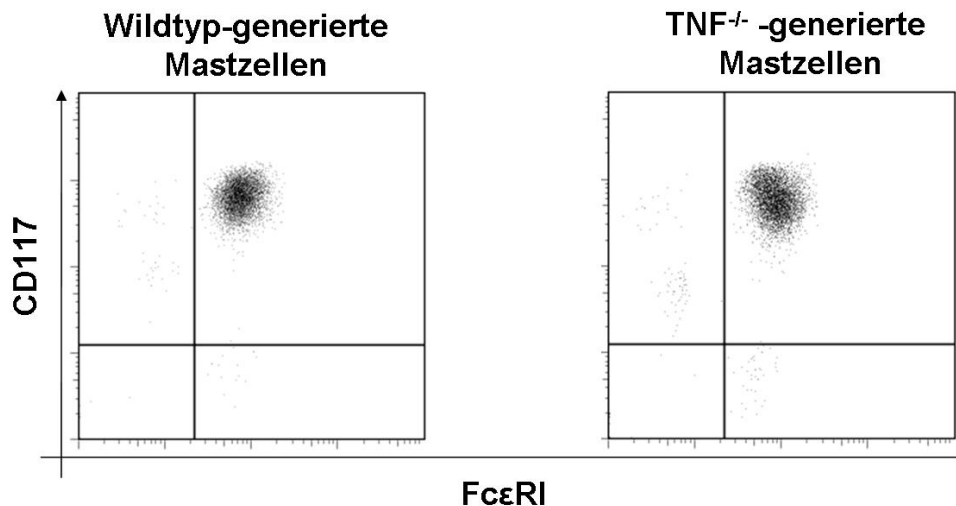
## 6. Anhang



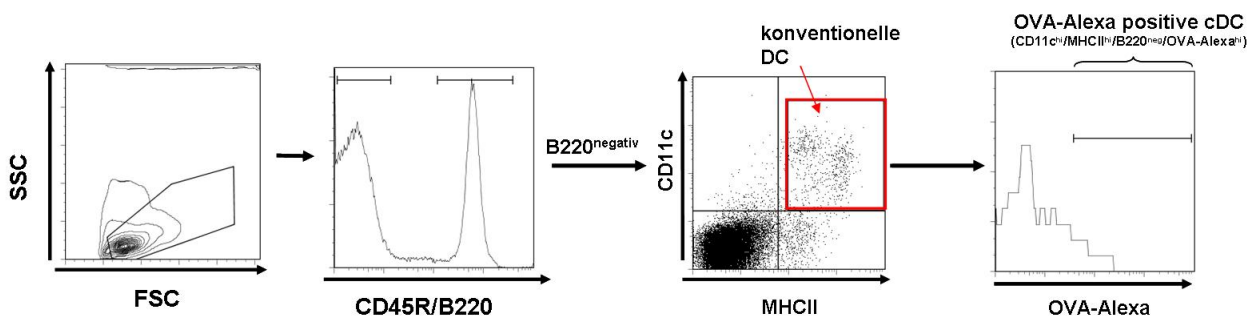
**Anhang 6.1: Analyse der Inflammation des Lungengewebes.** Die Entzündung des Lungengewebes wurde 48 Stunden nach der letzten Provokation untersucht. Mittels Hämatoxylin und Eosinfärbung (HE) konnten einzelne Lungenbereiche verdeutlicht und Zellinfiltrate hervorgehoben werden. Die abgebildeten Bilder geben exemplarisch die Situation in Wildtyp-Tieren und mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung und Provokation, sowie den nur provozierten Tieren wieder. 100 fache Vergrößerung.



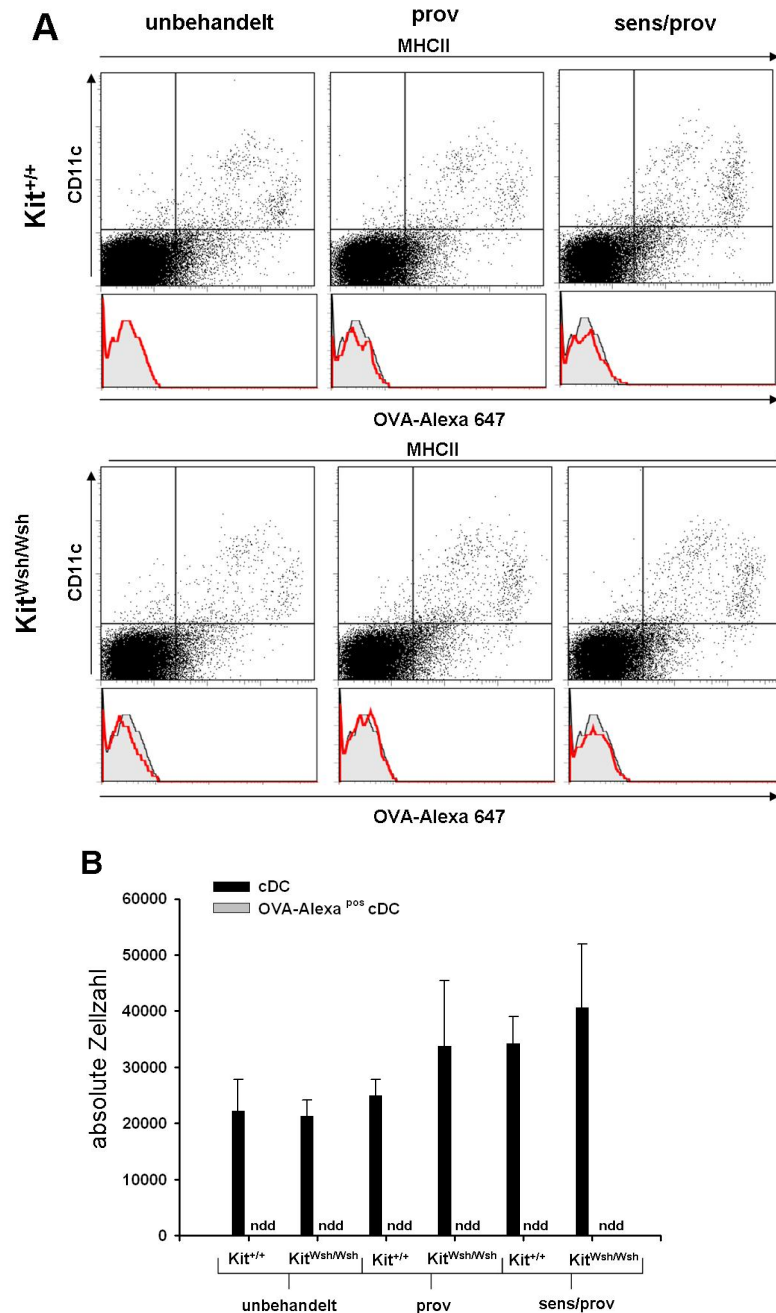
**Anhang 6.2: Verhältnis der IgG1 Titer zu den IgG2b Titern.** Die dargestellten Graphen geben das Verhältnis der IgG1 zu den IgG2b Titern wider. **Graph A** zeigt das Verhältnis der Antikörper in WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup>. \*  $p < 0,05$  im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> sens/prov mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nur prov. **Graph B** in C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> Mäusen und entsprechenden Wildtypen. Es sind provozierte (sens) und sensibilisierte und provozierte (sens/prov) Gruppen dargestellt verdeutlicht und Zellinfiltrate hervorgehoben werden.  $n=8-12$  Tiere, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*  $p < 0,05$  im Vergleich von C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> sens/prov mit C57BL/6-Kit<sup>+/+</sup> und C57BL/6-Kit<sup>Wsh/Wsh</sup> nur prov.



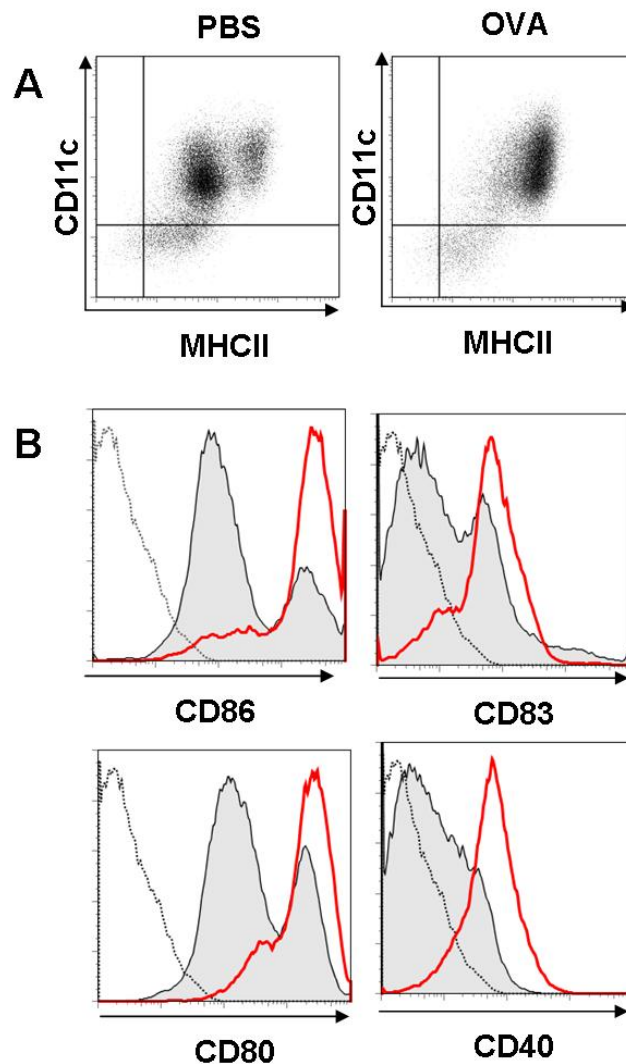
**Anhang 6.3.: FACS-Analyse der invitro aus Knochenmarkzellen von Wildtyp bzw. TNF<sup>-/-</sup> generierten Mastzellen.** Invitro generierte Mastzellen wurden nach 3 bis 4 Wochen Kultur auf die Expression des Kit-Rezeptors und des FcεRI-Rezeptors hin mittels FACS-Untersucht. Doppelpositive Zellen wurden als Mastzellen charakterisiert. Mastzellen die aus dem Knochenmark von Wildtypen und TNF<sup>-/-</sup>-Mäusen generiert wurden hatten nach 4 Wochen eine vergleichbare Expression der beiden Rezeptoren.



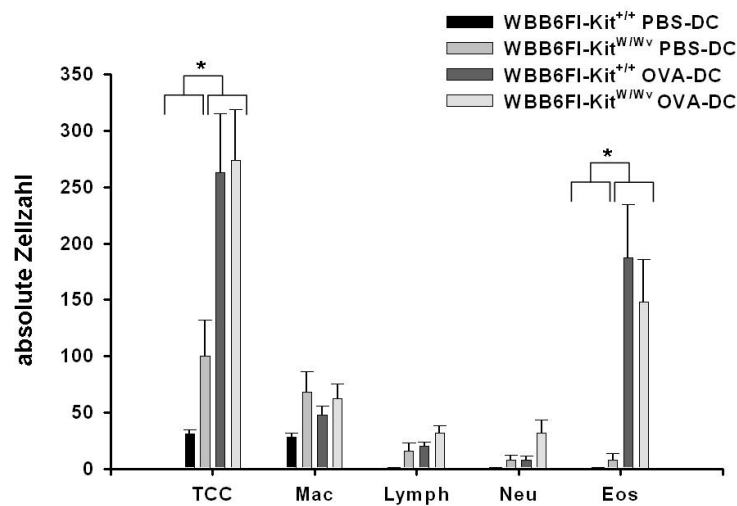
**Anhang 6.4: FACS-Gating Strategie zur Analyse von OVA-positiven konventionellen DC.** In der Ansicht Forward- gegen Sidescatter wurde als erstes ein grobes Gate um die Lymphozytenpopulation, die als kleine ungranuläre Zellen gut zu definieren sind gesetzt. Innerhalb dieses Gates wurde sich per Histogramm die B220 exprimierenden Zellen angeschaut. Die B220 negativen Zellen wurden in einem neuen Gate zusammengefasst. Innerhalb dieser Population wurde sich anschließend die Expression von CD11c und MHCII anzeigen lassen. Zellen die Doppelpositiv für beide Marker waren wurden als konventionelle dendritische Zellen charakterisiert und in einem neuen Gate betrachtet. Im Histogramm wurde innerhalb dieser Population die Expression von dem fluoreszierenden OVA analysiert. Mit Hilfe einer Negativkontrolle konnte ein neues Gate gesetzt werden, welches alle OVA positiven DC zusammenfasst.



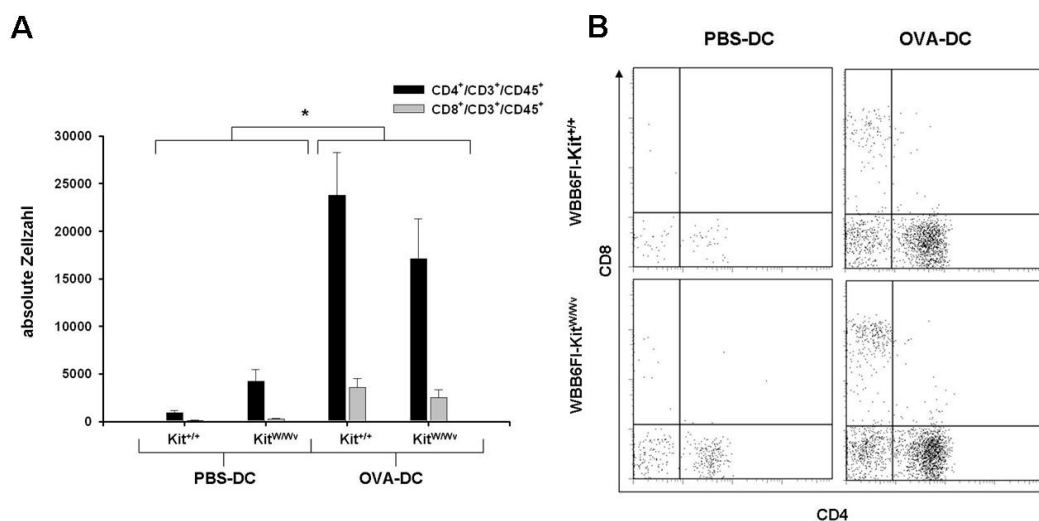
**Anhang 6.5: Untersuchung der inguinalen Lymphknoten auf OVA-Alexa positive cDC mittels FACS.** Zu jedem Zeitpunkt wurden die inguinalen Lymphknoten der untersuchten Mäuse präpariert und auf OVA-positive konventionelle Dendritische Zellen hin untersucht. **Abbildung A** zeigt exemplarisch Dotplots und Histogramme von unbehandelten, nur mit OVA-Alexa provozierten (prov) und sensibilisierten und provozierten (sens/prov) mastzelldefizienten und entsprechenden Wildtyp-Tieren. In **Abbildung B** ist die absolute Anzahl der cDC und der OVA-Alexa positiven cDC in den inguinalen Lymphknoten dargestellt. n=4-8 Tiere.



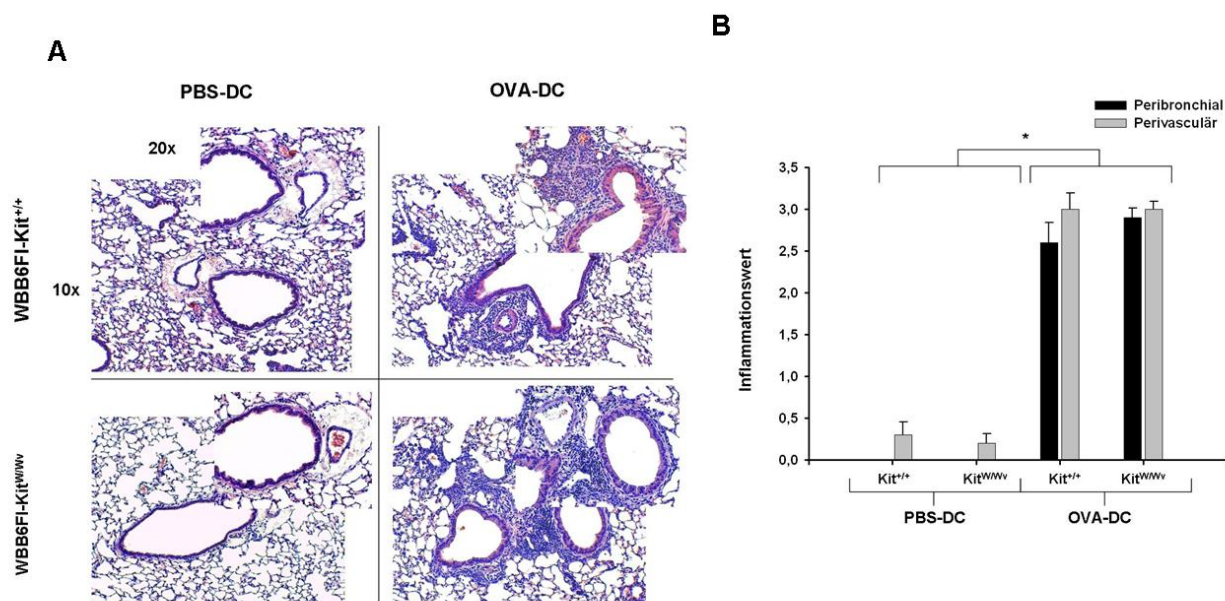
**Anhang 6.6.: FACS-Analyse der in vitro aus Knochenmarkzellen von Wildtyp generierten Dendritischen Zellen.** In vitro generierte Dendritische Zellen wurden nach 8 Tagen mit OVA bzw. PBS über Nacht inkubiert. Abbildung A: Anschließend wurden die Zellen auf die Expression von CD11c und MHCII hin mittels FACS-Untersucht. Doppelpositive Zellen wurden als Dendritische Zellen charakterisiert. Abbildung B: Auf den doppelpositiven Zellen wurde die Expression der Kostimulatorischen Moleküle CD86, 83, 80 und 40 analysiert. Bei der gestrichelten Linie handelt es sich um eine Isotypkontrolle, grau unterlegt sind PBS behandelte, rote Linie OVA behandelte DC (Exemplarische Darstellung).



**Anh. 6.7: Analyse der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveolaren Lavage.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurde eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Die Zellen der Lavage wurden fixiert, eine Differentialfärbung durchgeführt und mittels Lichtmikroskop die zelluläre Zusammensetzung bestimmt. Auf dem Bild ist die absolute Zellzahl (TCC) sowie die absolute Anzahl der in der BAL differenzierten Zellpopulationen dargestellt. Die Zelldifferenzierung wurde für mastzelldefiziente WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> die mit OVA-DC oder mit PBS-DC intranasal sensibilisiert wurden, bzw. für entsprechend behandelte Wildtyp Tiere durchgeführt. Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte, die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder. n= 12-15. Die absolute Zellzahl ist als Tausendstel angegeben. \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> OVA-DC mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/W<sup>v</sup></sup> PBS-DC.



**Anh. 6.8: Analyse der T-Zellpopulationen in der bronchoalveolaren Lavage mittels FACS.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere wurden die T-Zellpopulationen der bronchoalveolaren Lavage mittels FACS bestimmt. Lymphozyten wurden als CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen charakterisiert, T-Helfer Zellen wurden durch die zusätzliche Expression von CD4, T-Effektorzellen durch die Expression von CD8 bestimmt (**Bild B**). Anhand der FACS-Daten wurde die absolute Anzahl von T-Helfer und T-Effektorzellen in der Lavage von Wildtypen und mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA bestimmt (**Bild A**). n= 8-10. \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> OVA-DC mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> PBS-DC.

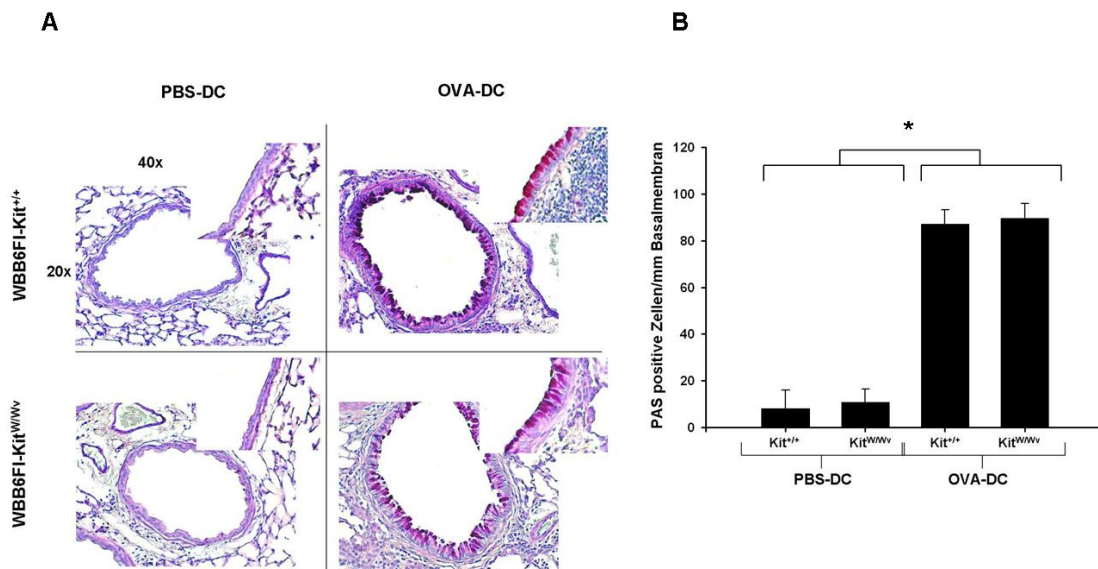


**Anh. 6.9: Histologische Analyse von Lungenquerschnitten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere mit OVA wurden die Lungen der Tiere in Parafin fixiert und Gewebsschnitte angefertigt.

**Bild A** zeigt exemplarisch HE-gefärbte Lungenschnitte von Wildtypen und mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. Von jeder Gruppe sind zwei unterschiedliche Vergrößerungen (gesamt 100\*/200\*) dargestellt. Zellinfiltrate sind auf Lungenschnitten von OVA-DC behandelten Tieren peribronchial und perivaskulär als dunkle Zellansammlungen detektierbar.

**Bild B** zeigt den Inflammationswert von allen analysierten Lungengeweben. Der Inflammationswert stellt eine objektivierbare Größe für das Ausmaß der Inflammation dar und nimmt Werte zwischen null und vier an. Dabei steht null für keine nachweisbaren inflammatorischen Zellinfiltrate und vier für die Infiltration aller auf dem Lungenschnitt vorhandenen Atemwege und Gefäße. Der Inflammationswert wurde für Wildtypen und mastzelldefiziente WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA analysiert und daraus. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. n=12-15 \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> OVA-DC mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> PBS-DC.

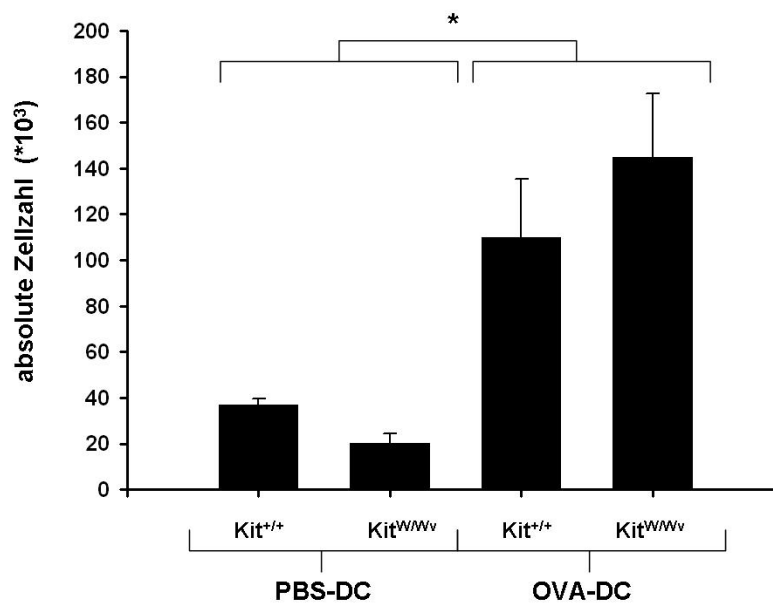




**Anh. 6.10: Histologische Analyse von Lungenquerschnitten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation der Tiere mit OVA wurden die Lungen der Tiere in Parafin fixiert und Gewebsschnitte angefertigt.

**Bild A** zeigt exemplarisch PAS gefärbte Lungenschnitte von Wildtyp und mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. Von jeder Gruppe sind zwei unterschiedliche Vergrößerungen (gesamt 200\*/400\*) dargestellt. PAS positive Zellen sind auf dem Atemwegsepithel als lila gefärbte Zellen dargestellt.

**Bild B** zeigt die Anzahl an PAS-positiven Zellen/mm Basalmembran von allen analysierten Lungengewebe. Die Anzahl der Mukus-produzierenden Zellen wurde mit Hilfe einer speziellen Software auf die Länge der Basalmembran bezogen. Die Anzahl an PAS positiven Zellen/mm Basalmembran wurde für Wildtypen und mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA analysiert und Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder. n=8-10. \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> OVA-DC mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> PBS-DC.



**Anh. 6.11.: FACS Analyse der trachealen Lymphknoten.** 24 Stunden nach der letzten Provokation mit OVA wurden die drainierenden Lymphknoten präpariert und mittels FACS die Anzahl an konventionellen DC untersucht. Dargestellt ist die absolute Anzahl von CD11c<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup> konventionellen Dendritischen Zellen in den drainierenden Lymphknoten von mastzelldefizienten WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> und Wildtyp-Tieren, nach Sensibilisierung mit OVA- bzw. PBS-DC und anschließender Provokation mit OVA. n=7-8 \* p < 0,05 im Vergleich von WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> OVA-DC mit WBB6FI-Kit<sup>+/+</sup> und WBB6FI-Kit<sup>W/Wv</sup> PBS-DC.

### 7. Literaturverzeichnis

1. Kitamura Y, Shimada M, Hatanaka K, Miyano Y. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature* 1977 August 4;268(5619):442-3.
2. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2002 October;2(10):773-86.
3. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997 October;77(4):1033-79.
4. Galli SJ, Tsai M, Wershil BK. The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol* 1993 April;142(4):965-74.
5. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989;7:59-76.:59-76.
6. Galli SJ, Hammel I. Mast cell and basophil development. *Curr Opin Hematol* 1994 January;1(1):33-9.
7. Serafin WE, Dayton ET, Gravallesse PM, Austen KF, Stevens RL. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as a differentiation marker. *J Immunol* 1987 December 1;139(11):3771-6.
8. Serafin WE, Reynolds DS, Rogelj S, Lane WS, Conder GA, Johnson SS, Austen KF, Stevens RL. Identification and molecular cloning of a novel mouse mucosal mast cell serine protease. *J Biol Chem* 1990 January 5;265(1):423-9.
9. Heavey DJ, Ernst PB, Stevens RL, Befus AD, Bienenstock J, Austen KF. Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. *J Immunol* 1988 March 15;140(6):1953-7.
10. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 June;83(12):4464-8.
11. Tsai M, Tam SY, Wedemeyer J, Galli SJ. Mast cells derived from embryonic stem cells: a model system for studying the effects of genetic manipulations on mast cell development, phenotype, and function in vitro and in vivo. *Int J Hematol* 2002 May;75(4):345-9.
12. Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994;55:1-96.:1-96.
13. Huang C, Sali A, Stevens RL. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation. *J Clin Immunol* 1998 May;18(3):169-83.

14. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998 August 15;161(4):1939-46.
15. Boyce JA. Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol* 2003 January;111(1):24-32.
16. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005 February;6(2):135-42.
17. Gurish MF, Austen KF. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 2001 July 2;194(1):F1-F5.
18. Marone G, Triggiani M, Genovese A, Paulis AD. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* 2005;88:97-160.:97-160.
19. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 1990 July;%19;346(6281):274-6.
20. Young JD, Liu CC, Butler G, Cohn ZA, Galli SJ. Identification, purification, and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 December;84(24):9175-9.
21. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006 June;117(6):1214-25.
22. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2004 October;4(10):787-99.
23. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005;23:749-86.:749-86.
24. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999;17:931-72.:931-72.
25. Kraft S, Kinet JP. New developments in Fc epsilon RI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 2007 May;7(5):365-78.
26. Metzger H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev* 1992 February;125:37-48.:37-48.
27. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* 1999 November 25;402(6760 Suppl):B24-B30.
28. Mayr SI, Zuberi RI, Liu FT. Role of immunoglobulin E and mast cells in murine models of asthma. *Braz J Med Biol Res* 2003 July;36(7):821-7.

29. Lantz CS, Huff TF. Murine KIT+ lineage- bone marrow progenitors express Fc gamma-RII but do not express Fc epsilon-RI until mast cell granule formation. *J Immunol* 1995 January 1;154(1):355-62.
30. Sterk AR, Ishizaka T. Binding properties of IgE receptors on normal mouse mast cells. *J Immunol* 1982 February;128(2):838-43.
31. Yamaguchi M, Sayama K, Yano K, Lantz CS, Noben-Trauth N, Ra C, Costa JJ, Galli SJ. IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 1999 May 1;162(9):5455-65.
32. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, Kinet JP, Galli SJ. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 1997 February 17;185(4):663-72.
33. Yano K, Yamaguchi M, de MF, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ. Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Lab Invest* 1997 August;77(2):185-93.
34. Stassen M, Hultner L, Schmitt E. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev Immunol* 2002;22(2):115-40.
35. Kitamura Y, Go S, Hatanaka K. Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 1978 August;52(2):447-52.
36. Kitamura Y, Go S. Decreased production of mast cells in S1/S1d anemic mice. *Blood* 1979 March;53(3):492-7.
37. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988 October 7;55(1):185-92.
38. Nocka K, Tan JC, Chiu E, Chu TY, Ray P, Traktman P, Besmer P. Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *EMBO J* 1990 June;9(6):1805-13.
39. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1997 August 15;90(4):1345-64.
40. Duttlinger R, Manova K, Chu TY, Gyssler C, Zelenetz AD, Bachvarova RF, Besmer P. W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development* 1993 July;118(3):705-17.
41. Lyon MF, Glenister PH. A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet Res* 1982 June;39(3):315-22.

42. Tono T, Tsujimura T, Koshimizu U, Kasugai T, Adachi S, Isozaki K, Nishikawa S, Morimoto M, Nishimune Y, Nomura S, . c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient *Wsh/Wsh* mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood* 1992 September 15;80(6):1448-53.
43. Grimaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *Kit W-sh/W-sh* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 2005 September;167(3):835-48.
44. Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa T, Kitamura Y, Galli SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient *W/W<sup>v</sup>* mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 1985 September 1;162(3):1025-43.
45. Wolters PJ, Mallen-St CJ, Lewis CC, Villalta SA, Baluk P, Erle DJ, Caughey GH. Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient *Kit(W-sh)/Kit(W-sh)* *sash* mice. *Clin Exp Allergy* 2005 January;35(1):82-8.
46. Grimaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ. Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *Kit W-sh/W-sh* mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 2005 September;167(3):835-48.
47. Alizadeh H, Murrell KD. The intestinal mast cell response to *Trichinella spiralis* infection in mast cell-deficient *w/w<sup>v</sup>* mice. *J Parasitol* 1984 October;70(5):767-73.
48. Galli SJ, Arizono N, Murakami T, Dvorak AM, Fox JG. Development of large numbers of mast cells at sites of idiopathic chronic dermatitis in genetically mast cell-deficient *WBB6F1-W/W<sup>v</sup>* mice. *Blood* 1987 June;69(6):1661-6.
49. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997 October 31;91(3):295-8.
50. Beutler B. The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* 2005 July;57(6):385-92.
51. Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2004 July;114(1):21-7.
52. Leal-Berumen I, Conlon P, Marshall JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994 June 1;152(11):5468-76.
53. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 2002 May;109(10):1351-9.

54. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 1994 February 15;152(4):1907-14.
55. Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 July 6;96(14):8110-5.
56. Genovese A, Bouvet JP, Florio G, Lamparter-Schummert B, Bjorck L, Marone G. Bacterial immunoglobulin superantigen proteins A and L activate human heart mast cells by interacting with immunoglobulin E. *Infect Immun* 2000 October;68(10):5517-24.
57. Patella V, Florio G, Petraroli A, Marone G. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human Fc epsilon RI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J Immunol* 2000 January 15;164(2):589-95.
58. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996 May 2;381(6577):75-7.
59. Echtenacher B, Weigl K, Lehn N, Mannel DN. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect Immun* 2001 June;69(6):3550-5.
60. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996 May 2;381(6577):77-80.
61. Stassen M, Hultner L, Muller C, Schmitt E. Mast cells and inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2002;50(3):179-85.
62. Malaviya R, Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 2000 June;67(6):841-6.
63. Huang C, Friend DS, Qiu WT, Wong GW, Morales G, Hunt J, Stevens RL. Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6. *J Immunol* 1998 February 15;160(4):1910-9.
64. Rajakulasingam K, Hamid Q, O'Brien F, Shotman E, Jose PJ, Williams TJ, Jacobson M, Barkans J, Durham SR. RANTES in human allergen-induced rhinitis: cellular source and relation to tissue eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 February;155(2):696-703.
65. Hogaboam C, Kunkel SL, Strieter RM, Taub DD, Lincoln P, Standiford TJ, Lukacs NW. Novel role of transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. *J Immunol* 1998 June 15;160(12):6166-71.

66. Orinska Z, Bulanova E, Budagian V, Metz M, Maurer M, Bulfone-Paus S. TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment. *Blood* 2005 August 1;106(3):978-87.
67. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999 August;66(2):205-8.
68. Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* 2007;39(6):440-56.
69. Bryce PJ, Miller ML, Miyajima I, Tsai M, Galli SJ, Oettgen HC. Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity* 2004 April;20(4):381-92.
70. Jawdat DM, Albert EJ, Rowden G, Haidl ID, Marshall JS. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J Immunol* 2004 October 15;173(8):5275-82.
71. Suto H, Nakae S, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J Immunol* 2006 April 1;176(7):4102-12.
72. Heib V, Becker M, Warger T, Rechtsteiner G, Tertilt C, Klein M, Bopp T, Taube C, Schild H, Schmitt E, Stassen M. Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* 2007 August 1;110(3):946-53.
73. Skokos D, Botros HG, Demeure C, Morin J, Peronet R, Birkenmeier G, Boudaly S, Mecheri S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J Immunol* 2003 March 15;170(6):3037-45.
74. Ioffreda MD, Whitaker D, Murphy GF. Mast cell degranulation upregulates alpha 6 integrins on epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1993 August;101(2):150-4.
75. Gosset P, Pichavant M, Faveeuw C, Bureau F, Tonnel AB, Trottein F. Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur J Immunol* 2005 May;35(5):1491-500.
76. Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A, Segal DM. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 2001 December;108(12):1865-73.
77. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, Ito T, Wang YH, Malefyt RW, Omori M, Zhou B, Ziegler SF. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:193-219.
78. Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003 May 1;101(9):3594-6.



79. Tedla N, Wang HW, McNeil HP, Di GN, Hampartzoumian T, Wakefield D, Lloyd A. Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha and MIP-1 beta. *J Immunol* 1998 November 15;161(10):5663-72.
80. Wang HW, Tedla N, Lloyd AR, Wakefield D, McNeil PH. Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest* 1998 October 15;102(8):1617-26.
81. McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, Shelburne CP, Staats HF, Gunn MD, Abraham SN. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol* 2003 December;4(12):1199-205.
82. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001 September 27;413(6854):420-5.
83. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol* 1999 September;104(3 Pt 1):517-23.
84. Maurer M, Lopez KS, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, von SE. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J* 2006 December;20(14):2460-7.
85. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001 February 1;344(5):350-62.
86. Cain H. Bronchoprovocation testing. *Clin Chest Med* 2001 December;22(4):651-9.
87. Medoff BD, Thomas SY, Luster AD. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annu Rev Immunol* 2008;26:205-32.:205-32.
88. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989 February 2;320(5):271-7.
89. Boyce JA. The role of mast cells in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003 August;69(2-3):195-205.
90. Cieslewicz G, Tomkinson A, Adler A, Duez C, Schwarze J, Takeda K, Larson KA, Lee JJ, Irvin CG, Gelfand EW. The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration. *J Clin Invest* 1999 August;104(3):301-8.
91. Crosby JR, Cieslewicz G, Borchers M, Hines E, Carrigan P, Lee JJ, Lee NA. Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG. *J Immunol* 2002 April 15;168(8):4050-4.
92. Taube C, Dakhama A, Gelfand EW. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 2004 October;135(2):173-86.

93. Finotto S, De Sanctis GT, Lehr HA, Herz U, Buerke M, Schipp M, Bartsch B, Atreya R, Schmitt E, Galle PR, Renz H, Neurath MF. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* 2001 June 4;193(11):1247-60.
94. Gonzalo JA, Lloyd CM, Kremer L, Finger E, Martinez A, Siegelman MH, Cybulsky M, Gutierrez-Ramos JC. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *J Clin Invest* 1996 November 15;98(10):2332-45.
95. Gavett SH, Chen X, Finkelman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 June;10(6):587-93.
96. Holt PG, Strickland DH, Wikstrom ME, Jahnsen FL. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol* 2008 February;8(2):142-52.
97. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008 March;8(3):193-204.
98. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002 December 16;196(12):1645-51.
99. Eisenbarth SC, Zhadkevich A, Ranney P, Herrick CA, Bottomly K. IL-4-dependent Th2 collateral priming to inhaled antigens independent of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 2004 April 1;172(7):4527-34.
100. Kiss A, Montes M, Susarla S, Jaensson EA, Drouin SM, Wetsel RA, Yao Z, Martin R, Hamzeh N, Adelagun R, Amar S, Kheradmand F, Corry DB. A new mechanism regulating the initiation of allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007 August;120(2):334-42.
101. Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994 January;24(1):73-80.
102. Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, Shultz LD, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med* 1997 August 4;186(3):449-54.
103. Nogami M, Suko M, Okudaira H, Miyamoto T, Shiga J, Ito M, Kasuya S. Experimental pulmonary eosinophilia in mice by *Ascaris suum* extract. *Am Rev Respir Dis* 1990 May;141(5 Pt 1):1289-95.
104. Williams CM, Galli SJ. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* 2000 August 7;192(3):455-62.

105. Mayr SI, Zuberi RI, Zhang M, de Sousa-Hitzler J, Ngo K, Kuwabara Y, Yu L, Fung-Leung WP, Liu FT. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* 2002 August 15;169(4):2061-8.
106. Taube C, Wei X, Swasey CH, Joetham A, Zarini S, Lively T, Takeda K, Loader J, Miyahara N, Kodama T, Shultz LD, Donaldson DD, Hamelmann EH, Dakhama A, Gelfand EW. Mast cells, Fc epsilon RI, and IL-13 are required for development of airway hyperresponsiveness after aerosolized allergen exposure in the absence of adjuvant. *J Immunol* 2004 May 15;172(10):6398-406.
107. Yu M, Tsai M, Tam SY, Jones C, Zehnder J, Galli SJ. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 2006 June;116(6):1633-41.
108. Bryce PJ, Mathias CB, Harrison KL, Watanabe T, Geha RS, Oettgen HC. The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses. *J Clin Invest* 2006 June;116(6):1624-32.
109. Kim YS, Ko HM, Kang NI, Song CH, Zhang X, Chung WC, Kim JH, Choi IH, Park YM, Kim GY, Im SY, Lee HK. Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* 2007 April;37(4):1107-15.
110. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 July;152(1):76-80.
111. Halasz A, Cserhati E, Magyar R, Kovacs M, Cseh K. Role of TNF-alpha and its 55 and 75 kDa receptors in bronchial hyperreactivity. *Respir Med* 2002 April;96(4):262-7.
112. Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994 May;10(5):471-80.
113. Kitawaki T, Kadowaki N, Sugimoto N, Kambe N, Hori T, Miyachi Y, Nakahata T, Uchiyama T. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int Immunol* 2006 December;18(12):1789-99.
114. Nigo YI, Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Inami M, Kimura M, Hasegawa A, Kohno Y, Nakayama T. Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 February 14;103(7):2286-91.
115. Lambrecht BN, Peleman RA, Bullock GR, Pauwels RA. Sensitization to inhaled antigen by intratracheal instillation of dendritic cells. *Clin Exp Allergy* 2000 February;30(2):214-24.

116. Lambrecht BN, De VM, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 2000 August;106(4):551-9.
117. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 2004 May;59(5):469-78.
118. Chung KF, Godard P, Adelroth E, Ayres J, Barnes N, Barnes P, Bel E, Burney P, Chanaz P, Connett G, Corrigan C, de BJ, Fabbri L, Holgate ST, Ind P, Joos G, Kerstjens H, Leuenberger P, Lofdahl CG, McKenzie S, Magnussen H, Postma D, Saetta M, Salmeron S, Sterk P. Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. ERS Task Force on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1999 May;13(5):1198-208.
119. Kool M, Soullie T, van NM, Willart MA, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008 April 14;205(4):869-82.
120. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 1999 December 15;163(12):6448-54.
121. Kraneveld AD, van der Kleij HP, Kool M, van Houwelingen AH, Weitenberg AC, Redegeld FA, Nijkamp FP. Key role for mast cells in nonatopic asthma. *J Immunol* 2002 August 15;169(4):2044-53.
122. Ogawa K, Kaminuma O, Kikkawa H, Kameda R, Ikezawa K, Suko M, Okudaira H, Akiyama K, Mori A. Primary role of CD4+ T cells and supplemental role of mast cells in allergic pulmonary eosinophilia. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120 Suppl 1:15-8.:15-8.
123. Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, Kreutner W, Egan RW, Chapman RW. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 April;12(4):404-9.
124. Jutel M, Blaser K, Akdis CA. Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol* 2005 May;137(1):82-92.
125. Caron G, Delneste Y, Roelandts E, Duez C, Bonnefoy JY, Pestel J, Jeannin P. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol* 2001 October 1;167(7):3682-6.
126. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001 September 27;413(6854):420-5.

127. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 1996 May 2;381(6577):75-7.
128. Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 May 15;88(10):4220-4.
129. Benyon RC, Bissonnette EY, Befus AD. Tumor necrosis factor-alpha dependent cytotoxicity of human skin mast cells is enhanced by anti-IgE antibodies. *J Immunol* 1991 October 1;147(7):2253-8.
130. Ying S, Robinson DS, Varney V, Meng Q, Tsicopoulos A, Moqbel R, Durham SR, Kay AB, Hamid Q. TNF alpha mRNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1991 November;21(6):745-50.
131. Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax* 2002 September;57(9):774-8.
132. Casale TB, Costa JJ, Galli SJ. TNF alpha is important in human lung allergic reactions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 July;15(1):35-44.
133. Busse PJ, Zhang TF, Srivastava K, Lin BP, Schofield B, Sealson SC, Li XM. Chronic exposure to TNF-alpha increases airway mucus gene expression in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2005 December;116(6):1256-63.
134. Choi IW, Sun K, Kim YS, Ko HM, Im SY, Kim JH, You HJ, Lee YC, Lee JH, Park YM, Lee HK. TNF-alpha induces the late-phase airway hyperresponsiveness and airway inflammation through cytosolic phospholipase A(2) activation. *J Allergy Clin Immunol* 2005 September;116(3):537-43.
135. Nakae S, Ho LH, Yu M, Monteforte R, Iikura M, Suto H, Galli SJ. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2007 July;120(1):48-55.
136. Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1997 April;9(2):247-51.
137. Bigda J, Holtmann H. TNF receptors--how they function and interact. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 1997;45(4):263-70.
138. Gaede KI, Fitschen J, Ernst M, Martinet N, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Expression of tumour necrosis factor receptors (CD120a and CD120b) on bronchoalveolar cells. *Cytokine* 1999 August;11(8):611-6.
139. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 1986 September 15;137(6):1893-6.

140. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 December;82(24):8667-71.
141. Yamamoto H, Sedgwick JB, Busse WW. Differential regulation of eosinophil adhesion and transmigration by pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1998 July 15;161(2):971-7.
142. Lassalle P, Gosset P, Delneste Y, Tsiopoulos A, Capron A, Joseph M, Tonnel AB. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clin Exp Immunol* 1993 October;94(1):105-10.
143. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987 March 1;138(5):1469-74.
144. Adner M, Rose AC, Zhang Y, Sward K, Benson M, Uddman R, Shankley NP, Cardell LO. An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNFalpha up-regulates 5-HT(2A)-mediated contraction. *Br J Pharmacol* 2002 December;137(7):971-82.
145. Sukkar MB, Hughes JM, Armour CL, Johnson PR. Tumour necrosis factor-alpha potentiates contraction of human bronchus in vitro. *Respirology* 2001 September;6(3):199-203.
146. Rubbia-Brandt L, Sappino AP, Gabbiani G. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991;60(2):73-82.
147. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. *J Allergy Clin Immunol* 1999 November;104(5):983-9.
148. Cumberbatch M, Fielding I, Kimber I. Modulation of epidermal Langerhans' cell frequency by tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 1994 March;81(3):395-401.
149. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 May 3;102(18):6467-72.
150. Nakae S, Suto H, Iikura M, Kakurai M, Sedgwick JD, Tsai M, Galli SJ. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol* 2006 February 15;176(4):2238-48.
151. Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med* 1991 June 1;173(6):1345-56.

152. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 1988 February 1;167(2):262-74.
153. Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 2001 January 1;193(1):51-60.
154. Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN. Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol* 2003 October 15;171(8):3936-40.
155. Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St GB. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol* 2000 March 15;164(6):2937-46.
156. Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med* 1998 December 7;188(11):2019-31.
157. Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 1998 April 15;160(8):4090-7.
158. von GC, Wikstrom ME, Zosky G, Turner DJ, Sly PD, Smith M, Thomas JA, Judd SR, Strickland DH, Holt PG, Stumbles PA. Allergic airways disease develops after an increase in allergen capture and processing in the airway mucosa. *J Immunol* 2007 November 1;179(9):5748-59.
159. Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Jaksic A, Noonan FP, Finlay-Jones JJ. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* 1998 June 15;187(12):2045-53.
160. Toru H, Eguchi M, Matsumoto R, Yanagida M, Yata J, Nakahata T. Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood* 1998 January 1;91(1):187-95.
161. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani AM, Schwartz LB, Inagaki N, Takei M, Ishizaka K, Zsebo KM, Gillis S, . Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 January 15;90(2):735-9.
162. Hallgren J, Pejler G. Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *FEBS J* 2006 May;273(9):1871-95.

163. Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP, Bischoff SC. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol* 2000 January 1;164(1):43-8.
164. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns MP. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 1999 May;44(5):643-52.
165. Dahlen SE, Kumlin M. Monitoring mast cell activation by prostaglandin D2 in vivo. *Thorax* 2004 June;59(6):453-5.
166. Oguma T, Palmer LJ, Birben E, Sonna LA, Asano K, Lilly CM. Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med* 2004 October 21;351(17):1752-63.
167. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002 May 30;346(22):1699-705.



## 8. Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
DC	Dendritic cell - Dendritische Zelle
MC <sup>T</sup>	Tryptase positive Mastzelle
MC <sup>CT</sup>	Chymase und Tryptase positive Mastzelle
IL	Interleukin
CD	Cluster of Differentiation
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll like Receptor
BMMC	Bone marrow derived Mast cell
BMDC	Bone marrow derived Dendritic cell
MHC	Major Histocompatibility Complex – Haupthistokompatibilitätskomplex
WT	Wildtyp
TSLP	Thymic stromal lymphopoeitin
Th Zelle	T-Helferzelle
OVA	Ovalbumin
AHR	Airway Hyperreactivity - Atemwegsüberempfindlichkeit
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
OD	Optische Dichte
V	Volumen
VF	Verdünnungsfaktor
KF	Kammerfaktor
PBS	Phosphate buffered saline – Phosphat-gepufferte Salzlösung
HBSS	Hank´s balanced salt solution
FACS	Fluorescence activated cell sorting
MEM	Minimal essential Medium
FCS	Fetal calf serum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
KM	Kulturmedium
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
°C	Grad Celcius
U/min	Umdrehungen pro Minute
min	Minute
Std	Stunde
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
cm	Centimeter
mg	Milligramm
RT	Raumtemperatur
HE	Hämatoxylin-Eosin
PAS	Periodic Acid-Schiff Stain -
EtOH	Ethanol
i.p.	Intra peritoneal
i.n.	Intra nasal

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

tLN	Trachealer Lymphknoten
iLN	Inguinaler Lymphknoten
LN	Lymphknoten
Abb	Abbildung
sens	Sensibilisiert
prov	Provoziert
SCF	Stem cell factor - Stamzellofaktor
WT	Wildtyp

