

Mastzellen als Verstärker wichtiger Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fatma Doener

geb. am 13.08.1980 in Heilbronn

Mainz, März 2011

Aus dem
Institut für Immunologie
Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Entwicklung und Differenzierung von Mastzellen	1
1.2	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Modelle zur Untersuchung der Funktion muriner Mastzellen	2
1.3	Die Rolle der Mastzellen im Immunsystem	4
1.3.1	Die klassische Rolle der Mastzellen in der Allergie und der Abwehr von Nematoden	4
1.3.2	Die Rolle der Mastzellen bei Infektionen	5
1.4	Entwicklung und Funktion neutrophiler Granulozyten	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Plastikwaren	14
2.2	Chemikalien	14
2.3	Cytokine	14
2.4	Puffer, Kulturmedien und Reagenzien	15
2.4.1	Puffer und Lösungen	15
2.4.2	Medien	18
2.4.3	Reagenzien	19
2.5	Antikörper	19
2.5.1	Antikörper zur Isolierung von murinen neutrophilen Granulozyten	19
2.5.2	Antikörper zur Aktivierung von Mastzellen	19
2.5.3	Antikörper zur FACS-Analyse	20
2.5.4	Antikörper für ELISA	21
2.6	Mäuse	21
2.7	Methoden der Zellkultur	22
2.7.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	22
2.7.2	Präparation von Knochenmarkszellen	22
2.7.3	Differenzierung von „bone marrow-derived mast cells“ (BMMC) aus Knochenmarkszellen	23
2.7.4	Isolierung von Neutrophilen aus murinem Knochenmark mittels MACS	23
2.7.5	Aktivierung von <i>in vitro</i> generierten BMMC	24

2.8	FACS-Analyse	25
2.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	25
2.10	Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies („oxidative burst“) in neutrophilen Granulozyten	26
2.11	<i>In vitro</i> Phagozytoseassay	27
2.12	Apoptosebestimmung von Neutrophilen durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI)	28
2.13	Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels der Nicoletti-Methode	29
2.14	Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen mit BMMC	29
2.15	<i>In vivo</i> Phagozytoseassay und Entnahme der bronchoalveolären Lavage (BAL) und der Lungen	30
2.16	Erstellen und Färben von Cytospins	30
2.17	Färbung von Mastzellen in Lungenschnitten	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Mastzellen modulieren die Expression der Aktivierungsmarker CD11b und CD62L auf neutrophilen Granulozyten	32
3.2	Mastzellen verstärken den „oxidative burst“ von Neutrophilen	38
3.3	Mastzellen verstärken die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen	40
3.4	Die <i>W-sh</i> -Mutation bewirkt Mastzellosigkeit, hat aber keinen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von Neutrophilen in <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> -Mäusen	48
3.5	Mastzellen verstärken die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen in einem <i>in vivo</i> Modell einer LPS-induzierten akuten Atemwegsentszündung	53
3.6	Mastzellen erhöhen die Lebensdauer von Neutrophilen	58
3.7	Der Einfluss von Mastzell-produziertem TNF und GM-CSF auf Neutrophile	63
3.7.1	Mastzellen modulieren teilweise durch TNF und GM-CSF die Expression der Aktivierungsmarker von Neutrophilen	64
3.7.2	Mastzellen beeinflussen hauptsächlich durch GM-CSF den „oxidative burst“ von Neutrophilen	65
3.7.3	Mastzellen steigern durch GM-CSF und TNF die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen	66
3.7.4	Mastzellen erhöhen durch GM-CSF die Lebensdauer von Neutrophilen	69

4.	Diskussion	73
4.1	Mastzellen und neutrophile Granulozyten in protektiven und pathologischen Immunreaktionen	73
4.2	Mastzellen verstärken Effektorfunktionen von Neutrophilen	77
4.3	<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh} („sash“) –Mäuse als Modell zur Untersuchung von Neutrophilen und Mastzellen <i>in vivo</i>	79
4.4	Mastzellen verstärken <i>in vivo</i> die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen	81
4.5	Weiterführende Fragestellungen	82
5.	Zusammenfassung	85
6.	Abkürzungsverzeichnis	86
7.	Literaturverzeichnis	88
	Publikationen	97
	Lebenslauf	98

1. Einleitung

1.1 Entwicklung und Differenzierung von Mastzellen

Mastzellen entstehen wie alle Zellen des Immunsystems aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks [1]. Als unreife Vorläuferzellen verlassen sie dieses und wandern über das Blut in die peripheren Gewebe ein. Dort findet unter dem Einfluss lokal vorliegender Cytokin- und Gewebefaktoren die Differenzierung zu reifen, langlebigen Mastzellen statt [2]. Die frühesten murinen Mastzell-Vorläufer konnten im fötalen Blut identifiziert werden und sind definiert als Thy-1^{low} c-Kit^{high}, sie besitzen cytoplasmatische Granula und exprimieren RNA für Mastzell-spezifische Proteasen. Sie exprimieren jedoch noch nicht den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI). Nach adoptivem Transfer in Mastzell-defiziente Mäuse kann sich diese Zellpopulation zu reifen Mastzellen entwickeln [3]. Die Identifizierung von Mastzell-Vorläufern in der adulten Maus hat sich als schwierig erwiesen, da sich im Blut adulter Tiere kaum Mastzell-Vorläufer nachweisen lassen, sondern Mastzellen fast nur im Gewebe zu finden sind [4]. Die Einwanderung der Mastzell-Vorläufer in die Gewebe erfolgt vermutlich über definierte Adhäsionsmoleküle abhängig von den jeweiligen Zielorten. Für die Einwanderung in die Dünndarmmucosa konnte gezeigt werden, dass auf Mastzell-Vorläufern hierfür die Expression des Integrins $\alpha_4\beta_7$ notwendig ist [5].

Die Vorläuferzellen humaner Mastzellen sind bisher nicht besonders gut charakterisiert. Auch sie entstammen dem Knochenmark und werden als CD34⁺, c-Kit⁺, CD13⁺, CD33⁺, CD38⁺ und FcεRI⁻ beschrieben [6].

Mastzellen sind verstärkt in Geweben zu finden, welche in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen, wie der Haut und den Schleimhäuten des Darmes und der Lunge. Sie werden in der Maus in zwei Hauptpopulationen unterteilt: die Bindegewebsmastzellen („connective tissue type mast cells“, CTMC) und die mucosalen Mastzellen („mucosal type mast cells“, MMC). CTMC befinden sich hauptsächlich in der Haut und im Peritoneum. MMC hingegen sind vor allem in der *Lamina propria* des Darmes, in den mucosalen Schichten der Bronchien und in unmittelbarer Nähe von Blutgefäßen lokalisiert. Diese zwei Populationen lassen sich nicht nur durch ihre Verteilung in verschiedenen Geweben, sondern auch insbesondere durch die unterschiedliche Zusammensetzung von Proteasen und Proteoglykanen in den Granula unterscheiden [7].

Auch im Menschen lassen sich zwei Populationen von Mastzellen unterscheiden, die als MC_T und MC_{TC}¹ bezeichnet werden. Die Unterscheidung erfolgt anhand der Proteasen in ihren Granula. So exprimieren die MC_T nur Tryptase, die MC_{TC} hingegen besitzen Tryptase und Chymase [8]. MC_T kommen hauptsächlich in der Lunge und in den Schleimhäuten vor, MC_{TC} befinden sich hingegen in der Haut und der Darmschleimhaut [9].

Der Stammzellfaktor („stem cell factor“, SCF) ist *in vivo* sowohl für murine als auch humane Mastzellen der wichtigste Wachstums- und Differenzierungsfaktor und vermittelt seine Effekte über den membranständigen Tyrosinkinaserzeptor c-Kit (CD117) [10]. Im Gegensatz zu anderen Knochenmarkszellen tragen Mastzellen c-Kit während aller Entwicklungsstadien auf ihrer Zelloberfläche. Mäuse, die aufgrund von Mutationen im c-Kit Gen keinen funktionellen c-Kit Rezeptor besitzen, können keine Mastzellen entwickeln. Zudem hat der Stammzellfaktor auch eine chemotaktische Funktion und spielt eine Rolle in der Migration der Mastzellen oder ihrer Vorläufer in die Gewebe [11]. Das Cytokin Interleukin-3 (IL-3) ist *in vitro* ein wichtiger Wachstumsfaktor, aber *in vivo* für die Entwicklung von Mastzellen nicht essentiell. Dies zeigte sich vor allem durch IL-3-defiziente Mäuse, die normale Mastzellzahlen entwickeln. Jedoch ist in diesen Mäusen bei einer Infektion mit Nematoden die lokale Expansion der Mastzellen beeinträchtigt [12]. Für eine Reihe weiterer Cytokine, wie IL-4, IL-6, IL-9, TNF (Tumor Nekrose Faktor) und NGF (Nervenwachstumsfaktor), wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterstützende Funktionen in der Entwicklung und Differenzierung der Mastzellen beschrieben [7].

1.2 *In vitro* und *in vivo* Modelle zur Untersuchung der Funktion muriner Mastzellen

Da *in vivo* CTMC und MMC nur in geringer Zahl im Gewebe vorhanden sind, ist es sehr schwierig Mastzellen in ausreichend hoher Zahl und mit einer entsprechenden Reinheit aus dem Gewebe zu isolieren. Daher werden für *in vitro* Experimente sogenannte BMBC („bone marrow-derived mast cells“) verwendet, die aus murinen Knochenmarkszellen in einer 3- bis 4-wöchigen Kultur in Gegenwart von SCF und IL-3 generiert werden [2,7]. BMBC gelten als *in vitro* Äquivalent für mucosale Mastzellen und können nach adoptivem Transfer in mastzelllose Mäuse abhängig von den jeweiligen Geweben in Bindegewebs- oder mucosale Mastzellen differenzieren [13].

¹ T = Tryptase; TC = Tryptase + Chymase

Um die Rolle der Mastzellen *in vivo* zu untersuchen werden in der Regel Mäuse verwendet, die eine Mutation im *W*-Locus („*W*“ steht für „white spotting“) des *c-Kit* Gens auf dem Chromosom 5 besitzen, das den Rezeptor für SCF kodiert [14]. WBB6F₁-*Kit*^W/*Kit*^{W-v}-Mäuse (vereinfacht *Kit*^W/*Kit*^{W-v}) besitzen in beiden Kopien ihrer *c-Kit* Gene Mutationen. Das *Kit*^W-Allel kodiert für ein *c-Kit* Protein ohne eine transmembrane Region und kann daher nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden [15]. Das *Kit*^{W-v}-Allel hat eine Punktmutation innerhalb der kodierenden Region für die cytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors, wodurch die Kinaseaktivität von *c-Kit* stark reduziert ist [16]. Aufgrund einer extremen Anämie sind Tiere mit homozygoter *Kit*^W-Ausstattung nicht lebensfähig. Die genetische Konstellation *Kit*^W/*Kit*^{W-v} („*v*“ steht für „viable“) führt ebenfalls zu einer Anämie. Die betreffenden Tiere sind jedoch lebensfähig und weisen eine profunde Mastzell-Defizienz auf. Die Mutationen bewirken zusätzlich zur Anämie auch die Sterilität der Mäuse aufgrund fehlender Keimzellen. Da die *c-Kit* Mutation auch die Melanozyten betrifft, haben die Mäuse aufgrund fehlender Hautpigmentierung eine weiße Fellfarbe [17].

Einen weiteren Mastzell-defizienten Stamm stellen die C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse (vereinfacht *Kit*^{W-sh/W-sh} oder sogenannte „sash-Mäuse“) dar. Die *W-sh*-Mutation wurde ursprünglich in einem Hybrid (C3H/HeH x 101/H) entdeckt, da sich diese Mutation in heterozygoten *Kit*^{W-sh}/*Kit*⁺-Tieren äußerlich als ein breites weißes Band („sash“) rund um den mittleren Körperbereich zeigt [18]. Bei der *W-sh*-Mutation handelt es sich um eine Inversion der DNA-Sequenz oberhalb des Transkriptionsstartpunktes im *c-Kit* Gen [19]. Durch diese Mutation sind vermutlich regulatorische Elemente zerstört, was zu einer stark reduzierten Expression von *c-Kit* führt [20]. Jungen *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen fehlen in allen Geweben Mastzellen, ausgenommen in der Haut, in der Mastzellen noch zu einem geringen Prozentsatz detektierbar sind. Diese Mastzellen in der Haut gehen mit dem Alter jedoch ebenfalls verloren, so dass adulte Tiere (12 Wochen alt) in allen Geweben kaum noch Mastzellen besitzen. *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse haben im Vergleich zu *Kit*^W/*Kit*^{W-v}-Tieren den Vorteil, dass sie nicht anämisch und nicht steril sind. Die *W-sh*-Mutation scheint sich somit auf Mastzellen und Melanozyten zu beschränken. Zudem haben *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse den weiteren Vorteil, dass sie aufgrund von Rückkreuzungen auf dem genetischen Hintergrund des häufig verwendeten Mausstammes C57BL/6 vorliegen. Für *in vivo* Untersuchungen ist insbesondere entscheidend, dass sich beide mastzelllosen Mäuse-Stämme durch den Transfer von *in vitro* generierten Mastzellen rekonstituieren lassen [17,21].

1.3 Die Rolle der Mastzellen im Immunsystem

1.3.1 Die klassische Rolle der Mastzellen in der Allergie und der Abwehr von Nematoden

Die bestuntersuchte physiologische Aktivierung von Mastzellen erfolgt über die Quervernetzung ihrer IgE-gebundenen Fcε-Rezeptoren (FcεRI). Auf dieser Grundlage beruhen Soforttyp-Allergien (Typ I nach „Coombs and Gell“²) wie z.B. allergische Rhinitis (Heuschnupfen), allergisches Asthma und Urtikaria (Nesselsucht). Hierfür ist zunächst ein Erstkontakt des Körpers mit dem Allergen notwendig, bei dem eine spezifische T_H2-Immunantwort ausgelöst wird. Dies hat zur Folge, dass B-Zellen zur Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper induziert werden, die an die hochaffinen IgE-Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen binden. Dieser Vorgang des Erstkontakts wird als „Sensibilisierung“ bezeichnet. Bei einem erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Allergen bindet dieses spezifisch an die rezeptorgebundenen IgE-Antikörper auf der Mastzelloberfläche, wodurch es zu einer Kreuzvernetzung der FcεRI kommt. Dies führt zu einer schlagartigen Degranulation der Mastzellen, bei der in den Granula präformiert vorliegende proinflammatorische Mediatoren freigesetzt werden. Hierzu gehören Histamin und Heparin, Proteasen wie Tryptase und Chymase, aber auch Cytokine wie TNF. Zusätzlich werden durch *de novo* Synthese Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene, aber auch zahlreiche andere Cytokine und Chemokine gebildet, die durch ihre Freisetzung die Entstehung einer Spätreaktion verstärken. Diese setzt einige Stunden nach der Sofortreaktion ein und ist durch Infiltration des Gewebes mit weiteren Immunzellen, wie Granulozyten und Makrophagen, gekennzeichnet [2].

Als eine Hypersensibilitätsreaktion gehört die IgE-vermittelte Allergie zu den Immunreaktionen, die Gewebeschäden verursachen und zu ernsthaften Erkrankungen führen können. Im schlimmsten Fall erfolgt eine anaphylaktische Reaktion. Hier gelangt das Allergen direkt ins Blut und kann im Körper sensibilisierte Mastzellen systemisch aktivieren, wodurch eine lebensbedrohliche Situation entstehen kann. Daher wurde lange Zeit über die physiologische Funktion der IgE-vermittelten Immunreaktion von Mastzellen diskutiert. Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass die Funktion der IgE-vermittelten Immunabwehr in der Bekämpfung von extrazellulären Darmparasiten (Nematoden) liegt. So

² Die Allergie gehört zu den Hypersensibilitätsreaktionen, die 1963 von „Coombs and Gell“ in vier Typen eingeteilt wurden. Heute existieren viele Mischformen. Die verschiedenen Hypersensibilitätsreaktionen können auch durch IgG-vermittelte Immunantworten oder durch spezifische T-Zellen hervorgerufen werden.

wurde gezeigt, dass die Expulsion einiger Darmparasiten in Mastzell-defizienten Mäusen verglichen mit Wildtyp-Tieren stark verzögert war [9,22].

1.3.2 Die Rolle der Mastzellen bei Infektionen

Die Funktion der Mastzellen wurde lange Zeit ausschließlich nur im Kontext ihrer nachteiligen Wirkung in allergischen Reaktionen oder bei der Abwehr von Nematoden diskutiert. Diese Immunantworten werden über IgE-Antikörper vermittelt und gehören daher der adaptiven Immunität an. Doch in den letzten Jahren wurden viele Arbeiten veröffentlicht, welche Mastzellen eine protektive Funktion in der mikrobiellen Pathogenabwehr nachwiesen. Damit wurde Mastzellen im Rahmen der angeborenen Immunität eine entscheidende Rolle als Initiatoren und/oder Modulatoren von Entzündungsreaktionen zugewiesen. Mastzellen können somit auch eine nachfolgende adaptive Immunantwort, welche durch B- und T-Zellen sowie dendritischen Zellen vermittelt wird, beeinflussen. Mastzellen gelten seit dem als eine wichtige Schlüsselposition zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität.

Erst 1996 erschienen unabhängig voneinander zwei entscheidende Arbeiten, die den überzeugenden Nachweis für eine wichtige Funktion von Mastzellen in der Abwehr bakterieller Infektionen lieferten [23,24]. Die Gruppe von Echtenacher zeigte in einem Modell der akuten septischen Peritonitis („caecum ligation and puncture“, CLP³), dass spätestens fünf Tage nach Durchführung der CLP alle Mastzell-defizienten Mäuse (*Kit^W/Kit^{W-v}*) verstarben, wohingegen Wildtyp-Tiere des kongenen Stammes eine Sterberate von nur 25% aufwiesen. Der adoptive Transfer von Mastzellen in die mastzelllosen Mäuse erhöhte deren Überlebensrate auf Wildtyp-Niveau. Dieser schützende Effekt wurde in den rekonstituierten mastzelllosen Mäusen jedoch wieder aufgehoben, wenn ihnen direkt nach der CLP anti-TNF-Antikörper verabreicht wurden. Dies deutete darauf hin, dass für den protektiven Effekt das TNF von Mastzellen verantwortlich war. In einem Infektionsmodell mit *Klebsiella pneumoniae* an Mastzell-defizienten und Wildtyp-Mäusen konnte die Gruppe von Malaviya ebenfalls zeigen, dass Mastzellen bei der Abwehr bakterieller Infektionen eine wichtige Rolle einnehmen. Achtundvierzig Stunden nach intranasaler Applikation des Bakteriums in die Lungen der Mäuse zeigten mastzelllose Tiere im Vergleich zu

³ CLP: Akute septische Peritonitis. Ein experimentelles Modell zur Induktion einer Bauchfellentzündung in Mäusen. Hierbei wird ein Teil des Dickdarms (caecum) abgebunden und danach punktiert. Dies führt zum Austreten von Darmbakterien und anschließend zur Entstehung einer peritonealen Infektion.

Wildtyp-Tieren einen verminderten Influx neutrophiler Granulozyten und eine zwanzigfach höhere Bakterienzahl in den Lungen. Auch hier konnte die verstärkte Anfälligkeit der mastzelllosen Mäuse durch einen adoptiven Transfer von Mastzellen wieder aufgehoben werden.

In den darauf folgenden Jahren wurde die protektive Funktion der Mastzelle bei der Pathogenabwehr durch verschiedene Infektionsmodelle mit Mastzell-defizienten Mäusen weiter untermauert. So wurde gezeigt, dass nicht nur TNF von Mastzellen, sondern beispielsweise auch Leukotriene, mMCP-6 („mouse mast cell protease 6“), IL-6 und IL-4 je nach Modell entscheidend sind, um einen Influx von Neutrophilen am Infektionsort und hierdurch eine effiziente Entzündungsreaktion zu initiieren [25-29].

Für die Pathogenabwehr scheinen Mastzellen aufgrund verschiedener Merkmale prädestiniert zu sein. Hierzu gehört in erster Linie vor allem ihre strategische Lokalisation an potentiellen Eintrittswegen für Mikroorganismen, wie der Haut und den Schleimhäuten. Hier sind Mastzellen in der Nähe von Blutgefäßen und Nerven zu finden, wo sie durch direkten Kontakt mit Pathogenen unabhängig von IgE aktiviert werden können. Auf diese Weise können Mastzellen einen unmittelbaren Einfluss auf die Gefäßpermeabilität und die lokale Einwanderung von Leukozyten zu der Infektionsstelle nehmen. Für die Erkennung bakterieller und viraler Bestandteile besitzen Mastzellen eine breite Palette von Oberflächenrezeptoren. Darüber hinaus sind sie nach Aktivierung zur Produktion einer enormen Anzahl verschiedener proinflammatorischer Mediatoren fähig, wodurch sie die lokale Entzündungsreaktion initiieren und verstärken können [30]. Insbesondere in Bezug auf TNF nehmen Mastzellen eine Sonderstellung ein, da sie die einzigen Immunzellen sind, die TNF präformiert in Granula speichern und nach Aktivierung unmittelbar freisetzen können [31,32].

Die Aktivierung von Mastzellen kann zum einen durch eine direkte Interaktion mit Pathogenen erfolgen und zum anderen auf indirekte Weise durch Komplementfaktoren oder endogene Mediatoren, welche von körpereigenen Zellen während einer Entzündung freigesetzt werden. Die direkte Erkennung von Mikroorganismen ist über Toll-like Rezeptoren (TLR) möglich. TLR sind eine Familie der PRR („pattern recognition receptors“), die zu den Rezeptoren der angeborenen Immunität gehören. Die Spezifitäten der TLR sind keimbahnkodiert und sie erkennen stark verbreitete, konservierte Strukturen von Mikroorganismen, sogenannte PAMP („pathogen-associated molecular pattern“). Die

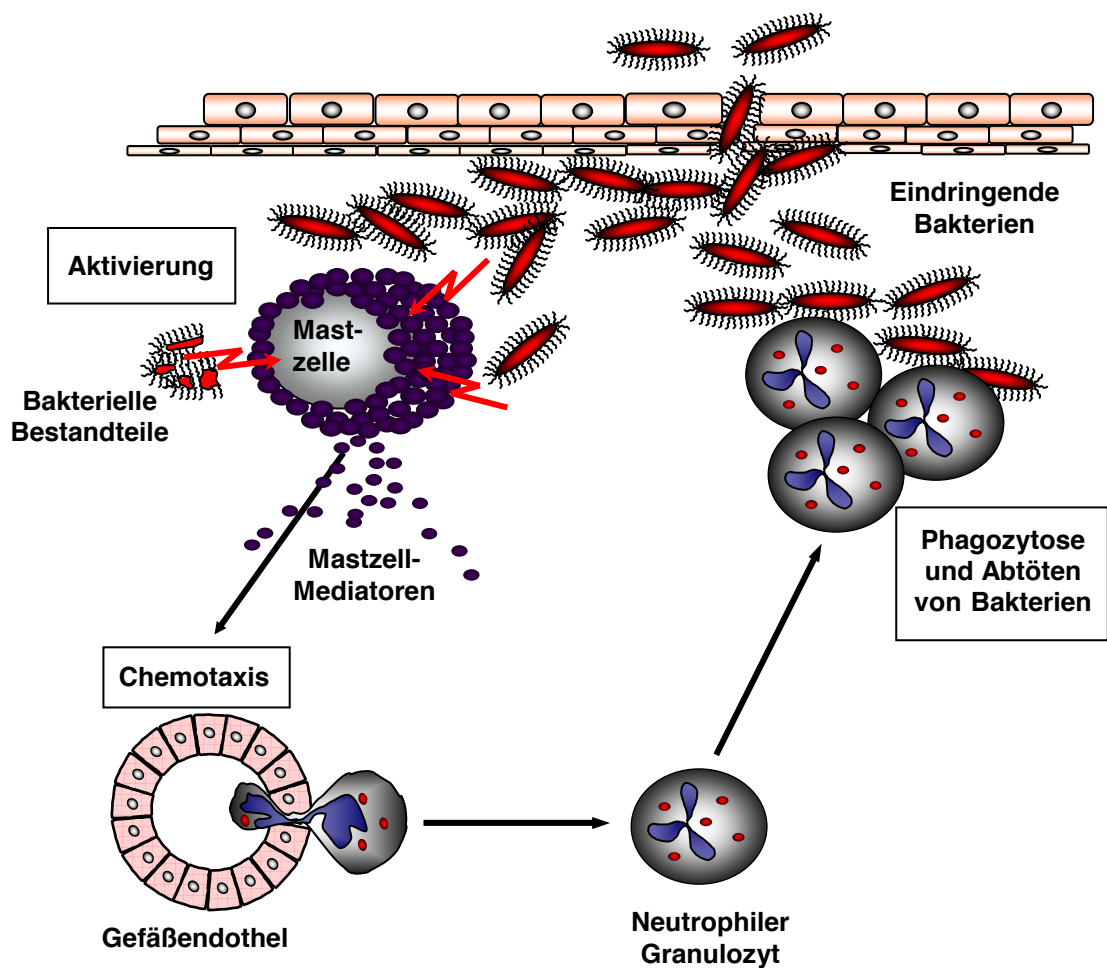
Expression von TLR auf Mastzellen kann sich abhängig von der Mastzell-Population und der Lokalisation unterscheiden. So exprimieren murine Mastzellen in der Mucosa TLR-1, -2, -4 und -6, während Mastzellen der Haut zusätzlich auch die TLR-3, -7 und -9 exprimieren [33,34].

Bei Infektionen von Mäusen mit Enterobakterien wurde gezeigt, dass für die Pathogenabwehr der TLR-4-vermittelte Signalweg in Mastzellen eine entscheidende Rolle spielt. Mastzell-defiziente Mäuse, die mit *in vitro* generierten TLR-4-defizienten Mastzellen rekonstituiert wurden, zeigten im CLP-Modell eine erhöhte Sterberate verglichen mit Mäusen, die mit TLR-4-intakten Mastzellen rekonstituiert wurden [35]. In einem Infektionsmodell mit *Mycobacterium tuberculosis* zeigte sich, dass die TLR-2-abhängige Aktivierung von Mastzellen für eine effiziente Beseitigung des Bakteriums notwendig ist [36].

Eine weitere direkte Erkennung von Pathogenen kann über die Interaktion des Oberflächenrezeptors CD48 auf Mastzellen mit FimH, einem Proteinbestandteil bakterieller Geißeln von Enterobakterien wie z.B. *Escherichia coli*, erfolgen. Diese Interaktion induziert in Mastzellen die Phagozytose von Bakterien und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Histamin und TNF [24,37,38].

Eine indirekte Aktivierung von Mastzellen ist durch Komponenten des Komplementsystems möglich. So wurde an Komplementfaktor C3-defizienten Mäusen gezeigt, dass Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien die Aktivierung von Mastzellen nicht wie erwartet über den TLR-2-Signalweg induziert, sondern über den Komplementfaktor C3 [39]. Darüber hinaus können Mastzellen auch durch eine Reihe weiterer endogener Substanzen aktiviert werden. Hierzu gehören die unter Stressbedingungen sezernierten Neuropeptide wie z.B. Substanz P, Neurotensin, das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), Somatostatin und Bradykinin. Weiterhin können auch antimikrobiell wirkende α - und β -Defensine die Degranulation von Mastzellen bewirken [7,40].

In Abb.1.1 ist die Funktion der Mastzelle in Entzündungsreaktionen der angeborenen Immunität vereinfacht dargestellt.



Quelle: Stassen *et al.*, Crit Rev Immunol, 2002

Abb.1.1: Mastzellen initiieren bei Infektionen einen schnellen Influx von Neutrophilen zu lokalen Entzündungsorten. Mastzellen sind an allen Orten des Körpers vertreten, die leicht in Kontakt mit der Umwelt und somit mit Pathogenen kommen können. Daher sind sie eine der ersten Zellen, die bei Infektionen eingedrungene Pathogene erkennen und folglich aktiviert werden. Die Aktivierung führt zu einer unmittelbaren Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Histamin und TNF) und zudem auch *de novo* gebildeter Substanzen (Chemokine und Cytokine). Mastzell-Mediatoren aktivieren die Endothelzellen der lokalen Blutgefäße. Hierdurch werden Effektorzellen, wie neutrophile Granulozyten, aus dem Blut in die entzündeten Gewebe angelockt und können anschließend als professionelle Phagozyten eingedrungene Bakterien beseitigen.

1.4 Entwicklung und Funktion neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten („polymorphonuclear neutrophils“, PMN) sind Schlüsselzellen der angeborenen Immunität, da sie als professionell phagozytierende Zellen die erste Abwehr bei Infektionen mit Pathogenen bilden. Sie entwickeln sich aus myeloiden Stammzellen im Knochenmark und verlassen dieses als reife Zellen um in der Blutbahn zu zirkulieren. Die Produktion von Neutrophilen im Knochenmark ist enorm und beträgt in einem gesunden Menschen zwischen $1-2 \times 10^{11}$ Zellen pro Tag [41]. Somit machen Neutrophile im Blut mit 40-60% den größten Anteil aller zirkulierenden Leukozyten aus [42]. Der wichtigste Faktor für die Reifung und die Lebensdauer von Neutrophilen ist G-CSF („granulocyte colony-stimulating factor“). Mäuse oder Menschen, die eine Defizienz in der Produktion von G-CSF oder seines Rezeptors haben, weisen eine starke Neutropenie⁴ auf. Diese führt zu einer stark erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen. G-CSF kann jedoch nicht der alleinige entscheidende Wachstumsfaktor für Neutrophile sein, da G-CSF-defiziente Mäuse noch einen Anteil von 20-30% Neutrophile im Blut aufweisen [43,44].

Bei einer Infektion werden die Endothelzellen der lokalen Blutgefäße durch Signale von eingedrungenen Pathogenen und durch Immunzellen im Gewebe, z.B. durch residente Makrophagen oder Mastzellen, aktiviert. Die aktivierten Endothelgefäße exprimieren in verstärktem Maß Adhäsionsmoleküle und Chemokine. Hierdurch kann eine Interaktion der Endothelzellen mit zirkulierenden Neutrophilen erfolgen, wodurch schließlich deren **Extravasation** aus der Blutbahn in die peripheren entzündeten Gewebe ermöglicht wird. Die Extravasation erfolgt in einer komplexen, mehrstufigen Kaskade von Wechselwirkungen zwischen Neutrophilen und dem aktivierten Endothel, bei denen Selektine, Integrine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie involviert sind. Chemokine wie Interleukin-8 und chemotaktisch wirkende Substanzen wie Leukotrien B4 oder bakterielles f-MLP⁵ ermöglichen eine festere Adhäsion der Neutrophilen an die Endothelgefäße und dirigieren sie anschließend durch Chemotaxis zum Infektionsherd. Am Entzündungsort beseitigen Neutrophile eingedrungene Pathogene durch Phagozytose, durch die intrazelluläre Bildung toxischer Sauerstoffradikale und durch die Freisetzung antimikrobieller Proteine [45-47].

⁴ Neutropenie: Verminderung der Anzahl neutrophiler Granulozyten

⁵ f-MLP: *N*-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin. fMLP ist ein bakterielles chemotaktisches Peptid, das von Phagozyten über den *N*-Formylpeptid Rezeptor (FPR) erkannt wird und die Zellen hauptsächlich zur Chemotaxis, zur Degranulation und zum „oxidativen burst“ aktiviert.

Die meisten Schritte, von der Extravasation bis hin zum Abtöten der Pathogene, werden durch die kontrollierte Freisetzung der **Neutrophilen-Granula** bestimmt. Diese werden in verschiedene Gruppen eingeordnet: Die azurophilen (primären), die spezifischen (sekundären) und die Gelatinase (tertiären) Granula sowie die sekretorischen Vesikel. Die einzelnen Granula werden in der genannten Reihenfolge während fortschreitender Stadien der Neutrophilenreifung gebildet. Hierdurch lässt sich auch die stark heterogene Zusammensetzung der Proteininhalte in den verschiedenen Granula erklären, da in den einzelnen Entwicklungsstadien unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren für eine definierte Biosynthese von Proteinen sorgen [48,49]. Für humane Neutrophile konnten bisher 286 Proteine in den azurophilen, spezifischen und Gelatinase-Granula identifiziert werden [50]. Aktivierte Neutrophile setzen den Inhalt ihrer Granula ebenfalls in einer festgelegten Reihenfolge frei, die jedoch umgekehrt zu der Reihenfolge ihrer Bildung während der Neutrophilenentwicklung ist. Nach Kontakt mit dem aktivierten Endothel oder durch Stimulation von Chemokinen (z.B. IL-8), pathogenen Substanzen (z.B. f-MLP) oder Komplementproteinen (z.B. C5a) werden zunächst die *sekretorischen Vesikel* mobilisiert. Die Membranen der sekretorischen Vesikel fusionieren vollständig mit der Oberflächenzellmembran der Neutrophilen. Sie beinhalten Proteine, die für eine feste Adhäsion der Neutrophilen an das Endothel und die Migration in die Gewebe nötig sind, wie z.B. das β_2 -Integrin CD11b/CD18 (auch Mac-1⁶ oder CR3⁷), den Komplementrezeptor CR1 oder den fMLP-Rezeptor. Mit diesem Prozess geht auch parallel die enzymatische Abspaltung des konstitutiv exprimierten Selektins CD62L auf der Zelloberfläche der Neutrophilen einher. Auch die *Gelatinase-Granula* sind besonders wichtig für die Migration der Neutrophilen, da sie durch ihren hohen Gehalt an Metalloproteinasen, wie insbesondere Gelatinase, die Degradierung der extrazellulären Matrix und somit die Einwanderung der Zellen ins Gewebe ermöglichen. Die *spezifischen Granula* sind definiert durch ihre hohe Konzentration an Laktoferrin und enthalten zusätzlich weitere antimikrobielle Proteine, welche sie sowohl extrazellulär in die Umgebung, als auch in die intrazellulären Phagosomen freisetzen. Die *azurophilen Granula* hingegen entlassen ihren Inhalt fast nur in die Phagosomen. Sie besitzen den Hauptanteil der Proteine zur Bekämpfung von Mikroorganismen wie unter anderem Myeloperoxidase, Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3 und Defensine und sind daher essentiell für den Abbau phagozytierter Pathogene [49,51].

⁶ Mac-1: macrophage antigen-1

⁷ CR-3: complement receptor-3

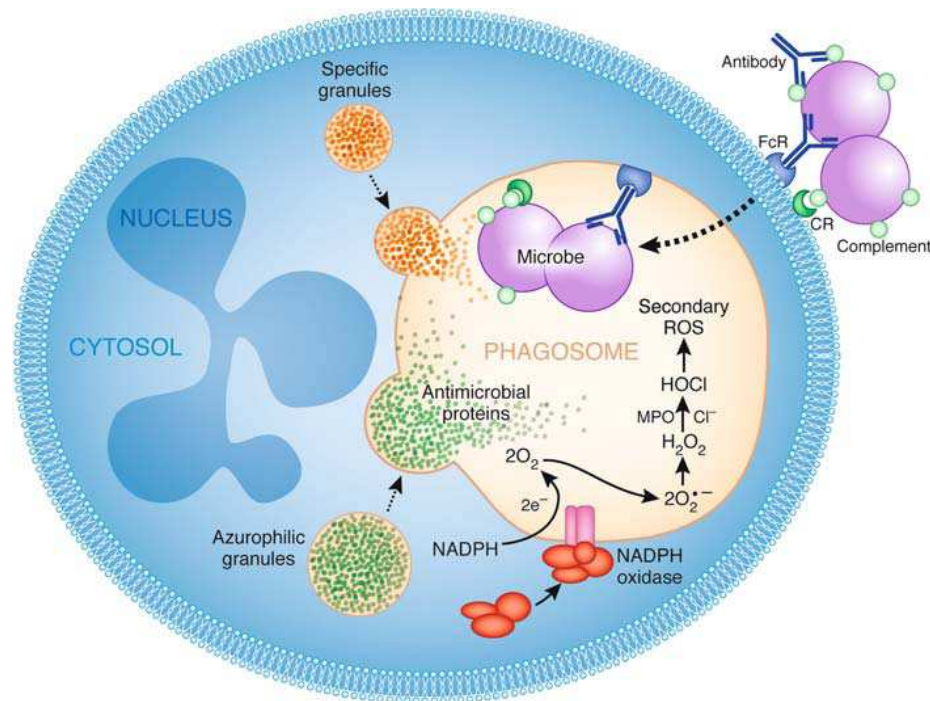
Beim **Phagozytoseprozess** nehmen Neutrophile im infizierten Gewebe Pathogene in die Zelle auf und schließen sie in sogenannten Phagosomen ein. Hier erfolgt anschließend die Abtötung der Mikroorganismen durch die Bildung toxischer Sauerstoffradikale („oxidative burst“) und zudem durch antimikrobielle Proteine, welche aus den Neutrophilen-Granula in die Phagosomen freigesetzt werden. Die Phagozytose wird initiiert über Rezeptor-vermittelte Signale auf der Oberfläche von Neutrophilen. Die Expression von TLR auf Neutrophilen ermöglicht eine direkte Erkennung und Bindung von Mikroorganismen. Weiterhin besitzen Neutrophile zwei verschiedene Klassen von Rezeptoren, über die sie opsonisierte Partikel erkennen und phagozytieren können. Hierbei handelt es sich zum einen um Fc-Rezeptoren, hauptsächlich den Fc γ -Rezeptoren, über die Neutrophile in der Lage sind, IgG-opsonisierte Partikel zu erkennen. Zum anderen exprimieren Neutrophile die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18), welche die Phagozytose von Komplement-opsonisierten Pathogenen ermöglichen [45,52,53].

Nach Aufnahme von Pathogenen in die Zellen erfolgt die Produktion toxischer Sauerstoffradikale („reactive oxygen species“, ROS). Dieser Prozess wird als „**oxidative burst**“ bezeichnet und wird von einem Multiproteinkomplex, der NADPH⁸-Oxidase, katalysiert. Sie katalysiert durch einen Elektronentransfer über eine Membran die Umwandlung von Sauerstoff zu Hyperoxidanionen (O₂⁻). Das hochreaktive Hyperoxidanion bildet das Ausgangsprodukt für die Synthese weiterer reaktiver Sauerstoffspezies, wie das Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Die NADPH-Oxidase besteht aus zwei transmembranen Proteinen (p22^{phox} und gp91^{phox}, welche zusammen das Cytochrom b₅₅₈ bilden) und vier cytosolischen Proteinen (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} und eine GTPase Rac1 oder Rac2). In ruhenden Neutrophilen liegen diese Komponenten getrennt in den Membranen bzw. im Cytosol vor. Nach Stimulation der Neutrophilen gelangen die cytosolischen Komponenten der NADPH-Oxidase an die Plasmamembran oder an die Membran des Phagosoms, wo sie sich mit dem Cytochrom b₅₅₈ zusammensetzen und somit den aktiven Enzymkomplex bilden [54,55].

Die ROS-Produktion von Phagozyten hat eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr gegen mikrobielle Pathogene. Bei Menschen mit einem Defekt in einem der NADPH-Oxidase Komponenten resultiert die fehlende ROS-Bildung in einer stark erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Dieses Krankheitsbild wird als „chronic granulomatous disease“ (CGD) bezeichnet [56].

⁸ NADPH: Nicotin Adenin Dinukleotid Phosphat

In Abb.1.2 ist der Phagozytoseprozess und die anschließende intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen durch Neutrophile vereinfacht dargestellt.



Quelle: Kennedy and DeLeo, Immunol Res, 2009

Abb. 1.2: Phagozytose und intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen durch neutrophile Granulozyten.

Neutrophile Granulozyten nehmen im infizierten Gewebe Mikroorganismen durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose auf. Hier ist die Phagozytose von opsonisierten Mikroorganismen dargestellt, die über Fc-Rezeptoren (FcR) und Komplementrezeptoren (CR) vermittelt wird. Die aufgenommenen Mikroorganismen werden in sogenannten Phagosomen abgelagert. In den Phagosomen erfolgt die intrazelluläre Abtötung der Mikroorganismen durch antimikrobielle Proteine aus den azurophilen und spezifischen Granula und zudem durch die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale („oxidative burst“).

Neutrophile sind kurzlebige Zellen, die zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Blut schon innerhalb weniger Stunden einer **spontanen Apoptose** unterliegen [57,58]. Im entzündeten Gewebe kann die spontane Apoptose von Neutrophilen durch proinflammatorische Mediatoren verzögert werden. Neutrophile enthalten jedoch viele Substanzen, die nicht nur Pathogene abtöten, sondern bei lang anhaltenden Entzündungsreaktionen oder bei einem Zelltod durch Nekrose auch zu Gewebeschäden führen können. Daher ist die Induktion der Apoptose von Neutrophilen und ihre sichere Beseitigung durch Makrophagen im Gewebe essentiell, um eine Entzündung zu beenden („resolution of inflammation“) [59,60]. Apoptotische Neutrophile werden durch morphologische Veränderungen für Makrophagen

über spezifische Rezeptoren erkennbar und können somit von diesen Zellen durch Phagozytose beseitigt werden. Zu solchen „Apoptosemarkern“ gehört zum Beispiel das Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen. In frühen Stadien der Apoptose erfolgt eine Änderung der Phospholipidverteilung innerhalb der Zellmembran. Hierdurch wird das Phosphatidylserin, das sich normalerweise nur auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet, an die Außenseite transloziert und kann von Makrophagen erkannt werden [61,62].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Viele Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass Mastzellen zusätzlich zu ihrer Funktion in allergischen Reaktionen noch in weiteren Entzündungsprozessen involviert sind. Viele dieser Prozesse sind der angeborenen Immunität zuzuordnen, bei der Mastzellen eine protektive Funktion in der Abwehr von Mikroorganismen einnehmen. Zudem sind Mastzellen auch in Autoimmunerkrankungen an entzündlichen Prozessen beteiligt. Mastzellen nehmen in diesen Entzündungsreaktionen eine entscheidende Funktion ein, indem sie über die Aktivierung lokaler Blutgefäße eine rasche Einwanderung von Neutrophilen zu Entzündungsorten bewirken. Der Mastzell-vermittelte Influx von Neutrophilen bestimmt somit entscheidend die Ausprägung vieler Entzündungsprozesse der angeborenen und adaptiven Immunität.

Über eine direkte Interaktion von Mastzellen mit Neutrophilen ist bisher nicht viel bekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob Mastzellen auch einen direkten Einfluss auf die essentiellen Effektorfunktionen von Neutrophilen nehmen können. Hierdurch ließe sich der Mastzelle auch eine Rolle als lokaler Verstärker von Neutrophilenfunktionen in Entzündungsprozessen zuordnen.

2. Material und Methoden

2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril und, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Greiner, BD Pharmingen, Nunc und StarLab bezogen.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim) und Merck (Darmstadt) in p.a. (pro analysis) Qualität bezogen.

2.3 Cytokine

Die aufgeführten Cytokine wurden als Zusätze zur Kultivierung und Differenzierung der „bone marrow-derived mast cells“ (BMMC) oder als Standard im ELISA verwendet.

Muriner rekombinanter Kit-Ligand (mrKL)

Die cDNA für den Kit-Ligand wurde von Dr.G.W. Bornkamm (GSF München) zur Verfügung gestellt. Kit-Ligand wurde in *E. coli* kloniert, exprimiert und anschließend gereinigt.

Murines IL-3 (mIL-3)

Das murine IL-3 wurde aus Kulturüberständen der Tumorzelllinie WEHI-3B gewonnen. Dazu wurden die Überstände mit Hilfe einer DEAE-Säule gereinigt. 1 Unit entspricht der Konzentration, bei welcher die Indikatorzelllinie DA-1 eine halbmaximale Proliferation aufzeigt.

Murines rekombinantes IL-4 (mrIL-4)

Das murine rekombinante IL-4 wurde aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen gewonnen und anschließend über Affinitätschromatographie gereinigt. 1 Unit ist die Konzentration, die bei der Zelllinie F4/4K.6 zur halbmaximalen Proliferation führt.

Murines rekombinantes IL-6 (mrIL-6):

IL-6 wurde als Standard für den ELISA verwendet und wurde von der Firma BD Pharmingen bezogen.

2.4 Puffer, Kulturmedien und Reagenzien**2.4.1 Puffer und Lösungen**

Alle Puffer und Medien wurden mit vollentsalztem (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Anschließend wurden sie mit 0,2µm Filtern sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

ACK-Puffer

8,02	g/l	NH ₄ Cl
0,1	g/l	KHCO ₃
0,037	g/l	EDTA
in H ₂ O; pH 7,3		

Annexin V Bindungspuffer [10x]

0,1	M	HEPES (pH 7,4)
1,4	M	NaCl
25	mM	CaCl ₂

Annexin V [10x] Bindungspuffer wurde direkt vor Gebrauch 1:10 mit 0,2µm sterilfiltriertem Wasser verdünnt.

Kopplungspuffer

0,1 M Na₂HPO₄, pH 9,3

EDTA-Puffer

0,5 M EDTA in PBS [1x], pH 7,2

Fötale Kälberserum (FCS)

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde von der Fa. Gibco bezogen und zur Inaktivierung der Komplementkomponenten bei 56°C für 45min im Wasserbad erhitzt. Vor der Verwendung wurde das FCS 20min bei 600xg zentrifugiert und nur die Überstände wurden verwendet.

Gey's Lysepuffer

8,29 g/l NH₄Cl
1,0 g/l KHCO₃
0,037 g/l EDTA
in H₂O; pH 7,29

Glutamin

Stammlösung 200 mM
29,2g/l in PBS [1x]
bei -20°C weggefroren

GM-Puffer (MACS- und FACS-Puffer)

0,5 % BSA
5 mM EDTA
0,01 % NaN₃
in PBS [1x]

Natriumpyruvat

0,1 M in VE-Wasser

Nicoletti-Puffer

50 µg/ml Propidium-Iodid (PI)
0,1 % Natriumcitratdihydrat
0,1 % Triton-X-100

PBS (phosphate buffered saline) [10x]

80,4 g/l NaCl

15,6 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O

pH 6,6

PBS mit 0,5% BSA

Wurde beim Waschen der MACS-Separationssäulen zur Entfernung des Isopropanols verwendet.

Physiologische Trypanblaulösung

Die Trypanblaulösung ist ein Vitalfarbstoff, der nur von toten Zellen aufgenommen wird und zur Bestimmung der Lebendzellzahl verwendet werden kann. Die Lösung wurde wie folgt aus zwei Komponenten (A:B) im Verhältnis 5:1 gemischt:

A: 0,2 % Trypanblau in H₂O_{dest}

B: 4,25 % NaCl in H₂O_{dest}

Rinderserumalbumin (BSA)

BSA-Pulver (Fa. Roth) wurde mit PBS [1x] als 10%ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Die folgenden Puffer wurden für die Durchführung von ELISA verwendet:

Blockpuffer

PBS [1x] mit 0,1% BSA

Kopplungspuffer

0,1 M Na₂HPO₄, pH 9,3

Substratpuffer

40 mM Citrat

60 mM Na₂HPO₄

pH 4,4 - 4,5

Waschpuffer

PBS [1x] mit 0,1% Tween 20

2.4.2 Medien

Die Medien wurden als Trockenpulver von der Firma Gibco (Grand Island, USA) bezogen.

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)

17,67 g/l IMDM Trockenpulver

3,02 g/l NaHCO₃

5x10⁻⁵ M β-Mercaptoethanol

100 I.U./l Penicillin / 100μg/l Streptomycin

in H₂O, pH 7,2, Phenolrot als Indikator

MEM (minimal essential medium)

10,58 g/l MEM Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

in H₂O, 0,2μm sterilfiltriert

KL-MZF (Kit-Ligand-Mastzellfutter)

IMDM mit

10 % FCS

1 mM Natriumpyruvat

2 mM Glutamin

20 U/ml IL-3

50 U/ml IL-4

200 ng/ml Kit-Ligand (KL)

Testmedium

IMDM mit

5 % FCS

1 mM Natriumpyruvat

2 mM Glutamin

2.5.3 Antikörper zur FACS-Analyse

anti-Gr-1-APC:	Klon RB6-8C5, eingesetzt 0,25µg/ml, BD Pharmingen, Ratte anti-Maus
anti-CD11b-FITC:	Klon M1/70, eingesetzt 1,25µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD11b-PE-Cy7:	Klon M1/70, eingesetzt 0,5µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD62L-FITC:	Klon MEL-14, eingesetzt 1,25µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD62L-PE-Cy7:	Klon MEL-14, eingesetzt 0,5µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD117-APC:	Klon ACK2, eingesetzt 0,5µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD117-PE:	Klon ACK2, eingesetzt 0,5µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD107a-Alexa Fluor 647:	Klon eBio1D4B, eingesetzt 0,2µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus
anti-CD16/CD32 (Fc-Block):	Klon 2.4G2, eingesetzt 5µg/ml, BD Pharmingen, Ratte anti-Maus
anti-MHCII-FITC:	Klon M5/114.15.2, eingesetzt 1,25µg/ml, eBioscience, Ratte anti-Maus

2.5.4 Antikörper für ELISA

anti-IL-6 Erstantikörper:	Klon MP5-20F3, eingesetzt 0,5µg/ml, BD Pharmingen, unmarkiert, Ratte anti-Maus
anti-IL-6 Zweitantikörper:	Klon MP5-32C11, eingesetzt 0,5µg/ml, BD Pharmingen, biotinyliert, Ratte anti-Maus

2.6 Mäuse

Alle Mäuse hatten als genetischen Hintergrund den C57BL/6-Stamm.

C57BL/6:	Wildtyp-Stamm, ZVTE der Universitätsmedizin Mainz
<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh} :	Mastzell-defizienter Stamm, ursprünglich von Prof. Marcus Maurer (Charité, Berlin), in der ZVTE der Universitätsmedizin Mainz weiter gezüchtet
<i>TNF</i> ^{-/-} :	TNF-defizienter Stamm, zur Verfügung gestellt von Dr. K. Steinbrink (Universitätsmedizin Mainz)
<i>GM-CSF</i> ^{-/-} :	GM-CSF-defizienter Stamm, zur Verfügung gestellt von Dr. Laura Codarri (Institut für Experimentelle Neuroimmunologie, Zürich)
<i>IL-1α/β</i> ^{-/-} :	IL-1α/β-defizienter Stamm; zur Verfügung gestellt von Dr. E. von Stebut-Borschitz (Universitätsmedizin Mainz)
<i>IL-1RI</i> ^{-/-} :	IL-1-Rezeptor I-defizienter Stamm, zur Verfügung gestellt von Dr. E. von Stebut-Borschitz (Universitätsmedizin Mainz)

2.7 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden an einer sterilen Werkbank, mit sterilen Materialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung und Stimulation der Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator (Brutschrank) bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

2.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand) bestimmt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dieser Vitalfarbstoff färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Es wurden insgesamt 4 Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten) ausgezählt, wobei tote Zellen in der Berechnung nicht berücksichtigt werden. Die Gesamt-Lebendzellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Zellen/Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Gesamtvolumen} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

2.7.2 Präparation von Knochenmarkszellen

Alle Versuchstiere wurden mittels CO₂ abgetötet und die beiden Hinterbeine vom Hüftgelenk abgetrennt. Ober- und Unterschenkelknochen (Tibia und Femur) wurden weiterhin vom Knie- und Fußgelenk getrennt und die Muskulatur entfernt. Die Knochen wurden mit Isopropanol abgespült und danach zweimal mit MEM gewaschen. Die Knochen wurden mit Hilfe einer Schere an beiden Enden geöffnet und das Knochenmark mit einer Spritze (Kanülengröße 0,55x0,25mm) und MEM aus den Markhöhlen ausgespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde zunächst mit Hilfe einer sterilen Glaspipette resuspendiert, so dass eine homogene Zellsuspension entstand. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb filtriert (70µm) um diese von groben Resten (z.B. Knochensplitter) zu befreien. Das Filtrat wurde abzentrifugiert (600xg, 10min, 4°C) und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von Gey's Lysepuffer (zur Differenzierung von BMNC) oder durch ACK-Puffer (zur Anreicherung von Neutrophilen) wurden die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach ca. 1min wurde die Reaktion durch Zugabe

des vierfachen Volumens an MEM abgestoppt. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert, in einem definierten Volumen aufgenommen und die Zellzahl ermittelt.

2.7.3 Differenzierung von „bone marrow-derived mast cells“ (BMMC) aus Knochenmarkszellen

Die BMMC wurden, wenn nicht anders angegeben, immer aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Wildtypmäusen generiert. Zunächst erfolgte die Isolation von Knochenmarkszellen, wie unter Kap. 2.7.2 beschrieben. Die gewonnene Zellsuspension wurde nach der Zellzahlbestimmung auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in KL-MZF eingestellt und in sterile 24-well Platten mit 1ml/well gegeben. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit frischem KL-MZF versetzt und dabei auf neue 24-well Platten umgesetzt. Hierbei wurde zunächst die Hälfte des Mediums abgesaugt, die Kultur durch vorsichtiges Resuspendieren auf eine neue Platte umgesetzt und anschließend wieder mit frischem Medium aufgefüllt. So konnten die entstehenden BMMC von adhärenenten Zellen, wie z.B. Makrophagen, getrennt werden. Nach vier Wochen konnten die generierten BMMC für Versuche verwendet werden.

2.7.4. Isolierung von Neutrophilen aus murinem Knochenmark mittels MACS

Vorbereiten der MACS-Zellseparationssäulen

Die Isolierung von Neutrophilen aus Knochenmarkszellen erfolgte mittels MACS. Hierfür wurden MACS-Zellseparationssäulen (Fa. Miltenyi) vor Gebrauch mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe jeweils mit 20ml PBS/0,1% Tween 20, danach mit PBS und zuletzt mit Isopropanol gespült. Die Säulenkappen wurden ebenfalls mit Isopropanol desinfiziert und getrocknet. Vor Zugabe der Zellen wurden die Säulen mit 5ml PBS/0,5% BSA gespült um das restliche Isopropanol zu entfernen.

Markierung und Isolierung von Neutrophilen aus Knochenmarkszellen

Neutrophile Granulozyten wurden, wenn nicht anders angegeben, immer aus Knochenmarkszellen von C57BL/6-Wildtypmäusen angereichert. Zunächst wurden Knochenmarkszellen aus Mäusen gewonnen (siehe Kap. 2.7.2). Die Isolierung von Neutrophilen aus den Knochenmarkszellen erfolgte mit Hilfe des anti-Ly-6G Microbead Kits

(Miltenyi Biotech) über eine positive MACS-Selektion⁹. Hierfür wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml in 4°C kaltem GM-Puffer eingestellt. Die Zellen wurden mit anti-Ly-6G-Biotin ($50 \mu\text{l}/1 \times 10^8$ Zellen) für 10min und anschließend mit anti-Biotin-Microbeads ($100 \mu\text{l}/1 \times 10^8$ Zellen) für 15min bei 4°C inkubiert. Nach den Inkubationen wurden die Zellen zweimal in GM-Puffer gewaschen ($600 \times g$, 10min, 4°C) und in 5ml GM-Puffer aufgenommen (max. 5×10^8 Zellen/5ml/Säule). Die Zellen wurden in 1ml-Volumen über die Separationssäule gegeben. Nach Durchlauf der Zellen wurden die Säulen zweimal mit 3ml GM-Puffer gespült. Die Separationssäulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die verbliebenen Zellen in den Säulen mit 5ml GM-Puffer und sterilem Säulenstempel eluiert. Die isolierten Neutrophilen wurden zweimal in Testmedium gewaschen, bevor sie für Experimente auf 1×10^6 Zellen/ml in Testmedium eingestellt wurden. Um die Reinheit der Neutrophilen zu überprüfen, wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf die Expression von Gr-1 und MHCII mittels FACS analysiert. Der Anteil der isolierten Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}-Zellpopulation lag zwischen 92-96%.

2.7.5 Aktivierung von *in vitro* generierten BMDC

Aktivierung von Mastzellen durch Kreuzvernetzung des membrangebundenen IgE

Vier Wochen alte Mastzellen wurden zunächst drei Tage in KL-MZF mit $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ anti-DNP-IgE präinkubiert. Hierfür wurden die Mastzellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Kulturplatten gegeben. Nach der Präinkubation wurden die IgE-beladenen Mastzellen geerntet und zweimal in Testmedium gewaschen um nicht-gebundenes IgE zu entfernen. Die Aktivierung der anti-DNP-IgE beladenen BMDC erfolgte durch die Kreuzvernetzung mit plattengebundenem DNP-HSA ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) als Antigen. Die Beschichtung der Kulturplatten mit DNP-HSA wurde in Kopplungspuffer bei 37°C über Nacht durchgeführt. Vor Zugabe der Zellen auf die beschichteten Kulturplatten wurde der Kopplungspuffer entfernt und die Kulturplatte zweimal mit Testmedium gewaschen.

Kontrolle der Mastzell-Aktivierung

Um sicherzugehen, dass Mastzellen in den Experimenten aktiviert waren, wurde zur Kontrolle ein IL-6-ELISA mit Überstände der Mastzellkulturen durchgeführt (siehe Kap. 2.9).

⁹ Positive MACS-Selektion: Zielzellen werden mit Microbeads markiert und verbleiben in der Säule. Nach Entfernung der Säule vom Magneten können die Zielzellen mit GM-Puffer eluiert werden.

Desweiteren wurde zum Nachweis der Degranulation die CD107a-Expression¹⁰ auf der Mastzelloberfläche mittels FACS analysiert. Für diesen Degranulationsnachweis wurde der Antikörper gegen CD107a in einer Konzentration von 0,2µg/ml zu Beginn der Mastzellstimulation hinzugegeben. Nach 1h bei 37°C wurden die Zellen geerntet, in GM-Puffer gewaschen und unverzüglich am FACS gemessen.

2.8 FACS-Analyse

Die Oberflächenfärbung von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfolgte in einer 96-well Spitzbodenplatte. Hierfür wurden die Zellen in 50µl GM-Puffer mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Kap. 2.5.3) für 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 100µl GM-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 600xg, 2min) und für die FACS-Analyse in 200µl GM-Puffer aufgenommen. Die Messungen erfolgten am FACS-Canto, LSR2 oder FACS-Calibur (alle Fa. BD). Die Auswertungen wurden mit Hilfe der Software FACS-Diva (Fa. BD) oder mit FlowJo (Fa. Tree Star) durchgeführt.

2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der quantitative Nachweis von sezerniertem IL-6 in Kulturüberständen von Mastzellen erfolgte durch ELISA, die nach der Sandwichmethode durchgeführt wurden. Alle Proben wurden als Verdünnungsreihe auf die ELISA-Platten (Maxisorb, Fa. Nunc) aufgegeben und auf jeder Platte wurde ein bekannter Standard als Referenz zum Einstellen einer Eichgeraden mitgeführt. Die Auswertung der photometrischen Messung erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm Excel mit Hilfe eines Makros, für dessen Entwicklung wesentlich Dr. S. Jin (Universitätsmedizin, Mainz) verantwortlich war.

Die Beschichtung der 96-well Platten mit dem unmarkierten Primärantikörper (50µl/well, Klon MP5-20F3, Fa. BD) erfolgte durch eine 24-stündige Inkubation in Kopplungspuffer bei 4°C. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Freie Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit Blockpuffer (50µl/well) für 30min bis

¹⁰ CD107a (LAMP-1, „lysosome associated membrane protein-1“) ist ein lysosomales Glykoprotein, welches bei der Degranulation von Mastzellen an die Zelloberfläche gelangt. Durch Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen CD107a kann das Maß der Degranulation mittels FACS detektiert werden.

1h bei 37°C abgesättigt. Die Überstände und eine bekannte IL-6 Positivkontrolle wurden in Blockpuffer 1:2 titriert (50µl/well) und für 1h bei 37°C in antikörperbeschichteten Wells inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten folgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (50µl/well, Klon MP5-32C11, Fa. BD). Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurde für 30min bei 37°C das mit Peroxidase gekoppelte Streptavidin (Roche) in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockpuffer zugegeben (50µl/well). Nach drei weiteren Waschschrritten wurde die Substratlösung (1mg/ml ABTS¹¹ in Citratpuffer mit 0,0075% H₂O₂; 50µl/well) hinzugegeben. Die photometrische Messung wurde mit Genios der Fa. Tecan bei 410nm durchgeführt.

2.10 Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies („oxidative burst“) in neutrophilen Granulozyten

Der „oxidative burst“ beschreibt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS). Die Produktion von ROS in neutrophilen Granulozyten erfolgt zur Abtötung von Mikroorganismen. Durch die Messung der ROS-Bildung kann somit ein Rückschluss auf den Aktivierungszustand von Neutrophilen gezogen werden. Der Nachweis von intrazellulärem ROS erfolgte durch die Verwendung von DCFH-DA¹². Das farblose DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembranen und wird durch intrazelluläre Esterasen zu nicht-fluoreszierendem DCFH hydrolysiert. In Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies wird DCFH zu stark fluoreszierendem 2,7-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert [63]. Der Anstieg der Fluoreszenz kann mittels FACS detektiert werden.

Für die Messungen des „oxidative burst“ erfolgte die Anreicherung der neutrophilen Granulozyten mit NaN₃-freiem GM-Puffer. In einer 48-well Kulturplatte wurden frisch isolierte Neutrophile (2,5x10⁵ Zellen/well) alleine in Testmedium, in Kokultur mit Mastzellen oder mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Neutrophile mit 0,5µM fMLP (Calbiochem) stimuliert. Nach definierten Zeitpunkten wurde das Experiment gestoppt, indem die Zellen geerntet und mit 4°C kaltem GM-Puffer (ohne NaN₃) gewaschen (Zentrifugation: 600xg, 5min) wurden. Die Zellen wurden mit anti-Gr-1-APC und mit DCFH-DA für 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das DCFH-DA wurde vor jedem Experiment aus einer Stammlösung (50mM gelöst in DMSO) in

¹¹ ABTS: 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)

¹² DCFH-DA: 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat

GM-Puffer frisch angesetzt und in einer Endkonzentration von $5\mu\text{M}$ verwendet. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen und unverzüglich am FACS analysiert.

2.11 In vitro Phagozytoseassay

Zur Quantifizierung der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wurden Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Polystyrolpartikel ($1\mu\text{m}$; Fluoresbrite® polychromatic red microspheres; Polysciences, Warrington, PA) verwendet. Nach Aufnahme durch Phagozytose in die Zellen kann die Fluoreszenz dieser Polystyrolpartikel mittels FACS als Phycoerythrin (PE)-Signal detektiert werden.

Für die Durchführung des Phagozytoseassays wurden Zellen und Reagenzien (LPS, PE-Polystyrolpartikel) in Testmedium aufgenommen. Frisch angereicherte Neutrophile wurden entweder alleine in Testmedium, in Kokultur mit Mastzellen oder mit Überständen von Mastzellkulturen inkubiert. Als Referenz wurden zusätzlich Neutrophile mit 100ng/ml LPS stimuliert. Neutrophile wurden in $0,25 \times 10^6 / 250\mu\text{l}$ Testmedium ausplattiert. Mastzellen, Überstände der Mastzellkulturen und LPS wurden ebenfalls in $250\mu\text{l/well}$ dazu gegeben. Es erfolgte eine Präinkubation von 2h bei 37°C im Brutschrank. Nach der Präinkubation wurden die Zellen mit PE-Polystyrolpartikeln ($2,5\mu\text{l/well}$ aus einer Suspension mit $4,55 \times 10^{10}$ Partikel/ml) für weitere 30-45min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert ($600 \times g$, 5min) und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in $100\mu\text{l}$ GM-Puffer resuspendiert und in eine 96-well Spitzbodenplatte überführt. Hier wurden die Zellen dreimal mit $100\mu\text{l}$ GM-Puffer gewaschen (Zentrifugation: $600 \times g$, 2min) um nicht-aufgenommene PE-Partikel zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern auf Zelloberflächenmoleküle 20min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit $100\mu\text{l}$ GM-Puffer wurden die Zellen mit Cytifix (BD Pharmingen) nach Herstellerangaben fixiert und anschließend im FACS analysiert.

2.12 Apoptosebestimmung von Neutrophilen durch Färbung mit Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI)

In frühen Stadien der Apoptose gelangt das Phospholipid Phosphatidylserin (PS), welches sich normalerweise nur auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet, an die Außenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein Protein, das Calcium-abhängig mit einer sehr hohen Affinität an PS binden kann. Durch die Markierung der Zellen mit Annexin V-FITC können somit apoptotische Zellen mittels FACS detektiert werden. Annexin V kann jedoch ebenfalls in nekrotische Zellen mit permeabilisierter Membran gelangen und somit an PS auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran binden. Daher ist es nicht möglich, durch die alleinige Färbung mit Annexin V-FITC zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Deshalb ist unbedingt eine kombinierte Färbung von Annexin V-FITC mit Propidium-Iodid (PI) notwendig. Dieser Farbstoff dringt in Zellen mit permeabel gewordener Zellmembran ein und interkaliert in die DNA. Durch die gleichzeitige Färbung mit Annexin V-FITC und PI können frühapoptotische Zellen ($\text{AnnexinV}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$) von spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen ($\text{AnnexinV}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$) unterschieden werden [64,65].

Im Apoptoseassay wurden frisch angereicherte Neutrophile ($0,25 \times 10^6$ Zellen/well) in Kokultur mit Mastzellen oder mit Überständen von Mastzellkulturen in einer 48-well Platte für 16-20h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert ($600 \times g$, 5min). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in $100 \mu\text{l}$ GM-Puffer resuspendiert. Es erfolgte die Oberflächenfärbung auf Gr-1 für 20min bei 4°C in einer 96-well Spitzbodenplatte. Die Zellen wurden in der Platte zweimal mit $100 \mu\text{l}$ PBS gewaschen (Zentrifugation: $600 \times g$, 2min). Danach wurden die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Annexin-Bindungspuffer [1x] aufgenommen und in große FACS-Röhrchen überführt. Zu jeder Probe wurde Annexin V-FITC (Fa. BD) in einer Verdünnung von 1:20 dazu gegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von $400 \mu\text{l}$ Annexin-Bindungspuffer [1x]. Das Propidium-Iodid (1:200 aus $50 \mu\text{g/ml}$ -Stammlösung) wurde während der FACS-Analyse unmittelbar vor der Messung der Proben hinzugegeben.

2.13 Apoptosebestimmung von Neutrophilen mittels der Nicoletti-Methode

Die Apoptosebestimmung beim Nicolettiassay beruht auf der Färbung von DNA mit Propidium-Iodid [65]. Im späten Stadium der Apoptose erfolgt die Fragmentierung der DNA in oligonukleosomale Einheiten durch spezifische Endonukleasen. Apoptotische Zellen zeigen daher im FACS-Histogramm eine geringere Fluoreszenzintensität des Propidium-Iodids verglichen mit vitalen Zellen. Nach Färbung mit PI werden die DNA-Fragmente von apoptotischen Zellen im FACS als breiter, subdiploider Peak detektiert und können von nicht-apoptotischen Zellen mit intakter DNA, welche einen schmalen Peak mit höherer Fluoreszenzintensität zeigen, unterschieden werden.

Für die Durchführung des Nicolettiassays wurden frisch angereicherte Neutrophile ($0,25 \times 10^6$ Zellen/well) mit Überständen von Mastzellkulturen in einer 48-well Platte für 24h und 48h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert (600xg, 5min). Die Zellpellets wurden in 100µl Nicoletti-Puffer resuspendiert, in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und für 2h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (600xg, 2min) und in 200µl GM-Puffer aufgenommen.

2.14 Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen mit BMMC

Mastzelllose Mäuse des Stammes *Kit^{W-sh/W-sh}* wurden mit BMMC rekonstituiert. Die BMMC wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6-Stamm), wie unter 2.7.2 und 2.7.3 beschrieben, generiert. Vor der Rekonstitution wurden die BMMC zweimal mit PBS gewaschen und auf 25×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt. Zur Rekonstitution wurden 5×10^6 Zellen den Mäusen intravenös in die Schwanzvene appliziert. 16 Wochen nach der Injektion wurden die Mäuse in Versuchen verwendet.

2.15 In vivo Phagozytoseassay und Entnahme der bronchoalveolären Lavage (BAL) und der Lungen

Für *in vivo* Untersuchungen der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wurde das Modell einer LPS-induzierten Atemwegsentzündung gewählt. Hierfür wurden Mäuse zunächst mit Ketamin-ratiopharm®/Rompun (2%) narkotisiert. Danach wurden den Mäusen intranasal 1 µg LPS in Kombination mit $1,5 \times 10^8$ IgG-opsonisierten PE-Polystyrolpartikeln (1 µm; Fluoresbrite® polychromatic red microspheres; Polysciences, Warrington, PA) appliziert. Die Opsonisierung der Polystyrolpartikel mit einem IgG-Antikörper sollte eine schnellere Erkennung und Phagozytose der Partikel durch die Neutrophilen ermöglichen. Nach 8h wurden die Versuchstiere abgetötet und die bronchoalveoläre Lavage (BAL) und die Lungen entnommen. Für die Entnahme der BAL wurden 1ml PBS mit einer 1ml Spritze durch eine Trachealkanüle langsam in die Trachea hineingegeben und sofort wieder entnommen. Die BAL wurde in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgenommen und abzentrifugiert (600xg, 10min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 200 µl 4°C kaltem PBS resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung (Cytospins/FACS-Analyse) auf Eis gelagert. Die Gesamtzellzahl der BAL wurde durch Zellzählung, wie unter Kap. 2.7.1 beschrieben, ermittelt. Für die FACS-Analyse wurden die BAL-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf die Expression von Gr-1 und CD11b auf Neutrophilen untersucht. Nach Ende der Antikörperfärbung und der darauf folgenden Waschschrte wurden die BAL-Zellen mit 1% Paraformaldehyd fixiert und anschließend am FACS gemessen. Nach Entnahme der BAL wurden die Lungen aus den Mäusen herauspräpariert, in 4% Formalin (Roth) fixiert und danach in Paraffin eingebettet um Gewebeschnitte anzufertigen.

2.16 Erstellen und Färben von Cytospins

Mit 100 µl der entnommenen bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden Cytospins angefertigt. Hierfür wurden Zellen in einer Cytofuge (Cytospin 4, Thermo Electron Corporation) auf Objektträger zentrifugiert und fixiert. Danach wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI¹³ (Fa. Fluka) gefärbt. DAPI wird zur Fluoreszenzfärbung von DNA verwendet. Nach Färbung mit diesem Farbstoff entstehen stark blau-fluoreszierende

¹³ DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid

Zellkerne. Somit konnten mittels der DAPI-Färbung Neutrophile aufgrund ihres polymorphen Zellkerns identifiziert werden. Das DAPI wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in Methanol gelöst und in 100 μ l auf die fixierten Zellen auf den Objektträgern gegeben. Die Färbung mit DAPI erfolgte für 10min im Dunkeln. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit Methanol gespült und luftgetrocknet. Die Cytospins wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-Analyzer, Keyence Corporation, Japan) fotografiert und analysiert.

2.17 Färbung von Mastzellen in Lungenschnitten

Zur Färbung von Mastzellen in Lungenschnitten wurden die Lungen in Paraffin eingebettet und 5 μ m dicke Längsschnitte an einem Mikrotom angefertigt, welche anschließend auf einen Objektträger gelegt wurden¹⁴. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst für 10min in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 95%, 70%, 50%, H₂O) für jeweils 10min inkubiert um sie wieder in ein wässriges Milieu zu überführen. Die Schnitte wurden für 1h in PBS/10% FCS/1% BSA geblockt. Die Färbung der Mastzellen erfolgte mit Alexa-Fluor 488 gekoppeltem Avidin (Invitrogen), welches in einer Konzentration von 2 μ g/ml in PBS/10% FCS/1% BSA für 1h auf die Schnitte dazu gegeben wurde. Avidin ist ein Glykoprotein und bindet an Heparin, das in den Granula von Mastzellen gespeichert wird. Nach der Färbung wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Entellan[®] (Fa. Merck) eingedeckelt.

¹⁴ Die Anfertigung der Lungenschnitte erfolgte durch die Kooperationsgruppe Dr. C. Taube (Universitätsmedizin Mainz).

3. Ergebnisse

Mastzellen sind hauptsächlich als Effektorzellen der IgE-vermittelten allergischen Reaktion bekannt. Jedoch zeigen immer mehr Arbeiten der letzten Jahre, dass Mastzellen auch eine entscheidende Funktion in weiteren Entzündungsprozessen der angeborenen und adaptiven Immunität haben. Innerhalb der angeborenen Immunität nehmen Mastzellen bei der Pathogenabwehr eine zentrale Rolle ein, wofür sie vor allem durch ihre Lokalisation an potentiellen Eintrittswegen für Pathogene (z.B. Haut und Schleimhäute) prädestiniert zu sein scheinen. Zudem ermöglicht eine große Bandbreite an Oberflächenrezeptoren auf Mastzellen die Interaktion mit Pathogenen bzw. deren Bestandteilen. Nach Aktivierung produzieren Mastzellen eine enorme Zahl an unterschiedlichen Mediatoren, wodurch sie Entzündungsreaktionen induzieren und fördern können. In vielen Studien wurde gezeigt, dass entzündungsfördernde Mastzell-Mediatoren maßgeblich an der Aktivierung des Gefäßendothels und der Anlockung von Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, zum Infektionsherd beteiligt sind [23,24,66]. Als professionelle Phagozyten stellen neutrophile Granulozyten die früheste Abwehr bei Infektionen dar. Somit scheint der schnelle Mastzell-vermittelte Influx von Neutrophilen ein zentrales Element für die Induktion protektiver Immunantworten bei der Pathogenabwehr zu sein. Darüber hinaus spielt die Mastzell-abhängige Einwanderung von Neutrophilen auch in weiteren entzündlichen Prozessen wie in Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle [67]. Über eine direkte Interaktion von Mastzellen mit Neutrophilen am Entzündungsort ist bisher nicht viel bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Mastzellen einen direkten Einfluss auf wichtige Effektorfunktionen von Neutrophilen nehmen können.

3.1 Mastzellen modulieren die Expression der Aktivierungsmarker CD11b und CD62L auf neutrophilen Granulozyten

Um zu untersuchen, ob Mastzellen einen Einfluss auf die Aktivierung von Neutrophilen haben, wurden zunächst Bedingungen für Kokultur-Experimente etabliert. Hierfür wurden Neutrophile aus frisch isoliertem murinen Knochenmark über eine positive MACS-Selektion anhand des Granulozytenmarkers Ly-6G angereichert. Mastzellen wurden *in vitro* aus Knochenmarkszellen als BMDC („bone marrow-derived mast cells“) generiert. Für die Differenzierung der BMDC wurden die Zellen für drei bis vier Wochen in Medium mit den

wichtigsten Wachstumsfaktoren Interleukin-3, Interleukin-4 und Kit-Ligand (SCF¹⁵, „stem cell factor“) kultiviert. Um in den Kokulturen ganz gezielt nur Mastzellen primär zu aktivieren, wurden diese zuvor mit monoklonalem IgE beladen, welches anschließend mit dem plattengebundenen Antigen DNP-HSA¹⁶ kreuzvernetzt wurde. Im Gegensatz zu humanen Neutrophilen besitzen murine Neutrophile keinen IgE-Rezeptor und können folglich nicht über IgE aktiviert werden. In allen Experimenten dieser Arbeit wurden Mastzellen auf diese Weise aktiviert. Die Aktivierung wurde durch die Expression von CD107a¹⁷ auf der Mastzelloberfläche und zusätzlich durch den Nachweis von IL-6 in den Kulturüberständen der Mastzellen kontrolliert. Um einen Einfluss von DNP-HSA auf Neutrophile ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle Neutrophile alleine in einer mit DNP-HSA beschichteten Kulturplatte inkubiert. Als weitere Kontrolle dienten Mastzellen, die nur mit IgE beladen, aber nicht aktiviert wurden. Unstimulierte Neutrophile, die alleine in Medium inkubiert wurden und LPS-stimulierte Neutrophile dienten als Referenzen.

Die Aktivierung von Neutrophilen geht mit der stark erhöhten Expression des β_2 -Integrins CD11b und der gleichzeitig verminderten Expression des L-Selektins CD62L auf ihrer Zelloberfläche einher [68]. Daher wurde zunächst die Expression dieser Aktivierungsmarker auf Neutrophilen nach Kokultur mit Mastzellen mittels FACS bestimmt (Abb.3.1).

¹⁵ SCF: SCF bindet auf Mastzellen an den Oberflächenrezeptor CD117 (c-Kit) und ist *in vivo* der wichtigste Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen im Menschen und in der Maus.

¹⁶ DNP-HSA: Dinitrophenyliertes humanes Serumalbumin

¹⁷ CD107a ist ein lysosomales Glykoprotein, welches bei der Degranulation von Mastzellen an die Zelloberfläche gelangt und durch einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper gegen CD107a mittels FACS detektiert werden kann.

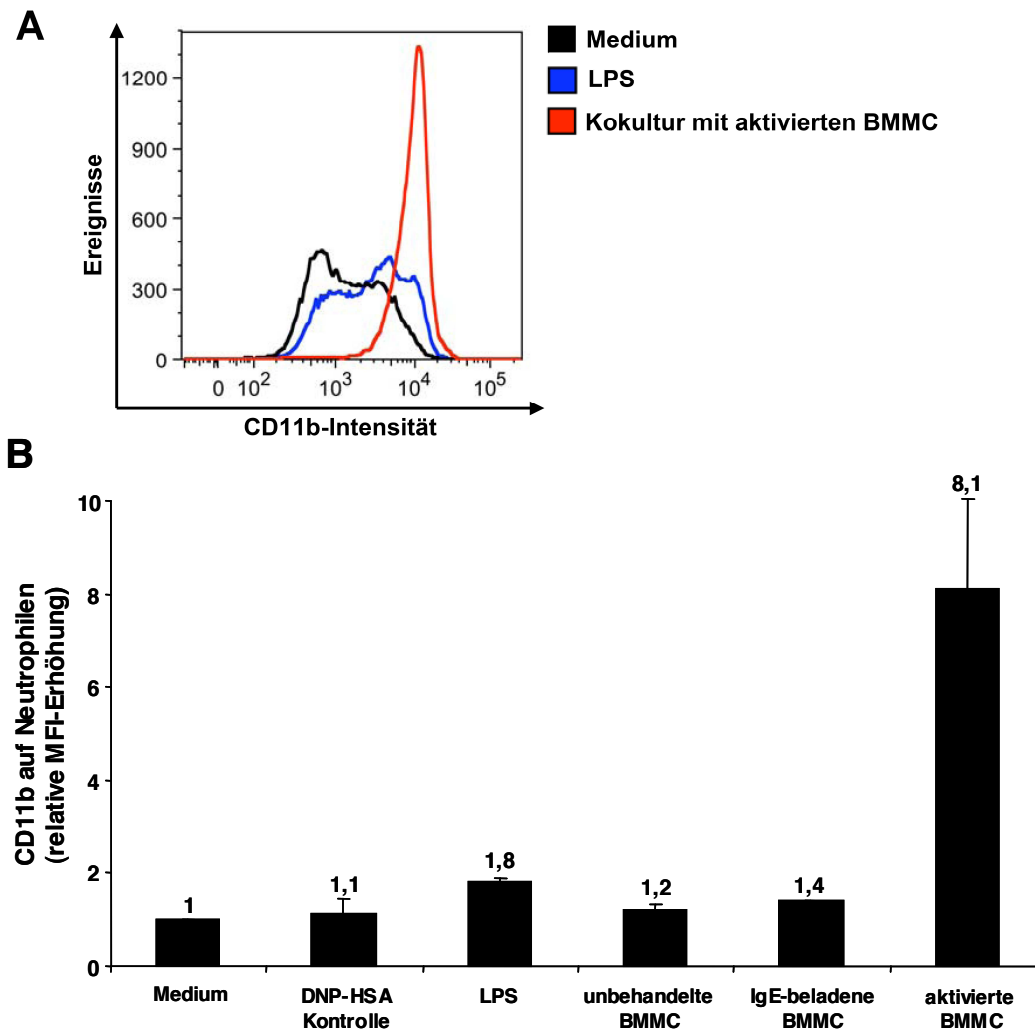


Abb.3.1: Aktivierte Mastzellen steigern die Expression des Aktivierungsmarkers CD11b auf der Zelloberfläche von Neutrophilen. Neutrophile wurden alleine in Medium, mit LPS (100ng/ml) oder in Kokultur mit Mastzellen in einem Zellzahl-Verhältnis von 1:1 bei 37°C inkubiert. IgE-beladene Mastzellen wurden durch Kreuzvernetzung mit DNP-HSA aktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 3h wurden Neutrophile mittels FACS auf die CD11b-Expression analysiert. Neutrophile wurden als Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}-Population bestimmt. **Bild A** zeigt exemplarisch ein Histogramm der CD11b-Expression auf Neutrophilen nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen. **Bild B** stellt die relative Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD11b-Expression auf Neutrophilen dar. Die MFI wurde mit dem geometrischen Mittelwert bestimmt. Die konstitutive Expression von CD11b auf ruhenden Neutrophilen wurde gleich eins gesetzt. n=3.

In Abb.3.1 A ist wie erwartet zu erkennen, dass ruhende Neutrophile eine konstitutive Expression des Oberflächenmoleküls CD11b zeigen. Nach Stimulation mit LPS erhöht sich die CD11b-Expression, aber in Anwesenheit aktivierter Mastzellen steigt diese weiter drastisch an. Abb.3.1 B zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der CD11b-Expression auf Neutrophilen. Die MFI der CD11b-Expression ist als relative Erhöhung zu ruhenden Neutrophilen angegeben. Es ist zu erkennen, dass unbehandelte Mastzellen keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von Neutrophilen haben. Dies gilt ebenfalls für ruhende

Mastzellen, deren Fcε-Rezeptoren nur mit IgE beladen, aber nicht kreuzvernetzt wurden. Die MFI der CD11b-Expression auf Neutrophilen in Gegenwart aktivierter Mastzellen ist um das Achtfache erhöht, während die LPS-Stimulation lediglich eine Erhöhung um etwa das Doppelte bewirkt.

Um zu überprüfen, ob für diese starke Erhöhung der CD11b-Expression lösliche Mastzell-Mediatoren verantwortlich sind oder ein direkter Zellkontakt zwischen Neutrophilen und Mastzellen notwendig ist, wurden in den nächsten Experimenten Neutrophile mit Überständen von Mastzellkulturen inkubiert und anschließend mittels FACS auf ihre CD11b-Expression analysiert.

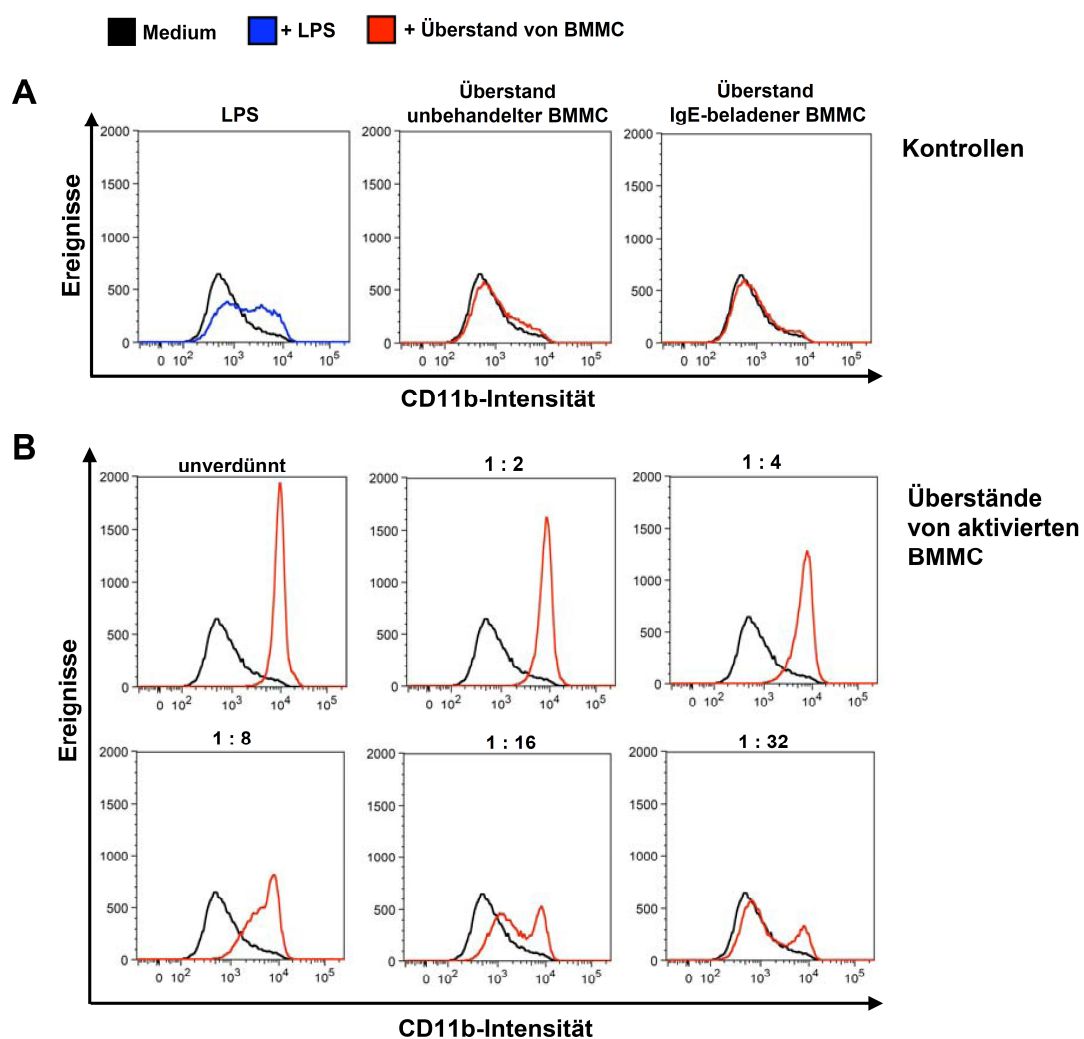


Abb.3.2: Mastzell-Mediatoren steigern die CD11b-Expression auf Neutrophilen konzentrationsabhängig.

IgE-beladene Mastzellen wurden durch Kreuzvernetzung mit DNP-HSA für 12-16h bei 37°C aktiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte und ruhende IgE-beladene Mastzellen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Überstände der Mastzellkulturen abgenommen. Neutrophile wurden in Medium, mit Überständen von Mastzellkulturen oder mit 100ng/ml LPS für 3h inkubiert und anschließend mittels FACS auf ihre CD11b-Expression analysiert. Die Histogramme zeigen die CD11b-Expression auf Neutrophilen (Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}). **Bild A** zeigt die Kontrollen, **Bild B** zeigt die CD11b-Expression auf Neutrophilen nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellen in den angegebenen Verdünnungsstufen.

In Abb.3.2 ist zu erkennen, dass sich die CD11b-Expression auf Neutrophilen durch Zugabe von Überständen aktivierter Mastzellkulturen wie zuvor in den Kokultur-Experimenten drastisch erhöht. Überstände unbehandelter bzw. ruhender IgE-beladener Mastzellen zeigen keinen Einfluss auf die CD11b-Expression (Abb.3.2 A). In Gegenwart von Überständen aktivierter Mastzellen wird jedoch die CD11b-Expression auf Neutrophilen enorm gesteigert (Abb.3.2 B). Hierbei ist die CD11b-Expression nach Inkubation mit unverdünntem Mastzell-Überstand am stärksten. Mit steigender Verdünnung nimmt die CD11b-Expression auf Neutrophilen ab. Der Einfluss von LPS auf die CD11b-Expression der Neutrophilen ist lediglich vergleichbar mit der stärksten Verdünnung der Mastzell-Überstände. Diese Effekte sind in Abb.3.3 aus mehreren Experimenten zusammengefasst.

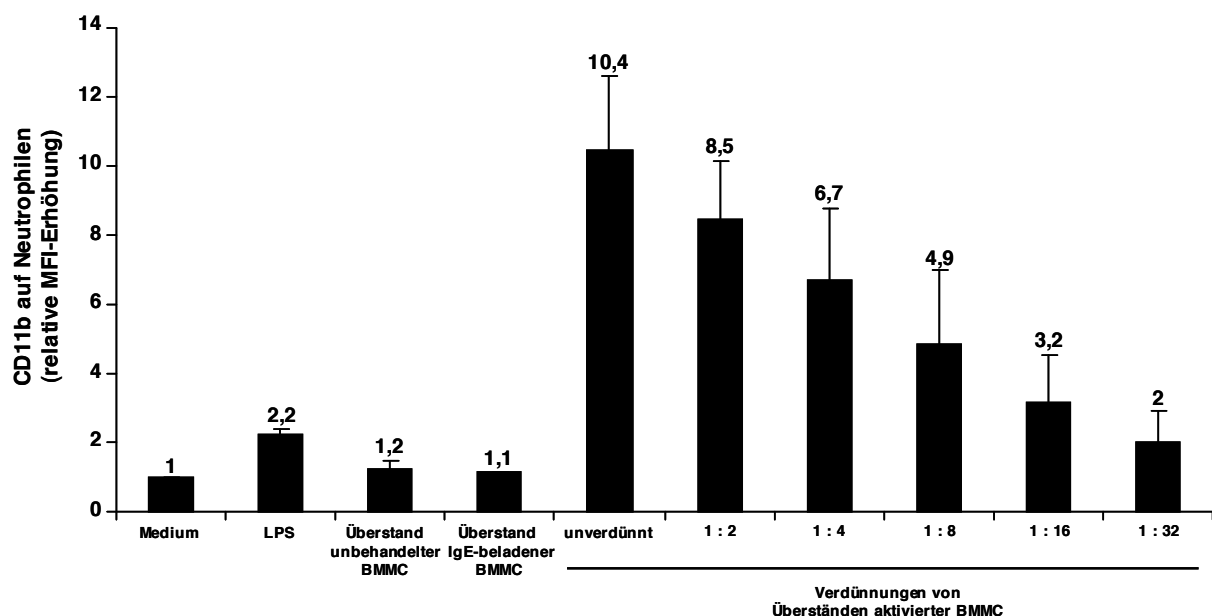


Abb.3.3: Verstärkte CD11b-Expression auf Neutrophilen in Anwesenheit löslicher Mastzell-Mediatoren.

Die Versuche wurden wie in Abb.3.2 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist die relative MFI-Erhöhung (geometrischer MFI) der CD11b-Expression auf Neutrophilen. Die konstitutive CD11b-Expression auf ruhenden Neutrophilen wurde gleich eins gesetzt. n=3.

Die Zugabe von unverdünnten Überständen aktivierter Mastzellkulturen erhöht die CD11b-Expression auf Neutrophilen nach 3h mindestens um das Zehnfache verglichen mit ruhenden Neutrophilen (Abb.3.3). Die Verdünnung der Mastzell-Überstände resultiert in einer geringeren CD11b-Expression auf der Zelloberfläche von Neutrophilen. Die LPS-Stimulation erhöht die CD11b-Expression in diesem Zeitraum lediglich um den Faktor 2,2. Der LPS-Effekt ist somit deutlich geringer als der Einfluss von Mastzellen.

Zusätzlich zu der Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b wurde ebenfalls die Expression von CD62L auf Neutrophilen in Gegenwart von Mastzellen untersucht (Abb.3.4). Auf ruhenden Neutrophilen wird CD62L sehr stark exprimiert, nach Aktivierung jedoch wird CD62L von der Zelloberfläche enzymatisch abgespalten („L-Selektin-Shedding“). Daher kann der Aktivierungsstatus von Neutrophilen durch die Abnahme der CD62L-Expressionsstärke mittels FACS bestimmt werden.

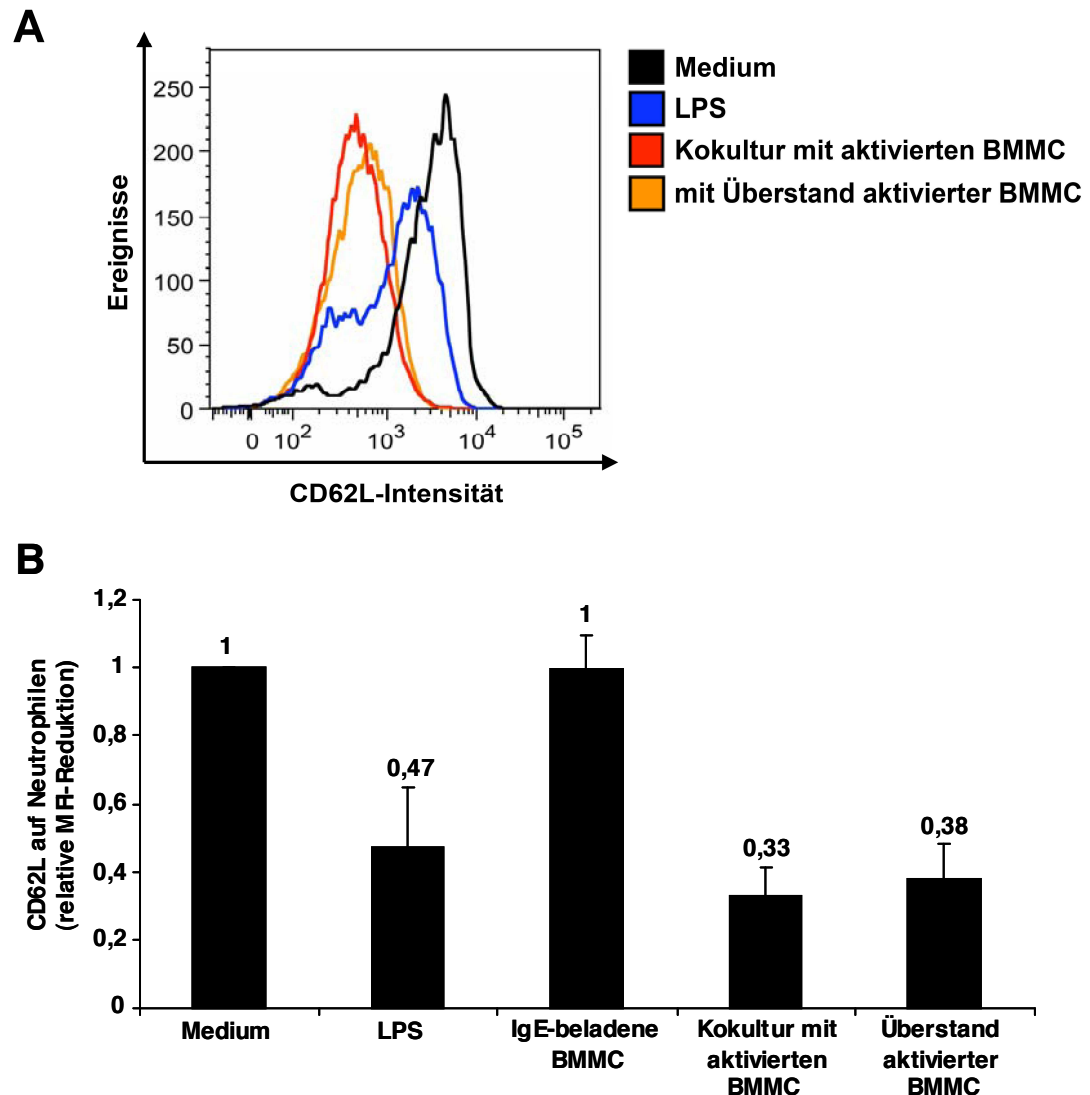


Abb.3.4: Aktivierte Mastzellen bewirken die Reduktion der CD62L-Expression auf Neutrophilen.

Neutrophile wurden in Kokultur mit Mastzellen oder mit Überständen von Mastzellkulturen für 5h bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung von IgE-beladenen Mastzellen erfolgte mit DNP-HSA. Die Überstände von Mastzellen wurden generiert, indem Mastzellen für 12-16h bei 37°C aktiviert wurden. In den Kokulturen wurden Mastzellen erst zu Beginn des Experiments aktiviert. Als Kontrollen wurden Neutrophile alleine in Medium, mit ruhenden IgE-beladenen Mastzellen oder mit 100ng/ml LPS inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden Neutrophile mittels FACS auf ihre CD62L-Expression untersucht. Neutrophile wurden als Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}-Population bestimmt. **Bild A** zeigt exemplarisch ein Histogramm, in dem Neutrophile hinsichtlich ihrer CD62L-Expressionsstärke abgebildet sind. **Bild B** zeigt die relative MFI-Reduktion von CD62L auf Neutrophilen. Hierbei wurde die konstitutive CD62L-Expression auf ruhenden Neutrophilen gleich eins gesetzt. n=3.

In Abb.3.4 ist zu erkennen, dass der starke Einfluss von Mastzellen auf den Aktivierungsstatus von Neutrophilen auch anhand der CD62L-Expression nachgewiesen werden kann. In Gegenwart aktivierter Mastzellen bzw. Überständen aktivierter Mastzellkulturen wird die auf ruhenden Neutrophilen konstitutiv hohe CD62L-Expression stark reduziert (Abb.3.4 A). Dies wird vor allem durch die reduzierte MFI der CD62L-Expression in Gegenwart von Mastzellen verdeutlicht (Abb.3.4 B). Aktivierte Mastzellen und ihre löslichen Mediatoren führen zu einer Abnahme der CD62L-Expressionsstärke um 60-70%. Die LPS-Stimulation bewirkt hingegen eine Reduktion von CD62L um höchstens 50%. Auch hier zeigt sich, wie im Fall des CD11b, dass der Einfluss aktivierter Mastzellen auf die CD62L-Expression von Neutrophilen stärker ist als die LPS-Stimulation.

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass Mastzellen bzw. deren lösliche Mediatoren den Aktivierungsstatus von Neutrophilen enorm steigern. Dies wurde durch die Mastzell-induzierte Modulation der CD11b- und CD62L-Expression auf Neutrophilen gezeigt. Dieser Effekt ist deutlich stärker als die LPS-Stimulation von Neutrophilen. In weiteren Versuchen sollte daher geklärt werden, ob Mastzellen auch einen Einfluss auf wichtige Effektorfunktionen von Neutrophilen haben, wie auf den „oxidative burst“ und auf die Phagozytoseaktivität.

3.2 Mastzellen verstärken den „oxidative burst“ von Neutrophilen

Der „oxidative burst“ beschreibt den Prozess der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) neutrophiler Granulozyten zur Abtötung von Mikroorganismen. Die Bildung von ROS kann durch die Färbung der Zellen mit DCFH-DA¹⁸ gemessen werden, welches durch H₂O₂ zu DCF hydrolysiert und dann grün fluoresziert. Diese Fluoreszenz kann mittels FACS detektiert werden [69]. Zur Untersuchung, ob Mastzellen einen Einfluss auf den „oxidative burst“ haben, wurden Neutrophile entweder in Kokultur mit aktivierten Mastzellen oder mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Neutrophile, die mit fMLP¹⁹ stimuliert wurden. fMLP ist ein bekannter Stimulator der ROS-Produktion in Neutrophilen. Die Bildung von ROS wurde über

¹⁸ DCFH-DA: 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat

¹⁹ fMLP: N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin. fMLP ist ein bakterielles chemotaktisches Peptid.

einen Zeitraum von 120min mittels FACS verfolgt. Abb.3.5 zeigt den relativen Anstieg der DCF-Fluoreszenz zu unstimulierten Neutrophilen.

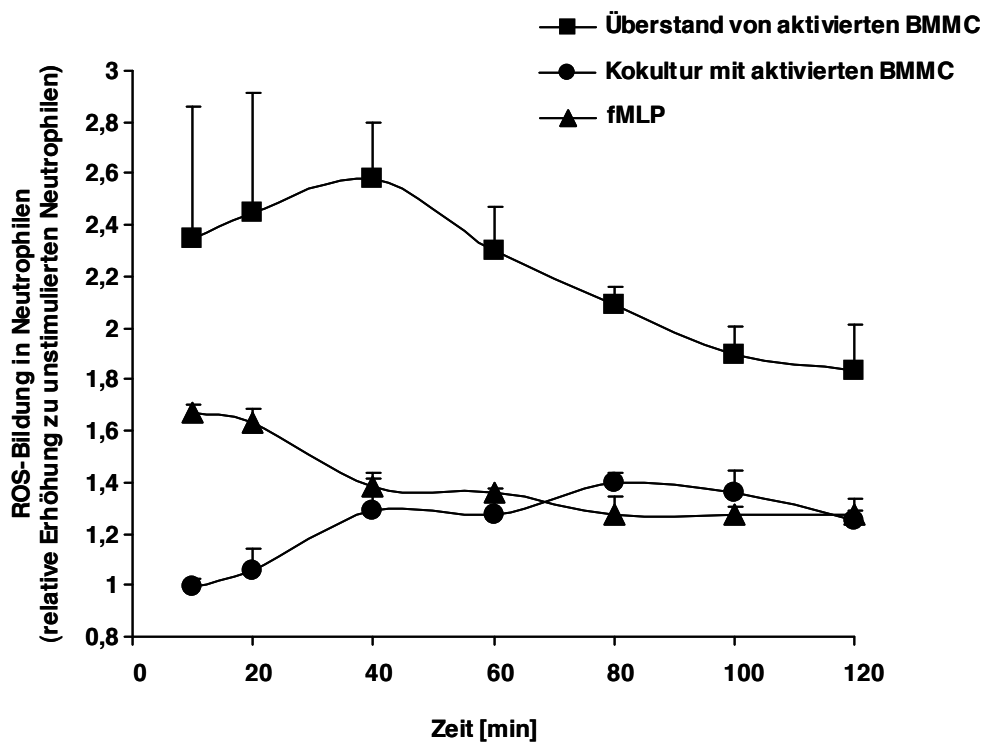


Abb.3.5: Aktivierte Mastzellen erhöhen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Neutrophilen.

Neutrophile wurden alleine in Medium, in Kokultur mit aktivierten Mastzellen oder mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Neutrophile mit $0,5\mu\text{M}$ fMLP stimuliert. Es erfolgte eine Messung über einen Zeitraum von 120min. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Zellen auf Eis gestellt und geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und mit anti-Gr-1-APC und $5\mu\text{M}$ DCFH-DA für 20min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen unmittelbar mittels FACS analysiert. Die Bildung von ROS ist als relative Erhöhung der geometrischen MFI zu unstimulierten Neutrophilen angegeben. $n=3$.

Die Ergebnisse aus Abb.3.5 verdeutlichen, dass Mastzellen einen starken Einfluss auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Neutrophilen haben. Die Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellen erhöht die ROS-Produktion in Neutrophilen bereits nach zehn Minuten um mehr als das Doppelte. Nach 40min ist mit einem 2,5-fachen Anstieg zu unstimulierten Neutrophilen das Maximum erreicht. Danach erfolgt zwar ein Rückgang der ROS-Bildung, doch diese bleibt trotzdem über den gesamten Zeitraum um das Doppelte höher als in ruhenden Neutrophilen. Auch in Kokultur mit aktivierten Mastzellen erfolgt ein Anstieg der ROS-Bildung von Neutrophilen. Dieser Anstieg ist jedoch etwas verzögert und nicht so hoch wie durch die Zugabe von Mastzell-Überständen. Dies ist jedoch zu erwarten, da hier die Mastzellen erst mit Beginn der Kokultur aktiviert wurden. Der Einfluss von fMLP ist deutlich geringer als der Effekt der Mastzell-Überstände.

3.3 Mastzellen verstärken die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen

Die Hauptfunktion neutrophiler Granulozyten ist die Bekämpfung von Erregern in entzündetem Gewebe durch Phagozytose. Daher war eine entscheidende Frage, ob Mastzellen die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen beeinflussen können. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst ein Protokoll für die experimentellen Bedingungen etabliert. Um die Phagozytose durch Neutrophile quantitativ bestimmen zu können, wurden in den Experimenten $1\mu\text{m}$ große Fluoreszenzfarbstoff-markierte Polystyrolpartikel eingesetzt. Nach Aufnahme durch Zellen kann die Fluoreszenz dieser Partikel mittels FACS als PE²⁰-Signal detektiert werden. Somit ist es möglich, den prozentualen Anteil aller phagozytierenden Neutrophilen und zudem die Stärke der Phagozytoseaktivität der Zellen zu bestimmen. Das Letztere kommt durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der phagozytierenden PE-positiven Zellen zum Ausdruck.

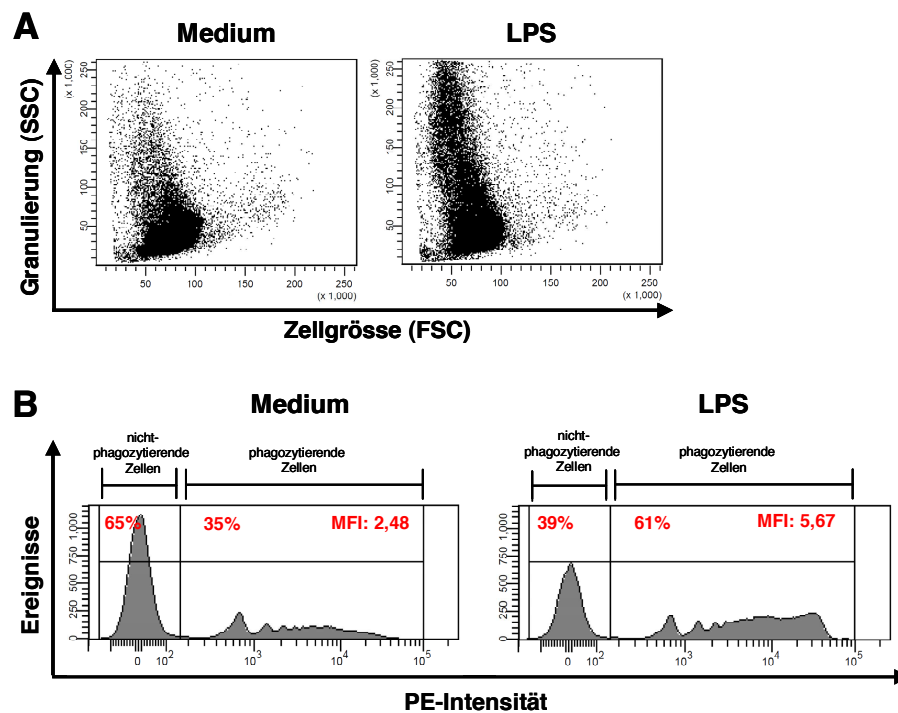


Abb.3.6: Quantifizierung der phagozytierenden Neutrophilen durch Aufnahme von PE-Polystyrolpartikeln mittels FACS-Analyse. Neutrophile wurden für 2h bei 37°C mit 100ng/ml LPS stimuliert oder unbehandelt gelassen. Danach erfolgte für 30min die Inkubation mit PE-Polystyrolpartikeln. Anschließend wurden die Zellen mehrmals gewaschen und für die FACS-Analyse auf das Oberflächenmolekül Gr-1 gefärbt. **Bild A** zeigt phagozytierende Neutrophile in einer „Dot Plot“ Darstellung. In **Bild B** sind dieselben Zellen im Histogramm gemäß ihrer PE-Intensität abgebildet. (MFI $\times 10^{-3}$).

²⁰ PE: Phycoerythrin

Abb.3.6 zeigt exemplarisch die FACS-Analyse der Phagozytose von PE-Partikeln durch unstimulierte bzw. LPS-stimulierte Neutrophile. In der „Dot Plot“-Darstellung (Abb.3.6 A) dieser beiden Ansätze ist zu erkennen, dass nach LPS-Stimulation die Phagozytose durch Neutrophile verstärkt wird, da sich durch die Aufnahme der Partikel auch die Granularität der Zellen erhöht. In den Histogrammen (Abb.3.6 B) sind Neutrophile gemäß ihrer PE-Intensität abgebildet. Die Histogramme geben zum einen den prozentualen Anteil und zum anderen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der phagozytierenden Neutrophilen an. Die MFI korreliert mit der Anzahl der aufgenommenen PE-Partikeln pro Zelle und ist hier mit dem geometrischen Mittelwert angegeben.²¹ Die LPS-Stimulation steigert die Anzahl der phagozytierenden Neutrophilen von 35% auf 61% und die MFI dieser PE-positiven Zellen ist um etwa das Doppelte erhöht. Somit steigt nach Stimulation mit LPS der prozentuale Anteil der phagozytierenden Neutrophilen und zudem zeigen diese Zellen eine stärkere Phagozytoseaktivität, erkennbar durch eine verstärkte Aufnahme von PE-Partikeln pro Zelle.

Um zu klären, ob Mastzellen die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen beeinflussen können, wurden Kokulturen dieser beiden Zelltypen angesetzt. Die Zellen wurden zunächst für 2h inkubiert, um eine Aktivierung der Neutrophilen durch aktivierte Mastzellen zu gewährleisten. Danach wurden die Kokulturen für weitere 30min mit PE-fluoreszierenden Partikeln inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen geerntet und mehrmals gewaschen, um nicht-aufgenommene PE-Partikel zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen auf den Granulozytenmarker Gr-1 gefärbt und im FACS analysiert (Abb.3.7).

²¹ Für die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wurde der geometrische Mittelwert herangezogen, da die gemessenen Fluoreszenzintensitäten keiner Gauss-Verteilung entsprachen und daher der arithmetische Mittelwert nicht angewendet werden konnte.

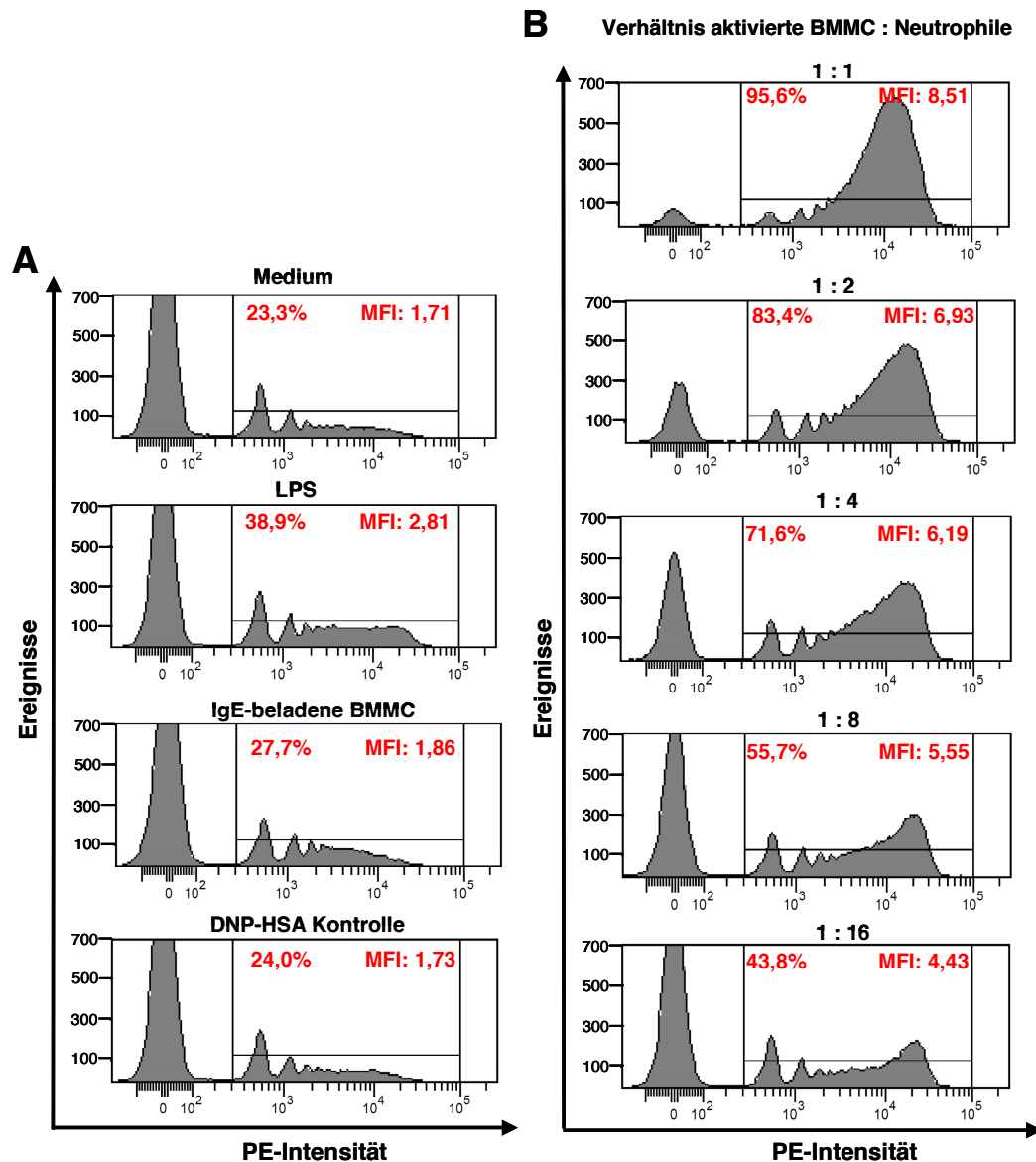


Abb.3.7: Aktivierte Mastzellen verstärken die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen.

Neutrophile wurden alleine in Medium, in Kokultur mit Mastzellen oder mit 100ng/ml LPS bei 37°C inkubiert. Die IgE-beladenen Mastzellen wurden zu Beginn des Experiments mit DNP-HSA aktiviert. Nach 2h erfolgte die Zugabe von PE-Partikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Die Histogramme bilden die gesamte Neutrophilen-Population ($Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}$) ab. **Bild A** zeigt die Referenzen und Kontrollen. **Bild B** zeigt Neutrophile, die mit aktivierten Mastzellen in den angegebenen Zellzahl-Verhältnissen inkubiert wurden. (MFI $\times 10^{-3}$).

Die Ergebnisse in Abb.3.7 zeigen, dass aktivierte Mastzellen die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen drastisch erhöhen. In Abb.3.7 A sind die Referenzen und Kontrollen abgebildet. Die spontane Phagozytose durch ruhende Neutrophile liegt bei ca. 23%. Die LPS-Stimulation steigert den Anteil phagozytischer Zellen auf ca. 39% und die MFI ist 1,6-fach erhöht verglichen mit unstimulierten Neutrophilen. Ruhende IgE-beladene Mastzellen haben keinen Einfluss auf Neutrophile, da sich der Anteil phagozytischer Zellen kaum vom Niveau der

unstimulierten Neutrophilen unterscheidet. Auch die DNP-HSA Kontrolle, bei der Neutrophile alleine in einer mit DNP-HSA beschichteten Kulturplatte inkubiert wurden, zeigt keine Veränderung. Abb.3.7 B stellt die Phagozytose durch Neutrophile nach Kokultur mit aktivierten Mastzellen dar. Bei einem Zellzahl-Verhältnis von Mastzellen zu Neutrophilen von 1:1 beträgt der Anteil phagozytischer Neutrophile 96% und ist somit um das Vierfache höher als bei ruhenden Neutrophilen. Auch die MFI ist hier sehr stark erhöht (Fünffach) gegenüber ruhenden Neutrophilen. Mit abnehmender Anzahl von Mastzellen in der Kokultur reduziert sich der prozentuale Anteil phagozytischer Neutrophile und zudem das Maß der Phagozytoseaktivität der einzelnen Zellen, welches durch die Abnahme der MFI-Werte der PE-positiven Neutrophilen zum Ausdruck kommt. Aber auch bei dem niedrigsten Verhältnis von Mastzellen zu Neutrophilen (1:16-Verhältnis) ist der Anteil phagozytischer Neutrophile noch fast doppelt so hoch verglichen mit unstimulierten Neutrophilen. Mastzellen machen in der entzündeten Haut der Maus einen Anteil von 1-2%, Neutrophile einen Anteil von 20-40% aus [70]. Dies bedeutet, dass Verhältnisse von Mastzellen zu Neutrophilen von 1:10 bis 1:20 durchaus realistische Verhältnisse darstellen. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass aktivierte Mastzellen einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Phagozytosefunktion von Neutrophilen haben als die Stimulation mit LPS.

In Abb.3.8 sind die Ergebnisse mehrerer Phagozytose-Experimente von Neutrophilen nach Kokultur mit Mastzellen zusammengefasst.

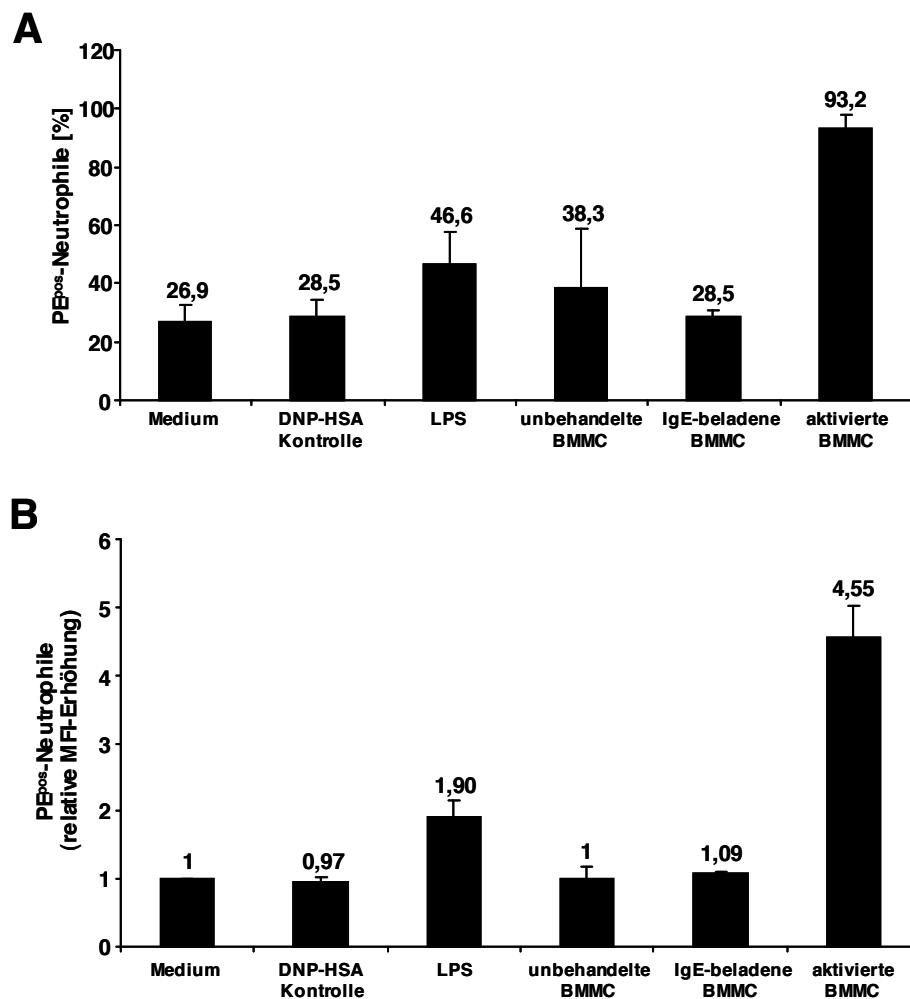


Abb.3.8: Die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wird durch aktivierte Mastzellen drastisch verstärkt.

Die Versuche wurden wie in Abb.3.7 beschrieben durchgeführt. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller phagozytierenden Neutrophilen nach Kokultur mit Mastzellen. In **Bild B** ist die relative MFI-Erhöhung (geometrische MFI) phagozytierender Neutrophilen abgebildet. Die spontane Phagozytose durch ruhende Neutrophile wurde gleich eins gesetzt. n=3.

Wie Abb.3.8 nochmals verdeutlicht, bewirken aktivierte Mastzellen eine drastische Erhöhung der Phagozytosefunktion von Neutrophilen. Dies spiegelt sich sowohl im prozentualen Anteil der phagozytierenden Neutrophilen (Abb.3.8 A) als auch in den MFI-Werten dieser PE-positiven Zellen (Abb.3.8 B) wider.

Um zu klären, ob die Mastzell-induzierte Steigerung der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen durch Zell-Zell-Kontakt oder durch lösliche Mastzell-Mediatoren ausgelöst wird, wurden in den folgenden Versuchen Überstände von Mastzellkulturen eingesetzt. Hierfür wurden IgE-beladene Mastzellen für ca. 12-16h mit DNP-HSA aktiviert. Danach wurden die Überstände der Mastzellen abgenommen und zu frisch angereicherten

Neutrophilen gegeben. Nach zweistündiger Inkubation folgte die Zugabe von PE-Partikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen für die FACS-Analyse auf Gr-1 gefärbt.

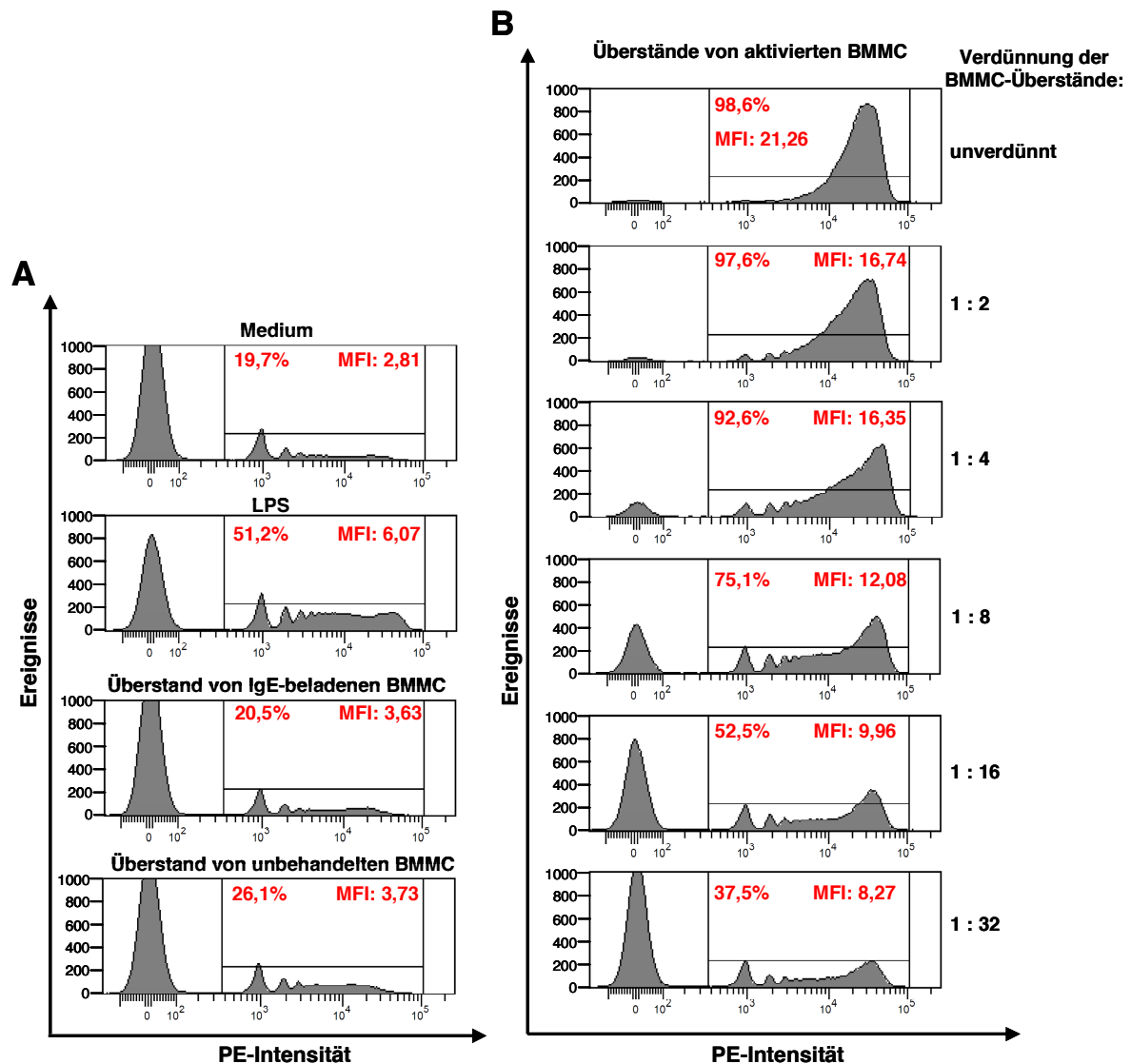


Abb.3.9: Mastzell-Mediatoren induzieren eine verstärkte Phagozytoseaktivität von Neutrophilen.

Neutrophile wurden in Medium, mit Überständen von Mastzellkulturen oder mit 100ng/ml LPS bei 37°C inkubiert. Die Überstände von Mastzellen wurden generiert, indem IgE-beladene Mastzellen für 12-16h aktiviert wurden. Danach wurden die Überstände 1:2 seriell verdünnt und diese Verdünnungen auf frisch angereicherte Neutrophile gegeben. Nach 2h erfolgte die Zugabe von PE-Partikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen für die FACS-Analyse auf Gr-1 gefärbt. Die Histogramme bilden die Neutrophilen-Population ($\text{Gr-1}^{\text{pos}}/\text{MHCII}^{\text{neg}}$) ab. **Bild A** zeigt die Referenzen und Kontrollen. **Bild B** zeigt Neutrophile, die mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen inkubiert wurden. (MFI $\times 10^{-3}$).

Aus Abb.3.9 kann entnommen werden, dass sich die enorme Steigerung der Phagozytose durch Neutrophile nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellen reproduzieren lässt. Abb.3.9 A zeigt die Referenzen und Kontrollen. Die Phagozytose durch unstimulierte Neutrophile liegt bei ca. 20% und die MFI bei 2,81. Nach LPS-Stimulation erhöht sich der

Anteil phagozytierender Neutrophile auf ca. 51% und die MFI ist um etwa das Doppelte erhöht und beträgt 6,07. Die Zugabe von Überständen unbehandelter bzw. IgE-beladener Mastzellen hat keinen Einfluss auf die Phagozytose. Abb.3.9 B zeigt die Phagozytose durch Neutrophile nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellen in unterschiedlichen Verdünnungsstufen. Der Anteil phagozytierender Neutrophile beträgt nach Inkubation mit unverdünntem Mastzell-Überstand fast 99% und auch die MFI ist mit 21,26 sehr stark erhöht gegenüber dem Niveau unstimulierter Neutrophile. Mit zunehmender Verdünnung der Überstände nimmt der prozentuale Anteil und die MFI der phagozytierenden Neutrophilen ab. Jedoch ist die Phagozytoseaktivität sogar bei der höchsten Verdünnung der Mastzell-Überstände (1:32) immer noch weit über dem Niveau unstimulierter Neutrophile. Auch hier zeigt sich wieder, dass der Einfluss aktivierter Mastzellen weitaus stärker ist als der LPS-Effekt auf Neutrophile.

Abb.3.10 stellt eine Zusammenfassung mehrerer Phagozytose-Experimente von Neutrophilen mit Mastzell-Überständen dar.

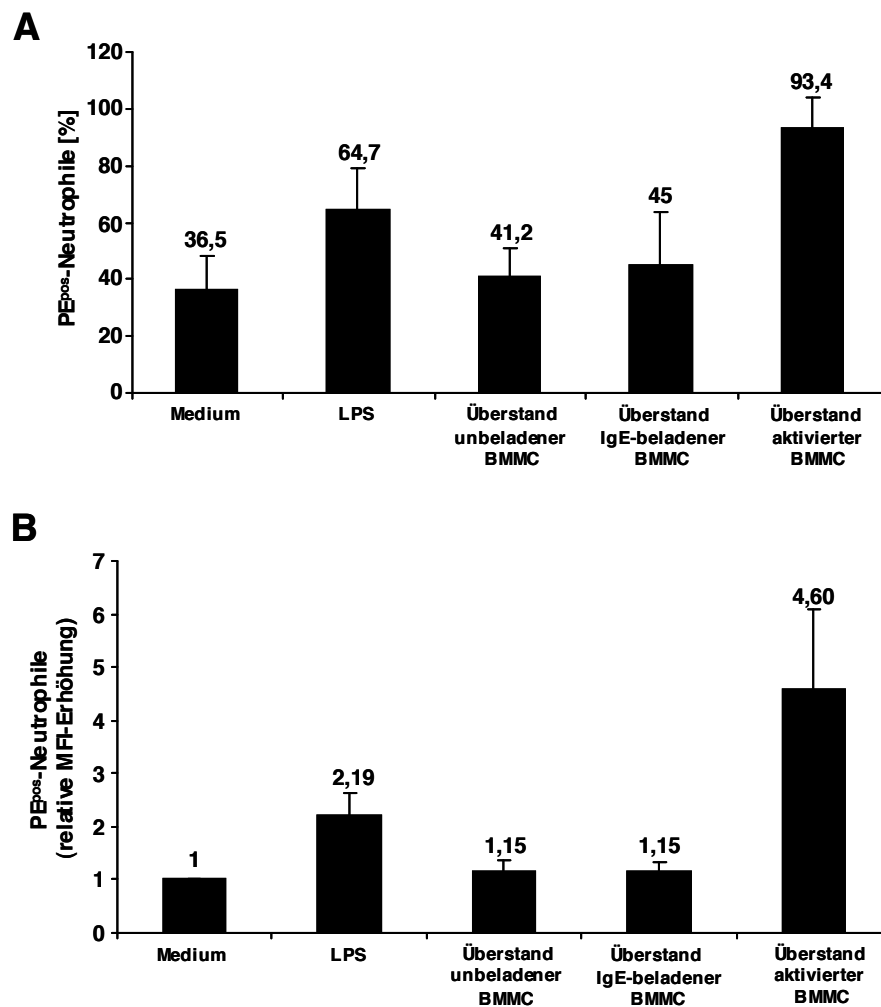


Abb.3.10: Die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wird durch lösliche Mastzell-Mediatoren enorm gesteigert.

Die Experimente wurden wie in Abb.3.9 beschrieben durchgeführt. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller phagozytierenden Neutrophilen. **Bild B** zeigt die relative MFI-Erhöhung dieser PE-positiven Zellen. Die spontane Phagozytose durch ruhende Neutrophile wurde gleich eins gesetzt. n=6.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieses Kapitels, dass *in vitro* aktivierte Mastzellen bzw. deren Mediatoren die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen enorm steigern. In den nächsten Experimenten sollten diese Beobachtungen in einem Mastzell-abhängigen *in vivo* Modell bestätigt werden.

3.4 Die *W-sh*-Mutation bewirkt Mastzellosigkeit, hat aber keinen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von Neutrophilen in *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen

Vorhergehende Experimente zeigten, dass Mastzellen *in vitro* die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen steigern. Diese Beobachtungen sollten nun in einem *in vivo* Modell bestätigt werden. Um die Phagozytose durch Neutrophile in An- und Abwesenheit von Mastzellen bestimmen zu können, sollten *in vivo* Untersuchungen mit mastzelllosen *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen und mit Wildtyp-Tieren des kongenen Stammes (C57BL/6) durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch noch nicht ausgeschlossen werden, ob die *W-sh*-Mutation einen Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von Neutrophilen in *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen hat. Daher sollten zuvor in *in vitro* Experimenten die Aktivierung und die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen aus naiven mastzelllosen *Kit^{W-sh/W-sh}*- und Wildtyp-Tieren verglichen werden. Zunächst wurden aus *Kit^{W-sh/W-sh}*- und Wildtyp-Mäusen Milz-, Blut- und Knochenmarkszellen aufbereitet, um den prozentualen Anteil der Neutrophilen in diesen Organen zu vergleichen (Abb.3.11 und Abb.3.12).

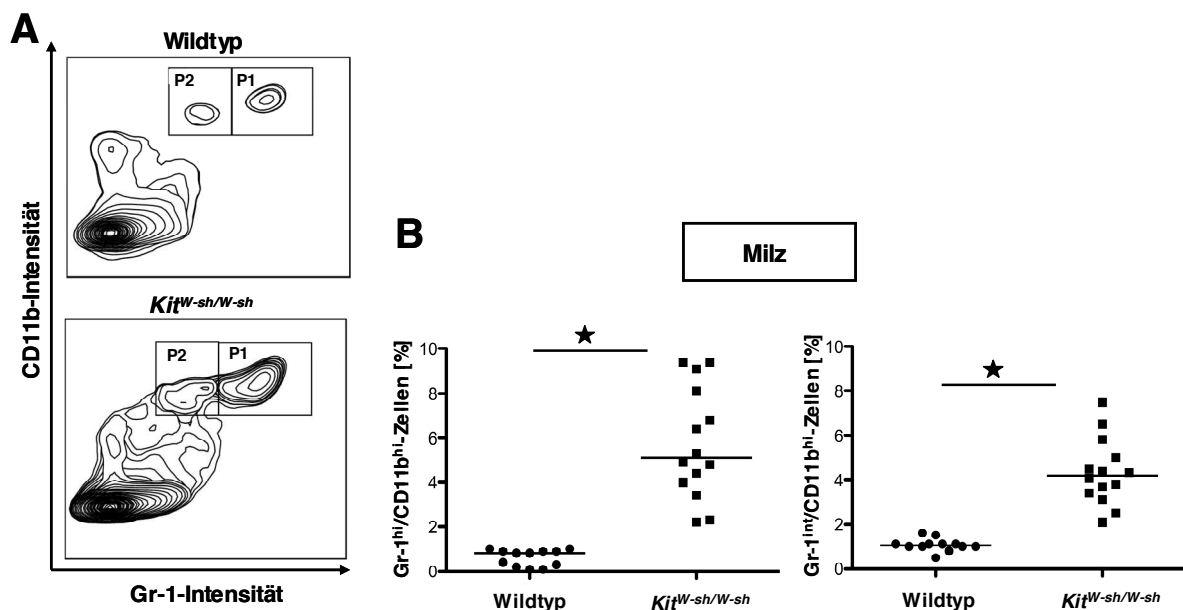


Abb.3.11: *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse weisen in der Milz eine erhöhte Anzahl an Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen auf als Wildtyp-Mäuse.

Zellen aus der Milz naiver Wildtyp (C57BL/6)- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse wurden isoliert, mit PBS gewaschen und mittels FACS auf die Expression von Gr-1 und CD11b analysiert. **Bild A** zeigt exemplarisch einen „Contour Plot“ einer Maus, in dem Milzzellen gemäß ihrer Gr-1/CD11b-Expression dargestellt sind. Das P1-Gate zeigt die Gr-1^{hi}/CD11^{hi}-Zellpopulation, das P2-Gate zeigt die Gr-1^{int}/CD11^{hi}-Population (hi: high; int: intermediate) **Bild B** zeigt den prozentualen Anteil der Gr-1^{hi}/CD11^{hi}- und Gr-1^{int}/CD11^{hi}-Zellpopulationen in den Milzen von Wildtyp und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen. n=12-14 Tiere.

★ p<0,0001.

Aus Abb.3.11 wird ersichtlich, dass Mastzell-defiziente $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Tiere in der Milz signifikant mehr Gr-1/CD11b-exprimierende Zellen aufweisen als Wildtyp-Tiere des kongenen Stammes. In Abb.3.11 A ist erkennbar, dass hierbei zwischen zwei Populationen mit entweder einer sehr hohen Gr-1-Expression ($Gr-1^{hi}$, P1-Gate) oder mit einer mittleren Gr-1-Expression ($Gr-1^{int}$, P2-Gate) unterschieden werden kann. In der Milz naiver Wildtyp-Mäuse beträgt der Anteil der $Gr-1^{hi}/CD11b^{hi}$ -Zellen durchschnittlich ca. 0,8%, wohingegen diese Zellpopulation in den $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäusen fast 5% beträgt. Genauso stark erhöht ist der Anteil der $Gr-1^{int}/CD11b^{hi}$ -Zellen in der Milz von $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäusen mit 4% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (1%).

Auch im Blut und im Knochenmark naiver Wildtyp- und $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäuse wurde der Anteil der Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen verglichen.

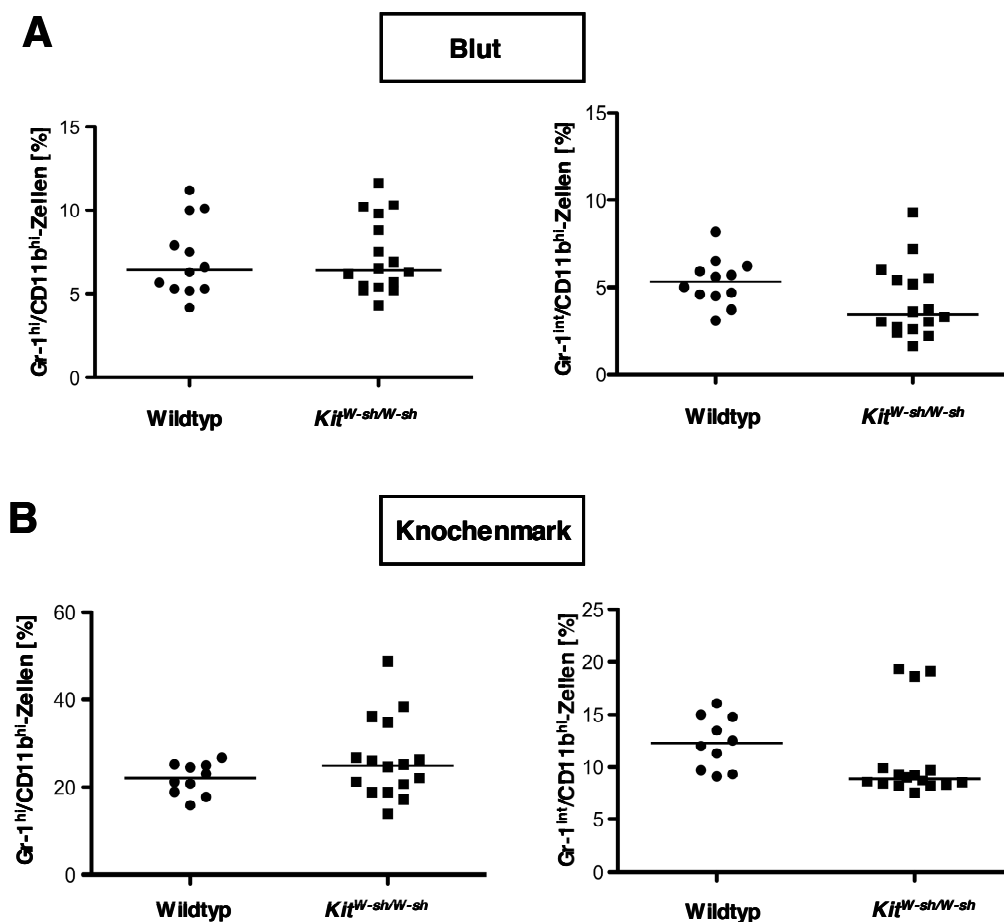


Abb.3.12: Im Blut und im Knochenmark ist der prozentuale Anteil der Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen in $Kit^{W-sh/W-sh}$ - und Wildtyp-Mäusen gleich. Blut- und Knochenmarkszellen naiver Wildtyp (C57BL/6) und $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäuse wurden isoliert, mit PBS gewaschen und mittels FACS auf die Expression von Gr-1 und CD11b analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil der $Gr-1^{hi}/CD11b^{hi}$ und $Gr-1^{int}/CD11b^{hi}$ -Zellpopulationen im Blut von Wildtyp- und $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäusen. **Bild B** zeigt den prozentualen Anteil der $Gr-1^{hi}/CD11b^{hi}$ und $Gr-1^{int}/CD11b^{hi}$ -Zellpopulationen im Knochenmark von Wildtyp- und $Kit^{W-sh/W-sh}$ -Mäusen. n=10-16 Tiere.

In Abb.3.12 ist erkennbar, dass sich der prozentuale Anteil der Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen im Blut und Knochenmark von *Kit*^{W-sh/W-sh}- und Wildtyp-Mäusen kaum voneinander unterscheidet. Die erhöhte Frequenz der Gr-1/CD11b-positiven Zellen in *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen beschränkt sich somit auf die Milz. Dieses Phänomen wurde bereits von Nigrovic *et al.* beschrieben und könnte damit zusammenhängen, dass *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse eine Splenomegalie²² mit expandierten myeloiden Zellpopulationen aufweisen [71].

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich die Aktivierung und die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen aus *Kit*^{W-sh/W-sh}- und Wildtyp-Tieren unterscheidet. Daher wurden Neutrophile aus dem Knochenmark beider Stämme angereichert, mit Wildtyp-Mastzellen bzw. Kulturüberständen von Wildtyp-Mastzellen inkubiert und danach mittels FACS zunächst auf die CD11b-Expression analysiert (Abb.3.13).

²² Splenomegalie: Vergrößerung der Milz

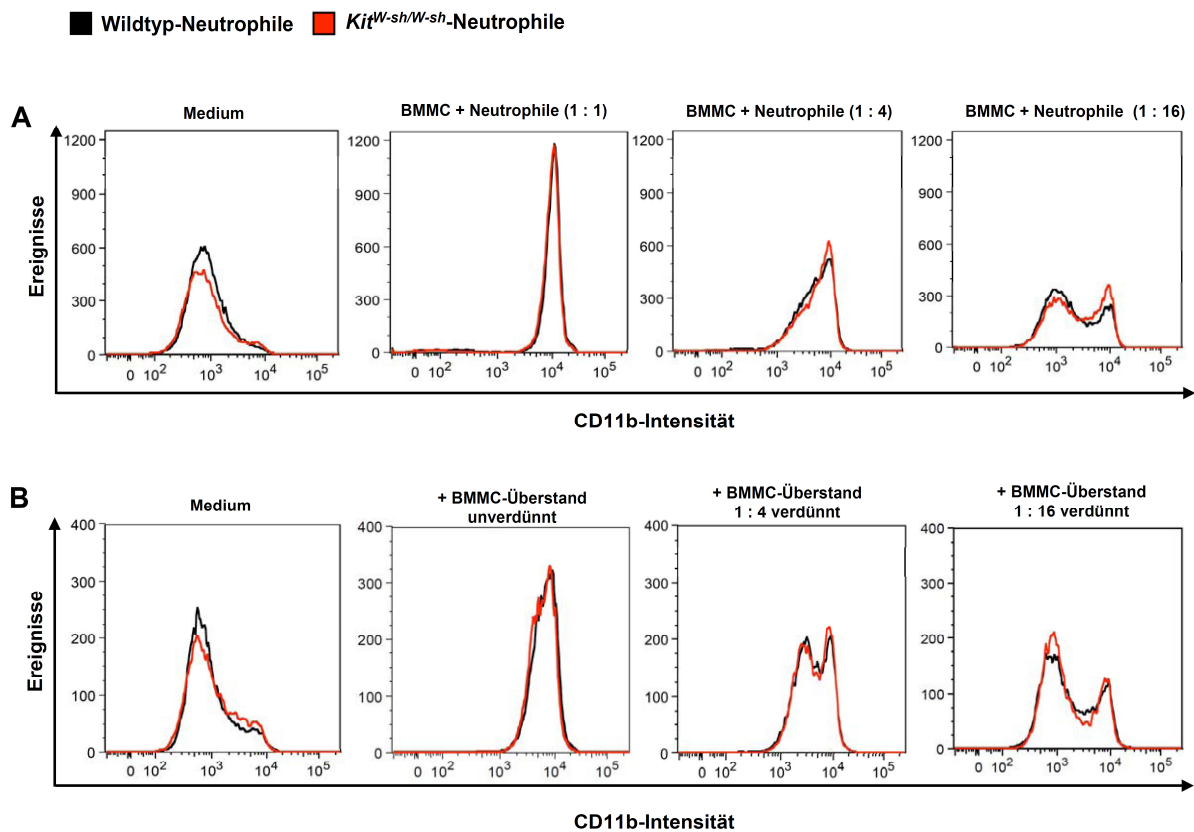


Abb.3.13: Die CD11b-Expression auf Neutrophilen naiver Wildtyp- und mastzellloser *Kit^{W-sh/W-sh}*-Tiere ist gleich.

Neutrophile aus Wildtyp- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen wurden alleine in Medium, in Kokultur mit aktivierten Mastzellen und mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 3h wurden die Zellen mittels FACS analysiert. **Bild A** zeigt die CD11b-Expression von Wildtyp- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Neutrophilen in Kokultur mit aktivierten Mastzellen in den angegebenen Zellzahl-Verhältnissen. **Bild B** zeigt die CD11b-Expression von Wildtyp- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Neutrophilen nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen.

Abb.3.13 zeigt die CD11b-Expression von Neutrophilen aus Wildtyp- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen nach Kokultur mit Mastzellen (Abb.3.13 A) bzw. nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen (Abb.3.13 B). Ruhende Neutrophile beider Mäuse-Stämme haben eine vergleichbare konstitutive CD11b-Expression. In Anwesenheit aktivierter Mastzellen bzw. deren Überständen steigt die CD11b-Expression auf Neutrophilen beider Mäuse-Stämme gleichermaßen stark an. Dies verdeutlicht, dass Neutrophile aus mastzelllosen *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen keinen Defekt in ihrer Aktivierung haben. Um dies zu bestätigen, wurde in den folgenden Experimenten die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen aus Wildtyp- und *Kit^{W-sh/W-sh}*-Tieren verglichen (Abb.3.14).

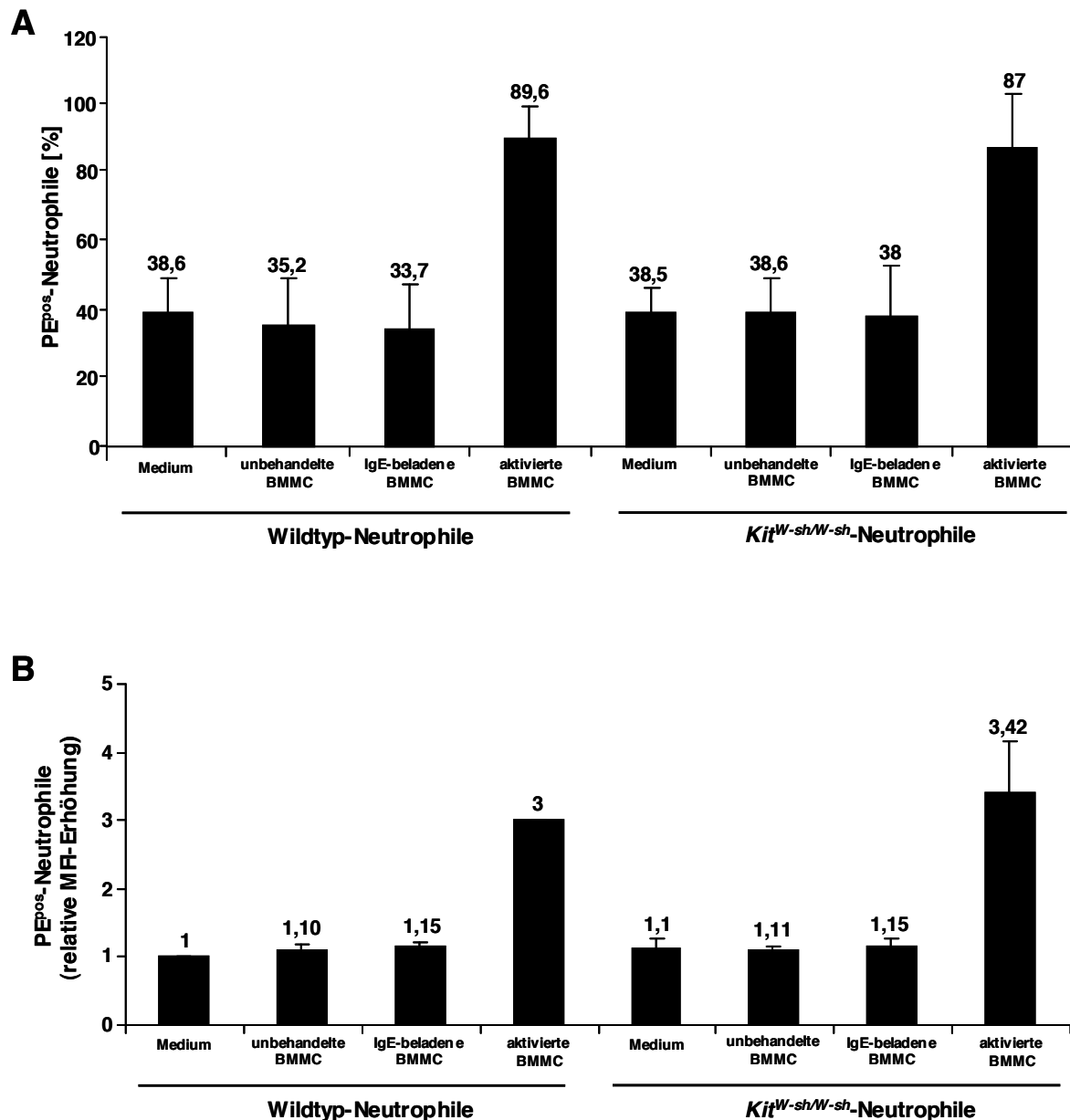


Abb.3.14: Neutrophile aus Mastzell-defizienten *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen und Wildtyp-Tieren haben eine vergleichbar starke Phagozytoseaktivität.

Neutrophile aus Wildtyp- und mastzelllosen *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen wurden in Medium oder mit Überständen von Mastzellkulturen bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden generiert, indem IgE-beladene Mastzellen für 12-16h aktiviert wurden. Nach 2h Inkubation der Neutrophile mit Überständen der Mastzellkulturen erfolgte die Zugabe von PE-konjugierten Partikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller phagozytierenden Neutrophilen. **Bild B** zeigt die relative MFI-Erhöhung dieser PE-positiven Zellen. Die spontane Phagozytose von ruhenden Wildtyp-Neutrophilen wurde gleich eins gesetzt. n=2.

Abb.3.14 verdeutlicht, dass Neutrophile aus Mastzell-defizienten und Wildtyp-Tieren eine vergleichbar starke Phagozytoseaktivität aufweisen. Abb.3.14 A zeigt für beide Mäuse-Stämme den prozentualen Anteil phagozytierender PE-positiver Neutrophile innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population. Es ist zu erkennen, dass die spontane Phagozytose durch

ruhende Neutrophile beider Mäuse-Stämme gleich ist. Nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellen erhöht sich der Anteil phagozytischer Neutrophile beider Stämme gleichermaßen stark auf ca. 90%. Abb.3.14 B zeigt die relative MFI-Erhöhung der PE-positiven Neutrophilen zu ruhenden Wildtyp-Neutrophilen. Die MFI der PE-positiven Neutrophilen beider Stämme ist in Gegenwart von Mastzell-Überständen um etwa das Dreifache erhöht. Somit ist die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen aus *Kit^{W-sh/W-sh}*- und Wildtyp-Tieren vergleichbar.

Die Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen, dass Neutrophile aus *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen hinsichtlich ihrer Aktivierung und Phagozytosefunktion sich von Wildtyp-Neutrophilen nicht unterscheiden. Daraus kann gefolgert werden, dass die *W-sh*-Mutation keinen Einfluss auf die Funktion von Neutrophilen in den *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen nimmt. *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse erwiesen sich somit für *in vivo* Untersuchungen der Mastzell-abhängigen Phagozytoseaktivität von Neutrophilen als geeignet.

3.5 Mastzellen verstärken die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen in einem *in vivo* Modell einer LPS-induzierten akuten Atemwegsentzündung

Das murine Modell einer LPS-induzierten Atemwegsentzündung, bei der es zu einer raschen Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge kommt, schien für *in vivo* Untersuchungen der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen geeignet zu sein. Durch die Anwendung dieses Modells in Wildtyp (*Kit^{+/+}*) und Mastzell-defizienten (*Kit^{W-sh/W-sh}*) Mäusen sollte der Einfluss von Mastzellen auf die Phagozytosefunktion von Neutrophilen *in vivo* näher untersucht werden. Hierbei wurden Mäusen intranasal 1µg LPS in Kombination mit opsonisierten PE-Polystyrolpartikeln appliziert. Die Opsonisierung der PE-Partikel erfolgte mit einem IgG-Antikörper und sollte eine schnellere Erkennung und Phagozytose der PE-Partikel durch die Neutrophilen ermöglichen. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, denen nur LPS verabreicht wurde. Zunächst wurde ein Kinetikversuch mit Wildtyp-Tieren durchgeführt. So sollte der Zeitpunkt nach LPS-Applikation ermittelt werden, an dem die größte Anzahl PE-positiver Neutrophile in der bronchoalveolären Lavage (BAL) der Mäuse nachzuweisen ist. Hierfür wurde nach 8h, 12h, 24h und 48h die BAL der Mäuse entnommen und die Zellen im FACS analysiert (Abb.3.15).

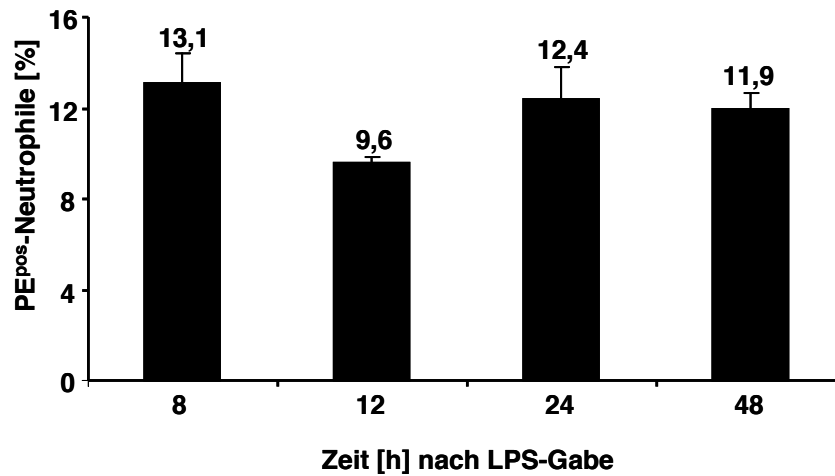


Abb.3.15: *In vivo* Phagozytose von PE-Partikeln durch Neutrophile nach LPS-induzierter Atemwegsentzündung in Wildtyp-Mäusen.

Wildtyp-Mäusen wurde intranasal 1 μ g LPS zusammen mit IgG-opsonisierten PE-Partikeln verabreicht. Kontrolltieren wurde nur LPS appliziert. Nach 8h, 12h, 24h und 48h wurde bei den Mäusen eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und die Zellen im FACS analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PE-positiven Neutrophilen innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/CD11b^{pos}) aus der BAL. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von n=3 Tieren pro Gruppe angegeben.

Wie aus Abb.3.15 ersichtlich, konnten in der BAL der Mäuse Neutrophile nachgewiesen werden, welche PE-Partikel *in vivo* phagozytierten. Der prozentuale Anteil der PE-positiven Neutrophilen innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/CD11b^{pos}) blieb über den Zeitraum von 8-48h zwischen 10-13% konstant. Daher wurden die weiterführenden *in vivo* Experimente nur mit dem Zeitwert von 8h durchgeführt. Zur Klärung der Frage, ob Mastzellen die Phagozytose durch Neutrophile ebenfalls *in vivo* verstärken, wurde dieses Modell in Wildtyp (*Kit*^{+/+}) und Mastzell-defizienten (*Kit*^{W-sh/W-sh}) Mäusen angewendet. Um Ergebnisse abzusichern, wurden zusätzlich Mastzell-defiziente Mäuse zuvor intravenös mit BMDC rekonstituiert. Die BMDC wurden *in vitro* aus Knochenmarkszellen des entsprechenden Wildtyp-Stammes (C57BL/6) generiert (Abb.3.16).

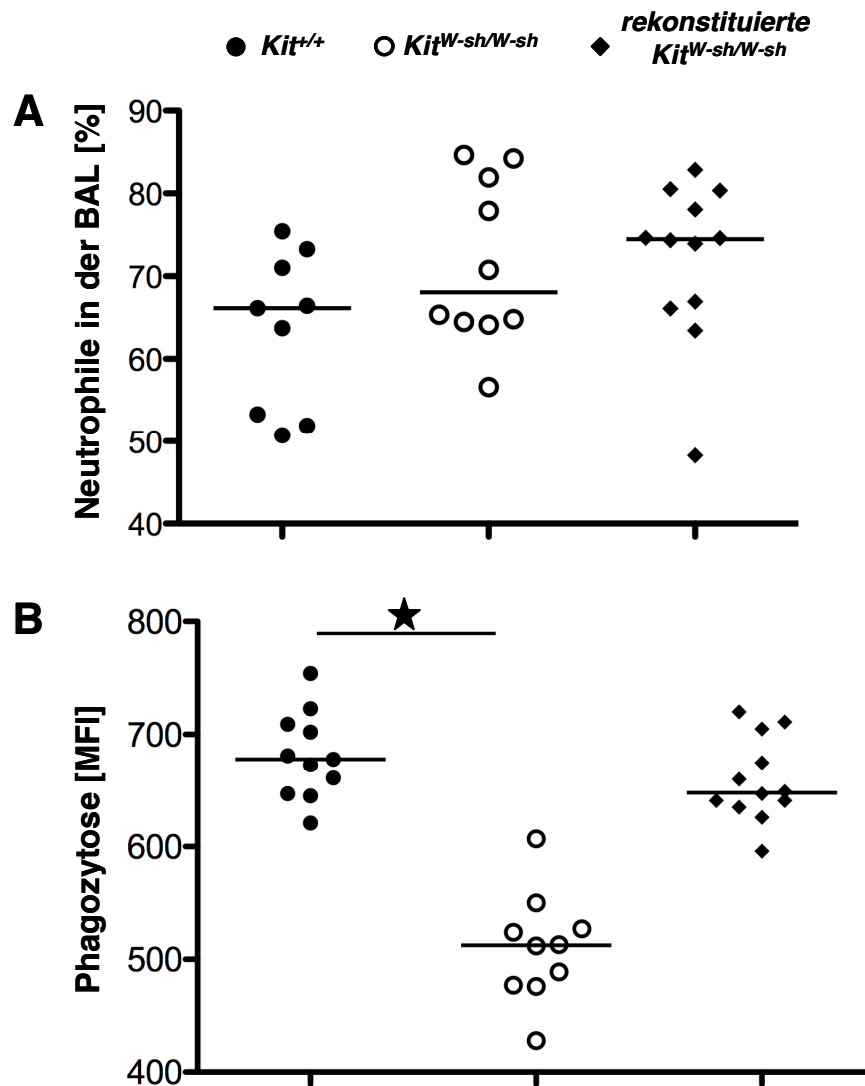


Abb.3.16: Das Fehlen von Mastzellen resultiert in einer reduzierten Phagozytoseaktivität von Neutrophilen. Die Rekonstitution von mastzelllosen Tieren mit BMMC kompensiert diesen Effekt.

12 Wochen nach der intravenösen Rekonstitution der Mastzell-defizienten Mäuse mit BMMC wurden Wildtyp- (*Kit*^{+/+}), Mastzell-defizienten (*Kit*^{W-sh/W-sh}) und rekonstituierten Mastzell-defizienten Mäusen (rekonstituierte *Kit*^{W-sh/W-sh}) 1 μ g LPS in Kombination mit IgG-opsonisierten PE-Polystyrolpartikeln intranasal verabreicht. Kontrolltieren wurde nur LPS appliziert. Nach 8h wurde den Mäusen die bronchoalveoläre Lavage (BAL) entnommen und die Zellen im FACS analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller Neutrophilen (Gr-1^{pos}/CD11b^{pos}) in der BAL. **Bild B** zeigt den Median der MFI von PE-positiven Neutrophilen aus der BAL, die aus der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/CD11b^{pos}) bestimmt wurde. ★ Die statistische Analyse wurde mit dem unverbundenen T-Test durchgeführt und beträgt p<0,0001 (Prism 5,0 Software). n=10-12 Tiere.

In Abb.3.16 ist die FACS-Analyse der Neutrophilen aus der bronchoalveolären Lavage dargestellt. Abb.3.16 A zeigt die Migration der Neutrophilen in die Lungen der Mäuse, welche durch die LPS-Applikation induziert wurde. Die prozentualen Werte der FACS-Analyse zeigen, dass die Anzahl der eingewanderten Neutrophile in Wildtyp- und mastzelllosen Mäusen vergleichbar ist. Aus Abb.3.16 B wird ersichtlich, dass in diesem

Modell das Fehlen von Mastzellen in der Abnahme der phagozytotischen Aktivität von Neutrophilen resultiert. Dargestellt sind hier die medianen MFI der PE-positiven Neutrophilen ($Gr-1^{pos}/CD11b^{pos}$) aus der BAL. Hierbei entspricht ein Punkt im Diagramm der MFI aller PE-positiven Neutrophilen einer einzelnen Maus. Der mediane Mittelwert der MFI aller mastzelllosen Mäuse liegt bei 510 und ist somit deutlich reduziert gegenüber dem gemittelten MFI-Wert der Wildtyp-Tiere, der bei 681 liegt. Die intravenöse Rekonstitution der Mastzell-defizienten Tiere mit BMDC gleicht die Phagozytose beinahe an das Niveau der Wildtyp-Tiere an und liegt bei 659. Hierdurch zeigt sich sehr deutlich, dass in diesem Modell der LPS-induzierten Atemwegsentzündung Neutrophile in mastzelllosen Tieren eine verminderte Phagozytoseaktivität aufweisen. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls durch die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Cytospins von Zellen aus der BAL bestätigt werden (Abb.3.17).

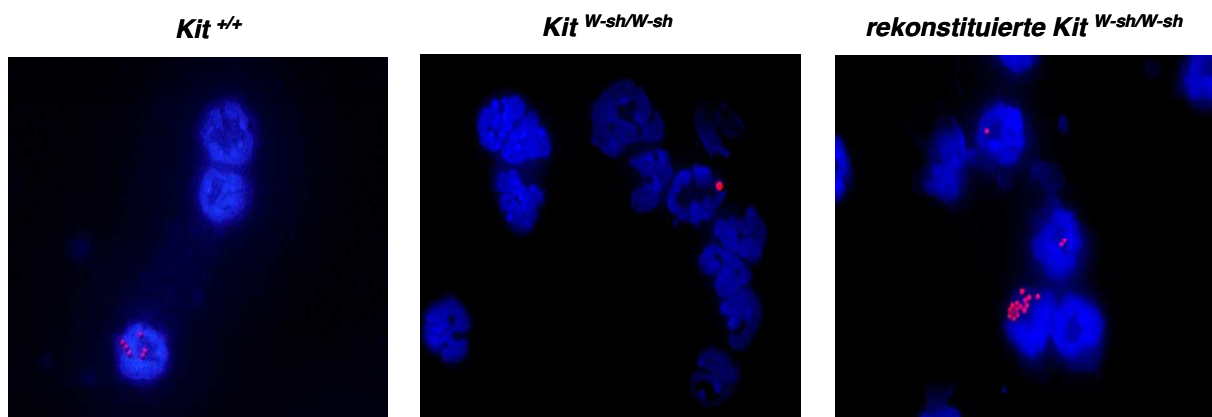


Abb.3.17: Mastzellen steigern die phagozytotische Aktivität von Neutrophilen in einem Modell einer LPS-induzierten Atemwegsentzündung.

Der Versuch wurde wie in Abb.3.16 beschrieben durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Cytospins der BAL von jeweils einer Maus aus jeder Gruppe. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Neutrophile sind mittels DAPI-Färbung anhand ihres polymorphen Zellkerns erkennbar. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Polystyrolpartikel erscheinen rot-fluoreszierend.

Abb.3.17 verdeutlicht nochmals die verminderte Phagozytose durch Neutrophile in mastzelllosen Tieren exemplarisch an Cytospins der BAL-Zellen von jeweils einer Maus aus jeder Versuchsgruppe. Neutrophile sind mittels DAPI-Färbung aufgrund ihres polymorphen Zellkerns identifizierbar. Es ist deutlich zu sehen, dass die Phagozytose von PE-Partikeln durch Neutrophile in mastzelllosen Tieren ($Kit^{W-sh/W-sh}$) verglichen mit Wildtyp-Tieren ($Kit^{+/+}$) stark vermindert ist. Neutrophile aus rekonstituierten mastzelllosen Mäusen zeigen eine gleich starke Phagozytoseaktivität wie Wildtyp-Neutrophile.

Die intravenöse Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen führt unter anderem zu einer Migration der BMMC in die Lunge [17]. Um zu kontrollieren, ob die Mastzell-defizienten Tiere erfolgreich mit BMMC rekonstituiert waren, wurde an Lungenschnitten der Versuchstiere der Nachweis von Mastzellen mittels Avidin-Heparin-Färbung durchgeführt (Abb.3.18).

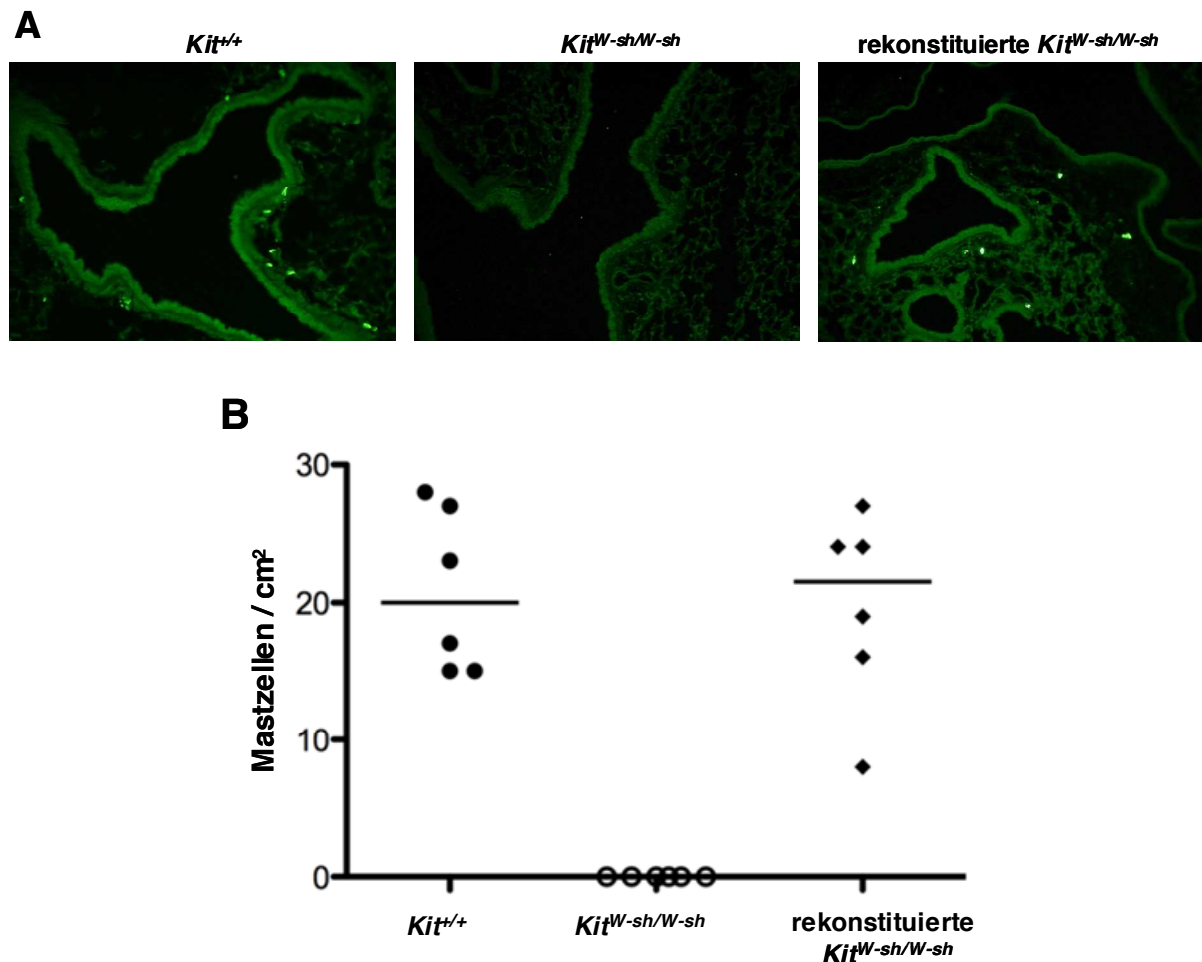


Abb.3.18: Rekonstitution der Lungen von Mastzell-defizienten Mäusen mit *in vitro* generierten BMMC.

Mastzell-defiziente Mäuse wurden intravenös mit 5×10^6 BMMC 12 Wochen vor Versuchsbeginn rekonstituiert. Die BMMC wurden *in vitro* aus Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) generiert. Der Mastzellnachweis an Lungenschnitten erfolgte mittels Avidin-Heparin-Färbung. Hierfür wurden die Lungen nach der Präparation in Formalin fixiert. Entparaffinierte Lungenschnitte wurden mit Avidin-Alexa 488 inkubiert. Das Avidin bindet mit einer hohen Affinität an Heparin, welches hauptsächlich in Mastzellen vorkommt. Durch das Fluorochrom Alexa 488 konnten die Mastzellen mittels Fluoreszenzmikroskop als grün-fluoreszierende Zellen detektiert und ausgezählt werden. **Bild A** zeigt Aufnahmen von Lungenschnitten. **Bild B** zeigt die Anzahl der Mastzellen pro cm^2 mit den medianen Mittelwerten. $n=6$ Tiere.

Die histologische Analyse von Lungenschnitten zeigt die erfolgreiche Rekonstitution der Mastzell-defizienten Tiere (Abb.3.18 A). Durch die Bindung von Avidin-Alexa 488 an das Heparin sind Mastzellen als grün-fluoreszierende Zellen in den Wildtyp-Tieren (*Kit*^{+/+}) und in den rekonstituierten mastzelllosen Mäusen (rekonstituierte *Kit*^{W-sh/W-sh}) eindeutig erkennbar.

Die Auszählung der Mastzellen an den gefärbten Lungenschnitten zeigt, dass die Anzahl von Mastzellen in rekonstituierten Mastzell-defizienten und Wildtyp-Tieren vergleichbar war (Abb.3.18 B).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse in diesem *in vivo* Modell, dass Mastzellen entscheidend die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen steigern.

3.6 Mastzellen erhöhen die Lebensdauer von Neutrophilen

Neutrophile haben eine kurze Lebensdauer. Im Blut zirkulierend, werden sie bereits nach kurzer Zeit apoptotisch. Wenn sie aktiviert werden und aus dem Blut in die lokalen Entzündungsorte auswandern, verzögert sich die Apoptose. Da in den vorhergehenden Kapiteln ein deutlicher Einfluss der Mastzellen auf die CD11b- und CD62L-Expression, den „oxidative burst“ und die Phagozytose von Neutrophilen beschrieben wurde, sollte untersucht werden, ob Mastzellen ebenfalls die Apoptose von Neutrophilen modulieren.

Mit dem Eintreten der Apoptose geht eine Veränderung der Zelloberfläche einher, welche die Zellen für die Erkennung und das Beseitigen durch Makrophagen vorbereitet [61,72]. Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise ausschließlich auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran, doch im frühen Stadium der Apoptose gelangt das PS auch an deren Außenseite. Annexin V ist ein Protein, das Calcium-abhängig mit einer hohen Affinität an PS bindet und daher zur Identifizierung frühapoptotischer Zellen eingesetzt wird [64]. Da Annexin V in nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran auch an die Innenseite der Zellmembran gelangen und dort an PS binden kann, ist eine gleichzeitige Färbung mit Propidium-Iodid (PI) unbedingt erforderlich um frühapoptotische von spätapoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Im späten Stadium der Apoptose erfolgt unter anderem die Fragmentierung der DNA. Auf dieser Eigenschaft beruht die Apoptosebestimmung nach der Nicoletti-Methode, bei der DNA von Zellen mit PI gefärbt wird [65]. Apoptotische Zellen zeigen aufgrund der Fragmentierung ihrer DNA eine schwächere Färbung als die intakte DNA von vitalen Zellen. Mit diesen zwei beschriebenen Methoden wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss von Mastzellen auf die spontane Apoptose von Neutrophilen untersucht. Zunächst wurden hierfür Neutrophile alleine in Medium oder in Kokultur mit Mastzellen für 12h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Annexin V und PI gefärbt und mittels FACS analysiert (Abb.3.19).

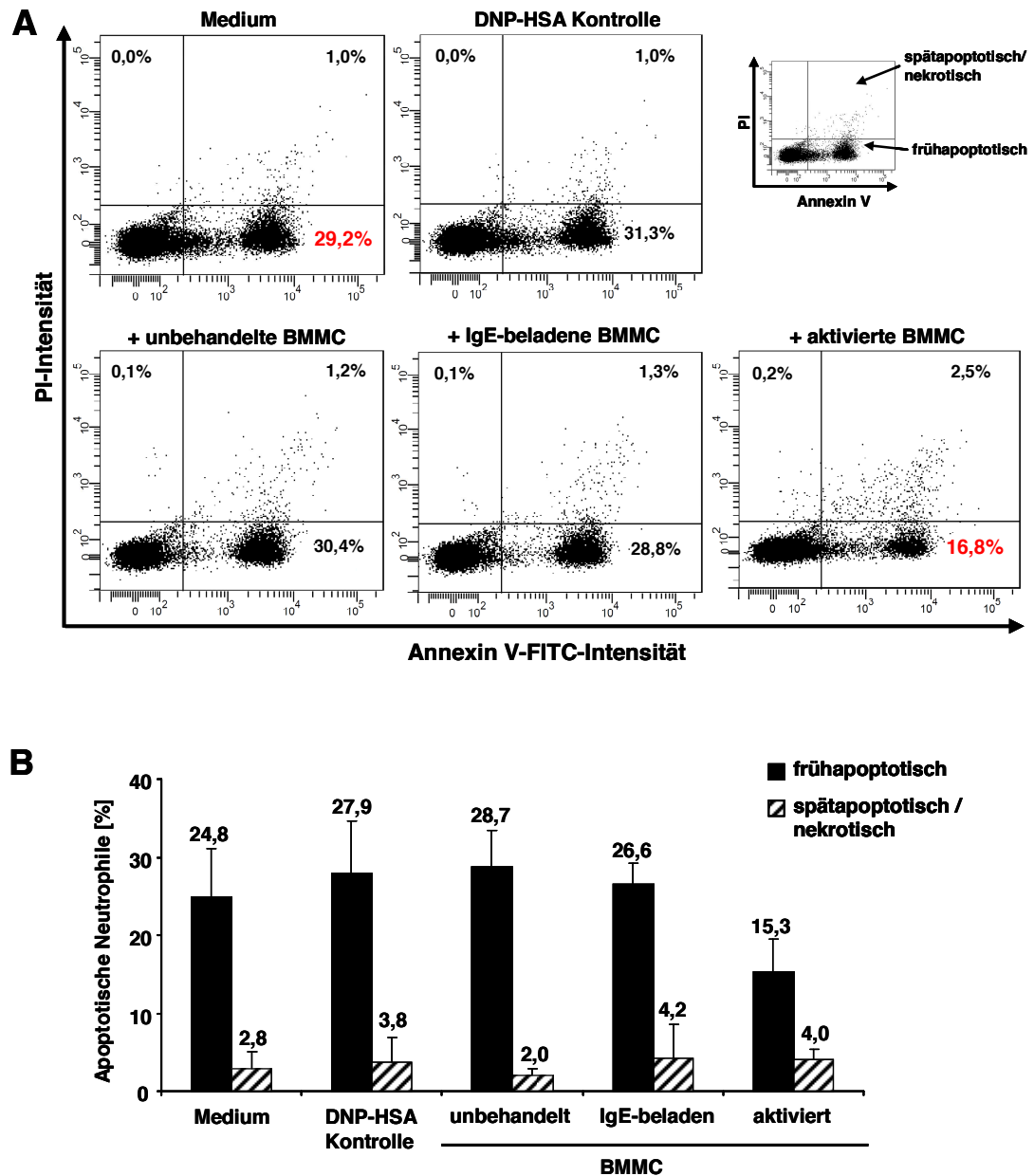


Abb.3.19: Aktivierte Mastzellen reduzieren die spontane Apoptose von Neutrophilen.

Neutrophile wurden alleine in Medium oder in Kokultur mit Mastzellen (Zellzahl-Verhältnis 1:1) bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung von IgE-beladenen Mastzellen erfolgte durch Kreuzvernetzung mit DNP-HSA. Nach 12h Inkubation der Kokulturen wurden die Zellen für die FACS-Analyse mit Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und analysiert. Der Anteil der frühapoptotischen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{neg}) und spätapoptotischen/nekrotischen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{pos}) Neutrophilen wurde aus der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}) bestimmt. **Bild A** zeigt exemplarisch die FACS-Analyse eines Experiments. **Bild B** zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Abb.3.19 A zeigt eine repräsentative FACS-Analyse der Apoptosebestimmung von Neutrophilen nach Kokultur mit Mastzellen. Nach 12h Inkubation beträgt der Anteil von frühapoptotischen Neutrophilen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{neg}) innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}) 29,2%. Dieser Anteil an apoptotischen Neutrophilen bleibt konstant, wenn Neutrophile mit unbehandelten oder ruhenden

IgE-beladenen Mastzellen inkubiert werden. Doch die Anwesenheit aktivierter Mastzellen führt zu einer Reduktion der Apoptoserate auf 16,8%. In Abb.3.19 B sind Ergebnisse von mehreren Apoptose-Experimenten zusammengefasst.

Zur Untersuchung, ob die verminderte Apoptose von Neutrophilen in Gegenwart von Mastzellen durch lösliche Mastzell-Mediatoren vermittelt wird, erfolgten Apoptoseanalysen mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen. Um die Überstände zu generieren, wurden Mastzellen ca. 20h aktiviert. Neutrophile wurden mit diesen Überständen für 20h inkubiert und anschließend im FACS untersucht (Abb.3.20).

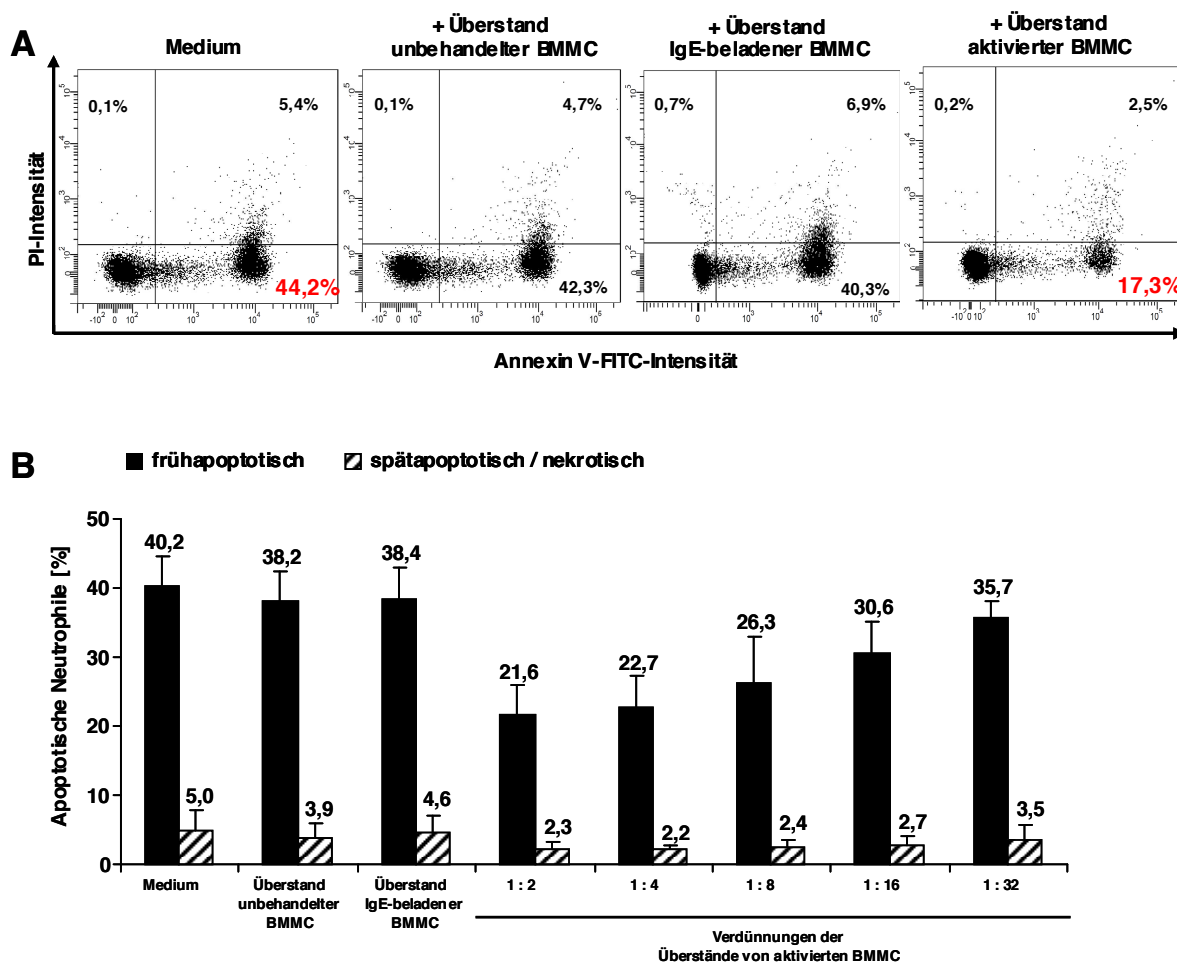


Abb.3.20: Die Reduktion der spontanen Apoptose von Neutrophilen erfolgt durch lösliche Mastzell-Mediatoren.

Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen von Mastzellkulturen bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden generiert, indem IgE-beladene Mastzellen für ca. 20h aktiviert wurden. Frisch angereicherte Neutrophile wurden mit Mastzell-Überständen in den angegebenen Verdünnungen für 20h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Gr-1-APC, Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und mittels FACS analysiert. **Bild A** zeigt exemplarisch die Apoptoseanalyse von Neutrophilen nach Inkubation mit Mastzell-Überständen. **Bild B** zeigt eine Zusammenfassung von sechs unabhängigen Experimenten.

Abb.3.20 A zeigt eine repräsentative FACS-Analyse der Apoptosebestimmung von Neutrophilen nach Inkubation mit Überständen von Mastzellkulturen. Der Anteil frühapoptotischer Neutrophile (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{neg}) innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population beträgt nach 20h Inkubation im Medium 44,2%. Der Anteil an spätapoptotischen Zellen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{pos}) aller Neutrophilen, die in Medium inkubiert wurden, liegt bei 5,4%. Die Inkubation mit Überständen unbehandelter oder ruhender IgE-beladener Mastzellen zeigt wie erwartet keinen Einfluss auf die Apoptose von Neutrophilen. Die Zugabe von Überständen aktivierter Mastzellen führt jedoch zu einer deutlichen Reduktion der frühapoptotischen Neutrophilen auf 17,3%. Diese Effekte konnten in mehreren Wiederholungen reproduziert werden und sind in Abb.3.20 B zusammengefasst. Der Anteil apoptotischer Neutrophile reduziert sich somit nach Inkubation mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen um beinahe die Hälfte. Mit steigender Verdünnung der Mastzell-Überstände erhöht sich wieder die Apoptoserate von Neutrophilen.

Ergänzend dazu wurde die Apoptose von Neutrophilen zu einem späteren Zeitpunkt mit der Nicoletti-Methode untersucht. Hierfür wurden Neutrophile mit Überständen von Mastzellen für 24h und für 48h inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2h in Nicoletti-Puffer, der Propidium-Iodid enthält, inkubiert und anschließend im FACS analysiert (Abb.3.21).

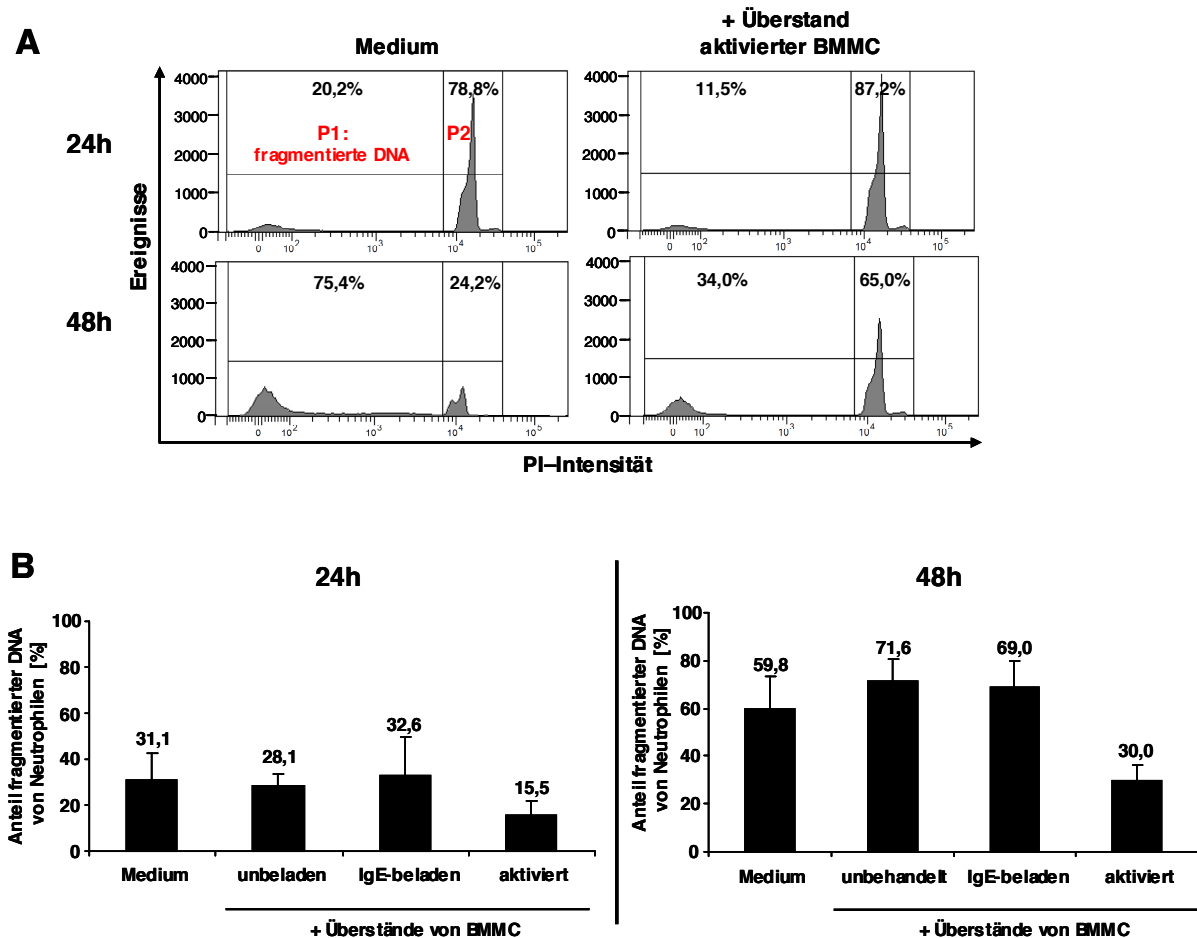


Abb. 3.21: Mastzell-Mediatoren erhöhen die Lebensdauer von Neutrophilen.

Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen für 24h und 48h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2h in Nicoletti-Puffer inkubiert und anschließend im FACS analysiert. **Bild A** zeigt exemplarisch Histogramme eines Nicolettiassays. Das P1-Gate zeigt den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen mit fragmentierter DNA. Das P2-Gate gibt den prozentualen Anteil der vitalen Zellen mit intakter DNA wider. **Bild B** zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von vier unabhängig durchgeführten Experimenten.

Auch mit der Nicoletti-Methode kann deutlich gezeigt werden, dass aktivierte Mastzellen die Erhöhung der Lebensdauer von Neutrophilen bewirken. Abb.3.21 A zeigt exemplarisch Histogramme eines Nicolettiassays von Neutrophilen nach Inkubation in Medium bzw. mit Überständen aktivierter Mastzellen. Nach 24h weisen 20,2% der unstimulierten Neutrophilen fragmentierte DNA auf (P1-Gate). Die Inkubation mit Überstand aktivierter Mastzellen reduziert den Anteil apoptotischer Neutrophile auf 11,5%. Nach 48h Inkubation kommt der antiapoptotische Effekt der Mastzellen sehr stark zum Ausdruck. Hier beträgt der Anteil apoptotischer Neutrophile im Medium 75,4%, mit Überstand von Mastzellen jedoch nur 34%. Mastzell-Mediatoren reduzieren somit den Anteil apoptotischer Neutrophile nach diesen Zeitpunkten um die Hälfte. In Abb.3.21 B sind die Ergebnisse von mehreren Nicolettiassays zusammengefasst.

3.7 Der Einfluss von Mastzell-produziertem TNF und GM-CSF auf Neutrophile

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln gezeigt, werden Neutrophile in ihren wichtigen Effektorfunktionen durch lösliche Mastzell-Mediatoren stark beeinflusst. Daher war nun die Frage naheliegend, um welche Mediatoren es sich hierbei handelt. Als mögliche Kandidaten galten hierbei zunächst Histamin und TNF. Histamin und TNF können sehr schnell in Mastzellen nach Aktivierung freigesetzt und auch *de novo* synthetisiert werden und spielen eine große Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Als weitere Mediatoren wurden die proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und IL-1 β sowie der Wachstums- und Aktivierungsfaktor GM-CSF in Betracht gezogen. Ob diese genannten Mediatoren einen Effekt auf Neutrophile haben, wurde anhand folgender Parameter untersucht: die Expression der Aktivierungsmarker CD11b und CD62L, der „oxidative burst“, die Phagozytoseaktivität und die Apoptoserate von Neutrophilen. Erste Analysen mit kommerziell erhältlichem Histamin zeigten, dass dieser Mediator keinerlei Einfluss auf die Aktivierung von Neutrophilen hat. Für Untersuchungen der Rolle von IL-1 α/β standen BMMC aus IL-1 α/β -defizienten Mäusen und zudem Neutrophile aus dem Knochenmark von IL-1-Rezeptor-defizienten Mäusen zur Verfügung. Die Untersuchungen ergaben, dass IL-1 α und IL-1 β an der Aktivierung von Neutrophilen durch Mastzellen nicht beteiligt sind. Für Mastzell-produziertes TNF und GM-CSF konnte ein Einfluss auf Neutrophile nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.7.1 Mastzellen modulieren teilweise durch TNF und GM-CSF die Expression der Aktivierungsmarker von Neutrophilen

Zunächst wurde die CD11b- und CD62L-Expression auf Neutrophilen in Gegenwart von Mastzellen aus Wildtyp-, *TNF*^{-/-}- und *GM-CSF*^{-/-}-Mäusen untersucht.

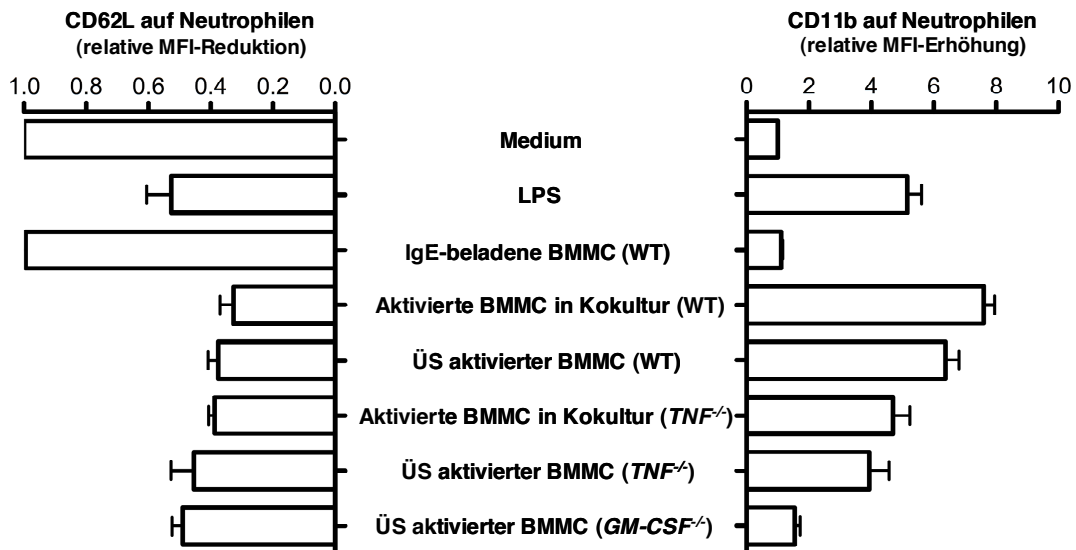


Abb.3.22: Mastzell-produziertes TNF und GM-CSF beeinflussen die Expression der Aktivierungsmarker CD11b und CD62L auf Neutrophilen. Neutrophile wurden alleine in Medium, mit 100ng/ml LPS, in Kokultur mit Mastzellen (Zellzahl-Verhältnis 1:1) oder mit Überständen (ÜS) aktivierter Mastzellkulturen für 5h bei 37°C inkubiert. Die Mastzellen wurden aus Knochenmark von Wildtyp-, *TNF*^{-/-}- und *GM-CSF*^{-/-}-Mäusen generiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen auf die Expression von Gr-1, CD11b und CD62L mittels FACS analysiert. Abgebildet ist die relative geometrische MFI der CD11b- und CD62L-Expression auf Neutrophilen. Die Expression von unstimulierten Neutrophilen wurde hierbei gleich eins gesetzt. n=6.

Die Ergebnisse in Abb.3.22 verdeutlichen, dass die Mastzell-induzierte Steigerung der CD11b-Expression auf Neutrophilen teilweise von TNF abhängig ist. Aktivierte *TNF*^{-/-}-Mastzellen bzw. Überstände von *TNF*^{-/-}-Mastzellen bewirken zwar einen Anstieg der CD11b-Expression auf Neutrophilen, dieser bleibt jedoch geringer als die Erhöhung der CD11b-Expression durch aktivierte Wildtyp-Mastzellen. Die CD62L-Expression wird nur geringfügig durch Mastzell-produziertes TNF beeinflusst. Neutrophile zeigen mit Überständen aktivierter *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellen kaum eine Steigerung von CD11b, wohingegen die CD62L-Expression vergleichsweise stark reduziert wird wie in Ansätzen mit Wildtyp-BMMC. Hierdurch wird ersichtlich, dass Mastzell-produziertes GM-CSF die CD11b-Expression sehr stark beeinflusst, aber kaum Einfluss auf die CD62L-Expression von Neutrophilen hat.

3.7.2 Mastzellen beeinflussen hauptsächlich durch GM-CSF den „oxidative burst“ von Neutrophilen

In den nächsten Experimenten wurde untersucht, ob Mastzell-produziertes TNF und GM-CSF einen Einfluss auf den „oxidative burst“ von Neutrophilen haben.

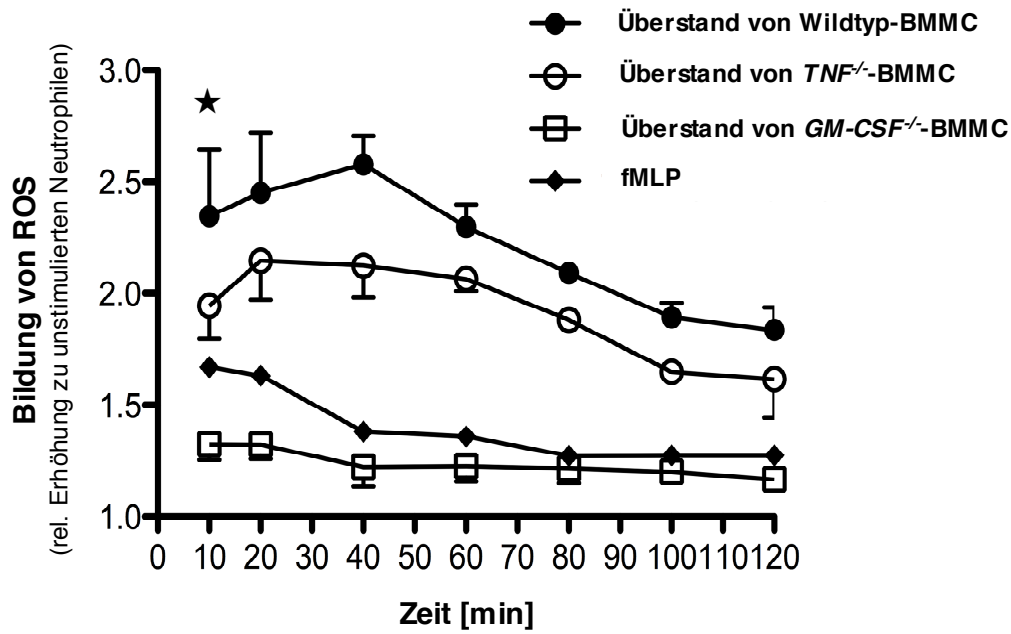


Abb.3.23: Für den Mastzell-induzierten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Neutrophilen ist hauptsächlich GM-CSF verantwortlich. TNF von Mastzellen beeinflusst die ROS-Bildung nur gering.

Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen 12h aktivierter Wildtyp-, *TNF*^{-/-}- und *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellkulturen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Neutrophile mit 0,5µM fMLP stimuliert. Es erfolgte eine Messung über 120min. Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen auf Eis gestellt, mit FACS-Puffer gewaschen und mit anti-Gr-1-APC und 5µM DCFH-DA für 20min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen unmittelbar mittels FACS analysiert. Die ROS-Bildung ist als relative Erhöhung der geometrischen MFI zu unstimulierten Neutrophilen angegeben. n=3.

Abb.3.23 zeigt, wie bereits in Kap. 3.2 beschrieben, dass die Inkubation mit Überständen aktivierter Wildtyp-Mastzellen zu einer stark erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Neutrophilen führt. Für diesen Effekt ist hauptsächlich GM-CSF von Mastzellen verantwortlich. Dies wird dadurch ersichtlich, dass es zu keinem Anstieg der ROS-Bildung kommt, wenn Neutrophile mit Überständen von *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellkulturen inkubiert werden. Betrachtet man die ROS-Produktion von Neutrophilen in Gegenwart TNF-defizienter Mastzellen, so wird deutlich, dass Mastzell-produziertes TNF auf den „oxidative burst“ von Neutrophilen nur einen geringen Einfluss hat. Die ROS-Produktion der Neutrophilen bleibt auch bei dem Fehlen von Mastzell-produziertem TNF stark erhöht. Dieser Anstieg ist jedoch über den gesamten Zeitraum der Messung niedriger verglichen mit Überständen von Wildtyp-Mastzellkulturen.

3.7.3 Mastzellen steigern durch GM-CSF und TNF die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen

In den bisherigen Versuchen konnte ein Einfluss von Mastzell-produziertem GM-CSF und TNF auf die CD11b- und CD62L-Expression und auf den „oxidative burst“ von Neutrophilen nachgewiesen werden. Daher wurde als nächstes untersucht, ob die Phagozytosefunktion von Neutrophilen ebenfalls durch GM-CSF und TNF der Mastzellen beeinflusst wird (Abb.3.24).

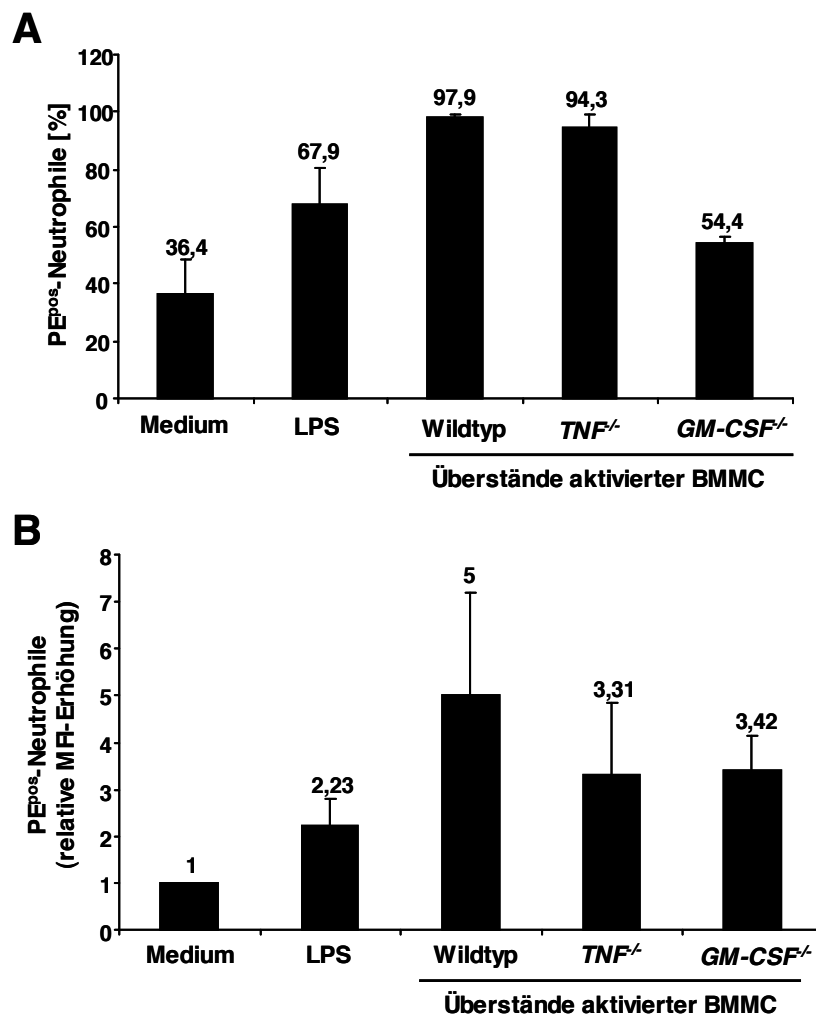


Abb.3.24: Die gesteigerte Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wird durch Mastzell-produziertes GM-CSF und TNF induziert.

Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen von Wildtyp-, TNF^{-/-}- und GM-CSF^{-/-}-Mastzellen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Neutrophile mit 100ng/ml LPS stimuliert. Die Überstände wurden generiert, indem IgE-beladene Mastzellen für 12-16h mit DNP-HSA bei 37°C aktiviert wurden. Neutrophile wurden mit Mastzell-Überständen für 2h inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von PE-Polystyrolpartikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen auf Gr-1 gefärbt und mittels FACS analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil der phagozytierenden Neutrophilen innerhalb der gesamten Neutrophilen-Population. In **Bild B** ist die relative geometrische MFI dieser PE-positiven Zellen abgebildet. Die Phagozytose durch unstimulierte Neutrophile wurde hierbei gleich eins gesetzt. n=3.

Abb.3.24 verdeutlicht, dass Mastzell-produziertes TNF, aber hauptsächlich GM-CSF die Steigerung der Phagozytoseaktivität von Neutrophilen bewirken. In Abb.3.24 A ist zu erkennen, dass nach Inkubation mit Überständen aktivierter *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellen lediglich 54,4% der Neutrophilen phagozytieren, wohingegen mit Überständen von Wildtyp-Mastzellen der Anteil bei 98% liegt. Der Anteil der phagozytierenden Neutrophilen beträgt nach Inkubation mit Überständen der *TNF*^{-/-}-Mastzellkulturen 94,3%. Hierdurch entsteht der Eindruck, dass TNF keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen hat. Die relativen MFI-Werten der phagozytierenden Zellen (Abb.3.24) lassen jedoch erkennen, dass TNF-defiziente Mastzellen eine verminderte Phagozytoseaktivität von Neutrophilen induzieren als Wildtyp-Mastzellen. Sowohl mit Überständen von *TNF*^{-/-}- als auch mit *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellen ist die Phagozytose durch Neutrophile etwa 1,5-fach geringer verglichen mit Überständen von Wildtyp-Mastzellen.

Zusätzlich wurden Phagozytose-Experimente von Kokulturen aus Neutrophilen mit *TNF*^{-/-}-Mastzellen durchgeführt (Abb.3.25).

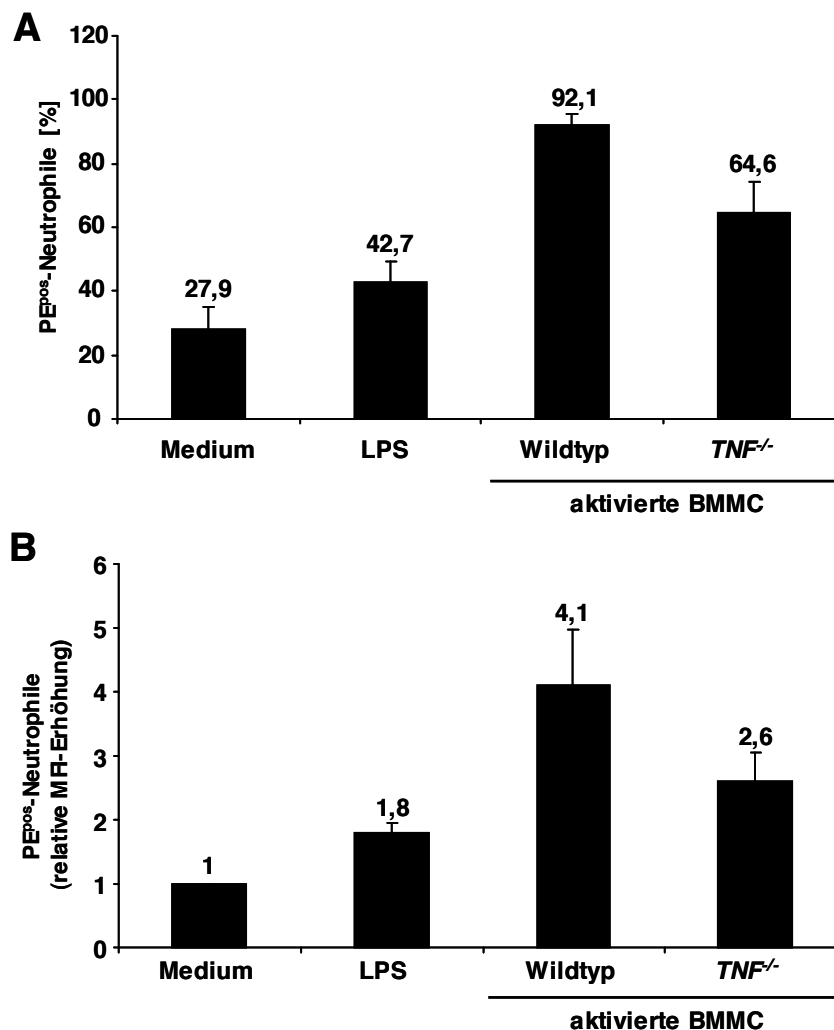


Abb.3.25: TNF von aktivierten Mastzellen verstärkt die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen.

Neutrophile wurden alleine, mit 100ng/ml LPS oder in Kokultur mit aktivierten Wildtyp- und *TNF*^{-/-}-Mastzellen (Zellzahl-Verhältnis 1:1) bei 37°C inkubiert. Die IgE-beladenen Mastzellen wurden zu Beginn des Experiments mit DNP-HSA aktiviert. Nach 2h erfolgte die Zugabe von PE-Partikeln für 30min. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller phagozytierenden Neutrophilen nach Kokultur mit Mastzellen. In **Bild B** ist die relative geometrische MFI der phagozytierenden Neutrophilen abgebildet. Die spontane Phagozytose durch ruhende Neutrophile wurde hierbei gleich eins gesetzt. n=3.

TNF^{-/-}-Mastzellen induzieren eine verminderte Phagozytoseaktivität von Neutrophilen als Wildtyp-Mastzellen. In Kokultur mit *TNF*^{-/-}-Mastzellen phagozytieren etwa 65% aller Neutrophilen, wohingegen mit Wildtyp-Mastzellen der Anteil bei 92% liegt (Abb.3.25 A). Ebenso sind die MFI-Werte der phagozytierenden Neutrophilen nach Inkubation mit *TNF*^{-/-}-Mastzellen um ca. 1,6-fach geringer als mit Wildtyp-Mastzellen (Abb.3.25 B). Somit zeigt sich hier die Reduktion der Phagozytose im prozentualen Anteil und zudem in den MFI-Werten der Neutrophilen.

3.7.4 Mastzellen erhöhen durch GM-CSF die Lebensdauer von Neutrophilen

In Kap.3.6 konnte gezeigt werden, dass Mastzellen die Lebensdauer von Neutrophilen erhöhen. Daher sollte untersucht werden, ob hier TNF und GM-CSF involviert sind. Zunächst wurde die spontane Apoptose von Neutrophilen in Gegenwart von Wildtyp- und $TNF^{-/-}$ -Mastzellen bzw. Überstände dieser Mastzellen mittels Annexin/PI-Färbung analysiert.

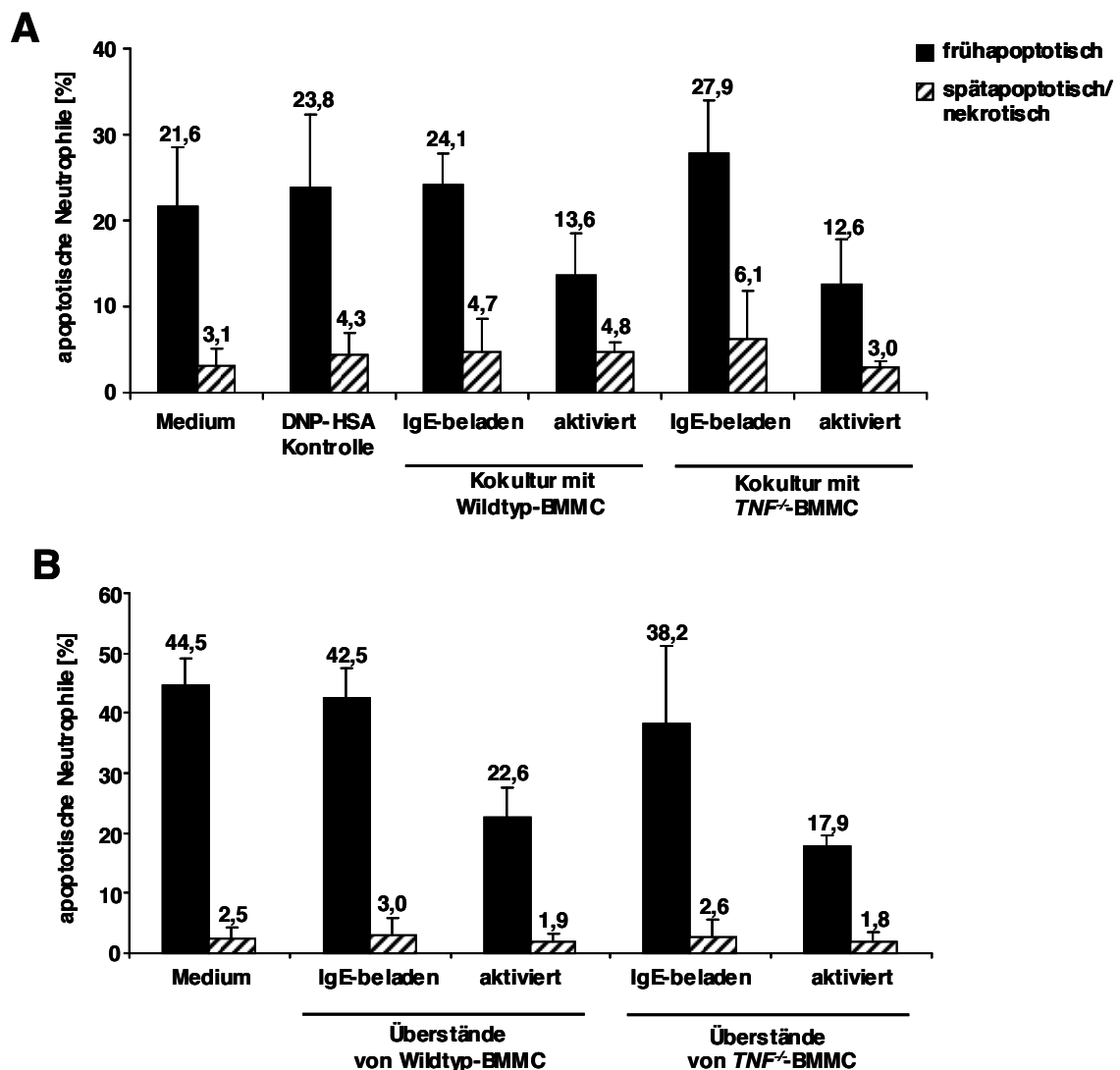


Abb.3.26: Mastzell-produziertes TNF hat keinen Einfluss auf die spontane Apoptose von Neutrophilen.

Neutrophile wurden alleine in Medium, in Kokultur mit Wildtyp- und $TNF^{-/-}$ -Mastzellen (Zellzahl-Verhältnis 1:1; 12h) oder mit Überständen von Mastzellkulturen (20h) der beiden Mäuse-Stämme bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden generiert, indem IgE-beladene Mastzellen für 12-16h mit DNP-HSA aktiviert wurden. Die Zellen wurden für die FACS-Analyse mit Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und analysiert. Der Anteil der frühapoptotischen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{neg}) und spätapoptotischen/nekrotischen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{pos}) Neutrophilen wurde aus der gesamten Neutrophilen-Population (Gr-1^{pos}/MHCII^{neg}) bestimmt. **Bild A** zeigt die Apoptosebestimmung nach Kokultur von Neutrophilen mit Mastzellen, **Bild B** zeigt die Ergebnisse nach Inkubation mit Überständen von Mastzellkulturen. n=3.

Die Ergebnisse in Abb.3.26 zeigen, dass Mastzell-produziertes TNF für den antiapoptotischen Effekt auf Neutrophile nicht verantwortlich ist. Wie bereits in Kap.3.6 gezeigt wurde, nimmt der Anteil apoptotischer Neutrophile in Gegenwart aktivierter Mastzellen stark ab. Dieser Effekt ist auch hier nochmals zu erkennen. Sowohl in Kokultur mit aktivierten Wildtyp-Mastzellen, als auch mit Überständen dieser Zellen wird der Anteil der frühapoptotischen Neutrophilen (AnnexinV-FITC^{pos}/PI^{neg}) ca. um die Hälfte reduziert. Die Apoptoserate von Neutrophilen nach Inkubation mit *TNF*^{-/-}-Mastzellen bzw. deren Überständen ist vergleichbar mit Ansätzen von Wildtyp-Mastzellen. Dies zeigt, dass TNF in der Mastzell-abhängigen Reduktion der spontanen Apoptose von Neutrophilen nicht involviert ist.

Als nächstes wurde die Apoptose von Neutrophilen nach Inkubation mit Überständen von Wildtyp- und *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellen untersucht.

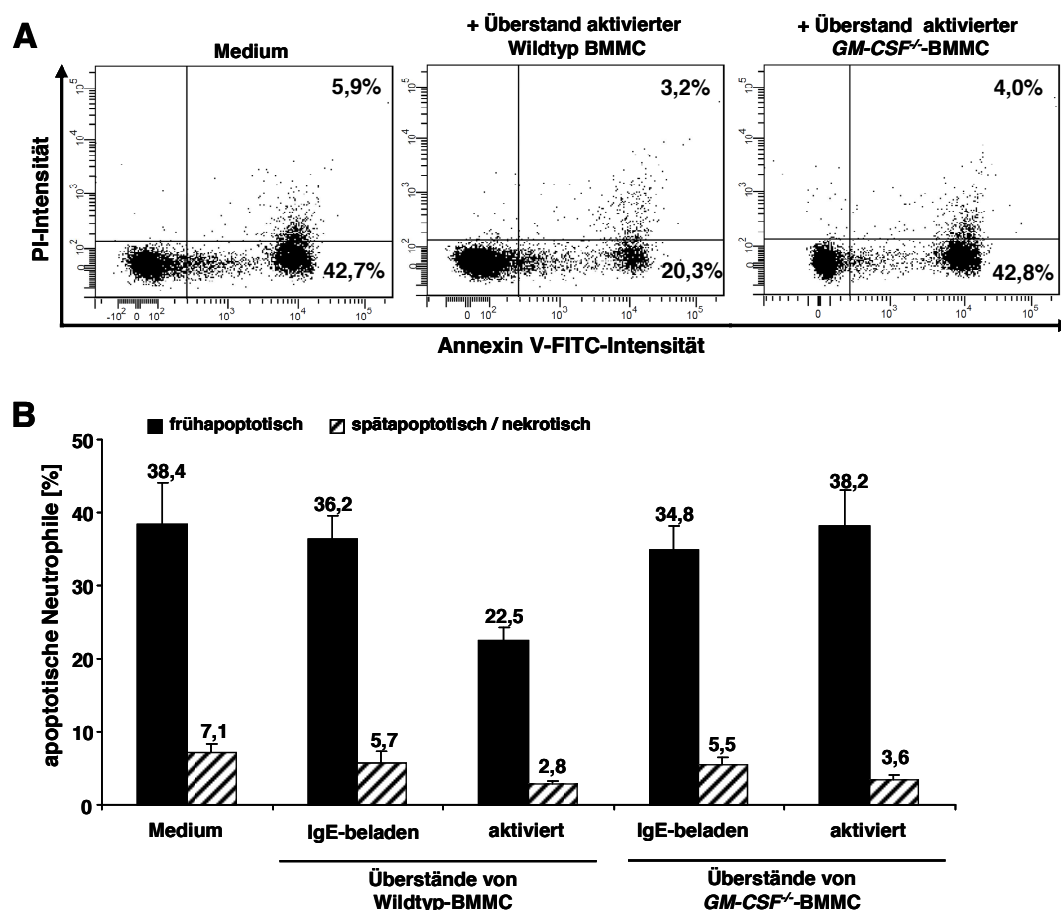


Abb.3.27: Für die Mastzell-induzierte Reduktion der spontanen Apoptose von Neutrophilen ist *GM-CSF* verantwortlich. Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen von Wildtyp- und *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellkulturen für 20h inkubiert. Die Überstände wurden generiert, indem Mastzellen für ca. 12-16h aktiviert wurden. Nach 20h Inkubation der Neutrophilen mit Überständen von Mastzellkulturen wurden die Zellen für die FACS-Analyse mit Annexin V-FITC und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und analysiert. **Bild A** zeigt exemplarisch „Dot Plots“ der Annexin/PI-Färbung von Neutrophilen. **Bild B** zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten.

Abb.3.27 zeigt deutlich, dass der antiapoptotische Effekt von Mastzellen auf Neutrophile einzig von GM-CSF abhängig ist. Der Anteil apoptotischer Neutrophile wird nach Inkubation mit Überständen von Wildtyp-Mastzellen um 50% reduziert. In Gegenwart von Überständen aktivierter *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellen findet keine Reduktion der Apoptoserate von Neutrophilen statt.

Die Bedeutung von Mastzell-produziertem TNF und GM-CSF auf die Apoptose von Neutrophilen wurde nicht nur in einem frühen Apoptose-Stadium untersucht, sondern mittels der Nicoletti-Methode auch zu einem späteren Zeitpunkt von 48h (Abb.3.28).

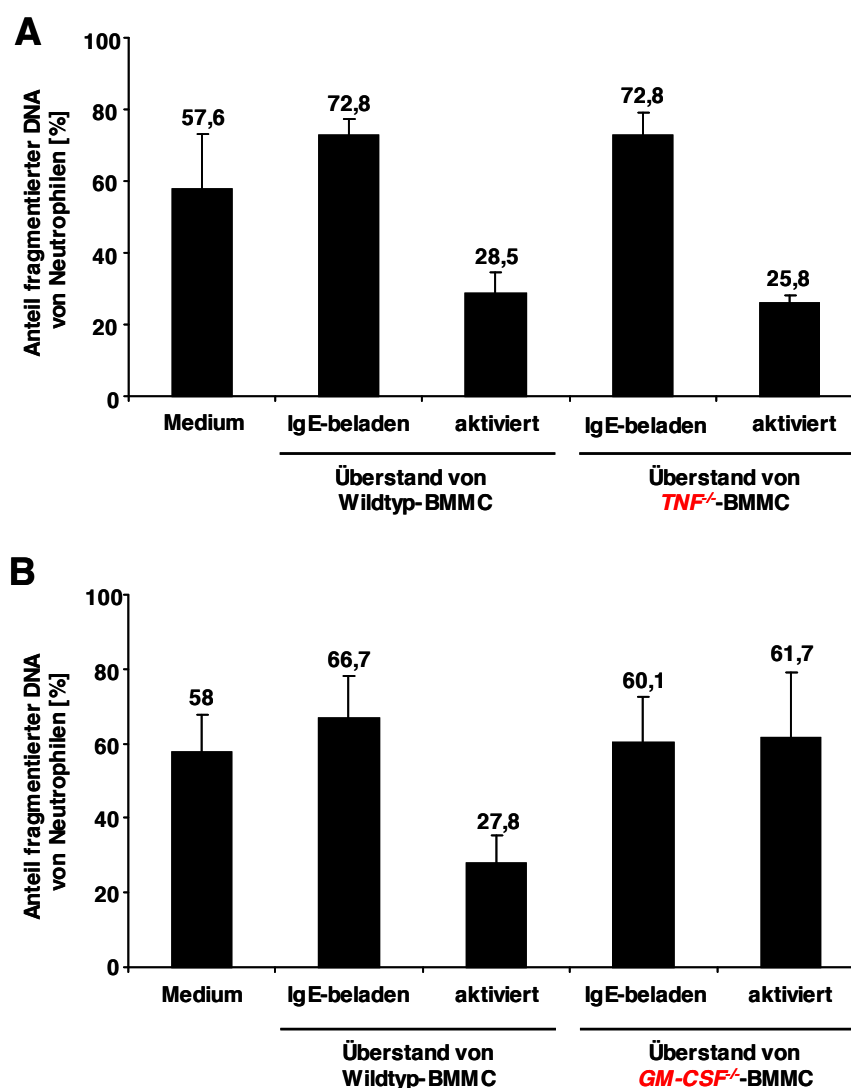


Abb.3.28: Die Mastzell-induzierte Erhöhung der Lebensdauer von Neutrophilen wird durch GM-CSF bewirkt.

Neutrophile wurden in Medium oder mit Überständen von Wildtyp-, *TNF*^{-/-} und *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellkulturen für 48h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 2h in Nicoletti-Puffer gefärbt und anschließend im FACS analysiert. **Bild A** zeigt die Ergebnisse der Apoptosebestimmung von Neutrophilen nach Inkubation mit Überständen von Wildtyp- und *TNF*^{-/-}-Mastzellen. **Bild B** zeigt die Ergebnisse nach Inkubation mit Überständen von Wildtyp- und *GM-CSF*^{-/-}-Mastzellkulturen. n=3.

Die Ergebnisse in Abb.3.28 A zeigen sehr deutlich, dass Mastzell-produziertes TNF auch zu einem späteren Zeitpunkt (48h) keinen Einfluss auf die Apoptose von Neutrophilen hat. Der Anteil apoptotischer Neutrophile beträgt mit Überständen von Wildtyp-Mastzellen 28,5%, mit Überständen von *TNF^{-/-}*-Mastzellen 25,8%. Abb.3.28 B zeigt wie in Abb.3.27, dass einzig GM-CSF für die Mastzell-induzierte Reduktion von apoptotischen Neutrophilen verantwortlich ist. Der Anteil apoptotischer Neutrophile beträgt in Gegenwart von Überstand aktivierter Wildtyp-Mastzellen 27,8% und ist somit verglichen mit der Apoptoserate von unstimulierten Neutrophilen im Medium um fast die Hälfte reduziert. In Gegenwart von Überständen aktivierter *GM-CSF^{-/-}*-Mastzellen erfolgt keine Reduktion von apoptotischen Neutrophilen. Der Anteil apoptotischer Neutrophile beträgt hier 61,7%.

4. Diskussion

4.1 Mastzellen und neutrophile Granulozyten in protektiven und pathologischen Immunreaktionen

Die traditionelle Sichtweise der Mastzelle als reine Effektorzelle in IgE-vermittelten allergischen Entzündungsreaktionen des Soforttyps hat sich in den letzten Jahren erheblich gewandelt. Mastzellen sind auch an der Entstehung und Modulation vieler anderer Entzündungsreaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt. Hierdurch können Mastzellen sowohl protektive als auch pathologische Funktionen ausüben. Durch zahlreiche Arbeiten in Mausmodellen konnte den Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenabwehr zugeordnet werden. Hierbei scheint die zentrale Funktion der Mastzelle die Initiierung einer raschen Einwanderung von Neutrophilen zum entzündeten Gewebe zu sein. Dieser Mastzell-vermittelte Influx von Neutrophilen stellt ein wichtiges Element der angeborenen Immunität dar. Als entscheidende Arbeiten hierzu gelten die frühen Studien der zwei Arbeitsgruppen von Echtenacher und Malaviya aus dem Jahr 1996. Echtenacher *et al.* zeigten in einem Modell der endogenen **septischen Peritonitis** mit Enterobakterien, dass Mastzell-defiziente Mäuse gegenüber Wildtyp-Tieren einen stark verminderten Influx von Neutrophilen aufwiesen und hierdurch keine effiziente Entzündungsreaktion stattfinden konnte. Daher hatten mastzelllose Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine deutlich geringere Überlebensrate. Durch Rekonstitution der mastzelllosen Mäuse mit *in vitro* generierten Mastzellen vor Beginn der Peritonitis, erhöhte sich die Überlebensrate dieser Tiere auf Wildtyp-Niveau. In dieser und weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass für den Neutrophilen-Influx das TNF von Mastzellen verantwortlich ist [23,24]. Die Mastzell-abhängige Rekrutierung von Neutrophilen spielt jedoch auch in der pathologischen Ausprägung vieler Krankheiten eine Rolle. So hat sich bei der allergischen Erkrankung **Urtikaria** (Nesselsucht) gezeigt, dass durch Mastzell-Degranulation die Anlockung von Neutrophilen in die Haut induziert wird [73]. Bei **bullösem Pemphigoid**, einer Autoimmunerkrankung der Haut mit einhergehender Blasenbildung, führt die Mastzell-Degranulation im experimentellen Mausmodell ebenfalls zu einem Influx von Neutrophilen. Mastzell-defiziente Mäuse entwickeln diese Krankheit nicht, aber durch vorherige lokale Rekonstitution mit BMMC kann die Krankheit in den mastzelllosen Tieren wieder ausgelöst werden [74,75]. Mastzellen und Neutrophile scheinen auch in der Pathogenese von **Psoriasis** (Schuppenflechte) involviert zu sein [67,76]. In der Ausprägung **Multipler Sklerose**, einer

chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, konnte ebenfalls eine Beteiligung von Mastzellen nachgewiesen werden. Sowohl murin als auch human liegen Mastzellen stark gehäuft an Entzündungsorten vor und sind degranuliert [77]. Aber der entscheidende Nachweis zeigte sich im Mausmodell für Multiple Sklerose, der sogenannten „experimental autoimmune encephalomyelitis“ (EAE). In diesem Modell zeigen Mastzell-defiziente Mäuse einen sehr schwach ausgeprägten Krankheitsverlauf verglichen mit Wildtyp-Tieren, werden aber durch den Transfer von BMMC für die Krankheit wieder empfänglich [78]. Auch hierbei geht die Entzündung mit einem Mastzell-abhängigen Influx von Neutrophilen in das zentrale Nervensystem einher [79]. Für die chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung der **rheumatoiden Arthritis** (RA) konnte im experimentellen Mausmodell mit Serumtransfer aus K/BxN-Mäusen²³ ebenfalls eine pathologische Funktion für Mastzellen bestätigt werden. Dies beruht auf der Beobachtung, dass mastzelllose Mäuse nicht an RA erkranken und erst nach Rekonstitution mit BMMC diese rheumatische Erkrankung entwickeln [80,81]. In weiteren Arbeiten mit Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass auch hier Mastzellen einen Influx von Neutrophilen induzieren [82-84]. Die genannten Arbeiten verdeutlichen die zentrale Bedeutung des Zusammenspiels von Mastzellen und Neutrophilen in Entzündungsprozessen sowohl für die Pathogenabwehr als auch für Autoimmunerkrankungen.

Eine wichtige Voraussetzung für die immunmodulatorische Funktion von Mastzellen in Entzündungsprozessen ist ihre Eigenschaft, abhängig von den jeweiligen Stimuli, unterschiedliche Mediatoren freizusetzen. So sind Mastzellen nicht nur zu einer massiven Degranulation (anaphylaktische Degranulation), sondern darüber hinaus auch zu der sogenannten „piecemeal degranulation“ fähig. Letztere bezeichnet die schrittweise, selektive Freisetzung von Granulamediatoren [85,86]. Zudem können Mastzellen auch Mediatoren ohne Degranulation freisetzen [40,87]. In verschiedenen Mausmodellen mit akuten Entzündungsreaktionen konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Neutrophilen durch eine Freisetzung definierter Mastzell-Mediatoren induziert wird. So wurde diesbezüglich für das Mastzell-TNF eine entscheidende Rolle im Infektionsmodell einer septischen Peritonitis zugewiesen [23,24]. Darüber hinaus konnte die Beteiligung von Mastzell-TNF an der Rekrutierung von Neutrophilen auch in Immunkomplex-vermittelter Peritonitis, im CHSR²⁴-Modell, in Th17-Zell-abhängiger Lungenentzündung und im EAE-Modell gezeigt

²³ K/BxN-Mäuse: Transgene Tiere, die im Alter von 3-4 Wochen spontan Gelenkentzündungen entwickeln, welche mit der humanen rheumatoiden Arthritis vergleichbar ist. Von diesen Mäusen wird Serum entnommen und in andere Mausstämme gespritzt, wodurch in den Empfängermäusen ebenfalls eine Arthritis ausgelöst werden kann.

²⁴ CHSR: contact hypersensitivity reaction. T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ.

werden [79,88-90]. Auch für mMCP-6²⁵ konnte in der infektiösen Peritonitis und im Arthritis-Modell ein Einfluss bestätigt werden [26,27,82]. Desweiteren zeigten in verschiedenen experimentellen Mausmodellen der Pathogenabwehr und Autoimmunerkrankungen auch Leukotriene und MIP-2²⁶ von Mastzellen eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile [25,89,91,92].

Die meisten Studien beschreiben den Einfluss von Mastzellen auf Neutrophile nur im Hinblick auf die Rekrutierung von Neutrophilen zu den Entzündungsorten. Dieser Mastzell-abhängige Influx wird über Mastzell-Mediatoren, welche lokale Endothelgefäße aktivieren, induziert [7,93]. So kann z.B. TNF von Mastzellen die Aktivierung von Endothelgefäßen über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) vermitteln und hierdurch die Einwanderung von Neutrophilen einleiten [66]. Jedoch gibt es bisher kaum Literatur, die einen direkten Einfluss der Mastzellen auf essentielle Effektorfunktionen von Neutrophilen beschreibt. Erste Hinweise zur direkten Beeinflussung des Aktivierungsgrades von Neutrophilen durch Mastzellen liefert eine Arbeit von Sutherland *et al.* aus dem Jahr 2008. In einem murinen Infektionsmodell wurde hier belegt, dass Mastzell-produziertes IL-6 Neutrophile auf direkte Weise aktiviert und so ihre Fähigkeit zum Abtöten von Bakterien steigert [28]. Da aber bislang wenige Erkenntnisse über eine direkte Wirkung von Mastzellen auf Effektorfunktionen von Neutrophilen vorliegen, sollte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Die Aktivierung von Neutrophilen geht einher mit der verstärkten Expression von CD11b²⁷ und der gleichzeitig verminderten Expression von CD62L auf ihrer Zelloberfläche [68]. CD11b und CD62L sind als Adhäsionsmoleküle für die Extravasation von Neutrophilen ins entzündete Gewebe verantwortlich. Das konstitutiv exprimierte L-Selektin CD62L ermöglicht den initialen Kontakt der zirkulierenden Neutrophilen im Blut zu den Endothelgefäßen durch Interaktionen mit P- und E-Selektinen auf dem aktivierten Endothel. Diese initiale Bindung ermöglicht eine rollende Bewegung entlang des Endothels. Nach Aktivierung der Neutrophilen wird CD62L enzymatisch von der Zelloberfläche abgespalten. Das β_2 -Integrin CD11b wird ebenfalls konstitutiv auf der Neutrophilen-Oberfläche exprimiert. In aktivierten Neutrophilen kommt es zur Fusion intrazellulärer Granula mit der Zellmembran. In den Granula liegt CD11b präformiert vor, so dass die Fusion sehr schnell zu einer erhöhten CD11b-Expression auf der Zelloberfläche führt. Durch Bindung von CD11b an

²⁵ mMCP-6: mouse mast cell protease-6

²⁶ MIP-2: macrophage inflammatory protein-2

²⁷ CD11b liegt als Heterodimer CD11b/CD18 vor, welches zu den β_2 -Integrinen gehört. Andere Bezeichnungen für diesen Rezeptor sind Mac-1 (macrophage antigen-1) oder CR3 (complement receptor 3).

ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“) auf dem Endothel erfolgt eine feste Adhäsion der Neutrophilen [47,94]. Zur Klärung der grundlegenden Frage, ob Mastzellen auch eine direkte Aktivierung von Neutrophilen bewirken können, wurde zunächst die CD11b- und CD62L-Expression auf Neutrophilen in Gegenwart von Mastzellen untersucht. Hierfür wurden Experimente etabliert, in denen aus murinem Knochenmark frisch angereicherte Neutrophile zusammen mit *in vitro* kultivierten BMMC in Kokulturen inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit stimulierter Mastzellen der Aktivierungsstatus von Neutrophilen enorm verstärkt wird, was durch die drastische CD11b-Erhöhung und der gleichzeitigen CD62L-Reduktion auf der Zelloberfläche von Neutrophilen ersichtlich wurde. Hiermit belegen diese Ergebnisse, dass Mastzellen in der Lage sind, Neutrophile direkt zu aktivieren. Als nächstes stellte sich die Frage nach dem Mechanismus der Beeinflussung von Neutrophilen durch Mastzellen. Interaktionen zwischen Zellen können über direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch lösliche Mediatoren vermittelt werden. Daher wurden zunächst Neutrophile mit Überständen von Mastzellkulturen inkubiert. Durch die Analyse der CD11b- und CD62L-Oberflächenexpression zeigte sich in diesen Experimenten, dass die Aktivierung von Neutrophilen mit Überständen von Mastzellkulturen vergleichbar war wie in den Kokulturen (Abb.3.1-Abb.3.4). Daraus kann gefolgert werden, dass die Mastzell-vermittelte Modulation der CD11b- und CD62L-Oberflächenexpression auf Neutrophilen zumindest hauptsächlich durch lösliche Mediatoren induziert wird.

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, welche Mastzell-Mediatoren eine direkte Aktivierung von Neutrophilen bewirken können. Diesbezüglich konnte durch *in vitro* Experimente gezeigt werden, dass TNF und GM-CSF von Mastzellen den Aktivierungsstatus von Neutrophilen modulieren. TNF liegt sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form vor. Zunächst wird TNF als membrangebundenes Protein gebildet, woraus das sogenannte TACE („TNF-alpha converting enzyme“) durch enzymatische Spaltung die lösliche Form bildet [95,96]. Da das membranständige TNF ebenfalls biologisch aktiv sein kann [97-99], wurden in *in vitro* Experimenten Neutrophile sowohl in Kokultur mit $TNF^{-/-}$ -Mastzellen als auch mit Überständen dieser Zellen inkubiert. Es zeigte sich, dass aktivierte $TNF^{-/-}$ -Mastzellen bzw. Überstände von $TNF^{-/-}$ -Mastzellkulturen die CD11b-Expression auf Neutrophilen steigern. Jedoch ist die CD11b-Expression mit $TNF^{-/-}$ -Mastzellen gegenüber den Kontrollen mit Wildtyp-Mastzellen vermindert (Abb.3.22). Nach Inkubation mit Überständen von $GM-CSF^{-/-}$ -Mastzellkulturen wurde die CD11b-Expression auf Neutrophilen kaum gesteigert. Hierdurch wird ersichtlich, dass GM-CSF auf die CD11b-Expression einen stärkeren Effekt

hat als das Mastzell-TNF. Die CD62L-Expression auf Neutrophilen wurde sowohl nach Inkubation mit Ansätzen von *TNF^{-/-}*-Mastzellen als auch mit *GM-CSF^{-/-}*-Mastzellen beinahe gleichermaßen stark gedrosselt wie nach Inkubation mit Ansätzen der Wildtyp-Mastzellen. Somit kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass lösliches TNF und GM-CSF von Mastzellen in der Steigerung der CD11b-Expression auf Neutrophilen involviert sind, aber die CD62L-Expression kaum beeinflussen. Die Beobachtung, dass in Gegenwart TNF- und GM-CSF-defizienter Mastzellen eine verminderte Aktivierung stattfand, lässt auf weitere Mastzell-Mediatoren schließen, die in der Aktivierung von Neutrophilen involviert sind. Kandidaten, die hierfür in Frage kamen, waren Histamin und IL-1 α/β . Von besonderem Interesse war Histamin, das während Entzündungsprozessen an der Chemotaxis von Effektorzellen und einer erhöhten vaskulären Permeabilität beteiligt ist. Doch die Stimulation von Neutrophilen mit Histamin zeigte keine Aktivierung der Zellen (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls konnten die proinflammatorischen Cytokine IL-1 α und IL-1 β ausgeschlossen werden, da Untersuchungen mit BMDC aus IL-1 α/β -defizienten Mäusen und Experimente mit Neutrophilen aus IL-1-Rezeptor-defizienten Tieren keine Unterschiede zu den Kontrollen zeigten (Daten nicht gezeigt).

4.2 Mastzellen verstärken Effektorfunktionen von Neutrophilen

Eine direkte Aktivierung von Neutrophilen durch Mastzellen könnte für die lokale Verstärkung von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen. Neben ICAM-1 können beispielsweise auch das Komplementprotein iC3b, LPS oder proinflammatorische Cytokine (z.B. TNF) als Liganden an CD11b binden [52]. Hierdurch können in Neutrophilen Effektorfunktionen wie der „oxidative burst“ oder die Phagozytose eingeleitet werden [100]. Diese Effektorfunktionen können allerdings auch über andere Signalwege induziert werden [45]. Aufgrund dieser Kenntnisse und den bisher beschriebenen Ergebnissen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Mastzellen durch eine direkte Aktivierung von Neutrophilen die Phagozytose und den „oxidative burst“ lokal in Entzündungsreaktionen verstärken könnten. Da Neutrophile als professionelle Phagozyten die früheste Abwehr bei Infektionen darstellen, wäre der direkte Einfluss von Mastzellen auf Neutrophile ein entscheidendes Kriterium für eine effiziente Pathogenabwehr. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der Einfluss von Mastzellen hinsichtlich der Effektorfunktionen von Neutrophilen untersucht.

Für die Untersuchung der **Phagozytoseaktivität** wurden Neutrophile in Gegenwart von PE-Polystyrolpartikeln und in An- und Abwesenheit von Mastzellen inkubiert. Die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Partikel konnten nach Aufnahme in die Zellen mittels FACS detektiert werden. Es zeigte sich, dass aktivierte Mastzellen die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen drastisch verstärken (Abb.3.7 und Abb.3.8). Diese gesteigerte Phagozytosefunktion wird durch lösliche Mastzell-Mediatoren vermittelt, wie Inkubationen von Neutrophilen mit Überständen aktivierter Mastzellkulturen zeigen (Abb.3.9 und Abb.3.10). Durch weiterführende Experimente mit *TNF^{-/-}*- und *GM-CSF^{-/-}*-Mastzellen wurde deutlich, dass die verstärkte Phagozytose durch Neutrophile von TNF und von GM-CSF vermittelt wird. Hierbei scheint das GM-CSF einen stärkeren Effekt zu haben, da bei Fehlen von Mastzell-produziertem GM-CSF sowohl die MFI als auch der prozentuale Anteil der phagozytierenden Neutrophilen gegenüber Ansätzen mit Wildtyp-Mastzellen vermindert ist (Abb.3.24).

Die Messung des „**oxidative burst**“ von Neutrophilen erfolgte mittels FACS durch Färbung der Zellen mit einem Farbstoff, der in den Zellen durch H₂O₂ hydrolysiert wird und daraufhin fluoresziert. Es zeigte sich, dass aktivierte Mastzellen bzw. Überstände aktivierter Mastzellkulturen die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale von Neutrophilen verstärken (Abb.3.5). Experimente mit *GM-CSF^{-/-}*-Mastzellen zeigen, dass die Erhöhung des „oxidative burst“ hauptsächlich durch das GM-CSF der Mastzellen vermittelt wird. TNF von Mastzellen hat nur einen geringen Einfluss auf den „oxidative burst“ der Neutrophilen, da *TNF^{-/-}*-Mastzellen die Bildung toxischer Sauerstoffradikale beinahe gleichermaßen stark induzieren wie Wildtyp-Mastzellen (Abb.3.23).

Inflammatorische Mediatoren können nicht nur Effektorfunktionen von Neutrophilen beeinflussen, sondern auch die **Lebensdauer** dieser Zellen modulieren [62,101]. Um festzustellen, ob Mastzellen ebenfalls einen Einfluss auf die Lebensdauer von Neutrophilen ausüben, wurde der Anteil apoptotischer Neutrophile nach Inkubation mit Mastzellen untersucht. Hierbei zeigte sich durch Annexin V/PI-Färbung, dass Mastzellen die spontane Apoptose von Neutrophilen durch lösliche Mediatoren konzentrationsabhängig reduzieren (Abb.3.19 und Abb.3.20). Diese Ergebnisse konnten im Nicolettiassay bestätigt werden, mit welchem die Apoptose von Neutrophilen anhand der Fragmentierung ihrer DNA in einem späteren Stadium (24h und 48h) bestimmt wurde. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass in Gegenwart von Überständen aktivierter Mastzellkulturen der prozentuale Anteil apoptotischer

Neutrophile um etwa die Hälfte reduziert wird (Abb.3.21). Für TNF ist beschrieben, dass es konzentrationsabhängig gegensätzliche Effekte auf Neutrophilen induzieren kann. So fördern hohe TNF-Konzentrationen die Apoptose, während niedrige Konzentrationen antiapoptotisch auf Neutrophile wirken. Diese gegensätzliche Wirkung von TNF wird über zwei separate antiapoptotische Signalwege in Neutrophilen vermittelt. Hohe TNF-Konzentrationen induzieren einen beschleunigten „turnover“ des antiapoptotischen Proteins Mcl-1, während niedrige TNF-Mengen die Expression eines anderen antiapoptotischen Proteins, dem sogenannten BFL-1, induzieren [102]. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Effekt von Mastzell-TNF auf die Apoptose von Neutrophilen bestimmt werden, sondern das GM-CSF von Mastzellen ist alleine verantwortlich für die Reduktion von apoptotischen Neutrophilen (Abb.3.26-Abb.3.28). Die Mastzell-abhängige Modulation der Lebensdauer von Neutrophilen könnte bei Infektionen Vorteile für den Organismus haben. Neutrophile hätten mehr Zeit eingedrungene Pathogene im Körper abzutöten. Hierdurch könnte die Ausbreitung einer Infektion effizient kontrolliert werden, bis andere Leukozyten wie Monozyten und auch Zellen der adaptiven Immunität (T- und B-Zellen) zum Infektionsherd gelangen.

4.3 *Kit*^{W-sh/W-sh} („sash“) –Mäuse als Modell zur Untersuchung von Neutrophilen und Mastzellen *in vivo*

Die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Phagozytoseversuche sollten in einem *in vivo* Mausmodell bestätigt werden. Um die Funktionalität von Neutrophilen in Abhängigkeit von Mastzellen untersuchen zu können, schien die *Kit*^{W-sh/W-sh} („sash“)-Maus ein geeignetes *in vivo* Modell zu sein. *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse besitzen eine Inversionsmutation oberhalb ihres c-Kit-Gens. Da die *W-sash*-Mutation nicht im kodierenden Bereich, sondern in regulatorischen Elementen oberhalb des Transkriptionsstartpunktes im c-Kit-Gen liegt, scheint sich diese Mutation nur auf Mastzellen und Melanozyten zu beschränken. Daher besitzen *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse in all ihren Geweben keine Mastzellen und weisen eine fehlende Pigmentierung auf [17]. Da jedoch c-Kit nicht nur von Mastzellen exprimiert wird, sondern unter anderem auch von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen [103], konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die *W-sash*-Mutation nicht doch einen Einfluss auf die Funktionalität von Neutrophilen hat. Daher war es zunächst notwendig, die Aktivierung der Neutrophilen in *Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäusen und Wildtyp-Tieren des kongenen C57BL/6-Stammes miteinander zu vergleichen. *In vitro* Experimente zeigten, dass frisch

angereicherte Neutrophile aus dem Knochenmark naiver *Kit^{W-sh/W-sh}*- und Wildtyp-Mäuse eine gleich starke konstitutive CD11b-Expression zeigen. Auch nach Aktivierung der Neutrophilen durch Mastzellen waren keine Unterschiede in der CD11b-Expression zwischen beiden Stämmen festzustellen (Abb.3.13). Weiterhin zeigten Neutrophile beider Stämme in Gegenwart von Überständen aktivierter Mastzellkulturen eine vergleichbar stark gesteigerte Phagozytoseaktivität (Abb.3.14). Da somit Defekte in der CD11b-Aktivierung und in der Phagozytose von Neutrophilen in *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen ausgeschlossen werden konnten, erwiesen sich diese Mäuse für *in vivo* Untersuchungen der Mastzell-abhängigen Phagozytoseaktivität von Neutrophilen als geeignet.

Auffällig war jedoch, dass *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Tieren trotz gleicher Körpermasse eine stark vergrößerte Milz besitzen und in diesem Organ ein signifikant erhöhter Anteil von Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen vorliegt (Abb.3.11). Diese Beobachtung stimmt mit einer anderen Arbeit überein, in der eine detaillierte Charakterisierung der *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse durchgeführt wurde [71]. Aus dieser Beobachtung könnte gefolgert werden, dass es sich bei dieser expandierten Gr-1/CD11b-positiven Zellpopulation um Neutrophile handelt und somit *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse eine Neutrophilie aufweisen. Eine Neutrophilie könnte auf einen Defekt im „turnover“ der Neutrophilen beruhen, z.B. durch Veränderungen in der Apoptose dieser Zellen. Jedoch müsste sich dann die Neutrophilie auch im Knochenmark und im Blut der Tiere widerspiegeln. Doch eigene Daten (Abb.3.12) und auch Studien von Nigrovic *et al.* zeigen, dass sich der prozentuale Anteil der Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen sowohl im Knochenmark als auch im Blut von *Kit^{W-sh/W-sh}*- und Wildtyp-Tieren nicht voneinander unterscheidet. Da sich somit die expandierte Gr-1/CD11b-positiv Zellpopulation auf die Milz beschränkt, kann hier keine Neutrophilie vorliegen. Daher besteht die Vermutung, dass es sich bei dieser expandierten Gr-1/CD11b-positiven Zellpopulation in den *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen um sogenannte „myeloide Suppressorzellen“ („myeloid-derived suppressor cells“; MDSC) handeln könnte. MDSC liegen unter pathologischen Bedingungen, wie hauptsächlich bei Tumoren, aber auch bei Infektionen und anderen Entzündungserkrankungen, stark expandiert vor. Sie bilden eine heterogene Gruppe aus myeloiden Vorläuferzellen, die in der Maus als eine Gr-1/CD11b-exprimierende Zellpopulation beschrieben wird. Kennzeichnend für diese Zellen ist ihre Fähigkeit zur Suppression von T-Zell-Immunantworten. Die Expansion dieser Zellen und ihre suppressive Fähigkeit werden durch Faktoren im pathologischen Milieu induziert [104,105]. Zu Faktoren, welche die Expansion von MDSC fördern können, gehört der Stammzellfaktor (SCF). In Mäusen mit Tumoren wurde gezeigt, dass durch die Blockade des SCF-Rezeptors

c-Kit (CD117) die Expansion der myeloiden Suppressorzellen und die Tumorangiogenese reduziert werden [106]. Diese Beobachtung stärkt weiter die Vermutung, dass es sich bei der Gr-1/CD11b-positiven Zellpopulation in der Milz der *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse um myeloide Suppressorzellen handeln könnte. In Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten in den Milzen der mastzelllosen Mäuse nicht nur ein stark erhöhter Anteil von Gr-1/CD11b-exprimierenden Zellen, sondern gleichzeitig auch ein Anstieg von CD117-positiven Zellen festgestellt werden. In der Milz der *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse beträgt der Anteil CD117-exprimierender Zellen 2,4%, wohingegen Wildtyp-Tiere einen Anteil dieser Zellen von 1,4% aufweisen. Im Knochenmark ist der Anteil CD117-positiver Zellen mit 18-19% in beiden Mäuse-Stämmen gleich. Die Expansion der Gr-1/CD11b-positiven Zellen in der Milz von *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen könnte mit der Mutation im c-Kit Gen und der damit verbundenen erhöhten Expression von CD117 auf Milzzellen zusammenhängen, deren Identität jedoch noch bestimmt werden muss. Grundsätzlich jedoch zeigten aus dem Knochenmark von *Kit^{W-sh/W-sh}*-Tieren isolierte Neutrophile keine Anomalien. Ob sich die stark expandierte Gr-1/CD11b-positive Population in den Milzen auf immunologische Reaktionen dieser Tiere auswirken kann, müssen weitere Arbeiten zeigen.

4.4 Mastzellen verstärken *in vivo* die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen

Für *in vivo* Untersuchungen der Mastzell-abhängigen Phagozytoseaktivität von Neutrophilen hatte sich der *Kit^{W-sh/W-sh}*-Stamm als geeignet erwiesen (Abb.3.13 und Abb.3.14). Hierbei wurde ein Modell gewählt, in dem in *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen und Wildtyp-Tieren des kongenen Stammes durch intranasale LPS-Applikation eine akute Atemwegsentszündung induziert wurde. Die Inhalation von LPS führt zu einer schnellen Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge und aktiviert auch Mastzellen [107,108]. Um die Phagozytoseaktivität der Neutrophilen messen zu können, wurden den Mäusen PE-Polystyrolpartikel in Kombination mit LPS verabreicht. Die Ergebnisse dieses *in vivo* Modells zeigen deutlich, dass Mastzellen *in vivo* die Phagozytosefunktion von Neutrophilen verstärken können. Mastzelllose *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäuse zeigten eine reduzierte Phagozytoseaktivität von Neutrophilen verglichen mit Wildtyp-Tieren. Diese verminderte Phagozytose ließ sich durch die Rekonstitution der Mastzell-defizienten Mäuse mit *in vitro* generierten BMDC wieder auf Wildtyp-Niveau steigern (Abb.3.16 B). Die Einwanderung der Neutrophilen in die Lungen der Mäuse wurde in diesem LPS-induzierten Entzündungsmodell durch Mastzellen nicht beeinflusst

(Abb.3.16 A). Hiermit kann auch ausgeschlossen werden, dass die verminderte Phagozytose durch Neutrophile in den Lungen der mastzelllosen Mäuse auf einem unterschiedlichen Anzahlverhältnis von eingewanderten Neutrophilen zu den verabreichten Partikeln beruht. Diese Daten zeigen somit, dass Mastzellen die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen *in vivo* verstärken können und zudem auch, dass Mastzellen den Influx und die Effektorfunktionen von Neutrophilen unabhängig voneinander beeinflussen können.

Aus Gründen einfacher experimenteller Durchführbarkeit wurden in den *in vitro* Versuchen Mastzellen grundsätzlich über IgE aktiviert, was *in vivo* eine vorhergehende adaptive Immunreaktion voraussetzt. Die Resultate der LPS-induzierten akuten Lungenentzündung legen im Einklang mit bereits publizierten Daten jedoch nahe, dass ein Einfluss von Mastzellen auf Neutrophile auch unabhängig von IgE bzw. einer vorausgegangenen adaptiven Reaktion stattfinden kann. Dies macht es wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit beschriebene Wechselwirkung zwischen Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in Prozessen der angeborenen und adaptiven Immunität eine Rolle spielen kann.

4.5 Weiterführende Fragestellungen

Die Daten zeigen, dass die Aktivierung von Neutrophilen durch Kulturüberstände aktivierter Mastzellen induziert werden kann. Somit handelt es sich um lösliche Faktoren von Mastzellen, welche die Funktion von Neutrophilen beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Neutrophile auch mit Überständen aktivierter Mastzellen inkubiert, die zuvor bei 95°C für zehn Minuten erhitzt wurden. Trotz der so erfolgten Denaturierung enthaltener Proteine, waren die behandelten Kulturüberstände weiterhin in der Lage, eine starke Aktivierung von Neutrophilen auszulösen. Hieraus lässt sich schließen, dass zum Teil lösliche Lipidmediatoren von Mastzellen auf Neutrophile wirken. Mit Hilfe der Massenspektrometrie soll in weiteren Arbeiten eine genaue Identifizierung der involvierten Mastzell-Lipide erfolgen. Erste massenspektrometrische Untersuchungen haben Hinweise geliefert, dass womöglich „platelet-activating factor“ (PAF) und Prostaglandine involviert sind.

Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde in der eigenen Arbeitsgruppe ein *in vivo* Modell etabliert, bei dem in *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen und Wildtyp-Tieren intratracheal eine Atemwegsentzündung durch Konidien des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* induziert wird. *A. fumigatus* ist der vorherrschende pathogene Pilz, der über die Luftwege bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem lebensbedrohliche Infektionen auslösen kann [109]. Gelangen Konidien des *A. fumigatus* in die Lungen, werden sie vor allem durch Alveolarmakrophagen phagozytiert [110]. Für die Bekämpfung der Hyphen von *A. fumigatus* sind jedoch hauptsächlich Neutrophile verantwortlich [111]. Neutrophile können ebenfalls Konidien phagozytieren und durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale die Keimung der Konidien verhindern [112,113]. Über die Rolle von Mastzellen bei einer Infektion von *A. fumigatus* ist bisher kaum etwas bekannt. In besagtem *in vivo* Modell wurde deutlich, dass in mastzelllosen und Wildtyp-Mäusen nach Infektion mit *A. fumigatus* sowohl die Rekrutierung als auch die Aktivierung von Neutrophilen stark von Mastzellen abhängig sind. Nach acht Stunden wanderten in die Lungen mastzellloser Tiere weniger Neutrophile ein als in Wildtyp-Tieren. Zudem hatten eingewanderte Neutrophile in den mastzelllosen Tieren eine geringere CD11b-Expression verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Abb.4.1). Somit zeigen Mastzellen in diesem Modell sowohl einen Einfluss auf den Influx als auch auf die CD11b-Aktivierung von Neutrophilen. In zukünftigen Arbeiten soll geklärt werden, ob Mastzellen in diesem Infektionsmodell mit *A. fumigatus* auch die Phagozytoseaktivität und das Überleben von Neutrophilen beeinflussen können.

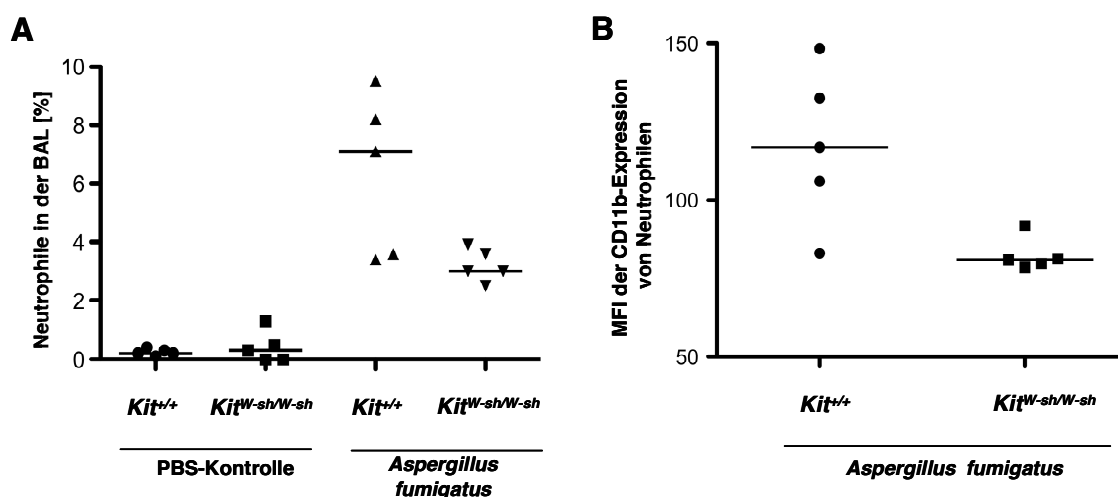


Abb.4.1: Im Infektionsmodell mit *Aspergillus fumigatus* sind Influx und Aktivierung von Neutrophilen Mastzell-abhängig. Mastzelllosen *Kit^{W-sh/W-sh}*-Mäusen und Wildtyp-Tieren *Kit^{+/+}* des kongenen Stammes (C57BL/6) wurden intratracheal 5×10^6 Konidien von *Aspergillus fumigatus* verabreicht. Als Kontrollen wurde Mäusen intratracheal PBS appliziert. Nach 8h wurde den Mäusen die bronchoalveoläre Lavage (BAL) entnommen und die Zellen im FACS analysiert. **Bild A** zeigt den prozentualen Anteil aller Neutrophile (Gr-1^{POS}/CD11b^{POS}) in der BAL. **Bild B** zeigt die medianen MFI der CD11b-Expression auf Neutrophilen. n=5 Tiere.

Für weitere Arbeiten wäre es ebenfalls interessant zu untersuchen, ob Mastzellen außer den traditionellen Effektorfunktionen von Neutrophilen auch andere Funktionen beeinflussen können. Kürzlich wurde eine Subpopulation der Neutrophilen beschrieben, die durch die Expression des Adhäsionsmoleküls CD49d an der Zelloberfläche identifiziert werden kann [114]. In einem murinen Modell von chronischem Asthma, welches durch Infektion mit dem Sendai-Virus induziert wurde, konnte in den Lungen der Versuchstiere eine Akkumulation von CD49d-exprimierenden Neutrophilen beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass die CD49d-positive Subpopulation in den Lungen die FcεRI-Expression auf Dendritischen Zellen induziert. Da in diesem Modell die Entwicklung der Atemwegsentzündung von der FcεRI-Expression auf Dendritischen Zellen abhängig ist, kommt dieser neubeschriebenen Granulozytenpopulation eine zentrale Rolle für das Zustandekommen einer adäquaten Immunreaktion zu. Die Mechanismen, durch welche die CD49d-Expression auf Neutrophilen induziert wird, sind noch weitestgehend ungeklärt [115]. Daher wäre es eine interessante Frage, ob in Entzündungsprozessen Mastzellen an der Entstehung der CD49d^{pos}-Subpopulation von Neutrophilen involviert sind.

5. Zusammenfassung

Mastzellen sind an der Entstehung und Regulation von Entzündungsreaktionen unterschiedlicher Genese beteiligt und leisten somit auch innerhalb der angeborenen Immunität einen wichtigen Beitrag zur Pathogenabwehr. Mastzellen sind jedoch auch in entzündliche Prozesse involviert, welche chronische Erkrankungen auslösen oder verstärken können. Zentral ist hierbei ihre Fähigkeit, durch Produktion inflammatorischer Mediatoren die lokalen Blutgefäße zu aktivieren und somit rasch neutrophile Granulozyten zum Entzündungsort zu rekrutieren. Über eine direkte Interaktion zwischen Mastzellen und Neutrophilen ist bisher jedoch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mastzellen essentielle Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten verstärken. So erhöhen Mastzellen den Aktivierungsstatus von Neutrophilen, was durch die Modulation der Aktivierungsmarker CD11b und CD62L auf der Zelloberfläche von Neutrophilen demonstriert wurde. Die Phagozytoseaktivität von Neutrophilen wird in Anwesenheit aktivierter Mastzellen enorm gesteigert. Dies wird hauptsächlich durch Mastzell-produziertes TNF und GM-CSF vermittelt, wie in Experimenten mit Mastzellen aus TNF- und GM-CSF-defizienten Mäusen gezeigt wurde. Darüber hinaus wird die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale von Neutrophilen in Gegenwart aktivierter Mastzellen erhöht. Dieser Effekt wird hauptsächlich durch GM-CSF der Mastzellen induziert, während TNF nur einen geringen Einfluss hat. Weiterhin zeigten *in vitro* Experimente, dass aktivierte Mastzellen die Lebensdauer von Neutrophilen erhöhen. Die Reduktion der Apoptose von Neutrophilen wird einzig durch GM-CSF bewirkt.

Zur Validierung der *in vitro* Studien wurden *in vivo* Untersuchungen zur Mastzell-abhängigen Phagozytoseaktivität von Neutrophilen durchgeführt. Mit Hilfe des Modells einer LPS-induzierten akuten Atemwegsentzündung in Mastzell-defizienten und Wildtyp-Tieren des kongenen Stammes konnte bestätigt werden, dass Mastzellen auch *in vivo* die Phagozytosefunktion von Neutrophilen verstärken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Mastzellen einen direkten Einfluss auf wichtige Effektorfunktionen neutrophiler Granulozyten ausüben. Diese Verstärkerfunktion von Mastzellen könnte ihre essentielle Bedeutung in multiplen akuten und chronischen Entzündungen erklären und einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Mastzellen und Granulozyten aufzeigen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC	Allophycocyanin
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMMC	bone marrow-derived mast cells
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	cluster of differentiation
CLP	caecum ligation and puncture
CR	complement receptor
CTMC	connective tissue type mast cells
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP-HSA	Dinitrophenol-Human Serum Albumin
EDTA	Disodium ethylendiamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	Lateinisch: et alia = und andere
FACS	fluorescence activated cell scanner
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
Fc ϵ RI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
fMLP	<i>N</i> -Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin; bakterielles Peptid
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Gr-1	charakteristisches Oberflächenmolekül für neutrophile Granulozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
iv	intravenös
Kap	Kapitel
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
Mac-1	macrophage antigen-1
MACS	magnetic activated cell sorter
MCP	mast cell protease
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MEM	minimal essential medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMC	mucosal type mast cells
min	Minute
NADPH	Nicotin Adenin Dinukleotid Phosphat
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
PMN	polymorphonuclear neutrophil

PRR	pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserin
ROS	reactive oxygen species
SCF	stem cell factor (Stammzellfaktor)
SSC	side scatter
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

7. Literaturverzeichnis

1. Kitamura Y, Shimada M, Hatanaka K, Miyano Y: Development of Mast-Cells from Grafted Bone-Marrow Cells in Irradiated Mice. *Nature* 268:442-443, 1977.
2. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: Mast cells. *Physiological Reviews* 77:1033-1079, 1997.
3. Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ: Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271:818-822, 1996.
4. Hallgren J, Gurish MF: Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunological Reviews* 217:8-18, 2007.
5. Artis D, Humphreys NE, Potten CS, Wagner N, Muller W, McDermott JR, Grecis RK, Else KJ: beta 7 integrin-deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small intestine during enteric helminth infection. *European Journal of Immunology* 30:1656-1664, 2000.
6. Kumar V, Sharma A: Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Mol Immunol* 48:14-25, 2010.
7. Stassen M, Hultner L, Schmitt E: Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev Immunol* 22:115-140, 2002.
8. 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* 83:4464-4468, 1986.
9. Heib V, Becker M, Taube C, Stassen M: Advances in the understanding of mast cell function. *Br J Haematol* 142:683-694, 2008.
10. Austen KF, Boyce JA: Mast cell lineage development and phenotypic regulation. *Leuk Res* 25:511-518, 2001.
11. Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR: The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79:958-963, 1992.
12. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ: Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90-93, 1998.
13. 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^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 162:1025-1043, 1985.
14. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE: The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 55:185-192, 1988.

15. Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Yamaguchi K, Nishikawa S: Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res* 19:1267-1271, 1991.
16. Reith AD, Rottapel R, Giddens E, Brady C, Forrester L, Bernstein A: W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev* 4:390-400, 1990.
17. Grimbaldeston 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* 167:835-848, 2005.
18. Lyon MF, Glenister PH: A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet Res* 39:315-322, 1982.
19. Nagle DL, Kozak CA, Mano H, Chapman VM, Bucan M: Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Hum Mol Genet* 4:2073-2079, 1995.
20. Berrozpe G, Timokhina I, Yukl S, Tajima Y, Ono M, Zelenetz AD, Besmer P: The W(sh), W(57), and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood* 94:2658-2666, 1999.
21. Wolters PJ, Mallen-St Clair J, 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* 35:82-88, 2005.
22. Ha TY, Reed ND, Crowle PK: Delayed expulsion of adult *Trichinella spiralis* by mast cell-deficient W/W^v mice. *Infect Immun* 41:445-447, 1983.
23. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L: Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77, 1996.
24. 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* 381:77-80, 1996.
25. Malaviya R, Abraham SN: Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 67:841-846, 2000.
26. 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* 160:1910-1919, 1998.
27. Thakurdas SM, Melicoff E, Sansores-Garcia L, Moreira DC, Petrova Y, Stevens RL, Adachi R: The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections. *J Biol Chem* 282:20809-20815, 2007.
28. Sutherland RE, Olsen JS, McKinstry A, Villalta SA, Wolters PJ: Mast cell IL-6 improves survival from *Klebsiella pneumoniae* and sepsis by enhancing neutrophil killing. *J Immunol* 181:5598-5605, 2008.

29. Ketavarapu JM, Rodriguez AR, Yu JJ, Cong Y, Murthy AK, Forsthuber TG, Guentzel MN, Klose KE, Berton MT, Arulanandam BP: Mast cells inhibit intramacrophage *Francisella tularensis* replication via contact and secreted products including IL-4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9313-9318, 2008.
30. Abraham SN, St John AL: Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 10:440-452, 2010.
31. Gordon JR, Galli SJ: Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 174:103-107, 1991.
32. Gordon JR, Galli SJ: Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346:274-276, 1990.
33. Vliagoftis H, Befus AD: Rapidly changing perspectives about mast cells at mucosal surfaces. *Immunol Rev* 206:190-203, 2005.
34. Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S: TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 173:531-541, 2004.
35. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H: Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167:2250-2256, 2001.
36. Carlos D, Frantz FG, Souza-Junior DA, Jamur MC, Oliver C, Ramos SG, Quesniaux VF, Ryffel B, Silva CL, Bozza MT, Faccioli LH: TLR2-dependent mast cell activation contributes to the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 11:770-778, 2009.
37. Malaviya R, Ross E, Jakschik BA, Abraham SN: Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest* 93:1645-1653, 1994.
38. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN: Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 152:1907-1914, 1994.
39. Jawdat DM, Rowden G, Marshall JS: Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol* 177:1755-1762, 2006.
40. Theoharides TC, Cochrane DE: Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol* 146:1-12, 2004.
41. Borregaard N: Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33:657-670, 2010.
42. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW: Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)* 49:1618-1631, 2010.

43. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR: Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84:1737-1746, 1994.
44. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC: Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity* 5:491-501, 1996.
45. Kobayashi SD, DeLeo FR: Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1:309-333, 2009.
46. Nathan C: Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6:173-182, 2006.
47. Zarbock A, Ley K: Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 16:31-42, 2009.
48. Borregaard N, Cowland JB: Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89:3503-3521, 1997.
49. Faurschou M, Borregaard N: Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5:1317-1327, 2003.
50. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR: Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* 4:1503-1521, 2005.
51. Hager M, Cowland JB, Borregaard N: Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 268:25-34, 2010.
52. Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Witko-Sarsat V: The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib Microbiol* 15:118-146, 2008.
53. Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 23:197-223, 2005.
54. Quinn MT, Gauss KA: Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 76:760-781, 2004.
55. El Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F: p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 41:217-225, 2009.
56. Meischl C, Roos D: The molecular basis of chronic granulomatous disease. *Springer Semin Immunopathol* 19:417-434, 1998.
57. Luo HR, Loison F: Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 83:288-295, 2008.
58. von Vietinghoff S, Ley K: Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 181:5183-5188, 2008.

59. Simon HU: Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 193:101-110, 2003.
60. Akgul C, Edwards SW: Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci* 60:2402-2408, 2003.
61. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216, 1992.
62. Kennedy AD, DeLeo FR: Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 43:25-61, 2009.
63. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231, 1992.
64. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51, 1995.
65. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-279, 1991.
66. Kneilling M, Mailhammer R, Hultner L, Schonberger T, Fuchs K, Schaller M, Bukala D, Massberg S, Sander CA, Braumuller H, Eichner M, Maier KL, Hallmann R, Pichler BJ, Haubner R, Gawaz M, Pfeffer K, Biedermann T, Rocken M: Direct crosstalk between mast cell-TNF and TNFR1-expressing endothelia mediates local tissue inflammation. *Blood* 114:1696-1706, 2009.
67. Kneilling M, Rocken M: Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights. *Exp Dermatol* 18:488-496, 2009.
68. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC: Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245:1238-1241, 1989.
69. Freitas M, Lima JL, Fernandes E: Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Anal Chim Acta* 649:8-23, 2009.
70. Becker M, Heib V, Klein M, Doener F, Bopp T, Taube C, Radsak M, Schild H, Schmitt E, Stassen M: Impaired mast cell-driven immune responses in mice lacking the transcription factor NFATc2. *J Immunol* 182:6136-6142, 2009.
71. Nigrovic PA, Gray DH, Jones T, Hallgren J, Kuo FC, Chaletzky B, Gurish M, Mathis D, Benoist C, Lee DM: Genetic inversion in mast cell-deficient (Wsh) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *Am J Pathol* 173:1693-1701, 2008.
72. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14:131-136, 1993.

73. Kaplan AP, Greaves M: Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 39:777-787, 2009.
74. Chen R, Ning G, Zhao ML, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z: Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 108:1151-1158, 2001.
75. Chen R, Fairley JA, Zhao ML, Giudice GJ, Zillikens D, Diaz LA, Liu Z: Macrophages, but not T and B lymphocytes, are critical for subepidermal blister formation in experimental bullous pemphigoid: macrophage-mediated neutrophil infiltration depends on mast cell activation. *J Immunol* 169:3987-3992, 2002.
76. Wetzel A, Wetzig T, Haustein UF, Sticherling M, Anderegg U, Simon JC, Saalbach A: Increased neutrophil adherence in psoriasis: role of the human endothelial cell receptor Thy-1 (CD90). *J Invest Dermatol* 126:441-452, 2006.
77. Ibrahim MZ, Reder AT, Lawand R, Takash W, Sallouh-Khatib S: The mast cells of the multiple sclerosis brain. *J Neuroimmunol* 70:131-138, 1996.
78. Secor VH, Secor WE, Gutekunst CA, Brown MA: Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med* 191:813-822, 2000.
79. Sayed BA, Christy AL, Walker ME, Brown MA: Meningeal mast cells affect early T cell central nervous system infiltration and blood-brain barrier integrity through TNF: a role for neutrophil recruitment? *J Immunol* 184:6891-6900, 2010.
80. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB: Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 297:1689-1692, 2002.
81. Kneilling M, Hultner L, Pichler BJ, Mailhammer R, Morawietz L, Solomon S, Eichner M, Sabatino J, Biedermann T, Krenn V, Weber WA, Illges H, Haubner R, Rocken M: Targeted mast cell silencing protects against joint destruction and angiogenesis in experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 56:1806-1816, 2007.
82. Shin K, Nigrovic PA, Crish J, Boilard E, McNeil HP, Larabee KS, Adachi R, Gurish MF, Gobezie R, Stevens RL, Lee DM: Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis via their tryptase/heparin complexes. *J Immunol* 182:647-656, 2009.
83. Pimentel TA, Sampaio AL, D'Acquisto F, Perretti M, Oliani SM: An essential role for mast cells as modulators of neutrophils influx in collagen-induced arthritis in the mouse. *Lab Invest* 91:33-42, 2011.
84. van den Broek MF, van den Berg WB, van de Putte LB: The role of mast cells in antigen induced arthritis in mice. *J Rheumatol* 15:544-551, 1988.
85. Dvorak AM, McLeod RS, Onderdonk A, Monahan-Earley RA, Cullen JB, Antonioli DA, Morgan E, Blair JE, Estrella P, Cisneros RL, .: Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *Int Arch Allergy Immunol* 99:74-83, 1992.

86. Crivellato E, Nico B, Mallardi F, Beltrami CA, Ribatti D: Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:778-784, 2003.
87. Kandere-Grzybowska K, Letourneau R, Kempuraj D, Donelan J, Poplawski S, Boucher W, Athanassiou A, Theoharides TC: IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol* 171:4830-4836, 2003.
88. Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA: Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* 258:1957-1959, 1992.
89. Biedermann T, Kneilling M, Mailhammer R, Maier K, Sander CA, Kollias G, Kunkel SL, Hultner L, Rocken M: Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 192:1441-1452, 2000.
90. Nakae S, Suto H, Berry GJ, Galli SJ: Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* 109:3640-3648, 2007.
91. Ramos BF, Zhang Y, Qureshi R, Jakschik BA: Mast cells are critical for the production of leukotrienes responsible for neutrophil recruitment in immune complex-induced peritonitis in mice. *J Immunol* 147:1636-1641, 1991.
92. Mercer-Jones MA, Shrotri MS, Heinzelmann M, Peyton JC, Cheadle WG: Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 65:249-255, 1999.
93. Zhang J, Alcaide P, Liu L, Sun J, He A, Luscinskas FW, Shi GP: Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages, and neutrophils. *PLoS One* 6:e14525, 2011.
94. Choi EY, Santoso S, Chavakis T: Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci* 14:1596-1605, 2009.
95. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729-733, 1997.
96. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, .: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* 385:733-736, 1997.
97. Decoster E, Vanhaesebroeck B, Vandenabeele P, Grooten J, Fiers W: Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 270:18473-18478, 1995.

98. Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ, Korner H, Scheerens H, Hessel EM, Cyster JG, McEvoy LM, Sedgwick JD: Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 15:533-543, 2001.
99. Torres D, Janot L, Quesniaux VF, Grivennikov SI, Maillet I, Sedgwick JD, Ryffel B, Erard F: Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to *Listeria* infection. *Am J Pathol* 167:1677-1687, 2005.
100. Ross GD: Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20:197-222, 2000.
101. Elbim C, Estaquier J: Cytokines modulate neutrophil death. *Eur Cytokine Netw* 21:1-6, 2010.
102. Cross A, Moots RJ, Edwards SW: The dual effects of TNFalpha on neutrophil apoptosis are mediated via differential effects on expression of Mcl-1 and Bcl-1. *Blood* 111:878-884, 2008.
103. Berrozpe G, Agosti V, Tucker C, Blanpain C, Manova K, Besmer P: A distant upstream locus control region is critical for expression of the Kit receptor gene in mast cells. *Mol Cell Biol* 26:5850-5860, 2006.
104. Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9:162-174, 2009.
105. Youn JI, Gabrilovich DI: The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol* 40:2969-2975, 2010.
106. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, Chen SH: Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111:219-228, 2008.
107. Murakami D, Yamada H, Yajima T, Masuda A, Komune S, Yoshikai Y: Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. *Clin Exp Allergy* 37:339-347, 2007.
108. 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* 103:2286-2291, 2006.
109. Brakhage AA: Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Curr Drug Targets* 6:875-886, 2005.
110. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, Latge JP: Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun* 71:891-903, 2003.

111. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, Jeron A, Latge JP, Brakhage AA, Gunzer M: Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog* 6:e1000873, 2010.
112. Sturtevant J, Latge JP: Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* 166:580-586, 1992.
113. Bonnett CR, Cornish EJ, Harmsen AG, Burritt JB: Early neutrophil recruitment and aggregation in the murine lung inhibit germination of *Aspergillus fumigatus* Conidia. *Infect Immun* 74:6528-6539, 2006.
114. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F: Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 21:215-226, 2004.
115. Cheung DS, Ehlenbach SJ, Kitchens RT, Riley DA, Thomas LL, Holtzman MJ, Grayson MH: Cutting edge: CD49d+ neutrophils induce FcepsilonRI expression on lung dendritic cells in a mouse model of postviral asthma. *J Immunol* 185:4983-4987, 2010.

Publikationen

Mast cells boost neutrophil effector functions

Doener F, Michel A, Reuter S, Becker M, Friedrich P, Tenzer S, Klein M, Bopp T, Schmitt E, Schild H, Radsak M, Taube C and Stassen M

In Vorbereitung

Genetic variation determines mast cell functions in experimental asthma

Becker M, Reuter S, Friedrich P, Doener F, Michel A, Bopp T, Klein M, Schmitt E, Schild H, Radsak M, Echtenacher B, Taube C and Stassen M

Journal of Immunology, zur Veröffentlichung eingereicht

Impaired mast cell-driven immune responses in mice lacking the transcription factor NFATc2

Becker M, Heib V, Klein M, Doener F, Bopp T, Taube C, Radsak M, Schild H, Schmitt E, Stassen M

Journal of Immunology 2009 May 15;182(10):6136-42.

