

Aus der Hautklinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Die Mastzelle als Schlüsselzelle in der
natürlichen Immunität bei septischer
Peritonitis: Rolle von Endothelin-1**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Martin Metz
aus Tübingen

Mainz, 2003

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: **20. Mai 2003**

meinen Eltern gewidmet

INHALTSÜBERSICHT

INHALTSÜBERSICHT	4
ZIELSETZUNG	7
EINLEITUNG	8
Grundzüge der Mastzellbiologie	8
Einführung	8
Herkunft	10
Heterogenität	11
Aktivierung	12
Produkte der Mastzelle	13
Funktionen der Mastzelle	14
Das <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i> Mausmodell zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Funktionen der Mastzelle	17
Die Rolle von Mastzellen bei der natürlichen Immunität gegen Bakterien	20
Endothelin-1	23
Allgemein	23
Biosynthese	25
Rezeptoren	26
Physiologie von Endothelin-1	29
Pathophysiologie von Endothelin-1	30
Endothelin-1 und Sepsis	33
Mastzellen und Endothelin-1	35
MATERIAL UND METHODEN	37
Tiere	37
Induktion einer akuten septischen Peritonitis durch Ligatur und Punktion des Blinddarms (Cecal ligation and puncture, CLP)	37

Messung von ET-1 und Bestimmung der MZ-Anzahl in peritonealer Lavage nach CLP	39
MZ-Rekonstitution von MZ-defizienten <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i>-Mäusen	39
Messung der durch ET-1 induzierten Mastzell-Degranulation	41
<i>In vivo</i> Behandlung mit ET-1	42
Feststellung der Biodistribution von ET-1 nach i.p. Injektion	43
Statistische Analysen	44
ERGEBNISSE	45
ET-1 trägt zur Mortalität bei akuter septischer Peritonitis bei.	45
Peritoneale ET-1 Konzentrationen nach CLP sind in Mastzell-defizienten <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i> Mäusen höher als in den <i>Kit +/+</i> Mäusen.	49
ET-1 Injektionen in die Bauchhöhle führen bei Mastzell-defizienten <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i>, aber nicht bei normalen <i>Kit +/+</i> Mäusen zu Hypothermie, Diarrhö und Tod.	53
Mastzellen müssen degranulieren können, um vor ET-1 induzierter Morbidität und Mortalität zu schützen.	56
ET-1 induziert Mastzelldegranulation durch den ET_A Rezeptor.	59
Der ET_A-Rezeptorantagonist BQ-123 verhindert den Mastzell-abhängigen Schutz vor ET-1 vermittelter Toxizität durch Inhibition der MZ Degranulation.	63
Mastzellen können zu einer schnelleren Elimination von ET-1 aus der Bauchhöhle beitragen.	67
DISKUSSION	70
ZUSAMMENFASSUNG	77
LITERATURVERZEICHNIS	78
DANKSAGUNG	92
LEBENS LAUF	93

Verwendete Abkürzungen

BMCMC	bone marrow derived cultured mast cells
HMEM	Hank's minimal essential medium
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
CLP	cecal ligation and puncture
cpm	counts per minute
CTMC	connective tissue type mast cells
ECE	Endothelin-converting enzyme
EDCF	endothelium-derived contractile factors
EDRF	endothelium-derived relaxing factors
ET-1, -2, -3	Endothelin-1, -2, -3
ET _{A/B}	Endothelin Rezeptor A/B
Fc _ε RI	hoch-affiner IgE Rezeptor
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
KO	Knockout
M	molar
MMC	mucosal mast cells
MZ	Mastzelle(n)
p	probability value
PLF	peritoneale Lavageflüssigkeit
PMZ	peritoneale Mastzellen
SCF	stem cell factor
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TNF α	Tumor necrosis factor α

ZIELSETZUNG

Zielsetzung dieser Arbeit ist es,

1. Die Rolle von Endothelin-1 und seiner Rezeptoren in einem gut etablierten Mausmodell der septischen Peritonitis zu charakterisieren,
2. anhand des Modells der Mastzell-defizienten Kit^W/Kit^{W-v} Maus der Frage nachzugehen, welche regulierende Funktion dabei Mastzellen zu kommt,
3. die funktionelle Bedeutung der Mastzelle als wichtiger Faktor in der angeborenen Immunität anhand ihrer Rolle in der Regulation der durch Endothelin-1 induzierten Morbidität und Mortalität zu klären,
4. die Ergebnisse dieser Untersuchungen vor dem Hintergrund der Literatur zu diskutieren und insbesondere die Beteiligung von Mastzellen in der natürlichen Immunabwehr gegen Bakterien hervorzuheben.

EINLEITUNG

Grundzüge der Mastzellbiologie

Einführung

Die Entdeckung der Mastzelle (MZ) erfolgte bereits 1863, als von Recklinghausen die Zellen an ungefärbten Schnitten von Froschmesenterium nachweisen konnte (von Recklinghausen, 1863). Einige Jahre später erhielt diese Zelle durch Paul Ehrlich die Bezeichnung "Mastzelle" (Ehrlich, 1879), da er bei seinen Gewebefärbungen mit basischen Farbstoffen im Zytoplasma der Zellen metachromatische Granula fand, von denen er annahm, dass sie durch Phagozytose entstehen und damit die Zellen "gemästet" würden (Ehrlich, 1877).

Noch heute stellen diese metachromatischen zytoplasmatischen Granula, von denen wir heute wissen, dass sie präformierte Mediatoren wie Histamin und Proteoglykane enthalten, ein charakteristisches Merkmal aller MZ dar (**Abbildung 1**), gleich aus welcher Spezies oder Lokalisation (Galli, 1993; Church and Levi-Schaffer, 1997). Weitere, für alle MZ gültige Merkmale, sind membranständige Rezeptoren für Immunglobulin E ($Fc_{\epsilon}RI$) und stem cell factor (c-kit) (Galli, 1990).

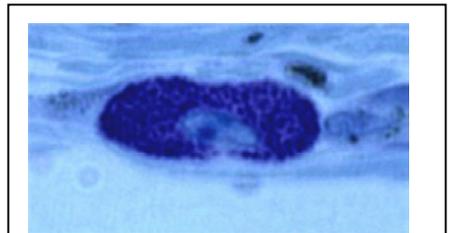


Abbildung 1

Darstellung einer Mastzelle mit charakteristischen metachromatischen Granula in einem alkaline Giemsa gefärbten Semidünnschnitt (1 μ m) von Maushaut.

Zahlreiche weitere MZ-Merkmale sind Spezies-spezifisch (Serotonin z.B. kann nur in MZ von Nagern, nicht jedoch in humanen MZ nachgewiesen werden) oder Organ-spezifisch. So können beim Menschen je nach

Nachweisbarkeit von Chymase die MZ in zwei verschiedene Populationen, die sich auch hinsichtlich ihrer Lokalisation unterscheiden, eingeteilt werden (s. **Tabelle 1**).

	Tryptase ⁺ /Chymase ⁺ MZ	Tryptase ⁺ MZ
Produkte		
Heparin, Histamin	+	+
Tryptase	+	+
Chymase	+	-
Verteilung		
Haut	+++	(+)
Intestinale Submukosa	+++	++
Bronchien	+++	++
Lunge	+	+++
Alveolenwand	(+)	+++

Tabelle 1 Unterscheidung humaner MZ-Populationen (Galli, 2000)

MZ konnten bisher in allen untersuchten Vertebraten nachgewiesen werden. In besonders großer Zahl lassen sie sich in Organen finden, die im Kontakt zur Außenwelt stehen, also in der Haut sowie in der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes und der Atemwege. Dort sind sie präferentiell in der Nähe von Gefäßen und sensorischen Nerven lokalisiert. In geringerer Anzahl sind sie in parenchymatösen Organen wie der Leber oder Niere zu finden und nur in Knorpelgewebe lassen sich so gut wie keine MZ nachweisen (Botchkarev *et al*, 1997; Cindik *et al*, 2000).

Herkunft

Kitamura und Mitarbeiter konnten in einer Reihe von eleganten Versuchen mit beige-Mäusen (C57BL/6-*bg^j/bg^j*) und MZ-defizienten Mausstämmen zeigen, dass sich die MZ der Maus aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln. Zuerst transplantierten sie Knochenmarkszellen von C57BL/6-*bg^j/bg^j* Mäusen in normale bestrahlte C57BL/6-+/+ Tiere, was zur Ausbildung von MZ des histologisch leicht zu identifizierenden beige-Typs führte (Kitamura *et al*, 1977). Bei verschiedenen MZ-defizienten Mausstämmen führte die Transplantation von Knochenmark der jeweiligen normalen, MZ-kompetenten Mäusen zu einer Anreicherung von MZ in der Peritonealhöhle und der Haut (Kitamura *et al*, 1978).

Einige Jahre später postulierten Kitamura und Mitarbeiter, dass MZ-Vorläufer aus dem Knochenmark (noch ohne die typischen Rezeptoren und Granulainhalt) nach Zirkulation im Blut in das Bindegewebe migrieren, dort proliferieren und sich zu morphologisch erkennbaren MZ differenzieren (Kitamura *et al*, 1993). Bei Mäusen konnte inzwischen eine Zellpopulation aus fetalem Blut isoliert werden, die den Kriterien einer MZ-Vorläuferzelle entspricht (Rodewald *et al*, 1996).

Einer der frühesten Marker für MZ ist der Tyrosinkinase-Rezeptor Kit (CD 117), der auch von reifen MZ exprimiert wird (Galli *et al*, 1994). Andere hämatopoetische Zellen, einschließlich der verwandten Basophilen, verlieren diesen Marker während ihrer Differenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass fehlende oder fehlerhafte Expression von Kit oder dessen Liganden stem cell factor (SCF) zu einer stark beeinträchtigten Entwicklung von MZ und zu einer Reduktion oder Abwesenheit differenzierter MZ in zahlreichen Geweben einschließlich der Haut führt (Galli and Kitamura, 1987). In der Haut und anderen Organen von *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen, die auf Grund natürlicher Mutationen

des für Kit kodierenden Protoonkogens c-kit kein funktionelles Kit exprimieren, finden sich so gut wie keine MZ (Tsai *et al*, 1991).

Heterogenität

Die MZ in verschiedenen Spezies und in unterschiedlicher Lokalisation in einem Individuum zeigen zwar, wie oben bereits erwähnt, in vielen Aspekten Gemeinsamkeiten, dennoch weisen sie untereinander eine starke Heterogenität in Bezug auf ihre morphologischen, biochemischen und funktionellen Eigenschaften auf.

Bereits vor über 100 Jahren vermuteten Hardy und Wesbrook aufgrund morphologischer Unterschiede zwischen MZ in unterschiedlichen anatomischen Regionen, dass es verschiedene Subpopulationen von MZ geben muß (Hardy and Wesbrook, 1895) und wenige Jahre später beschrieb Maximow, dass bestimmte MZ "atypisch" in Bezug auf ihre histochemische Anfärbarkeit seien (Maximow, 1905). Seit den 60er Jahren war es insbesondere Enerbäck, der die Erkenntnisse über die Heterogenität der MZ erweiterte. 1966 beschrieb er an Ratten detailliert die histochemischen Unterschiede zwischen den MZ des Bindegewebes und MZ der intestinalen Mukosa (Enerbäck, 1966a; Enerbäck, 1966b). Seitdem wurden in zahlreichen Spezies, auch beim Menschen, unterschiedliche MZ Subpopulationen nachgewiesen, deren Einteilung in die bei Mäusen und Ratten definierten MZ Subtypen jedoch schwieriger zu bewerkstelligen ist und noch immer kontrovers diskutiert wird (Galli, 1990).

Bei der Maus werden üblicherweise zwei unterschiedliche MZ Phänotypen beschrieben, die Bindegewebs-MZ ("connective tissue type mast cells", CTMC) und Mukosa-MZ ("mucosal mast cells", MMC), die sich unter anderem in der Lokalisation, Morphologie, Färbereigenschaft, Granulainhalt und der Aktivierung und Aktivierungshemmung durch verschiedene Substanzen unterscheiden (s. **Tabelle 2**).

	Bindegewebs MZ (CTMC)	Mukosa MZ (MMC)
Lokalisation	Peritoneum, Haut, Lunge	intestinale Mukosa, Bronchialepithel
Lebensdauer	Monate bis Jahre	ca. 40 Tage
Granula	groß, uniform elektronendicht	klein, unterschiedlich elektronendicht
T-Zell-abhängige Proliferation	nein	ja
wichtigstes Proteoglykan	Heparin	Chondroitinsulfat
Serotoningehalt	variabel hoch	gering
Histamingehalt	hoch (ca. 10 pg/Zelle)	gering (ca. 1 pg/Zelle)
Hochaffine IgE- Rezeptoren	ja	ja
Anfärbung mit: Alcianblau	ja	ja
Safranin	ja	nein
Berberinsulfat	ja	nein
Aktivierbarkeit durch Substanz 48/80	ja	kaum
Inhibition durch Theophyllin und Cromoglicinsäure	ja	nein

Tabelle 2 Eigenschaften verschiedener MZ Subtypen der Maus (Kitamura, 1989; Galli, 1990; Malaviya and Abraham, 1998)

Aktivierung

Die wohl bekannteste und klinisch gesehen folgenschwerste Form der MZ Aktivierung ist die durch IgE vermittelte Degranulation von MZ im Rahmen allergischer und anaphylaktischer Reaktionen (Ishizaka und

Ishizaka, 1984; Galli und Wershil, 1996). Dabei binden IgE-Moleküle mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren (Fc_εRI) auf der MZ Oberfläche; durch die Bindung eines oder mehrerer Antigene (z.B. eines Allergens) erfolgt eine Vernetzung der Rezeptoren und daraufhin die Fusion mehrerer Granula miteinander sowie mit der Zellmembran, was dann zur Ausschüttung ihres Inhalts in den Interzellularraum führt (Dvorak, 1993).

Neben dieser Antigen-vermittelten Aktivierung bestehen jedoch weitere Möglichkeiten eine Degranulation von MZ zu induzieren. Beschrieben sind, neben zahlreichen weiteren, die Aktivierung durch das Kalziumionophor A23187, dem synthetischen Polyamin Substanz 48/80, verschiedenen Neuropeptiden wie z.B. Substance P, Wachstumsfaktoren wie z.B. NGF oder durch physikalische Stimuli (Murphy *et al*, 1987; Schick und Austen, 1987; Paus *et al*, 1994a; Williams *et al*, 1995).

Produkte der Mastzelle

MZ enthalten oder produzieren nach entsprechender Stimulation eine enorme Bandbreite verschiedener biologisch aktiver Mediatoren, die zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Effekten führen. Ein Teil dieser Substanzen wird dabei bereits vorgefertigt in den zytoplasmatischen Granula gespeichert, andere Mediatoren werden als Folge der MZ Aktivierung neu synthetisiert (s. **Tabelle 3**).

Präformiert	de novo synthetisiert
Histamin Serotonin Glykosaminoglykane: Heparin Chondroitinsulfat Proteasen: Chymase Tryptase Carboxypeptidase TNF α , VEGF	Zytokine: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL- 15, IL-16, GM-CSF, TNF α , TGF β , NGF, IFN γ , MIP- 1 α , MIP-1 β Lipide: PGD ₂ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , LTB ₄ , PAF

Tabelle 3 Beispiele präformierter und neu hergestellter MZ Mediatoren (Galli, 1990; Leon *et al*, 1994; Okayama *et al*, 1995; Church und Levi-Schaffer, 1997; Boesiger *et al*, 1998; Williams und Galli, 2000)

Funktionen der Mastzelle

MZ sind über den gesamten Körper verteilt in Bindegeweben, serösen Höhlen und Schleimhäuten anzutreffen. Sie sind besonders zahlreich in der Nähe von kleinen Blut- und Lymphgefäßen und von Nervenendigungen. Daher, und aufgrund der enormen Anzahl pharmakologisch potenter Mediatoren, die zum Teil chemotaktische, vasoaktive (z.B. Leukotriene, PAF) oder proinflammatorische sowie Wachstum stimulierende (z.B. Interleukine, VEGF) Eigenschaften besitzen, ist die Beteiligung von MZ an zahlreichen pathologischen und physiologischen Abläufen im Körper anzunehmen.

Neben der bereits beschriebenen Rolle der MZ in der Vermittlung allergischer Reaktionen durch die, teilweise exzessive, Freisetzung von Histamin, sind weitere Vorgänge im Körper bekannt oder werden vermutet, die mit MZ assoziiert sind. Insbesondere in der Haut konnten

bei zahlreichen Erkrankungen eine Beteiligung von MZ nachgewiesen werden. So wurde bei verschiedenen Dermatosen eine deutliche Vermehrung von MZ festgestellt, u.a. bei chronischem Ekzem, malignem Melanom, Neurofibromen, bullösem Pemphigoid, Fibromen, Lichen sclerosus et atrophicus, Psoriasis und M. Behçet (Rothe *et al*, 1990; Grabbe *et al*, 1994; Church und Levi-Schaffer, 1997).

Insgesamt fällt bei der Betrachtung dermalen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Zahl und Aktivität von MZ korrelieren, der hohe Anteil an Dermatosen mit ausgeprägten Wachstumsstörungen und Gewebeumbauprozessen auf. Eine Beteiligung von MZ an diesen, aber auch an anderen, physiologischen Gewebeumbauprozessen ist sehr wahrscheinlich, da MZ als Ursprung potenter Wachstumsfaktoren, u.a. $\text{TNF}\alpha$, VEGF, PAF, $\text{TGF-}\beta$, NGF, in der Lage sind, auf diese Prozesse Einfluß zu nehmen.

Unterstützt wird diese Hypothese durch verschiedene Arbeiten. So konnte z.B. am Modell des murinen Haarzyklus eine Beteiligung von MZ an der Transformation des Haarfollikels von der ruhenden Phase (Telogen) zur Phase des Wachstums (Anagen), sowie in der Phase der Haarfollikelregression (Katagen) nachgewiesen werden (Paus *et al*, 1994b; Maurer *et al*, 1995; Maurer *et al*, 1997). Auch im Rahmen der Wundheilung scheint MZ eine bedeutende Rolle zuzukommen, so konnten in Narben verschiedenen Alters eine Aktivierung von MZ nachgewiesen werden, und es erscheint wahrscheinlich, dass Produkte der MZ zur akuten Blutstillung und Entzündungsreaktion, aber auch zu der späteren Angiogenese und Re-epithelialisierung beitragen (Artuc *et al*, 1999; Norrby, 2002).

Eine erhöhte Anzahl an MZ wird auch bei der interstitiellen Zystitis gefunden, wobei kausale Zusammenhänge noch nicht vollkommen geklärt sind (Yamada *et al*, 2000). Dagegen ist bei verschiedenen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, insbesondere bei der Nahrungsmittelallergie (Bischoff *et al*, 2000), den chronisch

inflammatorischen Darmerkrankungen wie M. Crohn und Colitis ulcerosa (Wershil *et al*, 1995), *Clostridium difficile* induzierter Enteritis (Wershil *et al*, 1998) und Gastritis (Furuta *et al*, 1997) eine pathogenetische Bedeutung von MZ beschrieben worden.

Im Rahmen maligner Erkrankungen scheinen MZ ebenso eine Rolle zu spielen. Die Implantation von Tumorzellen in MZ-defiziente Mäuse führte zu geringerer Anzahl an Kapillaren in der Tumorperipherie, reduzierter Tumorgröße und weniger Metastasen als in normalen Mäusen und bei verschiedenen soliden Tumoren konnte eine Akkumulation von MZ am Tumorrand beobachtet werden (Warner und Kroegel, 1994; Meininger, 1995; Bradding und Holgate, 1999). Die Unterstützung der Tumor-assoziierten Angiogenese durch MZ-Mediatoren scheint daher zur Ausbreitung und Metastasierung von Tumoren beitragen zu können. Allerdings wurde auch postuliert, dass MZ durch die Rekrutierung von Immunzellen zur Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen beitragen können (Henderson *et al*, 1981).

Neben der im nächsten Kapitel ausführlicher betrachteten, erst seit kurzem bekannten Rolle von MZ in der natürlichen Immunität gegen Bakterien, ist die Beteiligung von MZ an der Immunabwehr gegen Parasiten bereits seit längerer Zeit bekannt. So findet bei einer Infektion mit bestimmten Parasiten eine starke Vermehrung von MZ, sowie von spezifischen und unspezifischen IgE Antikörpern statt, wodurch ein gewisser Schutz vor einer Infektion mit Parasiten gewährleistet wird (Warner und Kroegel, 1994; Mécheri und David, 1997).

Das Kit^W/Kit^{W-v} Mausmodell zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Funktionen der Mastzelle

Galli, Kitamura und Mitarbeiter publizierten 1985 das bereits oben erwähnte Kit^W/Kit^{W-v} Modell, mit dem seither zahlreiche, bis dahin nur vermutete Funktionen von MZ bewiesen werden konnten (Nakano *et al*, 1985). Die Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse weisen aufgrund einer spontan aufgetretenen Doppelmutation keinen funktionellen SCF-Rezeptor auf, was zu einer MZ-Defizienz führt. An diesen Mäusen läßt sich daher prüfen, welche Prozesse in der Abwesenheit von MZ anders verlaufen als normal.

Aufgrund der fehlenden Expression von Kit kommt es bei den Tieren neben der fehlenden Entwicklung von MZ auch zu einer leichten Anämie, einer vollständigen Melanozyten-Defizienz (weißes Fell, siehe **Abbildung 2**) sowie zu Sterilität, während das Immunsystem keine nennenswerten Veränderungen aufweist (normale T- und B-Zellen, Granulozyten, usw.) (Galli und Kitamura, 1987; Galli und Hammel, 1994). Unterschiede in Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen und normalen $Kit^{+/+}$ Kontrollmäusen sprechen für eine Beteiligung einer oder mehrerer Kit^+ Zellpopulationen in der Auslösung der untersuchten Reaktion.

Um nachzuweisen, dass die Abwesenheit von MZ - und nicht von Melanozyten oder anderen Kit^+ Zellen - für einen beobachteten Defekt in Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen verantwortlich sind, werden zum Vergleich Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse untersucht, die zuvor lokal oder systemisch mit MZ rekonstituiert wurden (Galli und Kitamura, 1987). Hierfür werden Zellen aus dem Knochenmark von $Kit^{+/+}$ Mäusen gewonnen und in Anwesenheit von IL-3 zu Mastzellen differenziert (BMCMC, bone marrow-derived cultured mast cells). Diese werden, nach dem die Kultur zu >98% aus Mastzellen besteht (nach ca. 6 Wochen Kultivierung), s.c., i.p. oder i.v. in Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse injiziert. In der Maus erfolgt unter dem Einfluss des regionalen Zytokinmilieus die weitere Ausreifung der Mastzellen (Galli und Kitamura, 1987). Wenn MZ

für eine Reaktion verantwortlich sind, die in MZ-defizienten Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen nicht normal verläuft, dann muß eine solche Rekonstitution diese Reaktion - zumindest teilweise - normalisieren.

Darüber hinaus bietet das Kit^W/Kit^{W-v} Mausmodell die Möglichkeit, die Relevanz definierter MZ-Produkte oder Rezeptoren für die Auslösung einer MZ-abhängigen Reaktion zu untersuchen. Für die Rekonstitution von Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen werden hier nicht MZ aus normalen $Kit^{+/+}$ Tieren verwendet, sondern MZ aus Mäusen, die für das jeweilige MZ-Produkt oder den MZ-Rezeptor defizient sind, z.B. $TNF\alpha$ -Knockout-Mäuse ($TNF\alpha^{-/-}$), bei denen das Gen für das MZ-Produkt $TNF\alpha$ genetisch deletiert wurde. Auf diese Weise können Tiere generiert werden, die sich lediglich dadurch unterscheiden, dass ihre MZ $TNF\alpha$ produzieren oder nicht produzieren können (Von Stebut *et al*, 2003). Unterschiedliche Reaktionen in diesen Mäusen müssen also auf MZ- $TNF\alpha$ -vermittelten Effekten beruhen (**Abbildung 2**).

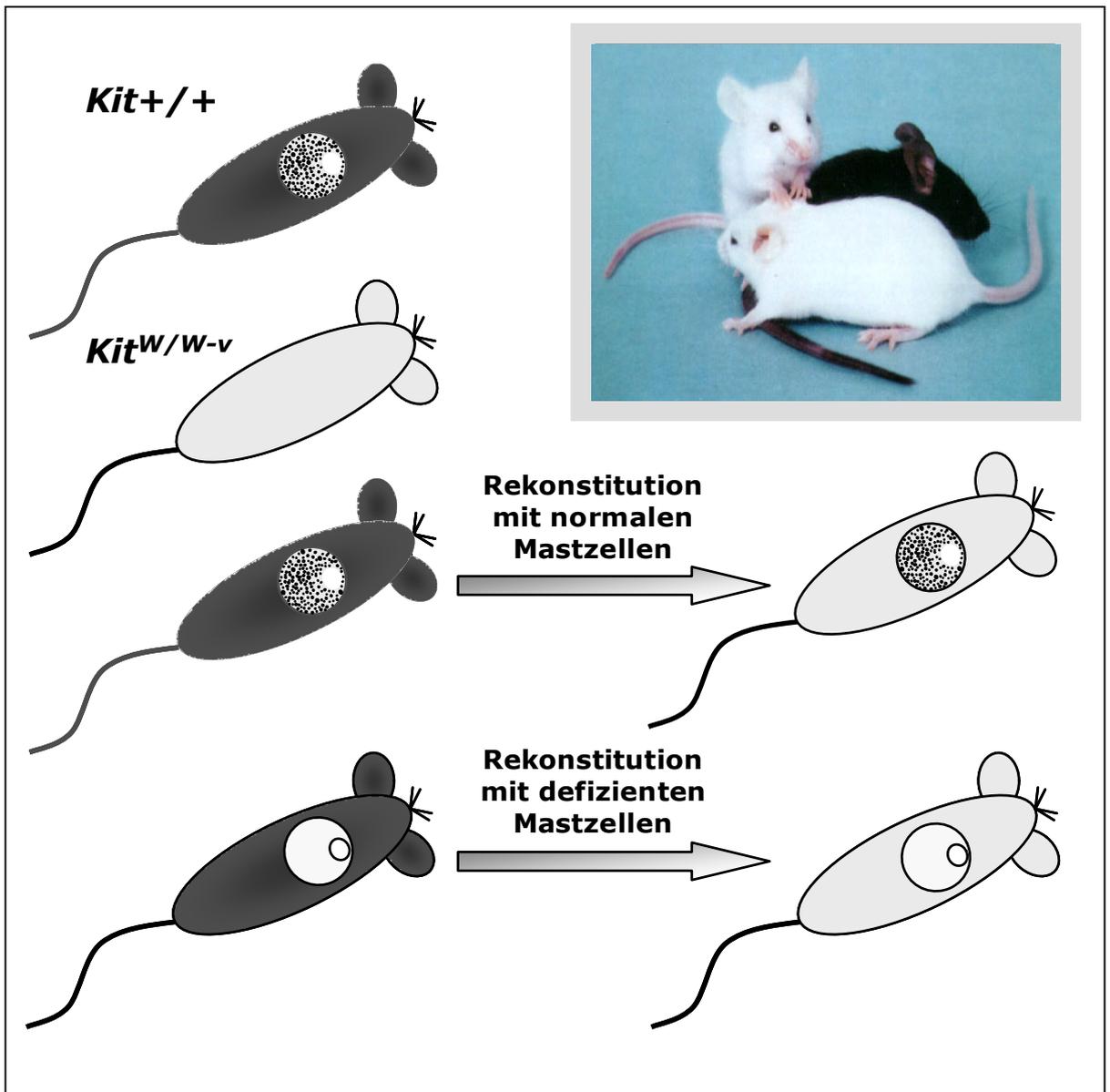


Abbildung 2 Schematische Darstellung des *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mausmodells und der Möglichkeiten der Rekonstitution.

Die Rolle von Mastzellen bei der natürlichen Immunität gegen Bakterien

Erst vor wenigen Jahren hat sich herausgestellt, dass - zumindest im Maussystem - MZ eine entscheidende Rolle in der Abwehr bestimmter bakterieller Infektionen spielen. Die ersten Untersuchungen an *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen auf diesem Gebiet erfolgten durch Echtenacher *et al* sowie von Malaviya *et al*, die 1996 zeigen konnten, dass eine Infektion mit Enterokokken für MZ-defiziente *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse letal verläuft, wohin gegen MZ-kompetente *Kit +/+* Mäuse und mit MZ-rekonstituierte *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse diese überleben (Echtenacher *et al*, 1996; Malaviya *et al*, 1996).

Echtenacher und Kollegen zeigten, dass MZ-defiziente *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse nach Induktion einer septischen Peritonitis durch die Ligatur und Punktion des Blinddarms (cecal ligation and puncture, CLP) im Vergleich zu normalen *Kit+/+* Mäusen eine deutlich niedrigere Überlebensrate aufweisen. Nachdem die peritoneale MZ-Defizienz durch den Transfer von MZ behoben wurde, waren die Mäuse wieder vor den letalen Auswirkungen der CLP geschützt (Echtenacher *et al*, 1996). Malaviya *et al* beschrieben eine bis zu 80%ige Mortalität bei MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen nach i.p. Applikation von Enterobakterien, wohingegen keines der normalen *Kit+/+* Tiere verstarb. Beide Arbeitsgruppen konnten dabei zeigen, dass die erhöhte Mortalität der MZ-defizienten Mäuse mit einer deutlich reduzierten Elimination der Bakterien einherging. Die geringe Elimination der Bakterien wiederum ist auf die Abwesenheit des aus MZ stammenden TNF α zurück zu führen, das zu einer deutlich erniedrigten Anzahl an einwandernden Neutrophilen führt (Echtenacher *et al*, 1996; Malaviya *et al*, 1996).

Spätere Arbeiten konnten ähnliche Ergebnisse erzielen. So zeigen z.B. Mac-1-defiziente Mäuse, bei denen die Anzahl an peritonealen MZ

deutlich erniedrigt ist, gegenüber Wildtyp Mäusen eine signifikant erhöhte Sterblichkeit nach CLP, bei einer gleichzeitig höheren Zahl an Bakterien im Peritoneum (Rosenkranz *et al*, 1998). Studien mit C3 und C4 Knockout Mäusen zeigten, dass in der Abwesenheit eines intakten Komplementsystems peritoneale MZ im Rahmen einer natürlichen Immunantwort gegen Bakterien nach CLP in geringerem Ausmaß aktiviert werden. Dieses führt wiederum durch eine geringere Menge an freigesetztem TNF α zu einer Abnahme der einwandernden Neutrophilen und parallel dazu auch zu einer Abnahme der Überlebensrate nach CLP (Prodeus *et al*, 1997) (**s. Abbildung 3**).

Malaviya und Abraham konnten kürzlich zeigen, dass durch die Bindung von Bakterien an spezifische Rezeptoren (FimH) auf der Mastzelloberfläche neben TNF α auch Leukotriene freigesetzt werden, die zu einer Invasion von Neutrophilen und damit zu einer Reduktion der Bakterien im Entzündungsgebiet führen (Malaviya *et al*, 1999; Malaviya und Abraham, 2000). Einen weiteren Beleg für die Beteiligung von MZ an der Abwehr bakterieller Erreger lieferten Maurer *et al*, indem sie normale Mäuse wiederholt mit Stem cell factor, einem Zytokin, das als Wachstumsfaktor für MZ fungiert, behandelten. Die so behandelten Mäuse wiesen eine deutlich erhöhte Überlebensrate nach CLP-induzierter septischer Peritonitis auf (Maurer *et al*, 1998).

In **Abbildung 3** soll schematisch die in den oben beschriebenen Arbeiten charakterisierte funktionelle Rolle von MZ in der septischen Peritonitis zusammengefasst werden: Durch die Induktion einer septischen Peritonitis werden Bakterien freigesetzt, die direkt oder über die Aktivierung von Komplement zu einer MZ-Degranulation führen. Durch die daraus folgende Freisetzung der präformiert vorliegenden Mediatoren werden neutrophile Granulozyten in das Entzündungsgebiet rekrutiert, die zu einer Reduktion der Bakterien in der Bauchhöhle führen.

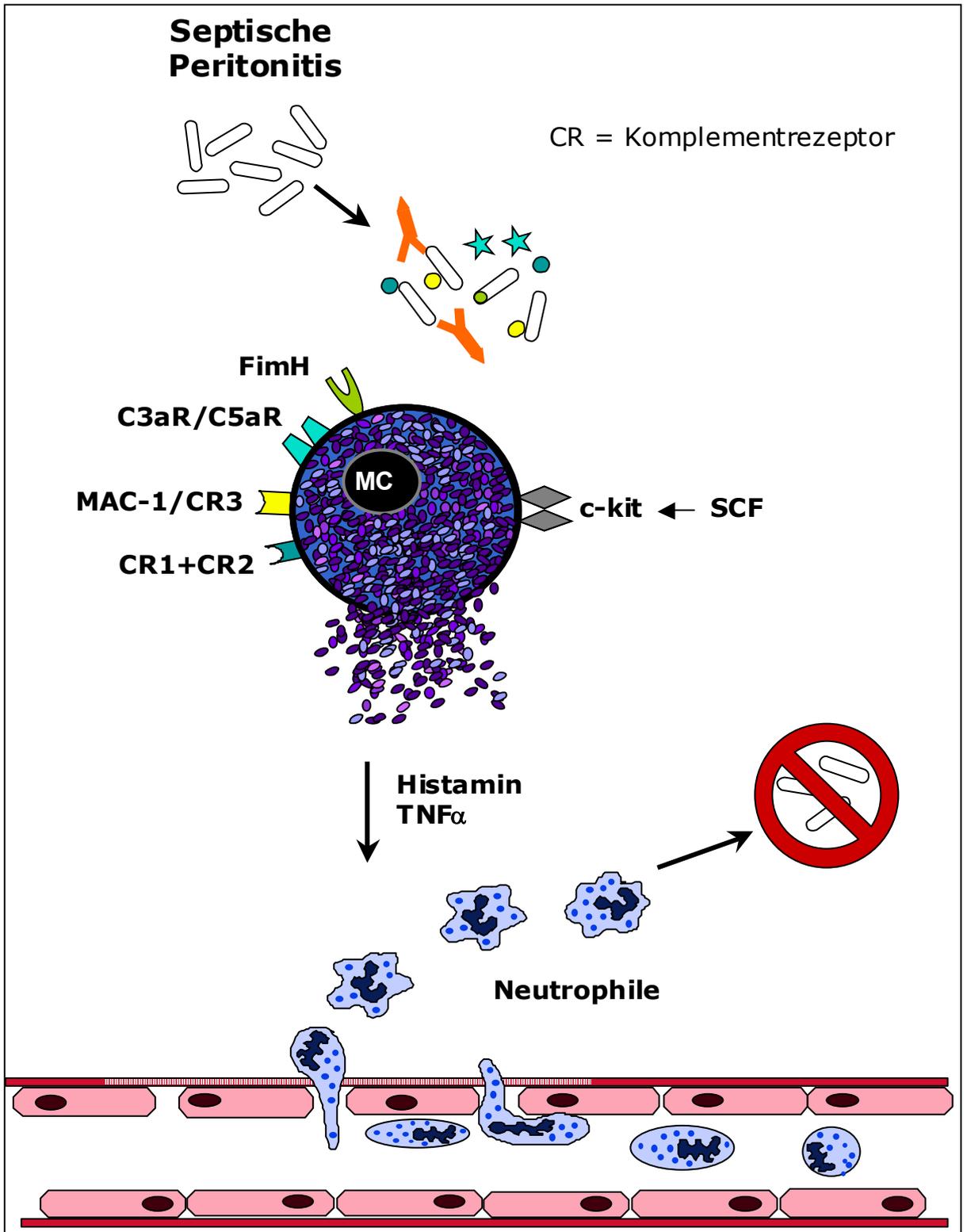


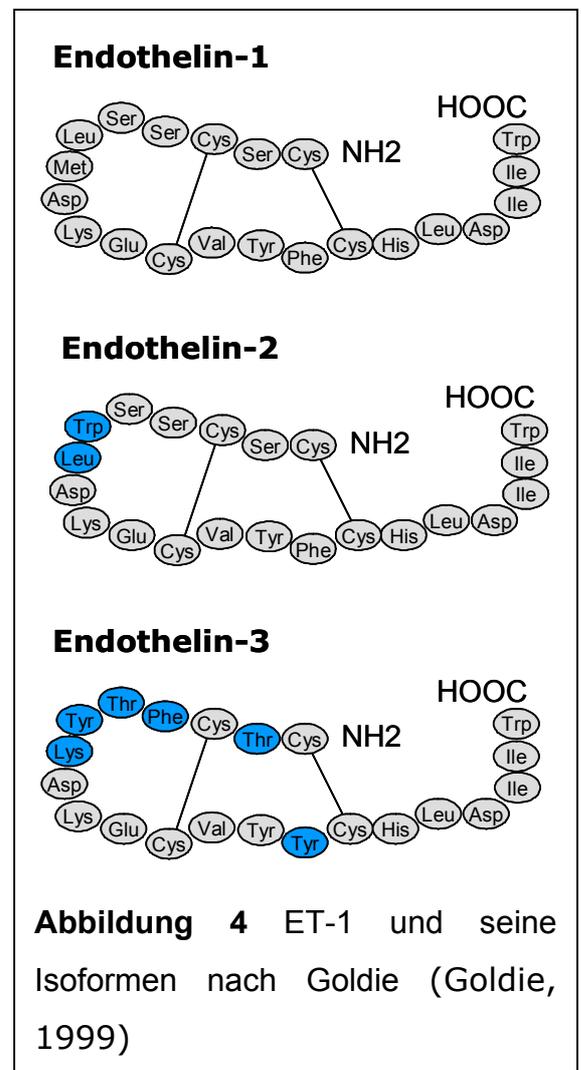
Abbildung 3 Schematische Zeichnung der funktionellen Rolle von MZ bei septischer Peritonitis.

Endothelin-1

Allgemein

Vor etwas über 20 Jahren postulierten Furchgott und Zawadzki, dass Endothelzellen in der Lage sind, bestimmte Faktoren zu produzieren und freizusetzen, die zu einer Vasodilatation führen. Sie gaben ihnen daher die Bezeichnung endothelium-derived relaxing factors (EDRF) (Furchgott und Zawadzki, 1980). Wenige Jahre später gelang es Palmer und Kollegen zu zeigen, dass nitric oxide (NO), mit diesen postulierten EDRFs identisch ist (Palmer *et al*, 1987). Im Rahmen der Erforschung der EDRFs und des NO wurde festgestellt, dass neben den relaxierenden

auch kontraktile Faktoren, als endothelium-derived contractile factors (EDCF) bezeichnet, im Gefäßendothel vorhanden sind (Hickey *et al*, 1985). 1988 schließlich gelang es Yanagisawa und Mitarbeitern aus Endothelzellen von Schweineaorta ein Peptid mit 21-Aminosäuren zu isolieren, das den bis dahin potentesten Vasokonstriktor darstellte und gab ihm den Namen Endothelin (ET) (Yanagisawa *et al*, 1988). Wenig später beschrieb die gleiche Arbeitsgruppe zwei weitere Isoformen des ET, die sich in zwei, bzw. sechs Aminosäuren vom ursprünglichen, jetzt ET-1 genannten, Peptid unterscheiden (s. **Abbildung**



4). Ihnen wurden die Namen ET-2 und ET-3 gegeben (Inoue *et al*,

1989). Die Peptide sind in einigen Regionen homolog zu einer Gruppe von Neurotoxinen, u.a. dem alpha scorpion toxin, omega-conotoxin und vor allem der Gruppe der Sarafotoxine (S6a, S6b, S6c), dem Gift der Schlange *Atractaspis engaddensis* (Stjernquist, 1998).

ET-1 wurde in kultivierten Endothelzellen aus der Aorta von Schweinen identifiziert (Yanagisawa *et al*, 1988), jedoch beschränkt sich sein Vorkommen bei weitem nicht nur auf das Gefäßendothel. Sehr bald nach seiner Entdeckung wurde ET-1 und mRNA für ET-1 in einer Vielzahl anderer Lokalisationen nachgewiesen. Die **Tabelle 4** soll einen Überblick über einige in der Literatur beschriebenen Lokalisationen von ET-1 und seiner mRNA bieten.

Vorkommen	Referenz	Vorkommen	Referenz
Lunge	(Benigni und Remuzzi, 1999)	Parathyreoidea	(Eguchi <i>et al</i> , 1992)
Niere	(Benigni <i>et al</i> , 2000)	Zahnpulpa	(Casasco <i>et al</i> , 1991)
ZNS	(Lee <i>et al</i> , 1990; Giaid <i>et al</i> , 1991)	kardiale Myozyten	(Suzuki <i>et al</i> , 1993)
Amnion	(Casey <i>et al</i> , 1991)	Keratinocyten	(Yohn <i>et al</i> , 1993)
Brustdrüse	(Baley <i>et al</i> , 1990)	Makrophagen	(Ehrenreich <i>et al</i> , 1990)
Penis/Corpora cavernosa	(Saenz de Tejada <i>et al</i> , 1991)	Mastzellen	(Ehrenreich <i>et al</i> , 1992)

Tabelle 4 Übersicht über nicht-endotheliale Lokalisationen von ET-1

Biosynthese

Die ET werden aus einem Preproendothelin (Prepro-ET) genannten Vorläufer synthetisiert (Itoh *et al*, 1988) (**Abbildung 5**). Dieses 212 Aminosäuren große Vorläuferpeptid wird durch Endopeptidasen in einen weiteren ET Vorläufer, das Proendothelin gespalten. Dieses "Big ET" genannte, 39 Aminosäuren umfassende Peptid unterläuft eine weitere Enzym-gesteuerte Spaltung, woraus das aktive, aus 21 Aminosäuren bestehende ET entsteht (Miyachi und Masaki, 1999). Die Umwandlung von Big ET in die aktive Form des ET erfolgt durch spezifische Endothelin Converting Enzymes (ECE) (Xu *et al*, 1994; Emoto und Yanagisawa, 1995). Die beiden Vorläufer Prepro-ET und Big ET besitzen im Gegensatz zum aktiven ET praktisch keine vasokonstriktiven Eigenschaften (Kimura *et al*, 1988).

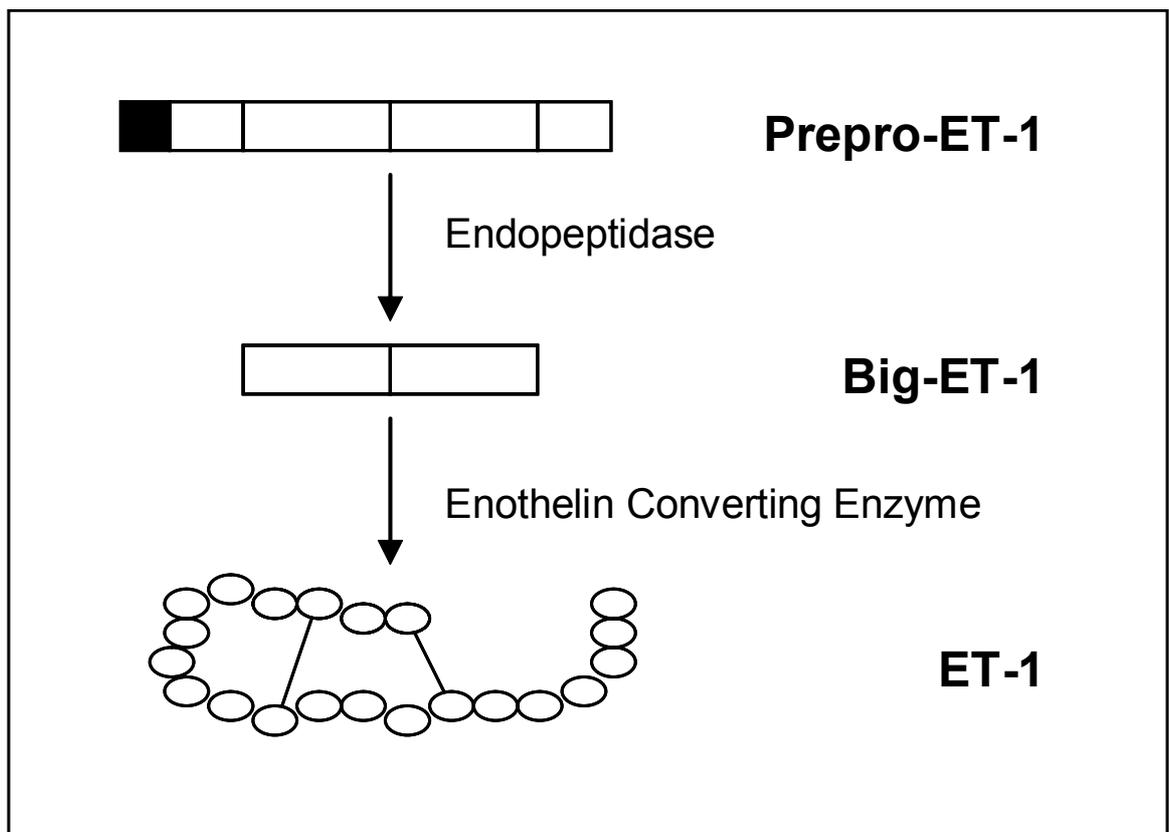


Abbildung 5 Biosynthese von Endothelin-1

Rezeptoren

Es wurden bisher 2 unterschiedliche Endothelinrezeptoren kloniert und sequenziert: der Endothelin_A (ET_A) Rezeptor mit selektiver Affinität für ET-1 und ET-2 (Arai *et al*, 1990) sowie der Endothelin_B (ET_B) Rezeptor, der die gleiche Affinität für alle drei Isopeptide aufweist (Sakurai *et al*, 1990). Beide Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt, können aber unterschiedliche second messenger Systeme aktivieren, die jeweils zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums führen (Stjernquist, 1998). Die ET-Rezeptoren konnten bisher in nahezu allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden, u.a. in Herz, Milz, Nieren, Atemwegen, Magen-Darm-Trakt, Leber, Pankreas und Gehirn (Rubanyi und Polokoff, 1994). Zu den am ausführlichsten untersuchten und funktionell wichtigsten Lokalisationen der ET-Rezeptoren gehören aber die Blutgefäße. Man ist sich inzwischen einig, dass der ET_A-Rezeptor hauptsächlich an der Zelloberfläche der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert ist und deren Kontraktion vermittelt, wohingegen der ET_B-Rezeptor vorwiegend im Gefäßendothel vertreten ist und die Freisetzung von dilatierenden Substanzen (NO, PGI₂) reguliert. Jedoch scheinen sich nicht alle Rezeptoren in dieses Schema einordnen zu lassen, daher ist eine genauere Klassifikation noch immer Gegenstand der Diskussion (Bax und Saxena, 1994; Stjernquist, 1998).

Inzwischen wurden zahlreiche Antagonisten der ET Rezeptoren entwickelt, klassifiziert werden sie derzeit als ET_A-selektiv, ET_B-selektiv oder als gemischte Antagonisten mit gleicher Affinität für beide Rezeptoren. Im experimentellen Bereich werden im Allgemeinen Antagonisten aus allen drei Gruppen eingesetzt. Der am häufigsten eingesetzte selektive ET_A-Antagonist ist BQ-123, seltener verwendete sind FR139317 oder PD151242 (Warner *et al*, 1993; Lipa *et al*, 1999; Miyauchi und Goto, 1999). Selektive ET_B-Antagonisten spielen bisher nur im experimentellen Bereich eine Rolle. Einer der Hauptvertreter der Gruppe der ET_B Antagonisten ist BQ-788 (Ishikawa *et al*, 1994;

Miyauchi und Goto, 1999). Zu den häufiger verwendeten Vertretern aus der Gruppe der gemischten Antagonisten zählt PD142893 (Warner *et al*, 1993; Miyauchi und Goto, 1999). In **Tabelle 5** sind alle beschriebenen ET-Rezeptorantagonisten in einer Überblickstabelle zusammengefasst.

Für die klinische Anwendung werden überwiegend Substanzen verwendet die oral appliziert werden können, wie z.B. der selektive ET_A-Antagonist Atrasentan, der derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Karzinomen, insbesondere des Prostatakarzinoms, zum Einsatz kommt (Norman, 2002). ET_B Antagonisten spielen klinisch zum jetzigen Zeitpunkt keine Rolle, die derzeit am häufigsten in klinischen Studien getesteten ET-Rezeptorantagonisten sind die gemischten Antagonisten. Zu dieser Gruppe gehört auch die Substanz Bosentan, die unter dem Namen TracleerTM bisher als einzige Substanz eine Zulassung zur Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie erhalten hat (Krum *et al*, 1998; Davenport und Battistini, 2002). Derzeit befinden sich zahlreiche weitere, v.a. für den klinischen Gebrauch einsetzbare Rezeptorantagonisten sowie Antagonisten des Endothelin converting enzymes (ECE) in der Entwicklung und Erprobung.

Rezeptor-spezifität	Bezeichnung	Rezeptor-spezifität	Bezeichnung
ET _A	BQ123	ET _B	BQ788
	FR139317		IRL2500
	TTA788		RES7011
	PD155080		A192621
	PD156707		K8794
	SB234551		RES114491
	L754142		Ro468443
	BMS182874		TBC10894
	A127722	ET _A /ET _B	PD142893
	TBC11251		TAK044
	LU127043		A182086
	LU135252		CGS27830
	ABT627 (Atrasentan)		L754142
	BMS193884		LU224332
	BSF208075		PD160672
	J104132		PD160874
	Ro61-1790		Ro462005
	SPP301		Ro470203 (Bosentan)
	TBC3711		SB209670
ZD1611	SB217242		
PD176856	J104121		
SO139	PD145065		
T0201	Ro610612		
FR139317			

Tabelle 5. ET-Rezeptorantagonisten (Maguire *et al*, 1995; Raschack *et al*, 1995; Burke *et al*, 1997; Miyauchi und Goto, 1999; Chow *et al*, 2002; Davenport und Battistini, 2002)

Physiologie von Endothelin-1

Durch die Entwicklung von Knockout (-/-) Mäusen, bei denen die jeweiligen Gene für ET-1 (Kurihara *et al*, 1994), ET-3 (Baynash *et al*, 1994), ET_A und ET_B (Hosoda *et al*, 1994; Clouthier *et al*, 1998) ausgeschaltet wurden, konnten zahlreiche Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des endogenen ET im Körper gewonnen werden.

Von den erwähnten Mutanten ist die ET-1-/-Maus, die Kurihara und Mitarbeiter 1994 erstmals beschrieben haben, die am ausführlichsten studierte (Kurihara *et al*, 1994). Die auffälligste Abnormität dieser Tiere ist deren gestörte Ausbildung der kraniofazialen Organe (unterentwickelte Mandibula, Gaumen und Zunge sowie hypoplastische Anlagen des äußeren Ohres und des Mittelohres), darüber hinaus sind Schilddrüse und Thymus bei diesen Mäusen kleiner als bei den Wildtyp-Mäusen. Die homozygoten ET-1 (-/-) -Mäuse sterben unmittelbar nach der Geburt auf Grund einer respiratorischen Insuffizienz durch die Verengung der Trachea. Heterozygote ET-1 (-/-) -Mäuse zeigen unerwarteter Weise einen leichten, aber signifikanten Anstieg des arteriellen Blutdruckes (Kurihara *et al*, 1994), der nach zahlreichen weiteren Experimenten verschiedener Gruppen durch eine Überaktivität der sympathischen Vasokonstriktion erklärt wird (Kuwaki *et al*, 1997). Bei Mäusen denen das Gen für ET_A ausgeschaltet wurde, zeigten sich fast identische Abnormitäten (Clouthier *et al*, 1998), was darauf hinweist, dass die für eine normale embryonale Entwicklung nötige ET-1 Aktivität über ET_A vermittelt wird.

Sowohl ET_B als auch ET-3 (-/-) -Mäuse sind bei Geburt lebensfähig und zeigen einen identischen Phänotyp, der durch eine fast vollständige Depigmentierung des Felles und durch ein Megakolon, auf Grund dessen sie nach 2-8 Wochen sterben, charakterisiert ist (Baynash *et al*, 1994; Hosoda *et al*, 1994). Untersuchungen an 2-3 Wochen alten ET-3 (-/-) - Mäusen zeigten, dass auch ET-3, zumindest in den ersten Lebensabschnitten, keinen Beitrag zur Beeinflussung des Blutdrucks

leistet (Kuwaki *et al*, 2002).

Zusammengenommen zeigen diese Modelle, dass ET eine entscheidende Rolle in der embryonalen Entwicklung und Morphogenese spielt, jedoch, überraschender Weise, unter physiologischen Bedingungen nur einen untergeordneten Beitrag zur Aufrechterhaltung eines normalen Blutdruckes leistet.

Pathophysiologie von Endothelin-1

Bei verschiedenen Erkrankungen des Menschen und in zahlreichen Tiermodellen pathologischer Zustände konnte bisher eine Beteiligung von ET-1 nachgewiesen werden. Dabei ist die Rolle von ET-1 bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems am besten dokumentiert und durch zahlreiche experimentelle und klinische Studien belegt:

Herz-Kreislauf-System

Schon bei der Erstbeschreibung des Endothelins durch Yanagisawa und Kollegen (Yanagisawa *et al*, 1988) wurde aufgrund der ausgeprägten vasokonstriktorisches Eigenschaften und der Beobachtung, dass ET-1 eine dauerhafte Erhöhung des Blutdruckes bewirkt, vermutet, dass ET-1 eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und des lokalen Blutflusses spielt. In zahlreichen Studien wurde anschließend versucht, die Beteiligung von ET-1 in der Entstehung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie zu klären. Obwohl die bisherigen Experimente und Studien widersprüchliche Aussagen über die pathophysiologische Funktion von ET-1 im Menschen machen (Benigni und Remuzzi, 1999), konnte kürzlich in einer klinischen Studie an 293 Patienten mit essentieller Hypertonie eine signifikante Abnahme des Blutdruckes durch eine Behandlung mit Bosentan, einem gemischten ET-Rezeptorantagonisten, beobachtet werden (Krum *et al*, 1998). Eine weitere, kürzlich durchgeführte Studie an 213 Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertension zeigte ebenso eine signifikante Besserung der

mit Bosentan behandelten Patienten (Rubin *et al*, 2002). Die Ergebnisse dieser Studie führten zur ersten Zulassung eines ET-Rezeptorantagonisten unter dem Namen TracleerTM.

Die Plasmakonzentrationen von ET-1 sind im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz erhöht und korrelieren sowohl beim Menschen als auch in Tiermodellen mit dem Ausmaß der Herzschädigung (Benigni und Remuzzi, 1999; Miyauchi und Masaki, 1999). Insbesondere scheint die durch ET-1 induzierte und aufrechterhaltene pulmonale Hypertension für eine chronische Herzinsuffizienz prognostisch entscheidend zu sein (Sharma *et al*, 2000). Erste Ergebnisse aus einer multizentrischen Studie (REACH-1) zeigen, dass Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz unter Behandlung mit Bosentan eine symptomatische Besserung erfahren und kürzere sowie insgesamt seltenere Krankenhausaufenthalte benötigen (Gray *et al*, 2000). Ebenso ist bei akutem Herzinfarkt und instabiler Angina pectoris ein erhöhter ET-1 Plasmaspiegel festzustellen, der auch hier mit dem Schweregrad korreliert. Der weitere Krankheitsverlauf scheint von der Konzentration an ET-1 im Plasma abhängig zu sein, da Reinfarkte, Mortalität und Koronarspasmen bei hohen ET-1 Spiegel gehäuft auftreten als bei niedrigen (Miyauchi *et al*, 1989; Mateo und Aleixandre de Artinano, 1997).

Nieren

Transgene, ET-1 überexprimierende Mäuse entwickeln Nierenzysten, Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose, die zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt (Hocher *et al*, 1997). Darüber hinaus zeigte sich in zahlreichen Tierversuchen an Modellen des akuten Nierenversagens eine Beteiligung von ET-1 und durch verschiedene ET-Antagonisten eine Besserung der GFR, erniedrigtes Serum Kreatinin, verminderte renale Vasokonstriktion und eine erhöhte Natrium-Rückresorption (Bach *et al*, 1987; Mateo und Aleixandre de Artinano, 1997; Benigni und Remuzzi, 1999). Bei Patienten im akutem

Nierenversagen wurden ebenfalls erhöhte ET-1 Plasmaspiegel festgestellt (Tomita *et al*, 1989), klinische Studien stehen hier jedoch noch aus.

Lunge

Endothelin-1 wird bei zahlreichen Erkrankungen der Lunge mit verantwortlich gemacht. So finden sich z.B. im Serum von Patienten mit einem Asthmaanfall deutlich erhöhte ET-1 Spiegel, die mit der Schwere der Erkrankung korreliert sind. Weiterhin wird von einer wichtigen Rolle von Endothelin-1 in so verschiedenen Erkrankungen wie Bronchiektasie, Lungenfibrose, maligne Erkrankungen der Lunge und der oben bereits ausführlicher beschriebenen pulmonalen arteriellen Hypertonie ausgegangen (Fagan *et al*, 2001).

Zerebrovaskuläre Erkrankungen

Bei Patienten mit einer Subarachnoidalblutung (SAB) sind, ebenso wie in entsprechenden Tiermodellen, die Plasma- und Liquorspiegel von ET-1 und ET-3 teilweise stark erhöht. Daher gibt es auch hier therapeutische Bestrebungen durch eine Blockade der ET-Rezeptoren eine Verbesserung der bisherigen Therapie zu erreichen. In einer ersten Phase II Studie an 420 Patienten mit Subarachnoidalblutung wurde die Wirksamkeit eines gemischten ET-Antagonist geprüft, die jedoch noch keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte (Shaw *et al*, 2000).

Auch Patienten mit ischämischem Schlaganfall entwickeln erhöhte ET-1 Werte im Blut, in Tierversuchen reduzierten ET-Rezeptorantagonisten die Auswirkungen eines Schlaganfalles deutlich (Mateo und Aleixandre de Artinano, 1997; Stjernquist, 1998; Benigni und Remuzzi, 1999), so dass auch hier mit einer klinischen Prüfung zu rechnen ist.

Haut

Seit längerem ist bekannt, dass Endothelin eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Ausreifung und Funktion von Melanozyten spielt (Hara *et*

al, 1995; Reid *et al*, 1996; Yoshida *et al*, 1996). So ist es nicht verwunderlich, dass in den letzten Jahre zahlreiche Berichte über eine Beteiligung von ET und seinen Rezeptoren in pigmentierten Hautläsionen wie einfachen Naevi über Lentigo senilis bis zum malignen Melanom erschienen sind (Lahav *et al*, 1999; Demunter *et al*, 2001; Kadono *et al*, 2001; Eberle *et al*, 2002). Weitere Krankheitsbilder der Haut, bei denen eine Beteiligung von ET gezeigt werden konnte, sind z.B. Psoriasis, bei der mit dem Schweregrad des Krankheitsbildes korreliert deutlich erhöhte ET-1 Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden konnten (Bonifati *et al*, 1998) und Sklerodermie, bei der ET-1 als Aktivator von Fibroblasten eine wichtige Rolle zu zukommen scheint (Kahaleh, 1991; Shi-Wen *et al*, 2001).

Endothelin-1 und Sepsis

Zahlreiche Studien in den letzten Jahren weisen darauf hin, dass ET-1 eine bislang unbekannte, wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion bei Sepsis spielt. Unterstützt wird diese Ansicht durch verschiedene Beobachtungen: Zum einen wird ET-1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch TNF α (Maemura *et al*, 1992; Redl *et al*, 1994; Ahn *et al*, 1998; Kruse-Elliott *et al*, 1998) oder Endotoxin (Sugiura *et al*, 1989; Lundblad und Giercksky, 1995a) freigesetzt, die beide nachweislich eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des septischen Schocks haben (Murphy *et al*, 1998). Darüber hinaus wurden bei Sepsis in Tierexperimenten und beim Menschen hohe ET-1 Konzentrationen im Serum festgestellt, die mit dem Ausmaß der Endotoxämie korrelierten (Hirata *et al*, 1993; Takakuwa *et al*, 1994; Mitaka *et al*, 1998; Szalay *et al*, 1998; Avontuur *et al*, 1999). In den Untersuchungen von Takakuwa und Mitarbeitern lagen bei den Patienten, die an den Folgen der Infektion verstarben, die Konzentrationen von ET-1 und TNF α im Blut deutlich höher als bei der Gruppe der Überlebenden (Takakuwa *et al*, 1994). Ratten mit einer durch CLP ausgelösten septischen Peritonitis

zeigen eine deutliche Zunahme der ET-1 Konzentrationen in der Bauchhöhle (Lundblad und Giercksky, 1995b).

Zusätzlich konnten durch ET-Rezeptorantagonisten eine Reihe von Sepsis assoziierten pathologischen Zuständen gebessert werden. So wurde beschrieben, dass ET-Rezeptorantagonisten im Rahmen eines experimentellen septischen Schocks bei Hunden die Ausbildung von metabolischer Azidose, Hypoxämie und renaler Dysfunktion verhindern (Mitaka *et al*, 1998). Bei Ratten, die einer CLP unterzogen wurden, erhöhen ET-Rezeptorantagonisten die kardiale Auswurfleistung und verringern den systemischen Gefäßwiderstand (Szalay *et al*, 1998). Bei Schweinen wird die Endotoxin-vermittelte pulmonale Hypertonie durch ET-Rezeptorantagonisten deutlich gesenkt, das abfallende Herzminutenvolumen steigt wieder an und der durch die Endotoxämie ausgelöste pH Abfall wird verhindert (Oldner *et al*, 1998; Wanecek *et al*, 1999a; Wanecek *et al*, 1999b). Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die durch *Escherichia coli*-Endotoxin hervorgerufenen Schädigungen von Leber und Milz sowie die Abnahme des mesenterialen Blutflusses durch den unselektiven ET-Rezeptorantagonisten Bosentan vollkommen aufgehoben werden (Iskit *et al*, 1999).

Mastzellen und Endothelin-1

1992 wurde erstmals berichtet, dass ET-1 bei Meerschweinchen die Freisetzung von Histamin aus MZ induzieren kann (Uchida *et al*, 1992). Im gleichen Jahr konnten Ehrenreich und Mitarbeiter nachweisen, dass Mastzellen, die *in vitro* aus murinen Knochenmarkszellen gewonnen worden waren (bone marrow derived cultured mast cells, BMCMC), und verschiedene Mastzelllinien in der Lage sind, ET-1 zu produzieren, zu speichern und freizusetzen (Ehrenreich *et al*, 1992). Zwei Jahre später zeigten Egger *et al* sowie Yamamura *et al*, dass ET-1 die Degranulation von murinen BMCMC induzieren kann und dass diese Degranulation ET_A-Rezeptor vermittelt ist (Yamamura *et al*, 1994a; Egger *et al*, 1995). Im gleichen Jahr konnten Yamamura *et al* an peritonealen MZ der Maus zeigen, dass ET-1 zu den potentesten MZ-degranulierenden Substanzen unter den bekannten MZ-Sekretagoga gehört (Yamamura *et al*, 1994b). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch MZ vom Mukosa-Typ durch ET-1, über ET_A, aktiviert werden und dadurch zu einer Schädigung der Darmschleimhaut beitragen (Boros *et al*, 2002).

Immunhistologisch wurde in verschiedenen Arbeiten ET-1 in MZ nachgewiesen. So sind im Magen-Darm-Trakt von Ratten nahezu alle MZ im physiologischen Zustand ET-1 positiv (Liu *et al*, 1998), im Rahmen von experimentellem Diabetes bei Ratten zeigen MZ in der Gefäßwand der A. mesenterica Immunreaktivität für ET-1 (Gilbert *et al*, 2000) und beim Menschen wurde in chirurgisch entfernten hyperplastischen, jedoch nicht in normalen Tonsillen ET-1 in MZ nachgewiesen (Li *et al*, 1999).

Mastzellen, bzw. deren Mediatoren, scheinen darüber hinaus in manchen Regionen des Körpers eine Rolle in der Umwandlung von Big ET zu aktivem ET zu spielen. So zeigten Wypij und Kollegen, dass die von MZ stammende Chymase in der perfundierten Rattenlunge in der

Lage ist, Big ET zu ET-1 zu spalten, Nakano und Mitarbeiter bestätigten diese Arbeit später, indem sie zeigten, dass Chymase von humanen MZ bestimmte Big ET zu Trachea-kontrahierendem, aktivem ET umwandeln kann (Wypij *et al*, 1992; Nakano *et al*, 1997).

MATERIAL UND METHODEN

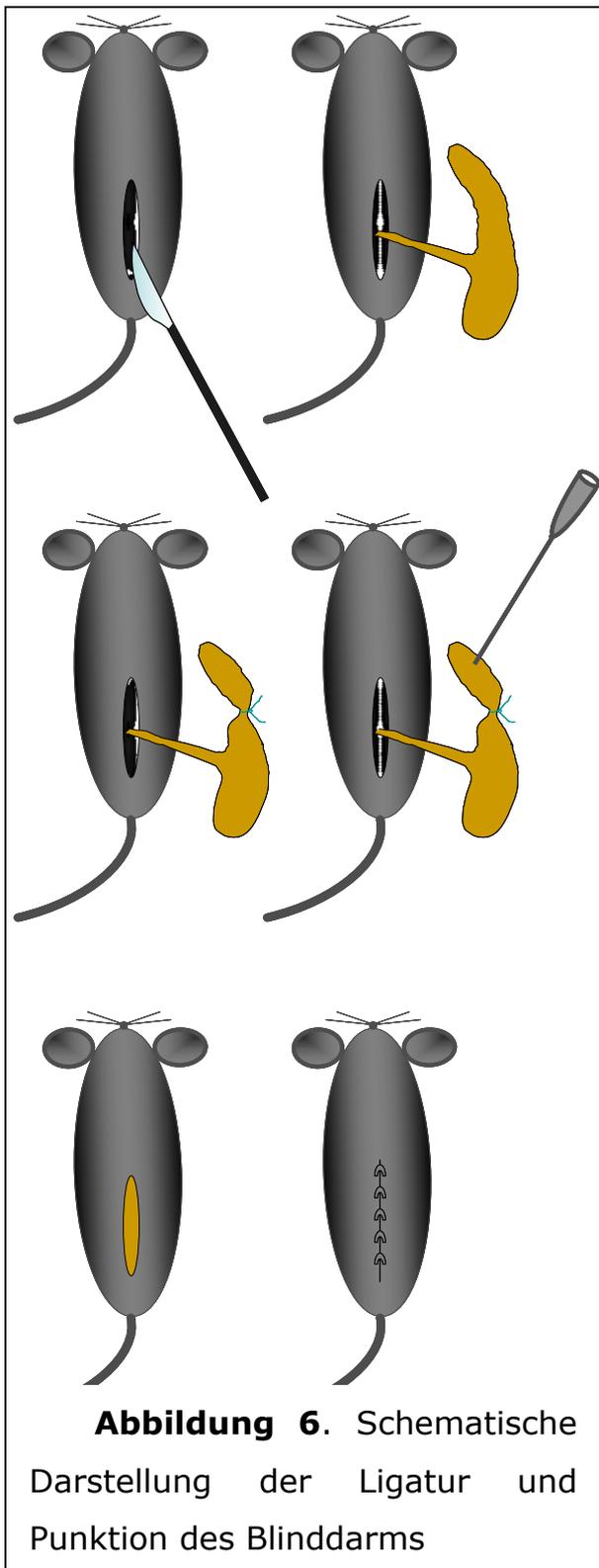
Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden C57BL/6 Mäuse, sowie genetisch Mastzell-defiziente WBB6F₁-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse (im weiteren *Kit*^W/*Kit*^{W-v} genannt) und kongenitale normale WBB6F₁-+/+ (*Kit* +/+) Mäuse verwendet, die sämtlich von Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME, USA erworben wurden. Die *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse weisen aufgrund einer spontan aufgetretenen Doppelmutation des keinen funktionellen SCF-Rezeptor auf. Das vorhanden sein von dieses Rezeptors ist jedoch essentiell zur Ausbildung von MZ, so dass diese Tiere eine MZ-Defizienz aufweisen (Nakano *et al*, 1985).

Alle Mäuse wurden in Gemeinschafts-Versuchstierkäfigen in den Versuchstierställen des Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA, USA bei konstanten klimatischen Bedingungen unter einem 12 Std. Tag-Nacht Zyklus gehalten. Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommissionen der Harvard Universität und des Beth Israel Hospitals.

Induktion einer akuten septischen Peritonitis durch Ligatur und Punktion des Blinddarms (Cecal ligation and puncture, CLP)

Die Induktion einer septischen Peritonitis erfolgte mit Hilfe des von Echtenacher *et al* etablierten Modells der Ligatur und Punktion des Blinddarms (cecal ligation and puncture, CLP) (Echtenacher *et al*, 1996). Im Einzelnen wurde bei Mäusen in tiefer Allgemeinnarkose das



Caecum durch einen 1-2 cm langen Mittelbauchschnitt freigelegt. Die distale Hälfte wurde ligiert und daraufhin mit einer 0,7 mm Kanüle durch eine einmalige Punktion perforiert. Anschließend wurde das Caecum in den Bauchraum reponiert und die Wunde mit 9 mm Stahlclips wieder verschlossen (**Abbildung 6**).

Die Mäuse wurden daraufhin über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen beobachtet und Morbidität und Mortalität wurden in kurzen Zeitabständen dokumentiert. Mäuse die eindeutig moribund waren, wurden durch CO₂ Inhalation getötet. Um zu prüfen, ob ET-1 zur Morbidität oder Mortalität einer CLP beiträgt, wurden C57BL/6 Mäuse eine Stunde vor CLP mit den hochselektiven und -spezifischen Antagonisten für die Endothelinrezeptoren A (BQ-123) oder B (BQ-788; beide von Bachem, Bubendorf, Schweiz)

behandelt (100 nMol in 200 µl 0,9% NaCl). Diese Substanzen wurden in dieser Arbeit verwendet, da Sie die im experimentellen Bereich am häufigsten verwendeten Antagonisten sind (Warner *et al*, 1993; Ishikawa *et al*, 1994; Lipa *et al*, 1999; Miyauchi und Goto, 1999).

Messung von ET-1 und Bestimmung der MZ-Anzahl in peritonealer Lavage nach CLP

Zur Bestimmung der ET-1 Konzentration in peritonealer Lavage wurden Mäuse vor sowie 8, 16 oder 24 Stunden nach CLP durch CO₂ Inhalation getötet. Die Bauchhaut wurde mit 70% Ethanol gewaschen, das Peritoneum freigelegt und 2 ml sterile Kochsalzlösung sowie 8 ml Luft in die Bauchhöhle injiziert. Das Abdomen wurde für etwa 3 min. massiert und anschließend die peritoneale Flüssigkeit wieder abgezogen. In der auf diese Weise gewonnenen Peritoneallavage wurden die Mastzellen mittels Kimura Färbung, einer Färbelösung bestehend aus Toluidinblau (Serva, Heidelberg) und Saponin (Sigma) angefärbt (Kimura *et al*, 1973) und in einer Neubauerkammer gezählt. Die Lavageflüssigkeit wurde dann zentrifugiert und die ET-1 Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA-Kits für Maus ET-1 (von Amersham, Arlington Heights, IL, USA) nach Angaben des Herstellers gemessen.

MZ-Rekonstitution von MZ-defizienten Kit^W/Kit^{W-v} - Mäusen

MZ-defiziente Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse wurden durch verschiedene Verfahren mit MZ rekonstituiert:

1. Einige Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse (männlich, 4-6 Wochen alt) wurden durch die Injektion von Wachstumsfaktor-abhängigen, aus Knochenmark stammenden, kultivierten Mastzellen (bone marrow derived cultured mast cells, BMCMC) in die Bauchhöhle lokal und selektiv rekonstituiert. Auf diese Art rekonstituierte MZ verbleiben am Ort der Rekonstitution (in diesem Fall der Bauchhöhle) und reifen dort unter dem Einfluss des lokalen Zytokinmilieus zu reifen MZ aus (Nakano *et*

al, 1985). Hierfür wurden Zellen aus dem Knochenmark von +/+ Mäusen gewonnen und *in vitro* in IL-3 haltigem, Concanavalin-A stimuliertem Medium aus Zellen von Mäusemilz kultiviert. Dieses Verfahren hat eine Differenzierung der Zellen zu unreifen MZ zur Folge. Mehr als 95% der kultivierten Zellen zeigen nach 4-5 Wochen phänotypische Charakteristika von MZ (Metachromasie der zytoplasmatischen Granula nach Färbung mit Toluidinblau). Jeweils $1,0 \times 10^6$ dieser MZ in 200 μ l HMEM-Pipes (Hank's minimal essential medium (Wershil *et al*, 1992)) oder HMEM-Pipes alleine wurden daraufhin intraperitoneal injiziert. 6 Monate nach dem Transfer der kultivierten MZ wurden diese Mäuse gemeinsam mit *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen und *Kit* +/+ Mäusen gleichen Alters und Geschlechts für Experimente verwendet.

2. Andere *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse erhielten peritoneale Zellsuspensionen von *Kit* +/+ Mäusen i.p. injiziert, die pro Maus ca. 200.000 peritoneale MZ enthielten. Als Kontrolltiere zu diesen Mäusen wurden in den Experimenten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse verwendet, denen peritoneale Zellsuspensionen aus MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen injiziert wurden.
3. In einer weiteren Gruppe wurde wie unter 2. vorgegangen, jedoch wurden die peritonealen Zellsuspensionen 30 min. vor dem Transfer entweder mit Vehikel oder dem Membran permeablen Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM (von Molecular Probes, Eugene, OR, USA) vorbehandelt. Die Behandlung mit BAPTA-AM inhibiert *in vitro* vollständig die durch ET-1 induzierte Degranulation von PMZ der Maus (Yamamura *et al*, 1994b), da durch diese Behandlung die Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion verhindert wird, ohne dabei die MZ selber zu aktivieren oder Rezeptoren zu besetzen.

Messung der durch ET-1 induzierten Mastzell-Degranulation

Peritoneale MZ (PMZ) wurden von C57BL/6 Mäusen (weiblich, 20-25g, 6-8 Wochen) mittels peritonealer Lavage gewonnen. Die Mäuse wurden durch CO₂-Begasung getötet und anschließend 2 ml sterile Kochsalzlösung und 8 ml Luft in die Bauchhöhle injiziert. Die peritoneale Lavageflüssigkeit wurde nach ca. dreiminütiger Massage des Abdomens wiedergewonnen. Durch Färbung nach Kimura wurde der durchschnittliche prozentuale Anteil an Mastzellen in der peritonealen Zellsuspension festgestellt, der 1-3% betrug. Um angereicherte PMZ Suspensionen zu erhalten, wurde die Lavageflüssigkeit mit Hilfe eines 22-23%igen Metrizamide (Accurate Chemical and Science Corp., Westbury, NY, USA) Gradienten (Enerbäck und Svensson, 1980) aufgereinigt. Diese aufgereinigten Mastzellsuspensionen wurden vor der Stimulation in "Standard Medium" (DMEM angereichert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum, 2mM L-Glutamin und 50 µM β-Mercaptoethanol) über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Der Anteil an Mastzellen in dieser angereicherten Lösung betrug >90%, die Viabilität der Zellen wurde durch Ausschluß in der Trypanblau Färbung festgestellt und betrug sowohl in der unaufgereinigten wie auch in der aufgereinigten Suspension >95%.

Die Degranulation von Mastzellen nach Stimulation wurde durch die Messung der Freisetzung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wie folgt nachgewiesen. Die Zellen wurden in Standard Medium mit Tritiummarkiertem Serotonin ([³H]5-HT, von New England Nuclear, Boston, MA, USA) für 2 Std. bei 37°C vorinkubiert, in dieser Zeit nehmen die Mastzellen das Serotonin auf und speichern es in Granula (Boesiger *et al*, 1998). Anschließend wurden die Zellsuspensionen drei mal

gewaschen um überschüssige Radioaktivität zu entfernen, so dass das verbliebene radioaktive Serotonin ausschließlich in den MZ-Granula gespeichert ist. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen für 15 min bei 37°C unterschiedlichen Konzentrationen von ET-1 (Sigma, St. Louis, MO, USA), dem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten BQ-123, dem selektiven ET_B-Rezeptorantagonisten BQ-788 (beide von Bachem, King of Prussia, PA, USA), dem ET_A /ET_B-Antagonisten PD 142893 (von Sigma, St. Louis, MO, USA), dem Calcium Ionophor A23187 (als Positivkontrolle; von Sigma St. Louis, MO, USA) oder 10⁻⁷M ET-1 zusammen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BQ-123, BQ-788 oder PD142893 ausgesetzt. Durch eine Degranulation wird das [³H]5-HT aus den Granula der MZ freigesetzt und wird dann, ebenso wie das in den Zellen verbliebene Serotonin, im durch Zentrifugation gewonnenen Überstand mittels Szintillationszählung gemessen (Boesiger *et al*, 1998).

Die prozentuale Serotoninfreisetzung wurde dann anhand folgender Formel errechnet: % 5-HT-Freisetzung = [([³H]5-HT im Überstand) / ([³H]5-HT im Überstand + zelluläres [³H]5-HT)] x 100. Die für die jeweilige Substanz spezifische Serotoninfreisetzung wurde ermittelt, indem die spontane, Vehikel-induzierte Serotoninfreisetzung (3-5% in allen Experimenten) vom Ergebnis subtrahiert wurde.

***In vivo* Behandlung mit ET-1**

Zuerst wurde die basale Körpertemperatur von jedem Tier mit Hilfe eines Rektalthermometers (Physitemp, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) festgestellt. Anschließend wurde den Tieren entweder Vehikel (300µl sterile Kochsalzlösung mit 0,1% Rinderserum Albumin), ET-1 (1 nmol), BQ-123 (100 nmol) oder BQ-788 (100 nmol) i.p. injiziert. In anderen Experimenten wurde vor einer ET-1 Injektion (1 nmol) in die

Bauchhöhle BQ-123 (100 nmol) oder BQ-788 (100 nmol) injiziert. Im Verlauf von 3 Std. wurde regelmäßig die Temperatur, der Beginn und die Dauer der Diarrhö protokolliert. Weiterhin wurde die Mortalität innerhalb der ersten 24 Stunden in kurzen Zeitabständen (1-2 Std.) nach Injektion dokumentiert. Zur Bestimmung der Anzahl granulierter Mastzellen in der peritonealen Lavageflüssigkeit (PLF) von unbehandelten Mäusen sowie von ET-1 (1 nmol) behandelten Mäusen denen entweder Vehikel oder BQ-123 (100 nmol) vor ET-1 Applikation i.p. injiziert wurde, wurden eine Stunde nach ET-1 Injektion Cytospins der PLF angefertigt, mit May-Grünwald-Giemsa (Sigma) gefärbt und anschließend morphologisch ausgewertet.

Feststellung der Biodistribution von ET-1 nach i.p. Injektion

Die Mäuse erhielten i.p. Injektionen von ^{125}I -ET-1 (0,2 pmol in 200 μl sterilem NaCl; Amersham) sowie nicht-radioaktivem ET-1 (1 nmol in 300 μl sterilem NaCl). 30 min später wurde das Blut gewonnen und die Mäuse getötet. Es wurde eine Lavage der Bauchhöhle (wie bereits beschrieben) durchgeführt und Lunge, Herz, Nieren, Leber, Intestinum, Kolon, Milz, Augen, Mesenterium und Gehirn gewogen, homogenisiert und in 1 ml H_2O suspendiert. Das Plasma (100 μl), die peritoneale Lavageflüssigkeit (2 ml) und die homogenisierten Organe wurden dann in einem Gammazähler gemessen. Sämtliche Versuche mit Radioaktivität wurden mit den entsprechenden Genehmigungen der Harvard Universität und des Beth Israel Hospitals in einem für ^{125}I zugelassenen Isotopenlabor durchgeführt.

Statistische Analysen

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach folgenden statistischen Methoden:

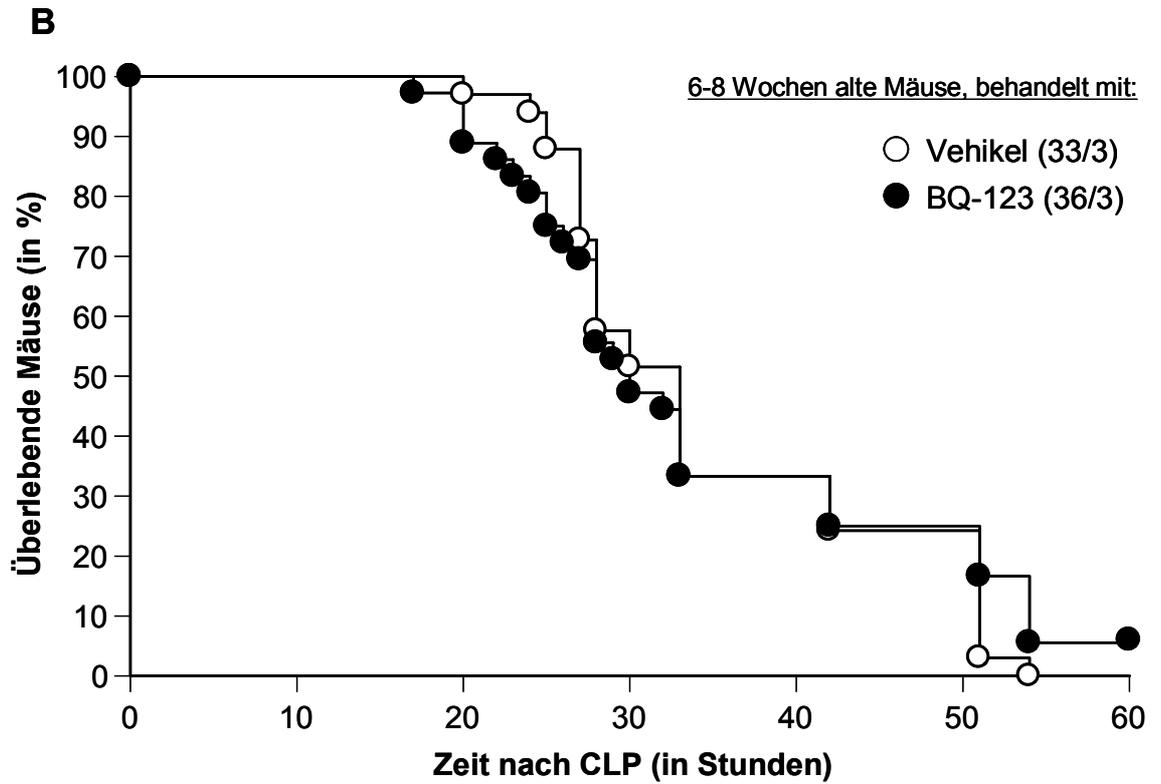
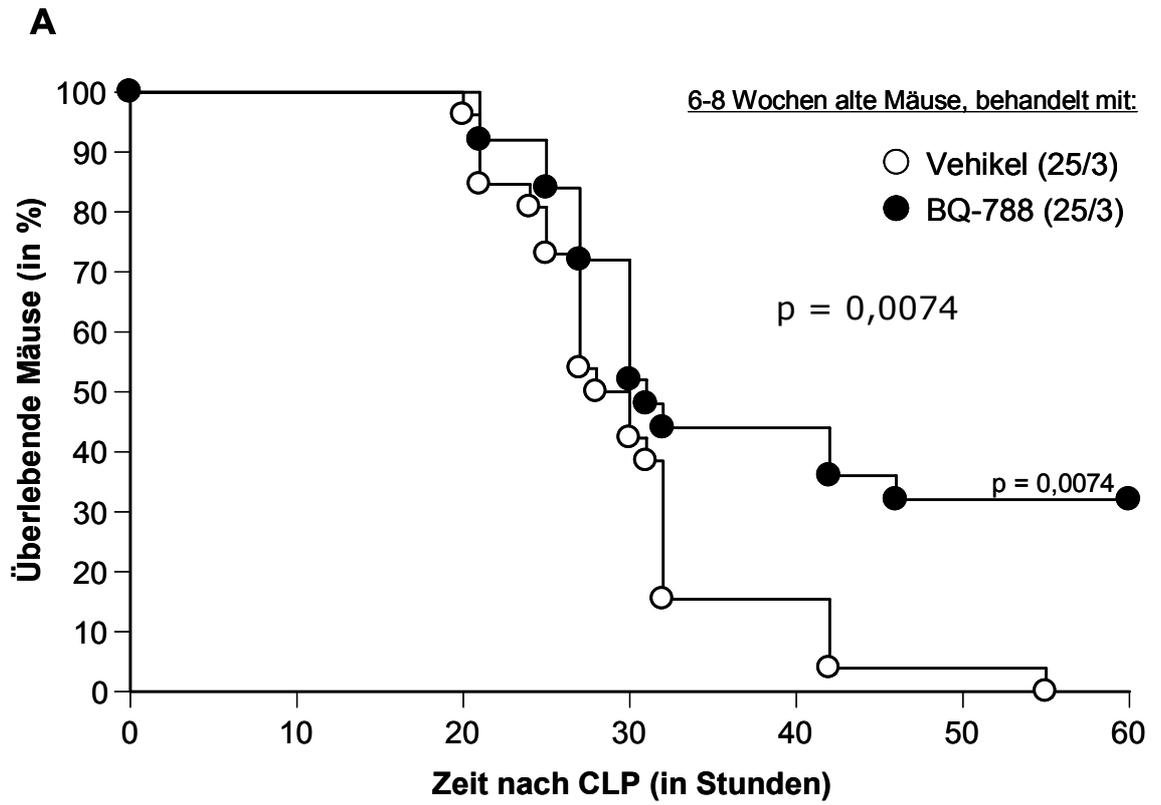
Die Signifikanz der Unterschiede in den Überlebensraten nach CLP wurde durch den Mantel-Cox Test festgestellt. Die Unterschiede in den Anteilen der Mäuse, die infolge der ET-1 Injektion Diarrhö entwickelten oder starben, wurden mit Hilfe des exakten Fisher Tests ermittelt. Alle anderen Daten wurden auf ihre statistische Signifikanz mittels des zweiseitigen Student *t*-Test für ungebundene Stichproben geprüft.

Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability value [p] von $p < 0,001$ wurde als hoch signifikant, ein $p < 0,05$ als signifikant und ein $p > 0,05$ als nicht signifikant angesehen. Alle Daten werden als Mittelwert \pm SE dargestellt.

ERGEBNISSE

ET-1 trägt zur Mortalität bei akuter septischer Peritonitis bei.

Die Mortalität durch bakterielle Peritonitis in C57BL/6 Mäusen nach Ligatur und Punktion des Caecum (cecal ligation and puncture, CLP) konnte durch die vorhergehende i.p. Injektion des selektiven ET_B-Antagonisten BQ-788 (100 nmol in 200 µl steriler, 0,9 %iger Kochsalzlösung, eine Stunde vor CLP) deutlich gesenkt werden (**Diagramm 1 A, C**). Ebenso konnten, wenn auch in geringerem Ausmaß, Mäuse durch eine Vorbehandlung mit dem selektiven ET_A-Antagonisten BQ-123 vor den Auswirkungen der CLP geschützt werden (100 nmol in 200 µl Kochsalzlösung, eine Stunde vor CLP) (**Diagramm 1 B, D**). Der protektive Effekt der jeweiligen Substanzen machte sich bei älteren Tieren (11-12 Monate, **Diagramm 1 C, D**) stärker bemerkbar als bei jüngeren (6-8 Wochen, **Diagramm 1 A, B**). Dies resultiert vermutlich daraus, dass ältere Mäuse gegenüber der mit CLP assoziierten Mortalität resistenter sind als junge (Maurer *et al*, 1998).



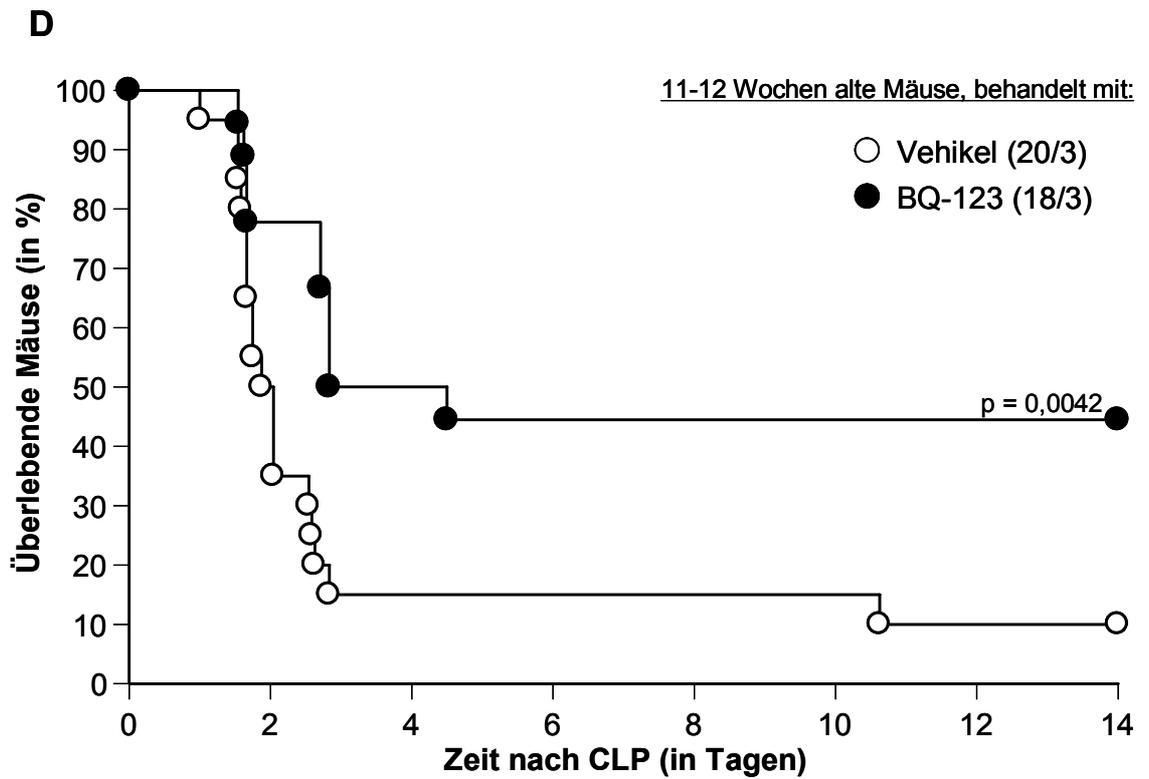
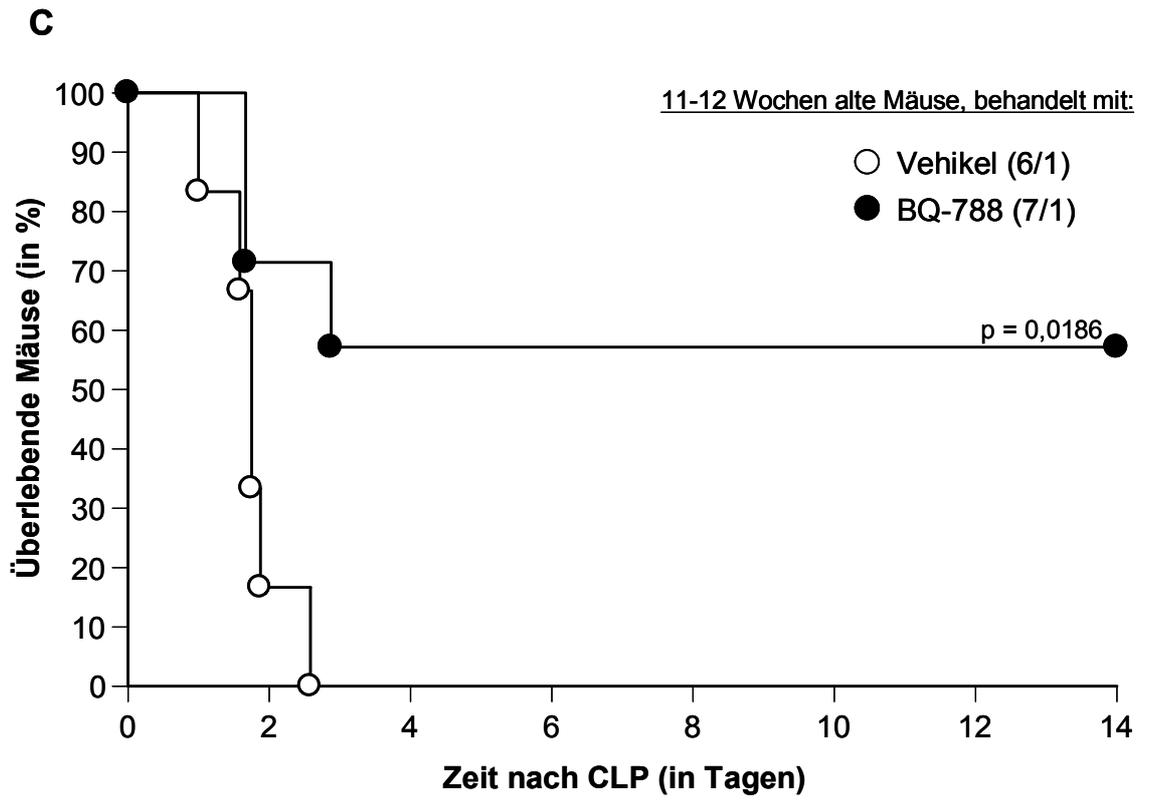


Diagramm 1. Pharmakologischer Nachweis, dass ET-1 zur Mortalität nach Ligatur und Punktion des Caecums (cecal ligation and puncture, CLP) beiträgt. Dargestellt sind der Prozentsatz überlebender Mäuse (C57BL/6; männlich; **A, B**: 6-8 Wochen alt, **C, D**: 11-12 Wochen alt) nach CLP (50 %ige Ligatur, einmalige Punktion) die eine Stunde vor CLP eine einmalige Injektion des selektiven ET_B Antagonisten BQ-788 (100 nmol in 200 µl Kochsalzlösung), des selektiven ET_A Antagonisten BQ-123 (100 nmol in 200 µl Kochsalzlösung) oder von Vehikel (ausschließlich 200µl Kochsalzlösung) bekamen. Die Anzahl der verwendeten Tiere und die Anzahl der durchgeführten Experimente sind in Klammern angegeben.

Peritoneale ET-1 Konzentrationen nach CLP sind in Mastzell-defizienten Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen höher als in den $Kit +/+$ Mäusen.

An Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass nach Induktion einer septischen Peritonitis die ET-1 Konzentrationen in der Bauchhöhle deutlich ansteigen (Lundblad und Giercksky, 1995b). Um dies auch für das hier verwendete Mausmodell zu bestätigen wurden die ET-1 Konzentrationen in der peritonealen Lavageflüssigkeit von C57BL/6 Mäusen 8, 16 und 24 Stunden nach Induktion einer septischen Peritonitis mittels ELISA gemessen. Nach der Durchführung der CLP stiegen, ausgehend von einer Kontrollmessung vor CLP, die Konzentrationen von ET-1 in der peritonealen Lavageflüssigkeit (PLF) nach 8 Std. um das 11-fache, nach 16 Std. um das 22-fache und nach 24 Std. um das 32-fache an (**Diagramm 2A**). Diese deutliche Erhöhung der ET-1-Spiegel korrespondiert mit den Zeichen der zunehmenden Morbidität bei den betroffenen Tieren (Diarrhö, Piloerektion, Hypothermie, abnehmende Aktivität).

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass MZ-defiziente Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse an den Folgen einer CLP versterben, normale $Kit +/+$ Mäuse jedoch nicht oder nur in einem geringeren Ausmaß (Echtenacher *et al*, 1996). Um zu prüfen, ob die protektive Funktion der MZ in diesem Zusammenhang durch eine Neutralisierung von ET-1 vermittelt wird, wurden zunächst MZ-defiziente Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse und Wildtypkontrollen ($Kit +/+$) einer CLP unterzogen und die ET-1 Konzentration in der peritonealen Lavage nach 16 Stunden mittels ELISA gemessen. Dabei fand sich bei Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen eine etwa 2,7-fach höhere Konzentration an ET-1 als bei $Kit +/+$ Mäusen (**Diagramm 2B**). Die höheren ET-1-Spiegel der Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse reflektieren, zumindest

teilweise, die fehlenden peritonealen MZ (PMZ) dieser Tiere, da *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, die durch eine einmalige i.p. Injektion peritonealer Zellen aus *Kit +/+* Mäusen (mit 2×10^5 MZ pro Maus) rekonstituiert wurden, signifikant niedrigere ET-1 Werte in der peritonealen Lavageflüssigkeit 16 Std. nach CLP aufwiesen als die MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse (**Diagramm 2B**).

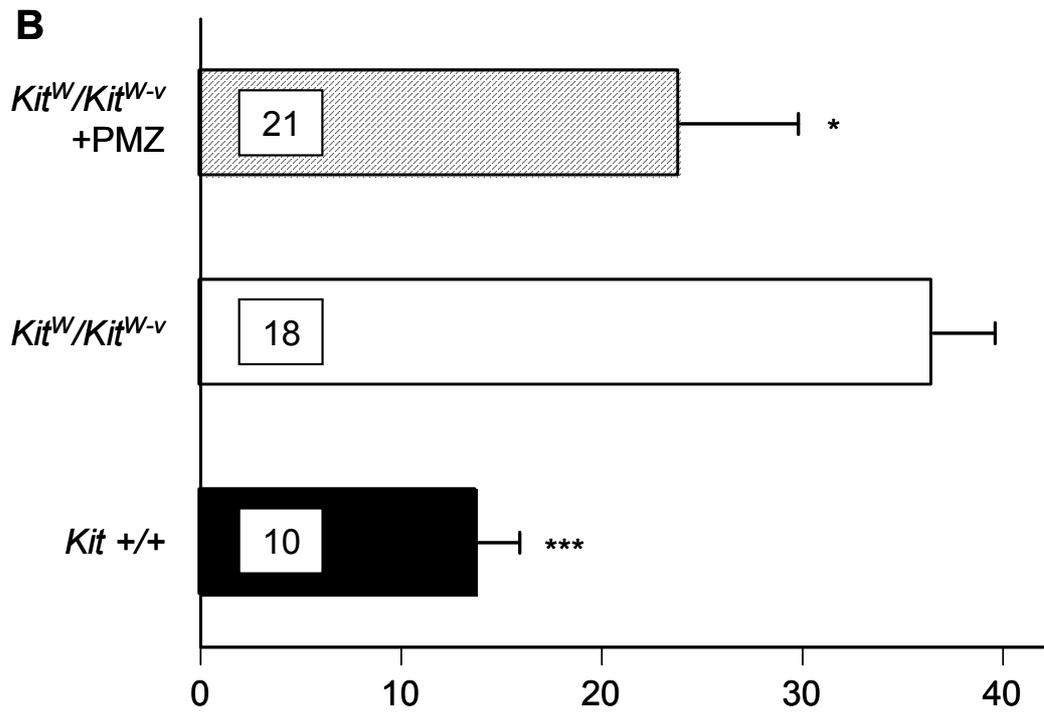
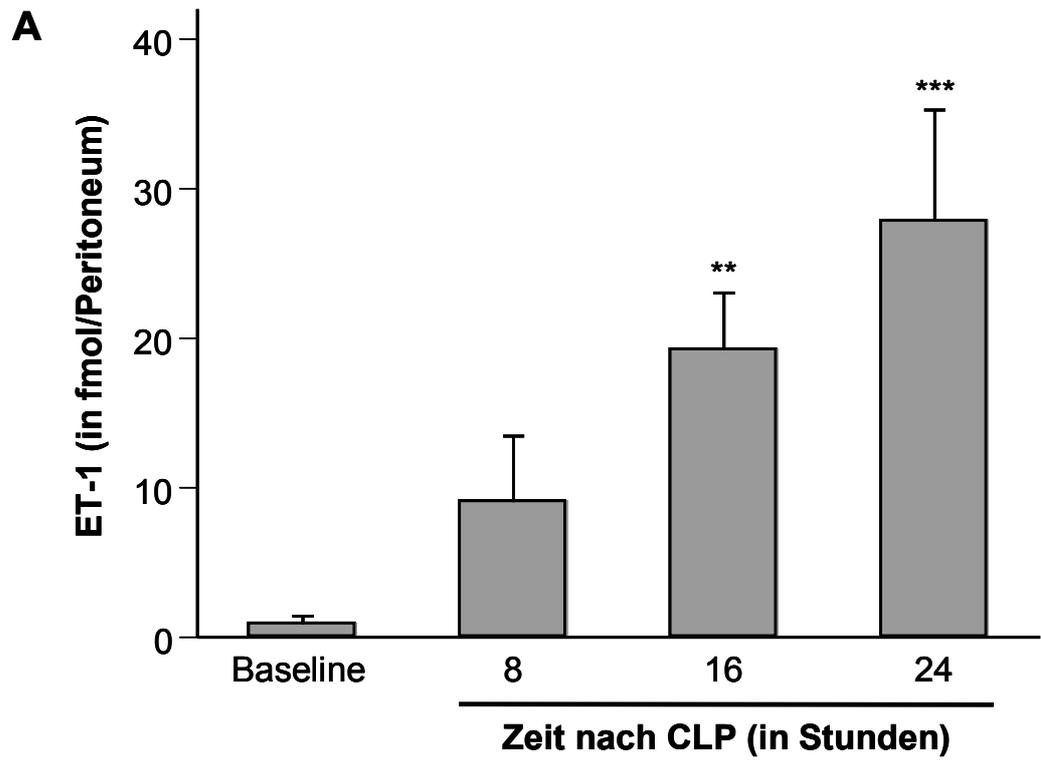


Diagramm 2. Die intraperitonealen ET-1 Konzentrationen sind in der Abwesenheit von Mastzellen erhöht.

A ET-1 Spiegel in der peritonealen Lavageflüssigkeit von C57BL/6 Mäusen (männlich, 6-8 Wochen alt) steigen nach CLP (50%ige Ligatur, einmalige Punktion) an. Die Daten sind zusammengefaßt aus 2 unabhängigen Experimenten (n = 8 pro Zeitpunkt). ** = p < 0,005, *** = p < 0,001, verglichen mit den Baseline Werten.

B MZ-defiziente *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse weisen nach CLP sowohl im Vergleich zu Wildtyp (*Kit +/+*) als auch zu *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen, denen eine Stunde vor CLP peritoneale Zellsuspensionen (jeweils mit 200 000 PMZ pro Maus) von *Kit +/+* i.p. injiziert wurden, höhere ET-1 Spiegel in der peritonealen Lavageflüssigkeit auf. Die Daten sind zusammengefaßt aus 3 unabhängigen Experimenten (Anzahl der Tiere sind in der jeweiligen Säule angegeben). * = p < 0,05, *** = p < 0,001, im Vergleich zu den *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen.

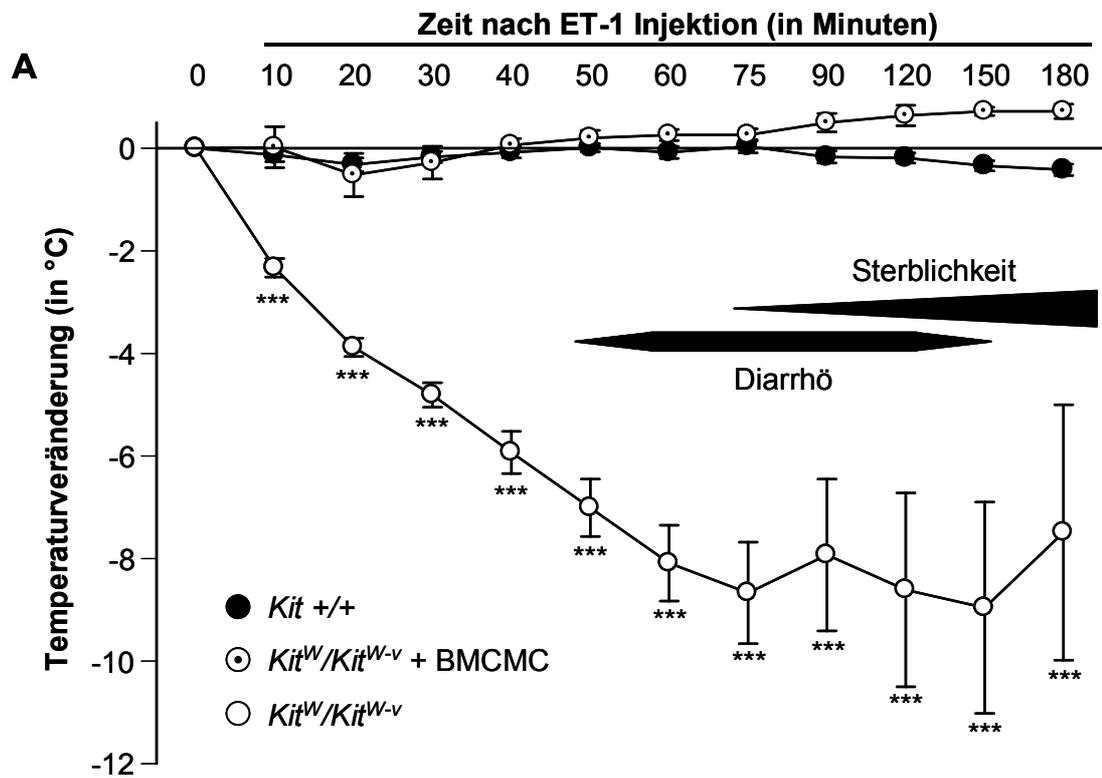
ET-1 Injektionen in die Bauchhöhle führen bei Mastzelldefizienten Kit^W/Kit^{W-v} , aber nicht bei normalen $Kit +/+$ Mäusen zu Hypothermie, Diarrhö und Tod.

Neben ET-1 spielen verschiedene weitere Mediatoren in dem durch CLP verursachten Krankheitsprozeß eine Rolle. Um die Fähigkeit von ET-1, in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Mastzellen *in vivo* Krankheitszeichen zu produzieren, genauer zu erfassen, wurde als nächstes die Reaktion MZ-defizienter Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse sowie normaler ($Kit +/+$) Mäuse auf eine einmalige ET-1 Injektion (1 nmol in 200 µl NaCl, i.p.) untersucht. Während sämtliche Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse einen dramatischen Abfall der Körpertemperatur zeigten, wies keine der $Kit +/+$ Mäusen eine Hypothermie auf (**Diagramm 3**). Darüber hinaus entwickelten 15 von 16 Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen (= 94%), aber keine der $Kit +/+$ Mäuse, durchschnittlich 30-40 min nach der ET-1 Gabe Diarrhö. 11 von 16 (= 69%) der Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen starben innerhalb von 24 Std. nach der ET-1 Injektion, während alle $Kit +/+$ Mäuse die Behandlung überlebten (**Diagramm 3**).

Um zu prüfen, ob die erhöhte Morbidität und Mortalität von Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen nach CLP durch das Fehlen von PMZ in diesen Tiere verursacht ist, wurden Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse selektiv und lokal mit MZ rekonstituiert. Dies ist notwendig, da es theoretisch denkbar ist, dass die erhöhte Morbidität und Mortalität der Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse nach ET-1 Injektion nicht aufgrund ihres Mangels an MZ zustande kommt, sondern eventuell andere, durch die c-kit Mutation entstandene Ursachen hat. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen i.p. ET-1 verabreicht, nachdem ein Teil der Tiere durch die intraperitoneale Gabe von BMCMC hinsichtlich ihrer Defizienz an peritonealen MZ repariert wurde. Diese Rekonstitution der Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse resultierte in einem komplettem Schutz vor der durch ET-1 induzierten Morbidität und

Mortalität. Keine der MZ-rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse entwickelte Diarrhö, Hypothermie oder starb (**Diagramm 3**).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Anwesenheit von MZ dringend erforderlich ist, um vor der durch Endothelin-1 vermittelten Morbidität und Mortalität zu schützen.



B

	Mäuse mit Diarrhö	p-Wert vs. <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i>	überlebende Mäuse	p-Wert vs. <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i>
<i>Kit +/+</i>	0 von 10	< 0,001	10 / 10	< 0,001
<i>Kit^W/Kit^{W-v} + BMCMC</i>	0 von 5	< 0,001	5 / 5	= 0,012
<i>Kit^W/Kit^{W-v}</i>	15 von 16	-	5 / 16	-

Abbildung 3. Durch die Anwesenheit von peritonealen MZ (PMZ) werden Mäuse vor der Morbidität und Mortalität nach i.p. Injektion von ET-1 geschützt.

A Veränderung der Rektaltemperatur im Anschluß an eine i.p. Injektion von ET-1 (1nmol in 200µl Kochsalzlösung) in Wildtyp (*Kit +/+*) Mäuse, MZ-defiziente *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse und *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse die i.p. mit in vitro gewonnenen MZ aus Zellen des Knochenmarks von *Kit +/+* Mäusen rekonstituiert wurden (*Kit^W/Kit^{W-v} + BMCMC*). Die Daten sind zusammengefaßt aus 3 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, verglichen mit den entsprechenden Werten für die *Kit +/+* Mäuse.

B Anzahl der Mäuse die pro Genotyp verwendet wurden und Häufigkeit des Auftretens von Diarrhö und Anzahl der verstorbenen Tiere.

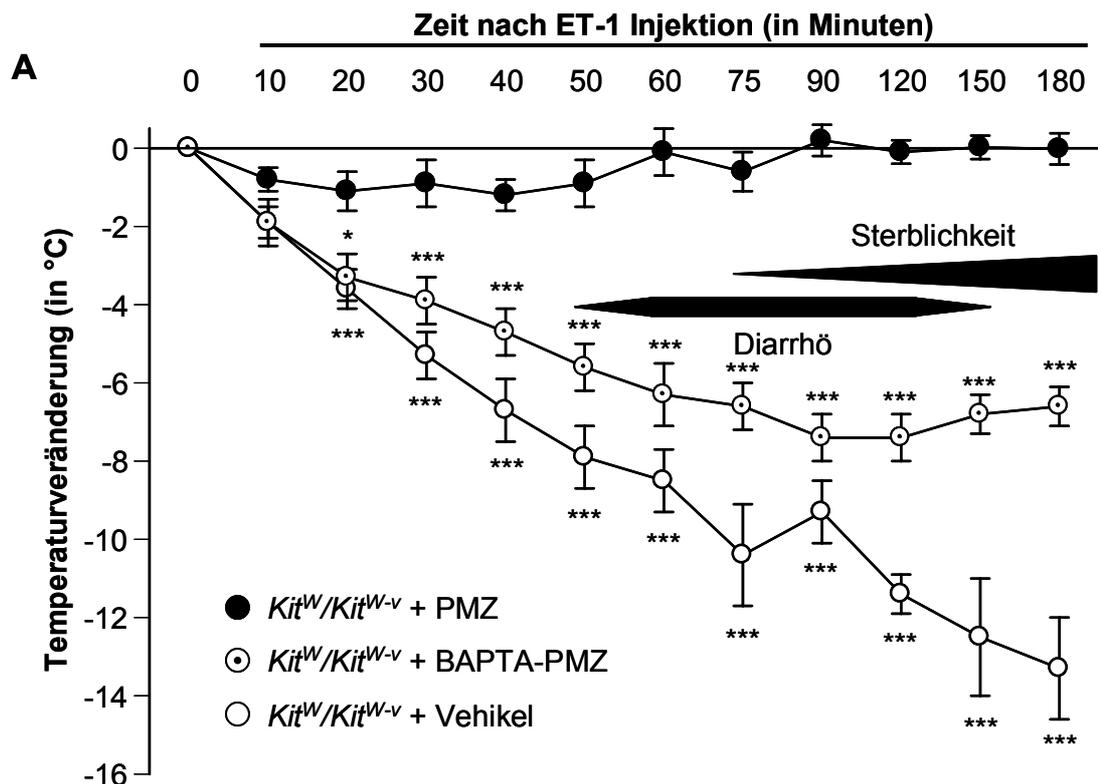
Mastzellen müssen degranulieren können, um vor ET-1 induzierter Morbidität und Mortalität zu schützen.

Um zu klären, wie peritoneale MZ (PMZ) in der Lage sind, die ET-1 induzierte Toxizität zu verringern, wurde als nächstes versucht, *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse vor der durch ET-1 induzierten Morbidität und Mortalität zu schützen. Dazu wurden frisch isolierte PMZ von +/+ Mäusen ersatzweise in die Bauchhöhle von *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen transferiert.

Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse, denen eine peritoneale Zellsuspension mit 2×10^5 MZ pro Maus intraperitoneal injiziert wurde, zeigten praktisch keine Reaktion auf eine anschließende Gabe von ET-1, wohingegen die mit Vehikel behandelten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse wiederum mit den selben Symptomen reagierten wie unbehandelte *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse nach ET-1 Injektion; sie entwickelten Hypothermie (alle Mäuse), Diarrhö (7 von 8 Mäusen, = 88%) und starben (5 von 8 Mäusen, = 63%). Wenn jedoch die peritonealen Zellsuspensionen vor Injektion in die Peritonealhöhle der *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse mit dem Membran permeablen Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM vorbehandelt wurden, war der vorher beobachtete protektive Effekt der ersatzweise transferierten PMZ stark reduziert (**Diagramm 4**). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MZ nicht durch ein „Abfangen“ des freien Endothelins (durch Bindung an Rezeptoren auf der MZ-Oberfläche) zu einer Reduktion der Toxizität beitragen, sondern dass es erforderlich ist, dass MZ aktiviert werden um einen protektiven Effekt zu vermitteln.

Über BAPTA-AM wurde berichtet, dass es die Histaminfreisetzung von PMZ der Maus nach Stimulation mit ET-1 unterbindet (Yamamura *et al*, 1994b). Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden. In einer eigenen Versuchsreihe zeigten mit BAPTA-AM behandelte PMZ nach der Stimulation mit 10^{-6}M ET-1 eine spezifische Serotoninfreisetzung von

0%, Vehikel behandelte Mastzellen jedoch 64% ($p < 0,001$; Daten grafisch nicht dargestellt).



B

	Mäuse mit Diarrhö	p-Wert vs. Kit^W/Kit^{W-v} + PMZ	überlebende Mäuse	p-Wert vs. Kit^W/Kit^{W-v} + PMZ
Kit^W/Kit^{W-v} + PMZ	0 / 7	-	7 / 7	-
Kit^W/Kit^{W-v} + BAPTA-PMZ	6 / 7	< 0,005	5 / 7	n.s.
Kit^W/Kit^{W-v} + Vehikel	7 / 8	= 0,001	3 / 8	= 0,025

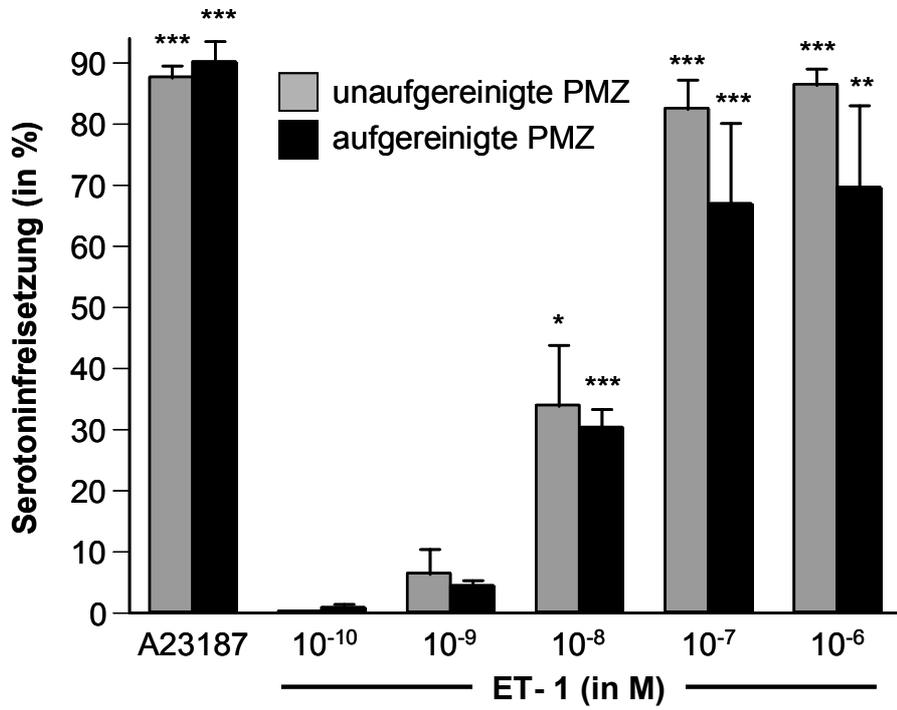
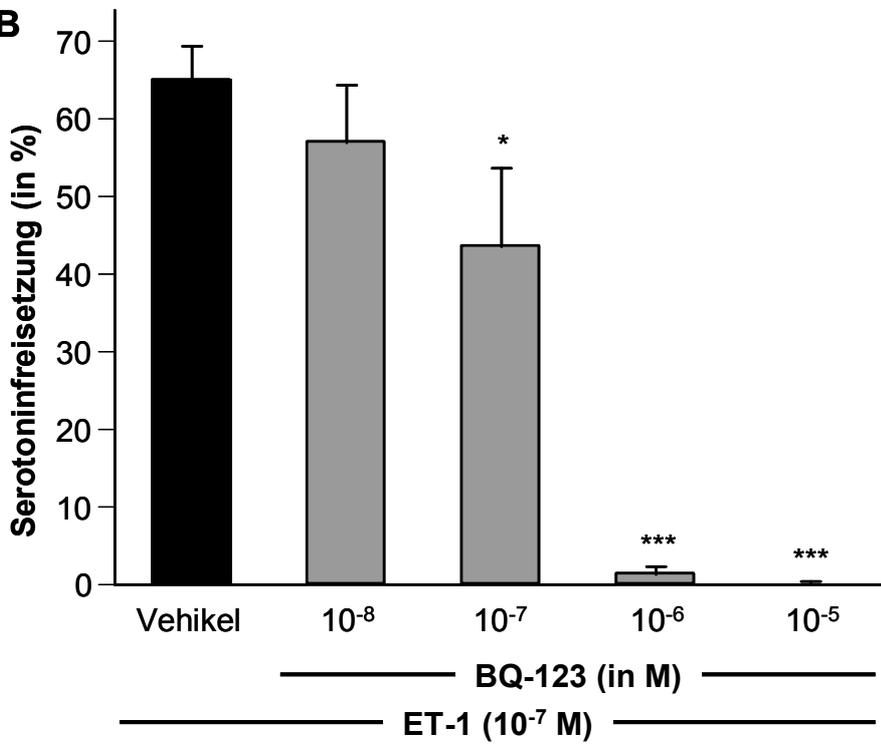
Diagramm 4. Die Aktivierung von PMZ schützt vor Morbidität und Mortalität nach i.p. Injektion von ET-1.

A ET-1 induzierte Veränderung der Rektaltemperatur (1 nmol ET-1 in 200µl Kochsalzlösung i.p.) in drei verschiedenen Gruppen von *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen: Zwei Gruppen wurden peritoneale Zellsuspensionen (mit 200.000 PMZ/Maus) i.p. injiziert, die vorher jeweils entweder mit Vehikel (*Kit^W/Kit^{W-v}* + PMZ) oder mit dem Ca²⁺ Chelator BAPTA-AM (*Kit^W/Kit^{W-v}* + BAPTA-PMZ, 50 µM für 30 Min zur Inhibition der MZ Degranulation) behandelt wurden. Der dritten Gruppe von *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen wurde ausschließlich Vehikel injiziert (*Kit^W/Kit^{W-v}* + Vehikel). Die Daten sind zusammengefaßt aus 3 unabhängigen Experimenten. * = p < 0,05, *** = p < 0,001, verglichen mit den entsprechenden Werten für *Kit^W/Kit^{W-v}* + PMZ Mäuse. + = p < 0,05, +++ = p < 0,001, verglichen mit den entsprechenden Werten für *Kit^W/Kit^{W-v}* + Vehikel Mäuse.

B Anzahl der Mäuse die pro Genotyp verwendet wurden und Häufigkeit des Auftretens von Diarrhö und Anzahl der verstorbenen Tiere.

ET-1 induziert Mastzelldegranulation durch den ET_A Rezeptor.

Die bisher gezeigten Daten weisen daraufhin, dass der schützende Effekt der PMZ bei der durch ET-1 induzierten Toxizität davon abhängig ist, dass die MZ aktiviert und damit ihre Mediatoren freigesetzt werden können. Im Einklang mit dieser Hypothese und als Bestätigung einer bereits publizierten Studie (Yamamura *et al*, 1994b) konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit ET-1 selbst in niedrigen Konzentrationen von 10^{-8} M die Degranulation von unaufgereinigten und hoch aufgereinigten (>90%), aus C57BL/6 Mäusen gewonnenen, PMZ Suspensionen (**Diagramm 5A**) induzierte, erkennbar an den erhöhten Konzentrationen von Serotonin im Überstand der Zellen. Durch den hoch selektiven ET_A Antagonisten BQ-123 konnte die durch 10^{-7} M ET-1 ausgelöste Serotoninfreisetzung aus unaufgereinigten peritonealen MZ um 98% verringert werden (**Diagramm 5B**). Eine Vorbehandlung mit dem nicht selektiven ET_A/ET_B Antagonisten PD142893 zeigte einen fast identischen inhibitorischen Effekt auf die Degranulation (**Diagramm 5D**), wohingegen der hoch selektive ET_B Antagonist BQ-788 die Serotoninfreisetzung in geringerem Ausmaß inhibierte (**Diagramm 5C**).

A**B**

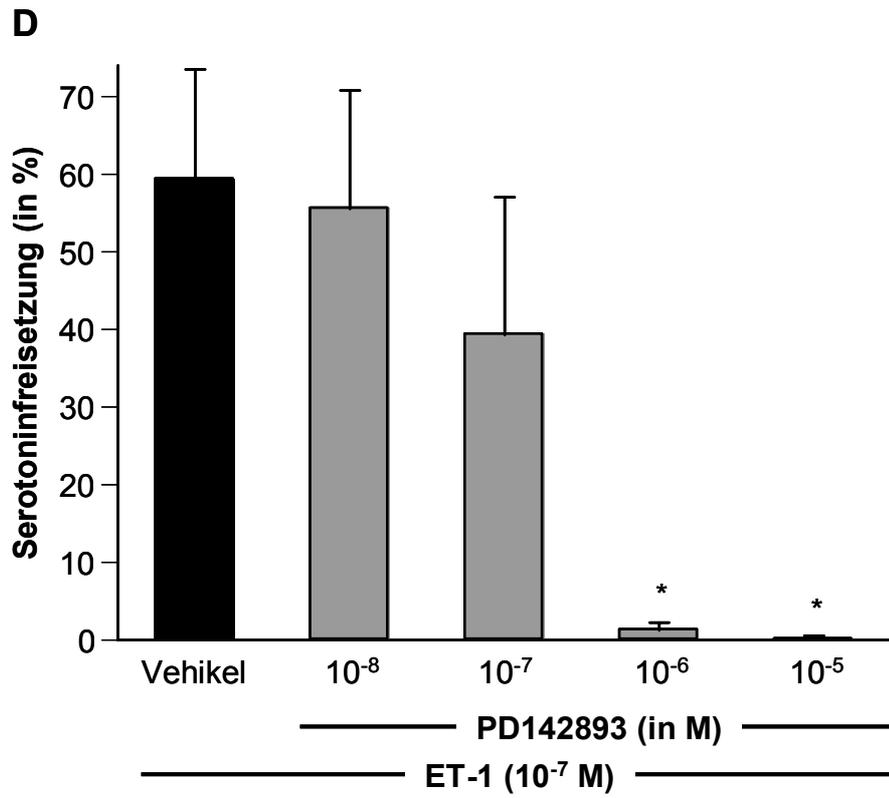
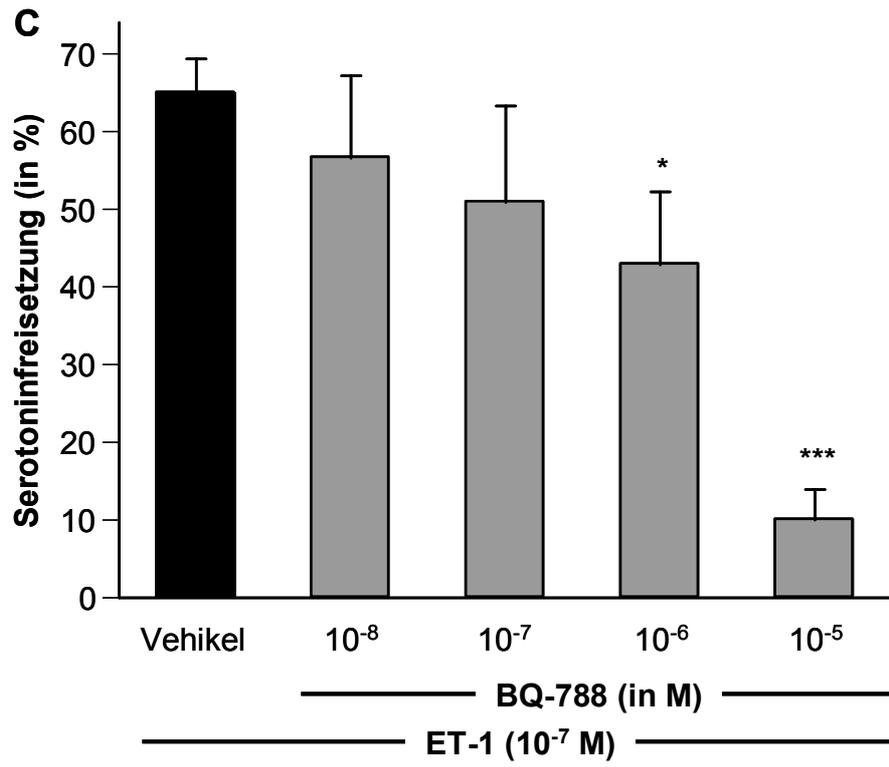


Diagramm 5. ET-1 induziert die Freisetzung von Serotonin aus peritonealen Mastzellen der Maus durch die Aktivierung von Endothelinrezeptoren.

A unaufgereinigte und aufgereinigte PMZ wurden mit den angegebenen Konzentrationen von ET-1 oder mit A23187 (10^{-5} M) stimuliert. Die Ergebnisse sind aus drei voneinander unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Die verwendeten Zellen wurden durch peritoneale Lavage aus C57BL/6 Mäusen gewonnen, für 2 Std. mit ^3H -5-Hydroxytryptamin (^3H -Serotonin) inkubiert und anschließend für 15 Min. mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, im Vergleich mit Vehikel behandelten Zellen.

B-D Die durch ET-1 (10^{-7} M) induzierte Freisetzung von Serotonin wird durch Antagonisierung der Endothelinrezeptoren ET_A (mit BQ-123, in **B**), ET_B (mit BQ-788, in **C**) und durch einen unspezifischen Antagonisten (PD142893, in **D**) unterbunden. *= $p < 0,05$, ***= $p < 0,001$, im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen. Alle Daten in **A-D** sind als spezifische Serotoninfreisetzung angegeben, die Spontanfreisetzung betrug 3-5% in allen Experimenten.

Der ET_A-Rezeptorantagonist BQ-123 verhindert den Mastzell-abhängigen Schutz vor ET-1 vermittelter Toxizität durch Inhibition der MZ Degranulation.

Um festzustellen, ob die Hemmung der Mastzellaktivierung durch ET_A die Anfälligkeit der normalen Mäuse gegenüber der durch ET-1 verursachten Morbidität verändern kann, wurden *Kit* +/+ Mäuse vor einer intraperitonealen Gabe von ET-1 mit dem selektiven ET_A Antagonisten BQ-123 behandelt. Als Ergebnis zeigte sich, dass alle mit BQ-123 vorbehandelten Mäuse nach der ET-1 Injektion eine ausgeprägte Hypothermie entwickelten, die mit Vehikel behandelten Kontrolltiere jedoch nur einen vorübergehenden leichten, statistisch nicht signifikanten, Abfall der Körpertemperatur aufwiesen (**Diagramm 6A**).

Dabei zeigte sich auch bei der morphologischen Analyse der Peritoneallavage eine Stunde nach ET-1 Injektion, dass BQ-123 die durch ET-1 induzierte MZ Degranulation in *Kit* +/+ Mäusen beeinflusste (**Diagramm 7**). In *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen hat BQ-123 nicht zu einer weiteren, durch ET-1 verursachten Abnahme der Körpertemperatur geführt (**Diagramm 6B**). Der Effekt von ET-1 auf *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, deren Mangel an MZ mit BMCMC behoben wurde, nach Vorbehandlung mit Vehikel oder BQ-123 war jedoch praktisch identisch mit dem bei *Kit* +/+ Mäusen beobachteten (**Diagramm 6C**). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fähigkeit des ET_A Antagonisten, die durch i.p. Injektion von ET-1 induzierte Morbidität zu verstärken, zumindest zum Teil seine Ursache in der Beeinflussung der MZ-Aktivierbarkeit hat.

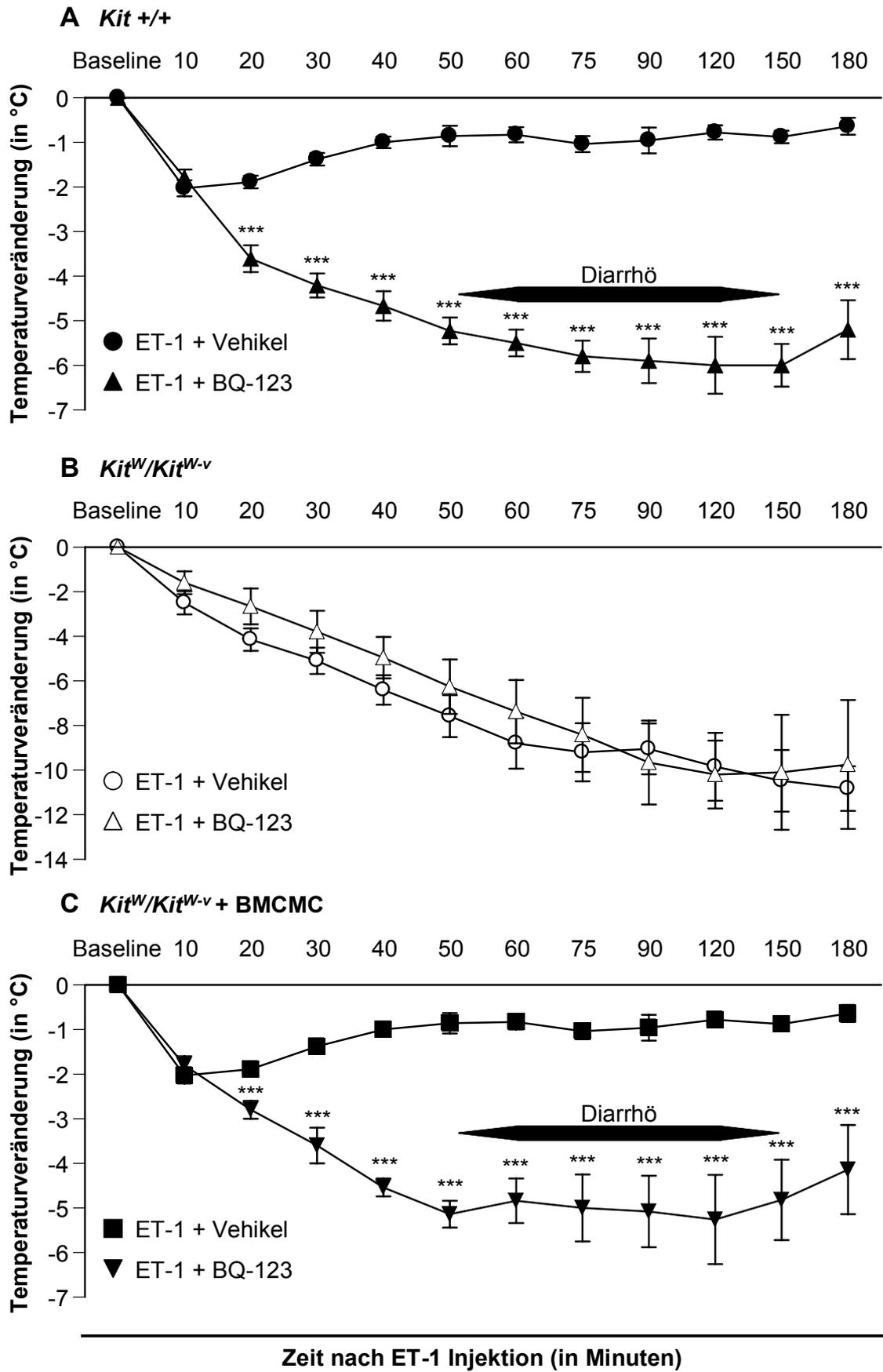


Diagramm 6. Die Fähigkeit der peritonealen Mastzellen, die Toxizität von ET-1 zu verringern, basiert auf der Expression von ET_A.

A-C: Dargestellt ist die Veränderung der Rektaltemperatur von Mäusen, denen ET-1 (1 nmol in 200 µl Kochsalzlösung, i.p.) injiziert wurde, nachdem sie eine einmalige i.p. Injektion des ET_A-Antagonisten BQ-123 (100 nmol in 200 µl Kochsalzlösung) erhalten hatten. **= p < 0,005, ***= p < 0,001, verglichen mit den entsprechenden Werten für Vehikel-behandelte Mäuse.

A *Kit* +/+ Mäuse. Diarrhö wurde nur bei BQ-123 vorbehandelten (n=15), nicht jedoch bei Vehikel behandelten (n=12) Mäusen beobachtet. Die Daten sind zusammengefaßt aus 5 unabhängigen Experimenten.

B MZ-defiziente *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse. Keine der Vehikel (n=7) und keine der BQ-123 (n=5) behandelten Mäuse entwickelte Diarrhö. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten.

C MZ-rekonstituierte *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse (*Kit^W/Kit^{W-v}* + BMCMC). Nur mit BQ-123 (n=7), nicht jedoch mit Vehikel vorbehandelte (n=7) Mäuse entwickelten Diarrhö. Die Daten stammen aus 2 unabhängigen Experimenten.

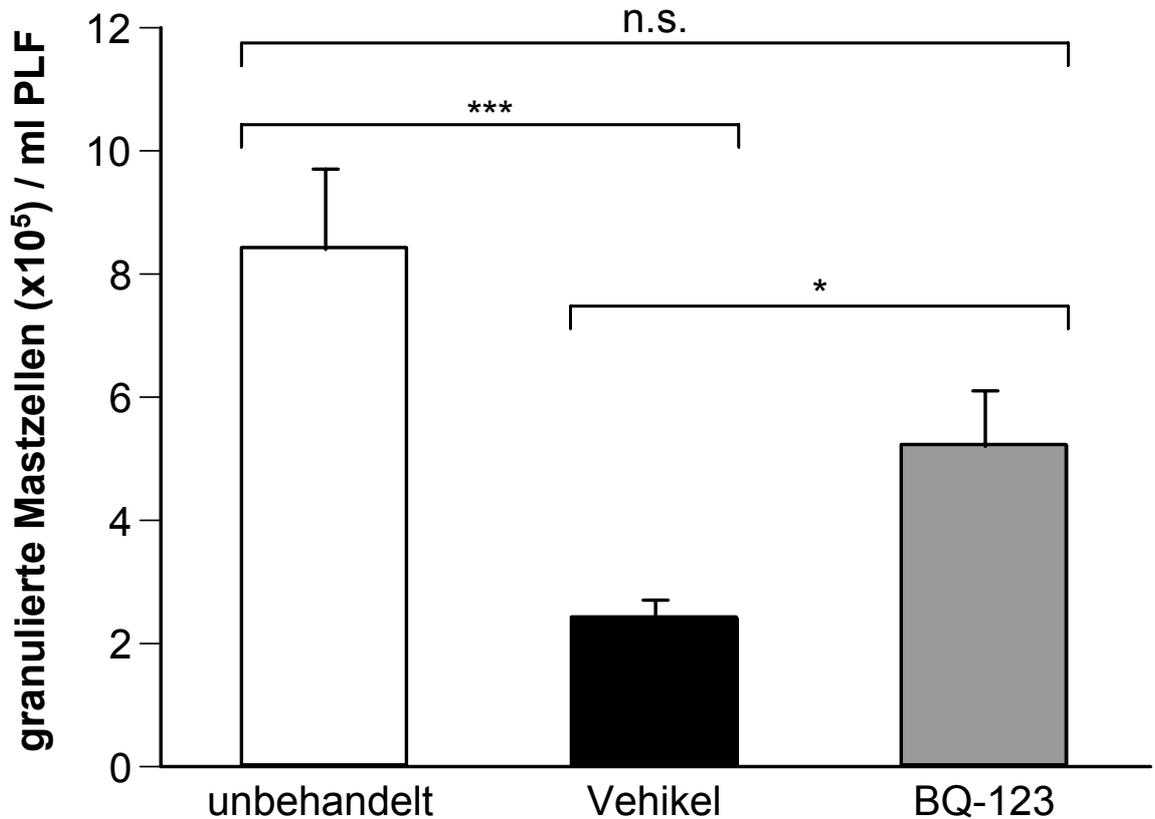


Diagramm 7. Morphologischer Nachweis in der Peritoneallavage eine Stunde nach ET-1 Injektion, dass die durch ET-1 induzierte MZ Degranulation in *Kit* +/- Mäusen durch BQ-123 beeinflusst wird. Mastzellen wurden in mit May-Grünwald-Giemsa gefärbten Cytospins aus der Lavage von unbehandelten Mäusen (n=8, aus 5 Experimenten), sowie von ET-1 behandelten (1 nmol) mit vorheriger Injektion von Vehikel oder BQ-123 (100nmol) (n=4 pro Gruppe, aus 2 Experimenten) gezählt. *= p< 0,05, ***= p< 0,001.

Mastzellen können zu einer schnelleren Elimination von ET-1 aus der Bauchhöhle beitragen.

Da aktivierte peritoneale MZ eine Vielzahl von potenten vasoaktiven Mediatoren freisetzen, die die Durchlässigkeit von Gefäßen in der Bauchhöhle erhöhen können, stellte sich die Frage, ob die durch ET-1 induzierte Degranulation der MZ die Neutralisierung von intraperitonealem ET-1 beeinflusst könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde in die Bauchhöhle von *Kit* +/+, *Kit^W/Kit^{W-v}* sowie rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen ¹²⁵I-ET-1 injiziert, und anschließend die Konzentrationen des radioaktiv markierten ET-1 in der Bauchhöhle, dem Blut und verschiedenen Organen gemessen. Im Vergleich zu *Kit* +/+, bzw. rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen wiesen die *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse 30 min. nach der ET-1 Gabe eine um das 6,5-fache, bzw. 8,4-fache höhere Konzentration an ET-1 in der Peritonealhöhle auf, während die Konzentrationen im Plasma und im Gewebe extraperitonealer Organe (Gehirn, Augen, Herz, Lunge und Nieren) in *Kit* +/+, sowie in rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen signifikant höher waren, als bei den *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen (**Diagramm 8**). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Aktivierung von MZ durch ET-1 zu einer erhöhten Clearance des ET-1 aus der Bauchhöhle beiträgt und damit zu einer Reduktion der Toxizität führt.

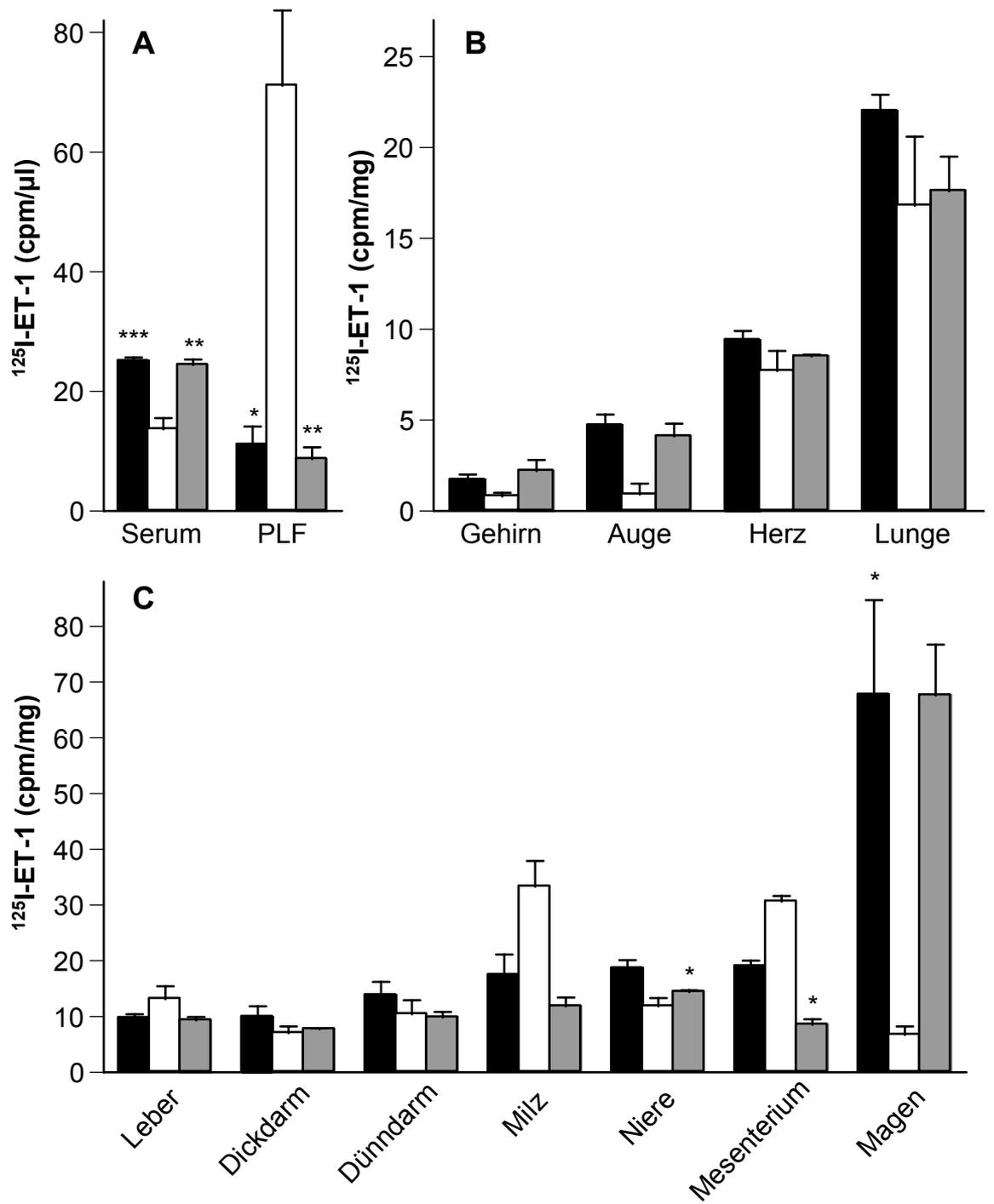


Diagramm 8. Die Clearance von ET-1 aus der Bauchhöhle von Mäusen ist MZ-abhängig.

A-C Durch I^{125} -ET-1 verursachte cpm in **(A)** Plasma und peritonealer Lavageflüssigkeit (PLF), **(B)** extraperitonealen Organen und **(C)** intraperitonealen Organen von *Kit* +/+ Mäusen, MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* sowie MZ-rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* + BMC MC Mäusen 30 Min. nach der i.p. Injektion von I^{125} -ET-1 (0,2 pmol, zusammen mit 1nmol nicht markiertes ET-1 in 400 μ l Kochsalzlösung). Die Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefaßt (n= 3-4 pro Gruppe). *= p< 0,05, **= p< 0,005, ***= p< 0,001, verglichen mit den entsprechenden Werten für *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse.

DISKUSSION

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre weisen darauf hin, dass ET-1 in der Pathogenese der septischen Peritonitis eine wichtige Rolle spielt (Lundblad und Giercksky, 1995b; Oldner *et al*, 1998; Avontuur *et al*, 1999; Wanecek *et al*, 1999b). Welche Faktoren die Toxizität und Verteilung dieses endogenen Sepsismediators ausmachen, ist bisher nur unzureichend geklärt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass C57BL/6 Mäuse durch eine Vorbehandlung mit BQ-788, einem selektiven ET_B Antagonisten, und in geringerem Maße auch mit dem selektiven ET_A Antagonisten BQ-123 eine signifikant höhere Überlebensrate nach CLP aufweisen (Diagramm 1). Gleichzeitig kann gezeigt werden, dass die Konzentrationen von intraperitonealem ET-1 im Rahmen der durch CLP ausgelösten akuten septischen Peritonitis bei Mäusen stark erhöht sind (Diagramm 2). Diese Erkenntnisse sind im Einklang mit Ergebnissen aus Studien an Ratten, die beschreiben, dass eine CLP induzierte septische Peritonitis mit einer deutlichen Erhöhung der ET-1 Werte in der Bauchhöhle einhergeht (Lundblad und Giercksky, 1995b) und dass eine Behandlung mit ET-1 Rezeptorantagonisten die mit einer CLP assoziierten hämodynamischen Störungen bei diesen Tieren verbessern kann (Szalay *et al*, 1998).

Aus verschiedenen Gründen konnte man annehmen, dass MZ die durch ET-1 verursachte Pathologie mit unterstützen: 1.) aktivierte MZ setzen früh große Mengen an TNF α frei (Gordon und Galli, 1990), einem Zytokin, das sehr potent die Bildung von ET-1 induzieren kann (Klemm *et al*, 1995); 2.) ET-1 kann MZ aktivieren und damit eine Freisetzung von Mediatoren bewirken (Yamamura *et al*, 1994b) und 3.) sind MZ selber ein Ursprungsort von ET-1 (Ehrenreich *et al*, 1992). Hier jedoch kann gezeigt werden, dass *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, die einen Mangel an MZ aufweisen und auch deutlich anfälliger sind für die potentiell

letalen Effekte der CLP (Echtenacher *et al*, 1996), nach CLP im Vergleich zu normalen *Kit*^{+/+} Mäusen einen stärkeren Anstieg der peritonealen ET-1 Konzentrationen aufweisen. Da *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse, die mit peritonealen Zellsuspensionen aus *Kit*^{+/+} Mäusen (mit jeweils ca. 200.000 MZ pro Maus) rekonstituiert wurden, im Vergleich zu *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen ohne MZ signifikant niedrigere ET-1 Werte in der peritonealen Lavageflüssigkeit aufwiesen, können die erhöhten Werte bei den *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen, zumindest zum Teil, deren MZ-Defizienz zugeschrieben werden. Diese Resultate führten zu der Vermutung, dass die Reduktion der Konzentration an ET-1 in der Bauchhöhle einen möglichen Mechanismus des MZ-vermittelten Schutzes vor Mortalität nach CLP darstellt.

Um zu ermitteln, ob die Toxizität von ET-1 in der Abwesenheit von MZ erhöht ist, wurden sowohl MZ-defiziente *Kit*^W/*Kit*^{W-v}, als auch kongenitale normale *Kit*^{+/+} Mäuse intraperitoneal mit ET-1 injiziert. Praktisch alle *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse entwickelten eine Hypothermie und Diarrhö (Symptome, die man typischer Weise nach einer CLP beobachten kann), und 11 von 16 Mäuse starben innerhalb von 24 Std. nach Applikation des ET-1, wohingegen keine einzige der *Kit*^{+/+} Mäuse Krankheitszeichen aufwies (Diagramm 3). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MZ eine zentrale Rolle im Schutz vor ET-1 vermittelter Toxizität spielen.

Kit^W/*Kit*^{W-v} Mäuse weisen neben ihrer Defizienz an MZ weitere Abweichungen gegenüber normalen *Kit*^{+/+} Mäusen auf. Sie sind leicht anämisch, ihnen fehlen Melanozyten und sie sind unfruchtbar (Galli und Kitamura, 1987). Obwohl die bisherigen Ergebnisse bereits darauf hinweisen, dass die Anwesenheit von MZ dringlich erforderlich ist, um erhöhte Konzentrationen von intraperitonealem ET-1 bei einer bakteriellen Peritonitis zu überleben, ist es theoretisch möglich, dass in den *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen andere, durch die *Kit* Mutation entstandene Defekte als der Mangel an MZ für diese Resultate verantwortlich sind.

Daher erhielten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, deren MZ-Defizienz 6 Monate vor den Experimenten durch die Gabe von unreifen MZ, die aus dem Knochenmark von *Kit +/+* Mäusen gewonnen und *in vitro* kultiviert wurden (bone marrow derived cultured mast cells, BMCMC), behoben wurde, eine i.p. Injektion von ET-1. Diese lokale und selektive Rekonstitution mit BMCMC führte zu einem vollkommenen Schutz der *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse vor der durch ET-1 vermittelten Morbidität und Mortalität (Diagramm 3). Dies zeigt, dass der Widerstand der *Kit+/+* Mäuse gegen die durch ET-1 vermittelte Toxizität größtenteils, wenn nicht sogar vollständig, MZ abhängig ist.

Um in Erfahrung zu bringen, durch welchen Mechanismus MZ die durch ET-1 induzierte Toxizität verringern können, wurde eine Substanz gesucht, die die Degranulation von MZ möglichst komplett inhibiert, ohne jedoch Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche zu besetzen. Diese Kriterien werden von BAPTA-AM, einem Membran permeablen Ca^{2+} -Chelator, erfüllt. Peritoneale Zellsuspensionen, die vor einer Stimulation mit 10^{-6}M ET-1 mit BAPTA-AM vorbehandelt wurden, zeigten keine spezifische Serotoninfreisetzung im Gegensatz zu ET-1 stimulierten, Vehikel behandelten Kontrollzellen, die eine spezifische Serotoninfreisetzung von 64% aufwiesen ($p < 0,001$), diese Daten bestätigen vorausgehende Arbeiten von Yamamura *et al* (Yamamura *et al*, 1994b). Da diese Vorbehandlung mit BAPTA-AM jedoch nur *ex vivo* erfolgen kann erfordert dies eine anschließende lokale Rekonstitution mit frisch isolierten peritonealen MZ (PMZ). Daher wurde zuerst versucht *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse vor der ET-1-assoziierten Morbidität und Mortalität zu schützen, indem sie mit frisch aus *Kit+/+* Mäusen gewonnenen PMZ rekonstituiert wurden. Nachdem die *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse mit peritonealen Zellsuspensionen (die ca. 200.000 MZ pro Maus beinhalten) i.p. rekonstituiert wurden, zeigten sie, wie zu erwarten, praktisch keine Reaktion auf eine darauffolgende i.p. Gabe von ET-1. Die nur mit Vehikel behandelten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse wiesen im Gegensatz

dazu wiederum Hypothermie und Diarrhö auf, und mehr als die Hälfte der Tiere starben. MZ-defiziente Mäuse können also auch durch den Transfer von frisch isolierten PMZ vor ET-1-assoziierten Morbidität und Mortalität schützen. Wurden jedoch die peritonealen Zellsuspensionen, bevor sie in die Bauchhöhle injiziert wurden, mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM behandelt, und damit die ET-1-induzierte Degranulation der MZ verhindert, war die schützende Funktion der MZ nach ET-1 Injektion deutlich herabgesetzt (Diagramm 4).

Die Ergebnisse dieser Versuche weisen darauf hin, dass MZ vor den schädlichen Auswirkungen von ET-1 schützen können, indem sie aktiviert werden und dadurch ihre Mediatoren freisetzen.

Folgende Beobachtungen unterstützen diese Hypothese: 1) Die Stimulation peritonealer MZ durch ET-1 führt zu einer Degranulation (Yamamura *et al*, 1994b). 2) Dieser Effekt kann durch BQ-123, einem selektiven ET_A Antagonisten, supprimiert werden (Yamamura *et al*, 1994b). 3) Wir konnten zeigen, dass unaufgereinigte und aufgereinigte PMZ der Maus nach Stimulation mit ET-1-Konzentrationen von bis zu 10^{-8} M degranulieren und Serotonin freisetzen. Dieser Effekt konnte durch BQ-123 praktisch vollkommen blockiert werden. Zusätzlich konnte in derselben Konzentration allerdings auch durch den selektiven ET_B Antagonisten BQ-788 eine, wenn auch geringere, Inhibition der Degranulation und Serotoninfreisetzung beobachtet werden, während der gemischte ET_A/ET_B Antagonist PD142893 genauso wie BQ-123 eine komplette Inhibition bewirkte (Diagramm 5). ET-1 stellt also einen hochpotenten MZ-Aktivator dar, der seine Wirkung über spezifische Rezeptoren auf MZ vermittelt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob bei normalen Mäusen *in vivo* durch eine ET_A Blockade, und der daraus resultierenden Hemmung der Aktivierung der PMZ, die Anfälligkeit für ET-1 verursachte Morbidität verändert werden kann. Dazu wurden *Kit+/+* Mäuse vor einer i.p. Injektion von ET-1 mit BQ-123

vorbehandelt. Alle so behandelten Mäuse entwickelten eine ausgeprägte Hypothermie, ebenso wie eine identisch behandelte Gruppe von *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen, die mit BMCMC rekonstituiert wurden (Diagramm 6). Durch die Gabe des ET_A Antagonisten steigt also die durch ET-1 Injektion induzierte Morbidität und diese Auswirkung des Antagonisten wird, zumindest teilweise, durch seinen Effekt auf MZ vermittelt.

Erst in den letzten Jahren stellte sich heraus, dass MZ eine wichtige Rolle in der natürlichen Immunität spielen. Durch welche Mechanismen MZ im Rahmen der angeborenen Immunität zur Immunabwehr beitragen, ist bisher noch weitestgehend unbekannt. Erste Hinweise auf mögliche Mechanismen sind jedoch bereits beschrieben: Prodeus *et al* zeigten, dass die beeinträchtigte Aktivierung von MZ bei Mäusen, denen das Komplement C3 fehlt, im Gegensatz zu +/+ Mäusen, die eine normale Aktivierung der PMZ nach CLP aufweisen, mit reduzierten Konzentrationen an TNF α , einer geringeren Invasion von neutrophilen Granulozyten und der Zunahme der Sterblichkeitsrate nach CLP korreliert (Prodeus *et al*, 1997).

Ebenso wurde bei Mac-1-defizienten Mäusen, deren Anzahl an PMZ deutlich reduziert ist, ein signifikanter Anstieg der Sterblichkeitsrate nach CLP beschrieben, der mit einer deutlich höheren Bakterienlast einher ging (Rosenkranz *et al*, 1998). Malaviya *et al* beschrieben bei MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen eine verringerte Elimination von i.p. applizierten Bakterien bei einer geringeren Invasion von neutrophilen Granulozyten in Folge der fehlenden TNF α Freisetzung aus MZ (Malaviya *et al*, 1996). Kürzlich konnte die gleiche Gruppe an Mäusen nachweisen, dass auch aus MZ stammende Leukotriene zur Immunabwehr im Rahmen einer septischen Peritonitis beitragen, indem sie zu einer schnellen Invasion von neutrophilen Granulozyten führen und damit zu der Elimination der Bakterien im Entzündungsgebiet beitragen (Malaviya und Abraham, 2000).

Die günstigen Effekte der MZ Aktivierung bei einer septischen Peritonitis

könnten jedoch ebenso die Elimination von lokal produzierten und freigesetzten septischen Mediatoren wie z.B. ET-1 beinhalten ("Elimination durch Inflammation"). Um festzustellen ob PMZ in der Lage sind, zu einer Reduktion von hohen Konzentrationen an ET-1 in der Bauchhöhle beizutragen, wurde ET-1 gemeinsam mit iodiniertem ET-1 als Tracer in die Bauchhöhle von *Kit^W/Kit^{W-v}*, mit BMCMC rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* und *Kit+/+* Mäusen injiziert und die Konzentration an radioaktiv markiertem ET-1 in der Peritoneallavage, dem Plasma sowie in intra- und extraperitonealen Organen bestimmt. Bei der anschließenden Messung der Radioaktivität 30 Min. nach Injektion des ET-1 zeigte sich, dass in der peritonealen Lavageflüssigkeit der MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse noch immer sehr hohe Konzentrationen von ET-1 vorhanden waren, wohingegen bei den *Kit+/+* Mäusen und den mit BMCMC rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen sich das in die Bauchhöhle injizierte ET-1 im ganzen Körper verteilte (Diagramm 8). Die Anwesenheit von MZ führt also dazu, dass die lokal sehr hohen Konzentrationen an ET-1 deutlich reduziert werden, indem es zu Organen transportiert wird, in denen ET-1 inaktiviert und entsorgt wird.

In früheren Studien wurde bereits darauf hingewiesen, dass PMZ durch die Vermittlung einer TNF α abhängigen Entzündungsreaktion zu einer verbesserten Überlebensrate nach CLP beitragen können (Echtenacher *et al*, 1996; Malaviya *et al*, 1996) und dass in diesem Rahmen eine Aktivierung des Komplements notwendig ist, um einen normalen Grad der PMZ Degranulation und TNF α Produktion und Freisetzung zu erreichen (Prodeus *et al*, 1997). In späteren Studien an TNF α -Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit SCF, einem MZ-Wachstumsfaktor, auch eine verbesserte Überlebensrate erreicht wird. Dies weist darauf hin, dass Mastzellen durch weitere, von TNF α weitgehend unabhängige Mechanismen zu einer verbesserten

Überlebensrate beitragen können (Maurer *et al*, 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass ein Mechanismus, durch den die MZ zum Schutz bei CLP beitragen, die Regulierung der lokalen ET-1 Konzentrationen darstellt. Es wird gezeigt, dass erhöhte ET-1 Konzentrationen bei Mäusen zu der Sterblichkeit bei septischer Peritonitis beitragen können und dass die Aktivierung von MZ im Bauchraum ET-1 von der Stelle der Entzündung eliminiert und dadurch die durch ET-1 induzierte Morbidität und Mortalität reduziert.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse weisen auf einen möglichen neuen Mechanismus hin, durch den MZ die Immunabwehr unterstützen können: Durch die Regulation lokaler Konzentrationen toxischer, endogener Mediatoren. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der Vorgänge bei der septischen Peritonitis und liefern neue Theorien über die protektive Rolle von MZ in der Regulierung endogener toxischer Mediatoren. Die hier vorgebrachten Nachweise über die Beteiligung von ET-1 im Rahmen der bakteriellen Peritonitis und der möglichen Beeinflussung der potentiell letalen Effekte durch MZ, regen neue therapeutische Konzepte der septischen Peritonitis an. Zum einen bestätigen sie die Notwendigkeit einer intensiven Prüfung therapeutisch nutzbarer ET-Rezeptorantagonisten in der Behandlung von Sepsis, zum anderen lassen sie über neue therapeutische Verfahren spekulieren, bei denen die Beeinflussung der MZ im Vordergrund steht. Inwieweit man die Schutzfunktion der MZ in diesem Zusammenhang beim Menschen therapeutisch nutzen kann, bedarf ebenso weiterer Untersuchungen, wie die Frage ob und inwieweit MZ in der Lage sind, die pathologischen Auswirkungen anderer endogener Mediatoren zu beeinflussen und falls ja, wie sie genau zur erhöhten Clearance dieser potentiell toxischen Substanzen beitragen.

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass Endothelin-1 (ET-1) eine wichtige Rolle im Rahmen bakterieller Sepsis spielt. Gleichzeitig gibt es immer mehr Hinweise, dass Mastzellen (MZ) - neben ihrer weit bekannten Funktion als Vermittler allergischer Reaktionen - zur Aufrechterhaltung der natürlichen Immunität gegen Bakterien beitragen. In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal anhand eines etablierten Mausmodells der septischen Peritonitis (durch Ligatur und Punktion des Caecums, CLP) der Frage nachgegangen, welche Rolle peritonealen MZ in der Regulation der durch ET-1-induzierten Morbidität und Mortalität zukommt.

Im experimentellen Teil der Arbeit wird zunächst der Nachweis erbracht, dass ET-1 zur Mortalität nach CLP beiträgt. Durch Versuche an MZ-defizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen wird weiterhin gezeigt, dass MZ, zumindest zum Teil, vor der ET-1 induzierten Morbidität und Mortalität schützen. Diese Funktion erfüllen die MZ durch eine verstärkte Elimination von ET-1 aus der Bauchhöhle und einer damit einhergehenden Reduktion der lokalen toxischen ET-1 Konzentrationen.

In dieser Arbeit wird erstmals ein möglicher neuer Mechanismus aufgezeigt, durch den MZ zur Immunabwehr beitragen können: Durch die Regulation lokaler Konzentrationen eines toxischen, endogenen Mediators. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Beteiligung von ET-1 bei septischer Peritonitis und weisen erstmals darauf hin, dass MZ in der Regulation der ET-1 vermittelten Morbidität und Mortalität eine protektive Rolle spielen.

LITERATURVERZEICHNIS

Ahn GY, Butt KI, Jindo T, Yaguchi H, Tsuboi R, Ogawa H: The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alpha. *J Dermatol* 25: 78-84, 1998

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S: Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348: 730-732, 1990

Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM: Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp. Dermatol.* 8: 1-16, 1999

Avontuur JA, Boomsma F, van den Meiracker AH, de Jong FH, Bruining HA: Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Circulation* 99: 271-275, 1999

Bach MK, Brashler JR, White GJ, Galli SJ: Experiments on the mode of action of piroprost (U-60,257), an inhibitor of leukotriene formation in cloned mouse mast cells and in rat basophil leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 36: 1461-1466, 1987

Baley PA, Resink TJ, Eppenberger U, Hahn AW: Endothelin messenger RNA and receptors are differently expressed in cultured human breast epithelial and stromal cells. *J. Clin. Invest.* 85: 1320-1323, 1990

Bax WA and Saxena PR: The current endothelin receptor classification: time for reconsideration? *TIPS* 15: 379-386, 1994

Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 79: 1277-1285, 1994

Benigni A, Perico N, Remuzzi G: Endothelin antagonists and renal protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: S75-78, 2000

Benigni A and Remuzzi G: Endothelin antagonists. *Lancet* 353: 133-138, 1999

Bischoff SC, Mayer JH, Manns MP: Allergy and the gut. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 121: 270-283, 2000

Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ: Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J. Exp. Med.* 188: 1135-1145, 1998

Bonifati C, Mussi A, Carducci M, Pittarello A, D'Auria L, Venuti A, Bagnato A, Salani D, Fazio M, Ameglio F: Endothelin-1 levels are increased in sera and lesional skin extracts of psoriatic patients and correlate with disease severity. *Acta Derm Venereol* 78: 22-26, 1998

Boros M, Szalay L, Kaszaki J: Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation and tissue injury via ETA receptors. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 1: 31S-34S, 2002

Botchkarev VA, Eichmuller S, Peters EM, Pietsch P, Johansson O, Maurer M, Paus R: A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle--dependent changes in mast cell--nerve fiber contacts in murine skin. *Arch Dermatol Res* 289: 292-302, 1997

Bradding P and Holgate ST: Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 31: 119-133, 1999

Burke SE, Lubbers NL, Gagne GD, Wessale JL, Dayton BD, Wegner CD, Opgenorth TJ: Selective antagonism of the ET(A) receptor reduces neointimal hyperplasia after balloon-induced vascular injury in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 33-41, 1997

Casasco A, Calligaro A, Casasco M, Springall DR, Tenti P, Marchetti P, Poggi P, Polak JM: Immunohistochemical localization of endothelin-like immunoreactivity in human tooth germe and mature dental pulp. *Anat. Embrol.* 183: 515-520, 1991

Casey ML, Word RA, MacDonald PC: Endothelin-1 expression and regulation of endothelin mRNA and protein biosynthesis in avascular human amnion. Potential source of amniotic fluid endothelin. *J. Biol. Chem.* 266: 5762-5768, 1991

Chow M, Dumont AS, Kassell NF: Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery* 51: 1333-1341, 2002

Church MK and Levi-Schaffer F: Updates on cells and cytokines: The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99: 155-160, 1997

Cindik ED, Maurer M, Hannan MK, Muller R, Hayes WC, Hovy L, Kurth AA: Phenotypical characterization of c-kit receptor deficient mouse femora using non-destructive high-resolution imaging techniques and biomechanical testing. *Technol Health Care* 8: 267-275, 2000

Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA, Williams SC, Yanagisawa H, Kuwaki T, Kumada M, Hammer RE, Yanagisawa M: Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125: 813-824, 1998

Davenport AP and Battistini B: Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 1: 1S-3S, 2002

Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ: Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 438: 485-491, 2001

Dvorak A: Ultrastructural analysis of anaphylactic and piecemeal degranulation of human mast cells and basophils. In: (eds.) J. C. Foreman: *Immunopharmacology of mast cells and basophils.* , San Diego, 1993

Eberle J, Fecker LF, Orfanos CE, Geilen CC: Endothelin-1 decreases basic apoptotic rates in human melanoma cell lines. *J Invest Dermatol* 119: 549-555, 2002

Echtenacher B, Männel DN, Hültner L: Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381: 75-77, 1996

Egger D, Geuenich S, Denzlinger C, Schmitt E, Mailhammer R, Ehrenreich H, Dormer P, Hultner L: IL-4 renders mast cells functionally responsive to endothelin-1. *J Immunol* 154: 1830-1837, 1995

Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Akiba T, Sakamoto A, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F: Endothelin receptors in human parathyroid gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1448-1455, 1992

Ehrenreich H, Andersson RW, Fox CH, Rieckman P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS: Endothelins, peptides with potent vasoactive properties are produced by macrophages. *J. Exp. Med.* 172: 1741-1748, 1990

Ehrenreich H, Burd PR, Rottem M, Hultner L, Hylton JB, Garfield M, Coligan JE, Metcalfe DD, Fauci AS: Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol.* 4: 147-156, 1992

Ehrlich P: Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch. mikr. Anat.* 13: 263-277, 1877

Ehrlich P: Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leucocyten. *Arch. Anat. Physiol.* 3: 166-169, 1879

Emoto N and Yanagisawa M: Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* 270: 15262-15268, 1995

Enerbäck L: Mast cells in the rat gastrointestinal mucosa. I. Effect of fixation. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66: 289-302, 1966a

Enerbäck L: Mast cells in the rat gastrointestinal mucosa. II. Dye binding and metachromatic properties. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 66: 302-312, 1966b

Enerbäck L and Svensson I: Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of percoll. *J. Immunol. Meth.* 39: 135-145, 1980

Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM: Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2: 90-101, 2001

Furchgott RF and Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980

Furuta GT, Schmidt-Choudhury A, Wang M-Y, Wang Z-S, Lu L, Furlano RI, Wershil BK: Mast cell-dependant tumor necrosis factor α production participates in allergic gastric inflammation in mice. *Gastroenterology* 113: 1560-1569, 1997

Galli SJ: New insights into "the riddle of the mast cells": Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Invest.* 62: 5-33, 1990

Galli SJ: New concepts about the mast cell. *New Engl. J. Med.* 328: 257-265, 1993

Galli SJ: Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7: 32-39, 2000

Galli SJ and Hammel I: Mast cell and basophil development. *Curr Opin Hematol* 1: 33-39, 1994

Galli SJ and Kitamura Y: Genetically mast-cell-deficient W/W^v and Sl/Sl^d mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *Am J Pathol* 127: 191-198, 1987

Galli SJ and Wershil BK: The two faces of the mast cell. *Nature* 381: 21-22, 1996

Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN: The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.* 55: 1-96, 1994

Giaid A, Gibson SJ, Herrero MT, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, Masaki T, Ibrahim NB, Roberts GW, Rossi ML, et al.: Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain. *Histochemistry* 95: 303-314, 1991

Gilbert RE, Rumble JR, Cao Z, Cox AJ, van Eeden P, Allen TJ, Kelly DJ, Cooper ME: Endothelin receptor antagonism ameliorates mast cell infiltration, vascular hypertrophy, and epidermal growth factor expression in experimental diabetes. *Circ. Res.* 86: 158-165, 2000

Gordon JR and Galli SJ: Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346: 274-276, 1990

Grabbe J, Haas N, Czarnetzki BM: Die Mastzelle. *Hautarzt* 45: 55-64, 1994

Gray GA, Battistini B, Webb DJ: Endothelins are potent vasoconstrictors, and much more besides. *TIPS* 21: 38-40, 2000

Hara M, Yaar M, Gilchrist BA: Endothelin-1 of keratinocyte origin is a mediator of melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 105: 744-748, 1995

Hardy WB and Westbrook FF: The wandering cells of the alimentary canal. *J. Physiol.* 18: 490-524, 1895

Henderson WR, Chi EY, Jong EC, Klebanoff SJ: Mast cell-mediated tumor-cell cytotoxicity. Role of the peroxidase system. *J Exp Med* 153: 520-533, 1981

Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF: Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 248: C550-C556, 1985

Hirata Y, Mitaka C, Emori T, Amaha K, Marumo F: Plasma endothelins in sepsis syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* 270: 2182, 1993

Hofer B, Thöne-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer H-H, Schleuning W-D, Theuring F: Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J. Clin. Invest.* 99: 1380-1389, 1997

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M: Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 79: 1267-1276, 1994

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2863-2867, 1989

Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase K, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, Nishikibe M, Yano M: Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4892-4896, 1994

Ishizaka T and Ishizaka K: Activation of mast cell mediator release through IgE receptors. *Prog. Allergy* 34: 188-235, 1984

Iskit AB, Sungur A, Gedikoglu G, Oguz Guc M: The effect of bosentan, aminoguanidine and L-canavanine on mesenteric blood flow, spleen and liver in endotoxaemic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 379: 73-80, 1999

Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, Kimura C, Kosaka T, Inoue A, Ishida N, Mitsui Y, Onda H, Fujino M, et al.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 231: 440-444, 1988

Kadono S, Manaka I, Kawashima M, Kobayashi T, Imokawa G: The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J Invest Dermatol* 116: 571-577, 2001

Kahaleh MB: Endothelin: an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 34: 978-983, 1991

Kimura I, Moritani Y, Tanizaki Y: Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin. Allergy* 3: 195, 1973

Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T: Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 1182-1186, 1988

Kitamura Y: Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 59-76, 1989

Kitamura Y, Go S, Hatanaka K: Decrease of mast cells in W/W^V mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52: 447-452, 1978

Kitamura Y, Kasugai T, Nomura S, Matsuda H: Development of mast cells and basophils. In: (eds.) J. C. Foreman: *Immunopharmacology of mast cells and basophils.* , San Diego, 1993

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

Klemm P, Warner TD, Hohlfeld T, Corder R, Vane JR: Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2691-2695, 1995

Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V: The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* 338: 784-790, 1998

Kruse-Elliott KT, Whorton AR, Olson NC: Role of lipid-derived mediators in tumor necrosis factor-induced endothelin-1 release in vivo. *Shock* 9: 40-45, 1998

Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H, Kodama T, Maemura K, Nagai R, Oda H, Kuwaki T, Cao W-H, Kamada N, Jishage K, Ouchi Y, Azuma S, Toyoda Y, Ishikawa T, Kumada M, Yazaki Y: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 368: 703-710, 1994

Kuwaki T, Ishii T, Ju K, Yanagisawa M, Fukuda Y: Blood pressure of endothelin-3 null (-/-) knockout mice and endothelin A receptor null (-/-) knockout mice under anaesthesia. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 1: 48S-52S, 2002

Kuwaki T, Kurihara H, Cao WH, Kurihara Y, Unekawa M, Yazaki Y, Kumada M: Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Progr. Neurobiol.* 51: 545-579, 1997

Lahav R, Heffner G, Patterson PH: An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11496-11500, 1999

Lee M-E, de la Monte SM, Ng S-C, Bloch KD, Quertermous T: Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J. Clin. Invest.* 86: 141-147, 1990

Leon A, Buriani A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L, Levi Montalcini R: Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3739-3743, 1994

Li Z, Niwa Y, Rokutan K, Nakaya Y: Expression of endothelin-1 in macrophages and mast cells in hyperplastic human tonsils. *FEBS Letters* 457: 381-384, 1999

Lipa JE, Neligan PC, Perreault TM, Baribeau J, Levine RH, Knowlton RJ, Pang CY: Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ETA and ETB receptors. *Am J Physiol* 276: H359-367, 1999

Liu Y, Yamada H, Ochi J: Immunocytochemical studies on endothelin in mast cells and macrophages in the rat gastrointestinal tract. *Histochem. Cell. Biol.* 109: 301-307, 1998

Lundblad R and Giercksky KE: Effect of volume support, antibiotic therapy, and monoclonal antiendotoxin antibodies on mortality rate and blood concentrations of endothelin and other mediators in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Crit Care Med* 23: 1382-1390, 1995a

Lundblad R and Giercksky KE: Endothelin concentrations in experimental sepsis: profiles of big endothelin and endothelin 1-21 in lethal peritonitis in rats. *Eur J Surg* 161: 9-16, 1995b

Maemura K, Kurihara H, Morita T, Oh-hashii Y, Yazaki Y: Production of endothelin-1 in endothelial cells is regulated by factors associated with vascular injury. *Gerontology* 38 Suppl. 1: 29-35, 1992

Maguire JJ, Kuc RE, Doherty AM, Davenport AP: Potency of PD155080, an orally active ETA receptor antagonist, determined for human endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3: S362-364, 1995

- Malaviya R and Abraham SN: Clinical implications of mast cell-bacteria interaction. *J. Mol. Med.* 76: 617-623, 1998
- Malaviya R and Abraham SN: Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* 67: 841-846, 2000
- Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN: The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8110-8115, 1999
- 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
- Mateo AO and Aleixandre de Artinano A: Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol. Res.* 36: 339-351, 1997
- Maurer M, Echtenacher B, Hultner L, Kollias G, Mannel DN, Langley KE, Galli SJ: The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med* 188: 2343-2348, 1998
- Maurer M, Fischer E, Handjiski B, von Stebut E, Algermissen B, Bavandi A, Paus R: Activated skin mast cells are involved in murine hair follicle regression (catagen). *Lab. Invest.* 77: 319-332, 1997
- Maurer M, Paus R, Czarnetzki BM: Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp. Dermatol.* 4: 266-271, 1995
- Maximow A: Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Arch. mikrosk. Anat.* 67: 680-757, 1905
- Mécheri S and David B: Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity? *Immunol. Today* 18: 212-215, 1997
- Meininger CJ: Mast cells and tumor-associated angiogenesis. *Chem. Immunol.* 62: 239-257, 1995
- Mitaka C, Hirata Y, Yokoyama K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K: Pathologic role of endothelin-1 in septic shock. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 Suppl 1: S233-S235, 1998
- Miyauchi T and Goto K: Heart failure and endothelin antagonists. *TIPS* 20: 210-217, 1999

Miyauchi T and Masaki T: Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 391-415, 1999

Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T: Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 2: 53-54, 1989

Murphy GF, Austen KF, Fonferko E, Sheffer AL: Morphologically distinct forms of cutaneous mast cell degranulation induced by cold and mechanical stimuli: An ultrastructural study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80: 603-611, 1987

Murphy K, Haudek SB, Thompson M, Giroir BP: Molecular biology of septic shock. *New Horiz.* 6: 181-193, 1998

Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H: Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J. Immunol.* 159: 1987-1992, 1997

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 to genetically mast cell-deficient W/W^V mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue and mucosal mast cells. *J. Exp. Med.* 162: 1025-1043, 1985

Norman P: Atrasentan Abbott. *Curr Opin Investig Drugs* 3: 1240-1248, 2002

Norrby K: Mast cells and angiogenesis. *Apmis* 110: 355-371, 2002

Okayama Y, Bradding P, Tonon-de-Lara JM, Holgate ST, Church MK: Cytokine production by human mast cells. *Chem. Immunol.* 61: 114-134, 1995

Oldner A, Wanecek M, Goiny M, Weitzberg E, Rudehill A, Alving K, Sollevi A: The endothelin receptor antagonist bosentan restores gut oxygen delivery and reverses intestinal mucosal acidosis in porcine endotoxin shock. *Gut* 42: 696-702, 1998

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987

- Paus R, Lüftl M, Czarnetzki BM: Nerve growth factor modulates keratinocyte proliferation in murine skin organ culture. *Br. J. Dermatol.* 130: 174-180, 1994a
- Paus R, Maurer M, Slominski A, Czarnetzki BM: Mast cell involvement in murine hair growth. *Dev. Biol.* 163: 230-240, 1994b
- Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC: Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* 390: 172-175, 1997
- Raschack M, Unger L, Riechers H, Klinge D: Receptor selectivity of endothelin antagonists and prevention of vasoconstriction and endothelin-induced sudden death. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3: S397-399, 1995
- Redl H, Schlag G, Bahrami S, Kargl R, Hartter W, Woloszczuk W, Davies J: Big-endothelin release in baboon bacteremia is partially TNF dependent. *J Lab Clin Med* 124: 796-801, 1994
- Reid K, Turnley AM, Maxwell GD, Kurihara Y, Kurihara H, Bartlett PF, Murphy M: Multiple roles for endothelin in melanocytes development: regulation of progenitor number and stimulation of differentiation. *Development* 122: 3911-3919, 1996
- Rodewald HR, Dessing M, Dvorak AM, Galli SJ: Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science* 271: 818-822., 1996
- Rosenkranz AR, Coxon A, Maurer M, Gurish MF, Austen KF, Friend DS, Galli SJ, Mayadas TN: Impaired mast cell development and innate immunity in Mac-1 (CD11b/CD18, CR3)-deficient mice. *J. Immunol.* 161: 6463-6467, 1998
- Rothe MJ, Nowak M, Kerdel FA: The mast cell in health and disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* 23: 615-624, 1990
- Rubanyi GM and Polokoff MA: Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46: 325-415, 1994
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G: Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346: 896-903, 2002

Saenz de Tejada I, Carson MP, De las Morenas A, Goldstein I, Traish AM: Endothelin: localization, synthesis, activity, and receptor types in human penile corpus cavernosum. *Am. J. Physiol.* 261: H1078-H1085, 1991

Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T: Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348: 732-735, 1990

Schick BA and Austen KF: The biochemistry of mast cells and basophils. In: (eds.) M. Lessof, Lee, T., Kemeney, D.: *Allergy: An international textbook.* , New York, 1987

Sharma R, Coats AJ, Anker SD: The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Int J Cardiol* 72: 175-186, 2000

Shaw MD, Vermeulen M, Murray GD, Pickard JD, Bell BA, Teasdale GM: Efficacy and safety of the endothelin, receptor antagonist TAK-044 in treating subarachnoid hemorrhage: a report by the Steering Committee on behalf of the UK/Netherlands/Eire TAK-044 Subarachnoid Haemorrhage Study Group. *J Neurosurg* 93: 992-997, 2000

Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, Black CM, Abraham DJ: Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116: 417-425, 2001

Stjernquist M: Endothelins - vasoactive peptides and growth factors. *Cell Tissue Res.* 292: 1-9, 1998

Sugiura M, Inagami T, Kon V: Endotoxin stimulates endothelin- release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161: 1220-1227, 1989

Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y: Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 823-830, 1993

Szalay L, Kaszaki J, Nagy S, Boros M: The role of endothelin-1 in circulatory changes during hypodynamic sepsis in the rat. *Shock* 10: 123-128, 1998

Takakuwa T, Endo S, akae H, Kikichi M, Suzuki T, Inada K, Yoshida M: Plasma level of TNF- α , endothelin-1 and thrombomodulin in patients with sepsis. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84: 261-269, 1994

Tomita K, Ujiie K, Nakanishi T, Tomura S, Matsuda O, Ando K, Shichiri M, Hirata Y, Marumo F: Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* 321: 1127, 1989

Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ: Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6382-6386, 1991

Uchida Y, Ninomiya H, Sakamoto T, Lee JY, Endo T, Nomura A, Hasegawa S, Hirata F: ET-1 released histamine from guinea pig pulmonary but not peritoneal mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 189: 1196-1201, 1992

von Recklinghausen F: Über Eiter und Bindegewebskörperchen. *Virchows Arch. Path. Anat.* 28: 157-197, 1863

Von Stebut E, Metz M, Milon G, Knop J, Maurer M: Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha /beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. *Blood* 101: 210-215, 2003

Wanecek M, Oldner A, Rudehill A, Sollevi A, Alving K, Weitzberg E: Endothelin(A)-receptor antagonism attenuates pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. *Eur Respir J* 13: 145-151, 1999a

Wanecek M, Oldner A, Sundin P, Alving K, Weitzberg E, Rudehill A: Effects on haemodynamics by selective endothelin ET(B) receptor and combined endothelin ET(A)/ET(B) receptor antagonism during endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 386: 235-245, 1999b

Warner JA and Kroegel C: Pulmonary immune cells in health and disease: mast cells and basophils. *Eur. Respir. J.* 7: 1326-1341, 1994

Warner TD, Allcock GH, Corder R, Vane JR: Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. *Br. J. Pharmacol.* 110: 777-782, 1993

Wershil BK, Castagliuolo I, Pothoulakis C: Direct evidence of mast cell involvement in *clostridium difficile* toxin a-induced enteritis. *Gastroenterology* 114: 956-964, 1998

Wershil BK, Furuta GT, Lavigne JA, Choudhury AR, Wang ZS, Galli SJ: Dexamethasone and cyclosporin A suppress mast cell-leukocyte cytokine cascades by multiple mechanisms. *Int Arch Allergy Immunol* 107: 323-324, 1995

Wershil BK, Tsai M, Geissler EN, Zsebo KM, Galli SJ: The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces c-kit receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the c-kit receptor can induce expression of cellular function. *J. Exp. Med.* 175: 245-255, 1992

Williams CMM and Galli SJ: The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 847-859, 2000

Williams RM, Bienenstock J, Stead RH: Mast cells: The neuroimmune connection. *Chem. Immunol.* 61: 208-235, 1995

Wypij DM, Nichols JS, Novak PJ, Stacy DL, Berman J, Wiseman JS: Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol* 43: 845-853, 1992

Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M: ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78: 473-485, 1994

Yamada T, Murayama T, Haruhisa M, Akiyama K: Subtypes of bladder mast cells in interstitial cystitis. *Int. J. Urol.* 7: 292-297, 2000

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K: Endothelin-1 induces release of histamine and leukotriene C4 from mouse bone marrow-derived mast cells. *Eur J Pharmacol* 257: 235-242, 1994a

Yamamura H, Nabe T, Kohno S, Ohata K: Endothelin-1, one of the most potent histamine releasers in mouse peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol* 265: 9-15, 1994b

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazake Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988

Yohn JJ, Morelli JG, Walchak SJ, Rundell KB, Norris DA, Zamora MR: Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J. Invest. Dermatol.* 100: 23-26, 1993

Yoshida H, Kunisada T, Kusakabe M, Nishikawa S, Nishikawa S-I: Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* 122: 1207-1214, 1996

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt allen, die mir dabei geholfen haben diese Arbeit fertig zu stellen und die dazu beigetragen haben, dass ich mich immer mit Freude an die Zeit im Labor in Mainz, Boston und Berlin erinnern werde. Insbesondere möchte ich folgenden Personen danken:

Prof. Dr. K., für die Überlassung des Themas, sein großes Engagement für die Forschung, die stete Unterstützung sowie die großen wissenschaftlichen Freiräume die er seinen Mitarbeitern bietet.

Dr. M., meinem Betreuer, Kollegen, Mentor und Freund für Rat und Tat in allen Lebens- und Arbeitsfragen in Berlin, Boston und Mainz und die unermüdliche Bereitschaft bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit zu helfen,

Prof. Dr. G., für die einmalige Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu können,

Prof. Dr. P., in dessen Labor ich einige Jahre verbringen durfte, für sein persönliches Engagement, ohne das ich nie zu den Erfahrungen, die ich den letzten Jahren gesammelt habe, gekommen wäre,

der **Arbeitsgruppe Mastzelle**, insbesondere **A., A., D., F., H., K., M., S., V., W.**,

M., einem steten Weggefährten, für die geistige Ablenkung und die ausdauernde Hilfe bei Computer- und Grafikproblemen,

T. für die orthographischen Feinheiten,

I., für ihre Geduld mit mir und die moralische Unterstützung,

meinen Eltern, **M.** und **J.**, für die unverwüstliche Zuversicht, dass alles schon irgendwie klappt,

sowie **L.** für jede Minute, die ich mit ihr verbringen kann.

LEBENS LAUF

Christoph Martin Heinrich Metz, *19.2.1972, verheiratet, ein Kind

Am 19. 2. 1972 wurde ich in Tübingen als drittes Kind des Dipl. Kaufmanns Jörg und der Apothekerin Margret Metz, geb. Fittje geboren.

Von 1982 bis 1991 besuchte ich das Geschwister-Scholl-Gymnasium in Tübingen, wo ich am 12.6.91 das Abitur erlangte. Anschließend absolvierte ich als Pflegediensthelfer meinen Zivildienst an der Winghofer Klinik in Rottenburg.

1993 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität in Berlin. Nach dem Physikum 1994 wechselte ich an die Humboldt Universität zu Berlin. Dort habe ich alle Abschnitte der ärztlichen Prüfung abgelegt. Mein praktisches Jahr absolvierte ich am King's College Hospital in London (Dermatologie) und am St. Gertrauden Krankenhaus in Berlin (Chirurgie und Innere), bevor ich im Mai 2000 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung abgelegt habe.

Ab 1996 arbeitete ich in der AG Haarforschung der Hautklinik der Charité unter der Leitung von Prof. Dr. R. Paus.

1997 und 1998 arbeitete ich für jeweils 3 Monate als Doktorand unter der Betreuung von Dr. Marcus Maurer im Labor von Prof. S.J. Galli am Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School in Boston, USA

Am 22.4.2000 wurde meine Tochter Lili Charlotte geboren.

Von Dezember 2000 bis Mai 2002 arbeitete ich als Arzt im Praktikum in der Hautklinik der Johannes Gutenberg Universität Mainz unter der Leitung von Prof. J. Knop, wo ich seit Juni 2002 als wissenschaftlicher Assistent angestellt bin.

Seit Dezember 2000 bin ich als Doktorand in der Arbeitsgruppe Mastzelle von Dr. Marcus Maurer tätig.