

Der Transkriptionsfaktor NFATc2 ist essentiell für die
Funktion von Mastzellen *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marc Becker

geb. am 26.02.1977 in Mainz

Mainz, den 25.11.2008

Aus dem
Institut für Immunologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2009

Eigene Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden:

a) bereits zur Veröffentlichung eingereicht:

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

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

Journal of Immunology, zur Veröffentlichung eingereicht, in Revision

b) bereits veröffentlicht in:

Mast cells are crucial for early inflammation, emigration of Langerhans cells and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice

Heib V, **Becker M**, Warger T, Rechtsteiner G, Tertilt C, Klein M, Bopp T, Taube C, Schild H, Schmitt E, and Stassen M.

Blood, 2007 Aug 1;110(3):946-53. Epub 2007 Apr 19.

Weitere Publikationen:

Advances in the understanding of mast cell function

Heib V, **Becker M**, Taube C, Stassen M

British Journal of Haematology 2008 Sep;142(5):683-94. Review

Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression

Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, **Becker M**, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E.

Journal of Experimental Medicine 2007 Jun 11;204(6):1303-10. Epub 2007 May 14.

p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1.

Stassen M., Klein M, **Becker M**, Bopp T, Neudorfl C, Richter C, Heib V, Klein-Hessling S, Serfling E, Schild H, and Schmitt E

Molecular Immunology 2007 Feb;44(5):926-33. Epub 2006 May 2.

Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines

Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Bopp T, Heib V, **Becker M**, Taube C, Schild HJ, Schmitt E, and Stassen M.

Journal of Immunology 2006 Nov 15;177(10):6667-74.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Entwicklung muriner Mastzellen.....	1
1.2 Methoden zur Untersuchung der Mastzellfunktion.....	3
1.3 Funktion der Mastzelle im Immunsystem.....	4
a) IgE-vermittelte / anaphylaktische Reaktionen	4
b) Funktion an der Schnittstelle von angeborener und erworbener Immunität.....	6
1.4 Struktur und Funktion von NFAT-Transkriptionsfaktoren.....	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 Plastikwaren	16
2.2 Chemikalien.....	16
2.3 Cytokine.....	16
2.3.1 Cytokine zur Differenzierung und Kultivierung muriner Mastzellen („bone marrow-derived mast cells“ – BMMC).....	16
2.3.2 Cytokine zur Differenzierung und Kultivierung von murinen Dendritischen Zellen („bone marrow-derived dendritic cells“ – BMDC)	17
2.4 Puffer, Kulturmedien und Reagenzien	17
2.4.1 Puffer.....	17
2.4.2 Kulturmedien	19
2.4.3 Reagenzien	21
2.5 Antikörper	22
2.5.1 Antikörper zur histologischen Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis.....	22
2.5.2 Antikörper zur FACS-Analyse	22
2.5.3 Antikörper für ELISA	23
2.5.4 Antikörper für passive kutane Anaphylaxis.....	24
2.6 Mäuse.....	24
2.7 Zellkultur	24
2.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	24
2.7.2 Präparation von Knochenmarkszellen	25
2.7.3 Differenzierung von BMMC aus Knochenmarkszellen	25

2.7.4	Differenzierung von BMDC aus Knochenmarkszellen.....	26
2.7.5	Stimulation von <i>in vitro</i> -generierten BMMC	26
2.7.6	Präparation von Milzzellen.....	26
2.7.7	Bestimmung des Gehalts von IL-10 in Kulturüberständen von BMMC	26
2.7.8	Fluoreszenzfärbung von Zellen mittels Antikörper und anschließende FACS-Analyse	27
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.8.1	Präparation von RNA aus BMMC	27
2.8.2	Präparation von RNA aus Geweben.....	27
2.8.3	Photometrische Messung der RNA-Konzentration	28
2.8.4	Reverse Transkription.....	29
2.8.5	Konventionelle PCR.....	30
2.8.6	Semiquantitative RealTime-PCR	31
2.8.7	mRNA-Microarray	32
2.9	Histologische Methoden.....	32
2.9.1	Präparation der Epidermis	32
2.9.2	Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis	33
2.9.3	Histologische Färbung von dermalen Mastzellen	33
2.10	Passive kutane Anaphylaxis („passive cutaneous anaphylaxis“ – PCA)	34
2.11	Behandlung der Mäuseohren mit Aldara/5% Imiquimod Creme.....	34
2.12	Rekonstitution der Ohren von mastzellosen Mäusen mit BMMC.....	34
2.13	Messung der Ohrschwellung.....	35
2.14	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Ohrgewebe	35
2.15	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten	35
2.16	Immunisierung mit Dendritischen Zellen	36
2.17	Transkutane Immunisierung (TCI)	36
2.18	Nachweis von peptidspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	36
2.19	<i>In vivo</i> Cytotoxizitätstest.....	37
2.20	Proliferationstest peptidspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	38
3.	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Die TLR7-vermittelte Entzündungsreaktion der Haut ist bei NFATc2-defizienten Mäusen stark verzögert.....	40

3.2	Die Auswanderung von Langerhanszellen nach Applikation von Imiquimod ist größtenteils abhängig vom Transkriptionsfaktor NFATc2	46
3.3	NFATc2 beeinflusst die TLR7-vermittelte Hypertrophie der regionalen Lymphknoten.....	48
3.4	Die Bedeutung von NFATc2 für die Entstehung einer cytotoxischen T-Zellantwort.....	50
3.4.1	NFATc2-defiziente CD8 ⁺ T-Zellen weisen einen aktivierten Phänotyp auf	50
3.4.2	NFATc2-defiziente Mäuse können starke cytotoxische T-Zellantworten nach Immunisierung mit peptidbeladenen DC entwickeln.....	52
3.4.3	Langerhanszellen sind essentiell für effektive transkutane Immunisierungen gegen Peptide	53
3.4.4	Nach transkutaner Immunisierung ist die Zahl der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in NFATc2-defizienten Mäusen stark vermindert	56
3.4.5	NFATc2-defiziente Mäusen zeigen nach transkutaner Immunisierung eine verminderte cytotoxische T-Zellantwort	57
3.5	NFATc2-defiziente Mastzellen zeigen einen normalen Phänotyp	59
3.6	Die Mastzellpopulation in der Haut und deren IgE-vermittelte Aktivierung <i>in vivo</i> ist durch das Fehlen von NFATc2 nicht beeinträchtigt	62
3.7	NFATc2 in Mastzellen fördert die Entstehung einer schnellen Entzündungsreaktion in der Haut nach Applikation von Imiquimod.....	64
3.8	Die TLR7-vermittelte Auswanderung von Langerhanszellen ist direkt abhängig von NFATc2 in Mastzellen	66
3.9	NFATc2 in Mastzellen ist verantwortlich für eine adäquate Expansion antigenspezifischer cytotoxischer T-Zellen nach Applikation von Peptid und Imiquimod.....	67
3.10	NFATc2-kontrollierte Gene in Mastzellen	71
3.11	Die Rolle von IL-10 in der TLR7-vermittelten Entzündungsreaktion in der Haut	75
4.	DISKUSSION	77
4.1	Mastzellen als Auslöser rascher Entzündungsreaktionen	77
4.2	Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 in Mastzellen bei der Entstehung adaptiver Immunreaktionen.....	83
4.3	Die Rolle der Mastzelle bei der Begrenzung von Immunreaktionen.....	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87

LITERATURVERZEICHNIS88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....95

LEBENS LAUF FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1. Einleitung

1.1 Entwicklung muriner Mastzellen

Mastzellen sind in allen durchbluteten Geweben vorhanden. Sie kommen verstärkt in Geweben mit Kontakt zur äußeren Umwelt vor und sind besonders in der Nähe von Epithelien und Blutgefäßen lokalisiert. Im Jahre 1977 konnte erstmals durch Knochenmarktransfer in radioaktiv bestrahlte Mäuse gezeigt werden, dass sich Mastzellen aus Stammzellen im Knochenmark entwickeln (Kitamura *et al*, 1977). Jedoch ist über Mastzell-Vorläuferzellen bis heute relativ wenig bekannt. Der früheste Mastzell-Vorläufer konnte im fötalen Blut der Maus als eine gering granulierte Zelle identifiziert werden, welche das Oberflächenmolekül CD117 (c-kit) exprimiert, aber nicht den hochaffinen Rezeptor für IgE, Fc_εRI (Rodewald *et al*, 1996). Im Blut von adulten Tieren sind jedoch mögliche Vorläuferzellen kaum nachweisbar, lediglich in den Geweben sind sie in höherer Anzahl zu finden (Hallgren & Gurish, 2007). Es ist daher davon auszugehen, dass in der Maus kurze Zeit nach der Geburt eine große Zahl von Mastzell-Vorläufern das Knochenmark verlässt, welche anschließend in den Geweben differenzieren und dort sehr langlebig residieren. Basierend auf den Arbeiten von Gurish *et al.*, die zeigten, dass Mastzellen zum Einwandern in das Darmgewebe das Integrin $\alpha_4\beta_7$ benötigen (Gurish *et al*, 2001), konnte schließlich auch in adulten Tieren ein Mastzell-Vorläufer identifiziert werden, der β_7 auf der Zelloberfläche exprimiert (Chen *et al*, 2005). Nach Infektion von Mäusen mit *Trichinella spiralis* steigt die Anzahl dieser Vorläuferzellen zunächst im Knochenmark an und diese wandern schließlich über das Blut bis in das Darmgewebe ein (Pennock & Grecis, 2004). Darüber hinaus konnte in der Milz eine bipotente Vorläuferzelle nachgewiesen werden, aus welcher sich *in vivo* Mastzellen und *in vitro* basophile Granulozyten entwickeln können (Arinobu *et al*, 2005).

In der Maus wird bei Mastzellen zwischen zwei Hauptpopulationen unterschieden: Schleimhautmastzellen (MMC – mucosal mast cells) und Bindegewebsmastzellen (CTMC – connective tissue type mast cells). Die MMC befinden sich vor allem in den Schleimhäuten von Nase, Auge, Verdauungstrakt (Lamina propria), sowie in den Alveolarwänden der Lunge. Die CTMC sind hauptsächlich in der Haut und der Bauchhöhle (Peritoneum) angesiedelt. Beide Populationen können auch

phänotypisch in ihrer Größe und Granularität sowie in der Zusammensetzung ihrer Granula unterschieden werden. So sind z.B. in den Granula der CTMC die Proteasen MMCP-3, -4, -5, -6 und Carboxypeptidasen enthalten sowie ein hoher Gehalt an Histamin und präformiertes TNF- α (Heib *et al*, 2008; Sur *et al*, 2007). Die Granula der MMC hingegen enthalten die Proteasen MMCP-1, -2 und geringere Mengen an Histamin und TNF- α . Auf humaner Ebene wird ebenfalls zwischen zwei Hauptpopulationen von Mastzellen unterschieden, die verschiedene Proteasen, Tryptase und Chymase in ihren Granula aufweisen. Hierbei ähneln die humanen MC_T den MMC und die MC_{TC}¹ den murinen CTMC (Marshall, 2004; Stassen *et al*, 2002).

Darüber hinaus besitzen Mastzellen die besondere Eigenschaft, in ihrer Differenzierung flexibel zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass einmal zu MMC oder CTMC differenzierte Mastzellen jederzeit, abhängig von den lokalen Bedingungen im Gewebe, in die jeweils andere Mastzellpopulation transdifferenzieren können (Kitamura *et al*, 1987).

Der wichtigste Wachstums- und Differenzierungsfaktor in der Maus und im Menschen für Mastzellen *in vivo* ist der sogenannte „stem cell factor“ (SCF), welcher über den Oberflächenrezeptor CD117 (c-kit) auf der Mastzelle erkannt wird (Li & Krilis, 1999). Mäuse, die durch Mutationen keinen funktionellen c-kit-Rezeptor ausprägen können, entwickeln keine Mastzellen (siehe 1.2). Ein weiterer Wachstumsfaktor für murine Mastzellen *in vitro* ist das Cytokin Interleukin-3 (IL-3), der *in vivo* jedoch keine entscheidende Rolle spielt. Diese Aussage wird darin bestätigt, dass Mäuse, die kein IL-3 bilden können (IL-3-knockout-Mäuse), normale Mastzellzahlen entwickeln (Lantz *et al*, 1998). Das Fehlen von IL-3 begrenzt jedoch die Expansion von Mastzellen, was daran ersichtlich ist, dass nach Nematodeninfektionen in IL-3-defizienten Tieren keine sonst typische Mastozytose entsteht. Für andere Cytokine, wie z.B. TNF- α , IL-4 und IL-9 konnte *in vivo* oder *in vitro* lediglich eine unterstützende Funktion in der Entwicklung und Differenzierung von Mastzellen nachgewiesen werden (Stassen *et al*, 2002).

¹ T = Tryptase; TC = Tryptase + Chymase

1.2 Methoden zur Untersuchung der Mastzellfunktion

Im murinen System können sowohl CTMC als auch MMC nicht in ausreichend hohen Mengen und nur unter hohem Aufwand aus Mäusen isoliert werden und sind daher für *in vitro*-Experimente ungeeignet. Das am weitesten verbreitete *in vitro*-Modell für die Untersuchung von Mastzellfunktionen sind die sogenannten BMMC („bone marrow-derived mast cells“), die ein anerkanntes *in vitro*-Äquivalent für mucosale Mastzellen sind. Diese Zellen werden aus Vorläuferzellen im Knochenmark unter Verwendung von SCF und IL-3 mittels einer mehrwöchigen Kultur aus dem Knochenmark generiert (Stassen *et al*, 2002; Metcalfe *et al*, 1997). Eine wichtige Eigenschaft der BMMC ist, dass sie nach adoptivem Transfer in den jeweiligen Geweben genetisch kompatibler, mastzellloser Mäuse zu CTMC oder MMC ausdifferenzieren können.

Um eine Beteiligung von Mastzellen bei immunologischen Reaktionen *in vivo* identifizieren und quantifizieren zu können, sind mastzell-defiziente Mausstämme von äußerst wichtiger Bedeutung. Die am besten untersuchten mastzelllosen Mausstämme besitzen Mutationen („loss of function“), die den Rezeptor für den Wachstums- und Differenzierungsfaktor SCF, CD117 (c-kit), betreffen.

Der häufig verwendete mastzelllose Mausstamm WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}* (im Folgenden als *Kit^W/Kit^{W-v}* bezeichnet) besitzt zwei unterschiedlich mutierte Allele (Tamai & Kitamura, 1978). Bei der *Kit^W*-Mutation des einen Allels besitzt das c-kit-Protein keine transmembrane Proteindomäne und kann daher nicht auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Hayashi *et al*, 1991). Die *Kit^{W-v}*-Mutation des anderen Allels besitzt eine Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors, was eine starke Verminderung der Kinase-Aktivität und somit eine erhebliche Störung des Signaltransduktionsweges zur Folge hat (Reith *et al*, 1990). Durch die Addition beider Mutationen kommt es zur Mastzell-Defizienz der *Kit^W/Kit^{W-v}*-Mäuse, was jedoch noch andere nachteilige Effekte mit sich führt. Neben Anämie und Sterilität zeigen solche Tiere eine höhere Anfälligkeit gegenüber Krankheiten, wie die Ausprägung einer spontanen Dermatitis (Grimbaldeston *et al*, 2005).

Ein weiterer mastzellloser Mausstamm, welcher durch spontane Mutation entstanden ist, ist der *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*-Stamm (sogenannte „sash“-Mäuse). Dieser

wurde bereits im Jahre 1982 erstmals beschrieben (Lyon & Glenister, 1982), jedoch erst seit 2004 für *in vivo*-Studien der Mastzellfunktionen eingesetzt (Mallen-St Clair *et al*, 2004). Die *W-sash*-Mutation ist eine Inversion im Promoter oberhalb des Transkriptionsstartes von *c-kit* auf dem Maus-Chromosom 5 (Nagle *et al*, 1995), was eine Zerstörung regulatorischer Elemente und eine deutlich herabgesetzte Expression des Rezeptors *c-kit* (CD117) bewirkt (Berrozpe *et al*, 1999). Im Gegensatz zu *Kit^W/Kit^{W-v}*-Mäusen weisen die „sash“-Mäuse (*Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*), abgesehen von fehlender Hautpigmentierung, keine weiteren bekannten Defekte auf (Grimbaldeston *et al*, 2005). Diese „sash“-Mutation von *c-kit* scheint sich also auf Mastzellen und Melanozyten zu beschränken.

Beide mastzelllosen Mausstämme können durch adoptiven Transfer genetisch kompatibler und *in vitro*-generierter BMMC rekonstituiert werden. Hierbei entscheidet die Applikationsart, welche Organe mit den adoptiv transferierten Mastzellen besiedelt werden (Grimbaldeston *et al*, 2005; Wolters *et al*, 2005). So können Mastzellen nach intravenöser Gabe von BMMC in den Organen Lunge, Milz, Leber, Lymphknoten und Magen nachgewiesen werden. Die Haut kann jedoch nur über lokale, intradermale Injektion mit Mastzellen rekonstituiert werden. Durch die Möglichkeit der Rekonstitution mastzellloser Mäuse mit *in vitro*-generierten Mastzellen ist man in der Lage, die Funktion der Mastzelle *in vivo* in unterschiedlichen Modellen zu untersuchen.

1.3 Funktion der Mastzelle im Immunsystem

a) IgE-vermittelte / anaphylaktische Reaktionen

Zwei wesentliche Merkmale von Mastzellen sind ihre starke Granulierung und die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors $Fc_{\epsilon}R1$. Seit den 1960er Jahren, als den Mastzellen erstmals eindeutige Funktionen bezüglich IgE und Anaphylaxie zugeschrieben werden konnte (Ishizaka *et al*, 1966), sah man sie jahrzehntelang fast ausschließlich in der Rolle als Effektorzelle in allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Typ I), wie z.B. allergisches Asthma. Hierbei kommt es nach Erstkontakt mit einem Allergen zu einer spezifischen Th2-Immunantwort, wodurch es zur Bildung von monomeren IgE-Antikörpern kommt, welche an die hochaffinen Fc_{ϵ} -Rezeptoren binden (siehe Abb.1A). Bei diesem Vorgang der „Sensibilisierung“

wird zum einen die Mastzelle „armiert“ und zum anderen werden sogenannte B-Gedächtniszellen gebildet, die nach erneutem Kontakt große Mengen an IgE freisetzen können. Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen werden die rezeptorgebundenen IgE-Antikörper kreuzvernetzt, wodurch es zu einer sofortigen und massiven Degranulation (anaphylaktische Degranulation) sowie zur *de novo*-Synthese verschiedener Cytokine und Chemokine kommt (siehe Abb.1B) (Metcalf *et al*, 1997; Stassen *et al*, 2002).

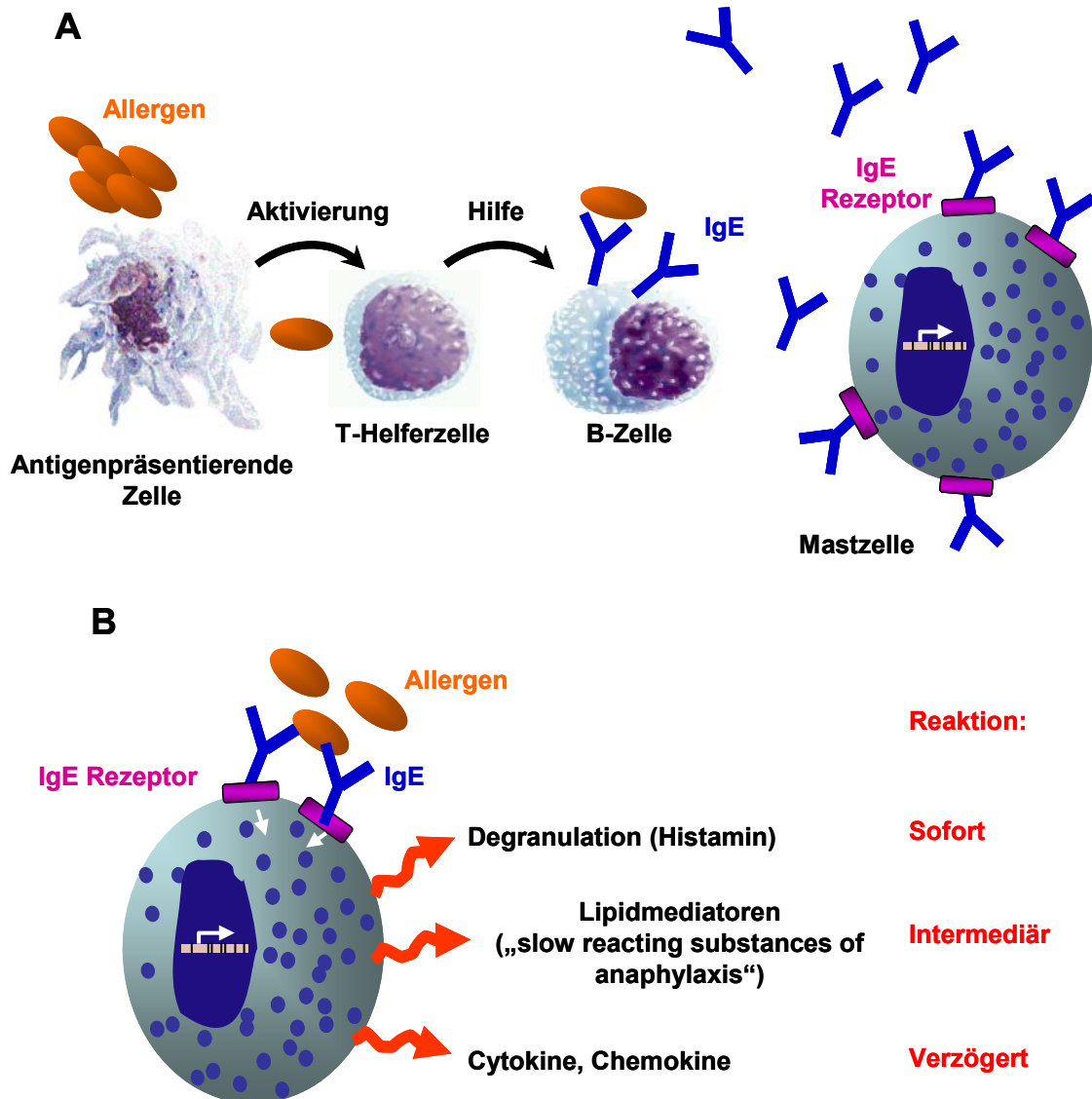


Abb.1: Sensibilisierung und Aktivierung von Mastzellen während einer allergischen Reaktion vom Soforttyp (Typ I) (Quelle: Becker & Stassen, Bioforum, im Druck)

Diese schlagartige Freisetzung bewirkt eine Gefäßerweiterung und sofortige Erhöhung von lokaler Durchblutung und Gefäßdurchlässigkeit, wodurch es zur Einwanderung neutrophiler Granulozyten und anderen Leukozyten in das entzündete Gewebe kommt. Im Fall einer systemischen Aktivierung der

antigenbeladenen Mastzellen kann es zu einem anaphylaktischen Schock kommen.

b) Funktion an der Schnittstelle von angeborener und erworbener Immunität

Mastzellen sind in relativ hoher Anzahl in Geweben vertreten, die ständig in Kontakt zur äußeren Umgebung stehen, wie in der Haut, den Bindegeweben, dem Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt. Diese Orte stellen potentielle Eintrittsstellen für pathogene Organismen dar. Mastzellen scheinen daher prädestiniert zu sein, den Wirt vor eindringenden pathogenen Mikroorganismen zu schützen.

Den ersten Nachweis einer Mastzell-Bakterien-Interaktion erbrachten Sher et al., welche die Bindung von Mastzellen an komplementbeladene (C3b) Salmonellen und Helminthen (*Schistosoma mansoni*) über den Komplementrezeptor CR3 zeigten (Sher, 1976). Doch erst im Jahre 1988 konnte man durch *in vivo*-Experimente zeigen, dass Mastzellen bei bakteriellen Infektionen vermutlich eine wichtige Rolle spielen können (Shin et al, 1988). Nach Injektion von destilliertem Wasser in die Bauchhöhle von Ratten, wurden die Mastzellen lysiert und der Inhalt ihrer Granula freigesetzt. Die anschließend induzierte Peritonitis zeigte, dass diese Mäuse eine geringere Sterblichkeit als die zuvor unbehandelten Kontroll-Ratten aufwiesen.

Den endgültigen Nachweis, dass Mastzellen einen wichtigen Beitrag zur Abwehr bakterieller Infektionen leisten, erfolgte durch Arbeiten von Echtenacher et al. und Malaviya et al., wodurch der Mastzelle eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunität zugewiesen werden konnte (Echtenacher et al, 1996; Malaviya et al, 1996). In einem Modell der akuten septischen Peritonitis (CLP² – „caecum ligation and puncture“) waren alle mastzelllose Mäuse (*Kit^W/Kit^{W-v}*-Mäuse) bereits nach 3 Tagen verstorben, wohingegen mastzell-kompetente Wildtypmäuse eine Mortalitätsrate von lediglich 25% aufwiesen (Echtenacher et al, 1996). Die Sterblichkeit der mastzelllosen Mäuse konnte auf Wildtypniveau vermindert werden, indem 20 Tage vor CLP Wildtyp-Mastzellen in das Peritoneum adoptiv transferiert wurden. Injizierte man jedoch in die rekonstituierten Mäuse unmittelbar nach CLP anti-TNF- α -Antikörper, so wurde der schützende Effekt der Mastzellen

² CLP: In diesem Modell wird ein Teil des Dickdarms (caecum) der Mäuse abgebunden und punktiert, wodurch eine akute septische Peritonitis induziert wird. Die Bedingungen hierbei sind so definiert, dass Wildtypmäuse die entstehende Peritonitis größtenteils überleben (gilt für den Stamm C57Bl/6).

aufgehoben (Echtenacher *et al*, 1990). Dieser Versuch zeigte, dass vor allem das von Mastzellen gebildete TNF- α eine protektive Wirkung in einer experimentellen Peritonitis besitzt.

In dem Infektionsmodell von Malaviya *et al.* wurde der virulente Bakterienstamm *Klebsiella pneumoniae* in die Lunge von mastzelllosen *Kit^W/Kit^{W-v}*- und mastzellkompetenten Wildtyp-Mäusen injiziert. Hier wiesen die mastzelllosen Mäuse nach 48 Stunden einen verminderten Influx an neutrophilen Granulozyten und eine 20fach höhere Bakterienzahl auf als die Wildtypkontrollen. Nach Rekonstitution der mastzelllosen Tiere mit Mastzellen aus Wildtypmäusen konnten diese Defizite in der Bakterienabwehr behoben werden.

Die Fähigkeit von Mastzellen, mikrobielle Infektionen zu kontrollieren, basiert auf der Expression zahlreicher Rezeptoren, die zu einer IgE-unabhängigen Aktivierung der Zellen führen. Ein bekanntes Beispiel ist die Bindung von FimH (Proteinbestandteil bakterieller Geißeln) an das Oberflächenmolekül CD48 und die damit verbundene Phagozytose der Bakterien sowie die Produktion von TNF- α (Malaviya *et al*, 1994a; Malaviya *et al*, 1994b). Weiterhin kann die Mastzelle über Komplement-Rezeptoren, z.B. für die sogenannten „Anaphylatoxine“ C3a und C5a aktiviert werden (Marshall, 2004). Zudem wurde berichtet, dass der Komplement-Faktor C1q an das Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf Mastzellen bindet, was zur Mastzellaktivierung und Cytokinexpression beiträgt (Edelson *et al*, 2004; Edelson *et al*, 2006). In der folgenden Abb.2 soll noch einmal die Funktion der Mastzellen in der angeborenen Immunantwort zusammengefasst werden.

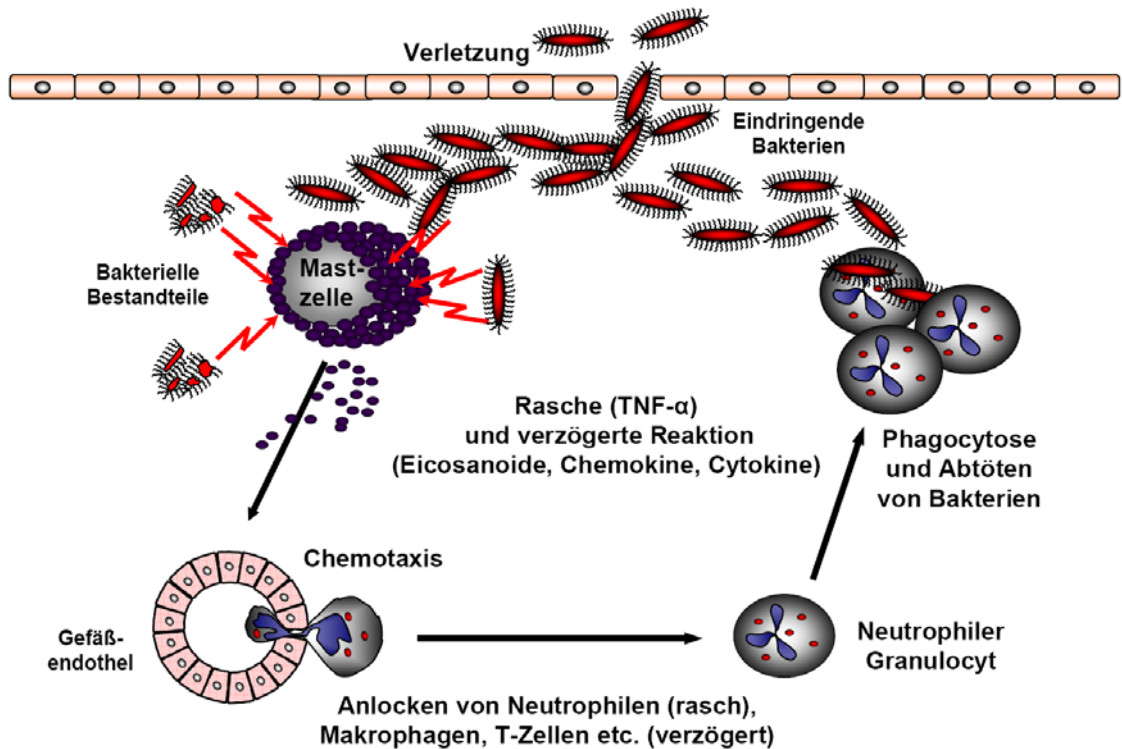


Abb.2: Die Mastzelle als Wächter des angeborenen Immunsystems (Quelle: Becker & Stassen, Bioforum, im Druck)

Die Mastzelle kann durch eindringende Mikroorganismen aktiviert werden und daraufhin verschiedene entzündungsfördernde Mediatoren freisetzen. Dadurch werden Effektorzellen an den Entzündungsherd gelockt, die in der Lage sind, diese Mikroorganismen effektiv abzutöten.

Eine direkte Erkennung potentiell pathogener Organismen kann auch über eine transmembrane Rezeptorfamilie, den sogenannten Toll-like Rezeptoren, erfolgen, die bei *Drosophila melanogaster* bis hin zu höheren Säugern entdeckt wurden (Medzhitov & Janeway, Jr., 2000). Diese in der Keimbahn kodierten Rezeptoren erkennen Bestandteile einer Reihe von Pathogenen (sogenannte PAMPs - pathogen-associated molecular patterns). Eine Übersicht der Toll-like Rezeptoren und dessen wichtigster Liganden ist in Tabelle 1 dargestellt (Croizat & Beutler, 2004; Diebold *et al*, 2004; Heil *et al*, 2004; Lund *et al*, 2004; Medzhitov, 2001; Marshall, 2004).

Toll-like Rezeptor	natürlicher Ligand
TLR1	bakterielle Lipoproteine
TLR2	Lipoteichonsäure, Zymosan, Pam ₃ Cys (synthetisch)
TLR3 (endosomal)	doppelsträngige RNA (viral), poly (I:C) (synthetisch)
TLR4	LPS
TLR5	Flagellin
TLR6	Lipoproteine, Peptidoglykan, Zymosan
TLR7 (endosomal)	einzelsträngige RNA, synthetische Liganden sind Imidazolderivate, z.B. Imiquimod oder R848
TLR8 (endosomal)	einzelsträngige RNA (murin nicht funktionell)
TLR9 (endosomal)	unmethylierte bakterielle DNA, CpG-ODN (synthetisch)
TLR10	unbekannt, murin nicht funktionell
TLR11	urogene Bakterien, human inaktiv
TLR12, TLR13	unbekannt

Tab.1: Übersicht der Toll-like-Rezeptoren und ihrer wichtigsten Liganden

Durch Stimulation über TLRs kommt es u.a. zur Expression verschiedener Cytokine und Chemokine, die als Reaktion des Immunsystems gegen bakterielle und virale Infektionen von großer Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass bakterielles LPS in Makrophagen und Dendritischen Zellen neben einer Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen noch die Produktion von Th1-Differenzierungs-faktoren, wie IL-12, induziert (Akira *et al*, 2001; Anderson, 2000). Man kann somit beobachten, dass die TLRs ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort darstellen.

Mastzellen sind in der Lage, ein breites Spektrum an Toll-like Rezeptoren zu exprimieren, das sich je nach Mastzell-Population unterscheiden kann (Matsushima *et al*, 2004). So exprimieren die CTMC neben TLR2 und TLR4, noch TLR3, 7 und 9, wobei die drei letztgenannten bei BMDC, die als *in vitro*-Analogon mucosaler Mastzellen gelten, kaum nachzuweisen sind.

Eine Aktivierung von Mastzellen über TLR konnte zunächst bei peritonealen Mastzellen aus Ratten beobachtet werden. Nach Stimulation über den TLR4 mit LPS konnte die Produktion des proinflammatorischen Cytokins IL-6 induziert werden (Leal-Berumen *et al*, 1994). Anhand *in vitro*-generierter muriner BMDC konnte zudem gezeigt werden, dass LPS als starker Co-Stimulus die Produktion

der Cytokine IL-9 und IL-13 bei IgE-kreuzvernetzten Mastzellen verstärkt (Stassen *et al*, 2001).

In *in vivo*-Experimenten führt die Stimulation des TLR4 auf Mastzellen mit LPS zum einen zur mastzellabhängigen Freisetzung der proinflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, sowie zur daraus resultierenden Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Supajatura *et al*, 2001). Zudem konnten Orinska *et al*. feststellen, dass eine Aktivierung des TLR3 auf Mastzellen mittels poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic-acid) eine Freisetzung der Chemokine MIP-1 β , RANTES und KC verursachte und somit CD8⁺-T-Zellen angelockt wurden (Orinska *et al*, 2005).

Ein weiterer Toll-like Rezeptor, über den die Mastzelle aktiviert werden kann, ist der TLR9, welcher nach Stimulation mit CpG-Motiven aus bakterieller DNA die Produktion der proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-6 induziert (Zhu & Marshall, 2001).

Diese genannten Arbeiten verdeutlichen, dass die Mastzellaktivierung über TLRs eine wichtige Rolle für die angeborene Immunantwort spielen kann. Abhängig von der Art des TLR-Stimulus kann die Mastzelle auch in der Cytokin- und Chemokinexpression variabel reagieren (Matsushima *et al*, 2004).

Durch ihre Fähigkeit, nach einem TLR-Stimulus proinflammatorische Cytokine freizusetzen und somit die Entzündungsreaktion zu verstärken, könnte die Mastzelle sogar bei der anschließenden Entstehung einer erworbenen (adaptiven) Immunantwort eine Rolle spielen.

1.4 Struktur und Funktion von NFAT-Transkriptionsfaktoren

Mastzellen können, abhängig vom jeweiligen Stimulus, ein breites Spektrum von Cytokinen produzieren, was durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Seit mehreren Jahren wird an unserem Institut unter anderem die Funktion der Transkriptionsfaktorfamilie NFAT („nuclear factor of activated T cells“) untersucht, welche, außer in T-Zellen auch in Mastzellen exprimiert werden (Solymar *et al*, 2002). NFAT wurde erstmals als ein induzierbarer Transkriptionsfaktor beschrieben, der an den IL-2-Promoter von T-Zellen bindet und diesen transaktiviert (Shaw *et al*, 1988). Mittlerweile besteht die NFAT-Familie aus fünf Mitgliedern, NFATc1-c4 und NFAT5 (s. Tab.2), von denen, bis auf

NFATc4, alle in Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Weiterhin sind bis auf NFAT5 von allen Mitgliedern verschiedene Isoformen bekannt (Park *et al*, 1996; Inamura *et al*, 1998; Chuvpilo *et al*, 1999).

in der Arbeit verwendete Bezeichnung	synonyme Bezeichnungen
NFATc1	NFAT2, NFATc
NFATc2	NFAT1, NFATp
NFATc3	NFAT4, NFATx
NFATc4	NFAT3
NFAT5	TonEBP, OREBP, NFATz

Tab.2: Auflistung der verschiedenen Bezeichnungen der NFAT-Transkriptionsfaktoren

Die Mitglieder der NFAT-Transkriptionsfaktoren besitzen eine stark konservierte DNA-Bindedomäne, die eine strukturelle Verwandtschaft zur DNA-bindenden Domäne der Familie der Rel/NF- κ B-Transkriptionsfaktoren aufweist und daher als „Rel similarity domain“ (RSD) bezeichnet wird (Serfling *et al*, 2000). Alle NFATc-Formen besitzen am N-terminalen Ende eine Transaktivierungsdomäne, an die sich ein regulatorischer Bereich anschließt. Diese regulatorische Domäne ist durch Serin-reiche Motive (SRR) charakterisiert und enthält Bindestellen für verschiedene Proteinkinasen sowie für die aktivierende Phosphatase Calcineurin, die an der Regulation von NFAT-Faktoren beteiligt sind.

Bis auf NFAT5, das bei osmotischem Stress aktiviert wird, werden alle NFATc-Faktoren über ein starkes, lang anhaltendes Ca^{2+} -Signal aktiviert (Dolmetsch *et al*, 1997).

Wie aus folgender Abb.3 hervorgeht, gibt es zwei Wege, die Signaltransduktionskaskade für die Aktivierung von NFAT in Gang zu setzen (Gwack *et al*, 2007). Zum einen führt die Aktivierung verschiedener Immunorezeptoren (z.B. T-Zellrezeptor oder Fc ϵ RI auf Mastzellen) zur Aktivierung der Phospholipase- γ (PLC- γ) und somit zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Zum anderen können sogenannte G-protein coupled receptors (GPCR) nach Aktivierung der PLC- β ebenso diese Ca^{2+} -Freisetzung bewirken. Die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels hat wiederum, durch bisher nicht genau charakterisierte Mechanismen, die Öffnung der Ca^{2+} -abhängigen Kanäle (CRAC – Ca²⁺-release activated Ca²⁺-channels) in

der Plasmamembran zur Folge, wodurch es zu einem lang anhaltenden Einstrom extrazellulären Calciums und somit zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels kommt. Das Ca^{2+} bindet an das Trägermolekül Calmodulin (CaM), wodurch es nun in der Lage ist, die Phosphatase Calcineurin zu aktivieren. Calcineurin aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT durch Dephosphorylierung im Cytosol der Zelle, woraufhin NFAT in den Zellkern wandert und schließlich zur Transkription NFAT-abhängiger Gene führt (Gwack *et al*, 2007; Macian, 2005; Serfling *et al*, 2000; Crabtree & Olson, 2002).

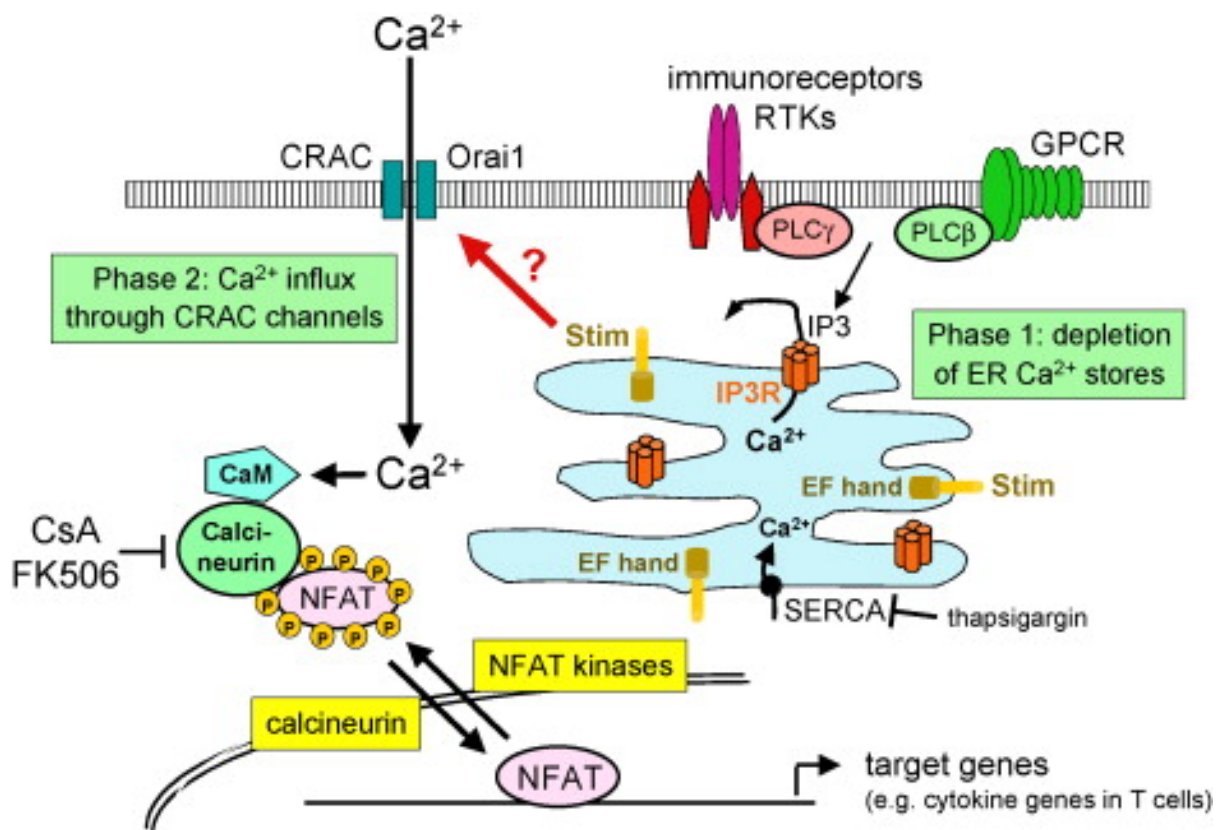


Abb.3: Aktivierung von NFATc- Transkriptionsfaktoren (Quelle: Gwack *et al*, Cell Calcium, 2007)

Es gibt zudem Möglichkeiten, die Aktivierung von NFATc-Faktoren gezielt zu unterbinden. Hierzu zählen die Inhibitoren für Calcineurin, wie die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK 506, die in der Lage sind, indirekt die Aktivierung der NFAT-Faktoren unterbinden (Macian, 2005; Coghlan *et al*, 1995; Sun *et al*, 1998).

Im Zellkern kann NFAT mit anderen Transkriptionspartnern interagieren und somit die Expression verschiedener Cytokingene regulieren. Alle bislang bekannten Interaktionspartner von NFAT und deren Ziel promotoren für die Expression verschiedener Cytokine sind in folgender Tabelle 3 aufgelistet.

Transkriptionspartner	Zielpromoter	Auswirkung
p21 ^{SNFT} ; PPAR- γ	IL-2 Promoter	Inhibition der NFAT-Aktivierung
ICER	viele verschiedene Promotoren	Inhibition der NFAT-Aktivierung
AP-1	viele verschiedene Promotoren	Aktivierung
MAF; IRF4	IL-4 Promoter	Aktivierung
GATA-3	IL-4 3' Enhancer	Aktivierung
EGR1- und -4	TNF Promoter	Aktivierung
OCT	IL-3 Enhancer	Aktivierung
T-bet	IFN- γ 5' Enhancer	Aktivierung
C/EBP	PPAR- γ Promoter	Aktivierung
MEF2	NUR77 Promoter	Aktivierung

Tab.3: Interaktionspartner von NFAT-Transkriptionsfaktoren während der Transkription verschiedener Cytokingene (Quelle: Macian, Nat Rev Immunol, 2005)

Wie bereits erwähnt, sind in Zellen des Immunsystems die Transkriptionsfaktoren NFATc1, c2 und c3 entscheidend an der Regulation verschiedener Cytokingene beteiligt. Anhand NFAT-defizienter Mausstämmen konnten verschiedene Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren *in vivo* bestimmt werden.

So sterben NFATc1-defiziente Mäuse bereits im embryonalen Stadium im Mutterleib aufgrund von Entwicklungsdefekten der Herzklappen und –scheidewände (de la Pompa *et al*, 1998). In chimären NFATc1^{-/-} / Rag-1^{-/-}-Mäusen zeigte sich eine reduzierte Anzahl von Thymozyten sowie verminderte Proliferation peripherer Lymphozyten und eine reduzierte Synthese von Th2-Cytokinen (Oukka *et al*, 1998).

Hingegen weisen Mäuse mit einer Doppeldefizienz der Transkriptionsfaktoren NFATc2 und c3 letale lymphoproliferative Erkrankungen auf. Die peripheren T-Zellen dieser Mäuse besitzen einen aktivierten Phänotyp, sind hyperproliferativ und weisen unabhängig von costimulatorischen Signalen eine Überproduktion von Cytokinen auf, was letztlich zu Autoimmunerkrankungen und zum Tod der Tiere im Alter von 8 – 10 Wochen führt (Ranger *et al*, 1998; Rengarajan *et al*, 2002). In diesem Zusammenhang konnte an unserem Institut gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen aus NFATc2/c3-doppeldefizienten Mäusen durch suppressive CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen in ihrer Aktivität nicht gehemmt werden können, wodurch

größtenteils die lymphoproliferative Fehlfunktion der T-Zellen zu erklären ist (Bopp *et al*, 2005).

Mäuse, die lediglich defizient für NFATc3 sind, unterscheiden sich in ihrer Entwicklung nicht von Wildtypmäusen. In ihrer T-Zellentwicklung weisen sie jedoch erhöhte Apoptose-Raten von Thymozyten auf und periphere T-Zellen besitzen einen aktivierten Phänotyp. Die Proliferation und Cytokinexpression dieser aktiviert erscheinenden T-Zellen ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp normal (Oukka *et al*, 1998).

NFATc2-defiziente Mäuse, die von drei Gruppen gleichzeitig generiert wurden, zeigen keine Defekte in der T-Zellentwicklung, besitzen jedoch eine leicht erhöhte Anzahl von T- und B-Zellen (Hodge *et al*, 1996; Xanthoudakis *et al*, 1996; Schuh *et al*, 1997). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die NFATc2-defizienten Tiere verstärkte Immunantworten in Infektions- und Allergiemodellen entwickeln, was einhergeht mit verstärkter Produktion von Th2-Cytokinen (Xanthoudakis *et al*, 1996; Schuh *et al*, 1998; Erb *et al*, 2003; Viola *et al*, 1998; Karwot *et al*, 2008).

Die oben genannten Beispiele verdeutlichen, dass die NFAT-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase spielen und sich im Falle von NFATc2 und c3 ihre Funktionen zumindest teilweise überlappen können (Serfling *et al*, 2006).

Wie an unserem Institut gezeigt werden konnte, ist die Funktion von Mastzellen bei Abwesenheit von NFATc2 beeinträchtigt (Klein *et al*, 2006). In BMMC konnte nach Stimulation mit Ionomycin nachgewiesen werden, dass die Expression von TNF- α und IL-13 stark vom Transkriptionsfaktor NFATc2 abhängig ist. NFATc1 scheint zusätzlich an der Produktion dieser Cytokine beteiligt zu sein, NFATc3 hingegen nimmt auf die TNF- α - und IL-13-Produktion keinen Einfluss.

In vivo konnte den NFAT-Transkriptionsfaktoren in Mastzellen bislang jedoch keine Funktion zugeordnet werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor NFATc2 wird in verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert. Bisherige Arbeiten konzentrierten sich auf die Funktionen von NFATc2 in T-Zellen und zeigten, dass dieser Faktor wichtig ist zur Aufrechterhaltung der T-Zellhomöostase. Das Fehlen von NFATc2 führt zu verstärkten Immunreaktionen in verschiedenen Mausmodellen der Infektion und Allergie.

Unsere bisherigen Arbeiten hingegen zeigten, dass das Fehlen von NFATc2 in Mastzellen zu einer starken Beeinträchtigung der Produktion entzündungsfördernder Cytokine und Th2-Cytokine führt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von NFATc2 in Mastzellen *in vivo* zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde ein von uns zuvor untersuchtes Modell der transkutanen Immunisierung verwendet, in dem Mastzellen wichtige Funktionen für die Ausprägung angeborener und adaptiver Immunreaktionen haben.

2. Material und Methoden

2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril und, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Greiner oder Costar bezogen.

2.2 Chemikalien

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

2.3 Cytokine

2.3.1 Cytokine zur Differenzierung und Kultivierung muriner Mastzellen („bone marrow-derived mast cells“ – BMMC)

Muriner rekombinanter Kit Ligand (mrKL)

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

Murines IL-3 (mIL-3)

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

Murines rekombinantes IL-4 (mrIL-4)

Das murine, rekombinante IL-4 wurde aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen gewonnen und anschließend über Affinitätschromatographie

gereinigt. Ein Unit ist die Konzentration, die bei der Zelllinie F4/4K.6 zur halbmaximalen Proliferation führt.

2.3.2 Cytokine zur Differenzierung und Kultivierung von murinen Dendritischen Zellen („bone marrow-derived dendritic cells“ – BMDC)

GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor)

GM-CSF wurde aus der Myelom-Zelllinie X63/0 gewonnen und ist im Kulturüberstand enthalten. Dieser Kulturüberstand wurde dem Kulturmedium in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt.

2.4 Puffer, Kulturmedien und Reagenzien

2.4.1 Puffer

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

Physiologische Trypanblaulösung

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

A: 0,2% Trypanblau in H₂O

B: 4,25% NaCl in H₂O

PBS (phosphate buffered saline)

81,8 g/l NaCl

15,6 g/l NaH₂PO₄ x 2H₂O

pH 6,6

Fötales Kälberserum (FCS)

Das fötale Kälberserum (FCS) wurde von der Firma Gibco (Charge 50G9993X) bezogen und zur Inaktivierung der Komplementkomponenten bei 56°C für 45 min im Wasserbad erhitzt.

Rinderserumalbumin (BSA):

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

Gey's Lysepuffer

8,28 g/l NH₄Cl

1,0 g/l KHCO₃

0,037 g/l EDTA

in H₂O; pH 7,29; 0,2µm sterilfiltriert

ACK-Puffer

8,02 g/l NH₄Cl

0,1 g/l KHCO₃

0,037 g/l EDTA

in H₂O; pH 7,3; 0,2µm sterilfiltriert

EDTA-Puffer

30 mM EDTA

0,01 % NaN₃

in PBS [1x]

GM-Puffer (großer MACS-Puffer)

0,5 % BSA

5 mM EDTA

0,01 % NaN₃

in PBS [1x]

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

10,8 g Tris Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

5.5 g Borsäure (H₃BO₃)

4 ml EDTA-Lösung (0,5M)

in H₂O, ad 1l

Waschpuffer (IL-10 ELISA)

0,05 % Tween 20

in PBS [1x], pH 7,4

Blockpuffer (IL-10 ELISA)

5 % BSA

25 g Sucrose

0,01 % NaN₃

in PBS [1x]

Diluent (IL-10 ELISA)

1 % BSA

in PBS [1x]

2.4.2 Kulturmedien

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

MEM (minimal essential medium)

10,58 g/l MEM Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

in H₂O, 0,2µm sterilfiltriert

IMDM (Iscove`s modified Dulbecco`s medium)

17,67 g/l IMDM Trockenpulver
3,02 g/l NaHCO₃
5x10⁻⁵ M β-Mercaptoethanol
100 I.U./l Penicillin / 100µg/l Streptomycin
in H₂O, pH 7,2, 0,2µm sterilfiltriert
Phenolrot als Indikator

Testmedium

IMDM mit
5 % FCS
1 mM Natriumpyruvat
2 mM Glutamin

KL-MZF (Kit-Ligand Mastzellfutter)

IMDM mit
10 % FCS
1 mM Natriumpyruvat
2 mM Glutamin
20 U/ml IL-3
50 U/ml IL-4
200 ng/ml Kit-Ligand (KL)

DC-Medium (zur Kultivierung von BMDC)

IMDM mit
10 % FCS
1 mM Natriumpyruvat
2 mM Glutamin

GM-CSF (Kulturüberstand der Myelom-Zelllinie X63/0, 1:100 eingesetzt)

2.4.3 Reagenzien

Ionomycin:

Das Ionomycin-Calciumsalz (aus *Streptomyces conglobatus*) ist ein Calcium-Ionophor, das zur Stimulation von Mastzellen eingesetzt werden kann. Dieses Ionophor erhöht den Calcium-Ionen-Gehalt in der Zelle, wodurch es zu einer Degranulation der Mastzellen kommt, sowie zur *de novo*-Synthese von Cytokinen. Es ist somit vergleichbar mit einer Aktivierung von Mastzellen über IgE/anti-IgE. Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1,3mM in Ethanol angesetzt, 50µM-Lösungen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Polyinosine-polycytidylic-acid (poly (I:C)):

Dieses Molekül ist ein synthetisches Analogon zu viraler doppelsträngiger DNA und bindet an den Toll-like Rezeptor 3.

Poly (I:C) wurde von der Firma Invitrogen bezogen, in sterilem, endotoxinfreiem Wasser gelöst (Stammlösung 1mg/ml) und bei -20°C gelagert.

SIINFEKL-Peptid

Das Peptid SIINFEKL wurde am Interfakultären Zentrum für Zellbiologie der Universität Tübingen synthetisiert und freundlicherweise von Stefan Stevanovic zur Verfügung gestellt.

CFDASE (CFSE)

5-(und-6)-Carboxyfluoreszein Diacetat, Succinimidyl Ester (5(6)-CFDASE; CFSE) wurde von Molecular Probes Europe BV bezogen und in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Die Stocklösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Je nach Anwendungen wurden die Zellen mit Konzentrationen von 0,4, 2 und 4µM angefärbt.

Dispase II

Die Dispase II wurde von der Firma Roche (Mannheim) bezogen und diente zur Ablösung der Epidermis von der Dermis. Sie wurde 0,5fach in MEM/2% FCS eingesetzt.

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper zur histologischen Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis

anti Langerin (CD207): polyklonales Ziegen IgG, eingesetzt 2µg/ml (Santa Cruz Biotechnology), Ziege anti Maus

Kaninchen anti Ziege: Alexa Fluor® 594 markiert, eingesetzt 5µg/ml (Molecular Probes)

2.5.2 Antikörper zur FACS-Analyse

anti Gr-1-FITC: Klon RB6-8C5, BD Pharmingen, 2,5µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti MHC-II-PE: Klon M5/114.15.2, BD Pharmingen, 0,5µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti F4/80-APC: Klon BM8, eBioscience, 0,5µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD11c-PE-Cy7: Klon N418, eBioscience, 0,33µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD3-APC-Cy7: Klon 145-2C11, BD Pharmingen, 0,5µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD25-PerCP: Klon PC61, BD Pharmingen, 0,2µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD69-PE-Cy7: Klon H1.2F3, BD Pharmingen, 0,33µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD44-FITC: Klon KM81, Immunotools 1:200 eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD62L-PE: Klon Mel-14, Immunotools 1:200 eingesetzt, Ratte anti Maus

anti CD8-APC: Klon 53-6-7, eBioscience, 0,5µg/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

anti TCR Vα2-PE:	Klon B20.1, eBioscience, 0,5 μ g/ml eingesetzt, Ratte anti Maus
anti CD16/32 (Fc-Block):	Klon 2.4G2, BD Pharmingen, 30 μ g/ml eingesetzt Ratte anti Maus
anti FcϵRI-PE:	Klon MAR-1, eBioscience, 0,5 μ g/ml eingesetzt, Ratte anti Maus
anti CD117-bio:	Klon 2B8, eBioscience, 0,5 μ g/ml eingesetzt, Ratte anti Maus

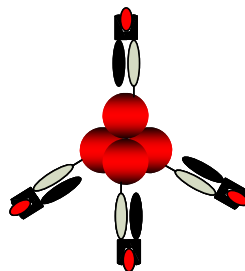
Streptavidin-FITC (SA-FITC):

SA-FITC wurde von BD Pharmingen bezogen und nach Angaben des Herstellers zur Fluoreszenzmarkierung (FITC) biotinylierter Antikörper eingesetzt.

SIINFEKL-H2K^b-Tetramer-PE:

Zur Detektion peptidspezifischer T-Zellen nach transkutane Immunisierung. Dieses mit Phycoerythrin (PE) fluoreszenzmarkierte Tetramer besteht aus MHC-I-Molekülen, die mit dem Peptid SIINFEKL beladen sind. Spezifische T-Zellen können an diesen Komplex binden.

Schematische Darstellung des Tetramermoleküls:



Das Tetramer wurde bezogen von Orpegen Pharma.

2.5.3 Antikörper für ELISA

anti IL-10:	Klon JES052A5, R&D Systems, Ratte anti Maus
anti IL-10-bio:	Klon nicht bekannt, R&D Systems, Ziege anti Maus

2.5.4 Antikörper für passive kutane Anaphylaxis

anti DNP-IgE: Klon SPE-7, Sigma-Aldrich, monoklonaler Maus-Antikörper

2.6 Mäuse

Alle Mäuse hatten als genetischen Hintergrund den C57Bl/6-Stamm.

Die NFATc2-defizienten Mäuse wurden von Prof. E. Serfling, Universität Würzburg, bezogen und in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) weitergezüchtet. Als mastzellloser Mausstamm diente Kit^{W-sh/W-sh}. Diese Tiere wurden von Prof. Marcus Maurer, Charité Berlin, bezogen und heterozygot in der ZVTE weiter verpaart. Zur Gewinnung peptidspezifischer T-Zellen (SIINFEKL) dienten OT-I-Mäuse. Die T-Zellen dieser Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch an den Komplex aus MHC-I K^b und dem Peptid SIINFEKL bindet. Die Tiere wurden von Jackson Laboratories bezogen und in der ZVTE weiter verpaart. Die Lang-DTR-EGFP-Mäuse wurden freundlicherweise von Bernard Malissen (Universität Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt und in der ZVTE weiter verpaart. Die „4-get-Mäuse“ wurden freundlicherweise von Prof. A. Gessner (Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt.

2.7 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die hierzu verwendeten Materialien, wie z.B. Pipetten oder Zellkulturplatten, wurden entweder steril bezogen oder vor Gebrauch sterilisiert. Die Kultivierung und Stimulation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂-Gehalt und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

2.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurde eine Probe der Zellsuspension mit Trypanblaulösung verdünnt. Dieser

Vitalfarbstoff färbt tote Zellen blau, während lebende Zellen durch ihre intakte Membran ungefärbt bleiben. Es wurden insgesamt 4 Großquadrate (bestehend aus 16 Kleinquadraten) ausgezählt, wobei tote Zellen in der Berechnung nicht berücksichtigt wurden.

Die Gesamt-Lebendzellzahl konnte wie folgt berechnet werden:

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

2.7.2 Präparation von Knochenmarkszellen

Alle Versuchstiere wurden vorher durch CO₂ abgetötet. Anschließend wurden die Ober- und Unterschenkelknochen (Tibia und Femur) der Hinterbeine entfernt und von der Muskulatur befreit. Nach Desinfektion mit Isopropanol wurden die Knochen an beiden Enden geöffnet und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und entsprechender Kanüle mit MEM ausgespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde zunächst gründlich resuspendiert, zur Abtrennung von groben Resten (z.B. Knochensplinter) über ein Zellsieb (70µm) gegeben und anschließend bei 500xg abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 2ml Gey's Lysepuffer aufgenommen. Durch Zugabe des 4fachen Volumens an MEM wurde die Reaktion nach ca. 1 Minute abgestoppt. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Knochenmarkszellen entsprechend kultiviert (s.u.).

2.7.3 Differenzierung von BMBC aus Knochenmarkszellen

Die Zellsuspension wurde nach der Zellzahlbestimmung auf eine Konzentration von 2-3x10⁶Zellen/ml mit KL-MZF eingestellt und in sterile 24-well-Platten mit 1ml/well gegeben. Die Zellen wurden alle drei Tage mit KL-MZF gefüttert und dabei auf neue 24-well-Platten umgesetzt. So konnten die entstehenden BMBC von adhärennten Zellen, wie z.B. Makrophagen, getrennt werden. Nach vier Wochen konnten die generierten BMBC für Versuche verwendet werden.

2.7.4 Differenzierung von BMDC aus Knochenmarkszellen

Die gewonnenen Knochenmarkszellen wurden in DC-Medium aufgenommen und mit $3 \times 10^6/4\text{ml}$ auf 6well Platten ausgesät. Nach 2 Tagen wurden 3ml des Überstandes nach leichtem Spülen verworfen und durch frisches Medium ersetzt. An Tag 4 wurden ebenfalls 3ml des Überstandes durch frisches Medium ersetzt, jedoch ohne zu spülen. Nach 5 Tagen in Kultur sind die Knochenmarkszellen zu unreifen Dendritischen Zellen (BMDC) ausdifferenziert und können nun weiter verwendet werden.

2.7.5 Stimulation von *in vitro*-generierten BMMC

Vier Wochen alte BMMC wurden geerntet, mit Testmedium gewaschen und in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in einer 24well-Platte ausgesät. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe des Calcium-Ionophors Ionomycin stimuliert. Die Endkonzentration an Ionomycin in den Testansätzen betrug $1\mu\text{M}$.

2.7.6 Präparation von Milzzellen

Alle Tiere wurden vorher durch CO_2 abgetötet. Anschließend wurden die Milzen entnommen, auf einem sterilen Zellsieb zerrieben und in einem Gefäß in MEM aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen gründlich resuspendiert, bei $500 \times g$ abzentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet für 1-2 Minuten in 2ml Gey's Lysepuffer aufgenommen und die Reaktion mit dem vierfachen Volumen MEM abgestoppt. Zur weiteren Verwendung wurden die Milzzellen noch zweimal mit PBS gewaschen.

2.7.7 Bestimmung des Gehalts von IL-10 in Kulturüberständen von BMMC

Nach Stimulation von BMMC aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen für 24 Stunden mit Ionomycin, wurde der Gehalt des Cytokins IL-10 quantitativ mittels ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) bestimmt. Der ELISA wurde nach

der Sandwichmethode (indirekt) nach Angaben des Herstellers (R&D Systems) durchgeführt. Alle Proben wurden als Verdünnungsreihe auf die ELISA-Platten aufgetragen und auf jeder Platte wurde ein bekannter Standard als Referenz zum Einstellen einer Eichgeraden mitgeführt. Nach Abstoppen der finalen Enzymreaktion wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 410nm mit Hilfe eines Photometers (SpectraFluor Plus, Fa. Tecan) gemessen. Die Errechnung der Cytokinkonzentration erfolgte im Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL.

2.7.8 Fluoreszenzfärbung von Zellen mittels Antikörper und anschließende FACS³-Analyse

Zur Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen (ca. 1×10^6) in 50µl GM-Puffer aufgenommen und mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern in den unter 2.5.3 angegebenen Konzentrationen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen und für die FACS-Analyse in 250µl GM-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte an einem FACS-Canto mit Hilfe der FACS-Diva Software (beides BD Pharmingen).

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Präparation von RNA aus BMMC

Zur Isolierung der RNA aus BMMC wurden zunächst die Zellen in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt und lysiert. Die Lyse sowie die RNA-Isolierung erfolgten gemäß Herstellerangaben des RNA-Isolations-Kit RNeasy[®] Mini Kit (50) (siehe Benutzer-Handbuch). Im letzten Schritt der RNA-Isolierung wurde die RNA mit 100µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.8.2 Präparation von RNA aus Geweben

Vor der RNA-Isolation wurden zunächst Mörser und Pistill mit Isopropanol gereinigt und auf -20°C im Gefrierschrank vorgekühlt. Die Mäuse wurden durch

³ FACS: fluorescence activated cell sorting - Durchflusscytometrie

CO₂ getötet und die Ohren an der Basis entfernt. Anschließend wurden die Ohren in Alufolie eingeschlossen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Jedes einzelne Ohr konnte nun im gefrorenen Zustand bis zu einem feinen Gewebepulver zermörsert werden.

Das Gewebepulver wurde mit Hilfe eines mit Isopropanol gereinigten Spatels in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt und unmittelbar ein mit β-Mercaptoethanol versetzten Guanidinthiocyanat-Puffer (RLT-Puffer, RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (50), Qiagen) hinzugegeben. Anschließend wurde das mit RLT-Puffer versetzte Gewebepulver zum weiteren Zerkleinern 15-20mal durch eine Kanüle gezogen und auf eine Kieselgel-Säule (QIAshredder[®], Qiagen) gegeben.

Die weitere RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNA-Isolations-Kits RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (50) (siehe Benutzer-Handbuch).

Im letzten Schritt der RNA-Isolierung wurde die RNA mit 100µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Um eine höhere RNA-Konzentration zu erhalten, wurde diese nach Elution mit den folgenden Zusätzen gefällt:

250µl (2,5faches Volumen)	Ethanol 100%
10µl	3M Natriumacetatlösung (in DEPC-H ₂ O)
1µl	Glykogen 20mg/ml in DEPC-H ₂ O

Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C.

Am nächsten Tag wurde die RNA bei 4°C für 10min abzentrifugiert (>10.000g) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde mit 1ml eiskaltem, 75%igen Ethanol gewaschen, bei 4°C für 20min abzentrifugiert (>10.000g) und der Überstand ebenfalls verworfen. Es folgte die Lufttrocknung des RNA-Pellets und dessen anschließende Aufnahme in 20µl DEPC-H₂O. Zum besseren Lösen des Pellets wurde, nach Zugabe der 20µl DEPC-H₂O, das Eppendorf-Gefäß für ca. 3-5min in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt und anschließend gevortext.

2.8.3 Photometrische Messung der RNA-Konzentration

Um vergleichbare RNA-Mengen in die reverse Transkription einzusetzen, wurde von jeder RNA-Probe der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Hierzu wurde 5µl

der gewonnenen RNA (2.8.2) in 95µl sterilem, destilliertem Wasser verdünnt und die optische Dichte (OD) bei einer Licht-Wellenlänge 260nm mit einem Photometer gemessen.

Eine optische Dichte von 1 entspricht einem RNA-Gehalt von 40µg/ml.

Unter Berücksichtigung der OD und des Verdünnungsverhältnisses konnte der RNA-Gehalt jeder Probe errechnet werden.

2.8.4 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben, wozu eine Mischung aus Oligo(dT)_n- und p(dN)₆-Primern verwendet wurde. Beim Oligo(dT)_n-Priming bindet dieser Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA, wodurch die Synthese der cDNA am 3`-Ende beginnt. Die Effizienz nimmt jedoch mit zunehmendem Abstand zum 3`-Ende ab. Beim p(dN)₆-Priming wird ein Gemisch von Hexanukleotid-Primern verwendet, welche an alle möglichen Sequenzabfolgen binden können. Hierdurch wird garantiert, dass alle mRNA-Sequenzen gleichmäßig vertreten sind, weil die vom 3`-Ende weiter entfernten Sequenzen durch die Oligo(dT)_n-Primer nicht begünstigt sind. Ein Nachteil ist jedoch, dass der Anteil unvollständig umgeschriebener mRNA-Moleküle steigt. Zur optimalen Ausbeute von cDNA wird eine Mischung beider Primer verwendet.

Zur reversen Transkription wurde folgender Ansatz gewählt:

3,5µg RNA, je nach Konzentration auf 11µl mit DEPC-Wasser
aufgefüllt
4µl 5x RT-Puffer (5x Buffer for M-MuLV RT, Fermentas)
2µl dNTP`s (10nM)
je 1µl Oligo(dT) / N₆ - Primer
1µl Reverse Transkriptase
(RevertAid™ M-MuLV RT 200U/µl, Fermentas)
Gesamtvolumen: 20µl

Der 20µl-Ansatz wurde zur Transkription für 1h bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Zur weiteren Verwendung für die verschiedenen PCRs wurde die erhaltene cDNA mit 80µl sterilem Wasser verdünnt.

2.8.5 Konventionelle PCR

In der PCR kommt es mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern zur 10^6 - 10^7 -fachen Anreicherung der nachzuweisenden cDNA. Die Primer wurden von der Firma Metabion in einer Konzentration von 100pmol/ml bezogen.

Verwendete Primer:

HGPRT

forward: 5`-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3`
reverse: 5`-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-3`

TNF- α

forward: 5`-TCT ACT GAA CTT CGG GGT GAT CGG TCC-3`
reverse: 5`-AGA TAG CAA ATC GGC TGA CGG TGT GGG-3`

IL-1 β

forward: 5`-AGG TGC TCA TGT CCT CAT CC-3`
reverse: 5`-CAG CGA GGC AGT ATC ACT CA-3`

TLR7

forward: 5`-CCA CCA GAC CTC TTG ATT CC-3`
reverse: 5`-TCC AGA TGG TTC AGC CTA CG-3`

MMCP-4

forward: 5`-ACC ACT GAG AGA GGG TTC ACA GC-3`
reverse: 5`-GAA GAC TCT GAT GCA CGC AGG TC-3`

IL-10

forward: 5`-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3`
reverse: 5`-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3`

PCR-Ansatz:

17,15µl	H ₂ O
2,5µl	10x PCR-Puffer (Biotherm)
1,25µl	MgCl ₂ (50mM)
2,5µl	cDNA
1µl	Primerpaar (je 5pmol/µl)
0,5µl	dNTP`s (10mM)
0,1µl	Taq-Polymerase (Biotherm)

PCR-Programm 1: für Ansatz mit HGPRT

94°C	2min	1x
94°C	30s	} 30x
60°C	30s	
68°C	1min	

PCR-Programm 2: für Ansatz mit restlichen Primern

94°C	2min	1x
94°C	30s	} 35x
60°C	30s	
68°C	1min	

Nach der konventionellen PCR wurde jeder Ansatz mit 2,5µl Ladepuffer(10x) versetzt, 20µl auf ein 1,5%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (0,2µg/ml) aufgetragen und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

2.8.6 Semiquantitative RealTime-PCR

Bei dieser PCR-Methode, welche auf dem gleichen Prinzip wie der konventionellen PCR beruht, besteht die Möglichkeit der Quantifizierung. Hierbei lässt sich eine Aussage über die relative Expression von mRNA zwischen unterschiedlichen Proben machen. Nach Normalisierung der jeweiligen Expressionen zur Expression des Haushaltsgens HGPRT wurden die C_T-Werte der Proben miteinander verglichen. Die PCR wurde in Triplikaten unter Verwendung des Absolute SYBR Green Fluorescein Mix (ABgene), welche bereits

den benötigten Fluoreszenzfarbstoff, sowie Puffer, Polymerase und MgCl₂ enthält, auf einem iCycler (Bio-Rad) durchgeführt.

Verwendete Primer:

HGPRT

forward: 5`-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3`

reverse: 5`-GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT-3`

MCP-1

forward: 5`-CTC AGC CAG ATG CAG TTA ACG-3`

reverse: 5`-TTG GGA TCA TCT TGG TGG TG-3`

KC

forward: 5`-CAC CCA AAC CGA AGT CAT AGC-3`

reverse: 5`-AGC CAG CGT TCA CCA GAC AGG-3`

2.8.7 mRNA-Microarray

Die mRNA wurde, wie unter 2.8.1 beschrieben, aus jeweils 1x10⁷ BMMC von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen isoliert. Der mRNA-Microarray wurde in einer Kooperation von Dr. M.S. Staeger (Universität Halle(Saale)) durchgeführt. Der Microarray, GeneChip[®] Mouse Genome 430A, wurde von der Firma Affimetrix bezogen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes EXCEL.

2.9 Histologische Methoden

2.9.1 Präparation der Epidermis

Zur Präparation der Epidermis wurden die Ohren abgetrennt und in eine dorsale und ventrale Hälfte geteilt. Anschließend wurde die dorsale Hälfte mit der Epidermis nach oben für 20 Minuten und bei 37°C auf eine 0,5%ige

Dispaselösung gelegt. Nach Inkubation wurde in PBS die Epidermis vom Ohr abgetrennt. Diese wurde zur weiteren Verwendung in Aceton für 15 Minuten fixiert.

2.9.2 Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis

Nach Fixierung der Epidermis wurde diese für jeweils 15 Minuten in PBS und PBS/0,5% BSA gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Ratte anti Maus Langerin – 2µg/ml in PBS/0,5% BSA) für eine Stunde bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die Epidermis 2x für 15 Minuten mit PBS/0,5% BSA gewaschen. Danach folgte die Färbung mit einem sekundären, AlexaFluor®594 markierten Ziege anti Ratte Antikörper (5µg/ml in PBS/0,5% BSA) wieder für 1 Stunde bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/0,5% BSA wurden die Epidermen auf Objektträger gebracht und mit Eindeckmedium (AquaPolymount, Polysciences, USA) eingebettet. Die Präparate wurden mit Deckgläschen abgedeckt, mit Nagellack versiegelt und im Fluoreszenzmikroskop wurde unter Verwendung der Cell^R Imaging Software (Olympus) die Zahl der Langerhanszellen ermittelt. Hierzu wurden in jedem Präparat 3 Quadrate an unterschiedlichen Stellen zu je 300x400µm ausgezählt.

2.9.3 Histologische Färbung von dermalen Mastzellen

Zur Färbung dermalen Mastzellen wurden die abgetrennten Ohren in Paraffin eingebettet und 5µm dicke Längsschnitte an einem Mikrotom angefertigt, welche anschließend auf Objektträger gelegt wurden. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe gewaschen (Ethanol 100%, 95%, 70%, 50%, H₂O). Zum Blocken wurden die Schnitte für eine Stunde in PBS + 10% FCS/1% BSA inkubiert. Die Färbung der Mastzellen erfolgte mittels fluoreszenzmarkiertem Avidin (Alexa Fluor®488), welches in einer Konzentration von 2µg/ml in PBS + 10% FCS/1% BSA für eine Stunde hinzugegeben wurde. Avidin ist ein Glykoprotein und bindet an Heparin, das in den Granula von Mastzellen gespeichert wird. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit Eindeckmedium (AquaPolymount, Polysciences, USA) eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.10 Passive kutane Anaphylaxis („passive cutaneous anaphylaxis“ – PCA)

Zu Beginn des Versuches wurden die Mäuse zunächst mit einer Mischung von Ketamin[®] (Ratiopharm) 71,2mg/Maus und Rompun[®] (Bayer) 0,2mg/Maus durch intraperitoneale Injektion betäubt. Anschließend erfolgte eine intradermale Injektion von 1µg anti-DNP⁴ IgE in 30µl PBS in ein Ohr und 30µl PBS als Kontrolle in das kontralaterale Ohr. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse mit Antigen (DNP-HSA⁵) provoziert. Hierzu wurden 100µl einer 0,5%igen Evans blue-Lösung (in PBS gelöst) mit 0,5mg/ml DNP-HSA in die Schwanzvene intravenös injiziert. Nach 30 Minuten wurden die Tiere mit CO₂ abgetötet, die Ohren entfernt und gewogen. Diese wurden anschließend zur Extraktion des Farbstoffes für 24 Stunden bei 55°C in 500µl Formamid inkubiert. Die optische Dichte (OD) des extrahierten Farbstoffes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 620nm gemessen und diese mit dem Gewicht des jeweiligen Ohres ins Verhältnis gesetzt (mOD/mg Ohr).

2.11 Behandlung der Mäuseohren mit Aldara/5% Imiquimod Creme

Zum Eincremen der Ohren wurden die Mäuse zunächst mit dem Inhalationsanästhetikum Forene[®] betäubt. Die Imiquimodbehandlung erfolgte durch gleichmäßiges Auftragen von ca. 40mg Aldara/5% Imiquimod Creme (3M Pharmaceuticals) auf die dorsale und ventrale Seite jedes Ohres. Das kontralaterale Ohr wurde zur Kontrolle mit Salbengrundlage (ohne Wirkstoff Imiquimod) aufgetragen. Die Behandlung dauerte je nach Versuch 3 bis 6 Tage an.

2.12 Rekonstitution der Ohren von mastzellosen Mäusen mit BMBC

Unmittelbar vor Rekonstitution wurden die mastzellosen Kit^{W-sh/W-sh} Mäuse mit einer Mischung von Ketamin[®] (Ratiopharm) 71,2mg/Maus und Rompun[®] (Bayer)

⁴ DNP: **D**initrophenyl. Das DNP ist ein sogenanntes Hapten. Haptene sind kleine organische Moleküle, die zur Gruppe der Antigene gehören, aber selbst nicht in der Lage sind, eine Immunreaktion hervorzurufen. Dies ist nur möglich, wenn sie an ein Träger-Protein gebunden sind (Hapten-Carrier-Prinzip).

⁵ DNP-HSA: Das beschriebene DNP ist zur Provokation der Mäuse an das Trägerprotein HSA (**h**umanes **S**erum**a**lbumin) gebunden.

0,2mg/Maus durch intraperitoneale Injektion betäubt. Anschließend wurden 5×10^5 BMMC in 50 μ l PBS in die Ohrfalte intradermal injiziert. Nach einer Dauer von 6 Wochen sind die BMMC in vivo zu dermalen Mastzellen ausdifferenziert und die Mäuse anschließend für weitere Versuche verwendbar.

2.13 Messung der Ohrschwellung

Die Ohrschwellung wurde täglich unmittelbar vor jeder Imiquimodbehandlung an den narkotisierten Mäusen bestimmt (s. 2.10), wozu eine Testarm-Messuhr (Fa. Mitutoyo) verwendet wurde. Die gemessenen Ohrschwellungen wurden auf den unbehandelten Zustand der Ohren zu Beginn des Versuches (d0) bezogen.

2.14 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Ohrgewebe

Die Mäuse wurden mittels CO₂ getötet, die Ohren entfernt und jeweils in eine dorsale und ventrale Hälfte zerteilt. Die beiden Hälften eines Ohres wurden in MEM + 0,5mg/ml Liberase (BD Pharmingen) und 0,5mg/ml DNase für 90min bei 37°C inkubiert. Zur anschließenden Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden beide Hälften in 1ml MEM für 5-7 Minuten mit Hilfe einer sogenannten „Medimachine“ geschreddert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zweimal mit GM-Puffer gewaschen, mit den entsprechenden Antikörpern fluoreszenzgefärbt und im FACS analysiert.

2.15 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten

Die Mäuse wurden mittels CO₂ getötet und die aurikularen Lymphknoten entnommen. Jeder Lymphknoten wurde unter Verwendung von PBS zwischen zwei Objektträgern zerrieben, anschließend über ein Zellsieb (70 μ m) gegeben und zur weiteren Verwendung einmal mit PBS gewaschen.

2.16 Immunisierung mit Dendritischen Zellen

In vitro-generierte BMDC (s. 2.7.4) aus NFATc2^{-/-}-Mäusen wurden nach 6 Tagen geerntet und in Testmedium aufgenommen (1x10⁶/ml). Die in der 24well-Platte ausgesäten BMDC wurden mit dem TLR3-Ligand poly(I:C) (50µg/ml) für 18 Stunden stimuliert. Nach Stimulation wurden die Zellen mit Testmedium gewaschen und für eine Stunde bei 37°C mit SIINFEKL (100nM) inkubiert (1x10⁶Zellen/well in 1ml). Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese anschließend für die intraperitoneale Injektion in NFATc2^{+/+}- und NFATc2^{-/-}-Mäuse verwendet (1x10⁶).

2.17 Transkutane Immunisierung (TCI)

Vor transkutaner Immunisierung wurden die Mäuse 2 Tage vor Versuchsbeginn großflächig am Rücken rasiert, um eventuelle Hautreizungen abklingen zu lassen. Hiernach wurden die Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf dem rasierten Rücken mit ca. 40mg Creme (Aldara/5% Imiquimod) + 100µg SIINFEKL immunisiert (d0, d1).

2.18 Nachweis von peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Sechs Tage nach erster Immunisierung wurde den Mäusen durch Anritzen der Schwanzvene Blut entnommen (in ein mit EDTA-Puffer gefülltes Eppendorf-Cup). Die Blutproben wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zur Lyse der Erythrozyten für 5 Minuten und 4°C in ACK-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in GM-Puffer gewaschen und zum Nachweis der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit folgenden Antikörpern, etc. fluoreszenzgefärbt:

SIINFEKL-H2K^b Tetramer PE (Fa. Orpegen)

anti CD44-FITC (1:200)

anti CD25-PE- Cy7 (0,25µg/ml)

anti CD62L-APC (0,2µg/ml)

anti CD8-APC. Cy7 (1µg/ml)

Propidiumiodid (um tote Zellen von der Analyse auszuschließen)

Nach Inkubation der Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C wurde 1µl SIINFEKL-H2K^b-Tetramer-PE zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen und unmittelbar vor der FACS-Analyse mit Propidiumiodid versetzt.

2.19 In vivo Cytotoxizitätstest

Um die cytotoxische Aktivität der nach TCI aktivierten peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden den Mäusen peptidbeladene und CFSE-markierte Zielzellen intravenös injiziert. Hierzu wurden nach dem Abtöten aus Wildtypmäusen (C57Bl/6), wie unter 2.7.6 beschrieben, die Milzen entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese Zellen wurden auf 2×10^7 /ml in PBS eingestellt und anschließend hälftig aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit einer hohen Konzentration CFSE (4µM) und die andere mit einer niedrigen Konzentration (0,4µM) für 4 Minuten bei 37°C markiert. Durch Zugabe des 2fachen Volumens von TM + 10% FCS wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellen mit jeweils 10ml TM+ 10% FCS, TM+ 5% FCS und IMDM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, die mit der niedrigen Konzentration (0,4µM) CSFE gefärbt worden waren, zusätzlich mit Peptid beladen. Hierzu wurden die Zellen auf 2×10^7 /ml in IMDM eingestellt und mit dem Peptid SIINFEKL (Endkonzentration 1µM) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen beider Konzentrationen in einem Verhältnis von 1:1 vermischt, auf 2×10^7 /300µl eingestellt und 300µl der Zellsuspension i.v. in die immunisierten Mäuse injiziert. Acht Stunden (mit Imiquimod immunisierte Mäuse) bzw. 20 Stunden (mit DC immunisierte Mäuse) nach Injektion wurden die Milzen der Mäuse entnommen, wie unter 2.7.6 beschrieben, präpariert und im FACS die Anwesenheit von peptidbeladenen, CFSE-markierten Zielzellen analysiert.

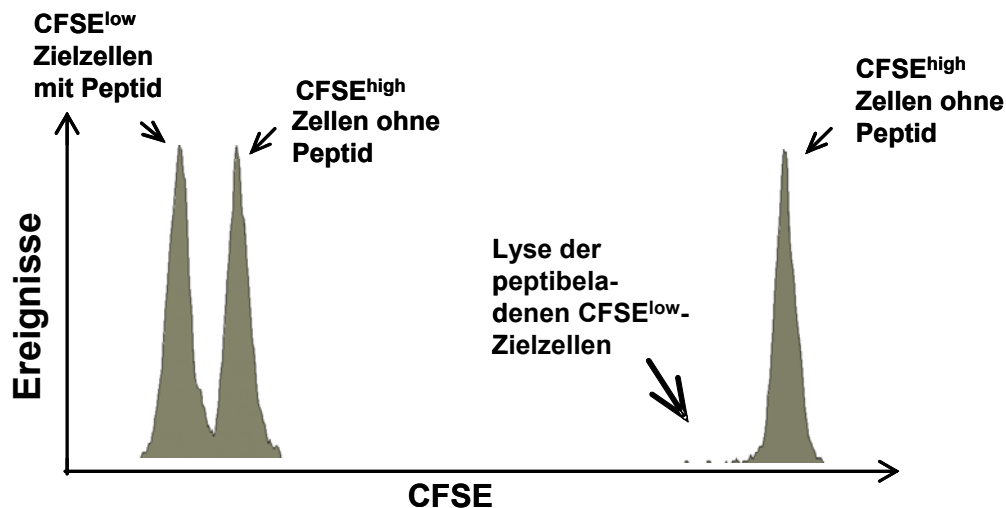


Abb.1: Beispiel der FACS-Analyse eines Cytotoxizitätstests. Nach Immunisierung werden die peptidbeladenen, $CFSE^{low}$ -markierten Zielzellen abgetötet und sind im FACS nicht mehr nachweisbar

Nach erfolgreicher Immunisierung kommt es zur Lyse der peptidbeladenen, $CFSE^{low}$ -markierten Zielzellen durch peptidspezifische $CD8^+$ T-Zellen (s. Abb.1), nach der diese Population im FACS nicht mehr nachweisbar ist. Anhand folgender Formel wird anschließend der prozentuale Anteil der lysierten Zellen errechnet:

$$\text{Lyse der Zielzellen [\%]} = \frac{(\text{Anzahl unbeladener Zellen} - \text{Anzahl peptidbeladener Zellen})}{(\text{Anzahl unbeladene Zellen})} \times 100\%$$

2.20 Proliferationstest peptidspezifischer $CD8^+$ T-Zellen *in vivo*

Einen Tag vor Immunisierung der Mäuse wurden zunächst Milzzellen aus transgenen OT-I-Tieren (s. 2.7.6) gewonnen. Anschließend wurde den Zellen CFSE hinzugegeben (Endkonzentration $2,5\mu\text{M}$) und bei 37°C für 4 Minuten inkubiert. Durch Zugabe des 2fachen Volumens von TM + 10% FCS wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellen mit jeweils 10ml TM+ 10% FCS, TM+ 5% FCS, IMDM und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf $1 \times 10^7/200\mu\text{l}$ in PBS eingestellt und in die zu immunisierenden Mäuse i.v. injiziert (Tag -1). An den nächsten beiden Tagen erfolgte jeweils eine Immunisierung mit ca. 40mg der Creme Aldara/5% Imiquimod vermischt mit $100\mu\text{g}$ SIINFEKL am rechten Ohr der jeweiligen Maus. Auf die Kontrollohren wurde lediglich die Creme (ohne Peptid) aufgetragen. Wiederum einen Tag später (Tag 2) wurden die Mäuse

mittels CO₂ getötet, die lokalen aurikularen Lymphknoten isoliert und wie unter 2.14 beschriebenen Zellsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem anti-CD8 Antikörper gefärbt und im FACS analysiert.

3. Ergebnisse

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist die Funktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 in T-Zellen vergleichsweise gut untersucht, und es zeichnet sich insbesondere ab, dass NFATc2 an der Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase beteiligt ist. T-Zellen aus NFATc2-defizienten Mäusen besitzen einen aktivierten Phänotyp und weisen nach Stimulation eine erhöhte Produktion der Th2-Cytokine IL-4, -5, -9 und -13 auf. Vermutlich deshalb neigen NFATc2-defiziente Tiere bei Infektionen und allergischen Entzündungsreaktionen zu verstärkten Immunantworten (Viola *et al*, 1998; Xanthoudakis *et al*, 1996; Schuh *et al*, 1997). Arbeiten an unserem Institut hingegen zeigten, dass bei Mastzellen, welche *in vitro* generiert wurden (BMMC), durch das Fehlen von NFATc2 die Expression von TNF- α und Th2-Cytokinen stark beeinträchtigt ist (Klein *et al*, 2006).

Bei der Induktion von Entzündungsreaktionen spielen Toll-like Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle und können daher als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort angesehen werden. An *ex vivo* kultivierten Mastzellen, die aus Vorläufern in embryonaler Haut gewonnen wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Mastzellen ein breites Spektrum von Toll-like Rezeptoren (TLR-2,-3,-4, -7 -9) exprimieren (Matsushima *et al*, 2004; Marshall, 2004; Supajatura *et al*, 2002). Nach deren Stimulation sind sie in der Lage, rasch entzündungsfördernde Mediatoren, wie TNF- α , freizulassen. Erst kürzlich konnte von uns gezeigt werden, dass Mastzellen dadurch sogar an der Entstehung einer adaptiven Immunantwort entscheidend beteiligt sind (Heib *et al*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem mastzellabhängigen Modell der Mauhaut die Rolle von NFATc2 in der Entzündungsreaktion und Ausprägung einer cytotoxischen T-Zellantwort untersucht. Darüber hinaus war die Abhängigkeit der Mastzellfunktion vom Transkriptionsfaktor NFATc2 in diesem Modell von besonderem Interesse.

3.1 Die TLR7-vermittelte Entzündungsreaktion der Haut ist bei NFATc2-defizienten Mäusen stark verzögert

Die lokale Applikation des synthetischen TLR7-Liganden Imiquimod löst starke Entzündungsreaktionen der Haut aus. Imiquimod ist der wirksame Bestandteil der

als Medikament zugelassenen Creme Aldara, die in der Humanmedizin zur Therapie von Warzen und Melanomen eingesetzt wird.

Daher wurde zunächst untersucht, ob der Transkriptionsfaktor NFATc2 an der TLR7-vermittelten Entzündungsreaktion beteiligt ist. Hierzu wurde ca. 2mg Imiquimod als Creme (Aldara® 5% Imiquimod) täglich auf die Ohren von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen appliziert (siehe Material und Methoden 2.11). Im Folgenden wird die Applikation dieser Menge an Creme kurz als „Imiquimodbehandlung“ bezeichnet. Als Maß für die Entzündung diente die tägliche Messung der Ohrschwellung.

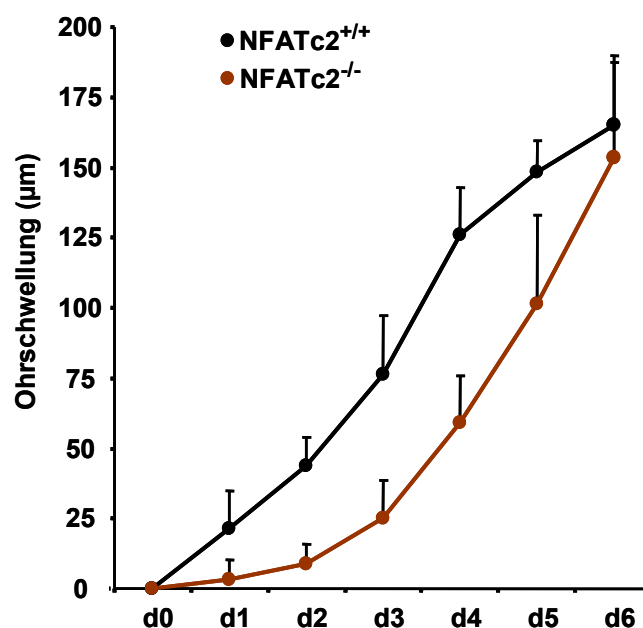


Abb.1: Verspätete Entzündungsreaktion NFATc2-defizienter Mäuse nach Behandlung mit Imiquimod

Es wurden täglich ca. 2mg Imiquimod in Form der Creme Aldara® auf das rechte Ohr jedes Tieres aufgetragen. Vor jeder Behandlung wurde die Schwellung des rechten Ohres gemessen. Die Schwellung des Ohres vor der ersten Behandlung (an Tag 0) wurde als 0 definiert. n = 6.

Bereits einen Tag nach erstmaliger Applikation von Imiquimod kann in den Wildtyp-tieren eine deutliche Ohrschwellung gemessen werden (Abb.1). Diese nimmt stetig und mit fortlaufender Behandlung zu, wobei sich nach Tag 4 die tägliche Zunahme der Ohrschwellung etwas reduziert. An Tag 6 hat sich die Dicke der Ohren nahezu verdoppelt, welche bei 6 – 8 Wochen alten Mäusen in unbehandeltem Zustand ca. 170µm beträgt. Bei NFATc2-defizienten Mäusen hingegen kommt es erst zwei Tage später zu einem signifikanten Anstieg der Ohrschwellung, d.h. erst an Tag 3 erreicht die Schwellungsreaktion ein

vergleichbares Niveau wie in Wildtyp-Mäusen an Tag 1. Diese verspätet entstehende Schwellung bei den NFATc2-defizienten Mäusen steigt jedoch mit täglicher Behandlung stetig an und erreicht schließlich an Tag 6 das Niveau des Wildtyps.

Wie bereits berichtet (Palamara *et al*, 2004), kommt es während der TLR7-vermittelten Schwellungsreaktion zum Influx verschiedener Entzündungszellen in das Gewebe. Um den Hintergrund der verzögerten Entzündungsreaktion bei NFATc2-defizienten Mäusen genauer zu untersuchen, wurde das Ohrgewebe auf infiltrierende Zellpopulationen mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die tägliche Imiquimodbehandlung eine massive Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe zur Folge hat (Palamara *et al*, 2004). Im Wesentlichen konnten hierbei Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen nachgewiesen werden.

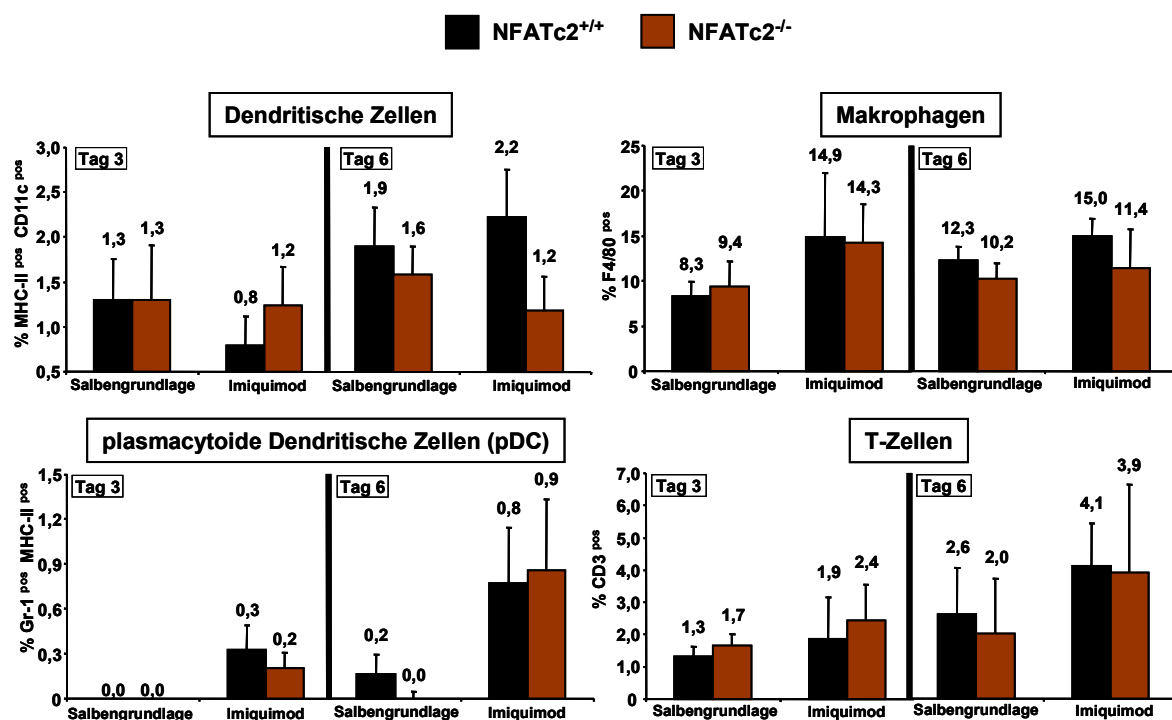


Abb.2: Influx von Entzündungszellen in das Ohrgewebe nach 3 und 6 Tagen täglicher Imiquimodbehandlung

Wildtyp- und NFATc2-defiziente Mäuse wurden über 3 bzw. 6 Tage einmal täglich mit Imiquimod am rechten Ohr und mit der gleichen Menge Salbengrundlage⁶ (ohne Wirkstoff) am linken Ohr behandelt. Nach Tag 3 und 6 wurden Zellsuspensionen des Gewebes hergestellt und mittels FACS auf Anwesenheit verschiedener Leukozytenpopulationen analysiert. n = 6-8. * p < 0,001.

⁶ Salbengrundlage: enthält alle Inhalts- und Trägerstoffe ausgenommen den Wirkstoff Imiquimod

Wie in Abb.2 ersichtlich, kann ab Tag 3 nach täglicher Imiquimodbehandlung ein leichter Einstrom von plasmacytoiden DC (MHC-II^{pos} / Gr-1^{pos}) in das Ohrgewebe beobachtet werden. Diese pDC produzieren nach Aktivierung große Mengen an Typ-I-Interferonen (IFN- α , β). Daher wird ihnen eine wichtige Bedeutung bei Entzündungsreaktionen zugeschrieben. Weiterhin kann man an Tag 6 einen leichten Einstrom CD3⁺ Zellen erkennen und bereits an Tag 3 einen Influx von Makrophagen (F4/80^{pos}). Diese analysierten Zellpopulationen zeigten jedoch bezüglich Einwanderung in das entzündete Ohrgewebe keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen.

Betrachtet man jedoch die Einwanderung neutrophiler Granulozyten (Gr-1^{pos} / MHC-II^{neg}), so kann man an Tag 3 beträchtliche Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen erkennen (Abb.3).

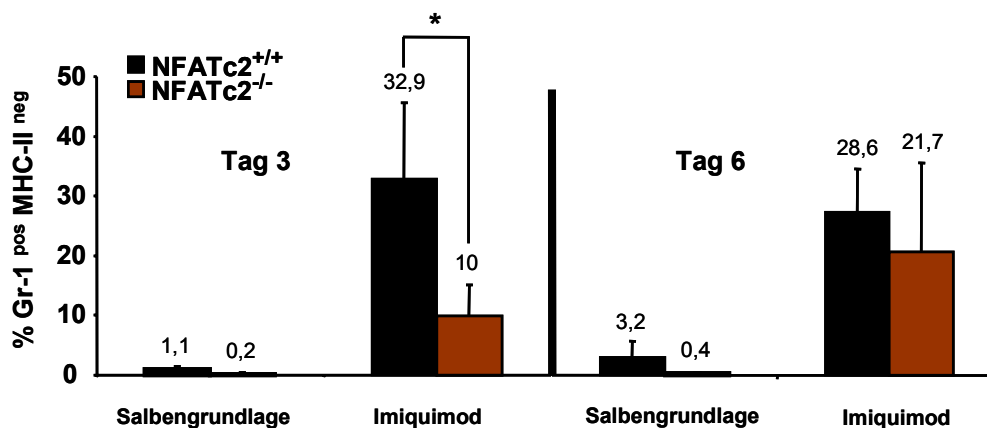


Abb.3: NFATc2 trägt entscheidend zum schnellen Influx von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe bei

Wildtyp- und NFATc2-defiziente Mäuse wurden über 3 bzw. 6 Tage hinweg einmal täglich mit Imiquimod am rechten Ohr und mit der gleichen Menge Salbengrundlage (ohne Wirkstoff) am linken Ohr behandelt. Nach Tag 3 und 6 wurden Zellsuspensionen des Gewebes hergestellt und mittels FACS auf Anwesenheit von Gr-1^{pos} MHC-II^{neg} neutrophilen Granulozyten analysiert. n = 6-8.

* p < 0,001.

Hier kommt es nach täglicher Imiquimodbehandlung im Ohrgewebe der Wildtyp-Mäuse zu einem sehr starken Influx von neutrophilen Granulozyten (Gr-1^{pos} MHC-II^{neg}), die an Tag 3 bereits 32,9% der Gesamtzellzahl der Ohr-Zellsuspension darstellen. Dieser Influx fällt bei NFATc2-defizienten Mäusen mit nur 10% wesentlich geringer aus. An Tag 6 ist die Anzahl der Granulozyten im Ohrgewebe der Wildtyp-Tiere wieder leicht rückläufig, bei NFATc2-defizienten Tieren hingegen sind weiter Granulozyten eingewandert, so dass zu diesem Zeitpunkt eine Nivellierung der Granulozytenzahlen erreicht wird. Dieses Ergebnis steht im

Einklang mit der in Abb.1 dargestellten Schwellungsreaktion und zeigt, dass durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors NFATc2 der Influx wichtiger Entzündungszellen, in Form neutrophiler Granulozyten, stark beeinträchtigt ist.

Proinflammatorische Cytokine und Chemokine spielen bei Entzündungsreaktionen eine große Rolle. Diese Botenstoffe erweitern die umliegenden Gefäße und erhöhen die Permeabilität für Plasmabestandteile und Zellen. Endothelzellen der Gefäße werden außerdem veranlasst, lokal Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, wodurch Effektorzellen in das Gewebe einwandern und anhand des Chemokingradienten an den Entzündungsherd gelangen können. In diesem Zusammenhang wurde die Expression verschiedener Cytokine und Chemokine nach Behandlung mit Imiquimod untersucht, die auf die Entzündungsreaktion Einfluss nehmen könnten.

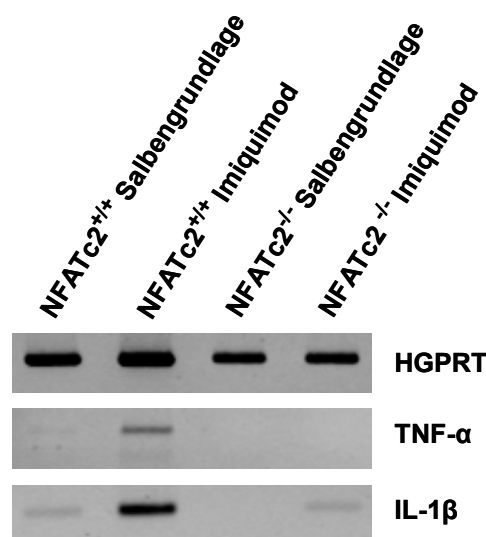


Abb.4: Die Expression der proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-1 β ist nach Imiquimodbehandlung bei NFATc2-defizienten Mäusen stark beeinträchtigt

Zwei Stunden nach der Applikation von Imiquimod oder Salbengrundlage auf die Ohren von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurde RNA aus diesen isoliert und die Expression von TNF α und IL-1 β mRNA untersucht. Die mRNA des Haushaltgens HGPRT diente als Referenz.

Bereits zwei Stunden nach Applikation von Imiquimod ist zu erkennen, dass eine Induktion der mRNA-Expression der proinflammatorischen Moleküle TNF- α und IL-1 β in Wildtyp-Mäusen stattfindet (Abb.4). Im Ohrgewebe, das mit Salbengrundlage behandelt wurde, ist keine Induktion der entsprechenden Cytokine erkennbar. Bei NFATc2-defizienten Tieren ist die mRNA-Expression der

proinflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-1 β nach Imiquimodbehandlung hingegen stark beeinträchtigt.

Anschließend wurde die mRNA-Expression des Chemokins KC und des Typ-I-Interferons IFN- β untersucht. Das Chemokin KC ist für die Anlockung von neutrophilen Granulozyten wichtig. IFN- β wird von virusinfizierten Zellen gebildet (TLR7-vermittelt; Rezeptor für einzelsträngige RNA) und kann Makrophagen und NK-Zellen aktivieren.

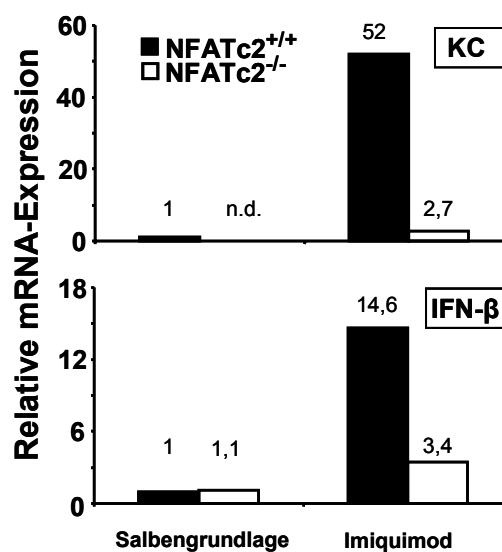


Abb.5: In NFATc2-defizienten Mäusen ist die Induktion der mRNA-Expression von KC und IFN- β nach Imiquimodbehandlung stark vermindert

Zwei Stunden nach der Applikation von Imiquimod oder Salbengrundlage auf die Ohren von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurde die RNA aus diesen isoliert und die Expression von KC und IFN- β mRNA untersucht. HGPRT diente als Haushaltsgen.

Nach der Applikation von Imiquimod auf die Ohren kommt es in Wildtyp-Mäusen zu einer sehr starken Induktion (Faktor 52) der mRNA des Chemokins KC, welches in NFATc2-defizienten Mäusen lediglich schwach induziert wird (Faktor 2,7). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse und zeigt, dass NFATc2 für die TLR7-vermittelte Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielt.

Die Induktion der IFN- β mRNA ist in NFATc2-defizienten Mäusen ebenfalls stark vermindert (Abb.5).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass in NFATc2-defizienten Tieren die Auslösung einer raschen Entzündungsreaktion stark beeinträchtigt ist. Dies ist

durch einen verzögerten Influx von neutrophilen Granulozyten in das Gewebe gekennzeichnet, was mit der starken Reduktion wichtiger entzündungsfördernder Substanzen (TNF, KC, IFN- β) in Einklang steht.

3.2 Die Auswanderung von Langerhanszellen nach Applikation von Imiquimod ist größtenteils abhängig vom Transkriptionsfaktor NFATc2

Neben der entzündungsfördernden Funktion proinflammatorischer Cytokine haben diese zusätzlich Einfluss auf die Reifung und Auswanderung antigenpräsentierender Zellen. Diese Zellen präsentieren das aufgenommene Antigen nach Migration zum lokalen Lymphknoten den naiven T-Zellen und können daraufhin eine spezifische Immunantwort induzieren. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Imiquimod die Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis induziert (Suzuki *et al*, 2000). Daher sollte zunächst untersucht werden, ob diese TLR7-vermittelte Auswanderung der Langerhanszellen vom Transkriptionsfaktor NFATc2 abhängig ist.

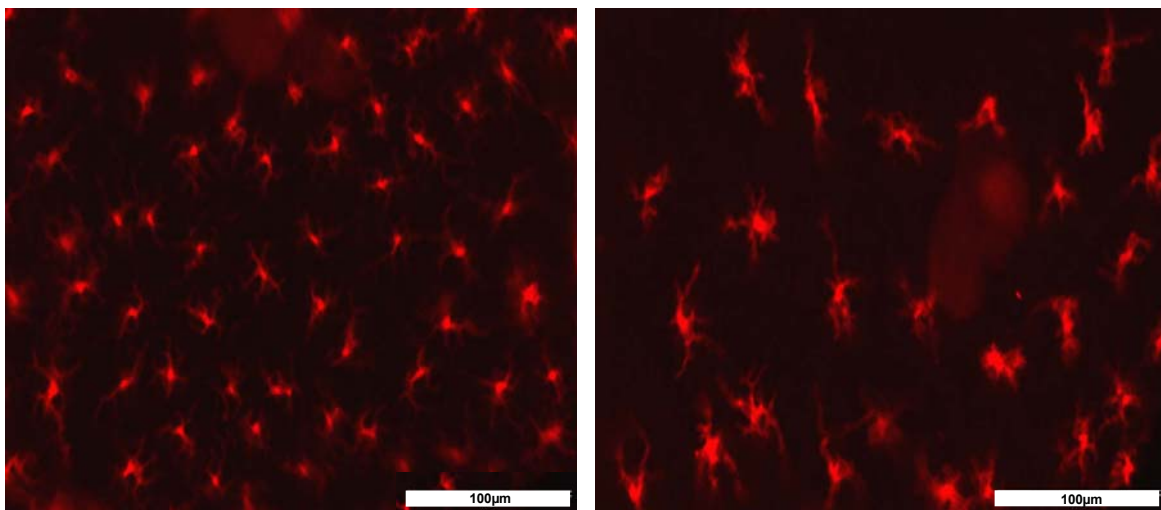


Abb.6: Die Applikation von Imiquimod auf die Haut induziert die Aktivierung und Auswanderung von Langerhanszellen

Nach Imiquimodbehandlung am Ohr einer Wildtypmaus wurde die Epidermis präpariert und die Langerhanszellen anschließend mit einem Antikörper gegen Langerin (CD207) nachgewiesen.

Wie in Abb.6 dargestellt, besitzt die Epidermis von Mäusen im unbehandelten Zustand ein dichtes Netzwerk von Langerhanszellen (linkes Bild). Um diese Zellen zu identifizieren, wurden die Epidermispräparate mit einem fluoreszenzfarbstoff-

gekoppelten Antikörper angefärbt, welcher an Langerin (CD207) bindet, ein Intergrin, das sowohl membranständig als auch intrazellulär in den sogenannten Birbeck'schen Granula vorkommt und spezifisch für Langerhanszellen ist. Nach Behandlung mit Imiquimod werden die Langerhanszellen aktiviert und wandern aus der Epidermis aus. Die verbliebenen Langerhanszellen verändern ihren Phänotyp, indem sie größer werden und sich die Dendriten verlängern (Abb.6, rechtes Bild). Dies wird als Zeichen ihrer Aktivierung angesehen.

In einem Kontrollexperiment wurde zunächst überprüft, ob sich das Fehlen des Transkriptionsfaktors NFATc2 generell auf die Anzahl der Langerhanszellen in der Epidermis auswirkt. Hierzu wurden die Epidermen der Ohren von unbehandelten Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen präpariert, angefärbt (s.o.) und die Langerhanszellen ausgezählt.

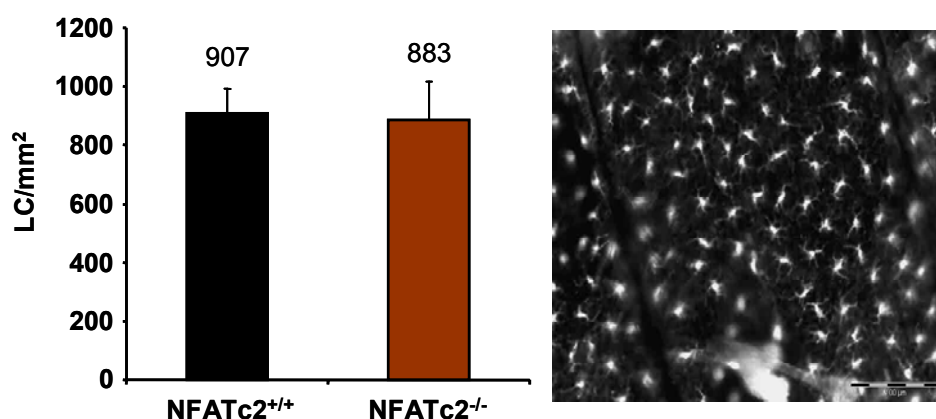


Abb.7: Die Anzahl der Langerhanszellen (LC) in der Epidermis von NFATc2-defizienten Mäusen ist vergleichbar mit der von Wildtyp-Mäusen

Die Epidermen der Ohrhaut von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurden präpariert und anschließend die Langerhanszellen mit einem Antikörper gegen Langerin (CD207) nachgewiesen. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes wurden die Langerhanszellen schließlich ausgezählt.

Wie in Abb. 7 ersichtlich, ist durch das Fehlen von NFATc2 die Anzahl von Langerhanszellen in unbehandelter Epidermis nicht beeinträchtigt. Beide Mausstämme weisen ca. 900 Langerhanszellen pro Quadratmillimeter Epidermis auf.

In einer früheren Arbeit konnten wir bereits zeigen, dass IL-1 ein wichtiger Faktor für die Auswanderung von Langerhanszellen (LC) aus der Epidermis nach Imiquimodbehandlung ist (Heib *et al*, 2007). Da die Expression der IL-1 β -mRNA in

diesem Modell in NFATc2-defizienten Mäusen stark beeinträchtigt ist (Abb.4), wurde untersucht, ob dadurch auch die LC-Wanderung reduziert ist.

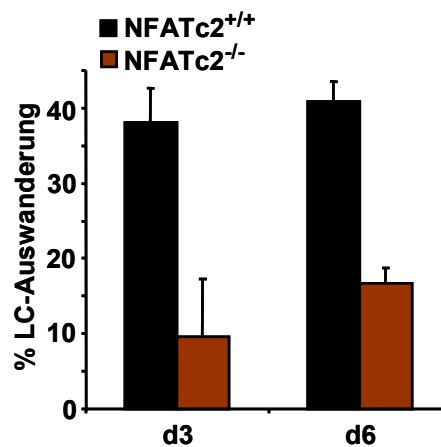


Abb.8: Die Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis ist vom Transkriptionsfaktor NFATc2 abhängig

Wildtyp- und NFATc2-defiziente Mäuse wurden täglich mit Imiquimod behandelt. An den Tagen 3 und 6 wurde die Epidermis präpariert und die Langerhanszellen mit einem Antikörper gegen Langerin (CD207) nachgewiesen. Anschließend wurde die Anzahl der Langerhanszellen in den unbehandelten und Imiquimodbehandelten Präparaten bestimmt. n =8.

Aus Abb. 8 geht hervor, dass es bereits nach drei Tagen täglicher Imiquimodbehandlung zu einer maximalen Auswanderungsrate der Langerhanszellen von ca. 40% kommt. In NFATc2-defizienten Mäusen hingegen sind an Tag 3 lediglich ca. 10% der Langerhanszellen ausgewandert, was bis Tag 6 nur schwach auf ca. 18% ansteigt. Die Langerhanszell-Auswanderung in NFATc2-defizienten Mäusen erreicht während der Dauer von 6 Tagen somit bei weitem nicht das Niveau der Wildtyp-Mäuse und zeigt, im Gegensatz zur Ohrschwellungsreaktion (Abb.1), keinen verzögerten Effekt.

3.3 NFATc2 beeinflusst die TLR7-vermittelte Hypertrophie der regionalen Lymphknoten

Eine weitere Folge der über TLR7 induzierten Entzündungsreaktion ist die entstehende Schwellung der regionalen Lymphknoten. Antigenpräsentierende Zellen wandern dort ein und aktivieren spezifische, naive CD8⁺ T-Zellen, was zur klonalen Expansion dieser T-Zellen führt. Da bekannt ist, dass TNF- α für die Schwellungsreaktion von großer Bedeutung ist und die Expression dieses

Cytokins nach Imiquimodbehandlung durch NFATc2 gefördert wird (Abb.4), wurde im folgenden Versuch die Rolle von NFATc2 in der TLR7-vermittelten Lymphknoten-Hypertrophie untersucht (Jawdat *et al*, 2006).

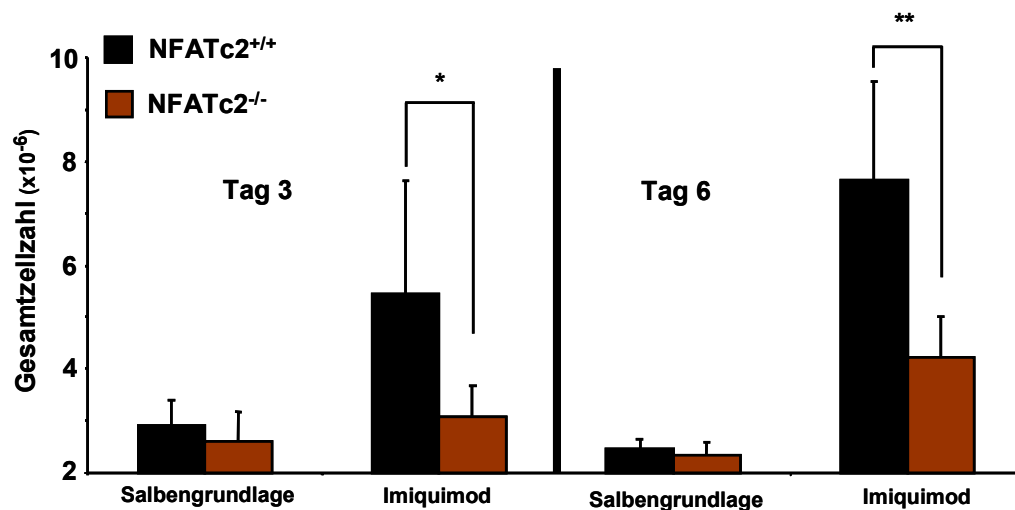


Abb.9: Die Schwellung der regionalen Lymphknoten nach Imiquimodbehandlung ist größtenteils abhängig vom Transkriptionsfaktor NFATc2

Nach täglicher Imiquimodbehandlung der Ohren wurden an den Tagen 3 und 6 die regionalen aurikularen Lymphknoten präpariert und die Gesamtzellzahl jedes Lymphknotens bestimmt. Jede Gruppe besteht aus 8 Tieren. * p < 0,02; ** p < 0,001.

Wie durch die bisherigen Experimente zu erwarten war, ist auch die Schwellung der regionalen Lymphknoten nach Imiquimodbehandlung stark von der Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NFATc2 abhängig. Fehlt dieser, so kann man nach drei Tagen keine signifikante Zunahme der Zellzahl feststellen, während sich im Vergleich die Zellzahl in den Lymphknoten von Wildtyp-Tieren nahezu verdreifacht. Die Lymphknoten-Schwellung bei NFATc2-defizienten Mäusen bleibt auch nach längerer Behandlung der Ohren (Tag 6), wie die Auswanderung der Langerhanszellen, stark beeinträchtigt.

Zusammenfassend konnte bislang gezeigt werden, dass NFATc2 nicht nur für die Entstehung einer schnellen, lokalen Entzündungsreaktion nach Imiquimodbehandlung verantwortlich ist, sondern dass in diesem Modell auch die Auswanderung antigenpräsentierender Zellen aus der Haut und das Anschwellen der Lymphknoten von diesem Transkriptionsfaktor abhängig sind. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch die Entstehung daran gekoppelter

adaptiver Immunantworten von NFATc2 abhängig ist, was Gegenstand der folgenden Untersuchung war.

3.4 Die Bedeutung von NFATc2 für die Entstehung einer cytotoxischen T-Zellantwort

3.4.1 NFATc2-defiziente CD8⁺ T-Zellen weisen einen aktivierten Phänotyp auf

Frühere Arbeiten, die an unserem Institut durchgeführt wurden, zeigten, dass sich Imiquimod sehr gut als Adjuvans für transkutane Immunisierungen gegen hautgängige Peptide eignet (Rechtsteiner *et al*, 2005). Hierbei wird eine Aktivierung und Vermehrung peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen erreicht. Um nach Applikation von Imiquimod auf die Haut eine Abhängigkeit der entstehenden adaptiven Immunantwort von NFATc2 zu untersuchen, wurde das Modell der transkutanen Immunisierung angewandt.

Da CD4⁺ T-Zellen in naiven NFATc2-defizienten Mäusen einen hyperresponsiven Phänotyp aufweisen, wurde zunächst der Aktivierungszustand NFATc2-defizienter CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dieser kann anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle überprüft werden. Im Folgenden wurde die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) untersucht, der für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin wurde die Expression eines frühen Markers der T-Zell-Aktivierung, CD69, untersucht, sowie von CD44, der verstärkt an der Zelloberfläche von Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen zu finden ist. Aktivierte T-Zellen verlassen den Lymphknoten und reduzieren die Expression des Adhäsionsmoleküls für den Lymphknoten, CD62L. Folglich wurde auch die Expression von CD62L in NFATc2-defizienten CD8⁺ T-Zellen im FACS untersucht.

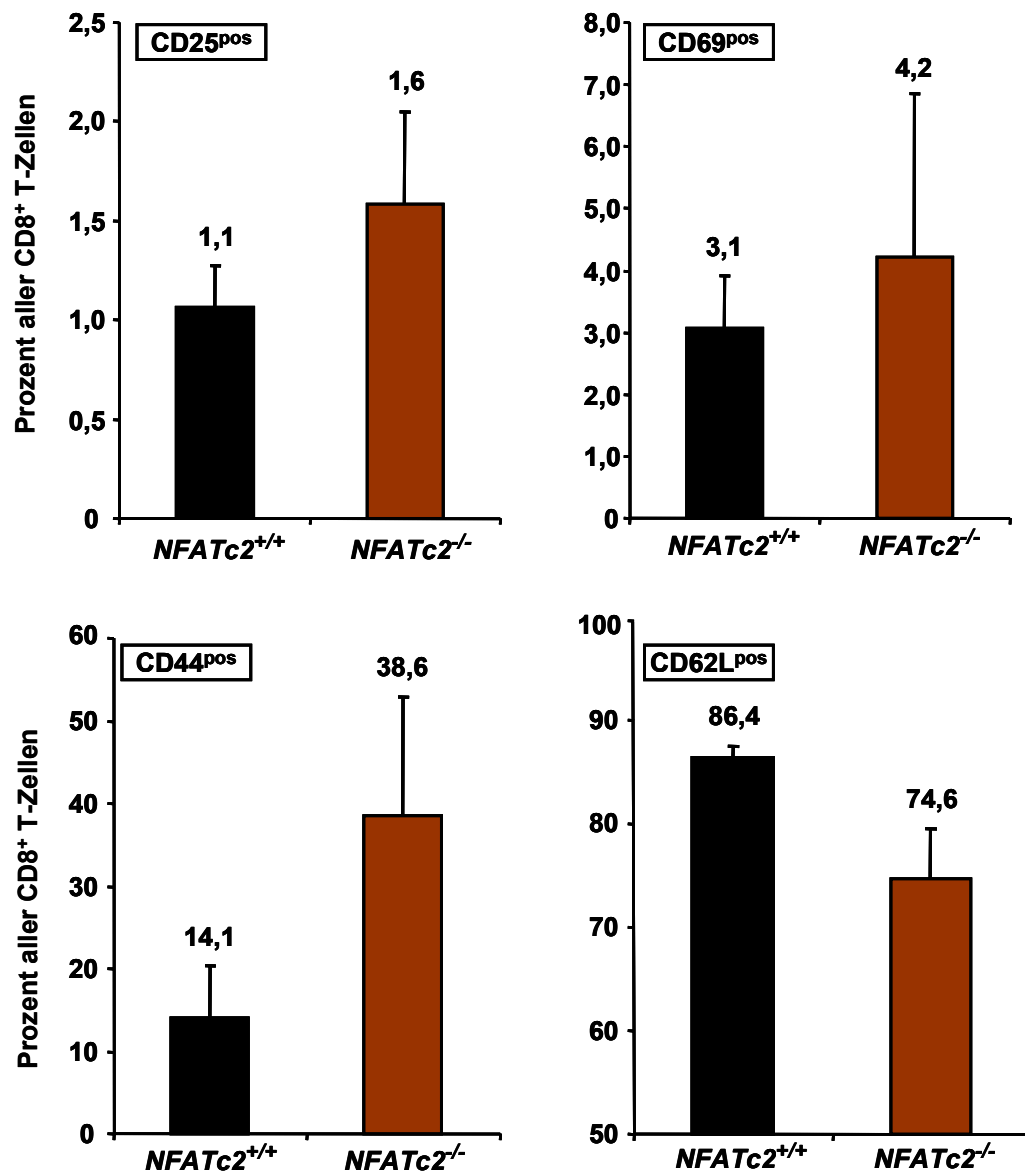


Abb. 10: CD8⁺ T-Zellen aus NFATc2-defizienten Mäusen zeigen einen aktivierten Phänotyp

Milzzellen von ca. 6 Wochen alten Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurden isoliert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusscytometrisch untersucht.

Wie in Abb.10 zu erkennen ist, weisen die CD8⁺ T-Zellen aus NFATc2-defizienten Mäusen einen aktivierten Phänotyp auf. Die leicht erhöhte Expression von CD25 und CD69 sowie eine stark erhöhte Expression von CD44, weisen, im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen aus Wildtyp-Mäusen, auf einen höheren Aktivierungszustand der CD8⁺ T-Zellen hin.

3.4.2 NFATc2-defiziente Mäuse können starke cytotoxische T-Zellantworten nach Immunisierung mit peptidbeladenen DC entwickeln

Vor der transkutanen Immunisierung wurde in einem weiteren Versuch geklärt, ob sich NFATc2-defiziente Mäuse effektiv immunisieren lassen und ob NFATc2-defiziente antigenpräsentierende Zellen in der Lage sind, eine adaptive Immunantwort zu generieren. Hierzu wurden Dendritische Zellen (DC) aus dem Knochenmark von NFATc2-defizienten Mäusen gewonnen, mittels TLR3-Liganden (poly (I:C)) aktiviert und mit dem MHC-I-restringierten Peptid SIINFEKL aus Ovalbumin beladen. Diese so behandelten Dendritischen Zellen wurden anschließend intraperitoneal sowohl in Wildtyp- als auch NFATc2-defiziente Mäuse injiziert und nach 6 Tagen die cytotoxische T-Zellantwort in den immunisierten Mäusen bestimmt. Um die CTL-Antwort messen zu können, wurden zunächst Milzzellen aus nicht immunisierten Wildtyp-Mäusen isoliert. Ein Teil der Milzzellen wurde mit einer niedrigen Konzentration des Vitalfarbstoffes CFSE⁷ fluoreszenzmarkiert (0,4µM, CFSE^{low}), der andere Teil mit einer hohen Konzentration (4µM, CFSE^{high}). Die CFSE^{low} markierten Zielzellen wurden zusätzlich mit dem Peptid SIINFEKL beladen, anschließend in einem Verhältnis von 1:1 mit der CFSE^{high}-Population vermischt und intravenös in die immunisierten Mäuse injiziert. Nach 20 Stunden wurden die Milzen der immunisierten Tiere isoliert und diese auf die Anwesenheit der CFSE-markierten Populationen analysiert. Hat eine erfolgreiche Immunisierung stattgefunden, so wird die peptidbeladene Population (CFSE^{low}) lysiert, die andere CFSE^{high}-Population hingegen bleibt unverändert und dient somit als Kontrolle. Anhand des Ausmaßes der Zellyse lässt sich nun die cytotoxische Aktivität peptidspezifischer T-Zellen *in vivo* messen, die man prozentual wie folgt errechnen kann.

$$\text{Lyse der Zielzellen [\%]} = \frac{(\text{Anzahl unbeladener Zellen} - \text{Anzahl peptidbeladener Zellen})}{(\text{Anzahl unbeladene Zellen})} \times 100\%$$

⁷ CFSE: Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Esther - fluoreszierender Vitalfarbstoff

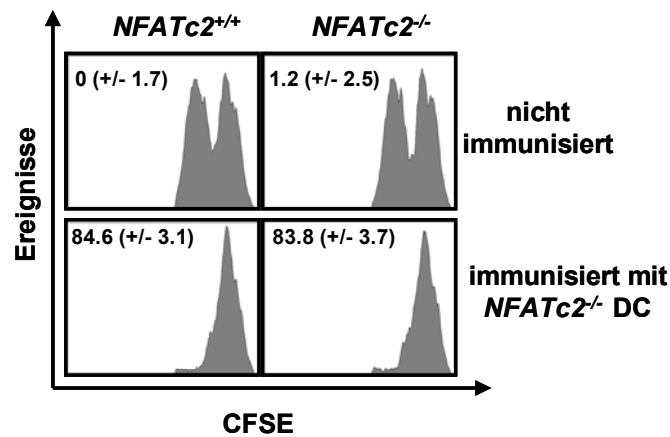


Abb.11: NFATc2-defiziente Mäuse können starke CTL-Antworten entwickeln

Wildtyp- bzw. NFATc2-defiziente Mäuse wurden mit aktivierten und peptidbeladenen (SIINFEKL) Dendritischen Zellen immunisiert, die vorher aus dem Knochenmark von NFATc2-defizienten Mäusen generiert wurden. Nach 6 Tagen wurden zwei unterschiedlich stark CFSE-markierte Zielzellpopulationen im Verhältnis 1:1 in die Mäuse i.v. injiziert, wobei die CFSE^{low}-Population zusätzlich mit SIINFEKL beladen wurde. 20 Stunden nach Injektion wurde das Ausmaß der Lyse der Zielzellen ermittelt.

Die Kontrollgruppe der nicht-immunisierten Wildtyp- und NFATc2-defizienten Tiere zeigten 20 Stunden nach Injektion der peptidbeladenen Zielzellen keine spezifische Lyse (Abb.11). In den immunisierten Tieren beider Stämme konnten nach der gleichen Zeitspanne bereits über 80% dieser peptidbeladenen Zielzellpopulation eliminiert werden. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass NFATc2-defiziente Dendritische Zellen eine starke und spezifische Immunreaktion auslösen können und dass sich NFATc2-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf diese Weise grundsätzlich gleichermaßen effizient immunisieren lassen.

3.4.3 Langerhanszellen sind essentiell für effektive transkutane Immunisierungen gegen Peptide

Die Aufnahme eines Antigens von antigenpräsentierenden Zellen im Gewebe und die anschließende Präsentation dieses Antigens im Lymphknoten ist für die Induktion einer adaptiven Immunantwort von essentieller Bedeutung. Da nachgewiesenermaßen die Auswanderung von Langerhanszellen nach Imiquimodbehandlung in NFATc2-defizienten Mäusen beeinträchtigt ist, wurde zunächst untersucht, ob Langerhanszellen bei der TLR7-vermittelten Induktion einer CTL-Antwort eine wichtige Rolle spielen.

In diesem Kontrollversuch wurden „knock-in“-Mäuse verwendet, die ausschließlich auf Langerhanszellen den Rezeptor für das Diphterietoxin (aus *Corynebacterium diphtheriae*) exprimieren. Natürlicherweise exprimieren Mäuse keinen funktionstüchtigen Rezeptor für dieses Toxin. In den verwendeten Tieren wurde das Gen des Rezeptors unter die Kontrolle des endogenen Langerin-Promoters gebracht, so dass ausschließlich Langerhanszellen den Diphterietoxin-Rezeptor exprimieren (Kissenpfennig *et al*, 2005). Gleichzeitig enthält die Expressionkassette die Information des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP), wodurch die Langerhanszellen *in vivo* fluoreszieren.

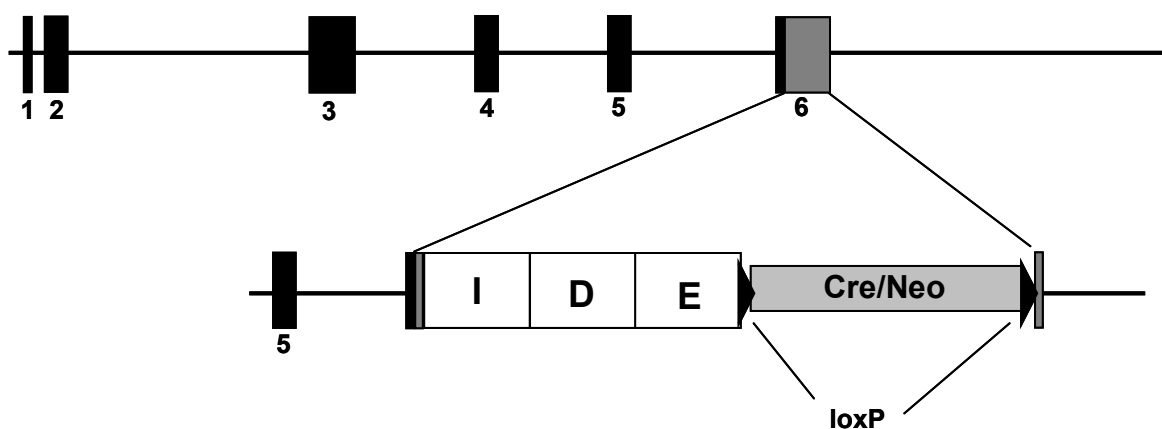


Abb.12a: Vereinfachte Darstellung des integrierten Konstruktes für den Diphterietoxinrezeptor

Numeriert sind die Exons des Langerin-Gens.

- I = „internal ribosomal entry site“ (IRES), vermittelt die Bindung der mRNA an das Ribosom
- D = Expressionskassette für den Diphterietoxin-Rezeptor
- E = Expressionskassette für EGFP
- Neo = Expressionskassette für das Resistenzgen Neomycin (zur Selektion)
- Cre, loxP = Zur Eliminierung des Neomycin-Gens nach Selektion

Zwei Tage nach intraperitonealer Applikation des Diphterie-Toxins wurde die Epidermis der jeweiligen Ohren auf Anwesenheit von Langerhanszellen untersucht.

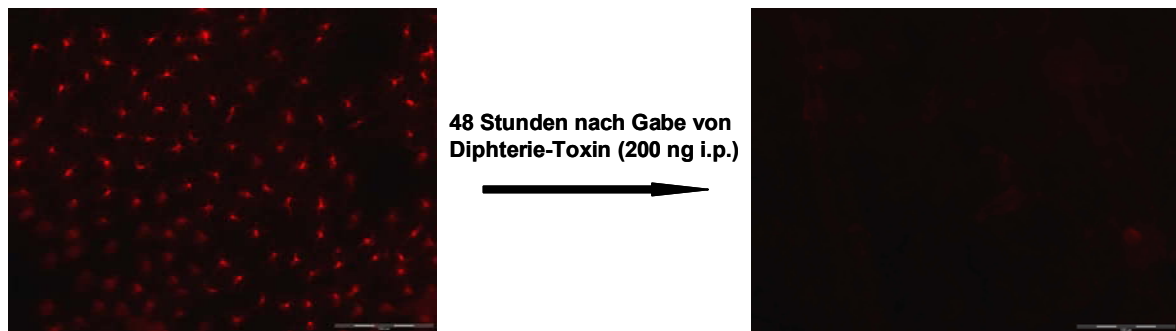


Abb.12b: Langerhanszellen können nach Gabe von Diphtherie-Toxin in Langerin-DTR-EGFP Mäusen vollständig eliminiert werden

In Langerin-DTR-EGFP Mäuse wurde 200ng Diphtherie-Toxin intraperitoneal appliziert. Nach 48 Stunden wurde die Epidermis der Ohren präpariert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop auf Anwesenheit von Langerhanszellen untersucht.

Wie in Abb.12b ersichtlich, können bereits nach einmaliger Gabe von 200ng Diphtherie-Toxin die Langerhanszellen in Langerin-DTR-EGFP Mäusen vollständig eliminiert werden.

Um zu untersuchen, ob Langerhanszellen bei der TLR7-vermittelten Induktion einer adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen, wurde das Modell der transkutanen Immunisierung (TCI) angewandt. Hierbei wurden Wildtyp- und Langerin-DTR-EGFP Mäusen an zwei aufeinander folgenden Tagen das Peptid SIINFEKL, in Kombination mit der Creme Aldara als Adjuvans, auf den rasierten Rücken appliziert. Zwei Tage zuvor wurde den Tieren beider Mausstämme 200ng Diphtherie-Toxin i.p. injiziert. Sechs Tage nach erstmaliger Immunisierung wurden peptidbeladene, CFSE-markierte Zielzellen intravenös injiziert (s. 3.4.2) und 24 Stunden später die peptidspezifische Lyse der Zielzellen mittels FACS analysiert.

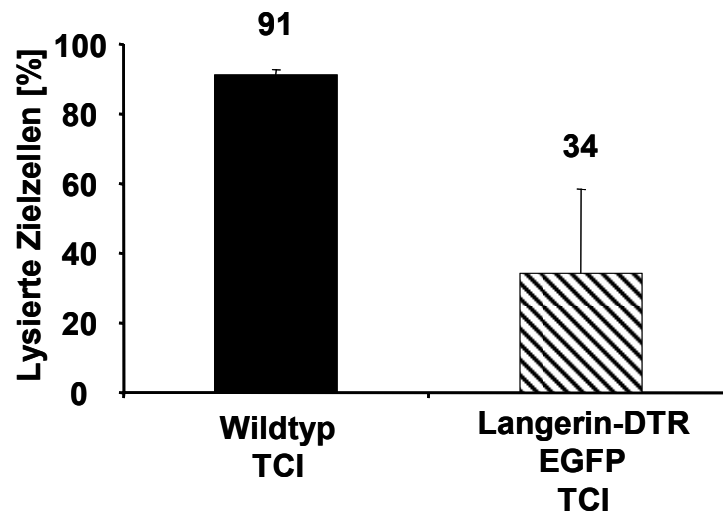


Abb.13: Langerhanszellen sind bei transkutanen Immunisierungen (TCI) von essentieller Bedeutung

Zwei Tage nach Gabe des Diphtherietoxins wurden Wildtyp- und Lang-DTR-EGFP Mäuse (n=3) an zwei aufeinander folgenden Tagen mit Imiquimod unter Zugabe von 100µg SIINFEKL immunisiert. Am Tag 6 wurden CFSE^{low}-markierte SIINFEKL-beladene und CFSE^{high}-markierte unbeladene Zielzellen im Verhältnis 1:1 i.v. injiziert. Die Lyse der peptidbeladenen Zielzellen wurde durchflußzytometrisch 24 Stunden nach adoptivem Transfer analysiert.

In Abb.13 ist zu erkennen, dass durch die Abwesenheit von Langerhanszellen die entstehende adaptive CTL-Antwort stark beeinträchtigt ist. In Wildtypmäusen sind 24 Stunden nach Transfer über 91% der peptidbeladenen Zielzellen lysiert worden. Die Mäuse, in denen zuvor die Langerhanszellen durch Diphtherietoxingabe eliminiert wurden, zeigten eine spezifische Lyse von lediglich 34%, was auf eine wichtige Rolle der Langerhanszellen in diesem Modell der transkutanen Immunisierung gegen Peptide hinweist.

Es ist zu vermuten, dass die ohne Langerhanszellen entstandene aber schwächere Immunreaktion gegen das Peptid von dermalen Dendritischen Zellen vermittelt wurde (Kissenpfennig & Malissen, 2006).

3.4.4 Nach transkutaner Immunisierung ist die Zahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in NFATc2-defizienten Mäuse stark vermindert

Im Modell der transkutanen Immunisierung wurde nun die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 untersucht. Hierbei wurden Wildtyp- und NFATc2-defiziente Mäuse, wie unter 3.4.3 beschrieben, mit dem Peptid SIINFEKL immunisiert. Als Negativkontrolle wurde das Peptid in Kombination mit der

Salbengrundlage appliziert. Nach 6 Tagen wurde den immunisierten Mäusen Blut entnommen und die Anzahl peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Tetramer⁸ im FACS analysiert.

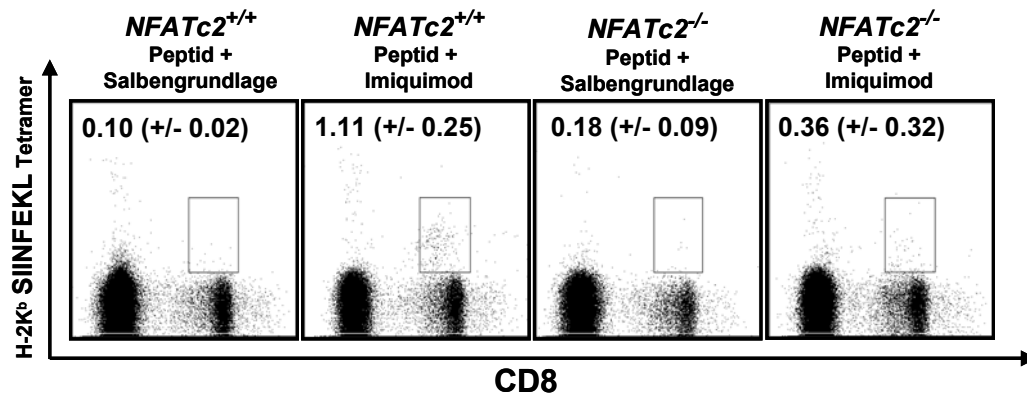


Abb. 14: Die Anzahl peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen ist nach transkutaner Immunisierung in NFATc2-defizienten Mäusen stark reduziert

Wildtyp- und NFATc2-defiziente Mäuse (n=8-10) wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit Imiquimod unter Zugabe von 100µg SIINFEKL immunisiert. An Tag 6 wurde im Blut der Tiere die Anzahl peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Tetramere nachgewiesen. Die Zahlen stellen den prozentualen Anteil antigenspezifischer Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulation dar.

In Abb.14 ist zu erkennen, dass in Wildtyp-Mäusen 6 Tage nach transkutaner Immunisierung bereits über 1% aller CD8⁺ T-Zellen spezifisch für das Peptid SIINFEKL sind. In NFATc2-defizienten Mäusen hingegen ist der Anteil dieser peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen deutlich geringer und befindet sich mit 0,36% (+/- 0,32) praktisch auf dem Niveau der entsprechenden Negativkontrolle (0,18%).

3.4.5 NFATc2-defiziente Mäusen zeigen nach transkutaner Immunisierung eine verminderte cytotoxische T-Zellantwort

Den unter 3.4.4 beschriebenen immunisierten Tieren wurden an Tag 6 peptidbeladene und CFSE-markierte Zielzellen intravenös injiziert (s. 3.4.2) und nach 8 Stunden die peptidspezifische Lyse der Zielzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Somit kann anhand dieses Versuchs die Aktivität

⁸ Tetramer: Besteht aus vier SIINFEKL-beladenen MHC-I-Molekülen zur Detektion peptid-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

der entstandenen peptidspezifischen cytotoxischen T-Zellen funktionell und *in vivo* untersucht werden.

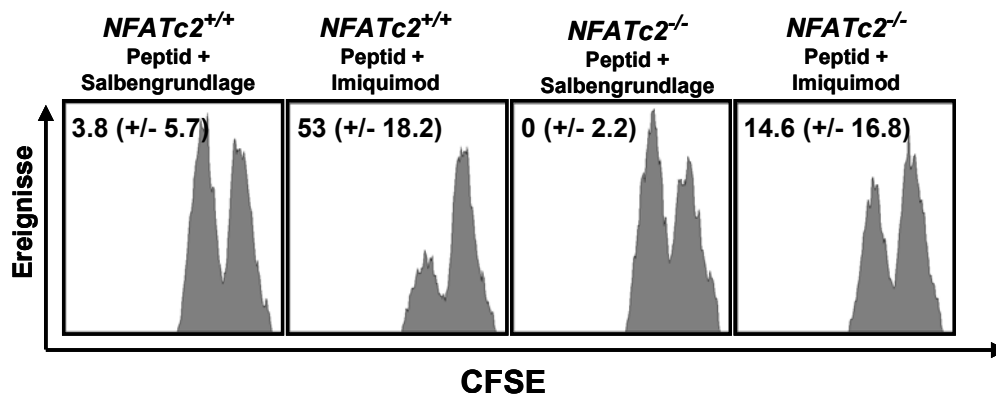


Abb. 15: NFATc2 ist essenziell für die Entstehung einer peptidspezifischen cytotoxischen T-Zellantwort nach transkutaner Immunisierung mit Imiquimod als Adjuvans

In die unter 3.4.4 beschriebenen immunisierten Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäuse wurden an Tag 6 CFSE^{low}-markierte und SIINFEKL-beladene sowie CFSE^{high}-markierte unbeladene Zielzellen im Verhältnis 1:1 i.v. injiziert. Die Lyse der peptidbeladenen Zielzellen wurde durchflusszytometrisch 8 Stunden nach adoptivem Transfer analysiert. Die Zahlen stellen den prozentualen Anteil lysierter Zielzellen dar.

Wie sich nach der Analyse der Anzahl antigenspezifischer T-Zellen im Blut (3.4.4) schon vermuten lässt, fällt die Lyse in immunisierten NFATc2-defizienten Mäusen wesentlich schwächer im Vergleich zu den immunisierten Wildtyp-Tieren aus. In diesen sind 8 Stunden nach adoptivem Transfer bereits mehr als die Hälfte der peptidbeladenen Zielzellen lysiert worden, in den NFATc2-defizienten Mäusen hingegen weniger als 15%.

Die spezifische Immunreaktion ist somit deutlich vom Transkriptionsfaktor NFATc2 abhängig, was sich in der stark verminderten Anzahl peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen und der oben gezeigten reduzierten cytotoxischen T-Zellantwort widerspiegelt.

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, dass in diesem Modell der transkutanen Immunisierung der Transkriptionsfaktor NFATc2 eine entscheidende Rolle spielt. Er ist wichtig für die Entstehung einer raschen Entzündungsreaktion, für das Auswandern antigenpräsentierender Zellen und die Hypertrophie lokaler Lymphknoten. Letztlich nimmt NFATc2 dadurch auch Einfluss auf die Entstehung einer adaptiven Immunantwort. Der generelle „Gen-Knockout“ von *NFATc2* lässt jedoch nicht erkennen, in welchen Zellen der Transkriptionsfaktor aktiv werden

muss, um zu einer adäquaten Immunreaktion wesentlich beizutragen. Erst kürzlich konnte von uns gezeigt werden, dass Mastzellen in dem hier verwendeten Modell für die Entzündungsreaktion und Entstehung der adaptiven CTL-Antwort verantwortlich sind.

Daher wurde im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das Fehlen von NFATc2 selektiv in Mastzellen für die Beeinträchtigung der Entzündungsreaktion und die verminderte adaptive Immunantwort verantwortlich ist. Hierzu wurden mastzelllose Mäuse sowohl mit Wildtyp- als auch mit NFATc2-defizienten Mastzellen lokal im Ohrgewebe rekonstituiert. Anschließend wurde in diesen rekonstituierten Mäusen die Ohrschwellung, die Auswanderung der Langerhanszellen und die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort nach Behandlung mit Imiquimod bzw. Imiquimod und Peptid ermittelt.

3.5 NFATc2-defiziente Mastzellen zeigen einen normalen Phänotyp

Um einen Defekt in der Mastzellentwicklung ausschließen zu können, wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen *in vitro* BMMC generiert und auf die Expression der charakteristischsten Oberflächenmoleküle untersucht. Hierzu wurde die Expression von CD117⁹, sowie von Fc ϵ RI (hochaffiner IgE-Rezeptor) im FACS analysiert.

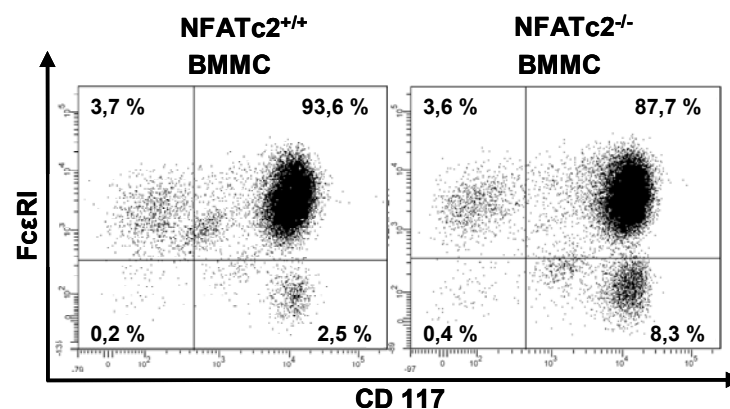


Abb. 16: BMMC aus NFATc2-defizienten Tieren zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine phänotypischen Unterschiede

Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurden isoliert und mit Hilfe von SCF, IL-3 und IL-4 innerhalb von 4 Wochen zu Mastzellen (BMMC) differenziert. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden die BMMC anschließend im FACS analysiert.

⁹ CD117 (c-kit): Rezeptor für den wichtigsten Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen („stem cell factor“ – SCF)

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, weisen BMMC aus NFATc2-defizienten Mäusen keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf. Die Expression der charakteristischsten Oberflächenmoleküle, Fc_εRI und CD117, ist bei NFATc2-defizienten BMMC vergleichbar zum Wildtyp. NFATc2-defiziente BMMC scheinen sich daher *in vitro* vergleichbar zu Wildtyp-BMMC zu entwickeln.

Bereits im Jahre 2004 konnten Matsushima et al die Expression von TLR7-mRNA in *in vitro* generierten Mastzellen nachweisen. Im folgenden Versuch wurde daher die mRNA-Expression des TLR7 in NFATc2-defizienten Mastzellen untersucht.

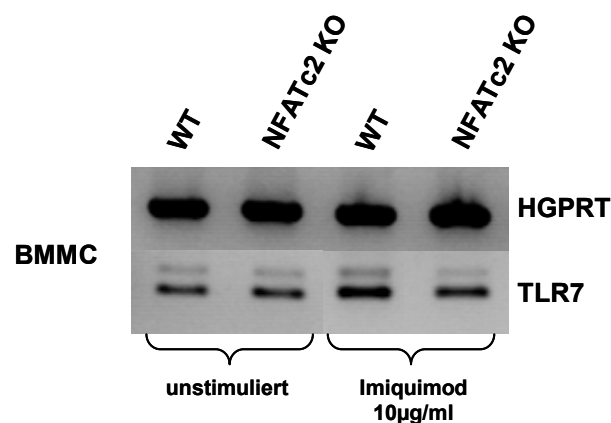


Abb. 17: Die mRNA-Expression von TLR7 ist durch das Fehlen von NFATc2 nicht beeinträchtigt

Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurden isoliert und mit Hilfe von SCF, IL-3 und IL-4 innerhalb von 4 Wochen zu Mastzellen (BMMC) differenziert. Unstimulierte, bzw. für 24 Stunden mit 10µg/ml Imiquimod stimulierte BMMC wurden lysiert, die RNA isoliert und die mRNA-Expression von TLR7 mittels PCR und spezifischen Primern analysiert.

Die Ergebnisse in Abb.17 zeigen, dass durch die Defizienz des Transkriptionsfaktors NFATc2 die Expression der TLR7-mRNA in *in vitro* generierten Mastzellen nicht beeinträchtigt wird.

Anschließend sollte die Expression des TLR7 in dermalen Mastzellen überprüft werden. Im Laufe dieses Versuchs stellte sich jedoch heraus, dass sich zum einen murine dermale Mastzellen nur mit einem enorm hohen Materialaufwand gewinnen lassen und zum anderen nur sehr schwer zu kultivieren sind. Durch die notwendige Proteasebehandlung des Gewebes ist die Expression der Oberflächenmoleküle zudem stark beeinträchtigt. Um in dermalen Mastzellen den TLR7 nachweisen zu können, wurden diese aus sogenannten „4get-Mäusen“ gewonnen. Die Zellen dieser Mäuse können durch einen „knock-in“ das fluoreszierende Protein EGFP exprimieren, was über den endogenen IL-4-

Promoter reguliert wird (Gessner *et al*, 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass in der Haut von naiven und unbehandelten Tieren ausschließlich Mastzellen EGFP konstituiv exprimieren und somit grün fluoreszieren. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem Ohrgewebe und anschließender Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD117 Antikörper wurden die Mastzellen mit Hilfe eines FACS-Sort isoliert.

Da sich kein käuflicher Antikörper für den Nachweis von TLR7 im FACS oder Westernblot eignet, konnte im folgenden Versuch lediglich die mRNA-Expression in den isolierten Mastzellen ermittelt werden.

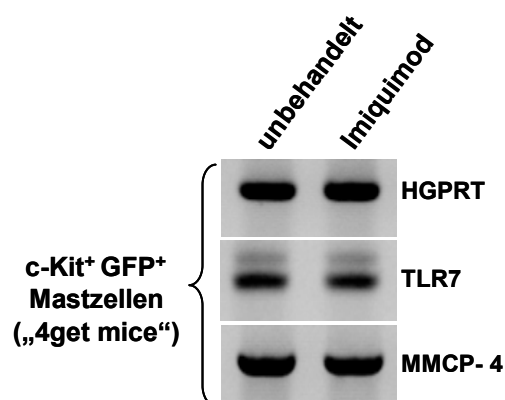


Abb. 18: Murine dermale Mastzellen exprimieren TLR7-mRNA

Aus unbehandelten und mit Imiquimod über Nacht behandelten Ohren wurden mittels FACS-Sort dermale Mastzellen isoliert und anschließend lysiert. Nach Isolierung der RNA wurde diese auf die Expression der TLR7-spezifischen mRNA durch PCR analysiert.

Wie in Abb.18 ersichtlich, kann eine deutliche Expression von TLR7-mRNA in dermalen Mastzellen nachgewiesen werden. Nach Behandlung der Ohren mit Imiquimod bleibt die Expression von TLR7-mRNA in Mastzellen konstant. Als Kontrolle wurde in der PCR die Expression der mastzellspezifischen Protease MMCP-4 (mouse mast cell protease -4) überprüft. Es ist daher anzunehmen, dass dermale Mastzellen in der Lage sind, den TLR7 auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Zudem deuten die Ergebnisse aus Abb.17 darauf hin, dass die Expression des Rezeptors durch das Fehlen von NFATc2 nicht beeinträchtigt wird.

3.6 Die Mastzellpopulation in der Haut und deren IgE-vermittelte Aktivierung *in vivo* ist durch das Fehlen von NFATc2 nicht beeinträchtigt

Nachdem NFATc2-defiziente Mastzellen *in vitro* keine phänotypischen Unterschiede aufweisen, sollte im Folgenden gezeigt werden, ob dermale Mastzellen in NFATc2-defizienten Mäusen prinzipiell in ihrer Aktivierung nicht beeinträchtigt sind. Hierzu wurde das Modell der passiven kutanen Anaphylaxis (passive cutaneous anaphylaxis – PCA) angewandt. Die lokalen dermalen Mastzellen wurden zunächst lokal mit spezifischem, monoklonalen IgE beladen, das durch subkutane Applikation in das Ohrgewebe injiziert wurde. Anschließend wurden die mit IgE beladenen Mastzellen durch systemische Gabe von Antigen (i.v.) aktiviert. Dies löst als klassische Reaktion des Soforttyps die schnelle Degranulation und Mediatorfreisetzung der Mastzellen aus.

Um die Stärke der Aktivierung in Form von Degranulation messen zu können, wurde zunächst das Antigen in Kombination mit einem Farbstoff i.v. injiziert. Nach Aktivierung der Mastzellen tritt der Farbstoff bereits nach 5 Minuten in das Gewebe aus (Abb.19A, rote Pfeile), der nach Extraktion durch photometrische Messung quantifiziert werden kann.

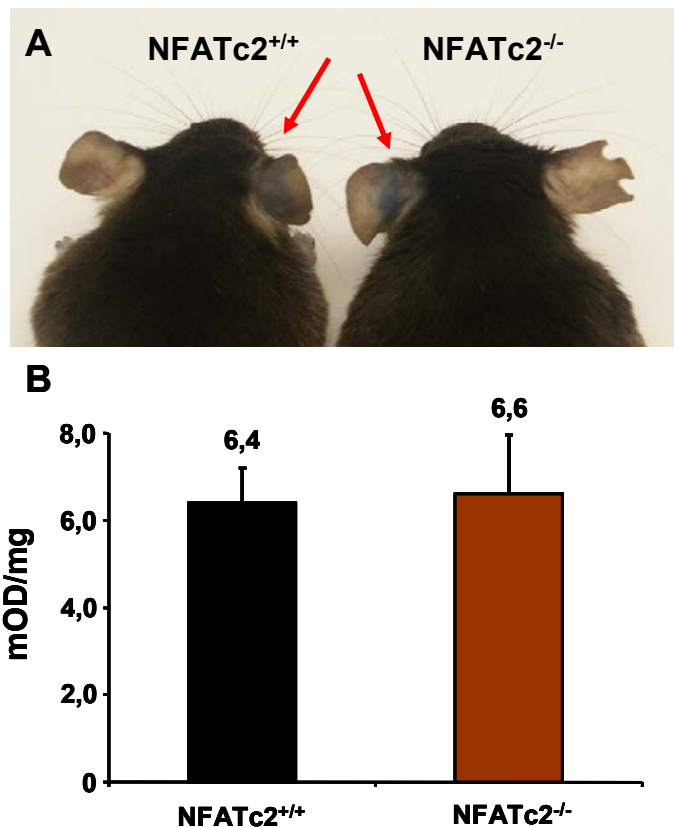


Abb. 19: Die Aktivierung von NFATc2-defizienten Mastzellen ist *in vivo* nicht beeinträchtigt

A) Bei Wildtyp- oder NFATc2-defizienten Mäusen wurden in jeweils ein Ohr 1µg anti-DNP¹⁰-IgE und in das kontralaterale Ohr PBS subkutan injiziert. Nach 24 Stunden wurde das Antigen, DNP-HSA, mit der Konzentration von 0,5mg/ml in Kombination mit 0,5%iger Evans Blue-Lösung in PBS i.v. injiziert (100µl).

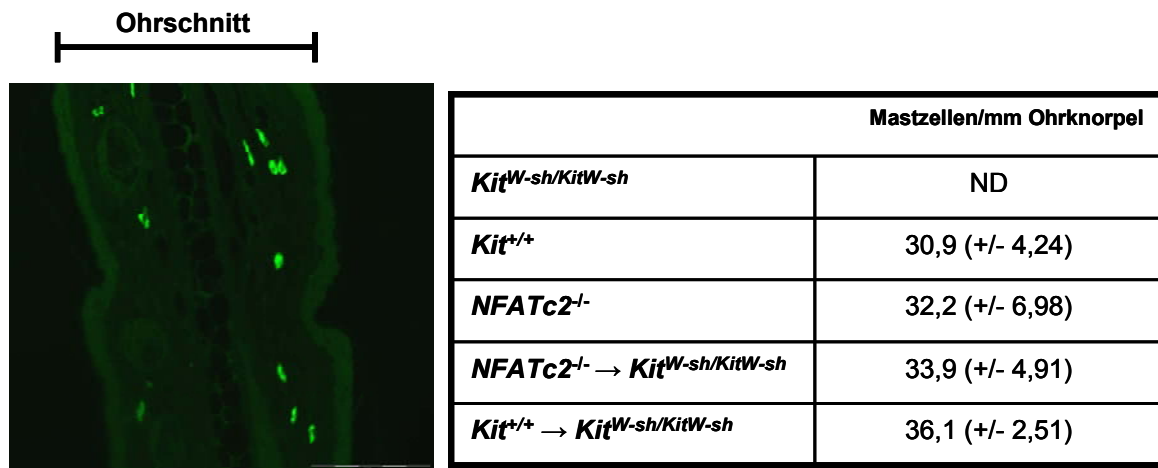
B) 30 Minuten nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Ohren abgetrennt, gewogen und über Nacht bei 55°C in 500µl Formamid inkubiert. Zur Quantifizierung des extrahierten Farbstoffes Evans Blue wurde die Absorption bei 620nm gemessen. Die gemessene Absorption (OD = optische Dichte) des extrahierten Farbstoffes wurde pro mg des gewogenen Ohrgewebes errechnet.

Wie aus Abb.19 hervorgeht, können NFATc2-defiziente Mastzellen *in vivo* IgE-vermittelt aktiviert werden. Darüber hinaus ist die Aktivierung der NFATc2-defizienten Mastzellen im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt.

Im nächsten Versuch sollte zusätzlich gezeigt werden, ob durch subkutane Injektion von Wildtyp- und NFATc2-defizienten BMMC die Mastzellpopulation, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, vollständig wieder hergestellt werden kann. Hierzu wurden zunächst 5×10^5 BMMC zwischen die dorsale und ventrale Seite eines Ohres injiziert. Nach 6 Wochen wurden histologische Schnitte der mit Wildtyp-

¹⁰ DNP: Dinitrophenol, wird als Antigen („Hapten“) von IgE erkannt. Als Trägermolekül für das Hapten dient humanes Serumalbumin (HSA).

oder NFATc2-defizienten Mastzellen rekonstituierten Mäuseohren sowie aus Ohren von nicht-rekonstituierten mastzelllosen Tieren, Wildtyp- und NFATc2-defizienten Tieren angefertigt. Die Mastzellen konnten nach Anfärben mit fluoreszenzmarkiertem Avidin¹¹ mit Hilfe eines Mikroskopes ausgezählt werden.



Tab.1: Zahlen von dermalen Mastzellen (Ohr) in den verwendeten Mausstämmen

Die Ohren von mastzelllosen Mäusen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit BMMC aus Wildtyp-, bzw. NFATc2-defizienten Mäusen rekonstituiert. Nach 6 Wochen wurden histologische Schnitte von Mäuseohren hergestellt, mit fluoreszenzmarkiertem Avidin angefärbt und die Mastzellen im Mikroskop ausgezählt. ND bedeutet „nicht detektierbar“. n = 4.

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Mastzellzahlen in der Haut von Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Darüber hinaus kann gezeigt werden, dass durch subkutane Injektion von Wildtyp- oder NFATc2-defizienten Mastzellen die Haut mastzellloser Mäuse lokal vollständig rekonstituiert werden kann.

3.7 NFATc2 in Mastzellen fördert die Entstehung einer schnellen Entzündungsreaktion in der Haut nach Applikation von Imiquimod

Um nachzuweisen, dass die verspätete Entzündungsreaktion in NFATc2-defizienten Mäusen nach Applikation von Imiquimod auf das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors in Mastzellen zurückzuführen ist, wurden zunächst

¹¹ Avidin ist ein Glykoprotein, welches an Heparin binden kann. Da Heparin ausschließlich in den Granula der Mastzellen gespeichert wird, ist die Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Avidin mastzellspezifisch.

mastzelllose Mäuse mit Wildtyp- oder NFATc2-defizienten Mastzellen lokal im Ohrgewebe rekonstituiert.

Nach Rekonstitution des Ohrgewebes wurden diese täglich einer Behandlung mit Imiquimod unterzogen. Es wurde vor jeder Behandlung die Ohrschwellung gemessen.

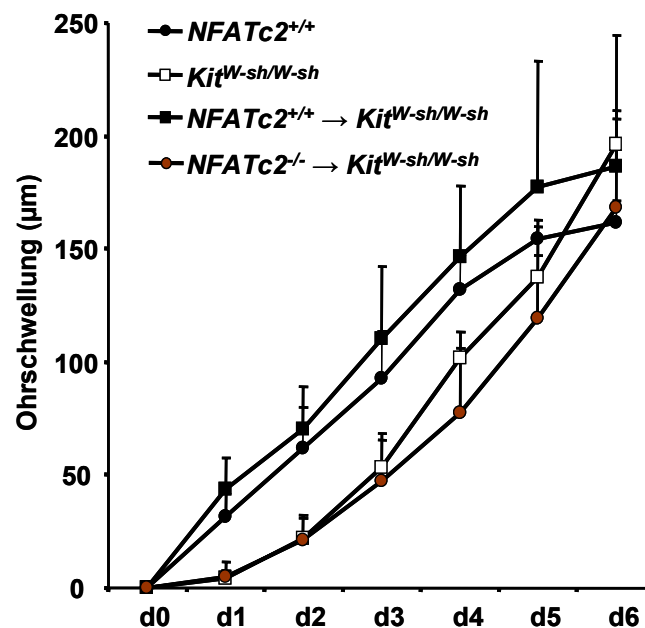


Abb. 20: Der Transkriptionsfaktor NFATc2 in Mastzellen ist wichtig für die schnelle Entstehung einer Entzündungsreaktion nach Applikation von Imiquimod

Die Ohren von mastzell-defizienten Mäusen wurden mit BMMC aus NFATc2-kompetenten oder NFATc2-defizienten Tieren lokal rekonstituiert. Wildtyp-, mastzelllose und rekonstituierte Mäuse wurden täglich am rechten Ohr mit Imiquimod behandelt. Vor jeder Behandlung wurde die Ohrschwellung gemessen. n = 6-8.

In Abb.20 kann beobachtet werden, dass mastzelllose Tiere, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, nach Behandlung eine um zwei Tage verzögerte Entzündungsreaktion ausbilden. Diese Verzögerung wird durch Rekonstitution von mastzell-defizienten Mäusen mit Wildtyp-Mastzellen komplett wieder aufgehoben. Nach Rekonstitution mastzellloser Tiere mit $NFATc2^{-/-}$ -BMMC ist die Entzündungsreaktion, wie in den nicht-rekonstituierten mastzelllosen Mäusen, gleichermaßen verzögert. Im weiteren Verlauf der Entzündung (d4 – d6) ist die Ohrschwellung in den mit $NFATc2^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Mäusen sogar tendenziell schwächer als in den nicht rekonstituierten Tieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ausschließlich das Fehlen von NFATc2 in Mastzellen für die verspätete Entzündung verantwortlich ist.

3.8 Die TLR7-vermittelte Auswanderung von Langerhanszellen ist direkt abhängig von NFATc2 in Mastzellen

Neben der Ohrschwellung ist auch die Auswanderung der Langerhanszellen nach Imiquimodbehandlung von NFATc2 abhängig (s. Abb.8). Daher sollte im nächsten Experiment untersucht werden, ob dies auf die NFATc2-Defizienz in Mastzellen zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Ohren von rekonstituierten Mäusen sowie von Kontrolltieren täglich mit Imiquimod behandelt und an zwei unterschiedlichen Tagen (d3 und d6) die Emigration der Langerhanszellen untersucht.

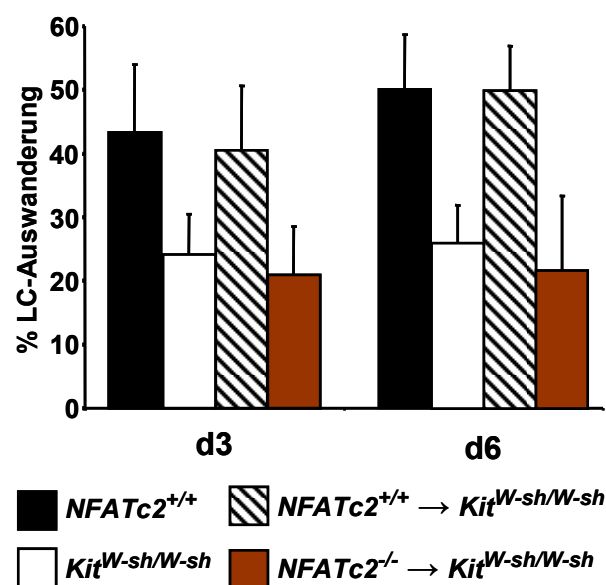


Abb. 21: Die Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis nach Imiquimodbehandlung ist abhängig von NFATc2 in Mastzellen

Die Ohren von mastzell-defizienten Mäusen wurden mit BMMC aus NFATc2-kompetenten oder NFATc2-defizienten Tieren lokal rekonstituiert. Wildtyp-, mastzelllose und rekonstituierte Mäuse wurden täglich am rechten Ohr mit Imiquimod behandelt, an den Tagen 3 und 6 wurde die Epidermis präpariert und die Langerhanszellen mit einem Antikörper gegen Langerin (CD207) nachgewiesen. Anschließend wurde die Anzahl der Langerhanszellen in den unbehandelten und Imiquimod-behandelten Präparaten bestimmt. n =4.

In Abb.21 ist ersichtlich, dass in Wildtyp-Tieren bereits an Tag 3 ca. 45% der Langerhanszellen ausgewandert sind, was sich nach drei weiteren Behandlungstagen nur unwesentlich auf ca. 50% steigert. In mastzell-defizienten Mäusen ist die Auswanderung um ungefähr die Hälfte reduziert, was man allerdings durch Rekonstitution mit Mastzellen aus Wildtyp-Tieren vollständig wieder herstellen kann. Rekonstituiert man mastzelllose Mäuse mit BMMC aus NFATc2-defizienten Tieren, so bleibt die Auswanderungsrate der

Langerhanszellen jedoch in gleichem Maße reduziert wie in nicht-rekonstituierten Mäusen.

Da Mastzell-NFATc2 offenbar die Entzündungsreaktion und die Auswanderung antigenpräsentierender Zellen kontrolliert, wurde konsequenterweise untersucht, ob sich das Fehlen von NFATc2 in Mastzellen auch auf die Entwicklung einer CTL-Antwort auswirkt.

3.9 NFATc2 in Mastzellen ist verantwortlich für eine adäquate Expansion antigenspezifischer cytotoxischer T-Zellen nach Applikation von Peptid und Imiquimod

In den Abschnitten 3.4.4 und 3.4.5 wurde beschrieben, dass sich durch Eincremen der Rückenfläche mit Imiquimod und Peptid eine effiziente und systemische CTL-Antwort induzieren lässt. Diese Vorgehensweise eignete sich nicht für die Untersuchungen an mastzelllosen Tieren, da durch systemische Gabe (i.v.) von BMMC in solche Mäuse viele Organe wieder mit Mastzellen besiedelt werden, nicht jedoch die Haut (Wolters *et al*, 2005). Um dennoch die Reaktion peptidspezifischer CTL *in vivo* verfolgen zu können, wurden die Ohren lokal mit BMMC rekonstituiert und die Tiere 6 Wochen später durch Applikation von Imiquimod und Peptid auf die Ohren immunisiert. Anschließend wurde die Proliferation spezifischer CTL im drainierenden (aurikularen) Lymphknoten verfolgt. Zu diesem Zweck wurden einen Tag vor Immunisierungsbeginn peptidspezifische T-Zellen des Stammes OT-I gewonnen, CFSE-markiert und i.v. in die Mäuse injiziert (d-1), um nach Immunisierung die Proliferation dieser Zellen im Lymphknoten analysieren zu können. Alle T-Zellen dieses congenen transgenen Mausstammes exprimieren den gleichen T-Zellrezeptor, der spezifisch das Peptid SIINFEKL, gebunden an den MHC-I-Komplex auf antigenpräsentierenden Zellen, erkennt. Dass alle T-Zellen den gleichen Rezeptor exprimieren, führt dazu, dass die OT-I-Mäuse fast ausschließlich peptidspezifische CD8⁺ T-Zellen besitzen. Daher wurde eine Milzzellsuspension von diesen Tieren mit CFSE fluoreszenzmarkiert und für den oben erwähnten adoptiven Transfer in die zu immunisierenden Mäuse verwendet. Die Applikation von Imiquimod mit SIINFEKL erfolgte an zwei aufeinander folgenden Tagen, d0 und d1. Einen Tag später (d2) wurden die regionalen aurikularen Lymphknoten isoliert und auf

Proliferation der fluoreszenzmarkierten peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen im FACS untersucht.

Der Vitalfarbstoff CFSE passiert im diacetylierten Zustand die Zellmembran (CFDASE: carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) und wird in der Zelle nach Abspaltung zweier Acetatgruppen zu CFSE umgewandelt, was im Bereich von 510-550nm fluoresziert. Weiterhin kann CFSE an Zellproteine binden und bleibt anschließend über Wochen und Monate stabil.

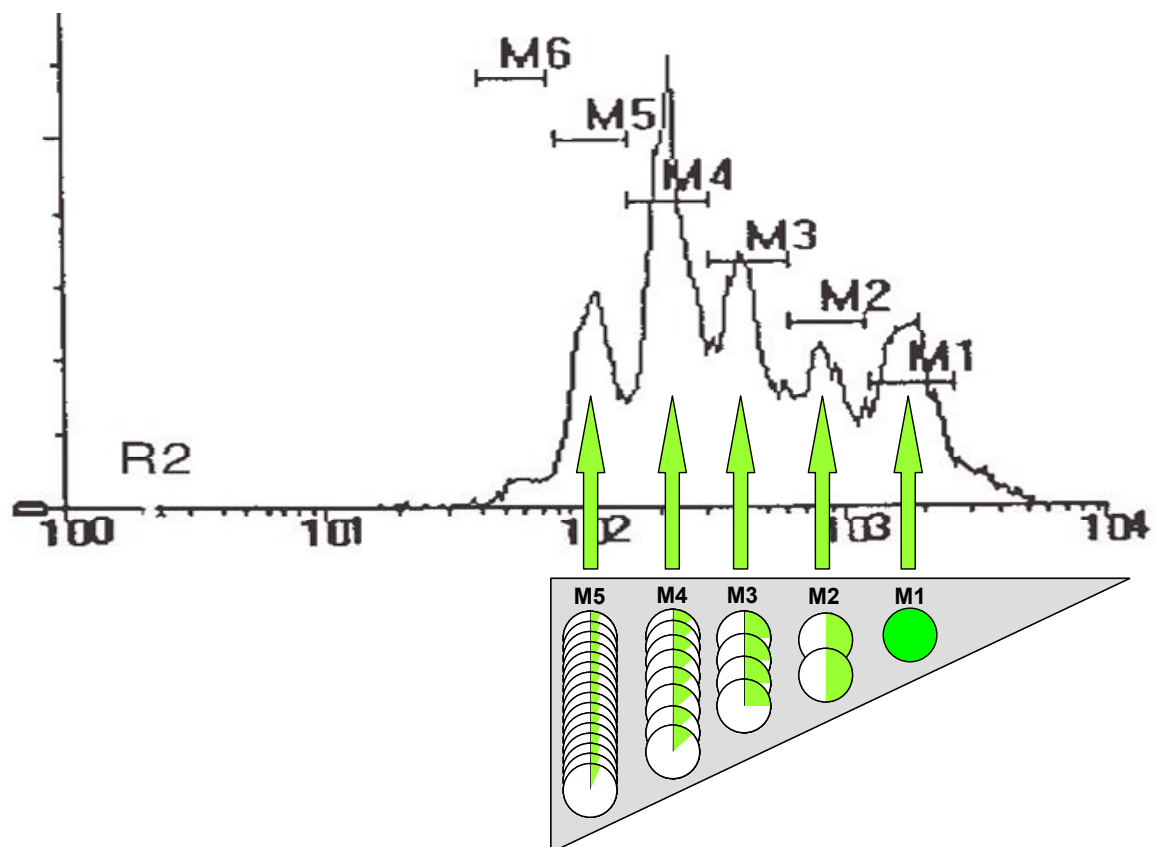


Abb. 22a: Darstellung der CFSE-Verdünnung in fluoreszenzmarkierten, proliferierenden Zellen

Nach Teilung einer CFSE-markierten Zelle (M1) nimmt die Fluoreszenz der entstehenden Tochterzellen um den Faktor zwei ab (M1 → M2). Bei jeder weiteren Teilung nimmt die Fluoreszenz ebenfalls um den Faktor zwei ab. Die Zellpopulationen der jeweiligen Teilungsstadien können im FACS als „Peaks“ dargestellt werden.

Nach jeder Zellteilung reduziert sich die Menge von CFSE in den Zellen linear um den Faktor zwei, was mittels FACS-Analyse bestimmt werden kann (Abb.22a).

Die Proliferation der adoptiv transferierten CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Mäusen kann als Maß für die Ausprägung einer cytotoxischen T-Zellantwort gesehen werden, was im Histogramm an der Abnahme der CFSE-Intensität zu erkennen ist (Abb.22b).

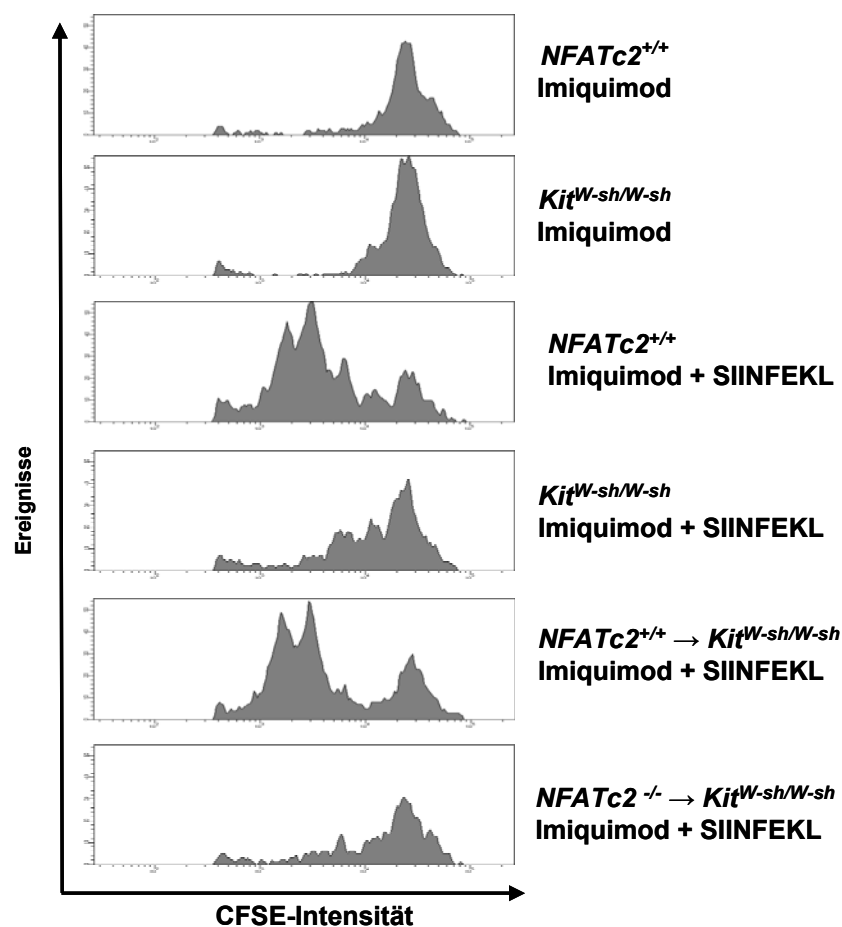


Abb. 22b: Die Expansion peptidspezifischer cytotoxischer T-Zellen wird vom NFATc2 in Mastzellen gefördert

Die Ohren von mastzell-defizienten Mäusen wurden mit BMMC aus NFATc2-kompetenten oder NFATc2-defizienten Tieren lokal rekonstituiert.

2×10^7 CFSE-markierte Milzzellen aus OT-I Mäusen wurden an Tag -1 in die Mäuse i.v. injiziert. Die Ohren wurden entweder mit Imiquimod alleine oder mit dem Antigen SIINFEKL + Imiquimod als Adjuvans an den Tagen 0 und 1 behandelt. An Tag 2 wurden die regionalen aurikularen Lymphknoten präpariert und auf die Anwesenheit von CFSE-markierten CD8⁺ cytotoxischen T-Zellen analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für jeweils drei Mäuse pro Bedingung.

Nach Behandlung mit Imiquimod + SIINFEKL am Ohr bilden Wildtyp-Mäuse (*NFATc2^{+/+}*) eine deutlich ausgeprägte cytotoxische T-Zellantwort aus, zu erkennen an der starken Proliferation der adoptiv transferierten CD8⁺ T-Zellen aus OT-I Mäusen. In den Lymphknoten der mastzelllosen Mäuse hingegen kommt es zu einer stark abgeschwächten Aktivierung dieser peptidspezifischen Zellen, was sich in der verminderten Proliferation dieser Zellen niederschlägt. Nach Rekonstitution mastzellloser Mäuse mit Wildtyp-BMMC kann die Intensität der Proliferation auf Wildtyp-Niveau angehoben werden, hingegen ist dies nach Rekonstitution mit NFATc2-defizienten Mastzellen nicht der Fall.

Um das Ausmaß der Proliferation der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu quantifizieren, wurde, wie in Abb.23 gezeigt, die mittlere Fluoreszenzintensität der jeweiligen Histogramme bestimmt. Niedrige Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit starker Proliferation der Zellen.

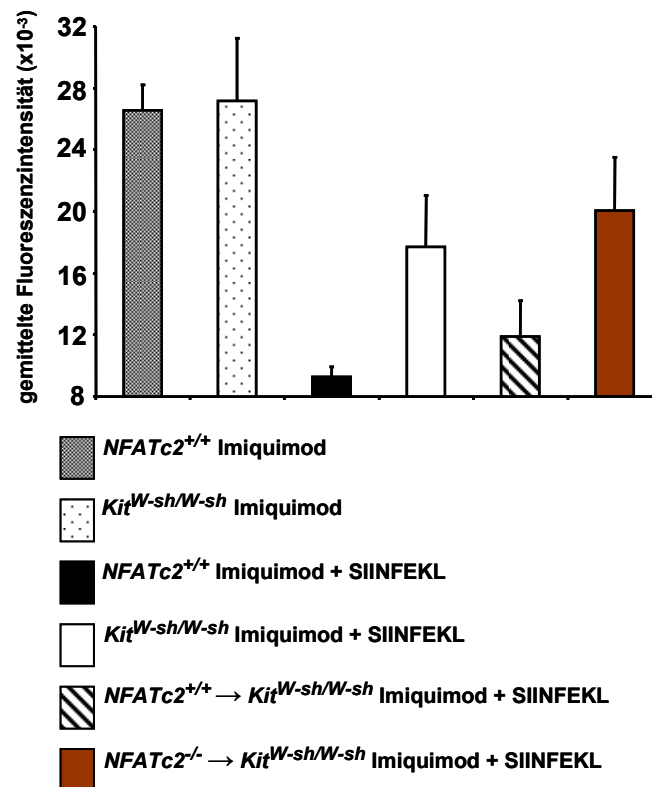


Abb. 23: Gemittelte Fluoreszenzintensität der jeweiligen Histogramme aus Abb.22b

Hier sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Histogramme aus Abb. 22b gezeigt.

In Abb.23 ist abermals ersichtlich, dass in den Lymphknoten der Wildtypiere die stärkste Proliferation der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen stattgefunden hat. Dies zeigt sich an der starken Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität. Die stark verminderte Proliferation in mastzell-defizienten Mäusen kann durch Rekonstitution von Wildtyp-BMMC weitestgehend ausgeglichen werden. NFATc2-defiziente Mastzellen sind jedoch nicht in der Lage, eine vergleichbare Proliferation der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu induzieren.

Die Ergebnisse in diesem Modell zeigen, dass die Expansion peptidspezifischer CD8⁺ T-Zellen entscheidend vom Transkriptionsfaktor NFATc2 in Mastzellen abhängig ist. Folglich ist die, nach TLR7-vermittelter Immunisierung, entstehende Immunantwort durch das Fehlen von NFATc2 in Mastzellen stark beeinträchtigt.

3.10 NFATc2-kontrollierte Gene in Mastzellen

Wie eingangs erwähnt, ist über die Regulation verschiedener Cytokine oder Chemokine durch NFATc2 in Mastzellen wenig bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Ionomycin die Expression von TNF- α und der Th2-Cytokine IL-9 und IL-13 durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors in *in vitro* generierten BMMC stark beeinträchtigt ist (Klein et al, 2006).

Es sind bislang nur wenige Gene bekannt (TNF- α , IL-13), die der Kontrolle von NFATc2 in Mastzellen unterliegen. Um weitere NFATc2-regulierte Gene zu identifizieren, wurden BMMC aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Tieren generiert und mit dem Ca²⁺-Ionophor Ionomycin für 1h aktiviert.

Mittels mRNA-Expressionsarray konnten in stimulierten Mastzellen etwa 12000 mRNAs nachgewiesen werden (siehe Abb.24). Aus dieser Menge stehen ca. 1000 mRNAs unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors NFATc2. Etwa die Hälfte dieser 1000 mRNAs wird stärker oder ausschließlich in stimulierten Wildtyp-BMMC exprimiert, die andere Hälfte stärker oder ausschließlich in NFATc2-defizienten BMMC. Die Expression der meisten Cytokin- und Chemokingene war jedoch durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors stark beeinträchtigt.

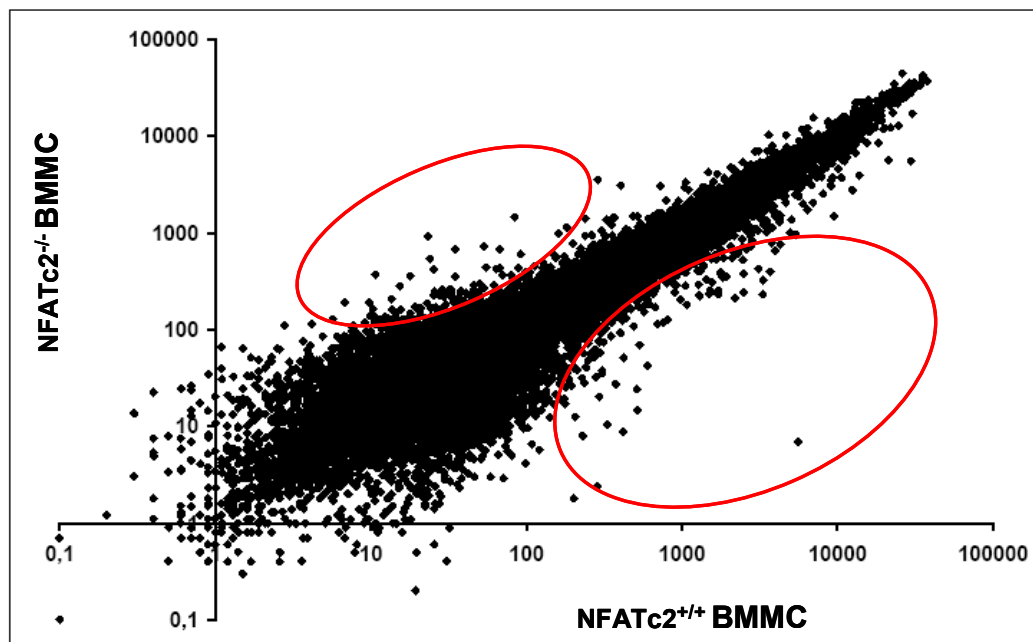


Abb. 24: Gesamtheit aller nachgewiesenen mRNAs nach Ionomycin-Stimulation in NFATc2-kompetenten und –defizienten BMMC

Dieser DotPlot zeigt die Anzahl aller vorkommenden mRNAs in Ionomycin-stimulierten Mastzellen. Die rot umrandeten Bereiche zeigen die mRNAs, die unter dem Einfluss von NFATc2 am stärksten reguliert werden.

Der Array konnte die stark verminderte Expression von TNF- α in NFATc2-defizienten Mastzellen bestätigen (s. Abb.25, obere Tabelle). Eine Übersicht weiterer mRNAs, die in Mastzellen stark von NFATc2 reguliert werden, findet sich in Abb.25.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		WT Iono 60min		NFATc2 KO Iono 60min		Description	Gene Title	Gene Symbol	Faktor
2	1450566_at	5693,6	P	10,3	A	gb:NM_010556.1 /DB_Xinterleukin 3		Il3	552,7787
3	1452231_x	320,7	P	5,2	A	gb:M74124.1 /DB_XREFinterferon activated gene 203		Ifi203	81,673077
4	1430979_a	247,8	P	5,7	A	gb:AK011963.1 /DB_XRperoxiredoxin 2		Prdx2	43,473684
5	1427381_at	275,9	P	10,6	A	gb:L38281.1 /DB_XREFimmunoresponsive gene 1		Irg1	26,028302
6	1418126_at	520,5	P	23,3	A	gb:NM_013653.1 /DB_Xchemokine (C-C motif) ligand 5		Ccl5	22,339056
7	1427429_at	3391,5	P	178,9	A	gb:X03019.1 /DB_XREFcolony stimulating factor 2 (granulocyte)		Csf2	18,957518
8	1421369_a	343,2	P	19,2	A	gb:NM_010750.1 /DB_Xmab-21-like 1 (C. elegans)		Mab2111	17,875
9	1421134_at	526,8	P	31,1	A	gb:NM_009704.1 /DB_Xamphiregulin		Areg	16,938907
10	1422286_a	2152,9	P	172,7	P	gb:NM_009372.1 /DB_XTG interacting factor		Tgif	12,466126
11	1424800_at	2688	P	255,3	A	gb:D10727.1 /DB_XREFenabled homolog (Drosophila)		Enah	10,52879
12	1418003_at	3108,4	P	326	P	gb:NM_025427.1 /DB_XRIKEN cDNA 1190002H23	gen	1190002H23Rik	9,5349693
13	1424776_a	3419,5	P	384,5	A	gb:BC025908.1 /DB_XRsolute carrier family 25, memb		Slc25a28	8,893368
14	1421969_a	3791,2	P	475,8	P	gb:U82536.1 /DB_XREFfatty acid amide hydrolase		Faah	7,9680538
15	1422924_at	4354,1	P	549	P	gb:NM_009404.1 /DB_Xtumor necrosis factor (ligand)		Tnfsf9	7,9309654
16	1453981_at	1109,6	P	140,3	P	gb:BB624336 /DB_XREIRIKEN cDNA 2900009107	gen	2900009107Rik	7,9087669
17	1427736_a	1982,8	P	268,1	P	gb:AJ318863.1 /DB_XRchemokine (C-C motif) receptor		Ccr2	7,3957479
18	1436494_x	249,8	P	35,1	A	gb:BF319098 /DB_XREFTRM1 tRNA methyltransferase		Trmt1	7,1188091
19	1419610_at	755,9	P	115,3	P	gb:AV231648 /DB_XREIRIKEN cDNA 2900009107	gen	2900009107Rik	6,555941
20	1449990_at	2446,1	P	388,8	P	gb:AF065914.1 /DB_XRinterleukin 2 /// similar to Interleukin 2		Il2 /// LOC630222	6,2914095
21	1415904_at	792,9	P	127	A	gb:NM_008509.1 /DB_Xlipoprotein lipase		Lpl	6,2433071
22	1460565_at	1731,5	P	279,3	P	gb:BF134253 /DB_XREFsolute carrier family 41, memb		Slc41a1	6,1994271
23	1419208_at	9438	P	1546,3	P	gb:NM_007746.1 /DB_Xmitogen activated protein kinase		Map3k8	6,1036021
24	1424801_at	1752,9	P	289,4	A	gb:BQ044016 /DB_XREFenabled homolog (Drosophila)		Enah	6,0570145
25	1438855_x	4011,6	P	708,6	P	gb:BB233088 /DB_XREFtumor necrosis factor, alpha-in		Tnfaip2	5,661304
26	1415834_at	5221,6	P	937,9	P	gb:NM_026268.1 /DB_Xdual specificity phosphatase 8		Dusp8	5,5673313
27	1419607_at	30652,7	P	5548,6	P	gb:NM_013693.1 /DB_Xtumor necrosis factor		Tnf	5,5244026
28	1450165_at	1543,7	P	281,6	P	gb:NM_011408.1 /DB_Xschlafen 2		Sfn2	5,4818892
29	1450513_at	5086,4	P	983	P	gb:NM_021293.1 /DB_XCD33 antigen		Cd33	5,1743642
30	1415874_at	2515	P	494	P	gb:NM_011896.1 /DB_Xsprouty homolog 1 (Drosophila)		Spry1	5,0910931
31	1425464_at	137	P	28	A	gb:BM214048 /DB_XREIRIKEN cDNA 4921506122	gen	4921506122Rik	4,8928571

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		WT Iono 60min		NFATc2 KO Iono 60min		Description	Gene Title	Gene Symbol	Faktor
2	1425584_x	288,5	P	3530	P	gb:BC010605.1 /D????? (artefact)			0,08172805
3	1460203_at	160,9	P	999,4	P	gb:NM_010585.1 /INOSITOL 1,4,5-TRIPHOSPHATE		ITPR1	0,1609966
4	1450330_at	50,2	P	289,6	P	gb:NM_010548.1 /INTERLEUKIN 10		Il10	0,16755674
5	1434440_at	239,6	P	1410,1	P	gb:BQ174580 /DB_GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN		GNAI1	0,16991703
6	1420114_at	48,8	P	244,3	P	gb:AW556396 /DEIRIKEN CDNA 2610507K20	GE	SLC14A1	0,1997544
7	1416199_at	325,9	P	1368,8	P	gb:NM_010631.1 /KINESIN FAMILY MEMBER G	KIFC3		0,23809176
8	1454959_s	730,4	P	3059,7	P	gb:BQ174580 /DB_GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN		GNAI1	0,23871621
9	1428209_at	146,9	P	614,4	P	gb:AK010400.1 /DBRAIN EXPRESSED GENE 4	BEX4		0,23909505
10	1452907_at	82	P	337,5	P	gb:AK010101.1 /D GALACTOSYL CERAMIDASE	GALC		0,24296296
11	1418649_at	112,9	P	454,1	P	gb:BB284358 /DB_EGL NINE HOMOLOG 3 (C. ELEGANS)	EGLN3		0,24862365
12	1417279_at	364,6	P	1439,5	P	gb:NM_008789.1 /INOSITOL 1,4,5-TRIPHOSPHATE		ITPR1	0,25328239
13	1439200_x	99,6	P	391,4	P	gb:BE686792 /DB_ERYTHROID DIFFERENTIATION	ERDR1		0,25447113
14	1421187_at	198,2	P	778,2	P	gb:U47035.1 /DB_CHEMOKINE (C-C MOTIF) RECEPTOR		CCR2	0,25469031
15	1438366_x	239,6	P	932,2	P	gb:BB144743 /DB_CHLORIDE CHANNEL 3		CLCN3	0,25702639
16	1420544_at	84,4	P	321,9	P	gb:NM_008099.1 /GERMINAL CENTER EXPRESSED GENE 2	GCET2		0,26219323
17	1427510_at	152,9	P	577,9	P	gb:U38501.1 /DB_GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN		GNAI1	0,26457865
18	1418829_a	96,6	P	352,1	P	gb:NM_013509.1 /ENOLASE 2, GAMMA NEURON	ENO2		0,27435388
19	1450716_at	153,5	P	557	P	gb:D67076.1 /DB_A DISINTEGRIN-LIKE AND METALLO	ADAMTS1		0,27558348
20	1436213_a	11,5	P	41,6	P	gb:AV023018 /DB_RIKEN CDNA 1110028C15	GE	1110028C15Rik	0,27644231
21	1415750_at	50	P	178,1	P	gb:BC019504.1 /DEIRIKEN CDNA 9430070M15	GE	TBL3	0,28074116
22	1425471_x	302,9	P	1067,8	P	gb:BC003855.1 /D????? (artefact)			0,28366735
23	1427441_a	131,1	P	462	P	gb:BF608645 /DB_SUCCINATE-COENZYME A LIGASE	SUCLG2		0,28376623
24	1426922_s	96,9	P	339,8	P	gb:BG071632 /DB_HIV-1 REV BINDING PROTEIN	HRB		0,28516775
25	1455678_at	355,1	P	1206,8	P	gb:AW542299 /DESEMA DOMAIN, IMMUNOLOGICAL	SEMA4B		0,29424925
26	1417299_at	103,9	P	346,1	P	gb:NM_010892.1 /NIMA (NEVER IN MITOSIS) G	NEK2		0,30020225
27	1452268_at	66,1	P	219	P	gb:AV337692 /DB_RIKEN CDNA 2810485I05	GE	2810485I05Rik	0,30182648
28	1432282_a	174,9	P	579	P	gb:AK008522.1 /DEIRIKEN CDNA 2010305C02	GE	2010305C02Rik	0,30207254
29	1423072_at	1057	P	3342,1	P	gb:AK013431.1 /DEIRIKEN CDNA 6720475J19	GE	6720475J19Rik	0,31626821
30	1425198_at	29,1	P	91,3	P	gb:BG076152 /DBPROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE	PTPN2		0,31872946
31	1430032_at	71	P	220,2	P	gb:AK019871.1 /DEIRIKEN CDNA 4921506I22	GE	4921506I22Rik	0,32243415

Abb. 25: Ausschnitt aus der Auflistung der am stärksten dysregulierten mRNAs in NFATc2-kompetenten und -defizienten BMBC

In der oberen Tabelle sind mRNAs aufgelistet, deren Expression in BMBC durch das Fehlen von NFATc2 am stärksten beeinträchtigt ist. Die untere Tabelle zeigt die durch NFATc2-Defizienz überexprimierten mRNAs in BMBC. Regulierte Cytokin-mRNAs sind mit der Farbe Orange gekennzeichnet, Chemokin-mRNAs mit Gelb.

Die mRNAs wurden mittels fluoreszenzmarkierten Sonden nachgewiesen und quantifiziert (gemessene Fluoreszenzintensitäten, Spalten B und D). Nach Abgleich mit Negativkontrollen wurden die mRNAs als vorhanden (P = present) oder nicht vorhanden (A = absent) eingestuft (Spalten C und E). Um Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mastzellen

darzustellen, wurden die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen mRNA miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Bsp.:

Fluoreszenzintensität IL-3 mRNA Wildtyp-BMMC / Fluoreszenzintensität IL-3 mRNA NFATc2-knockout-BMMC = 552,8 (Faktor, Spalte I)

Auffällig ist, dass IL-10-mRNA in aktivierten NFATc2-defizienten BMMC etwa 6-fach stärker exprimiert wird als in Wildtypzellen. Das Interleukin-10 ist ein wichtiges antiinflammatorisches Cytokin, das begrenzend auf eine Entzündungsreaktion wirken kann und somit den Organismus vor einer Überreaktion schützt.

Um die Ergebnisse des Arrays bezüglich der IL-10 Produktion zu bestätigen, wurden zunächst Wildtyp- und NFATc2-defiziente BMMC mit Ionomycin stimuliert. Nach 24 Stunden Stimulation wurde die Produktion von IL-10 mittels ELISA bestimmt.

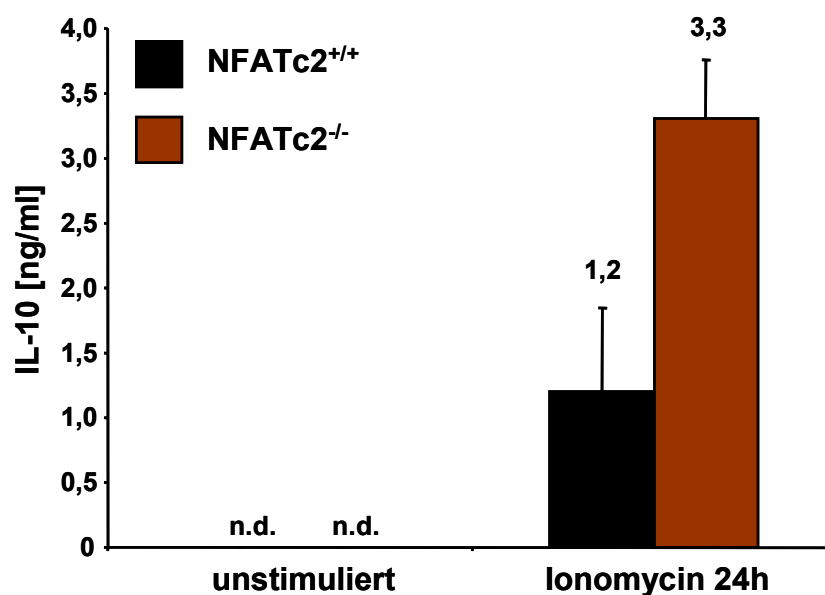


Abb. 26: Mastzellen aus NFATc2-defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Produktion von IL-10

Mastzellen aus Wildtyp- und NFATc2-defizienten Mäusen wurden für 24 Stunden zunächst mit Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde in den Kulturüberständen die Konzentration an gebildetem IL-10 bestimmt. n.d. = nicht detektierbar.

Wie aus Abb.26 hervorgeht, ist sowohl in Wildtyp- als auch in NFATc2-defizienten BMMC nach Stimulation mit Ionomycin die Expression von IL-10 deutlich induziert. In den NFATc2-defizienten BMMC ist jedoch die Produktion von IL-10 um das nahezu Dreifache erhöht.

Im Allgemeinen sind *in vitro* generierte Mastzellen in der Lage, IL-10 zu exprimieren. Daher ist anzunehmen, dass ausdifferenzierte Mastzellen *in vivo* als wichtige, potentielle IL-10-Produzenten in Entzündungsreaktionen angesehen werden können. Die Produktion von IL-10 scheint darüber hinaus von NFATc2 zumindest zum Teil reguliert zu werden.

3.11 Die Rolle von IL-10 in der TLR7-vermittelten Entzündungsreaktion in der Haut

Um zunächst zu prüfen, ob IL-10 im Verlauf der durch TLR7-Stimulation induzierten Entzündungsreaktion produziert wird, wurden im folgenden Versuch zunächst die Ohren von Wildtypmäusen für 48 Stunden mit Imiquimod behandelt und anschließend auf die Expression der IL-10-mRNA untersucht.

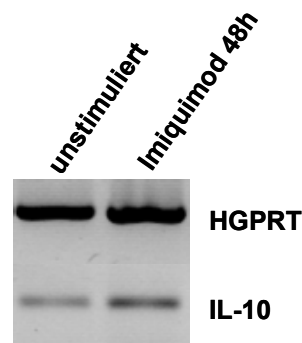


Abb. 27: Imiquimodbehandlung verstärkt die mRNA-Expression von IL-10 *in vivo*.

Wildtypmäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 1x täglich mit Imiquimod behandelt. Nach 48 Stunden wurde die RNA aus den Ohren isoliert und die Expression von IL-10 mRNA untersucht.

Wie in Abb. 27 ersichtlich, kann die mRNA-Expression von IL-10 mRNA durch tägliche Behandlung mit Imiquimod leicht gesteigert werden.

Daraufhin wurde im nächsten Versuch *in vivo* ermittelt, ob IL-10 direkten Einfluss auf die Limitierung der TLR7-vermittelten Entzündung nimmt. Hierzu wurde Wildtypmäusen neben täglicher Imiquimodbehandlung zusätzlich an zwei Tagen (d0 und d2) 500µg anti-IL-10-Rezeptor oder eine Isotypkontrolle i.v. injiziert.

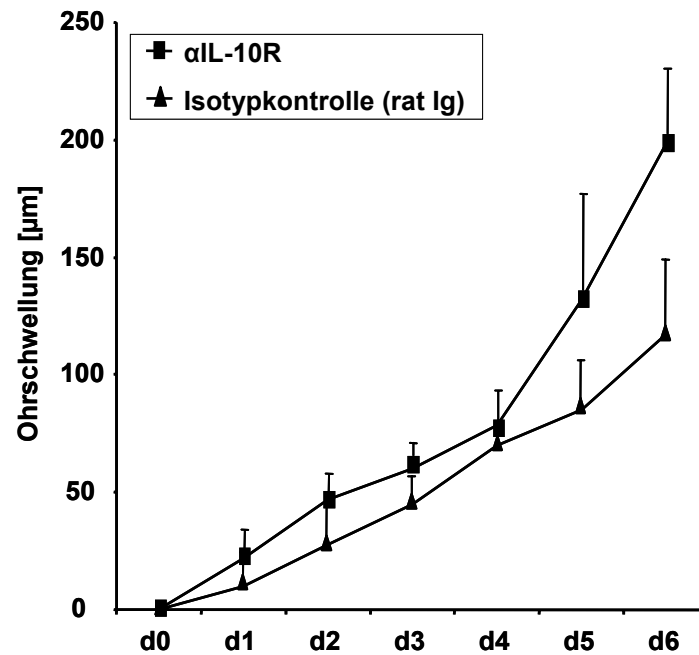


Abb. 28: IL-10 trägt nach längerer Imiquimodbehandlung zur Limitierung der Entzündungsreaktion bei

Die Ohren der Wildtypmäuse wurden täglich mit Imiquimod behandelt. An den Tagen 0 und 2 wurden entweder 0,5mg anti-IL-10-Rezeptor oder unspezifischer Kontrollantikörper in die Mäuse i.v. injiziert. Vor jeder Behandlung mit Imiquimod wurde die Ohrschwellung bestimmt. n = 2-3.

Wie aus Abb.28 hervorgeht, macht es bis einschließlich Tag 4 in Hinblick auf die Stärke der Entzündungsreaktion keinen Unterschied, ob die Tiere zuvor mit einem blockierenden Antikörper gegen den IL-10-Rezeptor oder mit Kontrollantikörper behandelt wurden. Ab Tag 5 lässt sich jedoch erkennen, dass die Blockade des IL-10-Rezeptors die Entzündungsreaktion deutlich verstärkt. IL-10 wirkt somit offensichtlich als ein Begrenzer der Entzündungsreaktion in diesem Modell. Weitere Arbeiten müssen zeigen, ob Mastzellen *in vivo* eine entscheidende Rolle als IL-10-Produzenten spielen.

4. Diskussion

4.1 Mastzellen als Auslöser rascher Entzündungsreaktionen

Im Jahre 1996 konnte durch zwei unabhängige Gruppen erstmals gezeigt werden, dass Mastzellen in IgE-unabhängigen Reaktionen unentbehrlich für eine effiziente Immunreaktion gegen pathogene Mikroorganismen sein können (Echtenacher *et al*, 1996; Malaviya *et al*, 1996). In ihren Modellen der septischen Peritonitis konnten sie eine schnelle Freisetzung des proinflammatorischen Cytokins TNF- α nachweisen, was zu einer raschen Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Peritoneum und somit zu einer effektiven Abtötung der Bakterien führt. Echtenacher *et al* zeigten sogar, dass nach 3 Tagen bereits alle mastzelldefizienten Tiere verstorben waren, hingegen lag die Mortalitätsrate bei Wildtyptieren nur bei 25%.

Schnell freigesetztes TNF- α von Mastzellen spielt auch in einer Entzündungsreaktion eine Rolle, die über Immunkomplexe aus IgG-Antikörpern hervorgerufen wird (sog. Arthusreaktion, allergische Reaktion vom Typ III). Bereits 5 Minuten nach intravenöser Injektion von Antigen und intraperitonealer Gabe von antigenspezifischen Antikörpern konnte in der Bauchhöhle eine „erste Welle“ von TNF- α festgestellt werden. Diese TNF- α -Produktion nahm nach 15 Minuten wieder ab, fehlte in mastzelllosen Mäusen aber vollends (Zhang *et al*, 1992). Nach ca. 6 Stunden folgte eine zweite, stärkere Welle von TNF- α , die den ins Peritoneum einwandernden Granulozyten sowie den Makrophagen zugeschrieben wird. In mastzelllosen Mäusen hingegen fiel der Granulozyten-Influx und die darauf folgende Freisetzung von TNF- α deutlich verzögert und geringer aus. Durch Rekonstitution der mastzelllosen Tiere mit BMDC aus Wildtyptieren konnten diese verminderte TNF- α -Produktion sowie der abgeschwächte Granulozyten-Influx wieder aufgehoben werden.

Die Eigenschaft der Mastzelle, schnell auf äußere Einflüsse (wie z.B. eindringende Bakterien) reagieren zu können, kann somit von überlebenswichtiger Bedeutung sein. Sie wird daher als Wächter des Immunsystems angesehen.

Die einleitend genannten Arbeiten verdeutlichen, dass in murinen Infektionsmodellen die Mastzellaktivierung über TLRs eine wichtige Rolle für die Immunantwort spielen kann. Interessanterweise haben Mastzellen die

Eigenschaft, flexibel in Abhängigkeit des aktivierenden Agens zu reagieren. Während die Aktivierung über kreuzvernetztes membranständiges IgE zur „anaphylaktischen“, d.h. schlagartigen Degranulation der Mastzelle führt, resultiert insbesondere die Aktivierung über TLRs in der sogenannten „piecemeal“-Degranulation. Letztere zeichnet sich durch die selektive Freisetzung von Mediatoren aus ohne, dass es zu einer massiven Degranulation kommt. Auf diese Weise kann die Freisetzung von Cytokinen von der Degranulation entkoppelt werden (Leal-Berumen *et al*, 1994; Theoharides & Cochrane, 2004; Theoharides *et al*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Entzündungsmodell der Haut angewandt, das durch den synthetischen TLR7-Liganden Imiquimod ausgelöst wird. Wie bereits durch Arbeiten an unserem Institut gezeigt werden konnte, kommt es nach Imiquimodbehandlung zu einer schnellen und mastzellabhängigen Entzündungsreaktion, die durch Produktion proinflammatorischer Cytokine von Mastzellen induziert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, dass in diesem TLR7-abhängigen System die Cytokinexpression und die damit verbundene Entzündungsreaktion stark vom Transkriptionsfaktor NFATc2 abhängig sind. NFATc2-defiziente Mäuse zeigten, verglichen zum Wildtyp, eine stark verminderte Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine, sowie eine um zwei Tage verzögerte Entzündungsreaktion, die mit einem verzögertem Influx von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Ohr Gewebe einherging (s. Tab.2).

Entzündungsparameter	Wildtyp (<i>NFATc2^{+/+}</i>)	<i>NFATc2^{-/-}</i>
Ohrschwellung	schnell (ab Tag 1)	verzögert (ab Tag 3)
Influx neutrophiler Granulozyten	Tag 3: stark Tag 6: bereits abnehmend	Tag 3: stark vermindert Tag 6: auf Wildtyp-Niveau
Produktion proinflammatorischer Cytokine und Chemokine	schnelle Produktion von TNF- α , IL-1 β , KC und IFN- β	stark vermindert: IL-1 β , KC und IFN- β keine: TNF- α

Tab.2: Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Entstehung einer TLR7-vermittelten Entzündung

Um nachweisen zu können, dass nach Imiquimodbehandlung NFATc2 in Mastzellen exprimiert werden muss, um eine schnelle Entzündungsreaktion hervorzurufen, wurden vor dem Auftragen des TLR7-Stimulus mastzelllose Mäuse mit NFATc2-defizienten oder Wildtypmastzellen rekonstituiert. Wie sich hiernach herausstellte, ist der Transkriptionsfaktor NFATc2 in Mastzellen für die Entstehung einer adäquaten Entzündungsreaktion unerlässlich (s. Abb.20).

Funktionen von NFATc2 *in vivo* wurden bislang ausschließlich in der Beeinflussung der T-Zellaktivität in adaptiven Immunreaktionen beschrieben (Serfling *et al*, 2007). Eine Funktion dieses Transkriptionsfaktors bei angeborenen Immunreaktionen ist jedoch unbekannt. Anhand der vorliegenden Arbeit konnte daher NFATc2 zum ersten Mal eine zentrale Funktion in der angeborenen Immunität zugesprochen werden. Wie aus zahlreichen Publikationen hervorgeht, führt die Stimulation aller Toll-like-Rezeptoren zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B-Familie (s. Abb.29), aber nicht zur NFAT-Aktivierung.

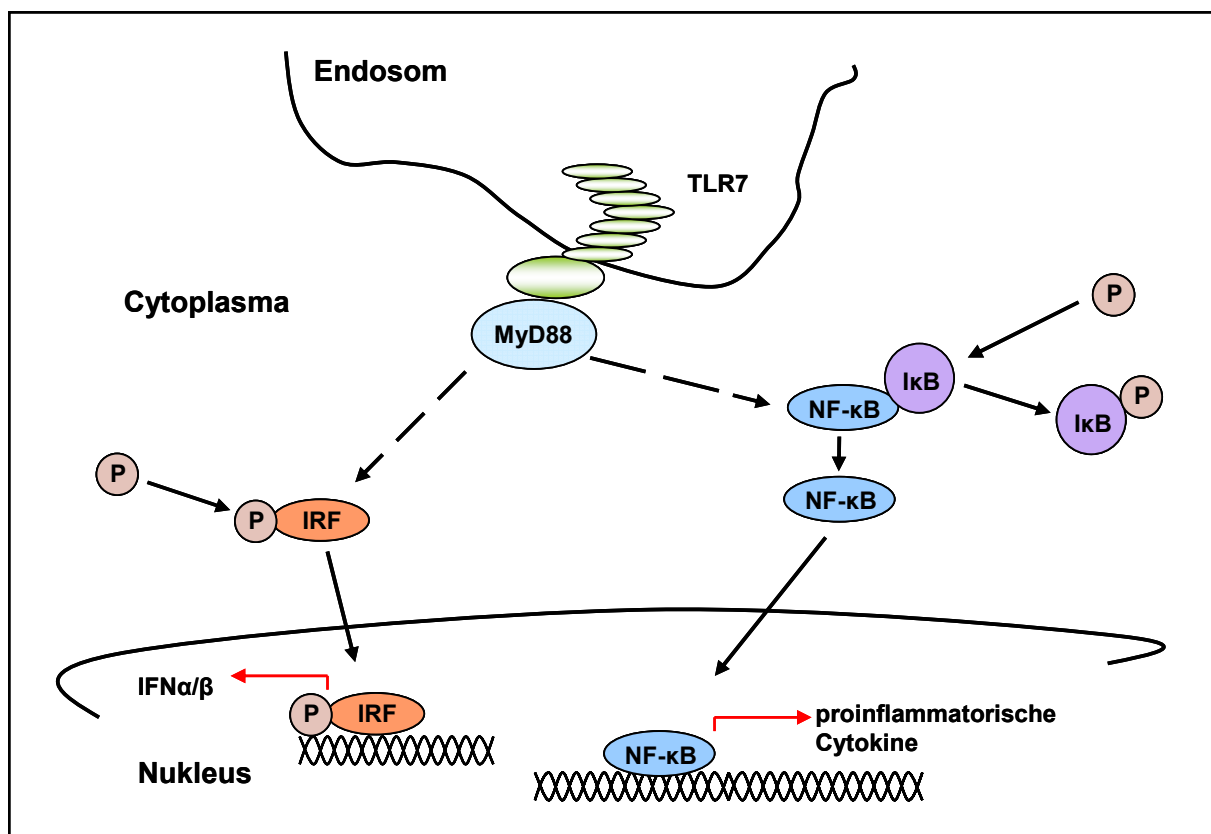


Abb. 29: Vereinfachtes Schema zur Aktivierung von NF- κ B nach Ligation des TLR7

Die Aktivierung des TLR7 führt über das Adapterprotein MyD88 zur Phosphorylierung und Degradation der inhibitorischen Untereinheit des inaktiven NF- κ B, wodurch das aktivierte NF- κ B in den Zellkern wandern kann und somit Cytokinexpression induziert. Über MyD88 werden zusätzlich Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie phosphoryliert („interferon regulatory factor“), welche in den Zellkern wandern und für die Produktion von Typ-1-Interferonen verantwortlich sind.

Die beiden Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B besitzen zwar gemeinsame Strukturmerkmale im Bereich der DNA-Bindedomäne (RSD – Rel similarity domains) (Serfling *et al*, 2004) und können sogar in einzelnen Fällen gleiche Bindungsstellen besetzen (Jin *et al*, 2003; Macian *et al*, 2000; Serfling *et al*, 2000), sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Aktivierung. So führt ein starkes, kurzlebige Ca^{2+} -Signal in der Zelle bereits zur Aktivierung von NF- κ B, hingegen wird NFAT nur durch einen lang anhaltenden und starken Ca^{2+} -Einstrom aktiviert (Dolmetsch *et al*, 1997). Dieser wird letztlich über geöffnete Calciumkanäle in der Plasmamembran erreicht (Oh-hora & Rao, 2008), was durch TLR-Stimulation alleine jedoch nicht bewerkstelligt werden kann.

Dies lässt vermuten, dass die Mastzelle *in vivo* außer Imiquimod einen zusätzlichen Stimulus zur NFATc2-Aktivierung benötigt. Hierbei könnten neutrophile Granulozyten als früh einwandernde Effektorzellen eine wichtige Rolle spielen (Abb. 30).

Aktiviert neutrophile Granulozyten können Substanzen sezernieren, die in der Lage sind, Mastzellen prinzipiell über „G-Protein coupled receptors“ (GPCR) zu aktivieren. Mitglieder dieser Gruppe membranständiger Rezeptoren zeichnen sich durch ein sogenanntes „7 Helix-turn-Helix“-Motif aus und können ein Ca^{2+} -Signal ausgehend von Phospholipase C- β auslösen (Kuehn & Gilfillan, 2007). Zu dieser großen Gruppe von Rezeptoren zählen unter anderem die sogenannten „proteinase activated receptors“ (PAR) und der Rezeptor für fMLP¹². Diese Rezeptoren können u.a. von Proteasen aktiviert werden, die von aktivierten neutrophilen Granulozyten stammen (Moormann *et al*, 2006; Ali *et al*, 2000).

Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit fMLP in humanen Mastzellen ein lang anhaltendes Ca^{2+} -Signal induziert, was eine Aktivierung von NFAT zur Folge hat (Ali *et al*, 2000).

Weiterhin sind Mastzellen und neutrophile Granulozyten nach Aktivierung in der Lage, antimikrobielle Peptide, wie Defensine oder Cathelicidine, zu bilden. Diese Peptide können ihrerseits die Zellen wiederum aktivieren.

So konnte in der Haut von Mäusen nach Streptococccen-Infektion gezeigt werden, dass Mastzellen durch Produktion von Cathelicidinen Bakterien abtöten und neutrophile Granulozyten an den Entzündungsherd locken (Di *et al*, 2003).

¹² fMLP: N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin; bakterielles, chemotaktisches Peptid

Darüber hinaus können von neutrophilen Granulozyten freigesetzte Defensine zur Aktivierung und Degranulation von Mastzellen führen (Befus *et al*, 1999).

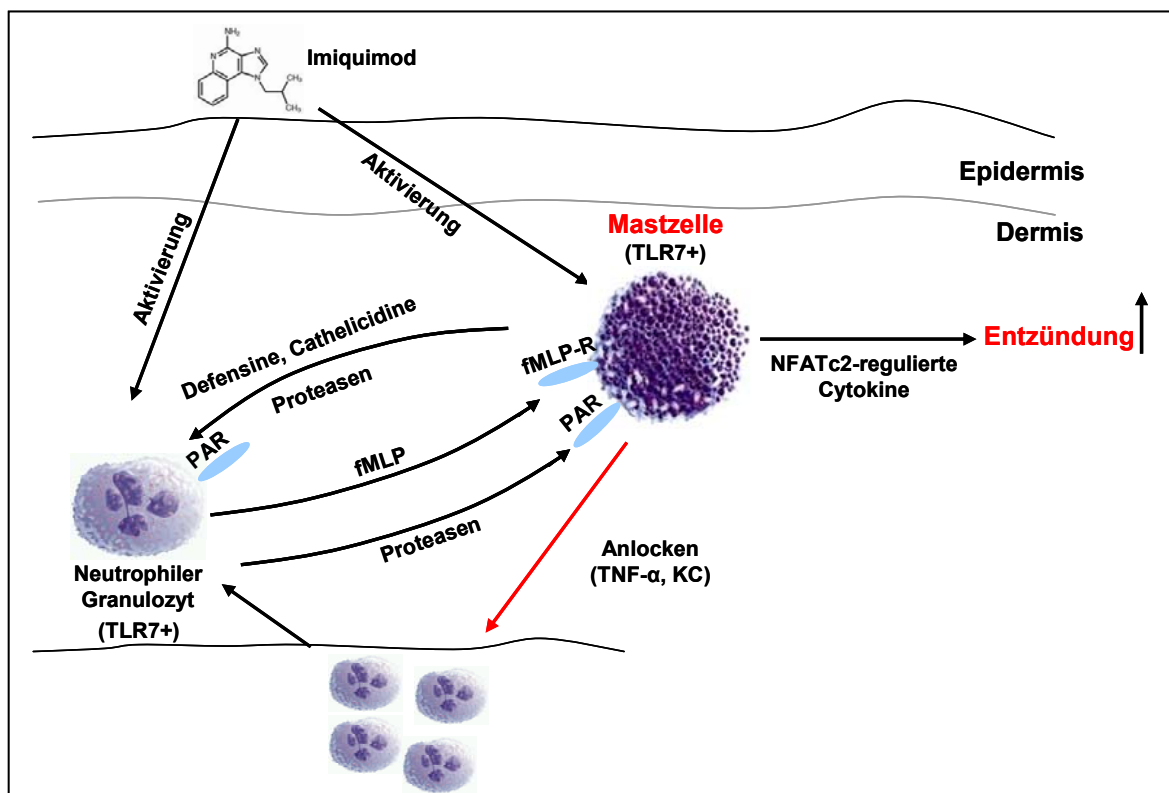


Abb. 30: Mögliche Interaktionen zwischen Mastzellen und neutrophilen Granulozyten nach Aktivierung über TLR7

Nach Aktivierung der dermalen Mastzelle durch Imiquimod über den TLR7 werden durch Produktion von TNF- α und KC neutrophile Granulozyten aus der Blutbahn in das Gewebe gelockt. Diese können zum einen über Defensine, Cathelicidine oder Proteasen, welche von den dermalen Mastzellen freigesetzt werden, aktiviert werden. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die neutrophilen Granulozyten über den TLR7-Liganden Imiquimod selbst stimuliert werden¹³. Daraufhin setzen die Granulozyten Proteasen frei, welche wiederum GPCR (G-Protein coupled receptors) auf den Mastzellen aktivieren (fMLP-Rezeptor; PAR – proteinase activating receptor) können. Die Aktivierung von Mastzellen kann auch durch Defensine von neutrophilen Granulozyten verstärkt werden. Dies könnte zu einem lang anhaltenden Ca²⁺-Einstrom in die Mastzelle und somit zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc2 führen. Daraufhin kommt es zu einer starken Expression proinflammatorischer Cytokine und Chemokine, was letztlich eine starke Entzündungsreaktion zur Folge hat.

Weiterhin scheint sich eine Interaktion zwischen Mastzellen und neutrophilen Granulozyten auch auf die entstehende adaptive Immunantwort auszuwirken. Erste Arbeiten am eigenen Institut zeigen, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten *in vivo* zu einer extrem verminderten CTL-Antwort nach transkutaner

¹³ Bei humanen Granulozyten wurde festgestellt, dass sie alle bislang bekannten TLRs exprimieren (ausgenommen TLR3) und über sie aktiviert werden können (Hayashi *et al*, 2003).

Immunisierung führt (unveröffentlichte Beobachtungen von Dr. M. Radsak und P. Aranda-Lopez). Weiterhin gibt es nicht publizierte Hinweise, dass radioaktiv lethal bestrahlte Wildtypmäuse (9Gy), die anschließend mit Knochenmark aus TLR7-defizienten Mäusen rekonstituiert wurden, ebenfalls eine stark verminderte CTL-Antwort nach Immunisierung generieren. Unter diesen Bedingungen muss man davon ausgehen, dass sich aus dem transferierten Knochenmark TLR7-defiziente neutrophile Granulozyten entwickeln, die strahlenresistenten TLR7-kompetenten Mastzellen im Rezipienten jedoch erhalten bleiben (Soule *et al*, 2007). Man kann daher vermuten, dass TLR7-exprimierende neutrophile Granulozyten im Sinne einer positiven Rückkopplung eine wichtige Rolle für die Mastzellaktivierung spielen können.

Grundsätzlich wäre eine starke Erhöhung des cytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels durch GPCR-vermittelte Signale für die Aktivierung von NFAT ausreichend. Dies könnte auch durch neuronale Signale erreicht werden. Eine gerade erschienene Arbeit zeigt, dass sensorische Hautnerven mastzellabhängige Reaktionen verstärken können (Siebenhaar *et al*, 2008). Mastzellen finden sich häufig in direkter Nähe peripherer Nerven und Nervenendigungen. Neuere Publikationen identifizierten Adhäsionsmoleküle, die eine Nervenzell-Mastzell-Interaktion vermitteln (Furuno *et al*, 2005; Ito & Oonuma, 2006). Eine Kommunikation zwischen Nervenzellen und Mastzellen kann bidirektional erfolgen. Mastzellen sind in der Lage, Substanzen mit direkter Wirkung auf Neuronen freizusetzen, wie Histamin, Serotonin, Adenosin, verschiedene Cytokine und Metabolite der Arachidonsäure. Andererseits können Mastzellen durch verschiedene Neuropeptide aktiviert werden (Bauer & Razin, 2000; Van *et al*, 2007). Ein relativ gut untersuchtes Beispiel ist das Peptid „Substance P“, welches über GPCRs (Neurokinin-Rezeptoren) die Aktivierung und Degranulierung von Mastzellen bewirkt (Furuno *et al*, 2004).

Man kann also davon ausgehen, dass außer TLR7 *in vivo* weitere Signale an der Aktivierung der Mastzellen beteiligt sind, deren Identifizierung Gegenstand weiterführender Arbeiten sein wird. Derzeit werden am Institut für Immunologie *in vitro*-Modelle etabliert, die eine Ko-Kultur von Mastzellen mit neutrophilen Granulozyten und Zellen normalen Ursprungs erlauben, um mögliche gegenseitige Beeinflussungen gezielt zu untersuchen.

4.2 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 in Mastzellen bei der Entstehung adaptiver Immunreaktionen

Alle bislang verfügbaren Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Mastzelle die Entstehung adaptiver Immunantworten prinzipiell an drei Stellen positiv beeinflussen kann.

- I. Über die Fähigkeit der Mastzelle, die Wanderung antigenpräsentierender Zellen in die drainierenden Lymphknoten zu fördern
- II. In den drainierenden Lymphknoten ein Mikromilieu zu generieren, was das Aufeinandertreffen von antigenpräsentierenden Zellen mit Lymphozyten ermöglicht
- III. Über Mastzell-T-Zell-Interaktion die Aktivität von T-Zellen zu verstärken

Zu I.

Eine beeinträchtigte Wanderung epidermaler Langerhanszellen und eine stark abgeschwächte Kontaktallergie gegen lokal appliziertes Hapten wurde von Bryce et al in Mäusen berichtet, denen entweder Mastzellen fehlten oder IgE bzw. der hochaffine Fc ϵ RI (Bryce *et al*, 2004). In einem Mausmodell der passiven kutanen Anaphylaxis wurde weiterhin berichtet, dass die lokale Aktivierung von Mastzellen über IgE-Antigen ein starkes Signal liefert für die Wanderung von Langerhanszellen in die drainierenden Lymphknoten. Dies war teilweise abhängig von der Histaminwirkung auf H₂-Rezeptoren; jedoch war die lokale Gabe von Histamin allein nicht ausreichend, die Auswanderung von Langerhanszellen zu induzieren. Dieser Befund deutet darauf hin, dass weitere Mastzellmediatoren in diesem Prozess eine Rolle spielen (Jawdat *et al*, 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass die effiziente Wanderung von Langerhanszellen nach lokaler Gabe des Kontaktallergens FITC abhängig ist von Mastzellen und Mastzell-TNF- α (Suto *et al*, 2006). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen zeigte die letztgenannte Studie, dass das Ausmaß der Langerhanszell-Wanderung in TNF- α und mastzelldefizienten Mäusen jenes in Wildtyp-Tieren nach 48 bis 72 Stunden erreichte bzw. noch übertraf (Heib *et al*, 2007). In dieser Arbeit wirkte sich die verzögerte Auswanderung von Langerhanszellen jedoch nicht auf die Hapten-spezifische T-Zellantwort in mastzell- oder TNF- α -defizienten Mäusen aus. Eine Studie, die den

Mechanismus der Mastzellwirkung auf die Langerhanszell-Wanderung untersuchte, stellte fest, dass die IgE-Antigen-induzierte Langerhanszell-Wanderung komplett abhängig war von Mastzell-TNF- α , während die Peptidoglykan-induzierte Langerhanszell-Wanderung nur teilweise von Mastzell-TNF- α abhängig war (Jawdat *et al*, 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass der Mechanismus der Mastzellwirkung stark abhängig ist von der Art und Weise der Mastzellaktivierung. Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass die Mediatorproduktion von Mastzellen abhängt von der Art des Stimulus (z.B. Aktivierung über IgE versus Peptidoglykan) und sich sogar zwischen verschiedenen TLR-Aktivatoren unterscheiden kann (Jawdat *et al*, 2006; Matsushima *et al*, 2004). Eine gerade erschienene Arbeit zeigt, dass die Wanderung mucosaler Dendritischer Zellen nach Aktivierung von Mastzellen durch kleine kationische Peptide und polymere Verbindungen stark von Mastzell-TNF- α abhängig ist (McLachlan *et al*, 2008). Solche Verbindungen („compound 48/80“, „mast cell-degranulating peptide“, Catestatin) bewirken die Aktivierung von Mastzellen über GPCRs respektive G_i-Proteine. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Wanderung von Langerhans-Zellen in dem verwendeten Modell abhängig ist von Mastzell-NFATc2, lässt sich durch die Bedeutung von NFATc2 für die Produktion von Mastzell-Cytokinen erklären. Insbesondere von Mastzellen produziertes IL-1 ist von zentraler Bedeutung für die Auswanderung von Langerhanszellen nach lokaler Applikation von Imiquimod (Heib *et al*, 2007). Die Produktion des Cytokins ist in Abwesenheit von Mastzell-NFATc2 stark reduziert.

Zu II.

Mehrere Studien zeigten übereinstimmend, dass die nach Infektion bzw. Immunisierung eintretende Schwellung der drainierenden Lymphknoten abhängig ist von Mastzellen (McLachlan *et al*, 2003; Heib *et al*, 2007; Jawdat *et al*, 2006). Eine besondere Rolle kommt hierbei dem Mastzell-TNF- α zu. Auch dessen Produktion ist stark abhängig von NFATc2, wodurch sich die fehlende Ausprägung der Lymphknoten-Hypertrophie in NFATc2-defizienten Mäusen erklären lässt. Ob für diesen Effekt die Wanderung von Mastzellen in den Lymphknoten notwendig ist, oder ob das von Mastzellen produzierte TNF- α über afferente Lymphbahnen an den Zielort gelangt, scheint modellabhängig zu sein.

Zu III.

Es mehren sich Hinweise, dass Mastzellen auch direkt in der Lage sind, die Aktivierung von T-Zellen zu verstärken. Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass dies abhängig ist von direktem Mastzell-T-Zell-Kontakt sowie von TNF- α (Nakae *et al*, 2005). Durch Expression des Liganden für OX40 können Mastzellen ebenfalls die T-Zellaktivierung verstärken (Nakae *et al*, 2006). Solche direkten Mastzell-T-Zell-Interaktionen könnten lokal im entzündeten Gewebe eine wichtige Rolle spielen, in dem T-Zellen und Mastzellen in direktem Kontakt zu finden sind (Nakae *et al*, 2005).

4.3 Die Rolle der Mastzelle bei der Begrenzung von Immunreaktionen

Die Daten der vorliegenden Arbeit untermauern die Bedeutung der Mastzelle für die Ausbildung angeborener und adaptiver Immunreaktionen. Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 ist es offensichtlich, in der Mastzelle die Produktion hierfür wichtiger Cytokine zu fördern. Jedoch zeigten Rekonstitutionsexperimente, wie in Abb.20 dargestellt, reproduzierbar die Tendenz, dass die Entzündungsreaktionen in mastzelllosen Tieren, die zuvor Mastzellen aus NFATc2-defizienten Spendern erhielten, schwächer waren als in mastzelllosen Mäusen. Dies führte zur Hypothese, dass es in NFATc2-defizienten Mastzellen zu einer Überproduktion immunsuppressiver Mediatoren kommt. In der Tat zeigen die Daten der mRNA-Expressionsanalyse eine starke Überproduktion von IL-10-mRNA in NFATc2-defizienten Mastzellen, was auf Proteinebene bestätigt werden konnte. Dass IL-10 tatsächlich an der Begrenzung der nach Imiquimodbehandlung einsetzenden Entzündungsreaktion beteiligt ist, zeigte sich nach der Blockade des IL-10-Rezeptors mittels Antikörper *in vivo*, was zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion ab Tag 4 führte. Dass Mastzellen *in vivo* als IL-10-Produzenten eine tragende Rolle spielen, müsste man durch Züchtung IL-10- und NFATc2-doppeldefizienter Mäuse zeigen, die als Quelle für Mastzellen in Rekonstitutionsexperimenten dienen können.

Unterstützt wird die Annahme, dass Mastzellen das Ausmaß von Immunreaktionen limitieren können, durch zwei neu erschienene Arbeiten. So zeigen Grimaldeston *et al* in einem Modell der allergischen Kontaktdermititis, dass von Mastzellen produziertes IL-10 wichtig ist zur Vermeidung pathologischer

Gewebsschäden (Grimbaldeston *et al*, 2007). Norman *et al* berichten ebenfalls in einem murinen Modell der Kontaktallergie, dass nach Auslösen der allergischen Reaktion in zuvor sensibilisierten mastzelllosen Tieren kein IL-10 nachweisbar ist. Dies geht einher mit einer überschießenden allergischen Reaktion im Vergleich zu Wildtyptieren, in denen lokal IL-10 nachgewiesen werden kann (Norman *et al*, 2008).

Zusammenfassend legen diese Beobachtungen nahe, dass die Mastzelle nicht nur als Verstärker von Immunreaktion fungiert, sondern in der Lage, ist solche Reaktionen auch zu modulieren.

Die Fähigkeit zur Modulation von Immunantworten sowie die Interaktion von Mastzellen mit weiteren Zellen des Immunsystems, wie Dendritischen Zellen, T-Zellen und Granulozyten, aber auch mit Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems, werden sicherlich in Zukunft den Schwerpunkt weiterführender Arbeiten bilden.

5. Zusammenfassung

Neueste Arbeiten zeigen, dass Mastzellen wichtige Funktionen innerhalb des angeborenen und erworbenen Immunsystems ausüben. Von zentraler Bedeutung ist hierbei die Fähigkeit der Mastzelle, auf IgE-unabhängige Signale zu reagieren und ein breites Spektrum an Cytokinen und Chemokinen zu produzieren.

Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie sind wichtige Regulatoren der Immunhomöostase und Cytokinproduktion. In Mausmodellen führt die Defizienz des NFATc2 zu überschießenden Immunreaktionen, was ursächlich auf die Hyperreaktivität NFATc2-defizienter T-Zellen zurückgeführt wird. Demgegenüber zeigten unsere eigenen *in vitro* durchgeführten Arbeiten, dass die Produktion wichtiger entzündungsfördernder Cytokine in Mastzellen abhängig ist von NFATc2.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von NFATc2 in einem Mastzell-abhängigen Modell der transkutanen Immunisierung mit einem TLR7-Liganden als Adjuvans zu untersuchen. Experimente an NFATc2-defizienten Mäusen ergaben zunächst, dass die Schlüsselprozesse Entzündung, Auswanderung antigenpräsentierender Zellen, Lymphknotenhypertrophie sowie Expansion und Funktion spezifischer T-Zellen in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors NFATc2 extrem beeinträchtigt sind. Dieser experimentell induzierte Phänotyp gleicht somit dem mastzellloser Mäuse in dieser Immunisierungsstudie. Rekonstitutionsexperimente erlaubten es, *in vitro* generierte Mastzellen aus NFATc2-defizienten und NFATc2-kompetenten Spendern in mastzelllose Mäuse zu transferieren und deren Reaktivität in dem angewandten TLR7-abhängigen Entzündungsmodell *in vivo* zu vergleichen.

Hierbei zeigte sich, dass die in NFATc2-defizienten Mäusen nach transkutaner Immunisierung zu beobachtenden Beeinträchtigungen gänzlich auf die Abwesenheit des NFATc2 in Mastzellen zurückzuführen sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass der Transkriptionsfaktor NFATc2 für die Funktion der Mastzelle *in vivo* eine bedeutsame Rolle spielt. Dies betrifft sowohl Reaktionen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Darüber hinaus könnte NFATc2 ein wichtiges Ziel bei therapeutischen Maßnahmen gegen mastzellabhängige Krankheiten darstellen.

Literaturverzeichnis

- Akira,S., Takeda,K., & Kaisho,T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.*, 2, 675-680.
- Ali,H., Ahamed,J., Hernandez-Munain,C., Baron,J.L., Krangel,M.S., & Patel,D.D. (2000) Chemokine production by G protein-coupled receptor activation in a human mast cell line: roles of extracellular signal-regulated kinase and NFAT. *Journal of Immunology*, 165, 7215-7223.
- Anderson,K.V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12, 13-19.
- Arinobu,Y., Iwasaki,H., Gurish,M.F., Mizuno,S., Shigematsu,H., Ozawa,H., Tenen,D.G., Austen,K.F., & Akashi,K. (2005) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, 18105-18110.
- Bauer,O. & Razin,E. (2000) Mast Cell-Nerve Interactions. *News Physiol Sci.*, 15, 213-218.
- Befus,A.D., Mowat,C., Gilchrist,M., Hu,J., Solomon,S., & Bateman,A. (1999) Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *Journal of Immunology*, 163, 947-953.
- Berrozpe,G., Timokhina,I., Yukl,S., Tajima,Y., Ono,M., Zelenetz,A.D., & Besmer,P. (1999) The W(sh), W(57), and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood*, 94, 2658-2666.
- Bopp,T., Palmetshofer,A., Serfling,E., Heib,V., Schmitt,S., Richter,C., Klein,M., Schild,H., Schmitt,E., & Stassen,M. (2005) NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 201, 181-187.
- Bryce,P.J., Miller,M.L., Miyajima,I., Tsai,M., Galli,S.J., & Oettgen,H.C. (2004) Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity.*, 20, 381-392.
- Chen,C.C., Grimaldeston,M.A., Tsai,M., Weissman,I.L., & Galli,S.J. (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, 11408-11413.
- Chuvpilo,S., Avots,A., Berberich-Siebelt,F., Glockner,J., Fischer,C., Kerstan,A., Escher,C., Inashkina,I., Hlubek,F., Jankevics,E., Brabletz,T., & Serfling,E. (1999) Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 162, 7294-7301.
- Coghlan,V.M., Perrino,B.A., Howard,M., Langeberg,L.K., Hicks,J.B., Gallatin,W.M., & Scott,J.D. (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*, 267, 108-111.
- Crabtree,G.R. & Olson,E.N. (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 Suppl, S67-S79.
- Crozat,K. & Beutler,B. (2004) TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 6835-6836.
- de la Pompa,J.L., Timmerman,L.A., Takimoto,H., Yoshida,H., Elia,A.J., Samper,E., Potter,J., Wakeham,A., Marengere,L., Langille,B.L., Crabtree,G.R., & Mak,T.W. (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*, 392, 182-186.

- Di,N.A., Vitiello,A., & Gallo,R.L. (2003) Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J Immunol.*, 170, 2274-2278.
- Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., & Reis e Sousa (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*, 303, 1529-1531.
- Dolmetsch,R.E., Lewis,R.S., Goodnow,C.C., & Healy,J.I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, 386, 855-858.
- Echtenacher,B., Falk,W., Mannel,D.N., & Krammer,P.H. (1990) Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *Journal of Immunology*, 145, 3762-3766.
- Echtenacher,B., Mannel,D.N., & Hultner,L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, 381, 75-77.
- Edelson,B.T., Li,Z., Pappan,L.K., & Zutter,M.M. (2004) Mast cell-mediated inflammatory responses require the alpha 2 beta 1 integrin. *Blood*, 103, 2214-2220.
- Edelson,B.T., Stricker,T.P., Li,Z., Dickeson,S.K., Shepherd,V.L., Santoro,S.A., & Zutter,M.M. (2006) Novel collectin/C1q receptor mediates mast cell activation and innate immunity. *Blood*, 107, 143-150.
- Erb,K.J., Twardzik,T., Palmetshofer,A., Wohlleben,G., Tatsch,U., & Serfling,E. (2003) Mice deficient in nuclear factor of activated T-cell transcription factor c2 mount increased Th2 responses after infection with *Nippostrongylus brasiliensis* and decreased Th1 responses after mycobacterial infection. *Infect.Immun.*, 71, 6641-6647.
- Furuno,T., Ito,A., Koma,Y., Watabe,K., Yokozaki,H., Bienenstock,J., Nakanishi,M., & Kitamura,Y. (2005) The spermatogenic Ig superfamily/synaptic cell adhesion molecule mast-cell adhesion molecule promotes interaction with nerves. *Journal of Immunology*, 174, 6934-6942.
- Furuno,T., Ma,D., van der Kleij,H.P., Nakanishi,M., & Bienenstock,J. (2004) Bone marrow-derived mast cells in mice respond in co-culture to scorpion venom activation of superior cervical ganglion neurites according to level of expression of NK-1 receptors. *Neurosci.Lett.*, 372, 185-189.
- Gessner,A., Mohrs,K., & Mohrs,M. (2005) Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *Journal of Immunology*, 174, 1063-1072.
- Grimbaldeston,M.A., Chen,C.C., Piliponsky,A.M., Tsai,M., Tam,S.Y., & Galli,S.J. (2005) Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am.J.Pathol.*, 167, 835-848.
- Grimbaldeston,M.A., Nakae,S., Kalesnikoff,J., Tsai,M., & Galli,S.J. (2007) Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat.Immunol.*, 8, 1095-1104.
- Gurish,M.F., Tao,H., Abonia,J.P., Arya,A., Friend,D.S., Parker,C.M., & Austen,K.F. (2001) Intestinal Mast Cell Progenitors Require CD49beta7 (alpha4beta7 Integrin) for Tissue-specific Homing. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 1243-1252.
- Gwack,Y., Feske,S., Srikanth,S., Hogan,P.G., & Rao,A. (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca²⁺ entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium*, 42, 145-156.
- Hallgren,J. & Gurish,M.F. (2007) Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol.Rev.*, 217, 8-18.

- Hayashi,S., Kunisada,T., Ogawa,M., Yamaguchi,K., & Nishikawa,S. (1991) Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res.*, 19, 1267-1271.
- Heib,V., Becker,M., Taube,C., & Stassen,M. (2008) Advances in the understanding of mast cell function. *Br.J Haematol.*
- Heib,V., Becker,M., Warger,T., Rechtsteiner,G., Tertilt,C., Klein,M., Bopp,T., Taube,C., Schild,H., Schmitt,E., & Stassen,M. (2007) Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood*, 110, 946-953.
- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., & Bauer,S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-1529.
- Hodge,M.R., Ranger,A.M., Charles,d.I.B., Hoey,T., Grusby,M.J., & Glimcher,L.H. (1996) Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity.*, 4, 397-405.
- Inamura,N., Mekori,Y.A., Bhattacharyya,S.P., Bianchine,P.J., & Metcalfe,D.D. (1998) Induction and enhancement of Fc(epsilon)RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *Journal of Immunology*, 160, 4026-4033.
- Ishizaka,K., Ishizaka,T., & Hornbrook,M.M. (1966) Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *Journal of Immunology*, 97, 840-853.
- Ito,A. & Oonuma,J. (2006) Direct interaction between nerves and mast cells mediated by the SgIGSF/SynCAM adhesion molecule. *J.Pharmacol.Sci.*, 102, 1-5.
- Jawdat,D.M., Albert,E.J., Rowden,G., Haidl,I.D., & Marshall,J.S. (2004) IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *Journal of Immunology*, 173, 5275-5282.
- Jawdat,D.M., Rowden,G., & Marshall,J.S. (2006) Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol.*, 177, 1755-1762.
- Jin,L., Sliz,P., Chen,L., Macian,F., Rao,A., Hogan,P.G., & Harrison,S.C. (2003) An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat.Struct.Biol.*, 10, 807-811.
- Karwot,R., Maxeiner,J.H., Schmitt,S., Scholtes,P., Hausding,M., Lehr,H.A., Glimcher,L.H., & Finotto,S. (2008) Protective role of nuclear factor of activated T cells 2 in CD8+ long-lived memory T cells in an allergy model. *J Allergy Clin.Immunol.*, 121, 992-999.
- Kissenpfennig,A., Henri,S., Dubois,B., Laplace-Builhe,C., Perrin,P., Romani,N., Tripp,C.H., Douillard,P., Leserman,L., Kaiserlian,D., Saeland,S., Davoust,J., & Malissen,B. (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.*, 22, 643-654.
- Kissenpfennig,A. & Malissen,B. (2006) Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol.*, 27, 132-139.
- Kitamura,Y., Kanakura,Y., Sonoda,S., Asai,H., & Nakano,T. (1987) Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 82, 244-248.

- Kitamura, Y., Shimada, M., Hatanaka, K., & Miyano, Y. (1977) Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*, 268, 442-443.
- Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Tertilt, C., Bopp, T., Heib, V., Becker, M., Taube, C., Schild, H., Schmitt, E., & Stassen, M. (2006) Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines. *Journal of Immunology*, 177, 6667-6674.
- Kuehn, H.S. & Gilfillan, A.M. (2007) G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *Immunol.Lett.*, 113, 59-69.
- Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Dranoff, G., & Galli, S.J. (1998) Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature*, 392, 90-93.
- Leal-Berumen, I., Conlon, P., & Marshall, J.S. (1994) IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, 152, 5468-5476.
- Li, L. & Krilis, S.A. (1999) Mast-cell growth and differentiation. *Allergy*, 54, 306-312.
- Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., & Flavell, R.A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101, 5598-5603.
- Lyon, M.F. & Glenister, P.H. (1982) A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet.Res.*, 39, 315-322.
- Macian, F. (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 472-484.
- Macian, F., Garcia-Rodriguez, C., & Rao, A. (2000) Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.*, 19, 4783-4795.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., & Abraham, S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, 381, 77-80.
- Malaviya, R., Ross, E., Jakschik, B.A., & Abraham, S.N. (1994a) Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest*, 93, 1645-1653.
- Malaviya, R., Ross, E.A., MacGregor, J.I., Ikeda, T., Little, J.R., Jakschik, B.A., & Abraham, S.N. (1994b) Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *Journal of Immunology*, 152, 1907-1914.
- Mallen-St Clair, J., Pham, C.T., Villalta, S.A., Caughey, G.H., & Wolters, P.J. (2004) Mast cell dipeptidyl peptidase I mediates survival from sepsis. *J.Clin.Invest*, 113, 628-634.
- Marshall, J.S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. *Nat.Rev.Immunol.*, 4, 787-799.
- Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., & Shimada, S. (2004) TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *Journal of Immunology*, 173, 531-541.
- McLachlan, J.B., Hart, J.P., Pizzo, S.V., Shelburne, C.P., Staats, H.F., Gunn, M.D., & Abraham, S.N. (2003) Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat.Immunol.*, 4, 1199-1205.
- McLachlan, J.B., Shelburne, C.P., Hart, J.P., Pizzo, S.V., Goyal, R., Brooking-Dixon, R., Staats, H.F., & Abraham, S.N. (2008) Mast cell activators: a new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nat.Med*, 14, 536-541.

- Medzhitov,R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.*, 1, 135-145.
- Medzhitov,R. & Janeway,C., Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.Rev.*, 173:89-97., 89-97.
- Metcalfe,D.D., Baram,D., & Mekori,Y.A. (1997) Mast cells. *Physiol.Rev.*, 77, 1033-1079.
- Moormann,C., Artuc,M., Pohl,E., Varga,G., Buddenkotte,J., Vergnolle,N., Brehler,R., Henz,B.M., Schneider,S.W., Luger,T.A., & Steinhoff,M. (2006) Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *J.Invest Dermatol.*, 126, 746-755.
- Nagle,D.L., Kozak,C.A., Mano,H., Chapman,V.M., & Bucan,M. (1995) Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Hum.Mol.Genet.*, 4, 2073-2079.
- Nakae,S., Suto,H., Iikura,M., Kakurai,M., Sedgwick,J.D., Tsai,M., & Galli,S.J. (2006) Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J Immunol.*, 176, 2238-2248.
- Nakae,S., Suto,H., Kakurai,M., Sedgwick,J.D., Tsai,M., & Galli,S.J. (2005) Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102, 6467-6472.
- Norman,M.U., Hwang,J., Hulliger,S., Bonder,C.S., Yamanouchi,J., Santamaria,P., & Kubers,P. (2008) Mast cells regulate the magnitude and the cytokine microenvironment of the contact hypersensitivity response. *Am.J.Pathol.*, 172, 1638-1649.
- Oh-hora,M. & Rao,A. (2008) Calcium signaling in lymphocytes. *Curr.Opin.Immunol.*, 20, 250-258.
- Orinska,Z., Bulanova,E., Budagian,V., Metz,M., Maurer,M., & Bulfone-Paus,S. (2005) TLR3-induced activation of mast cells modulates CD8+ T-cell recruitment. *Blood*, 106, 978-987.
- Oukka,M., Ho,I.C., de la Brousse,F.C., Hoey,T., Grusby,M.J., & Glimcher,L.H. (1998) The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity.*, 9, 295-304.
- Palamara,F., Meindl,S., Holcmann,M., Luhrs,P., Stingl,G., & Sibilio,M. (2004) Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *Journal of Immunology*, 173, 3051-3061.
- Park,J., Takeuchi,A., & Sharma,S. (1996) Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc. *J.Biol.Chem.*, 271, 20914-20921.
- Pennock,J.L. & Grencis,R.K. (2004) In vivo exit of c-kit+/CD49d(hi)/beta7+ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Blood*, 103, 2655-2660.
- Ranger,A.M., Oukka,M., Rengarajan,J., & Glimcher,L.H. (1998) Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity.*, 9, 627-635.
- Rechtsteiner,G., Warger,T., Osterloh,P., Schild,H., & Radsak,M.P. (2005) Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *Journal of Immunology*, 174, 2476-2480.
- Reith,W., Herrero-Sanchez,C., Kober,M., Silacci,P., Berte,C., Barras,E., Fey,S., & Mach,B. (1990) MHC class II regulatory factor RFX has a novel DNA-binding domain and a functionally independent dimerization domain. *Genes Dev.*, 4, 1528-1540.
- Rengarajan,J., Tang,B., & Glimcher,L.H. (2002) NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. *Nat.Immunol.*, 3, 48-54.

- Rodewald,H.R., Dessing,M., Dvorak,A.M., & Galli,S.J. (1996) Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*, 271, 818-822.
- Schuh,K., Kneitz,B., Heyer,J., Bommhardt,U., Jankevics,E., Berberich-Siebelt,F., Pfeffer,K., Muller-Hermelink,H.K., Schimpl,A., & Serfling,E. (1998) Retarded thymic involution and massive germinal center formation in NF-ATp-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 28, 2456-2466.
- Schuh,K., Kneitz,B., Heyer,J., Siebelt,F., Fischer,C., Jankevics,E., Rude,E., Schmitt,E., Schimpl,A., & Serfling,E. (1997) NF-ATp plays a prominent role in the transcriptional induction of Th2-type lymphokines. *Immunol.Lett.*, 57, 171-175.
- Serfling,E., Berberich-Siebelt,F., & Avots,A. (2007) NFAT in lymphocytes: a factor for all events? *Sci.STKE*, 2007, e42.
- Serfling,E., Berberich-Siebelt,F., Avots,A., Chuvpilo,S., Klein-Hessling,S., Jha,M.K., Kondo,E., Pagel,P., Schulze-Luehrmann,J., & Palmetshofer,A. (2004) NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives. *Int.J Biochem.Cell Biol.*, 36, 1166-1170.
- Serfling,E., Berberich-Siebelt,F., Chuvpilo,S., Jankevics,E., Klein-Hessling,S., Twardzik,T., & Avots,A. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim.Biophys.Acta*, %20;1498, 1-18.
- Serfling,E., Klein-Hessling,S., Palmetshofer,A., Bopp,T., Stassen,M., & Schmitt,E. (2006) NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *European Journal of Immunology*, 36, 2837-2843.
- Shaw,J.P., Utz,P.J., Durand,D.B., Toole,J.J., Emmel,E.A., & Crabtree,G.R. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241, 202-205.
- Sher,A. (1976) Complement-dependent adherence of mast cells to schistosomula. *Nature*, 263, 334-336.
- Shin,R., Iliescu,H., & Dumont,A.E. (1988) Resistance to peritonitis following disruption of peritoneal mast cells. *J.Surg.Res.*, 45, 565-567.
- Siebenhaar,F., Magerl,M., Peters,E.M., Hendrix,S., Metz,M., & Maurer,M. (2008) Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 121, 955-961.
- Solyman,D.C., Agarwal,S., Bassing,C.H., Alt,F.W., & Rao,A. (2002) A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity*, 17, 41-50.
- Soule,B.P., Brown,J.M., Kushnir-Sukhov,N.M., Simone,N.L., Mitchell,J.B., & Metcalfe,D.D. (2007) Effects of gamma radiation on FcepsilonRI and TLR-mediated mast cell activation. *Journal of Immunology*, 179, 3276-3286.
- Stassen,M., Hultner,L., & Schmitt,E. (2002) Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev.Immunol.*, 22, 115-140.
- Stassen,M., Muller,C., Arnold,M., Hultner,L., Klein-Hessling,S., Neudorfl,C., Reineke,T., Serfling,E., & Schmitt,E. (2001) IL-9 and IL-13 production by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. *Journal of Immunology*, 166, 4391-4398.
- Sun,L., Youn,H.D., Loh,C., Stolow,M., He,W., & Liu,J.O. (1998) Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, 8, 703-711.
- Supajatura,V., Ushio,H., Nakao,A., Akira,S., Okumura,K., Ra,C., & Ogawa,H. (2002) Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J.Clin.Invest*, 109, 1351-1359.

- Supajatura,V., Ushio,H., Nakao,A., Okumura,K., Ra,C., & Ogawa,H. (2001) Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *Journal of Immunology*, 167, 2250-2256.
- Sur,R., Cavender,D., & Malaviya,R. (2007) Different approaches to study mast cell functions. *Int.Immunopharmacol.*, 7, 555-567.
- Suto,H., Nakae,S., Kakurai,M., Sedgwick,J.D., Tsai,M., & Galli,S.J. (2006) Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *Journal of Immunology*, 176, 4102-4112.
- Suzuki,H., Wang,B., Shivji,G.M., Toto,P., Amerio,P., Tomai,M.A., Miller,R.L., & Sauder,D.N. (2000) Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.*, 114, 135-141.
- Tamai,M. & Kitamura,Y. (1978) Hematologic changes during spleen colony development in nonirradiated mice. *Blood*, 52, 1148-1155.
- Theoharides,T.C. & Cochrane,D.E. (2004) Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J.Neuroimmunol.*, 146, 1-12.
- Theoharides,T.C., Kempuraj,D., Tagen,M., Conti,P., & Kalogeromitros,D. (2007) Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol.Rev.*, 217, 65-78.
- Van,N.L., Adriaensen,D., & Timmermans,J.P. (2007) The bidirectional communication between neurons and mast cells within the gastrointestinal tract. *Auton.Neurosci.*, 133, 91-103.
- Viola,J.P., Kiani,A., Bozza,P.T., & Rao,A. (1998) Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood*, 91, 2223-2230.
- Wolters,P.J., Mallen-St,C.J., Lewis,C.C., Villalta,S.A., Baluk,P., Erle,D.J., & Caughey,G.H. (2005) Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit(W-sh)/Kit(W-sh) sash mice. *Clin.Exp Allergy*, 35, 82-88.
- Xanthoudakis,S., Viola,J.P., Shaw,K.T., Luo,C., Wallace,J.D., Bozza,P.T., Luk,D.C., Curran,T., & Rao,A. (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272, 892-895.
- Zhang,Y., Ramos,B.F., & Jakschik,B.A. (1992) Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*, 258, 1957-1959.
- Zhu,F.G. & Marshall,J.S. (2001) CpG-containing oligodeoxynucleotides induce TNF-alpha and IL-6 production but not degranulation from murine bone marrow-derived mast cells. *J.Leukoc.Biol.*, 69, 253-262.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
APC	Allophycocyanin
bio	biotinyliert
BMDC	bone marrow-derived dendritic cells
BMMC	bone marrow-derived mast cells
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CFDASE / CFSE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
CLP	caecum ligation and puncture
CR	complement receptor
CRAC	Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ channels
Cre	causes recombination (Rekombinase)
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
CTMC	connective tissue type mast cells
DC	dendritic cells
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Dinitrophenol
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
EDTA	Disodium ethylendiamine tetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescence protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell scanner
FCS	fetal calf serum
Fc _ε RI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
fMLP	<i>N</i> -formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanin; bakterielles Peptid
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPCR	G-protein coupled receptor
Gr-1	charakteristisches Oberflächenmolekül für neutrophile
Granulozyten	
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSA	humanes Serum Albumin
IFN-β	Interferon-β
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium

i.p.	intraperitoneal
IRES	internal ribosomal entry site
i.v.	intravenös
KC	Chemokin zur Anlockung neutrophiler Granulozyten
LC	Langerhans cells
LPS	Lipopolysaccharid
loxP	Erkennungssequenz (DNA) für die Rekombinase Cre
MCP-1	macrophage chemoattractant protein -1
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein -1 β
MMC	mucosal mast cells
MMCP	mouse mast cell protease
M-MuLV	moloney murine leukemia virus
mr	murin rekombinant
ND	nicht detektierbar
Neo	Neomycin
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	nuclear factor κ B
OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PAR	protease activated receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCA	passive cutaneous anaphylaxis
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PE	Phycoerythrin
PLC- γ /- β	Phospholipase C- γ /- β
Rag-1	recombinase activating gene
RANTES	chemotaktisches Cytokin zur Anlockung von Leukozyten
RSD	Rel similarity domain
RT	Reverse Transkription
SCF	stem cell factor
SIINFEKL	Peptid vom Hühner-Ovalbumin (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)
SRR	Serin-reiche Motive
TCI	transkutane Immunisierung
TCR	T cell receptor
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VE	voll entsalzt

