

Die kutane murine Mastzelle als Initiator angeborener und adaptiver Immunreaktionen der Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Valeska Heib

geb. am 26.08.1977 in Rüsselsheim

Mainz, September 2006

Aus dem
Institut für Immunologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2006

Eigene Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht

Heib V, Becker M, Warger T, Rechtsteiner G, Tertilt C, Klein M, Bopp T, Taube C, Schild H, Schmitt E, and Stassen M. "Mast cells are crucial for early inflammation, emigration of Langerhans cells and specific CTL responses following topical application of TLR7 ligand."

BLOOD, zur Veröffentlichung eingereicht, im Review-Prozeß

Weitere Publikationen

Bopp T, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, Klein M, Schild H, Schmitt E, Staksen M. "NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells."

J Exp Med. 2005 Jan 17;201(2):181-7

Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, Schmitt E, Schild H, Radsak MP. "Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo."

Blood. 2006 Jul 15;108(2):544-50

Stassen M, Klein M, Becker M, Bopp T, Neudörfl C, Richter C, Heib V, Klein-Hessling S, Serfling E, Schild H, Schmitt E. " p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1."

Mol Immunol. 2006 Apr 29, published online

Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Bopp T, Heib V, Becker M, Taube C, Schild HJ, Schmitt E, and Stassen M. "Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines."

J Immunol; in press

A.	EINLEITUNG.....	1
1	Die Entwicklung und Differenzierung von Mastzellen.....	1
2	Die Rolle der Mastzelle bei Allergien-die klassische Betrachtungsweise.....	3
3	Mastzellen besitzen eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Infektionen.....	5
4	Zielsetzung.....	10
B.	MATERIAL UND METHODEN.....	11
1	Chemikalien	11
2	Puffer und Medien	11
2.1	Puffer, Lösungen und Reagenzien	11
2.2	Medien	13
3	Cytokine	14
4	Antikörper	15
4.1	Antikörper für die FACS-Analyse	15
4.2	Antikörper zur Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis.....	16
4.3	Antikörper für den ELISA	16
4.4	Antikörper zur Stimulation von Mastzellen.....	17
5	Mäuse	17
6	Methoden der Zellkultur.....	17
6.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	17
6.2	Präparation von Knochenmarkszellen	18
6.2.1	Differenzierung von BMMC aus Knochenmarkszellen	18
6.2.2	Generierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen.....	18
6.3	Stimulation von Mastzellen <i>in vitro</i>	19
6.4	Stimulation von Dendritischen Zellen <i>in vitro</i>	19
7	Nachweis von Cytokinen in Kulturüberständen	19
8	Histologische Methoden.....	21
8.1	Präparation der Epidermis	21
8.2	Färbung der Langerhanszellen in der Epidermis.....	21

9	Molekularbiologische Methoden	22
9.1	Präparation von RNA aus Geweben.....	22
9.2	Reverse Transkription der mRNA in cDNA.....	23
9.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	23
9.3.1	Semiquantitative Realtime-PCR	24
9.3.2	Konventionelle PCR.....	24
10	Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen mit BMMC.....	25
11	Behandlung mit Aldara/5% Imiquimod Creme	25
11.1	Messung der Aldara/Imiquimod-vermittelten Ohrschwellung.....	25
11.2	Bestimmung der Auswanderung von Langerhanszellen nach Aldara-Behandlung.....	26
12	Immunisierung mit Dendritischen Zellen.....	26
12.1	Test auf cytotoxische Aktivität nach Immunisierung	26
13	Transkutane Immunisierung mit Aldara/Imiquimod als Adjuvans	28
13.1	Nachweis von peptidspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen	28
13.2	Test auf cytotoxische Aktivität nach TCI	29
13.3	IFN- γ Produktion der CD8 ⁺ T-Zellen nach Restimulation.....	29
C.	ERGEBNISSE	30
1	Mastzellen fördern die Entzündungsreaktion nach Aldara/Imiquimod-Behandlung	30
2	Die durch Aldara/Imiquimod induzierte Wanderung der Langerhanszellen ist zum Großteil mastzellabhängig	33
3	Mastzell-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Expression proinflammatorischer Cytokine nach Behandlung mit Imiquimod	37
4	Die Freisetzung von Cytokinen durch Mastzellen beeinflusst die Entzündungsreaktion und die Auswanderung von Langerhanszellen	39
4.1	Die Rolle von TNF- α	40
4.2	Die Rolle von IL-1 α/β	43
5	Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Funktion von Mastzellen <i>in vivo</i> ..	46
5.1	NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine reduzierte Cytokin- und Chemokinexpression nach Aldara- Behandlung	47
5.2	Die Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung ist in NFATc2-defizienten Tieren stark verzögert	48

6 Mastzellen sind für eine erfolgreiche transkutane Immunisierung mit Imiquimod als Adjuvans notwendig	53
6.1 Die Zahl der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach transkutaner Immunisierung ist in Mastzell- defizienten Mäusen stark reduziert	55
6.2 Mastzellose Tiere entwickeln nur eine schwache cytotoxische T- Zellantwort nach transkutaner Immunisierung	57
 D. DISKUSSION	60
 E. ZUSAMMENFASSUNG	69
 F. LITERATUR	71
 G. ABKÜRZUNGEN	77

A. Einleitung

1 Die Entwicklung und Differenzierung von Mastzellen

Mastzellen stammen von myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks ab, die kürzlich erstmals in Mäusen charakterisiert werden konnten (1). Unreife Vorläufer der Mastzellen zirkulieren zunächst im Blut, wandern schließlich in die Zielgewebe ein und differenzieren dort zu reifen Mastzellen. Diese Vorläuferzelle wird auch als Promastocyt bezeichnet. Der Promastocyt zeichnet sich durch den Phänotyp $\text{Thy-1}^{\text{low}}$, $\text{c-kit}^{\text{high}}$, das Vorhandensein von cytoplasmatischen Granula und die Expression von mRNA für Mastzellproteasen aus. In diesem Stadium wird der hochaffine IgE Rezeptor ($\text{Fc}\epsilon\text{RI}$) jedoch noch nicht exprimiert (2).

Für die Einwanderung der Mastzellvorläufer sind offensichtlich definierte Proteine wichtig. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mastzellvorläufer durch die Interaktion des von Mastzellen exprimierten Adhesionsmoleküls $\alpha_4\beta_7$ und dem MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule) in die Dünndarmmucosa einwandern können (3).

Über die Vorläuferzellen humaner Mastzellen ist nur wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass aus CD34^+ , CD13^+ , c-kit^+ , $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^-$ -Zellen im Blut oder Knochenmark Mastzellen, aber auch basophile Granulozyten entstehen können (4).

In der Maus unterscheidet man hauptsächlich zwei Mastzellpopulationen. Zum einen sind das die Bindegewebsmastzellen (CTMC, connective tissue type mast cells) und zum anderen die Mastzellen der Schleimhäute (MMC, mucosal type mast cells). Beide Mastzellpopulationen unterscheiden sich phänotypisch in Größe, Granulierung und dem Inhalt der Granula.

Bindegewebsmastzellen sind hauptsächlich in der Haut und im Peritoneum angesiedelt. Die Schleimhautmastzellen hingegen sind in den Epithelien und den mucosalen Schichten der Bronchien, der Lamina Propria des Gastrointestinaltrakts und den Schleimhäuten der Augen und Nase zu finden. Desweiteren findet man MMC auch in direkter Nähe zu den Blutgefäßen.

Damit besetzen Mastzellen nahezu jede Stelle im Körper, die der Außenwelt zugewandt ist.

Beim Menschen kann man ebenfalls zwei Populationen von Mastzellen unterscheiden, MC_T und MC_{TC} . Die Bezeichnungen sind auf die charakteristische Expression der Proteasen Chymase und Tryptase zurückzuführen. Hierbei ähneln die humanen MC_T den MMC bei der Maus, die MC_{TC} eher den Bindegewebsmastzellen (CTMC).

Murine Mastzellen besitzen einen plastischen Phänotyp, d.h. beide Zellpopulationen können unter den entsprechenden Bedingungen ineinander übergehen (5). So erscheinen nach Injektion (*i.v.* oder *i.p.*) von Mastzellen, welche aus dem Peritoneum gewonnen wurden

(CTMC-Typ), in mastzelloser Mäuse in der Magenmuskulatur und der Milz Mastzellen vom CTMC-Typ in der Mucosa des Magens hingegen Mastzellen des MMC-Typs. Ebenso entwickeln sich aus Knochenmark generierte Mastzellen (BMMC¹), welche als Analogon zu mucosalen Mastzellen gesehen werden, in den entsprechenden Geweben zu Bindegewebs- oder mucosalen Mastzellen (6).

		Biogene Amine	Proteasen	Proteoglykan	Vorkommen
Maus	Mucosal MMC	Histamin, Serotonin	mMCP-1,2	Chondroitinsulfat	Gastrointestinaltrakt Lunge, Blutgefäße
	Bindegewebe CTMC	Histamin, Serotonin	mMCP-3, 4, 5, 6 Carboxypeptidasen	Heparin	Bauchhöhle Haut
Mensch	Mucosal MC _T	Histamin	Tryptase	Chondroitinsulfat Heparin	Schleimhäute, Lunge
	Bindegewebe MC _{TC}	Histamin	Tryptase Chymase	Chondroitinsulfat Heparin	Haut, Darmschleimhaut

Tab.1: Die Tabelle faßt die wichtigsten Eigenschaften der beiden Hauptpopulationen von Mastzellen bei Maus und Mensch zusammen.

Der wichtigste Wachstumsfaktor für Mastzellen ist der Ligand für c-kit, SCF (stem cell factor). Andere Wachstumsfaktoren wie IL-4, IL-6, TNF- α , IL-9 oder IL-10 spielen ebenfalls eine Rolle für Differenzierung und Proliferation dieser Zellen (2). Obwohl IL-3 ein essentieller Faktor für die *in vitro* Kultivierung muriner Mastzellen darstellt, entwickeln sich Mastzellen auch in IL-3-defizienten Mäusen (7).

Ein wichtiges Modell zur Untersuchung von Mastzellen bei immunologischen Reaktionen kam mit der Beschreibung von Mastzell-defizienten Mäusen durch Kitamura 1978 auf (5). Der Mausstamm WBB6F1- *Kit^W/Kit^{W-v}* (im Folgenden als *Kit^{W/W-v}* bezeichnet) besitzt 2 defekte Allele für c-kit (CD117), den Rezeptor für SCF. Da SCF aber ein entscheidender Wachstumsfaktor für Mastzellen darstellt, können diese Tiere keine Mastzellen ausbilden. Die Mutation des einen Allels (*Kit^W*) führt durch den Verlust der Transmembrandomäne zu einer Verkürzung des c-kit Proteins, wodurch dieses nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert werden kann und somit funktionslos ist (8). Die *Kit^{W-v}* Mutation des zweiten Allels weist eine Punktmutation in der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors auf, wodurch die Weiterleitung der Signalkaskade erheblich gestört ist (9). Diese Tiere zeigen, neben dem

¹ Bone marrow derived mast cells

Verlust von Mastzellen, jedoch noch weitere Defekte. So sind diese steril und anämisch, besitzen keine Melanocyten und Cajal- Zellen.

Ein weiterer Mausstamm, *Kit^{W-sh/W-sh}* („sash“-Mutation), besitzt ebenfalls keine Mastzellen. Diese Tiere haben im Gegensatz zu den *Kit^{W/W-v}* Mäusen den Vorteil, dass sie, von fehlender Hautpigmentierung abgesehen, keine weiteren Defekte aufweisen (10, 11). Tiere dieses Stammes sind fertil und besitzen zudem noch den Vorteil, dass sie den genetischen Hintergrund des viel verwendeten Mausstammes C57Bl/6 aufweisen, was Rekonstitutionsexperimente mit BMMC bzw. Kreuzungen mit Tieren anderer Stämme erheblich erleichtert. Die sash-Mutation ist eine Inversion, welche regulatorische Elemente ca. 70kb oberhalb des Kit-Gens zerstört, die offensichtlich für die Expression des Rezeptors in Mastzellen essentiell sind (11-13).

Tiere beider Stämme (*Kit^{W/W-v}* und *Kit^{W-sh}*) lassen sich erfolgreich durch den Transfer von *in vitro* kultivierten BMMC lokal oder systemisch rekonstituieren. Dadurch gibt es nun die Möglichkeit die Funktion der Mastzelle direkt *in vivo* in unterschiedlichen Modellen zu untersuchen.

2 Die Rolle der Mastzelle bei Allergien-die klassische Betrachtungsweise

Erstmals beschrieben wurden Mastzellen von Paul Ehrlich im Jahre 1878. Er stellte diese Zellen durch Färbung mit Anilinfarbstoffen als stark granulierte Zellen in unterschiedlichen Geweben dar. Ebenso zeigte er, dass Mastzellen sich in der direkten Nähe von Blutgefäßen befinden, ohne jedoch zum Blutgefäßsystem zu gehören (14).

20 Jahre später wurde der Begriff der Anaphylaxie durch Richet und Portier definiert (15). Danach konnte erst im Jahre 1967 durch Arbeiten von Ishizaka und Kollegen eine Verbindung zwischen Anaphylaxie und reaktiven IgE-Antikörpern nachgewiesen werden (16). Jedoch erst nach weiteren 6 Jahren wurde der IgE-Rezeptor auf Mastzellen beschrieben (17).

Seit dieser Zeit wurde die Mastzelle nur noch in Verbindung mit Soforttyp-Allergien wie z.B. Asthma gesehen (Typ I, Coombs und Gell, Clinical Aspects of Immunology, ed. Gell, PGH (Blackwell Scientific), pp. 317-337). Nach Produktion von Antigen- bzw. Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern durch aktivierte B-Zellen kann IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auf der Mastzelloberfläche binden. Kommt es nun zu einem erneuten Kontakt mit dem betreffenden Allergen, so kann dieses an die IgE-Antikörper binden. Dadurch kommt es zu einer Kreuzvernetzung der rezeptorgebundenen IgE-Antikörper, was zu einer schlagartigen Degranulation der Mastzellen und somit zur Freisetzung und *de novo* Synthese verschiedener Cytokine und Chemokine führt (siehe Abb.1).

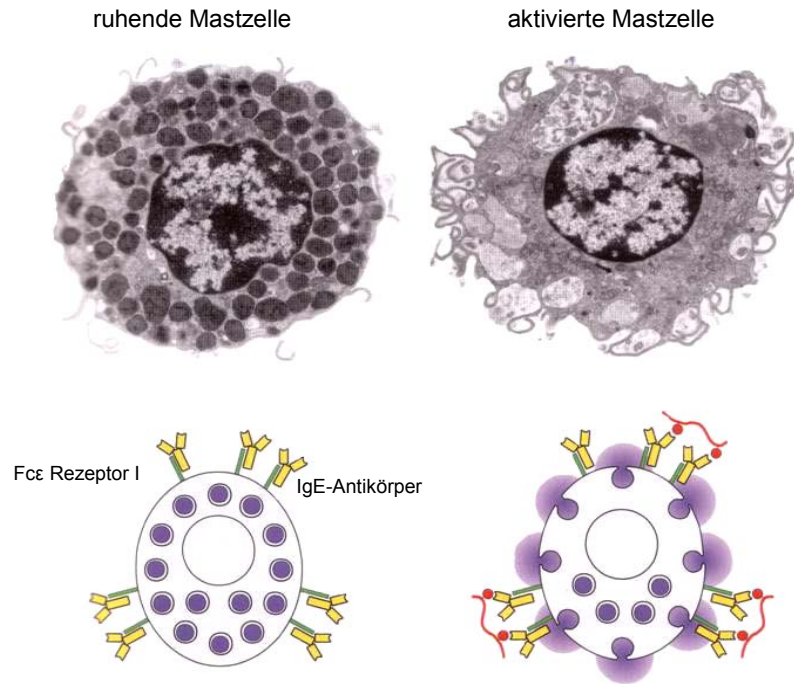


Abb.1: Die Aktivierung der Mastzelle über die Kreuzvernetzung von rezeptorgebundenen IgE-Antikörpern führt zu einer schlagartigen Degranulation der Mastzelle.

Der obere Teil der Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Darstellung der Mastzelle. In der ruhenden Zelle sind die Granula deutlich zu erkennen. Wird die Mastzelle aktiviert, so wird deren Inhalt (Histamin etc.) nach außen abgegeben. Im unteren Teil ist eine schematische Darstellung dieses Vorgangs abgebildet. (abgeändert aus Immunologie, C.A.Janeway/P.Travers, 5.Auflage,2002, Spektrum Akademischer Verlag)

Zusätzlich werden durch die Freisetzung von Histamin und Serotonin die Gefäße erweitert und die Gefäßdurchlässigkeit erhöht. Es kommt zu einer Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und weiteren Lymphozyten. Lokal bewirkt dies die bekannten Reaktionen wie Schwellung und Juckreiz. Eine systemische Aktivierung jedoch kann zu einem anaphylaktischen Schock und sogar zum Tod führen. Dabei kommt es durch die Schwellung der Bronchialschleimhäute zu Atemnot und die erhöhte Gefäßpermeabilität und Erweiterung der Gefäße führen zu einem starken Blutdruckabfall.

Eine weitere Überempfindlichkeitsreaktion ist die vom verzögerten Typ (Typ IV, Coombs und Gell). Zu den DTH-Reaktionen (delayed type hypersensitivity) gehört auch die Kontaktallergie (CHS, contact hypersensitivity). Diese Reaktionen sind strikt T-Zell vermittelt. Die CHS wird z.B. durch Metallionen, oder chemisch aktive Moleküle, s.g. Haptene, ausgelöst. Haptene können körpereigene Proteine so verändern, dass gegen diese eine Immunreaktion entsteht. Die Funktion der Mastzelle bei der Überempfindlichkeit vom

verzögerten Typ ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Mastzellen sind in der Lage innerhalb kurzer Zeit nach Haptenapplikation TNF- α und MIP-2 zu produzieren, wodurch neutrophile Granulozyten und T-Zellen einwandern (18). Desweiteren zeigten mastzellose Mäuse sowohl in der Sensibilisierungs- als auch in der Effektorphase der CHS gegen Oxazonon eine reduzierte Reaktion (19). So wanderten nach erster Haptenapplikation in Mastzell-defizienten Tieren wesentlich weniger antigenpräsentierende Zellen aus als in Wildtyp-Tieren (Sensibilisierungsphase). IgE-Antikörper scheinen die Reaktion noch unspezifisch zu verstärken. Durch den Transfer von T-Zellen aus sensibilisierten Mastzell-defizienten Mäusen konnte in Wildtyp-Tieren eine DTH-Reaktion ausgelöst werden. Wurden jedoch T-Zellen aus sensibilisierten Wildtyp-Tieren auf Mastzell-defiziente Tiere übertragen, so konnte anschließend keine Reaktion gemessen werden. Dies zeigt, dass die Mastzelle eine wichtige Funktion auch in der Effektorphase der DTH übernimmt (20).

Biogene Amine	Histamin, Serotonin
Lipidmediatoren:	Prostaglandine, Leukotriene
Cytokine:	IL-1, TNF- α , IL-6, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13
Chemokine:	MCP-1, Rantes, KC, MIP-1 α
Hämatopoetische Cytokine:	IL-3, GM-CSF

Tab.2: Zusammenfassung der wichtigsten von Mastzellen nach Aktivierung freigesetzten Produkte.

3 Mastzellen besitzen eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Infektionen

Die Mastzelle war zunächst nur als potentiell schädliche Zelle bekannt. Es stellte sich somit die Frage, warum die Mastzelle im Laufe der Evolution also überhaupt entstand und erhalten geblieben ist.

Seit längerem ist bekannt, dass Mastzellen in Kooperation mit eosinophilen Granulozyten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Darmparasiten spielen können. So ist die Expulsion einiger darmparasitierender Würmer in Mastzell-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren stark verzögert (21). Jedoch sind Mastzellen nicht bei allen Modellen zur Expulsion der Parasiten notwendig.

Die Bedeutung der Mastzelle erschien jedoch in einem anderen Licht, als deutlich wurde, dass Mastzellen zur Abwehr bakterieller Infektionen beitragen können und somit einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunität leisten. So konnte Echtenacher et al. in einem Modell der akuten septischen Peritonitis (caecum ligation and puncture, CLP) zeigen, dass Mastzellen für die Abwehr der Infektion und das Überleben der Tiere unbedingt nötig sind. In

diesem Modell wurde zur Erzeugung einer entzündungsfördernden Ischämie ein Teil des Dickdarms abgebunden und anschließend punktiert. Nach 5 Tagen waren alle Mastzell-defizienten Tiere verstorben. Von den Wildtyp-Tieren verstarben jedoch nur 25%. Durch Rekonstitution mit BMMC konnte die Mortalitätsrate in den mastzellosen Tieren wieder auf Wildtyp-Niveau gesenkt werden. Durch die Gabe von anti-TNF- α Antikörpern direkt nach der Punktion wurde die Sterblichkeit jedoch wieder erhöht. So konnte hier die protektive Wirkung des von Mastzellen produzierten TNF- α , welches sofort (15-20 min.) nach Aktivierung aus den Granula freigesetzt wurde, gezeigt werden (22).

In einem Infektionsmodell mit *Klebsiella pneumoniae* konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. 48 Stunden nach Gabe der Bakterien in die Lunge konnten Malaviya et al. zeigen, dass in Mastzell-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren die Zahl der Bakterien in der Lunge 20fach erhöht war. Zusätzlich war die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den mastzellosen Mäusen stark reduziert (23).

Beide Arbeiten konnten also erstmals eindeutig zeigen, dass die Mastzelle und ihre Produkte bei der Abwehr von Pathogenen eine überlebenswichtige Rolle spielen können.

Neben der klassischen Aktivierung über die Kreuzvernetzung von gebundenen IgE-Antikörpern auf der Mastzelloberfläche lassen sich Mastzellen über weitere ganz unterschiedliche alternative Mechanismen aktivieren.

Mastzellen lassen sich auch durch IgG-Antikörper aktivieren. So wurde gezeigt, dass humane Mastzellen nach Kreuzvernetzung von IgG-Rezeptoren des hochaffinen Typs Fc γ RI ebenfalls biogene Amine, Lipid-Mediatoren und Cytokine, einschließlich TNF- α , freisetzen (24, 25).

Eine weitere Möglichkeit Mastzellen zu aktivieren sind Immunkomplexe aus IgG-Antikörpern und Antigenen. Eine sehr bekannte Reaktion dieser Art ist die Arthus-Reaktion (Typ III, Coombs und Gell, 1963). Binden die Immunkomplexe über den Fc-Teil des Antikörpers an den niederaffinen IgG-Rezeptor Fc γ RIII an Mastzellen, so kommt es ebenfalls zur Degranulation und Aktivierung der Zellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es in Mäusen, welche zunächst eine *i.v.* Injektion mit Ovalbumin und anschließend eine *i.p.* Injektion mit anti-Ovalbumin Antikörpern zur lokalen Generierung von Immunkomplexen erhalten hatten, bereits nach wenigen Minuten zur Freisetzung von TNF- α in der Bauchhöhle kam. In mastzellosen Mäusen hingegen blieb die rasche Freisetzung von TNF- α völlig aus. Etwa 6 Stunden nach der Injektion kam es zu einer zweiten und stärkeren Welle der TNF- α -Produktion. Diese ging mit der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten einher, welchen zusammen mit Makrophagen die zweite Welle der TNF- α -Produktion zugeschrieben wurde. In Mastzell-defizienten Mäusen waren die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die Freisetzung von TNF- α deutlich reduziert (26). Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion über den Fc γ RIII-Rezeptor (CD16) der Mastzellen vermittelt wird. Wurden Mastzell-defiziente Mäuse mit BMMC rekonstituiert,

welchen die gemeinsame γ -Untereinheit der Rezeptoren $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIII$ und $Fc\epsilon RI$ fehlt, so war die Auslösung einer Arthus-Reaktion stark beeinträchtigt. Komplementkomponenten schienen hierbei keine Rolle zu spielen, da die Reaktion auch in Komplement-defizienten Tieren normal verlief (27, 28). Der finale Beweis für die Bedeutung des Rezeptors $Fc\gamma RIII$ auf Mastzellen für die Auslösung der Arthus-Reaktion konnte schließlich durch Verwendung von Mäusen mit genetischer Defizienz für die Liganden-spezifische α -Kette dieses Rezeptors erbracht werden (28).

Mastzellen können desweiteren auch über den Komplementrezeptor CR3 aktiviert werden. So zeigte Sher et al. schon früh, dass komplementbeladene (C3b) Salmonellen und Helminthen wie *Schistosoma mansoni* an diesen Rezeptor binden können (29). Desweiteren wurde auch gezeigt, dass in einem induzierten Peritonitis-Modell (CLP) die Beseitigung der Bakterien und die mastzellabhängige Entzündung in komplement-defizienten Mäusen deutlich vermindert ausfielen (30).

Neben der indirekten Aktivierung über Komponenten des Komplementsystems oder über Antikörper können Mastzellen auch durch direkten Kontakt mit Pathogenen oder deren Produkten bzw. Bestandteilen aktiviert werden.

Ein bekanntes Beispiel ist das FimH-Antigen, ein Proteinbestandteil bakterieller Geißeln. Es bindet an CD48 auf der Mastzelloberfläche und löst so die Freisetzung von $TNF-\alpha$ und die Phagozytose der Bakterien durch Mastzellen aus (31, 32).

Bestandteile von Pathogenen werden jedoch auch von so genannten „pattern recognition receptors“ erkannt. Die bekanntesten Rezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren, welche zunächst in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurden (33). Bis heute sind 13 unterschiedliche Toll-like Rezeptoren bekannt. Diese können ganz unterschiedliche Bestandteile von Bakterien und Viren erkennen, sogenannte „pathogen associated molecular patterns“. So bindet das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwände gramnegativer Bakterien, an TLR4, die für Bakterien-DNA typischen unmethylierten CpG-Motive hingegen an TLR9. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der adaptiven Immunität, B-Zellrezeptoren bzw. Antikörpern und T-Zellrezeptoren, deren Spezifität durch DNA-Rekombinationen auf somatischer Ebene festgelegt wird, sind die Spezifitäten der TLR bereits in der Keimbahn definiert. Aus diesem Grund zählt man die TLR zur angeborenen Immunität, kann sie jedoch auch, da z.B. die Aktivierung von Dendritischen Zellen über TLR zu deren Reifung und damit zur Entstehung einer adaptiven Immunantwort führt, als ein zentrales Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität sehen (34).

Eine Zusammenstellung der bisher bekannten Toll-like Rezeptoren und ihrer wichtigsten Liganden ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Toll-like Rezeptor	Ligand
TLR1	bakterielle Lipoproteine
TLR2	Lipoteichonsäure, Peptidoglycan, Pam3Cys
TLR3 (in Endosomen vorliegend)	doppelsträngige RNA (viral), poly I:C
TLR4	LPS
TLR5	Flagellin
TLR6	Lipoprotein
TLR7 (in Endosomen vorliegend)	einzelsträngige RNA, Imiquimod, R848 (synthetisch)
TLR8 (in Endosomen vorliegend)	einzelsträngige RNA, in Maus nicht funktionell
TLR9 (in Endosomen vorliegend)	bakterielle DNA (unmethylierte CpG- Motive)
TLR10	unbekannt, in Maus nicht funktionell
TLR11	unbekannt, uropathogene Bakterien, human inaktiv
TLR12	unbekannt
TLR13	unbekannt

Tab.3: Zusammenfassung der Toll- like Rezeptoren und ihrer Liganden (35)

Eine ganze Reihe von Zellen des Immunsystems exprimieren unterschiedliche Kombinationen von Toll-like Rezeptoren.

Dendritische Zellen z.B. setzen nach der Stimulation mit LPS oder CpG-DNA eine Reihe von Cytokinen und Chemokinen frei. Desweiteren reifen sie aus, was auch durch die verstärkte Expression costimulatorischer Moleküle für T-Zellen gekennzeichnet ist.

Mastzellen exprimieren ebenfalls ein weites Spektrum an Toll-like Rezeptoren, welches sich je nach Population unterscheiden kann (36). So exprimieren Bindegewebsmastzellen neben TLR2 und TLR4 auch die TLR3, 7 und 9, bei BMDC sind die drei letztgenannten TLR jedoch nicht nachzuweisen.

Frühere Arbeiten konnten zunächst *in vitro* zeigen, dass TLR-Signale ebenfalls Mastzellen aktivieren können. Bei peritonealen Mastzellen der Ratte induziert die Aktivierung über LPS/TLR4 die Freisetzung des proinflammatorischen Cytokins IL-6, bewirkt jedoch nicht deren Degranulation (37). Weiterhin wirkt LPS als starkes costimulatorisches Signal auf die Produktion der Mastzellcytokine IL-9 und IL-13 (38). Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass die TLR-vermittelte Aktivierung von Mastzellen auch *in vivo* essentiell an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt ist.

Im Modell der akuten septischen Peritonitis (CLP) konnten Supajatura et al. zeigen, dass die protektive Funktion der Mastzelle über den LPS/TLR4-Signalweg vermittelt wird (39). Weiterhin kann der LPS/TLR4-Signalweg der Mastzellen auch eine wichtige Funktion für die Entstehung chronischer Entzündungen haben, wie kürzlich anhand eines murinen Asthmodells gezeigt werden konnte (40). In einem TLR3-vermittelten Entzündungsmodell

wurde demonstriert, dass derart aktivierte Mastzellen wichtig für das Anlocken von CD8⁺ T-Zellen sind.

Durch die Vielzahl an Rezeptoren ist die Mastzelle in der Lage, auf ganz unterschiedliche Stimuli durch die Freisetzung von Mediatoren entsprechend zu reagieren (41).

In der folgenden Abbildung soll nun noch einmal kurz die einzelnen Funktionen der Mastzelle im Immunsystem zusammengefaßt werden. Diese gehen weit über die lange Zeit bekannte Rolle als Effektorzelle bei allergischen Reaktionen hinaus.

Die Mastzelle besitzt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen und könnte sogar bei der Entstehung und dem Verlauf einer Immunantwort einen entscheidenden Beitrag leisten.

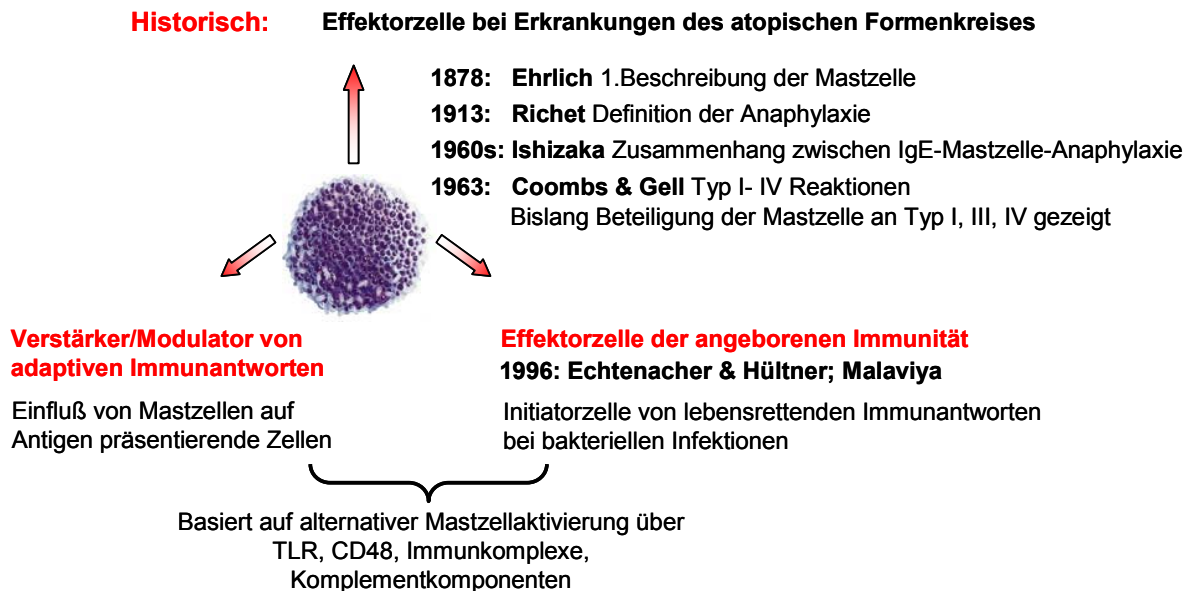


Abb.2: Mastzellen spielen nicht nur bei allergischen Reaktionen eine Rolle, sondern besitzen auch eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen und eventuell auch bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort.

4 Zielsetzung

Mastzellen liefern einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von Pathogenen. Sie können dabei durch Bestandteile der Pathogene z.B. über Toll-like Rezeptoren aktiviert werden und setzen dadurch eine Reihe proinflammatorischer Cytokine und Chemokine frei.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Rolle der Mastzelle bei einer lokalen Entzündungsreaktion in der Haut untersucht werden. Als Modell wurde dafür die Aktivierung über den Toll-like Rezeptor 7 gewählt. Dieses Modell ist in sofern interessant, da bestimmte Populationen von Mastzellen den Rezeptor für Imiquimod (TLR7) exprimieren können, Langerhanszellen, als typische antigenpräsentierende Zellen der Haut, und Keratinocyten jedoch nicht.

Desweiteren sollte im zweiten Teil der Arbeit die Funktion der Mastzelle bei einer adaptiven Immunreaktion ermittelt werden, die durch eine transkutane Immunisierung ausgelöst werden kann. Als Adjuvans bei der Immunisierung diene der synthetische TLR7 Ligand Imiquimod.

B. Material und Methoden

Plastikwaren

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

1 Chemikalien

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

2 Puffer und Medien

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

2.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien

Gey's Lysepuffer

NH ₄ Cl	8,29g/l
KHCO ₃	1g/l
EDTA	0,037g/l
in H ₂ O, pH 7,29, 0,2µm sterilfiltriert	

GM-Puffer

GM-Puffer wurde bei der Färbung von Zellen und zur FACS-Analyse verwendet.

BSA	0,5%
NaN ₃	0,01%
EDTA	5mM
in PBS (1x)	

EDTA- Puffer

EDTA	30mM
NaN ₃	0,01%
in PBS (1x)	

ACK-Puffer

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

Saponin-Puffer

Saponin	0,5%
BSA	0,5%
NaN ₃	0,01%
in PBS (1x)	

Physiologische Trypanblaulösung

Bei Trypanblau handelt es sich um einen s.g. Vitalfarbstoff, welcher nur von toten Zellen aufgenommen wird. Dabei kann Typanblau zur Bestimmung der Lebenszellzahl verwendet werden. Die Lösung wurde wie folgt aus zwei Komponenten im Verhältnis 5:1 gemischt:

- A: 0,2% Trypanblau in VE- Wasser
- B: 4,25% NaCl in VE- Wasser

CFDASE (CFSE)

5-(und-6)-Carboxyfluoreszein Diacetat, Succinimidyl Ester (5(6)-CFDASE; CFSE) wurde von Molecular Probes Europe BV, Niederlande (C-1157) bezogen und in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Die Stocklösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Die Zellen wurden mit Konzentrationen von 0,4 und 4µM gefärbt.

Dispase II

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

SIINFEKL- Peptid

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

Ionomycin

Durch das Calcium-Ionophor Ionomycin lassen sich Mastzellen aktivieren. Dazu wurde eine Stammlösung von 0,5mM in Ethanol angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 1µm stimuliert.

Actinomycin D

Actinomycin D wurde in Ethanol auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2 Medien

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

Fötales Kälberserum (FCS)

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

MEM (minimal essential medium)

MEM-Trockenpulver 10,58g/l

HEPES 4,77g/l

in H₂O, 0,2µm sterilfiltriert

Für einige Zwecke wurden 2% FCS (fötales Kälberserum) zugegeben.

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)

IMDM-Trockenpulver 17,76g/l

NaHCO₃ 3,02g/l

2-Mercaptoethanol 5x10⁻⁵M

Penicillin 100 I.U./l

Streptomycin 100µg/l

Phenolrot als Indikator

in H₂O, pH 7,2, 0,2µm sterilfiltriert

TM (Testmedium)

IMDM mit:

FCS	5%
Natriumpyruvat	1mM
Glutamin	2mM

KL-MZF (Kit-Ligand Mastzellfutter)

IMDM mit:

FCS	10%
Natriumpyruvat	1mM
Glutamin	2mM
IL-3	20U/ml
IL-4	50U/ml
mrKit-Ligand	200ng/ml

3 Cytokine

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

GM-CSF wurde zur Generierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarks-Vorläuferzellen als Kulturüberstand der Myelom-Zelllinie X63/0 verwendet. Der Kulturüberstand wurde dem Kulturmedium in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt.

Murines IL-3 (mIL-3)

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

Murines rekombinantes IL-4 (mrIL-4)

mrIL-4 wurde aus transformierten X63Ag8-653 Myelomzellen gewonnen und über Affinitätschromatographie gereinigt. Eine Unit entspricht hier der Konzentration, bei der die Zelllinie F4/4K.6 die Halbmaximale Proliferation erreichte.

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* exprimiert und anschließend gereinigt.

Humanes rekombinantes TNF- α (hrTNF- α)

hrTNF- α wurde von Dr. G.R. Adolf (Firma Bender, Jena) zur Verfügung gestellt.

Murines rekombinantes IL-6 (rmIL-6)

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

4 Antikörper**4.1 Antikörper für die FACS-Analyse**

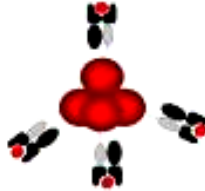
Die Zellen wurden in GM-Puffer gefärbt und die Antikörper in den jeweils angegebenen Konzentrationen verwendet.

anti CD44-FITC:	Klon KM81, eingesetzt 1:200 (Immunotools), Ratte anti Maus
anti CD25-PE-Cy7:	Klon PC61, eingesetzt 0,25 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus
anti CD62L-APC:	Klon Mel-14, eingesetzt 0,2 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus
anti CD8-APC-Cy7:	Klon 53-6.7, eingesetzt 1 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus
anti CD16/32 (Fc- Block):	Klon 2.4G2, eingesetzt 30 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus
anti IFN-γ-APC:	Klon XMG1.2, eingesetzt 0,5 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus
anti CD8-PE:	Klon 53-6.7, eingesetzt 1 μ g/ml (BD Pharmingen), Ratte anti Maus

SIINFEKL- H2K^b Tetramer- PE

Zur Detektion der peptidspezifischen T-Zellen wurden Phycoeritrin (PE)-markierte Tetramere verwendet. Diese bestehen aus MHC-I Molekülen, welche mit SIINFEKL beladen wurden. Die können nun spezifisch an den entsprechenden T-Zellrezeptor binden. Das Tetramer wurde von der Firma Orpegen (Deutschland) bezogen.

Die Abbildung zeigt ein solches Tetramermolekül.



Bildquelle: <http://www.orpegen.com>

4.2 Antikörper zur Färbung von Langerhanszellen in der Epidermis

anti MHC-II: Klon M5.114.15.2, eingesetzt 20µg/ml (American Type Culture Collection, Rockville, USA, TIB 120), Ratte anti Maus

Ziege anti Ratte IgG (H+L): Alexa Fluor® 594 markiert, eingesetzt 5µg/ml (Molecular Probes, USA)

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

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

4.3 Antikörper für den ELISA

anti IL-6 (Erst- Antikörper) Klon MP5-20F3, eingesetzt 0,5µg/ml (BD Pharmingen) unmarkiert, Ratte anti- Maus

anti IL-6 (zweit Antikörper) Klon MP5-32C11, eingesetzt 0,5µg/ml (BD Pharmingen) biotinyliert, Ratte anti Maus

4.4 Antikörper zur Stimulation von Mastzellen

anti DNP-IgE	Der Antikörper wurde aus Überständen einer murinen B-Zellhybridomlinie gewonnen und mit durch Affinitätschromatographie gereinigt. Mit diesem Antikörper wurden BMMC beladen, um sie anschließend zu aktivieren. Eingesetzt 5µg/ml
anti IgE	Klon EM95.3, eingesetzt 2,5µg/ml. Der Antikörper wurde aus den Kulturüberständen der B-Zellhybridomlinie EM95.3 und über einer Protein G-Säule angereinigt. Ratte anti Maus Antikörper

5 Mäuse

Alle verwendeten Mäuse hatten den genetischen Hintergrund des C57Bl/6 Stammes. Als mastzellose Mäuse wurden die Stämme $\text{Kit}^{W/W-v}$ und $\text{Kit}^{W-sh/W-sh}$ und die jeweiligen congenen Wildtyp- Tiere verwendet. Diese wurden von Dr.M. Maurer zur Verfügung gestellt. Die TLR7 Knockout Tiere wurden von Dr.S. Bauer (Universität Marburg), die TNF- α Knockout von Dr.K. Steinbrink (Universität Mainz) und die IL-1 α/β defizienten Tiere wurden von Yoichiro Iwakura (Center of Experimental Medicine, Universität Tokyo) zur Verfügung gestellt. Die NFATc2 Knockout Mäuse wurden von Dr.E. Serfling von der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden im Alter von 6-10 Wochen verwendet.

6 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur wurden an einer sterilen Werkbank, mit sterilen Materialien und Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator bei 10% CO₂-Gehalt kultiviert.

6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch die Verdünnung einer Probe der Zellsuspension in physiologischer Tyranblaulösung. Tote Zellen färben sich dadurch blau, lebende Zellen bleiben ungefärbt, da der Farbstoff nicht durch die intakte Membran dringen kann.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde anschließend mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dabei wurden 4 Großquadrate a 16 Einzelquadrate ausgezählt. Die Kammertiefe betrug 0,1mm. Die Zellzahl ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Gezählte Zellzahl}/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4) = \text{Zellzahl/ml}$$

6.2 Präparation von Knochenmarkszellen

Zunächst wurden die Tiere durch CO₂-Begasung getötet. Anschließend wurden die Knochen der Hinterbeine freipräpariert und durch Spülen in Isopropanol desinfiziert. Danach wurden die Knochen an beiden Enden aufgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze mit MEM aus dem Knochen gespült. Die Knochenmarksstränge wurden nun zu einer Einzelzellsuspension resuspendiert und diese anschließend zentrifugiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte für 2 Minuten durch Zugabe von Gey's Lysepuffer. Zur Beendigung Reaktion wurden ein ca. 3faches Volumen MEM/2% FCS zugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein Zellsieb (70µm) gegeben, um Knochensplitter und Gewebereste zu entfernen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl konnten die Zellen weiter verwendet werden.

6.2.1 Differenzierung von BMMC aus Knochenmarkszellen

Die Knochenmarkszellen wurden nach der Präparation in Mastzellfütter auf 3×10^6 /ml eingestellt und auf einer 24well Platte mit 3×10^6 Zellen/well ausgesetzt und über 4 Wochen kultiviert.

Während der ersten 2-3 Wochen der Kultur wurden die Zellen jeden zweiten Tag gefüttert und umgesetzt, um die adherenten Makrophagen zu entfernen. Dabei wurde zunächst die Hälfte des Mediums entfernt, die Kultur anschließend auf eine neue Platte gesetzt und wieder mit frischem Medium aufgefüllt.

Nach 4 Wochen sind aus den Knochenmarkszellen Mastzellen (BMMC) mit einer sehr hohen Reinheit entstanden, die nun zu Versuchen verwendet werden konnten.

6.2.2 Generierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen

Ebenso wie die Mastzellen, lassen sich Dendritische Zellen aus Knochenmarkszellen generieren. Hierzu wurden die Knochenmarkszellen in Testmedium/1% GM-CSF aufgenommen und mit 3×10^6 /4ml 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 (BMDC²) ausdifferenziert und können nun weiter verwendet werden.

6.3 Stimulation von Mastzellen *in vitro*

Nach der Differenzierung der Mastzellen aus Knochenmarksvorläuferzellen wurden diese nun *in vitro* stimuliert.

Stimulation mit Ionomycin:

Dazu wurden sie mit Testmedium gewaschen und mit 1×10^6 Zellen/ml in einer 24well Platte ausgesät. Die Stimulation erfolgte durch die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Ionomycin für 4 Stunden bei 37°C .

Stimulation über kreuzvernetztes IgE:

Zur Stimulation wurden die Zellen (1×10^6 /ml, 24well Platte) zunächst für 72 Stunden mit einem anti- DNP-IgE Antikörper ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) beladen. Danach wurden die Zellen gewaschen und durch die Zugabe des anti IgE Antikörpers (Em95.3, $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 4 Stunden stimuliert.

6.4 Stimulation von Dendritischen Zellen *in vitro*

Zur Stimulation wurden die Dendritischen Zellen, welche aus Knochenmarksvorläuferzellen generiert wurden, geerntet und in Testmedium (1×10^6 Zellen/ml) aufgenommen. Anschließend wurden sie mit 1×10^6 Zellen/well in einer 24well Platte ausgesät. Zur Stimulation wurde der TLR3-Ligand poly(I:C) (Amersham) in einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Nach 18 Stunden Stimulation wurden die Zellen mit Testmedium gewaschen und danach für eine Stunde mit SIINFEKL (100nM) inkubiert (1×10^6 Zellen/well in 1ml). Als nächstes wurden die Zellen noch einmal mit PBS (1x) gewaschen und konnte anschließend verwendet werden.

7 Nachweis von Cytokinen in Kulturüberständen

Nach der Stimulation der Mastzellen mit Ionomycin oder durch kreuzvernetztes IgE sollte in den Überständen die Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 bestimmt werden.

² Bone marrow derived dendritic cells

ELISA³ zur Bestimmung der IL- 6 Produktion:

Die Produktion von IL-6 nach Stimulation wurde durch einen ELISA nach der Sandwichmethode gemessen. Dazu wurden zunächst die 96well Platten (MaxiSorp) über Nacht mit dem unmarkierten, primären Antikörper (MP5-20F3) in Kopplungspuffer bei 4°C beschichtet. Überschüssiger Antikörper wurde durch 3maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Freie Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit Blockpuffer bei 37°C abgesättigt. Die Kulturüberstände und die Positivkontrolle wurden im ersten well 1:1 in Blockpuffer verdünnt und anschließend über 8 Stufen 1:1 titriert. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte eine Inkubation (1 Stunde, 37°C) mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (MP5-32C11). Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 37°C Streptavidin gekoppelte Peroxidase (Roche, Mannheim) in einer 1:10000 Verdünnung zugegeben. Nach weiteren Waschschritten (3x) wurde der ELISA durch Zugabe der Substratlösung (1mg/ml ABTS in Citratpuffer+ 0,0075% H₂O₂) entwickelt. Die photometrische Messung wurde mit dem ImmunoReader NJ200 der Firma Intermed (Nunc, Wiesbaden) durchgeführt.

Kopplungspuffer

Na ₂ HPO ₄	0,1M
pH9,2	

Blockpuffer

BSA	0,1%
in PBS (1x)	

Waschpuffer

Twenn20	0,1%
in PBS (1x)	

Citratpuffer

Zitronensäure	40mM
Na ₂ HPO ₄	60mM
pH4,4	

³ Enzyme linked Immunosorbent Assay

Test auf biologisch aktives TNF- α :

Biologisch aktives TNF- α lässt sich durch die Zelllinie WEHI-164 bestimmen. TNF- α induziert in diesen Zellen die Apoptose.

Dazu wurden die Überstände der stimulierten Mastzellen auf einer 96well Platte seriell 1:1 verdünnt. Zu den 50 μ l der Überstände wurden anschließend jeweils 4×10^4 WEHI-Zellen/well in einem Volumen von 50 μ l gegeben. Zusätzlich befand sich in dem Ansatz 1 μ g/ml Actinomycin D, um die Proliferation der Zellen zu unterbinden. Als Referenz wurde rekombinantes humanes TNF- α verwendet.

Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C wurde den Ansätzen jeweils 50 μ l MTT zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C weiter inkubiert. Durch Zugabe von 100 μ l SDS-DMF Lysepuffer wurden Farbaggregate gelöst und das von den überlebenden Zellen umgesetzte Substrat wurde photometrisch (ImmuniReader NJ 200, Nunc, Deutschland) bestimmt

MTT-Lösung

MTT (Thiazolyl Blue Bromid) 2,5mg/ml
in PBS, 0,2 μ m sterilfiltriert

SDS-DMF

2 Vol 30% SDS in aqua dest.
1 Vol Dimethylformamid
pH 4,7, 0,2 μ m sterilfiltriert

8 Histologische Methoden

8.1 Präparation der Epidermis

Zur Präparation der Epidermis wurden die Ohren direkt am Ansatz abgeschnitten und die beiden Hälften auseinander gezogen. Anschließend wurde die dorsale Hälfte mit der Epidermis nach oben für 20 Minuten bei 37°C auf eine 0,5%ige Dispaselösung gelegt. Das Ohr wurde danach in PBS (1x) gelegt und die Epidermis abgezogen.

Diese wurde zur weiteren Verwendung zunächst in Aceton für 15 Minuten fixiert.

8.2 Färbung der Langerhanszellen in der Epidermis

Nach Fixierung der Epidermis wurde diese jeweils für 15 Minuten 1x in PBS (1x) und 1x in PBS/0,5% BSA gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für eine Stunde bei 37°C. Verwendet wurde hierzu ein Ratte anti Maus MHC-II oder alternativ ein anti Langerin Antikörper (siehe 5.2) in einer Konzentration von 20 μ g/ml bzw. 2 μ g/ml in

PBS/0,5% BSA. 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 2maligem 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 und mit Nagellack versiegelt.

Anschließend konnte die Anzahl bzw. die Auswanderung der Langerhanszellen im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der Cell^R Imaging Software (Olympus) ermittelt werden. Dabei wurden in jedem Präparat 3 Quadrate an unterschiedlichen Stellen zu je 300x400µm ausgezählt.

9 Molekularbiologische Methoden

9.1 Präparation von RNA aus Geweben

Zunächst wurden die Ohren in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden sie mit Mörser und Pistill, welche ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt worden waren, zu einem Gewebepulver zerrieben. Das Pulver wurde in ein RNase freies 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und ein mit β-Mercaptoethanol versetzter Guanidinthiocyanat-Puffer (RLT-Puffer, RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit) zugegeben. Um das Gewebe weiter zu zerkleinern wurde es mehrere Male durch eine Kanüle gezogen. Gewebereste, die sich nicht zerkleinern ließen, wurden durch die Zentrifugation über eine Kieselgel-Säule (QIAshredder®, Qiagen) entfernt.

Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte über den RNA-Isolations-Kit RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (50) und wurde nach Anweisung des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

Am Ende wurde die RNA 2x mit 50µl RNase- freiem Wasser (DEPC-Wasser) eluiert. Nach Elution wurde die RNA, um eine höhere Konzentration zu erreichen, über Nacht bei -20°C gefällt.

Fällungsansatz (100µl Eluat):

250µl	Ethanol 100%
10µl	Natriumacetat (3M in DEPC- Wasser)
1µl	Glycogen (20mg/ml)

Nach Fällung wurde die Lösung zentrifugiert (>10000g) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde anschließend mit eiskaltem, 75%igem Ethanol gewaschen und noch einmal bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Nach

Trocknung des Pellets wurde dieses in 20µl DEPC-Wasser gelöst und bei 60°C für wenige Minuten inkubiert, um eine bessere Löslichkeit zu erreichen.

Anschließend wurde der RNA-Gehalt photometrisch bei 260nm bestimmt, wobei eine OD von 1 einem RNA-Gehalt von 40µg/ml entspricht.

9.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Die Reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in cDNA. Dabei wurde eine Mischung aus Oligo(dT)_n-Primern und p(dN)₆-Primern verwendet um eine optimale Kopienzahl der mRNA-Moleküle zu erreichen. Dabei bindet der Oligo(dT)_n-Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA, so dass die Synthese am 3'-Ende beginnt. Die Effizienz der Synthese nimmt jedoch mit der Entfernung vom 3'-Ende hin ab. Der p(dN)₆-Primer hingegen kann theoretisch an jede denkbare Sequenzfolge binden. Dabei sinkt jedoch die Zahl der vollständigen Kopien, da die Bindung nicht immer direkt am 3'-Ende erfolgen muß. Die Mischung der beiden Primer jedoch garantiert eine gute Ausbeute bezüglich der Kopienzahl.

Für die Reverse Transkription wurde folgender Ansatz gewählt:

3,5µg RNA, je nach Konzentration mit DEPC- Wasser auf 11µl aufgefüllt

4µl 5x RT-Puffer (5x Buffer for M-MuLV RT, Fermentas)

2µl dNTP (10mM)

1µl Oligo (dT)_n (100ng/µl)

1µl p(dN)₆ (20ng/µl)

Der Ansatz wurde vor Zugabe der Reversen Transkriptase im Wasserbad bei 60°C für 5 Minuten denaturiert. Danach Zugabe der RTase:

1µl Reverse Transkriptase

(RevertAid™ M-MuLV RT 200U/µl, Fermentas)

Gesamtvolumen: 20µl

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42°C im Wasserbad inkubiert und die cDNA anschließend durch die Zugabe von 80µl sterilem Wasser verdünnt.

9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase Kettenreaktion kommt es mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung der DNA. Dabei besteht ein Zyklus aus der DNA-Denaturierung, der Hybridisierung der Primer

mit der DNA und eine anschließende Auffüllreaktion. Die Bereiche die von einem Primerpaar begrenzt werden, können dabei um das bis zu 10^7 -fache angereichert werden.

In dieser Arbeit wurde sowohl mit der konventionellen als auch mit der semiquantitativen Realtime-PCR gearbeitet.

Die Primer wurden von der Firma Roth bezogen und mit TE-Puffer gelöst. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 100pmol/μl wurde bei -20°C aufbewahrt.

9.3.1 Semiquantitative Realtime-PCR

Mit Hilfe der Realtime-PCR lässt sich eine Aussage über die relative Expression von mRNA zwischen unterschiedlichen Proben machen. Dabei wurde die jeweilige Expression der gewünschten mRNA zu der jeweiligen Expression der mRNA für das gewählte Haushaltsgen normalisiert und anschließend konnte die Expression durch Vergleich der C_T -Werte unter den einzelnen Proben verglichen werden.

Die PCR wurde in Triplikaten unter Verwendung des Absolute SYBR Green Fluorescein Mix (ABgene), welche bereits den benötigten Fluoreszenzfarbstoff, sowie Puffer, Polymerase und $MgCl_2$ enthielt 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`

9.3.2 Konventionelle PCR

Wird in der Vergleichsprobe die untersuchte mRNA gar nicht exprimiert, so ist sie für die Analyse durch Realtime-PCR nicht geeignet. In solch einem Fall bedient man sich der konventionellen PCR und trägt anschließend die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel auf und trennt sie auf. Durch die Färbung mit Ethidiumbromid lassen sich die Fragmente nachweisen und untereinander vergleichen.

Hierfür wurde das Advantage 2 Polymerase-Mix Kit von BD verwendet.

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`

10 Rekonstitution von Mastzell-defizienten Mäusen mit BMMC

Mastzellose Mäuse des Stammes *Kit^{W-sh/W-sh}* wurden lokal in der Ohrfalte rekonstituiert. Dazu wurde den Tieren zunächst mit Ketamin® (Ratiopharm) 71,2mg/Maus + Rompun® (Bayer) 0,2mg/Maus durch intraperitoneale Injektion betäubt. Anschließend wurden subdermal 5×10^5 BMMC in 50 μ l 1x PBS in die Ohrfalte injiziert. Nach 6 Wochen waren die BMMC zu dermalen Mastzellen ausdifferenziert und die Tiere konnten für weitere Versuche verwendet werden.

11 Behandlung mit Aldara/5% Imiquimod Creme

Um die Tiere eincremen zu können, wurde diese zunächst betäubt. Zur Behandlung wurden den Tieren einmal täglich ca. 40mg der Creme Aldara auf beide Seiten der Ohren aufgetragen. Die Behandlung dauerte je nach Versuch zwischen 3 und 7 Tagen. Zur Kontrolle wurden Tiere auch mit Salbengrundlage ohne den Wirkstoff Imiquimod behandelt.

11.1 Messung der Aldara/Imiquimod-vermittelten Ohrschwellung

Vor jeder Behandlung wurde täglich die Schwellung der Ohren nach Betäubung der Mäuse vermessen. Dies geschah mit einer Testarm-Messuhr zur Außenmessung (Mitutoyo, Neuss). Als Ausgangswert diente die Ohrdicke vor Behandlung mit Aldara/Imiquimod.

11.2 Bestimmung der Auswanderung von Langerhanszellen nach Aldara-Behandlung

Nachdem die Versuche zur Ohrschwellung abgeschlossen waren, wurden, wie bereits beschrieben die Epidermis der behandelten Tiere präpariert (siehe 8.1). Anschließend wurde in den Präparaten die Langerhanszellen gefärbt und die Zahl der Zellen bestimmt (siehe 8.2). Die Auswanderung der Langerhanszellen wurde durch Vergleich mit den unbehandelten oder mit Salbengrundlage behandelten Kontrolltieren ermittelt.

12 Immunisierung mit Dendritischen Zellen

Zunächst wurden Dendritische Zellen aus Knochenmarkszellen generiert (7.2.2). Nach 5 Tagen wurde diese über Nacht mit poly (I:C) stimuliert und anschließend mit dem H2K^b-Peptid SIINFEKL beladen (siehe 7.2.2). Nach der Aktivierung und Beladung mit Peptid wurden die Zellen gewaschen. Die Mäuse wurden dann *i.p.* mit 1×10^6 Dendritischen Zellen/Maus immunisiert. Die Injektion der Zellen erfolgte in 500µl (1x) PBS.

7 Tage nach Immunisierung wurde der Erfolg der Immunisierung durch einen Test zur SIINFEKL-spezifischen cytotoxischen Aktivität der T-Zellen untersucht.

12.1 Test auf cytotoxische Aktivität nach Immunisierung

Die cytotoxische Aktivität der peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen läßt sich durch die spezifische Lyse peptidbeladener Zielzellen untersuchen.

Dazu werden mit CFSE markierte und mit SIINFEKL-belade Milzzellen *i.v.* in die immunisierten Tiere gespritzt. Nach 20 Stunden kann man durch FACS-Analyse feststellen, ob die injizierten Zielzellen noch vorhanden sind oder ob sie durch eine entsprechende CTL-Antwort lysiert wurden.

Herstellung der Zielzellen:

Als Zielzellen wurden Milzzellen verwendet. Dazu wurde die Milz in einem Sieb zerrieben und anschließend die Erythrocyten mit 5ml ACK-Puffer/Milz lysiert. Anschließend wurden die Milzzellen mit PBS gewaschen und auf 2×10^7 /ml mit PBS eingestellt. Die Zellsuspension wurde aufgeteilt und mit einer hohen (4µM) oder einer niedrigen (0,4µM) Konzentration CFSE gefärbt. Dazu wurden die Färbelösungen jeweils doppelt- konzentriert (8 und 0,8µM) angesetzt und anschließend 1:1 zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden für 4 Minuten bei 37°C mit CFSE inkubiert. Durch die Zugabe von FCS wurde die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen noch 1x mit Testmedium/5% FCS und 1x mit IMDM gewaschen.

Die Zellen, welche mit der niedrigen Konzentration ($0,4\mu\text{M}$) CFSE gefärbt worden waren, wurden nun noch mit Peptid beladen. Dazu wurden die Zellen auf $2 \times 10^7/\text{ml}$ in IMDM eingestellt und unter Zugabe von SIINFEKL ($1\mu\text{M}$) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und auf $2 \times 10^7/300\mu\text{l}$ eingestellt. Diese Zellen wurden dann mit den Milzzellen, welche mit einer hohen Konzentration ($4\mu\text{M}$) CFSE gefärbt und ebenfalls auf $2 \times 10^7/300\mu\text{l}$ in PBS eingestellt worden waren 1:1 gemischt. Den Tieren wurden danach $300\mu\text{l}$ der Zellsuspension *i.v.* gespritzt, so daß diese jeweils 1×10^7 Zellen der jeweiligen CFSE-Konzentration erhielten.

FACS Analyse der peptidspezifischen Zellyse:

11-22 Stunden nach der Injektion der Zielzellen lassen sich diese durch FACS-Analyse im Blut bzw. in der Milz nachweisen.

Dazu wurde Blut abgenommen und dieses in EDTA-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in ACK-Puffer aufgenommen und zu Lyse der Erythrocyten für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit GM-Puffer konnten die Zellen im FACS (FACSCanto und FACSDiva Software, BD Pharmingen) analysiert werden.

Zur Analyse der Milzzellen wurde das Organ entnommen und in einem Zellsieb zerrieben. Die anschließende Lyse der Erythrocyten erfolgte durch Aufnahme der Milzzellen in Gey's-Lysepuffer ($1\text{ml}/\text{Milz}$). Nach 2 minütiger Lyse wurde die Reaktion durch die Zugabe von Testmedium/ 5% FCS abgestoppt und die Zellen anschließend noch 2x mit GM-Puffer gewaschen. Hiernach konnten die Zellen durch FACS-Analyse untersucht werden.

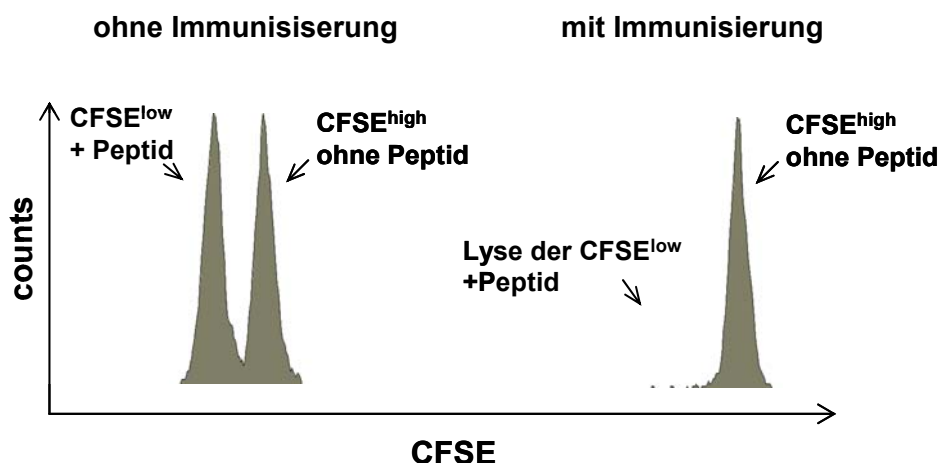


Abb.3: Nach Immunisierung werden die peptidbeladenen Zielzellen (CFSE^{low}) lysiert und sind im FACS nicht mehr nachweisbar.

Die Abbildung zeigt eine solche FACS-Analyse der antigenspezifischen Zellyse. Zunächst ließen sich beide Populationen (CFSE^{low} und $\text{CFSE}^{\text{high}}$) gut voneinander unterscheiden. Wurden die Zellen jedoch lysiert, verschwand die peptidbeladene CFSE^{low} Population.

Anhand der folgenden Formel wurde nun die spezifische Zellyse bestimmt:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{(\text{Zellzahl unbeladene Zellen} - \text{Zellzahl beladene Zellen})}{\text{Zellzahl unbeladene Zellen}}$$

13 Transkutane Immunisierung mit Aldara/Imiquimod als Adjuvans

Für die transkutane Immunisierung wurden die Mäuse 3-4 Tage vor Versuchsbeginn am Rücken (ca. 10cm²) rasiert, um eventuelle Hautreizungen abklingen zu lassen. Einen Tag vor der Behandlung wurden die Tiere ggf. noch einmal nachrasiert.

Zur Immunisierung wurde den Tieren ca. 40mg Aldara (entspricht 3mg Wirkstoff), welche zuvor mit 100µg SIINFEKL versetzt worden war, aufgetragen (Tag 0). 24 Stunden später wurden die Tiere noch einmal mit Aldara/SIINFEKL immunisiert (Tag1).

13.1 Nachweis von peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Nach 5 und 6 Tagen bzw. in einem zweiten unabhängigen Versuch an Tag 6 und 8, wurde den Mäusen Blut abgenommen und in EDTA-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die Erythrozyten mit ACK-Puffer lysiert und die Zellen zweimal mit GM-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für die FACS-Analyse zum einen mit Antikörpern, aber auch mit dem SIINFEKL-H2K^b-Tetramer gefärbt. So lassen sich die Aktivierung und die Spezifität der cytotoxischen T-Zellen untersuchen.

Zur Färbung wurde eine Zellprobe in 50µl GM-Puffer aufgenommen und in eine 96well Platte überführt.

Verwendet wurden folgende Antikörper:

anti CD44-FITC (1:200)

anti CD25-PE- Cy7 (0,25µg/ml)

anti CD62L-APC (0,2µg/ml)

anti CD8-APC. Cy7 (1µg/ml)

anti CD16/32 (Fc- Block, 30µg/ml)

Die Färbung erfolgte für 20 Minuten bei 4°C. Schließlich wurde dem Ansatz 1µl SIINFEKL-H2K^b-Tetramer-PE (Orpegen, Deutschland) zugegeben und für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Beendigung der Färbung wurden die Zellen 2x mit GM-Puffer gewaschen. Zur FACS-Analyse wurde der Probe noch Propidiumiodid zugegeben, um tote Zellen ausschließen zu können.

13.2 Test auf cytotoxische Aktivität nach TCI

Nach 6 bzw. 7 Tagen wurden den Tieren nach der letzten Blutentnahme die wie unter 12.1 beschrieben hergestellten Zielzellen gespritzt. Nach 11 Stunden wurde im Blut bzw. nach 20 Stunden in der Milz die antigenspezifische Lyse der Zielzellen ermittelt (siehe 12.1).

13.3 IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach Restimulation

Zur Restimulation wurden die Milzzellen, welche nicht zur FACS-Analyse verwendet wurden, (siehe 13.2 bzw. 12.1) in 96well Platten ausgesät. Dazu wurden 4×10^6 Zellen/200 μ l in α MEM/ 15% FCS aufgenommen und mit 1 μ g/ml SIINFEKL für 4 Stunden in Anwesenheit von Brefeldin A (1 μ g/ml) bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Zellen 2x mit GM-Puffer gewaschen und mit einem Antikörper (anti CD8-PE, 1 μ g/ml) gefärbt. Die Färbung wurde bei 4°C für 30 Minuten durchgeführt. Es folgten zwei Waschschrte mit GM-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ l Cytofix/ Cytoperm (BD) für 30 Minuten bei 4°C fixiert. Nach zwei Waschrten mit Saponin-Puffer wurden die Zellen in Saponin-Puffer mit einem anti-IFN- γ Antikörper (anti IFN- γ -APC, 0,5 μ g/ml) für 30 Minuten bei 4°C gefärbt. Um die überschüssigen Antikörper zu entfernen wurde wiederum 2x mit Saponin-Puffer gewaschen und die Zellen in GM-Puffer aufgenommen und im FACS analysiert.

C. Ergebnisse

Seit Entdeckung des Zusammenhangs zwischen IgE, Mastzelle und Allergien des Soforttyps in den 1960er Jahren war die Mastzelle lange Zeit nur als Effektorzelle der erworbenen Immunität bekannt. Dabei stand sie vor allem durch ihre Beteiligung an allergischen und anaphylaktischen Reaktionen in einem schlechten Licht. Später erst konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle jedoch auch als Auslöser angeborener Immunreaktionen dient (22, 23), und somit einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von Pathogenen leistet. So lassen sich Mastzellen unabhängig von IgE auch über Toll-like Rezeptoren aktivieren, wodurch diese eine Reihe proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 freisetzen, was innerhalb von Minuten die Entstehung einer Entzündungsreaktion einleitet.

Desweiteren konnte auch gezeigt werden, dass durch die Aktivierung der Mastzelle und die damit verbundene Freisetzung von Cytokinen wie TNF- α die Wanderung von Dendritischen Zellen ausgelöst werden kann (42, 43).

Liganden für Toll-like Rezeptoren (TLR) wirken als Adjuvantien positiv auf die Entstehung adaptiver, d. h. antigenspezifischer Immunantworten, sie bilden somit die Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Als Adjuvantien sind Liganden für TLR (z.B. LPS, Peptidoglycan, CpG-Motive in DNA) wichtige Kostimulantien für die Funktion antigenpräsentierender Zellen (vornehmlich Dendritischer Zellen). Die Expression einer Reihe verschiedener TLR auf Mastzellen legt jedoch auch nahe, daß diese Zellen als Konsequenz ihrer Funktion als „Wächter“ ebenfalls an der Entstehung adaptiver Immunantworten mitwirken können.

Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit an einem Entzündungsmodell der Maushaut, ausgelöst durch lokale Applikation des synthetischen TLR7 Liganden Imiquimod, untersucht werden.

1 Mastzellen fördern die Entzündungsreaktion nach Aldara/Imiquimod-Behandlung

Um zu untersuchen, ob Mastzellen an der durch lokale Applikation von Imiquimod ausgelösten Entzündungsreaktion beteiligt sind, sollte zunächst das Ausmaß der Entzündungsreaktion zwischen Wildtyp (*Kit*^{+/+}) und Mastzell-defizienten (*Kit*^{W-sh/W-sh}) Mäusen verglichen werden. Hierzu wurden die Ohren der Tiere mit einer Imiquimod-haltigen Creme (Aldara) eingecremt; als Maß der Entzündungsreaktion diente die Ohrschwellung.

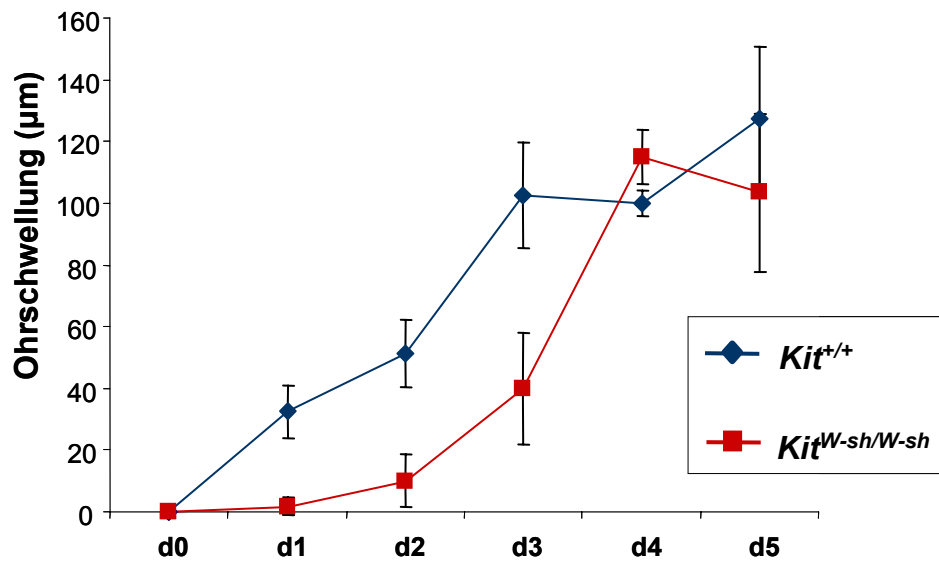


Abb.4: Mastzell defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Ohrschwellung nach Behandlung mit Aldara

Mastzellose Mäuse ($Kit^{W-sh/W-sh}$) (n=2) und die entsprechenden Wildtypiere ($Kit^{+/+}$) (n=2) wurden über 4 Tage hinweg einmal täglich mit 40mg Aldara am Ohr behandelt und die Ohrdicke über alle Tage hinweg gemessen. Die Ohrschwellung der unbehandelten Ohren (Tag 0 der Behandlung) wurde als 0 definiert.

Wie in Abb.4 zu erkennen, zeigten die Wildtyp-Tiere schon am Tag nach der ersten Applikation von Aldara eine beginnende Ohrschwellung. Diese Schwellung stieg bis zum dritten Tag stetig an und erreicht dann eine Plateauphase. Die mastzellosen Tiere hingegen zeigten eine stark verzögerte Entzündungsreaktion. Hier begann die Ohrschwellung erst nach dreimaliger Behandlung (d2), erreichte dann aber innerhalb von zwei Tagen Wildtypniveau (d4).

In einem weiteren Kontrollversuch sollte nun die Wirkung von reiner Salbengrundlage (ohne Imiquimod) untersucht werden. Dabei wurden Wildtyp-Tiere über 4 Tage hinweg einmal täglich mit Aldara oder Salbengrundlage behandelt und der Verlauf der Ohrschwellung beobachtet (siehe Abb.5).

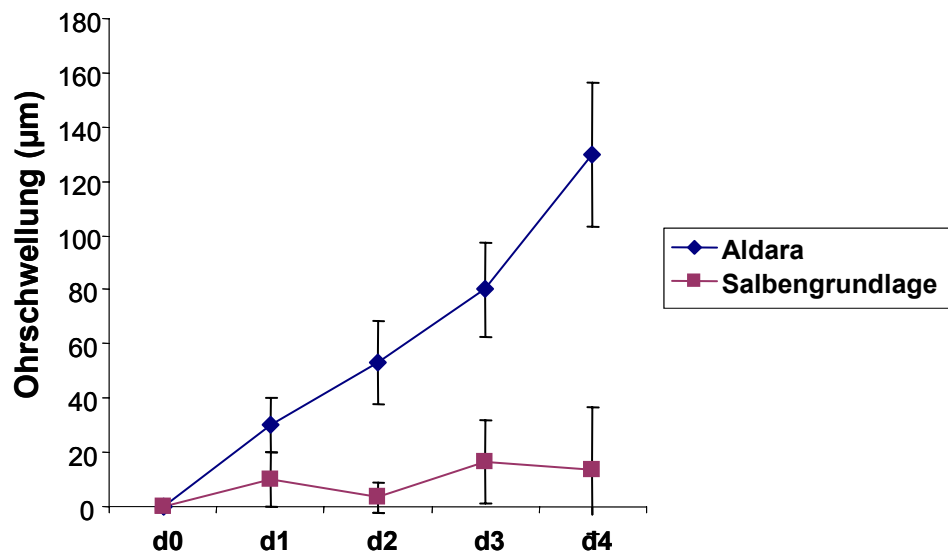


Abb.5: Salbengrundlage induziert im Vergleich zu Aldara keine Entzündungsreaktion.

Wildtyp-Mäuse ($\text{Kit}^{+/+}$) ($n=3$) wurden über 4 Tage hinweg einmal täglich mit Aldara oder Salbengrundlage ohne Wirkstoff (Imiquimod) behandelt. Dabei wurde täglich die Ohrschwellung gemessen.

Erneut zeigte sich nach Aldara-Behandlung eine frühe Entzündung. Diese blieb jedoch, wie zu erwarten war, bei der Behandlung mit reiner Salbengrundlage völlig aus.

Die Beobachtung, dass mastzellose Mäuse verspätet auf einen TLR7-Stimulus reagieren, war ein erster Hinweis auf die Beteiligung dermalen Mastzellen an der raschen Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung. Um diesen Befund zu untermauern, wurden mastzellose Mäuse 6 Wochen vor Versuchsbeginn durch Injektion von BMMC in die Ohrfalten lokal mit Mastzellen rekonstituiert. Für dieses Experiment wurden die Tiere entweder mit BMMC aus Wildtyp oder TLR7-defizienten Mäusen rekonstituiert, wodurch gleichzeitig die Aussage getroffen werden sollte, ob die Expression des TLR7 auf Mastzellen für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist, oder ob andere Zelltypen daran beteiligt sind.

Im weiteren Versuchsverlauf wurde erneut die Ohrschwellung der rekonstituierten Mäuse nach Aldara-Behandlung über 4 Tage hinweg bestimmt. Zur Kontrolle wurden Wildtyp-Tiere mitgeführt (Abb.6).

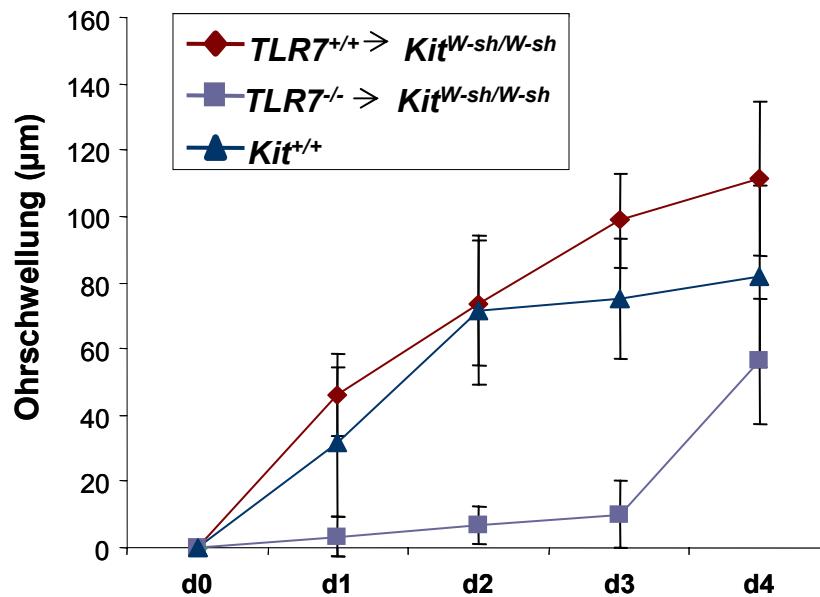


Abb.6: Die Wirkung von Aldara (Imiquimod) wird über den Toll-like Rezeptor 7 der Mastzelle vermittelt.

Mastzellose Mäuse ($Kit^{W-sh/W-sh}$) (n=4) wurden mit 5×10^5 BMMC, welche entweder aus Wildtyp- oder $TLR7^{-/-}$ Knochenmarkszellen generiert wurden, lokal in der Ohrhaut rekonstituiert. Nach 6 Wochen wurden die Ohren täglich mit Aldara behandelt und die Ohrschwellung gemessen. Als Kontrolle wurden Wildtypiere ($Kit^{+/+}$) (n=4) ebenfalls täglich behandelt.

Wie bereits im ersten Versuch, begann die Entzündung im Wildtyp ($Kit^{+/+}$) bereits am ersten Tag nach Aldara-Behandlung und stieg stetig bis Tag 4 an. Die mastzellosen Mäuse, welche zuvor mit Wildtyp-BMMC rekonstituiert wurden ($TLR7^{+/+} \rightarrow Kit^{W-sh/W-sh}$), zeigten einen parallelen Verlauf zum Wildtyp. In den mit $TLR7^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Tieren ($TLR7^{-/-} \rightarrow Kit^{W-sh/W-sh}$) hingegen verlief die Entzündung stark verzögert. Bei diesen Mäusen wurde eine den Wildtyp-Tieren an Tag 1 vergleichbare Ohrschwellung erst an Tag 4 erreicht. Durch dieses Ergebnis konnte nun gezeigt werden, dass die frühe Entzündungsreaktion, induziert durch Imiquimod, direkt über TLR7 der Mastzelle vermittelt wird. Der späte Anstieg der Ohrschwellung bei den Tieren, welche zuvor mit $TLR7$ -defizienten BMMC rekonstituiert worden waren, zeigt jedoch, dass offensichtlich weitere Zellen an der $TLR7$ -vermittelten Reaktion beteiligt sind. Allerdings bewirkt die Mastzelldefizienz eine starke Verzögerung der Entzündungsreaktion.

2 Die durch Aldara/Imiquimod induzierte Wanderung der Langerhanszellen ist zum Großteil mastzellabhängig

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann die Aktivierung der Mastzellen und die damit verbundene Freisetzung von $TNF-\alpha$ teilweise die Auswanderung von Langerhanszellen induzieren (42, 43). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Imiquimod die Wanderung von

Langerhanszellen auslösen kann (44). In der murinen Haut exprimieren jedoch weder Langerhanszellen, noch Keratinozyten den Rezeptor für Imiquimod (TLR7) (45). Es wurde jedoch gezeigt, dass Mastzellen, die aus embryonaler Maushaut isoliert und *in vitro* gezüchtet wurden, diesen Rezeptor exprimieren (46).

Daher sollte auch die Rolle der Mastzelle bei der Auswanderung der Langerhanszellen untersucht werden. Dazu wurde am Ende des jeweiligen oben beschriebenen Versuchs die Epidermis der Ohren präpariert und die Langerhanszellen mit einem anti MHC-II Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt. Die Auswanderung der Langerhanszellen wurde anschließend durch den Vergleich zwischen unbehandelten und Aldara behandelten Präparaten ermittelt.

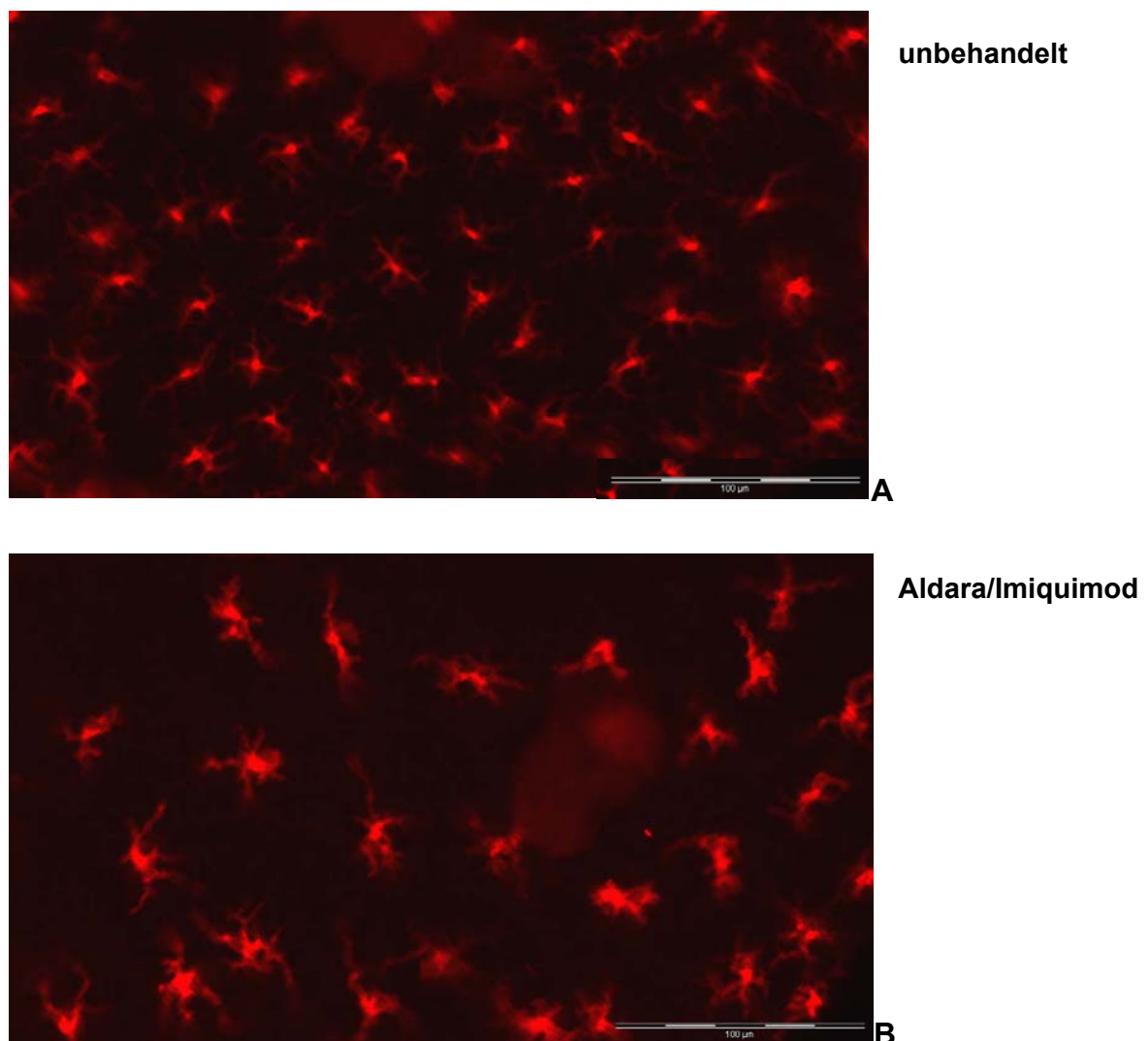


Abb.7: Die Behandlung mit Aldara induziert die Reifung und Auswanderung von Langerhanszellen.

Nach 5 Tagen Aldara- Behandlung wurde die Epidermis der Ohrhaut präpariert und anschließend mit einem Antikörper gegen MHC-II und einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt.

In Abb.7 sind die Präparate nach der Färbung dargestellt. In der unbehandelten Epidermis (Abb.7A) bilden die Langerhanszellen ein dichtes Netzwerk. Wird die Haut jedoch mit Aldara behandelt, so wandert ein Großteil der Zellen aus (Abb.7B). Auch der Phänotyp der Zellen ändert sich. In der unbehandelten Epidermis sind die Zellen relativ klein und haben nur kurze Fortsätze. Nach der Behandlung wurden die Zellen größer und ihre Dendriten länger, was als phänotypischer Ausdruck ihrer Aktivierung angesehen wird. Zunächst wurde die Auswanderung der Langerhanszellen nach Aldara-Behandlung zwischen Wildtyp- und mastzellosen Mäusen verglichen. Da die mastzellosen Tiere gegen Ende des Versuchs bezüglich der Ohrschwellung das Niveau der Wildtyp-Mäuse erreichten, wurde auch die Auswanderung der LC zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt (Abb.8).

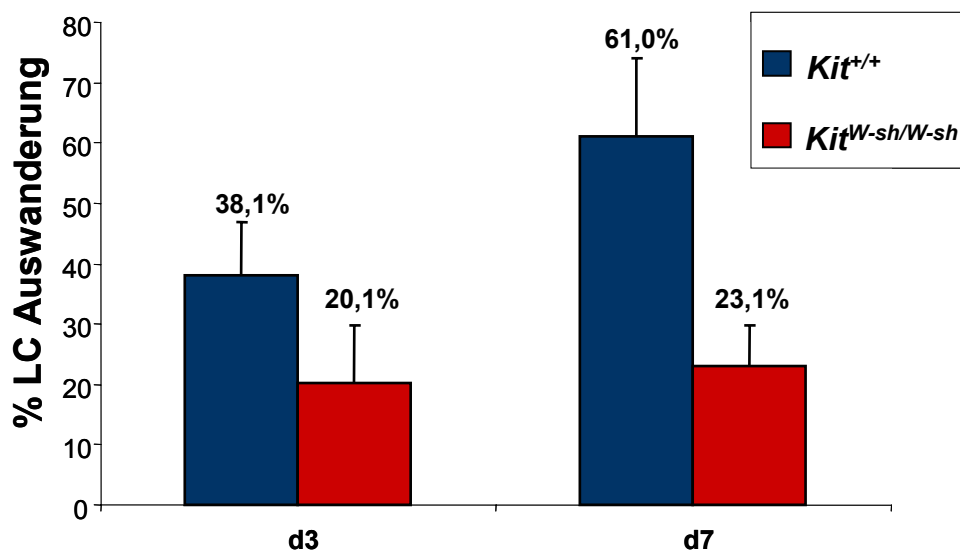


Abb.8: Die Wanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis ist stark von Mastzellen abhängig.

Wildtyp- (n=2) und mastzellose Mäuse (n=2) wurden über 3 bzw. 7 Tage hinweg einmal täglich mit Aldara behandelt. Nach Ende des Versuchs wurde die Epidermis präpariert und mit einem Antikörper gegen MHC-II und einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt. Anschließend wurde die Anzahl der Langerhanszellen in den unbehandelten und mit Aldara behandelten Epidermispräparaten bestimmt.

Wie in Abb.8 ersichtlich ließen sich auch, wie auch bereits bei der Ohrschwellung beobachtet (Abb.4) bei der Auswanderung der Langerhanszellen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Mastzell-defizienten Mäusen erkennen. Bereits nach drei Tagen Aldara-Behandlung wanderten im Wildtyp ca. 40% der Langerhanszellen aus. In den mastzellosen Tieren waren hingegen nur 20% der Langerhanszellen ausgewandert. Nach 7 Tagen Behandlung waren im Wildtyp sogar 61% ausgewanderte LC zu beobachten. In den mastzellosen Mäusen hingegen stieg die Auswanderung nur um wenige Prozent auf 23% an. Die Mastzell-

defizienten Tiere konnten also nicht, wie bei der Ohrschwellung, das Niveau der Wildtyp-Tiere erreichen.

Dies zeigte, dass die Auswanderung der Langerhanszellen zu einem Großteil mastzellabhängig ist und diese Funktion offensichtlich nicht von anderen Zellen kompensiert werden kann.

In einem Kontrollversuch wurde nun die Auswanderung der Langerhanszellen nach Behandlung mit Salbengrundlage ohne Imiquimod ermittelt.

Ebenso wie bei der Ohrschwellung induziert die Salbengrundlage keine Reaktion (Abb.9). Die minimale Auswanderung von ca. 5% könnte auf ein leichtes Kratzen der Tiere nach Auftragen der Creme zurückzuführen sein, wodurch eine ganz leichte Entzündung entstanden sein könnte.

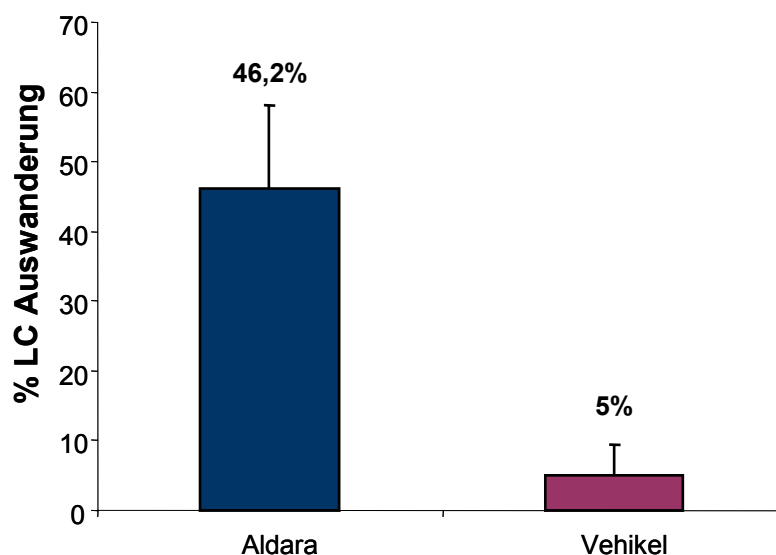


Abb.9: Salbengrundlage ohne Imiquimod induziert keine Auswanderung von Langerhanszellen

Wildtyp-Tiere (n=3) wurden über 4 Tage hinweg mit Aldara oder Salbengrundlage ohne Imiquimod gecremt. Nach Beendigung des Versuchs wurde die Epidermis präpariert, die Langerhanszellen gefärbt und die Zahl der Langerhanszellen bestimmt.

Um dieses Ergebnis weiter abzusichern, wurden die mastzellosen Tiere vor Versuchsbeginn ebenfalls mit BMMC rekonstituiert.

Durch die Rekonstitution mit Wildtyp-BMMC ließ sich die Auswanderung der Langerhanszellen wieder herstellen. So wanderten in den mastzellosen Tieren nur ca. 20% LC aus (Abb.8), in den Wildtyp bzw. mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten Tieren jedoch 41% bzw. 48% (Abb.10). Wurden die Tiere jedoch mit *TLR7^{-/-}*-BMMC rekonstituiert, so wanderten hier nur 31% der Langerhanszellen aus. Dies ist ein Wert, wie er durchaus auch für mastzellose Mäuse erreicht wurde. Somit läßt sich also feststellen, dass auch die

Wanderung der Langerhanszellen über die TLR7-induzierte Aktivierung von Mastzellen vermittelt wird.

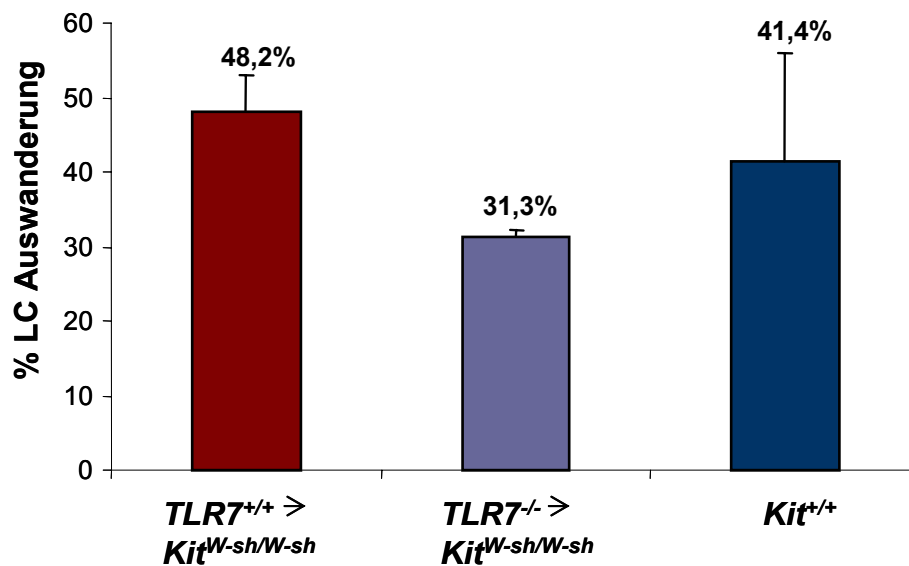


Abb.10: Die Wanderung der Langerhanszellen nach Aldara- Behandlung wird über TLR7 der Mastzellen gefördert.

Mastzellose Mäuse (*Kit*^{W-sh/W-sh})(n=4) wurden mit 5×10^5 BMMC, welche entweder aus Wildtyp- oder *TLR7*^{-/-} Knochenmarkszellen generiert wurden, in der Ohrhaut rekonstituiert. Nach 6 Wochen wurden diese wiederum täglich mit Aldara behandelt und nach Ende des Versuchs (d4) die Epidermis präpariert und, wie bereits oben beschrieben, gefärbt. Als Kontrolle wurden Wildtypiere (*Kit*^{+/+})(n=4) ebenfalls täglich behandelt.

3 Mastzell-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Expression proinflammatorischer Cytokine nach Behandlung mit Imiquimod

Durch die oben beschriebenen Ergebnisse konnte bereits die Bedeutung der Mastzelle für die Auswanderung der Langerhanszellen und die frühe Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung gezeigt werden. In diesem Zusammenhang sollte nun die Mastzell-spezifische Expression von Cytokinen und Chemokinen nach Behandlung mit Aldara untersucht werden, da diese beiden Mediator-Familien womöglich direkten Einfluß auf die beobachteten Phänomene nehmen könnten (Abb.11).

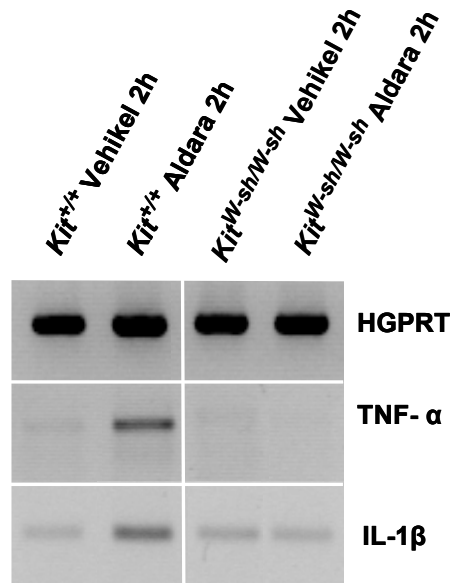


Abb.11: Mastzell-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Cytokinexpression nach Aldarabehandlung.

Wildtyp (*Kit*^{+/+})- und mastzellose Mäuse (*Kit*^{W-sh/W-sh}) wurden entweder mit Aldara oder mit Salbengrundlage (Vehikel) gecremt. Nach zwei Stunden wurde aus den Geweben die RNA isoliert und die Cytokinexpression von TNF-α und IL-1β untersucht. Als Kontrolle diente die Expression von HGPRT, einem „Haushaltsgen“.

In den Wildtyp-Tieren (*Kit*^{+/+}) war bereits 2 Stunden nach Aldara-Behandlung eine Induktion der mRNA für TNF-α und IL-1β zu beobachten. Tiere, welche nur mit Salbengrundlage (Vehikel) behandelt wurden, zeigten nur eine schwache Expression der entsprechenden Cytokin-mRNA. In den mastzellosen Tieren (*Kit*^{W-sh/W-sh}) war 2 Stunden nach Behandlung ebenfalls nur eine geringe Expression von TNF-α oder IL-1β mRNA nachzuweisen, die sich nicht von der Expression nach Behandlung mit Salbengrundlage unterschied.

Der Nachweis der Chemokine KC und MCP-1 erwiesen sich in den Mäusen des Stammes *Kit*^{W-sh/W-sh} (Hintergrund C57Bl/6) als äußerst schwierig. Eine Alternative bot hier der ebenfalls mastzellose Stamm *Kit*^{W/w-v} (Hintergrund (WB X C57BL/6)F1). Dieser zeigte wie auch die *Kit*^{W-sh/W-sh} eine reduzierte Auswanderung von Langerhanszellen und eine verzögerte Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung (Daten nicht gezeigt), kann also hier durchaus im Vergleich verwendet werden (Abb.12).

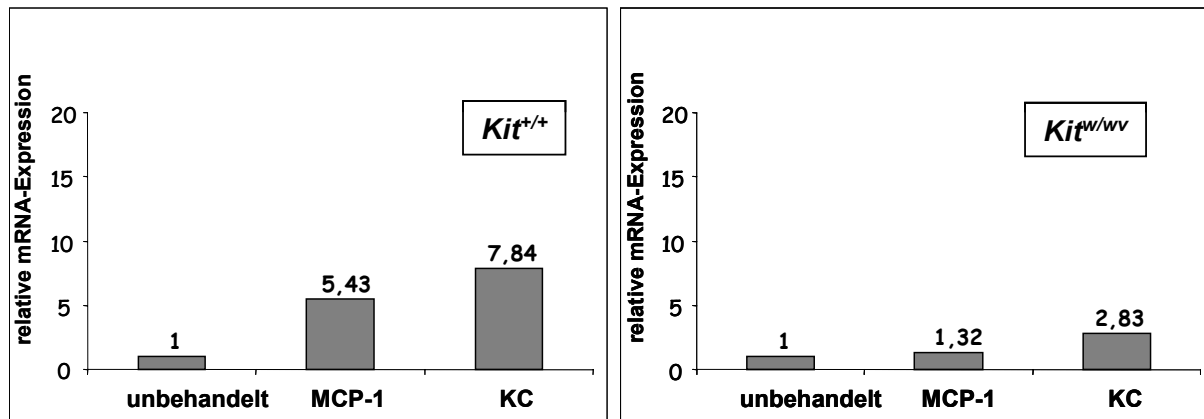


Abb.12: Mastzellen sind wichtig für eine Induktion der Chemokinexpression nach Aldara-Behandlung.

Wildtyp (*Kit^{+/+}*) und mastzellose Mäuse (*Kit^{w/w-v}*) wurden für zwei Stunden mit Aldara behandelt. Anschließend wurde die mRNA aus den Geweben isoliert und die Expression von KC und MCP-1 mittels qRT-PCR analysiert. Zur Kontrolle wurde RNA aus unbehandelten Geweben isoliert.

In diesem Versuch ließ sich in den Wildtyp-Mäusen (*Kit^{+/+}*) eine Induktion der mRNA sowohl für MCP-1 als auch für KC nachweisen. In den Mastzell-defizienten Tieren (*Kit^{w/w-v}*) hingegen fiel die Induktion beider Chemokine wesentlich schwächer aus.

Diese Versuche zeigten, dass die frühe Induktion von Cytokinen wie TNF- α und IL-1 β und von Chemokinen (KC und MCP-1) erheblich von der Anwesenheit von Mastzellen abhängt. Ob diese direkt von der Mastzelle freigesetzt werden und so Einfluß auf die Entzündung nehmen, sollte in den nun folgenden Versuchen geklärt werden.

4 Die Freisetzung von Cytokinen durch Mastzellen beeinflusst die Entzündungsreaktion und die Auswanderung von Langerhanszellen

Die Cytokine TNF- α und IL-1 β tragen entscheidend zur Reifung und Auswanderung der Langerhanszellen bei. TNF- α und IL-1 β fördern jedoch auch die Einwanderung von T-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Die Expression der mRNA beider Cytokine wird, wie in den vorherigen Experimenten gezeigt, innerhalb von zwei Stunden nach Behandlung mit Imiquimod induziert.

Da die Daten der mRNA Expression jedoch nicht zeigen, ob diese Cytokine direkt von der Mastzelle nach TLR7-Aktivierung freigesetzt werden, sollte in den folgenden Versuchen geklärt werden, welche Rolle die von Mastzellen produzierten Cytokine bei der Entzündung spielen.

4.1 Die Rolle von TNF- α

Zunächst sollte in dem verwendeten Modell die Rolle von TNF- α bei der Entzündungsreaktion und Auswanderung von Langerhanszellen geklärt werden.

Dazu wurden *TNF α ^{-/-}* und congenetische Wildtyp-Tiere wiederum für 5 Tage einmal täglich mit Aldara behandelt und über diesen Zeitraum die Ohrschwellung beobachtet. Desweiteren wurden in diesem Versuch wieder mastzellose Mäuse zur Kontrolle mitgeführt (Abb. 13).

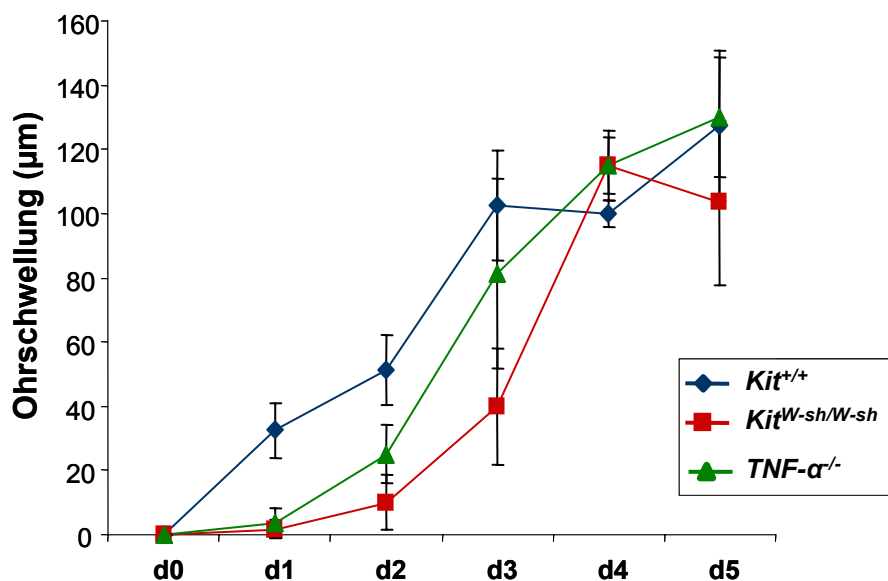


Abb.13: TNF- α -defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Entzündungsreaktion.

Wildtyp, mastzellose und TNF- α defiziente Mäuse (n=2-3) wurden über 5 Tage einmal täglich mit Aldara behandelt. Die Ohrschwellung wurde täglich bestimmt.

Erneut konnte man in den Wildtyp- Tieren (*Kit*^{+/+}) eine früh einsetzende Entzündungsreaktion nachweisen. In den mastzellosen Mäusen (*Kit*^{W-sh/W-sh}) hingegen trat die Ohrschwellung wieder zwei Tage verzögert auf. Die *TNF- α* ^{-/-} -Tiere zeigten ebenfalls eine verzögerte Reaktion, diese Verzögerung fiel jedoch schwächer als in den Mastzell-defizienten Tieren aus. Sowohl die mastzellosen als auch die TNF- α -defizienten Tiere erreichten jedoch zu Ende des Versuchs bezüglich der Ohrschwellung das Niveau des Wildtyps.

Dieser Versuch zeigte jedoch noch nicht, ob das für die unmittelbar entstehende Ohrschwellung notwendige TNF- α auch von den Mastzellen stammt. Um diese Frage zu klären, wurden mastzellose Mäuse mit TNF- α -defizienten BMMC rekonstituiert. Zum Vergleich wurden wiederum mastzellose Tiere und auch mit Wildtyp-BMMC rekonstituierte Tiere herangezogen.

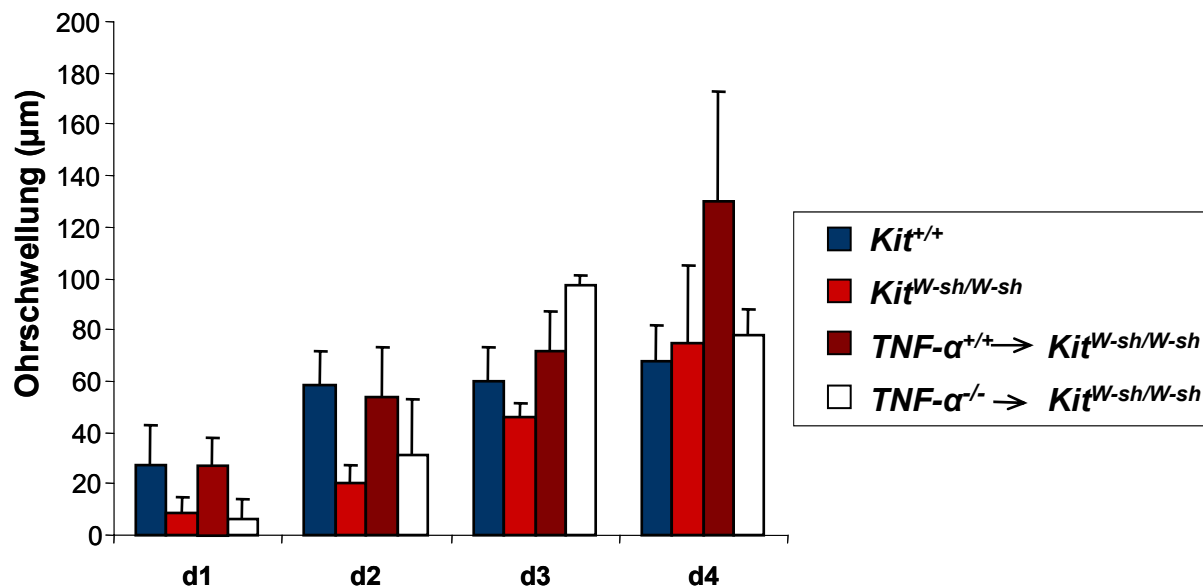


Abb.14: Von Mastzellen produziertes TNF- α ist wichtig für die schnelle Entstehung einer Entzündungsreaktion.

Mastzellose Mäuse wurden lokal im Ohr mit BMMC aus Wildtyp oder *TNF- α* ^{-/-}-Knochenmark rekonstituiert (n=4). Nach 6 Wochen wurden diese Tiere für 4 Tage mit Aldara behandelt und die Ohrschwellung bestimmt. Als Vergleich dienten Wildtyp und Mastzell-defiziente Tiere (n=4).

Wildtyp- und Mastzell-defiziente Tiere zeigten in diesem Versuch (Abb.14) wieder den typischen Verlauf der Entzündungsreaktion nach Aldara- Behandlung. In den mastzellosen Tieren trat die Ohrschwellung wieder mit einer zweitägigen Verzögerung auf. Durch die Rekonstitution mit Wildtyp-BMMC konnte die Entzündungsreaktion in den mastzellosen Mäusen ebenfalls vollständig wiederhergestellt werden. Wurden die Tiere jedoch mit *TNF- α* ^{-/-}-BMMC rekonstituiert, konnte man eine ähnlich verzögerte Ohrschwellung wie in den mastzellosen Mäusen beobachten. So kann man annehmen, dass das von den Mastzellen nach Aktivierung freigesetzte TNF- α eine wichtige Rolle bei der frühen und schnellen Entstehung einer Entzündungsreaktion spielt.

TNF- α kann jedoch auch ein wichtiger Faktor für die Reifung und Auswanderung von Langerhanszellen in die drainierenden Lymphknoten sein. Daher sollte nun auch die Bedeutung von TNF- α für die Auswanderung von Langerhanszellen unter diesen Bedingungen untersucht werden.

Betrachtet man nun die Auswanderungsrate in den TNF- α defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp- und mastzellosen Mäusen, so lässt sich feststellen, dass TNF- α nur eine minimale Rolle zu spielen scheint, d.h. andere Faktoren wesentlich wichtiger zu sein scheinen. Das Ausmaß der Auswanderung lag in den TNF- α -defizienten Tieren nur leicht unter dem der Wildtyp-Tiere (siehe Abb.15).

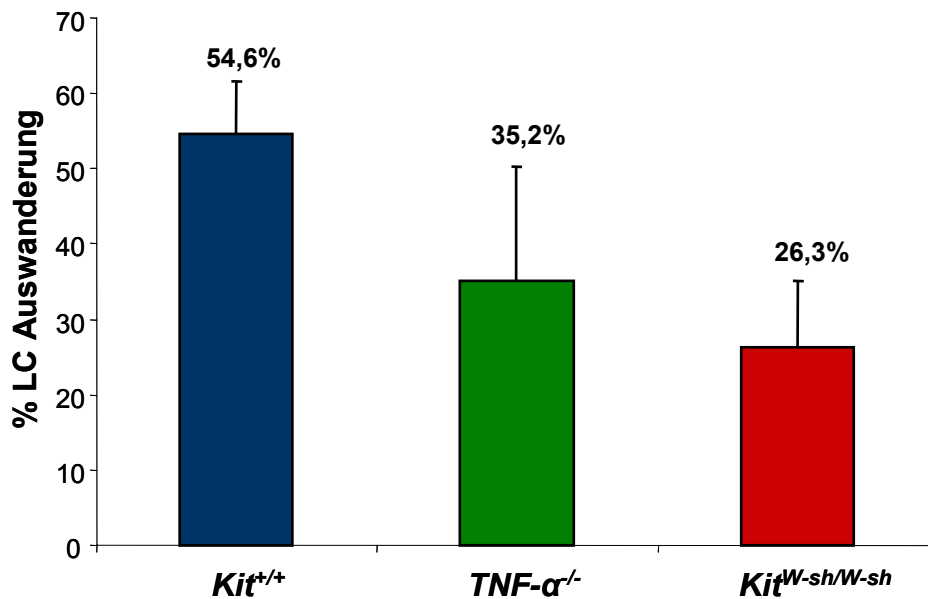


Abb.15: Die Auswanderung von Langerhanszellen ist zum Teil von $TNF-\alpha$ anhängig.

Nach Behandlung mit Aldara (einmal täglich, über 5 Tage) wurde von mastzellosen, $TNF-\alpha$ defizienten und Wildtyp-Tieren (n=2-3) die Epidermis präpariert und die Langerhanszellen mit einem Antikörper gegen MHC II gefärbt. Die Auswanderung wurde durch den Vergleich mit den unbehandelten Präparaten bestimmt.

Es läßt sich aber auch hier nicht klären, ob es sich dabei um das von Mastzellen produzierte $TNF-\alpha$ handelt, oder ob auch andere Zellen als Quelle in Frage kommen.

Zur Klärung dieses Problems wurde nun die Auswanderung der LC in den mit $TNF-\alpha^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Tieren untersucht.

Diese wurden 6 Wochen nach Rekonstitution einmal täglich über 4 Tage hinweg mit Aldara behandelt und anschließend die Auswanderung der Langerhanszellen bestimmt.

Die mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten, die Wildtyp und mastzellosen Tiere zeigten hier wieder den für sie typischen Verlauf. Bei den Wildtyp-Tieren wurde eine Auswanderung von über 40% erreicht. Die mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten erreichten sogar über 60% Auswanderung. Die Mastzell-defizienten Tiere zeigten eine um die Hälfte reduzierte Migration (nur 20%) der Langerhanszellen (Abb.16).

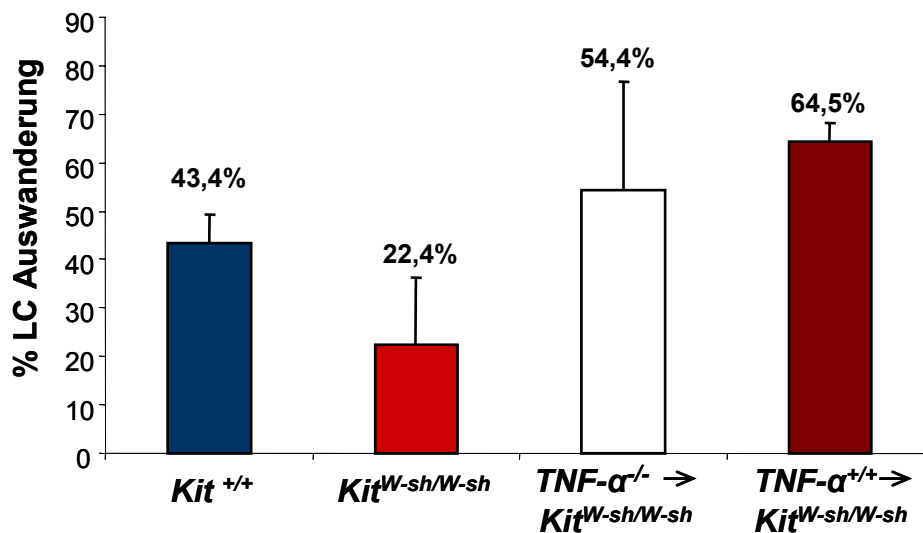


Abb.16: Mastzell-TNF- α hat nur einen geringen Effekt auf die Auswanderung von Langerhanszellen.

Mastzellose Mäuse wurden wie bereits beschrieben mit BMMC aus Wildtyp und $TNF-\alpha^{-/-}$ Knochenmark rekonstituiert. Nach 6 Wochen wurden diese wieder für 4 Tage mit Aldara behandelt und anschließend die Auswanderung der Langerhanszellen ermittelt. Als Vergleich dienten wiederum mastzellose und Wildtyp Tiere (n=4).

Die mit $TNF-\alpha^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Tiere zeigten hier praktisch keinen Unterschied zu den Wildtyp- oder mit Wildtyp- BMMC rekonstituierten Tieren.

Diese Versuche zeigen, dass $TNF-\alpha$ zwar einen minimalen Einfluß auf die Auswanderung der Langerhanszellen hat, aber dafür nicht unbedingt notwendig ist.

4.2 Die Rolle von IL-1 α/β

Wie bereits beschrieben, hat IL-1 β einen wichtigen Einfluß auf die Auswanderung von Langerhanszellen und die Anlockung von neutrophilen Granulozyten.

Ähnlich wie in den Rekonstitutionsversuchen mit $TNF-\alpha^{-/-}$ -BMMC sollte nun auch die Rolle von IL-1 für die Entzündungsreaktion und die Auswanderung der Langerhanszellen untersucht werden.

Um nun den Einfluß von IL-1 aufzuzeigen, wurden mastzellose Mäuse mit IL-1 α/β doppeldefizienten BMMC rekonstituiert und nach 6 Wochen wiederum für 4 Tage mit Aldara behandelt und die Ohrschwellung vermessen.

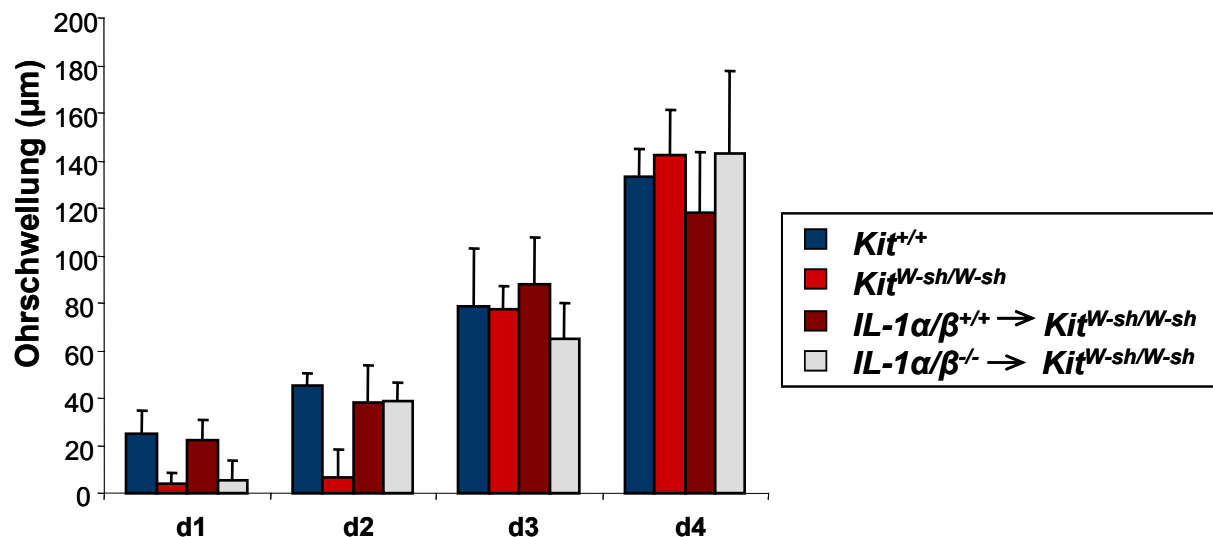


Abb.17: Mastzell-IL-1 wird für die schnelle Induktion einer Entzündung benötigt.

Wie oben beschrieben wurden mastzellose Mäuse lokal mit Wildtyp oder IL-1 α/β defizienten BMMC rekonstituiert und nach 6 Wochen mit Aldara behandelt. Über den gesamten Behandlungszeitraum hinweg wurde die Ohrschwellung beobachtet. Als Kontrolle dienten wiederum Wildtyp und mastzellose Mäuse (n=5).

Auch hier (Abb.17) ließ sich wieder eine Verzögerung der Entzündungsreaktion im Vergleich mit dem Wildtyp oder mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten Tieren feststellen. Die Entzündung begann in beiden Fällen (Wildtyp und mit Wildtyp-BMMC rekonstituiert) bereits nach der ersten Behandlung mit Aldara.

Diese Verzögerung fiel jedoch schwächer als in den mit *TNF- α* ^{-/-}-BMMC rekonstituierten Tieren aus. Die Entzündung in den mit *IL-1 α/β* ^{-/-}-BMMC rekonstituierten Mäusen hatte bereits an Tag 2 das Niveau des Wildtyps erreicht. Die mastzellosen Mäuse erreichten das Niveau der Wildtyp-Tiere erneut erst an Tag 3.

Am Ende des Versuchs wurden von diesen Tieren ebenfalls die Epidermis präpariert und die Langerhanszellen angefärbt und anschließend ausgezählt (Abb.18).

In den Wildtyp und den mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten Tieren wurde wie schon in den vorherigen Versuchen eine Auswanderung der Langerhanszellen um die 50% erreicht. In den Mastzell-defizienten Tieren zeigte sich wiederum eine stark reduzierte Auswanderung. Hier wurde nur ein Wert von ca. 25% erreicht. Aber auch in den mit *IL-1 α/β* ^{-/-}-BMMC rekonstituierten Tieren war die Auswanderung stark vermindert. Hier konnte nur eine Auswanderung der Langerhanszellen von 33% ermittelt werden. Mit diesem Wert lag sie jedoch immer noch leicht über der Auswanderung der Langerhanszellen in den mastzellosen Mäusen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das IL-1 der Mastzelle einen entscheidenden Einfluß auf die Auswanderung der LC besitzt.

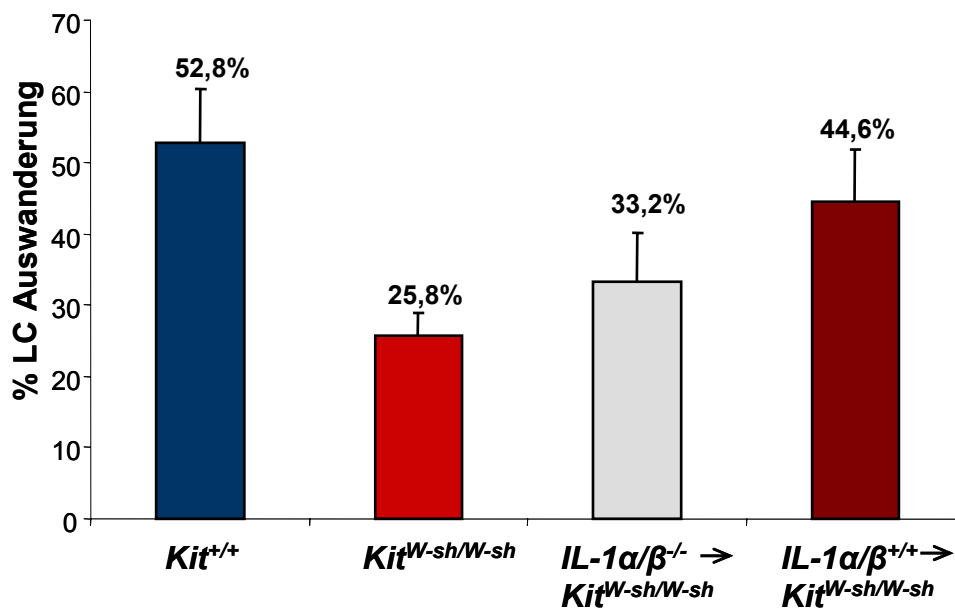


Abb.18: Von Mastzellen produziertes IL-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Emigration von Langerhanszellen.

Nach Beendigung des oben beschriebenen Versuchs wurde die Epidermis der Tiere präpariert und nach Färbung mit einem anti- MHC II Antikörper und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper die Auswanderung der Langerhanszellen bestimmt.

Zusammengenommen zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass von Mastzellen produziertes TNF- α und IL-1 für die schnelle Entstehung einer Entzündungsreaktion notwendig sind, das Ausmaß der Langerhanszell-Emigration aber hauptsächlich durch das IL-1 der Mastzelle vermittelt wird.

Arbeiten über die Regulation der Produktion von Mastzell-Cytokinen sind seit einigen Jahren ein Schwerpunkt am Institut für Immunologie und es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren aus der NFAT⁴-Familie wichtig sind für Produktion einer ganzen Reihe von Mastzell-Cytokinen (Klein et al., im Druck). Somit ergab sich die Möglichkeit, die Funktion der NFAT-Faktoren in Mastzellen unter Zuhilfenahme des Imiquimod induzierten Entzündungsmodells *in vivo* zu untersuchen.

⁴ Nuclear factor of activated T cells

5 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Funktion von Mastzellen *in vivo*

Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie wurden ursprünglich in T-Zellen entdeckt, in welchen sie entscheidend an der Regulation der Expression von Cytokinen und einer Vielzahl von Rezeptoren beteiligt sind. Arbeiten an unserem Institut konnten bislang zeigen, daß NFAT-Faktoren, insbesondere NFATc2, auch von zentraler Bedeutung für die Expression der Mastzellcytokine IL-9, IL-13 und TNF- α sind.

In Abb.16 ist die Produktion von TNF- α und IL-6 nach Stimulation mit IgE- anti-IgE und Ionomycin dargestellt. In den NFATc2-defizienten BMMC war die Produktion im Vergleich zu den Wildtyp-BMMC von TNF- α nach Stimulation stark vermindert, die des IL-6 blieb jedoch unverändert (Abb.19).

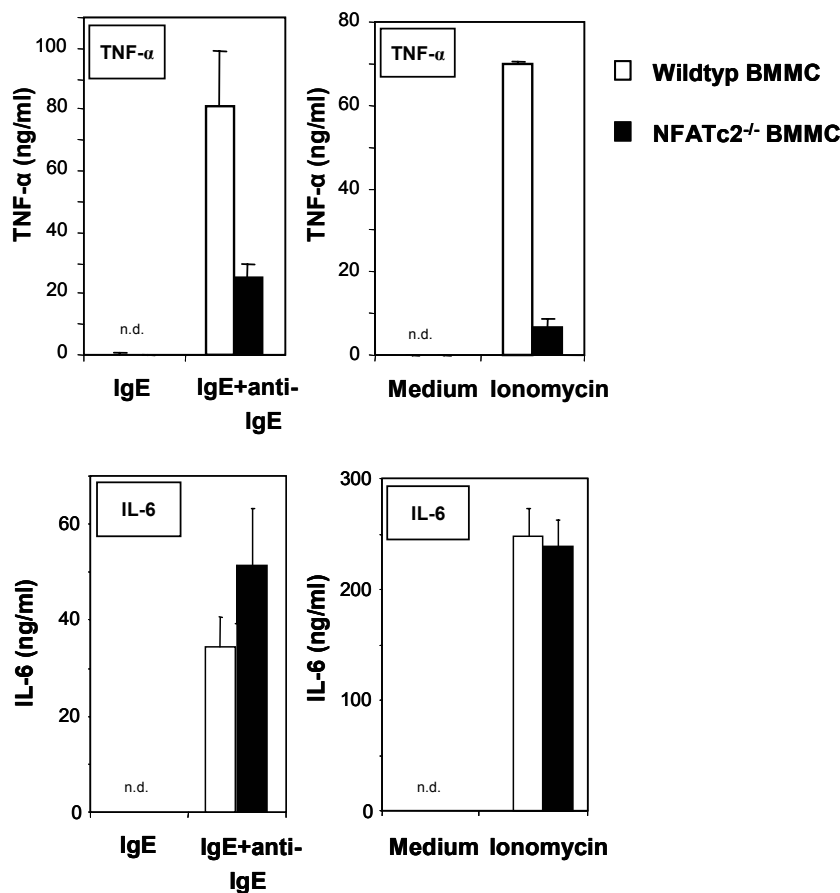


Abb.19: NFATc2 defiziente Mastzellen zeigen nach Stimulation eine stark verminderte TNF- α Produktion.

BMMC aus Wildtyp und NFATc2^{-/-} wurden für 4 Stunden mit IgE+ anti-IgE oder Ionomycin stimuliert. Anschließend wurde in den Kulturüberständen die Produktion von biologisch aktivem TNF- α mit Hilfe von WEHI-164 Zellen und die Produktion von IL-6 mittels ELISA bestimmt.

Da die Produktion wichtiger Cytokine wie TNF- α in Mastzellen aus NFATc2-defizienten Tieren stark reduziert ist, schienen diese ein interessantes Modell zur *in vivo* Untersuchung von mastzell-abhängigen Effekten zu sein.

5.1 NFATc2-defiziente Tiere zeigen eine reduzierte Cytokin- und Chemokinexpression nach Aldara- Behandlung

In ersten Experimenten wurde zunächst die Cytokinexpression nach Aldara-Behandlung auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurden die Tiere (Wildtyp und *NFATc2*^{-/-}) für 2 Stunden mit Aldara behandelt und anschließend die RNA aus den Geweben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Untersucht wurde die Expression von TNF- α und IL-1 β (Abb.20).

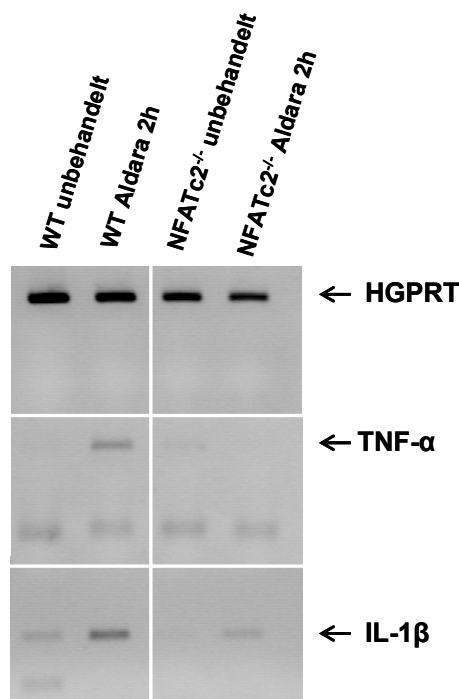


Abb.20: NFATc2 defiziente Mäuse zeigen eine stark reduzierte Cytokinproduktion nach Aldara Behandlung.

Wildtyp und NFATc2-defiziente Mäuse wurden für zwei Stunden entweder mit Aldara oder Salbengrundlage behandelt. Anschließend wurde aus den Geweben die RNA isoliert und die Expression von IL-1 und TNF- α untersucht.

In den Wildtyp-Tieren konnte nach 2 Stunden Aldara-Behandlung bereits eine Induktion sowohl der TNF- α als auch der IL-1 β mRNA nachgewiesen werden. In den NFATc2-defizienten Tieren blieb die Expression von TNF- α jedoch völlig aus. Für IL-1 β konnte zwar eine Expression der mRNA nachgewiesen werden, diese fiel aber im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren wesentlich schwächer aus.

In einem weiteren Versuch sollte nun auch die Expression der Chemokine KC und MCP-1 untersucht werden. Diese nehmen über die Anlockung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen ebenfalls Einfluß auf Entzündungsreaktionen.

Dazu wurden die mRNA beider Chemokine nach 2 Stunden Aldara-Behandlung in Wildtyp- und NFATc2-defizienten Tieren untersucht. Zur Kontrolle wurden Tiere auch nur mit Salbengrundlage ohne Imiquimod behandelt (Abb.21).

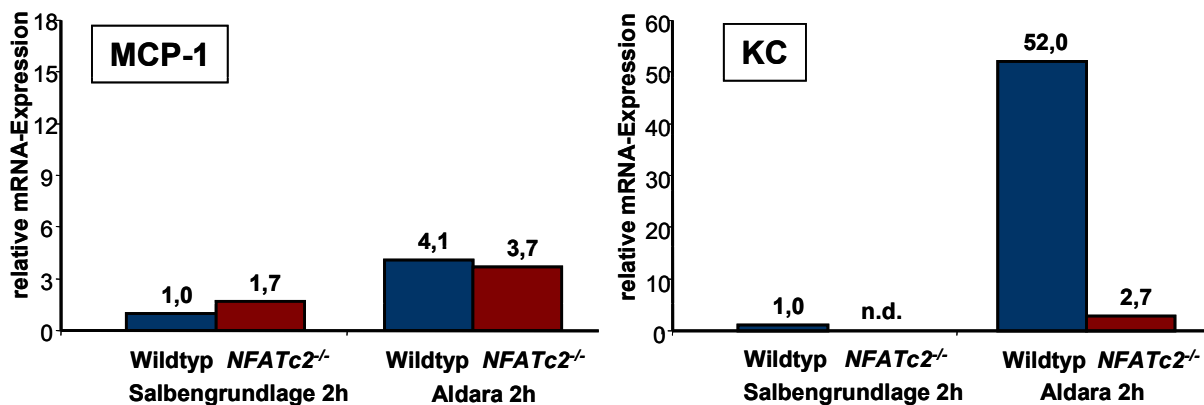


Abb.21: NFATc2-defiziente Tiere zeigen nach Aldara- Behandlung eine reduzierte KC mRNA-Expression.

Wildtyp und NFATc2-defiziente Mäuse wurden für zwei Stunden entweder mit Aldara oder Salbengrundlage behandelt. Anschließend wurde aus den Geweben die RNA isoliert und die Expression der Chemokine MCP-1 und KC mittels qRT-PCR untersucht.

Nach Aldara-Behandlung wurde sowohl in den Wildtyp- als auch in den NFATc2-defizienten Tieren die Expression von MCP-1 induziert. Diese war zwar relativ schwach, zeigte aber zwischen Wildtyp und NFATc2^{-/-} keinen großen Unterschied. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der mRNA für KC im Wildtyp um das 50fache nach Aldara- Behandlung erhöht. In den NFATc2-defizienten Tieren konnte die Expression nur leicht um das 2,7fache gesteigert werden.

5.2 Die Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung ist in NFATc2-defizienten Tieren stark verzögert

Die Unterschiede in der Cytokin- und Chemokin-Expression bei Wildtyp- und NFATc2^{-/-}-Tieren ließen nun vermuten, dass auch bezüglich der Entzündungsreaktion Unterschiede auftreten könnten, da vor allem die Cytokine TNF- α und IL-1 β , wie in den vorherigen Versuchen gezeigt, für die frühe Entzündungsreaktion und die Auswanderung von Langerhanszellen ausgesprochen wichtig sind.

Um zunächst die grundsätzliche Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 zu untersuchen, wurden im Vergleich Wildtyp- und *NFATc2*^{-/-}-Tiere über einen Zeitraum von 6 Tagen mit Aldara behandelt und die Ohrschwellung als ein Maß der Entzündung ermittelt (Abb.22).

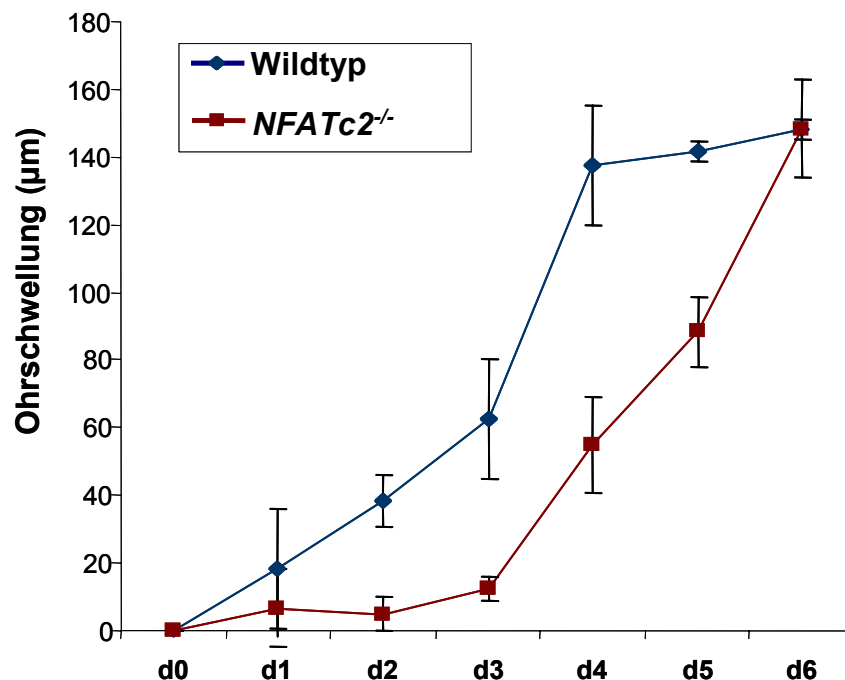


Abb.22: *NFATc2*^{-/-}-Tiere weisen eine stark verzögerte Entzündungsreaktion nach Aldara-Behandlung auf.

Wildtyp und *NFATc2*-defiziente Mäuse (n=3) wurden über 6 Tage einmal täglich mit Aldara behandelt und dabei die Ohrschwellung beobachtet.

In den Wildtyp-Tieren war bereits wieder nach der ersten Behandlung mit Aldara ein Anschwellen der Ohren zu beobachten. Diese Schwellung stieg bis zum vierten Tag an und blieb anschließend trotz Weiterbehandlung fast unverändert. In den *NFATc2*-defizienten Tieren hingegen begann die Schwellung erst an Tag 4 und erreichte schließlich an Tag 6 das gleiche Ausmaß wie bei Wildtyp-Tieren. Vergleicht man diesen Verlauf mit den mastzellosen Tieren, so kann man feststellen, dass die Entzündungsreaktion in den *NFATc2*^{-/-}-Tieren noch stärker verzögert ist (siehe Abb.4).

In den folgenden Experimenten sollte nun die Frage geklärt werden, ob allein der Defekt in den Mastzellen für diese starke Verzögerung der Entzündungsreaktion verantwortlich ist. Dazu wurden mastzellose Mäuse mit BMMC aus *NFATc2*^{-/-} und Wildtyp-Knochenmark rekonstituiert und anschließend über mehrere Tage täglich mit Aldara behandelt (Abb. 23).

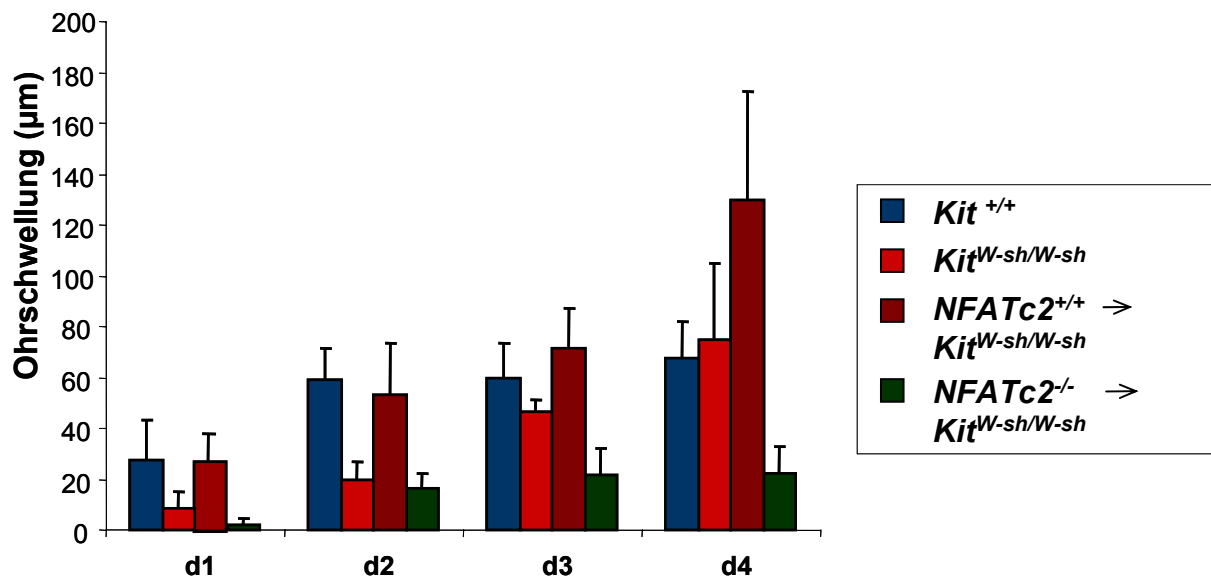


Abb.23: NFATc2 der Mastzelle spielt eine wichtige Rolle bei der Aldara- vermittelten Entzündung.

Mastzell-defiziente Mäuse wurden entweder mit Wildtyp oder *NFATc2*^{-/-}-BMMC rekonstituiert. Die Tiere wurden 4 Tage mit Aldara behandelt und während dessen die Ohrschwellung beobachtet. Als Vergleich dienten wiederum Wildtyp- und Mastzell-defiziente Mäuse (n=3).

Bei diesem Versuch verliefen die Ohrschwellungen bei Wildtyp-, mastzellosen und mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten Tieren wieder wie zu erwarten war. Die mit *NFATc2*-defizienten BMMC rekonstituierten Tiere hingegen zeigten auch nach 4 Tagen Behandlung mit Aldara noch keinerlei Schwellung.

Dies zeigt, dass die sehr starke Verzögerung der Entzündungsreaktion in *NFATc2*-defizienten Mäusen tatsächlich auf den Defekt von *NFATc2* in den Mastzellen zurückzuführen ist.

Da aber nicht nur die Ohrschwellung unter dem Einfluß der Mastzellen steht, sondern auch die Auswanderung von Langerhanszellen von Mastzellen befördert wird, wurden nach der Bestimmung der Ohrschwellung in den beiden oben beschriebenen Experimenten die Epidermis der jeweiligen Tiere präpariert und die Auswanderung der Langerhanszellen ermittelt.

In den *NFATc2*-defizienten Tieren wurde zunächst die Auswanderung an zwei Zeitpunkten bestimmt (Abb.24).

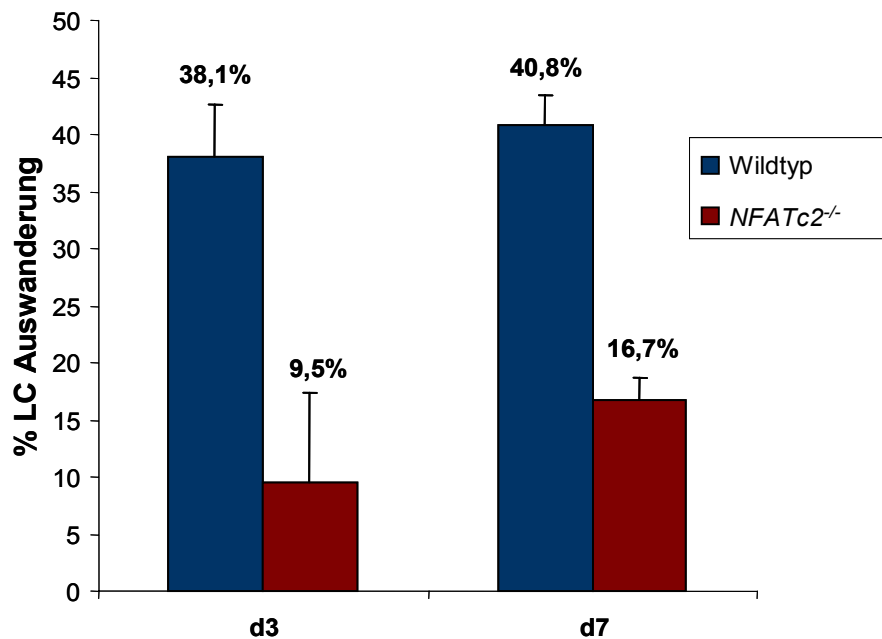


Abb.24: Die Auswanderung von Langerhanszellen ist in *NFATc2*^{-/-}-Tieren deutlich vermindert.

Wildtyp- und *NFATc2*-defiziente Tiere (n=3) wurden für 3 bzw. 7 Tage mit Aldara behandelt und anschließend die Epidermen präpariert. Diese wurden dann mit einem Antikörper gegen MHC-II und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper gefärbt und die Auswanderung der LC bestimmt.

In diesem Versuch hatten die Wildtyp- Tiere bereits nach drei Tagen die maximale Auswanderung von ca. 40% erreicht. Diese ließ sich auch durch weitere Behandlung bis d7 nicht mehr steigern. In den *NFATc2*^{-/-}-Tieren hingegen konnte man nach drei Tagen eine Auswanderung von etwa 10% ermitteln, die sich bis Tag 7 auf 17% steigern ließ. Die Auswanderung erreichte jedoch, wie in den mastzellosen Mäusen, nicht das Niveau der Wildtypiere.

Ebenso wurde die Auswanderung der Langerhanszellen nach Rekonstitution von mastzellosen Tieren mit *NFATc2*^{-/-}-BMMC untersucht (Abb.25).

Dabei entsprach die Auswanderung der Langerhanszellen in den mit *NFATc2*^{-/-}-BMMC rekonstituierten Tieren der der mastzellosen Mäuse. Beide zeigten eine Auswanderung von nur ca. 17%. In den Wildtyp- bzw. in den mit Wildtyp-BMMC rekonstituierten Tieren wurden Auswanderungsraten von 35% bzw. 27% erreicht.

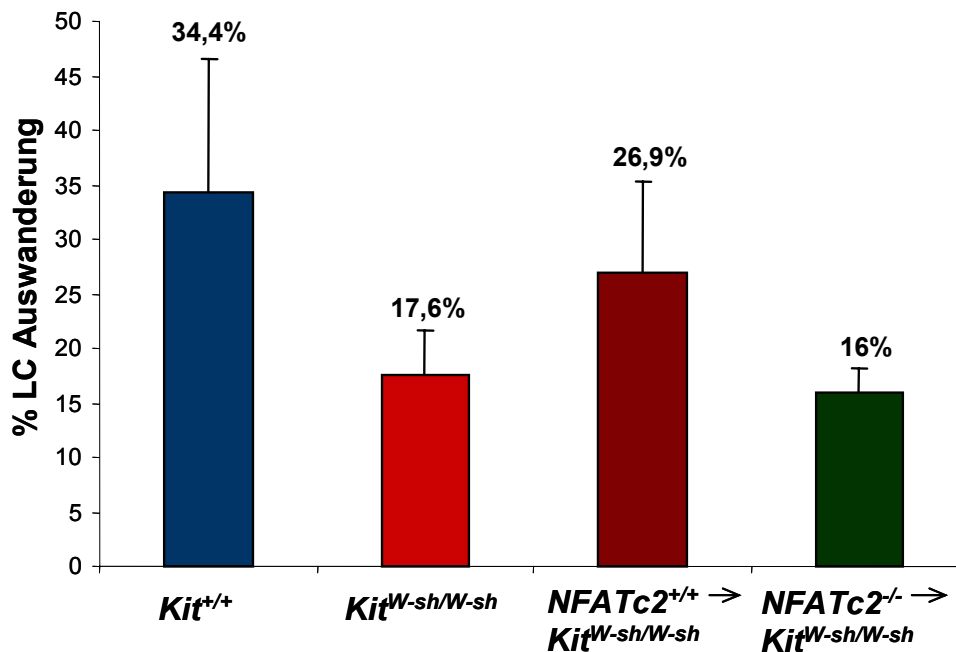


Abb.25: Mastzell NFATc2 ist wichtig für die Auswanderung von Langerhanszellen nach Aldara Behandlung.

Nach 4 Tagen Aldara-Behandlung wurden von den oben beschriebenen Tieren die Epidermen präpariert und die Auswanderung der Langerhanszellen durch Färbung mit einem anti- MHC-II Antikörper bestimmt (n=3).

Im Bezug auf die Emigration der LC scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Tiere mit NFATc2-defizienten Mastzellen rekonstituiert wurden oder gar keine Mastzellen besitzen. Die Ohrschwellung hingegen scheint durch den Defekt des Mastzell-NFATc2 sogar noch weiter verzögert zu werden.

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass die Mastzelle und von ihr produzierte Cytokine eine entscheidende Rolle bei der frühen Entstehung einer Entzündung und der Auswanderung von Langerhanszellen spielen. Langerhanszellen sind in der Lage, Antigen aufzunehmen und es im Lymphknoten T-Zellen zu präsentieren und so eine adaptive Immunantwort zu induzieren.

Da die Mastzelle offensichtlich in der Lage ist, die Funktion der Langerhanszellen -gemessen an deren Emigration- zu modulieren, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die Mastzelle dadurch Einfluß auf die Entstehung einer adaptiven T-Zellantwort nehmen kann.

6 Mastzellen sind für eine erfolgreiche transkutane Immunisierung mit Imiquimod als Adjuvans notwendig

Die Creme Aldara mit dem Wirkstoff Imiquimod besitzt eine antivirale und anti-Tumor Aktivität. Sie wird bereits erfolgreich zur Behandlung von Warzen und Melanomen eingesetzt (47, 48). Desweiteren wurde gezeigt, dass durch die Zugabe definierter Peptide in die Creme und anschließende epikutane Applikation eine vollständige antigenspezifische cytotoxische T-Zell-Antwort induziert werden kann (49). Die Mechanismen der transkutanen Immunisierung mit Imiquimod sind jedoch noch weitgehend unbekannt, vor allem wenn man bedenkt, dass die Langerhanszellen selbst kein TLR7 exprimieren und so als antigenpräsentierende Zellen der Haut selbst nicht auf Imiquimod reagieren können.

Die vorherigen Versuche, die zeigten, dass die Mastzelle sowohl bei der Induktion einer Entzündung als auch bei der Auswanderung der Langerhanszellen nach Aldara-Behandlung eine wichtige Rolle spielen, ließen die Annahme zu, dass Mastzellen auch bei der transkutanen Immunisierung eine wichtige Funktion innehaben.

Um sicher zu gehen, dass sich *Kit^{W-sh/W-sh}* generell in gleicher Weise wie *Kit^{+/+}* immunisieren lassen, wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt.

Dazu wurden Dendritische Zellen (DC) aus Knochenmark von *Kit^{+/+}* und *Kit^{W-sh/W-sh}* Mäusen generiert. Anschließend wurden sie nach einem etablierten Protokoll (49) mit poly I:C (TLR3 Ligand) aktiviert und mit dem definierten CTL-Epitop SIINFEKL aus Ovalbumin beladen. Nun wurden die Mäuse *i.v.* mit diesen Dendritischen Zellen immunisiert. Dabei wurden sowohl *Kit^{+/+}* als auch *Kit^{W-sh/W-sh}*-Tiere entweder mit DC aus *Kit^{+/+}* oder *Kit^{W-sh/W-sh}* immunisiert, so dass 4 unterschiedliche Kombinationen zustande kamen.

Nach 7 Tagen konnte nun die cytotoxische Aktivität der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden. Dazu wurden Milzzellen mit einer niedrigen Konzentration an CFSE markiert (CFSE^{low}) und anschließend mit Peptid beladen. Diese peptidbeladenen CFSE^{low} Milzzellen wurden anschließend in einem Verhältnis 1:1 mit unbeladenen CFSE^{high} markierten Milzzellen gemischt und den Mäusen als Zielzellen für die cytotoxischen T-Zellen *i.v.* gespritzt. Werden nun die peptidbeladenen CFSE^{low} Zellen lysiert, so verschiebt sich das Verhältnis von CFSE^{low} und CFSE^{high} Zellen im Blut zu Gunsten der CFSE^{high} Zellen, da diese nicht lysiert werden sollten. Anhand dieser Verschiebung lässt sich nun die antigenspezifische Zellyse bestimmen, die ein Maß für die cytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Zellen darstellt.

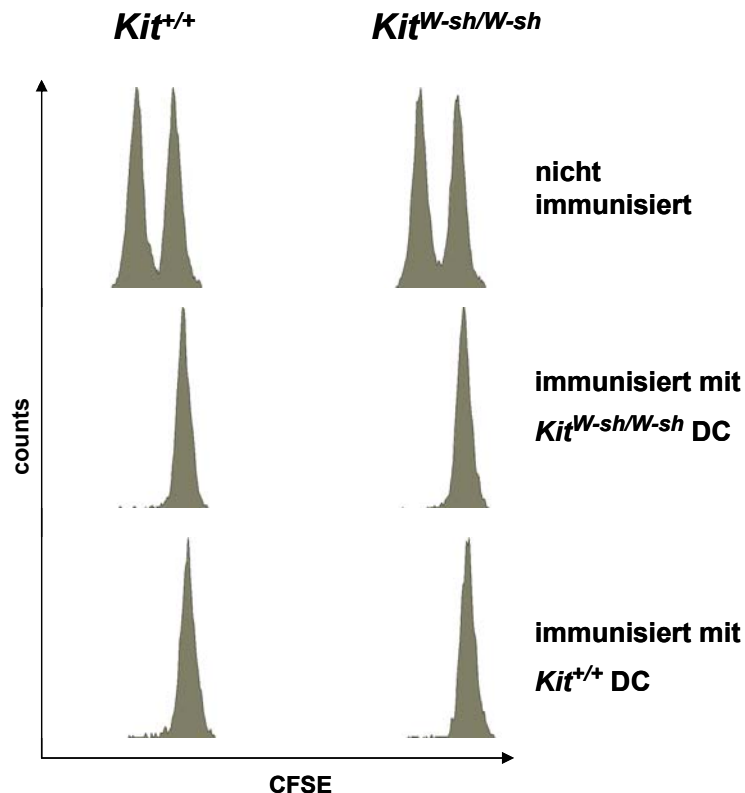


Abb.26: Wildtyp und Mastzell- defiziente Tiere lassen sich erfolgreich mit poly (I:C) aktivierten und Peptid beladenen Dendritischen Zellen immunisieren. *Kit*^{+/+} und *Kit*^{W-sh/W-sh} (n=3) Tiere wurden mit BMDC, welche zuvor mit poly I:C aktiviert und mit Peptid (SIINFEKL) beladen wurden, immunisiert. Dabei wurden BMDC aus beiden Genotypen verwendet. 6 Tage nach der Immunisierung wurden CFSE gefärbte Zielzellen *i.v.* injiziert. Dabei wurden nur die CFSE^{low} Zellen mit Peptid beladen und mit den unbeladenen CFSE^{high} in einem Verhältnis 1:1 gemischt. 20 Stunden nach Injektion der Zielzellen wurde im Blut die spezifische Lyse der mit Peptid beladenen Zielzellen bestimmt.

Die nicht immunisierten Mäuse zeigten nach 7 Tagen keinerlei Lyse der injizierten Zielzellen. Beide Population (CFSE^{low} und CFSE^{high}) sind noch deutlich zu erkennen (Abb. 26, obere Reihe). In den anderen Tieren (*Kit*^{+/+} und *Kit*^{W-sh/W-sh}) verschwand die peptidbeladene CFSE^{low} Population vollständig. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Tiere mit BMDC aus *Kit*^{+/+} oder *Kit*^{W-sh/W-sh} Knochenmark immunisiert wurden (Abb26, mittlere und untere Reihe). Es gab auch zwischen den *Kit*^{+/+} und *Kit*^{W-sh/W-sh} keinerlei Unterschied in Bezug auf die Qualität der Immunisierung. Dies zeigt, dass sich *Kit*^{W-sh/W-sh} Mäuse ganz normal mit BMDC systemisch immunisieren lassen und dass die Dendritischen Zellen aus diesen Tieren keinerlei Defekte bezüglich ihrer Immunisierungskapazität aufweisen.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß der Mastzelle auf die Entstehung einer cytotoxischen T-Zellantwort nach transkutaner Immunisierung untersucht.

6.1 Die Zahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nach transkutaner Immunisierung ist in Mastzell-defizienten Mäusen stark reduziert

Wildtyp- und Mastzell-defiziente Mäuse wurden durch die Applikation von Aldara, welcher zuvor das Peptid SIINFEKL zugegeben wurde, an zwei aufeinander folgenden Tagen immunisiert. An Tag 5 und 6 wurde den Tieren Blut abgenommen und die Zahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Dies geschah durch ein fluoreszenzmarkiertes Tetramer, welches aus MHC-I-Molekülen besteht, die mit dem entsprechenden Antigen beladen sind. Diese Tetramer binden an den T-Zellrezeptor und markieren so die antigenspezifischen T-Zellen, die sich nun durch FACS-Analyse nachweisen lassen.

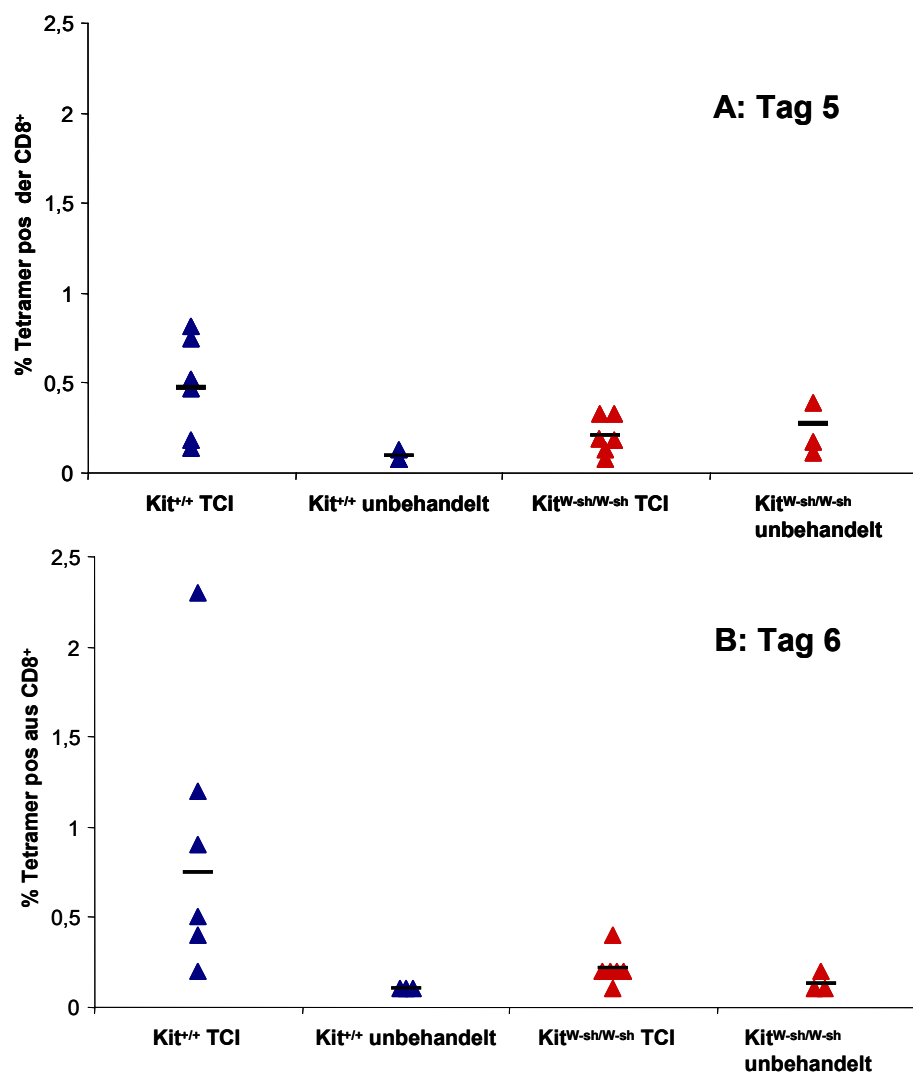


Abb.27: Mastzellose Mäuse zeigen eine stark reduzierte Anzahl an SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach transkutaner Immunisierung (TCI) mit Aldara als Adjuvans. Wildtyp und mastzellose Mäuse (n=5) wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Aldara (3mg Imiquimod/Applikation) unter Zugabe von SIINFEKL (100µg) immunisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere. An Tag 5 (A) und 6 (B) wurde den Tieren Blut entnommen und die peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe spezifischer markierter Tetramere nachgewiesen.

In den Wildtyp-Tieren ($Kit^{+/+}$) konnte nach transkutaner Immunisierung (TCI) eine Erhöhung der Anzahl an SIINFEKL-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen lag in einigen Tieren der Anteil schon bei ca. 0,9% aller $CD8^+$ T-Zellen (Abb.27A). Dieser Wert konnte sogar an Tag 6 noch auf bis zu 2,5% gesteigert werden (Abb.27B). In den mastzellosen Tieren ($Kit^{W-sh/W-sh}$) hingegen konnte keine Expansion $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb.27A/B). Hier lag die Färbung stets auf gleichem Niveau wie in den unbehandelten Tieren.

Da die mastzellosen Tiere bezüglich der Ohrschwellung mit einigen Tagen Verspätung das Niveau der Wildtyp-Tiere erreichten, sollte nun auch nach transkutaner Immunisierung untersucht werden, ob die $Kit^{W-sh/W-sh}$ Tiere nicht auch zu einem späteren Zeitpunkt die gleiche Anzahl an antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen erreichen können.

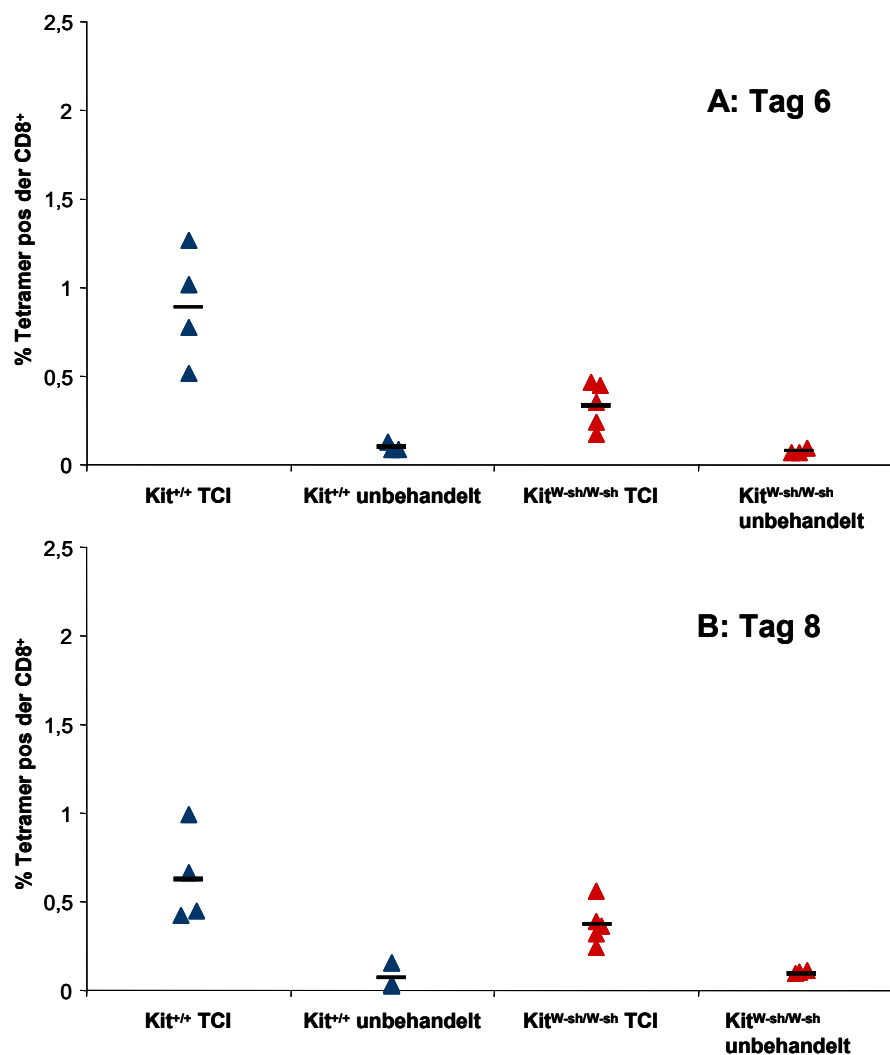


Abb.28: Die Expansion antigenspezifischer T-Zellen bleibt auch zu späteren Zeitpunkten nach transkutaner Immunisierung mastzelloser Mäuse beeinträchtigt. Mastzellose und Wildtyp Mäuse (n=5) wurden an zwei Tagen transkutan mit Aldara (100µg SIINFEKL) immunisiert und an Tag 6 (A) und 8 (B) die Zahl spezifischer $CD8^+$ T-Zellen analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere (n=3).

Dazu wurde den Tieren an Tag 6 und 8 Blut abgenommen und die spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Tetrameren gefärbt.

Wieder zeigte sich an Tag 6, dass in den Wildtyp-Tieren bis zu 1,3% der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für SIINFEKL waren (Abb.28A). In den mastzellosen Tieren hingegen konnten nur 0,4% der CD8⁺ T-Zellen auch als antigenspezifisch nachgewiesen werden (Abb.28A). Die unbehandelten Tiere zeigten wiederum keine spezifischen T-Zellen.

An Tag 8 nahm die Zahl der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen schon wieder leicht ab. Jetzt wurde nur noch ein Wert von ca. 0,7% erreicht. In den mastzellosen Tieren hingegen konnten wieder nur ca. 0,4% der CD8⁺ T-Zellen als SIINFEKL-spezifisch detektiert werden (Abb.28B).

Diese Versuche zeigen, dass, wie bei der Auswanderung der Langerhanszellen, die mastzellosen Tiere das Fehlen der Mastzellen langfristig nicht mittels anderer Mechanismen ausgleichen können.

6.2 Mastzellose Tiere entwickeln nur eine schwache cytotoxische T-Zellantwort nach transkutaner Immunisierung

Nach der Blutentnahme an Tag 6 wurde den Tieren, wie bereits für den Vorversuch beschrieben, eine Mischung von antigenbeladenen CFSE^{low} und unbeladenen CFSE^{high} Milzzellen *i.v.* injiziert. Nach 11 Stunden wurde im Blut und nach weiteren 11 Stunden in der Milz die spezifische Lyse der antigenbeladenen Milzzellen im FACS analysiert. Die antigenspezifische Lyse wurde anhand der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{(\text{Zellzahl unbeladene Zellen} - \text{Zellzahl beladene Zellen})}{\text{Zellzahl unbeladene Zellen}}$$

Bereits 11 Stunden nach Injektion der SIINFEKL-beladenen Milzzellen waren in den Wildtyp-Tieren (*Kit^{+/+}*) ca. 74% der Zielzellen lysiert worden. In den mastzellosen Mäusen (*Kit^{W-sh/W-sh}*) hingegen waren es nur 21% (Abb.29A). Nach weiteren 11 Stunden konnte in der Milz der Wildtyp-Tiere eine nahezu vollständige Lyse von 94% festgestellt werden. In den Mastzelldefizienten Mäusen hingegen konnte auch zu diesem Zeitpunkt nur eine relativ schwache Lyse von ca. 33% nachgewiesen werden (Abb.29B).

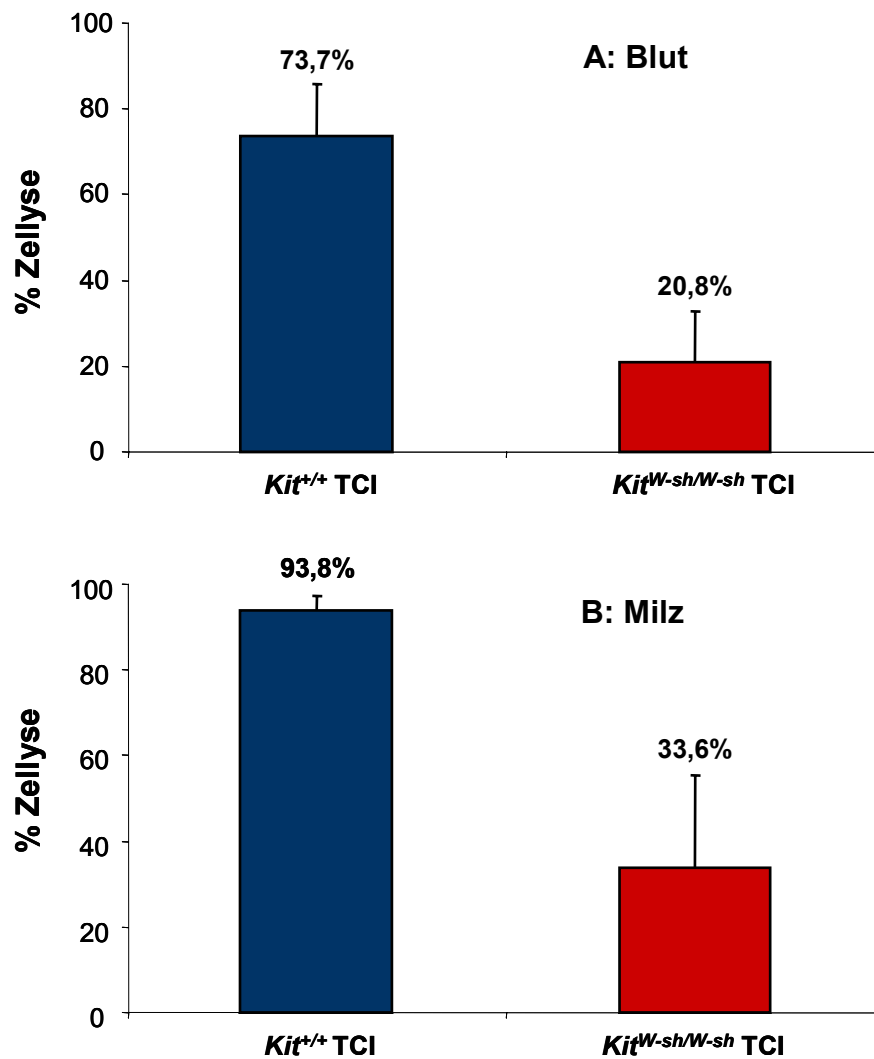


Abb.29: Mastzellen sind wichtig für die Entstehung einer vollständigen cytotoxischen T-Zellantwort nach transkutaner Immunisierung mit Imiquimod als Adjuvans. Wildtyp und mastzellose Tiere wurden wie oben beschrieben an zwei Tagen mit Aldara/SIINFEKL immunisiert. An Tag 6 wurden den Tieren CFSE^{low} Peptid beladene und CFSE^{high} unbeladene Milzzellen in einem Verhältnis von 1:1 *i.v.* injiziert. Nach 11 bzw. 22 Stunden wurde die spezifische Lyse der peptidbeladenen Zielzellen durch FACS-Analyse bestimmt.

Nach Ende des Versuchs wurden die Milzzellen der Tiere *in vitro* noch einmal mit SIINFEKL restimuliert. Nach Zugabe von Brefeldin A konnte nun durch intrazelluläre Färbung die Produktion von INF- γ durch CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden.

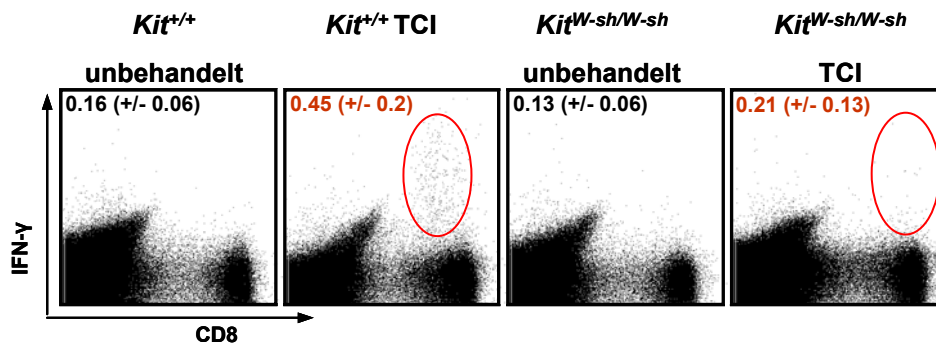


Abb.30: Die Zahl der INF-γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen ist in mastzellosen Mäusen stark reduziert.

Nach Beendigung des oben beschriebenen Versuchs wurden die Milzzellen der immunisierten und unbehandelten Tiere unter Zugabe von 100nM SIINFEKL und Brefeldin A (1μg/ml) *in vitro* restimuliert. Die IFN-γ Produktion wurde durch intrazelluläre FACS-Färbung analysiert.

Auch hier zeigte sich wieder, dass die Reaktion in den mastzellosen Tieren wesentlich schwächer als in den Wildtyp-Tieren ausfiel (Abb.30). In den *Kit*^{+/+} Tieren produzierten etwa 0,45% der CD8⁺ T-Zellen INF-γ während in den mastzellosen nur 0,21% der CD8⁺ T-Zellen INF-γ produzierten.

Die Ergebnisse der transkutanen Immunisierung zeigen, dass die Mastzellen in diesem Modell für eine massive Etablierung einer cytotoxischen T-Zellantwort unbedingt notwendig sind. Dies zeigt sich durch eine Reduktion antigenspezifischer T-Zellen in mastzellosen Mäusen, nachgewiesen durch Tetramärfärbung, eine stark beeinträchtigte cytotoxische Antwort *in vivo* und eine reduzierte Anzahl IFN-γ produzierender CD8⁺ T-Zellen nach Restimulation *ex vivo*.

Weiterhin lassen die gezeigten Daten vermuten, dass die Funktion von Mastzellen in diesem Modell nicht durch andere Zelltypen kompensiert werden kann.

D. Diskussion

Mastzellen lassen sich nicht nur, wie bereits in der Einleitung beschrieben, über den klassischen IgE-abhängigen Weg aktivieren, sondern auch über eine ganze Reihe alternativer Mechanismen.

Ein relativ gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Aktivierung von Mastzellen über CD48. Hier wurde zunächst grundsätzlich gezeigt, dass durch die Interaktion von Mastzellen mit Typ 1 Fimbrien von *E.coli* die Mastzellen zur Degranulation gebracht werden (31). Schließlich konnte belegt werden, dass dieser Prozeß über den Proteinbestandteil FimH der Bakteriengeißeln und CD48 auf der Mastzelloberfläche vermittelt wird. Dabei kommt es zum einen zur Freisetzung von gespeichertem TNF- α und zum anderen zur Phagocytose der Bakterien durch die Mastzelle (32, 50, 51).

Eine weitere Möglichkeit, Mastzellen über alternative Wege zu aktivieren, sind die Toll-like Rezeptoren. Dies konnte zunächst für LPS, dem Liganden für TLR4, gezeigt werden. So bilden peritoneale Mastzellen nach Stimulation mit LPS IL-6, ohne jedoch zu degranulieren (37). Ebenso kann LPS die Produktion von IL-9 und IL-13 nach IgE-abhängiger Aktivierung in Mastzellen erheblich steigern (38).

CpG-Motive bakterieller DNA, als Liganden für TLR9, sind ebenfalls in der Lage, die Cytokinproduktion in Mastzellen zu induzieren. Durch die Stimulation kommt es hier zur Expression von TNF- α und IL-6 (52). Interessanterweise können sich die Muster an Cytokinen und Chemokinen, die nach Aktivierung von Mastzellen über verschiedene TLR produziert werden, unterscheiden (36, 53).

Diese Beispiele zeigen, dass die Mastzelle erstaunlich flexibel auf die jeweiligen Stimuli reagieren kann. In manchen Fällen (wie z.B. bei der Stimulation über IgE-Kreuzvernetzung) kommt es dabei zu einer explosionsartigen Degranulation („anaphylaktische Degranulation“) der Mastzelle und zur Freisetzung von Mediatoren wie TNF- α und Histamin. Davon abzugrenzen ist die sog. „piecemeal Degranulation“, welche wesentlich langsamer verläuft und nicht zur völligen „Entleerung“ der Zellen führt. Diese Art der Degranulation läuft bevorzugt nach Kontakt von Mastzellen mit bakteriellen Komponenten ab (54, 55).

Mastzellen sind nahezu an jeder Stelle, die im Kontakt mit der Außenwelt steht (Haut, Mucosa etc), vertreten. Dies und die Möglichkeit auf eindringende Pathogene schnell und flexibel zu reagieren, ließ zunächst die Vermutung aufkommen, dass die Mastzelle nicht nur als Effektorzelle der erworbenen Immunität zu sehen ist, sondern auch eine wichtige Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems hat. Diese Annahme wurde inzwischen durch zahlreiche Arbeiten belegt, die nachwiesen, dass Mastzellen wichtige Auslöser von schnellen Entzündungsreaktionen sind (2, 56).

Die Rolle der Mastzelle bei der TLR7-vermittelten Entzündungsreaktion

Als Modell wurde in dieser Arbeit die Toll-like Rezeptor 7 vermittelte Aktivierung der Mastzellen durch den synthetischen Liganden Imiquimod (Wirkstoff in der Creme Aldara) gewählt. Die Creme Aldara wird in der Medizin zur Behandlung von Warzen verwendet und wurde im Mausmodell bereits erfolgreich bei der Behandlung von Melanomen eingesetzt. Die Wirkung von Aldara/Imiquimod zeichnet sich durch die Induktion von Entzündungsreaktionen aus. Auf Grund dieser entzündungsfördernden Wirkung wurde Imiquimod auch erfolgreich im Mausmodell als Adjuvans für transkutane Immunisierungen verwendet.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Imiquimod-vermittelte Entzündungsreaktion, gemessen als Ohrschwellung, in den mastzellosen Tieren stark verzögert auftrat und erst mit mehreren Tagen Verzögerung das Niveau der Wildtyp-Tiere erreichte. Dies zeigt, dass Mastzellen in diesem Modell für eine schnelle Entzündungsreaktion unerlässlich sind. Nach Rekonstitution mit Wildtyp-BMMC konnte die schnelle Reaktion der mastzellosen Mäuse auf Imiquimod wieder hergestellt werden, nicht jedoch nach Transfer von TLR7-defizienten BMMC. Dies zeigt indirekt, dass BMMC, die keinen TLR7 exprimieren, in der Haut zu dermalen Mastzellen differenzieren (6), welche den Toll-like Rezeptor 7 exprimieren und so auch auf Imiquimod reagieren können. Da sich die Ohrschwellung in den Mastzell-defizienten Mäusen nach einiger Zeit dem Wildtyp anglich, tragen sicherlich noch andere Zellen zu dieser späten Reaktion auf TLR7 Ligand bei. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass plasmacytoid-ähnliche Dendritische Zellen ebenfalls TLR7 tragen und sich nach Behandlung mit Imiquimod in der Haut anreichern (57). Die frühe und schnelle Entstehung der Entzündung lässt sich jedoch durch andere Zellen in der Haut offensichtlich nicht kompensieren. Die Mastzellen sind hier unbedingt notwendig. Ob die Rekrutierung der pDC-ähnlichen Zellen auch durch Mastzellen vermittelt wird, ist noch zu untersuchen. Ebenso ist ihre Funktion bei der Entzündungsreaktion noch zu überprüfen.

Mastzellen setzen nach Stimulation eine ganze Reihe präformierter und *de novo* synthetisierter Substanzen frei. So wurde ursprünglich am Beispiel der Arthus-Reaktion gezeigt, dass Mastzell-TNF- α innerhalb weniger Minuten freigesetzt wird und so zu einem Influx von neutrophilen Granulozyten führt (26). Echtenacher et al., und Malaviya et al., konnten ebenfalls zeigen, dass bei bakteriellen Infektionen die schnelle Freisetzung von TNF- α durch Mastzellen überlebenswichtig ist (22, 23).

Aufgrund dieser Kenntnisse wurde in dieser Arbeit die Expression wichtiger entzündungsfördernder („proinflammatorischer“) Cytokine nach Aldara-Behandlung in der Haut untersucht. Dabei war bereits 2 Stunden nach Applikation von Imiquimod eine erhöhte Expression von TNF- α und IL-1 β mRNA in den Wildtyp-Tieren zu finden. In den Mastzell-defizienten Tieren hingegen war keine Expression von TNF- α nachzuweisen. Die Expression von IL-1 β fiel sehr schwach aus und ließ sich auch durch die Aldara-Behandlung nicht weiter steigern.

Um direkt die Rolle der von Mastzellen exprimierten Cytokine zu untersuchen, wurden mastzellose Mäuse lokal mit Cytokin-defizienten Mastzellen rekonstituiert und anschließend mit Aldara eingecremt.

In den mit $TNF-\alpha^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Tieren war die Ohrschwellung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um 2 Tage verzögert, somit den mastzellosen Mäusen vergleichbar. Bei den mit $IL-1\alpha/\beta^{-/-}$ -BMMC rekonstituierten Tieren war die Entzündungsreaktion hingegen nur um einen Tag reduziert.

Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse der Ohrschwellung noch einmal zusammen.

	Ohrschwellung
$Kit^{+/+}$	schnell
$Kit^{W-sh/W-sh}$	verzögert (2 Tage)
rekonstituiert mit $Kit^{+/+}$ BMMC	schnell
rekonstituiert mit $TNF-\alpha^{-/-}$ BMMC	verzögert (2 Tage)
rekonstituiert mit $IL-1\alpha/\beta^{-/-}$ BMMC	leicht verzögert (1 Tag)

Tab.4: Die Bedeutung von Mastzellen und Mastzellcytokinen für die Entstehung der Ohrschwellungsreaktion nach Aldara-Behandlung. Verglichen wird dies an der Reaktion des Wildtyps ($Kit^{+/+}$)(siehe Abb. 14 und 17).

Durch diese Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Mastzellen vor allem durch die Bildung von $TNF-\alpha$, aber auch von $IL-1$, in der Imiquimod/TLR7 vermittelten Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen. Ohne diese von der Mastzelle freigesetzten Cytokine verläuft die Reaktion wesentlich langsamer. Mastzellen sind hier also für die schnelle Entstehung der Entzündung unerlässlich.

Der Einfluß von Mastzellen auf andere Zellen des Immunsystems

Durch die Freisetzung von Cytokinen und anderen Mediatoren kann die Mastzelle theoretisch eine Vielzahl anderer Zellen des Immunsystems beeinflussen. Ein bereits mehrfach erwähntes Beispiel ist die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch $TNF-\alpha$.

Desweiteren können humane Mastzellen den Klassenwechsel von IgG zur Produktion von IgE-Antikörpern in B-Zellen bewirken. Dabei sind vor allem die Interaktion von CD40- CD40-Ligand und die Cytokine $IL-4$ und $IL-13$ von Bedeutung (58-60).

Weiterhin können Mastzellen auch Einfluß auf die Differenzierung von T-Zellen nehmen. So führt die gleichzeitige Aktivierung von BMMC (IgE-Kreuzvernetzung) und naiven T-Zellen (anti CD3-Antikörper) zu einer Entwicklung der T-Zellen zu Th2-Zellen. Diese Differenzierung

hängt vor allem von dem Cytokin IL-4 ab. IL-4 defiziente Mastzellen konnten diese Entwicklung nicht induzieren (61).

Die Differenzierung von T-Zellen kann jedoch auch durch Histamin beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass Histamin über den H1-Rezeptor die Entstehung einer Th1-Antwort fördert. Die Deletion dieses Rezeptors führte zu einer verminderten IFN- γ Produktion und einer erhöhten Expression von IL-4 und IL-13 in T-Zellen (62). In humanen Dendritischen Zellen jedoch unterdrückt Histamin die Expression des Th1 induzierenden Cytokins IL-12 während der Reifung und fördert so indirekt die Entstehung von Th2-Zellen (63).

Aber nicht nur die Differenzierung, sondern auch die Aktivierung von T-Zellen kann durch Mastzellen befördert werden. Über die Freisetzung von TNF- α wird die Expression von OX40, einem costimulatorischen Molekül, auf T-Zellen verstärkt, wodurch diese nun direkt mit dem OX40-Liganden auf der Mastzelle interagieren und aktiviert werden (64). Das durch Mastzellen nach Aktivierung freigesetzte TNF- α kann auch zu einer Anhäufung von T- und auch B-Zellen im Lymphknoten führen (65). Aber auch andere von Mastzellen produzierte Cytokine und Chemokine können prinzipiell die Wanderung von T-Zellen beeinflussen (66).

Eine ganze Reihe von Mastzellmediatoren sind potentiell auch in der Lage, die Reifung und Wanderung Dendritischer Zellen (DC) zu beeinflussen. Hierzu gehören GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , LTC₄ sowie Histamin, welche alle nach Kontakt von Mastzellen mit bakteriellen Komponenten freigesetzt werden können (53, 67, 68). Diese Eigenschaft ließ den Verdacht aufkommen, dass die Mastzelle somit auch prinzipiell an der Entstehung adaptiver Immunantworten beteiligt sein könnte.

Um dieser Vermutung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachzugehen, wurde zunächst untersucht, ob die Auswanderung der Langerhanszellen aus der Epidermis nach Applikation von Imiquimod auch von Mastzellen abhängt. Dieses Modell erschien nicht zuletzt deshalb interessant, weil Langerhanszellen selbst nicht auf TLR7-Liganden reagieren können, somit offensichtlich durch andere Zellen aktiviert werden müssen.

Tatsächlich wanderten in den Mastzell-defizienten Tieren auch nach längerer Behandlung mit Imiquimod wesentlich weniger Langerhanszellen als im Wildtyp aus. Dieses Defizit konnte jedoch nicht, wie bei der Ohrschwellung, durch längere Behandlung ausgeglichen werden. Nach Rekonstitution mit Wildtyp-BMMC ließ sich die Wanderung der LC aus der Epidermis in den mastzellosen Mäusen wieder dem Wildtyp-Niveau angleichen. Durch die Rekonstitution mit Cytokin-defizienten BMMC zeigte sich, dass die Imiquimod induzierte Auswanderung stark von Mastzell-IL-1 abhängt, TNF- α hingegen keine Rolle zu spielen scheint.

	LC Auswanderung
<i>Kit</i> ^{+/+}	41,4- 61%
<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh}	17,6- 26,3%
rekonstituiert mit <i>Kit</i> ^{+/+} BMMC	44,6- 64,5%
rekonstituiert mit <i>TNF-α</i> ^{-/-} BMMC	54,4%
rekonstituiert mit <i>IL-1α/β</i> ^{-/-} BMMC ⁻	33,2%

Tab.5: Das IL-1 der Mastzelle hat eine wichtige Funktion für die Emigration der Langerhanszellen.

Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit erschienen mehrere Publikationen, die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Mastzellen und Langerhanszellen aufzeigen.

In einem murinen Modell der Kontaktallergie konnte zunächst nachgewiesen werden, dass Mastzellen wichtig für die Auswanderung von Langerhanszellen nach Applikation des Allergens sind, ohne jedoch genaueren Einblick in die zugrunde liegenden Mechanismen zu geben (19). Weiterhin wurde bei der passiven cutanen Anaphylaxie⁵ die starke Abhängigkeit der Langerhanszell-Wanderung von Mastzellen berichtet, aktiviert durch IgE-Kreuzvernetzung (42).

Durch Verwendung entsprechender Inhibitoren konnte in der letztgenannten Arbeit eine wichtige Rolle für Histamin nachgewiesen werden. Da die Injektion von reinem Histamin in die Haut jedoch keinen Einfluß auf die Wanderung von Langerhanszellen hatte, kam auch hier der Verdacht auf, dass weitere Mastzellmediatoren an diesem Prozeß beteiligt sein müssen. Zwei soeben erschienene Publikationen geben erste Einblicke in den Mechanismus der Mastzell-Langerhanszell-Interaktion; demnach ist von Mastzellen produziertes TNF-α wichtig für die Wanderung von Langerhanszellen nach Applikation von Kontaktallergen (43) und nach der Aktivierung von Mastzellen durch IgE-Kreuzvernetzung (42).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen jedoch, dass die Imiquimod/TLR7-vermittelte Auswanderung von Langerhanszellen in TNF-α-defizienten Tieren nur marginal beeinträchtigt ist, und ein Zusammenhang zwischen Mastzell-TNF-α und Emigration ließ sich statistisch nicht nachweisen. Jedoch besteht in diesem Modell eine starke Abhängigkeit der Emigration von Mastzell-IL-1. Dieses IL-1 wiederum kann in Keratinozyten die Produktion von TNF-α induzieren, wodurch die Migration der Langerhanszellen weiter vorangetrieben wird (69). Dadurch stellt sich das von Mastzellen produzierte IL-1 in diesem Modell als

⁵ Mastzellen werden zunächst durch die systemische Gabe mit IgE-Antikörpern beladen. Durch die anschließende lokale Injektion des entsprechenden Antigens oder anti IgE-Antikörpern kommt es dann zur Degranulation der Mastzellen und der Freisetzung von verschiedenen Mediatoren wie Histamin etc.. Die Bildung der IgE-Antikörper wird in diesem Modell nicht durch Antigene/Allergene induziert, sondern diese werden passiv verabreicht.

„Schlüsselcytokin“ für die Auswanderung der LC dar. Sowohl IL-1 als auch TNF- α bewirken eine starke Reduktion der Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin auf Langerhanszellen, wodurch, als Voraussetzung für die Auswanderung, der Kontakt zu den umgebenden Keratinocyten gelockert wird. Beide Cytokine sind ferner auch in der Lage, die Reifung von Langerhanszellen zu induzieren, charakterisiert durch verstärkte Produktion von MHC-II und kostimulatorischen Molekülen (69, 70).

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass eine gewisse Flexibilität in Bezug auf die Mechanismen der durch Mastzellen geförderten Emigration von Langerhanszellen zu beobachten ist, welche höchstwahrscheinlich von der Art der Mastzell-Aktivierung abhängig ist.

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Funktion der Mastzelle *in vivo*

Die Expression der Mastzellcytokine wird zum Teil durch die Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie reguliert. So wurde bereits beschrieben, dass in NFATc2-defizienten Mastzellen die Produktion von TNF- α nach Stimulation *in vitro* stark vermindert ausfällt (Klein et al., im Druck). Da sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt hatte, dass TNF- α und IL-1 β von Mastzellen für die schnelle Entzündungsreaktion nötig sind, wurde die Cytokinexpression in NFATc2-defizienten Mäusen nach Aldara-Behandlung untersucht. In den Wildtyp-Tieren war, wie erwartet, nach 2 Stunden eine erhöhte mRNA Expression beider Cytokine zu finden. In den *NFATc2*^{-/-}-Mäusen jedoch war die TNF- α mRNA nicht zu detektieren und die IL-1 β mRNA Expression fiel stark reduziert aus. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde nun die Ohrschwellungsreaktion in diesen Tieren analysiert. Diese war, im Vergleich zu den mastzellosen Tieren, noch stärker reduziert. Nach Rekonstitution mastzelloser Tiere mit *NFATc2*^{-/-}-BMMC blieb das Ausmaß der Entzündung immer noch hinter dem der mastzellosen Tiere zurück.

	Ohrschwellung
<i>Kit</i> ^{+/+}	schnell, vollständig
<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh}	verzögert, vollständig
rekonstituiert mit <i>Kit</i> ^{+/+} BMMC	schnell, vollständig
rekonstituiert mit <i>NFATc2</i> ^{-/-} BMMC	stark verzögert, vollständig
<i>NFATc2</i> ^{-/-}	stark verzögert

Tab.6: Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 bei der Aldara vermittelten Entzündungsreaktion (siehe Abb.22 und 23).

Da sich bereits bei der Cytokinproduktion in Mastzellen und der Ohrschwellungsreaktion eine wichtige Funktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 herausgestellt hatte, wurde auch hier nach Aldara-Behandlung die Auswanderungsrate der Langerhanszellen bestimmt.

Diese war in den mit NFATc2-defizienten BMMC rekonstituierten Tieren stark vermindert. Durchschnittlich lag hier die Auswanderungsrate sogar noch unter der der mastzellosen Mäuse.

	LC Auswanderung
<i>Kit</i> ^{+/+}	34,4- 40,8%
<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh}	17,6%- 26,3%
rekonstituiert mit <i>Kit</i> ^{+/+} BMMC	34,4%
rekonstituiert mit <i>NFATc2</i> ^{-/-} BMMC	16%
<i>NFATc2</i> ^{-/-}	16,7%

Tab.7: Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFATc2 bei der Auswanderung von Langerhanszellen.

Ob hier für die so stark verminderte Auswanderung eine verstärkte Expression von supprimierenden Cytokinen durch NFATc2-defiziente Mastzellen die Ursache ist, müßte noch weiter untersucht werden. Die Expression der potentiell suppressiven Cytokine IL-10 oder TGF- β konnte in den mastzellosen Mäuse, die mit *NFATc2*^{-/-}-BMMC rekonstituiert worden waren, nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass das verwendete Modell sich sehr gut zur Untersuchung der Funktion einzelner Gene in Mastzellen eignet und belegen erstmals eine wichtige Funktion des Transkriptionsfaktors NFATc2 für die Funktion von Mastzellen *in vivo*.

Mastzellen und die Entstehung adaptiver Immunität

Antigenbeladene Langerhanszellen sind potente antigenpräsentierende Zellen *in vitro* (71). Dies zusammen mit der Beobachtung, dass die Mastzelle eine stark emigrationsfördernde Wirkung auf Langerhanszellen ausübt, begründete die Annahme, dass Mastzellen direkten Einfluß auf die Entstehung einer adaptiven Immunreaktion nehmen können.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Mausmodell für transkutane Immunisierung gewählt (49).

Dazu wurden die Tiere (Wildtyp- und mastzellose Mäuse) unter Verwendung von Imiquimod als Adjuvans gegen das Peptid SIINFEKL immunisiert. Zunächst wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 5-8) die Zahl der peptidspezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut ermittelt. Hier zeigte sich, dass im Wildtyp bis zu 2% der CD8⁺ T-Zellen SIINFEKL-spezifisch waren. In den mastzellosen Tieren hingegen lies sich zu keiner Zeit eine signifikante Erhöhung der Zahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachweisen, sie blieb stets auf dem Niveau der unbehandelten Tiere. In diesem Versuch konnten die mastzellosen Mäuse ihr Defizit, wie schon bei der Auswanderung der Langerhanszellen, auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht aufholen. Das Fehlen der Mastzellen hatte auch eine erhebliche Beeinträchtigung der peptidspezifischen Zellyse zur Folge, eine Methode die, verglichen mit dem FACS-Nachweis peptidspezifischer Zellen, eine weit höhere Sensitivität aufweist. So wurden nach transkutaner Immunisierung in den Wildtyp-Tieren über 90% der peptidbeladenen Zielzellen lysiert, in den mastzellosen waren es hingegen etwa um die 35%. Auch die nach Restimulation *ex vivo* IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen waren in den Mastzell-defizienten Tieren um die Hälfte reduziert.

	SIINFEKL- spezifische CD8 ⁺ T-Zellen (%)	Spezifische Zellyse (%)	IFN- γ produzierende CD8 ⁺ T- Zellen (%)
<i>Kit</i> ^{+/+} unbehandelt	0,1	0	0,16
<i>Kit</i>^{+/+} TCI	0,75	93,8	0,45
<i>Kit</i> ^{W-sh/W-sh} unbehandelt	0,13	0	0,13
<i>Kit</i>^{W-sh/W-sh} TCI	0,22	33,6	0,21

Tab.8: Zusammenfassung der Ergebnisse der transkutanen Immunisierung mit Imiquimod als Adjuvans

Die Frage, ob diese Reduktion der cytotoxischen T-Zellantwort direkt mit der verminderten Auswanderung der Langerhanszellen in mastzellosen Mäusen zusammenhängt, läßt sich mit den bislang vorliegenden Daten jedoch noch nicht beantworten. Wie eingangs erwähnt, sind die antigenpräsentierenden Eigenschaften von Langerhanszellen *in vitro* gut untersucht und

allgemein akzeptiert, ihre Funktion *in vivo* wird jedoch vergleichsweise schlecht verstanden (72). Entsprechende Experimente werden vor allem durch das Vorhandensein dermalen dendritischer Zellen erschwert, welche sich phänotypisch kaum von Langerhanszellen unterscheiden lassen, was eine funktionelle Abgrenzung beider Zelltypen bislang unmöglich machte. Ein vielversprechender und neuer Ansatz stellt die Verwendung von Mäusen dar, die unter der Kontrolle des endogenen Langerin-Locus eine EGFP Expressionskassette bzw. ein Fusionsprodukt aus EGFP und dem Rezeptor des Diphtherietoxins (DTR) tragen. Dieser Rezeptor wird normalerweise in Mäusen nicht exprimiert. Deshalb ist es möglich mit Hilfe dieser Mäuse, die Wanderung von Langerhanszellen direkt zu verfolgen und diese durch Gabe des Toxins gezielt *in vivo* zu eliminieren. Komplementiert werden können solche Untersuchungen durch Einsatz entsprechender CD11c „knock in“ Mäuse, die eine EGFP-DTR Expressionskassette unter Kontrolle des CD11c Promoters besitzen. Es wurde bereits gezeigt, dass nach Gabe des Toxins stark CD11c exprimierende dendritische Zellen in solchen Tieren eliminiert werden können, Langerhanszellen, die CD11c entweder nicht oder nur schwach exprimieren, werden durch diese Behandlung nicht betroffen (73-75). Durch Kreuzung dieser Mausstämmen mit mastzellosen Mäusen sollte es in Zukunft möglich sein, den Einfluß von Mastzellen auf Langerhanszellen und dermale dendritische Zellen sowie die funktionelle Beziehung zwischen den letztgenannten Zelltypen gezielt zu untersuchen.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen wichtigen Zusammenhang zwischen Mastzellen und der Entstehung einer spezifischen adaptiven Immunantwort am Beispiel des Immunsystems der Haut. Ermöglicht wird dieses Zusammenspiel letztlich durch die IgE-unabhängige Aktivierung von Mastzellen über einen Rezeptor des angeborenen Immunsystems, den TLR7. Grundsätzlich hängt die Entstehung einer adaptiven Immunantwort von einer adäquaten Aktivierung angeborener Mechanismen ab, welche durch die Entstehung einer raschen Entzündungsreaktion die Entwicklung einer spezifischen Immunantwort einleiten. In diesem Rahmen können Mastzellen offensichtlich eine wichtige Funktion als Scharnier zwischen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems bilden.

E. Zusammenfassung

Für lange Zeit wurde die Mastzelle nur als Effektorzelle im Rahmen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises gesehen. Erst lange Zeit nach ihrer ersten Beschreibung konnte gezeigt werden, dass die Mastzelle einen wichtigen Beitrag zur Abwehr von Pathogenen leistet. Dies wird vor allem durch Wege der alternativen Mastzellaktivierung, z.B. über Toll-like Rezeptoren, ermöglicht.

In dieser Arbeit sollte daher zunächst die mögliche Funktion der Mastzelle bei der durch den synthetischen TLR7-Liganden Imiquimod induzierten Entzündungsreaktion der Haut und der Auswanderung von Langerhanszellen in einem Mausmodell untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass Mastzellen vor allem für die frühe und schnelle Induktion einer Entzündung unerlässlich sind. Dabei spielt bei der Entzündungsreaktion vor allem das von Mastzellen gebildete $TNF-\alpha$ eine entscheidende Rolle. Mastzellose Mäuse und mit $TNF-\alpha$ -defizienten Mastzellen rekonstituierte Tiere zeigten nach Imiquimod-Behandlung eine stark verzögerte Entzündungsreaktion. Da diese jedoch nach einigen Tagen das Niveau der Wildtyp-Tiere erreichte, spielen in diesem Modell sicherlich noch andere Zellen (z.B. plasmacytoid-ähnliche Dendritische Zellen) eine Rolle, die jedoch die späte Phase der Entzündung beeinflussen.

Ebenso wie die Entzündungsreaktion ist die Auswanderung der Langerhanszellen (LC) stark von der Anwesenheit der Mastzelle abhängig. In mastzellosen Mäusen war die Auswanderungsrate nach Imiquimod-Applikation auch noch nach mehrtägiger Behandlung um mehr als 50% reduziert. Für die Auswanderung der LC zeigte sich, dass vor allem das Mastzellcytokin IL-1 von entscheidender Bedeutung ist.

Da NFATc2-defiziente Mastzellen eine stark reduzierte Cytokinproduktion, insbesondere von $TNF-\alpha$ zeigten, wurde auch die Funktion dieses Transkriptionsfaktors bei der Imiquimod-vermittelten Entzündungsreaktion und Auswanderung von Langerhanszellen untersucht. Sowohl die Auswanderung der Langerhanszellen als auch die Entstehung der Entzündungsreaktion waren durch die NFATc2-Defizienz der Mastzellen noch stärker reduziert als in den mastzellosen Mäusen. Desweiteren ließ sich in NFATc2-defizienten Mäusen nach Aldara/Imiquimod-Applikation die Expression weder von $TNF-\alpha$ noch von IL-1 β nachweisen.

Imiquimod wurde in Form der Creme Aldara bereits erfolgreich zur transkutanen Immunisierung (TCI) in Mausversuchen verwendet. Da die Wirkung von Imiquimod bezüglich der Entzündungsreaktion und Auswanderung von Langerhanszellen zu einem großen Teil auf die Mastzelle zurückzuführen war, ließen diese Ergebnisse die Schlußfolgerung zu, dass Mastzellen auch einen entscheidenden Einfluß bei der TCI und somit auf die Entstehung einer adaptiven Immunantwort haben könnten. Durch den Vergleich von mastzellosen und Wildtyp-Mäusen nach transkutaner Immunisierung gegen das Ovalbuminpeptid SIINFEKL unter Verwendung von Imiquimod als Adjuvans konnte diese Annahme bestätigt werden. Die

Immunisierungserfolge waren in den mastzellosen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren stark vermindert. So konnten nach Immunisierung in den Mastzell-defizienten Tieren deutlich weniger SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden und auch die cytotoxische T- Zellantwort gegen peptidbeladene Zielzellen *in vivo* war in den mastzellosen Mäusen um 2/3 reduziert.

Da Mastzellen in dem verwendeten Modell einen entscheidenden Einfluß auf die Entstehung einer adaptiven Immunantwort haben, können sie somit als ein weiteres wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität gesehen werden.

F. Literatur

1. Chen, C. C., M. A. Grimbaldston, M. Tsai, I. L. Weissman, and S. J. Galli. 2005. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:11408-11413.
2. Stassen, M., L. Hultner, and E. Schmitt. 2002. Classical and alternative pathways of mast cell activation. *Crit Rev.Immunol.* 22:115-140.
3. Gurish, M. F., H. Tao, J. P. Abonia, A. Arya, D. S. Friend, C. M. Parker, and K. F. Austen. 2001. Intestinal Mast Cell Progenitors Require CD49dbeta7 (alpha4beta7 Integrin) for Tissue-specific Homing. *J.Exp.Med.* 194:1243-1252.
4. Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, T. Semere, B. Foster, L. M. Scott, and D. D. Metcalfe. 1999. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 94:2333-2342.
5. Kitamura, Y., Y. Kanakura, J. Fujita, and T. Nakano. 1987. Differentiation and transdifferentiation of mast cells; a unique member of the hematopoietic cell family. *Int.J.Cell Cloning* 5:108-121.
6. Nakano, T., T. Sonoda, C. Hayashi, A. Yamatodani, Y. Kanayama, T. Yamamura, H. Asai, T. Yonezawa, Y. Kitamura, and S. J. Galli. 1985. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 162:1025-1043.
7. Lantz, C. S., J. Boesiger, C. H. Song, N. Mach, T. Kobayashi, R. C. Mulligan, Y. Nawa, G. Dranoff, and S. J. Galli. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90-93.
8. Hayashi, S., T. Kunisada, M. Ogawa, K. Yamaguchi, and S. Nishikawa. 1991. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res.* 19:1267-1271.
9. Reith, A. D., R. Rottapel, E. Giddens, C. Brady, L. Forrester, and A. Bernstein. 1990. W mutant mice with mild or severe developmental defects contain distinct point mutations in the kinase domain of the c-kit receptor. *Genes Dev.* 4:390-400.
10. Grimbaldston, M. A., C. C. Chen, A. M. Piliponsky, M. Tsai, S. Y. Tam, and S. J. Galli. 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.
11. Wolters, P. J., J. Mallen-St Clair, C. C. Lewis, S. A. Villalta, P. Baluk, D. J. Erle, and G. H. Caughey. 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.
12. Lyon, M. F. and P. H. Glenister. 1982. A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet.Res.* 39:315-322.

13. Berrozpe, G., I. Timokhina, S. Yukl, Y. Tajima, M. Ono, A. D. Zelenetz, and P. Besmer. 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.
14. Crivellato, E., C. Beltrami, F. Mallardi, and D. Ribatti. 2003. Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br.J.Haematol.* 123:19-21.
15. Kemp, S. F. and R. F. Lockey. 2002. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J.Allergy Clin.Immunol.* 110:341-348.
16. Ishizaka, K. and T. Ishizaka. 1968. Human reaginic antibodies and immunoglobulin E. *J.Allergy* 42:330-363.
17. Bach, M. K. and J. R. Brashler. 1973. On the nature of the presumed receptor for IgE on mast cells. I. The effect of sialidase and phospholipase C treatment on the capacity of rat peritoneal cells to participate in IgE-mediated, antigen-induced histamine release in vitro. *J.Immunol.* 110:1599-1608.
18. Biedermann, T., M. Kneilling, R. Mailhammer, K. Maier, C. A. Sander, G. Kollias, S. L. Kunkel, L. Hultner, and M. Rocken. 2000. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J.Exp.Med.* 192:1441-1452.
19. Bryce, P. J., M. L. Miller, I. Miyajima, M. Tsai, S. J. Galli, and H. C. Oettgen. 2004. Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity.* 20:381-392.
20. Askenase, P. W., H. Van Loveren, S. Kraeuter-Kops, Y. Ron, R. Meade, T. C. Theoharides, J. J. Nordlund, H. Scovern, M. D. Gerhson, and W. Ptak. 1983. Defective elicitation of delayed-type hypersensitivity in W/W^v and Sl/Sl^d mast cell-deficient mice. *J.Immunol.* 131:2687-2694.
21. Ha, T. Y., N. D. Reed, and P. K. Crowle. 1983. Delayed expulsion of adult *Trichinella spiralis* by mast cell-deficient W/W^v mice. *Infect.Immun.* 41:445-447.
22. Echtenacher, B., D. N. Mannel, and L. Hultner. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77.
23. Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature* 381:77-80.
24. Okayama, Y., D. D. Hagan, and D. D. Metcalfe. 2001. A comparison of mediators released or generated by IFN- γ -treated human mast cells following aggregation of Fc γ RI or Fc ϵ RI. *J.Immunol.* 166:4705-4712.
25. Latour, S., C. Bonnerot, W. H. Fridman, and M. Daeron. 1992. Induction of tumor necrosis factor- α production by mast cells via Fc γ R. Role of the Fc γ RIII γ subunit. *J.Immunol.* 149:2155-2162.
26. Zhang, Y., B. F. Ramos, and B. A. Jakschik. 1992. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science* 258:1957-1959.

27. Sylvestre, D., R. Clynes, M. Ma, H. Warren, M. C. Carroll, and J. V. Ravetch. 1996. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *J.Exp.Med.* 184:2385-2392.
28. Hazenbos, W. L., J. E. Gessner, F. M. Hofhuis, H. Kuipers, D. Meyer, I. A. Heijnen, R. E. Schmidt, M. Sandor, P. J. Capel, M. Daeron, J. G. van de Winkel, and J. S. Verbeek. 1996. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity.* 5:181-188.
29. Sher, A. 1976. Complement-dependent adherence of mast cells to schistosomula. *Nature* 263:334-336.
30. Prodeus, A. P., X. Zhou, M. Maurer, S. J. Galli, and M. C. Carroll. 1997. Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* 390:172-175.
31. Malaviya, R., E. Ross, B. A. Jakschik, and S. N. Abraham. 1994. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest* 93:1645-1653.
32. Malaviya, R., E. A. Ross, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, B. A. Jakschik, and S. N. Abraham. 1994. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J.Immunol.* 152:1907-1914.
33. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.Rev.* 173:89-97.:89-97.
34. Pasare, C. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes.Infect.* 6:1382-1387.
35. Takeda, K. and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int.Immunol.* 17:1-14.
36. Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada. 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. *J.Immunol.* 173:531-541.
37. Leal-Berumen, I., P. Conlon, and J. S. Marshall. 1994. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol.* 152:5468-5476.
38. Stassen, M., C. Muller, M. Arnold, L. Hultner, S. Klein-Hessling, C. Neudorfl, T. Reineke, E. Serfling, and E. Schmitt. 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. *J.Immunol.* 166:4391-4398.
39. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J.Immunol.* 167:2250-2256.
40. Nigo, Y. I., M. Yamashita, K. Hirahara, R. Shinnakasu, M. Inami, M. Kimura, A. Hasegawa, Y. Kohno, and T. Nakayama. 2006. Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:2286-2291.

41. Maurer, M. and M. Metz. 2005. The status quo and quo vadis of mast cells. *Exp.Dermatol.* 14:923-929.
42. Jawdat, D. M., E. J. Albert, G. Rowden, I. D. Haidl, and J. S. Marshall. 2004. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J.Immunol.* 173:5275-5282.
43. Suto, H., S. Nakae, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, and S. J. Galli. 2006. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J.Immunol.* 176:4102-4112.
44. Suzuki, H., B. Wang, G. M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M. A. Tomai, R. L. Miller, and D. N. Sauder. 2000. Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J.Invest Dermatol.* 114:135-141.
45. Mitsui, H., T. Watanabe, H. Saeki, K. Mori, H. Fujita, Y. Tada, A. Asahina, K. Nakamura, and K. Tamaki. 2004. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J.Invest Dermatol.* 122:95-102.
46. Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada. 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. *J.Immunol.* 173:531-541.
47. Navi, D. and A. Huntley. 2004. Imiquimod 5 percent cream and the treatment of cutaneous malignancy. *Dermatol.Online.J.* 10:4.
48. Fleming, C. J., A. M. Bryden, A. Evans, R. S. Dawe, and S. H. Ibbotson. 2004. A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream. *Br.J.Dermatol.* 151:485-488.
49. Rechtsteiner, G., T. Warger, P. Osterloh, H. Schild, and M. P. Radsak. 2005. Cutting edge: priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod. *J.Immunol.* 174:2476-2480.
50. Malaviya, R., Z. Gao, K. Thankavel, P. A. van der Merwe, and S. N. Abraham. 1999. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing Escherichia coli is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:8110-8115.
51. Shin, J. S., Z. Gao, and S. N. Abraham. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 289:785-788.
52. Zhu, F. G. and J. S. Marshall. 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.
53. McCurdy, J. D., T. J. Olynych, L. H. Maher, and J. S. Marshall. 2003. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J.Immunol.* 170:1625-1629.
54. Dvorak, A. M., R. S. McLeod, A. Onderdonk, R. A. Monahan-Earley, J. B. Cullen, D. A. Antonioli, E. Morgan, J. E. Blair, P. Estrella, and R. L. Cisneros. 1992. Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells in vivo. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 99:74-83.

55. Dvorak, A. M., E. S. Morgan, R. A. Monahan-Earley, P. Estrella, R. P. Schleimer, P. F. Weller, R. I. Tepper, L. M. Lichtenstein, and S. J. Galli. 1995. Analysis of mast cell activation using diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural cytochemistry. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 107:87-89.
56. Stassen, M., L. Hultner, C. Muller, and E. Schmitt. 2002. Mast cells and inflammation. *Arch.Immunol.Ther.Exp (Warsz.)* 50:179-185.
57. Palamara, F., S. Meindl, M. Holcman, P. Luhrs, G. Stingl, and M. Sibilio. 2004. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. *J.Immunol.* 173:3051-3061.
58. Gauchat, J. F., S. Henchoz, G. Mazzei, J. P. Aubry, T. Brunner, H. Blasey, P. Life, D. Talabot, L. Flores-Romo, J. Thompson, and . 1993. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365:340-343.
59. Pawankar, R., M. Okuda, H. Yssel, K. Okumura, and C. Ra. 1997. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J.Clin.Invest.* 99:1492-1499.
60. Pawankar, R. 2001. Mast cells as orchestrators of the allergic reaction: the IgE-IgE receptor mast cell network. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 1:3-6.
61. Huels, C., T. Germann, S. Goedert, P. Hoehn, S. Koelsch, L. Hultner, N. Palm, E. Rude, and E. Schmitt. 1995. Co-activation of naive CD4+ T cells and bone marrow-derived mast cells results in the development of Th2 cells. *Int.Immunol.* 7:525-532.
62. Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413:420-425.
63. Mazzoni, A., H. A. Young, J. H. Spitzer, A. Visintin, and D. M. Segal. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J.Clin.Invest* 108:1865-1873.
64. Nakae, S., H. Suto, M. Iikura, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, and S. J. Galli. 2006. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J.Immunol.* 176:2238-2248.
65. McLachlan, J. B., J. P. Hart, S. V. Pizzo, C. P. Shelburne, H. F. Staats, M. D. Gunn, and S. N. Abraham. 2003. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat.Immunol.* 4:1199-1205.
66. Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimbaldston, A. M. Piliponsky, C. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu.Rev.Immunol.* 23:749-786.
67. Malaviya, R. and S. N. Abraham. 2000. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J.Leukoc.Biol.* 67:841-846.
68. Lin, T. J., R. Garduno, R. T. Boudreau, and A. C. Issekutz. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil transendothelial migration via mast cell-derived IL-1 alpha and beta. *J.Immunol.* 169:4522-4530.

-
69. Griffiths, C. E., R. J. Dearman, M. Cumberbatch, and I. Kimber. 2005. Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine* 32:67-70.
 70. Koch, F., L. Ivarsson, K. Janke, P. Stoitzner, B. Ryffel, H. P. Eugster, and N. Romani. 2005. Development and maturation of Langerhans cells, spleen and bone marrow dendritic cells in TNF-alpha/lymphotoxin-alpha double-deficient mice. *Immunol.Lett.* 96:109-120.
 71. Stoitzner, P., C. H. Tripp, A. Eberhart, K. M. Price, J. Y. Jung, L. Bursch, F. Ronchese, and N. Romani. 2006. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:7783-7788.
 72. Kissenpfennig, A. and B. Malissen. 2006. Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol.* 27:132-139.
 73. Bennett, C. L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R. M. Steinman, M. L. Kapsenberg, and B. E. Clausen. 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol.* 169:569-576.
 74. Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, S. K. De los, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 17:211-220.
 75. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen. 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.

G. Abkürzungen

ABTS	2,2- Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
BMDC	bone marrow- derived dendritic cells
BMMC	bone marrow- derived mast cells
BSA	bovine serum albumin
CFSE	5-(und-6)-Carboxyfluoreszein Diacetat, Succinimidyl Ester
CHS	contact hypersensitivity
CLP	caecum ligation and puncture
CR	Komplementrezeptor
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
CTMC	connective tissue type mast cells
DC	Dendritic cells
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	delayed type hypersensitivity
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescence protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell scanner
FCS	fetal calf serum
GM-CSF	Granulozyten und Makrophagen colony stimulating factor
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
<i>i.p.</i>	intra peritoneal
<i>i.v.</i>	intra venös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LC	Langerhans cells
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Macrophage chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMC	mucosal type mast cells
mMCP	mouse mast cell protease
mRNA	messenger ribonucleic acid
NFAT	nuclear factor of activated T cells
SCF	stem cell factor

TCI	transkutane immunisierung
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
