

**Akkumulation von Splenozyten
mit immunsuppressiven Eigenschaften
in mastzelllosen Mäusen mit *Kit*^{W-sh}-Mutation**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Anastasija Michel

geb. am 27.05.1984

in Dshetysaj (Kasachstan)

Mainz, Januar 2013

Aus dem
Institut für Immunologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juni 2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Doktorarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den

Anastasija Michel

*Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit*

ZUSAMMENFASSUNG

Mutationen, die zu einer reduzierten Aktivität der Tyrosinkinase c-Kit führen, können zum Verlust von Mastzellen führen, weshalb entsprechende Mausstämme intensiv zur Erforschung von Mastzellfunktionen verwendet werden.

C-Kit ist der Rezeptor für den in der Hämatopoese essentiellen Stammzellfaktor (SCF) und die vorliegende Arbeit hatte daher das Ziel, mögliche weitere Auswirkungen der Mutation *Kit^{W-sh}* auf die Hämatopoese in Mäusen zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass die *Kit^{W-sh}*-Mutation zu einer ausgeprägten extramedullären Hämatopoese in der Milz führt. Dies ist durch das vermehrte Vorkommen von hämatopoetischen Stammzellen und Vorläufern der myeloiden Zellreihe charakterisiert, die alle eine reduzierte Expression von c-Kit aufweisen. Detailliert untersucht wurde eine massiv expandierte Zellpopulation mit dem Phänotyp neutrophiler Granulozyten in den Milzen naiver *Kit^{W-sh}*-Mäuse. Es handelt sich hierbei jedoch um Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften, die in Wildtypmäusen typischerweise während der Entwicklung von Tumoren expandieren und als "myeloid-derived suppressor cells" (MDSC) angesprochen werden, eine phänotypisch und funktionell heterogene Zellgruppe. Die entsprechenden Zellen aus naiven *Kit^{W-sh}*-Mäusen wurden als granulozytär-(G)-MDSC-ähnlichen Zellen bezeichnet, da sie in der Lage sind, *in vitro* die Proliferation von T-Zellen durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu hemmen und nach Transfer in tumortragende Wildtypmäuse das Tumorstadium zu begünstigen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unserer Beobachtung, dass der Transfer einer Karzinom-Zelllinie in *Kit^{W-sh}*-Mäusen zur Bildung größerer Tumore führt als in entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren, unabhängig von der Abwesenheit von Mastzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen starken Einfluss der *Kit^{W-sh}*-Mutation nicht nur auf die Entwicklung von Mastzellen, sondern auch auf die extramedulläre Myelopoese. Die Expansion G-MDSC-ähnlicher Zellen mit potentiell immunsuppressiven Eigenschaften kann die Verwendung von *Kit^{W-sh}*-Mäusen für die gezielte Untersuchung Mastzell-spezifischer Phänomene einschränken.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Struktur und Funktionen von c-Kit	4
1.2	Die Rolle von c-Kit in der Hämatopoese und Myelopoese	6
1.3	Mäuse mit <i>Kit</i> -Mutationen als Werkzeuge in der Mastzellforschung	8
1.4	Zielsetzung der Arbeit	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Plastikwaren	13
2.2	Chemikalien	13
2.3	Puffer und Kulturmedien	13
2.3.1	Puffer	13
2.3.2	Kulturmedien	14
2.4	Antikörper	15
2.4.1	Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	15
2.4.2	Antikörper zur Depletion von Zellen	16
2.4.3	Antikörper zur Anreicherung von Zellen	16
2.5	Mäuse	16
2.6	Methoden der Zellkultur	17
2.6.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	17
2.6.2	Präparation von Einzelzellsuspensionen	17
2.6.3	Depletion von B- und T-Zellen	19
2.6.4	Methylzellulose-Assay	20
2.6.5	Generierung von dendritischen Zellen (BMDC)	20
2.6.6	Proliferationstest	21
2.7	<i>In vivo</i> Versuche	21
2.7.1	Passive kutane Anaphylaxis	21
2.7.2	Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation	22
2.7.3	Inokulation mit L1C2-Tumorzellen	22
2.8	MACS-gestützte Sortierung von Zellen	23
2.9	Durchflusszytometrische Analysen (FACS)	24
2.10	FACS-gestützte Sortierung von Zellen	25
2.11	Molekularbiologische Methoden	25

2.11.1	Präparation von DNA	25
2.11.2	Genotypisierung	26
2.12	Massenspektrometrische Methoden	27
2.12.1	Proteolytischer Verdau	28
2.12.2	Massenspektrometrische Analyse	28
2.12.3	Prozessierung der Daten und Identifizierung von Proteinen	28
2.13	Histologische Methoden	29
2.13.1	Präparation von Ohrgewebe und Färbung von dermalen Mastzellen	29
2.13.2	Anfertigung von Zytospins und Färbung von Zellen	29
2.14	Statistische Methoden	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Identifikation eines mit der <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mutation gekoppelten DNA-Polymorphismus und Generierung von Mastzell-defizienten C.B6- <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mäusen	30
3.2	Phänotypische Charakterisierung der C.B6- <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mäuse	33
3.3	Die <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mutation verursacht Veränderungen in der Hämatopoese	40
3.4	Die <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mutation führt durch einen intrinsischen Effekt zur Akkumulation von CD11b ⁺ /Ly6G ^{int} /Ly6C ⁺ - und CD11b ⁺ /Ly6G ^{high} /Ly6C ⁺ -Zellen in der Milz	47
3.5	Suppressive Eigenschaften von CD11b ⁺ /Ly6G ^{int} /Ly6C ⁺ - und CD11b ⁺ /Ly6G ^{high} /Ly6C ⁺ -Zellen	55
3.6	<i>Kit</i> ^{W-sh} -Mäuse zeigen ein starkes Wachstum transplanteder L1C2-Tumorzellen	61
3.7	G-MDSC-ähnliche Zellen fördern L1C2-induziertes Tumorstadium	65
4	DISKUSSION	67
4.1	Auswirkungen der <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mutation auf die Hämatopoese	67
4.2	G-MDSC-ähnliche Zellen in Milzen naiver <i>Kit</i> ^{W-sh} -Mäuse	70
4.3	Aktuelle <i>Kit</i> -unabhängige Modelle mastzellloser Mäuse	74
5	LITERATURVERZEICHNIS	78
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86

7	DANKSAGUNG	89
8	LEBENS LAUF	90

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur und Funktionen von c-Kit

C-Kit (CD117) ist ein 110 kDa schweres Transmembranprotein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Extrazellulär befindet sich eine Bindungsregion für den Liganden SCF, welche aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht, wie es in der **Abb. 1A** dargestellt ist. Daran angeschlossen sind eine hydrophobe Transmembransequenz und zwei intrazelluläre Tyrosinkinase-Domänen (**Abb. 1B**).

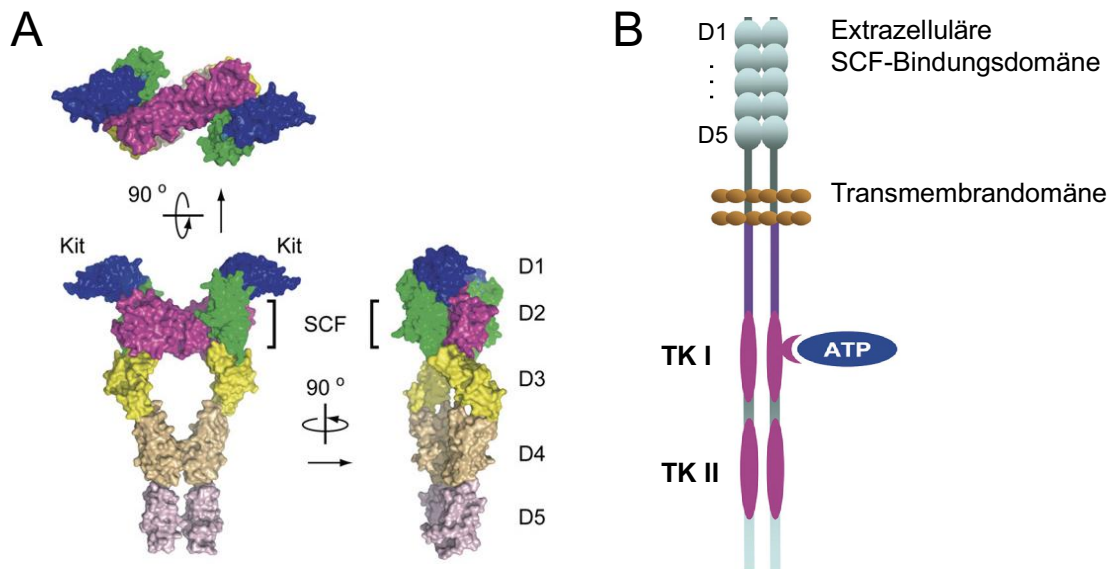


Abb. 1: Struktur der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit. **A**, Gezeigt sind unterschiedliche Ansichten des extrazellulären Bereichs eines dimerisierten Kit-SCF 2:2-Komplexes. Die fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D1-D5) sind farblich gekennzeichnet. SCF ist in der Farbe Magenta dargestellt und interagiert als Homodimer mit D1, D2 und D3 zweier Kit-Ektodomänen. Zusätzlich kommt es zur Interaktion zwischen D4 und D5 zweier Rezeptoren. **B**, c-Kit-Struktur mit extrazellulärer SCF-Bindungsdomäne, Transmembrandomäne und intrazellulärer Domäne bestehend aus zwei Tyrosinkinase-Domänen (TK I und TK II) und einer ATP-Bindungsstelle. (Quelle A: Yuzawa et al., *Cell*, 2007; Quelle B: Pittoni et al., *Oncogene*, 2011)

Durch die Bindung des löslichen oder membrangebundenen SCF an den Rezeptor c-Kit kommt es zu einer Konformationsänderung mit anschließender Dimerisierung des Rezeptors. Dieses Ereignis initiiert eine Autophosphorylierung der Tyrosinkinase-Domänen, die nun als Andockstellen für Signaltransduktionsmoleküle der Ras/ERK-, PI3-Kinase/Akt- und JAK/STAT-Signalwege dienen [1]. Durch diese Signaltransduktionskaskaden werden Prozesse im Zellinneren moduliert.

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit erfüllt in Verbindung mit ihrem Liganden, dem Stammzellfaktor (SCF), zentrale Funktionen in der Hämatopoese. So wird durch die

Interaktion zwischen c-Kit und SCF über das Überleben, die Retention, Proliferation und Differenzierung der Stammzellen im Knochenmark entschieden, sowie die Entwicklung, Wanderung und Funktion von Mastzellen gewährleistet. Aber auch außerhalb des Immunsystems ist c-Kit in der Melanogenese und Gametogenese relevant.

Ursprünglich wurde Kit in seiner viralen Form (v-Kit) beschrieben. V-Kit ist als Onkogen für die transformierende Aktivität des Hardy-Zuckerman IV-Fibrosarkomvirus bei Katzen verantwortlich [2], wohingegen sein humanes Pendant zunächst als Zelloberflächenmarker während akuter myeloischer Leukämie bekannt war [3]. Der Nachweis physiologischer Relevanz erfolgte mit der Zuordnung von c-Kit zum *White spotting*-Lokus (*W*) auf dem 5. Chromosom und von SCF zum *Steel*-Lokus (*Sl*) auf dem 10. Chromosom in Mäusen [4–6]. So wurde beobachtet, dass natürliche c-Kit-betreffende Spontanmutationen im *W*- oder im *Sl*-Lokus erstaunlicherweise einen sehr ähnlichen Phänotyp mit schwerer makrozytärer Anämie¹, Sterilität und Pigmentierungsdefekten verursachen. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des Phänotyps und der Beeinträchtigung der Tyrosinkinase-Aktivität des c-Kit-Rezeptors festgestellt [7].

Bereits im Jahre 1927 wurde von Danforth et al. [8] gezeigt, dass homozygote *W*-Mutanten an schwerer Anämie leiden und *in utero* nur bis zur Geburt lebensfähig sind. Erst im Jahre 2004 wurde entdeckt, dass die an Anämie leidenden homozygoten *W*-Mutanten durch 800-fache Überexpression von Erythropoetin gerettet werden können [9]. Somit wurde nachgewiesen, dass die normale Erythropoese auf c-Kit angewiesen ist.

Weitere Arbeiten zeigten, dass c-Kit und SCF bereits in frühen embryonalen Stadien entlang der Wanderungswege und der Zielorte von Urkeimzellen exprimiert werden. In dieser Phase ist die Expression von c-Kit auf vielen hämatopoetischen Zellen, im Verdauungstrakt, Haut und im Nervensystem erhöht [10,11], womit veranschaulicht wird, wie wichtig die c-Kit/SCF-Interaktion während der Embryonalentwicklung beim Dirigieren von Zellen zum endgültigen Bestimmungsort sein kann.

Bei Mäusen mit reduzierter c-Kit-Funktion wird auch eine gestörte Pigmentierung beobachtet. So ist mittlerweile bekannt, dass bei Funktionsstörungen von c-Kit in der Neuralleiste eine nur sehr schwache Proliferation der Melanozyten induziert werden kann. Folglich können nur sehr wenige Melanozyten in die Hautregionen migrieren. Desweiteren werden auch die Migrationsprozesse direkt von der c-Kit-SCF-Interaktion beeinflusst [12]. Die Resultate von Bernstein et al. zeigen, dass zwei Tyrosinreste an bestimmten Stellen

¹Makrozytäre Anämie = Form von Blutarmut mit erhöhtem Volumen der Erythrozyten.

von c-Kit der Juxtamembranregion notwendig sind um SFK (Src family kinase) zu binden und somit normale Pigmentierung zu ermöglichen [13]. Beim Menschen sind c-Kit-Mutationen in Patienten mit dem Piebaldismus-Syndrom beobachtet worden. Typisch für dieses Syndrom ist eine weiße Stirnlocke und eine Hypopigmentierung bestimmter Hautpartien [14].

Die Sterilität der *W*- bzw. *Sl*-Mutanten hängt vermutlich mit der Fähigkeit des c-Kit zusammen, die Keimzellen vor Apoptose zu schützen und ihre Proliferation einzuleiten [15]. Die molekularen Mechanismen sind bisher nicht bekannt, jedoch scheint der PI3-Kinase/Akt-Signalweg hierbei ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen [16].

1.2 Die Rolle von c-Kit in der Hämatopoese und Myelopoese

Die c-Kit/SCF-Interaktion ist notwendig, um die normale Hämatopoese zu gewährleisten. C-Kit ist auf allen Stammzellen und vielen Vorläuferzellen exprimiert, während sein Ligand SCF auf Stromazellen, Fibroblasten und Endothelzellen primärer und sekundärer lymphatischer Organe zu finden ist [17]. Ganz wichtig ist die c-Kit/SCF-Interaktion für die Retention der Stammzellen im Knochenmark [18], Leber [19], Herz [20], Prostata [21] und Keimdrüsen [22]. In der Arbeit von Ding et al. [23] wurde über den Liganden SCF als die zentrale Schlüsselkomponente der Stammzellnische berichtet. Demnach ist eine Zell-Zell-Interaktion über c-Kit und SCF unbedingt erforderlich, weil es sonst zu einer frühzeitigen Ausschwemmung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark führt.

Desweiteren sind viele Differenzierungsstufen der gesunden Hämatopoese durch ein gemeinsames Charakteristikum gekennzeichnet, nämlich die c-Kit-Expression. Diese Expression ist auf Stammzellen erhöht und wird normalerweise im Laufe der terminalen Differenzierung reduziert. Deshalb finden sich im peripheren Blut nur noch 0,1% der Zellen, die c-Kit exprimieren [24]. C-Kit ist also besonders in den frühen Stadien der Hämatopoese sehr wichtig. Die Ausnahme mit einer hohen bestehenden c-Kit-Expression nach einer vollständigen Zellreifung bilden hier die Mastzellen und - außerhalb des hämatopoetischen System - Melanozyten und ICC¹.

In der **Abb. 2** sind die wichtigsten Stadien der murinen Myelopoese dargestellt. Die Expressionsunterschiede bestimmter Oberflächenmoleküle erlauben es einzelne Stadien der Myelopoese auseinander zu halten.

¹ICC = spezialisierte glatte Muskelzellen, regulieren Darmmotilität und Peristaltik.

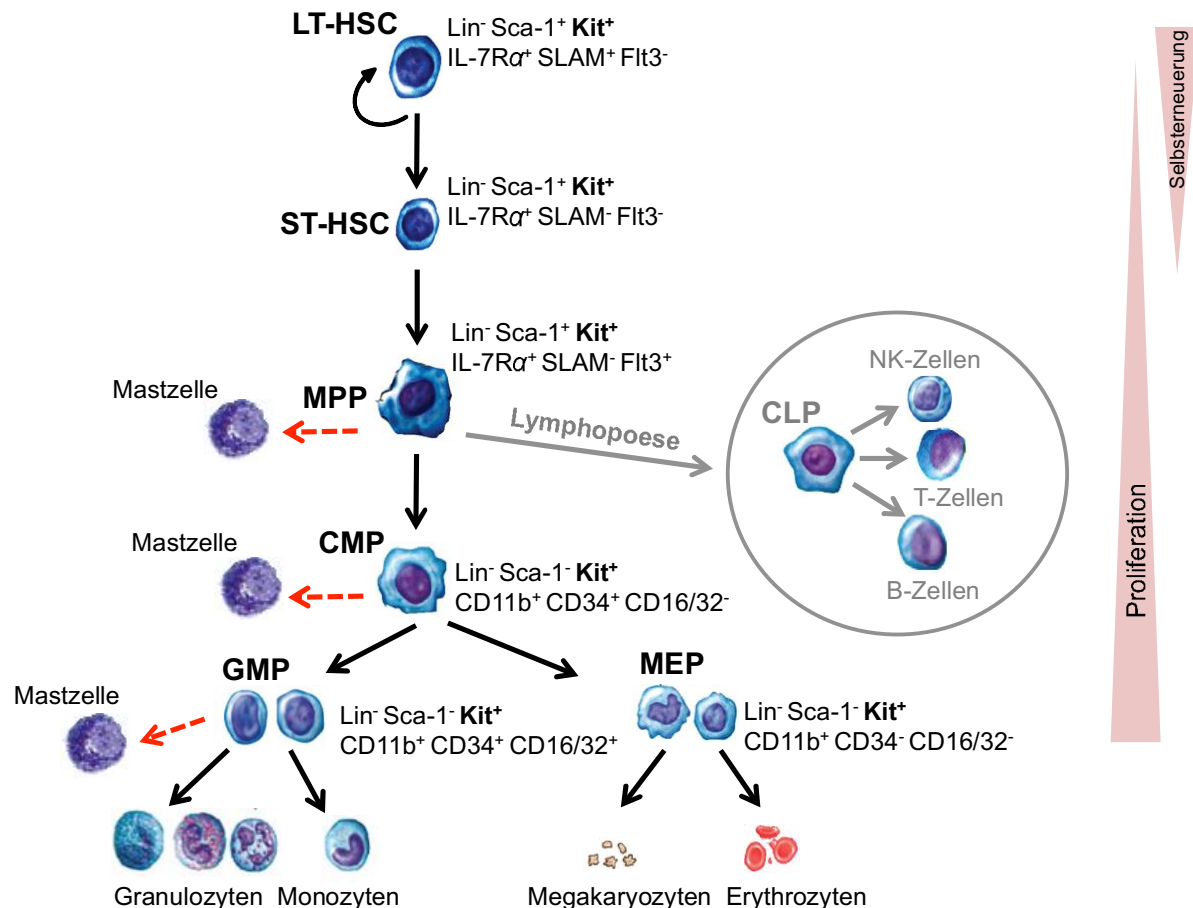


Abb. 2: Ein Stammbaum muriner Myelopoese. Einzelne Differenzierungsstufen der Vorläuferzellen und ihre wichtigsten Oberflächenmarker sind dargestellt. Den Anfang bilden die LT-HSC, ST-HSC und MPP, wo die Lymphopoese abzweigt (grau hinterlegt). Aus CMP erfolgt die Differenzierung in GMP und MEP. Die fragliche Abstammung der Mastzelle entweder aus MPP, CMP oder GMP ist durch rote gestrichelte Linien gekennzeichnet. LT-HSC = langlebige unreife Stammzellen, ST-HSC = kurzlebige reifere Stammzellen, MPP = multipotente Vorläuferzellen, CLP = gemeinsamer lymphoider Vorläufer, CMP = gemeinsamer myeloider Vorläufer, GMP = granulozytär-monocytäre Vorläufer, MEP = megakaryozytär-erythroider Vorläufer, Kit = CD117, SLAM = CD150, Flt3 = CD135, IL-7Rα = CD127, Lin = Lineage Marker CD3e, CD4, CD8, CD5, CD45R (B220), Gr1, TER119, CD127, CD11b. (Modifiziert nach: Sharma et al., *Exp Hematol*, 2007; Akashi et al., *Nature*, 2000; Passegue et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; Gurish et al., *Immunity*, 2012)

Die Ausgangszellen sind die langlebigen unreifen Stammzellen (LT-HSC), deren hämatopoetisches Entwicklungspotential noch nicht eingeschränkt ist. Diese LT-HSC sind jedoch nicht mehr totipotent¹, wie es für die frühen embryonalen Stammzellen typisch ist, sondern pluripotent². So bilden diese Zellen den Ursprung von Geweben, darunter die Zellen des Immunsystems. In diesem Stadium ist das Selbsterneuerungspotential im Vergleich zu den nachfolgenden Differenzierungsstufen am

¹Totipotent = "zu allem fähig", Befähigung einer Zelle einen kompletten Organismus zu bilden.

²Pluripotent = "zu vielem fähig", Befähigung einer Zelle Organe auszubilden.

höchsten, wohingegen kaum Proliferation stattfindet. Mit der Weiterentwicklung zu den kurzlebigen reiferen Stammzellen (ST-HSC) ist das Potential zur Selbsterneuerung eingeschränkt, während die Zellen eine Steigerung der Proliferation zeigen. Das nächste Stadium der multipotenten Vorläuferzelle (MPP) bildet eine Verzweigung zu Myelopoese und Lymphopoese. Während die Myelopoese im Knochenmark stattfindet, wird die Lymphopoese teilweise außerhalb des Knochenmarks in lymphatischen Organen vollzogen. Die gemeinsamen myeloiden Vorläufer (CMP) sind durch eine limitierte Differenzierungskapazität gekennzeichnet und können sich nur noch zu granulozytär-monocytären (GMP) oder zu megakaryozytär-erythroiden Vorläufern (MEP) entwickeln. Daraus entstehen endgültig ausgereifte Zellen, die ihre typischen Funktionen ausüben können, wie Pathogenabwehr bei neutrophilen Granulozyten oder Sauerstofftransport bei Erythrozyten.

Die Abstammung der Mastzelle wird zur Zeit kontrovers diskutiert, weil es bisher noch nicht gelungen ist, die unmittelbaren Mastzellvorläufer im Blut oder anderen Geweben zu detektieren. So gibt es Berichte, dass sich die Mastzellvorläufer bereits von MPP im Knochenmark abzweigen und die endgültige Differenzierung im Zielgewebe vollziehen [25]. Neuere Arbeiten schildern jedoch, dass diese von CMP [26,27] oder sogar von GMP [28] abstammen können.

Die Myelopoese scheint in Kit-defizienten Mäusen besonders beeinträchtigt zu sein, da die Erythrozytenzahlen drastisch reduziert sind und die Mastzellen gänzlich fehlen. Die Expression von c-Kit ist zwar auf einigen Vorläuferzellen der Lymphopoese ebenfalls erhöht, eine c-Kit-Insuffizienz hat jedoch kaum Auswirkung auf ausgereifte Zellen.

1.3 Mäuse mit *Kit*-Mutationen als Werkzeuge in der Mastzellforschung

Mastzellen besetzen nahezu jede Stelle im Körper, die der Außenwelt, und somit Pathogenen, zugewandt ist. Wie alle anderen Immunzellen stammen auch Mastzellen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab, wobei die endgültige Differenzierung erst im Zielgewebe vollzogen wird [29].

Die ersten Funktionen der Mastzelle wurden vom Entdecker der Mastzelle, Paul Ehrlich, bereits im Jahre 1877 postuliert. So verfolgte er die Annahme, dass die Mastzelle mit ihren fetthaltigen Granula die Nachbarzellen mit Nährstoffen versorgt ("mästet") sowie

eine schützende Funktion bei der Tumorentstehung besitzen kann. Später wurden weitere Funktionen, wie Phagozytose von Pathogenen, endokrine Funktionen, Lipidmetabolismus, Kalziummetabolismus, Wachstumskontrolle, Blutgerinnung, Hämatopoese, lokale Entgiftung, Blutdruckregulation, pH-Regulation, Temperaturregulation und Stressantworten postuliert, aber wegen fehlender Untersuchungsmodelle letztlich nicht bewiesen [30].

Noch bis vor 20 Jahren hatte die Mastzelle nur ihre sichere Rolle als kritische Hauptkomponente in der allergischen Entzündung (Typ-I-Allergie). In den letzten Jahren hat sich das Wissen um die Mastzelle gewaltig erweitert. So wird die Mastzelle nun als eine "Wächter"-Zelle des Immunsystems betrachtet, weil sie maßgeblich an der Abwehr von Parasiten, Bakterien, Pilzen und Viren beteiligt ist [31,32]. Die Rolle von Mastzellen *in vivo* konnte erst durch mastzelllose Mausmodelle gezeigt werden, wie in der **Tab. 1** gezeigt.

Genotyp	Mutation	Phänotyp	Aufhebung der Mastzell-defizienz durch Injektion von SCF?	Aufhebung der Mastzell-defizienz durch Injektion von Mastzellen?
<i>Sl/Sl^d</i>	<i>Sl</i> („Steel“) kodiert ein Allel für SCF, welches eine umfangreiche Deletion in der kodierenden Region enthält. <i>Sl^d</i> („Steel Dickie“) kodiert lösliches SCF, transmembrane und zytoplasmatische Domänen fehlen.	Anämie, Melanozyten fehlen (weißes Fell), Keimzellen fehlen (Sterilität), keine interstitiellen Cajal-Zellen, keine Mastzellen	Ja	Nein
<i>Kit^{W/W-v}</i>	<i>W</i> („white spotting“) kodiert ein Allel für c-Kit, keine Oberflächenexpression, da die Transmembrandomäne fehlt. <i>W-v</i> („viable white spotting“) kodiert eine Punktmutation in der Tyrosinkinase-Domäne, welche zu einer stark herabgesetzten Aktivität führt.	Anämie, Melanozyten fehlen (weißes Fell), Keimzellen fehlen (Sterilität), keine interstitiellen Cajal-Zellen, Neutropenie, keine Mastzellen	Nein	Ja
<i>Kit^{W-sh}</i>	<i>sh</i> („sash“) kodiert eine Inversion, die regulatorische Elemente oberhalb des Transkriptionsstartpunkts von c-Kit betrifft.	Melanozyten fehlen (weißes Fell), keine interstitiellen Cajal-Zellen, Neutrophilie, keine Mastzellen	Nein	Ja

Tab. 1: Häufig genutzte Stämme Mastzell-defizienter Mäuse und deren Eigenschaften.
(Quelle: Heib et al., *Br J Haematol*, 2008)

Bei diesen Modellen handelt es sich um spezielle Mäuse mit natürlich vorkommenden Mutationen von c-Kit oder SCF, die Mastzell-defizient sind. So führen bestimmte Kombinationen von Mutationen im *W*- oder *Sl*-Lokus zu Mastzelllosigkeit in diesen Mäusen.

Durch Verwendung mastzellloser Mäuse kann geprüft werden, wie der normale Ablauf der Prozesse in einem Organismus von der Abwesenheit der Mastzellen beeinflusst wird. Der Vorteil dieser Modelle ist die Möglichkeit das Fehlen von Mastzellen aufzuheben. So können die Mastzellen bei den *Sl/Sl^d*-Mäusen durch die zusätzliche Verabreichung von SCF und bei den *Kit^{W/W-v}*- bzw. *Kit^{W-sh}*-Mäusen direkt durch Injektionen ausgereifter Mastzellen repopuliert werden. Daher gehören die c-Kit-defizienten Mäuse zum “goldenen Standard” in der Mastzellforschung.

Die WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}*-Maus ist ein F1-Hybrid aus einer Kreuzung von WB/ReJ-*Kit^W* und C57BL/6-*Kit^{W-v}*, welcher phänotypisch von Sterilität, Neutropenie, Anämie und dem Fehlen von Melanin in den Melanozyten gekennzeichnet ist. Der Grund dafür ist die Mutation des *Kit^W*-Allels, welche einen funktionslosen Tyrosinkinase-Rezeptor zur Folge hat, und die Punktmutation des *Kit^{W-v}*-Allels, welche zu einer stark verminderten Kinaseaktivität führt [33]. Der komplexe genetische Hintergrund stellt hierbei die größte Herausforderung dar, weil ein adoptiver Transfer von Mastzellen nur mit genetisch übereinstimmenden Zellen möglich ist. Die Sterilität sowie die anspruchsvolle und schwer praktikable Zucht stellen ebenfalls einen Nachteil dar.

Dagegen ist das aktuellere C57BL/6-*Kit^{W-sh}*-Mausmodell nicht von Sterilität betroffen, womit die Zucht leichter zu handhaben ist. Insgesamt weisen die *Kit^{W-sh}*-Mäuse weniger Anomalien (**Tab. 1**) als *Kit^{W/W-v}*-Mäuse auf und werden deshalb von Mastzellforschern präferiert. Interessanterweise bewirkt die *Kit^W/Kit^{W-v}*-Mutation eine Neutropenie, wohingegen die *Kit^{W-sh}*-Mutation im Gegensatz dazu nach bisherigen Erkenntnissen eine Neutrophilie [34] verursacht. Ob der Einsatz dieser Mäuse die erzielten Ergebnisse bei der Untersuchung von Mastzellfunktionen beeinflusst, wird durch Rekonstitutionen mit BMMC¹ überprüft. Diese Rekonstitutionen können anhand von intravenösen, intraperitonealen oder intradermalen Injektionen durchgeführt werden, wobei die Mastzellen jedoch anschließend keine dem Wildtyp gleichende Organbesiedelung zeigen. So wird beispielsweise nach einer intravenösen Verabreichung die Haut nicht besiedelt, während in der Milz eine extrem hohe Anhäufung von Mastzellen beobachtet wird [35].

¹BMMC = bone marrow-derived mast cells.

Desweiteren ist das *Kit*^{W-sh}-Mausmodell wegen seines einheitlichen genetischen C57BL/6-Hintergrunds hoch geschätzt, weil es dem Nutzer erlaubt auf einen großen Pool an definierten Knock-out-Mäusen zurück zu greifen und die daraus isolierten bzw. generierten Mastzellen adoptiv zu transferieren. Standardmäßig werden hierfür Mastzellen aus Knochenmarkszellen im zytokinangereicherten Medium über mehrere Wochen generiert. Somit können sowohl die Rolle der Mastzelle selbst als auch ihrer freigesetzten Mediatoren in bestimmten Erkrankungen untersucht werden. Grundsätzlich muss jedoch bedacht werden, dass in allen Modellen die Rekonstitutionen mit Mastzellen in Tieren mit c-Kit-Mutationen erfolgen.

Die *Kit*^{W-sh}-Mutation ist erstmals als eine Spontanmutation auf dem 5. Chromosom bei Nachkommen von C3H/HeH x 101 H aufgetreten und wurde im Zusammenhang mit der Mastzelldefizienz jedoch erst im Jahre 1982 beschrieben [36]. Das erste heterozygote Weibchen hatte eine breite weiße Schärpe (*engl.* sash) um den Leib, was zur Namensgebung und zum Symbol *W-sh* geführt hat. Die homozygoten Mutanten sind durch ein durchgehend weißes Fell und schwarze Augen gekennzeichnet.

Die *c-Kit*-Expression ist in vielen Organen und Zellen adulter *Kit*^{W-sh}-Mäuse völlig normal. Von der Mutation in adulten Tieren sind hauptsächlich die Zellen betroffen, die in der embryonalen Entwicklung eine relativ hohe c-Kit-Oberflächenexpression aufweisen. Dazu zählen Mastzellen, ICC im Verdauungstrakt und Melanozyten. In *Kit*^{W-sh}-Embryonen zeigen alle diese Zellen eine mit dem Wildtyp vergleichbare c-Kit-Expression, mit der fortschreitenden Zelldifferenzierung wird diese jedoch reduziert. Diese Ergebnisse ließen Duttlinger et al. im Jahre 1993 [37] darauf schließen, dass von der Mutation nicht die kodierende Region des *Kit*-Gens selbst betroffen ist, sondern vielmehr dessen regulatorische Elemente. Wenig später fand man heraus, dass es sich bei der *W-sh*-Mutation um eine Inversionsmutation regulatorischer Elemente oberhalb des *Kit*-Lokus handelt [38,39]. Und erst im Jahre 2008 zeigte die Arbeit von Nigrovic et al. [34], dass es eine Inversion eines etwa 3 cM umfassenden DNA-Fragments ist, dessen 3'-Bruchstelle etwa 72 kbp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes von *Kit* liegt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren erfolgte die Untersuchung der Mastzellfunktionen *in vivo* hauptsächlich mit mastzelllosen Kit^{W-sh} -Mäusen auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6-Mäusen. Die Untersuchung vieler Krankheitsmodelle erfordert jedoch die Verwendung des genetischen BALB/c-Hintergrunds. Daher war das ursprüngliche Ziel dieser Arbeit die Kit^{W-sh} -Mutation vom C57BL/6- auf den BALB/c-Hintergrund zu kreuzen, um die Möglichkeiten der Untersuchung von Mastzellfunktionen *in vivo* zu erweitern.

Durch Rückkreuzung wurde so der Stamm mit der Bezeichnung C.B6- Kit^{W-sh} generiert. In Einklang mit den Erwartungen erwies sich der neue Stamm ebenfalls als mastzelllos. Dieser Stamm sollte jedoch auch dazu dienen, weitere Phänomene der Kit^{W-sh} -Mutation auf Zellen des Immunsystems, insbesondere der Myelopoese, zu untersuchen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Invitrogen (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich (Schnelldorf) in pro analysis (p. a.) Qualität bezogen.

2.3 Puffer und Kulturmedien

Zur Herstellung aller Flüssigkeiten wurde vollentsalztes (VE) Wasser verwendet. Vor Gebrauch wurden alle Flüssigkeiten sterilfiltriert ($0,2\ \mu\text{m}$) bzw. autoklaviert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

2.3.1 Puffer

ACK-Puffer

in VE-Wasser, 8,02 g/l NH_4Cl , 0,1 g/l KHCO_3 , 0,037 g/l EDTA, pH 7,3

Blockpuffer

in PBS, 1% BSA, 10% FCS

EDTA-Blutpuffer

in PBS, 30 mM EDTA, 0,01% NaN_3

Dynal-Puffer

in PBS, 0,1% BSA, 2 mM EDTA

Genomic Lysis Buffer

in VE-Wasser, 300mM NaCl , 25mM EDTA, 50mM Tris, 0,2% SDS, pH 8,0

Gey's Lysepuffer

in VE-Wasser, 8,3 g/l NH_4Cl , 1 g/l KHCO_3 , 0,037 g/l EDTA, pH 7,4

GM-Puffer

in PBS, 0,5% BSA, 5 mM EDTA, 0,01% NaN₃

Lysepuffer

in VE-Wasser, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 5 mM DTT, 2% CHAPS

PBS

in VE-Wasser, 1,4 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,2

TBE-Puffer

in VE-Wasser, 10,8 g/l Tris Base, 5,5 g/l H₃BO₃, 2 mM EDTA

Poly-L-Lysine

in VE-Wasser, 100 mg/l Poly-L-Lysine

2.3.2 Kulturmedien**BMDC-Medium**

in ISCOVE's, 5% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin, 50 ng/ml GM-CSF

Fötales Kälberserum (FCS)

Das verwendete FCS wurde zunächst zur Inaktivierung von Komplementkomponenten 45 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde das FCS 15 min bei 600xg zentrifugiert, um denaturierte Bestandteile zu entfernen. Nur die Überstände wurden verwendet.

ISCOVE's

in VE-Wasser, 17,67 g/l IMDM-Pulver, 3,02 g/l NaHCO₃, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 I.U./l Penicillin, 100 µg/l Streptomycin, 15 mg/l Phenolrot, pH 7,2

Minimal Essential Medium (MEM)

in VE-Wasser, 10,58 g/l MEM-Pulver, 4,77 g/l HEPES, 100 I.U./l Penicillin, 100 µg/l Streptomycin, pH 7,2

Physiologische Trypanblaulösung

Der Vitalfarbstoff Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen und lässt diese im

Lichtmikroskop blau erscheinen. Lebende Zellen werden nicht angefärbt. Trypanblau wurde zur Bestimmung der Lebendzellzahl in Zellsuspensionen eingesetzt. Folgende Lösungen A und B wurden im Verhältnis 5:1 gemischt:

Lösung A: 0,2% Trypanblau in VE-Wasser

Lösung B: 4,25% NaCl

Testmedium

in ISCOVE's, 5% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM Glutamin

2.4 Antikörper

2.4.1 Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper waren entweder anti-Maus oder anti-Maus/Human und wurden nach Herstellerempfehlungen verwendet.

CD3 ϵ -Biotin (500A2, BD)

CD4-Biotin (H129.19, eigene Produktion und Biotinylierung)

CD5-Biotin (53-7.3, BioLegend)

CD8 α -Biotin (53-6.7, BioLegend)

CD11b-Biotin (M1/70, eBioscience)

CD11b-FITC (M1/70, eBioscience)

CD11c-APC (N418, eBioscience)

CD16/32-PE (2.4G2, BD)

CD16/32 gereinigt, als Fc-Block (93, eBioscience)

CD19-PECy7 (1D3, eBioscience)

CD34-FITC (RAM34, eBioscience)

CD45R(B220)-Biotin (RA3-6B2, BioLegend)

CD49b-APC (DX5, eBioscience)

CD117-PE-Cy7 (ACK2, eBioscience)

CD117-APC (ACK2, BioLegend)

CD127-Biotin (A7R34, BioLegend)

CD135-PE (A2F10, eBioscience)

CD150-FITC (9D1, eBioscience)

Fc ϵ RI α (MAR-1, eBioscience)

Gr-1-Biotin (RB6-8C5, BioLegend)

Ly6G-PE (1A8, eBioscience)
Ly6G-FITC (1A8, BioLegend)
Ly6C-PerCP-Cy5.5 (HK1.4, eBioscience)
Sca-1-APC (D7, BioLegend)
TER-119-Biotin (TER-119, BioLegend)
Streptavidin-PerCP (BioLegend)
Propidiumiodid (Vitalfarbstoff, Sigma-Aldrich)

2.4.2 Antikörper zur Depletion von Zellen

CD4 Dynabeads (L3T4, Invitrogen)
CD8 Dynabeads (Lyt2, Invitrogen)
Pan B Dynabeads (B220, Invitrogen)

2.4.3 Antikörper zur Anreicherung von Zellen

CD11b MicroBeads Kit (M1/70, Miltenyi)
Anti-Ly6G-Biotin und anti-Biotin-MicroBeads aus dem Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit (Miltenyi)

2.5 Mäuse

Die Mäuse waren zum Beginn der Experimente zwischen sechs und zehn Wochen alt und wurden unter SPF (“specific pathogen free”) Bedingungen gehalten. Folgende Stämme wurden verwendet:

C57BL/6

Wildtyp-Stamm, ZVTE der Universitätsmedizin (Mainz).

C57BL/6-*Kit*^{W-sh}

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Markus Maurer, Charité (Berlin), Zucht in ZVTE der Universitätsmedizin (Mainz).

BALB/c

Wildtyp-Stamm, ZVTE der Universitätsmedizin (Mainz) oder JANVIER (Le Genest-saint-Isle, Frankreich).

C.B6-Kit^{W-sh}

ZVTE der Universitätsmedizin (Mainz).

Cpa3^{Cre/+}

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Feyerabend, Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg).

2.6 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank mit sterilen Glas- bzw. Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

2.6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei färben sich die toten Zellen blau an. Lebende Zellen können den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnehmen und erscheinen im Lichtmikroskop ungefärbt. Mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) wurde die Zahl der lebenden (= ungefärbten) Zellen bestimmt. Nach Auszählen von 16 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl (N) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

2.6.2 Präparation von Einzelzellsuspensionen

Die Mäuse wurden je nach Anzahl mittels Genickbruch oder Kohlenstoffdioxidinhalation getötet. Alle Medien und Zentrifugen waren auf 4°C gekühlt.

Knochenmarkszellen

Die beiden Hinterbeine der getöteten Mäuse wurden vom Hüftgelenk abgetrennt. Tibia und Femur wurden von Knie und Fußgelenk getrennt und die Muskulatur entfernt. Zur Desinfektion wurden die Knochen äußerlich mit Isopropanol gespült und zweimal mit MEM gewaschen. Die Röhrenknochen konnten mit Hilfe einer Schere an beiden Enden geöffnet und das Knochenmark mit einer Spritze (z. B. Kanülengröße 0,55x25 mm) und MEM aus den Markhöhlen ausgespült werden. Das gewonnene Knochenmarksgewebe

wurde mit Hilfe einer Glaspipette resuspendiert, sodass eine homogene Zellsuspension entstand. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb filtriert (Porengröße 70 μm), um diese von groben Resten (z. B. Knochensplitter) zu befreien. Das Filtrat wurde zentrifugiert (10 min bei 500xg), der Überstand verworfen und durch Zugabe von 3ml Gey's Lysepuffer bzw. 1 ml ACK-Puffer wurden die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach ca. 2 min wurde die Reaktion mit 8 ml MEM + 2% FCS abgestoppt und die Lebendzellzahl ermittelt. Die Zellen wurden wieder zentrifugiert und in einem definierten Volumen an Testmedium aufgenommen, um die gewünschte Zellzahl/ml zu erhalten.

Milzzellen (Splenozyten)

Die linke Flanke der getöteten Mäuse wurde mit Isopropanol desinfiziert, die Bauchdecke aufgeschnitten und die Milz abgetrennt. Durch Zerreiben über einem Sieb (Porengröße 70 μm) und mehrmaliges Resuspendieren wurde eine homogene Zellsuspension hergestellt. Die Reste an Bindegewebe wurden entfernt indem nach 10-minütiger Sedimentation nur der Überstand verwendet wurde. Diese Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert (10 min bei 500xg), der Überstand verworfen und durch Zugabe von 1 ml Gey's Lysepuffer bzw. 1 ml ACK-Puffer die enthaltenen Erythrozyten lysiert. Nach ca. 2 min wurde die Reaktion mit 8 ml MEM + 2% FCS abgestoppt. Falls dabei sichtbare Zellaggregate entstanden, wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 70 μm) filtriert. Die Splenozytenzahl wurde ermittelt, die Zellen wieder abzentrifugiert und in einem definierten Volumen an Testmedium aufgenommen, um die gewünschte Zellzahl/ml zu erhalten.

Lymphknotenzellen

Das Fell an Kopf und Hals von getöteten Mäusen wurde mit Isopropanol desinfiziert, aufgeschnitten und die aurikularen Lymphknoten freigelegt. Durch Zerreiben der Lymphknoten zwischen zwei mit PBS befeuchteten Objektträgern wurde eine Zellsuspension hergestellt. Nach Resuspendieren und Filtration (Zellsieb mit Porengröße 70 μm) wurde anschließend die Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min bei 500xg) und in einem definierten Volumen an Testmedium aufgenommen, um die gewünschte Zellzahl/ml zu erhalten.

Blutzellen

Unmittelbar nach dem Abtöten der Mäuse wurde die Bauchdecke geöffnet und die

Vena cava inferior durchschnitten. 200-400 μ l Blut wurden in 1 ml EDTA-Blutpuffer aufgefangen und zentrifugiert (10 min bei 500xg). Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml ACK-Puffer aufgenommen und die Reaktion nach 5 min durch die Zugabe von 10 ml PBS abgestoppt. Die Blutzellen wurden abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde ermittelt, Zellen wieder zentrifugiert und in einem definierten Volumen an Testmedium aufgenommen, um die gewünschte Zellzahl/ml zu erhalten.

2.6.3 Depletion von B- und T-Zellen

Zur Entfernung von B- und T-Zellen ($CD4^+$ - und $CD8^+$ -Zellen) aus einer Zellsuspension wurden die unerwünschten Zellen mit superparamagnetischen Polystyrolkugeln (Dynabeads, Invitrogen) markiert. Anhand magnetischer Einwirkung konnten diese Zellen von der Zellsuspension getrennt werden.

Knochenmarkszellen

Folgende Berechnung wurde durchgeführt: Im Knochenmark befinden sich etwa 20% B-Zellen, wovon jede B-Zelle mit 8 Pan B Dynabeads markiert werden soll. Die Knochenmarkszellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, aufbereitet und auf 10^7 Zellen/ml Dynal-Puffer eingestellt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die entsprechende Menge an Dynabeads in die Suspension gegeben und 20 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Platzierung des Gefäßes mit den Zellen in einen Dynal-Magneten wurden alle B-Zellen an der Gefäßwand gehalten, während die Suspension mit allen anderen Zellen vorsichtig abgezogen wurde.

Milzzellen (Splenozyten)

Folgende Berechnung wurde durchgeführt: In der Milz befinden sich etwa 50% B-Zellen, 10% $CD8^+$ -T-Zellen und 10% $CD4^+$ -T-Zellen, wovon jede Zelle mit 8 Dynabeads markiert werden soll. Die Milzzellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, zubereitet und auf 10^7 Zellen/ml Dynal-Puffer eingestellt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die entsprechende Menge an Dynabeads in die Suspension gegeben und 20 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Platzierung des Gefäßes mit den Zellen in einen Dynal-Magneten wurden alle B- und T-Zellen an einer Gefäßwand gehalten, während die Suspension mit allen anderen Zellen vorsichtig abgezogen wurde.

2.6.4 Methylzellulose-Assay

Kolonie-Formations-Assay

Für die Kolonie-Formations-Assays wurde 1202-Methylzellulose (ColonyGEL™ 1202 Mouse Complete Medium, CellSystems) verwendet, die bereits vom Hersteller mit den wachstumssfördernden Zytokinen SCF, IL-3, IL-6, und Erythropoetin versetzt wurde. Die Zellkultur im semisoliden Methylzellulosemedium erlaubt die erythroide und myeloide Differenzierung und somit eine Aussage über das Proliferationspotential einzelner Zellen zu treffen.

Milzzellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, aufbereitet und in ISCOVE's auf 1×10^6 Splenozyten/ml eingestellt. Ein 2,25 ml-Aliquot Methylzellulose wurde mit 250 μ l Splenozyten gründlich vermischt und als Duplikat zu je 1 ml mit einer Spritze und stumpfer Kanüle ausplattiert. Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Kolonien bestehend aus mindestens 50 Tochterzellen ausgezählt.

Differenzierungs-Assay

Für die Differenzierungs-Assays wurde 1201-Methylzellulose (ColonyGEL™ 1201 Mouse Base Medium, CellSystems) verwendet, die vor dem Versuchsbeginn zusätzlich mit 20 ng/ml M-CSF versetzt wurde. Damit wurde die monozytäre Differenzierung sowie das Überleben von Zellen gewährleistet. Als Kontrolle diente ein Parallelansatz mit 1202-Methylzellulose.

Milzzellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, aufbereitet und in ISCOVE's auf 1×10^6 Splenozyten/ml eingestellt. Ein 2,25 ml-Aliquot Methylzellulose wurde mit 250 μ l Splenozyten gründlich vermischt und als Duplikat zu je 1 ml mit einer Spritze und stumpfer Kanüle ausplattiert. Nach 7-tägiger Inkubation die Zellen zusammen mit der Methylzellulose geerntet und mit hohem PBS-Volumina dreimal gewaschen. Nach einer Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration in GM-Puffer eingestellt.

2.6.5 Generierung von dendritischen Zellen (BMDC¹)

Knochenmarkszellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben, präpariert und zu 3×10^6 Zellen/well einer 6-well-Suspensionsplatte in 4 ml BMDC-Medium ausplattiert. Am Tag 2 wurden die Platten geschwenkt, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen, und 3 ml

¹BMDC = bone marrow-derived dendritic cells.

Medium vorsichtig entnommen und durch frisches BMDC-Medium ausgetauscht. An Tag 4 wurden 3 ml Medium vorsichtig durch frisches BMDC-Medium ausgewechselt. An Tag 6 wurden die BMDC geerntet, gezählt und in die Versuche eingesetzt. Die durch durchflusszytometrische Analyse ermittelte Reinheit der CD11c⁺-Zellen lag bei ca. 85%.

2.6.6 Proliferationstest

Um die Proliferation aktivierter T-Zellen zu untersuchen, wurde eine allogene gemischte Lymphozytenreaktion (AMLR) angesetzt. Hierbei werden naive T-Zellen durch Fremdantigene auf reifen dendritischen Zellen zur Proliferation angeregt. Dieses System kann durch Zugabe suppressiver Zellen bzw. Inhibitoren moduliert werden. Hierzu wurden 5×10^4 Lymphknotenzellen von BALB/c-Mäusen (Kapitel 2.6.2) und $1,67 \times 10^3$ dendritische Zellen von dem anderen genetischen Hintergrund C57BL/6 (Kapitel 2.6.5) als Basis der AMLR bei 37°C inkubiert. Die Zugabe suppressiver Zellen und/oder der Inhibitoren (Katalase, L-NMMA¹ oder nor-NOHA²) erfolgte gleich zu Beginn der Kultur. Nach 4 Tagen Ko-Kultur wurden 0,5 μ Ci [³H]-Thymidin/Well gegeben und 20 h später die Inhalte der einzelnen Wells mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Cell Harvester 1295-001, LKB, Freiburg) durch einen Glasfaserfilter gesaugt, wobei nur Zellen auf dem Filter zurückgehalten wurden. Der Filter wurde 2-3 min in einer Mikrowelle getrocknet und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem β -Flüssigszintillationszähler (LKB Wallac). Dabei wird die vom [³H]-Thymidin, welches in die DNA der Zellen eingebaut wurde, ausgesandte radioaktive β -Strahlung über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einen vorgeschalteten Szintillator übertragen, der die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung freigibt. Diese wird weiterhin vom Szintillationszähler über eine Photozelle als Lichtimpuls verarbeitet und als *counts per minute* (cpm) angegeben.

2.7 *In vivo* Versuche

2.7.1 Passive kutane Anaphylaxis

Zunächst wurden die Mäuse mit Ketamin (Ratiopharm, 71,2 mg/Maus) und Rompun (Bayer, 0,2 mg/Maus) durch eine intraperitoneale Injektion betäubt. Anschließend

¹L-NMMA = N^G-methyl-L-arginine citrate.

²Nor-NOHA = N ^{ω} -hydroxy-nor-arginine.

erfolgte eine intradermale Injektion von 1 μg anti-DNP¹ IgE in 30 μl PBS in ein Ohr und 30 μl PBS als Kontrolle in das kontralaterale Ohr. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse mit Antigen (DNP-HSA²) provoziert. Hierzu wurden 100 μl einer 0,5%igen Evans Blau-Lösung in PBS mit 0,5 mg/ml DNP-HSA intravenös in die Schwanzvene injiziert. Nach 30 min wurden die Tiere mit CO₂ abgetötet, die Ohren entfernt und gewogen. Die Ohren wurden anschließend zur Extraktion des Farbstoffes für 24 Stunden bei 55°C in 500 μl Formamid inkubiert. Die optische Dichte (OD) des extrahierten Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch gemessen und diese mit dem Gewicht des jeweiligen Ohres ins Verhältnis gesetzt (mOD/mg Ohr).

2.7.2 Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation

Die Mäuse wurden mit einer lethalen Dosis von 8,5 Gy in einer Kleintierbestrahlungsanlage mit zwei Cäsium-137-Quellen bestrahlt und erhielten danach autoklaviertes Trinkwasser versetzt mit Borgal³. Am nächsten Tag wurden Knochenmarkszellen präpariert (Kapitel 2.6.2), auf 25×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt und 200 μl davon intravenös injiziert. Acht Wochen später wurden die Mäuse in Versuche eingesetzt.

2.7.3 Inokulation mit L1C2-Tumorzellen

Einige Tage vor der Behandlung wurde die L1C2-Tumorzellen aufgetaut und in Testmedium kultiviert, um höhere Zellzahlen zu erhalten. Am Tag der Behandlung wurden die L1C2-Zellen geerntet, zweimal in PBS gewaschen, gezählt und auf 2×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt. Die Mäuse wurden mit Ketamin (Ratiopharm, 71,2 mg/Maus) und Rompun (Bayer, 0,2 mg/Maus) durch eine intraperitoneale Injektion betäubt und die beiden Flanken rasiert. An zwei Stellen jeder Flanke wurden 10^5 L1C2-Tumorzellen in 50 μl PBS injiziert. Die Tumore wurden am Versuchsende ausgemessen und der Mittelwert der Tumorfläche aus vier Tumoren pro Maus errechnet.

¹DNP = Dinitrophenyl ist ein Hapten. Haptene sind kleine organische Moleküle, die zur Gruppe der Antigene gehören, aber selbst keine Immunreaktion hervorrufen. Dies ist nur möglich, wenn an ein Trägerprotein gebunden sind.

²DNP-HSA = DNP ist an humanes Serumalbumin gebunden.

³Borgal = Antibiotikum, blockiert die Folsäure-Biosynthese von Bakterien.

2.8 MACS¹-gestützte Sortierung von Zellen

CD11b⁺-Zellen

Milz- oder Knochenmarkszellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben vorbereitet, alle B- und T-Zellen depletiert (Kapitel 2.6.3) und die CD11b⁺-Zellen aus diesem Zellgemisch mittels MACS abgetrennt. Hierfür wurde das CD11b MicroBead Kit der Firma Miltenyi verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

In Kürze, das Zellgemisch wurde mit den CD11b MicroBeads für 15 min bei 4°C inkubiert, wodurch nur die CD11b⁺-Zellen gezielt markiert wurden. Es erfolgte ein Waschschriff (5 min bei 500xg) zur Beseitigung nicht gebundener MicroBeads. Beim Durchfluss der Zellen durch eine magnetische Säule wurden nur die Zellen zurückgehalten, die MicroBeads auf der Zelloberfläche gebunden hatten. Nach Entfernung des Magnetfelds konnten so die CD11b⁺-Zellen eluiert werden.

Ly6G⁺-Zellen

Milzzellen wurden, wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben aufbereitet, alle B- und T-Zellen depletiert (Kapitel 2.6.3) und die Ly6G⁺-Zellen aus diesem Zellgemisch mittels MACS abgetrennt. Hierfür wurde das Anti-Ly6G-Biotin und Anti-Biotin-MicroBeads aus dem Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit (Miltenyi) der Firma Miltenyi verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

In Kürze, das Zellgemisch wurde mit Fc-Block für 10 min bei 4°C inkubiert, dann das Anti-Ly6G-Biotin dazugegeben und weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff zur Beseitigung nicht gebundener Biotin-Ly6G-Moleküle wurde mit Anti-Biotin-MicroBeads für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein Waschschriff (5 min bei 500xg) zur Beseitigung nicht gebundener anti-Biotin-MicroBeads. Beim Durchfluss der Zellen durch eine magnetische Säule wurden nur die Zellen zurückgehalten, die Anti-Ly6G-Biotin und Anti-Biotin-MicroBeads auf der Zelloberfläche gebunden hatten. Nach Entfernung des Magnetfelds konnten so die Ly6G⁺-Zellen eluiert werden. Die Zellen wurden gezählt, zweimal mit PBS gewaschen und auf 25x10⁶ Zellen/ml in PBS eingestellt. Davon wurden pro Maus 200 µl intravenös injiziert oder 100 µl subkutan verabreicht.

¹MACS = Magnetic-Activated Cell Sorting.

2.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS¹)

Zellen können anhand ihrer Größe und Granularität sowie der Expression verschiedener Moleküle unterschieden werden. Um Zellen nach diesen Kriterien zu analysieren, bedient man sich der Durchflusszytometrie. Hierbei werden die Zellen in einer Lösung durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Aus dem hierbei emittierten Licht können verschiedene Zelleigenschaften abgeleitet werden. Durch Anfärbung der Probe mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern, die gegen bestimmte zu untersuchende Merkmale gerichtet sind, kann sowohl die Oberfläche als auch das Innere einer Zelle untersucht werden.

Die Analysen erfolgten an den Geräten FACS Canto (BD) oder FACS LSRII (BD) und die Auswertung mit der Software FACS Diva (BD) oder FlowJo (Tree Star). Die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (Kapitel 2.4.1) wurden nach empfohlenen Konzentrationsangaben der Hersteller eingesetzt. Die Zellhaufen aus zwei und mehr Zellen wurden nicht in die Analyse einbezogen.

Für die meisten Anwendungen wurde eine Färbelösung mit ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffen und Fc-Block (gereinigtes anti-CD16/32) in GM-Puffer vorbereitet. Es wurden 10^6 Zellen in 50 μ l dieser Färbelösung für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit GM-Puffer gewaschen, in 200 μ l GM-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Untersuchung der frühen Hämatopoesestadien LT-HSC, ST-HSC und MPP wurden 3×10^6 Zellen zunächst mit biotinylierten Lineage-Antikörpern gegen CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8 α , CD45R (B220), TER119, Gr-1 und CD11b für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte und eine Markierung des Biotins mit PerCP-konjugiertem Streptavidin für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Nach zwei Waschschrten erfolgte eine Färbung mit CD135 (Flt3) und CD150 (SLAM) für 45 min bei 4°C im Dunkeln auf einem Schüttler. Die Zellen wurden danach zweimal mit GM-Puffer gewaschen, in 500 μ l GM-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Untersuchung der Myelopoesestadien CMP, GMP und MEP wurden 3×10^6 Zellen zunächst mit biotinylierten Lineage-Antikörpern gegen CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8 α , CD45R (B220), TER119, Gr-1 und CD127 für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte und eine Markierung des Biotins mit PerCP-konjugiertem Streptavidin für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Nach zwei Waschschrten erfolgte eine Färbung mit

¹FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting.

CD16/32 und CD34 für 45 min bei 4°C im Dunkeln auf einem Schüttler. Die Zellen wurden danach zweimal mit GM-Puffer gewaschen, in 500 μ l GM-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde unmittelbar vor der Analyse Propidiumiodid (1:200 aus 50 μ g/ml Stammlösung) hinzugegeben.

2.10 FACS-gestützte Sortierung von Zellen

Die CD11b⁺-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, angereichert und in GM-Puffer auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Eine entsprechende Menge an Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen Ly6G, Ly6C, CD11b und Fc-Block wurde dazu gegeben und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die CD11b⁺-Zellen entsprechend ihrer Oberflächenexpression mit Hilfe eines Sortiergerätes (FACS Aria und FACS Diva Software, beides von BD) aufgetrennt.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Präparation von DNA

Milz

Die Milz wurde über einem Sieb zerrieben und in 3 ml Genomic Lysis Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55°C zum Aufbrechen der Zellwände sowie zur Proteindenaturierung über Nacht inkubiert. Das gleiche Volumen an Phenol wurde hinzu gegeben, homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 min bei 600xg). Die wässrige Phase des Überstands wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Chloroform vermischt, homogenisiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Die Fällung der DNA erfolgte nun mit dem gleichen Volumen an Isopropanol. Nach einer Zentrifugation wurde das Pellet mit kaltem 70%-EtOH zweimal gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in einigen μ l TBE-Puffer gelöst, die Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm (UV-Vis-Spektrometer, Biomate 3) bestimmt und auf 0,5 mg/ml mit TBE-Puffer verdünnt. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Schwanzspitzen

Etwa 1-1,5 mm der Schwanzspitze wurde abgetrennt und in 100 μ l Genomic Lysis Puffer

mit 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 30 µl dieser Lösung mit 470 µl H₂O versetzt und 5 min bei 95°C die DNasen inaktiviert.

Sortierte Zellen

Ein Zellpellet aus jeweils 10⁵ Zellen wurde in 10 µl Genomic Lysis Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K gelöst und bei 55°C für 3 h inkubiert. Dann wurde die Lösung auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt und 5 min bei 95°C die DNasen inaktiviert.

2.11.2 Genotypisierung

Mit Hilfe der konventionellen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist es möglich bestimmte DNA-Abschnitte durch 10⁶-10⁷-fache Amplifikation nachzuweisen. Die präparierte DNA (siehe Kapitel 2.11.1) wurde mit folgenden Primern, Programmen und Ansätzen verwendet:

Kit-8 forward 5'-ACG TGA ATT CCT GGT CTA CAG AGC AAG ATC C-3'

Kit-8 reverse 5'-ACG TGA ATT CAT TAA TGC AGT TCT CAT GAG ACC-3'

Programm für *Kit-8*:

Vorheizen 98°C 30 sec

1. 98°C 30 sec
2. 60°C 30 sec
3. 72°C 2 min

Schritte 1-3 wurden 35x wiederholt.

PCR-Ansatz für *Kit-8*:

5x Phusion Buffer High Fidelity (Finnzyme) 5 µl

dNTP (200 µM) 0,5 µl

Phusion Polymerase (0,5 U) 0,25 µl

Primer (5 pmol) 1 µl

DNA (50 ng) 3 µl

H₂O 15,25 µl

***Kit*^{W-sh}** forward 5'-AGG CTT GCA GCG CAT TAT-3'

***Kit*^{W-sh}** reverse 5'-GAG GAT TCA TAG TTG TTC AAT GTC C-3'

WT forward 5'-TTT GCA CGT GCT AGT TAC AC-3'

WT reverse 5'-TTA AGA TGG CAC CCT GCT G-3'

Programm für *Kit*^{W-sh} und WT nach Nigrovic et al. [34]:

Vorheizen 94°C 5 min

1. 94°C 20 sec
2. 67°C 30 sec
3. 72°C 1 min
4. 72°C 10 min

Schritte 1-3 wurden 35x wiederholt.

PCR-Ansatz für *Kit*^{W-sh} und WT:

5x GoTaq Green Buffer (Fermentas) 5 µl

dNTP (200 µM) 0,5 µl

MgCl₂ 2 µl

GoTaq Polymerase (0,5 U) 0,25 µl

Primer (5 pmol) 1 µl

DNA (50 ng) 3 µl

H₂O 13,25 µl

Die amplifizierten DNA-Produkte wurden anschließend in einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anhand von Ethidiumbromid nachgewiesen.

2.12 Massenspektrometrische Methoden

Die massenspektrometrischen Analysen wurden an unserem Institut von der darauf spezialisierten Arbeitsgruppe von Dr. Stefan Tenzer durchgeführt. Die exakte Vorgehensweise kann an dieser Stelle nur grob skizziert werden.

2.12.1 Proteolytischer Verdau

Zellen wurden durch Zugabe von Lysepuffer lysiert und mittels Ultraschall homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde danach mittels Pierce 660 nm Protein Assay (Thermo, Rockford, IL) bestimmt und die Proteine (20 μg pro Probe) mit Trypsin (Trypsin Gold, Promega) nach der FASP-Methode von Wiśniewski [40] verdaut. Die Proteinlösung wurde in wässriger 0,1% (v/v) Ameisensäure auf die Konzentration von 200 ng/ μl verdünnt und mit 20 fmol/ μl Enolase 1 (*S. cerevisiae*) als tryptischem Standard (Waters Corporation) versetzt.

2.12.2 Massenspektrometrische Analyse

Die Flüssigchromatographie (LC) von tryptischen Peptiden wurde mit dem nanoAcquity System (Waters Corporation, Eschborn) durchgeführt, welches mit einer HSS-T3 C18 1,8 μm , 75 μm x 250 mm Säule ausgestattet war. Die Analyse der Peptide erfolgte am Synapt G2-S Massenpektrometer (Waters Corporation) im positiven ESI-Modus mit einer Auflösung von 25000 FWHM (full width half maximum) kombiniert mit einer on-line Ionenmobilitätsauftrennung. Im Niedrigenergie MS-Modus wurden die Daten bei konstanter Kollisionsenergie von 4 eV aufgenommen, im hochenergetischen Modus zwischen 25 und 55 eV. So wurden Zyklen aus beiden Energiemodi generiert und alle 1,5 sec ausgelesen. Jede Probe wurde in vier Replikaten gemessen.

2.12.3 Prozessierung der Daten und Identifizierung von Proteinen

Die generierten LC-Massenspektrometrie Daten wurden mit der Software ProteinLynx GlobalSERVER (PLGS) (Version 2.5.2, Waters Corporation) prozessiert und mit bekannten Maus-Proteinen in der Uniprot-Datenbank abgeglichen. Zusätzlich wurde nach Sequenzen von Enolase 1 (*S. cerevisiae*), bovinem Trypsin und humanen Keratinen gesucht. Die falschpositive Rate für die Proteinidentifizierung wurde anhand einer Suche in einer dreifach randomisierten Datenbank sowie zusätzlichen Prozessierungsschritten unter Berücksichtigung von Isoformen, Homologien, Replikaten und Score-Filter auf unter 0,3% reduziert [41]. So wurden nur Proteine berücksichtigt, die einen PLGS Identifizierungsscore von mindestens 250 zeigten und mindestens zweimal aus zwei Replikatmessungen durch eindeutige Peptidsequenzen aus sechs oder mehr Aminosäuren einem Protein zugeordnet werden konnten.

2.13 Histologische Methoden

2.13.1 Präparation von Ohrgewebe und Färbung von dermalen Mastzellen

Die Ohren der abgetöteten Mäuse wurden abgeschnitten, in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Roth) über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 5 μ m dünne Längsschnitte an einem Mikrotom angefertigt und auf Objektträger gelegt. Die Gewebsschnitte wurden 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%, 0% EtOH in H₂O) für jeweils 5-10 min rehydriert. Nach einer kurzen Trocknung wurden die Schnitte 1 h in Blockpuffer inkubiert. Die Färbung in Blockpuffer mit 2 mg/ml Avidin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen) erfolgte für 1 h in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden danach zweimal in PBS gewaschen, getrocknet, mit Entellan eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop (BZ 8000, Keyence) untersucht. Die Grundlage der Färbung beruht auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin an Heparin zu binden, welches in den Mastzellgranula enthalten ist.

2.13.2 Anfertigung von Zytospins und Färbung von Zellen

Die Objektträger wurden zunächst für 5 min mit Poly-L-Lysin beschichtet und getrocknet. 10⁵ Zellen wurden auf beschichteten Objektträger zentrifugiert und für 1 h getrocknet. Die Färbung erfolgte mit dem Hemacolor Set (Merck) nach Herstellerangaben. In Kürze, die Objektträger wurden 3x für einige Sekunden in Lösung 1 zum Fixieren eingetaucht, 5x in Lösung 2 und 3x in Lösung 3 zum Färben. Die überschüssige Farbe wurde mit Puffer nach Weise oder Leitungswasser abgespült, die Zytospins getrocknet, mit Entellan eingedeckt und am Fluoreszenzmikroskop (BZ 8000, Keyence) in der Hellfeld-Einstellung untersucht.

2.14 Statistische Methoden

Statistische Analysen wurden mittels t-Test (zweiseitig, ungepaart) durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, sobald $p < 0,05$ ergab. Die Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

3 ERGEBNISSE

Mastzell-defiziente Mäuse mit Mutationen im “white spotting” (W) Locus gehören zu den wichtigsten Werkzeugen zur Untersuchung von Mastzellfunktionen *in vivo*. Der Einsatz solcher Mäuse ermöglichte bisher das Wissen über Mastzellfunktionen in angeborener und adaptiver Immunität entscheidend zu erweitern [42]. Da alle bisherigen Erkenntnisse über die Mastzellfunktionen *in vivo* auf die WBB6F1-*Kit*^{W/W-v} und C57BL/6-*Kit*^{W-sh/W-sh}-Mäuse mit entweder gemischtem oder einheitlichem C57BL/6-Hintergrund zurückzuführen sind, war zur Untersuchung der Rolle von Mastzellen bei der Entstehung allergischer Erkrankungen und für die Beseitigung parasitärer Infektionen ein Th2-dominiertes Immunprofil wünschenswert. Im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen neigen die BALB/c-Mäuse viel stärker dazu, Th2-Immunantworten zu generieren.

Mastzell-defiziente *Kit*^{W-sh}-Mäuse auf dem genetischen Hintergrund des BALB/c-Inzuchtstammes wurden von unserer Arbeitsgruppe ursprünglich mit dem Ziel generiert, die Auswirkungen der An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen in einem zu Th2-Immunantworten neigenden Mausstamm zu untersuchen [43]. Darüber hinaus wurde dieser Stamm auch für die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegenden Experimente eingesetzt. Daher wird im Folgenden auf die Herstellung des Mastzell-defizienten BALB/c-Stammes mit der Bezeichnung C.B6-*Kit*^{W-sh} näher eingegangen.

3.1 Identifikation eines mit der *Kit*^{W-sh}-Mutation gekoppelten DNA-Polymorphismus und Generierung von Mastzell-defizienten C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen

Die *Kit*^{W-sh}-Mutation bei C57BL/6-Tieren ist phänotypisch durch eine weiße Schärpe um den mittleren Teil des Leibes auf ansonsten dunklem Fell bei heterozygoten Tieren gekennzeichnet [35,36]. Die homozygoten Tiere sind durch ein weißes Fell und schwarze Augen leicht erkennbar. Der BALB/c-Stamm ist jedoch albinotisch, was eine optische Typisierung bereits am Anfang einer *Kit*^{W-sh}-Zucht unmöglich machen würde. Die Identifikation der Mutation auf DNA-Ebene wurde somit unerlässlich.

Es war geplant, den Bereich um die zu Beginn dieser Arbeit nur ungenau lokalisierte 3'-Bruchstelle der Inversionsmutation oberhalb des c-Kit-Gens mittels “primer walking” abzutasten, bis keine Amplifikation durch PCR mehr möglich war. Danach sollte, ausgehend von nur einer bekannten Primersequenz, der flankierende und durch die

Inversion benachbarte unbekannte Sequenzabschnitt durch Inverse PCR identifiziert werden [44]. Zufällig aber wurde während des “primer walking” ein DNA-Längenpolymorphismus entdeckt, welcher mit der Kit^{W-sh} -Mutation gekoppelt ist. Dieser Längenpolymorphismus liegt in unmittelbarer Nähe der 3'-Bruchstelle der Inversion, die parallel durch Nigrovic et al. beschrieben wurde [34].

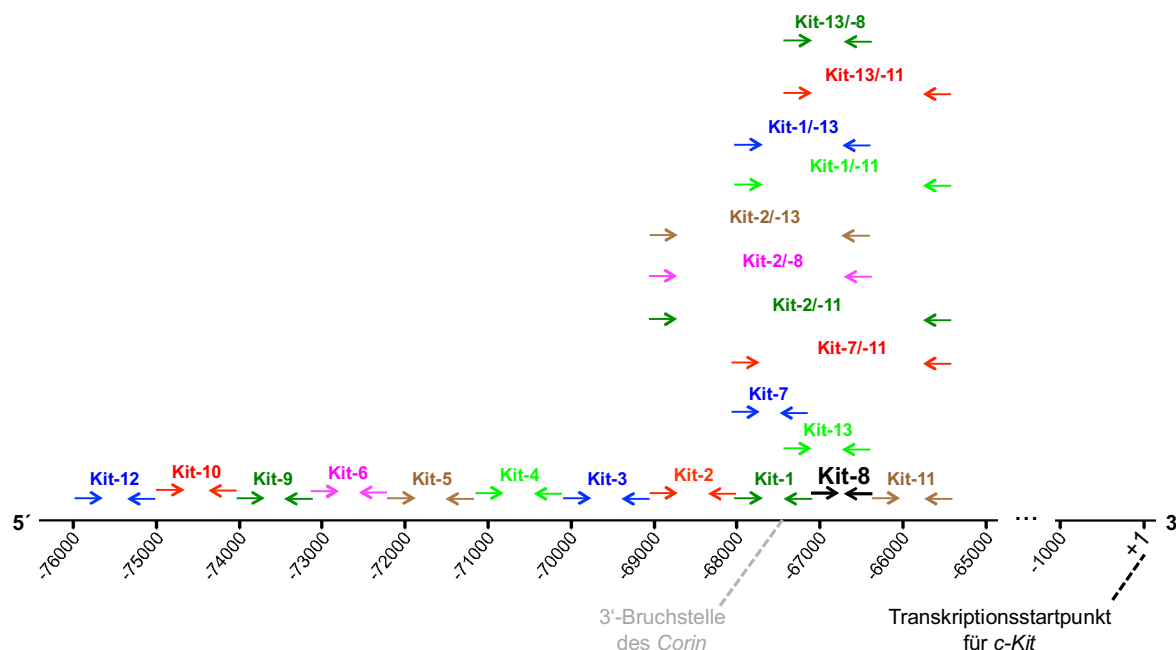
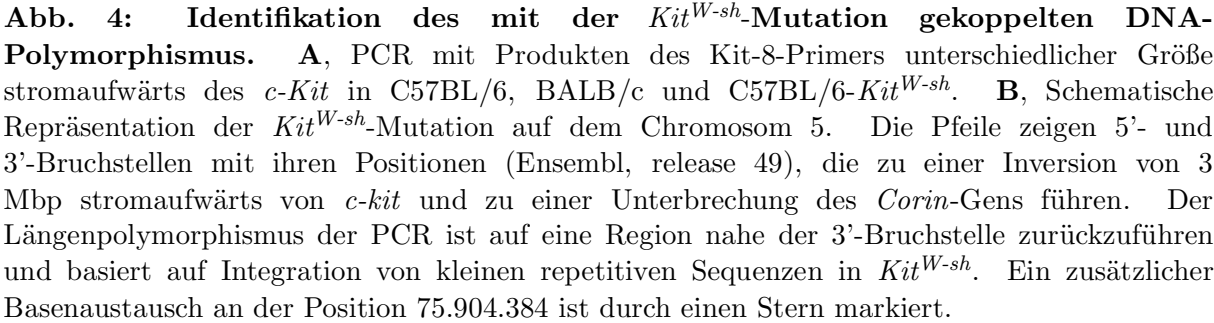


Abb. 3: Der Einsatz der “primer walking strategy” zur Lokalisation der 3'-Bruchstelle der Inversionsmutation oberhalb des eigentlichen *c-Kit*-Gens. Es ist der Bereich vor dem Transkriptionsstartpunkt des *c-Kit*-Gens auf dem Chromosom 5 dargestellt. Zur Bestimmung der 3'-Bruchstelle wurden zahlreiche Primerkombinationen verwendet. Der Transkriptionsstartpunkt von *c-Kit* wurde *per definitionem* als +1 bp gesetzt (Position 75.971.041, Ensembl, release 49) und die Inversion liegt etwa bei 67,5 kbp stromaufwärts davon.

Das schrittweise Vortasten an die Mutationsposition mittels der “primer walking strategy” (**Abb. 3**) erlaubte es, die 3'-Bruchstelle der Kit^{W-sh} -Inversion in C57BL/6- Kit^{W-sh} durch den Einsatz vieler Primerkombinationen präzise zu lokalisieren. Außerdem war es mit dem Kit-8-Primer möglich, einen Längenpolymorphismus in einer PCR-Reaktion festzustellen, welcher angrenzend an die 3'-Bruchstelle von Kit^{W-sh} liegt.



Nachdem der Polymorphismus auf DNA-Ebene identifiziert wurde, konnte die *Kit^{W-sh}*-Mutation durch Kreuzung in die albinotischen BALB/c-Mäuse eingebracht und nachgewiesen werden. Interessanterweise unterscheidet sich die PCR-Produktgröße dieses Sequenzbereichs auch zwischen den Stämmen C57BL/6 und BALB/c. Bei der Kreuzung der *Kit^{W-sh}*-Mutation von C57BL/6-*Kit^{W-sh}* auf BALB/c war es möglich, nicht nur die genetische Mutation mittels PCR in den Nachkommen zu verfolgen, sondern auch die Wildtyp-Allele von BALB/c und C57BL/6 zu unterscheiden. Das Auftreten kurzer repetitiver Sequenzen in diesem Abschnitt könnte ein Hinweis sein, weshalb es durch Rekombinationen überhaupt zu einer spontanen Inversionsmutation gekommen ist, die 1982 erstmals beschrieben wurde [36].

32

defizienten C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäuse sowie dazugehörige Wildtyp-Kontrolltiere erhielt man, indem heterozygote Nachkommen der 9. und 10. Generation untereinander verpaart wurden.

3.2 Phänotypische Charakterisierung der C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäuse

Zunächst war es wichtig festzustellen, ob die neu generierten Mäuse eine Mastzelldefizienz aufweisen und welche Wirkung die *Kit*^{W-sh}-Mutation auf andere Zellpopulationen ausübt. Hierzu wurden mastzelllose Mäuse mit den Wildtypen der Stämme BALB/c und C57BL/6 verglichen.

Durch Anwendung des Modells der passiven kutanen Anaphylaxis (passive cutaneous anaphylaxis - PCA) war es möglich, die An- bzw. Abwesenheit von dermalen Mastzellen zu untersuchen. Die dermalen Mastzellen wurden zunächst lokal mit spezifischem monoklonalem IgE, das durch subkutane Applikation in das Ohrgewebe injiziert wurde, beladen. Anschließend wurden die mit IgE beladenen Mastzellen durch systemische Gabe von Antigen aktiviert. Das Ergebnis ist die klassische Reaktion des Soforttyps, d. h. eine rasche Degranulation der Mastzellen verbunden mit Mediatorfreisetzung, was lokal zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führt. Um die Stärke der Mastzellaktivierung messen zu können, wurde das Antigen in Kombination mit einem Farbstoff i.v. injiziert. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität erlaubt den Austritt des Farbstoffes aus den Gefäßen in das umliegende Gewebe. Zur Quantifizierung kann der Farbstoff danach aus dem Ohrgewebe extrahiert und photometrisch gemessen werden.

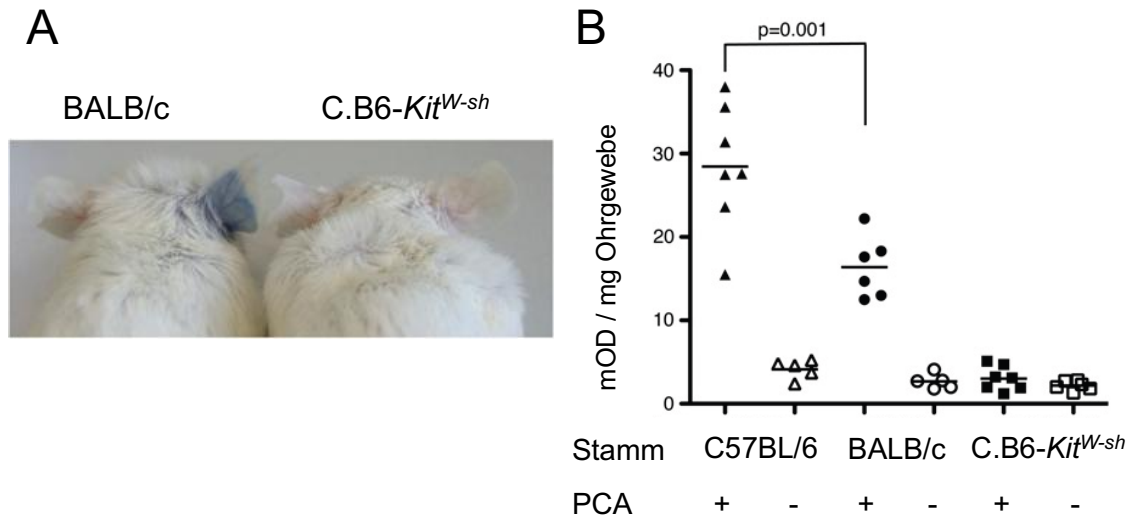


Abb. 5: C.B6-Kit^{W-sh}-Mäuse entwickeln keine passive kutane Anaphylaxis. Durch intradermale Injektion von 1 μ g DNP-spezifischem IgE ins rechte Ohr wurden die lokalen Mastzellen sensibilisiert und 24h später durch i.v. Injektion von Antigen, 0,5mg/ml DNP-HSA, zusammen mit 0,5% Evans Blau aktiviert. 30 min nach der Injektion wurden die Tiere getötet, der Farbstoff aus den Ohren extrahiert und der Gehalt photometrisch bestimmt. **A**, Wenige Minuten nach der Antigeninjektion tritt eine Blaufärbung in den mit IgE sensibilisierten Ohren auf. **B**, Zur Quantifizierung des extrahierten Farbstoffes Evans Blau wurde die Absorption bei 620nm gemessen. Die gemessene Absorption (OD = optische Dichte) des extrahierten Farbstoffes wurde pro mg des gewogenen Ohrgefäßes errechnet. n=5-7 Tiere pro Gruppe.

Wie aus der **Abb. 5** hervorgeht, entwickeln die C.B6-Kit^{W-sh}-Tiere keine passive kutane Anaphylaxis auf Grund der Mastzelldefizienz. Dass mastzelllose C57BL/6-Kit^{W-sh}-Mäuse ebenfalls keine passive kutane Anaphylaxis entwickeln, wurde bereits im Jahre 2007 in der Arbeit von Zhou et al. [45] gezeigt.

Außerdem ist noch zu erkennen, dass die Mäuse des Stammes C57BL/6 im Gegensatz zu den BALB/c-Tieren eine deutlich intensivere Antwort nach Antigeninjektion entwickeln, was mit den bereits publizierten Daten von Noguchi et al. [46] übereinstimmt. Die Autoren zeigen *in vitro*, dass durch Antigen-Kreuzvernetzung aktivierte C57BL/6-BMMC¹ höhere Mengen an präformierten proinflammatorischen Mediatoren, wie beta-Hexosaminidase und Histamin aus den Granula freisetzen. Dagegen sind die BALB/c-BMMC in der Lage, höhere Mengen an proinflammatorischen Mediatoren *de novo* zu synthetisieren. Unterschiedliche Anzahlen von Mastzellen in der Ohrhaut (**Abb. 6A**) können als Ursache jedenfalls ausgeschlossen werden.

¹BMMC = bone marrow-derived mast cells, *in vitro*-Äquivalent für mukosale Mastzellen.

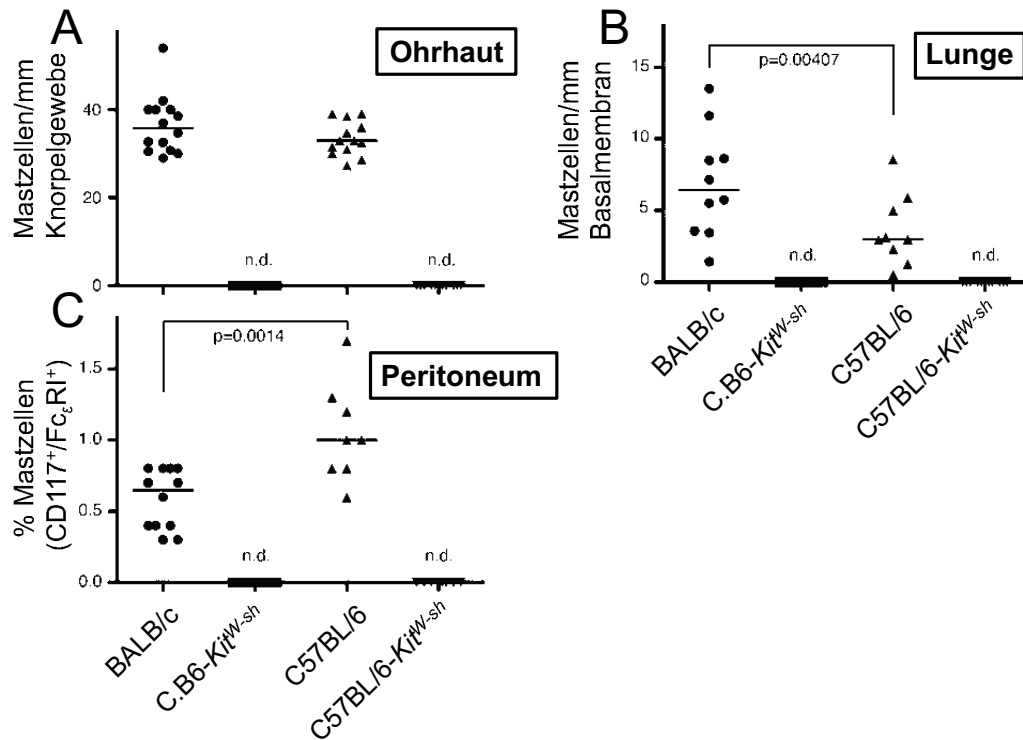


Abb. 6: C.B6-Kit^{W-sh}-Mäuse sind Mastzell-defizient. **A**, Ohren und **B**, Lungen wurden zunächst mit Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten. Der Mastzellnachweis erfolgte mittels Auszählung der mit fluoreszenzgekoppeltem Avidin gefärbten Zellen. **C**, Durch Peritoneallavage isolierte Zellen wurden mittels FACS auf die Expression von Fc ϵ RI und c-Kit (CD117) untersucht. Die doppelt positiven Zellen wurden als Mastzellen identifiziert. n=8-14 Tiere pro Gruppe. n.d.=nicht detektierbar.

Histologische Untersuchungen unterschiedlicher Gewebeproben bestätigen die Mastzelldefizienz der generierten C.B6-Kit^{W-sh}-Tiere. In **Abb. 6** ist veranschaulicht, dass in der Ohrhaut der Tiere mit der Kit^{W-sh}-Mutation keine Mastzellen aufzufinden sind. Dies trifft auf die beiden genetischen Hintergründe gleichermaßen zu. Weiterhin beobachtet man in den Lungen der BALB/c-Mäuse ein leicht erhöhtes Vorkommen der Mastzellen, im Peritoneum dagegen ist es umgekehrt.

Eine weitere Fragestellung war, inwieweit die Expression des Oberflächenrezeptors c-Kit auf anderen Zelltypen beeinträchtigt sein könnte, wenn eine Kit^{W-sh}-Mutation vorliegt. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen von Knochenmark und Blut hergestellt und mittels FACS auf die Expression von c-Kit untersucht.

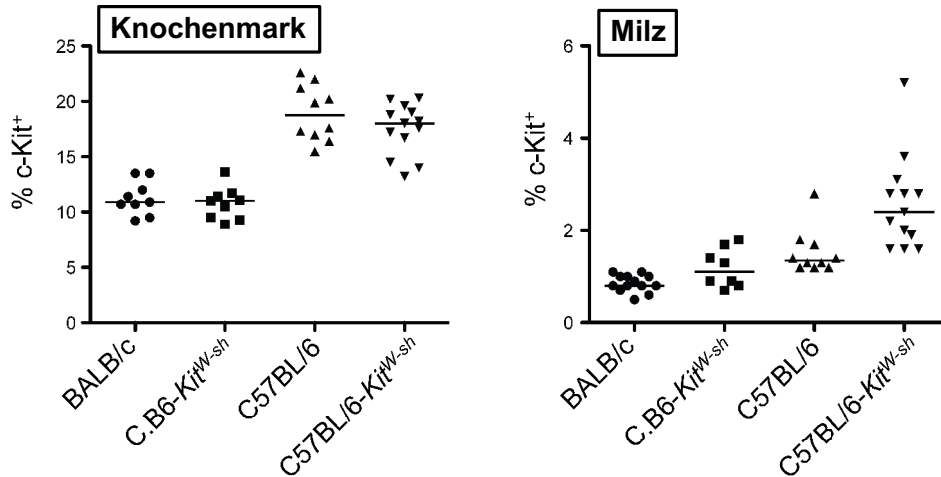


Abb. 7: Die Expression von c-Kit ist in C.B6-Kit^{W-sh}-Mäusen kaum beeinträchtigt. Zellen aus Knochenmark und Milzen wurden mittels FACS auf die Expression von c-Kit untersucht und als prozentualer Anteil dargestellt. n=8-13 Tiere pro Gruppe.

Wie in der **Abb. 7** dargestellt, scheint die Expression durch die *Kit^{W-sh}*-Mutation im Knochenmark unbeeinflusst zu sein, wobei die C57BL/6-Mäuse eine allgemein höhere c-Kit-Expression aufweisen. Dieser stammspezifische Unterschied ist in geringerem Maße auch in der Milz zu beobachten. Auffällig ist die erhöhte Expression von c-Kit in den Milzen der C57BL/6-Kit^{W-sh}-Mäuse, was mit bereits publizierten Ergebnissen übereinstimmt [34]. Eine geringe, aber dennoch statistisch signifikante Erhöhung c-Kit-exprimierender Zellen ist in den Milzen der C.B6-Kit^{W-sh}-Mäuse zu beobachten. Im Knochenmark ist jedoch kein Unterschied zwischen Wildtypen und *Kit^{W-sh}*-Mäusen zu beobachten.

Da *Kit^{W-sh}*-Mäuse keine detektierbaren Mastzellen aufweisen, könnte möglicherweise ein anderer Zelltyp mit ähnlichen Funktionseigenschaften, wie z. B. die basophilen Granulozyten, vermehrt vorkommen. Daher wurde untersucht, ob der Anteil der basophilen Granulozyten durch das Auftreten der *Kit^{W-sh}*-Mutation beeinflusst wird. Hierzu wurden Proben vom Knochenmark und Blut entnommen und mittels FACS der Anteil der basophilen Granulozyten bestimmt.

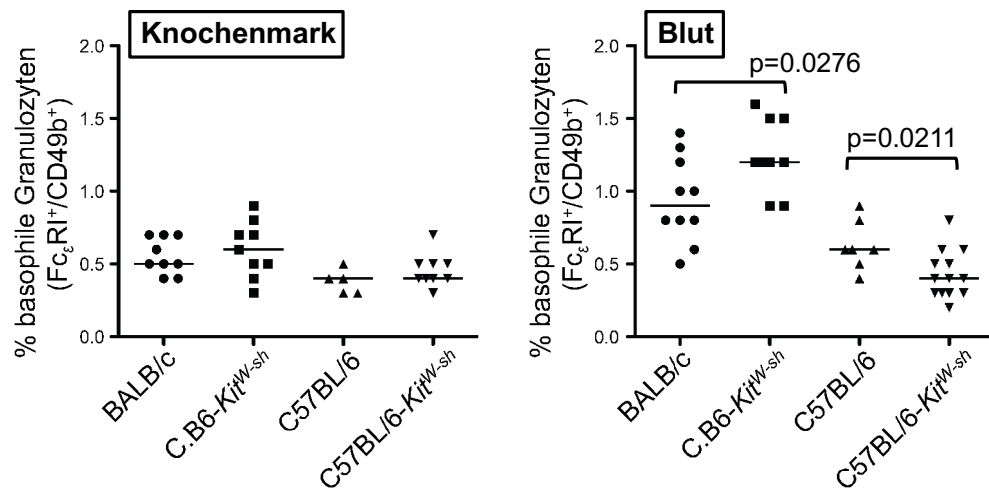


Abb. 8: Die *Kit*^{W-sh}-Mutation hat Einfluss auf das Vorkommen basophiler Granulozyten im Blut. Zellen aus Knochenmark und Blut wurden mittels FACS auf die Expression von Fc ϵ RI und CD49b untersucht und als prozentualer Anteil doppelt positiver Zellen dargestellt. n=5-13 Tiere pro Gruppe.

Wie in der **Abb. 8** zu erkennen ist, bleibt der Anteil basophiler Granulozyten im Knochenmark von der *Kit*^{W-sh}-Mutation unbeeinflusst. Im Blut hingegen führt die *Kit*^{W-sh}-Mutation in BALB/c zu einer moderaten Vergrößerung und in C57BL/6 zu einer leichten Verminderung der Population basophiler Granulozyten. Auffällig ist weiterhin die stammspezifische relative Expansion basophiler Granulozyten im Blut von BALB/c-Mäusen, was mit den öffentlich zugänglichen Daten von MPD¹ übereinstimmt.

¹MPD = Mouse Phenome Database (<http://phenome.jax.org>), C57BL/6 vs. BALB/c.

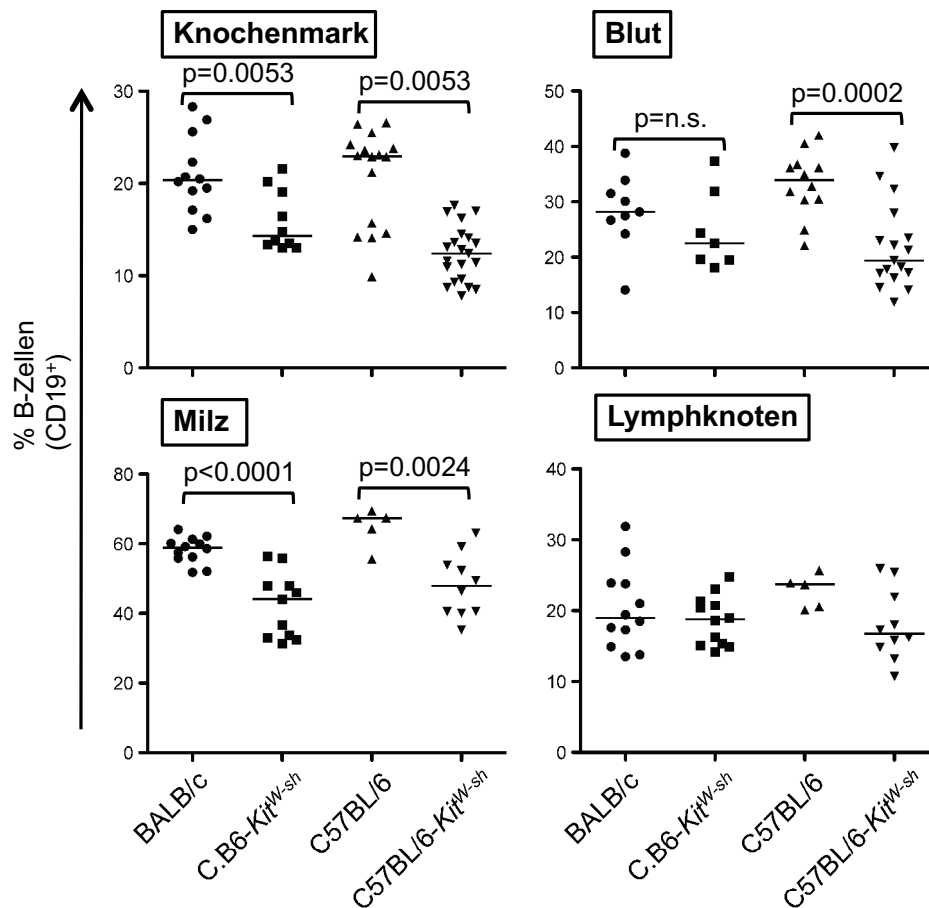


Abb. 9: Die Kit^{W-sh} -Mutation verursacht eine Abnahme der B-Zellpopulation. Zellen aus Knochenmark, Blut, Milz und Lymphknoten wurden mittels FACS auf die Expression von CD19 untersucht und als prozentualer Anteil dargestellt. n=5-21 Tiere pro Gruppe.

Im Hinblick auf die CD19-positiven B-Zellen kann eine moderate Reduktion in Mäusen mit Kit^{W-sh} -Mutation ermittelt werden.

Wie aus der **Abb. 9** hervorgeht, lässt sich diese Tendenz in beiden Stämmen nachweisen. Da c-Kit eine außerordentlich wichtige Komponente in der Hämatopoese darstellt [47], wurden weitere Zelltypen auf Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung untersucht. So wurden CD4- und CD8-positive Lymphozyten sowie CD11c-exprimierende dendritische Zellen in Thymus, Lymphknoten, Milz und Blut analysiert. Es konnte jedoch kein Unterschied in den jeweiligen Zellzahlen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

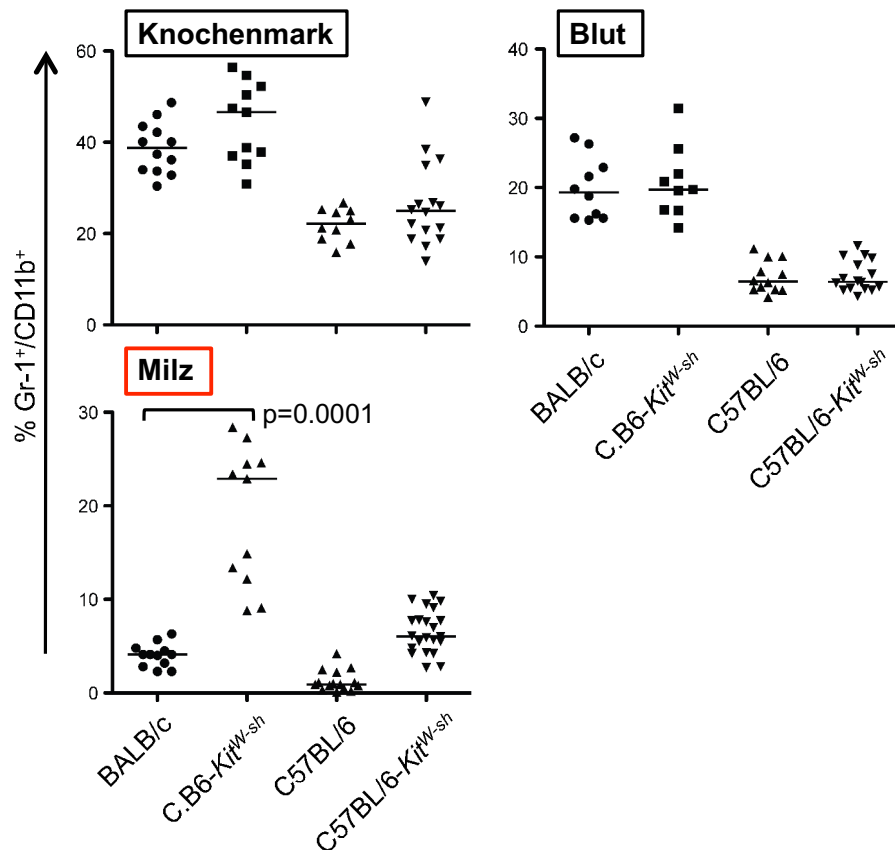


Abb. 10: Massive Expansion von Zellen mit dem Phänotyp neutrophiler Granulozyten in Milzen Mastzell-defizienter Mäuse. Zellen aus Knochenmark, Blut und Milz wurden mittels FACS auf Ko-Expression von Gr-1 und CD11b untersucht und deren prozentuale Anteile dargestellt. n=9-23 Tiere pro Gruppe.

Die Ergebnisse der Analyse doppelt positiver Gr-1/CD11b Zellen (**Abb. 10**) zeigen deren generelle Expansion in den Tieren auf dem BALB/c-Hintergrund, was im Einklang mit den Ergebnissen der MPD steht. In den Milzen der C57BL/6-Tiere verursacht die *Kit*^{W-sh}-Mutation eine markante Expansion doppelt positiver Gr-1/CD11b Zellen, nicht aber in Blut und Knochenmark. Eine ähnliche Situation ist in den Tieren des BALB/c-Hintergrundes zu beobachten, wobei dort der Unterschied in den Milzen noch drastischer ausgeprägt ist.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die *Kit*^{W-sh}-Mutation in beiden Stämmen in die hämatopoetische Entwicklung mancher Zelltypen eingreift. Die systemische Abwesenheit der Mastzellen bei erwachsenen Tieren ist nicht die einzige Auswirkung der Mutation, es sind vor allem die doppelt positiven Gr-1/CD11b Zellen, deren verstärkte Expansion in den Milzen *Kit*^{W-sh}-Tiere beider Stämme auftritt und insbesondere bei C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen extrem ausgeprägt ist.

3.3 Die *Kit^{W-sh}*-Mutation verursacht Veränderungen in der Hämatopoese

Wie die **Abb. 10** zeigt, ist eine deutliche Erhöhung CD11b und Gr-1 ko-exprimierender Splenozyten in *Kit^{W-sh}*-Mäusen zu beobachten.

Das Ziel weiterer Experimente war demnach zu untersuchen, was die Ursache für diese mögliche Neutrophilie ist. Eine niedrigere Sterberate oder eine erhöhte Proliferationsrate der doppelt positiven Gr-1/CD11b Zellen konnten als Ursachen nach bereits wenigen Versuchen ausgeschlossen werden. Beide Parameter unterscheiden sich kaum zwischen Mutanten und Wildtyp-Tieren (Daten nicht gezeigt). Somit können nur höhere Zahlen von Vorläuferzellen die Erklärung des Phänomens liefern.

Von Nigrovic et al. [34] wurde erstmals beschrieben, dass C57BL/6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse eine Splenomegalie ausbilden. Aufbauend auf diesem Befund wurde untersucht, ob sich in C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen ebenfalls eine Splenomegalie bildet und, falls ja, dies auf extramedulläre Hämatopoese in der Milz zurückzuführen ist.

Hierzu wurden Milzen von BALB/c und C.B6-*Kit^{W-sh}* präpariert, gewogen und die Einzelzellsuspension in mit wachstumsfördernden Zytokinen angereichertem Methylcellulose-Medium eine Woche lang kultiviert.

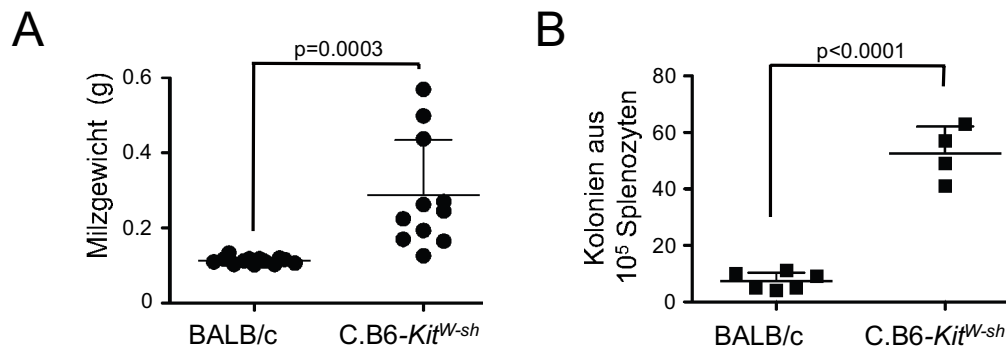


Abb. 11: *Kit^{W-sh}*-Mäuse weisen eine Splenomegalie und einen erhöhten Anteil proliferierender Splenozyten auf. Milzen von 10 Wochen alten C.B6-*Kit^{W-sh}* und von dazugehörigen Wildtypen wurden gewogen (**A**), eine Einzelzellsuspension hergestellt und zu je 10⁵ Zellen in einem mit Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-6, SCF und Epo) angereichertem Methylcellulose-Medium für eine Woche ausplattiert. Anschließend wurden die Zellkolonien aus mindestens 50 Zellen ausgezählt (**B**). n=4-13 Tiere pro Gruppe.

Die **Abb. 11A** veranschaulicht das dreifach erhöhte Milzgewicht in *Kit^{W-sh}*-Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyptieren. Auch fällt in **Abb. 11B** das massive Vorkommen von Zellen mit hohem Proliferationspotenzial unter den *Kit^{W-sh}*-Splenozyten auf.

Dieses Ergebnis deutet auf extramedulläre Hämatopoese in den Milzen von *Kit^{W-sh}*-Tieren hin, weshalb im nächsten Schritt die Anteile undifferenzierter hämatopoetischer Vorläuferzellen bestimmt wurden.

Milz- und Knochenmarkszellen von BALB/c und C.B6-*Kit^{W-sh}* wurden mit Antikörpern gegen definierte Moleküle auf der Oberfläche ausdifferenzierter Zellen markiert¹, um Zellen aus der Analyse ausschließen zu können, die bereits ausdifferenziert sind. Die restlichen, unreifen Vorläuferzellen werden als “Lineage negative” Zellen bezeichnet.

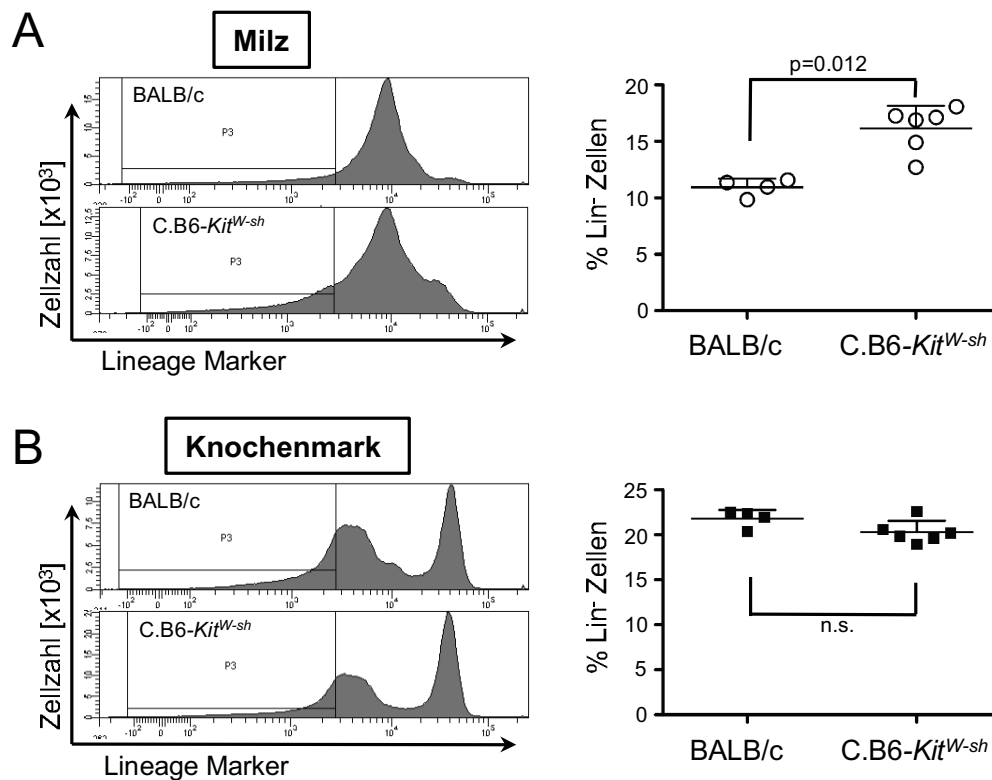


Abb. 12: In den Milzen der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse akkumulieren unreife “Lineage-negative” Zellen. Milz- und Knochenmarkszellen von BALB/c und C.B6-*Kit^{W-sh}* wurden mit biotinylierten Antikörpern spezifisch gegen CD3e, CD4, CD8, CD5, CD45R (B220), Gr1, CD11b, CD127 und TER119 markiert und mit PerCP-gekoppeltem Streptavidin angefärbt. Anschließend wurde der Anteil der Lineage-negativen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. In **A** sind die für die jeweilige Gruppe stellvertretenden Histogramme sowie die prozentualen Anteile Lineage-negativer Zellen in der Milz dargestellt. In **B** die für Knochenmark. n=4-6 pro Gruppe.

Aus der **Abb. 12** geht hervor, dass in den Milzen der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse vermehrt Lineage-negative Zellen vorkommen, wohingegen im Knochenmark kein Unterschied zu Wildtypen zu beobachten ist. Im Blut jedoch kann, bei ohnehin sehr geringem Anteil von Lineage-negativen Zellen, kein Unterschied beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

¹Lineage Marker Mix aus CD3e, CD4, CD8, CD5, CD45R (B220), Gr1, CD11b, CD127 und TER119. Ausdifferenzierte T-Zellen, B-Zellen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Erythrozyten werden markiert.

Weiterhin wurde präzisiert, um welche Vorläufer es sich unter den Lineage-negativen Zellen in den Milzen der *Kit^{W-sh}*-Mäuse genau handelt. Hierfür wurden die hämatopoetischen Vorläufer nach den von Passegue et al. [48] und Akashi et al. [49] beschriebenen Methoden durchflusszytometrisch untersucht. Somit war es möglich, die unreifen (LT-HSC¹) und die reiferen Stammzellen (ST-HSC²) von den multipotenten Vorläufern (MPP³) zu unterscheiden. Ein Teil der MPP entwickelt sich zu gemeinsamen lymphoiden Vorläufern (CLP) und ein anderer zu gemeinsamen myeloiden Vorläufern (CMP⁴), die den Ursprung für granulozytär-monocytäre Vorläufer (GMP⁵) und megakaryozytär-erythroide Vorläufer (MEP⁶) darstellen (siehe **Abb. 13A**).

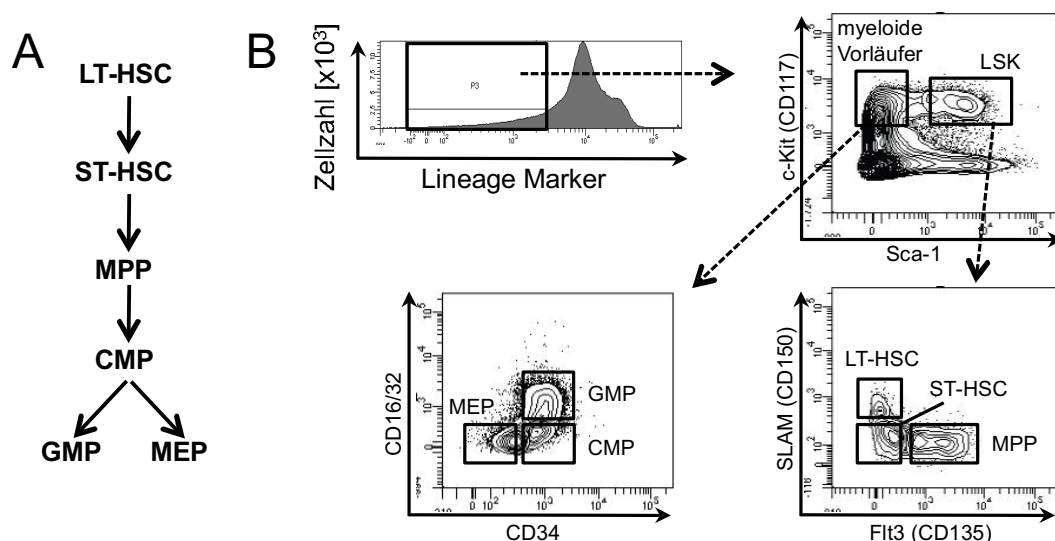


Abb. 13: Strategie zur durchflusszytometrischen Untersuchung der Myelopoese. **A**, Elementares Schema der adulten murinen Myelopoese. Aus den unreifen Stammzellen (LT-HSC) bilden sich die reiferen Stammzellen (ST-HSC), aus denen die multipotenten Vorläufer (MPP) entstehen. Daraus entstehen die gemeinsamen myeloiden Vorläufer (CMP) als Ursprung von sowohl granulozytär-monocytären Vorläufern (GMP) als auch von megakaryozytär-erythroiden Vorläufern (MEP). **B**, Die Lineage-negativen Zellen können mittels Anfärbung von c-Kit und Sca1 in die sogenannten LSK ($\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{Sca-1}^{\text{pos}}/\text{Kit}^{\text{pos}}$) und myeloischen Vorläufer ($\text{Lin}^{\text{neg}}/\text{Sca-1}^{\text{neg}}/\text{Kit}^{\text{pos}}$) unterteilt werden. Unter den LSK können durch Flt3 (CD135) und SLAM (CD150) die LT-HSC, die ST-HSC und die MPP unterschieden werden. Die myeloischen Vorläufer im c-Kit/Sca1-Dotplot können durch CD34 und CD16/32 in CMP, GMP und MEP unterschieden werden.

¹Long-term hematopoietic stem cells, lebenslange Fähigkeit zur Selbsterneuerung, niedrige Proliferationsrate.

²Short-term hematopoietic stem cells, eingeschränktes Selbsterneuerungs-Potenzial, hohe Proliferationsrate.

³Multipotent progenitors, keine Selbsterneuerung und hohes Differenzierungs-Potenzial.

⁴Common myeloid progenitors, Vorläufer aller myeloiden Zellen.

⁵Granulocyte-monocyte progenitors, eingeschränktes Differenzierungs-Potenzial.

⁶Megakaryocyte-erythroid progenitor, eingeschränktes Differenzierungs-Potenzial.

In der **Abb. 13B** ist die Vorgehensweise zur Untersuchung von hämatopoetischen Zellen veranschaulicht. Nach diesem Prinzip wurden die Milz- und Knochenmarkzellen von BALB/c- und C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen analysiert und die daraus entstandenen Resultate in folgenden Abbildungen dargestellt.

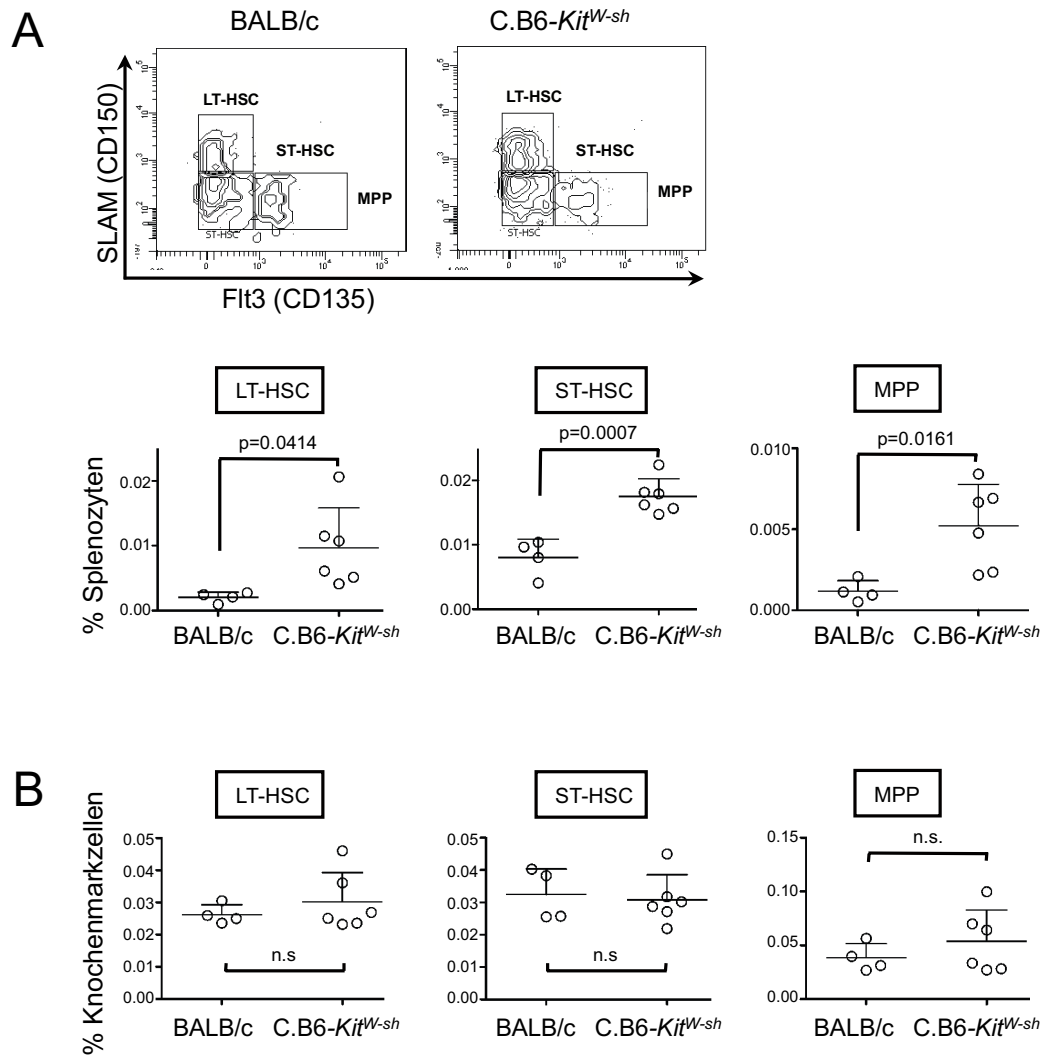


Abb. 14: Die *Kit^{W-sh}*-Mutation bewirkt eine Zunahme von hämatopoetischen Stammzellen in der Milz. Lineage-negative (A) Milz- und (B) Knochenmarkzellen aus BALB/c und C.B6-*Kit^{W-sh}* wurden mit Antikörpern gegen c-Kit, Sca-1, CD135 und CD150 gefärbt und die LT-HSC, ST-HSC und MPP durchflusszytometrisch quantifiziert. In A sind außerdem die für die jeweilige Gruppe stellvertretenden Dichteverteilungsplots der Splenozyten gezeigt.

Die in der **Abb. 14** gezeigten Ergebnisse lassen eine Anhäufung von LT-HSC, ST-HSC und von MPP in Milzen mastzellloser Mäuse feststellen. Im Knochenmark hingegen kann kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass in *Kit^{W-sh}*-Tieren bereits die frühe Hämatopoese zum Teil auch in der Milz stattfindet.

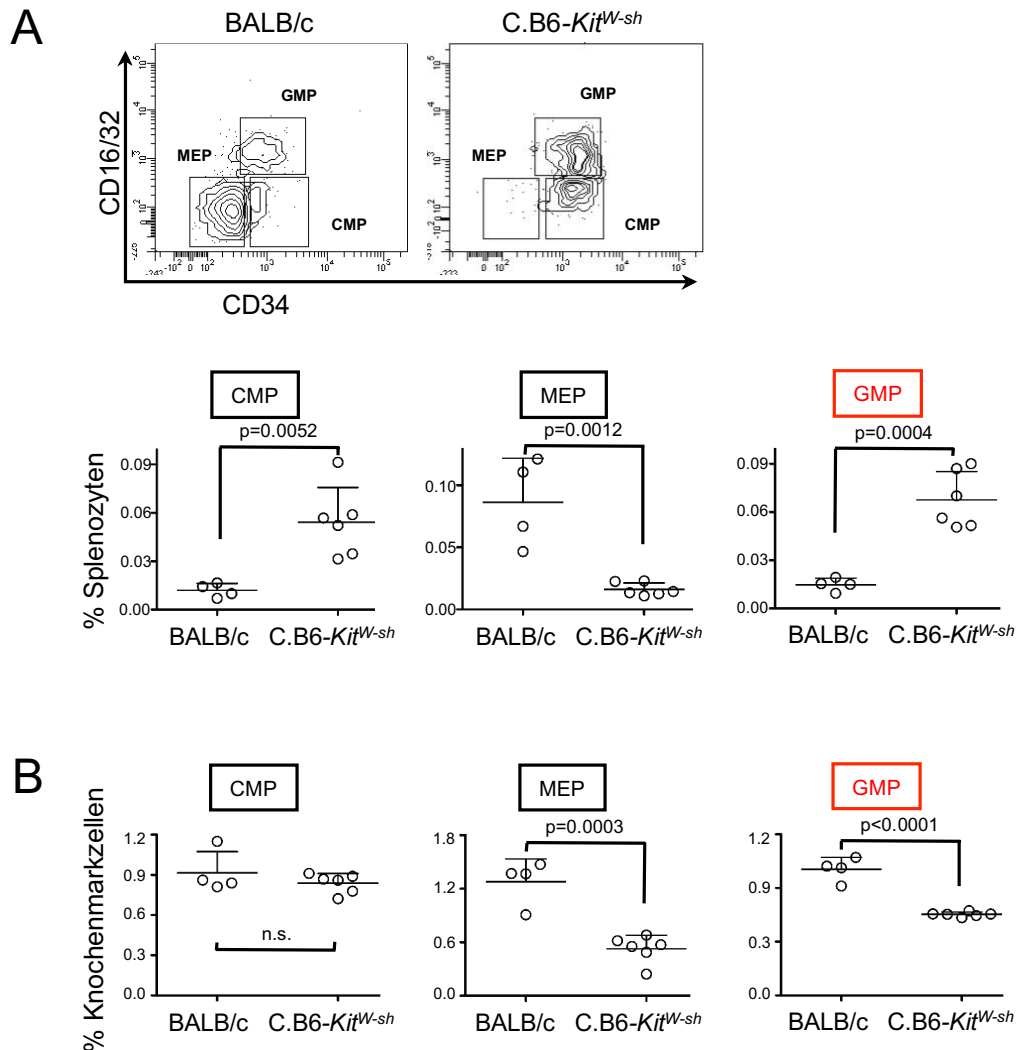


Abb. 15: In *Kit^{W-sh}*-defizienten Tieren ist die Entwicklung von MEP und GMP dereguliert. Lineage-negative (A) Milz- und (B) Knochenmarkzellen aus BALB/c und C.B6-*Kit^{W-sh}* wurden mit Antikörpern gegen c-Kit, Sca-1, CD16/32 und CD34 gefärbt und die gemeinsamen myeloiden Vorläufer (CMP), megakaryozytär-erythroide Vorläufer (MEP) und granulozytär-monocytären Vorläufer (GMP) durchflusszytometrisch analysiert. A veranschaulicht zusätzlich die für die jeweilige Gruppe stellvertretenden Dichteverteilungsplots der Splenozyten.

Desweiteren wurden die nachfolgenden Entwicklungsstufen, wie CMP, MEP und GMP, näher untersucht. **Abb. 15A** zeigt anhand der Dichteverteilungsplots eindrucksvoll eine Störung in der Myelopoese mastzellloser Tiere.

In der Milz von *Kit^{W-sh}*-Tieren ist auffällig, dass es, verglichen mit den Wildtyptieren, zu einer starken Expansion von CMP kommt (**Abb. 15A**). Deren weitere Entwicklung zu MEP und GMP ist durch die *Kit^{W-sh}*-Mutation ebenfalls in der Form beeinflusst, dass es zu einer starken Reduktion von MEP und einer Expansion von GMP kommt (**Abb. 15A**). Im Knochenmark hingegen sind die prozentualen Anteile der CMP in beiden Stämmen

vergleichbar (**Abb. 15B**), jedoch findet sich auch dort eine Verringerung der Zahl an MEP in Tieren mit Kit^{W-sh} -Mutation. Überraschenderweise ist die GMP-Population im Knochenmark mastzellloser Tiere deutlich kleiner als im Wildtyp (**Abb. 15B**).

Die einzige bislang bekannte Auswirkung der Kit^{W-sh} -Mutation ist die deregulierte Oberflächenexpression von c-Kit. Deshalb wurde die c-Kit-Expression während der Myelopoese auf den Vorläuferzellen untersucht.

In der Milz gibt es hinsichtlich der c-Kit-Expression (**Abb. 16A**) auf beiden HSC-Populationen und MPP keine erkennbaren Unterschiede, wohingegen im Knochenmark (**Abb. 16B**) der C.B6- Kit^{W-sh} eine c-Kit-Deregulation erkennbar wird. Die nachfolgenden Differenzierungsstufen zeigen deutlichere Unterschiede, nun sind von der c-Kit-Reduktion alle Differenzierungsstufen in beiden Organen betroffen. Dabei wird die c-Kit-Expression mit der fortschreitenden Zelldifferenzierung immer stärker reduziert.

In den Kit^{W-sh} -Tieren auf dem C57BL/6-Hintergrund wurde die Myelopoese ebenfalls untersucht und ergab ein sehr ähnliches Bild (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich die Aussage treffen, dass die beobachteten Resultate ausschließlich auf die Effekte der Kit^{W-sh} -Mutation zurückzuführen sind und nichts mit dem genetischen Hintergrund der Tiere zu tun haben.

Das vermehrte Aufkommen von GMP ist mit großer Wahrscheinlichkeit die Ursache der massiven Expansion der in der **Abb. 10** dargestellten Gr-1⁺/CD11b⁺-Zellen in der Milz der C.B6- Kit^{W-sh} -Mäuse. Diese vermehrt auftretende Zellpopulation wurde im Hinblick auf ihre Morphologie und Funktion in weiteren Experimenten näher untersucht.

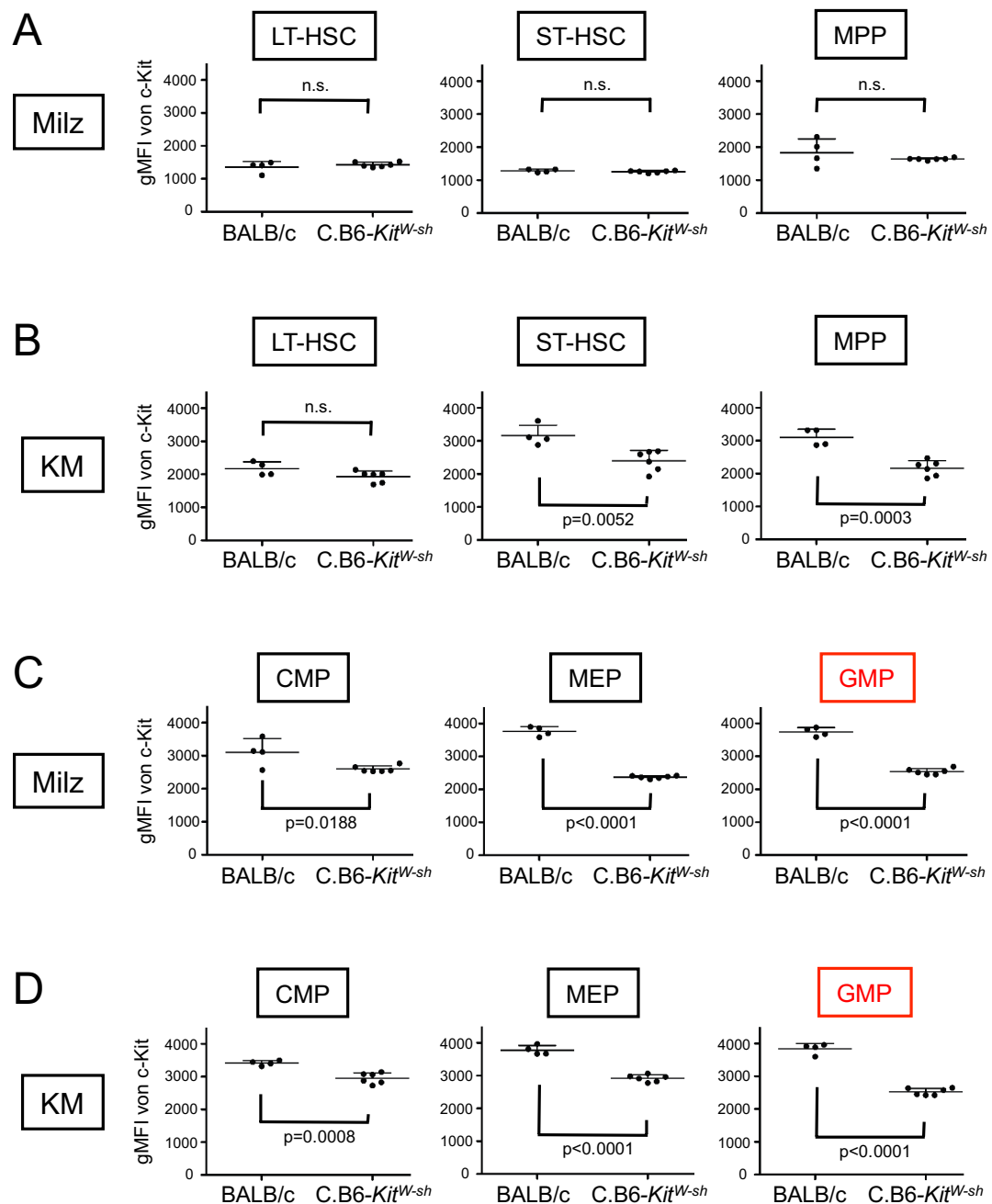


Abb. 16: Mit der fortschreitenden Zelldifferenzierung während der Myelopoese wird die c-Kit-Expression in C.B6-Kit^{W-sh} reduziert. Die c-Kit-Zelloberflächenexpression auf den beschriebenen Entwicklungsstufen der Myelopoese (siehe Abb. 13A) in BALB/c und C.B6-Kit^{W-sh} wurde mittels FACS untersucht und als geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität dargestellt. LT-HSC, ST-HSC und MPP in der Milz (A) und Knochenmark (B). CMP, MEP und GMP in der Milz (C) und Knochenmark (D). KM=Knochenmark.

3.4 Die *Kit*^{W-sh}-Mutation führt durch einen intrinsischen Effekt zur Akkumulation von CD11b⁺/Ly6G^{int}/Ly6C⁺- und CD11b⁺/Ly6G^{high}/Ly6C⁺-Zellen in der Milz

Die im vorherigen Kapitel gezeigte exzessive extramedulläre Myelopoese in der Milz der *Kit*^{W-sh}-Tiere ist höchstwahrscheinlich die Ursache für das massive Auftreten CD11b⁺ und Gr-1⁺ doppelt positiver Zellen (siehe **Abb. 10**). Nun sollte die Gr-1⁺/CD11b⁺-Population detailliert charakterisiert werden.

Der in unseren Vorarbeiten eingesetzte anti-Gr-1-Antikörper (Klon RB6-8C5) erkennt ein gemeinsames Epitop für Ly6G und Ly6C. Deshalb wurde eine Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Ly6G (Klon 1A8) und Ly6C (Klon HK1.4 oder Klon AL-21) auf CD11b-positiven Zellen durchgeführt.

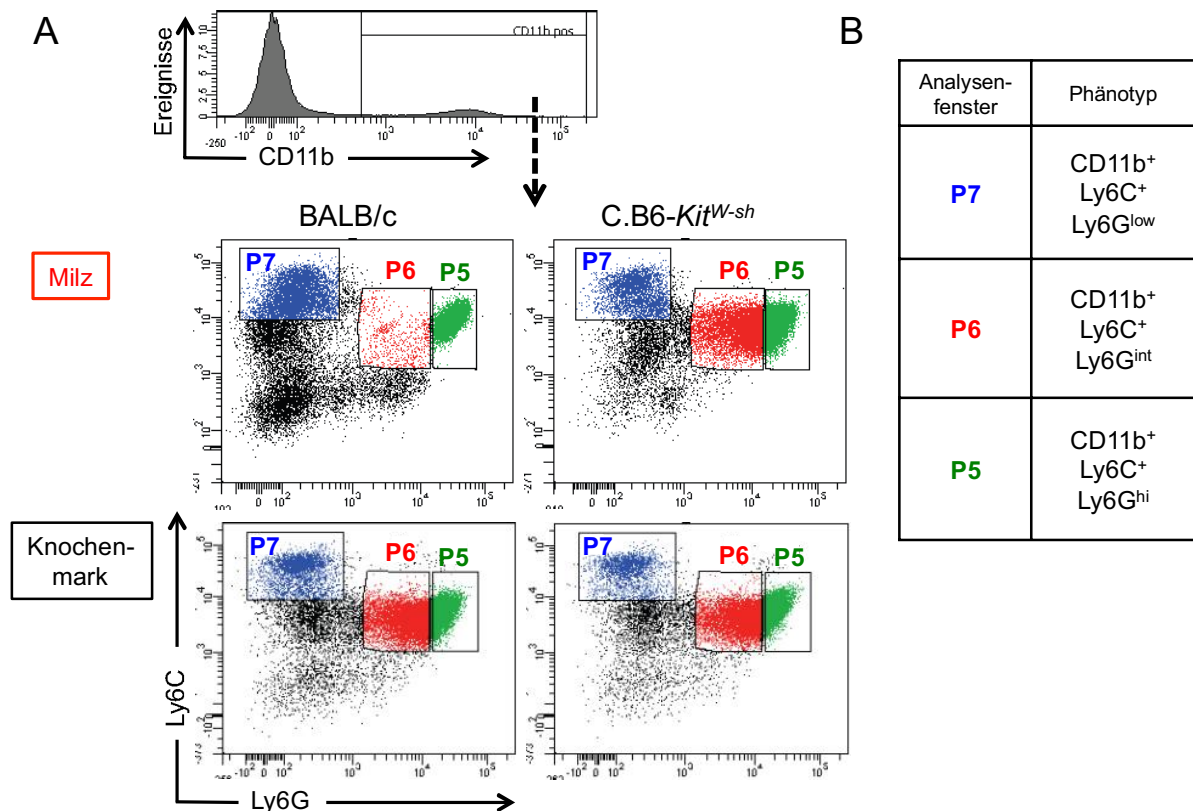


Abb. 17: Die *Kit*^{W-sh}-Mutation führt zu einer massiven Anhäufung von CD11b⁺-Zellen mit dem Phänotyp Ly6G^{high}Ly6C⁺ und Ly6G^{int}Ly6C⁺ in der Milz. **A**, CD11b⁺ Zellen aus Milz und Knochenmark von BALB/c- und C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen wurden mit Antikörpern gegen Ly6G und Ly6C spezifisch gefärbt und die Oberflächenexpression durchflusszytometrisch analysiert. **B**, Eine tabellarische Aufstellung der Zellphänotypen ausgehend von dem jeweiligen Analysenfenster der Durchflusszytometrie.

Aus der **Abb. 17** ist ersichtlich, dass die Anzahlen von Ly6G und Ly6C positiver Zellen innerhalb der CD11b⁺-Splenozyten markante Unterschiede aufweisen. Besonders auffällig

ist das Vorkommen von $CD11b^+/Ly6G^{int}/Ly6C^+$ -Milzzellen (P6-Analysenfenster) in den C.B6-*Kit^{W-sh}*-Tieren, die in den Wildtyp-Tieren nur marginal sichtbar sind. Im Knochenmark zeigen sich jedoch keine auffälligen Unterschiede zwischen *Kit^{W-sh}*- und Wildtyp-Mäusen.

Im nächsten Schritt wurden die prozentualen Anteile von $CD11b^+$ -Zellen und der dazugehörigen Sub-Populationen in Milz und Knochenmark errechnet und in **Abb. 18** dargestellt.

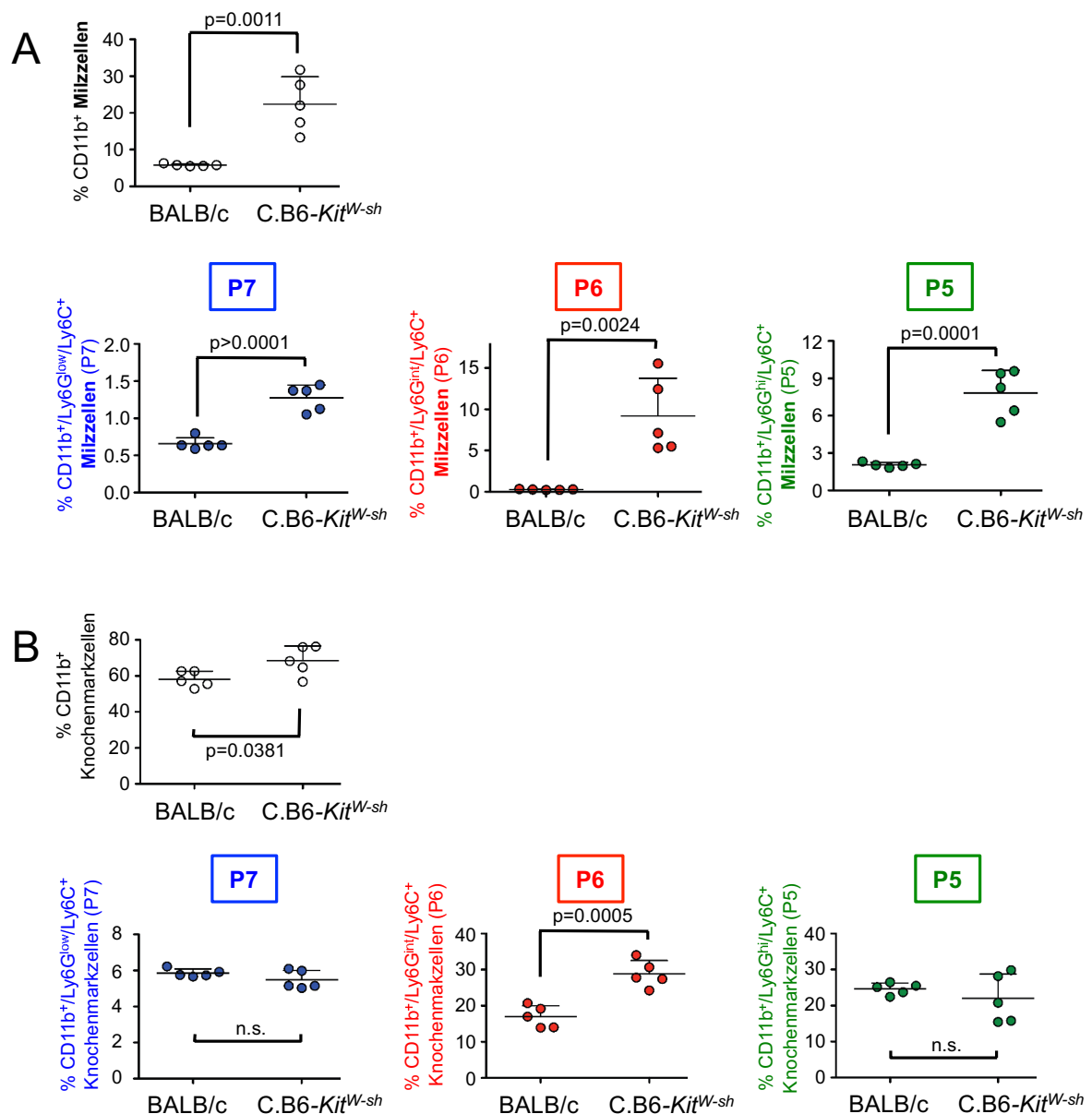


Abb. 18: Die Populationen P5 und P6 sind in der Milz der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse stark expandiert. Die prozentualen Anteile von $CD11b^+$, $CD11b^+/Ly6G^{low}/Ly6C^+$ (P7), $CD11b^+/Ly6G^{int}/Ly6C^+$ (P6), $CD11b^+/Ly6G^{high}/Ly6C^+$ (P5) wurden ermittelt. **A**, Milzzellen und **B**, Knochenmarkzellen sind dargestellt. n=5 Tiere pro Gruppe.

Im Folgenden wird der Phänotyp $CD11b^+/Ly6G^{high}/Ly6C^+$ als P5, $CD11b^+/Ly6G^{int}/Ly6C^+$ als P6 und $CD11b^+/Ly6G^{low}/Ly6C^+$ als P7 bezeichnet. Die $CD11b^+$ -Zellen in der Milz der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse zeigen eine um den Faktor vier erhöhte Häufigkeit, während diese im Knochenmark nur minimal ansteigt. Die P7 und P5 sind in der Milz vergrößert, während es im Knochenmark keine erkennbaren Unterschiede gibt. Der zahlenmäßige Unterschied der P6-Population in der Milz der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Tiere ist außerordentlich hoch, hier ist die Population um das 35-fache vergrößert und ca. um das Zweifache im Knochenmark im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

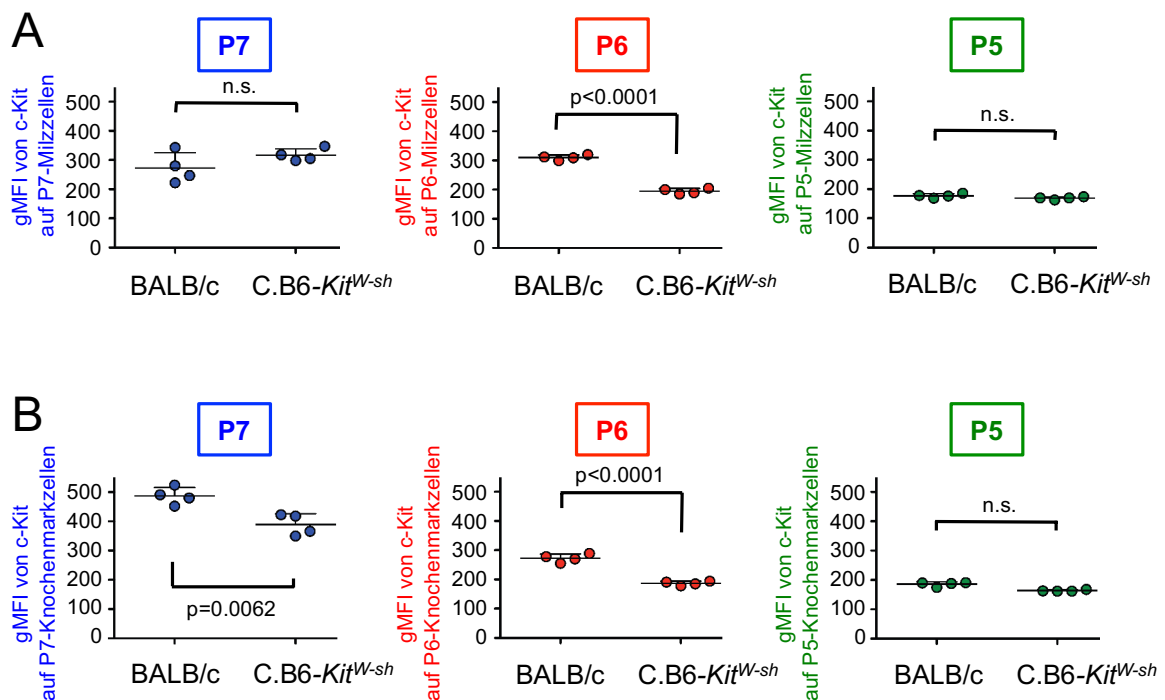


Abb. 19: Die c-Kit-Expression auf P6-Zellen ist deutlich reduziert in *Kit^{W-sh}*-Mäusen. Die in der Abb. 17 gezeigten $CD11b^+$ -Subpopulationen wurden auf die Oberflächenexpression von c-Kit durchflusszytometrisch analysiert. **A**, Milz und **B**, Knochenmark. n=4 Tiere pro Gruppe.

Die Ergebnisse in der **Abb. 16** zeigen eine Reduktion der Expression von c-Kit im Zuge fortschreitender myeloider Zelldifferenzierung in C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen. Daher wurde auch die Expression von c-Kit auf $CD11b^+$ -Subpopulationen in Milz und Knochenmark untersucht und die Resultate in der **Abb. 19** dargestellt.

Die deutlichste Abweichung kann auf P6-Zellen beobachtet werden, dabei zeigen jeweils die Milz- und Knochenmarkzellen aus C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen eine reduzierte Expression. In P7-Zellen gibt es nur einen geringen Expressionsunterschied im Knochenmark, in der Milz gibt es keinen.

Desweiteren war es essentiell festzustellen, um welchen Zelltyp es sich in der P6-Population in der Milz *Kit^{W-sh}*-Tiere handelt. Für eine phänotypisch-zytologische Untersuchung wurden Milzzellen durchflusszytometrisch aufgetrennt, auf Objektträger zentrifugiert und mit Eosin und Thiazin gefärbt (Pappenheim-Färbung). Die drei CD11b⁺-Subpopulationen P7, P6, und P5 zeigen jeweils ein charakteristisches Erscheinungsbild, wodurch sie leicht voneinander unterschieden werden können (Abb. 20).

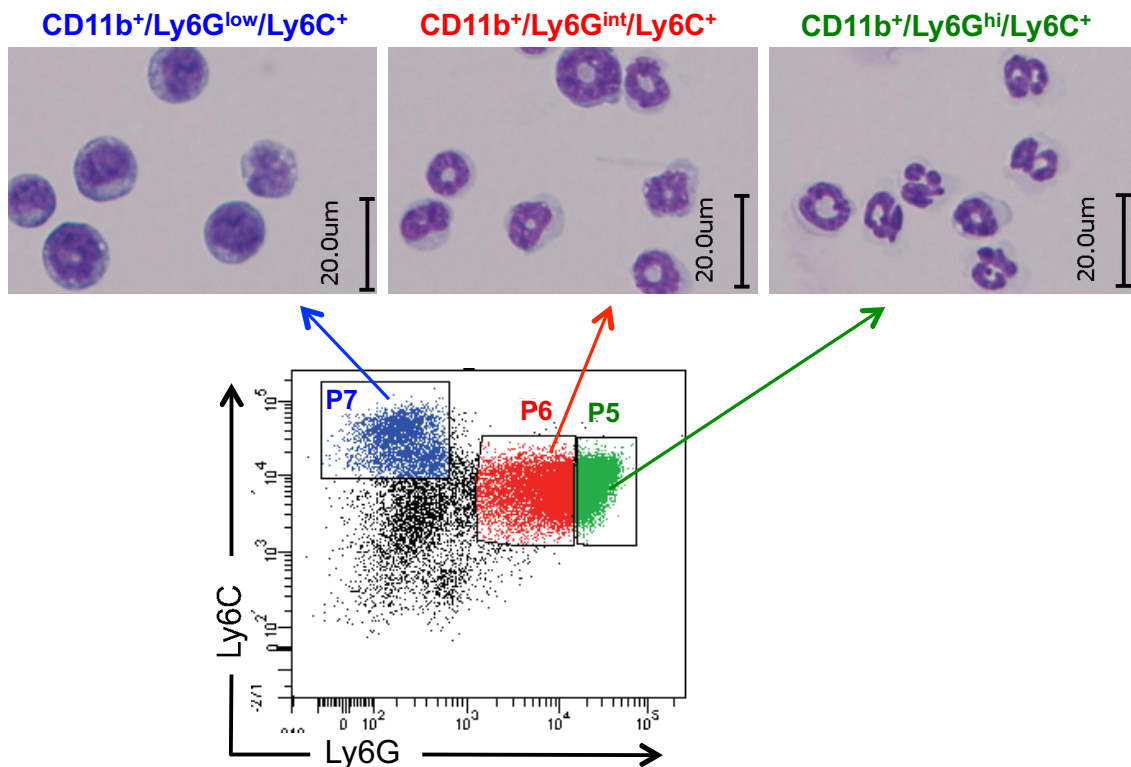


Abb. 20: Die P6-Population unterscheidet sich morphologisch von ihren Nachbarpopulationen. Milzzellen aus C.B6-*Kit^{W-sh}* wurden mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und durchflusszytometrisch nach P5, P6 und P7 aufgetrennt. Von jeder einzelnen Population wurden 10⁵-Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert, eine Differentialfärbung mit Eosin und Thiazin durchgeführt und lichtmikroskopisch untersucht.

Die P7-Zellen zeigen einen monozytären Phänotyp, der Zellkern ist aufgrund der Chromatinauflockerung im Vergleich zum zytoplasmatischen Raum groß und es liegt eine feine azurophile Granulierung des Zytoplasma vor. Die Zellen in P5 dagegen besitzen den mehrfach segmentierten Zellkern, sind demnach polymorphnukleär, zeigen keine angefärbten Granula und sind deshalb den neutrophilen Granulozyten zuzuordnen. Die Besonderheit der P6-Zellen ist ihr außergewöhnliches Zellkernprofil, eine ringförmige Struktur, ansonsten zeigen diese, wie P5, auch keine Granulierung.

Die gleiche Morphologie der entsprechenden Populationen kann in Knochenmark und Milz beider Stämme beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die Zellen der Population P6 in Knochenmark und Milz der *Kit^{W-sh}*-Tiere identisch sind, wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Als Referenz diente die P6-Population aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen. Die P6-Population aus BALB/c-Milzen wurde aufgrund sehr geringer Zellzahlen nicht in die Untersuchungen einbezogen.

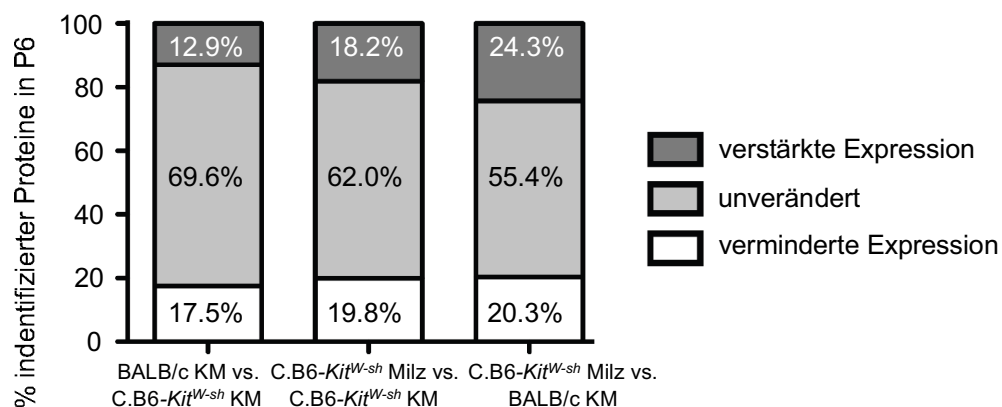


Abb. 21: Die Proteinexpression in P6-Zellen aus Milz der C.B6-*Kit^{W-sh}* und Knochenmark der C.B6-*Kit^{W-sh}* und BALB/c weist starke Unterschiede auf. Milzzellen aus C.B6-*Kit^{W-sh}* und Knochenmarkszellen aus C.B6-*Kit^{W-sh}* und BALB/c wurden durchflusszytometrisch nach P5, P6 und P7 aufgetrennt. Die in der Massenspektrometrie identifizierten Proteine wurden nach ihrer relativen Expression miteinander verglichen und in drei Gruppen unterteilt: verstärkte Expression, unveränderte und reduzierte Expression. In die vergleichende Untersuchung sind 1185 identifizierte Proteine eingegangen. Als signifikanter Regulationsunterschied wurde eine Signifikanz von $p < 0,05$ im t-Test betrachtet. KM = Knochenmark.

Der Vergleich von Zellen der Population P6 in Knochenmark und Milz von *Kit^{W-sh}*-Mäusen zeigt, dass lediglich 62% der identifizierten Proteine eine vergleichbare Expressionsstärke aufweisen, die restlichen Proteine sind in ihrer Expression entweder reduziert oder verstärkt (**Abb. 21**). Dies lässt auf deutliche Unterschiede der P6-Population in Knochenmark und Milz schließen, keinesfalls sollte es sich hierbei um identische Zellen handeln.

Die massenspektrometrische Analyse erlaubte auch eine Abschätzung, wie tiefgreifend die *Kit^{W-sh}*-Mutation die Proteinexpression in P6-Zellen aus Knochenmark beeinflusst. Als Referenz diente die P6-Population aus dem Wildtyp-Knochenmark. Hier zeigt sich, dass nur etwa 70% aller identifizierten Proteine eine vergleichbare Expressionsrate aufweisen, die *Kit^{W-sh}*-Mutation also einen starken Einfluss auf diese Zellen hat (**Abb. 21**).

Interessant war es herauszufinden, was die Expansion der CD11b⁺-Subpopulationen in der Milz verursacht. Ist es die Milz der *Kit^{W-sh}*-Tiere, die eine Nische für die P5- und P6-Zellen darstellt, oder ist es ein intrinsischer Effekt dieser Zellen? Dies konnte überprüft werden, indem BALB/c-Tiere letal bestrahlt und mit C.B6-*Kit^{W-sh}*-Knochenmarkzellen rekonstituiert wurden. Als Vergleichskontrolle diente eine Gruppe, die BALB/c-Knochenmark bekam sowie eine unbehandelte Gruppe.

Wie man der **Abb. 22A** entnehmen kann, steigen die Zahlen von P5 und P6 in den Milzen der mit C.B6-*Kit^{W-sh}*-Knochenmark rekonstituierten Wildtypiere. Auch fällt auf, dass die Bestrahlung und Rekonstitution mit dem BALB/c-Knochenmark ebenfalls eine leichte Expansion dieser Zellen auslöst, was höchstwahrscheinlich auf eine systemische Entzündungsreaktion als Folge der Bestrahlung zurückzuführen ist. Eine Genotypisierung dieser Zellen (**Abb. 22B**) zeigt eine eindeutige Donorabstammung der Milzzellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass es ein intrinsischer Defekt der P5- und P6-Zellen selbst ist, welcher zu deren Akkumulation in der Milz führt. Im Knochenmark der Chimären kann hingegen kein Unterschied bezüglich der P5- und P6-Zahlen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

53

Die Anwesenheit der Mastzellen in den bestrahlten Tieren konnte anhand histologischer Gewebsschnitte untersucht werden, wie in der **Abb. 23** verdeutlicht.

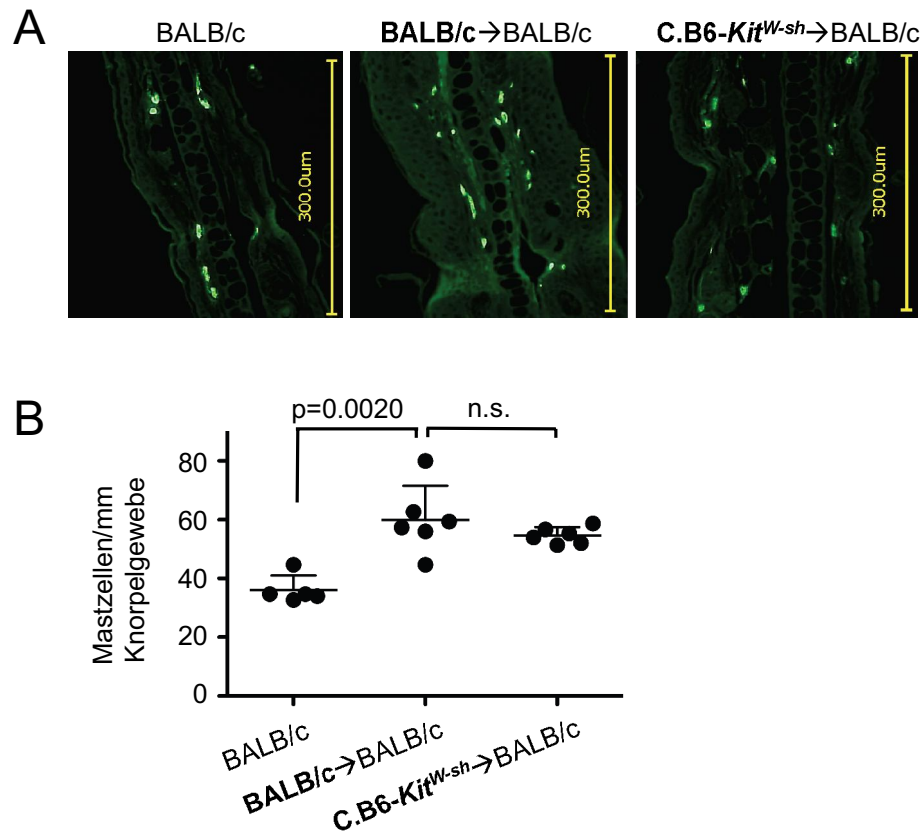


Abb. 23: Die Expansion von P5- und P6-Zellen aus *Kit*^{W-sh}-Knochenmark ist unabhängig von Mastzellen. Die Ohren von bestrahlten und rekonstituierten BALB/c-Mäusen (**Abb. 22**) wurden in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und davon Gewebsschnitte angefertigt. **A**, Mit fluoreszenzgekoppeltem Avidin konnten die Mastzellen angefärbt und fotografiert werden. Die Mastzellen sind als grün fluoreszierenden Zellen zu erkennen, wurden entlang des Knorpels ausgezählt und in **B** dargestellt. n=5-6 Tiere pro Gruppe.

Durch die Bestrahlung werden bekanntlich alle Vorläufer von Mastzellen im Knochenmark eliminiert, sodass nur die reifen Gewebsmastzellen erhalten bleiben, die strahlenresistent sind [50]. Nach acht Wochen konnten in bestrahlten Tieren Mastzellen gefunden werden, deren Zahlen gegenüber unbehandelten Tieren erhöht waren. Da auch die Ohrdicke erhöht war, spricht dies für eine allgemeine systemische Entzündung, ausgelöst durch die Bestrahlung vor der Knochenmarktransplantation. Hiermit konnte jedoch deutlich gezeigt werden, dass die Expansion von P5- und P6-Zellen unabhängig von der Anwesenheit der Mastzellen ist.

3.5 Suppressive Eigenschaften von $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{int}}/\text{Ly6C}^-$ - und $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{high}}/\text{Ly6C}^+$ -Zellen

Die morphologisch-zytologische Untersuchung der P6-Zellen (**Abb. 20**) veranschaulicht deren individuelle ringförmige Zellkernform. Solche Zellen kommen unter den sogenannten Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) vor, was bereits 2009 von Greifenberg et al. [51] berichtet wurde. Allerdings ist diese Morphologie kein zwingendes Definitionskriterium für die MDSC [51,52].

Per Definition steht der Begriff MDSC für keinen bestimmten Zelltyp, vielmehr ist es eine Bezeichnung für eine heterogene myeloide Zellpopulation, welche Vorläufer von Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten umfasst. Diese treten vor allem bei Tumorerkrankungen und Entzündungen gehäuft auf und haben eine suppressive Wirkung auf das Immunsystem, insbesondere auf T-Zellen [53,54]. Der Begriff MDSC ist also keine phänotypisch exakte, sondern eine operative Definition.

Murine MDSC können anhand ihrer CD11b -, Ly6G - und Ly6C -Expression in zwei Subpopulationen mit monozytärer (M-MDSC) und granulozytärer Morphologie (G-MDSC) unterteilt werden [55]. Die M-MDSC sind als $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{low}}/\text{Ly6C}^{\text{high}}$ (entspricht nach **Abb. 17B** den P7-Zellen) und die G-MDSC sind als $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{high}}/\text{Ly6C}^+$ (entspricht nach **Abb. 17B** den P5-Zellen) definiert. Die M-MDSC können durch Freisetzung von NO^1 und Arginase die T-Zellantwort unterdrücken und die G-MDSC größtenteils durch ROS^2 [56,57].

Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich in der P5- und P6-Population naiver mastzellloser Tiere um Myeloide Suppressorzellen bzw. deren Vorläufer handeln könnte. Die P7-Population wurde in folgenden Versuchen nicht weiter untersucht, da diese Population keine verstärkte Expansion in den Milzen von Kit^{W-sh} -Tieren erkennen lässt (Faktor 2 in **Abb. 18A**) und nach einer Knochenmarktransplantation aus C.B6- Kit^{W-sh} -Donoren in Wildtypempfängern sich zahlenmäßig ebenfalls unauffällig entwickelt (**Abb. 22B**).

Die suppressive Aktivität der P5- und P6-Zellen auf die Proliferation von T-Zellen konnte in einer allogenen gemischten Lymphozytenreaktion (AMLR) überprüft werden. Hierzu wurden Lymphknotenzellen zusammen mit allogenen dendritischen Zellen inkubiert, die

¹NO = Stickstoffmonoxid.

²ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, Sammelbegriff für chemisch hochreaktive Moleküle, die Sauerstoff enthalten.

zuvor über 6 Tage aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen generiert wurden. Das Verhältnis von 30:1 zwischen Lymphknotenzellen (5×10^4) und dendritischen Zellen ($1,67 \times 10^3$) wurde in allen Reaktionsansätzen konstant gehalten. Die Proliferation der in der Lymphknotenzellsuspension enthaltenen T-Zellen konnte 5 Tage später anhand des in die DNA eingebauten ^3H -Thymidins ermittelt werden.

Die durchflusszytometrisch isolierten Populationen P5 und P6 wurden zunächst in unterschiedlichen Verhältnissen in die AMLR gegeben, um deren suppressives Potential zu quantifizieren.

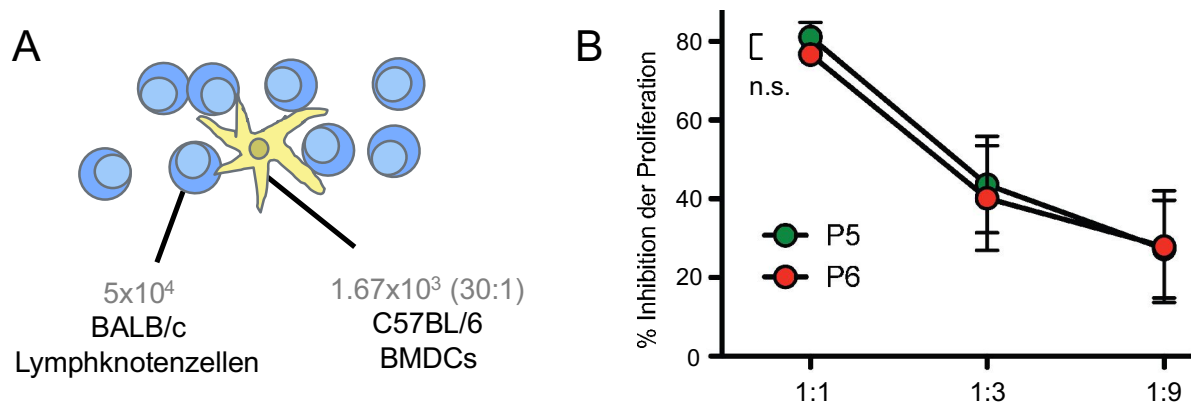


Abb. 24: $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{int}}/\text{Ly6C}^+$ - und $\text{CD11b}^+/\text{Ly6G}^{\text{high}}/\text{Ly6C}^+$ - Splenozyten inhibieren die T-Zell-Proliferation. **A**, Simple Schema der allogenen gemischten Lymphozytenreaktion (AMLR). Die AMLR bestand grundsätzlich aus 5×10^4 Lymphknotenzellen aus BALB/c und $1,67 \times 10^3$ allogenen dendritischen Zellen aus C57BL/6, also in einem Verhältnis von 30:1. **B**, P5- und P6-Milzzellen aus C.B6-*Kit*^{W-sh} wurden wie in der **Abb. 20** beschrieben isoliert. Davon wurden 5×10^4 Zellen (1:1), $1,67 \times 10^4$ Zellen (1:3) und $0,55 \times 10^4$ Zellen (1:9) gleich zu Beginn in die AMLR hinzugegeben. Am 4. Tag wurde ^3H -Thymidin für mindestens 20 Stunden hinzugefügt und am 5. Tag dessen Einbau in die DNA als radioaktive Strahlung gemessen. Gezeigt ist die prozentuale Inhibition der Proliferation im Vergleich zu den Ansätzen ohne P5 oder P6. Das Experiment wurde zwei mal mit je 5 Tieren wiederholt und jeweils in Triplikaten gemessen.

Das in der **Abb. 24** dargestellte Ergebnis zeigt, dass die beiden Populationen eine gleich starke suppressive Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen ausüben. Diese Wirkung lässt jedoch stetig nach, wenn die Anzahl der P5- oder P6-Zellen in der Ko-Kultur abnimmt. So wird in den Ansätzen mit dem 1:1 Verhältnis zwischen T-Zelle und P5- bzw. P6-Zelle die Proliferation zu ca. 80% unterdrückt, während die Suppression in den 1:9 Ansätzen noch 30% beträgt.

In einem Kontrollexperiment wurde auch überprüft, ob die durchflusszytometrisch isolierten P5- und P6-Zellen aktiv die Proliferation hemmen. Es war denkbar, dass die absterbenden P5- und P6-Zellen keine aktive suppressive Wirkung ausüben, sondern die T-Zellen während der Ko-Kultur durch Freisetzung von apoptotischen Signalmolekülen

in die Apoptose treiben. Deshalb wurde die Viabilität der T-Zellen in den Ko-Kulturen an Tag 4 ermittelt.

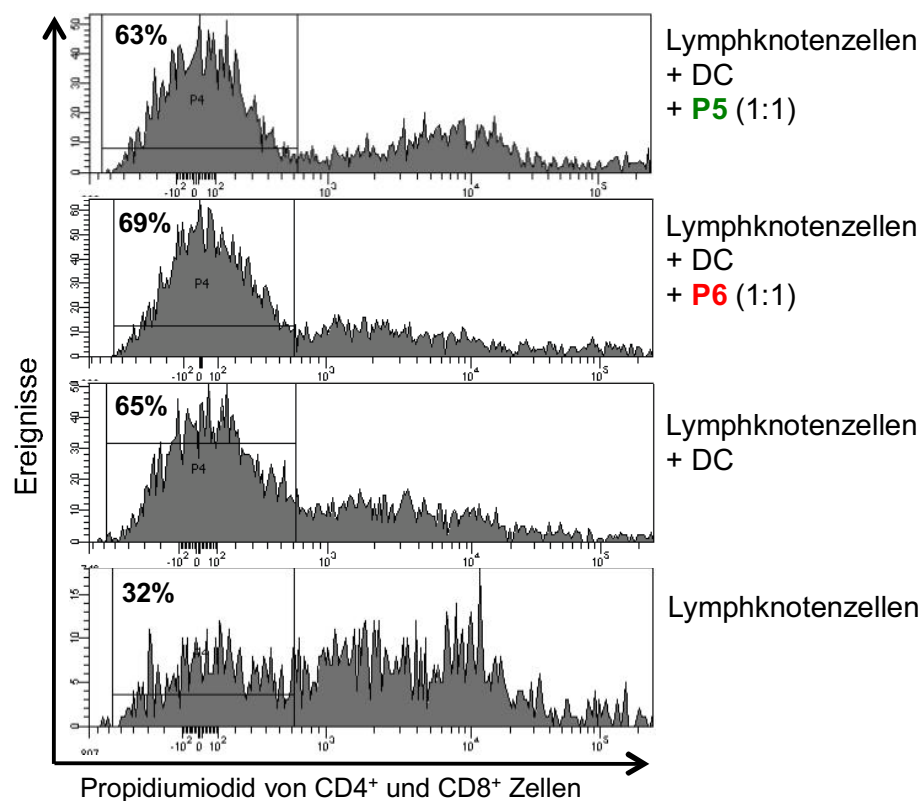


Abb. 25: Die T-Zell-Viabilität wird durch P5- und P6-Zellen nicht beeinflusst. Die T-Zellen aus den 1:1 Ansätzen (wie in **Abb. 24**) oder mit und ohne dendritischen Zellen wurden an Tag 4 mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Als Negativkontrolle diente der Ansatz aus Lymphknotenzellen alleine und als Positivkontrolle die Ko-Kultur von Lymphknotenzellen mit allogenen DC. Wie der **Abb. 25 unten** zu entnehmen ist, stirbt ein Großteil der T-Zellen in Abwesenheit allogener Antigenpräsentierender Zellen ab, lediglich 32% der T-Zellen sind negativ für den Farbstoff Propidiumiodid. Der Anteil lebender Zellen verändert sich drastisch infolge von Aktivierung und Proliferation durch allogene DC.

Die Zugabe von P5- und P6-Splenozyten verändert offensichtlich nicht die Viabilität der T-Zellen nach 4 Tagen Ko-Kultur, wie der **Abb. 25** zu entnehmen ist. Hiermit wurde gezeigt, dass die T-Zell-Proliferation tatsächlich supprimiert wird, die Zellen aber vital bleiben.

Weiterhin wurde untersucht, über welchen Mechanismus die Proliferation der T-Zellen gehemmt wird. Für diesen Zweck wurde Katalase als ROS-Inhibitor, L-NMMA¹ als iNOS²-Inhibitor und nor-NOHA³ als Arginase-Inhibitor in die AMLR eingesetzt.

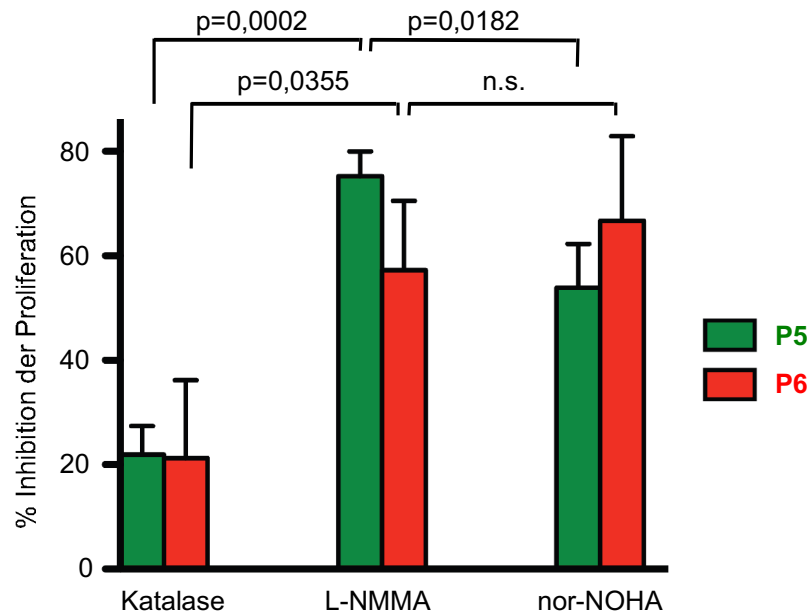


Abb. 26: Die P6-Zellen hemmen die Proliferation der T-Zellen über die Produktion von ROS. 5×10^4 durchflusszytometrisch aufgetrennte P5- und P6-Zellen wurden in die AMLR bestehend aus 5×10^4 Lymphknotenzellen und $1,67 \times 10^3$ DC gegeben und 4 Tage lang inkubiert. An Tag 4 wurden die Katalase (1000 U/ml), L-NMMA (0,5 mM) oder nor-NOHA (0,5 mM) dazugegeben und 8h später ³H-Thymidin hinzugefügt. An Tag 5 wurde dessen Inkorporation gemessen. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Proliferation im Vergleich zu den mit Inhibitoren behandelten Positivkontrollen ohne P5- bzw. P6-Zellen. Das Experiment wurde zwei mal mit je 5 Tieren wiederholt und jeweils in Triplikaten gemessen.

Das in der **Abb. 26** dargestellte Ergebnis gibt einen Hinweis auf den Mechanismus, mit dem die P5- und P6-Zellen die Proliferation von T-Zellen supprimieren können. Die Neutralisation von ROS durch Katalase kann die Inhibition der T-Zell-Proliferation deutlich herabsetzen. L-NMMA und nor-NOHA erzielen nur marginale Wirkungen, vermutlich weil iNOS und nor-NOHA von P5- bzw. P6-Zellen kaum gebildet werden. Somit wird die Hypothese, dass es sich um Zellen mit G-MDSC-Eigenschaften in den Milzen von C.B6-*Kit^{W-sh}* handelt, bekräftigt.

Aktuell gibt es keinen Oberflächenmarker, mit dem die G-MDSC eindeutig identifiziert werden könnten, auch weil diese Zellen in der Lage sind, sich weiter zu differenzieren. Außerdem sind die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen G-MDSC und neutrophilen

¹L-NMMA = N^G-methyl-L-arginine citrate.

²iNOS = induzierbare NO-Synthase.

³Nor-NOHA = N^ω-hydroxy-nor-arginine.

Granulozyten nicht geklärt und werden deshalb kontrovers diskutiert [57].

Die Möglichkeiten der *in vitro* Differenzierung der P6-Population wurden untersucht, indem P6-Zellen eine Woche lang in einem halbflüssigen Methylcellulose-Medium mit den wichtigsten Wachstumsfaktoren wie IL-3, IL-6, SCF¹ und Epo² inkubiert wurden. Außerdem konnte somit festgestellt werden, ob diese Zellen in der Lage sind, Kolonien zu bilden bzw. weiter zu proliferieren.

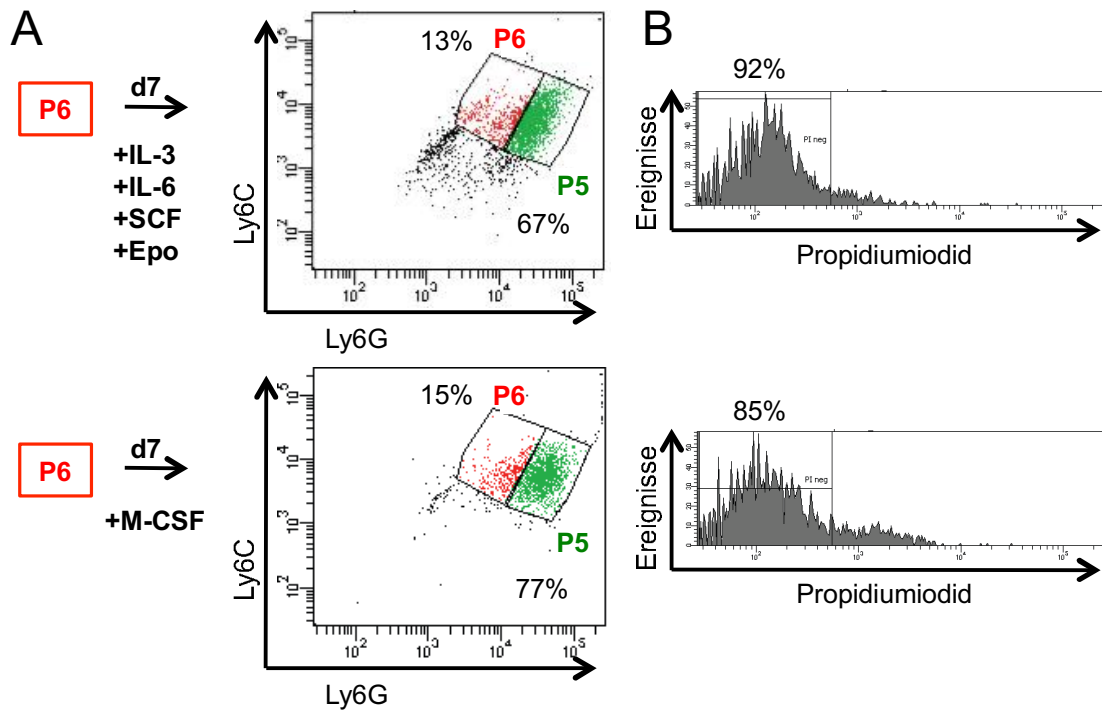


Abb. 27: Die phänotypische Verschiebung der P6-Population nach P5 lässt sich auch durch M-CSF nicht beeinflussen. **A**, 10^5 P6-Splenozyten wurden in einem mit IL-3, IL-6, SCF und Epo oder nur M-CSF angereicherten Methylcellulose-Medium für eine Woche inkubiert. An Tag 7 wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. **B**, Die Viabilität wurde durch Einsatz von Propidiumiodid untersucht. Zwei unabhängige Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Wie man in der **Abb. 27A oben** erkennen kann, entwickeln sich die P6-Zellen in Gegenwart IL-3, IL-6, SCF und Epo zum P5-Phänotyp.

Ob die Differenzierung der P6-Zellen in Richtung P5, also in Richtung eines G-MDSC-Phänotyps, irreversibel vorprogrammiert ist oder ob diese Zellen doch noch Potenzial haben sich in Richtung M-MDSC zu entwickeln, konnte geprüft werden, indem die Wachstumsfaktoren IL-3, IL-6, SCF und Epo durch M-CSF³ ersetzt wurden.

¹SCF = Stammzellfaktor, auch Kit-Ligand.

²Epo = Erythropoetin.

³M-CSF = Monozytenkolonien-stimulierender Faktor.

Das mit M-CSF erzielte Ergebnis (**Abb. 27A unten**) verdeutlicht den klaren Trend der Differenzierung in Richtung $\text{Ly6G}^{\text{high}}$. Interessant ist, dass in beiden Ansätzen keine Kolonienbildung und auch keine Proliferation zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Da die Zellviabilität (**Abb. 27B**) in allen Ansätzen mit über 85% vergleichbar hoch ist, handelt es sich demnach höchstwahrscheinlich um postmitotische Zellen.

Im nächsten Schritt wurden auch die Differenzierung und die Viabilität der P6-Population in der 1:1 Ko-Kultur mit Lymphknotenzellen (siehe **Abb. 24**) untersucht.

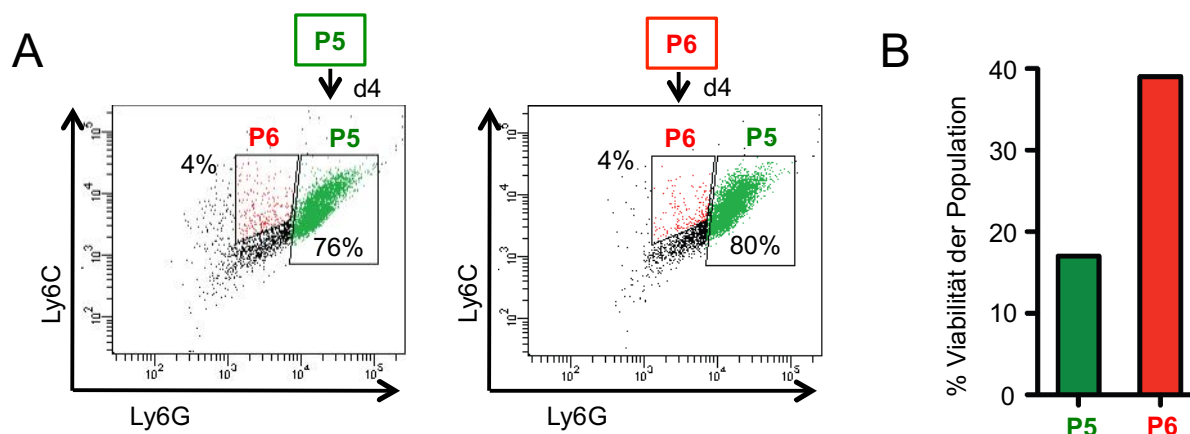


Abb. 28: Die P6-Zellen durchlaufen die Differenzierung zu P5-Zellen in Gegenwart aktivierter T-Zellen. A, Die P5- und P6-Zellen aus den 1:1 Ansätzen (**Abb. 24**) wurden an Tag 4 mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. B, Die Viabilität wurde rechnerisch ermittelt.

Die P5-Population zeigt nach 4 Tagen Ko-Kultur mit aktivierten T-Zellen einen unveränderten Phänotyp, wie die Resultate der durchflusszytometrischen Messung in der **Abb. 28A** veranschaulichen. Dagegen entwickeln die P6-Zellen den gleichen Phänotyp wie die P5-Zellen. Auch die Viabilität der Zellen ist unterschiedlich, während die P5-Zellen vermutlich das Ende ihrer Zelldifferenzierung erlangt haben und allmählich sterben, können die P6-Zellen vermutlich aufgrund des andauernden Differenzierungsprozesses eine verlängerte Lebensdauer aufweisen (**Abb. 28B**).

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die P6-Zellen sowie die P5-Zellen jeweils suppressive Wirkung auf die Proliferation von T-Zellen ausüben. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die P6-Zellen mögliche Vorläufer der P5-Population darstellen. Die stark erhöhten P5- und vor allem P6-Zahlen in der Milz der $\text{Kit}^{\text{W-sh}}$ -Tiere resultieren aus einer überwiegenden Entwicklung in Richtung $\text{Ly6G}^{\text{high}}$, welche durch die Deregulation der c-Kit-Expression im Laufe der Zelldifferenzierung verursacht wird.

3.6 *Kit*^{W-sh}-Mäuse zeigen ein starkes Wachstum transplantierter L1C2-Tumorzellen

Die suppressive Eigenschaft der P5- und P6-Zellen aus der Milz naiver C.B6-*Kit*^{W-sh}-Tiere sollte nun auch in einem *in vivo*-Tumormodell verifiziert werden. Hierfür wurde die BALB/c-syngene Lungenkarzinom-Zelllinie L1C2¹ [58] verwendet, die nach subkutaner Tumorentwicklung innerhalb weniger Wochen zur Bildung großer Hauttumore führt [59].



Abb. 29: Schema des murinen Adenokarzinom-Modells. An Tag 0 wurden 5-6 Wochen alten Mäuse rasiert und je 1×10^5 L1C2-Zellen an insgesamt vier Stellen in die Flanken der Tiere subkutan injiziert. 18 Tage später wurden die Tumore vermessen. Desweiteren wurden Milz, Knochenmark und Tumorgewebe durchflusszytometrisch analysiert.

In der **Abb. 29** ist die Vorgehensweise zur Induktion subkutaner Adenokarzinome skizziert. Hierzu wurden 1×10^5 L1C2-Zellen subkutan verabreicht und zweieinhalb Wochen später das Tumorstadium sowie die Immunzellen in der Milz, Knochenmark und Tumorgewebe analysiert.

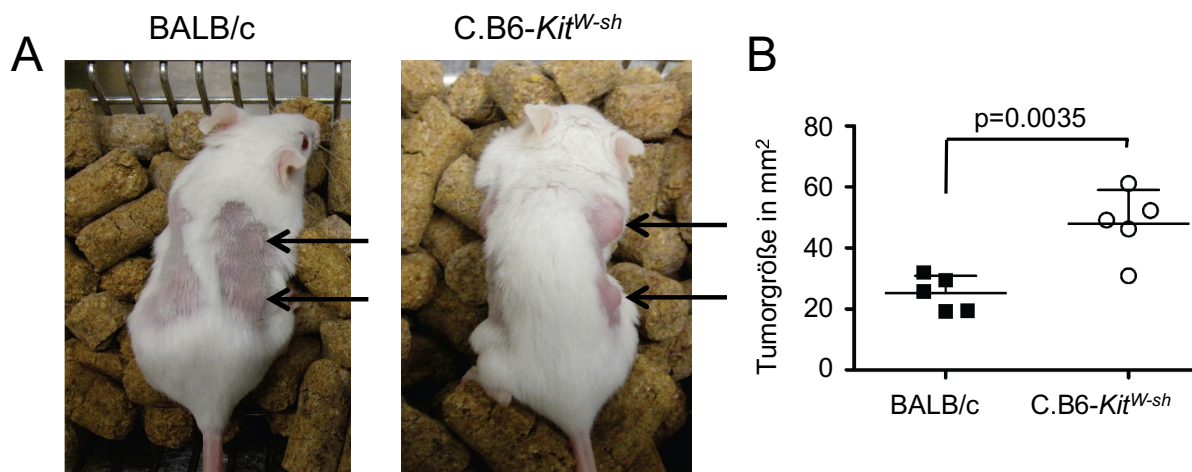


Abb. 30: Das Tumorstadium in *Kit*^{W-sh}-Mäusen ist beschleunigt. **A**, Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Maus der BALB/c- und der C.B6-*Kit*^{W-sh}-Gruppe mit Tumoren an den Flanken. Die Pfeile zeigen exemplarisch Tumore auf der rechten Seite. **B**, Die Tumorstadium wurde ermittelt, indem die Tumore kreuzweise ausgemessen, die beiden Werte miteinander multipliziert und ein Mittelwert aus vier Tumoren pro Maus errechnet wurde. n=5 Tiere pro Gruppe.

¹L1C2 = line 1 alveolar carcinoma, H2^d.

Die ersten Tumore sind bereits eine Woche nach der Inokulation mit L1C2-Zellen sichtbar. Wie in der **Abb. 30** gezeigt, entwickeln die C.B6-*Kit^{W-sh}*-Tiere rasch Hauttumore mit doppelter Fläche verglichen mit den Wildtyp-Tieren. Metastasenentwicklung ist nicht zu beobachten.

Ob die Tumorentwicklung mit einer Expansion der P5- und P6-Populationen einhergeht, wurde mittels FACS überprüft. Außerdem wurde das Milzgewicht tumortragender Mäuse beider Stämme miteinander verglichen.

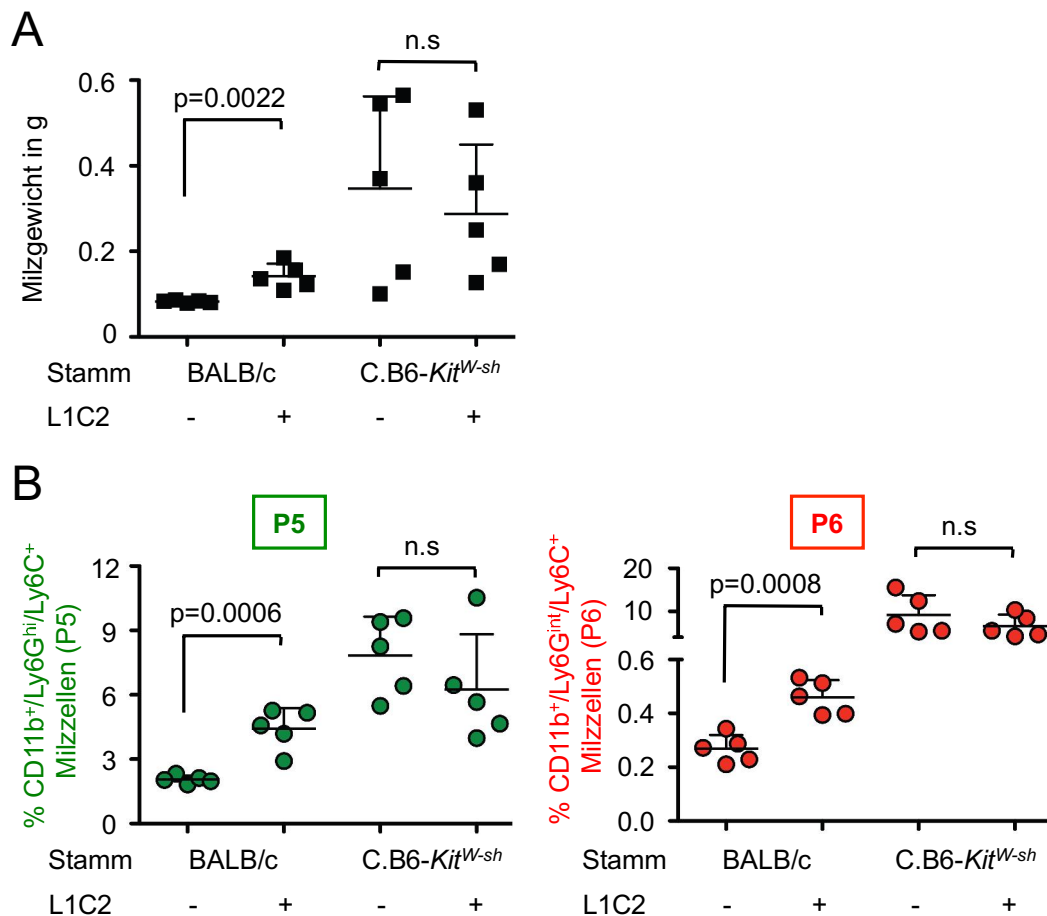


Abb. 31: Die Milzen von C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen verändern sich nicht durch L1C2-induziertes Tumorentwachstum. Milzen von den in **Abb. 30** gezeigten Tieren wurden gewogen (**A**), gegen CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (**B**).

Die Tumorentwicklung wird in BALB/c-Mäusen von einer leichten Milzvergrößerung verglichen mit unbehandelten Mäusen begleitet (**Abb. 31A**). Die ohnehin extreme Milzgröße der C.B6-*Kit^{W-sh}*-Tiere bleibt jedoch unverändert. Auch wenn die P5- und P6-Populationen in BALB/c-Mäusen unter Tumoreinwirkung expandieren, erreichen diese nicht das in den C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen zu beobachtende Niveau.

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob das verstärkte Tumorstadium durch die Abwesenheit von Mastzellen bedingt ist.

Hierzu wurde eine Knochenmarktransplantation, wie in der **Abb. 22** gezeigt, durchgeführt und die Tiere acht Wochen später mit L1C2 inokuliert. In den mit C.B6-*Kit^{W-sh}*-Knochenmark rekonstituierten Tieren sind Mastzellen anwesend, weil diese strahlenresistent sind (siehe **Abb. 23**). Dabei sind aber auch die P5- und P6-Populationen in den Milzen erhöht (siehe **Abb. 22**).

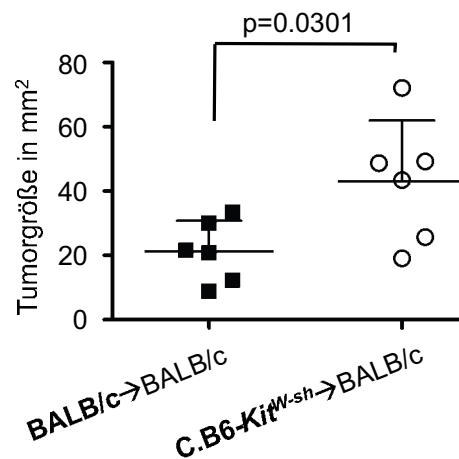


Abb. 32: L1C2-induziertes Tumorstadium ist unabhängig von der Anwesenheit von Mastzellen. 6 Wochen alte BALB/c-Mäuse wurden mit 8,5Gy myeloablativ bestrahlt und am nächsten Tag mit Knochenmark von C.B6-*Kit^{W-sh}* oder BALB/c rekonstituiert. Acht Wochen später wurden je 1×10^5 L1C2-Zellen an insgesamt vier Stellen subkutan injiziert und vier Wochen später die Tumorstadium bestimmt.

Durch Transplantation des C.B6-*Kit^{W-sh}*-Knochenmarks in die myeloablativ bestrahlten Wildtyp-Tiere kann die Eigenschaft schneller größere Tumore zu entwickeln auf die BALB/c-Tiere übertragen werden (**Abb. 32**). Bei diesem Versuch hat sich auch herausgestellt, dass eine Bestrahlung vor der Transplantation eine generelle Verlangsamung des Tumorstadium bewirkt. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung der Tumorstadium erst nach vier Wochen vorgenommen. Eine mögliche Ursache für das verlangsamte Tumorstadium in bestrahlten Mäusen könnte eine durch die Bestrahlung hervorgerufene systemische Entzündungsreaktion sein, die zu einer verstärkten anti-Tumor-Antwort führt [60].

Durch ein Kontrollexperiment (**Abb. 33**) mit $Cpa3^{Cre/+}$ -Tieren¹ wurde die Beteiligung der Mastzelle am schnelleren L1C2-Tumorwachstum endgültig ausgeschlossen. Diese Tiere weisen aufgrund des genotoxischen Effekts von Cre, welches unter der Kontrolle des Carboxypeptidase A3-Promoters exprimiert wird, einen Mastzelldefekt auf [61]. Dabei entsprechen P5- bzw. P6-Zellzahlen den Wildtyptieren (Daten nicht gezeigt).

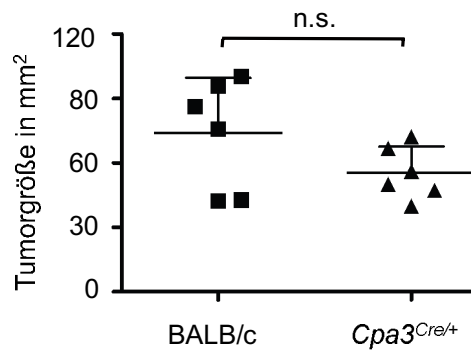


Abb. 33: Die Abwesenheit der Mastzelle in $Cpa3^{Cre/+}$ -Mäusen hat keine Auswirkung auf das L1C2-Tumorwachstum. 10 Wochen alte $Cpa3^{Cre/+}$ und dazugehörige Wildtyptiere wurden mit 1×10^5 L1C2-Zellen an insgesamt vier Stellen inokuliert und zwei Wochen später die Tumore ausgemessen.

Wie erwartet, zeigen die $Cpa3^{Cre/+}$ und die dazugehörigen Wildtyp-Wurfgeschwister keine signifikanten Unterschiede im Tumorwachstum (**Abb. 33**). Das Tumorwachstum ist im Vergleich zu den in **Abb. 30** gezeigten Tieren stark beschleunigt, was an dem insgesamt höheren Alter der Tiere liegen könnte.

Somit konnte die Beteiligung der Mastzelle im L1C2-Tumormodell eindeutig ausgeschlossen werden. Es war nun zu vermuten, dass das beschleunigte Tumorwachstum in Kit^{W-sh} -Mäusen auf die Anwesenheit der P5- und P6-Populationen zurückzuführen ist. Die immunsuppressive Eigenschaft dieser Zellen *in vitro* konnte bereits im Kapitel 3.5 gezeigt werden.

¹ $Cpa3^{Cre/+}$ = gezielte Insertion der Cre-Rekombinase in den Lokus des Carboxypeptidase A3-Promoters.

3.7 G-MDSC-ähnliche Zellen fördern L1C2-induziertes Tumorwachstum

Ein unausweichliches Problem in den Versuchen mit MDSC ist, dass es aktuell nicht möglich ist, diese Zellen selektiv zu depletieren, ohne dabei andere Zellpopulationen zu beeinträchtigen [62,63]. Außerdem ist es unmöglich vorherzusagen, ob die P5- bzw. P6-Zellen aus den *Kit^{W-sh}*-Mäusen und ihr Pendant aus den Wildtypen sich gleich verhalten. Die c-Kit-Deregulation (gezeigt in **Abb. 19**) könnte die Signalkaskade während der MDSC-Differenzierung beeinflussen, was durch die Ergebnisse massenspektrometrischer Untersuchungen (**Abb. 21**) bekräftigt wird.

Eine äquivalente Lösung dieses Problems sollte jedoch ein adoptiver Transfer der P5- und P6-Zellen anstelle der Depletion sein. Hierfür wurden BALB/c-Tiere mit L1C2 inokuliert und erhielten im Abstand von wenigen Tagen mehrmalige Injektionen von P5- und P6-Splenozyten aus C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen. Dazu wurde zunächst ein Protokoll zur Anreicherung von Ly6G^{pos}-Zellen (P5 und P6 zusammen) etabliert (**Abb. 34A**). Mehrmalige Injektionen dieser Zellen erschienen bei der Versuchsplanung sinnvoll, da mit einer Lebensdauer von wenigen Tagen *in vivo* gerechnet wurde.

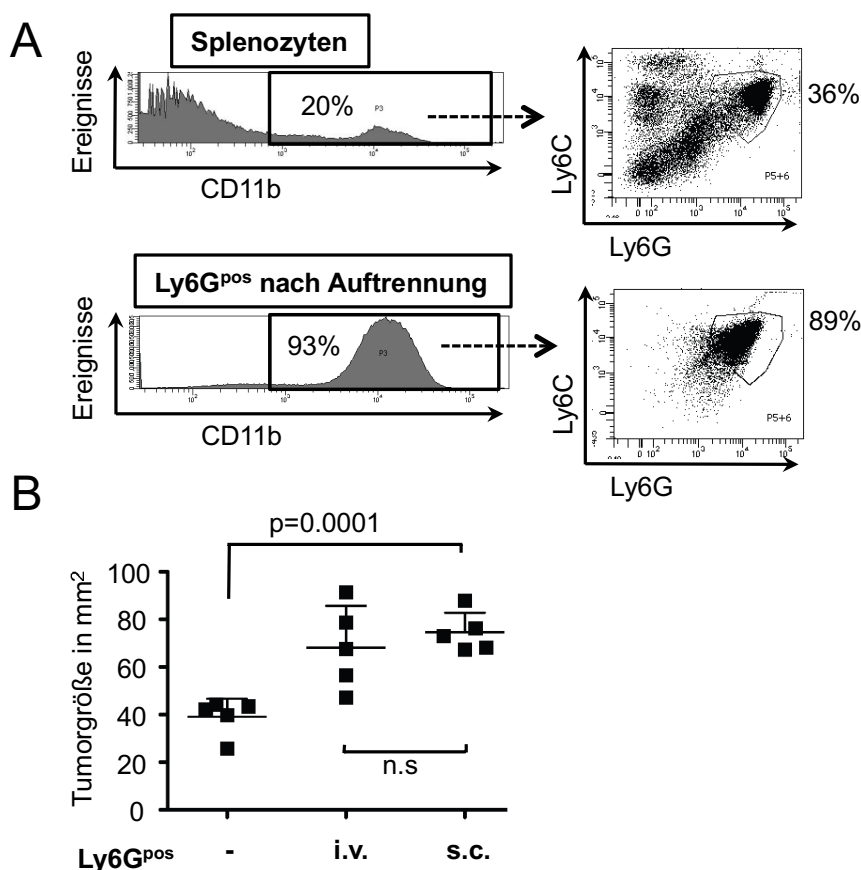


Abb. 34: G-MDSC-ähnliche Zellen aus C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen beschleunigen das Tumorstadium in Wildtyp-Tieren. An Tag 0 wurden BALB/c-Mäuse mit L1C2 inokuliert und an den Tagen 1, 4, 7, und 10 Ly6G^{pos}-Splenozyten aus C.B6-*Kit*^{W-sh} injiziert. Bei der intravenösen Injektion wurden 5x10⁶ Ly6G^{pos}-Zellen verabreicht und bei der subkutanen 2,5x10⁶-Zellen. Milzzellsuspensionen von C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen wurden zunächst durch Dynalbead-Behandlung von T-Zellen (CD4 und CD8) und B-Zellen (B220) befreit, bevor die Ly6G^{pos}-Zellen durch MACS angereichert werden konnten. Die Reinheit von Ly6G^{pos}-angereicherten Zellen wurde stets durchflusszytometrisch kontrolliert. **A**, Gezeigt sind die Anteile der Ly6G^{pos}-Zellen in der Milzsuspension vor und nach der Anreicherung. **B**, An Tag 14 wurde die Tumorgröße bestimmt. n=5 Tiere pro Gruppe.

Das Ergebnis in der **Abb. 34B** veranschaulicht das tumorfördernde Potential der Ly6G^{pos}-Splenozyten aus naiven C.B6-*Kit*^{W-sh}-Tieren. Sowohl die intravenöse als auch subkutane Injektion bewirkt gleichermaßen ein schnelleres Tumorstadium in BALB/c-Tieren. Somit erscheint es gerechtfertigt, die Ly6G^{pos}-Splenozyten aus naiven C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen als G-MDSC-ähnliche Zellen zu bezeichnen.

Insgesamt veranschaulichen die Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig eine anormale Myelopoese in den *Kit*^{W-sh}-Tieren, die zu einer Entwicklung von Splenozyten mit immunsuppressiven Eigenschaften führt.

4 DISKUSSION

4.1 Auswirkungen der *Kit*^{W-sh}-Mutation auf die Hämatopoese

Die Rolle der Mastzelle als die zentrale Komponente bei der Entstehung von IgE-abhängigen allergischen Reaktionen des Soforttyps ist nun seit mehreren Jahren unumstritten. Die Erforschung der Beteiligung von Mastzellen an protektiven angeborenen und adaptiven Immunantworten ist jedoch seit vielen Jahrzehnten die große Herausforderung für Mastzellforscher. Der eleganteste Lösungsansatz des Nachweises aller potentieller Mastzellfunktionen *in vivo* wäre eine selektive Depletion von Mastzellen. Einen solchen Ansatz glaubte man in Mäusen mit *Kit*-Mutationen gefunden zu haben, gleichwohl die Mastzelldefizienz nicht die einzige bekannte Auswirkung der *Kit*-Mutationen ist.

Die C57BL/6-*Kit*^{W-sh}-Maus stellt ein sehr nützliches Instrument für die Mastzellforschung dar, die Grenzen der Anwendbarkeit sind jedoch dann erreicht, wenn es um Untersuchungen von Th2-polarisierten Immunantworten geht. Deshalb wurde von unserer Arbeitsgruppe die *Kit*^{W-sh}-Mutation vom C57BL/6-Hintergrund mit typisch ausgeprägter Th1-Immunantwort auf den BALB/c-Hintergrund mit ausgeprägter Th2-Immunantwort übertragen.

Wie erwartet, zeigen die neu generierten C.B6-*Kit*^{W-sh}-Mäuse eine **Mastzelldefizienz** (**Abb. 6**). Entgegen unseren Erwartungen jedoch zeigen die C.B6-*Kit*^{W-sh}-Tiere keine Beeinträchtigungen bei der Entwicklung einer experimentellen Atemwegserkrankung [43]. Dies bedeutet, dass Mastzellen für die Ausprägung Asthma-äquivalenter Symptome¹ in BALB/c-Mäusen entbehrlich sind. Dies trifft für *Kit*^{W-sh}-Mäuse auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund nicht zu, es handelt sich also um ein stammspezifisches Phänomen [64–66].

Abgesehen von ihrer Mastzellosigkeit ist die Frequenz der **basophilen Granulozyten** im Blut von C.B6-*Kit*^{W-sh}-Tieren erhöht, während in den *Kit*^{W-sh}-Mäusen auf C57BL/6-Hintergrund diese Tendenz nicht zu beobachten ist. Auch andere Arbeiten bestätigen, dass in C57BL/6-*Kit*^{W-sh}-Mäusen [67] und in *Kit*^{W/W-v}-Mäusen [68] unveränderte Zahlen von basophilen Granulozyten vorliegen. Unsere Daten deuten also auf ein stammspezifisches Phänomen hin, welches durch die *Kit*^{W-sh}-Mutation in BALB/c ausgelöst wird. Basophile Granulozyten exprimieren ebenfalls den Fc_εRI, jedoch unterscheiden sie sich deutlich von

¹Atemwegsempfindlichkeit, Verschleimung der Atemwege, zelluläre Infiltration der Lunge.

der Mastzelle in der c-Kit-Expression, da reife Basophile kein c-Kit mehr aufweisen. Ob die erhöhten Zahlen basophiler Granulozyten die Abwesenheit von Mastzellen kompensieren können, z. B. bei der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit, ist derzeit noch eine Spekulation.

Desweiteren lässt sich in nicht-immunisierten *Kit^{W-sh}*-Mäusen sowohl auf dem BALB/c- als auch auf dem C57BL/6-Hintergrund eine reduzierte **B-Zellfrequenz** beobachten. Jedoch hat dieses Phänomen keine Auswirkung auf die Funktionalität der B-Zellen hinsichtlich ihrer Antikörperproduktion *in vivo*. Dass die *Kit^{W-sh}*-Mutation keine Auswirkung auf Konzentrationen von IgE, IgG1 und IgG2b im Serum immunisierter Tiere hat, wurde bereits in Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund während allergischer Atemwegserkrankungen untersucht und gezeigt [65,66]. Diese Ergebnisse konnten auch für die neu generierten C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Vermutlich sind die B-Zellen in immunisierten *Kit^{W-sh}*-Tieren zu einer früher einsetzenden bzw. einer intensiveren Antikörperproduktion oder erhöhter Proliferation fähig.

Der Tyrosinkinase-Rezeptor **c-Kit** stellt eine zentrale und lebensnotwendige Komponente dar, welche viele Prozesse in der Zellentwicklung und Differenzierung erst möglich macht. Mäuse mit einer zur Funktionslosigkeit führenden Mutation des *W*-Lokus (*Kit^{W/W}*) sterben kurz nach der Geburt infolge von Knochenmark-Hypoplasie und schwerer makrozytärer Anämie [67,69]. Wenn diese Mäuse jedoch mit Stammzellen aus Wildtyptieren rekonstituiert werden, können diese überleben. Das Überleben der *Kit^{W/W}*-Mäuse kann aber auch durch 800-fache Überexpression von Erythropoetin ermöglicht werden [9], was auf die Wichtigkeit von c-Kit in der Myelopoese, und speziell der Erythropoese, hindeutet. Obwohl B-lymphoide Vorläuferzellen auf der Zelloberfläche c-Kit tragen und *in vitro* auf SCF reagieren, scheint diese Interaktion in der Lymphopoese weniger kritisch zu sein als in der Myelopoese. So zeigen beispielsweise Knochenmarkzellen einen Verlust von myeloiden Zellen und dafür ein übermäßiges Wachstum von B-Lymphozyten, wenn sie mit einem blockierenden monoklonalen Antikörper gegen c-Kit behandelt werden [70]. Auf unreifen T-Zellen im Thymus ist c-Kit ähnlich hoch wie auf B-lymphoiden Vorläuferzellen exprimiert [71] und durch Zugabe von SCF kann sogar die Proliferation der T-Zellen *in vivo* erhöht werden [72]. Jedoch ist für die Differenzierung der T-Zellen die SCF/c-Kit-Interaktion nicht zwingend erforderlich [73].

Die *Kit*^{W-sh}-Mutation betrifft nicht das *Kit*-Gen selbst, sondern dessen regulatorische Elemente. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die c-Kit-Expression auf den hämatopoetischen Stammzellen der *Kit*^{W-sh}-Mäuse nicht beeinträchtigt ist (siehe **Abb. 16**), jedoch lassen sich vermehrt hämatopoetische Stammzellen in der Milz nachweisen (**Abb. 14**). Die Frequenzen der danach folgenden Entwicklungsstufen MPP¹, CMP² und GMP³ sind ebenfalls in den *Kit*^{W-sh}-Milzen erhöht, was letztendlich als **extramedulläre Myelopoese** bezeichnet werden kann. Einige Publikationen berichten von extramedullärer Hämatopoese in der Milz tumortragender Mäuse [53], was mit dem Phänomen in *Kit*^{W-sh}-Mäusen übereinstimmt (**Abb. 11** und **Abb. 12**), mit dem Unterschied, dass die letztgenannten Mäuse gesund sind.

Interessanterweise finden sich im Knochenmark der *Kit*^{W-sh}-Tiere weniger GMP, was auf eine Migration dieser Zellen aus dem Knochenmark in die Milz hindeuten könnte. Desweiteren verursacht die *Kit*^{W-sh}-Mutation eine reduzierte MEP⁴-Frequenz in der Milz und auch im Knochenmark (**Abb. 15**), was eine drastisch veränderte Myelopoese impliziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die MEP und GMP das Knochenmark verlassen, um in der Peripherie die endgültige Differenzierung durchlaufen zu können. Die GMP scheinen diese Entwicklung in der Milz zu vollziehen, während die MEP die Differenzierung in einem anderen Organ beenden, da die C.B6-*Kit*^{W-sh}-Tiere keine anämische Symptomatik zeigen [74]. Vermutlich wird dies durch verstärkte Proliferation der Erythrozyten-Vorläufer, Erythroblasten oder Retikulozyten, kompensiert.

Die *Kit*^{W-sh}-Mutation betrifft regulatorische DNA-Elemente, die für die Expression von c-Kit auf Mastzellen notwendig sind, daher sterben Mastzellen in *Kit*^{W-sh}-Mäusen ab. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass durch die *Kit*^{W-sh}-Mutation auch die Expression von c-Kit auf anderen myeloiden Zellen reguliert wird (**Abb. 19**), jedoch mit anderen Konsequenzen. Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine grundsätzliche c-Kit-Reduktion während der Myelopoese in *Kit*^{W-sh}-Mäusen (**Abb. 16**). Im Knochenmark setzt die c-Kit-Reduktion bereits ab dem Stadium ST-HSC ein, während in der Milz die ersten c-Kit-Unterschiede erst ab dem CMP-Stadium beobachtet werden. Die Arbeit von Ding et al. [23] belegt, dass der SCF auf Endothelzellen und perivaskulären Zellen eine zentrale Rolle für die Retention von Stamzellen im Knochenmark hat. Demnach sollten

¹MPP = Multipotente Vorläufer.

²CMP = Gemeinsame myeloide Vorläufer.

³GMP = Granulozytär-monocytaire Vorläufer.

⁴MEP = Megakaryozytär-erythroide Vorläufer.

die Stammzellen aus dem Knochenmark auswandern, wenn die Interaktion zwischen c-Kit und seinem Liganden SCF unzureichend ist. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das Auftreten der extramedullären Myelopoese in den *Kit^{W-sh}*-Milzen sein.

4.2 G-MDSC-ähnliche Zellen in Milzen naiver *Kit^{W-sh}*-Mäuse

Vor einigen Jahren wurde von der Arbeitsgruppe Nigrovic et al. [34] über eine **Neutrophilie** in C57BL/6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen berichtet, was sich jedoch mit unseren Ergebnissen nicht in Einklang bringen lässt. Eine Neutrophilie ist per Definition eine übermäßige Expansion neutrophiler Granulozyten im Blut. Dabei liegen die neutrophilen Granulozyten phänotypisch als polymorphnukleäre Zellen mit einer Ko-Expression von Gr-1 und CD11b auf der Zelloberfläche vor. Im Blut der *Kit^{W-sh}*-Mäuse lässt sich keine Expansion dieser Zellen feststellen (**Abb. 10**). Auch im Knochenmark, dem Bildungsort neutrophiler Granulozyten, ist keine Zellzahlveränderung zu beobachten. Sehr auffällig ist nur das vielfach stärker ausgeprägte Vorkommen der Gr1⁺/CD11b⁺-Population in den Milzen der *Kit^{W-sh}*-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Schlussendlich spricht unser Befund gegen eine Neutrophilie in *Kit^{W-sh}*-Mäusen.

Die genauere Analyse dieser Splenozyten in den *Kit^{W-sh}*-Mäusen ergab, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Populationen handelt. Eine davon CD11b⁺/Ly6G^{high}/Ly6C⁺ (P5) zeigt den Phänotyp neutrophiler Granulozyten, während die andere CD11b⁺/Ly6G^{int}/Ly6C⁺ (P6) eine morphologische Besonderheit, nämlich einen ringförmigen Zellkern, aufweist (**Abb. 20**). Normalerweise werden diese myeloiden Zellen mit ringförmigem Zellkern im Blut von Patienten mit myeloproliferativen Erkrankungen und nur sehr selten in gesunden Individuen beobachtet [75,76]. Die Publikation von Biermann et al. aus dem Jahre 1999 [52] führt ebenfalls Zellen mit einem ringförmigen Kern auf, in Knochenmark und Blut naiver BALB/c-Mäuse und vermehrt in Infiltraten tumortragender Mäuse. In dieser Arbeit werden die ringförmigen Zellen einzelnen Stadien der myeloiden Differenzierung zugeordnet, wie z. B. den Myelozyten, Promyelozyten oder den stabkernigen neutrophilen Granulozyten. Weiterhin wird beschrieben, dass solche Zellen unter den **myeloiden Suppressorzellen (MDSC)** vorkommen.

Der Begriff MDSC steht für eine heterogene Zellpopulation mit immunsuppressiven Eigenschaften, die bei Tumorerkrankungen oder Entzündungen auftritt. Darunter können sich Vorläufer polymorphnukleärer neutrophiler Granulozyten, Monozyten, Makrophagen

und dendritischer Zellen, aber auch bereits ausdifferenzierte Zellen befinden. Gewöhnlich akkumulieren diese im Tumorgewebe und in sekundären lymphatischen Organen, wo sie direkt eine suppressive Wirkung auf die inflammatorische Immunantwort ausüben können [53,77,78]. Außergewöhnlich ist jedoch unser Befund, dass diese Zellen in naiven *Kit^{W-sh}*-Mäusen vorkommen. Ob andere sekundäre lymphatischen Organe, z. B. Lymphknoten, Peyer-Plaques, Blinddarm und Mandeln, von der massiven Expansion der P6-Zellen betroffen sind, wurde noch nicht untersucht.

Die CD11b⁺-Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und *Kit^{W-sh}*-Mäusen zeigen einen einheitlichen Phänotyp, jedoch ist die P6-Population in *Kit^{W-sh}*-Mäusen vergrößert (**Abb. 18**) und wird deshalb möglicherweise z. T. aus dem Knochenmark ausgeschwemmt. Die vermutliche Ursache dafür findet man wiederum in der reduzierten c-Kit-Expression auf diesen Zellen (**Abb. 16**), die zu einer Migration dieser Zellen bzw. ihrer Vorläufer in die Milz führen könnte. So kommt es zu einer Akkumulation von fast allen Vorläuferzellen in der Milz (**Abb. 14A** und **Abb. 15A**) und zu einer bevorzugten Entwicklung in Richtung der GMP auf Kosten der MEP (**Abb. 15A**). Durch Knochenmarktransplantation konnte nachgewiesen werden, dass es ein intrinsischer Effekt in den *Kit^{W-sh}*-Knochenmarkszellen ist, welcher zur Expansion von CD11b⁺/Ly6G^{int}/Ly6C⁺ (P6) und CD11b⁺/Ly6G^{high}/Ly6C⁺ (P5) Zellen in der Milz führt (**Abb. 22**), unabhängig von ihrer Wildtyp-Umgebung.

Durch Funktionsanalysen konnte die suppressive Wirkung sowohl auf die T-Zellproliferation *in vitro* (**Abb. 24**) als auch durch adoptiven Transfer in tumortragende Mäuse *in vivo* (**Abb. 34**) nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse trifft das Definitionskonzept MDSC auf die P6- und auch P5-Zellen zu.

In der Literatur werden die Subpopulationen M-MDSC (monozytär) und G-MDSC (granulozytär) beschrieben, die jeweils über ihre Wirkungsweise und ihren Phänotyp definiert sind. Wenn diese M-MDSC und G-MDSC anhand gleicher durchflusszytometrischer Strategie mit CD11b, Ly6C und Ly6G untersucht werden, dann entsprechen die M-MDSC den P7-Zellen und die G-MDSC den P5-Zellen. Die P6-Zellen kommen in Milzen von Wildtyptieren kaum vor und sollten demnach im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

Die M-MDSC sind in der Lage, die Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen über die Produktion von iNOS und Arginase zu unterbinden. Die G-MDSC hingegen bewerkstelligen dies durch Freisetzung von ROS. Durch Einsatz spezifischer Inhibitoren

gegen iNOS, Arginase und ROS war es möglich, die funktionelle Identität der P6-Zellen zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass P6-Zellen aus naiven *Kit^{W-sh}*-Mäusen die T-Zellproliferation, zumindest teilweise, über ROS-Produktion supprimieren (**Abb. 26**) und somit eher den **G-MDSC** ähneln. Die expandierte P5-Population nutzt den selben Mechanismus zur Inhibition der T-Zellproliferation, was bereits in einigen Publikationen für die phänotypisch vergleichbare Population im Wildtyp berichtet wurde [57,79].

Lange Zeit wurde der **Unterschied zwischen G-MDSC und neutrophilen Granulozyten** kontrovers diskutiert, weil diese Zelltypen jeweils die gleiche polymorphkernige Morphologie und den CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁺ Phänotyp zeigen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes hat die Arbeit von Youn et al. [57] beigetragen, in welcher Neutrophile aus naiven Mäusen und die G-MDSC aus tumortragenden Mäusen untersucht und verglichen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Neutrophilen erhöhte Phagozytoseaktivität, lysosomale Proteinexpression und TNF- α -Produktion verglichen mit G-MDSC aufweisen. Dagegen ist die Expression von CD244, CD115, CD124 und die Aktivität der Myeloperoxidase, Arginase sowie die Produktion von ROS in G-MDSC verstärkt. Welche dieser Eigenschaften auf die in der vorliegenden Arbeit beschriebene P6-Zellpopulation zutreffen, wird sicherlich in zukünftigen Arbeiten näher untersucht. Vor allem sollten eventuelle Unterschiede zwischen der P6-Population in Milz, Tumor und Knochenmark aus *Kit^{W-sh}*-Mäusen und Wildtyptieren ausgearbeitet werden.

Der endgültige Beweis, dass es sich tatsächlich um MDSC handelt, konnte anhand eines Tumormodells erbracht werden. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass L1C2-Zellen in C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen größere Tumore bilden als in Wildtyptieren, was definitiv nicht auf die Abwesenheit von Mastzellen zurückgeführt werden kann. Der adoptive Transfer von P5- und P6-Zellen aus naiven C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen in tumortragende Wildtypmäuse führt ebenfalls zu einem schnelleren Tumorwachstum (**Abb. 34B**). Sowohl die intravenöse als auch die subkutane Verabreichung dieser Zellen bewirkt ein vergleichbares Ergebnis. Allerdings war es nicht möglich, das Schicksal der injizierten Ly6G⁺-Splenozyten zu verfolgen, da es zur Zeit keinen universellen Marker für diese Zellen gibt. Diese Fragestellung wird sicherlich noch in weiterführenden Arbeiten intensiver verfolgt. So könnte man die *Kit^{W-sh}*-Mäuse mit Mäusen verpaaren, die ubiquitär GFP oder Luziferase exprimieren. Nach Isolierung und adoptivem Transfer ließe sich das Schicksal der P6-Zellen aus *Kit^{W-sh}*-Mäusen in Wildtypen *in vivo* verfolgen.

Desweiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine drastische Verzögerung des

Tumorstadien in Mäusen beobachtet werden, welche zuvor lethal bestrahlt wurden und eine Knochenmarktransplantation erhielten (**Abb. 32**). Der Grund dafür ist vermutlich eine systemische Entzündung durch den massiven Anteil nekrotischer Zellen nach Bestrahlung, die vom Immunsystem zunächst beseitigt werden müssen. In dieser Zeit laufen pro-inflammatorische Prozesse ab, die zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort gegen Tumorzellen beitragen [60].

Dass *Kit*^{W-sh}-Mäuse aufgrund massiver Expansion der G-MDSC-ähnlichen Zellen spontan Tumore entwickeln, wurde in unserer Arbeitsgruppe nicht beobachtet. In der Literatur gibt es hierzu ebenfalls keine Hinweise, was dafür spricht, dass diese Splenozyten möglicherweise zunächst nur akkumulieren, ohne funktionell zu sein. Prinzipiell ist es allerdings möglich, dass ältere Tiere mit der *Kit*^{W-sh}-Mutation zur spontanen Tumorentwicklung neigen könnten. Denkbar ist es, dass erst ein geeignetes "aktivierendes Mikromilieu" benötigt wird, um eine Aktivierung der MDSC auszulösen.

Tumorzellen sind in der Lage Chemokine freizusetzen, welche Neutrophile und auch ihre Vorläufer anlocken. Dazu gehören GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TGF- β , SCF, VEGF, IL-3, IL-6, alles die Myelopoese fördernde und z. T. Zellreifung verhindernde Mediatoren [53,80]. Dies bewirkt, dass die Neutrophilen bzw. deren Vorläufer zu G-MDSC polarisiert werden und somit immunsuppressiv und pro-tumoral agieren [81]. In *in vitro*-Arbeiten wurde bisher belegt, dass GM-CSF, G-CSF, IL-6 und IL-13 in humanen und murinen unreifen myeloiden Knochenmarkzellen eine Transition zu MDSC induzieren [82–85]. Zu den wichtigsten bisher bekannten MDSC-Aktivatoren *in vivo* gehören PGE-2, LPS, Hsp72, S100A8/A9, IL-1 β , IFN- γ , IL-4 und IL-13 [86]. Am häufigsten werden dann die MDSC im Tumorgewebe, in der Milz und im Blut detektiert [87].

Die Arbeit von Youn et al. [56] zeigt jedoch, dass in Mäusen nicht jede von zehn untersuchten Tumorarten in der Lage ist, eine vergleichbar starke Expansion und Aktivierung von MDSC zu bewirken. Vielleicht kommt die Funktion der MDSC erst zum Tragen, wenn die Entstehung von Tumoren zusätzlich begünstigt wird. So wurden von Sinnamon et al. [88] C57BL/6-*Kit*^{W-sh}-Mäuse mit APC^{Min/+}-Mäusen gekreuzt, welche zu einer spontanen Entstehung von Darm-Adenomen neigen. Im Vergleich zu den Kontrolltieren entwickelten die APC^{Min/+}; *Kit*^{W-sh}-Mäuse zahlreichere und größere Tumore. Dieses Resultat ließ die Autoren darauf schließen, dass in diesem Modell die Tumor-protective Wirkung der Mastzellen zum Ausdruck kommt, wobei Kontrollversuche mit Mastzell-Rekonstitutionen versäumt wurden. Daher ist es möglich, dass in diesem

Modell die c-Kit-Mutation und die G-MDSC-ähnlichen Zellen für die Tumorentwicklung verantwortlich sind, und nicht die Mastzellen. Die Beteiligung der Mastzelle im L1C2-Tumormodell konnte von uns ausgeschlossen werden. Anhand der Kontrollversuche mit *Kit^{W-sh}*-Knochenmarkchimären (siehe **Abb. 32**) und *Cpa3^{Cre/+}*-Mäusen (siehe **Abb. 33**) konnte deutlich gezeigt werden, dass die Mastzelle keinen Einfluss auf die L1C2-Tumorentwicklung ausübt, sondern vielmehr die **G-MDSC-ähnlichen Zellen**.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse veranschaulichen die aberrante Myelopoese in den C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäusen, die schließlich zu einer massiven Akkumulation von CD11⁺Ly6C⁺-Zellen mit hoher und intermediärer Ly6G-Expression führt. Alle für C.B6-*Kit^{W-sh}*-Mäuse erhaltenen Ergebnisse treffen auch auf den Stamm C57BL/6-*Kit^{W-sh}* zu. Für die Tumorexperimente auf dem Hintergrund der C57BL/6-Maus muss jedoch noch ein entsprechendes Modell in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden.

4.3 Aktuelle *Kit*-unabhängige Modelle mastzellloser Mäuse

Durch *in vivo*-Versuche an mastzelllosen Mäusen hat die Mastzelle den Status einer **“Multi-Effektor”-Zelle** mit den meisten pleiotropen Funktionen erreicht. So wird beschrieben, dass die Mastzelle eine pathophysiologische Rolle in Arteriosklerose, pulmonaler Hypertonie, Ischämie-Reperfusionsschaden, männlicher Unfruchtbarkeit, rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, interstitieller Zystitis, Auslösung von Angstzuständen, Alzheimer-Krankheit, Nozizeption, Adipositas und Diabetes Mellitus und vieles mehr hat [89].

Protektiv	Angeborene Immunität	Abbau von Peptiden und Toxinen Schutz vor Bakterien Schutz vor Parasiten
Schädlich	Allergie	Anaphylaxis Asthma Kontaktallergie
	Gefäßserkrankungen und Gewebeveränderungen	Aneurysma Verbrennungen
Ungenau definiert	Angeborene Immunität	Enteromikrobielle Sepsis (CLP)
	Adaptive Immunität	Interaktionen mit T-Zellen, Transplantatabstoßung
	Autoimmunität	Typ-1-Diabetes Neurologische Störungen (EAE) Arthritis
	Gefäßserkrankungen, Gewebeveränderungen und Metabolismus	Arteriosklerose Adipositas Angiogenese Geweberegeneration und Gewebeveränderungen (Fibrose)
	Tumorerkrankungen	Tumorstadium und Vaskularisation

Tab. 2: Diversität und experimentelle Basis für angenommene Funktionen der Mastzelle. (Verändert nach: Rodewald et al., *Immunity*, 2012)

In der **Tab. 2** sind nachgewiesene protektive bzw. schädliche Funktionen der Mastzelle und bisher nur ungenau bestimmte Funktionen aufgezeigt. Ein beträchtlicher Teil der Ergebnisse wurde an Mastzell-defizienten Mäusen mit *Kit*-Mutationen generiert, die bekanntlich noch weitere Anomalien aufweisen. Die Unterteilung “ungenau definiert” umfasst die Studien, in denen die Ergebnisse **Diskrepanzen** ergaben, sobald unterschiedliche *Kit*-defiziente oder *Kit*-unabhängige Modelle verwendet wurden. So ist es möglich, dass einige der bisher der Mastzelle zugesprochenen Funktionen auf die in dieser Arbeit identifizierten immunsuppressiven G-MDSC-ähnlichen Zellen oder andere Anomalien in *Kit*-defizienten Mäusen zurückzuführen sind.

Deshalb ist der aktuelle Trend der Mastzellforschung, die *Kit*-abhängigen Modelle durch *Kit*-unabhängige Modelle mit einer mastzellspezifischen Mutation abzulösen. Diese *Kit*-unabhängigen Modelle sind in der **Tab. 3** aufgezeigt.

Defizienz	Mausbezeichnung	Konstrukt	Mastzellzahlen	Basophilenzahlen
konstitutiv	<i>Mcpt5-Cre; R-DTA</i>	Kreuzung R-DTA gefloxter Maus mit transgener Maus, die Cre unter der Kontrolle des <i>Mcpt5</i> -Promoters exprimiert	Peritoneale Mastzellen (98%) und Hautmastzellen (89-96,5%) drastisch reduziert, mukosale Mastzellen nicht betroffen	unverändert
	„Cre-Master“ <i>Cpa3^{Cre/+}</i>	Genveränderung: Cre Expression unter der Kontrolle des <i>Cpa3</i> -Promoters	Alle Typen von Mastzellen abwesend	60% Reduktion in der Milz
	„Hello Kitty“ <i>Cpa3-Cre; Mcl-1^{fl/fl}</i>	Kreuzung zwischen <i>Mcl-1</i> gefloxter Maus mit transgener Maus, die Cre unter der Kontrolle des <i>Cpa3</i> -Promoterfragments exprimiert	Reduktion aller Mastzellen (92-100%), Mastzellen in der Milz unverändert	Reduktion in der Milz (58%), Blut (74%) und Knochenmark (75%)
induzierbar	<i>Mcpt5-Cre; iDTR</i>	Kreuzung zwischen induzierbar-DTR gefloxter Maus mit transgener Maus, die Cre unter der Kontrolle des <i>Mcpt5</i> -Promoters exprimiert	Mastzellen des Peritoneums und Haut zu 97,5% 1 Woche nach DT-Behandlung depletiert, Mastzellen des Magen-Darm-Traktes unverändert	unverändert
	Mas-TRECK	Humanes <i>DTR</i> exprimierende transgene Maus, <i>DTR</i> unter der Kontrolle des Intronenhancer vom <i>Il4</i> -Gen	Mastzellen im Peritoneum, Haut, Magen und Mesenterium 3 Tage nach DT-Behandlung depletiert	>95% Reduktion im Blut

Tab. 3: Charakteristiken *Kit*-unabhängiger konstitutiver und induzierbarer Modelle mit einer Mastzelldefizienz. (Verändert nach: Reber et al., *Trends in Immunology*, 2012)

Die *Mcpt5-Cre; R-DTA*-Maus¹ ist durch die Abwesenheit von Mastzellen im Peritoneum und in der Haut gekennzeichnet, während die mukosalen Mastzellen unverändert bleiben [90]. Mit diesem Modell kommen die Forscher schnell an ihre Grenzen, sobald nicht nur die Bindegewebsmastzellen, sondern auch mukosale Mastzellen experimentell untersucht werden sollen.

Dagegen sind in der „Cre-Master“-Maus² alle Mastzelltypen eliminiert. Die Mastzelldefizienz resultiert aus der Genotoxizität von Cre, wobei nur die Zellen betroffen sind, die hohe Mengen an Carboxypeptidase 3 exprimieren [61]. So sind in dieser *Cpa3^{Cre/+}*-Maus zusätzlich 60% der basophilen Granulozyten in der Milz betroffen. Ansonsten wurden keine weiteren Defekte beobachtet, obwohl Carboxypeptidase 3 noch von einigen T-Zellvorläufern, T-Zellen im Thymus und manchen hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Dieses *Kit*-unabhängige Mausmodell wurde in einem Kontrollexperiment dieser Arbeit eingesetzt, um die Beteiligung der Mastzelle im L1C2-Tumormodell auszuschließen (**Abb. 33**).

Nach einem ähnlichem Prinzip wurde die *Cpa3^{Cre/+}; Mcl-1^{fl/fl}*-Maus generiert [91]. Hier

¹*Mcpt5* = Mastzellprotease 5, R-DTA - Diphtherietoxin α -Kette, wird unter der Kontrolle des *Rhodopsin*-Promoters exprimiert.

²Cre-Master = **Cre**-mediated **m**ast cell **e**radication.

ist die Genotoxizität von Cre nur in den Zellen hoch, die Mcl-1¹ exprimieren. Und auch bei diesem mastzelllosen Mausmodell sind die Basophilen zu einem beträchtlichen Anteil eliminiert bzw. ist ihre Funktion beeinträchtigt.

Die drei oben aufgeführten Modelle sind durch eine konstitutive Mastzelldefizienz gekennzeichnet. Es gibt allerdings auch Modelle, in denen die Mastzellen erst durch eine Diphtherietoxin-Behandlung eliminiert werden. So sind in den *Mcpt5-Cre; iDTR*-Mäusen die selben Mastzelltypen betroffen, wie in der *Mcpt5-Cre; R-DTA*-Maus, mit dem Unterschied, dass die Mastzellen nur für einige Wochen abwesend sind [90]. Die Basis dieses Modells ist die Interaktion des Diphtherietoxins mit dem induzierbaren Diphtherietoxin-Rezeptor, wodurch nur in betroffenen Mastzellen die Apoptose auslöst wird. Unklar ist jedoch, ob im Laufe der Behandlung mit Diphtherietoxin eine Wechselwirkung mit anderen Zellen eingegangen wird und somit der Ausgang eines Experimentes direkt beeinflusst.

Die Mas-TRECK-Maus² ist ebenfalls ein durch Diphtherietoxin induzierbares mastzellloses Modell [92,93]. Alle Mastzelltypen sind betroffen, wobei auch fast alle Basophilen entfernt werden. Dieser Mangel macht die Mas-TRECK-Maus vermutlich zu keinem optimalen Modell.

Üblich war es bisher die generierten Ergebnisse an mastzelllosen Mäusen durch Mastzell-Rekonstitutionen zu verifizieren. Ob bisher solch ein adoptiver Mastzelltransfer in den oben beschriebenen Modellen durchgeführt wurde, ist nicht berichtet worden. Auch wenn diese in Kultur generierten Mastzellen (BMMC) nicht alle Organe besiedeln, in denen Mastzellen vorkommen, und auch oft unphysiologische Frequenzen und Lokalisation in besiedelten Organen zeigen [67,94], wäre es dennoch ein wertvolles Kontrollexperiment um die möglichen genetischen Veränderungen in *Kit*-unabhängigen Modellen aufzudecken.

Diese Alternativen zu *Kit*-abhängigen Mastzell-defizienten Modellen stellen insgesamt, vor allem durch ihre Optionen konstitutiver und induzierbarer Defizienz, einen immensen Fortschritt für die Mastzellforschung dar. Allerdings ist keines dieser Modelle uneingeschränkt für *in vivo*-Experimente geeignet, weil entweder nicht alle Mastzelltypen eliminiert werden oder zusätzlich Basophile betroffen sind.

¹Mcl-1 = myeloid leukemia cell differentiation protein 1.

²Mas-TRECK = **m**ast cell-specific enhancer-mediated **t**oxin **r**eceptor-mediated **c**onditional cell **k**nock out.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I. & Schlessinger, J. Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* **130**, 323–334 (2007).
- [2] Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F.H., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, H.W.J., Brodeur, D., Zuckerman, E.E. & Hardy, W.D. A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* **320**, 415–421 (1986).
- [3] Gadd, S.J. & Ashman, L.K. A murine monoclonal antibody specific for a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human myeloid leukaemias. *Leukemia research* **9**, 1329–1336 (1985).
- [4] Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. & Bernstein, A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* **335**, 88–89 (1988).
- [5] Geissler, E.N., Ryan, M.A. & Housman, D.E. The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* **55**, 185–192 (1988).
- [6] Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.Y., Birkett, N.C., Okino, K.H. & Murdock, D.C. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* **63**, 213–224 (1990).
- [7] Ronnstrand, L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **61**, 2535–2548 (2004).
- [8] Danforth, C.H. & de Aberle, S.B. The Functional Inter-Relation of Certain Genes in the Development of the Mouse. *Genetics* **12**, 340–347 (1927).
- [9] Waskow, C., Terszowski, G., Costa, C., Gassmann, M. & Rodewald, H.-R. Rescue of lethal c-Kit^{W/W} mice by erythropoietin. *Blood* **104**, 1688–1695 (2004).
- [10] Matsui, Y., Zsebo, K.M. & Hogan, B.L. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* **347**, 667–669 (1990).
- [11] Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y. & Lonai, P. Developmental expression of c-kit, a proto-oncogene encoded by the W locus. *Development (Cambridge, England)* **109**, 911–923 (1990).
- [12] Wehrle-Haller, B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **16**, 287–296 (2003).
- [13] Roskoski, J., Robert, Signaling by Kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **337**, 1–13 (2005).

- [14] Agarwal, S. & Ojha, A. Piebaldism A brief report and review of the literature. *Indian dermatology online journal* **3**, 144–147 (2012).
- [15] Loveland, K.L. & Schlatt, S. Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature’s gene knockouts. *The Journal of endocrinology* **153**, 337–344 (1997).
- [16] Blume-Jensen, P., Janknecht, R. & Hunter, T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Current biology: CB* **8**, 779–782 (1998).
- [17] Broudy, V.C. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* **90**, 1345–1364 (1997).
- [18] Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Haynesworth, S.E., Bruder, S.P. & Gerson, S.L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *Journal of hematology & stem cell research* **9**, 841–848 (2000).
- [19] Laurson, J., Selden, C., Clements, M., Mavri-Damelin, D., Coward, S., Lowdell, M. & Hodgson, H.J.F. Putative human liver progenitor cells in explanted liver. *Cells, tissues, organs* **186**, 180–191 (2007).
- [20] Zaruba, M.-M., Soonpaa, M., Reuter, S. & Field, L.J. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation* **121**, 1992–2000 (2010).
- [21] Leong, K.G., Wang, B.-E., Johnson, L. & Gao, W.-Q. Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* **456**, 804–808 (2008).
- [22] Hutt, K.J., McLaughlin, E.A. & Holland, M.K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction* **12**, 61–69 (2006).
- [23] Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G. & Morrison, S.J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457–462 (2012).
- [24] Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V.C. & Zsebo, K.M. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* **78**, 1403–1412 (1991).
- [25] Kitamura, Y. & Ito, A. Mast cell-committed progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11129–11130 (2005).
- [26] Gurish, M.F. & Austen, K.F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity* **37**, 25–33 (2012).
- [27] Franco, C.B., Chen, C.-C., Drukker, M., Weissman, I.L. & Galli, S.J. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell stem cell* **6**, 361–368 (2010).

- [28] Moon, T.C., St Laurent, C.D., Morris, K.E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y. & Befus, A.D. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal immunology* **3**, 111–128 (2010).
- [29] Metcalfe, D.D., Baram, D. & Mekori, Y.A. Mast cells. *Physiological reviews* **77**, 1033–1079 (1997).
- [30] Maurer, M. & Metz, M. The status quo and quo vadis of mast cells. *Experimental dermatology* **14**, 923–929 (2005).
- [31] Galli, S.J., Tsai, M. & Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **454**, 445–454 (2008).
- [32] Metcalfe, D.D. Mast cells and mastocytosis. *Blood* **112**, 946–956 (2008).
- [33] Galli, S.J. & Kitamura, Y. Genetically mast-cell-deficient W/W^v and Sl/Sld mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *The American Journal of Pathology* **127**, 191–198 (1987).
- [34] Nigrovic, P.A., Gray, D.H.D., Jones, T., Hallgren, J., Kuo, F.C., Chaletsky, B., Gurish, M., Mathis, D., Benoist, C. & Lee, D.M. Genetic inversion in mast cell-deficient (Wsh) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *The American Journal of Pathology* **173**, 1693–1701 (2008).
- [35] Wolters, P.J., Mallen-St Clair, J., Lewis, C.C., Villalta, S.A., Baluk, P., Erle, D.J. & Caughey, G.H. Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit(W-sh)/Kit(W-sh) sash mice. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **35**, 82–88 (2005).
- [36] Lyon, M.F. & Glenister, P.H. A new allele sash (Wsh) at the W-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genetical research* **39**, 315–322 (1982).
- [37] Duttlinger, R., Manova, K., Chu, T.Y., Gyssler, C., Zelenetz, A.D., Bachvarova, R.F. & Besmer, P. W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development (Cambridge, England)* **118**, 705–717 (1993).
- [38] Nagle, D.L., Kozak, C.A., Mano, H., Chapman, V.M. & Bućan, M. Physical mapping of the Tec and Gabrb1 loci reveals that the Wsh mutation on mouse chromosome 5 is associated with an inversion. *Human molecular genetics* **4**, 2073–2079 (1995).
- [39] Berrozpe, G., Agosti, V., Tucker, C., Blanpain, C., Manova, K. & Besmer, P. A distant upstream locus control region is critical for expression of the Kit receptor gene in mast cells. *Molecular and cellular biology* **26**, 5850–5860 (2006).
- [40] Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. & Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature methods* **6**, 359–362 (2009).

- [41] Tenzer, S., Docter, D., Rosfa, S., Wlodarski, A., Kuharev, J., Rekik, A., Knauer, S.K., Bantz, C., Nawroth, T., Bier, C., Sirirattanapan, J., Mann, W., Treuel, L., Zellner, R., Maskos, M., Schild, H. & Stauber, R.H. Nanoparticle size is a critical physicochemical determinant of the human blood plasma corona: a comprehensive quantitative proteomic analysis. *ACS nano* **5**, 7155–7167 (2011).
- [42] Heib, V., Becker, M., Taube, C. & Stassen, M. Advances in the understanding of mast cell function. *British Journal of Haematology* **142**, 683–694 (2008).
- [43] Becker, M., Reuter, S., Friedrich, P., Doener, F., Michel, A., Bopp, T., Klein, M., Schmitt, E., Schild, H., Radsak, M.P., Echtenacher, B., Taube, C. & Stassen, M. Genetic variation determines mast cell functions in experimental asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **186**, 7225–7231 (2011).
- [44] Khairatkar-Joshi, N. & Ahmad, N.S. Inverse polymerase chain reaction mediated chromosome walking within the human glutamic acid decarboxylase gene. *Journal of Biosciences* **23**, 265–269 (1998).
- [45] Zhou, J.S., Xing, W., Friend, D.S., Austen, K.F. & Katz, H.R. Mast cell deficiency in Kit(W^{sh}) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 2797–2802 (2007).
- [46] Noguchi, J., Kuroda, E. & Yamashita, U. Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *Journal of leukocyte biology* **78**, 605–611 (2005).
- [47] Kimura, Y., Ding, B., Imai, N., Nolan, D.J., Butler, J.M. & Rafii, S. c-Kit-mediated functional positioning of stem cells to their niches is essential for maintenance and regeneration of adult hematopoiesis. *PloS One* **6**, 26918 (2011).
- [48] Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 1**, 11842–11849 (2003).
- [49] Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197 (2000).
- [50] Soule, B.P., Brown, J.M., Kushnir-Sukhov, N.M., Simone, N.L., Mitchell, J.B. & Metcalfe, D.D. Effects of gamma radiation on FcεRI and TLR-mediated mast cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **179**, 3276–3286 (2007).
- [51] Greifengberg, V., Ribechini, E., Rössner, S. & Lutz, M.B. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-γ treatment impairs DC development. *European journal of immunology* **39**, 2865–2876 (2009).
- [52] Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K.W., Sorg, C. & Sunderkötter, C. Murine

- leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *Journal of leukocyte biology* **65**, 217–231 (1999).
- [53] Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* **9**, 162–174 (2009).
- [54] Cuenca, A.G., Delano, M.J., Kelly-Scumpia, K.M., Moreno, C., Scumpia, P.O., Laface, D.M., Heyworth, P.G., Efron, P.A. & Moldawer, L.L. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **17**, 281–292 (2011).
- [55] Movahedi, K., Guillemins, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschinn, A., De Baetselier, P. & Van Ginderachter, J.A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233–4244 (2008).
- [56] Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **181**, 5791–5802 (2008).
- [57] Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I.N., Biswas, S.K. & Gabrilovich, D.I. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology* **91**, 167–181 (2012).
- [58] Sharma, S., Stolina, M., Luo, J., Strieter, R.M., Burdick, M., Zhu, L.X., Batra, R.K. & Dubinett, S.M. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **164**, 4558–4563 (2000).
- [59] Dubinett, S.M., Patrone, L., Tobias, J., Cochran, A.J., Wen, D.R. & McBride, W.H. Intratumoral interleukin-2 immunotherapy: activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **36**, 156–162 (1993).
- [60] Rubner, Y., Wunderlich, R., Rühle, P.-F., Kulzer, L., Werthmüller, N., Frey, B., Weiss, E.-M., Keilholz, L., Fietkau, R. & Gaipl, U.S. How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? *Frontiers in oncology* **2**, 75 (2012).
- [61] Feyerabend, T.B., Weiser, A., Tietz, A., Stassen, M., Harris, N., Kopf, M., Radermacher, P., Möller, P., Benoist, C., Mathis, D., Fehling, H.J. & Rodewald, H.-R. Cre-Mediated Cell Ablation Contests Mast Cell Contribution in Models of Antibody- and T Cell-Mediated Autoimmunity. *Immunity* (2011).doi:10.1016/j.immuni.2011.09.015
- [62] Ugel, S., Delpozzi, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S. & Bronte, V. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Current opinion in pharmacology* **9**, 470–481 (2009).
- [63] Kao, J., Ko, E.C., Eisenstein, S., Sikora, A.G., Fu, S. & Chen, S.-H. Targeting

- immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Critical reviews in oncology/hematology* **77**, 12–19 (2011).
- [64] Reuter, S., Dehzad, N., Martin, H., Heinz, A., Castor, T., Sudowe, S., Reske-Kunz, A.B., Stassen, M., Buhl, R. & Taube, C. Mast cells induce migration of dendritic cells in a murine model of acute allergic airway disease. *International archives of allergy and immunology* **151**, 214–222 (2010).
- [65] Nakae, S., Ho, L.H., Yu, M., Monteforte, R., Iikura, M., Suto, H. & Galli, S.J. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 48–55 (2007).
- [66] Reuter, S., Heinz, A., Sieren, M., Wiewrodt, R., Gelfand, E.W., Stassen, M., Buhl, R. & Taube, C. Mast cell-derived tumour necrosis factor is essential for allergic airway disease. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **31**, 773–782 (2008).
- [67] Grimbaldston, M.A., Chen, C.-C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.-Y. & Galli, S.J. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology* **167**, 835–848 (2005).
- [68] Rodewald, H.-R. & Feyerabend, T.B. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction? *Immunity* **37**, 13–24 (2012).
- [69] Russell, E.S. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Advances in genetics* **20**, 357–459 (1979).
- [70] Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T. & Nakauchi, H. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *The Journal of experimental medicine* **174**, 63–71 (1991).
- [71] Godfrey, D.I., Zlotnik, A. & Suda, T. Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **149**, 2281–2285 (1992).
- [72] Rodewald, H.R., Kretzschmar, K., Swat, W. & Takeda, S. Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo. *Immunity* **3**, 313–319 (1995).
- [73] Ashman, L.K., Ferrao, P., Cole, S.R. & Cambareri, A.C. Effects of mutant c-kit in early myeloid cells. *Leukemia & lymphoma* **37**, 233–243 (2000).
- [74] Tono, T., Tsujimura, T., Koshimizu, U., Kasugai, T., Adachi, S., Isozaki, K., Nishikawa, S., Morimoto, M., Nishimune, Y. & Nomura, S. c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient Wsh/Wsh mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood* **80**, 1448–1453 (1992).

- [75] Stavem, P., Hjort, P.F., Vogt, E. & van der Hagen, C.B. Ring-shaped nuclei of granulocytes in a patient with acute erythroleukaemia. *Scandinavian journal of haematology* **6**, 31–32 (1969).
- [76] Langenhuijsen, M.M. Neutrophils with ring-shaped nuclei in myeloproliferative disease. *British journal of haematology* **58**, 227–230 (1984).
- [77] Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S. & Bronte, V. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current opinion in immunology* **22**, 238–244 (2010).
- [78] Youn, J.-I. & Gabrilovich, D.I. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology* **40**, 2969–2975 (2010).
- [79] Raber, P., Ochoa, A.C. & Rodríguez, P.C. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunological investigations* **41**, 614–634 (2012).
- [80] Sica, A. & Bronte, V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of clinical investigation* **117**, 1155–1166 (2007).
- [81] Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. & Albelda, S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer cell* **16**, 183–194 (2009).
- [82] Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C.M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., Garrett-Mayer, E., Montero, A.J., Bronte, V. & Mandruzzato, S. A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* **118**, 2254–2265 (2011).
- [83] Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Biccato, S., Falisi, E., Calabrese, F., Basso, G., Zanovello, P., Cozzi, E., Mandruzzato, S. & Bronte, V. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP β transcription factor. *Immunity* **32**, 790–802 (2010).
- [84] Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M. & Ostrand-Rosenberg, S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* **67**, 4507–4513 (2007).
- [85] Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltsis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., Tolar, J., Ochoa, A.C. & Blazar, B.R. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* **116**, 5738–5747 (2010).
- [86] Condamine, T. & Gabrilovich, D.I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived

- suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology* **32**, 19–25 (2011).
- [87] Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology* **12**, 253–268 (2012).
- [88] Sinnamon, M.J., Carter, K.J., Sims, L.P., Lafleur, B., Fingleton, B. & Matrisian, L.M. A protective role of mast cells in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis* **29**, 880–886 (2008).
- [89] Anand, P., Singh, B., Jaggi, A.S. & Singh, N. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **385**, 657–670 (2012).
- [90] Dudeck, A., Dudeck, J., Scholten, J., Petzold, A., Surianarayanan, S., Köhler, A., Peschke, K., Vöhringer, D., Waskow, C., Krieg, T., Müller, W., Waisman, A., Hartmann, K., Gunzer, M. & Roers, A. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* **34**, 973–984 (2011).
- [91] Lilla, J.N., Chen, C.-C., Mukai, K., BenBarak, M.J., Franco, C.B., Kalesnikoff, J., Yu, M., Tsai, M., Piliponsky, A.M. & Galli, S.J. Reduced mast cell and basophil numbers and function in Cpa3-Cre; Mcl-1fl/fl mice. *Blood* **118**, 6930–6938 (2011).
- [92] Sawaguchi, M., Tanaka, S., Nakatani, Y., Harada, Y., Mukai, K., Matsunaga, Y., Ishiwata, K., Oboki, K., Kambayashi, T., Watanabe, N., Karasuyama, H., Nakae, S., Inoue, H. & Kubo, M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **188**, 1809–1818 (2012).
- [93] Otsuka, A., Kubo, M., Honda, T., Egawa, G., Nakajima, S., Tanizaki, H., Kim, B., Matsuoka, S., Watanabe, T., Nakae, S., Miyachi, Y. & Kabashima, K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PloS one* **6**, 25538 (2011).
- [94] Ebmeyer, J., Ebmeyer, U., Pak, K., Sudhoff, H., Broide, D., Ryan, A.F. & Wasserman, S. Reconstitution of the mast cell population in W/W^v mice. *Otology & neurotology: official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* **31**, 42–47 (2010).

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AMLR	allogene gemischte Lymphozytenreaktion
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BMDc	bone marrow-derived dendritic cell
BMMC	bone marrow-derived mast cell
bio	biotinyliert
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complenetary DNA
CLP	common lymphoid progenitor
CMP	common myeloid progenitor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	cyclization recombination
DC	dendritic cell
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DNP	2,4-Dinitrophenol
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	disodium ethylenediamine traacetic acid
et al.	et alia (und andere)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
F1	1. Filialgeneration
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FcεRI	hochaffiner Rezeptor für IgE-Antikörper
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FSC	Forward scatter

GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating factor
GMP	granulocyte-monocyte progenitor
Gy	Gray
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
l	Liter
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L1C2	lung carcinoma cell line
Lin	lineage
LPS	Lipopolysaccharid
LT-HSC	langlebige Stammzellen
μ	Mikro
m	murin
M	Molar
MACS	magnetic-activated cell sorter
Mb	Megabasen
MEM	Minimal essential medium
MEP	megacaryocyte-erythrocyte progenitor
M-CSF	monocyte colony-stimulating factor
MDSC	Myeloide Suppressorzellen
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPP	multipotente Vorläuferzellen
mr	murin rekombinant
mRNA	messenger RNA
n	Nano
n.s.	nicht signifikant

OD	optische Dichte
p	Signifikanzwert
PBS	phosphate buffered saline
PCA	passive cutaneous anaphylaxis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll protein
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Rauttemperatur
s.c.	subkutan
SCF	stem cell factor
SSC	Side scatter
ST-HSC	kurzlebige Stammzellen
TE	Tris-EDTA
TK	Tyrosinkinase-Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VE	voll entsalzt
xg	Vielfaches der Fallbeschleunigung
ZVTE	zentrale Versuchstiereinrichtung

7 DANKSAGUNG

8 LEBENS LAUF