

**ISOLIERUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG
HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Silke Schwengberg

geb. am 26.09.1967 in Lünen/Westf.

1998

Referent: Prof. Dr. M.P. Manns
Korreferent: Prof. Dr. K. Resch
Tag der Promotion: 24. 11. 1998
Datum der Veröffentlichung: Dezember 1998

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit gelang es, Mastzellen aus humaner Darmschleimhaut zu isolieren (Reinheit ca. 5 %) und sowohl mittels Magnetseparation als auch durch Langzeitkultur unter Zusatz von SCF bis auf 100 % anzureichern. Durch Dichtegradientenzentrifugation, wie sie für Rattenmastzellen beschrieben wurde, konnte dagegen keine nennenswerte Anreicherung erzielt werden.

In einem neu etablierten Kultursystem konnte nachgewiesen werden, daß SCF nicht nur die Reifung von Mastzell-Vorläufern, sondern auch das Überleben und die Proliferation reifer, aus humanem Gewebe isolierten Mastzellen induziert. Interleukin-3, ein wichtiger Wachstumsfaktor für murine Mastzellen, hatte keinen Einfluß auf das Überleben der Mastzellen in unserem Kultursystem.

SCF beeinflusste ebenfalls die Mediatorfreisetzung aus intestinalen Mastzellen, indem es sowohl die durch IgE-Rezeptor Quervernetzung hervorgerufene Mediatorfreisetzung verstärkte, als auch bei kultivierten Mastzellen selbst zu einer Mediatorfreisetzung führte. Damit konnte SCF als erstes Zytokin identifiziert werden, das die Mediatorfreisetzung aus humanen Mastzellen induziert.

Es konnte gezeigt werden, daß Neuropeptide, die die Freisetzung von Histamin aus humanen Haut- und Lungenmastzellen induzieren können, und Chemokine, die basophile Granulozyten aktivieren können, keinen Einfluß auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen haben. Nicht aktivierte intestinale Mastzellen exprimieren keine Rezeptoren für bestimmte Neuropeptide, die Tachykinine, allerdings konnte nach IgE-Rezeptor Quervernetzung einer der Rezeptoren, der NK-1 Rezeptor, durch RT-PCR und Immunzytochemie nachgewiesen werden.

Durch IgE-Rezeptor Quervernetzung konnten humane intestinale Mastzellen zur Produktion der Zytokine TNF- α und Interleukin-5 angeregt werden, wodurch zum ersten Mal eine Zytokinproduktion durch humane intestinale Mastzellen nachgewiesen werden konnte. Auch intestinale Bakterien sowie Lipopolysaccharid aus *E. coli* stimulierten die TNF- α Produktion, hatten aber nur einen geringen Einfluß auf die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen, was auf unterschiedliche Regulationmechanismen hindeutet.

Schlagworte: humane intestinale Mastzellen, Mediatorfreisetzung, Zytokine

ABSTRACT

In the present study, mast cells from human intestinal mucosa were isolated (about 5 % purity) and purified up to 100 % either by magnetic separation or by long-term culture in SCF-containing medium. Density gradient centrifugation over Percoll gradients, which was described for rodent mast cells before, did not raise mast cell purity in these experiments.

Using a new long-term culture system it was demonstrated that SCF not only causes mast cell maturation from their progenitors, but also induces survival and proliferation of mature mast cells isolated from human intestinal tissue. Interleukin-3, which is a potent growth factor for rodent mast cells, did not affect the survival of mast cells in this culture system.

SCF also had effects on the mediator release of human intestinal mast cells, either by enhancing the release after IgE-receptor crosslinking, or by inducing mediator release by itself from cultured mast cells. Therefore, SCF was identified as the first cytokine inducing mediator release from human intestinal mast cells.

It was shown that several neuropeptides known to induce histamine release from human skin and rodent mast cells, and chemokines, which activates mediator release from human basophils, failed to induce the release of histamine, sulfidoleukotrienes or TNF- α from human intestinal mast cells. Moreover, resting mast cells did not express receptors for some of the neuropeptides, the tachykinins, but become positive for the NK-1 receptor (RT-PCR and immunocytochemistry) after activation by IgE receptor-crosslinking.

After IgE receptor crosslinking, human intestinal mast cells produced and released the cytokines TNF- α and interleukin-5. Therefore it could be demonstrated for the first time, that human intestinal mast cells are capable of producing cytokines. Intestinal bacteria and lipopolysaccharide from *E. coli* also induced TNF- α release, but only marginal amounts of histamine and sulfidoleukotrienes, suggesting different regulation mechanisms for the production of these mediators.

Keywords: human intestinal mast cells, mediator release, cytokines

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	MASTZELLEN	8
1.2	BAU UND FUNKTION DER DARMSCHLEIMHAUT	14
1.3	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MASTZELLEN IM GASTROINTESTINALTRAKT	18
1.4	ZIELSETZUNG	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	MATERIAL	22
2.1.1	GEWEBEPROBEN ZUR ISOLATION VON ZELLEN AUS HUMANER DARMSCHLEIMHAUT	22
2.1.2	REAGENZIEN UND SUBSTANZEN	22
2.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLISOLATION	25
2.1.4	ZELLKULTUR	26
2.1.5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN-BLOT	28
2.2	METHODEN	29
2.2.1	ISOLATION VON MASTZELLEN AUS HUMANER DARMSCHLEIMHAUT	29
2.2.2	ANREICHERUNG VON MASTZELLEN DURCH DICHTEZENTRIFUGATION	30
2.2.3	ANREICHERUNG VON MASTZELLEN DURCH MAGNETSEPARATION	30
2.2.4	ZELLKULTUR	31
2.2.5	ZELLZÄHLUNG UND -DIFFERENZIERUNG	31
2.2.6	KULTUR UNGEREINIGTER MASTZELL-PRÄPARATIONEN MIT ZYTOKIN-INHIBIERENDEN ANTIKÖRPERN	32
2.2.7	PRÄPARATION INTESTINALER BAKTERIEN	33
2.2.8	MEDIATOR-FREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	33
2.2.8.1	KURZZEIT-STIMULATION (WASSERBAD-EXPERIMENTE)	33
2.2.8.2	LANGZEIT-STIMULATION	35
2.2.8.3	STIMULATION MIT INTESTINALEN BAKTERIEN	35

2.2.9	QUANTITATIVER NACHWEIS VON MASTZELL-MEDIATOREN MITTELS IMMUNOASSAY	35
2.2.10	QUALITATIVER NACHWEIS VON TNF- α DURCH SDS-POLYACRYLAMID- GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN-BLOT	36
2.2.11	RT-PCR MIT PRIMERN GEGEN HUMANE TACHYKININ-REZEPTOREN	37
2.2.12	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS DES NEUROKININ-1 REZEPTORS (NK-1) AUF ISOLIERTEN MASTZELLEN	38
2.2.13	STATISTIK	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	ISOLATION VON MASTZELLEN AUS HUMANER INTESTINALER MUKOSA	40
3.2	ANREICHERUNG UND KULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN	43
3.2.1	ANREICHERUNG HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN DURCH DICHTEGradientENZENTRIFUGATION (PERCOLL)	43
3.2.2	ANREICHERUNG HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN MITTELS MAGNETSEPARATION	44
3.2.3	LANGZEITKULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN	45
3.3	EINFLUß ZYTOKIN-INHIBIERENDER ANTIKÖRPERN AUF ÜBERLEBEN UND HISTAMINGEHALT HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN	50
3.4	MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	53
3.4.1	EINFLUß DER KULTUR MIT SCF AUF DIE FREISETZUNG VON HISTAMIN UND SULFIDOLEUKOTRIENEN AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	53
3.4.2	EINFLUß VON NEUROPEPTIDEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	56
3.4.3	EINFLUß VON CHEMOKINEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	60
3.5	ZYTOKINPRODUKTION DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	62
3.5.1	PRODUKTION VON TNF- α UND EINFLUß VON BAKTERIEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	62
3.5.2	PRODUKTION VON INTERLEUKIN-5 (IL-5) DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	65

3.6	EXPRESSION DES NEUROKININ-REZEPTORS NK-1 DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	66
4	DISKUSSION	69
4.1	ANREICHERUNG UND KULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN UND DEREN EINFLUß AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG	69
4.2	EINFLUß VON NEUROPEPTIDEN UND CHEMOKINEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	76
4.3	ZYTOKIN-PRODUKTION DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	80
4.4	ROLLE DER MASTZELLEN AN DER GASTROINTESTINALEN BARRIERE	86
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	LITERATURVERZEICHNIS	91
7	PUBLIKATIONSLISTE	108
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
9	EIDESTÄTTLICHE VERSICHERUNG	110
10	DANKSAGUNGEN	111
11	LEBENS LAUF	112

1 EINLEITUNG

1.1 Mastzellen

Mastzellen sind Gewebszellen, die in fast allen Bindegeweben des Körpers vorkommen. Besonders häufig sind sie in Geweben zu finden, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen, wie z.B. der Haut und der Schleimhaut des Respirations- und des Gastrointestinaltraktes (1,2). Darüber hinaus kommen Mastzellen jedoch auch in muskulären Organen wie dem Herzen und dem Uterus vor (3,4).

Mastzellen wurden zuerst im Jahr 1878 von *Paul Ehrlich* (5) beschrieben, der im Rahmen seiner Dissertation über histologische Färbungen einen Zelltyp fand, dessen Granula sich mittels des Farbstoffes Anilinblau tief violett anfärben ließen. Er nannte dieses Phänomen "Metachromasie" und den Zelltyp "Mastzellen", da er annahm, daß die Granulainhalte phagozytiertes Material darstellten und die Zellen gleichsam gemästet waren. Obwohl man inzwischen weiß, daß es sich bei den Granulainhalten um präformierte, gespeicherte Mediatoren der Zellen handelt, wurde der Name "Mastzelle" beibehalten.

Mastzellen sind große, runde bis ovale mononukleäre Zellen, deren Zytoplasma mit sekretorischen Granula gefüllt ist (6). Das darin u.a. enthaltene saure Heparin führt zu der von Ehrlich beschriebenen violetten Farbreaktion mit dem basischen Farbstoff Anilinblau. In den zytoplasmatischen Granula der Mastzellen sind präformierte Mediatoren in kristalliner Form an eine Matrix aus Proteoglykanen (Heparin (ca. 75%) und Chondroitinsulfate) gebunden. Wird die Zelle aktiviert, gehen die Mediatoren in eine lösliche Form über und werden aus den Granula über Exozytose ausgeschleust; dieser Vorgang wird als "Degranulation" bezeichnet. Neben der Freisetzung von präformierten, in den Granula gespeicherten Mediatoren werden nach entsprechender Stimulation außerdem Lipidmediatoren (Leukotriene und Prostaglandine) *de novo* synthetisiert (7) (vergl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Mediatoren, die von Mastzellen nach Stimulation freigesetzt werden.

1a): Mediatoren, die in den Granula gespeichert sind

1b): de novo synthetisierte Mediatoren

1a) In den Granula gespeicherte Mediatoren	
Mediator	Wirkungsweise
Histamin	erhöht die Vasodilatation erhöht die Permeabilität von Epithelien und Gefäßen induziert die Kontraktion glatter Muskulatur fördert die Sekretion von Mucinen und Magensäure wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Granulozyten hemmt die Freisetzung von Acetylcholin und Histamin aus Neuronen
Tryptase	degradiert Fibrinogen, VIP, und Neuropeptide stimuliert die Fibroblastenproliferation steigert die Bronchokonstriktion
Chymase	degradiert Substanz P degradiert Basalmembranen stimuliert die Mucus-Sekretion generiert Angiotensin II
Carboxypeptidase	spaltet Angiotensin I
Heparin, Chondroitinsulfat (wirkt wie Heparin, aber schwächer)	intrazellulär: bindet und stabilisiert die in den Granula gespeicherten Mediatoren extrazellulär: neutralisiert Major basic protein (MBP) erhöht die Bindung von Fibronectin an Kollagen stimuliert die Migration von Endothelzellen inhibiert die Komplementkaskade wichtiges Antikoagulans

1b) de novo synthetisierte Mediatoren	
Mediator	Wirkungsweise
Leukotrien C ₄ /D ₄ /E ₄ (Sulfidoleukotriene, sLT)	erhöhen die Gefäßpermeabilität stimulieren die Sekretion von Mucinen induzieren die Kontraktion glatter Muskulatur modulieren Proliferation und Differenzierung von Zellen
Leukotrien B ₄ (LTB ₄)	stimuliert die Sekretion von Mucinen erhöht die Chemotaxis und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten moduliert Proliferation und Differenzierung von Zellen
Prostaglandin D ₂ (PGD ₂)	Vasodilatation bronchiale Hyperreaktivität inhibiert die Thrombozytenaggregation
Tumor necrosis factor α (TNF- α)	stimuliert die Proliferation, das Überleben, die Adhäsion und die Aktivierung von Leukozyten vermindert die Kollagensynthese und erhöht die Kollagenaseexpression von Fibroblasten erhöht die Expression von Adhäsions- und Homing-Molekülen auf Endothelzellen
Interleukin 4 (IL-4)	Induziert die IgE-Produktion durch B-Lymphozyten Stimuliert die Expression von CD40, CD 25, IL-6 und MHC II durch B-Lymphozyten induziert eine Th2-Antwort von T-Lymphozyten stimuliert die Proliferation und Chemotaxis von Fibroblasten stimuliert die Migration von eosinophilen Granulozyten

Neuere Untersuchungen zeigten, daß Mastzellen auch in der Lage sind, Zytokine zu produzieren (8-11) (vergl. Tabelle 1). Murine Mastzellen exprimieren Interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFN- γ , und TNF- α (9). Diese Befunde konnten für humane Mastzellen nur teilweise bestätigt werden. So sind humane Hautmastzellen und Lungenmastzellen in der Lage, TNF- α zu produzieren und auch *in vitro* nach Stimulation freizusetzen (12,13). Isolierte humane Lungenmastzellen setzen

dagegen unter bestimmten Bedingungen (z.B. allergisches Asthma) nach Stimulation IL-4 frei (12,14,15). Die Beobachtung, daß Mastzellen in der Lage sind, Zytokine zu produzieren, eröffnet eine neue Sichtweise auf die bislang weitgehend unbekanntere physiologische Bedeutung der Mastzellen.

Mastzellen entwickeln sich aus multipotenten, CD34-positiven Stammzellen des Knochenmarks und der fetalen Leber unter dem Einfluß entsprechender löslicher Faktoren (16-21). Im Gegensatz zu Granulozyten reifen Mastzellen erst im Gewebe aus. Im Knochenmark oder im Blut eines gesunden Menschen finden sich daher keine reifen Mastzellen. Lange wurde angenommen, daß die im Blut zirkulierenden basophilen Granulozyten Vorläuferzellen der Mastzellen sind, heute vermutet man jedoch, daß Mastzellen und Basophile zwei getrennte Populationen darstellen (20,22).

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für humane Mastzellen sind Stem cell factor (SCF oder *c-kit* Ligand) sowie Interleukin-3 (IL-3), wobei der Effekt von IL-3 in der Bereitstellung von Vorläuferzellen, die den SCF-Rezeptor *c-kit* tragen, besteht (22-25). Reife humane Mastzellen haben keinen IL-3 Rezeptor auf ihrer Oberfläche und unterscheiden sich dadurch von basophilen Granulozyten (26,27). Im murinen System dagegen ist IL-3 neben SCF ein wichtiger Wachstumsfaktor auch für reife Mastzellen, es sind aber auch eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren (IL-4; IL-9; IL-10; nerve growth factor, NGF; granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) bekannt, die *in vitro* die Entwicklung von murinen Mastzellen aus Vorläuferzellen ermöglichen (20). Humane Mastzellen benötigen den Wachstumsfaktor SCF nicht nur in ihrer frühen Entwicklung, sondern er ist auch für die Differenzierung und Reifung der Zellen im Gewebe sowie für ihr Überleben verantwortlich. Daher tragen Mastzellen aller Entwicklungsstufen den Rezeptor für SCF, *c-kit* (CD117), auf ihrer Oberfläche, während er bei anderen Knochenmarkszellen nur in unreifen Stadien exprimiert wird. So haben reife basophile Granulozyten z.B. kein CD117 auf ihrer Oberfläche (27-29).

SCF wird beim Menschen von einem Gen auf Chromosom 12 codiert, während das Gen für den Rezeptor *c-kit* (CD117) auf Chromosom 4 lokalisiert ist. SCF kommt in einer löslichen und mindestens zwei membrangebundenen Formen vor, welche durch gewebsspezifisches alternatives Splicing entstehen (30,31). SCF wird von Stromazellen des Knochenmarks, der fetalen Leber und des Thymus, aber auch von

Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (20,31,32). Lösliches SCF kommt im peripheren Blut des Menschen in einer Größenordnung von 5 - 15 ng pro ml vor, über die Mengen an membrangebundenen oder löslichen SCF in den verschiedenen Geweben liegen keine Daten vor.

Da die Reifung der Mastzellen erst im Gewebe stattfindet, geht man heute davon aus, daß das von Fibroblasten exprimierte SCF nicht nur als Wachstumsfaktor, sondern auch als "homing"-Signal und Adhäsionsmolekül für Mastzellen wirkt. Für die Differenzierung der Mastzellen in den unterschiedlichen Geweben werden neben SCF gewebsspezifische lösliche Faktoren verantwortlich gemacht ("micro-environment").

Sowohl beim Menschen als auch in anderen Spezies (hier: Ratten und Mäuse) können unterschiedliche Subtypen von Mastzellen sowohl aufgrund ihrer Lokalisation in verschiedenen Geweben als auch aufgrund von funktionellen und histochemischen Eigenschaften unterschieden werden. Eine erste Unterteilung erfolgte in den 60er Jahren durch *Enerbäck* aufgrund der Beobachtung, daß bei Mäusen die Mastzellen der Haut ("connective tissue mast cells", CTMC) nach Fixation der Präparate in Formalin und Färbung mit Toluidinblau das Phänomen der Metachromasie behielten, während Mastzellen der intestinalen Mukosa ("mucosal mast cells", MMC) sich nach Formalinfixation nicht mehr mit Toluidinblau anfärben ließen (33). Auch in humanen Geweben gibt es Formalin-sensitive und Formalin-resistente Mastzellen, allerdings kommen beide Gruppen sowohl im Intestinaltrakt als auch in der Haut vor (2,34), so daß die von *Enerbäck* getroffene gewebsspezifische Einteilung hier nicht übernommen werden kann.

Humane Mastzellen werden nach ihrem Protease-Gehalt in zwei Gruppen unterteilt: Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren (M_T) und Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren (M_{TC}) (35-37). Diese beiden Subtypen unterscheiden sich auch hinsichtlich der Ultrastruktur ihrer Granula (38), und M_{TC} exprimieren neben Tryptase und Chymase auch noch die Proteasen Carboxypeptidase und Cathepsin G (25,35,39). Mastzellen der Haut sind zu fast 100 % M_{TC} , auch in der Submukosa des Gastrointestinaltraktes und in den Tonsillen finden sich überwiegend M_{TC} . Dagegen sind die Mastzellen der intestinalen und nasalen Mukosa sowie des Alveolargewebes überwiegend M_T (25,35,39). Kürzlich wurde

eine dritte Population von Mastzellen beschrieben, die nur Chymase exprimieren und ca. 5% der humanen Darmmastzellen ausmachen (40,41).

Die physiologische Bedeutung der Mastzell-Subtypen ist noch nicht geklärt. Erste Untersuchungen deuten aber auf eine pathologische Bedeutung hin. So finden sich in Läsionen der Haut bei atopischer Dermatitis vermehrt Mastzellen vom MC_T-Typ, ebenso in der Synovia von Patienten mit aktiver rheumatoider Arthritis. Hingegen ist die Zahl von MC_T in der gastrointestinalen Mukosa bei Patienten mit erworbener Immunschwäche (AIDS) erniedrigt und korrespondiert mit dort ebenfalls auftretenden verminderten T-Lymphozyten (35). In einer weiteren Arbeit wurde berichtet, daß sich die Mastzell-Subtypen auch aufgrund der Zytokine, die bei der Aktivierung der Mastzellen ausgeschüttet werden, voneinander unterscheiden (15).

Mastzellen können durch unterschiedliche Substanzen stimuliert und zur Degranulation sowie zur Neusynthese von Mediatoren angeregt werden. Dabei unterscheiden sich sowohl die Mastzell-Subtypen des Menschen untereinander als auch die Mastzellen verschiedener Spezies erheblich in ihrer Fähigkeit, durch IgE-unabhängige Stimuli wie z.B. Neuropeptide, Chemokine oder Anaphylatoxine aktiviert zu werden (25,42-44).

Die wichtigste physiologische Aktivierung von Mastzellen aller Spezies geschieht durch Quervernetzung der auf ihrer Oberfläche befindlichen hochaffinen Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE), den Fc_εRI (45). Diese Rezeptoren binden IgE-Moleküle über ihren Fc-Teil und sind *in vivo* immer mit IgE-Molekülen beladen. Wird nun ein multivalentes Antigen ("Allergen") von mehreren dieser IgE-Molekülen erkannt und gebunden, kommt es zu einer Quervernetzung ("crosslinking") der IgE-Moleküle und damit auch der Rezeptoren, was zu einer Aktivierung der Zelle und zur Freisetzung der Mediatoren führt. Diese Reaktion, bei der die Ausschüttung der gespeicherten Mediatoren innerhalb von wenigen Minuten erfolgt, wird als "allergische Sofortreaktion" (Typ I) bezeichnet. *In vitro* kann eine IgE-Rezeptor Quervernetzung und die damit verbundene Aktivierung der Zellen unabhängig von IgE-Molekülen oder Allergenen auch durch Antikörper gegen den IgE-Rezeptor hervorgerufen werden (46).

Neben der IgE-Rezeptor Quervernetzung gibt es eine Reihe sog. "nicht-immunologischer", d.h. von IgE-Molekülen unabhängiger Stimuli für Mastzellen. So

werden z.B. humane Mastzellen der Haut von den Neuropeptiden Substanz P (SP), Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Somatostatin zur Mediatorfreisetzung angeregt. Auch das Anaphylatoxin C5a sowie die basische Substanz Compound 48/80 und Morphine wirken stimulierend auf Hautmastzellen (43,44,47). Für Mastzellen von Mäusen und Ratten gibt es eine Reihe nicht-immunologischer Stimuli, die neben den o.a. Stoffen auch Mastoparan und Polymyxin B, die Neuropeptide Calcitonin-gene related peptide (CGRP), Neuropeptid Y (NP-Y), Neurokinin A (NK-A) und Neurotensin, das Bienengift-Peptid Mellitin sowie die Zytokine IL-1, IL-3 und GM-CSF beinhalten (25).

Im Gegensatz dazu sind für humane Mastzellen aus der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt kaum nicht-immunologische Stimuli bekannt (43). Diese Befunde machen deutlich, daß es sowohl zwischen den Spezies als auch innerhalb einer Spezies große funktionelle Unterschiede zwischen den Mastzell-Subtypen gibt.

1.2 Bau und Funktion der Darmschleimhaut

Die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes stellt die größte Kontaktfläche des Körpers zu unserer Umwelt dar. Sie trennt die Außenwelt (das Darmlumen) vom Körperinneren, und ihre Oberfläche ist mit ca. 200 m² ungefähr 100 x größer als die Oberfläche der Haut (48,49). Der Darm des Menschen wird von proximal nach distal in die Abschnitte Dünndarm (aus Duodenum, Jejunum und Ileum) und Dickdarm (aus Caecum, Colon und Rectum) unterteilt.

Die Darmwand ist aus mehreren Schichten aufgebaut, die zwar in den verschiedenen Abschnitten des Darms unterschiedlich stark ausgeprägt sind, denen aber ein einheitlicher Bauplan zugrunde liegt (50, S. 643-644). Die eigentliche Schleimhaut (*Tunica mucosa*) der Darmwand unterteilt sich von innen nach außen in die Epithelschicht (*Lamina epithelialis mucosae*), die *Lamina propria* und die *Muscularis mucosae*. Daran schließt eine Bindegewbsschicht (*Tela submucosa*) an, die zwischen der *Tunica mucosa* und der dann folgenden Muskelschicht (*Tunica muscularis*) liegt. Die Muskelschicht teilt sich in eine innere Ringmuskelschicht (*Stratum circulare*) und eine äußere Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*) und besteht aus glatter Muskulatur. Die Muskulatur durchmischt und transportiert den

Darminhalt. In der Darmwand liegen das arterielle und venöse Gefäßsystem, die Lymphgefäße und das intramurale Nervensystem, von welchem der *Plexus submucosus* (in der Submukosa liegend) und der *Plexus myentericus* (zwischen den Muskelschichten liegend) besonders hervorzuheben sind (50, S. 644-645). In der Mukosa und der Submukosa finden sich darüber hinaus Lymphfollikel und freie Zellen des Immunsystems, wie Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen (48,49,51,52).

Die Oberfläche des Dünndarms ist durch Falten (*Kerckringsche Falten*), Zotten und Krypten sowie die Mikrovilli der Epithelzellen enorm vergrößert. Die Zotten und Krypten werden von der Epithelschicht und der Lamina propria gebildet. Die Zellen der Epithelschicht, die sog. Enterozyten, bilden ein hochprismatisches Epithel. Zwischen den Enterozyten liegen Becherzellen. Diese bilden den Mucus der das Epithel zum Lumen hin überzieht (50, S. 659-671). Das Epithel entsteht durch mitotische Teilung von undifferenzierten Epithelzellen im mittleren Drittel der Krypten. Sie werden innerhalb von 2 - 5 Tagen zur Zottenspitze hin geschoben, wo sie durch Apoptose sterben und in das Lumen abgeschilfert werden (50, S. 678). Im Dickdarm fehlen die *Kerckringschen Falten* und die Zotten, und die Mikrovilli der Enterozyten sind kürzer als im Dünndarm. Die Krypten hingegen sind im Dickdarm tiefer als im Dünndarm (50, S. 674-678).

Die physiologischen Aufgaben der gastrointestinalen Barriere scheinen sich auf den ersten Blick zu widersprechen: Zum einen soll die Resorption von Nährstoffen, Wasser und Elektrolyten aus dem Darmlumen über das Epithel zum Gefäßsystem erfolgen, ohne daß dabei eine Immunantwort gegen die aufgenommenen Stoffe induziert wird. Gleichzeitig soll das Epithel eine wirksame Barriere gegenüber Pathogenen, Toxinen und Schadstoffen aus der Nahrung sowie den vor allem im Dickdarm ansässigen Darmbakterien darstellen (49,53). Nach dem heutigen Kenntnisstand scheint die Art der Aufnahme von Fremdstoffen eine Rolle bei der Entscheidung zu spielen, eine Substanz als harmlosen Nährstoff oder als potentiellen Krankheitserreger zu sehen und ggf. eine Immunantwort einzuleiten (48,49,53,54).

Die Aufnahme der Nährstoffe erfolgt hauptsächlich im Dünndarm, und zwar in Form von nicht-immunogenen Molekülen wie Glucose, Aminosäuren, Lipiden und Vitaminen, die unter Einfluß der Sekrete von Magen und Pankreas und des Gallensaftes aus der aufgenommenen Nahrung abgespalten werden. Diese Stoffaufnahme erfolgt transzellulär durch die Epithelzellen mit Hilfe spezialisierter Transportmoleküle oder mittels erleichterter Diffusion, so daß die Moleküle durch die apikale und basale Membran geschleust und zum Gefäßsystem geleitet werden. Eine weitere Möglichkeit der Stoffaufnahme besteht in der Pinozytose, wodurch auch intakte Proteine (z.B. Immunglobuline aus der Muttermilch) durch die gastrointestinale Barriere gelangen können. Auch die Schlußleisten der Epithelzellen (*Zonulae occludentes* oder "tight junctions") sind nicht wirklich dicht, sondern ermöglichen gerade im Bereich des Dünndarms einen Durchtritt von Molekülen bis zu einer Größe von 0,8 nm. Dieser Transport zwischen benachbarten Epithelzellen hindurch wird als parazellulärer Transport bezeichnet. Man geht davon aus, daß die auf diesem Weg aufgenommenen Moleküle eine sog. "orale Toleranz" hervorrufen, so daß zwar ggf. eine lokale Abwehrreaktion stattfindet, es jedoch systemisch zu keiner Immunantwort kommt (s.u.) (48,49,53-55).

Die Barrierefunktion der intestinalen Mukosa wird sowohl durch unspezifische, nicht-immunologische Abwehrmechanismen (Tabelle 2), als auch durch ein hochspezialisiertes lokales Immunsystem, das darmassoziierte Immunsystem (GALT, "gut associated lymphoid tissue") aufrechterhalten (48,49,51,55). Zum GALT gehören die Lymphfollikel und die *Peyerschen Plaques* des Dünndarms sowie freie immunkompetente Zellen, die in der *Lamina propria* und als intraepitheliale Lymphozyten zwischen den Epithelzellen vorkommen. Das GALT enthält ca. 50 % aller im menschlichen Körper vorkommenden lymphatischen Zellen und ist damit das größte lymphatische Organ.

Tabelle 2: Nicht-immunologische Abwehrmechanismen an der gastrointestinalen Barriere

Mechanismus	Wirkungsweise
Magensäure	Hydrolyse von Proteinen bakterizide Wirkung
Proteolytische Enzyme	Abbau von Proteinen (z.B. bakterielle Toxine)
Peristaltik	verringert Kontakt von Mikroorganismen mit der Darmoberfläche
Mucus	erschwert Kontakt von Mikroorganismen mit dem Schleimhautepithel
Cytochrom P450 System	Abbau bestimmter körpereigener und körperfremder Stoffe, wie z.B. Hormone, Medikamente und Toxine, die Mitglieder der P450-Familie sind hochspezialisiert

Die Peyerschen Plaques stellen eine Anhäufung von Lymphfollikeln (bis zu 400) dar und kommen im Ileum und Jejunum vor (48,49,51). Die in den Peyerschen Plaques befindlichen Follikel sind wie die der Lymphknoten aufgebaut.

Lumenwärts kommt es in den Peyerschen Plaques zu einer Ansammlung von B- und T-Lymphozyten und auch Makrophagen, die eine kuppelförmige Vorwölbung hervorrufen, das sog. "Dom-Areal" (48).

Innerhalb des Dom-Epithels liegen die hochspezialisierten M-Zellen (von "membraneous cells" oder "microfold cells"), die in den Einstülpungen ihrer basolateralen Membran Lymphozyten und auch Makrophagen beherbergen.

M-Zellen sind besonders zur Endozytose und Transzytose von Makromolekülen befähigt und stellen auch die Eintrittspforte verschiedener Krankheitserreger dar (48,55,56). Die von ihnen aufgenommenen Antigene werden unprozessiert durch die Zelle geschleust und von Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) den Lymphozyten der Peyerschen Plaques präsentiert. Daraufhin kommt es zur Produktion von Antikörpern durch die B-Lymphozyten, und zwar in erster Linie (ca. 80 %) zur Produktion von Immunglobulin A (IgA). IgA-Moleküle werden als Dimere sezerniert, an der basolateralen Membran der Epithelzellen mit einer von diesen synthetisierten sekretorischen Komponente

versehen und als sekretorisches IgA durch die Epithelzellen in das Darmlumen sezerniert. Durch die sekretorische Komponente sind die IgA-Moleküle sowohl vor lysosomaler Verdauung beim Durchtritt durch die Epithelzellen als auch vor enzymatischem Abbau im Darmlumen geschützt (57). Das sekretorische IgA übernimmt eine wichtige Schutzfunktion an der gastrointestinalen Barriere. Es agglutiniert hochmolekulare Antigene, vermindert durch seine Bindung die Adhärenz von Bakterien und antigenen Nahrungsbestandteilen an die Epithelzellen und fördert den Abtransport von Fremdstoffen durch die Peristaltik (48). Diese lokale Immunantwort des GALT geht einher mit der Ausbildung einer systemischen Toleranz durch Förderung IgA-produzierender B-Lymphozyten bei gleichzeitiger Unterdrückung der Produktion von Immunglobulinen anderer Klassen. So kann verhindert werden, daß die Aufnahme von ungefährlichen hochmolekularen Nahrungsbestandteilen zu einer verfehlten systemischen Reaktion führt (54).

1.3 Physiologische Bedeutung der Mastzellen im Gastrointestinaltrakt

Obwohl Mastzellen histologisch schon lange in vielen Geweben und Organen des menschlichen Körpers beschrieben wurden, ist ihre physiologische Bedeutung nach wie vor nicht geklärt. Das breite Wirkungsspektrum der von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren (vergl. Tabelle 1) legt die Vermutung nahe, daß sie auch bei nicht-allergischen Entzündungsprozessen im Körper eine Rolle spielen können. So gibt es Hinweise darauf, daß Mastzellen bei Atherosklerose, fibrotischen Prozessen und gastrointestinalen Entzündungen beteiligt sind (58-61). Desweiteren scheinen sie auch bei Wundheilungsprozessen eine Rolle zu spielen (62).

Die in neuerer Zeit gewonnene Erkenntnis, daß Mastzellen in der Lage sind, Zytokine zu produzieren (8), erweitert das Spektrum ihrer Bedeutung von einer reinen Effektorzelle hin zu einer Zelle mit immunregulatorischen Funktionen. Auch können Mastzellen CD40 Ligand exprimieren, wodurch ein "class-switch" von B-Lymphozyten hin zur IgE-Produktion angeregt wird (63). Diese immunmodulatorische Funktion war bis dahin vorwiegend T-Lymphozyten zugesprochen worden.

Die physiologische Bedeutung der Mastzellen für die gastrointestinale Barriere ist weitgehend unklar. Noch 1989 war in einem Artikel von *M.N. Marsh* zu lesen: "Virtually nothing is known of the functional attributes of human mast cells within intestinal tissues" (51). Schon länger ist bekannt, daß Mastzellen gehäuft bei bestimmten gastrointestinalen Entzündungsprozessen wie der *Colitis ulcerosa* vorkommen (61). Darüber hinaus können Mastzellen durch die von ihnen sezernierten Mediatoren einen Einfluß auf Gewebshomöostase und Gewebsdurchblutung sowie auf die Kontraktion von glatter Muskulatur, die im Gastrointestinaltrakt hauptsächlich vorkommt, haben. Die von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren stimulieren darüber hinaus den Ionentransport an der humanen intestinalen Mukosa (64), dieser Vorgang kann *in vitro* an isolierter intestinaler Mukosa (Ussing-Kammer Experimente) durch IgE Rezeptor Quervernetzung induziert werden (65,66).

Im Jahre 1989 wurde von *Stead et al.* die Beobachtung veröffentlicht, daß in der humanen Darmschleimhaut Mastzellen häufig in direkter Nachbarschaft zu Nervenendigungen zu finden sind (67). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß von den Nervenzellen ausgeschüttete Botenstoffe die Mediatorfreisetzung aus Mastzellen aktivieren können. Bislang konnte allerdings für humane intestinale Mastzellen diese Annahmen nicht bestätigt werden (43), wenn auch humane Hautmastzellen durch bestimmte Neuropeptide stimuliert werden können (s.o.). Im Tiermodell konnte aber gezeigt werden, daß die von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren in der Lage sind, ihrerseits die Nervenzellen der intestinalen Mukosa zu stimulieren (68,69). Im humanen System liegen hierfür bislang keine Untersuchungen vor.

Ebenfalls nicht bekannt ist, ob humane intestinale Mastzellen durch Chemokine aktiviert werden können. Chemokine bilden eine Klasse strukturell verwandter, ca. 8 kD großer Peptide, die innerhalb des Immunsystems vielfältige Funktionen haben (70,71). Chemokine können aufgrund ihrer Struktur in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, die unterschiedliche biologische Aktivitäten beinhalten. Chemokine binden an ihre Zielzellen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. In neuerer Zeit konnten eine Reihe von Chemokinen und Chemokin-Rezeptoren molekular charakterisiert werden. Basophile und eosinophile Granulozyten setzen nach Stimulation mit Chemokinen Mediatoren frei (72), und es wurde gezeigt, daß bestimmte Chemokine bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und bei

Infektionen mit *Helicobacter pylori* vermehrt vorkommen (73). Im Gegensatz dazu konnte eine Mediatorfreisetzung durch Chemokine weder in humanen Haut- oder Lungenmastzellen noch in murinen Mastzellen, die in vitro aus Knochenmark gewonnen wurden ("bone marrow-derived murine mast cells", BMMC), nachgewiesen werden (42,74-76).

Im Tiermodell konnte vor kurzem gezeigt werden, daß Mastzellen im Gastrointestinaltrakt durch das von ihnen ausgeschüttete TNF- α eine protektive Rolle bei der Abwehr von pathogenen Keimen spielen können (77,78). Auch humane Hautmastzellen können nach Stimulation TNF- α freisetzen (13), für humane intestinale Mastzellen liegen allerdings noch keine derartigen Ergebnisse vor. Auch ist die Wirkung von Bakterien oder bakteriellen Antigenen auf humane Mastzellen bisher nicht untersucht worden.

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, daß Mastzellen heute nicht mehr nur als Effektorzellen der allergischen Entzündung gesehen werden, sondern daß sie auch eine entscheidende Rolle im Zusammenspiel der Immunzellen und in der Infektabwehr haben können. Allerdings liegen für humane Mastzellen erst wenige Daten vor, viele Ergebnisse wurden bis jetzt nur im Tiermodell erhoben. Insbesondere gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zu humanen intestinalen Mastzellen, da bislang kaum geeignete Methoden zur Untersuchung dieses Zelltyps vorlagen.

1.4 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war über die Funktion humaner intestinaler Mastzellen wenig bekannt. Das lag nicht zuletzt daran, daß diese Zellen funktionellen Untersuchungen nur schwer zugänglich waren.

Für die Untersuchungen von Mastzellen *in vitro* stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen Untersuchungen an ungereinigten Mastzellen direkt nach der Gewebsaufarbeitung, die bereits von anderen Arbeitsgruppen angewandt wurden, aber nur sehr beschränkte Aussagekraft haben, und zum anderen die Untersuchung gereinigter oder angereicherter Zellen, die eine genauere, auch molekulare Charakterisierung ihrer biologischen Funktionen ermöglichen würde.

Zu Beginn dieser Arbeit war keine Methode bekannt, intestinale Mastzellen anzureichern oder zu kultivieren und somit einer genaueren Untersuchungen zugänglich zu machen. Allerdings gab es Berichte über die Reinigung von Mastzellen aus anderen Geweben bzw. von Ratten oder Mäusen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher zunächst Methoden zur Isolation und Reinigung humaner intestinaler Mastzellen etabliert werden, wobei sichergestellt werden mußte, daß die Zellen anschließend funktionell intakt waren. Anschließend sollten *in vitro* die Freisetzung von Mastzellmediatoren als eine der biologischen Funktionen von Mastzellen näher untersucht werden. Dabei sollten insbesondere die Mediatorfreisetzung durch IgE-Rezeptor Quervernetzung, aber auch IgE-unabhängige Stimuli wie Neuropeptide und Chemokine getestet werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob intestinale Mastzellen in der Lage sind, neben Histamin und Sulfidoleukotrienen Zytokine zu produzieren und ob Bakterien die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen beeinflussen können. Darüber hinaus sollte ein Kultursystem etabliert werden, in dem der Einfluß bestimmter Zytokine wie z.B. SCF auf das Überleben und die Mediatorfreisetzung humaner intestinaler Mastzellen untersucht werden kann.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 *Gewebeproben zur Isolation von Zellen aus humaner Darmschleimhaut*

Die verwendeten Gewebeproben wurden von chirurgischen Resektaten in den Operationsräumen der Abteilung Abdominal- und Transplantationschirurgie entnommen. Nach Anweisung der Chirurgen wurde aus den makroskopisch normalen Randbereichen der Resektate eine Probe von ca. 4 x 6 cm genommen. Bei Patienten, die wegen einer entzündlichen Darmerkrankung operiert wurden, wurde nach Möglichkeit sowohl entzündetes als auch nicht-entzündetes Gewebe entnommen. Es wurden Alter und Geschlecht des Patienten sowie die Diagnose, die Lokalisation des entnommenen Präparates und alle Besonderheiten wie Farbveränderungen etc. notiert.

2.1.2 *Reagenzien und Substanzen*

Antikörper

anti CD117 Antikörper (YB5.B8, monoklonal)	Pharmingen, Hamburg
anti IgE-Rezeptor Antikörper (mAk 29C6, monoklonal)	Dr. Chizzonite, Hoffmann-La Roche, Nutely, NJ, USA
anti Kaninchen-IgG Antikörper (aus Esel, mit POD markiert, für Western-Blot)	Amersham, Little Chalfont, GB
anti LTC ₄ D ₄ E ₄ Antikörper (monoklonal)	Dr. K. Brune, Inst. für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen- Nürnberg, Erlangen
anti Maus-IgG für MACS-System (aus Ziege, polyklonal)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti Ratten-NK-1 Antikörper (aus Kaninchen, polyklonal)	überlassen von Dr. H. Sann, Inst. für Physiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

anti TNF α Antikörper für Western-Blot (polyklonal, aus Kaninchen)	Genzyme GmbH, Rüsselsheim
Zytokin-inhibierende Antikörper (anti-SCF, -IL-3, -IL-4, -GM-CSF)	R&D Systems, Wiesbaden
Zymed Histostain plus - Kit	Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA

Zytokine

rekombinantes humanes IL-3	Pepto Tech, Rocky Hill, NJ, USA
rekombinantes humanes SCF	Novartis-Forschungsinstitut, Wien, Österreich, und Tebu GmbH, Frankfurt
rekombinantes humanes TNF- α	Pepto Tech, Rocky Hill, NJ, USA

Substanzen und Enzyme für die Zellaufarbeitung

Acetylcystein (ACC)	Sigma Chemie GmbH, München
BSA (Fraktion IV, fettsäurefrei)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Chymopapain	Sigma Chemie GmbH, München
Collagenase D	Boehringer Mannheim, Mannheim
DNase I	Boehringer Mannheim, Mannheim
Elastase	Boehringer Mannheim
Gelatine (cell culture tested)	Sigma Chemie GmbH, München
HEPES (cell culture tested)	Sigma Chemie GmbH, München
PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (cell culture tested, 10fach Konzentrat)	Gibco Life Technologies, Paisely, Schottland, UK
Pronase	Boehringer Mannheim, Mannheim

Substanzen für die Zellkultur

Antibiotika und Antimykotika für die Zellkultur (Metronidazol: s.u.)	Gibco Life Technologies, Paisely, Schottland, UK
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt
HEPES (cell culture tested)	Sigma Chemie GmbH, München

May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg
RPMI 1640 ohne Glutamin und Phenolrot	Gibco Life Technologies, Paisely, Schottland, UK
Foetales Kälber-Serum (FCS) (Charge: 40F1271J)	Gibco Life Technologies, Paisely, Schottland, UK
Trypan-Blau	Sigma Chemie GmbH, München
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalun	Merck, Darmstadt

Substanzen für die Stimulationsexperimente

Ionomycin	Sigma Chemie GmbH, München
LPS (E. coli O26:B6)	Sigma Chemie GmbH, München
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Calbiochem, Bad Soden

Neuropeptide

Acetylcholin (ACh), Natrium-Glutamat (Glu), Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), Somatostatin (ST)	Sigma Chemie GmbH, München
Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Gastrin releasing peptide (GRP), Neurokinin A (NK-A), NK-B, Neuropeptid Y (NP-Y), Substanz P (SP), Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Chemokine

Interleukin 8 (IL-8), Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP 1 α), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, "Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted" (RANTES)	Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA
---	---------------------------------

Reagenzien für SDS-PAGE und Western-Blot

Amersham "full range rainbow marker" (Molekulargewichtsmaker für Western-Blot)	Amersham, Little Chalfont, GB
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung)	Roth GmbH, Karlsruhe
Trans-Blot Nitrocellulose	Biorad, München

Reagenzien für die RT-PCR

oligo dT Primer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Primer für Tachykinin-Rezeptoren	Life Technologies, Eggenstein
RNAse-freie DNAse	Promega, Madison, WI, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Superscript™ Reverse Transkriptase	Life Technologies, Eggenstein
Taq DNA Polymerase	Life Technologies, Eggenstein

Alle nicht aufgeführten Substanzen wurden mit höchstem Reinheitsgrad (p.A.) verwendet.

2.1.3 Puffer und Lösungen für die Zellisolation

Alle Puffer und Lösungen wurden mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser ("Ampuwa", Fresenius, Bad Homburg) angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Tyrode-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 0,36 mM Na ₂ HPO ₄ 5,55 mM D-Glucose
TE-Puffer	2 mM EDTA in Tyrode
TEA-Puffer	0,2 % (v/v) Ampicillin 0,4 % (v/v) Gentamycin 50 mg/ml 4 % (v/v) Metronidazol, in TE-Puffer
TGMD-Puffer	1,23 mM MgCl ₂ 0,015 mg/ml DNAse 5 % (v/v) 2 %ige Gelatine, in Tyrode-Puffer

PCh-Lösung 3 mg/ml Pronase
 0,75 mg/ml Chymopapain, in TE-Puffer

CE-Lösung 1,5 mg/ml Collagenase D
 0,15 mg/ml Elastase, in TGMD-Puffer

Hepes-Puffer 20 mM HEPES
 125 mM NaCl
 0,5 mM D-Glucose
 5 mM KCl

HA-Puffer: 0,125 mg/ml BSA in Hepes-Puffer

HACM-Puffer: HA-Puffer mit je 1 mM CaCl₂ und MgCl₂

MACS-Puffer 1 mg/ml BSA in Hepes-Puffer

2.1.4 Zellkultur

Basismedium RPMI 1640 ohne Phenolrot
 10 % (v/v) FCS
 25 mM HEPES

Kulturmedium Basismedium mit
 2 mM L-Glutamin (Gibco Life-Technologies)
 100 µg/ml Gentamycin und Streptomycin
 100 U/ml Penicillin
 0,5 µg/ml Amphotericin

2.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

2x Probenpuffer:	186 mM Tris pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β -Mercapthoethanol 0,005% (w/v) Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngel (15 %):	5,1 ml 30 %ige Gel-Stocklösung 2,5 ml Trenngelpuffer 2,2 ml A. dest 100 μ l 10%ige SDS-Lösung 50 μ l 10 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung 5 μ l TEMED
Sammelgel (5 %):	870 μ l 30 %ige Gel-Stocklösung 1,25 ml Sammelgelpuffer 2,78 ml A. dest. 50 μ l 10 %ige SDS-Lösung 50 μ l 10 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung 5 μ l TEMED
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris 160 mM Glycin 1 % (w/v) SDS

Kathoden - Puffer: 25 mM Tris
40 mM 6-Aminohexansäure
20 % (v/v) Methanol

Anode I - Puffer: 30 mM Tris
20 % (v/v) Methanol

Anode II - Puffer: 300 mM Tris
20 % (v/v) Methanol

TBST: 150 mM NaCl
20 mM Tris
0,1 % (v/v) Tween 20
pH 7,4

Entwicklerlösung: 1 Tablette 4-Chloro-1 Naphtol
10 ml Methanol
50 ml PBS

2.2 Methoden

2.2.1 *Isolation von Mastzellen aus humaner Darmschleimhaut*

Die Resektate wurden bis zur Aufarbeitung bei 4 °C in TEA-Puffer gelagert (i.d.R. über Nacht), nachdem Klammern, Nahtmaterial und Fettgewebe entfernt wurden.

Die Mukosa wurde präpariert, gewogen und zur Entfernung von Schleim in 50 ml ACC-Lösung für die Dauer von 10 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad (Julabo, Seelbach, alle Inkubationen bei 37°C wurden in diesem Wasserbad durchgeführt) inkubiert. Falls sehr viel Schleim abgesondert wurde, wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurde das Gewebe in TE mit 5 mM EDTA für die Dauer von 20 min bei 37°C inkubiert, um Epithelzellen zu entfernen. Dann wurde die Mukosa in 25 ml PCh-Lösung mit einer feinen Schere geschnitten, bis eine Suspension von gleichmäßig kleinen Stückchen (ca 1mm²) entstand. Die Suspension wurde durch einen 250 µm Nybolt-Filter (Jürgens-Omnilab, Hannover, Deutschland) filtriert und mit TE nachgespült (insgesamt ca. 100 ml Filtrat). Das Filtrat (= *Fraktion 1*) wurde verworfen. Der Filtrerrückstand wurde in 25 ml PCh-Lösung für die Dauer von 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend filtriert und mit TGMD-Puffer nachgespült (insgesamt ca. 100 ml Filtrat (*Fraktion 2*), verworfen). Der Filtrerrückstand wurde dann in 25 ml CE-Lösung für die Dauer von 30 min bei 37°C inkubiert, wiederum filtriert und mit TGMD nachgespült (*Fraktion 3*). Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt, wodurch man *Fraktion 4* erhielt. Nach der vierten Filtration wurde der ggf. noch vorhandene Filtrerrückstand verworfen. Fraktion 3 und 4 wurden dann bei 200 x g 10 min lang zentrifugiert und die Zellsedimente in Medium resuspendiert, vereinigt und auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden durch einen 100 µm Nybolt-Filter filtriert und das Filtrat bei 200 x g 10 min lang zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellsediment in Medium resuspendiert und die Zellen gezählt und differenziert.

2.2.2 Anreicherung von Mastzellen durch Dichtezentrifugation

Ausgehend von einer Arbeit über die Anreicherung von Lungenmastzellen mittels Percoll-Gradienten (74) wurde für die vorliegende Arbeit nach einigen Vorversuchen mit höheren Dichten eine Percoll-Präparation mit einer Dichte von 1,036 verwendet.

Isotone Percoll-Lösung: 9 Teile Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden, Dichte = 1,13 g)
 1 Teil Hepes-10x Puffers (Dichte = 1,06 g)

Die entstandene Lösung (= SIP) ist isoton und hat eine Dichte von 1,123 g.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wird die SIP-Lösung mit Hepes 1x Puffer bis zur gewünschten Dichte verdünnt.

5 ml Percoll-Lösung wurden in sterile 16x125 mm Kunststoff-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/5 ml Medium eingestellt und die Percoll-Lösung mit 5 ml Zellsuspension überschichtet. Die Zellen wurden bei $500 \times g$ und RT für die Dauer von 30 min zentrifugiert. Die Zellen der Ringfraktion sowie die des Sedimentes wurden mit einer Pipette abgehoben und gesammelt. Die Zellen wurden 1x in Basismedium gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und gezählt und differenziert.

2.2.3 Anreicherung von Mastzellen durch Magnetseparation

Nach über-Nacht-Kultur wurden die Zellen geerntet, gezählt und differenziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, je angefangenen 10^8 Zellen (Gesamtzellzahl) in 250 μ l MACS™-Puffer aufgenommen und für die Dauer von 30 min bei 4°C mit 5 μ g/ml anti-CD117 Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in MACS™-Puffer gewaschen, bei $200 \times g$ zentrifugiert und das Sediment in der o.a. Puffermenge resuspendiert. Der Ziege-anti-Maus MACS™-Antikörper wurde in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration zugegeben und für die Dauer von 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in MACS™-Puffer gewaschen, in 1 ml MACS™-Puffer aufgenommen und auf die Säule gegeben. Die Anreicherung der Mastzellen erfolgte über eine MACS™-BS-Säule nach den Vorschriften des Herstellers. Die Säule wurde mit 50 ml MACS™-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Zellen zu

entfernen. Dann wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die an das Säulenmaterial gebundenen Mastzellen mit 30 ml MACS-Puffer eluiert. Die Waschfraktion und das Eluat wurden zentrifugiert, die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, gezählt und differenziert.

2.2.4 Zellkultur

Die Zellen von Fraktion 3+4 wurden in einer Dichte von 2×10^6 Gesamtzellen pro ml Kulturmedium in 6-well Gewebekulturschalen mit 5 ml Kulturvolumen pro Depot ausgesät. Die Zellen wurden mit oder ohne Zusatz von 25 ng/ml rekombinanten humanen SCF bei 37°C, 5 % CO₂ und max. Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Osterode) kultiviert. Die Kulturen wurden in der Regel 1x pro Woche versorgt, indem die Hälfte des alten Mediums vorsichtig abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. SCF wurde ebenfalls 1x pro Woche frisch zugesetzt.

Die Kultur von angereicherten Mastzellen nach Magnetseparation erfolgte im Prinzip genauso, allerdings wurden die Zellen hier in einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ /ml ausgesät.

2.2.5 Zellzählung und -differenzierung

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Jürgens-Omnilab Laborbedarf, Hannover) in Türk'scher Lösung, die Erythrozyten lysiert.

Färbeansatz: 90 µl Färbelösung + 10 µl Zellsuspension

Es wurden die 4 großen Außenquadrate der Zählkammer ausgezählt und von diesem Wert der Mittelwert gebildet. Ein großes Außenquadrat hat das Volumen von 0,1 µl. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgend Formel verwendet:

Anzahl gezählter Zellen x 10.000 x Verdünnungsfaktor = Anzahl Zellen pro ml Suspension.

Zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen wurde eine Trypan-Blau Färbung durchgeführt. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein und färbt sie blau. Lebende Zellen und Erythrozyten werden nicht gefärbt ("dye-exclusion" - Methode).

Färbeansatz: 20 µl Färbelösung + 80 µl Zellsuspension

Die Zellen wurden innerhalb von 2 min in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden 4 große Außenquadrate ausgezählt und der prozentuale Anteil der gefärbten (= toten) Zellen bestimmt.

Für die Differenzierung wurde von der Zellsuspension ein Zytospot mittels einer Zytospin 3 - Zentrifuge (Shandon Scientific Ltd., Astmoor, GB) angefertigt. Das Präparat wurde luftgetrocknet und dann mit einer May-Grünwald-Giemsä Färbung nach Pappenheim angefärbt. Die Differenzierung der Zellen erfolgte bei einer 1000fachen Vergrößerung an einem Leica Ortholux II Mikroskop in Wasserimmersion.

2.2.6 Kultur ungereinigter Mastzell-Präparationen mit Zytokin-inhibierenden Antikörpern

Die Zellen wurden direkt nach Aufarbeitung in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml Kulturmedium ausgesät. Die Zytokin-inhibierenden Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

anti-SCF:	10 µg/ml
anti-IL-3:	100 µg/ml
anti-IL-4:	10 µg/ml
anti-GM-CSF:	250 µg/ml

Die eingesetzte Menge an Antikörpern war ausreichend, um eine 100 %ige Blockierung der entsprechenden Zytokine zu erzielen, falls die in der normalerweise im menschlichen Serum vorliegenden Konzentration in der Zellsuspension vorhanden wären. Als Kontrolle wurden ein Teil der Zellen jeweils ohne Zusätze bzw.

mit 25 ng/ml SCF kultiviert. Die Zellen wurden für die Dauer von 7 Tagen kultiviert, wobei nach 3 Tagen erneut die inhibierenden Antikörper zugegeben wurden. Dadurch konnten eventuell innerhalb dieser Zeit durch kontaminierende Zellen neu produzierte Zytokine ebenfalls neutralisiert werden.

2.2.7 Präparation intestinaler Bakterien

Nach der Isolation von Darmzellen aus dem Resektat eines 33 jährigen männlichen Patienten mit der Diagnose "Polyposis coli" und ohne klinische Hinweise auf Sepsis oder Enteritis trat trotz der Antibiotika im Kulturmedium innerhalb weniger Stunden eine massive bakterielle Infektion der Zellen auf. Der Überstand dieser Kultur wurde entnommen und zur Identifikation der Keime sowie der Erstellung eines Antibiotogramms dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover übergeben. Bei den Bakterien handelte es sich um eine Mischpopulation aus den gramnegativen *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* und *Stenotrophomonas maltophilia*. Die Bakterien wiesen multiple Resistenzen gegenüber den gängigen und von uns verwendeten Antibiotika auf. Die Bakterien wurden als Mischpopulation in Basismedium (1 ml Originalüberstand auf 10 ml Medium) über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C angezogen und in Glycerin bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Am Abend vor dem Stimulationsexperiment werden 100 µl der frisch aufgetauten Bakteriensuspension in 5 ml Basismedium gegeben und für 14 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Dadurch betrug die Konzentration der Bakterien etwa 1×10^8 Bakterien pro ml Medium.

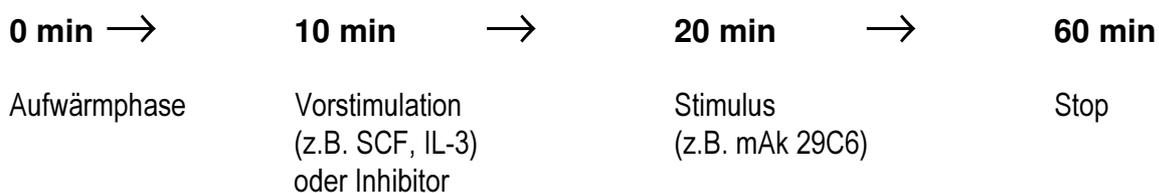
2.2.8 Mediator-Freisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen

2.2.8.1 Kurzzeit-Stimulation (Wasserbad-Experimente)

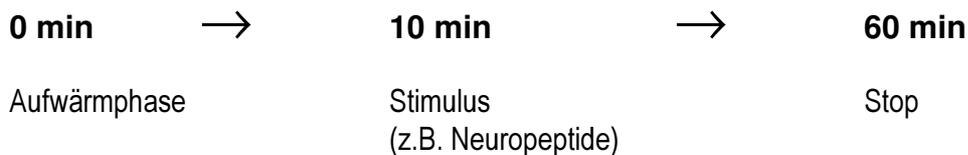
Diese Versuche wurden durchgeführt, um die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen (sLT) nach kurzzeitiger Stimulation durch IgE-Rezeptor Quervernetzung oder durch nicht-immunologische Stimuli zu induzieren.

Die Zellen wurden geerntet, gezählt und differenziert und in HACM-Puffer in einer Konzentration von ca. 10^5 Mastzellen pro ml Zellsuspension aufgenommen. Jeweils 1 ml dieser Zellsuspension wurde in sterile 3 ml-Plastikröhrchen pipettiert und bis zum Versuchsbeginn auf Eis gestellt. Pro Versuchsbedingung wurden 2 Röhrchen angesetzt (Doppelbestimmung). Die Versuche wurden in einem Schüttelwasserbad (Julabo, Seelbach) bei 37°C durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden i.d.R. nach folgendem Schema zupipettiert:

1) Versuche mit Vorstimulation



2) Versuche ohne Vorstimulation



Die Inkubationszeiten für die Stimuli oder die Triggersubstanzen wurden je nach Fragestellung modifiziert. Für Stimulationen, die länger als zwei Stunden dauern sollten, wurden die Zellen in Zellkulturplatten im Brutschrank inkubiert (s.u.)

Zur Beendigung der Reaktion wurden die Röhrchen mit den Zellen in ein Eiswasserbad gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 500 x g abzentrifugiert und der Zellüberstand bis zur Messung der Mediatoren in kleinen Aliquots bei -80°C gelagert. Der Totalhistamingehalt wurde aus Zelllysaten bestimmt. Dazu wurde die Hälfte der für die Stimulation eingesetzten Zellmenge mit dem gleichen Volumen sterilen Wasser verdünnt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut und 10 min lang mit Ultraschall behandelt. Der Zellüberstand wurde dann wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.8.2 *Langzeit-Stimulation*

Diese Versuche wurden für den Nachweis der Neusynthese von Zytokinen sowie für die Untersuchung von Langzeiteffekten von Testsubstanzen durchgeführt. Um eine unkontrollierte Vorstimulation durch SCF auszuschließen, wurden die Mastzellen frühestens 5 Tage nach der letzten SCF-Zugabe für diese Experimente verwendet. Die Zellen wurden geerntet, auf eine Konzentration von ca. 5×10^5 Mastzellen pro ml in Kulturmedium ohne SCF eingestellt und in entsprechenden Zellkulturplatten (6-, 12- oder 24-well-Platten für ein Volumen von 5, 2 oder 1 ml) ausgesät. Nach der Zugabe der Stimuli wurden die Zellen für die Dauer von 2 - 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Zellsuspension in sterile Plastikröhrchen überführt, die Zellen bei 500 x g abzentrifugiert und der Zellüberstand bei -80°C bis zur Messung der Mediatoren aufbewahrt.

2.2.8.3 *Stimulation mit intestinalen Bakterien*

Die Bakteriensuspension wurde wie unter 2.2.7 beschrieben hergestellt. Die Versuche wurden frühestens 5 Tage, nachdem die Zellen zuletzt versorgt worden waren, durchgeführt, um die Wirkung der im Medium vorhandenen Antibiotika abzuschwächen und einen unkontrollierten Einfluß von SCF zu vermeiden. Pro ml Zellsuspension (ca. 5×10^5 Mastzellen) wurden 10 µl Bakteriensuspension eingesetzt und für die Dauer von 6 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Bei der Ernte wurden die Zellen bei 200 x g abzentrifugiert und der Überstand erneut bei 15.000 x g in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, um die Bakterien zu sedimentieren. Der Überstand wurde bei -80°C bis zur Messung der Mediatoren eingefroren.

2.2.9 *Quantitativer Nachweis von Mastzell-Mediatoren mittels Immunoassay*

Histamin

Der Nachweis von Histamin aus Zellüberständen erfolgte mittels eines kompetitiven Histamin-Radioimmunoassays der Firma Coulter-Immunotech (früher: Dianova-Immunotech), Hamburg, nach den Angaben des Herstellers. Die Zellüberstände wurden ggf. vor der Messung mit HA-Puffer verdünnt. Die unter Nachweisgrenze

liegt bei 0,1 nM. Bei der Berechnung des Totalhistamingehaltes mußte der Verdünnungsfaktor durch die Zugabe des Wassers zur Zellsuspension (vergl. 2.2.8.1) eingerechnet werden. Die Darstellung des Histamingehaltes erfolgt als "% Histamin vom Totalhistamingehalt der Zellen" oder als "ng Histamin pro 10^6 Mastzellen".

Sulfidoleukotriene

Sulfidoleukotriene (sLT, LTC₄/D₄/E₄) wurden mittels eines kompetitiven Radioimmunoassays nachgewiesen (79-81). Die untere Nachweisgrenze liegt bei 3 pg pro ml Zellüberstand. Die Darstellung des Leukotrien-Gehaltes erfolgte als "pg Leukotrien pro 10^6 Mastzellen".

Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

Der Nachweis von TNF- α aus Kulturüberständen oder Zelllysaten wurde mit einem Enzymimmunoassays der Firma Genzyme Virotech, Rüsselsheim, nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Assay kann sowohl mit dem normalen Standardbereich als auch im "high-sensitivity" - Bereich verwendet werden. Dabei verringert sich die untere Nachweisgrenze von 3 pg/ml auf 0,5 pg/ml Kulturüberstand. Der TNF- α Gehalt wurde als "pg TNF- α pro 10^6 Mastzellen" dargestellt.

Interleukin 5 (IL-5)

IL-5 wurde in Kulturüberständen mittels eines Enzymimmunoassays der Firma R&D Systems, Wiesbaden, nach den Angaben des Herstellers gemessen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 21 pg/ml. Die Darstellung des IL-5-Gehaltes erfolgte als "pg IL-5 pro 10^6 Mastzellen".

2.2.10 *Qualitativer Nachweis von TNF- α durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot*

Pro Ansatz wurden 10^6 unstimulierte oder stimulierte Mastzellen (Reinheit > 95 %) geerntet, bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Die Zellen wurden mit 10 μ l doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer gemischt, für die

Dauer von 5 min mit Ultraschall behandelt und anschließend 10 min lang gekocht. Als Standard wurden 0,5 µg humanes rekombinantes TNF-α (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA) eingesetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Marker mit einem Spektrum von 10 - 250 kD verwendet.

Die SDS-PAGE erfolgte nach *Laemmli* (82) in einem Mini-Gel System (Mini Protean II Cell, Biorad, München) mit einem 15 %igen Trenngel und einem 5 %igem Sammelgel (Geldicke 0,75 mm). Die Proben konnten zunächst bei 50 V (Leistung und Stromstärke unbegrenzt) für die Dauer von 30 min in das Gel einlaufen und wurden dann bei 100 V für die Dauer von 2 h fraktioniert.

Das Blotten erfolgte in einer Semi-Dry Blot-Kammer (Phase, Mölln) auf Trans-Blot Nitrocellulose. Das Gel wurde in Kathodenpuffer 30 min lang äquilibriert und dann zu folgendem "Sandwich" gepackt:

ANODE

3 Filterpapiere mit Anode II - Puffer
3 Filterpapiere mit Anode I - Puffer
Nitrocellulose (Blot-Folie) in Anode I - Puffer
Gel
3 Filterpapiere in Kathoden - Puffer

KATHODE

Das Blotten erfolgte mit 45 mA pro Gel für die Dauer von 45 min. Die Blot-Folie wurde über Nacht in TBST mit 2 % (w/v) BSA bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Blot-Folie mit einem anti-TNF-α Antikörper (1:250 in TBST mit 2 % (w/v) BSA) bei RT für die Dauer von 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Die Blot-Folie wurde dann 3x 10 min lang in TBST gewaschen, ein POD-markierter anti-Kaninchen Antikörper (1:2000 in TBST) zugegeben und 1 h lang bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde 3 x 10 min lang in TBST gewaschen, die Entwicklerlösung sowie 100 µl 30 %iges H₂O₂ zugegeben und bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt.

2.2.11 RT-PCR mit Primern gegen humane Tachykinin-Rezeptoren

Mastzellen wurden durch Magnetseparation und nachfolgende Kultur mit SCF gereinigt. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen für die Dauer von 6 h bei 37°C

mit 100 ng/ml mAk 29C6 stimuliert. Stimulierte und unstimulierte Zellen der selben Zellpräparationen wurden geerntet und die Gesamt-RNA sofort mit dem RNeasy Mini Kit präpariert. Für die RT-PCR wurden 200 ng Total-RNA 15 min lang bei 37°C mit 10 U RNase-freier DNase behandelt, um genomische DNA zu entfernen. Die RNA wurde 10 min bei 70°C denaturiert und die cDNA durch Zugabe von Superscript™ Reverse Transkriptase und 20 pmol oligo dT Primern für die Dauer von 1 h bei 37°C synthetisiert. 1/10 des cDNA-Volumens wurde für eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde mit 2,5 U Taq DNA Polymerase und 20 pmol der Primer für die Tachykinin-Rezeptoren (s.u.) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. cDNA wurde mit einem Peltier thermal cycler (PTC200, MJ Research, Watertown, MA, USA) amplifiziert. 35 Zyklen (60 sec bei 94°C, 80 sec bei 60°C, 70 sec bei 72°C) wurden durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wurde eine Elongation für die Dauer von 5 min bei 72°C durchgeführt. 10 µl des PCR Produktes wurden in einem 1 %igem Agarose-Gel mit 500 ng/ml Ethidium-Bromid separiert und anschließend fotografiert.

Primer für den NK-1 Rezeptor:

sense: 5'-CAATCAGTTCGTGCAACCAGCC-3';

antisense: 5'-CTATCAAAGGCCACAGCCGTC-3' (83).

Primer für den NK-2 Rezeptor:

sense: 5'-GAAGAATGCCAGCTTCTGG-3';

antisense: 5'-GCAGCACCAAGAGGAGAGTG-3' (84).

Primer für den NK-3 Rezeptor:

sense: 5'-CTACTCCATGACGGCCATTGC-3';

antisense: 5'-CTCCTGGGATTTCTCCTCCC-3' (85).

2.2.12 Immunzytochemischer Nachweis des Neurokinin-1 Rezeptors (NK-1) auf isolierten Mastzellen

Stimulierte und unstimulierte Mastzellen (n = 3, Reinheit 54, 88 und 98 %) wurden mittels Zytocentrifugation auf Objektträger gebracht, die zuvor mit APES (0,5 % (v/v) in Azeton) beschichtet worden waren. Die Zellen wurden 10 min lang in Azeton fixiert und luftgetrocknet. Die Präparate wurden in PBS gewaschen und endogene Peroxidase durch Inkubation in H₂O₂ (3 % (v/v) in Methanol) für die Dauer von 10 min geblockt. Unspezifische Färbung wurde durch Absättigen mit einer Proteinlösung

in PBS (Zymed plus Kit) für die Dauer von 30 min bei RT reduziert. Die Präparate wurden dann mit einem Kaninchen-anti Ratten-NK-1 Antikörper (1:500 in PBS) oder Kaninchen-Normalserum als Negativkontrolle über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper erkennt den Tachykinin-Rezeptor NK-1, der - in absteigender Reihenfolge - die Liganden Substanz P (SP), Neurokinin-A (NK-A und NK-B) bindet. Die Präparate wurden in PBS gewaschen und dann mit dem "Zymed plus"-Kit nach den Angaben des Herstellers entwickelt, wobei Zellen mit einer positiven Immunreaktion rot angefärbt wurden. Die Präparate wurden mit Mayer's Hämalaun 10 s lang gegengefärbt und anschließend 5 min lang in Leitungswasser gebläut. Die Präparate wurden mit Kaiser's Glycerin-Gelatine eingedeckt. Pro Präparat wurden 2 x 500 Zellen gezählt und der Prozentsatz der für den NK-1 Rezeptor positiven Zellen bestimmt.

2.2.13 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm SPSS (Version 7.5 für Microsoft Windows) und der freundlichen Unterstützung von Frau Julika Mayer und Herrn Kinan Rifai durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD). Signifikanz-Berechnungen innerhalb eines Experimentes erfolgten mit dem zweiseitigen *t*-Test für gepaarte Stichproben. Signifikanz-Berechnungen zwischen zwei Gruppen (z.B. Patienten-Gruppen oder Kulturbedingungen) erfolgten mit dem zweiseitigen *t*-Test für unabhängige Stichproben oder mit dem Mann-Whitney-*U* Test. Korrelationen wurden nach Pearson berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Isolation von Mastzellen aus humaner intestinaler Mukosa

Nach der in 2.2.1 beschriebenen Methode gelang es, aus der Mukosa chirurgischer Darmresektate eine Einzelzell-Suspension herzustellen, die im Mittel 3,6 % Mastzellen enthielt.

In Tabelle 3 sind am Beispiel von 50 Resektaten die Patientencharakteristika sowie die Zellausbeute bei der Aufarbeitung dargestellt

Tabelle 3: Patientencharakteristika und Zellausbeute am Beispiel von 50 Präparaten

DD = Dünndarm, Co = Dickdarm, RS = Recto-Sigmoid. Dargestellt sind MW \pm SD und die Schwankungsbreite.

Diagnose	Anzahl (n)	Alter (Jahre)	Geschlecht (m:w)	Lage (DD:Co:RS)	Entzündung (n)	Gewicht Mukosa (g)	Zellzahl (x 10 ⁶)	Fr. 1+2 (x 10 ⁶)	Fr. 3+4 (x 10 ⁶)
Tumor	25	61 \pm 2 (44-82)	16:9	6:6:13	0	5,9 \pm 0,6 (2,9-16,0)	112 \pm 15 (13-242)	34 \pm 10 (1-140)	74 \pm 8 (12-148)
M. Crohn	13	29 \pm 2 (21-47)	8:5	5:8:0	10	2,3 \pm 0,4 (1,0-4,2)	93 \pm 26 (7-205)	49 \pm 13 (3-88)	56 \pm 14 (5-117)
C.U.	2	55 (42, 68)	1:1	1:1:0	2	5,8 (3,6-8)	177 (168-187)	16 (2-31)	16 (156-166)
Andere	10	45 \pm 5 (24-69)	7:3	4:2:4	1	5,7 \pm 1,3 (1,5-10)	93 \pm 32 (14-242)	27 \pm 9 (2-62)	61 \pm 15 (5-138)
Alle	50	49 \pm 2 (21-82)	32:18	15.17.18	13	5,2 \pm 0,5 (1,0-16)	105 \pm 12 (7-241)	35 \pm 6 (1-140)	71 \pm 7 (5-166)

Für alle weiteren Experimente wurden nur die Zellen von Fraktion 3+4 verwendet. Die Zellen von Fraktion 1+2 wurden verworfen, da sie im Mittel nur 1,6 % Mastzellen enthielten, während Fraktion 3+4 im Mittel 3,6 % Mastzellen enthielt. Da die Anzahl aller Zellen bei Fraktion 1+2 ebenfalls geringer war als bei Fraktion 3+4, lag die

absolute Mastzellzahl in Fraktion 3+4 mit $2,1 \times 10^6$ Zellen um den Faktor vier höher als in Fraktion 1+2.

Tabelle 4 zeigt die Zusammensetzung der Zellsuspension von Fraktion 3+4 von 50 Aufarbeitungen in Abhängigkeit von variablen Patientencharakteristika wie Diagnose und Resektionsort. Farbtafel 1 zeigt in Bild A die Zusammensetzung der Zellsuspension von Fraktion 3+4 nach Pappenheim-Färbung.

In Tabelle 4 ist gezeigt, daß der prozentuale Anteil an Mastzellen in Fraktion 3+4 keinen signifikanten Schwankungen in Abhängigkeit von der Diagnose, dem Resektionsort oder dem Grad der Entzündung des Gewebes unterliegt. Im Gegensatz dazu sind andere Entzündungszellen wie eosinophile und neutrophile Granulozyten oder Lymphozyten bei chronischer Entzündung (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) sowie im aktiv entzündeten Gewebe zu einem signifikant höheren Prozentsatz vertreten als in nicht-entzündetem Gewebe von Patienten mit intestinalen Tumoren oder anderen Erkrankungen. Der Histamingehalt pro Mastzelle ist bei Resektaten von Patienten mit chronischer Entzündung sowie bei Resektaten aus dem Dünndarm erhöht. Alter und Geschlecht der Patienten hatten keinen Einfluß auf den Anteil an Mastzellen sowie deren Histamingehalt (Daten nicht gezeigt).

Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte zunächst entweder sofort nach Erhalt des Präparates oder am nächsten Tag nach einer Lagerung in TEA-Puffer bei 4°C über Nacht. Vergleichend konnte gezeigt werden, daß der Zeitpunkt der Aufarbeitung keinen Einfluß auf die Vitalität der Zellen von Fraktion 3+4 hatte, die im Mittel nach der Trypanblau-Färbung zu 85 % vital waren. Darüber hinaus konnte sogar gezeigt werden, daß der prozentuale Anteil an Mastzellen in Fraktion 3+4 sowie der Histamingehalt pro Mastzellen bei den Aufarbeitungen am nächsten Tag höher waren (Tabelle 4). Diese Ergebnisse als auch logistische Aspekte führten dazu, daß die Aufarbeitung der Mukosa für alle weiteren Experimente in der Regel erst am nächsten Tag erfolgte.

Tabelle 4: Einfluß von Resektionsort, Diagnose und Zeitpunkt der Aufarbeitung auf die Zusammensetzung der Zellsuspension (Fraktion 3+4). Gezeigt sind Mittelwert (SEM).

Kriterien		Anzahl (n)	Zellzahl (x 10 ⁶)	MC (%)	EO (%)	NEU (%)	LY (%)	Andere (%)	Histamin (pg/MC)
Ort der Resektion	<i>Dünndarm</i>	15	58 (13)	3,3 (0,6)	6,1 (1,0)	2,8 (2,3)	8,7 (2,3)	73,0 (6,5)	1,19 (0,4)
	<i>Dickdarm</i>	17	75 (12)	4,3 (1,2)	5,5 (0,7)	1,5 (0,6)	26,4 (5,7)	62,1 (6,0)	0,25 (0,05)
	<i>Sigma/ Rektum</i>	18	78 (10)	3,1 (0,5)	3,6 (0,6)	0,3 (0,2)	13,3 (3,4)	80,0 (3,7)	0,33 (0,07)
Diagnose	<i>Tumor</i>	25	74 (8)	3,4 (0,4)	3,9 (0,4)	0,3 (0,2)	9,6 (1,8)	78,6 (4,0)	0,42 (0,06)
	<i>Morbus Crohn</i>	13	56 (14)	3,7 (1,5)	7,1 (1,0)	4,7 (2,8)	30,3 (6,3)	54,7 (6,3)	0,99 (0,43)
	<i>Colitis Ulcerosa</i>	2	161 (5)	4,0 (1,5)	9,3 (3,2)	1,3 (0,2)	33,0 (23,0)	53,7 (18,4)	0,86 (0,57)
	<i>Andere</i>	10	61 (15)	3,8 (1,0)	4,1 (0,8)	0,6 (0,4)	10,0 (4,1)	81,7 (4,1)	0,31 (0,14)
Gewebe	<i>nicht entzündet</i>	37	69 (7)	3,5 (0,4)	4,5 (0,5)	0,4 (0,2)	10,3 (1,7)	78,6 (3,0)	0,57 (0,17)
	<i>entzündet</i>	13	77 (18)	3,7 (1,6)	6,6 (1,0)	5,1 (3,1)	34,4 (6,8)	50,7 (6,5)	0,65 (0,35)
Isolation	<i>sofort nach OP</i>	21	81 (11)	2,2 (0,4)	4,5 (0,5)	1,5 (0,5)	18,4 (5,3)	68,2 (6,9)	0,3 (0,11)
	<i>nächster Tag</i>	29	63 (8)	4,4 (0,7)	5,3 (0,7)	1,5 (1,2)	14,5 (2,4)	74,4 (3,0)	0,76 (0,23)
Alle Patienten		50	71 (7)	3,6 (0,5)	5,0 (0,5)	1,5 (0,8)	16,0 (2,5)	72,0 (3,2)	0,61 (0,16)

3.2 Anreicherung und Kultur humaner intestinaler Mastzellen

Stimulationsexperimente mit ungereinigten Mastzellen sind nur bedingt aussagekräftig, da die kontaminierenden Zellen entweder die Aktivierbarkeit der Mastzellen verändern oder ihrerseits von den gewählten Agonisten stimuliert werden können. Besonders Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten sind auch in der Lage, Zytokine zu sezernieren, so daß es bei ungereinigten Zellpräparationen zu falsch-positiven Aussagen kommen könnte. Auch für molekularbiologische Methoden wie die RT-PCR werden reine Zellpräparationen benötigt. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen Methoden versucht, Mastzellen weiter anzureichern.

3.2.1 Anreicherung humaner intestinaler Mastzellen durch Dichtegradientenzentrifugation (Percoll)

Basierend auf Arbeiten mit humanen Lungenmastzellen (74) wurde nach einigen Vorversuchen Percoll der Dichte 1,037 g/ml verwendet. Mastzellen sollten sich nach der Zentrifugation im Sediment unter der Percoll-Lösung befinden. Tabelle 5 zeigt die Anreicherung sowie die Wiederfindungsrate der Mastzellen von 5 Experimenten.

Tabelle 5: Anreicherung und Wiederfindungsrate von Mastzellen nach Dichtegradientenzentrifugation (Percoll mit 1,037 g/ml)

	Anteil MC an Frakt. 3+4 (%)	Anteil MC nach Percoll (%)	Ausbeute MC nach Percoll (%)
Exp. 1	5,5	10,5	52,6
Exp. 2	8,5	11,5	73,5
Exp. 3	2,0	6	79,4
Exp. 4	2,5	5	50,5
Exp. 5	5,5	7,5	45,5
gesamt:	4,8±2,6	8,1±2,8	60,3±15

Die Daten zeigen, daß durch Dichtezentrifugation mittels Percoll keine wesentliche Anreicherung von Mastzellen erreicht wurde. Gleichzeitig kam es zu einem Verlust von fast 50 % der Mastzellen. Die oben dargestellten Ergebnisse ließen sich auch mit anderen Percoll-Dichten nicht verbessern: Eine niedrigere Dichte als 1,037 g/ml führte zu noch geringerer Anreicherung bei leicht verbesserter Ausbeute, während bei höheren Dichten die Wiederfindungsrate auf unter 20% absank (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse führten dazu, die Dichtegradientenzentrifugation als Methode zur Anreicherung von Mastzellen nicht weiter einzusetzen. Positiv konnte jedoch vermerkt werden, daß durch Dichtegradientenzentrifugation die bei einigen Präparationen aufgetretenen Kontamination mit Mucus vermindert werden konnte, da der Mucus auf der Percoll-Schicht liegenblieb, während die Mastzellen hauptsächlich im Sediment zu finden waren. Dichtegradientenzentrifugation kann also zur Entfernung des Mucus eingesetzt werden, wenn die Zellpräparationen viel Mucus enthalten und ein Verlust von Mastzellen in Kauf genommen werden kann.

3.2.2 *Anreicherung humaner intestinaler Mastzellen mittels Magnetseparation*

In der Literatur wurde die Anreicherung humaner Hautmastzellen mittels magnetischer Partikel, die an eine Antikörper gegen den c-kit-Rezeptor binden, beschrieben (86), wobei die Autoren das DynabeadTM-System der Firma Dynal verwendeten. Für die vorliegende Arbeit wurde das MACSTM-System der Firma Miltenyi Biotec verwendet (87), da die entsprechenden Geräte bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Das MACSTM-System hat außerdem den Vorteil, daß die an die Zellen bindenden paramagnetischen Partikel sehr klein sind (Durchmesser: << 0,05 µm) und diese daher nicht so stark beeinflussen wie die vergleichsweise sehr großen Dynabeads (Durchmesser: > 0,5 µm).

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Anreicherung durch Magnetseparation von 40 Aufarbeitungen gezeigt. Die Zellen wurden vor der Magnetseparation für 1 Nacht ohne den Zusatz von SCF kultiviert.

Tabelle 6: Reinheit und Ausbeute humaner intestinaler Mastzellen nach Magnetseparation (n = 40, dargestellt sind MW \pm SD und Schwankungsbreite)

	Gesamtzellen (x 10 ⁶)	Mastzellen (%)	Mastzellen (x 10 ⁶)	Vitalität (%)	Wiederfindung gesamt (%)	Wiederfindung Mastzellen (%)
Fr. 3 + 4	190,6 \pm 107,9 (45,5-522,0)	4,4 \pm 2,1 (1,5-11,0)	8,7 \pm 6,8 (1,1-31,2)	79 \pm 10 54-94	-	-
MACS +	7,7 \pm 5,9 (1,1-29,5)	60,6 \pm 20,4 (4,0-90,5)	4,2 \pm 3,3 (0,6-12,9)	35 \pm 17 (5-77)	4,6 \pm 3,8 (0,7-18,4)	59,8 \pm 47,9 (12,4-257,0)
MACS -	42,2 \pm 42,1 (3,8-173,0)	1,5 \pm 1,5 (0-5,8)	0,54 \pm 0,8 (0-4,2)	47 \pm 17 (4-85)	19,9 \pm 12,6 (5,0-57,0)	6,1 \pm 5,9 (0-20,6)

Direkt nach der Magnetseparation wurde bei den Zellen der MACS + Fraktionen häufig ein hoher Anteil an toten Zellen gezählt (positiv gefärbt in der Trypanblau-Färbung). In diesen Fällen waren die Mastzellen nach der Pappenheim-Färbung oftmals nur schwach granuliert und kaum angefärbt (nicht gezeit). Auffällig war weiterhin, daß ein hoher Teil der kontaminierenden Zellen während der Magnetseparation verloren ging. Zusammengerechnet erreichten die Gesamtzellzahlen der MACS + Fraktion (Eluat, Mastzellen) und der MACS - Fraktion (kontaminierende Zellen) nie den Wert der ursprünglich eingesetzten Zellen.

3.2.3 Langzeitkultur humaner intestinaler Mastzellen

Mit dem in dieser Arbeit etabliertem Kultursystem konnten Mastzellen über einen langen Zeitraum durch Zugabe des Mastzellwachstumsfaktors SCF am Leben erhalten werden, die längste Kulturdauer betrug 162 Tage. In Einzelfällen konnten Mastzellen bis zu 16 Tagen auch ohne die Zugabe von SCF kultiviert werden, in der Regel überlebten sie ohne SCF aber nur maximal 10 Tage. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Versuche zur Anreicherung von Mastzellen durch Langzeitkultur in Abhängigkeit des Zusatzes von SCF zusammenfassend dargestellt.

Während der Kultur starben die kontaminierenden Zellen zu einem großen Teil ab, während die Mastzellen mit SCF überlebten. Das führte dazu, daß schon nach relativ

kurzer Kulturdauer (6 - 8 Tage) eine Anreicherung der Mastzellen beobachtet werden konnte. Während der ersten Tage war die Anreicherung der Mastzellen unabhängig von der Zugabe von SCF, allerdings kam es mit SCF zu einer stärkeren Anreicherung von Mastzellen (vergl. auch Tabelle 9). Bei der Kultur von Mastzellen mit SCF korrelierte die Reinheit der Mastzellen mit der Zunahme der Kulturdauer (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r_P = 0,798$, $p = 0,001$, $n = 25$).

Tabelle 7: Zellzahlen und Histamingehalt von Mastzellen nach Kultur mit und ohne Zusatz von SCF (MW \pm SD, ggf. Schwankungsbreite)

n = 32, m:w = 17:15, 14 x Dickdarm, 18 x Dünndarm, 24 Tumorerkrankungen, 8 andere Erkrankungen, Alter: 56 ± 13 (24 - 93) Jahre, Gewicht der Mukosa: $5,8 \pm 1,9$ g (2,8 - 11,8 g)			
	vor Kultur	Kultur \emptyset SCF (n=17)	Kultur + SCF (n=26)
Zellzahl ($\times 10^6$)	$94,9 \pm 44,2$	$19,9 \pm 13,4$	$22,2 \pm 16,4$
Anzahl MC (%)	$6,6 \pm 11,6$	$9,4 \pm 5,2$ (3,5-23,5)	$24,5 \pm 25,9$ (4-100)
Anzahl MC ($\times 10^6$)	$4,2 \pm 2,4$	$1,6 \pm 1,1$	$2,9 \pm 1,9$
Kulturdauer (d)		7 ± 3 (5-16)	19 ± 32 (2-162)
Wiederfindung (%)	100	$34,2 \pm 12,7$	$34,6 \pm 17,6$
Wiederfindung MC (%)	100	$77,4 \pm 56,6$	$116,7 \pm 62,2$
Histamingehalt (pg/MC)	$0,66 \pm 0,27$	$0,88 \pm 0,69$	$1,66 \pm 1,9$

Die Wiederfindungsrate der Mastzellen lag in 14 von 26 Kulturen mit SCF bei über 100 % der eingesetzten Anzahl an Mastzellen, was eine proliferative Wirkung des SCF nahelegt (Tabelle 7), die Wiederfindungsrate der kontaminierenden Zellen wurde durch die Anwesenheit von SCF nicht verändert.. Diese Annahme konnte später von unserer Arbeitsgruppe bei 2 Experimenten mit hochreinen Mastzellen (93 und 95 % Reinheit) mit Hilfe des ^3H -Thymidineinbaus (2×10^5 Zellen und $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ Thymidin pro Ansatz, Kulturdauer: 4 Tage, Durchführung im Triplikate, vergl. (88)) bestätigt werden: Bei Kultur der Zellen mit SCF wurde ca. 20 mal mehr Thymidin eingebaut als

bei Kultur der entsprechenden Zellen ohne SCF. Somit konnte gezeigt werden, daß SCF *in vitro* eine proliferative Wirkung auf isolierte, reife intestinale Mastzellen hat.

Der Histamingehalt der mit SCF kultivierten Mastzellen ($1,66 \pm 1,9$ pg/Mastzelle) war signifikant höher als der Histamingehalt der Mastzellen direkt nach Aufarbeitung (Fraktion 3+4, vergl. Tabelle 4: $0,61 \pm 0,16$ pg/Mastzellen; $n = 25$; $p = 0,004$, Mann-Whitney *U* - Test). Der Histamingehalt der mit SCF kultivierten Mastzellen korrelierte dabei mit der Zunahme der Kulturdauer ($r_p = 0,623$; $p = 0,001$; $n = 25$). Der Histamingehalt der ohne SCF kultivierten Zellen ($0,88 \pm 0,69$ pg/Mastzelle) war nicht signifikant höher als der Histamingehalt der Mastzellen direkt nach Aufarbeitung ($p = 0,09$). Zwischen der Kulturdauer und dem Histamingehalt der ohne SCF kultivierten Mastzellen bestand keine Korrelation ($r_p = 0,174$; $p = 0,536$; $n = 15$).

Der Zusatz von Interleukin-3 (IL-3) als Wachstumsfaktor hatte in unserem Kultursystem keinen Einfluß auf die Reinheit und die Wiederfindungsrate der Mastzellen ($n = 5$, $p > 0,05$). Auch ein synergistischer Effekt bei gleichzeitiger Gabe von SCF und IL-3 konnte nicht beobachtet werden.

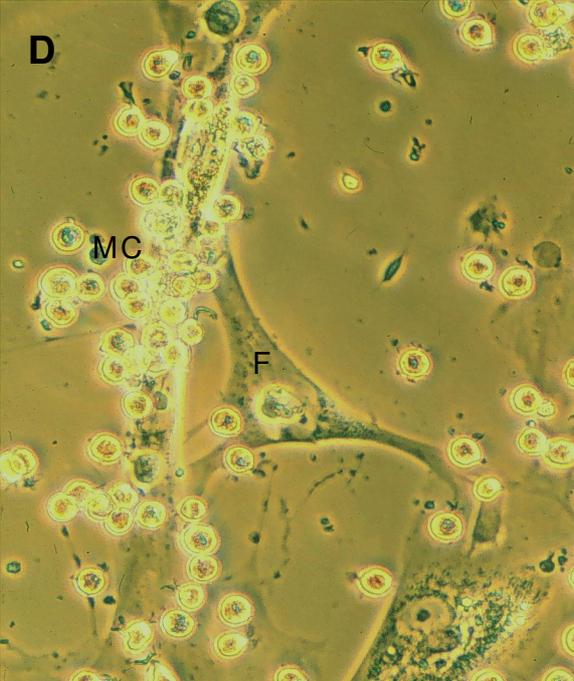
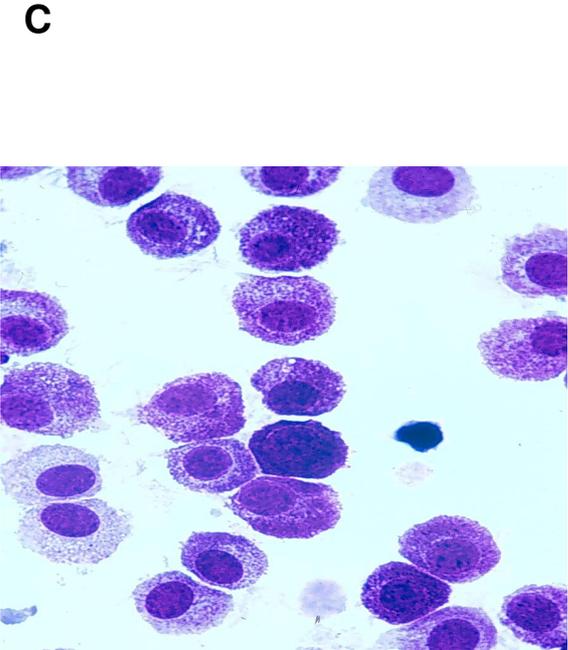
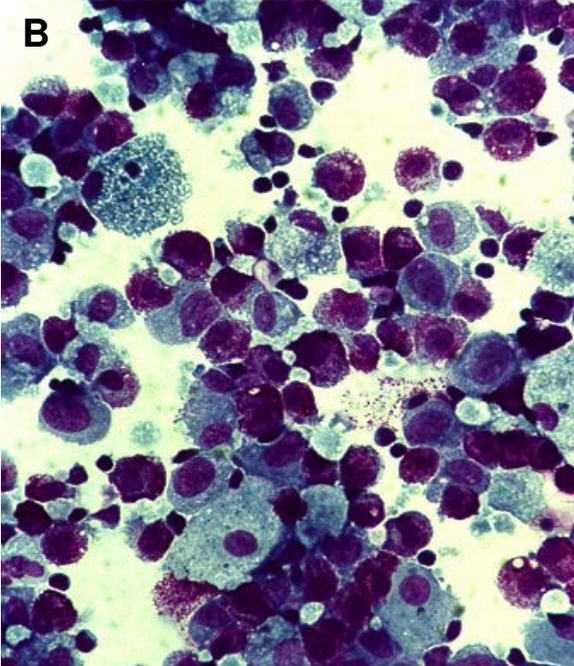
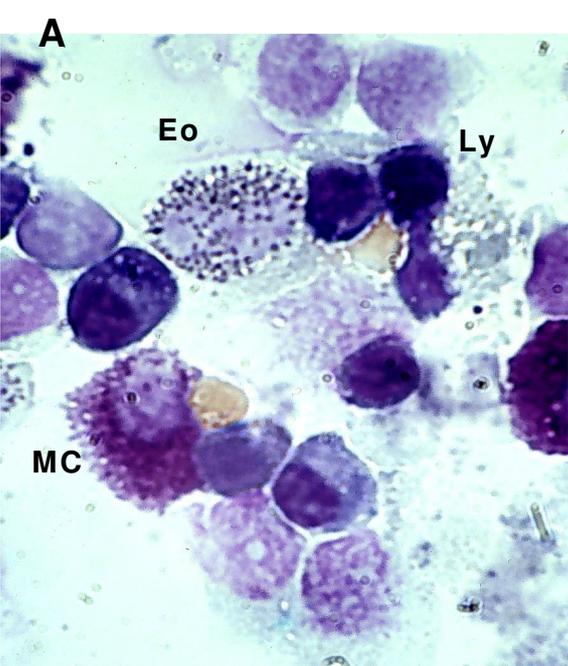
Die durch Magnetseparation angereicherten Mastzellen konnten im Gegensatz zu ungereinigten Zellen nicht ohne SCF in Kultur gehalten werden, die Wiederfindungsrate lag bei ohne SCF kultivierten, MACS-gereinigten Zellen nach 7 Tagen nur noch bei $10 \pm 15\%$ (parallele Kultur mit SCF: $49 \pm 44\%$, $n = 8$, $p < 0,01$). Diese Beobachtung läßt vermuten, daß bei der Kultur von ungereinigten Mastzellen von den kontaminierenden Zellen (hauptsächlich von Fibroblasten) zunächst noch soviel SCF angeboten wird, daß die Mastzellen auch ohne SCF-Zusatz bis zu 10 Tagen überleben können, wenn auch die absolute Zahl an Mastzellen im Gegensatz zur Kultur mit SCF dabei abnimmt (Tabelle 7). Mit Zusatz von SCF konnten MACS-gereinigte Mastzellen aber bis zu mehreren Wochen kultiviert und dadurch weiter angereichert werden, sie erreichten so bis zu 100 % Reinheit. In Tabelle 8 ist die Anzahl der Mastzellen nach MACS und Kultur mit SCF am Beispiel der für die Zytokinmessungen verwendeten Zellen dargestellt. Auch bei MACS-gereinigten Mastzellen zeigte sich, daß nach Kultur der Zellen mit SCF in vielen Fällen die Ausbeute bei über 100 % der nach der Magnetseparation eingesetzten Mastzellen lag, wodurch die proliferative Wirkung von SCF bestätigt wurde.

Tabelle 8 Anzahl, Reinheit und Ausbeute der Mastzellen nach Magnetseparation mit dem MACS-System sowie nach anschließender Kultur am Beispiel der für die Zytokinmessungen verwendeten Zellen (n = 13, MW ± SD)

	Anteil MC (%)	MC absolut (x 106)	Ausbeute nach MACS (% von 3+4)	Kulturdauer (d)	Ausbeute nach Kultur (% von MACS)	Ausbeute nach Kultur (% von 3+4)
Fraktion 3+4	6±3 (2,5-12,5)	11,9±9,3 (3,6-34,0)	-	-	-	-
MACS +	70±12 (50-86)	5,6±3,7 (1,2-14,4)	52±22 (13-87)	-	-	-
nach Kultur	91±6 (82-100)	3,3±2,1 (0,9-8,5)	-	13±8 (5-32)	72±45 (16-190)	35± 22 (8-75)

In Farbtafel 1 sind zum Vergleich Zellpräparationen direkt nach der Aufarbeitung (A, Originalvergrößerung: x 1000) sowie nach Magnetseparation (B, Originalvergrößerung: x 400) und nach Kultur mit SCF (C, Originalvergrößerung: x 100) gezeigt, die nach Pappenheim gefärbt wurden. Bild D (Originalvergrößerung: x 400) zeigt die Phasenkontrastaufnahme einer Langzeitkultur mit kontaminierenden Fibroblasten. Die Fibroblasten schienen allerdings nicht notwendig für das Überleben der Mastzellen zu sein, da nach Magnetseparation in fast allen Fällen keine Fibroblasten vorhanden waren und die Zellen trotzdem mit Zusatz von SCF kultiviert werden konnten (s.o.).

Farbtafel 1: Anreicherung humaner intestinaler Mastzellen
(MC = Mastzelle, Eo = Eosinophiler, Ly = Lymphozyt, F = Fibroblast)



3.3 Einfluß Zytokin-inhibierender Antikörper auf Überleben und Histamingehalt humaner intestinaler Mastzellen

Bei der Kultur humaner intestinaler Zellen kam es zu einer Anreicherung von Mastzellen. Dieser Effekt trat bei einer Kulturdauer von bis zu 10 Tagen auch auf, wenn der Kultur kein SCF zugesetzt wurde, allerdings war die Anreicherung bei Kultur mit SCF stärker (vergl. Tabelle 7 und Tabelle 9). Um zu untersuchen, ob nur SCF das Überleben der Mastzellen sichert oder ob andere, von den kontaminierenden Zellen sezernierte Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen könnten, wurden den Kulturen Zytokin-inhibierende Antikörper zugesetzt. Das Ziel dieser Versuche war, die entsprechenden Zytokine durch die Komplexbildung mit den Antikörpern zu neutralisieren und an einer Bindung an die evtl. auf der Zelloberfläche der Mastzellen befindlichen Rezeptoren zu hindern. Im Gegensatz zu einer Zugabe der entsprechenden Zytokine konnte so ausgeschlossen werden, daß andere Zellen durch die Zugabe von Zytokinen aktiviert würden und dann ihrerseits Stoffe produzierten, die einen positiven Einfluß auf das Überleben der Mastzellen hätten (indirekter Effekt). Andererseits konnten auch endogen von den kontaminierenden Zellen produzierte Zytokine neutralisiert werden. Für die im Folgenden dargestellten Versuche wurden Antiseren gegen SCF, IL-3, IL-4 und GM-CSF eingesetzt, da diese Zytokine im murinen System als Wachstumsfaktoren für Mastzellen bekannt sind (20). Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Zusatz sowie mit SCF kultiviert. Der Versuchsansatz wurde mit drei Zellpräparationen von unterschiedlichen Aufarbeitungen mit jeweils allen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Konzentration der Antiseren wurde so gewählt, daß bei einem der mittleren normalen humanen Serumkonzentration entsprechenden Gehalt der Zellpräparationen an den drei Zytokinen eine maximale Inhibierung erfolgte.

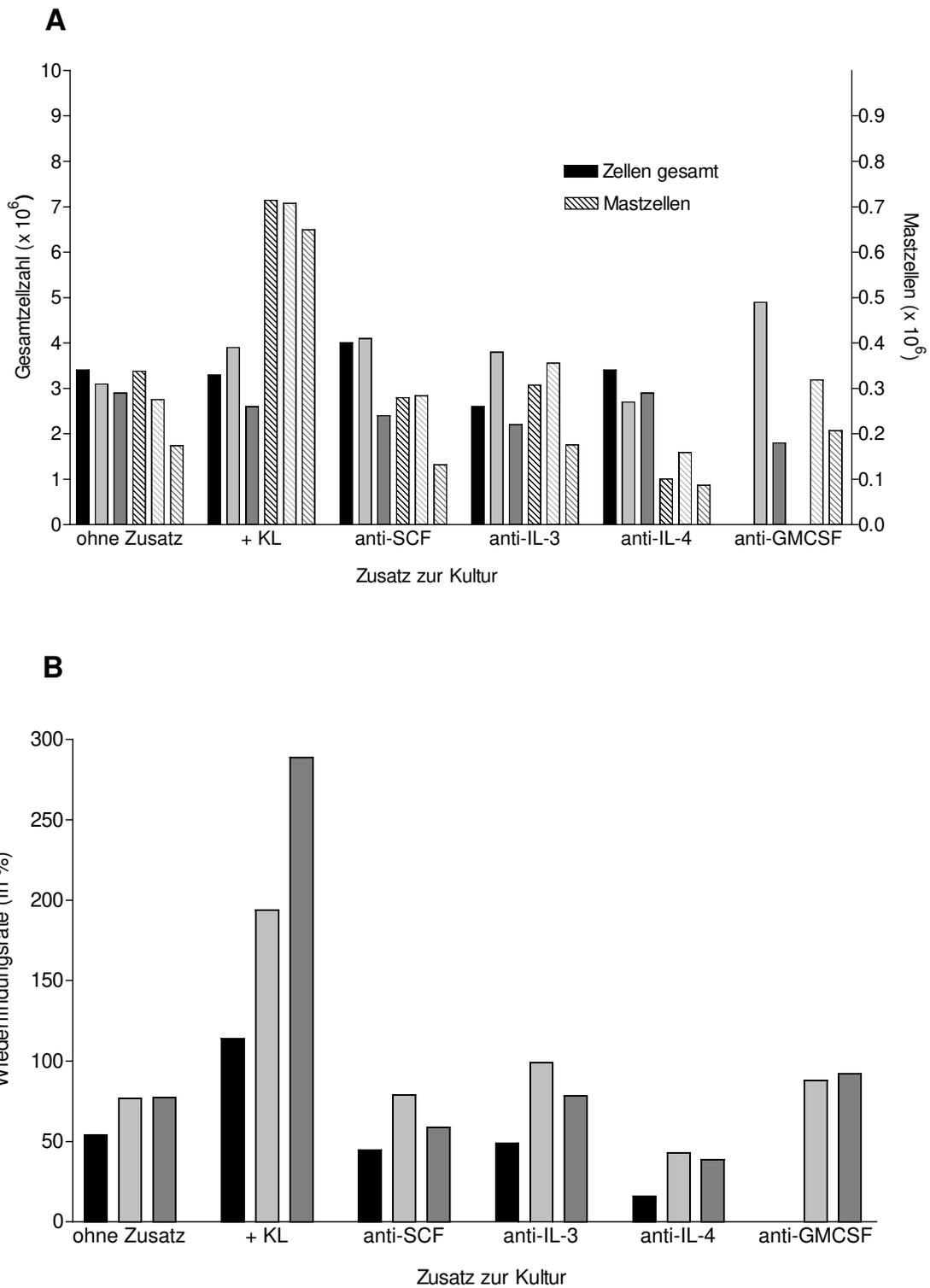


Abbildung 1: Einfluß Zytokin-inhibierender Antikörper auf das Überleben von Mastzellen

Dargestellt sind die Gesamtzellzahl und die Mastzellzahl (A) sowie die Wiederfindungsrate der Mastzellen (B) nach Kultur der Zellen mit einer optimalen Konzentration Zytokin-inhibierender Antikörper für die Dauer von 7 Tagen. Als Kontrolle diente die Kultur ohne Zusatz bzw. mit SCF. Die einzelnen Balken entsprechen den Werten von drei unabhängigen Zellpräparationen.

Im Vergleich zur Kultur ohne Zusätze führte die Inhibition von SCF zu einer Abnahme der Mastzellzahl, während die Inhibition von IL-3 oder GM-CSF zwar eine Abnahme der Gesamtzellzahl, aber nicht der Mastzellzahl bewirkte. Die Inhibition von IL-4 führte zu einer deutlichen Abnahme der Mastzellzahl (Abbildung 1), die bei allen drei Experimenten stärker als die durch anti-SCF war und mehr als 50% betrug. Durch Kultur mit SCF konnte in allen drei Experimenten die Anzahl an Mastzellen erhöht werden (Wiederfindungsrate > 100 %, Abbildung 1B).

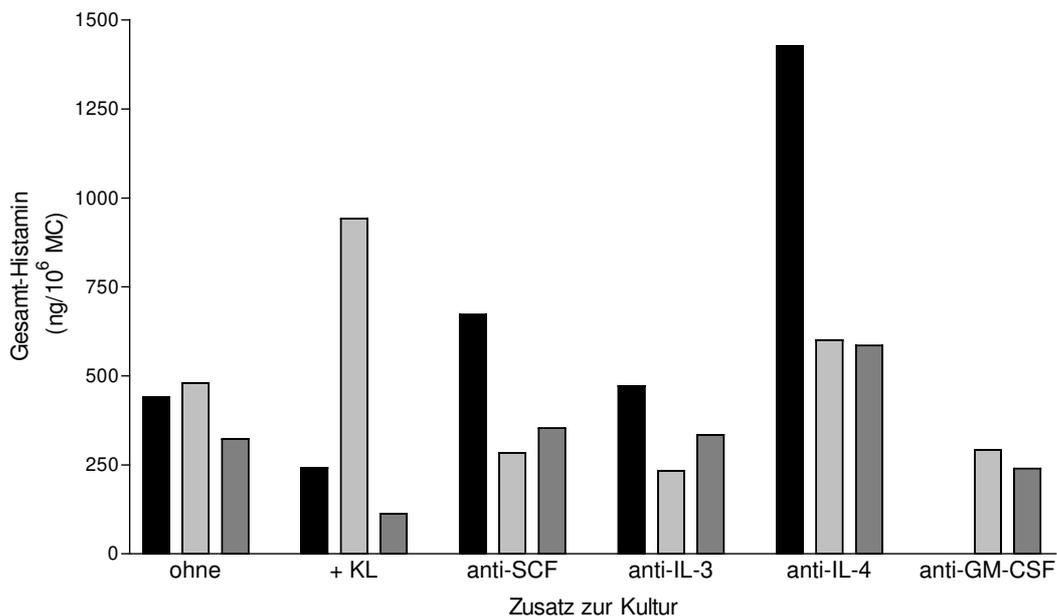


Abbildung 2: Histamingehalt humaner intestinaler Mastzellen nach Kultur mit Zytokin-inhibierenden Antikörpern

Dargestellt ist der Histamingehalt der Mastzellen nach Kultur mit Zytokin-inhibierenden Antikörpern und ohne Zusatz bzw. mit SCF als Kontrolle. Die einzelnen Balken entsprechen dem Mittelwert der Histaminmessungen (Doppelbestimmung) von drei unabhängigen Zellpräparationen.

Der Gesamthistamingehalt der Mastzellen stieg nach Inhibition von IL-4 bei allen drei Kulturen deutlich an, während die Inhibition der übrigen Zytokine keinen konstanten Einfluß auf den Histamingehalt hatte (Abbildung 2). Die Stimulierbarkeit der Zellen (Histaminfreisetzung durch mAk 29C6 in % vom Gesamthistamingehalt) wurde durch die Zytokin-Inhibition nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die Produktion von

Sulfidoleukotrienen wurde durch die Inhibition der Zytokine ebenfalls nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich vermuten, daß IL-4 einen Einfluß auf das Überleben und den Histamingehalt von humanen intestinalen Mastzellen haben muß, da die Inhibition von IL-4 in unserem Kultursystem die Wiederfindungsrate der Mastzellen stark herabsetzte, gleichzeitig aber den Histamingehalt der Mastzellen erhöhte. Keines der übrigen getesteten Antiseren hatte in unserem Kultursystem eine ähnlich starke Wirkung wie das anti-IL-4 Antiserum.

3.4 Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen

3.4.1 *Einfluß der Kultur mit SCF auf die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen aus humanen intestinalen Mastzellen*

Wie in 3.2.3 beschrieben, nahm der Histamingehalt der Mastzellen durch Langzeitkultur mit oder ohne SCF-Zugabe im Vergleich zu frisch isolierten Mastzellen zu. Die spontane Freisetzung von Histamin in Prozent vom Gesamthistamingehalt war im Gegensatz dazu bei kultivierten Mastzellen viel geringer als bei frisch isolierten Mastzellen (frisch isolierte Zellen: $21,8 \pm 2,3$ %, $n = 33$; Kultur ohne SCF: $5,9 \pm 0,9$ %, $n = 15$; Kultur mit SCF: $6,5 \pm 0,9$ %, $n = 25$; $MW \pm SEM$, $p = 0,01$). Dabei zeigten die mit SCF kultivierten Zellen eine geringfügig höhere Spontanfreisetzung als die ohne SCF kultivierten Mastzellen (nicht signifikant, $p > 0,05$). Bei einigen der Versuche mit frisch isolierten Zellen konnte auch nach Stimulation mit mAk 29C6 keine Freisetzung von Sulfidoleukotrienen (18 von 33) oder Histamin (9 von 33) gemessen werden (81), dagegen war bei allen Versuchen mit kultivierten Zellen eine Mediatorfreisetzung nachzuweisen.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit kultivierten Mastzellen dargestellt. Mastzellen, die ohne SCF kultiviert wurden, zeigten eine höhere Mediatorfreisetzung nach Stimulation mit 100 ng/ml SCF als Zellen, die mit SCF kultiviert worden waren. Die Mediatorfreisetzung nach Stimulation mit SCF war aber bei beiden Kulturbedingungen signifikant höher als die Spontanfreisetzung ($p = 0,033$ für Kultur mit SCF, $p < 0,001$ für Kultur ohne SCF). Im Gegensatz dazu konnte bei frisch isolierten Zellen durch Stimulation mit SCF nahezu keine

Mediatorfreisetzung induziert werden (81). Dieses Ergebnis zeigt zum ersten Mal, daß SCF in der Lage ist, eine Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen zu induzieren.

Die Histaminfreisetzung nach sequentieller Stimulation mit SCF und mAk 29C6 war bei den ohne SCF kultivierten Zellen ebenfalls höher als bei den mit SCF kultivierten Mastzellen und erreichte mit $78,7 \pm 7,9$ % des Totalhistamingehaltes einen Wert, der sonst nur durch unphysiologische Stimuli wie Ionomycin oder PMA erreicht wird (alle $p < 0,001$). Dabei konnte bei den ohne SCF kultivierten Zellen ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der Histaminfreisetzung durch mAk 29C6 und der durch SCF + mAk 29C6 festgestellt werden ($p = 0,005$, $n = 15$). Dieser Unterschied war bei den mit SCF kultivierten Zellen nicht so stark ausgeprägt ($p = 0,036$, $n = 25$).

Die Produktion von Sulfidoleukotrienen war bei den mit SCF kultivierten Zellen sowohl spontan als auch nach Stimulation mit mAk 29C6 oder SCF + mAk 29C6 höher (nicht signifikant, $p > 0,05$, $n = 15$ für Kultur ohne SCF und $n = 25$ für Kultur mit SCF). Bei Stimulation mit SCF waren die Werte wie beim Histamin auch bei den ohne SCF kultivierten Mastzellen höher. Bei den mit SCF kultivierten Zellen erreichten die Konzentrationen von Histamin und Sulfidoleukotrienen in den Überständen nach Stimulation mit mAk 29C6 fast die Höhe, die sie nach sequentieller Stimulation mit SCF und mAk 29C6 erreichten. Diese Beobachtung läßt auf eine Vorstimulation der Zellen durch die Kultur mit SCF schließen.

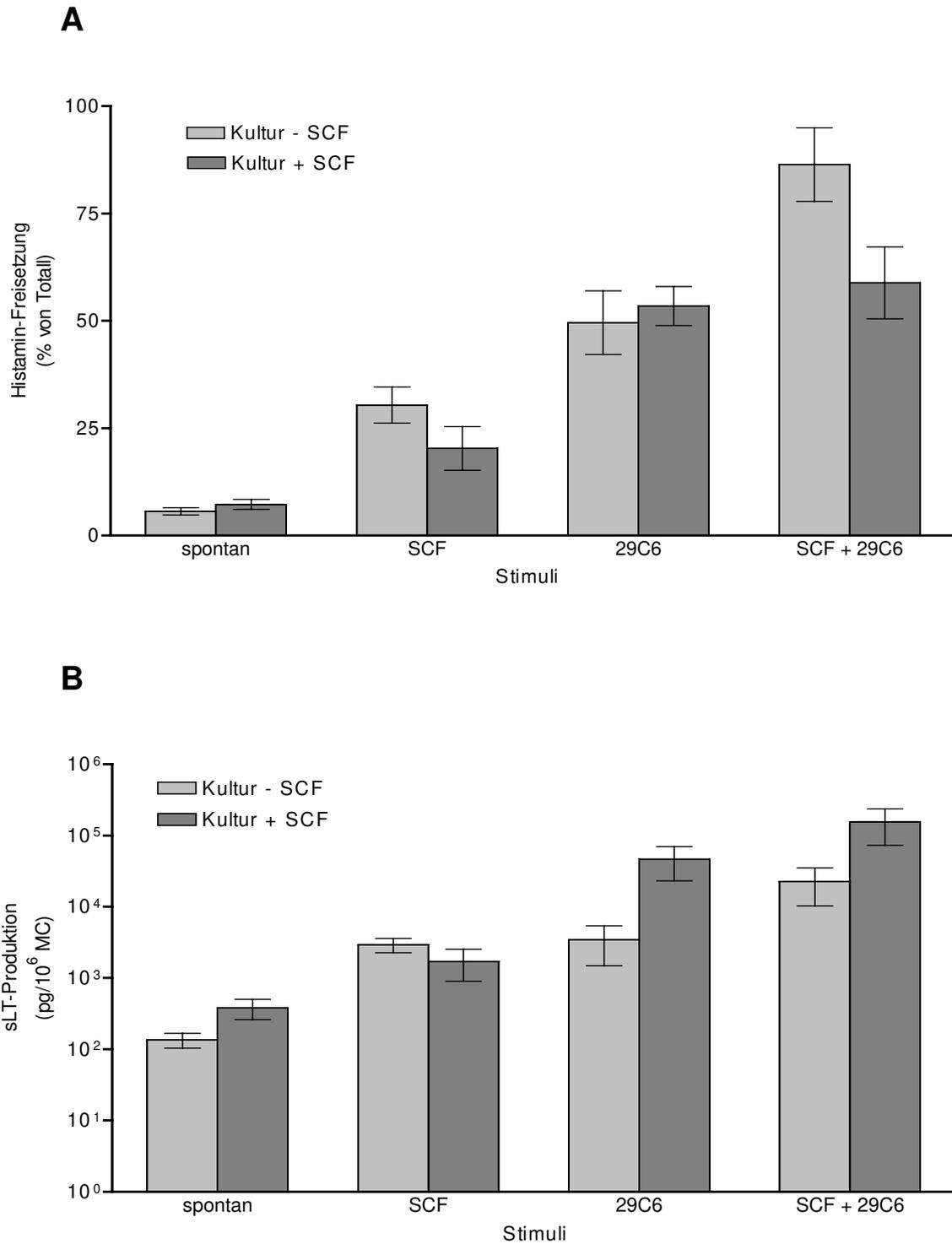


Abbildung 3: Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen (sLT) aus humanen intestinalen Mastzellen nach Kultur mit und ohne SCF-Zusatz

Gezeigt ist die Histamin-Freisetzung (A) und die Sulfidoleukotrien-Produktion (B) nach Stimulation mit mAk 29C6 (100 ng/ml), SCF (100 ng/ml) oder der Kombination beider Stimuli sowie einer Pufferkontrolle (spontan). Mastzellen aus unabhängigen Zellpräparationen wurden zuvor mit (n = 25) oder ohne (n = 15) SCF kultiviert. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD. Statistik: s. Text

3.4.2 **Einfluß von Neuropeptiden auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen**

Mastzellen wurden nach einwöchiger Kultur mit oder ohne SCF (Tabelle 9) mit 11 verschiedenen Neuropeptiden und verwandten Peptiden in verschiedenen Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-4} M) für unterschiedliche Zeiten (1h, 2h, 6h, 24 h) stimuliert. Abbildung 4 zeigt repräsentativ, daß bei einer Inkubationszeit von 1 h keines der getesteten Peptide eine signifikante Freisetzung von Histamin oder Sulfidoleukotrienen hervorrufen konnte ($p > 0,05$), unabhängig davon, ob die Zellen mit oder ohne SCF kultiviert wurden. Daher wurden die Daten der mit und ohne SCF kultivierten Zellen in Abbildung 4 zusammengefaßt dargestellt. Durch mAk 29C6 (100 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) wurde hingegen eine signifikante Mediatorfreisetzung induziert ($p < 0,001$). Auch bei allen anderen getesteten Inkubationszeiten sowie bei einer Erhöhung der Peptidkonzentrationen bis zu 10^{-4} M oder einer Vorinkubation der Zellen mit SCF (100 ng/ml) konnte keine Mediatorfreisetzung induziert werden (jeweils $n = 3$, Daten nicht gezeigt).

Tabelle 9: Zellzahlen der für die Neuropeptid- und Chemokin-Stimulationen verwendeten Zellpräparationen nach Kultur mit oder ohne SCF für die Dauer von einer Woche (MW \pm SD)

n = 12; m:w = 5:7; 9 x Dünndarm, 3 x Dickdarm; 8 Tumorerkrankungen, 4 andere Erkrankungen; Alter: 54 ± 17 Jahre; Mukosagewicht: $4,8 \pm 2,8$ g			
	vor Kultur	Kultur \emptyset SCF	Kultur +SCF
Zellzahl gesamt (x 10^6)	$76,0 \pm 36,2$	$17,01 \pm 15,41$	$25,5 \pm 16,2$
Anzahl MC (%)	$4,9 \pm 2,6$	$10,8 \pm 5,1$	$12,3 \pm 7,8$
Zellzahl MC (x 10^6)	$3,7 \pm 2,6$	$1,45 \pm 0,90$	$2,5 \pm 1,2$
Kulturdauer (d)		6 ± 1	7 ± 1
Wiederfindung ges. (%)	= 100	$25,9 \pm 15,1$	44 ± 15
Wiederfindung MC (%)	= 100	$74,0 \pm 19,8$	$114 \pm 61,4$

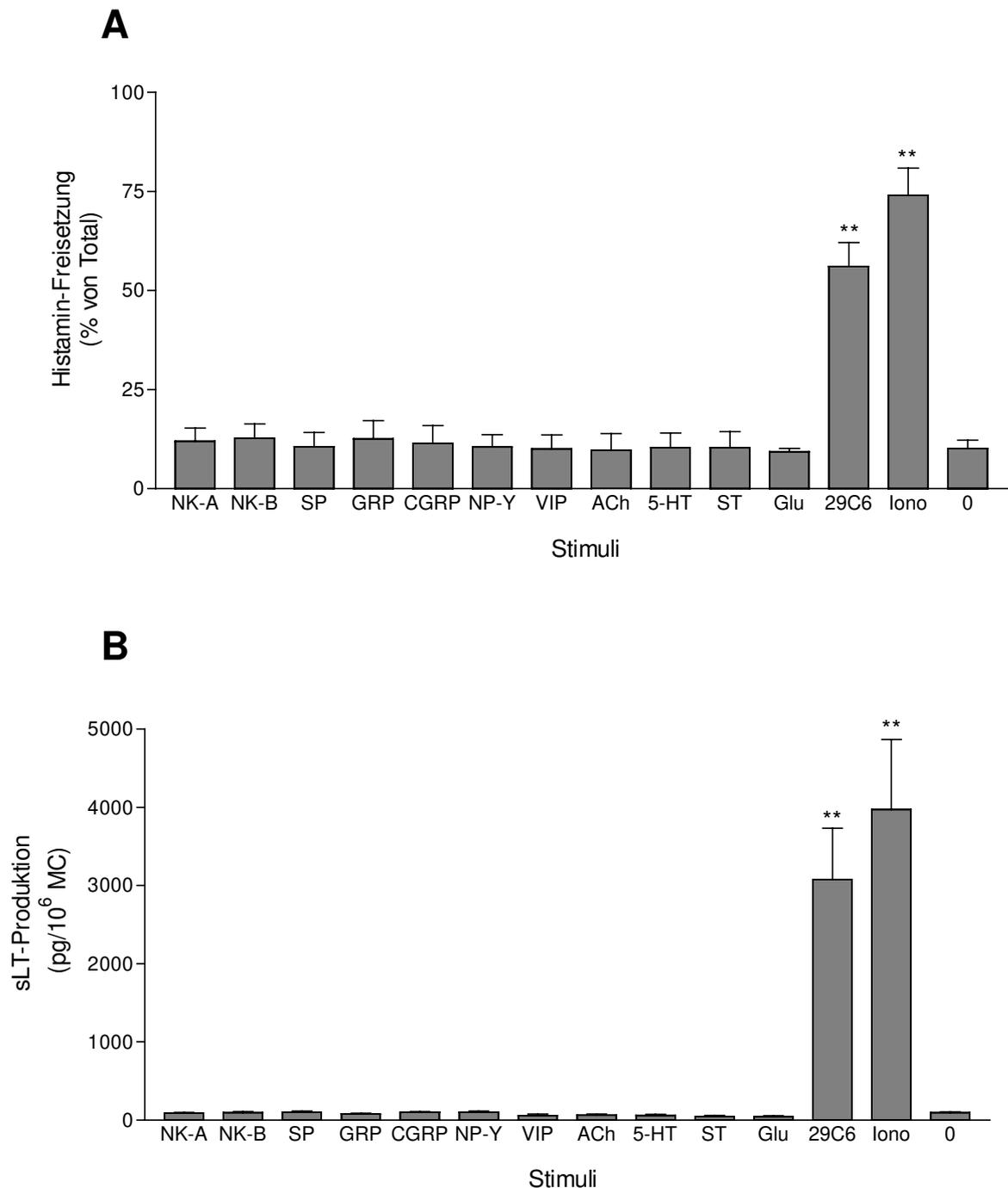


Abbildung 4: Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen nach Inkubation mit Neuropeptiden und verwandten Peptiden

Dargestellt ist die Histamin-Freisetzung (A) und die Produktion von Sulfidoleukotrienen (B) nach Inkubation der von Mastzellen mit Neuropeptiden ($n = 5$, $MW \pm SD$). Mastzellen aus unabhängigen Zellpräparationen wurden zuvor mit oder ohne SCF kultiviert (vergl. Text und Tabelle 9). Konzentration der Stimuli: NK-A, NK-B, SP, GRP, CGRP: 10^{-7} M; VIP, 5-HT, ST: 10^{-6} M; ACh 10^{-4} M; Glu, Ionomycin: 10^{-3} M; mACh 29C6: 100 ng/ml. Die Inkubationszeit betrug bei den dargestellten Experimenten 60 min. Statistik: ** = $p < 0,001$ im Vergleich zur Pufferkontrolle.

In Abbildung 5 ist gezeigt, daß auch bei Mastzellen, die aus aktiv entzündetem Gewebe eines Patienten mit Morbus Crohn isoliert wurden, keine Mediatorfreisetzung erzielt werden konnte. Im Vergleich mit den aus nicht-entzündetem Gewebe isolierten Zellen ergab sich kein Unterschied in der Mediatorfreisetzung durch die getesteten Peptide. Allerdings konnten aufgrund der geringen Zellzahlen in diesem Experiment nur 2 Peptide (NK-A und NK-B) getestet werden.

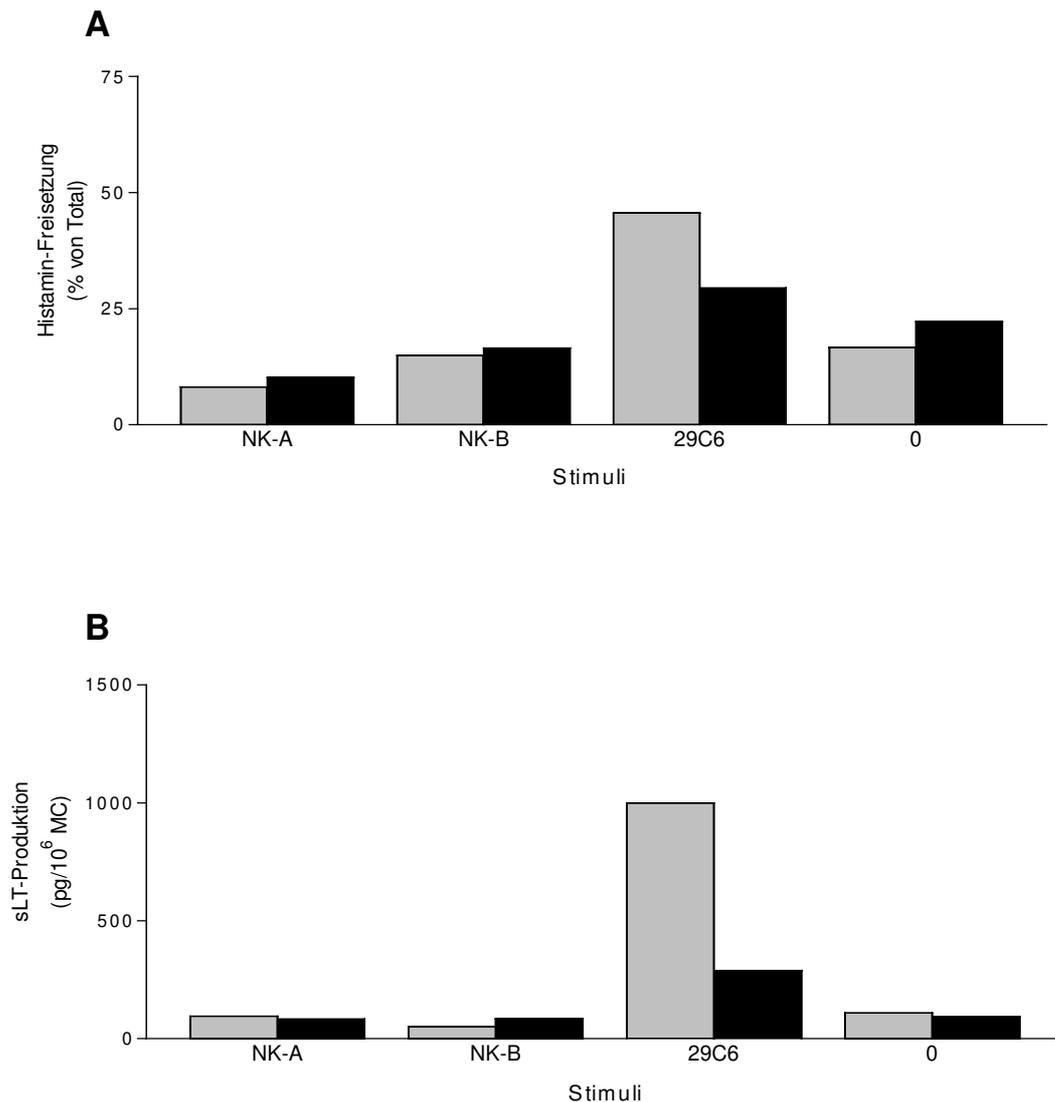


Abbildung 5: Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen eines Patienten mit Morbus Crohn nach Inkubation mit Neurokinin A und B

Vergleich der Mediatorfreisetzung (Histamin, A; Sulfidoleukotriene, B) von Mastzellen, die entweder aus nicht-entzündetem oder entzündetem Gewebe isoliert wurden. Mastzellen wurden vor Stimulation für die Dauer von 5 Tagen mit SCF kultiviert. Die Konzentrationen der Stimuli sowie die Dauer der Inkubation entsprechen denen in Abbildung 4.

Um zu untersuchen, ob die Wirkung der Neuropeptide eventuell durch die nach Kultur noch vorhandenen kontaminierenden Zellen aufgehoben wurde, wurden die o.a. Versuche mit gereinigten Zellen wiederholt. Auch bei Mastzellen, die nach Magnetseparation und anschließender Kultur zu 85 - 93 % rein waren (n = 3), konnte durch die Neuropeptide keine signifikante Mediatorfreisetzung erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Kürzlich wurde berichtet, daß humane Mastzellen aus Haut und Lunge dazu in der Lage sind, TNF- α zu produzieren (11,15). Bei Mäusen und Ratten exprimieren Mastzellen TNF- α , wenn sie mit Substanz P (SP) stimuliert werden (89,90). Die TNF- α Freisetzung aus humanen Mastzellen nach Stimulation mit Neuropeptiden wurde bislang jedoch nicht untersucht. Daher untersuchten wir, ob bei gereinigten Mastzellen (92 - 98 %, n = 3) die TNF- α Expression induziert werden kann. Da für die Messung von TNF- α eine sehr hohe Anzahl an Mastzellen pro Versuchsbedingung eingesetzt werden muß, wurden lediglich die Peptide SP sowie Vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Gastric releasing peptide (GRP) und Glutamat getestet (willkürliche Auswahl möglichst unterschiedlicher Peptide). 5×10^5 Mastzellen wurden in 1 ml Medium für die Dauer von 6 h bei 37°C mit den Peptiden oder mAk 29C6 (100 ng/ml, 6 h, 37°C) als Kontrolle inkubiert. Keines der Peptide konnte eine Freisetzung von TNF α in den Zellüberstand hervorrufen, wohingegen durch mAk 29C6 $122,3 \pm 22,9$ pg TNF α pro 10^6 Mastzellen freigesetzt wurde.

Abschließend kann gesagt werden, daß keines der 11 Peptide in dem hier verwendeten Testsystem eine Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen induzieren konnte. In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob humane intestinale Mastzellen die Tachykinin-Rezeptoren NK-1, -2 und -3 exprimieren, an die Neuropeptide SP, NK-A, NK-B und NP-Y binden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abschnitt 3.6 dargestellt.

3.4.3 *Einfluß von Chemokinen auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen*

Mastzellen wurden nach der Aufarbeitung für die Dauer von 1 Woche mit oder ohne SCF kultiviert (vergl. Tabelle 9). Anschließend wurden die Zellen mit Interleukin 8 (IL-8, CXC-Chemokin), Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP 1 α , CC-Chemokin), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3 (CC-Chemokine) und RANTES ("regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted", CC-Chemokin) in verschiedenen Konzentrationen (10^{-7} - 10^{-5} M) und für unterschiedliche Zeiten (30, 60 und 90 min) inkubiert.

Abbildung 6 zeigt repräsentativ, daß keines der getesteten Chemokine bei einer Inkubationszeit von 60 min und einer Konzentration von 10^{-7} M eine signifikante Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen induzieren konnte ($n = 6$, $p > 0,05$ für alle Chemokine im Vergleich zur Pufferkontrolle, $p < 0,001$ für die Histaminfreisetzung und $p < 0,01$ für die sLT-Produktion durch mAk 29C6 im Vergleich zur Pufferkontrolle). Auch höhere Konzentrationen der Chemokine sowie eine kürzere oder längere Inkubationszeit hatten keinen Effekt auf die Mediatorfreisetzung (Daten nicht gezeigt). Weiterhin hatte die Kultur der Zellen mit oder ohne SCF keinen Einfluß auf die Wirkung der Chemokine. Daher sind diese Versuche in Abbildung 6 zusammengefaßt.

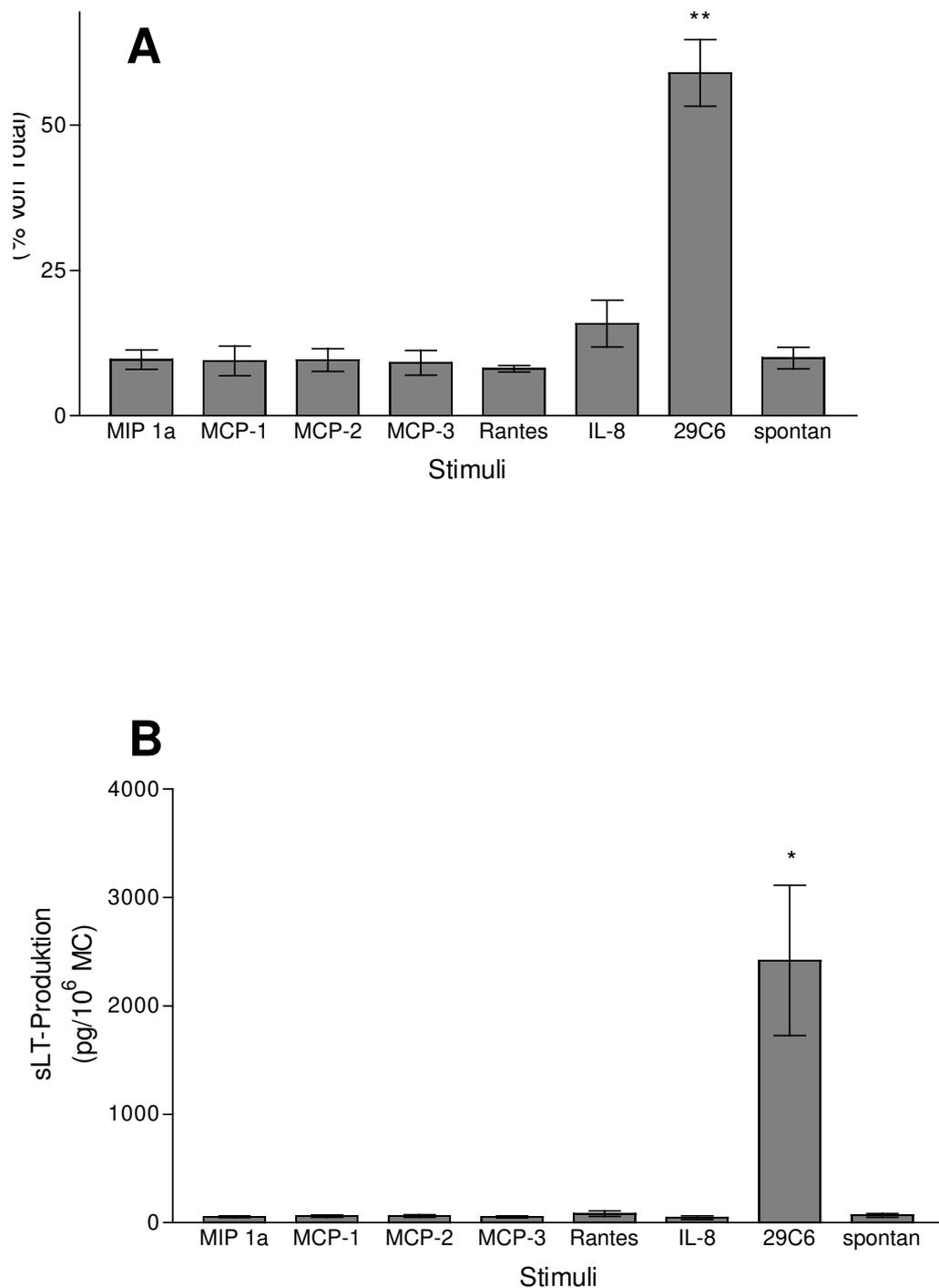


Abbildung 6: Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen nach Inkubation mit Chemokinen

Dargestellt ist die Freisetzung von Histamin (A) und Sulfidoleukotrienen (B) nach Inkubation von Mastzellen mit Chemokinen ($n = 6$). Mastzellen aus unabhängigen Zellpräparationen wurden zuvor mit oder ohne SCF kultiviert (vergl. Text und Tabelle 9). Die Konzentration der Chemokine betrug 10^{-7} M, die des mAk 29C6 100 ng/ml. Die Inkubationszeit betrug bei den dargestellten Experimenten 60 min. Statistik: * = $p < 0,01$; ** = $p < 0,001$ im Vergleich zur Pufferkontrolle.

3.5 Zytokinproduktion durch humane intestinale Mastzellen

3.5.1 *Produktion von TNF- α und Einfluß von Bakterien auf die Mediator-freisetzung durch humane intestinale Mastzellen*

TNF- α war eines der ersten Zytokine, das in Mastzellen gefunden wurde. Humane Mastzellen aus Haut und Lunge können TNF- α exprimieren und nach Stimulation auch freisetzen (11,15). Neue Arbeiten an Tiermodellen haben gezeigt, daß TNF- α eine protektive Rolle bei der Abwehr von intestinalen bakteriellen Infektionen haben kann (77,78). Über die Fähigkeit humaner intestinaler Mastzellen zur TNF- α Produktion sowie über den Einfluß von Bakterien auf humane Mastzellen war bislang nichts bekannt.

Humane intestinale Mastzellen wurden durch Magnetseparation und anschließende Kultur mit Zusatz von SCF gereinigt (vergl. Tabelle 8, Abschnitt 3.2.3) Nach Kultur wurden die Zellen mit mAk 29C6 (100 ng/ml), intestinalen Bakterien (zur Präparation vergl. 2.2.7) oder LPS aus *E. coli* O26:B6 (10 μ g/ml) für die Dauer von 6 h bei 37°C stimuliert.

Abbildung 7 zeigt den qualitativen Nachweis von TNF- α -Protein in Zelllysaten humaner intestinaler Mastzellen (Reinheit: 95%) im Western-Blot mit einem Kaninchen-Antiserum gegen denaturiertes humanes TNF- α , das speziell für den Einsatz im Western-Blot hergestellt wurde. Sowohl im Lysat von nicht-stimulierten Zellen als auch in denen von mit mAk 29C6 oder Bakterien stimulierten Zellen konnte TNF- α nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurden 0,5 μ g humanes rekombinantes TNF- α verwendet. Das in den Zelllysaten detektierte Protein war auf der gleichen Höhe zu finden wie das Kontrollprotein (MW: 17,9 kD) und lag zwischen den 15 kD und 25 kD - Banden des Molekulargewicht-Markers. Als Negativkontrollen wurden eine Spur nur mit dem Zweitantikörper (Kreuzreaktionen des Zweitantikörpers mit TNF- α) und eine Spur mit Kaninchen-Normalserum anstelle des Erstantikörpers (unspezifische Bindung des anti-TNF- α Antiserums) inkubiert. Es konnten keine unspezifischen Bindungen nachgewiesen werden (Blot nicht gezeigt).

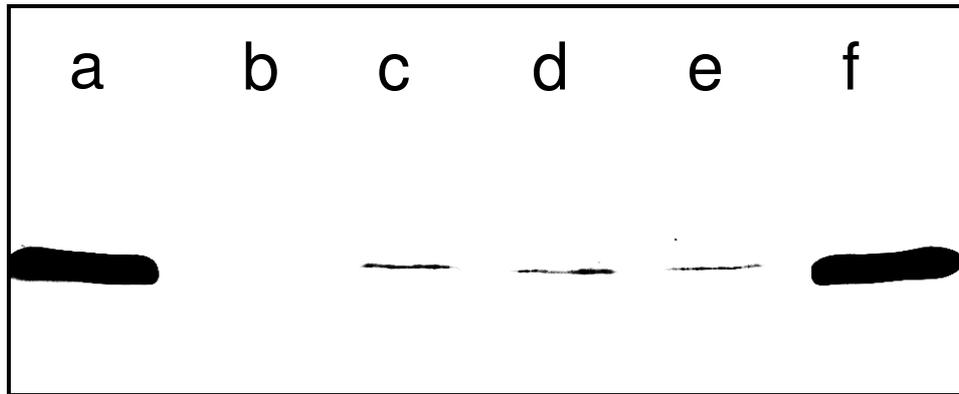


Abbildung 7: Western-Blot zum Nachweis von TNF- α in Zelllysaten gereinigter intestinaler Mastzellen.

Dargestellt ist der Nachweis von TNF- α in den Zelllysaten von je 1×10^6 Mastzellen mit 95 % Reinheit ohne Stimulation (Spur c), nach Stimulation mit 100 ng/ml mAk 29C6 für die Dauer von 6 h (Spur d) oder nach Inkubation mit intestinalen Bakterien für die Dauer von 6 h (Spur e). In Spur a und f wurden jeweils 0,5 μ g humanes rekombinantes TNF- α aufgetragen, Spur b zeigt Zellkulturmedium als Negativkontrolle.

Im Western-Blot konnten keine Unterschiede im TNF- α Gehalt von unstimulierten oder stimulierten intestinalen Mastzellen nachgewiesen werden. Um die TNF- α Freisetzung zu quantifizieren, wurde TNF- α in Zelllysaten und Zellüberständen mittels Enzymimmunoassay bestimmt ($n = 13$). Histamin und Sulfidoleukotriene wurden ebenfalls gemessen. In Abbildung 8 ist die TNF- α Freisetzung in den Zellüberstand dargestellt. Durch alle drei Stimuli wurde im Vergleich zur Negativkontrolle ein Anstieg in der Freisetzung von TNF- α und Histamin induziert. Die Freisetzung aller drei Mediatoren war nach Stimulation mit mAk 29C6 am stärksten. Die Inkubation der Mastzellen mit intestinalen Bakterien führte zu einem Anstieg der TNF- α Freisetzung, die ca. die Hälfte des durch mAk 29C6 erreichten Wertes betrug. Die Freisetzung von Histamin nach Inkubation mit Bakterien fiel demgegenüber schwächer aus. Durch Stimulation mit LPS wurden nur geringe Mengen an TNF- α und noch weniger Histamin freigesetzt. Sowohl Bakterien als auch LPS waren nicht in der Lage, die Produktion von Sulfidoleukotrienen anzuregen.

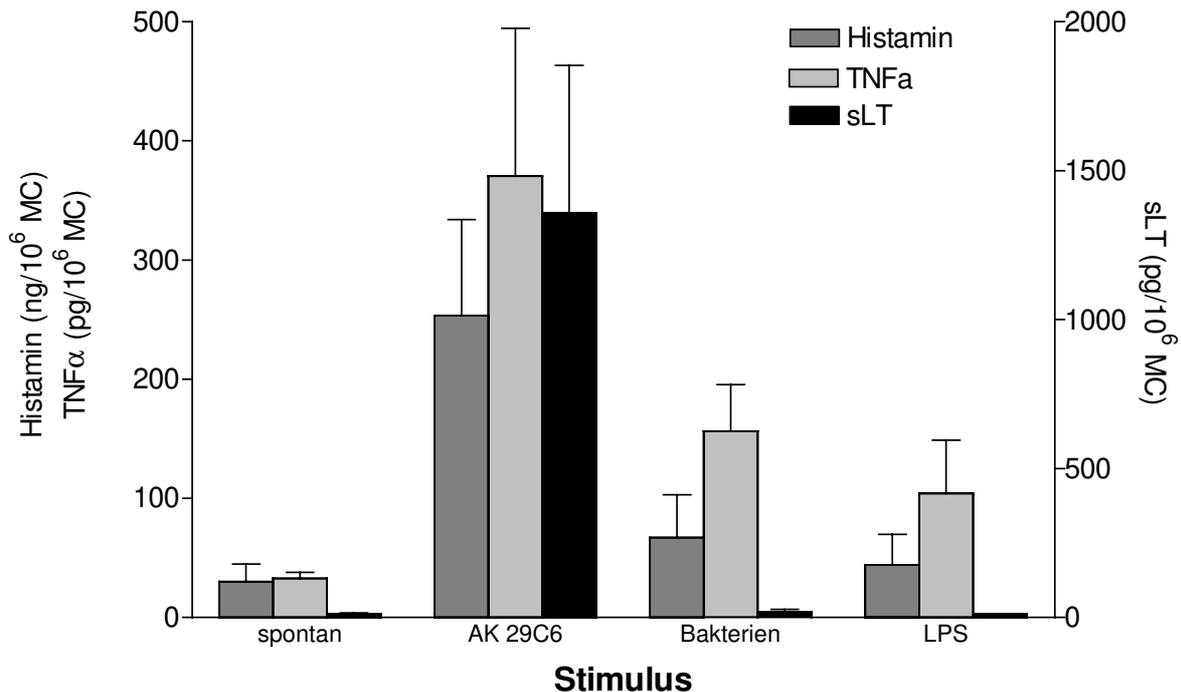


Abbildung 8: Produktion von TNF- α und den Mastzellmediatoren Histamin und Sulfidoleukotrienen durch humane intestinale Mastzellen

Gezeigt ist die Freisetzung von TNF- α , Histamin und Sulfidoleukotrienen nach Stimulation gereinigter intestinaler Mastzellen (76 - 92%) mit mAk 29C6 (100 ng/ml), LPS (10 μ g/ml) oder intestinalen Bakterien für die Dauer von 6 h (n = 13).

Auch nach 6-stündiger Stimulation der Mastzellen mit mAk 29C6, Bakterien oder LPS konnte in den anschließend lysierten Zellen noch TNF- α bestimmt werden (n = 6, 76 - 92 % Reinheit, Daten nicht gezeigt). Dabei lagen die in den Lysaten gemessenen Werte für alle drei Stimuli bei 4 von 6 Experimenten deutlich höher (ca. Faktor 2 für mAk 29C6 und LPS, ca. Faktor 3 für Bakterien) als die im Zellüberstand gemessenen Werte. In den Zelllysaten der unstimulierten Zellen konnte dagegen wie bei den Zellüberständen kein TNF- α nachgewiesen werden.

3.5.2 *Produktion von Interleukin-5 (IL-5) durch humane intestinale Mastzellen*

IL-5 gehört zu den "Th2"-Zytokinen und wird von T-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten produziert. Es besteht die Vermutung, daß auch humane Mastzellen

des Respirationstraktes unter bestimmten Bedingungen (allergisches Asthma) IL-5 produzieren können (12). Die Produktion von IL-5 durch humane intestinale Mastzellen wurde bis jetzt nicht untersucht.

Mastzellen (n = 7) wurden durch Magnetseparation und nachfolgender Kultur mit Zusatz von SCF gereinigt (vergl. Tabelle 8). Die Zellen wurden nach Kultur mit mAk 29C6 (100 ng/ml) für die Dauer von 6 h stimuliert. IL-5 wurde in Zellüberständen von stimulierten und unstimulierten Mastzellen mittels Enzymimmunoassay bestimmt (Nachweisgrenze: 21 pg/10⁶ Mastzellen)

Nur in einem von sieben Zellüberständen der unstimulierten Zellen konnte IL-5 nachgewiesen werden (95 pg/10⁶ Mastzellen), in den anderen Überständen lag die IL-5 Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Dagegen konnte nach Stimulation der Zellen mit mAk 29C6 in allen Zellüberständen IL-5 nachgewiesen werden (Abbildung 9).

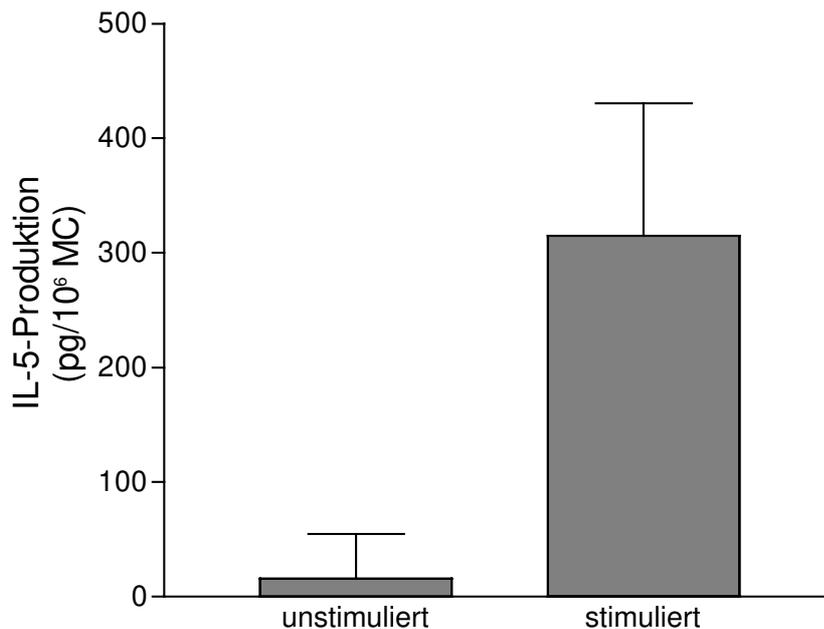


Abbildung 9: Produktion von Interleukin 5 (IL-5) durch humane intestinale Mastzellen nach IgE-Rezeptor –Quervernetzung

Dargestellt ist Produktion von IL-5 (MW±SD, n = 7) durch unstimulierte Mastzellen sowie nach Stimulation der Zellen mit mAk 29C6 (100 ng/ml) für die Dauer von 6 h.

3.6 Expression des Neurokinin-Rezeptors NK-1 durch humane intestinale Mastzellen

Da die Inkubation von intestinalen Mastzellen mit Neuropeptiden nicht zur Freisetzung von Mastzellmediatoren führte, sollte in einem weiteren Versuchsansatz untersucht werden, ob die Neurokinin-Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 von Mastzellen exprimiert werden. Bislang konnten noch keine Neuropeptid-Rezeptoren auf humanen Mastzellen nachgewiesen werden.

Gereinigte Mastzellen (95 - 98 % Reinheit, je 3×10^5 , $n = 3$) wurden für die Dauer von 6 h mit mAk 29C6 (100 ng/ml) stimuliert und die RNA von stimulierten und unstimulierten Zellen präpariert. Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob mRNA für die Neurokinin-Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 exprimiert wurde. Weder in den stimulierten noch in den unstimulierten Zellen konnte mRNA für NK-2 oder NK-3 nachgewiesen werden. Für NK-1 konnte jedoch in den stimulierten Zellen ein Signal detektiert werden, während in den unstimulierten Zellen keine mRNA für NK-1 nachweisbar war (Abbildung 10).

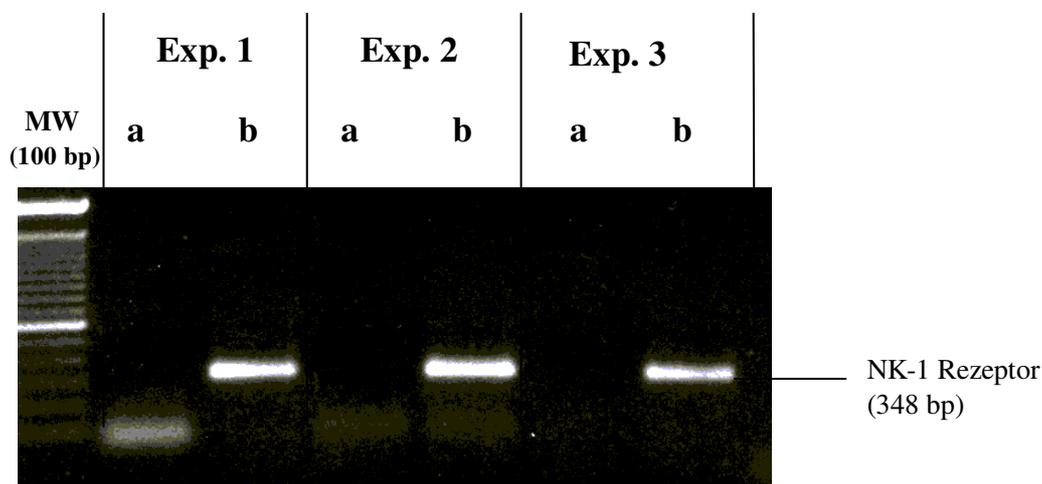
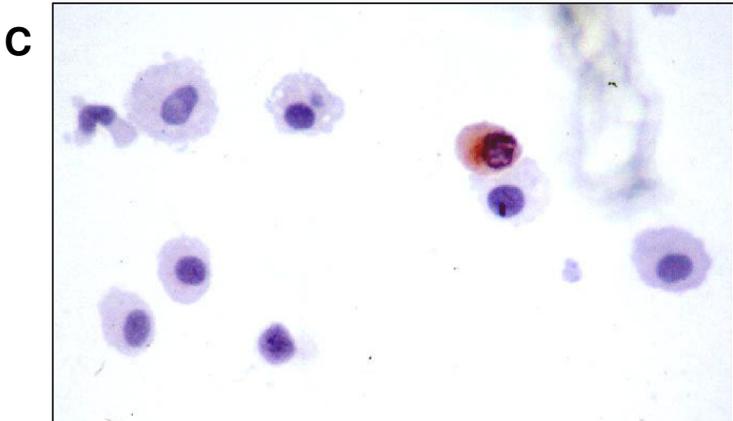
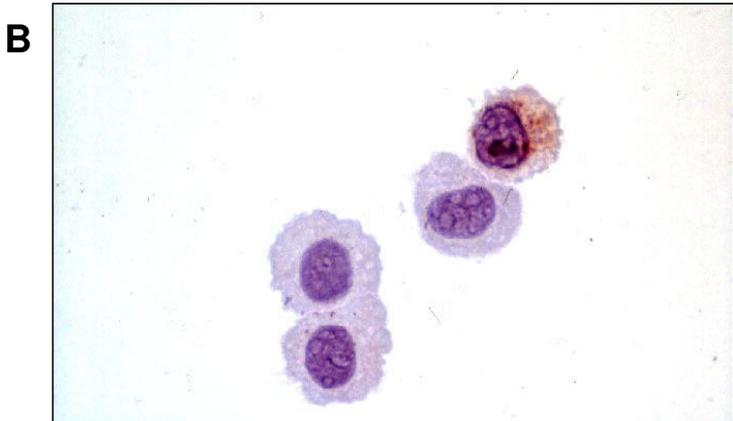
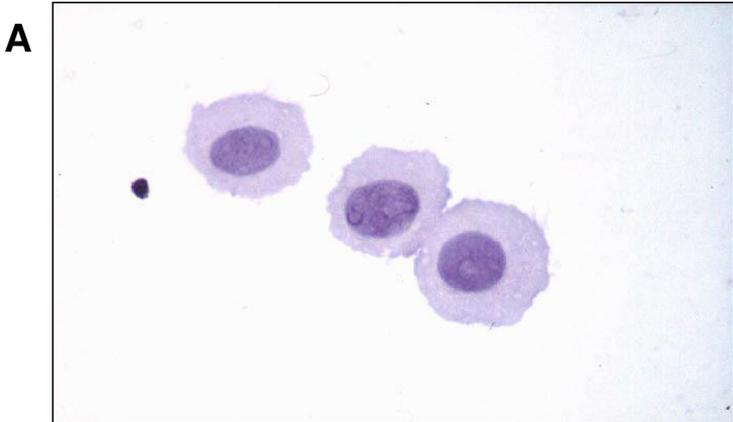


Abbildung 10: RT-PCR von stimulierten und unstimulierten gereinigten Mastzellen mit einem Primer für den Tachykinin-Rezeptor NK-1

Dargestellt ist die RT-PCR von 3 unabhängigen Experimenten. In Spur 1, 3 und 5 wurde jeweils die RNA der unstimulierten und in Spur 2, 4 und 6 die der stimulierten Mastzellen aufgetragen. Die linke Spur (MW) zeigt einen Größenmarker (jede Bande = 100 Basenpaare (bp)).

Antikörper gegen humane Neurokinin-Rezeptoren waren während der Durchführung der vorliegenden Arbeit noch nicht verfügbar. Allerdings wurde von Dr. H. Sann (Inst. für Physiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Leiter: Prof. M. Schemann) ein aus Kaninchen gewonnener Antikörper gegen Ratten-NK-1 zur Verfügung gestellt (91). Mittels dieses Antikörpers wurde bei stimulierten und nicht-stimulierten gereinigten Mastzellen (85 - 98 % Reinheit, n = 3) die Expression von NK-1 immunzytochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß in unstimulierten Mastzellen keine positive Immunreaktion für NK-1 nachzuweisen war. Von den stimulierten Zellen zeigte eine kleine Anzahl ($5,6 \pm 1$ %) eine positive Immunreaktion für NK-1. Dabei zeigten ca. 1 % der Zellen ein starkes Signal, während die übrigen lediglich eine schwache, aber deutliche Färbung zeigten. Farbtafel 2 zeigt die Ergebnisse der Immunzytochemie am Beispiel eines ausgewählten Experimentes: A): unstimulierte Mastzellen, B) und C): Mastzellen nach Stimulation mit 100 ng/ml 29C6 für 6 h, Reinheit der Zellen 98 % (Originalvergrößerung: A) und B) x 1000, C) x 400). Obwohl der Anteil an immunpositiven Zellen nur gering war, was evtl. auf die Spezifität des Antikörpers (Ratten-NK-1) zurückzuführen ist, trat die Färbung bei allen drei Zellpräparationen auf, während bei unstimulierten Zellen in keinem Fall positive gefärbte Zellen nachzuweisen waren. Daher kann abschließend gesagt werden, daß durch IgE-Rezeptor Quervernetzung die Expression von NK-1 in humanen intestinalen Mastzellen induziert werden kann.

Farbtafel 2: Expression des NK-1 Rezeptors in stimulierten Mastzellen (Erläuterungen s. Text)



4 DISKUSSION

4.1 Anreicherung und Kultur humaner intestinaler Mastzellen und deren Einfluß auf die Mediatorfreisetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden etabliert, um Mastzellen aus humaner Darmschleimhaut zu isolieren, anzureichern und selektiv zu kultivieren. Möglichkeiten zur Isolation humaner intestinaler Mastzellen wurden schon früher beschrieben (43,92,93), wobei die Methoden zur Herstellung der Einzelzell-Suspension variieren.

Die von uns etablierte Methode führt zu einer Zellsuspension, in der neben ca. 3,5 % Mastzellen auch eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Gewebszellen vorhanden sind. Die Zusammensetzung der Zellsuspension ist von verschiedenen Faktoren wie der Lokalisation der Resektates und der Diagnose abhängig. Für den prozentualen Anteil an Mastzellen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der o.a. Variablen, ihr Anteil war nur vom Zeitpunkt der Aufarbeitung abhängig. Überraschenderweise war der Anteil an Mastzellen in den Präparationen höher, die erst am nächsten Tag und nicht direkt nach dem Erhalt des Präparates aufgearbeitet wurden. Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte sein, daß die Mastzellen durch Vorgänge während der Operation (Einfluß der Narkose, partielle Unterbindung der Gefäßversorgung, Darmspülungen etc.) aktiviert werden und degranulieren. Bei der von uns gewählten Nachweismethode des Anfärbens der Zellen können aber degranulierte Mastzellen nicht als solche erkannt werden. Wenn die Mastzellen jedoch durch die "Lagerung" des Resektates über Nacht bei 4°C die Möglichkeit zu einer Rekonstitution ihrer Granula haben, würde am nächsten Tag ein höherer Prozentsatz an Mastzellen gezählt.

Der Histamingehalt der frisch isolierten Mastzellen lag bei 0,6 pg pro Zellen (n = 50), schwankte aber zwischen 1,19 pg/Zelle bei Isolationen aus dem Dünndarm (n = 15) und 0,25 pg/Zelle bei Isolationen aus dem Dickdarm (n = 17). In früheren Arbeiten wurden unterschiedliche Werte für den Anteil an Mastzellen sowie für deren Histamingehalt berichtet: 2,8 pg/Zelle bei einem Gehalt von 3,1 % (92); bzw. 2,81 pg/Zelle bei einem Gehalt von 1,5 % (43,93). Diese Unterschiede sowohl in der

Zellzählung als auch im Histamingehalt sind könnten methodischen Ursprungs sein, da sowohl für die Aufarbeitung als auch für den Nachweis der Mastzellen und die Messung des Histamingehaltes unterschiedliche Verfahren angewandt wurden.

Die Anreicherung von Mastzellen wurde in früheren Arbeiten mit unterschiedlichen Methoden versucht. Arbeitsgruppen, die mit Ratten-Peritonealmastzellen arbeiteten, verwendeten die Dichtegradientenzentrifugation über Percoll-Gradienten (94). Hierbei konnten gute Ergebnisse mit einer Dichte 1,11 g/ml erzielt werden, die von den Mastzellen noch durchtreten wurde (Reinheit > 90 %, Ausbeute > 70 %). Die Dichte der verwendeten Mastzellen war dabei nahezu identisch und variierte lediglich in Abhängigkeit vom Alter der Ratten. Für humane Lungenmastzellen wurden Dichten von 1,062 bis 1,090 g/ml verwendet, wobei sich der größte Teil der Mastzellen an der Grenze zwischen 1,062 und 1,070 g/ml befand (74). In der vorliegenden Arbeit konnte ausgehend von diesen Werten festgestellt werden, daß bei einer einstufigen Percoll-Lösung mit der Dichte von 1,036 g/ml ca. 50% der Mastzellen diese Schicht durchdrangen und im Sediment zu finden waren. Dabei kam es allerdings nur zu einer sehr geringen Anreicherung der Zellen. Bei höheren Dichten war aber der Verlust an Mastzellen so hoch, daß mit den verbleibenden Zellen keine weiteren Experiment durchgeführt werden konnten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß humane intestinale Mastzellen bezüglich ihrer Dichte sehr heterogen sind, was evtl. auf unterschiedliche Granulierungszustände oder unterschiedliche Zellgrößen zurückzuführen ist. Daher wurde im weiteren diese Methode zur Anreicherung von Mastzellen nicht mehr verwendet.

Die Magnetseparation zur Anreicherung von Mastzellen über den *c-kit* Rezeptor, CD117, wurde erstmals für humane Lungenmastzellen beschrieben (95). Allerdings verwendeten die Autoren das Dynabead™-System anstelle des von uns benutzten MACS™-Systems, welches - entgegen unseren Ergebnissen - in dieser Arbeit zu keiner guten Anreicherung führte (persönliche Mitteilung von M.K. Church, Southampton). Die für Lungenmastzellen erzielten Ergebnisse entsprechen bezüglich der Reinheit und Ausbeute im wesentlichen den von uns erzielten Ergebnissen. Die Verwendung des MACS-Systems hat allerdings den Vorteil, daß die magnetischen Partikel sehr klein und bei späteren Experimenten viel weniger störend sind als die verhältnismäßig großen Dynabeads (MACS-beads: << 0,05 µm,

Dynabeads: $> 0,5 \mu\text{m}$). Ein Nachteil der MACS-Methode ist aber, daß in den dazu verwendeten, mit Stahlwolle gefüllten Säulen tote Zellen unspezifisch an das Säulenmaterial binden und somit später in der Fraktion eluiert werden, in der sich auch die Mastzellen befinden. Das führt einerseits zu falsch-niedrigen Ergebnissen bezüglich der Reinheit und der Vitalität der Mastzellpräparationen, andererseits zu einer Belastung des Kulturmediums mit toxischen Abbauprodukten. Leider konnte bis jetzt noch keine Methode gefunden werden, um tote Zellen vor der Magnetseparation zu entfernen. Desweiteren scheint es durch die Arbeitsabläufe der Magnetseparation zu einer Art von Aktivierung der Zellen zu kommen, da sie anschließend häufig nur noch sehr schwach granuliert sind. Daher wurden auch nach Magnetseparation die Mastzellen vor einem Experiment kultiviert, so daß eine Rekonstitution der Granula und eine allgemeine Erholung der Mastzellen stattfinden kann.

Eine Methode zur Langzeitkultur von humanen Gewebemastzellen ohne den Zusatz von sog. "feeder cells" wie Maus 3T3-Fibroblasten (96) war bislang nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Kultivierung von intestinalen Mastzellen entwickelt, die es ermöglicht, die Zellen durch Zusatz des Mastzell-Wachstumsfaktors SCF nahezu unbegrenzt in Kultur zu halten und sie dadurch anzureichern. Ohne den Zusatz von SCF konnten Mastzellen für die Dauer von 7 - 10 Tagen kultiviert werden, wobei allerdings die absolute Zahl an Mastzellen abnahm (Wiederfindungsrate 77,4 %). Eine Anreicherung von Mastzellen geschah zum einen dadurch, daß der größte Teil der kontaminierenden Zellen abstarb, aber auch durch die Proliferation der Mastzellen in unserem Kultursystem. Eine SCF-abhängige Proliferation konnte an gereinigten Mastzellen mittels des ^3H Thymidineinbaus nachgewiesen werden (vergl.(88)). Es konnte somit gezeigt werden, daß SCF nicht nur die Reifung von Mastzellen aus ihren Vorläuferzellen induziert (22,23,26), sondern daß es wahrscheinlich auch für das Überleben und die Proliferation reifer Gewebemastzellen verantwortlich ist. Für humane Mastzellen sind im Gegensatz zu Mastzellen von Ratten und Mäusen bislang keine anderen Zytokine bekannt, die eine ähnliche Wirkung wie SCF haben. Mögliche Prinzipien der von uns beobachteten SCF-Wirkung sind entweder die Stimulation der Proliferation oder die Verlängerung des Überlebens bereits ausdifferenzierter, reifer Mastzellen. In der Literatur wurde beschrieben, daß SCF das Überleben von Mausmastzellen durch die

Unterdrückung von Apoptose ermöglicht (97). Untersuchungen von apoptotischen Vorgängen bei intestinalen Mastzellen wurden allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, wenn auch zu vermuten ist, daß das Absterben der Mastzellen bei einer Kultur ohne SCF auf Apoptose beruht. Auffällig war weiterhin, daß bereits nach eintägiger Kultur in fast allen Fällen ein höherer Anteil an Mastzellen gezählt wurde als direkt nach der Aufarbeitung (Daten nicht gezeigt). Das läßt sich zum einen dadurch erklären, daß ein Teil der kontaminierenden Zellen durch Adhäsion an die Oberfläche der Kulturgefäße aus der Suspension entfernt wird. Zum anderen wird aber auch eine weitere Erholung der Mastzellen bezüglich ihres Granulierungszustandes einsetzen (s.o.), so daß sie durch Anfärbung nachgewiesen werden können. Eine Proliferation der Mastzellen wäre nach so kurzer Zeit hingegen nicht zu erwarten.

Während der Kultur sowohl ohne als auch mit Zusatz von SCF nahm der Histamingehalt der Mastzellen verglichen mit dem frisch isolierter Zellen zu (vergl. auch (88)). Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, daß es durch die Aufarbeitung des Gewebes zu einer Aktivierung oder auch zu einer mechanisch-enzymatischen Schädigung der Mastzellen kommt, wodurch Histamin freigesetzt wird. Auch die hohe spontane Histaminfreisetzung aus Mastzellen direkt nach der Aufarbeitung kann so erklärt werden. Diese Ergebnisse lassen die Frage aufkommen, ob funktionelle Untersuchungen, die bisher an ungereinigten Mastzellen direkt nach deren Aufarbeitung durchgeführt wurden, die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln. Ergebnisse aus Untersuchungen im Tiermodell bestätigen die von uns erhobenen Daten und konnten zeigen, daß die nach Kultur der Zellen erzielten Werte eher den Verhältnissen *in vivo* entsprechen als die direkt nach Aufarbeitung erhobenen Werte (98).

Für frisch isolierte intestinale Mastzellen konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß es durch eine Vorinkubation der Zellen mit SCF zu einer signifikanten Erhöhung der Mediatorfreisetzung durch IgE-Rezeptor Quervernetzung mit mAk 29C6 kommt (81). Diese Ergebnisse bestätigten Untersuchungen an humanen Lungenmastzellen, bei denen SCF ebenfalls einen "Priming"-Effekt auf die Mediatorfreisetzung hat (74). Dieser Effekt war sowohl bei den ohne als auch bei den mit SCF kultivierten Zellen nicht so stark ausgeprägt wie bei den frisch isolierten Zellen, was vor allem daraus resultiert, daß die kultivierten Zellen eine weitaus

stärkere Reaktion auf die Stimulation mit mAk 29C6 alleine zeigten. Dabei konnte die spezifische Histaminfreisetzung von 3,3 % des Gesamthistamingehaltes bei frisch isolierten Zellen auf 40 % bei den ohne SCF und 44 % bei den mit SCF stimulierten Zellen erhöht werden (vergl. (81,88)). Diese Werte entsprechen eher denen, die man für eine IgE-abhängige Stimulation vermuten würde, da *in vivo* ja durch die IgE-Rezeptor Quervernetzung auch bei intestinalen Mastzellen eine anaphylaktische Reaktion hervorgerufen werden kann (99). Durch die Co-Stimulation der Mastzellen mit SCF und mAk 29C6 kam es zu einer fast maximalen Freisetzung der Mediatoren (84 %) im Gegensatz zu nur 11 % bei frisch isolierten Mastzellen. Auffällig war auch, daß bei frisch isolierten Zellen bei fast der Hälfte der Experimente keine Sulfidoleukotriene nachgewiesen werden konnten, was auf eine Schädigung der Zellen durch die Aufarbeitung schließen läßt. Im Gegensatz dazu konnte bei allen Experimenten mit kultivierten Zellen eine Freisetzung von Sulfidoleukotrienen beobachtet werden, die ungefähr um den Faktor 100 höher lag als bei nicht kultivierten Zellen (81,88). Ein Mechanismus für die derart gesteigerte Mediatorfreisetzung aus kultivierten Zellen ist bis jetzt noch nicht bekannt.

Bei Mastzellen, die ohne SCF kultiviert wurden, konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß alleine die Stimulation mit 100 ng/ml SCF zu einer signifikanten Mediatorfreisetzung führt. Damit ist SCF das einzige bisher bekannte Zytokin, das eine Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen induzieren kann. Ähnliche Effekte von SCF wurden bisher lediglich für humane Lungen-, Haut- Herz- und Uterus-Mastzellen beschrieben (100,101). Der Effekt von SCF auf intestinale Mastzellen konnte jedoch nicht mehr nachgewiesen werden, wenn die Zellen zuvor mit SCF kultiviert wurden. Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, daß zum einen die ohne SCF kultivierten Zellen die Rezeptordichte auf ihrer Oberfläche erhöhen, um so die geringe Konzentration an SCF in der Kultur auszugleichen. Zum anderen scheint bei mit SCF kultivierten Zellen durch die Bindung von SCF an den Rezeptor dieser für eine anschließende Stimulation blockiert zu sein. Gleichzeitig wird vielleicht die Rezeptordichte auf der Oberfläche der Mastzellen bei einem ausreichenden Angebot an SCF verringert, so daß für eine Stimulation durch SCF nicht genügend Rezeptoren vorhanden sind. In der Literatur wurde beschrieben, daß bei Mastzellen, die aus humaner fetaler Leber gewonnen wurden, der Rezeptor *c-kit* nach der Bindung von SCF internalisiert wird, und daß die Rezeptordichte erst nach 48 - 72 h ihren ursprünglichen Werte erreicht (102). Diese Beobachtung würde auch

erklären, daß eine Anreicherung der Mastzellen über Magnetseparation mittels des gegen *c-kit* (CD117) gerichteten Antikörpers YB5.B8 nicht mehr möglich war, wenn den Zellen bei der über-Nacht Kultur SCF zugesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Zur Zeit werden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen durchgeführt, bei denen mittels Durchflußzytometrie die Rezeptordichte von *c-kit* auf humanen intestinalen Mastzellen unter verschiedenen Bedingungen untersucht wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei der Kultur ungereinigter Mastzellen die Inhibition von IL-3 und GM-CSF keinen Einfluß auf das Überleben und den Histamingehalt der Mastzellen hat. Ausgehend von der Annahme, daß durch die Antikörper eine vollständige Blockierung der Zytokine erzielt wurde, ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, daß weder IL-3 noch GM-CSF wichtig für das Überleben humaner intestinaler Mastzellen sind. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition von SCF im Vergleich zur Kultur ohne Zusätze zu einer Abnahme der Mastzellzahl. Diese Abnahme war allerdings schwächer als von uns erwartet. Ein Grund dafür könnte sein, daß durch die Antikörper nur lösliches SCF blockiert wird, daß aber das membranständige, z.B. von Fibroblasten exprimierte SCF nicht beeinflußt wird und den Mastzellen weiterhin zur Verfügung steht. Eine weitere Erklärung könnte sein, daß von den Mastzellen gebundenes SCF zusammen mit dem Rezeptor internalisiert wird und die Mastzellen, wenn sie einmal mit SCF beladen wären, weiteres SCF nicht aufnehmen könnten. Somit würde eine Inhibition von SCF nicht die aus den Kulturexperimenten erwartete starke Wirkung haben.

Den stärksten Einfluß auf das Überleben der Mastzellen hatte die Inhibition von IL-4. Über eine Wirkung von IL-4 als Wachstumsfaktor für humane intestinale Mastzellen war bislang nichts bekannt. Die hier erzielten Ergebnisse lassen aber vermuten, daß IL-4 eine Wirkung auf das Überleben von Mastzellen ausübt. Da Mastzellen in einer Kultur ohne kontaminierende Zellen, die IL-4 produzieren könnten, nur mit Zusatz von SCF überlebten, kann dem IL-4 aber nur eine unterstützende Rolle zukommen. Folgende Theorie könnte den Effekt der IL-4 inhibierenden Antikörper erklären:

Die Bindung von IL-4 an einen Rezeptor auf den Mastzellen würde die Expression des Rezeptors für SCF, *c-kit*, vermindern. Diese Annahme wird durch frühere Arbeiten unterstützt, in denen gezeigt wurde, daß während der Entwicklung von Mastzellen aus Vorläuferzellen IL-4 die Expression von *c-kit* senkt (103,104). Die

Verringerung der *c-kit* Expression würde die Mastzellen in die Lage versetzen, bei Vorhandensein von IL-4 mit einer geringeren SCF-Konzentration zu überleben. Wenn IL-4 im umgebenden Medium nicht vorhanden wäre, würde mehr *c-kit* exprimiert, und die Mastzellen würden mehr SCF benötigen, um zu überleben. Da in unserem Versuchsansatz kein zusätzliches SCF angeboten wurde, wäre die vorhandene Menge nicht ausreichend, um allen Mastzellen ein Überleben zu sichern. Das würde heißen, daß bei einer Kultur, bei der kein IL-4 durch kontaminierende Zellen angeboten (z.B. nach Magnetseparation) bzw. zugefügt wird, mehr SCF verbraucht würde als bei einer (Langzeit)kultur ungereinigter Mastzellen. Außerdem müßte der Zusatz von IL-4 das Überleben und die Proliferation von Mastzellen deutlich verbessern und gleichzeitig die Rezeptordichte von *c-kit* vermindern. Dieser Versuchsansatz wird in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit zur Zeit untersucht. Erste Ergebnisse zeigten, daß der Zusatz von IL-4 zusätzlich zu SCF bei Kulturen gereinigter Mastzellen die Proliferation der Zellen sehr stark steigert (ca. Faktor 3, n = 12). Die Veränderung des Expressionsmusters von *c-kit* in Abhängigkeit von IL-4 soll in Zukunft durchflußzytometrisch untersucht werden.

Gleichzeitig mit der Abnahme der Mastzellzahl kam es bei Inhibition von IL-4 zu einem deutlichen Anstieg des Histamingehaltes der Mastzellen. Eine Beeinflussung der Reagibilität der Zellen (prozentuale Histaminfreisetzung durch mAk 29C6) oder der Sulfidoleukotrien-Produktion konnte nach Inhibition von IL-4 nicht festgestellt werden. In Anlehnung an die oben aufgestellte Theorie wäre eine Erklärung für dieses Phänomen, daß der Histamingehalt der Zellen von der Anzahl der *c-kit* Rezeptoren abhängig ist, die von der Zelle exprimiert werden. Eine hohe *c-kit* Expression müßte dann mit einem hohen Histamingehalt korreliert sein. Es wäre aber auch denkbar, daß dieser Fall nur eintritt, wenn keine Bindung von SCF an die Rezeptoren stattfindet. Demnach wäre also der Histamingehalt nicht nur von der Rezeptordichte, sondern von einer gleichzeitigen Nicht-Aktivierung der Rezeptoren abhängig. Auch ein indirekter Effekt könnte für den hohen Histamingehalt verantwortlich sein: Durch eine Verlangsamung der Stoffwechselfvorgänge und der Proliferation wäre die Aktivität der Mastzellen herabgesetzt, wodurch es zu einer Anreicherung von Histamin in den Granula kommen würde. In der Literatur wurde beschrieben, daß während der Entwicklung von Mastzellen aus fetalen Leberzellen IL-4 die Expression von Tryptase inhibiert (103). Über einen Einfluß von IL-4 auf den

Histamingehalt von Mastzellen war allerdings bisher nichts bekannt. Ein direkter Effekt von IL-4 auf den Histamingehalt von Mastzellen konnte bei Versuchen mit gereinigten Mastzellen (Kultur mit SCF und IL-4) in unserer Arbeitsgruppe allerdings nicht beobachtet werden.

4.2 Einfluß von Neuropeptiden und Chemokinen auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß insgesamt 11 getestete Neuropeptide und verwandten Peptide nicht in der Lage waren, die Freisetzung von Histamin, Sulfidoleukotrienen oder TNF- α aus humanen intestinalen Mastzellen zu induzieren. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Beobachtungen, nach denen humane intestinale Mastzellen und humane Lungenmastzellen nicht durch Substanz P (SP) stimuliert werden können (43,105,106). Im Gegensatz dazu sind humane Hautmastzellen in der Lage, nach Stimulation mit SP, Somatostatin und Vasoaktiven Intestinalem Peptid (VIP) Histamin (aber nur sehr geringe Mengen an Sulfidoleukotrienen) freizusetzen. Die Tachykinine Neurokinin A (NK-A) und NK-B hatten in diesen Versuchen keine Wirkung auf humane Hautmastzellen (106). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen daher die Unterschiede zwischen humanen Mastzellen, die aus verschiedenen Geweben stammen.

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß humane Lungenmastzellen, die durch bronchoalveolare Lavage gewonnen wurden und zum selben Subtyp gehören wie intestinalen Mastzellen, nach Stimulation mit SP Histamin freisetzen (107), was im Widerspruch zu den o.a. Beobachtungen Auch konnte von unserer Arbeitsgruppe und anderen kürzlich gezeigt werden, daß bis zu 40 % der intestinalen Mastzellen sowohl Tryptase als auch Chymase enthalten und damit dem Subtyp der Hautmastzellen entsprechen (41,88). Daher kann die fehlende Stimulierbarkeit der intestinalen Mastzellen durch SP und andere Neuropeptide nicht nur mit der andersartigen Protease-Expression erklärt werden.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen Hautmastzellen und intestinalen Mastzellen hinsichtlich der Stimulierbarkeit durch Neuropeptide könnte in

einer funktionellen Heterogenität zwischen Mastzellen aus verschiedenen Geweben begründet sein, die durch die unterschiedliche Reagibilität auf IgE-unabhängige Stimuli angedeutet wird. So wurde vermutet, daß die Reaktion humaner Hautmastzellen auf SP und andere nicht-immunologische Stimuli wie die Anaphylatoxine C5a und C3a oder die Substanz "Compound 48/80" unabhängig von der Anwesenheit entsprechender Rezeptoren auf der Oberfläche der Mastzellen ist, sondern daß diese Substanzen aufgrund ihrer starken basischen Eigenschaften direkt mit membran-assoziierten G-Proteinen reagieren und so die Histaminfreisetzung, nicht aber die Synthese von Sulfidoleukotrienen induzieren (106,108). Allerdings kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß Unterschiede in der Art der Gewinnung der Mastzellen einen Einfluß auf das Verhalten der Zellen bei Stimulation mit unterschiedlichen Substanzen hat. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, daß zwar die aus bronchoalveolarer Lavage gewonnenen Lungenmastzellen, aber nicht die mittels enzymatischer Methoden aus Gewebe isolierten Lungenmastzellen nach Stimulation mit SP Histamin freisetzen (43,107). Allerdings wurden Mastzellen aus der Haut, die durch SP und andere Neuropeptide stimuliert werden konnten, ebenfalls mittels enzymatischer Methoden isoliert (43), so daß ein negativer Einfluß dieser Methode nicht prinzipiell angenommen werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß kontaminierende Zellen keinen Einfluß auf das Nicht-Reagieren der intestinalen Mastzellen haben, da auch mit gereinigten Mastzellen keine Mediatorfreisetzung nach Stimulation mit Neuropeptiden erzielt werden konnte.

Die vorliegenden Ergebnisse machen es unwahrscheinlich, daß Neuropeptide einen direkten Einfluß auf die Regulation von intestinalen Mastzellen haben. Das wird dadurch bestätigt, daß aus Mastzellen aus aktiv entzündetem Gewebe ebenfalls keine Mediatorfreisetzung beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, daß Neuropeptide zusammen mit anderen Stimuli synergistisch auf Mastzellen wirken könnten. Zumindest für die Inkubation zusammen mit SCF kann diese Annahme aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aber ausgeschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung von Mastzellen durch Neuropeptide wurde kürzlich demonstriert. Es konnte gezeigt werden, daß SP und NK-A die Proliferation und Chemotaxis von Lungenfibroblasten stimulieren können (109). Da Fibroblasten membrangebundenes SCF exprimieren, haben sie ihrerseits eine chemotaktische und proliferative Wirkung auf Mastzellen. So könnten zunächst

die Fibroblasten durch die Ausschüttung von SP und NK-A angelockt werden und würden dann ihrerseits die Einwanderung von Mastzellen induzieren.

Auf der anderen Seite könnten Mastzellen selbst die Physiologie des Intestinaltraktes beeinflussen, indem sie die Freisetzung von Peptiden aus Nervenzellen induzieren. Neuropeptide und besonders Tachykinine spielen eine zentrale Rolle in der Regulation verschiedener Darmfunktionen, wie Motilität, Ionentransport und Sekretion von Verdauungssäften bzw. Mucus (110-113). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß Mastzellmediatoren wie Histamin, Sulfidoleukotriene und Prostaglandine die neuronale Steuerung des intestinalen Ionentransportes beeinflussen können (68,69,114).

Ebenfalls im Tiermodell konnte kürzlich gezeigt werden, daß Mastzellen von Ratten und Mäusen nach Stimulation mit SP TNF- α produzieren (89,90). Humane Mastzellen aus Haut und Lunge sezernieren TNF- α nach IgE-Rezeptor Quervernetzung (11,15), die Wirkung von Neuropeptiden auf die Freisetzung von TNF- α wurde bislang nicht untersucht. In den vorliegenden Untersuchungen konnte die Produktion von TNF- α nur nach Stimulation der Zellen mit mAk 29C6 nachgewiesen werden, nicht aber nach Stimulation mit SP, VIP, "gastric releasing peptide" (GRP) oder Glutamat. Diese Ergebnisse bestätigen die fundamentalen physiologischen Unterschiede zwischen den Mastzellen des Menschen und denen von Ratten und Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß ruhende humane intestinale Mastzellen keine Rezeptoren für die Tachykinine SP (bindet an NK-1>NK-2>NK-3), NK-A (bindet an NK-2>NK-3>NK-2), NK-B (bindet an NK-3>>NK-2≈NK-1) und NP-Y (bindet an NK-2>NK-1>>NK-3) (115) haben. In allen bisher durchgeführten Untersuchungen zur Freisetzung von Mediatoren nach Stimulation mit Neuropeptiden wurde angenommen, daß die Wirkung von SP und anderen Neuropeptiden rezeptorunabhängig ist (106,108), so daß die hier vorliegende Beobachtung, daß ruhende Mastzellen keine Tachykinin-Rezeptoren exprimieren, nicht unerwartet war. Allerdings konnte bei einem geringen Prozentsatz von Mastzellen, die durch IgE-Rezeptor Quervernetzung stimuliert wurden, die Expression des Rezeptors NK-1, der SP und - sehr viel schwächer - NK-A und NK-B bindet, induziert werden. Da der Nachweis des Rezeptors auf Proteinebene mit einem Antikörper durchgeführt wurde, der eigentlich gegen den NK-1 Rezeptor von

Ratten gerichtet ist, kann der Wert des prozentualen Anteil der für NK-1 positiven Zellen allerdings nicht als gesichert angesehen werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz der NK-1 Rezeptoren aus Mensch und Ratte mit Hilfe der Datenbank NCBI Entrez ergab allerdings eine Homologie von 88%, so daß eine Kreuzreaktivität der Antikörper durchaus möglich ist. Die Versuche sollten jedoch wiederholt werden, sobald ein Antikörper gegen den humanen NK-1 Rezeptor zur Verfügung steht. Die Bedeutung der NK-1 Expression ist unklar. Allerdings steht zu vermuten, daß die Liganden für den Rezeptor unter bestimmten (patho)physiologischen Voraussetzungen, in denen Mastzellen durch IgE-Rezeptor Quervernetzung stimuliert werden, einen Einfluß auf die Funktionen der Zellen haben könnten, wenn diese vielleicht auch nicht in der Freisetzung von Mediatoren besteht. Leider scheint es unmöglich, die funktionelle Bedeutung der NK-1 Expression in stimulierten Zellen hinsichtlich einer Mediatorfreisetzung zu untersuchen, da nach einer maximalen Stimulation der Mastzellen mit mAk 29C6 für die Dauer von 6 h, die in unseren Versuchen für eine Expression von NK-1 notwendig war, keine weitere Freisetzung von Histamin oder Sulfidoleulotrienen induziert werden könnte. Weitere Untersuchungen zum Phänotyp und zur Funktion der Mastzellen, die den NK-1 Rezeptor nach Stimulation exprimieren, sollen in Zukunft durchgeführt werden.

Auch die Chemokine MIP 1 α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, IL-8 und RANTES hatten in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluß auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen. Die getesteten Chemokine führten weder zu einer signifikanten spezifischen Histaminfreisetzung noch zu einer Produktion von Sulfidoleukotrienen. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Berichte, nach denen weder humane Hautmastzellen noch humane Lungenmastzellen nach Stimulation mit Chemokinen Histamin oder Sulfidoleukotriene freisetzen (42,74,76). Für murine Mastzellen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: während aus Knochenmark *in vitro* gewonnene Mastzellen nach Inkubation mit Chemokinen keine Degranulation zeigten (75), sezernierten murine Peritonealmastzellen nach Stimulation mit MIP 1 α und MCP-1 Histamin (116,117). Auch humane basophile Granulozyten können durch Chemokine stimuliert werden (42,76) Diese Ergebnisse verdeutlichen einmal mehr

die funktionellen Unterschiede zwischen murinen und humanen Mastzellen, aber auch zwischen humanen basophilen Granulozyten und Mastzellen.

Eine chemotaktische Wirkung von Chemokinen auf humane intestinale Mastzellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Berichte darüber konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Für murine Mastzellen ist allerdings eine chemotaktische Wirkung beschrieben worden (75). Mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden zur Reinigung und Kultur humaner intestinaler Mastzellen können aber in Zukunft Untersuchungen von chemotaktischen Vorgängen mittels spezieller Zellkultursysteme (z.B. Boyden-Kammer) durchgeführt werden.

Es steht zu vermuten, daß die fehlende Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen nach Inkubation mit Chemokinen darauf zurückzuführen ist, daß sie keine Chemokin-Rezeptoren exprimieren. Mit der Möglichkeit, reine humane Mastzellpräparationen zu erhalten, stehen diese nun weiteren Untersuchungen bezüglich der Expression von Chemokin-Rezeptoren zur Verfügung. In unserer Arbeitsgruppe konnte in vorläufigen Studien mittels RT-PCR nachgewiesen werden, daß humane intestinale Mastzellen keine Rezeptoren für CC-Chemokine, aber den Rezeptor CXCR4 exprimieren. An diesen Rezeptor bindet das CXC-Chemokin Stromal cell derived factor-1 (SDF-1), welches aber im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet wurde. Der Einfluß dieses Chemokins auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen soll in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

4.3 Zytokin-Produktion durch humane intestinale Mastzellen

TNF α ist ein multifunktionelles Zytokin, daß von einer Reihe von Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und auch Mastzellen gebildet werden kann (118-120). Es wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Monozyten und aktiviert Eosinophile, T-Lymphozyten und Mastzellen aus der Haut (118,121,122). Daneben führt TNF- α zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und zur Induktion verschiedener endothelialer Adhäsionsmoleküle (123). Auch wird TNF- α eine pathophysiologische Rolle bei

bestimmten gastrointestinalen Erkrankungen zugeschrieben (121,124), weshalb es als Zielmolekül für antiinflammatorische Substanzen dienen kann (125).

Es ist bekannt, daß Mastzellen in der Lage sind, TNF- α in ihren Granula zu speichern (120). Für humane Hautmastzellen und für Mastzellen aus Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, daß sie TNF- α nach Aktivierung freisetzen (12,13,120,126). Da sich humane Mastzellen von denen anderer Spezies sowie auch humane Mastzellen aus verschiedenen Geweben voneinander unterscheiden, konnten diese Ergebnisse nicht unbedingt auf humane intestinale Mastzellen übertragen werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß TNF- α in humaner gastrointestinaler Mukosa exprimiert wird, und daß dieses Zytokin verstärkt bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vorkommt (127-129). Auch Mastzellen sind unter diesen Bedingungen verstärkt in der intestinalen Mukosa vorhanden (40). Neben der Studie von Beil et al. (124), bei der elektronenmikroskopisch mit der Immunogold-Methode eine Immunreaktivität für TNF- α in humanen intestinalen Mastzellen festgestellt wurde, gibt es jedoch keine Untersuchungen zur Produktion von TNF- α durch humane intestinale Mastzellen. Bisher wurde die Produktion von TNF- α im humanen Gastrointestinaltrakt vor allem Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten, den "klassischen" Zytokinproduzierenden Zellen, zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte TNF- α in Zellüberständen und Zelllysaten sowohl quantitativ mittels ELISA als auch qualitativ mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß im ruhenden Zustand nur geringe Mengen TNF- α freigesetzt wurden, während nach Aktivierung der Mastzellen durch IgE-Rezeptor Quervernetzung mittels mAk 29C6 große Mengen an TNF- α sezerniert wurden. Obwohl bekannt ist, daß Mastzellen in ihren Granula TNF- α speichern können, konnte in den Zelllysaten der unstimulierten Mastzellen nur geringe Mengen an TNF- α nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe mittels immunhistochemischer Methoden gezeigt werden, daß sowohl Mastzellen von gesunden Kontrollpersonen als auch Mastzellen von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine positive Immunreaktion für TNF- α zeigen. Auch in gereinigten unstimulierten Mastzellen konnte immunocytochemisch TNF- α Protein nachgewiesen werden. Mittels RT-PCR konnte ebenfalls in

unstimulierten gereinigten Mastzellen mRNA für TNF- α nachgewiesen werden (Bischoff, S.C. *et al.*, "Mast cells are a potent source of TNF- α production in human intestinal tissue", zur Veröffentlichung eingereicht). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte darin liegen, daß der für den - käuflich erworbenen - ELISA verwendete Antikörper nur eine Form von TNF- α erkennt, die normalerweise in humanem Serum vorkommt. Da das von Zellen exprimierte TNF- α durch posttranslationale Veränderungen erst von einer membrangebundenen Vorstufe in die lösliche Form überführt wird und normalerweise im Serum als Homotrimer vorliegt (das Monomer ist biologisch nicht aktiv), ist zu vermuten, daß der für den ELISA verwendete Antikörper an das in den Mastzell-Granula gespeicherte TNF- α nicht so gut binden kann wie an sezerniertes TNF- α (130). Erst durch die Aktivierung der Mastzellen würde das TNF- α in die aktive Form übergehen und wäre dann durch den ELISA sowohl im Zellüberstand als auch in den Lysaten nachweisbar.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß nicht nur durch IgE-Rezeptor abhängige Stimulation der Mastzellen, sondern auch durch 6-stündige Inkubation mit einer Präparation aus intestinalen Bakterien oder mit LPS die TNF- α Freisetzung induziert werden kann. Die Menge an freigesetztem TNF- α (bezogen auf 1×10^6 Mastzellen) war nach Stimulation mit mAk 29C6 am stärksten, gefolgt von Stimulation durch Bakterien und - sehr viel schwächer - LPS. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß humane intestinale Mastzellen durch Bakterien aktiviert werden können. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen an Mäusen, in denen festgestellt wurde, daß Mastzell-defiziente Mäuse eine signifikant geringere Überlebenschance bei einer experimentell induzierten Peritonitis haben als normale Kontrolltiere, und daß diese Wirkung durch die fehlende TNF- α Produktion der Mastzellen hervorgerufen wird (77). In einer weiteren Untersuchung konnte gezeigt werden, daß isolierte Mastzellen aus Mäusen, die zuvor mit einem Maus-pathogenen Stamm von *Klebsiella pneumoniae* infiziert wurden, durch die Bakterien zur Freisetzung von TNF- α angeregt werden können (78). Darüber hinaus wurde berichtet, daß Mastzellen aus Ratten und Mäusen Bakterien phagozytieren und an T-Lymphozyten präsentieren können (131,132). Über eine Rolle von humanen Mastzellen als Antigen-präsentierende Zelle ist aber noch nichts bekannt.

Weitere in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen konnten die im ELISA erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch auf RNA-Ebene bestätigen. Es konnte mittels der "primer dropping"-Methode nachgewiesen werden, daß durch Stimulation der Zellen mit mAk 29C6, intestinalen Bakterien oder LPS ein Erhöhung der Menge an mRNA für TNF- α im Vergleich zu unstimulierten Zellen hervorgerufen wird (Bischoff, S.C. *et al.*, s.o.).

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß im Gegensatz zur Aktivierung der Mastzellen mit mAk 29C6, die Freisetzung von TNF- α und den Mastzell-Mediatoren Histamin und Sulfidoleukotriene induzierte, nach Stimulation mit intestinalen Bakterien und LPS zwar TNF- α , aber nur geringe Mengen an Histamin und keine Sulfidoleukotriene freigesetzt werden. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Freisetzung von Histamin bzw. Sulfidoleukotrienen und die Produktion von TNF- α unterschiedlich reguliert werden. Diese Annahme wird durch eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung an Maus-Mastzellen unterstützt, bei denen durch die Co-Stimulation über Fc ϵ RI und CD28 zwar eine Erhöhung der TNF- α Produktion, nicht aber der Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen beobachtet werden konnte (133). In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, daß die Produktion von IL-6 durch Rattenmastzellen nach Stimulation mit LPS nicht an die Freisetzung von Histamin gekoppelt ist (134). Die Vorstimulation der Mastzellen mit SCF, die zu einer Erhöhung der Histamin- und Sulfidoleukotrien-Freisetzung führte (81), hatte bei den hier durchgeführten Untersuchungen keinen Einfluß auf die Produktion von TNF- α (Bischoff, S.C. *et al.*, s.o.), was ebenfalls auf Unterschiede in der Regulation der Zytokinproduktion hinweist. Auch dieses Ergebnis unserer Arbeitsgruppe wird durch Ergebnisse an Rattenmastzellen bestätigt (135).

Über die Art der Aktivierung von Mastzellen durch Bakterien oder LPS ist noch nichts bekannt. Es kann aber vermutet werden, daß die Aktivierung unabhängig von spezifischem IgE auf der Oberfläche der Mastzellen ist, da nach der enzymatischen Präparation und der langen Kultur vor den Experimenten keine IgE-Moleküle mehr an die Fc ϵ RI-Rezeptoren gebunden sein sollten. Darüber hinaus ist bekannt, daß LPS bei Monozyten und Makrophagen die Produktion von TNF- α über die Bindung an CD14 hervorruft und damit einen wichtigen IgE-unabhängigen Stimulus darstellt (136). Daher sollte auch untersucht werden, ob humane intestinale Mastzellen CD14 exprimieren. Eigene unveröffentlichte durchflußzytometrische Ergebnisse ergaben,

daß isolierte gereinigte intestinale Mastzellen kein CD14 auf ihrer Oberfläche haben. Die Wirkung von LPS auf die TNF- α Produktion müßte also entweder über einen anderen, bisher unbekanntem Rezeptor vermittelt sein oder aber einen indirekten, evtl. zytotoxischen Effekt darstellen.

Bislang liegen noch keine statistisch gesicherten Daten darüber vor, ob die in der zur Stimulation verwendeten Bakteriensuspension vorhandenen Stämme *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* und *Stenotrophomonas maltophilia* unterschiedliche Wirkungen auf die Mediatorfreisetzungen haben oder ob sie sich evtl. gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken oder abschwächen. Erste Ergebnisse ergaben, daß *E. coli* eine stärkere Wirkung auf die Freisetzung von TNF- α und Histamin hat als die anderen beiden Stämme, allerdings ist die Wirkung von *E. coli* alleine nicht so stark wie die der Bakterienmischung. Zur Zeit werden Experimente durchgeführt, um die Wirkung der isolierten Bakterienstämme und vor allem entsprechender Referenzstämme auf die Mediatorfreisetzung zu untersuchen. Darüber hinaus kann durch Kultur von Mastzellen und Bakterien in zweikammerigen Kulturgefäßen, die durch eine bakteriendichte Membran getrennt sind, untersucht werden, ob lösliche, von den Bakterien sezernierte Faktoren die Aktivierung der Zellen hervorrufen können oder ob ein direkter Kontakt zwischen Mastzellen und Bakterien notwendig ist. Auch soll untersucht werden, ob Mastzellen in der Lage sind, Bakterien zu phagozytieren.

IL-5 ist ein Zytokin, das chemotaktisch und aktivierend auf eosinophile und basophile Granulozyten wirkt (137,138). Es wird von T-Lymphozyten gebildet, die dem Th2-Phänotyp entsprechen. Bei bestimmten intestinalen Erkrankungen wie der Zöliakie und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, nicht jedoch bei bakteriellen Infektionen, konnte eine vermehrte IL-5 Expression in der intestinalen Mukosa festgestellt werden (139-141). Bisherige Untersuchungen zeigten, daß in humaner intestinaler Mukosa IL-5 von T-Lymphozyten produziert wird (142). Kürzlich konnte aber nachgewiesen werden, daß auch Eosinophile unter bestimmten Bedingungen IL-5 produzieren und so ihre Funktion durch einen autokrinen Mechanismus regulieren können (139,143). Über die Produktion von IL-5 durch intestinale Mastzellen war bislang nichts bekannt. Es gibt aber Berichte, daß humane

Lungenmastzellen nach IgE-Rezeptor Quervernetzung IL-5 mRNA exprimieren (12,14).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß isolierte humane intestinale Mastzellen nach Stimulation durch IgE-Rezeptor Quervernetzung IL-5 in den Zellüberstand sezernieren. In unstimulierten Mastzellen konnte in der vorliegenden Arbeit nur bei einer von sieben Mastzellpräparationen eine geringe Freisetzung von IL-5 beobachtet werden, was möglicherweise auf eine ungewollte vorherige Aktivierung dieser Zellen *in vivo* hindeutet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei einigen der Patienten, von denen die verwendeten Präparate stammten, eine nicht bekannte Erkrankung vorliegt (z.B. Allergie, Entzündungsherde, etc.), die zu einer Aktivierung der Zellen *in vivo* führen würde. Bis jetzt sind keine nicht-immunologischen Stimuli bekannt, die bei isolierten intestinalen Mastzellen *in vitro* zu einer Freisetzung von IL-5 führen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten bestätigen immunhistochemische Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe, die nur bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) und intestinalen Allergien, nicht aber bei gesunden Kontrollpersonen, IL-5 positive Mastzellen in der intestinalen Mukosa nachweisen konnten (Lorentz, A. *et al.*, "Mast cells are a potent source of interleukin-5 in human intestinal mucosa", zur Veröffentlichung eingereicht). Auch mittels RT-PCR und RNase Protection Assay an isolierten gereinigten Mastzellen konnte festgestellt werden, daß die mRNA für IL-5 nicht konstitutiv, sondern erst nach Stimulation der Mastzellen durch IgE-Rezeptor Quervernetzung exprimiert wird. (Lorentz, A. *et al.*, s.o.). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Mastzellen nach Stimulation durch IgE-Rezeptor Quervernetzung eine weitaus größere Menge IL-5 pro Zelle freisetzen als isolierte, gereinigte eosinophile Granulozyten (ca. Faktor 13; Lorentz, A. *et al.*, s.o.) oder CD4-positive T-Lymphozyten (ca. Faktor 4,5; (142)). Allerdings muß berücksichtigt werden, daß *in vivo* die tatsächlich im Gewebe vorhandenen Menge an IL-5 abhängig ist von der Präsenz IL-5 - produzierender Zellen in den entsprechenden Geweben. So könnte z.B. durch eine hohen Prozentsatz an T-Lymphozyten in einem Gewebe eine größere Menge an IL-5 wirksam werden, obwohl diese pro Zelle weniger IL-5 sezernieren als z.B. Mastzellen. Auch das Vorhandensein einer Erkrankung, die zu einer Aktivierung IL-5 - produzierender Zellen führt, beeinflusst den IL-5 Spiegel in einem Gewebe.

Die in der vorliegenden Arbeit und in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten zeigen, daß aktivierte Mastzellen eine wichtige Quelle für IL-5 in der humanen intestinalen Mukosa sind. Durch das von ihnen produzierte IL-5 werden andere Entzündungszellen wie eosinophile Granulozyten angelockt und deren Proliferation und Aktivierung induziert. Somit hat das von Mastzellen produzierte IL-5 eine wichtige pathophysiologische Bedeutung für Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und intestinale Allergien.

4.4 Rolle der Mastzellen an der gastrointestinalen Barriere

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß humane intestinale Mastzellen nach IgE-Rezeptor Quervernetzung neben den klassischen Mastzellmediatoren wie Histamin und Sulfidoleukotrienen auch die Zytokine TNF- α und IL-5 freisetzen. Die durch diesen Mechanismus freigesetzten Mediatoren haben eine Fülle an biologischen Effekten, die allerdings nur nach entsprechender Stimulation der Zellen zum Tragen kommen würden. In Bezug auf die IgE-abhängige Stimulation würden also hauptsächlich im Falle einer intestinalen allergischen Reaktion Mastzellmediatoren freigesetzt, die durch ihr proinflammatorisches Potential die allergische Entzündung hervorrufen oder unterstützen. Intestinale allergische Reaktionen sind in neuere Zeit Gegenstand der Forschung und die Bedeutung der Mastzellen für die intestinale Allergie inzwischen allgemein akzeptiert (144,145).

Schon früh wurde gefunden, daß Mastzellen vermehrt im Rahmen bestimmter intestinaler Erkrankungen wie z.B. der Zöliakie und den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa vorkommen (40,61,146,147). Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß Mastzellen, die aus Gewebe von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen isoliert wurden, die Mediatorfreisetzung nach IgE-Rezeptor Quervernetzung erhöht ist (81). Über die Mechanismen, die im Falle solcher Erkrankungen die Mediatorfreisetzung auslösen, ist allerdings noch nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aber festgestellt werden, daß SCF, welches in seiner membranständigen, von Fibroblasten

exprimierten Form immer in der intestinalen Mukosa vorhanden ist, zu einer Mediatorfreisetzung aus intestinalen Mastzellen führen kann und somit einen IgE-unabhängigen Stimulus für Mastzellen darstellt. Weitere nicht-immunologische Stimuli wie Neuropeptide und Chemokine, die für Haut- und Lungenmastzellen beschrieben wurden (43), konnten für intestinale Mastzellen im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht gefunden werden.

Neben der proinflammatorischen, pathophysiologischen Wirkung der von den Mastzellen sezernierten Mediatoren haben diese aber auch regulative Effekte. So wird z.B. durch Histamin und Sulfidoleukotriene die Gewebsdurchblutung, die Mucus-Sekretion und die Kontraktion glatter Muskulatur gefördert. Da sie auch die Permeabilität von Epithelien erhöhen, kann das aber auch zu einem vermehrten Durchtritt von Antigenen führen. Besonders die von Mastzellen sezernierten Zytokine sind in der Lage, durch ihre vielfältigen Wirkungen sowohl immunregulatorisch auf andere Zellen zu wirken, als auch - im Falle von TNF- α - eine protektive Wirkung im Rahmen bakterieller Infektionen zu übernehmen (77,78,148). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Mastzellen nach Stimulation IL-5 sowie TNF- α freisetzen. Beide Zytokine wirken chemotaktisch und aktivierend auf andere Zellen des Immunsystems und kommen darüber hinaus auch bei bestimmten gastrointestinalen Erkrankungen vermehrt vor (118,121-124,137-141). Es konnte auch gezeigt werden, daß intestinale Mastzellen nach Inkubation mit einer Präparation aus intestinalen Bakterien sowohl Histamin als auch TNF- α freisetzen. Damit konnte zum ersten Mal ein Effekt von Bakterien auf intestinale Mastzellen festgestellt werden. Es ist somit möglich, daß humane intestinale Mastzellen an der Abwehr von bakteriellen Pathogenen in der Mukosa beteiligt sind.

In Abbildung 11 ist die Wirkung von Mastzellen und ihrer Mediatoren in der intestinalen Mukosa anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sowie aus der Literatur entnommener Daten abschließend schematisch dargestellt.

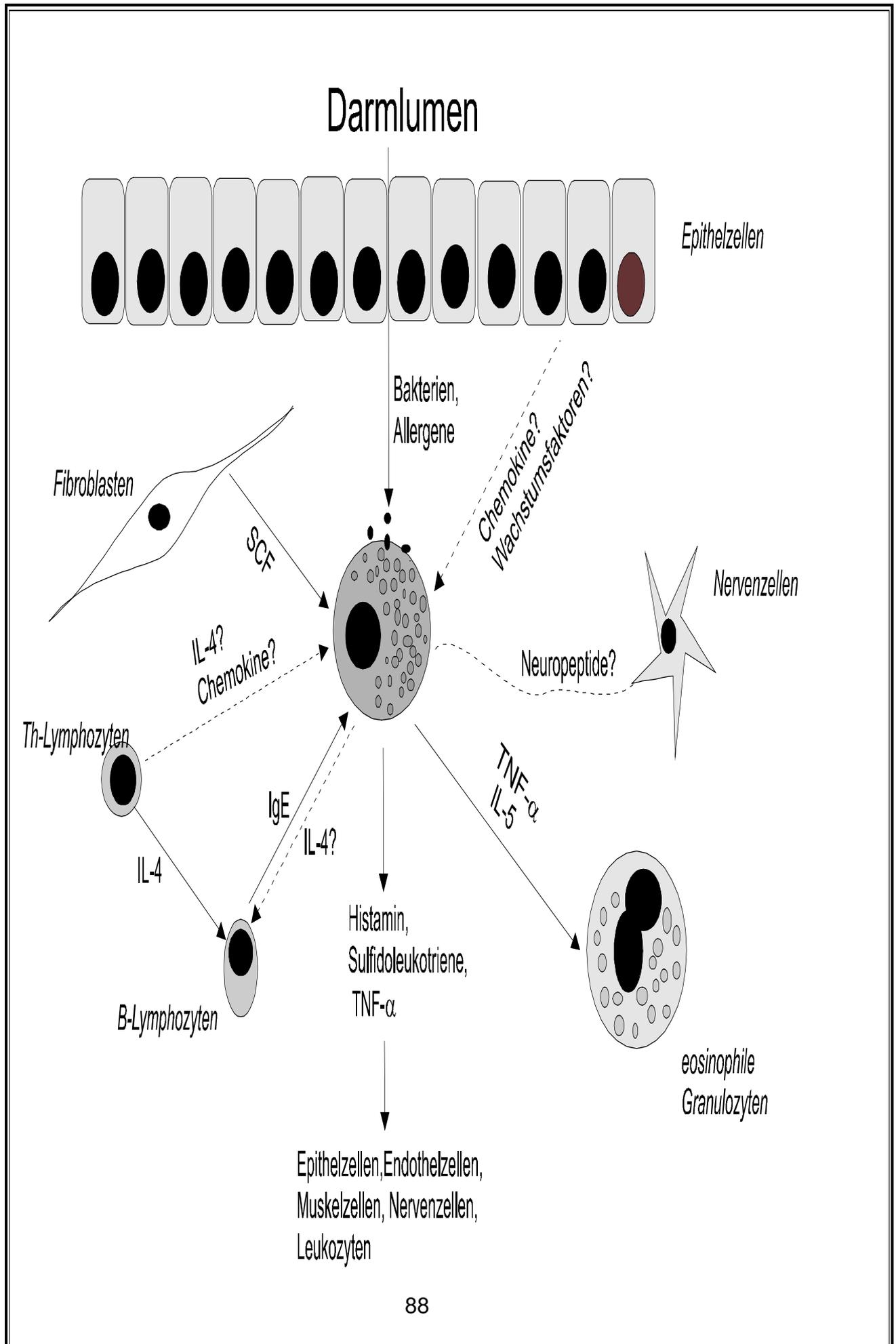


Abbildung 11: Wechselwirkungen von Mastzellen mit anderen Zellen der humanen gastrointestinalen Mukosa

Dargestellt sind die auf Mastzellen einwirkenden Faktoren sowie die möglichen Wirkungen der Mastzellmediatoren auf andere Zellen. Die gestrichelten Linien symbolisieren Interaktionen, die in der vorliegenden Arbeit für humane intestinale Mastzellen nicht untersucht oder bestätigt werden konnten, für die es aber Hinweise in der Literatur gibt. Die durchgezogenen Linien symbolisieren Funktionen von Mastzellen, die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Etablierung von Methoden zur Isolation, Anreicherung und Kultur humaner intestinaler Mastzellen
- 2) Einfluß von IgE-Rezeptor Quervernetzung sowie von IgE-unabhängigen Stimuli (Chemokine und Neuropeptide) und von Bakterien auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen
- 3) Produktion von Zytokinen durch humane intestinale Mastzellen

Die aus humaner Darmschleimhaut isolierten Mastzellen (Reinheit ca. 5 %) konnten sowohl mittels Magnetseparation als auch durch Langzeitkultur unter Zusatz von SCF bis zu 100 % angereichert werden. Eine Reinigung der Mastzellen durch Dichtegradientenzentrifugation, wie sie z.B. für Rattenmastzellen beschrieben wurde, führte dagegen nicht zu einer nennenswerten Anreicherung der Zellen.

In dem in dieser Arbeit etablierten Kultursystem konnte nachgewiesen werden, daß SCF nicht nur die Reifung von Mastzell-Vorläufern, sondern auch das Überleben und die Proliferation reifer, aus humanem Gewebe isolierten Mastzellen induziert. Interleukin-3 (IL-3), ein wichtiger Wachstumsfaktor für Mastzellen aus Ratten und Mäusen, hatte keinen Einfluß auf das Überleben oder die Proliferation der Mastzellen in unserem Kultursystem.

Auch die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotriene wurde durch SCF beeinflusst. Dabei verstärkte SCF nicht nur die durch IgE-Rezeptor Quervernetzung hervorgerufene Mediatorfreisetzung, sondern führte bei kultivierten Mastzellen selbst zu einer Mediatorfreisetzung. Damit konnte SCF als erstes Zytokin identifiziert werden, das die Mediatorfreisetzung aus humanen Mastzellen induziert..

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Neuropeptide, die die Freisetzung von Histamin aus humanen Haut- und Lungenmastzellen induzieren können, und Chemokine, die basophile Granulozyten aktivieren können, keinen Einfluß auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen haben. Nicht aktivierte intestinale Mastzellen exprimieren keine Rezeptoren für bestimmte Neuropeptide, die Tachykinine, allerdings konnte nach IgE-Rezeptor Quervernetzung einer der Rezeptoren, der NK-1 Rezeptor, sowohl durch RT-PCR als auch immunzytochemisch nachgewiesen werden.

Durch IgE-Rezeptor Quervernetzung konnten humane intestinale Mastzellen zur Produktion der Zytokine TNF- α und IL-5 angeregt werden, wodurch zum ersten Mal eine Zytokinproduktion durch humane intestinale Mastzellen nachgewiesen werden konnte. Auch bestimmte intestinale Bakterien sowie Lipopolysaccharid aus *E. coli* sind in der Lage, die TNF- α Produktion anzuregen, hatten aber nur einen geringen Einfluß auf die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen. Somit gehen wir von einer unterschiedlichen Regulation der Freisetzung dieser Mastzellmediatoren aus.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Benyon, R. C., M. A. Lowman, and M. K. Church.** 1987. Human skin mast cells: their dispersion, purification, and secretory characterization. *J. Immunol.* 138:861-867.
2. **Befus, D., N. Dyck, R. Goodarce, and J. Bienenstock.** 1987. Mast cells from the human intestinal lamina propria - isolation, histochemical subtypes, and functional characterization. *J. Immunol.* 138:2604-2610.
3. **Patella, V., I. Marinò, B. Lampärter, E. Arbustini, M. Adt, and G. Marone.** 1995. Human heart mast cells - Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J. Immunol.* 154:2855-2865.
4. **Massey, W. A., C.-B. Guo, A. M. Dvorak, W. C. Hubbard, B. S. Bhagavan, V. L. Cohan, J. A. Warner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein.** 1991. Human uterin mast cells: isolation, purification, characterization, ultrastructure, and pharmacology. *J. Immunol.* 147:1621-1627.
5. **Ehrlich, P.** 1878. *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung.* Promotionsschrift, Leipzig.
6. **Dvorak, A. M.** 1995. Ustrastructural analysis of human mast cells and basophils. In *Human basophils and mast cells: Biological aspects.* G. Marone, ed. Chem. Immunol., Karger, Basel, p. 2.
7. **Harvima, R. J. and L. B. Schwartz.** 1993. Mast cell-derived mediators. In *Immunopharmacology of mast cells and basophils.* J.C. Foreman, ed. Academic Press Ltd. London, p. 115.
8. **Bradding, P.** 1996. Human mast cell cytokines. *Clin. Exp. Allergy* 26:13-19.
9. **Gordon, J. R., P. R. Burd, and S. J. Galli.** 1990. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol. Today* 11:458-464.

10. **Okayama, Y., P. Bradding, J. M. Tunon-de-Lara, S. T. Holgate, and M. K. Church.** 1995. Cytokine production by human mast cells. In *Human basophils and mast cells: Biological aspects*. G. Marone, ed. Chem. Immunol., Karger, Basel, p. 114 ff.
11. **Okayama, Y., A. Semper, S. T. Holgate, and M. K. Church.** 1995. Multiple cytokine mRNA expression in human mast cells stimulated via Fc ϵ RI. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:158-159.
12. **Bradding, P., J. A. Roberts, K. M. Britten, S. Montefort, R. Djukanovic, R. Mueller, C. H. Heusser, P. H. Howarth, and S. T. Holgate.** 1994. Interleukins (IL)-4, -5, -6, and TNF- α in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10:471-480.
13. **Walsh, L. J., G. Trinchieri, H. A. Waldorf, D. Whitaker, and G. F. Murphy.** 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leucocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4220-4224.
14. **Okayama, Y., C. Petit-Frère, O. Kassel, A. Semper, D. Quint, M. J. Tunon-de-Lara, P. Bradding, S. T. Holgate, and M. K. Church.** 1995. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. *J. Immunol.* 155:1796-1808.
15. **Bradding, P., Y. Okayama, P. Howarth, M. K. Church, and S. T. Holgate.** 1995. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J. Immunol.* 155:297-307.
16. **Valent, P., E. Spanblöchl, W. R. Sperr, C. Sillaber, K. M. Zsebo, H. Agis, H. Strobl, K. Geissler, P. Bettelheim, and K. Lechner.** 1992. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/*kit*-ligand in long-term culture. *Blood* 80:2237-2245.

17. **Nilsson, G., K. Forsberg, M. P. Bodger, L. K. Ashman, K. M. Zsebo, A.-M. Irani, and L. B. Schwartz.** 1993. Phenotypic characterization of stem cell factor-dependent human fetal liver-derived mast cells. *Immunology* 79:325.-330.
18. **Kirshenbaum, A. S., J. P. Goff, S. W. Kessler, J. M. Mican, K. M. Zsebo, and D. D. Metcalfe.** 1992. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J. Immunol.* 148:772.-777.
19. **Irani, A.-M. A., G. Nilsson, U. Miettinen, S. S. Craig, L. K. Ashman, T. Ishizaka, K. M. Zsebo, and L. B. Schwartz.** 1992. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* 80:3009.-3021.
20. **Denburg, J. A.** 1995. Differentiation of human basophils and mast cells. In *Human basophils and mast cells: Biological aspects*. G. Marone, ed. Chem. Immunol, Karger, Basel, p. 49.
21. **Ishizaka, T., H. Mitsui, M. Yanagida, T. Miura, and A. M. Dvorak.** 1998. Development of human mast cells from their progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 5:937.-943.
22. **Kitamura, Y., T. Kasugai, N. Arizono, and H. Matsuda.** 1993. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am. J. Med. Sci.* 306:185.-191.
23. **Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667.-673.
24. **Valent, P.** 1994. The riddle of the mast cell: kit(CD 117)-ligand as the missing link? *Immunol. Today* 15:111.-114.
25. **Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori.** 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033.-1079.

26. **Valent, P., J. Besemer, C. Sillaber, J. H. Butterfield, R. Eher, O. Majdic, K. Kishi, W. Klepetko, F. Eckersberger, K. Lechner, and P. Bettelheim.** 1990. Failure to detect IL-3-binding sites on human mast cells. *J. Immunol.* 145:3432.-3437.
27. **Valent, P., O. Majdic, D. Maurer, M. Bodger, M. Muhm, and P. Bettelheim.** 1990. Further characterization of surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 91:198.-203.
28. **Valent, P.** 1994. The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 94:1177.-1183.
29. **Valent, P.** 1995. Immunophenotypic characterization of human basophils and mast cells. In *Human Basophils and mast cells: Biological aspects*. G. Marone, ed. Chem. Immunol., Karger, Basel, p. 34.
30. **Vandenbark, G. R., C. M. deCastro, H. Taylor, S. Dew-Knight, and R. E. Kaufman.** 1992. Cloning and structural analysis of the human *c-kit* gene. *Oncogene* 7:1259.-1266.
31. **Galli, S. J., K. M. Zsebo, and E. N. Geissler.** 1994. The kit ligand, stem cell factor. *Adv. Immunol.* 55:1.-96.
32. **Heinrich, M. C., D. C. Dooley, A. C. Freed, L. Band, M. Hoatlin, W. W. Keeble, S. T. Peters, K. V. Silvey, F. S. Ey, D. Kabat, R. T. Maziarz, and G. C. Bagby jr.** 1993. Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. *Blood* 82:771.-783.
33. **Enerbäck, L.** 1966. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Patho. Microbiol. Scand.* 66:289.-302.
34. **Marshall, J. S., G. P. Ford, and E. B. Bell.** 1987. Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis. *Br. J. Dermatol.* 117:29.-36.
35. **Irani, A.-M. A. and L. B. Schwartz.** 1994. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc.* 15:303.-308.

36. **Gibson, S. and H. R. P. Miller.** 1986. Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteinases. *Immunology* 58:101.-104.
37. **Craig, S. S. and L. B. Schwartz.** 1989. Tryptase and chymase, markers of distinct types of human mast cells. *Immunol. Res.* 8:130.-148.
38. **Weidner, N. and K. F. Austen.** 1990. Evidence for morphologic diversity of human mast cells - an ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab. Invest.* 63:63.-72.
39. **Church, M. K. and F. Levi-Schaffer.** 1997. The human mast cell. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:155.-160.
40. **Bischoff, S. C., J. Wedemeyer, A. Herrmann, P. N. Meier, C. Trautwein, Y. Cetin, H. Maschek, M. Stolte, M. Gebel, and M. P. Manns.** 1996. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 28:1.-13.
41. **Weidner, N. and K. F. Austen.** 1993. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. *Path. Res. Pract.* 189:156.-162.
42. **Füreder, W., H. Agis, H. Semper, F. Keil, U. Maier, M. R. Müller, K. Czerwenka, H. Höfler, K. Lechner, and P. Valent.** 1995. Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines. *Ann. Hematol.* 70:251.-258.
43. **Lowman, M. A., P. H. Rees, R. C. Benyon, and M. K. Church.** 1988. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81:590.-597.
44. **El-Lati, S. G., C. A. Dahinden, and M. K. Church.** 1994. Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J. Invest. Dermatol.* 102:803.-806.

45. **Scharenberg, A. M. and J. P. Kinet.** 1995. Early events in mast cell signal transduction. In *Human basophils and mast cells: Biological aspects*. G. Marone, ed. Chem. Immunol, Karger, Basel, p. 72.
46. **Riske, F. J., Hakimi, M. Mallamaci, M. Griffin, B. Pilson, N. Tobkes, P. Lin, W. Danho, J. Kochan, and R. Chizzonite.** 1991. High affinity human IgE receptor (Fc ϵ RI): analysis of functional domains of the α subunit with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 266:11245.
47. **Benyon, R. C., C. Robinson, and M. K. Church.** 1989. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 97:898.-904.
48. **Börsch, G.** 1984. Der Gastrointestinaltrakt als Immunorgan: Das Darmassoziierte Immunsystem. *Klin. Wochenschr.* 62:699.-709.
49. **Zeitz, M.** 1996. Der Darm als immunologisches Organ. *Gastro-Liga Report* 2:1-24.
50. **Neutra, M. R.** 1988. The gastrointestinal tract. In *Cell and tissue biology. A textbook of histology*. 6th ed. L. Weiss, ed. Urban&Schwarzenberg, Baltimore, p. 643
51. **Marsh, M. N.** 1989. The gut associated lymphoid tissue and immune system. In *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*. R. Whitehead, ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 142.
52. **Brandtzaeg, P., T. S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T. O. Rognum, H. Scott, and L. M. Sollid.** 1989. Immunobiology and Immunopathology of Human Gut Mucosa: Humoral Immunity and Intraepithelial Lymphocytes. *Gastroenterology* 97:1562.-1584.
53. **Hollander, D.** 1992. The Intestinal Permeability Barrier. *Scand. J. Gastroenterol.* 27:721.-726.
54. **Strobel, S. and A. M. Mowat.** 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol. Today* 19:173.-181.

55. **Walker, W. A.** 1986. Antigen Handling by the Small Intestine. *Clin. Gastroenterology* 15:1.-20.
56. **Neutra, M. R., A. Frey, and J.-P. Kraehenbuhl.** 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* 86:345.-348.
57. **Brandtzaeg, P., K. Bjerke, K. Kett, D. Kvale, T. O. Rognum, H. Scott, L. M. Sollid, and K. Valnes.** 1987. Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann. Allergy* 59:21.-39.
58. **Armbrust, T., D. Batusic, B. Ringe, and G. Ramadori.** 1997. Mast cell distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J. Hepatol.* 26:1042.-1054.
59. **Inoue, Y., T. E. King, S. S. Tinkle, K. Dockstader, and L. S. Newman.** 1996. Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders. *Am. J. Pathol.* 149:2037.-2054.
60. **Malone, D. G., A.-M. A. Irani, L. B. Schwartz, K. E. Barrett, and D. D. Metcalfe.** 1986. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum.* 29:956.-963.
61. **Fox, C. C., A. J. Lazenby, W. C. Moore, J. H. Yardley, T. M. Bayless, and L. M. Lichtenstein.** 1990. Enhancement of human intestinal mast cell mediator release in active ulcerative colitis. *Gastroenterology* 99:119.-124.
62. **King, T., W. Biddle, P. Bhatia, J. Moore, and P. B. Miner jr.** 1992. Colonic mucosal mast cell distribution at line of demarcation of active ulcerative colitis. *Dig. Dis Sci.* 37:490.-495.
63. **Gauchat, J.-F., S. Henchoz, G. Mazzei, J.-P. Aubry, T. Brunner, H. Blasey, P. Life, D. Talabot, L. Flores-Romo, J. Thompson, K. Kishi, J. Butterfield, C. Dahinden, and J.-Y. Bonnefoy.** 1993. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365:340.-343.

64. **Crowe, S. E., G. K. Luthra, and M. H. Perdue.** 1997. Mast cell mediated ion transport in intestine form patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 41:785.-792.
65. **Stack, W. A., S. J. Keely, D. P. O'Donoghue, and A. W. Baird.** 1995. Immune regulation of human colonic electrolyte transport in vitro. *Gut* 36:395.-400.
66. **Crowe, S. E. and M. H. Perdue.** 1993. Anti-immunoglobulin E-stimulated ion transport in human large and small intestine. *Gastroenterology* 105:764.-772.
67. **Stead, R. H., M. F. Dixon, N. H. Bramwell, R. H. Riddel, and J. Bienenstock.** 1989. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 97:575.-585.
68. **Frieling, T., C. Rupprecht, A. B. A. Kroese, and M. Schemann.** 1994. Effects of the inflammatory mediator prostaglandin D₂ on submucosal neurons and secretion in guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 266:G123.-G139.
69. **Frieling, T., H. J. Cooke, and J. D. Wood.** 1994. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk allergen. *Am. J. Physiol.* 267:G1087.-G1093.
70. **Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser.** 1997. Human chemokines: an update. *Ann. Rev Immunol.* 15:675.-705.
71. **Rollins, B. J.** 1997. Chemokines. *Blood* 90:909.-928.
72. **Weber, M. and C. A. Dahinden.** 1998. Basophil and eosinophil activation by CC chemokines. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:148.-150.
73. **Shimoyama, T. and J. E. Crabtree.** 1997. Mucosal chemokines in *Helicobacter pylori* infection. *J. Physiol. Pharmacol.* 48:315.-323.
74. **Bischoff, S. C. and C. A. Dahinden.** 1992. *c-kit* ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells. *J. Exp. Med.* 175:237.-244.

75. **Taub, D., J. Dastych, N. Inamura, J. Upton, D. Kelvin, D. Metcalfe, and J. Oppenheim.** 1995. Bone marrow-derived murine mast cells migrate, but do not degranulate, in response to chemokines. *J. Immunol.* 154:2393.-2402.
76. **Hartmann, K., F. Beiglböck, B. M. Czarnetzki, and T. Zuberbier.** 1995. Effect of CC chemokines on mediator release from human skin mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 108:224.-230.
77. **Echtenacher, B., D. Männel, and L. Hültner.** 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75.-77.
78. **Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham.** 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature* 381:77.-80.
79. **Reinke, M., U. Hoppe, T. Röder, H.-J. Bestmann, J. Mollenhauer, and K. Brune.** 1991. A monoclonal antibody against the sulfidopeptide leukotriens LTC₄, LTD₄ and LTE₄. *Biochim. Biophys. Acta* 1081:274.-278.
80. **Bischoff, S. C. and C. A. Dahinden.** 1992. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79:2662.-2669.
81. **Bischoff, S. C., S. Schwengberg, K. Wordelmann, A. Weimann, R. Raab, and M. P. Manns.** 1996. Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Gut* 38:104.-114.
82. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.-685.
83. **Takeda, Y., K. B. Chou, J. Takeda, B. S. Sachais, and J. E. Krause.** 1991. Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 179:1232.-1240.

84. **Larhammar, D., A. G. Blomqvist, F. Yee, E. Jazin, H. Yoo, and C. Wahlestedt.** 1992. Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. *J. Biol. Chem.* 267:10935.-10938.
85. **Krause, J. E., P. T. Staveteig, J. Nave Mentzer, S. K. Schmidt, J. B. Tucker, R. M. Brodbeck, J.-Y. Bu, and V. V. Karpitskiy.** 1997. Functional expression of a novel human neurokinin-3 receptor homolog that binds [³H]senktide and [¹²⁵I-MePhe⁷]neurokinin B, and is responsive to tachykinin peptide agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:310.-315.
86. **Okayama, Y., T. C. Hunt, O. Kassel, L. K. Ashman, and M. K. Church.** 1994. Assessment of the anti-c-kit monoclonal antibody YB5.B8 in affinity magnetic enrichment of human lung mast cells. *J. Immunol. Methods* 169:153.-161.
87. **Miltenyi, S., W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231.-238.
88. **Bischoff, S. C., S. Schwengberg, R. Raab, and M. P. Manns.** 1997. Functional properties of human intestinal mast cells cultured in a new culture system: enhancement of IgE receptor-dependent mediator release and response to stem cell factor. *J. Immunol.* 159:5560.-5567.
89. **Ansel, J. C., J. R. Brown, D. G. Payan, and M. A. Brown.** 1993. Substance P selectively activates TNF- α Gene Expression in murine mast cells. *J. Immunol.* 150:4478.-4485.
90. **Cocchiara, R., A. Bongiovanni, G. Albeggiani, A. Azzolina, N. Lampiasi, F. Di Blasi, and D. Geraci.** 1997. Inhibitory effect of neuraminidase on SP-induced histamine release and TNF- α mRNA in rat mast cells: evidence of a receptor-independent mechanism. *J. Neuroimmunol.* 75:9.-18.
91. **Kaneko, T., R. Shigemoto, S. Nakanishi, and N. Mizuno.** 1993. Substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat neostriatum are segregated into somatostatinergic and cholinergic aspiny neurons. *Brain Res.* 631:297.-303.

92. **Fox, C. C., A. M. Dvorak, S. P. Peters, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein.** 1985. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. *J. Immunol.* 135:483.-491.
93. **Rees, P. H., K. Hillier, and M. K. Church.** 1988. The secretory characteristics of mast cells isolated from the human large intestinal mucosa and muscle. *Immunology* 65:437.-442.
94. **Enerbäck, L. and I. Svensson.** 1980. Isolation of rat peritoneal mast cells by centrifugation on density gradients of percoll. *J. Immunol. Methods* 38:135.-145.
95. **Okayama, Y., R. C. Benyon, P. H. Rees, M. A. Lowman, K. Hillier, and M. K. Church.** 1992. Inhibition profiles of sodium cromoglycate and nedocromil sodium on mediator release from mast cells of human skin, lung, tonsil, adenoid and intestine. *Clin. Exp. Allergy* 22:401.-409.
96. **Levi-Schaffer, F., K. F. Austen, J. P. Caulfield, A. Hein, P. M. Gravallesse, and R. L. Stevens.** 1987. Co-culture of human lung-derived mast cells with mouse 3T3 fibroblasts: morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D₂, and leukotrienes. *J. Immunol.* 139:494.-500.
97. **Iemura, A., M. Tsai, A. Ando, B. K. Wershil, and S. J. Galli.** 1994. The *c-kit* Ligand, Stem Cell Factor, Promotes Mast Cell Survival by Suppressing Apoptosis. *Am. J. Pathol.* 144:321.-328.
98. **Taylor, A. M., S. J. Galli, and J. W. Coleman.** 1995. Stem-cell factor, the *kit* ligand, induces direct degranulation of rat peritoneal mast cells *in vitro* and *in vivo*: dependence of the *in vitro* effect on period of culture and comparisons of stem-cell factor with other mast cell-activating agents. *Immunology* 86:427.-433.
99. **Dvorak, A. M., R. S. McLeod, A. Onderdonk, R. A. Monahan-Earley, J. B. Cullen, D. A. Antonioli, E. Morgan, J. E. Blair, P. Estrella, R. L. Cisneros, W. Silen, and Z. Cohen.** 1992. Ultrastructural evidence for piecemeal and anaphylactic degranulation of human gut mucosal mast cells *in vivo*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99:74.-83.

100. **Columbo, M., E. M. Horowitz, L. M. Botana, D. W. MacGlashan jr., B. S. Bochner, S. Gillis, K. M. Zsebo, S. J. Galli, and L. M. Lichtenstein.** 1992. The Human recombinant *c-kit* receptor ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J. Immunol.* 149:599.-608.
101. **Sperr, W. R., K. Czerwenka, G. Mundigler, M. R. Müller, H. Semper, G. Klappacher, H. D. Glogar, K. Lechner, and P. Valent.** 1993. Specific activation of human mast cells by the ligand for *c-kit*: comparison between lung, uterus and heart mast cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102:170.-175.
102. **Shimizu, Y., L. K. Ashman, Z. Du, and L. B. Schwartz.** 1996. Internalization of kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells. *J. Immunol.* 156:3443.-3449.
103. **Nilsson, G., U. Miettinen, T. Ishizaka, L. K. Ashman, A.-M. A. Irani, and L. B. Schwartz.** 1994. Interleukin-4 inhibits the expression of *kit* and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood* 84:1519.-1527.
104. **Sillaber, C., H. Strobl, D. Bevec, L. K. Ashman, J. H. Butterfield, K. Lechner, D. Maurer, P. Bettelheim, and P. Valent.** 1991. IL-4 regulates *c-kit* proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J. Immunol.* 147:4224.-4228.
105. **Church, M. K., M. A. Lowman, C. Robinson, S. T. Holgate, and R. C. Benyon.** 1989. Interactions of neuropeptides with human mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 88:70.-78.
106. **Church, M. K., S. El-Lati, and J. P. Caulfield.** 1991. Neuropeptide-induced secretion from human skin mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94:310.-318.
107. **Heaney, L. G., L. J. M. Cross, C. F. Stanford, and M. Ennis.** 1995. Substance P induces histamine release from human pulmonary mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 25:179.-186.

108. **Emadi-Khiav, B., M. Mousli, C. Bronner, and Y. Landry.** 1995. Human and rat cutaneous mast cells: involvement of a G protein in the response to peptidergic stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 272:97.-102.
109. **Harrison, N. K., K. E. Dawes, O. J. Kwon, P. J. Barnes, G. J. Laurent, and F. K. Chung.** 1996. Effects of neuropeptides on human lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am. J. Physiol.* 268:L278.-L283.
110. **Pringent-Delecourt, L., B. Coffin, J. F. Colombel, J. P. Dehennin, J. P. Vaerman, and J. C. Rambaud.** 1995. Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the colonic mucosa: an *in vivo* study in man. *Clin. Exp. Immunol.* 99:221.-225.
111. **McKay, D. M., M. C. Berin, J. D. Fondacaro, and M. H. Perdue.** 1996. Effects of neuropeptide Y and substance P on antigen-induced ion secretion in rat jejunum. *Am. J. Physiol.* 271:G987.-G992.
112. **Holzer, P. and U. Holzer-Petsche.** 1997. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 73:219.-263.
113. **Lördal, M., A. Hallgren, O. Nylander, and P. M. Hellström.** 1996. Tachykinins increase vascular permeability in the gastrointestinal tract of the rat. *Acta Physiol. Scand.* 156:489.-494.
114. **Frieling, T., K. Becker, C. Rupprecht, G. Dobрева, D. Häussinger, and M. Schemann.** 1997. Leukotriene-evoked cyclic chloride secretion is mediated by enteric neuronal modulation in guinea-pig colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355:625.-630.
115. **Holzer, P. and U. Holzer-Petsche.** 1997. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol. Ther.* 73:173.-217.
116. **Alam, R., P. A. Forsythe, S. Stafford, M. A. Lett-Brown, and J. A. Grant.** 1992. Macrophage inflammatory protein-1 α activates basophils and mast cells. *J. Exp. Med.* 176:781.-786.

117. **Alam, R., D. Kumar, D. Anderson-Walters, and P. A. Forsythe.** 1994. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and monocyte chemoattractant peptide-1 elicit immediate and late cutaneous reactions and activate murine mast cells in vivo. *J. Immunol.* 152:1298.-1303.
118. **Bazzoni, F. and B. Beutler.** 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor family. *N. Engl. J. Med.* 334:1717.-1725.
119. **Costa, J. J., K. Matossian, and M. B. Resnick.** 1993. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor- α and macrophage inflammatory protein-1 α . *J. Clin. Invest.* 91:2673.-2684.
120. **Gordon, J. R. and S. J. Galli.** 1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346:274.-276.
121. **van Deventer, S. J. H.** 1997. Tumor necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 40:443.-448.
122. **van Overfeld, F. J., P. G. Jorens, M. Rampart, W. de Backer, and P. A. Vermeire.** 1991. Tumor necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. *Clin. Exp. Allergy* 21:711.-714.
123. **Paleolog, E. M., S. A. Delsalle, W. A. Buurman, and M. Feldman.** 1994. Functional activities of tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood* 84:2578.-2590.
124. **Beil, W., P. F. Weller, M. A. Peppercorn, S. J. Galli, and A. M. Dvorak.** 1995. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF- α in colonic Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* 58:284.-289.
125. **Bissonnette, E. Y., J. A. Enciso, and D. Befus.** 1995. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) release from mast cells by the anti-inflammatory drugs, sodium cromoglycate and nedocromil sodium. *Clin. Exp. Immunol.* 102:78.-84.
126. **Bradding, P., R. Mediwake, I. C. H. Feather, J. Madden, M. K. Church, S. T. Holgate, and P. H. Howarth.** 1995. TNF-alpha is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 25:406.-415.

127. **Braegger, C. P., S. Nicholls, S. H. Murch, S. Stephens, and T. T. MacDonald.** 1992. Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339:89.-91.
128. **Breese, E. J., C. A. Michie, W. Nichols, S. H. Murch, C. B. Williams, P. Domizio, J. A. Walker-Smith, and T. T. MacDonald.** 1994. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106:1455.-1466.
129. **Reinecker, H. C., M. Steffen, T. Witthoef, I. Pflueger, S. Scriber, R. P. MacDermott, and A. Raedler.** 1993. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 94:174.-181.
130. **Robache-Gallea, S., V. Morand, J. M. Bruneau, B. Schoot, E. Tagat, E. Réalo, S. Chouaib, and S. Roman-Roman.** 1995. *In vitro* processing of human tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 270:23688.-23692.
131. **Malaviya, R., N. J. Twesten, E. A. Ross, S. N. Abraham, and J. D. Pfeifer.** 1996. Mast cells process bacterial antigens through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J. Immunol.* 156:1490.-1496.
132. **Fox, C. C., S. D. Jewell, and C. C. Whitcare.** 1994. Rat peritoneal mast cells present antigen to a PPD-specific T cell line. *Cell. Immunol.* 158:253.-264.
133. **Tashiro, M., Y. Kawakami, R. Abe, W. Han, D. Hata, K. Sugie, L. Yao, and T. Kawakami.** 1997. Increased secretion of TNF- α by costimulation of mast cells via CD28 and FC ϵ RI. *J. Immunol.* 158:2382.-2389.
134. **Leal-Berumen, I., P. Conlon, and J. S. Marshall.** 1994. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 152:5468.-5476.
135. **Lin, T. J., E. Y. Bissonnette, A. Hirsh, and D. Befus.** 1996. Stem cell factor potentiates histamine secretion by multiple mechanisms, but does not affect tumour necrosis factor- α release from rat mast cells. *Immunology* 89:301.-307.

136. **Mattson, E., H. Van Dijk, K. Van Kessel, J. Verhoef, A. Fleer, and J. Rollof.** 1996. Intracellular pathways involved in tumor necrosis factor- α release by human monocytes on stimulation with lipopolysaccharide or staphylococcal peptidoglycan are partly similar. *J. Infect. Dis.* 173:212.-218.
137. **Bischoff, S. C., T. Brunner, A. L. de Weck, and C. A. Dahinden.** 1990. Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *J. Exp. Med.* 172:1577.-1582.
138. **Takafuji, S., S. C. Bischoff, A. L. de Weck, and C. A. Dahinden.** 1991. IL-3 and IL-5 prime normal human eosinophils to produce leukotriene C4 in response to soluble agonists. *J. Immunol.* 147:3855.-3861.
139. **Desreumaux, P., F. Bloget, D. Seguy, M. Capron, A. Cortot, J. F. Colombel, and A. Janin.** 1996. Interleukin 3, granulocyte-macrophage colony-stimulation factor and interleukin-5 in eosinophilic gastroenteritis. *Gastroenterology* 110:768-774.
140. **Desreumaux, P., A. Janin, J. F. Colombel, L. Prin, J. Plumas, D. Emilie, G. Torpier, A. Capron, and M. Capron.** 1993. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* 175:293.-296.
141. **Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg.** 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879.-2883.
142. **Fuss, I. J., M. Neurath, M. Boirivant, J. S. Klein, C. de la Motte, S. A. Strong, C. Fiocchi, and W. Strober.** 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157:1261.-1270.
143. **Rothenberg, M. E.** 1998. Eosinophilia. *J. Exp. Med.* 338:1592.-1600.
144. **Crowe, S. E. and M. H. Perdue.** 1992. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms for pathophysiology. *Gastroenterology* 103:1075.-1095.

145. **Bischoff, S. C.** 1996. Mucosal allergy: role of mast cells and eosinophil granulocytes in the gut. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 10:443.-459.
146. **Strobel, S., A. Busuttil, and A. Ferguson.** 1983. Human intestinal mucosal mast cells: expanded population in untreated coeliac disease. *Gut* 24:222.-227.
147. **Fox, C. C., L. M. Lichtenstein, and J. K. Roche.** 1993. Intestinal mast cell response in idiopathic inflammatory bowel disease - histamine release from human intestinal mast cells in response to gut epithelial proteins. *Dig.Dis.Sci.* 38:1105-1112.
148. **Galli, S. J. and B. K. Wershil.** 1996. The two faces of the mast cell. *Nature* 381:21.-22.

7 PUBLIKATIONSLISTE

1) Bischoff, S.C., S. Schwengberg, K. Wordelmann, A. Weimann, R. Raab, and M.P. Manns. 1996. Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Gut* 38:104.

2) Falkenberg, F.W., H. Hildebrand, L. Lutte, S. Schwengberg, B. Henke, D. Greshake, B. Schmidt, A. Friedrich, M. Rinke, G. Schlüter, and E. Bomhard. 1996. Urinary antigens as markers of papillary toxicity: I. Identification and characterization of rat kidney papillary antigens with monoclonal antibodies. *Arch. Toxicol.* 71:80

3) Bischoff, S.C., S. Schwengberg, R. Raab, and M.P. Manns. 1997. Functional properties of human intestinal mast cells cultured in a new culture system: enhancement of IgE receptor -dependent mediator release and response to stem cell factor. *J. Immunol.* 159:5560.

4) Bischoff, S.C., A. Lorentz, S. Schwengberg, G. Weier, R. Raab, and M P. Manns. 1998. Mast cells are a potent source of tumor necrosis factor α production in human intestinal tissue. Zur Veröffentlichung eingereicht.

5) Schwengberg, S., A. Lorentz, M. Schemann, H. Sann, M.P. Manns, and S.C. Bischoff. 1998. Neuropeptides fail to induce mediator release from human intestinal mast cells. Zur Veröffentlichung eingereicht.

6) Lorentz, A., S. Schwengberg, C. Mierke, M.P. Manns, and S.C. Bischoff. 1998. Activated mast cells are a potent source of interleukin 5 in human intestinal mucosa. Zur Veröffentlichung eingereicht.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ach	Acetylcholin
APES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
bp	Basenpaare
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
EDTA	Ethylendiaminteraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Eo	eosinophiler Granulozyt
FCS	fetal calf serum
Glu	Natrium-Glutamat
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony stimulation factor
GRP	Gastrin releasing peptide
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
Ly	Lymphozyt
MACS	Magnetic-beads activated cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Mastzelle
MCP-1, -2, -3	Monocyte chemoattractant protein 1, -2, -3
MIP 1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MW	1) Mittelwert, 2) Molekulargewicht
NK-A, -B	Neurokinin A, -B
NP-Y	Neuropeptid Y
PBS	Phosphat buffered saline
RANTES	"Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted"
rhu	rekombinantes humanes
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Rockwell-Parker Memorial Institut Medium Nr. 1640
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	sodium-dodecyl-sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	syn. für denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
sLT	Sulfidoleukotriene
SP	Substanz P
ST	Somatostatin
TBST	Tris bufferd saline with Tween
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoactives intestinales Peptid

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet habe.

Die verwendeten Hilfsmittel sowie die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen sind vollständig angegeben.

Hornbostel, im September 1998

Silke Schwengberg, Dipl. Biol.

10 DANKSAGUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Betreuung von Prof. Dr. M.P.Manns durchgeführt und im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 280 "Gastrointestinale Barriere", Teilprojekt C8 (Projektleiter: Dr. med. S.C. Bischoff), gefördert.

Herrn Prof. Dr. M.P. Manns danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Resch danke ich für die Übernahme des Koreferates

Herrn Dr. med. S.C. Bischoff danke ich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Anleitung und die vielen anregenden Diskussionen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Kathrin Scheiwe, Frau Gisela Weier, Frau Anita Schmeil und Frau Nicole Abraham danke ich für die ausgezeichnete technische Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die vielfältigen Anregungen und Hilfestellungen während der letzten Jahre bedanken. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Axel Lorentz, Herrn Gernot Sellge, Frau Julika Mayer und Herrn Kinan Rifai.

Den Mitgliedern der Abteilung Abdominal- und Transplantationschirurgie danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben und die gute Zusammenarbeit, Frau Dr. Susanne Häußler und Herrn Dr. Ivo Steinmetz für die Charakterisierung der Bakterien, und Herrn Prof. Dr. M. Schemann und Dr. H. Sann für die Hilfe bei der Planung der Neuropeptid-Experimente und die Bereitstellung des NK-1 Antikörpers.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Herrn Dr. Bernd Denecke, die mich in vielerlei Hinsicht während der letzten Jahre geduldig unterstützt haben.

11 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Silke Schwengberg
Geburtsdatum: 26.09.1967
Geburtsort: Lünen/Westf.
Derzeitige Adresse: Dorfstr. 35
29323 Wietze/Hornbostel

Schulbesuch

August 1973 -Juni 1978 Osterfeld-Grundschule, Lünen
August 1978 - Mai 1986 Helene-Lange-Gymnasium, Dortmund
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1986 Beginn des Biologie-Studiums an der Ruhr-Universität Bochum
August/September 1991 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie und Immunologie
Oktober 1991 - Oktober 1992: Durchführung der Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. F.W. Falkenberg

Wissenschaftliche Tätigkeit

November 1992 - April 1993 Arbeit als wiss. Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum
Oktober 1993 - Juli 1998 Arbeiten zur Dissertation in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. M.P. Manns) in der Arbeitgruppe von Dr. S.C. Bischoff