

*Interaktion von Mastzellen und  
Natürlichen Killerzellen*

Von der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von  
Dipl.-Biol. Katja Wüllner geb. Voßkuhl

geboren am 04. März 1981 in Goslar

2010

---

Referent: Prof. Dr. med. Hans Heinrich (Heiner) Wedemeyer

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo

Tag der Promotion: 24.01.2011

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
1.1	ZUSAMMENFASSUNG .....	1
1.2	ABSTRACT .....	2
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1	MASTZELLEN .....	3
2.1.1	<i>Morphologie, Phänotyp und Differenzierung von Mastzellen.....</i>	<i>3</i>
2.1.2	<i>Mastzellmediatoren und ihre Wirkung .....</i>	<i>4</i>
2.1.3	<i>Das Modell der „Mastzell-Knock-in Mäuse“ .....</i>	<i>6</i>
2.1.4	<i>Mastzellen im Kontext erworbener Immunität .....</i>	<i>7</i>
2.1.5	<i>Mastzellen im Zusammenhang mit angeborener Immunität.....</i>	<i>9</i>
2.1.6	<i>Mastzellen im Zusammenhang mit Tumorentstehung .....</i>	<i>10</i>
2.2	NATÜRLICHE KILLERZELLEN (NK-ZELLEN).....	11
2.2.1	<i>NK-Zell-Effektor Funktionen.....</i>	<i>11</i>
2.2.2	<i>Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren.....</i>	<i>13</i>
2.3	DIE INTERAKTION VON MASTZELLEN MIT NK-ZELLEN .....	14
2.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
3.1	MAUSSTÄMME, ZELLINIEN UND MATERIALIEN .....	17
3.1.1	<i>Mausstämme.....</i>	<i>17</i>
3.1.2	<i>Zelllinien .....</i>	<i>17</i>
3.1.3	<i>Materialien.....</i>	<i>18</i>
3.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	22
3.2.1	<i>Präparation von BMCMCs .....</i>	<i>22</i>
3.2.2	<i>Präparation von natürlichen Killerzellen .....</i>	<i>23</i>
3.2.3	<i>Kokultur von BMCMCs und natürlichen Killerzellen .....</i>	<i>24</i>
3.3	IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	24
3.3.1	<i>ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) .....</i>	<i>24</i>
3.3.2	<i>FACS (Fluorescence-activated cell sorting)-Analyse .....</i>	<i>25</i>
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	25
3.4.1	<i>rtPCR OX40 .....</i>	<i>25</i>
3.4.2	<i>Retrovirale Transduktion von RMA/S Zellen zur stabilen Expression von transgenem GFP .....</i>	<i>26</i>
3.5	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....	27
3.5.1	<i>LPS in vivo Experiment.....</i>	<i>27</i>
3.5.2	<i>RMA/S-GFP Experiment in vivo .....</i>	<i>28</i>
3.6	SONSTIGE METHODEN .....	28
3.6.1	<i>Zytotoxizitäts Nachweisverfahren .....</i>	<i>28</i>
3.6.2	<i><math>\beta</math>-Hexosaminidase-Nachweisverfahren.....</i>	<i>29</i>
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	29
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
4.1	FUNKTION UND PHÄNOTYP DIFFERENZIERTER MASTZELLEN.....	30
4.2	POTENTIELLE INTERAKTION VON MASTZELLEN UND NK-ZELLEN .....	32
4.3	EINFLUSS VON TNF- $\alpha$ AUF DIE MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION .....	41
4.4	EINFLUSS WEITERER STIMULATOREN AUF DIE MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION.....	42
4.5	TYPUS DER INTERAKTION VON MASTZELLEN UND NK-ZELLEN .....	44
4.6	MÖGLICHE INTERAKTIONSPARTNER FÜR DIE MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION.....	45
4.7	EINFLUSS DER MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT DER NK-ZELLEN.....	49
4.8	EINFLUSS VON MASTZELLEN AUF NK-ZELLEN NACH IN VIVO LPS INJEKTION.....	51
4.9	MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION NACH IN VIVO INJEKTION VON RMA/S ZELLEN.....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
5.1	EINFLUSS LPS-AKTIVIERTER MASTZELLEN AUF NK-ZELLEN .....	55
5.2	EINFLUSS DER MASTZELL-NK-ZELL INTERAKTION AUF RMA/S TUMORZELLEN.....	59
5.3	AUSBLICK.....	59

---

<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>75</b>
7.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	75
7.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	78
7.3	LEBENS LAUF.....	79
7.4	PUBLIKATIONEN .....	80
7.5	DANKSAGUNG .....	81
7.6	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION .....	82

---

# 1 Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Mastzellen spielen eine essentielle Rolle als Effektorzellen in der IgE-assoziierten Immunantwort und in der angeborenen Immunität. Es konnte bereits ein direkter Einfluss von Mastzellen auf T-Zellen und dendritische Zellen (DCs) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Interaktion von Mastzellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) *in vitro* und *in vivo* analysiert.

In einer Kokultur mit Mastzellen führte eine Stimulation mit den Toll-like-Rezeptor (TLR)-Liganden Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinic-polycytidylic-acid (Poly I:C) und CpG zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen. So induzierten LPS-aktivierte Mastzellen eine ~20-fach erhöhte Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen ohne Mastzellen. Für diese gesteigerte Produktion und Sekretion von IFN- $\gamma$  ist ein direkter Zellkontakt zwischen Mastzellen und NK-Zellen nötig. Anhand blockierender Antikörper und TNF- $\alpha$ -defizienter Mastzellen konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion TNF- $\alpha$ -unabhängig ist. Mit Hilfe weiterer blockierender Antikörper wurde nach möglichen Interaktionswegen gesucht. Es konnte eine Reduktion der IFN- $\gamma$  Freisetzung nach Blockierung von OX40L auf Mastzellen detektiert werden. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen konnte durch Mastzellen jedoch nicht beeinflusst werden. Die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen wurde *in vivo* mittels i.p. LPS Injektion überprüft. Die Applikation von LPS führte zu einer signifikanten Akkumulation von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen der Milz von Wildtyp (WT)-Mäusen im Vergleich zu NK-Zellen aus Mastzell-defizienten (Wsh)-Mäusen. Zur Analyse einer möglichen Rolle der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen in der Tumorummunologie wurden die Auswirkungen einer Mastzelldefizienz nach Injektion von Tumorzellen analysiert. Hierzu wurde WT- und Wsh-Mäusen GFP-positive MHC-I-negative RMA/S Tumorzellen i.p. injiziert. Eine Analyse der NK-Zellen aus dem Peritoneum, der Milz und Lymphknoten ergab einen signifikanten Anstieg an NK-Zellen im Peritoneum in Wsh- im Vergleich zu WT-Mäusen. Des Weiteren konnte ein Anstieg an intrazellulärem Granzym B in NK-Zellen im Peritoneum Wsh- im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet werden, was für eine gesteigerte zytotoxische Aktivität der NK-Zellen spricht.

Somit kann die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen sowohl aktivierend als auch inhibierend auf NK-Zellen wirken. Im Kontext einer Stimulation mit LPS bewirkt die Mastzell-NK-Zell Interaktion eine vermehrte Aktivierung der NK-Zellen, während in dem hier untersuchten Tumormodell nach Applikation von Tumorzellen ein inhibierender Effekt beobachtet wurde.

## 1.2 Abstract

Mast cells play an essential role as effector-cells in IgE-associated and in innate immune responses. Recent studies reported a direct influence of mast cells on T-cells and dendritic cells. This work analysed a possible interaction of mast cells and NK-cells *in vitro* and *in vivo*.

Stimulation with TLR-ligands LPS, Poly I:C or CpG evoked a significant increase in IFN- $\gamma$  release from NK-cells after coculture with mast cells. LPS-activated mast cells induced a ~20-fold increase in IFN- $\gamma$  release from NK-cells in comparison to NK-cells cultured without mast cells. This enhancement in production and secretion of IFN- $\gamma$  required cell-cell contact between mast cells and NK-cells. On the basis of blocking antibodies and TNF<sup>-/-</sup>-mast cells it was shown that the interaction is independent of TNF- $\alpha$ . The way of interaction was further analysed by blocking antibodies. A decreased amount of secreted IFN- $\gamma$  was detected after blocking of OX40L on mast cells. The cytotoxicity of NK-cells was not influenced by mast cells. The interaction of mast cells and NK-cells was determined *in vivo* by i.p. injection of LPS. The application of LPS significantly increased the intracellular IFN- $\gamma$  in splenic NK-cells in wildtype (WT)-mice in comparison to NK-cells from mast-cell-deficient (Wsh)-mice. The effect of mast cell deficiency after tumour cell injection was investigated to analyse a possible role of the mast-cell-NK-cell-interaction in context of tumour immunology. For this purpose we injected GFP-positive MHC-I-negative RMA/S tumour cells i.p. into WT- and Wsh-mice. The analysis of NK-cells from peritoneum, spleen and lymph nodes showed a significant increase of NK-cells in the peritoneum of Wsh- in comparison to WT-mice. Additionally an increase of intracellular Granzyme B was detected in peritoneal NK-cells of Wsh- in comparison to WT-mice.

These data show that the interaction of mast cells and NK-cells can have activating as well as inhibiting effects. Stimulation with LPS results in activation of NK-cells while application of tumour cells has an inhibiting effect on NK-cell functions.

Schlagworte: Mastzelle, Natürliche Killerzelle, Lipopolysaccharid

Key Words: Mast cell, natural killer cell, lipopolysaccharide

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Mastzellen

Mastzellen sind gewebeständige Effektorzellen hämatopoetischer Abstammung, denen eine besondere Bedeutung in der allergischen Entzündung, der Parasitenabwehr, der angeborenen und der erworbenen Immunität zukommt (1-3). Sie zeichnen sich besonders durch in Granula gespeicherte Mediatoren aus, die sie sofort freisetzen können. Mastzellen residieren vor allem im Bindegewebe an epithelialen Grenzflächen, wie der Haut, dem Gastrointestinaltrakt oder der Lunge. Hier treten Mastzellen als eine der ersten Zellen mit Antigenen in Kontakt. Zusätzlich können sie aufgrund ihrer Ansammlung in der Nähe von Blutgefäßen die Blutgefäßdurchlässigkeit regulieren und andere Effektorzellen anlocken (1;4).

#### *2.1.1 Morphologie, Phänotyp und Differenzierung von Mastzellen*

Mastzellen wurden zuerst von Paul Ehrlich im Jahr 1878 beschrieben. Dieser bezeichnete die entdeckten Zellen fälschlicherweise als Mastzellen, da er annahm, dass sie die in ihnen enthaltenen Granula aufnehmen (5).

Mastzellen haben einen Durchmesser von bis zu 20 µm und enthalten einen großen Vorrat an zytoplasmatischen Granula, die eine spezifische Färbung von Mastzellen mit basischen Farbstoffen, etwa Methylenblau und Brillantkresylblau, ermöglichen. Diese metachromatische Färbung der Granula wird durch schwefelhaltige Proteoglykane, wie z.B. Chondroitinsulfat, ermöglicht (6). Durch diese spezifischen Eigenschaften sowie die einzigartige Kombination der Expression von c-kit (CD177) und dem Fcε-Rezeptor I (FcεRI) auf der Zelloberfläche lassen sich Mastzellen eindeutig identifizieren. Außerdem exprimieren sie, u.a. abhängig von ihrer Lokalisation, dem Stand der Differenzierung bzw. der Art der Aktivierung, zahlreiche weitere Moleküle auf ihrer Oberfläche.

Mastzellen differenzieren aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen. Mastzell-Vorläufer zirkulieren im Blut und wandern in verschiedene Gewebe ein, wo sie abhängig vom *Stem Cell Factor* (SCF) ausreifen. Der von Fibroblasten sezernierte SCF bindet an c-kit (CD177), Mitglied der Rezeptor Tyrosin Kinase III Familie, auf Mastzellen (6-8). Für das Überleben und die Differenzierung ist IL-3, welches an den IL-3 Rezeptor auf Mastzellen bindet,

---

essentiell. Des Weiteren spielen das T<sub>H</sub>-2-assoziierte Zytokin IL-4 und IL-9 eine kritische Rolle (7;9;10).

Mastzellen können sehr langlebig sein und unter bestimmten Bedingungen auch im reifen Zustand proliferieren. Aufgrund der verschiedenen Einflüsse auf Mastzellen in den unterschiedlichen Geweben oder zu verschiedenen Zeiten der Reifung, bedingt durch die variable Expression von Oberflächenmolekülen, kommt es zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen, auch zwischen den Spezies. So kann es zur Expansion der Anzahl an Mastzellen, einer Veränderung der Verteilung innerhalb eines Gewebes oder phänotypischen Veränderungen als Antwort auf eine Infektion (z.B. mit Helminthen (Darmwürmern)) kommen (9-11). Bei diesem Phänomen spricht man von der sogenannten Mastzell Heterogenität (9;12;13).

### ***2.1.2 Mastzellmediatoren und ihre Wirkung***

Bei den bereits in den Granula vorliegenden Mediatoren, die eine schnelle und unmittelbare Freisetzung durch eine Aktivierung ermöglichen, handelt es sich um Histamin, Proteoglycane wie Heparin und Chondroitinsulfat, Tryptase und Chymase bzw. Maus-Mastzell-Proteasen (14;15), Carboxypeptidase-A (1), sowie TNF- $\alpha$ , SCF und VEGF (16). Die sekretierten Mediatoren können parakrin, autokrin oder auch systemisch wirken (1).

Histamin ruft Kontraktionen von glatten Muskelzellen hervor und beeinflusst Endothelzellen, Nervenenden und die Produktion und Sekretion von Mukus (Schleim) (17). Darüber hinaus wird die Aktivität von T-Zellen (18;19), Monozyten (20), Makrophagen (21;22), Neutrophilen (23) und Eosinophilen (24) durch Histamin beeinflusst.

Heparin, das wahrscheinlich exklusiv von Mastzellen produziert wird, gehört neben Chondroitinsulfat zu den Proteoglycanen in der Mastzelle. Die biologische Rolle der Proteoglycane, die aufgrund ihrer negativen Ladung Komplexe mit Histamin, Proteasen und anderen Granula-Bestandteilen bilden, ist noch nicht vollständig geklärt (25;26). Jedoch ist aus *in vivo* Experimenten mit Mäusen bekannt, dass Heparin für die korrekte Verpackung von einigen neutralen Proteasen in den cytoplasmatischen Granula entscheidend ist (25;26).

Die von Mastzellen sezernierten Proteasen Tryptase und Chymase wurden wie VEGF mit Angiogenese und einer damit indirekt assoziierten Tumorentwicklung in Zusammenhang gebracht. Schon Paul Ehrlich (1879) beobachtete eine Akkumulation von Mastzellen in Tumoren. Eine nachgewiesene Ansammlung von Mastzellen in zahlreichen Karzinomen des Menschen (27-29) und im Tiermodell (30) sowie das durch freigesetzte Mediatoren geförderte

---

Wachstum von Tumoren (31) deuten auf eine essentielle Rolle der Mastzellen in der Tumorummunologie hin.

Bei  $\text{TNF-}\alpha$  handelt es sich um ein Zytokin der TNF/TNFR Superfamilie und vermutlich um den essentiellsten aller Mastzellmediatoren. Mastzell- $\text{TNF-}\alpha$  wurde bereits mit vielen Funktionen in Verbindung gebracht. So spielt es eine kritische Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen oder der Migration von dendritischen Zellen (DCs).  $\text{TNF-}\alpha$  kommt ebenso wie VEGF eine besondere Rolle zu, da es sowohl neu synthetisiert, als auch direkt aus den Granula freigesetzt werden kann (1;32;33) (Abb.1).

Bei den „de novo“ synthetisierten Mediatoren handelt es sich um Lipid-Mediatoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Chemokine. Zu den Lipid-Mediatoren zählen Leukotrien C4 ( $\text{LTC}_4$ ), *Platelet activating factor* (PAF) und Prostaglandin D2 ( $\text{PGD}_2$ ).

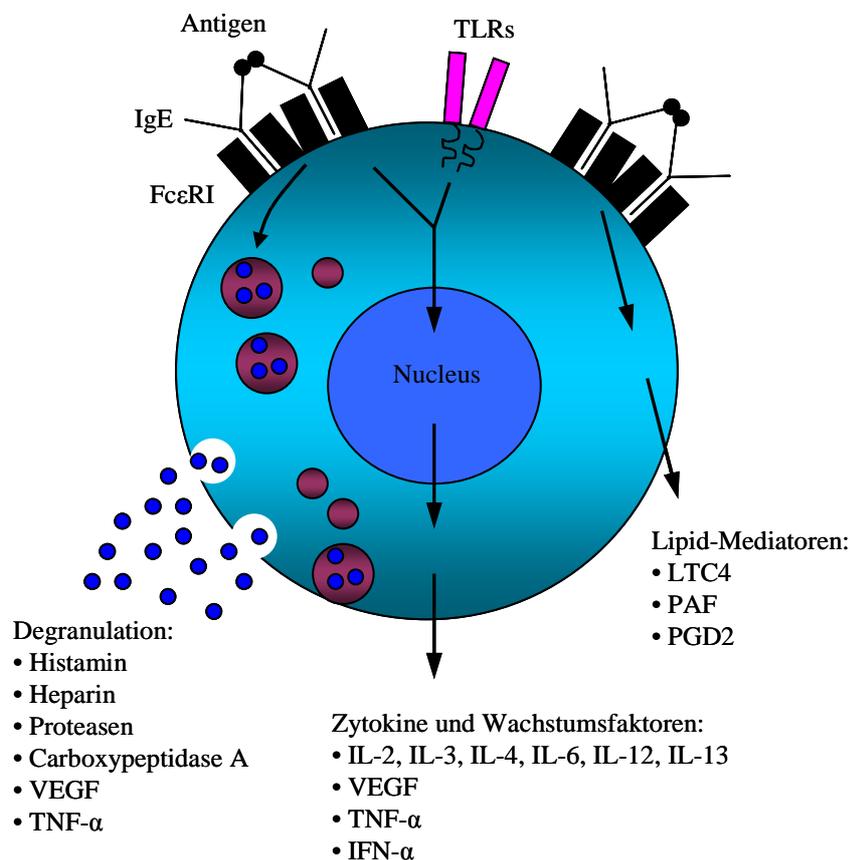


Abbildung 1: Mastzellen sekretieren gespeicherte und „de novo“ synthetisierte Mediatoren.

Mastzellen sezernieren nach  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  Kreuzvernetzung durch Bindung eines spezifischen Antigens an  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -gebundenes IgE „de novo“ synthetisierte und in Granula gespeicherte Mediatoren. Eine Toll-like-Rezeptor (TLR) Ligand Interaktion führt hingegen zu keiner Degranulation sondern zu einer Sekretion von Zytokinen.

Aufgrund der bereits erwähnten Heterogenität von Mastzellen werden von Spezies zu Spezies unterschiedliche Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine freigesetzt. Mediatoren, die sowohl von humanen als auch Nagetier-Mastzellen exprimiert werden sind GM-CSF (34-36), IFN- $\alpha$  (37), IL-1 $\beta$  (38), IL-3 (36;39;40), IL-4 (41-43), IL-5 (36;40;41), IL-6 (36;39;40), IL-9 (39;40), IL-10 (44;45), IL-12 (46;47), IL-13 (40;41), TGF- $\beta$ 1 (48-50), TNF (39;40;48;51;52)-32), bFGF (50;53),<sup>34</sup>, VEGF (50;54;55), CCL2 (MCP-1) (36;56;57), CCL5 (RANTES) (46;58). Jedoch gibt es nicht nur zwischen, sondern auch innerhalb der Spezies Unterschiede im Expressionsmuster. So konnten Noguchi et. al. (59) auch Differenzen zwischen Mastzellen einzelner Maus-Stämme zeigen. Mastzellen aus BALB/c Mäusen produzieren größere Mengen neu synthetisierte Mediatoren, PGD<sub>2</sub>, IL-6 und MCP-1, wohingegen Mastzellen aus C57BL/6 Mäusen Granula-assoziierte Mediatoren,  $\beta$ -Hexosaminidase und Histamin synthetisieren.

### **2.1.3 Das Modell der „Mastzell-Knock-in Mäuse“**

Zur *in vivo* Untersuchung von Mastzellentwicklung und -funktion sind die Mastzell-defizienten C57BL/6 *Kit*<sup>W<sup>sh</sup></sup>/*Kit*<sup>W<sup>sh</sup></sup> (Wsh) (60-62) und WBB6F<sub>1</sub>-*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W<sup>v</sup></sup> (W/W-v) (63) Mäuse geeignet. Im Unterschied zum Modell der Mastzell-defizienten W/W-v-Maus sind die Wsh-Mäuse fertil und nicht anämisch. Zudem bietet die Wsh-Maus den Vorteil eines reinen C57BL/6 Hintergrundes und ermöglicht somit eine syngene Rekonstitution mit BMCMCs aus knock-out- (KO-) Stämmen mit C57BL/6 Hintergrund. Wsh ist eine inverse Mutation auf dem Maus-Chromosom 5 (64;65) in der transkriptionell regulatorischen Region, die dem c-kit Transkriptionsstart vorgeschaltet ist. Die daraus resultierende Mastzelldefizienz kann anhand adoptiven Transfers von aus dem Knochenmark von WT-Mäusen *in vitro* generierten Mastzellen (BMCMC) behoben werden. Die Rekonstitution kann sowohl lokal (intraperitoneal [i.p.], subcutan) als auch systemisch (intravenös) erfolgen. Diese Art der Anwendung erlaubt eine *in vivo* Spezifizierung der biologischen Aufgaben der Mastzelle anhand ihrer Abwesenheit oder Präsenz. Außer mit BMCMCs von WT-Mäusen ist eine Rekonstitution auch mit BMCMCs aus verschiedenen, kongenen, KO-Stämmen und mit Mastzellen, die aus embryonalen Stammzellen (ESMC) generiert wurden, selbst wenn diese embryonal letale Mutationen tragen, möglich (66-68).

### ***2.1.4 Mastzellen im Kontext erworbener Immunität***

Im Zusammenhang mit der erworbenen Immunität spielen Mastzellen eine essentielle Rolle als Effektorzellen in der  $T_H2$ - und IgE-assoziierten Immunantwort. In den Körper eindringende Pollen, Parasiten, Allergene oder andere Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen wie DCs erkannt und in den regionalen Lymphknoten  $CD4^+$  T-Zellen als Peptid präsentiert. Die naiven  $CD4^+$  T-Zellen werden daraufhin zu  $T_H2$ -Zellen und sezernieren IL-4 und IL-13, welche an Oberflächenrezeptoren auf B-Zellen binden. Zusätzlich zu dieser Wechselwirkung ist eine Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf T-Zellen und CD40 an der Oberfläche von B-Zellen für den Isotypwechsel der B-Zellen zu IgE essentiell. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Antigen-spezifischem IgE, welches an die hoch affinen IgE-Rezeptoren  $Fc\epsilon RI$  auf Mastzellen und Basophilen bindet. Mastzellen und Basophile werden durch an den  $Fc\epsilon RI$  gebundenes IgE nach Antigen-Bindung aktiviert (69) (Abb.2). Diese Aktivierung startet, abhängig von der Intensität, Signalkaskaden, die sowohl zur Sekretion gespeicherter Mediatoren aus den Granula sowie zur „de novo“ Synthese von Proteinen und zum Sezernieren von Lipid-Mediatoren und Zytokinen sowie Chemokinen führen (70-72). Somit besteht die Möglichkeit einer lokalen oder systemischen immunologischen Reaktion. Diese Aktivierung kann zur Abwehr gegen bestimmte Parasiten führen (7;9;10;73;74) oder aber zu allergischen Erkrankungen wie Asthma (75;76) bis hin zu einem anaphylaktischen Schock (10;77).

---

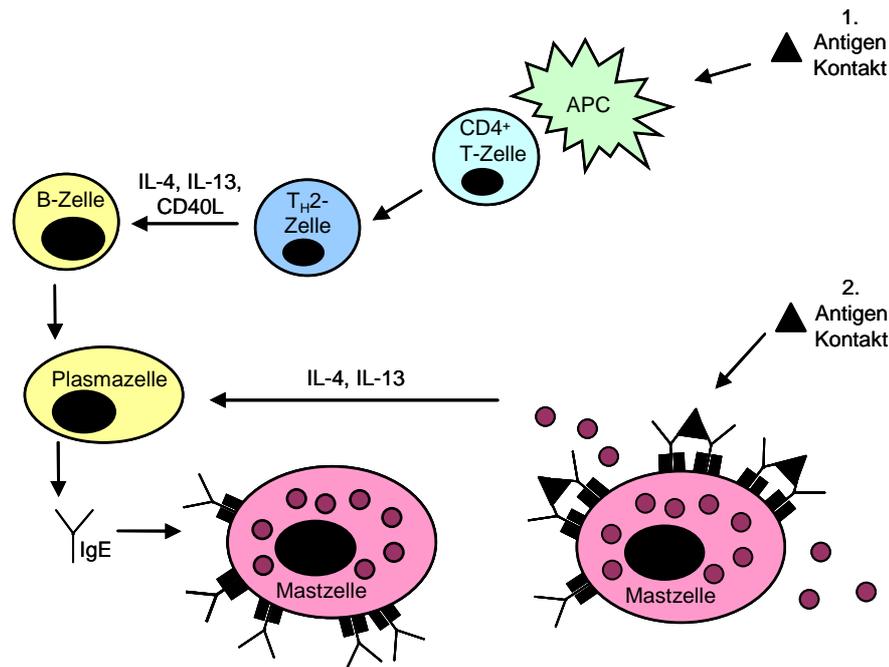


Abbildung 2: Mastzellen binden das von Plasmazellen nach Antigenpräsentation durch T<sub>H</sub>2-Zellen sezernierte IgE.

Beim ersten Kontakt mit einem Antigen wird dieses von antigenpräsentierenden Zellen (APC), z.B. Makrophagen und DCs, aufgenommen und als Peptid CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Diese werden durch den Kontakt zum Peptid zu T<sub>H</sub>2-Zellen und aktivieren B-Zellen mittels IL-4, IL-13 und CD40L, die somit zu IgE-sezernierenden Plasmazellen reifen. Das freigesetzte IgE wird durch den hoch affinen IgE-Rezeptor Fcε-RI auf den Mastzellen gebunden. Bei einem weiteren Kontakt mit dem Antigen kommt es zu einer sofortigen Sekretion von Mediatoren aus den Granula von Mastzellen. Zudem werden IL-4 und IL-13 von aktivierten Mastzellen freigesetzt und führen zu einem positiven Feedback durch eine erhöhte Produktion von IgE durch Plasmazellen. (Abbildung nach Wedemeyer et. al. (3), modifiziert).

Die Expression von FcεRI auf der Oberfläche korreliert mit der vorhandene Menge IgE und es ist sowohl für murine als auch humane Mastzellen bekannt, dass eine IgE-abhängige Steigerung der Expression von FcεRI zu einer erhöhten Freisetzung von Mastzellmediatoren führt (78;79). Hierbei steigert das sezernierte IL-4 in einem positiven Feedback die Produktion von IgE durch Plasmazellen. Durch die Aktivierung via IgE kommt es auf der Oberfläche der Mastzellen zu einer erhöhten Expression von CD40L, welche ebenfalls die IgE-Produktion durch B-Zellen steigert (69).

Kürzlich konnten Interaktionen von Mastzellen mit Zellen des erworbenen Immunsystems gezeigt werden (80-83). Hierbei scheint besonders das von Mastzellen produzierte und sekretierte bzw. auf der Zelloberfläche exprimierte TNF-α eine essentielle Rolle zu spielen. So konnte eine gesteigerte Expression von costimulatorischen Molekülen auf T-Lymphozyten

durch von Mastzellen freigesetztes TNF- $\alpha$  und eine Verstärkung der T-Zellaktivierung über eine direkte Zell-Zell Interaktion von Mastzellen mit T-Zellen über OX40-Ligand und OX40 gezeigt werden (80-82). Weiterhin konnte eine Mastzell-TNF- $\alpha$ -abhängige Migration von DCs *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (83).

Mastzellen spielen ebenfalls in der Immunabwehr gegen Parasiten eine zentrale Rolle. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mastzell-defiziente Mäuse, die mit *Leishmania major* infiziert wurden, größere Läsionen mit einer höheren Anzahl Parasiten hervorbringen, als Mäuse mit Mastzellen (84). Des Weiteren konnte anhand des gleichen Mausmodells nach Infektion mit *Heligmosomoides polygyrus* eine signifikant höhere Fertilität der Nematoden in den Mastzell-defizienten- im Vergleich zu WT-Mäusen oder rekonstituierten Tieren beobachtet werden (85). Es wird vermutet, dass T<sub>H</sub>2-Zytokine, wie IL-4 und IL-13, die u.a. von Mastzellen sekretiert werden, durch Stat6 Aktivierung die Ausscheidung von Würmern unterstützen (86;87).

### ***2.1.5 Mastzellen im Zusammenhang mit angeborener Immunität***

Anhand von „Mastzell Knock in“ Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass Mastzellen eine kritische Funktion in der angeborenen Immunität bei der Bekämpfung spezieller bakterieller Infektionen einnehmen. So locken Mastzellen zirkulierende Leukozyten mit Hilfe von TNF- $\alpha$  an (8;88;89). Sie exprimieren Toll-like-Rezeptoren (TLR), die anhand von *Pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) in den Wirt eindringende Pathogene erkennen. Jeder TLR bindet spezifische Liganden, so erkennt z.B. TLR3 virale, doppelsträngige RNA (dsRNA) (90), TLR4 bindet bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) (91) und unmethylierte DNA Sequenzen, wie das CpG Motiv in Bakterien und Viren, werden von TLR9 erkannt (92). Aus dem Knochenmark differenzierte Mastzellen (*Bone marrow derived cultured mast cells* (BMCMC)) sowie humane Mastzellen, die aus dem Nabelschnurblut differenziert wurden, exprimieren TLR2 und TLR4 (41;44;93-95). Darüber hinaus wurden TLR3, TLR6, TLR7 und TLR9 auf BMCMCs nachgewiesen (58). Murine Mastzellen die mit LPS, CpG oder Poly I:C, dem Liganden für TLR3, stimuliert werden produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie das Chemokin RANTES (58).

Viele Infektionen führen zur Aktivierung des Komplementsystems und resultieren in der Entstehung der Anaphylatoxine C3a und C5a durch Spaltung der Komplementfaktoren C3

---

und C5 (96). Die Anaphylatoxine dienen der Anlockung und Aktivierung von Leukozyten und phagozytierenden Zellen wie Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden (97;98). Aus der menschlichen Haut differenzierte Mastzellen können durch C5a und C3a aktiviert werden, wohingegen eine Stimulation von Mastzellen der Lunge mittels Anaphylatoxinen nicht möglich ist (99;100). Auch hier zeigt sich die Heterogenität von Mastzellen, da z.B. die Expression des Anaphylatoxin Rezeptors C5a auf synovialen Mastzellen nur in entzündetem Gewebe von Patienten mit rheumatischer Arthritis nachgewiesen werden konnte. Soruri et. al. (101) konnten zeigen, dass sowohl aus dem murinen Knochenmark differenzierte Mastzellen als auch primäre Peritoneal-Mastzellen nach vorheriger Stimulation mit IgE/Ag bzw. Iono/PMA eine gesteigerte Oberflächenexpression von C5aR aufweisen, die mit einer Chemotaxis nach C5a Exposition einhergeht (101). Außerdem ist bekannt, dass C3a die Degranulation und Produktion von RANTES (CCL5) und MCP-1 (CCL2) in humanen Mastzellen anregt (102;103).

### ***2.1.6 Mastzellen im Zusammenhang mit Tumorentstehung***

Mastzellen wurden schon früh mit Angiogenese und einer damit indirekt assoziierten Tumorentwicklung in Zusammenhang gebracht. So beobachtete bereits Paul Ehrlich (1879) eine Akkumulation von Mastzellen in Tumoren. Sie können Proteasen, wie Trypsinase, Chymase und Matrixmetalloproteinasen, deren proteolytische Aktivität extrazelluläre Matrixkomponenten degradieren, nach Aktivierung aus ihren Granula freisetzen (30;104). Eine nachgewiesene Ansammlung von Mastzellen in zahlreichen Karzinomen des Menschen (27-29) und im Tiermodell (30) sowie das durch freigesetzte Mediatoren geförderte Wachstum von Tumoren (31) deuten auf eine wesentliche Rolle in der Tumorummunologie hin. Anhand eines chemisch induzierten, intestinalen Tumormodells mittels Mastzell-defizienter Mäuse konnte eine Beteiligung dieser Zellen an der intestinalen Tumorentwicklung nachgewiesen werden (105). So zeigten die verwendeten Mastzell-defizienten Mäuse eine signifikant reduzierte Anfälligkeit für die chemisch induzierten Tumore (105).

Die verschiedenen Mastzell-Mediatoren könnten sowohl positiven als auch negativen Einfluss, bzw. einen indirekten als auch direkten Effekt auf die Karzinogenese und die Tumorprogression haben. So konnte in einigen Arbeiten eine erhöhte (106-108), in anderen eine niedrigere (30;109;110) Prädisposition für die Tumorentstehung, Angiogenese, Tumorgröße oder die Bildung von Metastasen in Mastzell-defizienten Mäusen beobachtet

---

werden. In einer eigenen, unpublizierten Arbeit wurden Mäuse mit einer Mutation im APC Lokus ( $APC^{min/+}$ ) verwendet. Diese entwickelten aufgrund der Mutation im APC Lokus spontane, intestinale Adenome und wurden mit Mastzell-defizienten  $WBB6F_1-Kit^W/Kit^{W-v}$  ( $W/W-v$ ) Mäusen gekreuzt. Die so entstandenen  $WBB6F_1-Kit^W/Kit^{W-v}-APC^{min/+}$  Mäuse wiesen im Alter von 40 Wochen eine signifikant höhere Anzahl an Adenomen im Vergleich zu  $WBB6F_1-Kit^+/Kit^+-APC^{min/+}$  Mäusen auf. In diesem spontanen, intestinalen Tumormodell haben  $WBB6F_1-Kit^+/Kit^+-APC^{min/+}$  Mäuse im Vergleich zu Mastzell-defizienten  $WBB6F_1-Kit^W/Kit^{W-v}-APC^{min/+}$  Mäusen eine niedrigere Prädisposition für die Adenombildung.

## 2.2 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen sind cytotoxische Lymphozyten, die im Blut, in sekundären lymphatischen Organen und in peripheren nicht-lymphatischen Geweben vorkommen (111;112). Sie repräsentieren 10-20% der Monozyten des peripheren Blutes (PBMCs) und sind Teil des angeborenen Immunsystems. NK-Zellen sind in der Lage, spontan und ohne vorherige Sensibilisierung MHC Klasse I (MHC-I)-negative Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren. Diese Fähigkeit basiert auf inhibitorischen NK-Zell-Rezeptoren, die spezifisch mit MHC-I Molekülen interagieren. Infizierte Zellen und Tumorzellen verlieren häufig ihre MHC-I Moleküle und können somit kein entsprechendes inhibitorisches Signal in der NK-Zelle auslösen (113-116).

### 2.2.1 NK-Zell-Effektor Funktionen

Ruhende NK-Zellen zirkulieren im Blut und können nach Aktivierung, mittels Extravasation infizierte Gewebe oder Gewebe mit entarteten Zellen infiltrieren (117-120).

Tumorzellen sind normalerweise resistent gegen nicht-aktivierte NK-Zellen aus dem peripheren Blut. Eine vorherige Stimulation der NK-Zelle durch von anderen Zellen freigesetzte Cytokine wie IL-2, IL-12, IL-15 oder IFN- $\alpha$  ist für die Aktivierung essentiell.

Aktivierte NK-Zellen produzieren IFN- $\gamma$ , welches in die Suppression von Viren und anderen Pathogenen involviert ist (121). Des Weiteren wirkt IFN- $\gamma$  direkt auf Tumorzellen, schränkt die Tumor-Angiogenese ein und ruft eine Typ I Immunantwort hervor, die zur Aktivierung und Rekrutierung anderer Immunzellen führt (122-124). So können IFN- $\gamma$  produzierende NK-Zellen phagozytierende Zellen aktivieren und zudem Antigen-präsentierende Zellen mittels

---

MHC-I- und MHC-II-Expressions-Steigerung aktivieren, die daraufhin eine zytotoxische T-Zell Antwort auslösen können (125;126).

Prinzipiell kann in Zielzellen Apoptose durch NK-Zellen über zwei Wege ermöglicht werden. Den Hauptmechanismus stellt die Exozytose von zytotoxischen Granula dar, die Perforin und Granzyme enthalten. Ein weiterer Mechanismus ist die Aktivierung der Caspase-abhängigen Zielzell-Apoptose durch FasL und *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) auf den NK-Zellen, die an den Fas-Rezeptor (FasR) bzw. an die TRAIL-Rezeptoren (DR4 und DR5) auf der Zielzelle binden.

Mit Hilfe von Perforin, das anhand von Polymerisation Poren in Zellwänden bildet, sind NK-Zellen in der Lage, Tumorzellen zu lysieren (127). Perforin ermöglicht durch die Zerstörung der Zellmembran das Eindringen von Granzymen in die Zielzelle. Jedoch existieren auch Theorien, die eine Perforin-unabhängige, Rezeptor-abhängige Endozytose von Granzymen beschreiben (128). Ein möglicher Rezeptor aus Zielzellen könnte der Mannose 6-Phosphat Rezeptor (MPR) sein (129).

Mittels Perforin-defizienter Mäuse konnte eine 10-100-fache Reduktion der Lyse MHC-I negativer hämatopoetischer und epithelialer Tumore festgestellt werden (127;130). Über die Funktion von Granzymen in der Abstoßung von Tumorzellen gibt es widersprüchliche Ansätze. So konnte gezeigt werden, dass Granzyme nicht essentiell für die NK-Zell-gesteuerte Abstoßung MHC-I-negativer Tumore sind (131). Jedoch berichten Pardo et al. (132), dass Granzym defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen ein unkontrolliertes Tumorstadium aufweisen und somit den Granzymen eine ähnlich essentielle Rolle an der Tumorbeseitigung zukommt wie Perforin.

Für die Lyse von Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen durch NK-Zellen ist zusätzlich die Expression bestimmter Oberflächenliganden, die von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren gebunden werden, nötig (133). So exprimieren NK-Zellen Fas-Ligand (FasL) und TRAIL, welche mit der Tumor-Zell-Apoptose assoziiert sind. Die Expression von FasL führt nachgewiesenermaßen zur Suppression des Tumorstadiums (134). Tumorzellen exprimieren normalerweise kein Fas auf ihrer Zelloberfläche, jedoch können NK-Zellen direkt eine Expression von Fas und somit die Apoptose mittels FasL bewirken (135). Die Neutralisation bzw. Abwesenheit von TRAIL unterstützt in einem durch Methylcholanthren (MCA) induzierten Tumormodell das Tumorstadium (136;137) und bestätigt somit indirekt die kritische Rolle von TRAIL in der NK-Zell-assozierten Apoptose.

---

Somit tragen NK-Zellen nach entsprechender Aktivierung sowohl direkt, durch die Exozytose zytotoxischer Granula, als auch indirekt, durch die Sekretion von IFN- $\gamma$ , zur Bekämpfung von infizierten Zellen und Tumorzellen bei.

### ***2.2.2 Aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren***

Die Reaktion von NK-Zellen auf andere Zellen wird anhand von Signalen durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren auf der NK-Zelle gesteuert. Um körpereigene Zellen vor der Lyse durch NK-Zellen zu schützen, werden diese anhand ihrer MHC-I Moleküle von den inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle erkannt.

Zu diesen inhibierenden Rezeptoren gehören in der Maus Ly49 (für klassische MHC-I Moleküle) und Qa-1b (für nicht klassische MHC-I Moleküle) und im Menschen KIR2DL, CD158, CD85 (für klassische MHC-I Moleküle) und CD94 (für nicht klassische MHC-I Moleküle).

NK-Zellen sind jedoch auch in der Lage, Zellen zu lysieren, die MHC-I exprimieren, da ihre Funktion von einer Balance aus inhibierenden und aktivierenden Signalen reguliert wird. Somit können auch Tumorzellen, bzw. Virus-infizierte Zellen, die MHC-I exprimieren, anhand aktivierender NK-Zell-Rezeptoren getötet werden.

Zu den aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen zählen in der Maus Ly49D, Ly49H, Ly49P, NKR-P1C (CD161c), PILR $\beta$ , im Menschen NKp30, KIR2DS und in beiden Spezies NKG2D, 2B4, NKp46, CD94/NKG2C und CD16.

Tabelle 1: Aktivierende und inhibierende murine NK-Zell-Rezeptoren und deren Liganden (adaptiert nach Lanier et. al. (138))

<b>aktivierende NK-Zell-Rezeptoren</b>	<b>Liganden</b>
NKG2D	Rae-1, H60
NKp46	unbekannt
Ly49D	H-2Dd
Ly49H	MCMV Protein m157
NKR-P1C	unbekannt
CD16	IgG
CD28	CD80, CD86
CD27	CD70
2B4	CD48
LFA-1 (CD11a/18)	ICAM 1-5
CD94	Qa-1b
<b>inhibierende NK-Zell-Rezeptoren</b>	<b>Liganden</b>
Ly49	H-2K, H-2D (MHC-I Moleküle)
NKR-P1A	unbekannt
2B4	CD48
CD94	Qa-1b
PILR $\alpha$	CD99

Die Aktivierung von NK-Zellen kann darüber hinaus durch costimulatorische Rezeptoren arrangiert werden. Einige humane und murine NK-Zellen exprimieren CD27 und werden nach Stimulation mittels CD70-transfizierter Tumorzellen zur Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion angeregt (139). Die Expression der CD28 Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf Tumorzellen resultiert in der Tumorlyse (140;141). Von humanen NK-Zellen ist bekannt, dass eine Expression von CD154 (CD40L) nach IL-2 Aktivierung zur Detektion von CD40 auf Tumorzellen und mit einer Aktivierung von NK-Zellen einhergeht (142).

### 2.3 Die Interaktion von Mastzellen mit NK-Zellen

Es ist sowohl für NK-Zellen als auch für Mastzellen bekannt, dass sie mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren und deren Status beeinflussen. Mastzellen regulieren die Kinetik des adaptiven Immunsystems, indem sie z.B. die Bewegung, Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen sowie die Bewegung und funktionelle Reifung von DCs unterstützen (1;16;80;83;143-145). Einige Studien haben gezeigt, dass eine Interaktion von NK-Zellen mit DCs zur zellulären Aktivierung, Reifung und zum Zelltod führen kann (126;146;147). Des Weiteren kommt dieser Interaktion eine wichtige Rolle in der Tumormunität und der Immunantwort von DCs gegen parasitäre Antigene zu (146-148).

Mediatoren wie IL-4, IL-12 and TNF- $\alpha$ , die von Mastzellen freigesetzt werden können, sind auch dafür bekannt, eine Aktivierung von NK-Zellen zu induzieren und könnten somit eine Interaktion ermöglichen (66;149). So induziert z.B. IL-12 einen IFN- $\gamma$ -abhängigen antimetastatischen Effekt von NK-Zellen (150).

Neben einer möglichen Immunmodulation durch Zytokine gibt es jedoch auch mögliche Rezeptor-Ligand-Paarungen, die eine direkte Zell-Zell Interaktion erlauben würden. Eine Interaktion wäre beispielsweise mittels 2B4 (CD244) auf NK-Zellen und dem Liganden CD48 auf Mastzellen möglich. 2B4 gehört zur SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) Familie und kann nach Bindung des Liganden CD48 aufgrund mehrerer *potential recruitment sequences* am cytoplasmatischen Ende des Rezeptors sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale auslösen (151;152). Außerdem ist eine Aktivierung der NK-Zellen durch die Interaktion des costimulatorischen Rezeptors ICOS (*inducible co-stimulator*) mit dem Liganden B7H/B7-H2 auf der Mastzelle (80) denkbar. Es ist bereits bekannt, dass eine ICOS-bedingte Stimulation aktivierter NK-Zellen zum effektiven Töten von MHC-I positiven Tumorzellen führt (153). Die Expression von CD30 auf murinen NK-Zellen (154) und des Liganden CD153 auf Mastzellen (80) würde ebenfalls theoretisch eine Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen ermöglichen. Wie bereits erwähnt spielt OX40L auf murinen Mastzellen eine wesentliche Rolle bei der Interaktion von Mastzellen und T-Zellen (80;155). Die Expression von OX40 konnte auf murinen NK-Zellen (156) und auf humanen NK-Zellen nach Stimulation mit IL-2 beobachtet werden (157).

Von Nakae et. al. (80) konnten eine konstitutive Expression von PD-L1 (B7-H1) auf Mastzellen gezeigt werden, die eine kritische Rolle für den Liganden des Rezeptors PD-1 vermuten lässt und somit eine theoretische Interaktion mit NK-Zellen ermöglichen könnte. Inamura et. al. (158) beschrieben eine Aktivierung der Mastzell Degranulierung nach Kokultur von Mastzellen und aktivierten T-Zellen, die abhängig von LFA-1 (CD11/CD18) und dem Liganden ICAM-1 ist. Da gezeigt werden konnte, dass BMCMCs ICAM-1 und NK-Zellen den Rezeptor LFA-1 exprimieren (159), wäre auch eine Interaktion mittels ICAM-1/LFA-1 möglich. Obwohl keine Publikation existiert, die eine Expression der Liganden REA-1, MULT1, H60a, H60b oder H60c auf Mastzellen beschreibt, wurde ein möglicher Einfluss einer NKG2D (CD314) Blockierung auf NK-Zellen auf die Interaktion mit Mastzellen getestet, da NKG2D als aktivierender NK-Zell-Rezeptor (160) für eine Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen infrage käme.

Des Weiteren ist eine Interaktion zwischen den in Kapitel 2.2.2 erwähnten costimulatorischen Rezeptoren auf den NK-Zellen mit den Liganden auf Mastzellen denkbar.

---

## 2.4 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl Mastzellen als auch NK-Zellen können andere Zellen des Immunsystems beeinflussen und sind Teil der angeborenen Immunität. Dennoch gab es vor unserer Publikation (161) neben den veröffentlichten Daten von Burke et. al. (162), die eine CXCL8-abhängige Rekrutierung humaner NK-Zellen durch Mastzellen nach Virus-abhängiger Stimulation beschreiben, keine publizierten Originaldaten, die über eine Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen berichten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Interaktion von murinen Mastzellen und NK-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Nach Etablierung der Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen sollte der Einfluss verschiedener Stimulatoren auf die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen und IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen analysiert werden. Da Mastzellen und NK-Zellen mit angeborener Immunität assoziiert sind, sollten zunächst die Liganden der auf Mastzellen exprimierten TLR (41;44;93-95) (58) LPS (TLR4), CpG (TLR9) und Poly I:C (TLR3) getestet werden. Darüber hinaus sollten die Auswirkungen einer, mit erworbener Immunität assoziierten Stimulation von Mastzellen durch IgE/Antigen auf NK-Zellen untersucht werden. Nach Identifikation möglicher Stimulatoren einer Mastzell-NK-Zell Interaktion sollte anhand blockierender Antikörper bzw. Knock-out Mastzellen oder NK-Zellen eine mögliche Interaktion genauer spezifiziert werden. Nach intensiven *in vitro* Analysen sollte sich eine *in vivo* Überprüfung der Ergebnisse anschließen. Anhand von Wsh- und WT-Mäusen sollte der Einfluss einer möglichen Mastzell-NK-Zell Interaktion überprüft und in weiteren Experimenten der Einfluss einer möglichen Mastzell-NK-Zell Interaktion im Zusammenhang mit Tumorummunologie eruiert werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mausstämme, Zelllinien und Materialien

#### 3.1.1 Mausstämme

- C57BL/6** Weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 im Alter von 9 bis 12 Wochen von Charles River. Die Mäuse werden bis zur Verwendung in der IVC-Haltung des zentralen Tierlabors der MHH gehalten und unterliegen einer ständigen hygienischen Kontrolle nach FELASA (163).
- BALB/c** Weibliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c im Alter von 9 bis 12 Wochen von Janvier. Die Mäuse werden bis zur Verwendung in der IVC-Haltung des zentralen Tierlabors der MHH gehalten und unterliegen einer ständigen hygienischen Kontrolle nach FELASA (163).
- B6.129S6-Tnftm1Gkl** Weibliche Mäuse aus dem zentralen Tierlabor in Mainz. C57BL/6 Mäuse, bei denen das TNF- $\alpha$  Gen auf Chromosom 17 inaktiviert wurde. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Dr. Steinbrink aus Mainz zur Verfügung gestellt.
- B6.Cg-Kit<sup>W-sh</sup>** Weibliche und männliche Mäuse, im Alter von 9 bis 12 Wochen, aus eigener Zucht in der IVC-Haltung des zentralen Tierlabors der MHH. Die Mäuse unterliegen einer ständigen hygienischen Kontrolle nach FELASA (163). Mäuse, bei denen eine spontane *Kit<sup>W-sh</sup>* Mutation aufgetreten ist, die mindestens zehn Mal auf C57BL/6 zurückgekreuzt wurden. Diese Mäuse sind Mastzell-defizient.

#### 3.1.2 Zelllinien

- WEHI-3** IL-3-sekretierende Maus Leukämie-Zelllinie
- Yac-1** Maus T-Zell-Lymphom Zelllinie; sensitiv für NK-Zell Zytotoxizität
-

RMA/S Tap 2-defiziente, murine T-Zell-Lymphom Zelllinie  
 RMA/S-GFP RMA/S Zellen stabil transduziert mit GFP

### 3.1.3 Materialien

#### 3.1.3.1 Antikörper

Antikörper Spezifität	Konjugat	Clone	Isotyp	Verdünnung/ Konzentration	Hersteller	Katalog-Nr.
CD3e	Biotin	145-2C11	Hamster IgG1, κ	1:100	BD	553060
CD11a	NA/LE	M17/4	Ratte IgG2a, κ	25 µg/ml	BD	553337
CD16/CD32	NA/LE	2.4G2	Ratte IgG2b, κ	1:100	BD	553140
CD18	NA/LE	M18/2	Ratte IgG2a, κ	25 µg/ml	BD	553341
CD23	NA/LE	B3B4	Ratte IgG2a, κ	1:100	BD	553136
CD48	NA/LE	HM48-1	Hamster IgG1, λ3	5 µg/ml	BD	553682
CD49b	PE	DX5	Ratte IgM, κ	1:100	eBioscience	12-5971
CD49b	APC	DX5	Ratte IgM, κ	1:100	eBioscience	17-5971
CD54 (ICAM)	NA/LE	3 E 2	Hamster IgG1, κ	25 µg/ml	BD	553249
CD69	PE	H1.2F3	Hamster IgG	1:100	eBioscience	12-0691
CD70	NA/LE	FR70	Ratte IgG2b, κ	20 µg/ml	BD	16-0701
CD117 (c-kit)	PE	2B8	Ratte IgG2b, κ	1:100	eBioscience	12-1171
CD134 (OX40)	PE	OX-86	Ratte IgG1, κ	1:100	eBioscience	12-1341
CD153 (CD30L)	NA/LE	RM153	Ratte IgG2b, κ	20 µg/ml	eBioscience	16-1531
CD252 (OX40L)	PE	RM134L	Ratte IgG2b, κ	1:100	eBioscience	12-5905
CD252 (OX40L)	NA/LE	RM134L	Ratte IgG2b, κ	10 µg/ml	eBioscience	16-5905
CD275 (ICOSL)	NA/LE	HK5.3	Ratte IgG2a, κ	10 µg/ml	eBioscience	16-5985
CD314 (NKG2D)	NA/LE	CX5	Ratte IgG1, κ	20 µg/ml	eBioscience	16-5882
FcεRIα	Biotin	MAR-1	Hamster IgG	1:100	eBioscience	13-5898
Granzym B	PE	16G6	Ratte IgG2b, κ	1:200	eBioscience	12-8822
DNP		SPE-7	Maus IgE	1 µg/ml	Sigma	D8406
B7-H1 (CD274)	NA/LE	MIH5	Ratte IgG2a, λ	5 µg/ml	eBioscience	16-5982
IFN-γ	APC	XMG1.2	Ratte IgG1, κ	1:100	BD	554413
IgE	FITC	R35-72	Ratte IgG1, κ	1:50	BD	553415
Qa-1b	NA/LE	6A8.6F10.1A6	Maus IgG1, κ	10-40 µg/ml	BD	559827
TNFR1		55R-170	Hamster IgG1	20 µg/ml	R&D	MAB430
TNFR2		TR7532	Hamster IgG1	20 µg/ml	R&D	MAB4261
Isotyp	APC	eBio299Arm	Hamster IgG		eBioscience	17-4888
Isotyp	APC	R3-34	Ratte IgG1, κ		BD	554686
Isotyp	FITC	R3-34	Ratte IgG1, κ		BD	553924
Isotyp	PE		Ratte IgG1, κ		eBioscience	12-4301
Isotyp	PE		Ratte IgG2b, κ		eBioscience	12-4031
Isotyp	Biotin	G155-178	Maus IgG2a, κ		BD	553455
Isotyp	NA/LE	G234-2356	Hamster IgG1, λ1		BD	554709
Isotyp	NA/LE	107.3	Maus IgG1, κ		BD	554721
Isotyp	NA/LE	R35-95	Ratte IgG2a, κ		BD	553926
Isotyp	NA/LE	A19-3	Hamster IgG1, κ		BD	553968
Isotyp	NA/LE		Ratte IgG2b, κ		eBioscience	16-4031
Streptavidin	PE-Cy7			1:100	eBioscience	25-4317
Streptavidin	FITC			1:100	eBioscience	11-4317
Streptavidin	PE			1:100	eBioscience	12-4317
Streptavidin	APC			1:100	eBioscience	17-4317

### 3.1.3.2 Chemikalien

10xPBS	Invitrogen
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich
$\alpha$ -Monothioglycerol	Sigma Aldrich
BSA	Sigma Aldrich
BSA II	Roche
DMSO	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
Glucose	Sigma Aldrich
Glycin	Sigma Aldrich
Hepes	Sigma Aldrich
Ionomycin	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natrium-Pyruvat	Biochrom
Polyethylenamin (PEI)	Sigma Aldrich
PMA	Sigma Aldrich
p-Nitrophenyl-N-acetyl-beta-D Glucosaminid	Sigma Aldrich
Tri-Natrium-Citrat	Roth
TritonX100	Sigma Aldrich
Zitronensäure	Merck

### 3.1.3.3 Medien

DMEM	Biochrom
IMDM	PAA
RPMI 1640	Invitrogen

WEHI Zellen wurden in IMDM, versetzt mit 10% FCS, 200  $\mu$ M  $\alpha$ -Monothioglycerol sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin zur antibakteriellen Prophylaxe kultiviert.

---

BMCMCs wurden in DMEM, versetzt mit 10% FCS Gold,  $\alpha$ -Monothioglycerol, 20% 0,2  $\mu$ m steril-filtriertem IL-3-haltigem-WEHI Zellkultur-Überstand und 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

NK Zellen wurden in RPMI 1640, versetzt mit 10% FCS, 200  $\mu$ M  $\alpha$ -Monothioglycerol sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin zur antibakteriellen Prophylaxe kultiviert.

YAC-1 Zellen wurden in RPMI 1640, versetzt mit 10% FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin zur antibakteriellen Prophylaxe kultiviert.

RMA/S Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% FCS, 1% NEA, 1 mM Natrium-Pyruvat und 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie 0,01 mg/ml Penicillin/Streptomycin, zur antibakteriellen Prophylaxe, kultiviert. Transduzierte RMA/S-GFP Zellen wurden durch den Zusatz von 500 pg/ml Neomycin selektioniert.

### 3.1.3.4 Pufferlösungen

10x HEPES (pH 7.4)	200 mM HEPES 1,25 M Natriumchlorid 5 mM Glucose 50 mM Kaliumchlorid
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat pH 8,5 2 mM EDTA
Citrat-Puffer (pH 4.5)	0,05 M Zitronensäure 0,05 M Tri-Natrium-Citrat
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,1 mM EDTA 0,16 M Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat

---

FACS-Puffer	1xPBS 1% Natriumazid 2% FCS
MACS-Puffer	0,5 M EDTA 0,5% BSA 1x HEPES

### 3.1.3.5 Kits

Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit	BD
Foxp3 Staining buffer Set	eBioscience
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen

### 3.1.3.6 Primer

OX40 1a	CAC GGA CAA CCC ATA TCC TGA	MWG Operon
OX40 1b	TAT TAG GAG CAC CAC CAG GCA	MWG Operon

### 3.1.3.7 Sonstige Substanzen, Materialien und Geräte

Ci <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub>	Amersham
dNTP Mix, 10 mM	Fermentas
FCS Gold	PAA
FCS	Biochrom
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	Fermentas
O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
pLEIN Vektor	Clontech
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
Trypsin/EDTA	Biochrom

---

Brutschrank für die Zellkultur	Heraeus
Durchflusszytometer FACS Canto-II	Becton Dickinson
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml und 25 ml (steril)	Sarstedt
ELISA Platten (96 Well)	Corning
Kanülen	Braun
Kühlzentrifuge für 1,5-2 ml Gefäße	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Heraeus
Kryoröhrchen	Sarstedt
Neubauer-Zählkammer	Brand
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt
Rainbow Thermo Reader	Tecan
Spritzen	Braun
Sterilfilter 0,2 µm	Steriflip
Vortexer	Scientific Industries
Wallac 1450 MicroBeta Trillux	Perkin Elmer
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (steril)	Sarstedt
Zellkulturflaschen für adhärente bzw. Suspensions-Zellen	Sarstedt
Zellkulturplatten 96 Well Rundboden	Corning
Zytozentrifuge	Shandon

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Präparation von BMCMCs

Im Rahmen der Präparation von BMCMCs wurde Knochenmark von C57BL/6 Weibchen, BALB/c oder TNF<sup>-/-</sup> Mäusen mit Hilfe einer 26Gx1 Kanüle aus dem Femur herausgespült. Mit einer 1 ml Pipettenspitze wurde aus dem Knochenmark eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden 8 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das resultierende Zellsediment wurde in 10 ml Komplettmedium (DMEM supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 20% IL-3-haltigem WEHI-Medium-Überstand, 1% Penicillin/Streptomycin, und 200 µM α-Monothioglycerol) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss für 24 h in einer 25cm<sup>2</sup>-Suspensionszell-Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 8 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde entfernt und das Pellet in 10 ml warmem Komplettmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension

---

in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. In einem Rhythmus von drei bis vier Tagen wurde das Medium gewechselt, wobei einmal pro Woche ein kompletter und einmal pro Woche ein halber Mediumwechsel vorgenommen wurde. Nach sechs Wochen konnten 97% der Zellen als Mastzellen identifiziert werden.

Zur Identifikation der Zellen wurden mit einer Zytocentrifuge bei 500 Umdrehungen/min für 5 min Objektträger mit den zu analysierenden Zellen beschichtet und anschließend für ca. 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden für 2 min in May-Grünwald-Lösung inkubiert. Anschließend wurde mit Wasser überschüssige Färbelösung abgespült, bevor die Objektträger für weitere 20 min in Giemsa-Lösung gefärbt wurden. Die getrockneten Zytospins wurden nach kurzer Inkubationszeit in Xylol mit Entellan eingedeckt und anschließend mikroskopiert. Mastzellen können anhand ihrer metachromatischen Granula leicht identifiziert werden.

Als weitere Methode zur Identifikation von Mastzellen diente die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen-Expression des FcεRI und c-kit (CD117), Rezeptor für SCF. Reife Mastzellen exprimieren sowohl FcεRI als auch c-kit.

### ***3.2.2 Präparation von natürlichen Killerzellen***

Die Milzen von getöteten C57BL/6 bzw. BALB/c Mäuse wurden entnommen und in NK-Spülmedium (RPMI 1640 Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin) aufbewahrt, anschließend wurde aus den isolierten Milzen eine Einzelzellsuspension gewonnen. Zur Beseitigung größerer Gewebeverbände wurde die Zellsuspension durch eine 40 µm Nylonmembran geleitet. Die so gewonnenen Zellen wurden abzentrifugiert (8 min 1200 rpm 4°C), danach in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für weitere 8 min zentrifugiert. Die somit Erythrozyten-freien Milzzellen wurden in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Zellsediment wurde in 93 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 5 µl Fc-Block (anti CD16/32) für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 1 µl CD49b und CD3 zugesetzt und für 10 min ebenfalls auf Eis inkubiert. Zum Auswaschen des überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpers wurde nach beendeter Inkubation mit 10 ml MACS-Puffer für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Zur Färbung des biotinylierten CD3 Antikörpers wurde daraufhin das in 99 µl MACS-Puffer resuspendierte Zellsediment mit 1 µl Streptavidin APC gefärbt. Im Anschluss an diese 10-minütige Inkubation wurden die Zellen für 8 min bei 1200 rpm zentrifugiert und abschließend in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in

---

der zentralen Einrichtung für Zellsortierung in der Medizinischen Hochschule Hannover auf CD49b-positive, CD3-negative Zellen (natürliche Killerzellen) sortiert und in RPMI-Medium mit 20% FCS aufgefangen.

### **3.2.3 Kokultur von BMCMCs und natürlichen Killerzellen**

Die differenzierten BMCMCs und NK-Zellen wurden je nach Experiment einzeln, zusammen oder getrennt in einem Transwell-System (Corning 0,4 µm Membran) mit LPS, CPG, Poly I:C, SCF oder ohne Stimulanz in 96-Well-Rundboden-Platten von Corning für die angegebene Zeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sie wurden in einem Volumen von 150 µl bzw. 200 µl im Transwell-System NK-Komplett-Medium (RPMI 1640, versetzt mit 10% FCS, 200 µM α-Monothioglycerol sowie 1% Penicillin/Streptomycin) inkubiert. In allen Fällen wurden 200 U/ml IL-2 zugesetzt. Für Experimente mit blockierenden Antikörpern wurden BMCMCs bzw. NK-Zellen mit der angegebenen Menge Antikörper für 15 min auf Eis inkubiert und, um ungebundene Antikörper auszuwaschen, anschließend für 8 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, bevor die Zellen kultiviert wurden. Im Anschluss an die jeweilige Inkubationszeit wurde die Zellsuspension abzentrifugiert und die resultierenden Zellüberstände bei -80°C eingefroren, bis diese weiter verwendet wurden. Die sedimentierten Zellen wurden entweder ebenfalls eingefroren oder für anschließende FACS-Analysen direkt verwendet.

## **3.3 Immunologische Methoden**

### **3.3.1 ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay)**

Zellen wurden durch 8 min Zentrifugieren bei 1200 rpm vom Zellkulturüberstand getrennt. Dieser wurde abpipettiert und bis zur ELISA-Messung bei -80°C aufbewahrt. Das retrobulbär gewonnene Blut von Mäusen wurde bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert, das somit getrennte Serum wurde ebenfalls abpipettiert und bis zur ELISA-Messung bei -20°C aufbewahrt. Die IFN-γ und TNF-α Konzentrationen im Zellkulturüberstand bzw. Serum wurden laut Anleitung der Duo-Set-ELISA-Kits von R&D Systems durchgeführt und in einem Photometer (Rainbow Reader) gemessen. Die Kits basieren auf dem Protein-Nachweis mittels Sandwich ELISA. Dabei werden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand zunächst an einen *Capture*-Antikörper in einer 96-Well-Platte gebunden und mittels eines zweiten biotinylierten Antikörpers (*Detection*) detektiert. Die

---

Bindung dieses Antikörpers wird anhand eines Streptavidin-HRP Konjugats in Kombination mit einem Substrat nachweisbar. Das Produkt der Enzym-Substrat-Umsetzung ist photometrisch detektierbar und anhand einer Standardkurve quantifizierbar.

### **3.3.2 FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*)-Analyse**

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer bei 1200 rpm für 8 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden, dem Experiment entsprechend, mit Antikörpern für 10 min auf Eis inkubiert. Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen wurden daran anschließend in FACS-Puffer hergestellt. Überschüssige Antikörper wurden nach Inkubation mit FACS-Puffer herausgewaschen. Für den intrazellulären Nachweis von IFN- $\gamma$  bzw. Granzym B wurden spezielle Kits verwendet. So wurden die Zellen zum Nachweis von IFN- $\gamma$  mit Hilfe des „Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization kit with GolgiPlug“ von BD und Granzym B mit dem „Foxp3 staining buffer Set“ von eBioscience vorbereitet. Golgi Plug dient der intrazellulären Akkumulation von Proteinen, um diese nach Permeabilisierung der Zellen anhand eines Antikörpers im FACS nachzuweisen. Sämtliche FACS-Analysen wurden am FACSCanto-II von Becton Dickinson durchgeführt und mit Hilfe der FlowJo Software ausgewertet. Die *Mean fluorescenc intensity* (MFI) wurde wie folgt kalkuliert: Geo Mean Antigen/Geo Mean Isotyp.

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 *rtPCR OX40***

Zunächst wurde nach der Kokultur aus BMCMCs und NK-Zellen bzw. den Einzelkulturen aus BMCMCs bzw. NK-Zellen oder T-Zellen RNA mit Hilfe des RNeasy® Plus Mini Kits isoliert. Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 0,5  $\mu$ g RNA mit 0,5  $\mu$ g oligodT Primern auf ein Volumen von 12,5  $\mu$ l mit Wasser aufgefüllt und 5 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt und mit 5x Reaktionspuffer, 1 mM 4 dNTP Mix und Wasser auf ein Volumen von 19  $\mu$ l aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C wurden jedem Ansatz 200 Units Reverse Transkriptase zugesetzt, bevor für 60 min bei 42°C und weiteren 10 min bei 70°C inkubiert wurde. Mit der so gewonnenen cDNA wurde eine PCR zur Detektion von OX40 durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 6  $\mu$ l der cDNA zusammen mit 40 pmol

---

der Primer OX40 1a bzw. OX40 1b (siehe 3.1.3.6), 12,5 µl HotStarTaq Master Mix (1,25 Units HotStarTaq DNA Polymerase, 1xPCR-Puffer, 200 µM von jedem dNTP), Wasser und 2% DMSO wie folgt inkubiert:

94°C	3 min
_____ 40 Zyklen _____	
94°C	30 sec
59,8°C	1 min
72 °C	45 sec
_____	
72°C	2 min
4°C	∞

Den 25 µl PCR Produkt wurden 2 µl 10x Laufpuffer zugesetzt und die DNA Fragmente wurden in einem 2%-igen horizontalen Agarosegel in TAE-Puffer bei 120 V für 20 min elektrophoretisch aufgetrennt. Zu ihrer Größenbestimmung wurde eine 50 bp DNA Leiter eingesetzt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert.

### ***3.4.2 Retrovirale Transduktion von RMA/S Zellen zur stabilen Expression von transgenem GFP***

Zur Etablierung eines stabil integrierten GFP in RMA/S Zellen erfolgte ein Gentransfer mittels Retroviren. Die RMA/S Zellen wurden mehrmals mit den Viren transduziert, um eine möglichst hohe Transduktionsrate zu erreichen.

Die verwendeten Spenderzellen 293 Phoenix GP wurden in einer 6 cm Schale in einem Volumen von 4 ml und einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium von den Zellen entfernt und mit 2 ml neuem, serumfreien Medium inkubiert. Währenddessen wurden 5 µg des Plasmids pLEIN mit PEI Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieses Transfektionsgemisch zu den Spenderzellen gegeben und für 4 h inkubiert, bevor es entfernt wurde. Die transfizierten Spenderzellen wurden für 24 h mit frischem Medium inkubiert.

Zur Transduktion der Zielzellen am zweiten und dritten Tag nach der Transfektion wurde der Retroviren-haltige Mediumüberstand der Spenderzellen abgenommen und bei 300 x g für 6 min bei 4°C zentrifugiert. Die Spenderzellen wurden erneut mit frischem Medium

versorgt. Zur Infektion der RMA/S Zielzellen wurde 1,5 ml des Retroviren-haltigen Überstands mit einem gleichen Teil frischem Medium sowie 4 µg/ml Polybren gemischt und auf die Zielzellen gegeben. Nach einer 4-stündigen Inkubation wurde das Medium durch neuen Retroviren-haltigen Mediumüberstand ersetzt und erneut für 4 h mit den Zielzellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit frischem Medium inkubiert, bevor am folgenden Tag die Transduktion wiederholt wurde.

Nach der Expansion der Zellen wurden die transduzierten Zellen anhand ihrer GFP Expression mittels Zellsortierung isoliert. Die erhaltenen GFP-positiven RMA/S Zellen wurden mittels Neomycin-Zusatz zum Medium weiter selektioniert.

### 3.5 Tierexperimentelle Methoden

Alle Experimente an Mäusen oder mit murinem Material wurden durch den Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Hochschule Hannover bzw. durch das Dezernat für Tierschutz des niedersächsischen Landesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (AZ 09/1749 (LPS *in vivo*), AZ 08/1466 (RMA/S-GFP *in vivo*)).

Zur Isolation von Knochenmark für die Differenzierung muriner Mastzellen wurden C57BL/6 und BALB/c Mäuse verwendet. Um den Einfluss von TNF auf die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen zu untersuchen, wurden aus dem Knochenmark von TNF<sup>-/-</sup> Mäusen Mastzellen differenziert. Die *in vivo* Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen wurde in WT- und Wsh-Mäusen analysiert.

#### 3.5.1 LPS *in vivo* Experiment

WT- und Mastzell-defizienten Wsh-Mäusen wurden 100 µg LPS pro 25 g Körpergewicht in einem Volumen von 200 µl PBS mit einer 27Gx1/2 Kanüle intraperitoneal injiziert. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde alle 3 h kontrolliert. Nach 14 h wurden die Mäuse getötet. Unmittelbar nach dem Eintreten des Todes wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen und abzentrifugiert, um Serum zu gewinnen. Peritonealzellen, mittels Peritoneallavage isoliert (siehe 3.5.1.1), Milz und inguinale sowie axiale Lymphknoten wurden entnommen. Aus den isolierten Milzen wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen (siehe 3.2.2). Zur Beseitigung größerer Gewebeverbände wurde die Zellsuspension durch eine 40 µm Nylonmembran geleitet. Die gewonnenen Zellen wurden wie zuvor

---

beschrieben auf NK-Zellen bzw. intrazelluläres IFN- $\gamma$  gefärbt und im FACS analysiert (siehe 3.3.2).

### **3.5.1.1 Peritoneallavage (PL)**

Zur Isolation von Peritonealzellen wurde eine Peritoneallavage, auch Bauchspülung genannt, durchgeführt. Hierfür wurde den getöteten Tieren mit einer 27Gx1/2 Kanüle 2 ml PBS i.p. injiziert. Nach Durchmischung der Peritonealflüssigkeit mit dem injizierten PBS wird die gesamte Flüssigkeit mit einer 27Gx1/2 Kanüle abgesaugt und auf Eis gelagert. Die Zellen werden zur weiteren Verwendung zweimal mit je 5 ml PBS für 8 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert.

### **3.5.2 RMA/S-GFP Experiment in vivo**

WT- und Wsh-Mäuse wurden  $10 \times 10^6$  RMA/S-GFP Tumorzellen in einem Volumen von 300  $\mu$ l PBS mit einer 27Gx1/2 Kanüle intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden nach 24 bzw. 48 h getötet. Peritonealzellen, mittels Peritoneallavage isoliert (siehe 3.5.1.1), Milz und inguinale sowie axiale Lymphknoten wurden entnommen. Aus den isolierten Milzen und Lymphknoten wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen. Zur Beseitigung größerer Gewebeverbände wurde die Zellsuspension durch eine 40  $\mu$ m Nylonmembran geleitet. Ein Teil der Peritonealzellen wurde direkt auf die Anwesenheit von GFP-positiven RMA/S Zellen und den Anteil apoptotischer Tumorzellen mittels Annexin V Färbung durch FACS analysiert. Der andere Teil isolierter Einzelzellkulturen wurde zur Akkumulation intrazellulärer Proteine für 4 h unter Anwesenheit von Golgi Plug bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit Iono/PMA. Im Anschluss wurden die Zellen wie zuvor beschrieben auf NK-Zellen bzw. intrazelluläres Granzym B gefärbt und durch FACS ausgewertet (siehe 3.3.2).

## **3.6 Sonstige Methoden**

### **3.6.1 Zytotoxizitäts Nachweisverfahren**

YAC Zellen, die sensitiv für die Lyse durch NK-Zellen sind, wurden mit 10  $\mu$ Ci <sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>/10<sup>5</sup> Zellen in 10  $\mu$ l Medium für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nachdem

---

die YAC Zellen von überschüssigem, nicht aufgenommenem  $^{51}\text{CrO}_4$  mittels mehrerer Waschschrte befreit wurden, wurden diese mit BMCMCs und/oder NK-Zellen bzw. allein (zur Bestimmung der maximal freigesetzten Menge) in einem Volumen von 180  $\mu\text{l}$  in einer 96 Well V-Boden-Platte und jeweils im Verhältnis 10:1, 5:1, 2.5:1 und 1.25:1 in dreifach Ansätzen kultiviert. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden je 100  $\mu\text{l}$  vom Zellkulturüberstand entnommen, in eine neue 96 Well Platte überführt und mit je 100  $\mu\text{l}$  Scintillations-Flüssigkeit versehen. Die durch Lyse freigesetzten  $^{51}\text{CrO}_4$  Mengen wurden mit Hilfe eines Wallac 1450 MicroBeta Trillux gemessen und die Zytotoxizität wurde wie folgt kalkuliert: (Freigestzte Menge/ maximale Freisetzung YAC Zellen) x 100.

### ***3.6.2 $\beta$ -Hexosaminidase-Nachweisverfahren***

Um Mastzellen via Fc $\epsilon$ RI zu stimulieren wurden BMCMCs 48 h vor dem eigentlichen Stimulationsexperiment in einer Zelldichte von  $1 \times 10^6/\text{ml}$  ausgesät und mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IgE-anti-DNP inkubiert. Zur Bestimmung der freigesetzten Menge  $\beta$ -Hexosaminidase als Maß für die Aktivierung von Mastzellen wurden BMCMCs und NK-Zellen als Kokultur zusammen oder getrennt durch eine Transwell-Membran oder als Singlezellkultur stimuliert mit oder ohne 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS oder mit 100  $\text{ng}/\text{ml}$  DNP für 20 h bei 37°C. BMCMCs, für 1 h mit 1.3  $\mu\text{M}$  Ionomycin und 50  $\text{nm}$  PMA stimuliert, dienten als Positivkontrolle. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen und der Überstand aus der Zellkulturplatte entnommen und durch Zentrifugation getrennt. Die Zellsedimente wurden mit 1% TritonX100 lysiert, um anschließend 50  $\mu\text{l}$  des Lysats und des Überstandes mit 100  $\mu\text{l}$  2,5  $\text{mM}$  Nitrophenyl-N-acetyl-beta-D Glucosaminid (gelöst in 0,05  $\text{M}$  Citratpuffer (pH 4.5)) zu inkubieren. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zusatz von 50  $\mu\text{l}$  0,4  $\text{M}$  Glycin (pH 10.7) gestoppt. Das Produkt aus der enzymatischen Umsetzung wurde mit einem Photometer (Rainbow Reader) bei einer Wellenlänge von 405  $\text{nm}$  gemessen. Der prozentuale Anteil  $\beta$ -Hexosaminidase in den Ansätzen wurde wie folgt berechnet: [(Überstand)/(Überstand + Lysat)] x 100%.

### **3.7 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde die Software Graph Pad Prism und Excel verwendet. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standard Error des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktion und Phänotyp differenzierter Mastzellen

Zur phänotypischen Untersuchung der *in vitro* generierten Mastzellen wurden diese regelmäßig anhand von Zytospins und FACS-Analysen untersucht. Es zeigte sich, dass die aus dem femoralen Knochenmark von C57BL/6 Mäusen differenzierten Zellen nach 4 bis 6 Wochen in der Pappenheim-Färbung die typischen metachromatischen Granula enthielten und bis zu 97% der vorliegenden Zellen eindeutig als Mastzellen identifiziert werden konnten (Abb.3A).

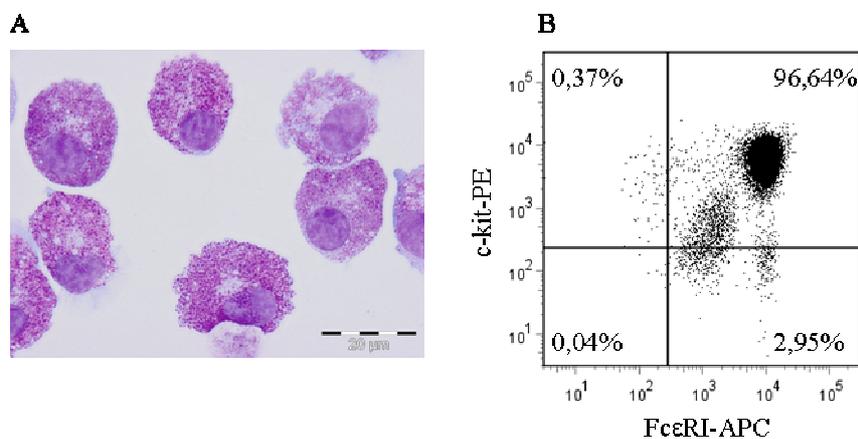


Abbildung 3: Aus dem Knochenmark differenzierte Zellen enthalten metachromatische Granula und exprimieren c-kit und FcεRI.

Abbildung 3A zeigt ein repräsentatives Foto eines Zytospins 6 Wochen alter Zellen, die mit May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden und mit einer 100x Vergrößerung dargestellt sind. Zu sehen sind einige Zellen, die aufgrund ihrer typischen metachromatischen Granula eindeutig als Mastzellen identifiziert werden können. In Abbildung 3B ist ein Dot Blot einer FACS-Analyse 6 Wochen alter Zellen abgebildet. Die Zellen wurden zuvor mit einem anti-c-kit sowie einem anti-FcεRI Antikörper inkubiert und erscheinen im FACS als „doppelt-positive“ Zellen.

Weiterhin unterstützt wurde dieses Ergebnis durch eine FACS-Analyse, bei der die zu untersuchenden Zellen mit einem anti-FcεRI-Antikörper gefärbt wurden. Bei dieser Technik handelt es sich um einen Nachweis des hoch affinen, IgE-bindenden FcεRI auf den Zellen. Des Weiteren wurde ein anti-CD117 (c-kit)-Antikörper verwendet. Mastzellen zeichnen sich durch die Expression von FcεRI und c-kit auf ihrer Oberfläche aus und können im FACS anhand der beschriebenen Doppelfärbung als „doppelt-positive“-Zellen erkannt werden

(Abb.3B). Die FACS-Analyse bestätigte die Ergebnisse der Pappenheim-Färbung, wonach es sich bei den aus dem Knochenmark differenzierten Zellen um Mastzellen handelte.

Darüber hinaus wurden funktionelle Experimente durchgeführt, die den Reifezustand der generierten Mastzellen überprüfen sollten. Hierzu wurden 5 bis 6 Wochen alte BMCMCs (zum Teil mit IgE-anti-DNP für 48 h vorinkubiert) mit DNP oder Iono/PMA als Positivkontrolle bzw. ohne Stimulanz als Negativkontrolle für 6 h stimuliert, um die Freisetzung von TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand anhand eines ELISA zu quantifizieren. Die Stimulation von Mastzellen mittels DNP sowie Iono/PMA resultierte in einer signifikant höheren Menge an TNF- $\alpha$  im Überstand im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb.4A). Dieses Experiment zeigte, dass es sich bei den *in vitro* generierten Zellen um Zellen handelt, die durch Stimulation mittels DNP in Kombination mit vorheriger Inkubation mit IgE-anti-DNP, befähigt sind größere Mengen TNF- $\alpha$  freizusetzen. Um weiterhin zu bestätigen, dass es sich um reife Mastzellen handelt, wurde ein  $\beta$ -Hexosaminidase-Test durchgeführt. Bei diesem Test handelt es sich um die Quantifizierung eines unter Stimulation freigesetzten Enzyms, welches indirekt anhand eines Produkts photometrisch nachgewiesen werden kann. Der  $\beta$ -Hexosaminidase-Test ist eine standardisierte Methode zur Bestimmung der Funktionalität von Mastzellen. Auch hier wurden 5 bis 6 Wochen alte, *in vitro* generierte Zellen für 48 h mit IgE-anti-DNP vorinkubiert und im anschließenden Experiment mit DNP bzw. ohne Stimulanz als Negativkontrolle für 20 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Mastzellen für 1 h mit Iono/PMA inkubiert. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg an  $\beta$ -Hexosaminidase nach Stimulation mit DNP im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb.4B). Ein signifikanter Anstieg an  $\beta$ -Hexosaminidase in der Positivkontrolle mit Iono/PMA Stimulation im Vergleich zur Negativkontrolle bestätigte die Funktionalität des Tests.

---

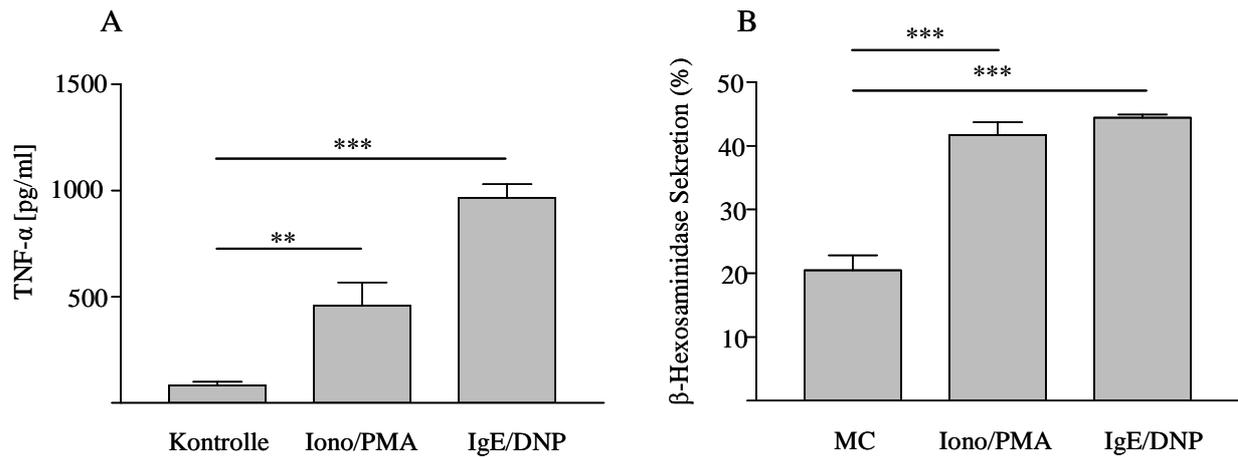


Abbildung 4: Aus dem Knochenmark differenzierte Zellen sekretieren nach Stimulation TNF- $\alpha$  und  $\beta$ -Hexosaminidase.

Abbildung 4A zeigt die ELISA-Auswertung fünf unabhängiger Experimente, bei denen die aus Knochenmark differenzierten Mastzellen im Alter von 5 bis 6 Wochen in Anwesenheit von Iono/PMA, DNP bzw. ohne Stimulanz als Kontrolle für 6 h inkubiert wurden. Der Zellkulturüberstand wurde für TNF- $\alpha$  ELISA-Messungen verwendet. In 4B ist die Auswertung von vier unabhängigen  $\beta$ -Hexosaminidase-Tests zu sehen. Auch hierfür wurden 6 Wochen alte Knochenmarkzellen verwendet. Dargestellt ist die prozentuale Sekretion von  $\beta$ -Hexosaminidase von Zellen, die ohne Stimulanz inkubiert wurden, im Vergleich zu Zellen, die mit IgE/DNP bzw. Iono/PMA stimuliert wurden. Student's t-Test; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,005.

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Pappenheim-Färbung, der FACS-Analyse und der TNF- $\alpha$  Messung bestätigt die  $\beta$ -Hexosaminidase Messung, dass es sich bei den *in vitro* generierten Zellen um reife Mastzellen handelt.

## 4.2 Potentielle Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen

NK-Zellen wurden mittels FACS-Sortierung in der Zellsortierungseinheit der Medizinischen Hochschule Hannover isoliert. Zuvor wurden murine Milzzellen mit einem anti-CD3- und einem anti-CD49b-Antikörper inkubiert, um beim FACS-Sortieren eine Selektion von CD49b-positiven und CD3-negativen Zellen zu ermöglichen.

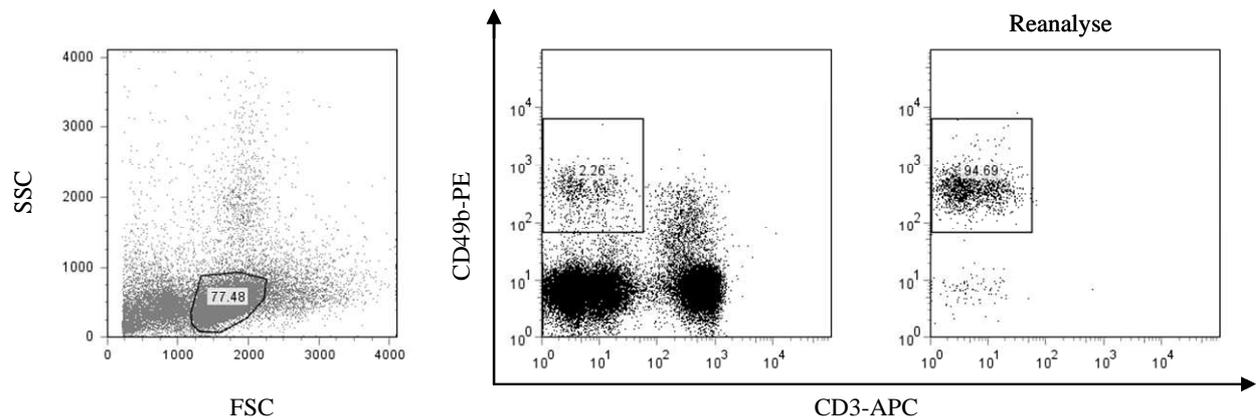


Abbildung 5: Die Reinheit der sortierten NK-Zellen beträgt ca. 95%.

Dargestellt sind Dot Blots einer exemplarischen Zellsortierung von NK-Zellen aus murinen Milzen. Der Anteil an NK-Zellen beträgt 2,26% der gesamten Lymphozyten. Die Reanalyse der sortierten NK-Zellen ergab eine Reinheit von 94,69%.

Die so gewonnenen Zellen (ca. 2% der gesamten Milzzellen) waren zu 94-98% NK-Zellen (Abb.5). Zunächst wurden die sortierten NK-Zellen zur Etablierung der NK-Zellkultur mit verschiedenen Konzentrationen IL-2 in verschiedenen Volumina getestet, um die Vitalität der Zellen nach 24 bzw. 48 h zu überprüfen. Eine IL-2-Konzentration von 600 U/ml in Kombination mit einer Inkubationszeit von 24 h in einem Volumen von 150  $\mu$ l in einer 96-Well-Rundboden-Platte stellte sich als optimal zur Kultivierung der sortierten NK-Zellen heraus. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen LPS auf NK-Zellen untersucht.

Die isolierten NK-Zellen wurden im Folgenden mit den (wie unter 3.2.1 beschriebenen) getesteten Mastzellen kokultiviert, um einen Einfluss von Mastzellen auf die produzierte und sezernierte Menge IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen unter Anwesenheit von LPS zu analysieren. In einem initialen Experiment wurde zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Interaktion eine Kinetik-Analyse durchgeführt, bei der NK-Zellen und Mastzellen zusammen oder allein als Kontrolle mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 12, 24, 48 und 72 h inkubiert wurden (Abb.6). Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und der zellfreie Überstand wurde zur Quantifizierung der freigesetzten Menge IFN- $\gamma$  für ELISA-Messungen verwendet. Hierbei zeigte sich die höchste IFN- $\gamma$  Konzentration im Zellüberstand nach 24 h.

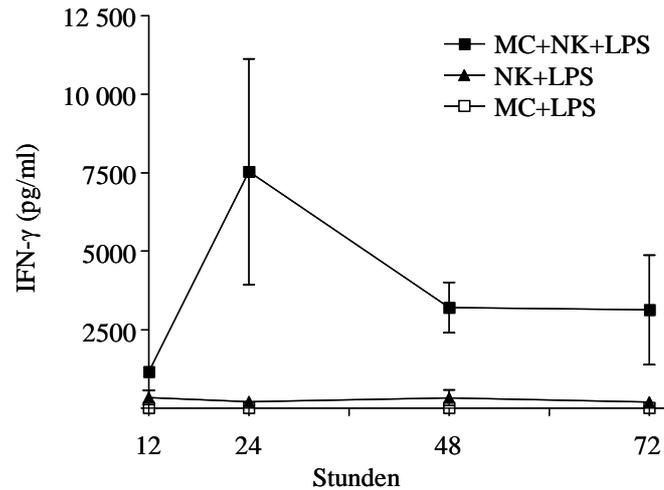


Abbildung 6: Höchste IFN- $\gamma$  Konzentration im Zellüberstand der Kokultur mit LPS nach 24 h.

Abgebildet ist die Zusammenfassung von IFN- $\gamma$  ELISA-Messungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Kokulturen aus Mastzellen und NK-Zellen bzw. Kulturen mit Mastzellen bzw. NK-Zellen allein, die nach 12, 24, 48 oder 72 h beendet wurden. Die Zellen wurden jeweils in einem Volumen von 150  $\mu$ l unter Anwesenheit von 1  $\mu$ g/ml LPS und 600 U/ml IL-2 kultiviert.

In den folgenden Experimenten wurden (außer, wenn anders beschrieben) Mastzellen und NK-Zellen für 24 h in einem Volumen von 150  $\mu$ l und 600 U/ml IL-2 in einer 96-Well-Rundboden-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Um eine Dosisabhängigkeit des in Abb.5 gezeigten Effekts zu untersuchen, wurden Mastzellen und NK-Zellen zusammen oder allein in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen LPS (0,01  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml bzw. 1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Die mittels ELISA ermittelten Ergebnisse zeigten eine deutliche Dosisabhängigkeit mit signifikanter IFN- $\gamma$  Sekretion nach Inkubation von Mastzellen mit NK-Zellen und Stimulanz mit 0,1  $\mu$ g/ml bzw. 1  $\mu$ g/ml LPS im Vergleich zu NK-Zellen und Mastzellen allein (Abb.7).

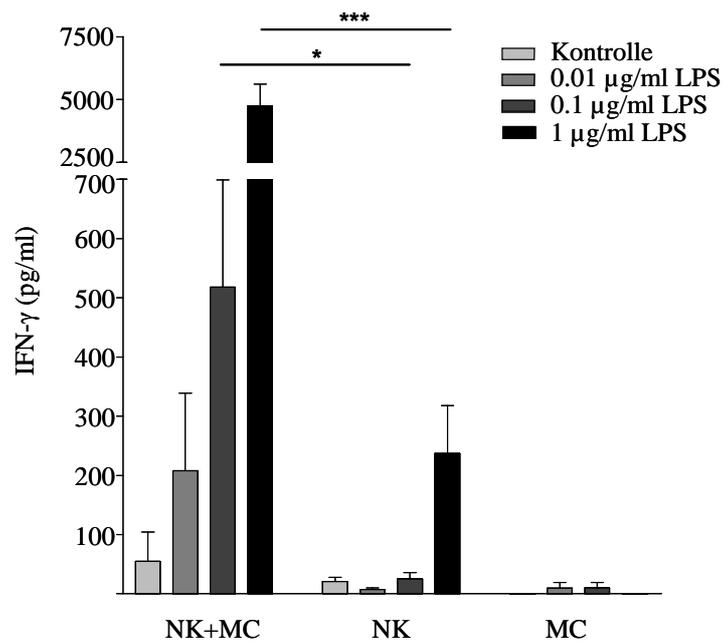


Abbildung 7: Erhöhte Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch Kokultur von Mastzellen mit NK-Zellen unter Einfluss von LPS.

Zur Überprüfung der freigesetzten Menge IFN- $\gamma$  wurden Mastzellen zusammen mit NK-Zellen bzw. Kulturen aus den jeweiligen Zellen allein für 24 h mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml LPS bzw. ohne LPS inkubiert. Der zellfreie Überstand diente der IFN- $\gamma$  Konzentrations-Bestimmung mittels ELISA. Dargestellt ist die Zusammenfassung von mindestens vier unabhängigen Experimenten mit Zellen aus verschiedenen Aufarbeitungen. Student's t-Test; \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,005.

Dennoch kann anhand einer ELISA-Messung die Quelle des ausgeschütteten Zytokins nicht sicher ermittelt werden. Trotz der Kontrollen bestand die Möglichkeit, dass Mastzellen durch die Anwesenheit von NK-Zellen zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Zur Überprüfung, welche Zelle in der Kokultur die Hauptquelle des detektierten IFN- $\gamma$  war, wurde eine intrazelluläre FACS-Analyse durchgeführt (Abb.8).

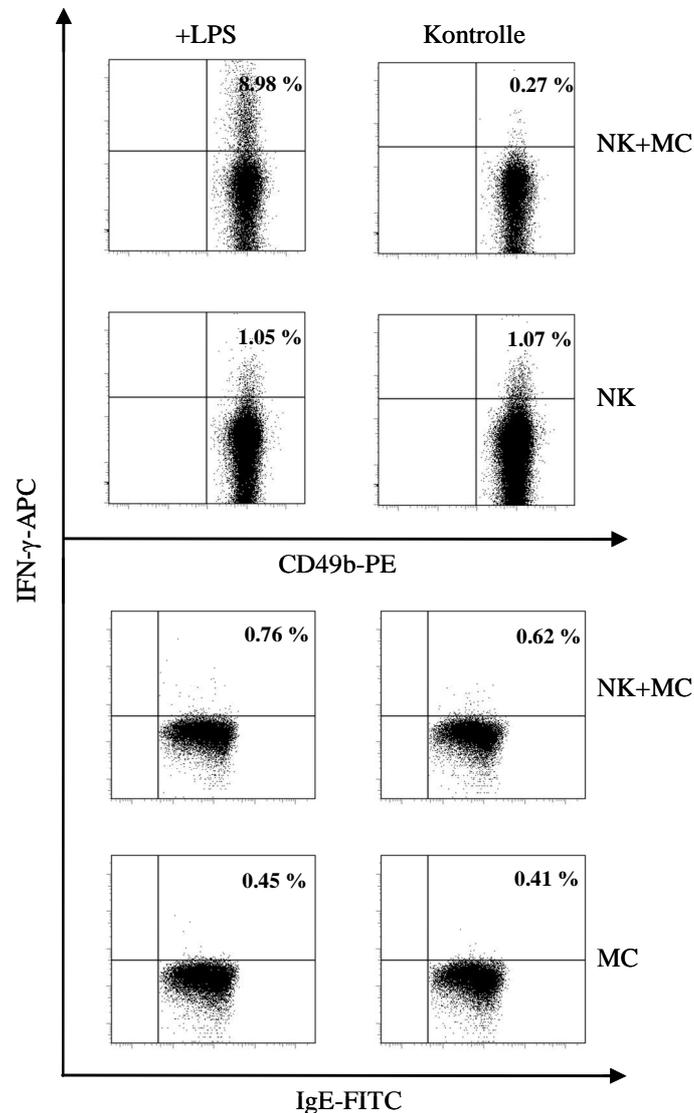


Abbildung 8: Identifizierung von NK-Zellen als IFN- $\gamma$  Quelle nach Kokultur mit Mastzellen und LPS.

Dargestellt sind exemplarische Dot Blots einer FACS-Analyse. Zur intrazellulären Akkumulation von IFN- $\gamma$  wurde den jeweiligen Ansätzen nach 12 h Inkubation für weitere 6 h Golgi Plug zugesetzt. Anschließend wurden die zu analysierenden Zellen mit anti-CD49b-PE, anti-IgE-FITC und anti-IFN- $\gamma$ -APC inkubiert und im FACS analysiert. Hierbei diente anti-IgE als Antikörper zum Nachweis von Mastzellen und anti-CD49b zur Erkennung von NK-Zellen. Zu erkennen ist die intrazelluläre Akkumulation von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen (gated auf CD49b-PE-positive Zellen) bzw. Mastzellen (gated auf IgE-FITC-positive Zellen) in Kokultur oder allein bzw. unter dem Einfluss von 1  $\mu$ g/ml LPS oder ohne Stimulanz.

Da anhand der Kinetik bekannt war, dass die größte Menge IFN- $\gamma$  zwischen 18 und 24 h Inkubationszeit sezerniert wird, wurde den Zellen nach 12 h Golgi Plug für weitere 6 h zugesetzt, um IFN- $\gamma$  in den Zellen zu akkumulieren. Anhand der schon zuvor erläuterten NK-

Zell-Färbung, einer indirekten Mastzell-Färbung mittels IgE-anti-DNP und einem anti-IgE Antikörper, konnten die beiden Zelltypen in der FACS-Analyse unterschieden und anhand einer intrazellulären Färbung auf ihren IFN- $\gamma$  Gehalt überprüft werden. Die Analyse zeigte eine erhöhte Anzahl IFN- $\gamma$ -positiver NK-Zellen nach Kokultur mit Mastzellen und LPS im Vergleich zur Kokultur ohne LPS bzw. NK-Zellen allein (Abb.8). Hingegen konnten kaum IFN- $\gamma$ -positive Mastzellen detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigten die ELISA-Messungen, dass durch die Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen in Anwesenheit von LPS die NK-Zellen zur Produktion und Freisetzung von IFN- $\gamma$  angeregt werden.

In den gleichen Zellüberständen, die für die ELISA-Messungen in Abbildung 6 verwendet wurden, wurde die freigesetzte Menge TNF- $\alpha$  gemessen (Abb.9). Hierbei konnte ebenfalls eine Dosisabhängigkeit festgestellt werden, die jedoch keinen signifikanten Einfluss einer Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen auf die freigesetzte Menge TNF- $\alpha$  zeigte. So steigt die in den Überstand abgegebene Menge TNF- $\alpha$  mit wachsender LPS Konzentration, jedoch ist hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen der Kokultur aus Mastzellen mit NK-Zellen bzw. Mastzellen allein zu sehen. Jedoch lässt sich festhalten, dass Mastzellen die „Hauptquelle“ des freigesetzten TNF- $\alpha$  zu sein scheinen, da NK-Zellen allein nur geringe Mengen TNF- $\alpha$  freisetzen.

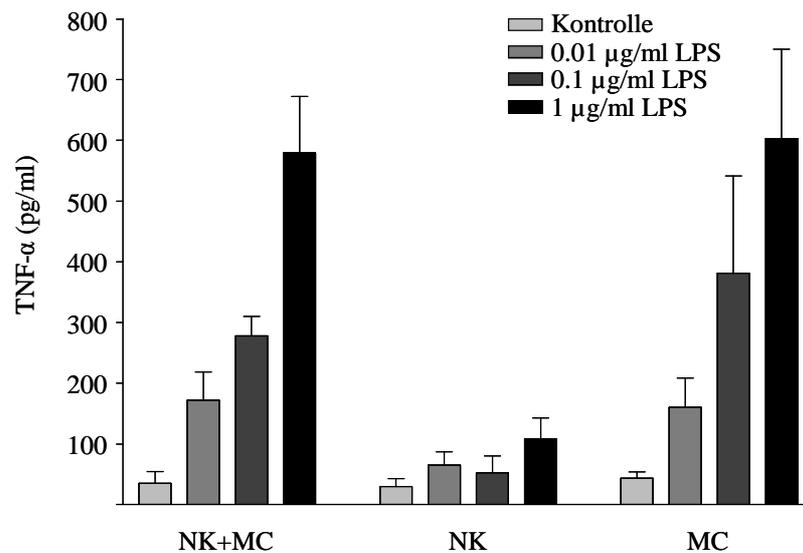


Abbildung 9: LPS-abhängige, NK-Zell-unabhängige Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen.

Zur Überprüfung der freigesetzten Menge TNF- $\alpha$  wurden Mastzellen zusammen mit NK-Zellen bzw. Kulturen aus den jeweiligen Zellen allein für 24 h mit 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS bzw. ohne LPS inkubiert. Der nach Zentrifugation gewonnene zellfreie Überstand diente der TNF- $\alpha$  Konzentrations-Bestimmung mittels ELISA. Dargestellt ist die Zusammenfassung mindestens drei unabhängiger Experimente mit Zellen aus verschiedenen Aufarbeitungen.

Anhand der Oberflächenexpression von CD69 wurde die Aktivierung der NK-Zellen analysiert (Abb.10). Hierzu wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit einem anti-CD69 Antikörper inkubiert und mittels FACS analysiert. Nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen mit LPS konnte ein signifikanter Anstieg der MFI für CD69 auf NK-Zellen im Vergleich zur Kokultur ohne LPS detektiert werden.

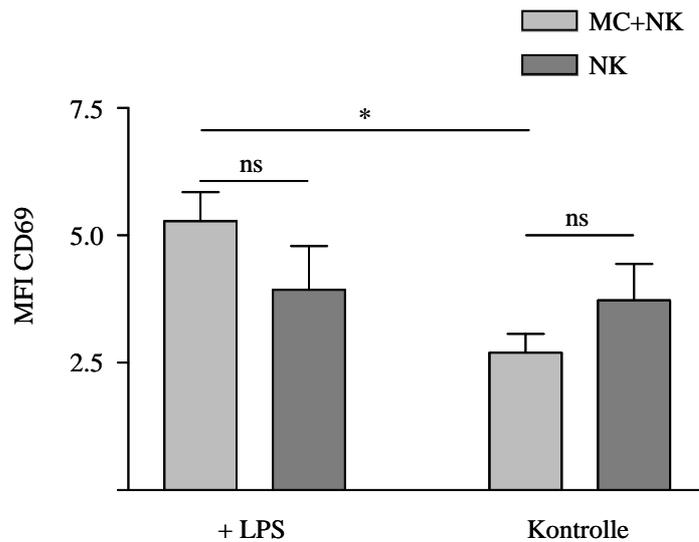


Abbildung 10: Expressions-Steigerung des Aktivierungsmarkers CD69 nach Kokultur von NK-Zellen mit Mastzellen und LPS.

Dargestellt ist der MFI von CD69 auf NK-Zellen nach Kokultur bzw. Singlekultur mit und ohne LPS. Zur Analyse der Expression von CD69 wurden die verwendeten Zellen nach 24-stündiger Inkubation im FACS auf CD49b-positive Zellen (NK-Zellen) gegatet. Zu sehen ist die Zusammenfassung der MFIs von drei unabhängigen Experimenten. Student's t-Test; \* $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant.

Die Steigerung des MFI für CD69 auf NK-Zellen nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen mit LPS wies auf eine Aktivierung der NK-Zellen hin und bestätigte die Resultate der vorherigen Experimente. Jedoch konnte keine signifikante Veränderung des MFI für CD69 zwischen den Kokulturen und NK-Zell Monokulturen gemessen werden.

Der Einfluss der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen auf die Degranulierung von Mastzellen wurde mittels eines  $\beta$ -Hexosaminidase-Tests analysiert (Abb.11). Die Stimulation von Mastzellen mit IgE/DNP bzw. Iono/PMA führte zu einer signifikanten Degranulierung im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen. Die Kokultur von Mastzellen mit NK-Zellen hatte, unabhängig von der Stimulation mit LPS, keine signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von  $\beta$ -Hexosaminidase im Vergleich zu unstimulierten Mastzellen. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen von Matsushima et al. (58), dass die Stimulation von Mastzellen mittels LPS im Vergleich zu IgE/DNP keinen Einfluss auf die Degranulierung der Zellen hat.

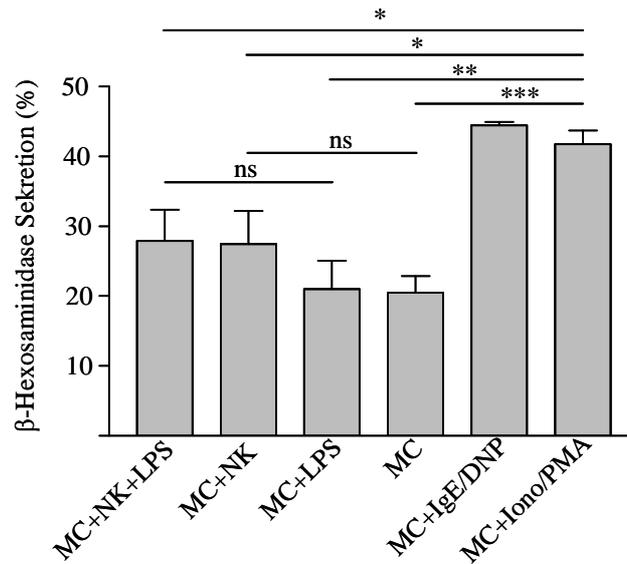


Abbildung 11: Keine Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf die  $\beta$ -Hexosaminidase Sekretion nach Stimulationen mit LPS.

Mastzellen wurden zusammen mit NK-Zellen in An- oder Abwesenheit von LPS bzw. allein mit Ige/DNP, Iono/PMA oder ohne Stimulanz inkubiert. Die freigesetzte Menge  $\beta$ -Hexosaminidase wurde als prozentuale Sekretion anhand der optischen Dichte nach enzymatischer Umsetzung im Überstand bzw. Zelllysate errechnet. Dargestellt ist die Zusammenfassung aus vier unabhängigen Experimenten mit Zellen aus verschiedenen Aufarbeitungen. Student's t-Test; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ , ns, nicht signifikant.

Zur weiteren Überprüfung der Signifikanz der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen wurde der Einfluss von LPS auf die freigesetzte Menge IFN- $\gamma$  anhand verschiedener NK-Zellzahlen analysiert (Abb.12). Hierzu wurden  $0,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  oder  $1,5 \times 10^6$  NK-Zellen bzw. Mastzellen mit  $0,5 \times 10^6$  NK-Zellen für 24 h mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS inkubiert. Auch die Stimulation von  $1 \times 10^6$  und  $1,5 \times 10^6$  NK-Zellen mit LPS zeigte eine signifikant geringere, sekretierte Menge IFN- $\gamma$  im Vergleich zur Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen.

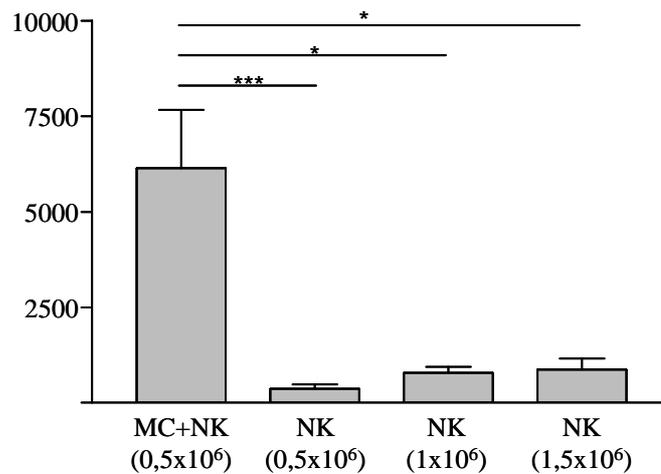


Abbildung 12: Zellzahl-abhängige Signifikanz der Sekretion von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit LPS.

Dargestellt ist die Zusammenfassung der IFN- $\gamma$  ELISA-Messungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Zellen aus unterschiedlichen Aufarbeitungen. Nach 24-stündiger Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen ( $0,5 \times 10^6$ ) bzw. NK-Zellen allein ( $0,5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1,5 \times 10^6$ ) mit LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) wurde der zellfreie Zellkulturüberstand für IFN- $\gamma$  ELISA-Messungen verwendet. Student's t-Test; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .

Diese Ergebnisse bestätigten den Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen nach Stimulation mit LPS. Des Weiteren konnte eine LPS-abhängige Expressionssteigerung des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche von NK-Zellen detektiert werden. Die Degranulation von Mastzellen konnte weder durch LPS noch durch die Anwesenheit von NK-Zellen angeregt werden und scheint somit keinen Einfluss auf die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen zu haben.

### 4.3 Einfluss von TNF- $\alpha$ auf die Mastzell-NK-Zell Interaktion

Wie bereits unter Ergebnisse 4.2 Abb.9 dargestellt, steigt die von Mastzellen sezernierte Menge TNF- $\alpha$  dosisabhängig unter dem Einfluss von LPS und deutet auf eine mögliche, essentielle Rolle von TNF- $\alpha$  in der Interaktion von Mastzellen mit NK-Zellen hin. TNF- $\alpha$  kommt in der Mastzell-Biologie eine bedeutende Rolle zu und auch in der Interaktion von Mastzellen mit T-Zellen spielt TNF- $\alpha$  eine kritische Rolle (80;81). Des Weiteren ist für NK-Zellen bekannt, dass diese sowohl den TNF-Rezeptor (TNFR) I, aktivierbar durch lösliches und membrangebundenes TNF, als auch TNFR II, der nur durch transmembranes TNF aktiviert werden kann, exprimieren (164). Somit wäre eine TNF- $\alpha$ -vermittelte Interaktion von

Mastzellen und NK-Zellen möglich. Zur Analyse dieser Hypothese wurden zunächst TNFR1- und TNFR2-blockierende Antikörper während der Kokultur verwendet (Abb.13A). Die mittels ELISA gemessenen IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Zellüberstand nach 24 h Inkubation zeigten eine leichte Reduktion der Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach Anwendung einer Kombination aus beiden TNFR Antikörpern, die jedoch, im Vergleich zur Inkubation ohne Antikörper nicht signifikant war. Zur Spezifizierung dieser Ergebnisse wurden Mastzellen aus TNF<sup>-/-</sup> Mäusen generiert und wie zuvor beschrieben mit NK-Zellen bzw. allein als Kontrolle inkubiert (Abb.13B).

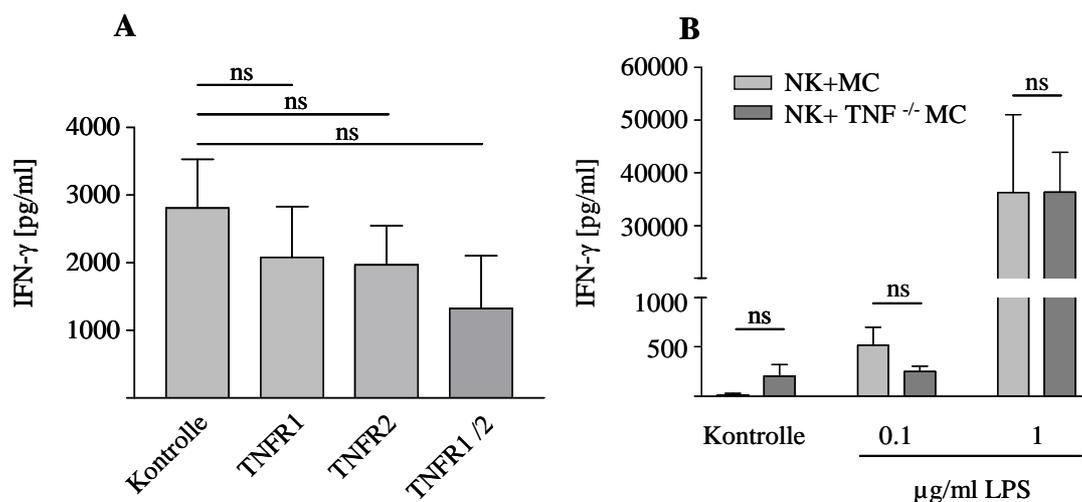


Abbildung 13: Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen ist TNF- $\alpha$  unabhängig

Dargestellt sind die Auswertungen der freigesetzte Menge IFN- $\gamma$  nach 24-stündiger Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen mit LPS in Anwesenheit von TNFR1, TNFR2 oder TNFR1 und TNFR2 oder ohne Antikörper (A), oder Kokultur mit Mastzellen bzw. TNF<sup>-/-</sup> Mastzellen mit NK-Zellen mit und ohne LPS (B). Abgebildet sind die Zusammenfassungen von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten. Student's t-Test; ns, nicht signifikant.

Die resultierenden IFN- $\gamma$  Konzentrationen bestätigen die Ergebnisse mit den blockierenden TNFR Antikörpern, dass die Mastzell-NK-Zell Interaktion, trotz einer LPS-induzierten TNF- $\alpha$  Sekretion, TNF- $\alpha$  unabhängig zu sein scheint.

#### 4.4 Einfluss weiterer Stimulatoren auf die Mastzell-NK-Zell Interaktion

Zur Analyse weitere, möglicher Substanzen zur Stimulation einer Mastzell-NK-Zell-Interaktion wurden Mastzellen und NK-Zellen, wie zuvor beschrieben, in Anwesenheit von weiteren TLR Liganden (Poly I:C bzw. CpG) oder bekannten Mastzellstimulatoren (IgE/DNP bzw. SCF) inkubiert. Die freigesetzte Menge an IFN- $\gamma$  wurde mittels ELISA bestimmt. Eine

Stimulation von Mastzellen mit SCF (Abb.14A) bzw. IgE/DNP (Abb.14B) konnte keinen signifikanten Anstieg an freigesetztem IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen hervorrufen. Jedoch erzeugte die Stimulation mittels Poly I:C (Abb.14C) und CpG (Abb.14D) eine signifikant höhere Freisetzung von IFN- $\gamma$  in der Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen im Vergleich zur Kokultur ohne Stimulanz bzw. zur CpG Kontrolle.

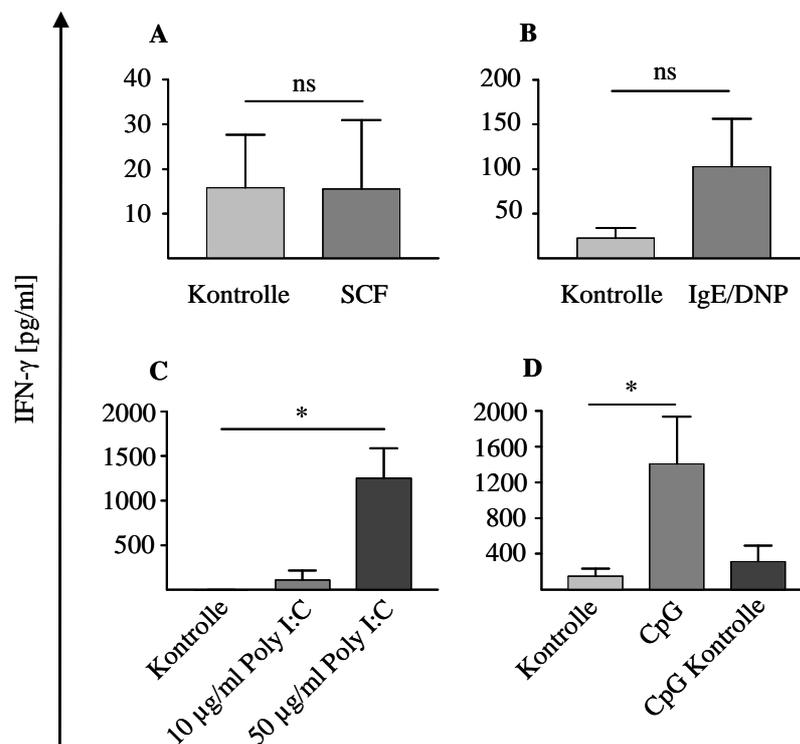


Abbildung 14: Stimulation der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen via TLR3 und TLR9

In Abbildung 14A-D sind die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen IFN- $\gamma$  ELISA-Messungen nach 24-stündiger Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen. Mastzellen und NK-Zellen wurden in Anwesenheit von SCF (A), IgE/DNP (B), Poly I:C (C), CpG (D) bzw. ohne Stimulanz oder mit der CpG Kontrolle inkubiert. Student's t-Test; \* $p < 0,05$ , ns, nicht signifikant.

Die durch TLR Liganden erzeugte Aktivierung der Mastzellen resultiert in der Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen und deutet somit auf eine essentielle Rolle dieser Zell-Zell Interaktion in der angeborenen Immunität hin. Im Vergleich hierzu scheint eine mit erworbener Immunität assoziierten Stimulation via Fc $\epsilon$ RI auf den Mastzellen keinen Einfluss auf die Mastzell-NK-Zell Interaktion zu haben.

## 4.5 Typus der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen

Als nächstes wurde ermittelt, ob es sich bei der beobachteten Mastzell-NK-Zell Interaktion um eine direkte Zell-Zell Interaktion oder eine Mediator-induzierte Interaktion handelt. Hierfür wurden zunächst Zellkulturüberstände von LPS-stimulierten Mastzellen für die Inkubation mit NK-Zellen verwendet und mit der Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen in Anwesenheit von LPS verglichen. Die sezernierten Mengen IFN- $\gamma$  wurden erneut mittels ELISA bestimmt und ergaben eine signifikant geringere Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand von NK-Zellen, die mit dem zellfreien Überstand LPS-stimulierter Mastzellen inkubiert wurden, im Vergleich zur direkten Mastzell-NK-Zell-Kokultur mit LPS (Abb.15A). Diese Ergebnisse deuten auf eine direkte Zell-Zell Interaktion zwischen beiden Zellen hin. Um diese Ergebnisse weiter zu spezifizieren wurden Mastzellen und NK-Zellen in einem Transwell-System durch eine für Zellen undurchdringliche Membran von 0,4  $\mu\text{m}$  getrennt und mit möglichem Zellkontakt ohne Membran inkubiert (Abb.15B). Die hier ermittelten IFN- $\gamma$  Konzentrationen bestätigten die Ergebnisse aus den Zellüberstands-Experimenten und zeigen eine signifikant geringere IFN- $\gamma$  Konzentration nach Separation der Zellen durch eine Membran.

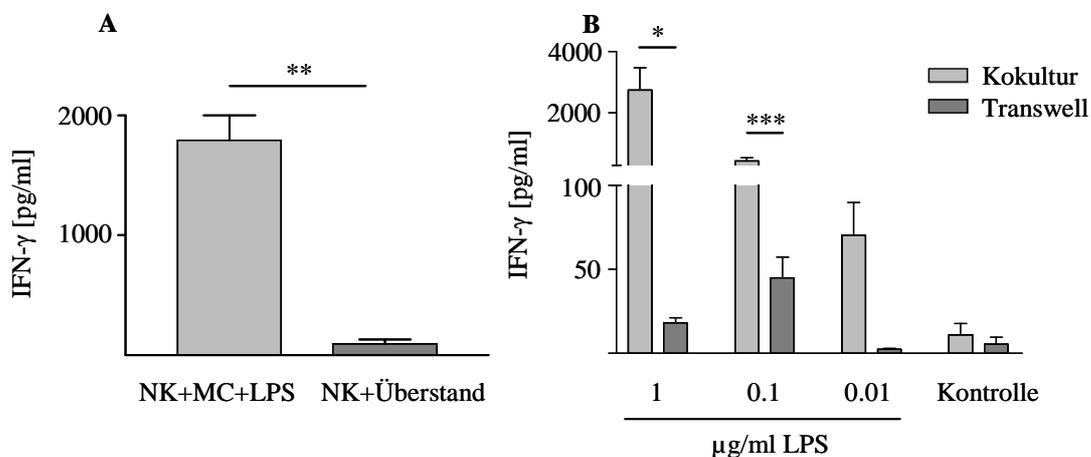


Abbildung 15: Zell-Zell-Kontakt ist essentiell für die Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen

Dargestellt sind die Zusammenfassungen der IFN- $\gamma$  ELISA-Messungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Abbildung 15A zeigt die Ergebnisse nach Inkubation von NK-Zellen mit Mastzellen und LPS bzw. mit dem zellfreien Überstand von Mastzellen, die zuvor für 24 h mit LPS stimuliert wurden. In Abbildung 15B sind die freigesetzten Mengen IFN- $\gamma$  nach Inkubation von Mastzellen und NK-Zellen mit verschiedenen Mengen bzw. ohne LPS im Transwell- oder Kokultur-System dargestellt. Student's t-Test; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ .

Zusätzlich bestätigt wurden diese Ergebnisse durch den Nachweis intrazellulären IFN- $\gamma$  nach Kokultur im Transwell- oder Kokultur-System (Abb.16). Nach direktem Zellkontakt zwischen Mastzellen und NK-Zellen waren 21,97% der NK-Zellen positiv für IFN- $\gamma$ , im Vergleich zu 7,36% IFN- $\gamma$ -positiven NK-Zellen nach Separation im Transwell-System.

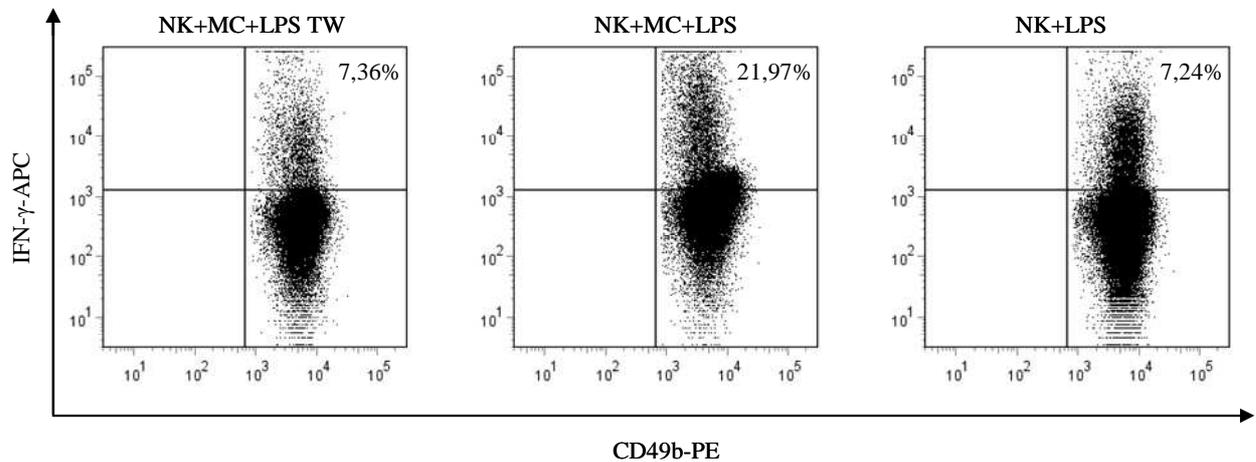


Abbildung 16: Zell-Zell-Kontakt ist essentiell für die Produktion von IFN- $\gamma$  nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen.

Dargestellt sind exemplarische Dot Blots einer FACS-Auswertung nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen mit LPS im Transwell (TW)- bzw. Kokultur-System und NK-Zellen mit LPS. Die Zellen wurden für 17 h inkubiert, bevor für weitere 4 h Golgi Plug zugesetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und mit einem anti-IFN- $\gamma$  Antikörper inkubiert. Im FACS wurden die CD49b-PE-positiven NK-Zellen auf ihren prozentualen Anteil IFN- $\gamma$ -positiver Zellen analysiert.

Die Ergebnisse aus den Abbildungen 15 und 16 deuten auf eine kritische Rolle einer direkten Zell-Zell Interaktion zwischen Mastzellen und NK-Zellen für die Produktion und Sekretion von IFN- $\gamma$  nach LPS Stimulation hin.

#### 4.6 Mögliche Interaktionspartner für die Mastzell-NK-Zell Interaktion

Da nun aus den bisherigen Ergebnissen bekannt war, dass es sich um eine TNF- $\alpha$ -unabhängige, Zell-Zell-Kontakt-abhängige, aktivierende Interaktion zwischen Mastzellen und NK-Zellen handelte, die die Produktion und Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen stimuliert, wurden anhand einer Literaturrecherche mehrere mögliche Interaktionspaare, bestehend aus Rezeptor und Ligand, eruiert.

Im Folgenden wurden die möglichen Interaktionspaare anhand des Einflusses blockierender Antikörper auf die freigesetzte Menge IFN- $\gamma$  überprüft. Hierfür wurden die Zielzellen mit

dem blockierenden Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert und nach anschließenden Waschschritten zur Entfernung ungebundenen Antikörpers mit der jeweils anderen Zelle inkubiert. Die gezeigten Werte entsprechen der prozentualen Änderung der IFN- $\gamma$  Freisetzung im Vergleich zur Isotypkontrolle (=100%). Bei Anwendung des blockierenden Antikörpers OX40L zur Blockierung von OX40L auf Mastzellen konnte eine Reduktion der IFN- $\gamma$  Freisetzung im Vergleich zur Isotypkontrolle von 45,3% erzielt werden (Abb.17A). Die Blockierung der Mastzellen bzw. NK-Zellen mit anti-ICOSL (Abb.17B), -CD70 (Abb.17C) oder -CD153 (Abb.17D), -B7-H1 (PD-L1), -CD48, Qa-1b, -ICAM und -NKG2D Antikörpern hatte keinen Effekt auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ . Zusätzlich zur Blockierung mittels anti-OX40L Antikörper wurde die Expression von OX40L auf der Zelloberfläche von Mastzellen anhand einer FACS-Analyse überprüft und zeigte eine erhöhte Expression auf Mastzellen unter dem Einfluss von LPS, der jedoch unabhängig von NK-Zellen ist (Abb.17E).

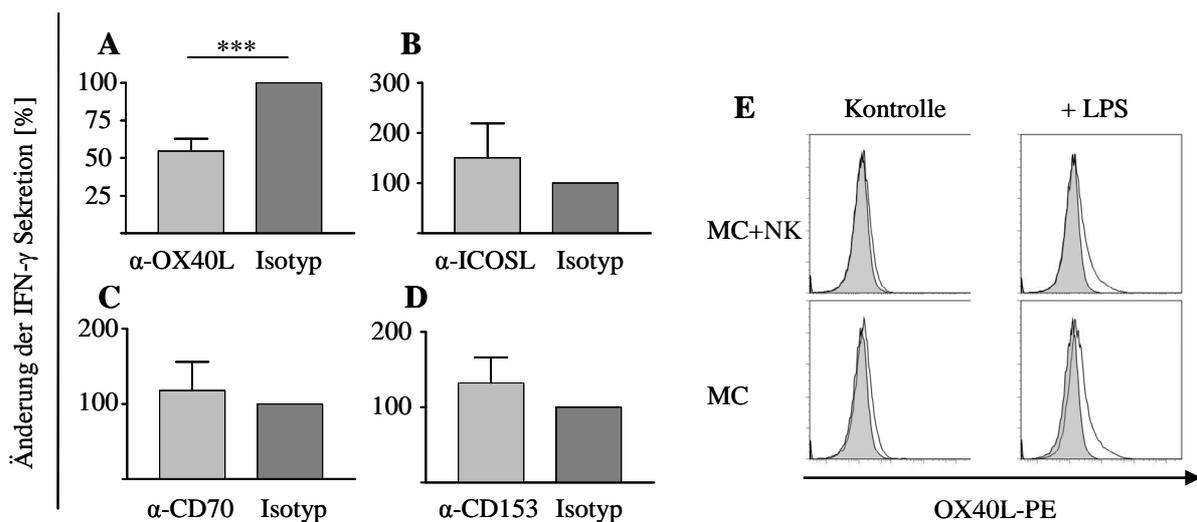


Abbildung 17: Blockierung von OX40L auf Mastzellen reduziert Sekretion von IFN- $\gamma$ .

In den Abbildungen 17A-D ist die prozentuale Änderung der sekretierten Menge IFN- $\gamma$  im Vergleich der verwendeten blockierenden Antikörper und der jeweiligen Isotypkontrolle (100%) dargestellt. Mastzellen wurden vor der Kokultur mit NK-Zellen und 1  $\mu$ g/ml LPS für je 15 min mit anti-Maus OX40L (A; 10  $\mu$ g/ml), ICOSL (B; 10  $\mu$ g/ml), CD70 (C; 20  $\mu$ g/ml) oder CD153 (D; 20  $\mu$ g/ml) bzw. den passenden Isotypkontrollen auf Eis inkubiert. Die Expression von OX40L auf Mastzellen (E) wurde nach 24-stündiger Kokultur aus Mastzellen und NK-Zellen, bzw. Mastzellen allein in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ g/ml LPS analysiert. Abgebildet ist eine repräsentative FACS-Auswertung. Student's t-Test; \*\*\*p < 0,005.

Da es keinen Antikörper zur Blockierung von OX40 gibt, um die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen durch Blockierung von OX40 auf NK-Zelle zu beeinflussen, wurde zunächst die Expression von OX40 auf den NK-Zellen unter dem Einfluss von LPS und Mastzellen anhand einer FACS-Analyse untersucht. Eine Expression von OX40 auf NK-Zellen, wie bereits von Liu et al. (156) beschrieben, konnte mittels FACS-Analyse nicht bestätigt werden. Als alternative Nachweismethode wurde die Expression von OX40 mittels reverser Transkriptions (rt)PCR anhand von Zelllysaten aus Kokulturen von Mastzellen mit NK-Zellen bzw. beiden Zellen allein jeweils mit und ohne LPS untersucht (Abb.18). Die rtPCR bestätigte die Ergebnisse der FACS-Analyse, dass NK-Zellen kein OX40 exprimieren. Die gelelektrophoretische Auswertung zeigt deutlich OX40 PCR-Produkte (Größe 119 bp). Es konnte eine positiver Nachweis und eine somit anzunehmende Expression von OX40 für T-Zellen, Mastzellen mit NK-Zellen sowohl mit als auch ohne LPS und Mastzellen mit bzw. ohne LPS gebracht werden. Diese Erkenntnis deutet auf eine autokrine Interaktion von OX40 mit OX40L auf Mastzellen hin.

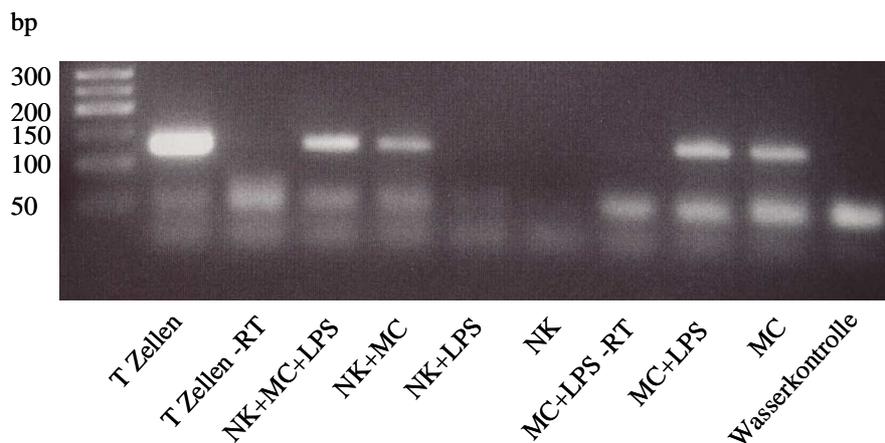


Abbildung 18: NK-Zellen exprimieren kein OX40.

Dargestellt ist das Ergebnis einer Gelelektrophorese einer PCR mit OX40 Primern über die mittels reverser Transkription generierten cDNA aus Mastzellen, NK bzw. der Kokultur aus beiden Zellen mit bzw. ohne LPS. Als Positivkontrolle wurde aus sortierten T-Zellen RNA isoliert. Zur Reinheitskontrolle der isolierten RNA wurde bei dem Ansatz T-Zellen-RT und MC+LPS-RT die Reaktion ohne reverse Transkriptase durchgeführt, um eine Amplifikation von OX40 über eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. Eine 50 bp DNA Leiter diente der Größenbestimmung der amplifizierten Fragmente.

Die Ergebnisse der rtPCR wurden mittels FACS-Analyse bestätigt. Auch hier konnte eine LPS- und NK-unabhängige Expression von OX40 auf Mastzellen detektiert werden (Abb.19).

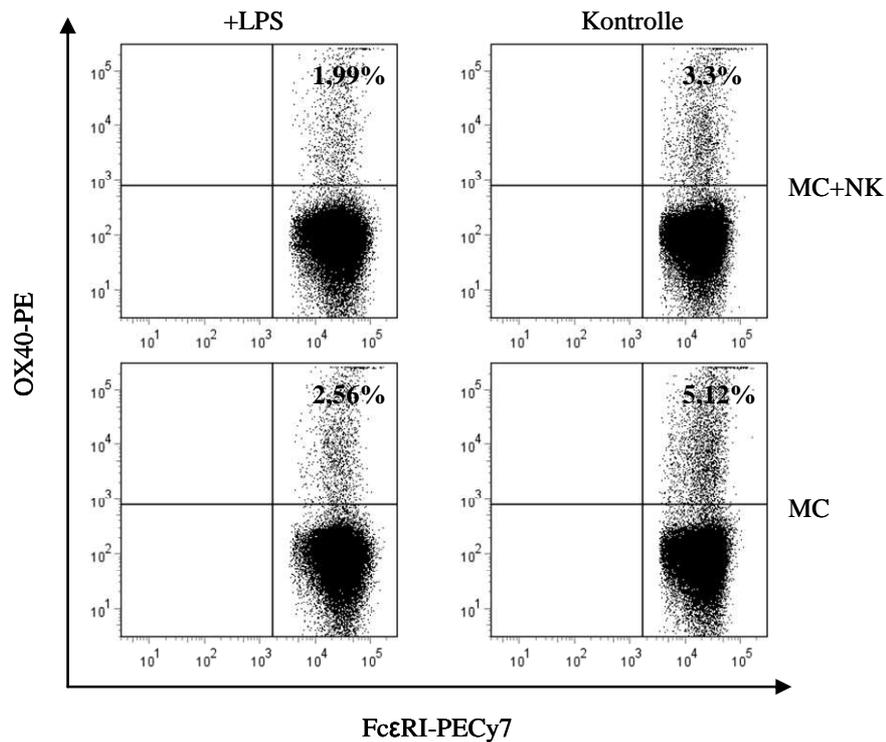


Abbildung 19: MC exprimieren OX40.

Dargestellt sind exemplarische Dot Blots einer FACS-Auswertung nach 24-stündiger Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen mit LPS oder ohne LPS als Kontrolle. Die Zellen wurden mit FcεRI-PECy7 und OX40-PE Antikörper inkubiert. Im FACS wurden die FcεRI-PECy7-positiven Mastzellen auf ihren prozentualen Anteil OX40-PE-positiver Zellen analysiert.

Somit konnte zwar anhand eines blockierenden OX40L Antikörpers die Freisetzung von IFN- $\gamma$  reduziert werden, jedoch scheint es sich eher um eine autokrine Interaktion von Mastzellen mittels OX40 und OX40L als eine Interaktion zwischen OX40L auf Mastzellen mit OX40 auf NK-Zellen zu handeln. Dennoch bestätigt dieses Ergebnis, dass OX40L, wie bereits zuvor beschrieben, eine essentielle Rolle in der Mastzellbiologie zu spielen scheint. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass OX40L auf Mastzellen über mehrere Spezies hinweg konserviert ist (80;155;165).

Zur Überprüfung des Einflusses von OX40L wurde die Blockierung von OX40L zusätzlich auf Mastzellen, generiert aus BALB/c Mäusen getestet. Die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen aus BALB/c Mäusen zeigte nach Blockierung mit OX40L keine Veränderung der IFN- $\gamma$  Sekretion im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb.20). Dieser Unterschied zu Zellen aus C57BL/6 Mäusen scheint auf Differenzen zwischen den beiden Stämmen zurückzuführen zu sein. Nakae et. al. (80) zeigten in ihrer Analyse der Mastzell-abhängigen T-Zell-Aktivierung

drastische Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen zwischen C57BL/6 und BALB/c Mäusen.

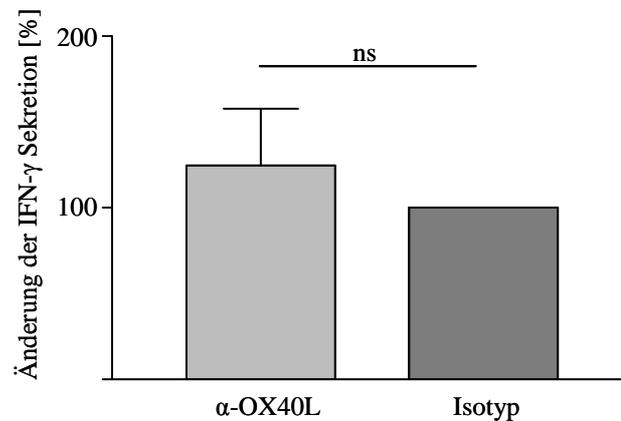


Abbildung 20: Blockierung von OX40L auf Mastzellen aus BALB/c Mäusen hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ .

Dargestellt ist die prozentuale Änderung der sekretierten Menge IFN- $\gamma$  im Vergleich von anti-OX40L zur Isotypkontrolle (100%). Mastzellen wurden vor der Kokultur mit NK-Zellen und 1  $\mu$ g/ml LPS für je 15 min mit anti-Maus OX40L bzw. der Isotypkontrolle auf Eis inkubiert. Student's t-Test; ns, nicht signifikant.

Die Interaktion von OX40-OX40L scheint eine erhebliche Komplexität aufzuweisen, die wahrscheinlich von unterschiedlichen Einflüssen reguliert wird.

#### 4.7 Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf die Zytotoxizität der NK-Zellen

Neben dem Einfluss auf die Freisetzung von IFN- $\gamma$  wird im Zusammenhang mit der Aktivierung von NK-Zellen zusätzlich der Einfluss auf dessen Zytotoxizität untersucht. Zur Bestimmung der Zytotoxizität der NK Zellen wurden ein standardisierter Zytotoxizitäts-Test sowie eine intrazelluläre Granzym B FACS-Analyse durchgeführt. Bei dem durchgeführten Zytotox-Test handelt es sich um einen *Chrom-Release-Assay*, bei dem anhand der freigesetzten Menge Chrom die Lyse-Rate in Prozent errechnet wird. Hierfür werden zunächst für die Lyse durch NK-Zellen sensitive YAC-1-Tumorzellen (Target) mit einer definierten Menge Chrom inkubiert, um dieses aufzunehmen. Anschließend werden die Chrom-beladenen YAC-1-Zellen mit Mastzellen und/oder NK-Zellen inkubiert. Die durch Lyse der YAC-1-Zellen freigesetzte Menge Chrom wird nach 4 h Inkubation gemessen.

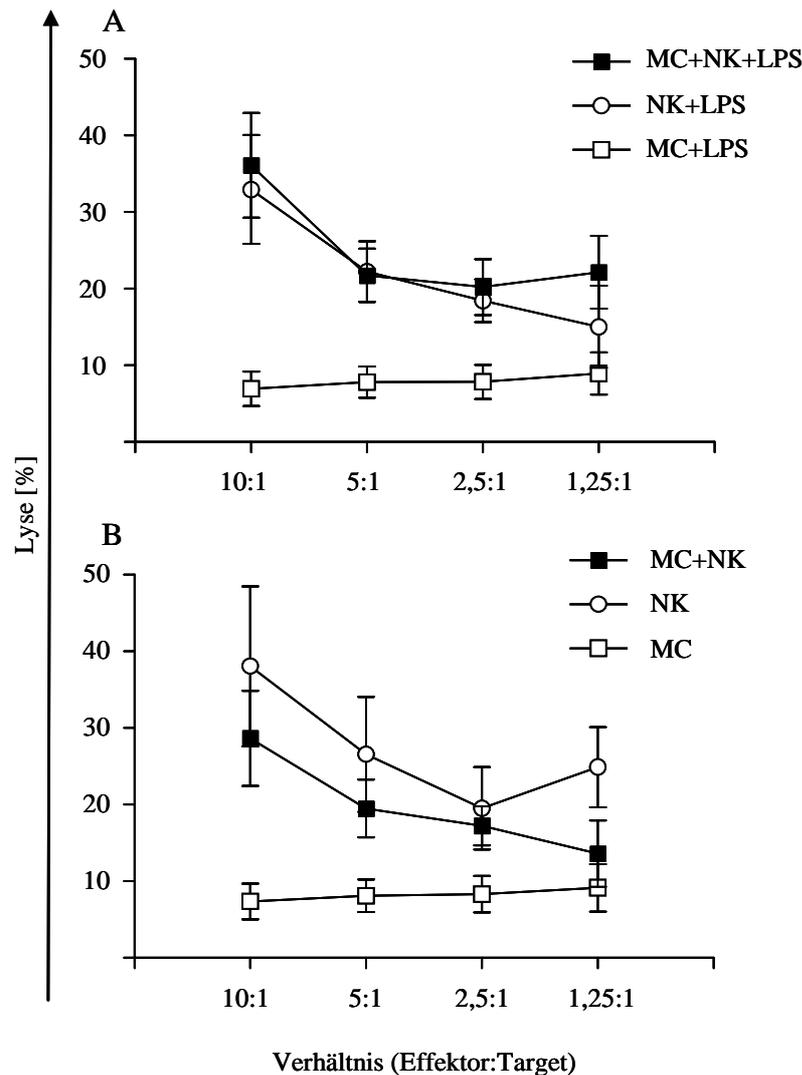


Abbildung 21: Mastzellen zeigen keinen Einfluss auf NK-Zell Zytotoxizität.

In Abbildung 21A und B sind die Auswertungen des Zytotoxizitäts-Tests nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen mit (A) und ohne (B) LPS dargestellt. Kokulturen aus Mastzellen und NK-Zellen bzw. Monokulturen der jeweiligen Zellen wurden für 4 h als Effektorzellen im Verhältnis 10:1, 5:1, 2,5:1 bzw. 1,25:1 mit YAC-1 Zellen (Target) inkubiert. Im Anschluss wurde im zellfreien Überstand die durch Lyse freigesetzte Menge  $^{51}\text{CrO}_4$  mit Hilfe eines Wallac 1450 MicroBeta Trillux gemessen und die Zytotoxizität wie folgt kalkuliert: (Freigesetzte Menge/ maximale Freisetzung YAC Zellen) x 100. Dargestellt sind die Zusammenfassungen aus mindestens drei unabhängigen Messungen mit Zellen aus unterschiedlichen Aufarbeitungen.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt einen deutlichen Anstieg der Lyse-Rate von Mastzellen mit NK-Zellen bzw. NK-Zellen im Vergleich zu Mastzellen, von denen auch keine zytotoxische Aktivität bekannt ist (Abb.21). Die Anwesenheit von Mastzellen bzw. LPS scheint jedoch keine aktivierende Wirkung auf die Zytotoxizität der NK-Zellen zu haben, da es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Zytotoxizität von NK-Zellen und NK-Zellen mit Mastzellen mit oder ohne LPS gab.

Zudem wurde anhand intrazellulärer Granzym B FACS-Analysen der Einfluss von Mastzellen auf die Zytotoxizität von NK-Zellen überprüft (Abb.22). Es konnte kein signifikanter An- oder Abstieg des für die Zytotoxizität essentiellen Granzym B detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate der *Chrom-Release-Assays*, dass Mastzellen *in vitro* keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen haben.

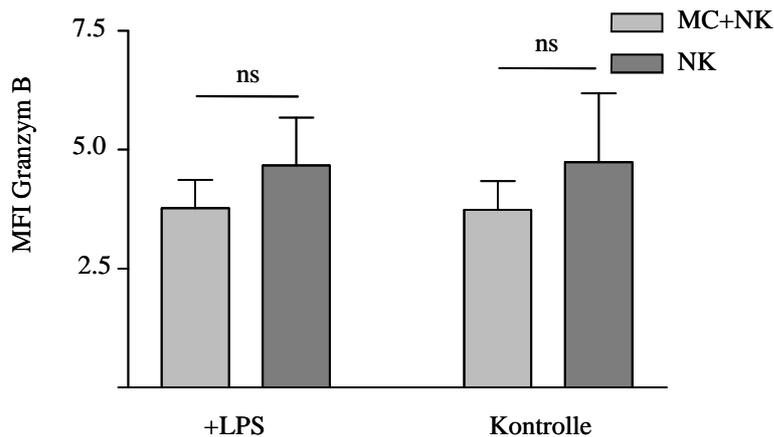


Abbildung 22: Keine Veränderung der Expression von Granzym B nach Kokultur von NK-Zellen mit Mastzellen.

Dargestellt ist der MFI von Granzym B auf NK-Zellen nach Kokultur bzw. Singlekultur mit und ohne LPS. Zur Analyse der intrazellulären Granzym B Expression wurden die verwendeten Zellen für 48 h inkubiert. In den letzten 8 h wurde den Zellen zur intrazellulären Protein-Akkumulation Golgi Plug zugesetzt. Im FACS wurden die CD49b-positiven Zellen (NK-Zellen) auf ihre Granzym B Expression analysiert. Zu sehen ist die Zusammenfassung der MFIs aus vier unabhängigen Experimenten. Student's t-Test; ns, nicht signifikant.

#### 4.8 Einfluss von Mastzellen auf NK-Zellen nach *in vivo* LPS Injektion

Zur Bestätigung der Relevanz der Mastzell-NK-Zell Interaktion wurde anhand Mastzell-defizienter Mäuse die Interaktion *in vivo* analysiert. Hierfür wurde WT-Mäusen und Mastzell-defizienten Mäusen 100 µg LPS pro 25 g Körpergewicht i.p. injiziert. Nachdem der Gesundheitszustand der Mäuse alle 3 h überprüft wurde, erfolgte nach 14 h die Tötung der Tiere sowie die Isolierung von Milz, Peritonealzellen sowie Lymphknoten. Aus den isolierten Geweben wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die so gewonnenen Zellen wurden mittels FACS auf den intrazellulären IFN- $\gamma$  Gehalt von NK-Zellen untersucht (Abb.23). NK-Zellen aus der Milz Mastzell-defizienter Mäuse wiesen eine signifikante Reduktion von IFN- $\gamma$ -positiven NK-Zellen im Vergleich zu NK-Zellen aus Milzen von WT-Mäusen auf. Für die

analysierten NK-Zellen aus den isolierten Lymphknoten bzw. den Peritonealzellen Mastzell-defizienter Tiere konnte eine Reduktion, jedoch keine signifikante Veränderung des IFN- $\gamma$  Gehalts verzeichnet werden.

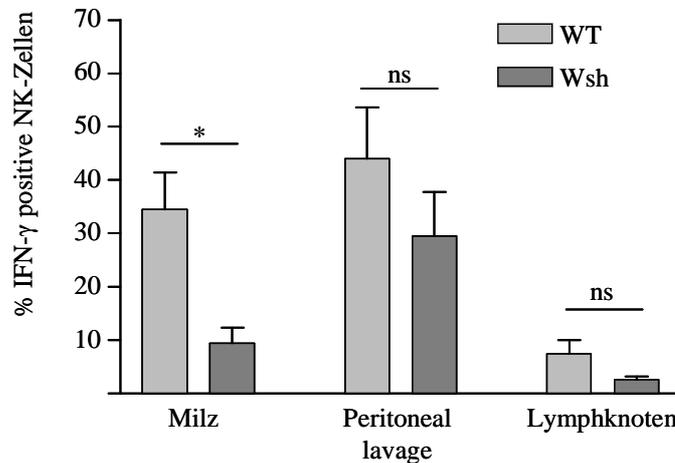


Abbildung 23: Mastzellen steigern intrazelluläre IFN- $\gamma$  Akkumulation in NK-Zellen *in vivo*.

Abgebildet ist die Zusammenfassung der intrazellulären IFN- $\gamma$  FACS-Analyse der NK-Zellen von sechs Mäusen je Genotyp (WT- und Wsh-Mäuse). Analysiert wurden die NK-Zellen aus der Milz, den Lymphknoten und den Zellen aus der Peritoneallavage. Die Zellen wurden jeweils 14 h nach Injektion von 100  $\mu$ g/25 mg Körpergewicht isoliert und mit anti-CD49b und anti-CD3 sowie intrazellulär mit anti-IFN- $\gamma$  Antikörpern gefärbt. Student's t-Test; \*p < 0,05, ns, nicht signifikant.

Eine Analyse der Serumkonzentration an IFN- $\gamma$  mittels ELISA ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mausgruppen. In einigen Fällen lag die Serum IFN- $\gamma$  Konzentration unter der Nachweisgrenze und ließ keine Auswertung zu.

Dennoch bestätigten die FACS-Analysen der *in vivo* Experimente die *in vitro* Ergebnisse, dass Mastzellen in Anwesenheit von LPS einen essentiellen Einfluss auf die produzierte und sekretierte Menge IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen nehmen.

#### 4.9 Mastzell-NK-Zell Interaktion nach *in vivo* Injektion von RMA/S Zellen

Zur Analyse einer möglichen Rolle der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen im Zusammenhang mit Tumorummunologie wurde Mäusen i.p. RMA/S-GFP Tumorzellen injiziert. Es ist bereits beschrieben, dass RMA/S Zellen im Peritoneum ausschließlich von NK-Zellen lysiert werden (151). Zur *ex vivo* Detektion der Tumorzellen wurden RMA/S Zellen stabil mit GFP transduziert. Es wurden WT- und Wsh-Mäuse mit  $10 \times 10^6$  RMA/S-GFP

Zellen i.p. appliziert. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Tiere getötet und Milz, Peritonealzellen sowie Lymphknoten isoliert. Aus den isolierten Geweben wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die so gewonnenen Zellen wurden mittels FACS auf den prozentualen Anteil von NK-Zellen und den intrazellulären Granzym B Gehalt der NK-Zellen untersucht. Zusätzlich wurden die Aktivierung der NK-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD69 und die Apoptose der RMA/S Zellen aus der Peritoneallavage anhand einer Annexin V Färbung analysiert. 24 h nach Injektion der RMA/S Zellen wiesen die Mastzell-defizienten Mäuse einen signifikant höheren prozentualen Anteil an NK-Zellen aus Lymphozyten auf als NK-Zellen aus WT-Mäusen (Abb.24). Dieser Effekt war jedoch nur nach 24 h signifikant.

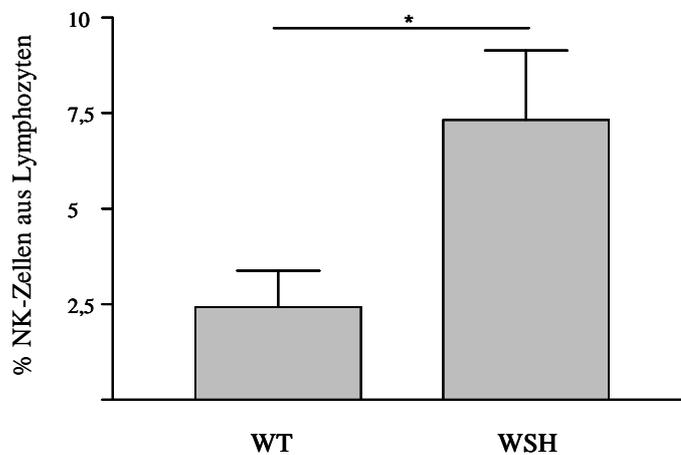


Abbildung 24: Signifikanter Einstrom von NK-Zellen in das Peritoneum Mastzell-defizienter Mäuse.

Abgebildet ist die Auswertung der FACS-Analysen von sechs Mäusen pro Genotyp (WT- und Wsh-Mäuse) 24 h nach i.p. Injektion von RMA/S Tumorzellen. Die Peritonealzellen wurden mit anti-CD49b und anti-CD3 Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von NK-Zellen aus den gegateten Lymphozyten. Student's t-Test; \*p < 0,05.

NK-Zellen aus der Peritoneallavage Mastzell-defizienter Mäuse wiesen 48 h nach RMA/S Injektion einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil Granzym B-positiver NK-Zellen (Abb.25A) im Vergleich zu WT-Mäusen auf. Diese NK-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (Abb.25B). Des Weiteren konnte eine Reduktion der Tumorzellzahl (Abb.25C) in Mastzell-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen festgestellt werden. Diese Reduktion war jedoch nicht signifikant und es konnte keine Steigerung der Apoptose der injizierten RMA/S Tumorzellen (Abb.25D) anhand der Annexin V Färbung detektiert werden.

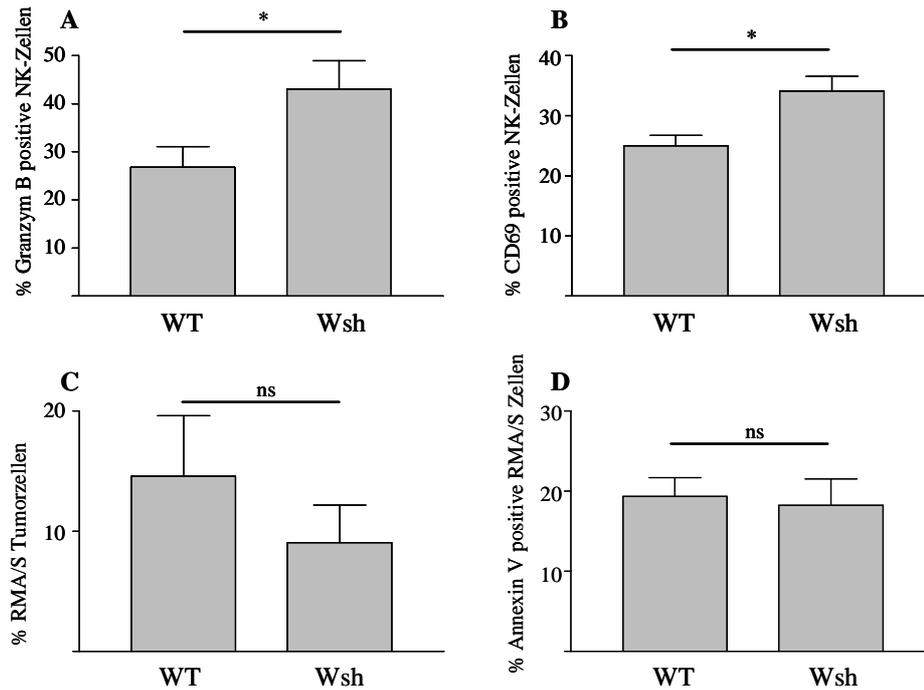


Abbildung 25: Inhibierender Einfluss von Mastzellen auf Aktivierung von NK-Zellen.

Dargestellt sind Auswertungen der FACS-Analysen von Peritonealzellen 48 h nach i.p. Injektion von RMA/S-GFP Tumorzellen in WT- und Wsh-Mäuse. Ein Teil der isolierten Peritonealzellen wurden zur intrazellulären Akkumulation von Granzym B (A; n=13) für 4 h in Anwesenheit von Golgi Plug inkubiert. Zusätzlich wurde mit einem anti-CD69 Antikörper die Aktivierung von NK-Zellen überprüft (B; n=7). Die restlichen Zellen wurden direkt nach der Isolation auf ihren prozentualen Anteil RMA/S-GFP-positiver Tumorzellen (C; n=13) und den Anteil apoptotischer (Annexin V-positiver) RMA/S-GFP Tumorzellen (D; n=12) untersucht. Student's t-Test; \*p < 0,05, ns, nicht signifikant.

## 5 Diskussion

Mastzellen regulieren die Kinetik des erworbenen Immunsystems, indem sie z.B. die Bewegung, Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen sowie die Bewegung und funktionelle Reifung von DCs unterstützen (4,13, 16, 39-42). Sie sekretieren Mediatoren wie IL-12 (47) und IFN- $\alpha$  (37), die für die Aktivierung von NK-Zellen benötigt werden. Für eine effektive Lyse von MHC-I-negativen Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen ist die vorherige Aktivierung essentiell. Diese Kenntnisse waren Grundlage für das Projekt der Doktorarbeit, in der eine mögliche Zell-Interaktion eruiert wurde.

*In vitro* konnte eine gesteigerte Sekretion und Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen nach Stimulation mit LPS und Zellkontakt mit Mastzellen gezeigt werden (Abb.26). Diese Ergebnisse konnten mittels i.p. Injektion von LPS in Mastzell-defiziente Wsh- oder WT-Mäuse *in vivo* bestätigt werden. NK-Zellen aus Milz, Peritoneallavage und Lymphknoten von Wsh-Mäusen zeigten eine Reduktion an intrazellulärem IFN- $\gamma$  im Vergleich zu WT-Mäusen, jedoch war diese Reduktion nur in den NK-Zellen der Milz signifikant.

Eine Analyse der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen im Zusammenhang mit der Tumorummunologie zeigte einen konträren Effekt. Hier scheinen Mastzellen einen inhibierenden Effekt auf NK-Zellen zu haben. In *in vivo* Experimenten mit Mastzell-defizienten Wsh- und WT-Mäusen konnte nach i.p. Injektion von MHC-I-negativen RMA/S Tumorzellen eine gesteigerte Aktivierung und ein erhöhter Anteil Granzym B-positiver peritonealer NK-Zellen in den Wsh-Mäusen detektiert werden. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Apoptose oder Anzahl der RMA/S Tumorzellen beobachtet werden.

### 5.1 Einfluss LPS-aktivierter Mastzellen auf NK-Zellen

Zur Analyse der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen wurden verschiedene Stimulationen getestet. Mastzellen sind für ihre Funktion als Effektorzellen in der IgE-assoziierten erworbenen Immunantwort bekannt. Sie sind nach Antigen-Bindung an Rezeptor-gebundenes IgE in der Lage, gespeicherte Mediatoren aus Granula zu sekretieren. Dennoch konnte im Fall der Mastzell-NK-Zell Interaktion keine Steigerung der IFN- $\gamma$  Sekretion nach IgE/Antigen Stimulation beobachtet werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass die

---

Anwesenheit bakterieller Antigene die Funktion von Mastzellen weg von der IgE-assoziierten erworbenen Immunantwort hin zur angeborenen Immunität reguliert (166).

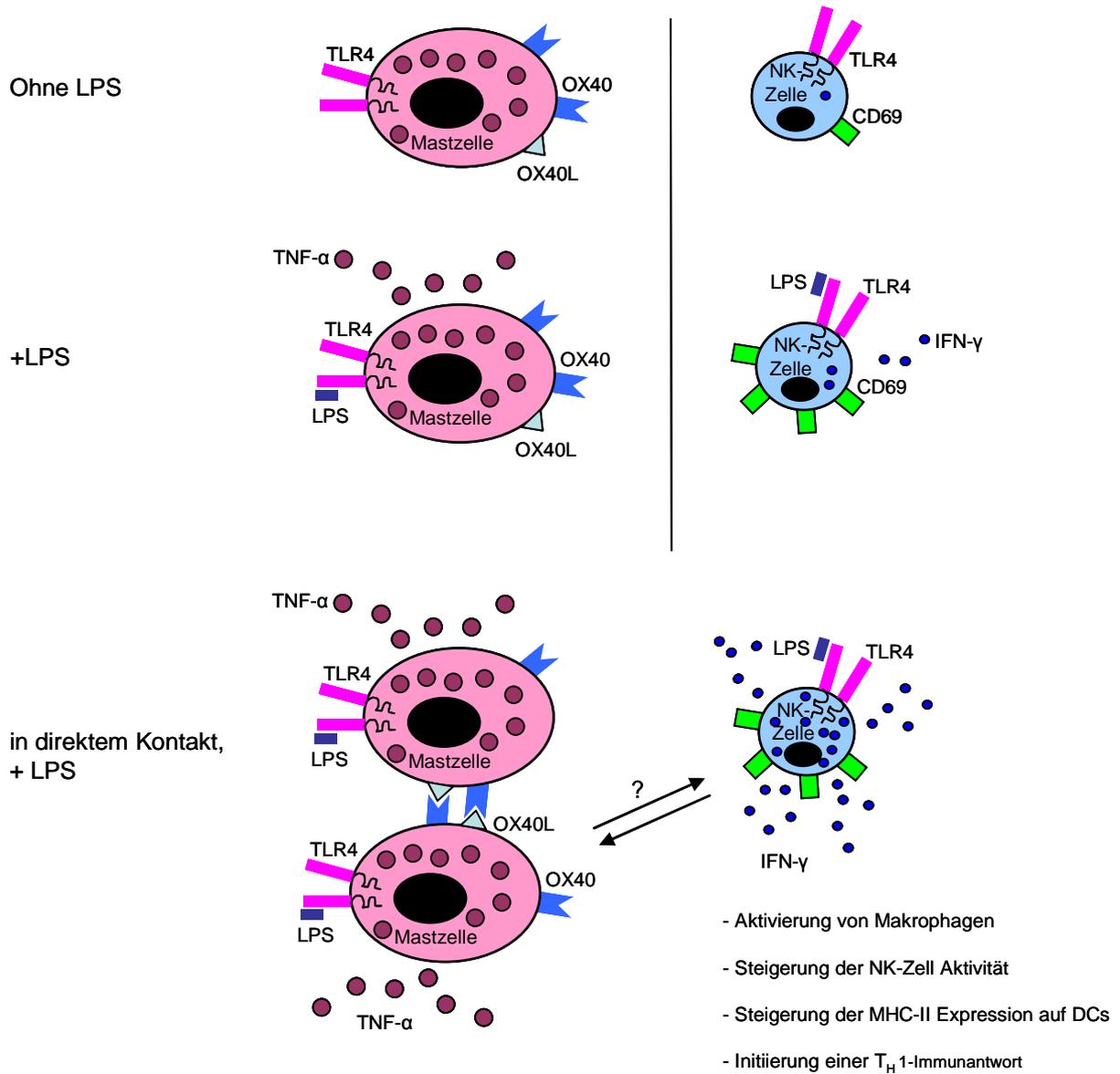


Abbildung 26: Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen führt zur signifikant höheren Sekretion von IFN- $\gamma$ .

Eine separate Inkubation von Mastzellen und NK-Zellen ohne LPS führt zu keiner deutlichen Sekretion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . LPS hat einen stimulierenden Einfluss auf die Freisetzung von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen und IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen. In Kokultur Experimenten konnte ein signifikanter Anstieg der freigesetzten Menge IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen jedoch kein Einfluss auf die sekretierte Menge TNF- $\alpha$  beobachtet werden. Die Interaktion von OX40/OX40L auf Mastzellen scheint einen essentiellen Einfluss auf die sekretierte Menge IFN- $\gamma$  zu nehmen jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar über welche Rezeptor-Ligand Interaktion Mastzellen mit NK-Zellen in Kontakt treten.

Von Mastzellen sekretiertes TNF- $\alpha$  scheint ein Schlüssel-Zytokin für die Interaktion von Mastzellen mit anderen Zellen des angeborenen bzw. erworbenen Immunsystems zu sein. TNF- $\alpha$  ist für die Rekrutierung von Neutrophilen während einer septischen Peritonitis sowie in der allergischen Spätreaktion essentiell (41;88;94). Zudem ist die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen für die Aktivierung von T-Zellen und die Migration von DCs relevant (80-83). In dieser Doktorarbeit konnte ein dosisabhängiger, signifikanter Einfluss von LPS auf die Steigerung der TNF- $\alpha$ -Sekretion durch Mastzellen bestätigt werden. Dennoch konnte kein Einfluss von TNF- $\alpha$  auf die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen detektiert werden (Abb.26). Anhand blockierender Antikörper und TNF-KO-BMCMCs konnte kein Unterschied in der Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen festgestellt werden.

Eine Stimulation von Mastzellen und NK-Zellen mit den Liganden für TLR3, TLR4 und TLR9 steigerte die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von TLR4 auf Mastzellen wichtig für die optimale Immunantwort während einer septischen Peritonitis im Mausmodell ist (94). Des Weiteren wird auch NK-Zellen im Zusammenhang mit Sepsis eine wichtige Rolle zugeschrieben. So wurde ein Anstieg an NK-Zellen im Peritoneum nach *Cecal ligation and puncture* beobachtet (167), einem Sepsismodell, bei dem auch das Vorhandensein von Mastzellen relevant ist (68;89). Des Weiteren sind NK-Zellen die Hauptquelle von IFN- $\gamma$  während einer Endotoxin-induzierten Sepsis (167-171). Die Stimulation von NK-Zellen zur Produktion und Sekretion von IFN- $\gamma$  könnte zur Aktivierung von Makrophagen und somit indirekt durch die Freisetzung von u.a. Stickstoffmonoxid mikrobizid wirken (172). Darüber hinaus könnte durch IFN- $\gamma$  die Prozessierung und Antigenpräsentation durch Makrophagen stimuliert und indirekt eine erworbene Immunreaktion unterstützt werden. IFN- $\gamma$  ist in der Lage, Makrophagen für eine Reaktion gegen LPS (173;174) oder CpG DNA (175;176) zu sensibilisieren. Des Weiteren führt die durch LPS induzierte Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen zu einer optimalen Rekrutierung von Neutrophilen und DCs zum Ort der Infektion. Somit könnte durch die gesteigerte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen nach Kontakt zu LPS-, CpG- oder auch Poly I:C-stimulierten Mastzellen in Kombination mit der erhöhten Sekretion von TNF- $\alpha$  durch Mastzellen eine effektive Immunantwort induziert werden.

Die Blockierung von OX40L auf BMCMCs aus C57BL/6 Mäusen ergab eine verringerte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen. Der OX40-OX40L Interaktion kommt eine wichtige Funktion in der Mastzell-assoziierten Aktivierung von T-Zellen (80) und der DC-gesteuerten

---

NK-Zell-Aktivierung (156) zu. Die Expression von OX40L auf Mastzellen scheint eine essentielle Rolle in der Mastzellbiologie zu spielen, da OX40L über mehrere Spezies hinweg konserviert ist (80;155;165).

Zur genaueren Analyse der OX40-OX40L Interaktion wäre auch eine Blockierung von OX40 auf NK-Zellen nötig gewesen. Da jedoch keine Möglichkeit bestand, OX40 auf NK-Zellen zu blockieren bzw. eine Expression mittels FACS nachzuweisen, wurde eine Expression mittels rtPCR überprüft. Die rtPCR zeigte überraschenderweise keine Expression von OX40 für NK-Zellen, jedoch für Mastzellen (unabhängig von LPS). Somit scheint es sich um eine autokrine Interaktion von OX40 und OX40L auf Mastzellen zu handeln, die zu einer Inhibierung der IFN- $\gamma$  Sekretion durch NK-Zellen führt (Abb.26).

Um eine Stamm-übergreifende Interaktion von OX40/OX40L auf Mastzellen und deren Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Sekretion durch NK-Zellen zu untersuchen, wurden BMCMCs und NK-Zellen aus BALB/c Mäusen isoliert. Im Vergleich zu den Experimenten mit Zellen aus C57BL/6 Mäusen konnte jedoch kein inhibierender Einfluss des blockierenden anti-OX40L Antikörpers auf die IFN- $\gamma$  Sekretion festgestellt werden. Auch wurde keine erhöhte Expression von OX40L auf BALB/c BMCMCs, wie zuvor beschrieben (80), nachgewiesen.

Die Analyse der NK-Zell-Zytotoxizität unter Einfluss von Mastzellen ergab keinen Unterschied zur Stimulation von NK-Zellen. Zusätzlich konnte kein Einfluss von LPS auf die Zytotoxizität von NK-Zellen festgestellt werden. Mastzellen scheinen, unabhängig von einer Stimulation mit LPS, keinen Einfluss auf die NK-Zell-Zytotoxizität zu haben. Dieser fehlende Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf die Zytotoxizität im Vergleich zur IFN- $\gamma$  Sekretion lässt sich dadurch erklären, dass die Zytokin Produktion und Zytotoxizität von unterschiedlichen Signalwegen *downstream* der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren reguliert werden. So konnte bereits gezeigt werden, dass Vav1 eine essentielle Rolle in der Signalkaskade für Zytotoxizität jedoch nicht für die IFN- $\gamma$  Sekretion spielt (177). Vahlne et. al. (178) konnten anhand von Expressionsmarkern NK-Zellen unterscheiden, die eher zur Zytokin Produktion oder zur Degranulierung neigten. Es konnte gezeigt werden, dass unreife NK-Zellen (Mac-1<sup>low</sup> CD27<sup>high</sup>) eher degranulieren und reife NK-Zellen (Mac-1<sup>high</sup> CD27<sup>low</sup>) IFN- $\gamma$  sekretieren.

---

## 5.2 Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf RMA/S Tumorzellen

Da sowohl Mastzellen als auch NK-Zellen einen Einfluss auf die Tumorummunologie (30;105;127;135) nehmen und nachdem mittels LPS Stimulation eine Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen gezeigt werden konnte, sollte als nächstes eine mögliche Interaktion der beiden Zellen in einem Tumormodell untersucht werden. Hierfür wurden GFP-transduzierte MHC-I-negative RMA/S Tumorzellen i.p. in Wsh- und WT-Mäuse injiziert. Die Analyse der peritonealen NK-Zellen ergab einen signifikanten Anstieg der Expression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie des Anteils an Granzym B-positiven NK-Zellen in den Mastzell-defizienten Wsh-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Da Granzym B eine kritische Rolle bei der effektiven Lyse von Tumorzellen spielt (132) und in Mastzell-defizienten Mäusen die Expression signifikant erhöht war, scheint die Anwesenheit von Mastzellen in den WT-Mäusen einen inhibierenden Effekt auf die Granzym B Produktion von NK-Zellen zu haben. Bestätigt wird diese Theorie durch die gesteigerte Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 auf peritonealen NK-Zellen Mastzell-defizienter Mäuse. Dennoch konnte in unserem Modell nach 48 h kein signifikanter Effekt durch An- oder Abwesenheit von Mastzellen auf die NK-assoziierte Lyse MHC-I-negativer Tumorzellen beobachtet werden.

Die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen weist scheinbar eine erhebliche Komplexität auf, die auch Mausstamm-übergreifende Unterschiede zeigt. Eine detaillierte Analyse der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen steht zu diesem Zeitpunkt noch aus.

## 5.3 Ausblick

Die Ergebnisse der Doktorarbeit zeigen zum ersten Mal eine bisher unbekannte, wichtige Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen, die eine essentielle Rolle in der Regulation einer effektiven Immunantwort im Zusammenhang mit einer bakteriellen oder viralen Infektion bzw. in der Tumorummunologie spielen könnte. Weitere Untersuchungen für eine detaillierte Analyse der Interaktion sind erforderlich.

---

Zur Klärung der Frage wie LPS-stimulierte Mastzellen und NK-Zellen interagieren, sollen zunächst Expressions-Unterschiede von bekannten Mastzell-Liganden und -Rezeptoren nach Blockierung von OX40L anhand von FACS-Analysen untersucht werden.

Um die Konservierung der Mastzell-NK-Zell Interaktion in Abhängigkeit einer TLR-Ligand Stimulation zu überprüfen, wird die Interaktion an humanen Zellen analysiert werden. Hierfür werden humane Mastzellen aus der Mukosa humaner Darmresektate und NK-Zellen aus dem Blut des gleichen Patienten isoliert. Eine Isolation von NK-Zellen aus der Mukosa ist aufgrund des geringen prozentualen Anteils an NK-Zellen derzeit nicht möglich.

Die Zellen sollen *in vitro* mit LPS, CPG oder Poly I:C bzw. ohne Stimulanz inkubiert werden. Sollte sich auch hier ein signifikanter Unterschied in der IFN- $\gamma$  Sekretion und Produktion durch NK-Zellen zeigen, so kann anhand blockierender Antikörper eine spezifische Analyse der Interaktion erfolgen.

Auch für die Untersuchung einer möglichen Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen bzw. eines direkten oder indirekten Einflusses von Mastzellen auf NK-Zellen im Zusammenhang mit Tumorummunologie sind weitere Experimente erforderlich.

Mittels einer *in vitro* Analyse soll zunächst eine mögliche direkte Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen in Gegenwart von RMA/S-GFP Tumorzellen untersucht werden. Hierbei soll die Aktivierung von NK-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD69 und die intrazelluläre sowie sekretierte Menge TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und Granzym B überprüft werden.

Anhand blockierender Antikörper oder durch Rekonstitution Mastzell-defizienter Mäuse mit KO-Mastzellen z.B. MHC-I- oder MHC-II-KO soll in weiteren *in vivo* Experimenten die Zell-Interaktion im Tumormodell noch spezifiziert werden. Des Weiteren soll unter Anwendung eines depletierenden NK-Antikörpers die Apoptose der RMA/S Zellen analysiert werden, um einen zytotoxischen Effekt anderer Zellen auf das Tumormodell auszuschließen bzw. zu untersuchen. Über dies hinaus sind weitere Experimente zur Analyse der Interaktion im Zusammenhang mit anderen Immunzellen in dem verwendeten Modell nötig.

In einem Langzeitmodell soll die Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen auf die Karzinogenese beobachtet werden. Hierbei soll außerdem der Einfluss von LPS bzw. LPS-stimulierten Mastzellen auf die Progression und Größe des Tumors bzw. eine eventuelle Metastasierung analysiert werden. Auch die Infiltration der Tumore durch NK-Zellen soll beobachtet werden.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Galli, S. J., Nakae, S., and Tsai, M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6:135-142.
  - 2 Metz, M. and Maurer, M. 2007. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 28:234-241.
  - 3 Wedemeyer, J., Tsai, M., and Galli, S. J. 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12:624-631.
  - 4 Marshall, J. S. 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 4:787-799.
  - 5 Ehrlich, P. 1878. Beiträge zur Theorie und Praxis der Histologischen Färbung.
  - 6 Stone, K. D., Prussin, C., and Metcalfe, D. D. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:S73-S80.
  - 7 Galli, S. J., Zsebo, K. M., and Geissler, E. N. 1994. The Kit-Ligand, Stem-Cell Factor. *Advances in Immunology, Vol 55* 55:1-96.
  - 8 Galli, S. J., Maurer, M., and Lantz, C. S. 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11:53-59.
  - 9 Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. 1997. Mast cells. *Physiol Rev.* 77:1033-1079.
  - 10 Kawakami, T. and Galli, S. J. 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol.* 2:773-786.
  - 11 Galli, S. J., Zsebo, K. M., and Geissler, E. N. 1994. The Kit-Ligand, Stem-Cell Factor. *Advances in Immunology, Vol 55* 55:1-96.
  - 12 Galli, S. J. 2000. Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* 7:32-39.
  - 13 Williams, C. M. and Galli, S. J. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:847-859.
  - 14 Huang, C. F., Sali, A., and Stevens, R. L. 1998. Regulation and function of mast cell proteases in inflammation. *Journal of Clinical Immunology* 18:169-183.
  - 15 Stevens, R. L. 1991. Gene-Expression in Different Populations of Mouse Mast-Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 629:31-37.
  - 16 Henz, B. M., Maurer, M., Lippert, U., Worm, M., and Babina, M. 2001. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp. Dermatol.* 10:1-10.
-

- 17 Takeyama, K., Tamaoki, J., Nakata, J., and Konno, K. 1996. Effect of oxitropium bromide on histamine-induced airway goblet cell secretion. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154:231-236.
  - 18 Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O. A. R., Malolepszy, J., Zak-Nejmark, T., Koga, R., Kobayashi, T., Blaser, K., and Akdis, C. A. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413:420-425.
  - 19 Jutel, M., Klunker, S., Akdis, M., Malolepszy, J., Thomet, O. A. R., Zak-Nejmark, T., Blaser, K., and Akdis, C. A. 2001. Histamine upregulates Th1 and downregulates Th2 responses due to different patterns of surface histamine 1 and 2 receptor expression. *International Archives of Allergy and Immunology* 124:190-192.
  - 20 Laszlo, V., Rothe, G., Hegyesi, H., Szeberenyi, J. B., Orso, E., Schmitz, G., and Falus, A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflammation Research* 50:428-434.
  - 21 Marone, G., Gentile, M., Petraroli, A., De Rosa, N., and Triggiani, M. 2001. Histamine-induced activation of human lung macrophages. *International Archives of Allergy and Immunology* 124:249-252.
  - 22 Triggiani, M., Gentile, M., Secondo, A., Granata, F., Oriente, A., Tagliatela, M., Annunziato, L., and Marone, G. 2001. Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H-1 receptors. *Journal of Immunology* 166:4083-4091.
  - 23 Hirasawa, N., Ohtsu, H., Watanabe, T., and Ohuchi, K. 2002. Enhancement of neutrophil infiltration in histidine decarboxylase-deficient mice. *Immunology* 107:217-221.
  - 24 Ling, P., Ngo, K., Nguyen, S., Thurmond, R. L., Edwards, J. P., Karlsson, L., and Fung-Leung, W. P. 2004. Histamine H-4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *British Journal of Pharmacology* 142:161-171.
  - 25 Humphries, D. E., Wong, G. W., Friend, D. S., Gurish, M. F., Qiu, W. T., Huang, C. F., Sharpe, A. H., and Stevens, R. L. 1999. Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* 400:769-772.
  - 26 Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., and Kjellen, L. 1999. Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* 400:773-776.
  - 27 Esposito, I., Kleeff, J., Bischoff, S. C., Fischer, L., Collecchi, P., Iorio, M., Bevilacqua, G., Buchler, M. W., and Friess, H. 2002. The stem cell factor-c-kit system and mast cells in human pancreatic cancer. *Laboratory Investigation* 82:1481-1492.
  - 28 Yano, H., Kinuta, M., Tateishi, H., Nakano, Y., Matsui, S., Monden, T., Okamura, J., Sakai, M., and Okamoto, S. 1999. Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric. Cancer.* 2:26-32.
-

- 29 Takanami, I., Takeuchi, K., and Naruke, M. 2000. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88:2686-2692.
  - 30 Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Caughey, G. H., and Hanahan, D. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & Development* 13:1382-1397.
  - 31 Soucek, L., Lawlor, E. R., Soto, D., Shchors, K., Swigart, L. B., and Evan, G. I. 2007. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nature Medicine* 13:1211-1218.
  - 32 Galli, S. J., Nakae, S., and Tsai, M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6:135-142.
  - 33 Gordon, J. R. and Galli, S. J. 1991. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J. Exp. Med.* 174:103-107.
  - 34 Gomi, K., Zhu, F. G., and Marshall, J. S. 2000. Prostaglandin E-2 selectively enhances the IgE-mediated production of IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by mast cells through an EP1/EP3-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 165:6545-6552.
  - 35 Bressler, R. B., Lesko, J., Jones, M. L., Wasserman, M., Dickason, R. R., Huston, M. M., Cook, S. W., and Huston, D. P. 1997. Production of IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by high-affinity IgE receptor ligation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99:508-514.
  - 36 Burd, P. R., Rogers, H. W., Gordon, J. R., Martin, C. A., Jayaraman, S., Wilson, S. D., Dvorak, A. M., Galli, S. J., and Dorf, M. E. 1989. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.* 170:245-257.
  - 37 Kulka, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., and Metcalfe, D. D. 2004. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114:174-182.
  - 38 Nakajima, T., Inagaki, N., Tanaka, H., Tanaka, A., Yoshikawa, M., Tamari, M., Hasegawa, K., Matsumoto, K., Tachimoto, H., Ebisawa, M., Tsujimoto, G., Matsuda, H., Nagai, H., and Saito, H. 2002. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fc epsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood* 100:3861-3868.
  - 39 Hultner, L., Kolsch, S., Stassen, M., Kaspers, U., Kremer, J. P., Mailhammer, R., Moeller, J., Broszeit, H., and Schmitt, E. 2000. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *Journal of Immunology* 164:5556-5563.
-

- 40 Lorentz, A., Schwengberg, S., Sellge, G., Manns, R. P., and Bischoff, S. C. 2000. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: Role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *Journal of Immunology* 164:43-48.
  - 41 Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest* 109:1351-1359.
  - 42 Brown, M. A., Pierce, J. H., Watson, C. J., Falco, J., Ihle, J. N., and Paul, W. E. 1987. B-Cell Stimulatory Factor-I Interleukin-4 Messenger-Rna Is Expressed by Normal and Transformed Mast-Cells. *Cell* 50:809-818.
  - 43 Bradding, P., Feather, I. H., Wilson, S., Bardin, P. G., Heusser, C. H., Holgate, S. T., and Howarth, P. H. 1993. Immunolocalization of Cytokines in the Nasal-Mucosa of Normal and Perennial Rhinitic Subjects - the Mast-Cell As A Source of Il-4, Il-5, and Il-6 in Human Allergic Mucosal Inflammation. *Journal of Immunology* 151:3853-3865.
  - 44 Varadaradjalou, S., Feger, F., Thieblemont, N., Hamouda, N. B., Pleau, J. M., Dy, M., and Arock, M. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur. J. Immunol.* 33:899-906.
  - 45 Marietta, E. V., Chen, Y. Y., and Weis, J. H. 1996. Modulation of expression of the anti-inflammatory cytokines interleukin-13 and interleukin-10 by interleukin-3. *European Journal of Immunology* 26:49-56.
  - 46 Okumura, S., Kashiwakura, J., Tomita, H., Matsumoto, K., Nakajima, T., Saito, H., and Okayama, Y. 2003. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and FcepsilonRI. *Blood* 102:2547-2554.
  - 47 Coulombe, M., Battistini, B., Stankova, J., Pouliot, P., and Bissonnette, E. Y. 2002. Endothelins regulate mediator production of rat tissue-cultured mucosal mast cells. Up-regulation of Th1 and inhibition of Th2 cytokines. *Journal of Leukocyte Biology* 71:829-836.
  - 48 Gordon, J. R. and Galli, S. J. 1994. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 180:2027-2037.
  - 49 Kendall, J. C., Li, X. H., Galli, S. J., and Gordon, J. R. 1997. Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:113-123.
  - 50 Toda, S., Tokuda, Y., Koike, N., Yonemitsu, N., Watanabe, K., Koike, K., Fujitani, N., Hiromatsu, Y., and Sugihara, H. 2000. Growth factor-expressing mast cells accumulate at the thyroid tissue-regenerative site of subacute thyroiditis. *Thyroid* 10:381-386.
  - 51 Young, J. D., Liu, C. C., Butler, G., Cohn, Z. A., and Galli, S. J. 1987. Identification, purification, and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:9175-9179.
-

- 52 Gordon, J. R. and Galli, S. J. 1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346:274-276.
  - 53 Qu, Z. H., Huang, X. N., Ahmadi, P., Stenberg, P., Liebler, J. M., Le, A. C., Planck, S. R., and Rosenbaum, J. T. 1998. Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells - Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. *International Archives of Allergy and Immunology* 115:47-54.
  - 54 Boesiger, J., Tsai, M., Maurer, M., Yamaguchi, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Dvorak, H. F., and Galli, S. J. 1998. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J. Exp. Med.* 188:1135-1145.
  - 55 Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., and Shimada, S. 2004. The effects of endothelin-1 on degranulation, cytokine, and growth factor production by skin-derived mast cells. *Eur. J. Immunol.* 34:1910-1919.
  - 56 Oliveira, S. H. P. and Lukacs, N. W. 2001. Stem cell factor and IgE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflammation Research* 50:168-174.
  - 57 Lee, S. A., Fitzgerald, S. M., Huang, S. K., Li, C. F., Chi, D. S., Milhorn, D. M., and Krishnaswamy, G. 2004. Molecular regulation of interleukin-13 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mast cells by interleukin-1 beta. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 31:283-291.
  - 58 Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., and Shimada, S. 2004. TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* 173:531-541.
  - 59 Noguchi, J., Kuroda, E., and Yamashita, U. 2005. Strain difference of murine bone marrow-derived mast cell functions. *Journal of Leukocyte Biology* 78:605-611.
  - 60 Grimbaldston, M. A., Chen, C. C., Piliponsky, A. M., Tsai, M., Tam, S. Y., and Galli, S. J. 2005. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am. J. Pathol.* 167:835-848.
  - 61 Xu, X., Zhang, D., Lyubynska, N., Wolters, P. J., Killeen, N. P., Baluk, P., McDonald, D. M., Hawgood, S., and Caughey, G. H. 2006. Mast cells protect mice from *Mycoplasma pneumoniae*. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 173:219-225.
  - 62 Wolters, P. J., Mallen-St Clair, J., Lewis, C. C., Villalta, S. A., Baluk, P., Erle, D. J., and Caughey, G. H. 2005. Tissue-selective mast cell reconstitution and differential lung gene expression in mast cell-deficient Kit(W-sh)/Kit(W-sh) sash mice. *Clinical and Experimental Allergy* 35:82-88.
  - 63 Kitamura, Y., Go, S., and Hatanaka, K. 1978. Decrease of mast cells in W/W<sup>v</sup> mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood.* 52:447-452.
-

- 64 Berrozpe, G., Timokhina, I., Yukl, S., Tajima, Y., Ono, M., Zelenetz, A. D., and Besmer, P. 1999. The W-sh, W-57, and Ph Kit expression mutations define tissue-specific control elements located between -23 and -154 kb upstream of Kit. *Blood* 94:2658-2666.
  - 65 Berrozpe, G., Timokhina, I., Yukl, S., Tajima, Y., Ono, M., Zelenetz, A., and Besmer, P. 1998. The W-sh, W-57 and Ph c-Kit expression mutations define tissue specific control elements located between -24 and -150Kb upstream of c-Kit. *Experimental Hematology* 26:719.
  - 66 Maurer, M., Echtenacher, B., Hultner, L., Kollias, G., Mannel, D. N., Langley, K. E., and Galli, S. J. 1998. The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J. Exp. Med.* 188:2343-2348.
  - 67 Tsai, M., Wedemeyer, J., Ganiatsas, S., Tam, S. Y., Zon, L. I., and Galli, S. J. 2000. In vivo immunological function of mast cells derived from embryonic stem cells: an approach for the rapid analysis of even embryonic lethal mutations in adult mice in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9186-9190.
  - 68 Maurer, M., Wedemeyer, J., Metz, M., Piliponsky, A. M., Weller, K., Chatterjea, D., Clouthier, D. E., Yanagisawa, M. M., Tsai, M., and Galli, S. J. 2004. Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 432:512-516.
  - 69 Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. 2002. Immunologie.
  - 70 Beaven, M. A. and Metzger, H. 1993. Signal-Transduction by Fc-Receptors - the Fc-Epsilon-Ri Case. *Immunology Today* 14:222-226.
  - 71 Turner, H. and Kinet, J. P. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature* 402:B24-B30.
  - 72 Kinet, J. P. 1999. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): From physiology to pathology. *Annual Review of Immunology* 17:931-972.
  - 73 Lantz, C. S., Boesiger, J., Song, C. H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R. C., Nawa, Y., Dranoff, G., and Galli, S. J. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90-93.
  - 74 King, C. L., Jia, X. L., Malhotra, I., Liu, S. F., Mahmoud, A. A. F., and Oettgen, H. C. 1997. Mice with a targeted deletion of the IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* 158:294-300.
  - 75 Williams, C. M. and Galli, S. J. 2000. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J. Exp. Med.* 192:455-462.
  - 76 Kobayashi, T., Miura, T., Haba, T., Sato, M., Serizawa, I., Nagai, H., and Ishizaka, K. 2000. An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *Journal of Immunology* 164:3855-3861.
-

- 77 Strait, R. T., Morris, S. C., Yang, M. Y., Qu, X. W., and Finkelman, F. D. 2002. Pathways of anaphylaxis in the mouse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109:658-668.
- 78 Yamaguchi, M., Lantz, C. S., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J. P., and Galli, S. J. 1997. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J. Exp. Med.* 185:663-672.
- 79 Yamaguchi, M., Sayama, K., Yano, K., Lantz, C. S., Noben-Trauth, N., Ra, C., Costa, J. J., and Galli, S. J. 1999. IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: Synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *Journal of Immunology* 162:5455-5465.
- 80 Nakae, S., Suto, H., Iikura, M., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M., and Galli, S. J. 2006. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell costimulatory molecules and secreted TNF. *J. Immunol.* 176:2238-2248.
- 81 Nakae, S., Suto, H., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M., and Galli, S. J. 2005. Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:6467-6472.
- 82 Nakae, S., Suto, H., Berry, G. J., and Galli, S. J. 2007. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* 109:3640-3648.
- 83 Suto, H., Nakae, S., Kakurai, M., Sedgwick, J. D., Tsai, M., and Galli, S. J. 2006. Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration. *J. Immunol.* 176:4102-4112.
- 84 Maurer, M., Kostka, S. L., Siebenhaar, F., Moelle, K., Metz, M., Knop, J., and von Stebut, E. 2006. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania* major infections. *Faseb Journal* 20:2460-2467.
- 85 Romao, P. R., Da Costa, S. H., Ramos, C. D., De Oliveira, C. F., Monteiro, M. C., De Queiroz, C. F., and Vieira, L. Q. 2009. Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania* major. *Parasite Immunol.* 31:140-146.
- 86 Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Morris, S. C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K. B., Schopf, L., and Urban, J. F. 2004. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews* 201:139-155.
- 87 Khan, W. I. and Collins, S. M. 2004. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol.* 26:319-326.
- 88 Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381:77-80.
- 89 Echtenacher, B., Mannel, D. N., and Hultner, L. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381:75-77.
-

- 90 Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
  - 91 Poltorak, A., He, X. L., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
  - 92 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
  - 93 McCurdy, J. D., Lin, T. J., and Marshall, J. S. 2001. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J. Leukoc. Biol.* 70:977-984.
  - 94 Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. 2001. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167:2250-2256.
  - 95 McCurdy, J. D., Olynych, T. J., Maher, L. H., and Marshall, J. S. 2003. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J. Immunol.* 170:1625-1629.
  - 96 Walport, M. J. 2001. Advances in immunology: Complement (First of two parts). *New England Journal of Medicine* 344:1058-1066.
  - 97 Guo, R. F. and Ward, P. A. 2005. Role of C5A in inflammatory responses. *Annual Review of Immunology* 23:821-852.
  - 98 Haas, P. J. and van Strijp, J. 2007. Anaphylatoxins - Their role in bacterial infection and inflammation. *Immunologic Research* 37:161-175.
  - 99 Schulman, E. S., Post, T. J., Henson, P. M., and Giclas, P. C. 1988. Differential-Effects of the Complement Peptides, C5A and C5A des Arg on Human Basophil and Lung Mast-Cell Histamine-Release. *Journal of Clinical Investigation* 81:918-923.
  - 100 Werfel, T., Zwirner, J., Oppermann, M., Sieber, A., Begemann, G., Drommer, W., Kapp, A., and Gotze, O. 1996. CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117(+) and CD14(+) cells and react with a desmosomal antigen in human skin. *Journal of Immunology* 157:1729-1735.
  - 101 Soruri, A., Grigat, J., Kiafard, Z., and Zwirner, J. 2008. Mast cell activation is characterized by upregulation of a functional anaphylatoxin C5a receptor. *Bmc Immunology* 9.
  - 102 Venkatesha, R. T., Thangam, E. B., Zaidi, A. K., and Ali, H. 2005. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and P13 kinase. *Molecular Immunology* 42:581-587.
-

- 103 Woolhiser, M. R., Brockow, K., and Metcalfe, D. D. 2004. Activation of human mast cells by aggregated IgG through Fc gamma RI: additive effects of C3a. *Clinical Immunology* 110:172-180.
  - 104 Taipale, J., Lohi, J., Saarinen, J., Kovanen, P. T., and Keskkioja, J. 1995. Human Mast-Cell Chymase and Leukocyte Elastase Release Latent Transforming Growth Factor-B1 from the Extracellular-Matrix of Cultured Human Epithelial and Endothelial-Cells. *Journal of Biological Chemistry* 270:4689-4696.
  - 105 Wedemeyer, J. and Galli, S. J. 2005. Decreased susceptibility of mast cell-deficient Kit(W)/Kit(W-v) mice to the development of 1, 2-dimethylhydrazine-induced intestinal tumors. *Lab Invest* 85:388-396.
  - 106 Tanooka, H., Kitamura, Y., Sado, T., Tanaka, K., Nagase, M., and Kondo, S. 1982. Evidence for involvement of mast cells in tumor suppression in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 69:1305-1309.
  - 107 Burtin, C., Ponvert, C., Fray, A., Scheinmann, P., Lespinats, G., Loridon, B., Canu, P., and Paupe, J. 1985. Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in W/WV, WV/+, and +/+ mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 74:671-674.
  - 108 Schitteck, A., Issa, H. A., Stafford, J. H., Young, D., Zwilling, B., and James, A. G. 1985. Growth of pulmonary metastases of B16 melanoma in mast cell-free mice. *J. Surg. Res.* 38:24-28.
  - 109 Starkey, J. R., Crowle, P. K., and Taubenberger, S. 1988. Mast-cell-deficient W/Wv mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 42:48-52.
  - 110 Dethlefsen, S. M., Matsuura, N., and Zetter, B. R. 1994. Mast cell accumulation at sites of murine tumor implantation: implications for angiogenesis and tumor metastasis. *Invasion Metastasis.* 14:395-408.
  - 111 Dokun, A. O., Chu, D. T., Yang, L., Bendelac, A. S., and Yokoyama, W. M. 2001. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. *J. Immunol.* 167:5286-5293.
  - 112 Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., and Vivier, E. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.
  - 113 Lopez-Botet, M., Llano, M., Navarro, F., and Bellon, T. 2000. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin. Immunol.* 12:109-119.
  - 114 Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., and Moretta, L. 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:619-648.
  - 115 Rosenberg, E. B., Herberman, R. B., Levine, P. H., Halterman, R. H., McCoy, J. L., and Wunderlich, J. R. 1972. Lymphocyte cytotoxicity reactions to leukemia-associated antigens in identical twins. *Int. J. Cancer* 9:648-658.
  - 116 Vilches, C. and Parham, P. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20:217-251.
-

- 117 Wiltrout, R. H., Mathieson, B. J., Talmadge, J. E., Reynolds, C. W., Zhang, S. R., Herberman, R. B., and Ortaldo, J. R. 1984. Augmentation of Organ-Associated Natural-Killer Activity by Biological Response Modifiers - Isolation and Characterization of Large Granular Lymphocytes from the Liver. *Journal of Experimental Medicine* 160:1431-1449.
  - 118 Fogler, W. E., Volker, K., McCormick, K. L., Watanabe, M., Ortaldo, J. R., and Wiltrout, R. H. 1996. NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction. *Journal of Immunology* 156:4707-4714.
  - 119 Biron, C. A. 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current Opinion in Immunology* 9:24-34.
  - 120 Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M. L., Ohlen, C., Orn, A., and Karre, K. 2000. Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype: An adaptive component of NK cell-mediated responses. *Journal of Experimental Medicine* 191:129-138.
  - 121 Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology* 17:189-220.
  - 122 Lauwerys, B. R., Garot, N., Renauld, J. C., and Houssiau, F. A. 2000. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *Journal of Immunology* 165:1847-1853.
  - 123 Bennett, I. M., Zatsepina, O., Zamai, L., Azzoni, L., Mikheeva, T., and Perussia, B. 1996. Definition of a natural killer NKR-P1A(+)/CD56(-)/CD16(-) functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine* 184:1845-1856.
  - 124 Golab, J. 2000. Interleukin 18 - Interferon gamma inducing factor - A novel player in tumour immunotherapy? *Cytokine* 12:332-338.
  - 125 Derby, E. G., Reddy, V., Nelson, E. L., Kopp, W. C., Baseler, M. W., Dawson, J. R., and Malyguine, A. M. 2001. Correlation of human CD56+ cell cytotoxicity and IFN-gamma production. *Cytokine* 13:85-90.
  - 126 Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. 2005. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *Journal of Immunology* 174:727-734.
  - 127 Smyth, M. J., Thia, K. Y. T., Cretney, E., Kelly, J. M., Snook, M. B., Forbes, C. A., and Scalzo, A. A. 1999. Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis. *Journal of Immunology* 162:6658-6662.
  - 128 Trapani, J. A., Browne, K. A., Smyth, M. J., and Jans, D. A. 1996. Localization of granzyme B in the nucleus - A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 271:4127-4133.
-

- 129 Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F. B., Gauldie, J., and Bleackley, R. C. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.
  - 130 vandenBroek, H. F., Kagi, D., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. 1995. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *European Journal of Immunology* 25:3514-3516.
  - 131 Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. 2001. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International Immunology* 13:459-463.
  - 132 Pardo, J., Balkow, S., Anel, A., and Simon, M. M. 2002. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur. J. Immunol.* 32:2881-2887.
  - 133 Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., and Moretta, A. 2005. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol.* 26:221-226.
  - 134 Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P. S., and Nagarkatti, M. 1998. Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas(+) and Fas(-) tumor cells. *Blood* 92:4248-4255.
  - 135 Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H. G., and Grandien, A. 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *Journal of Immunology* 167:2068-2073.
  - 136 Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *Journal of Immunology* 168:1356-1361.
  - 137 Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *Journal of Experimental Medicine* 195:161-169.
  - 138 Lanier, L. L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9:495-502.
  - 139 Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. 2000. CD27-mediated activation of murine NK cells. *Journal of Immunology* 164:1741-1745.
  - 140 Geldhof, A. B., Raes, G., Bakkus, M., Devos, S., Thielemans, K., and Debaetselier, P. 1995. Expression of B7-1 by Highly Metastatic Mouse T-Lymphomas Induces Optimal Natural-Killer Cell-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research* 55:2730-2733.
  - 141 Kelly, J. M., Takeda, K., Darcy, P. K., Yagita, H., and Smyth, M. J. 2002. A role for IFN-gamma in primary and secondary immunity generated by NK cell-sensitive tumor-expressing CD80 in vivo. *Journal of Immunology* 168:4472-4479.
-

- 142 Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K., and Zappacosta, S. 1997. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: The CD40-CD40 ligand interaction. *Journal of Experimental Medicine* 185:2053-2060.
  - 143 Lu, L. F., Lind, E. F., Gondek, D. C., Bennett, K. A., Gleeson, M. W., Pino-Lagos, K., Scott, Z. A., Coyle, A. J., Reed, J. L., Van, S. J., Strom, T. B., Zheng, X. X., and Noelle, R. J. 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.
  - 144 Mekori, Y. A. and Metcalfe, D. D. 1999. Mast cell-T cell interactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:517-523.
  - 145 Cumberbatch, M., Dearman, R. J., Griffiths, C. E., and Kimber, I. 2000. Langerhans cell migration. *Clin. Exp. Dermatol.* 25:413-418.
  - 146 Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine* 5:405-411.
  - 147 Andrews, D. M., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M., Smyth, M. J., and gli-Esposti, M. A. 2003. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nature Immunology* 4:175-181.
  - 148 Guan, H. B., Moretto, M., Bzik, D. J., Gigley, J., and Khan, I. A. 2007. NK cells enhance dendritic cell response against parasite antigens via NKG2D pathway. *Journal of Immunology* 179:590-596.
  - 149 Orange, J. S. and Biron, C. A. 1996. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* 156:4746-4756.
  - 150 Hafner, M., Falk, W., Echtenacher, B., and Mannel, D. N. 1999. Interleukin-12 activates NK cells for IFN- $\gamma$  -dependent and NKT cells for IFN- $\gamma$  - independent antimetastatic activity. *European Cytokine Network* 10:541-548.
  - 151 Lee, K. M., McNerney, M. E., Stepp, S. E., Mathew, P. A., Schatzle, J. D., Bennett, M., and Kumar, V. 2004. 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells. *J. Exp. Med.* 199:1245-1254.
  - 152 Tassi, I., Klesney-Tait, J., and Colonna, M. 2006. Dissecting natural killer cell activation pathways through analysis of genetic mutations in human and mouse. *Immunol. Rev.* 214:92-105.
  - 153 Ogasawara, K., Yoshinaga, S. K., and Lanier, L. L. 2002. Inducible costimulator costimulates cytotoxic activity and IFN- $\gamma$  production in activated murine NK cells. *J. Immunol.* 169:3676-3685.
  - 154 Bekiaris, V., Gaspal, F., McConnell, F. M., Kim, M. Y., Withers, D. R., Sweet, C., Anderson, G., and Lane, P. J. L. 2009. NK cells protect secondary lymphoid tissue from cytomegalovirus via a CD30-dependent mechanism. *European Journal of Immunology* 39:2800-2808.
-

- 155 Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M. P., and Pucillo, C. E. 2008. CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* 29:771-781.
  - 156 Liu, C. W., Lou, Y. Y., Lizee, G., Qin, H., Liu, S. J., Rabinovich, B., Kim, G. J., Wang, Y. H., Ye, Y., Sikora, A. G., Overwijk, W. W., Liu, Y. J., Wang, G., and Hwu, P. 2008. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *Journal of Clinical Investigation* 118:1165-1175.
  - 157 Takasawa, N., Ishii, N., Higashimura, N., Murata, K., Tanaka, Y., Nakamura, M., Sasaki, T., and Sugamura, K. 2001. Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:377-382.
  - 158 Inamura, N., Mekori, Y. A., Bhattacharyya, S. P., Bianchine, P. J., and Metcalfe, D. D. 1998. Induction and enhancement of Fc epsilon RI-dependent mast cell degranulation following coculture with activated T cells: Dependency on ICAM-1- and leukocyte function-associated antigen (LFA)-1-mediated heterotypic aggregation. *Journal of Immunology* 160:4026-4033.
  - 159 Mace, E. M., Monkley, S. J., Critchley, D. R., and Takei, F. 2009. A Dual Role for Talin in NK Cell Cytotoxicity: Activation of LFA-1-Mediated Cell Adhesion and Polarization of NK Cells. *Journal of Immunology* 182:948-956.
  - 160 Jamieson, A. M., Diefenbach, A., McMahon, C. W., Xiong, N., Carlyle, J. R., and Raulet, D. H. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17:19-29.
  - 161 Vosskuhl, K., Greten, T. F., Manns, M. P., Korangy, F., and Wedemeyer, J. 2010. Lipopolysaccharide-Mediated Mast Cell Activation Induces IFN- $\gamma$  Secretion by NK Cells. *J. Immunol.*
  - 162 Burke, S. M., Issekutz, T. B., Mohan, K., Lee, P. W. K., Shmulevitz, M., and Marshall, J. S. 2008. Human mast cell activation with virus-associated stimuli leads to the selective chemotaxis of natural killer cells by a CXCL8-dependent mechanism. *Blood* 111:5467-5476.
  - 163 Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A. A., Fumanelli, M., and Illgen-Wilcke, B. 2002. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 36:20-42.
  - 164 Xu, J., Chakrabarti, A. K., Tan, J. L., Ge, L., Gambotto, A., and Vujanovic, N. L. 2007. Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk. *Blood* 109:3333-3341.
  - 165 Kashiwakura, J., Yokoi, H., Saito, H., and Okayama, Y. 2004. T cell proliferation by direct cross-talk between OX40 ligand on human mast cells and OX40 on human T cells: comparison of gene expression profiles between human tonsillar and lung-cultured mast cells. *J. Immunol.* 173:5247-5257.
  - 166 Kulka, M., Fukuishi, N., Rottem, M., Mekori, Y. A., and Metcalfe, D. D. 2006. Mast cells, which interact with *Escherichia coli*, up-regulate genes associated with innate
-

- immunity and become less responsive to Fc(epsilon)RI-mediated activation. *J. Leukoc. Biol.* 79:339-350.
- 167 Etogo, A. O., Nunez, J., Lin, C. Y., Toliver-Kinsky, T. E., and Sherwood, E. R. 2008. NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J. Immunol.* 180:6334-6345.
- 168 Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H. L., Weissman, I. L., and Yokoyama, W. M. 2000. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:2731-2736.
- 169 Emoto, M., Miyamoto, M., Yoshizawa, I., Emoto, Y., Schaible, U. E., Kita, E., and Kaufmann, S. H. 2002. Critical role of NK cells rather than V alpha 14(+)NKT cells in lipopolysaccharide-induced lethal shock in mice. *J. Immunol.* 169:1426-1432.
- 170 Doherty, G. M., Lange, J. R., Langstein, H. N., Alexander, H. R., Buresh, C. M., and Norton, J. A. 1992. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 149:1666-1670.
- 171 Heinzl, F. P. 1990. The role of IFN-gamma in the pathology of experimental endotoxemia. *J. Immunol.* 145:2920-2924.
- 172 MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15:323-350.
- 173 Bundschuh, D. S., Barsig, J., Hartung, T., Randow, F., Docke, W. D., Volk, H. D., and Wendel, A. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *Journal of Immunology* 158:2862-2871.
- 174 Pace, J. L., Russell, S. W., Torres, B. A., Johnson, H. M., and Gray, P. W. 1983. Recombinant mouse gamma interferon induces the priming step in macrophage activation for tumor cell killing. *J. Immunol.* 130:2011-2013.
- 175 Stacey, K. J., Sweet, M. J., and Hume, D. A. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *Journal of Immunology* 157:2116-2122.
- 176 Sweet, M. J., Stacey, K. J., Kakuda, D. K., Markovich, D., and Hume, D. A. 1998. IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18:263-271.
- 177 Colucci, F., Rosmaraki, E., Bregenholt, S., Samson, S. I., Di Bartolo, V., Turner, M., Vanes, L., Tybulewicz, V., and Di Santo, J. P. 2001. Functional dichotomy in natural killer cell signaling: Vav1-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* 193:1413-1424.
- 178 Vahlne, G., Becker, S., Brodin, P., and Johansson, M. H. 2008. IFN-gamma production and degranulation are differentially regulated in response to stimulation in murine natural killer cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 67:1-11.
-

# 7 Anhang

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Tissue Culture Company</i>
bp	Basenpaare
BMCMC	<i>Bone marrow derived cultured mast cells</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CPG	synthetisches DNA Molekül: Cytosin, Guanin, Phosphodiester
DC(s)	Dendritische Zelle(n)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenyl
dNTPs	Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	acceleration of gravity
GFP	<i>Green fluorescence protein</i>
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure
ICOS	<i>Inducible co-stimulator</i>
ICOSL	<i>Inducible co-stimulator Ligand</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
Iono	Ionomycin
i.p.	intraperitoneal
IVC	<i>Individual ventilated cage</i>

---

---

kDa	Kilodalton
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MACS	magnetische Zellseparation
MC	Mastzelle ( <i>mast cell</i> )
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
μM	mikromolar
NA/LE	<i>no acid/low endotoxin</i>
NEA	nicht essenzielle Aminosäuren
NK	Natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenamin
PL	Peritoneallavage
PMA	Phorbol 12-myristate 13-Acetat
Poly I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
rtPCR	reverse Transkriptions PCR
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SCF	Stammzellfaktor
TAE	Tris/acetate/EDTA buffer
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	2-Amino-2,2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Einheit ( <i>Unit</i> )
Wsh(-Mäuse)	C57BL/6 <i>Kit<sup>Wsh</sup>/Kit<sup>Wsh</sup></i>

---

WT(-Mäuse)

Wildtyp (C57BL/6)

W/W-v(-Mäuse)

WBB6F<sub>1</sub>-*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Mastzellen sekretieren gespeicherte und „de novo“ synthetisierte Mediatoren.....	5
Abbildung 2:	Mastzellen binden das von Plasmazellen nach Antigenpräsentation durch T <sub>H</sub> 2-Zellen sezernierte IgE.....	8
Abbildung 3:	Aus dem Knochenmark differenzierte Zellen enthalten metachromatische Granula und exprimieren c-kit und FcεRI.....	30
Abbildung 4:	Aus dem Knochenmark differenzierte Zellen sekretieren nach Stimulation TNF-α und β-Hexosaminidase.....	32
Abbildung 5:	Die Reinheit der sortierten NK-Zellen beträgt ca. 95%.....	33
Abbildung 6:	Höchste IFN-γ Konzentration im Zellüberstand der Kokultur mit LPS nach 24 h.....	34
Abbildung 7:	Erhöhte Freisetzung von IFN-γ durch Kokultur von Mastzellen mit NK-Zellen unter Einfluss von LPS.....	35
Abbildung 8:	Identifizierung von NK-Zellen als IFN-γ Quelle nach Kokultur mit Mastzellen und LPS.....	36
Abbildung 9:	LPS-abhängige, NK-Zell-unabhängige Sekretion von TNF-α durch Mastzellen.....	38
Abbildung 10:	Expressions-Steigerung des Aktivierungsmarkers CD69 nach Kokultur von NK-Zellen mit Mastzellen und LPS.....	39
Abbildung 11:	Kein Einfluss der Mastzell-NK-Zell Interaktion auf die β-Hexosaminidase Sekretion nach Stimulationen mit LPS.....	40
Abbildung 12:	Zellzahl-abhängige Signifikanz der Sekretion von IFN-γ nach Stimulation mit LPS.....	41
Abbildung 13:	Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen ist TNF-α unabhängig.....	42
Abbildung 14:	Stimulation der Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen via TLR3 und TLR9.....	43
Abbildung 15:	Zell-Zell-Kontakt ist essentiell für die Freisetzung von IFN-γ nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen.....	44
Abbildung 16:	Zell-Zell-Kontakt ist essentiell für die Produktion von IFN-γ nach Kokultur von Mastzellen und NK-Zellen.....	45
Abbildung 17:	Blockierung von OX40L auf Mastzellen reduziert Sekretion von IFN-γ.....	46
Abbildung 18:	NK-Zellen exprimieren kein OX40.....	47
Abbildung 19:	MC exprimieren OX40.....	48
Abbildung 20:	Blockierung von OX40L auf Mastzellen aus BALB/c Mäusen hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN-γ.....	49
Abbildung 21:	Mastzellen zeigen keinen Einfluss auf NK-Zell Zytotoxizität.....	50
Abbildung 22:	Keine Veränderung der Expression von Granzym B nach Kokultur von NK-Zellen mit Mastzellen.....	51
Abbildung 23:	Mastzellen steigern intrazelluläre IFN-γ Akkumulation in NK-Zellen <i>in vivo</i> .....	52
Abbildung 24:	Signifikanter Einstrom von NK-Zellen in das Peritoneum Mastzell-defizienter Mäuse.....	53
Abbildung 25:	Inhibierender Einfluss von Mastzellen auf Aktivierung von NK-Zellen.....	54
Abbildung 26:	Interaktion von Mastzellen und NK-Zellen führt zur signifikant höheren Sekretion von IFN-γ.....	56

---

### 7.3 Lebenslauf

Name: Katja Voßkuhl  
Adresse: Werderstraße 14C  
30161 Hannover  
Geburt: 04. März 1981, in Goslar  
Familienstand: ledig

#### Schulbildung

07/1987 – 07/1991 Grundsule Bremerhöhe, Clausthal-Zellerfeld  
07/1991 – 07/1993 Orientierungsstufe Clausthal-Zellerfeld  
07/1993 – 07/2000 Gymnasium, Robert-Koch-Schule, Clausthal-Zellerfeld,  
Abschluss: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

#### Studium

10/2000 – 09/2005 Georg-August-Universität Göttingen, Studium Biologie,  
Abschluss: Diplom-Biologin (Dipl.-Biol.)  
01/2005 – 09/2005 Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung für Molekulare  
Mikrobiologie und Genetik, Diplomarbeit:  
„ISOLIERUNG UND ANALYSE VON NUDF-KOMPLEXEN AUS  
*ASPERGILLUS NIDULANS*“

#### Wissenschaftliche Tätigkeit

Seit 11/2005 Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für  
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie  
Erstellung einer wissenschaftlichen Arbeit im Rahmen der  
Promotion zur Erlangung des *Dr. rer. nat.* (rerum naturalium)

---

## 7.4 Publikationen

- 1 Wedemeyer, J. and **Vosskuhl, K.** 2008. Role of gastrointestinal eosinophils in inflammatory bowel disease and intestinal tumours. *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology* 22:537-549.
  - 2 Helmstaedt, K., Laubinger, K., **Vosskuhl, K.**, Bayram, O., Busch, S., Hoppert, M., Valerius, O., Seiler, S., and Braus, G. H. 2008. The nuclear migration protein NUDF/LIS1 forms a complex with NUDC and BNFA at spindle pole bodies. *Eukaryotic Cell* 7:1041-1052.
  - 3 **Vosskuhl, K.**, Greten, T. F., Manns, M. P., Korangy, F., and Wedemeyer, J. 2010. Lipopolysaccharide-Mediated Mast Cell Activation Induces IFN- $\gamma$  Secretion by NK Cells. *J. Immunol.*
-

## 7.5 Danksagung

Ich möchte mich zuerst und besonders bei PD Dr. Jochen Wedemeyer für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit bedanken. Sein verlässliches Engagement als Leiter der Forschungsgruppe hat diese Arbeit erst ermöglicht. Ich danke PD Dr. Wedemeyer, dass er sich jederzeit gerne Freiräume für fachliche aber auch aufheiternde Diskussionen mit mir geschaffen hat und mir immer fachlichen Rat hat zukommen lassen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Tim Greten und Dr. Firouzeh Korangy für ihre engagierte, fachliche Betreuung und stete Unterstützung meiner Arbeit. Die Fachkenntnisse von Prof. Dr. Greten und Dr. Korangy sowie der gesamten Arbeitsgruppe Greten/Korangy und die stete Diskussionsbereitschaft haben einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Prof. Dr. Michael P. Manns für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans Heinrich Wedemeyer und Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo für die freundliche Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Weiterhin richtet sich ein großer Dank an Anne-Kathrin Hinz, Meriame Nassiri und Gisela Weier für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in unserem Labor, die große Hilfe im Laboralltag und viele nette Gespräche. Des Weiteren danke ich den Mitgliedern bzw. ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Herrn Prof. Dr. Kubickas (Nina Strüver, Sarah Knocke, Dr. Bettina Fleischmann-Mundt, Dr. Engin Gürlevik, Dr. Norman Woller, Dr. Florian Kühnel, Dr. Peter Schache und Arnold Kloos) und Dr. Anurag Singh sowie Marina Juric für ihre große Hilfsbereitschaft und die nette gemeinsame Zeit.

Ich danke Eleonore Schmidt, Stephanie Loges und Ute Peters für die herzliche Aufnahme zu Beginn meiner Doktorarbeit und die netten Gespräche.

Ich danke dem Team der Einrichtung für Zellsortierung in der MHH Dr. Matthias Ballmaier, Christina Reimer und Mathias Rhein für die kompetente und freundliche Hilfe.

Ein großer Dank gilt meinen Freunden, besonders Vio und Kerstin, und meiner Familie, speziell meinen Eltern Heinz und Martina und meiner Schwester Lena, die immer für mich da sind und diese Arbeit stets mit großem Interesse verfolgt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Freund Alex, der mich während dieser Arbeit stets motiviert und unterstützt hat.

---

## **7.6 Erklärung zur Dissertation**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation

„Interaktion von Mastzellen und Natürlichen Killerzellen“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 31. August 2010

Katja Voßkuhl

---