

**Mechanismen der Mastzellaktivierung durch gram-negative  
Bakterien und Bakterienprodukte aus der Darmflora**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften  
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft

vorgelegt von  
**Sigrid Krämer**  
aus Frankfurt am Main  
2006

Dekan: Prof. Dr. H. Breer  
1. berichtende Person: Prof. Dr. S. C. Bischoff  
2. berichtende Person: Prof. Dr. C. Bode  
Eingereicht am: 10.08.2006  
Mündliche Prüfung am: 15.12.2006

Die vorliegende Arbeit wurde am 18.10.2006 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

*In tiefer Erinnerung an meinen Vater*



## Zusammenfassung

Die Rolle der Mastzelle (MC) als Effektorzelle in IgE-abhängigen Prozessen wie der Typ I Allergie ist seit langem bekannt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass MC in weitere pathophysiologische Prozesse wie der Tumorentwicklung, rheumatoiden Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Gewebsfibrose und Arteriosklerose involviert sind. Aber auch bei physiologischen Prozessen, z.B. der Abwehr von bakteriellen und parasitären Erkrankungen, der Wundheilung und Angiogenese sowie der Neuro-Immun-Interaktion, spielen MC eine Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle menschlicher Darm-MC bei der Immunantwort gegen Pathogene untersucht. Es wurden zwei Fragestellungen bearbeitet:

1. Expressieren menschliche Darm-MC Toll-like Rezeptoren (TLR), die konservierte Strukturen von Bakterien und Viren erkennen, und sind sie durch TLR-Liganden aktivierbar?
2. Führt die Infektion menschlicher Darm-MC mit verschiedenen *E. coli* und Shigellen Stämmen zur Aktivierung und welche Mechanismen liegen dieser Aktivierung zugrunde?

Hierfür wurden MC mittels mechanischer und enzymatischer Aufbereitung aus der Mukosa chirurgischer Darmresektate isoliert. Nach Aufreinigung durch Positivselektion und mehrwöchiger Kultur betrug die MC-Reinheit 98-100%. Es konnte gezeigt werden, dass menschliche Darm-MC mRNA für TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 9 exprimieren, allerdings tolerant gegenüber TLR-Liganden sind. Stimulation menschlicher Darm-MC mit LPS (Lipopolysaccharide, TLR 4 Ligand), LTA (Lipoteichonsäure, TLR 2 Ligand), Zymosan (TLR 2 Ligand), poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid, TLR 3 Ligand), R848 (TLR 7/8 Ligand), CpG (C poly G oligo-desoxy-nucleotide, TLR 9 Ligand) bzw. Non CpG führten weder zur Freisetzung von Histamin, Leukotrienen, TNF- $\alpha$  oder IL-8, noch zur mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  oder IL-8. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Infektion menschlicher Darm-MC mit dem Stuhlisolat *E. coli* (O101:H-) oder dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 beobachtet. Selbst die pathogenen Bakterien-Stämme, wie der invasive *S. flexneri* M90T und der FimH-exprimierende *E. coli* ORN 103(pSH2), induzierten keine signifikante Freisetzung der oben genannten Mediatoren. Zwar führten *E. coli* Stämme bei menschlichen Darm-MC zur Aktivierung der intrazellulären Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren ERK1/2, c-Fos und AP1. Diese Aktivierung reichte allerdings nicht aus, um eine vollständige Immunantwort auszulösen.

Interessanterweise bewirkten die hämolytischen *E. coli* Stämme ATCC 25922 und 35218 eine starke Aktivierung menschlicher Darm-MC. Mit Hilfe isogener Hämolysin-negativer *E. coli* Mutanten und der Hämolysin positiven Transformante des probiotischen

*E. coli* Nissle 1917 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass menschliche Darm-MC sensible Effektorzellen für *E. coli* alpha Hämolyisin sind. Sublytische Hämolyisin Konzentrationen führten bei menschlichen Darm-MC über einen Kalzium-abhängigen Signalweg zur mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8 und zur Freisetzung von Histamin und Leukotrienen. Der Einsatz von Inhibitoren intrazellulärer Signalmoleküle zeigte weiterhin, dass die durch Hämolyisin bedingte Aktivierung der Zellen abhängig von L-Typ Kalzium Kanälen, Calcineurin und NFAT bzw. NF $\kappa$ B ist. Ansteigende Hämolyisinkonzentrationen führten zur zweiten Phase der Aktivierung, die durch eine Lyse der Zellen gekennzeichnet war.

## Abstract

The role of mast cells (MC) as effector cells in IgE dependent processes like the type 1 allergy has been known for a long time. During the decade, it has been shown that MC are also involved in other pathophysiological processes such as mucosal polyposis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, tissue fibrosis, and atherosclerosis. Furthermore, MC play an important role in the regulation of host defense against microbes, tissue remodeling processes, and neuro-immunology-interaction.

The first aim of the present study was to clarify the question whether human intestinal MC express toll-like receptors (TLR), which recognize conserved bacterial and viral components, and can MC be activated through TLR-ligands. The second major focus of the present study was to investigate if the stimulation of human intestinal MC with different *E. coli* and *Shigella* strains, respectively, results in an activation of MC and to identify the underlying mechanism(s).

Accordingly, human intestinal MC were isolated from surgery tissue with a mechanical and enzymatical protocol. The purity of the MC cultures used in all experiments was between 98 and 100% which was achieved by positive selection (MACS). We could show, that human intestinal MC express mRNA for TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, and 9. However, neither the stimulation with LPS (lipopolysaccharide, TLR 4 ligand), LTA (lipoteichoic acid, TLR 2 ligand), Zymosan (TLR 2 ligand), poly I:C (polyinosinic-polycytidylic acid, TLR 3 ligand), R848 (TLR 7/8 ligand), CpG (C poly G oligo-desoxy-nucleotide, TLR 9 ligand) and non CpG, respectively resulted in a release of histamine, leucotriens, TNF- $\alpha$ , or IL-8. Furthermore, mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-8 were not induced by any of the treatments. Similar results were found when human intestinal MC were stimulated with *E. coli* (O101:H-) isolated from human faeces or the probiotic strain *E. coli* Nissle 1917. Even after stimulation with pathogenic bacteria strains such as the invasive *S. flexneri* M90T and the fimbriated *E. coli*, respectively, no induction of any of the parameters mentioned above was found. However, *E. coli* strains activate the intracellular signal molecule and transcription factors ERK1/2, c-Fos, and AP1, but this activation failed to induce a complete immune answer.

In contrast, the hemolytic *E. coli* stains ATCC 25922 and ATCC 35218 provoked strong activation of intestinal MC. Using the isogenic hemolysin negative *E. coli* mutants and the hemolysin positive transformants of the probiotic *E. coli* Nissle 1917 it was shown, that human intestinal MC are sensitive target cells for *E. coli* alpha hemolysin. Stimulation of MC with sublytic concentration of hemolysin resulted in an induction of TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-6,

IL-8 mRNA expression, the release of histamine as well as leucotrien. This activation was found to be regulated by calcium dependent signal cascades. Inhibition of intracellular signal molecules showed that the activation depends on L-type calcium channels, calcineurin, NFAT and NF $\kappa$ B. Prolonged infection with hemolytic *E. coli* strains resulted in lysis of intestinal MC indicating a biphasic activation of hemolysin.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Entwicklung und Verteilung von Mastzellen	1
1.2 Mastzell-Heterogenität	2
1.3 Effektorfunktion von Mastzellen	4
1.4 Funktion von Mastzellen bei der Immunantwort gegen Pathogene	6
1.5 Toll-like Rezeptoren	11
1.6 Toll-like Rezeptor Liganden	12
1.7 Signalwege der Toll-like Rezeptoren	13
1.8 Modulation der Immunantwort durch TLR	15
1.9 Virulenzfaktoren	17
1.10 Ziel dieser Arbeit	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1 Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer	20
2.2 Erstellen der isogenen <i>E. coli</i> Hämolysin-Mutante	23
2.2.1 Prinzip	23
2.2.2 DNA-Klonierung	25
2.2.3 DNA-Aufreinigung aus Agarose mit dem Jetsorb-Kit und DNA Präparation aus Bakterien	26
2.2.4 Transformation	27
2.2.5 Erzeugung der Mutanten	28
2.2.6 Genotypische Darstellung der <i>E. coli</i> -Mutanten im Southern Blot	29
2.3 Transformation des <i>E. coli</i> Nissle 1917	30
2.4 Isolation von Mastzellen aus menschlichem Darmgewebe	30
2.5 Mastzellanreicherung durch magnetische Zellseparation	31
2.6 Kultur menschlicher Darmmastzellen	32
2.7 Isolation und Kultur menschlicher <i>in vitro</i> generierter MC (CBMC)	33
2.8 Mastzellaktivierung	33
2.8.1 Mastzellaktivierung mit TLR-Liganden	33
2.8.2 Mastzellaktivierung durch Bakterien	34
2.9 Analyse intrazellulärer Bakterien	34

2.10	Inhibitoren	35
2.11	Mediatormessung	35
2.12	RNA-Isolation, Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und real-time RT-PCR	35
2.13	Durchflusszytometrie	37
2.14	Ca-Mobilisation	37
2.15	Statistik	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden	39
3.1.1	Toll-like Rezeptor Expression in menschlichen Darmmastzellen	39
3.1.2	Toleranz menschlicher Darmmastzellen gegenüber Toll-like Rezeptor-Liganden	40
3.1.3	Aktivierung <i>in vitro</i> generierter Mastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden	43
3.2	Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien	45
3.2.1	Mediator-Freisetzung menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien	45
3.2.2	Intrazelluläre Bakterien bei menschlichen Darmmastzellen	48
3.2.3	Zelllyse menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien	49
3.2.4	Geno- und Phänotypische Darstellung isogener Hämolysin Mutanten	51
3.2.5	<i>E. coli</i> alpha Hämolysin stimuliert die Mediator-Freisetzung menschlicher Darmmastzellen	52
3.2.6	Hämolytischer <i>E. coli</i> Nissle (pSF4000) führt zu Mediator-Freisetzung und Zelltod	53
3.2.7	Kulturüberstand hämolytischer <i>E. coli</i> Bakterien bewirkt MC-Aktivierung	55
3.2.8	<i>E. coli</i> alpha Hämolysin induziert Kalzium-Fluss	56
3.2.9	<i>E. coli</i> – Stämme aktivieren den extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 Signalweg	58
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
4.1	Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden	60
4.2	Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien	68
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>92</b>
8.1	Originalarbeiten	92
8.2	Ausgewählte Kongressbeiträge	92
<b>9</b>	<b>Erklärung</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein
CBMC	aus Nabelschnurblut gewonnene MC (cord blood derived mast cell)
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
CED	chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen
CpG-ODN	C poly G oligo-desoxy-nucleotide
CTMC	Bindegewebs-MC der Nager (connective tissue mast cell)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds RNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymvermittelter Immuno(sorbent)assey
Fc	konstante Region der Immunglobuline (Fragment crystallizable)
FCS	fetales Kälberserum
GDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HSP	Hitzeschockprotein
<i>Hly</i>	<i>E. coli</i> alpha Hämolysin
<i>hlyA</i>	Untereinheit A des <i>E. coli</i> alpha Hämolysin
IgER	Immunglobulin E -Rezeptor
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichic acid)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetische Zellseparation (magnetic-activated cell sorting)
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Mastzelle/n
MC <sub>T</sub>	Tryptase positive und chymase negative Mastzellen
MC <sub>TC</sub>	Tryptase und Chymase positive Mastzellen
MMC	Schleimhautmastzellen der Nager
mMCP-1	Maus Mastzell Protease 1 (mouse mast cell protease I)
MOI	mode of infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MyD88	myleoid differentiation primary-response protein 88
NF-κB	Transkriptionsfaktor NF-κB (nuclear factor-κB)
NGF	Nerven Wachstumsfaktor (Nerve growth factor)
OD	optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

PBMC	aus peripheren Blut generierte Mastzellen (peripheral blood derived mast cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
polyI:C	polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern-recognition-Rezeptoren
rh	rekombinant, human
RIA	Radioimmunoassay
RMCP II	Ratten Mastzell Protease II (rat mast cell protease II)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
RTX	repeats in toxin
SCF	Stammzellefaktor (Stem cell factor)
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )
sLT	Sulfido-Leukotriene
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung und Verteilung von Mastzellen

Mastzellen (MC) entwickeln sich aus CD34<sup>+</sup>/*c-kit*<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark (87) und werden als MC-Vorläufer ins periphere Blut entlassen, wo sie mit Endothelzellen interagieren. Die Interaktion erfolgt über bestimmte Oberflächenmoleküle aus der Familie der Adhäsionsmoleküle, wie z.B. VLA-4, VCAM-1, LFA-1, ICAM-1 oder E-Selectin, und bewirkt die Migration der noch nicht ausdifferenzierten MC in das Gewebe (19,103,132,183). Nach Einwanderung in das Zielgewebe differenzieren die ungranulierten, unreifen MC durch die Einwirkung von anderen anwesenden Zelltypen, Zytokinen und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix zu reifen MC aus. MC lokalisieren überwiegend in Geweben die eine Barrierefunktion gegenüber der Außenwelt erfüllen, dies sind z. B. Gastrointestinaltrakt, Lunge oder Haut. Aber auch in vielen anderen Organen wie Herz, Niere, Bauchspeicheldrüse, Gebärmutter oder Gehirn sind MC aufzufinden. Im Gewebe befinden sich MC meist in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen und Nerven. Die Anzahl der MC im Gewebe wird über Gradienten bestimmter Chemokine (Eotaxin, Rantes, Interleukin-8) oder extrazellulärer Matrix-Proteine (Fibronektion, Laminin) reguliert, welche Migration, Apoptose und Proliferation der MC regulieren (19,46,183). MC sind ebenso wie Monozyten bzw. Makrophagen langlebige Zellen, die nach Stimulation wieder in den Zellzyklus eintreten und proliferieren können. Im peripheren Blut zirkulieren unter physiologischen Bedingungen keine ausdifferenzierten MC.

Eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung und das Überleben der MC stellt der Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) dar. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass aus murinen und humanen Vorläuferzellfraktionen (Knochenmark, peripheres Blut, Nabelschnurblut) nahezu reine MC-Populationen generiert werden können, wenn der Kultur SCF zugesetzt wird (73,133,191,195). Auch aus Geweben wie Lunge und Darm isolierte, ausgereifte menschliche MC lassen sich nur in Anwesenheit von SCF kultivieren (17,97,132). Mäuse mit Mutationen im SCF bzw. SCF-Rezeptor (Tyrosin-Kinase *c-kit*) weisen neben Befunden wie einer makrozytär-hypoplastischen Anämie, Sterilität und dem Fehlen von Hautmelanozyten bzw. Cajal-Zellen auch nahezu keine Gewebe-MC auf (27,30). Im Gegensatz dazu leiden Patienten, die eine aktivierende Mutation im Gen für den SCF-Rezeptor aufweisen, häufig an ungehemmter lokaler oder systemischer MC-Vermehrung (Mastozytose) (139).

Neben SCF wurden eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren für MC beschrieben, die meist in Synergie mit SCF wesentliche Effekte vermitteln. Das TH2-Zytokin Interleukin (IL)-4

inhibiert beispielsweise das Wachstum von CD34<sup>+</sup> Mastzellvorläuferzellen aus peripherem Blut oder fetaler Leber (171,189,207). Auf MC, die aus Nabelschnurblut differenzierten, wirkt IL-4 dagegen – wenn auch nur sehr schwach – wachstumsfördernd (144,212). Humane Darm-MC zeigen in Anwesenheit von IL-4 eine deutlich gesteigerte Proliferation (16,105).

Die Effekte von IL-6 auf Wachstum und Differenzierung von CD34<sup>+</sup> Mastzellvorläuferzellen aus humanem Nabelschnurblut sind in der Literatur kontrovers beschrieben (86,140). Bei murinen Mastzellvorläuferzellen aus Knochenmark zeigt IL-6 eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation, jedoch eine steigernde Wirkung auf die Zellreifung (170). IL-6 steigert die Expression des SCF-Rezeptors, hat Einfluss auf die Zellgröße und die Anzahl Chymase positiver Zellen (86).

In neueren Studien wurde TGF (transforming growth factor)- $\beta$  als Inhibitor des Wachstums und der Differenzierung von MC identifiziert (48,147). In menschlichen Darm-MC zeigte TGF- $\beta$  eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum (48).

## 1.2 Mastzell-Heterogenität

Die MC-Population ist eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die sich aufgrund morphologischer, biochemischer und funktioneller Eigenschaften stark voneinander unterscheiden (117). Unterschiede sind beispielsweise bei dem Einfluss verschiedener Zytokine auf die Entwicklung von MC, der Synthese von Mediatoren nach IgE-abhängiger Aktivierung sowie der Expression und Aktivierbarkeit verschiedener Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Toll-like Rezeptoren, beschrieben worden (116,121).

Nager-MC werden in Bindegewebs-MC (connective tissue mast cell, CTMC) und Schleimhaut-MC (mucosal mast cell, MMC) unterteilt. In der Haut oder Peritonealhöhle dominieren die CTMC, welche im Gegensatz zu den MMC größer sind (38,131). Menschliche MC werden ebenfalls in zwei Subklassen unterteilt. MC, welche die Proteasen Tryptase und Chymase exprimieren (MC<sub>TC</sub>-Subtyp), befinden sich vorwiegend in Haut, Tonsillen oder Tela Submucosa des Gastrointestinaltraktes. MC, welche nur Tryptase, nicht jedoch Chymase exprimieren (MC<sub>T</sub>-Subtyp), sind überwiegend in der Schleimhaut von Lunge und Gastrointestinaltrakt angesiedelt (38,202). In funktioneller Hinsicht ist diese Einteilung nur bedingt sinnvoll. MC der menschlichen Haut (ca. 99% MC<sub>TC</sub>) lassen sich beispielsweise durch Agonisten wie Substanz P, Compound 48/80 oder Morphin aktivieren (106). Menschliche Darm-MC oder MC aus der Nasenschleimhaut reagieren dagegen nicht auf diese Substanzen, obwohl beide Zellpopulationen (MC<sub>TC</sub> -, MC<sub>T</sub> -Subtyp) vorhanden sind (106).

Einen großen Einfluss auf den MC-Phänotyp hat die organspezifische Umgebung. Es wurde beschrieben, dass zelluläre T-Zell-Defekte im Rahmen angeborener oder erworbener Immunsystemerkrankungen, wie z.B. AIDS, eine deutliche Reduktion der Anzahl von MC<sub>T</sub> in der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes zur Folge haben, während die Dichte der MC<sub>TC</sub> bei diesen Patienten unverändert erschien (72). Interessanterweise sind MC in der Lage ihren Phänotyp zu ändern und sich an eine neue Umgebung anzupassen. In Versuchen an MC-defizienten Mäusen, die mit MC aus Wildtyp-Mäusen rekonstituiert wurden, konnte gezeigt werden, dass ausdifferenzierte MC nach Transplantation in MC-defiziente Mäuse in der Lage sind die gewebespezifischen Eigenschaften zu entwickeln und sich der neuen Umgebung anzupassen (141).

Aufgrund ständig steigender Erkenntnisse der MC-Physiologie wird mittlerweile von einem breiten Spektrum unterschiedlicher MC-Subtypen ausgegangen, welche sich innerhalb entzündlicher Reaktionen oder Infektionen ständig verändern (117). In den letzten Jahren wurden sowohl humane als auch murine Modelle etabliert, anhand welcher die Subtyp-spezifischen MC-Funktionen untersucht werden (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Modelle für die Untersuchung von MC-Funktionen**

---

---

**Menschliche *in vitro* Modelle**

- Zelllinien: HMC-1, KU-812, LAD
- In vitro aus Stammzellen generierte Mastzellen aus Nabelschnurblut, peripherem Blut, Knochenmark oder fetaler Leber
- Gewebemastzellen aus Lunge, Haut, Gebärmutter und Gastrointestinaltrakt

**Nager *in vitro* Modelle**

- Zelllinie: MC/9
- In vitro generierte MC aus der Bauchhöhle oder Knochenmark

**Nager *in vivo* Modelle (Mastzell-defizient)**

- W/W<sup>v</sup> Mäuse: Mutation des SCF-Rezeptors (*c-kit*), kann lokal mit Mastzellen aus Wildtyp Mäusen rekonstituiert werden
  - W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup> Mäuse: Mutation des SCF-Rezeptors (*c-kit*), kann lokal mit Mastzellen aus Wildtyp Mäusen rekonstituiert werden
  - Sl/Si<sup>d</sup> Mäuse: SCF-Defizit
  - W<sup>s</sup>/W<sup>s</sup> Ratten: Mutation des SCF-Rezeptors (*c-kit*)
- 

nach Marshall et al. (117)

### 1.3 Effektorfunktion von Mastzellen

Die Rolle der MC als Effektorzelle in IgE-abhängigen Prozessen wie der Typ I Allergie ist seit langem bekannt. Durch Kreuzvernetzung von IgE-Molekülen, die über den hochaffinen IgE-Rezeptor an die Mastzelloberfläche gebunden werden, kommt es zur anaphylaktischen Reaktion mit Ausschüttung spezifischer Mediatoren (44,45,109). Doch die pathophysiologische Funktion von MC ist nicht nur auf deren Vermittlung allergischer Reaktionen beschränkt. In verschiedenen neueren Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MC eine Rolle bei Tumorentwicklung, rheumatoiden Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Gewebsfibrose und Arteriosklerose spielen (131,201). Diese Erkrankungen gehen meist mit einer Veränderung der MC-Dichte und des Aktivierungszustands einher. Es ist bekannt, dass bei vielen Erkrankungen, in denen es zu chronisch inflammatorischen oder auch fibrotischen Prozessen kommt, auch vermehrt MC gefunden werden (18,49). Aber auch bei physiologischen Prozessen, wie z.B. der Abwehr bakterieller und parasitärer Infektionen, der Wundheilung und Angiogenese sowie der Neuro-Immun-Interaktion spielen MC eine Rolle.

Die weite Verbreitung von MC im Gewebe und ihre Fähigkeit, nach Aktivierung in kurzer Zeit eine große Anzahl verschiedener Mediatoren freizusetzen, ermöglicht der MC ihr breites funktionelles Spektrum. Bei den Mediatoren handelt es sich sowohl um präformierte (Histamin, Proteasen, Proteoglykane, Zytokine) als auch um *de novo* synthetisierte (Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine) Stoffe. Die Freisetzung des am häufigsten mit MC in Verbindung gebrachten Mediators Histamin ist sowohl in physiologische als auch in pathophysiologische Reaktionen involviert. So spielt Histamin zum Beispiel eine entscheidende Rolle bei der von Coombs und Gell beschriebenen Typ I-Allergie. Im Rahmen dieser allergischen Sofortreaktion werden innerhalb von Sekunden große Mengen an Histamin freigesetzt, welche die typischen Symptome wie Schwellung, Rötung und Juckreiz bewirken. Aber nicht nur die akute Phase einer allergischen Reaktion wird durch MC initiiert, sondern ebenfalls der Übergang in eine chronische Erkrankung wird durch die Freisetzung von Histamin gefördert (3,77). Histamin beeinflusst Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Epithel- und Endothelzellen hinsichtlich Proliferation, Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen oder MHC II Antigenen (3,77,164). Im Gastrointestinaltrakt spielt Histamin eine wichtige Rolle bei der Regulation neurophysiologischer Darmprozesse wie Sekretion und Motilität (39,131). Kognitive Prozesse, Schlaf-Wachrhythmus sowie die Energie- und Endokrinehomöostase werden ebenfalls durch Histamin reguliert (56,67).



MC-Proteasen wie Trypsase und Chymase regulieren unter anderem Endothelzellen und Fibroblasten und führen zur Akkumulation von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Leukotriene (LTB<sub>4</sub> und LTC<sub>4</sub>) sind ebenfalls Chemotaxine für neutrophile und eosinophile Granulozyten (117). Sie sind außerdem neben Histamin an der allergischen Reaktion beteiligt. Bei den Zytokinen und Chemokinen, die von MC gebildet werden, handelt es sich sowohl um proinflammatorische (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) als auch um antiinflammatorische Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-10) sowie um Zytokine der TH-2 (IL-3, IL-5, IL-13) bzw. TH-1 Immunantwort (Interferon- $\gamma$ , IL-12, IL-18) (117). Als Besonderheit wird für MC angenommen, dass sie Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  auf einen Reiz hin nicht nur neusynthetisieren, sondern dass auch diese Mediatoren zusätzlich in Granula gespeichert vorliegen und so unmittelbar freigesetzt werden können (15,53). Einen Überblick, welche Mediatoren von humanen MC freigesetzt werden können liefert Tabelle 2.

Tabelle 2: Mediatoren humaner Mastzellen

Produkt-Klasse	Produkt
Präformierte Granulamediatoren:	Histamin, Heparin, Chondroitinsulfat, Trypsase, Chymase, major basic protein (MBP), Cathepsin, Carboxypeptidase-A
Eicosanoide	PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , PAF
Zytokine, Wachstumsfaktoren	GM-CSF, INF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R Antagonist, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-18, LIF, LT $\beta$ , M-CSF, MIF, TGF- $\beta$ 1, TNF, bFGF, EGF, PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF
Chemokine	CCL1, MCP-1, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , RANTES, MCP-3, MCP2, Eotaxin, MCP4, TARC, LARC, MDC, Groa/KC, Gro $\beta$ /MIP-2, Gro $\gamma$ , IP-10, Lymphotactin
Freie Radikale	Stickoxide, Superoxide
Andere	Corticotropin-releasing factor, Urocortin, Substanz P

nach Galli, S.J. et al. (46)

Der klassische Weg der MC-Aktivierung stellt die Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren durch polyvalente Antigene bzw. Allergene dar (200). In ähnlicher Weise können MC allerdings auch über Fc $\gamma$ -Rezeptoren gebundene IgG-Immunglobuline antigenspezifisch aktiviert werden (145). Ein Immunglobulin-unabhängiger MC-Agonist ist zum Beispiel SCF. SCF steht membrangebunden auf Fibroblasten und Endothelzellen (132) oder nach

proteolytischer Spaltung in löslicher Form (88,132) zur Verfügung und bindet an den auf der MC-Oberfläche befindlichen ckit-Rezeptor. SCF führt bei menschlichen Darm-MC zu einer Steigerung der Mediatorfreisetzung und der Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine (17,104). Weitere Agonisten gehören zu der Familie der Neuropeptide, wie zum Beispiel Substanz P, Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) oder Neuropeptid Y. Die Rolle der MC in der Neuro-Immun-Interaktion hat in den letzten Jahren aufgrund der auffälligen anatomischen Nähe zu Nervenzellendungen besondere Aufmerksamkeit erlangt (13). Humane Haut-MC werden z.B. durch Substanz P, VIP und Somatostatin zur Freisetzung von Histamin angeregt (29). Ältere Befunde in Lungen-MC zeigen, dass Agonisten des  $\beta$ 2-Adrenozeptors, wie Adrenalin, Noradrenalin und Salbutamol, potente inhibitorische Wirkungen auf die Mediator-Freisetzung von MC ausüben (76). Diese Befunde wurden an menschlichen Darm-MC hinsichtlich der Freisetzung von Histamin, Lipidmediatoren und diverser Zytokine aus primären Darm-MC zunächst bestätigt. Ferner erwiesen sich die  $\beta$ 2-Adrenozeptoragonisten als potente Inhibitoren der SCF-abhängigen Proliferation, Migration und Adhäsion von Darm-MC. Als ein möglicher, diesen Effekten zugrunde liegender Mechanismus wurde eine Störung des F-Aktin-Zytoskelettes nach Aktivierung des  $\beta$ 2-Adrenozeptors identifiziert und charakterisiert (47). Auch Zytokine zählen zu den Agonisten der MC. Die Anwesenheit von Zytokinen beeinflusst zum Beispiel das Antwortverhalten von MC nach IgER-Kreuzvernetzung (16,105,171,189). Pharmakologische Substanzen wie Chromoglycinsäure oder klassische Immunsuppressiva wie Glukokortikoide und Cyclosporin A konnten die IgE-abhängige Mediator-Freisetzung kultivierter MC hemmen (33,178,206). Neben biochemischen Agonisten werden MC des Weiteren durch bakterielle Produkte wie LPS oder FimH, virale und parasitäre Substanzen reguliert (109,131,200). Die Funktion der MC bei der Immunantwort gegen Pathogene wird im nächsten Kapitel genauer erläutert.

## **1.4 Funktion von Mastzellen bei der Immunantwort gegen Pathogene**

Lange Zeit wurde die Rolle der MC im angeborenen Immunsystem lediglich im Rahmen parasitärer Infektionen untersucht. Doch bis heute liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (125,204,205) und die Rolle der MC als Effektorzelle bei Parasitosen bleibt ungeklärt. Einige Autoren berichten von einer MC-Akkumulation im Gewebe im Rahmen parasitärer Infektionen (7,205). Kinetikstudien konnten zeigen, dass der Zeitpunkt der MC-Akkumulation im Gastrointestinaltrakt von Ratten während einer *Trichinella spiralis* Infektion mit dem Zeitpunkt der Trichinella-Ausscheidung übereinstimmt. Die systemische Sekretion der MC-Mediatoren RMCP II (rat mast cell protease II) bzw. mMCP-1 (mouse mast cell protease I) ist von großer Bedeutung bei der Immunantwort gegen Trichinellen (89,205).

BALB/c Mäuse mit einer Mutation in der mMCP-1 zeigten eine verminderte Ausscheidung von *Trichinella spiralis* und eine erhöhte Anzahl an Larven im Muskelgewebe (89,125). Wurden Ratten allerdings mit *Nippostrongylus brasiliensis* infiziert, trat eine MC-Akkumulation erst nach Beendigung der Ausscheidung auf (205). Diese im Anschluss an die Immunantwort auftretende MC-Akkumulation wurde von einigen Autoren als Folge einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort während einer parasitären Infektion bewertet (41). In einer weiteren *in vivo* Studie an Mäusen konnte zwar nach Infektion mit *Leishmania major* eine erhebliche MC-Degranulation beobachtet werden, MC-defiziente Mäuse wiesen jedoch im Vergleich zu kongenen Wildtypstämmen keinen Unterschied hinsichtlich der Intensität oder Dauer der Infektion auf (204). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Rolle der MC im Rahmen parasitärer Infektionen von dem Erreger abhängig ist.

In zahlreichen neueren Studien wurde die Rolle der MC in der Abwehr bakterieller Infektionen präzisiert. Beim Menschen wurde in histologischen Studien bei einer Reihe von bakteriellen Infektionen, darunter pulmonale Infektionen, Blaseninfektionen und *Helicobacter pylori*-assoziierte Gastritiden, eine MC-Akkumulation im Gewebe beobachtet (39,110). Im Tiermodell zeigten Echtenacher et al. und Malaviya et al., dass MC-defiziente Mäuse eine deutlich höhere Letalität nach experimentell induzierter Peritonitis aufwiesen als Kontrolltiere (36,111). Die antibakterielle Funktion der MC ist ganz wesentlich auf deren Produktion von TNF- $\alpha$  zurückzuführen, welches unter anderem für die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in das Entzündungsareal essentiell ist (108,111). Neben TNF- $\alpha$  spielen Leukotriene eine wichtige Rolle. Die Anwendung eines Leukotrien-Synthese Inhibitors in Mäusen mit experimentell induzierter Peritonitis führte zu einer erhöhten Letalität. Die in Wildtypstämmen verminderte Chemotaxis neutrophiler Granulozyten in das Peritoneum und die reduzierte „bacterial clearance“ nach Gabe des Leukotrien-Synthese Inhibitors konnte in MC-defizienten Mäusen nicht beobachtet werden (108).

In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass MC neben TNF- $\alpha$  und Leukotrienen Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-10, IL-13 nach bakterieller Infektion mit gram-negativen (z.B. *E. coli*, Klebsiellen, *Helicobacter pylori*, Borrelien u.a.), bzw. gram-positiven Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*) exprimieren (39,109). Die Bedeutung von MC bei der Abwehr bakterieller Infekte kann aus diesen Studien allerdings kaum abgeschätzt werden, zumal andere Zellen wie Makrophagen und Neutrophile nach Infektion ähnliche Produkte sezernieren. Des Weiteren konnte die Freisetzung von Histamin nach Infektion mit *Helicobacter pylori* beobachtet werden (119,208).

*In vitro* und *in vivo* Studien identifizierten einige bakterielle Strukturen, wie Zellwandkomponente (Fimbrien, Polysaccharide, Lipopolysaccharide) und sekretorische

Produkte (Clostridientoxin, Cholera toxin), die zur MC-Aktivierung führen (110,110,112,123,197,197). MC tragen auf der Oberfläche Rezeptoren wie CD48 und  $\beta_1$  Integrine, die als potentielle Bindungsstellen für Bakterienstrukturen in Frage kommen. Beispielsweise konnte in Ratten-MC CD48 als Rezeptor für das *E. coli* Fimbrienantigen FimH identifiziert werden (110,112). Aber auch „Pattern recognition receptors“ (PRR) wie beispielsweise die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLR), die als Rezeptoren für konservierte mikrobielle Strukturen dienen, sind auf murinen und humanen *in vitro* generierten MC nachgewiesen worden (121,123,197). Anhand eines Peritonitis Modells an MC-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Wirkung der MC gegenüber Enterobakterien TLR 4 abhängig ist. In dieser Studie wurde die Peritonitis durch eine Ligation und Punction des Caecums induziert, wodurch Enterobakterien in das Peritoneum gelangten. Die Rolle des TLR 4 wurde mit Hilfe MC-defizienter Mäuse, die mit MC aus TLR 4-defizienten Mäusen rekonstituiert wurden, aufgezeigt. In diesen „MC knock-in Mäusen“ kam es nach Induktion der Peritonitis zu einer verminderten Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Peritoneum (181). Neben der direkten MC-Aktivierung durch Bakterien spielt die indirekte Aktivierung über Fc-Rezeptoren bzw. Komplement-Rezeptoren eine ebenso wichtige Rolle. MC exprimieren eine Reihe von Fc-Rezeptoren, die pathogenspezifische Antikörper, aber auch so genannte B-Zell Superantigene (Immunglobulin-bindende Proteine) erkennen. Nach Bindung kommt es zur Freisetzung von Leukotrienen, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Proteasen und Histamin (117). Des Weiteren exprimieren MC Komplementrezeptoren, wie CR3, CR4, C3aR, C5aR auf ihrer Oberfläche. Die Bindung des Komplementsystems an diese Rezeptoren führt ebenfalls zur Aktivierung der MC und zur Freisetzung von Leukotrienen, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, Proteasen und Histamin (117). Komplementfaktoren sind nicht nur für die Aktivierung der MC von Bedeutung, sondern spielen auch eine Rolle bei der MC-Rekrutierung (142).

MC reagieren jedoch nicht nur mit der Freisetzung von Mediatoren auf bakterielle Infektionen, sondern sind auch in der Lage, Bakterien zu phagozytieren (110,113). Die Fähigkeit der Phagozytose wurde erstmalig 1979 von Sher et al. dokumentiert (168). Es konnte gezeigt werden, dass MC den pathogenen Stamm *Salmonella typhi* in Abhängigkeit vom Komplement-CR3-Rezeptor phagozytieren. In Anbetracht der invasiven Eigenschaft dieses Stammes war jedoch nicht klar, inwieweit dieser Mechanismus durch MC bedingt war. Erst 1994 konnten Malaviya et al. zeigen, dass auch nicht invasive Bakterien, wie der FimH-exprimierende *E. coli*, von MC phagozytiert werden (113). Erstaunlicherweise wurden diese Bakterien über einen Opsonin-unabhängigen Prozess von MC erkannt und phagozytiert (110). Die Opsonin-unabhängige Phagozytose erfolgt durch Bindung des Fimbrienproteins an CD48 (110) und der Bildung einer kaveolären Umhüllung der Bakterien (169). Diese

kaveoläre Umhüllung fusioniert nicht mit Lysosomen, wodurch ein längeres Überleben der Bakterien in der Zelle beobachtet werden kann (10).

Auch auf die spezifische Immunantwort gegen Bakterien haben MC einen Einfluss. Es liegen mittlerweile einige Studien vor, die den „Crosstalk“ zwischen MC und adaptivem Immunsystem beschreiben. In *in vitro* Studien zeigten humane und murine MC die Fähigkeit, Antigene über den MHC (major histocompatibility complex)-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-abhängigen Signalweg zu präsentieren (42,114,151). MHC-Klasse-I-Moleküle werden von murinen und auch von humanen MC aus Lunge, Leber, Uterus und Haut exprimiert (21,65). MHC-Klasse-II-Moleküle werden nach Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  oder bakteriellen Zellwandkomponenten (Lipopolysaccharid) exprimiert (21,65). Durch die Antigen-Präsentation sind MC in der Lage, mit T-Zellen zu interagieren und eine antigenspezifische klonale Expansion einer T-Zellpopulation zu induzieren (65,130). Doch MC beeinflussen T-Zellen noch durch weitere Mechanismen. So sind MC in der Lage, chemotaktische Faktoren wie IL-16, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , RANTES oder  $\text{LTB}_4$  freizusetzen, bzw. Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel E-Selektin auf der Zelloberfläche zu exprimieren, welche zu einer Migration der T-Zellen führen (46). Aber auch Histamin beeinflusst die T-Zell-Antwort. Zum Beispiel führt Histamin über die Bindung an H1-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen zu einer Induktion einer TH1-Antwort bzw. durch Bindung an H2-Rezeptoren zu einer Suppression der TH1- und TH2-Antwort (78). In Versuchen mit MC knock-in Mäusen konnte die Bedeutung der T-Zell Regulation durch MC *in vivo* gezeigt werden. In einer Studie von McLachlan et al. führte eine Injektion von *E. coli* –Bakterien in die Pfote dieser Mäuse zu einer Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  aus MC, was eine gesteigerte Migration von T- und B-Zellen in die Lymphknoten zur Folge hatte (126).

MC-Mediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1 bewirken des Weiteren eine Reifung Dendritischer Zellen von Zellen, die Antigene aufnehmen, aber aufgrund der geringen MHC Expression nicht auf der Oberfläche präsentieren, zu  $\text{CD80}^+\text{CD86}^+\text{CD40}^+$  -positiven Zellen, die eine starke MHC Expression aufweisen. Diese Reifung erfolgt nach Migration in den Lymphknoten (32,177). Weitere MC-Mediatoren wie Histamin,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ , GM-CSF, CCL20 führen bei Dendritischen Zellen zur Migration, Maturation und Aktivierung (46).

Die Rolle der MC im Rahmen viraler Infektionen ist noch nicht geklärt. MC können mit verschiedenen Viren, wie HIV-1 (9,99), Dengue Virus (84,85) oder Adenovirus (84) infiziert werden. Infektionsversuche mit dem Respiratory Syncytial Virus (RSV) bzw. Sendai Virus an Rindern und Nagern zeigten eine MC-Akkumulation und erhöhte Aktivität der MC (83,196). Die erhöhte MC-Aktivität ging dabei mit einer erhöhten Virentoleranz und einer erhöhten Lymphozyten-Infiltration einher (176). Im Kontext viraler Entzündung, wie z.B. bei einer

Infektion mit dem Dengue Virus, spielt die T-Zell-Rekrutierung durch MC eine entscheidende Rolle. Die Rekrutierung erfolgt durch Chemokine, wie CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 und CXCL11, welche in Folge viraler Infektionen von MC exprimiert werden (84).

## 1.5 Toll-like Rezeptoren

Das Protein Toll wurde erstmals als Transmembranrezeptor bei der Fruchtfliege *Drosophila* im Zusammenhang mit der dorsoventralen Polarisierung in der Embryonalentwicklung beschrieben. Erst später konnte ebenfalls in der Fruchtfliege *Drosophila spec.* gezeigt werden, dass das Toll-Protein eine Rolle im angeborenen Immunsystem spielt. Fliegen mit einer Mutation im Toll-Signalweg waren empfindlicher für Infektionen mit Pilzen und gram-positiven Bakterien als Tiere bei denen die Mutation fehlte (96,160). Gram-negative Bakterien wurden durch das Toll-Protein nicht erkannt (62). *Drosophila spec.* besitzen neben dem Toll-Signal-Weg einen weiteren Weg, der bei der Erkennung pathogener Erreger eine Rolle spielt. Dieser so genannte IMD (immune deficiency)-Signalweg dient der Erkennung gram-negativer Bakterien. Ein Rezeptor für diesen Signalweg konnte bis jetzt noch nicht identifiziert werden (184).

Ein Jahr nachdem die Rolle des Toll-Proteins im angeborenen Immunsystem erkannt war, wurde in Wirbeltieren eine homologe Protein-Familie identifiziert, die den Namen Toll-like Rezeptoren (TLR) erhielt. Es sind bisher zehn humane TLR beschrieben, die als Rezeptoren für unterschiedliche bakterielle und virale Produkte fungieren. Die Toll-like Rezeptoren weisen eine Leuzin-reiche extrazelluläre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne, die der zytoplasmatischen Domäne der IL-1 Rezeptoren bei Säugern homolog ist und daher als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) homologe Domäne bezeichnet wird, auf. Aufgrund einer starken Gen- und Protein Homologie wurden die Rezeptoren in 5 Unterfamilien (TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 2 und TLR 9) eingeteilt. Die Unterfamilie TLR 2 besteht aus TLR 1, TLR 2, TLR 6 und TLR 10, wobei die TIR-Domänen der TLR 1 und TLR 6 eine Homologie von über 90% aufweisen (187). Die TLR 9-Unterfamilie besteht aus den Rezeptoren TLR 7-9.

TLR sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Eine Ausnahme bildet hier jedoch TLR 9, der in Endosomen nachgewiesen wurde und in der Lage ist, intrazelluläre Bakterien-Komponenten zu erkennen (198,199). Des Weiteren treten TLR als homomäre bzw. heteromäre Strukturen auf. So bildet zum Beispiel TLR 2 Heterodimere mit TLR 6 oder TLR 1. Das Auftreten von Trimeren wurde bislang noch nicht beobachtet (149).

TLR konnten in allen Gewebetypen nachgewiesen werden (215). Gerade in Geweben, die immunologische Funktionen ausüben, wie Milz oder peripheres Blut, ist ein diverses Repertoire an TLR zu beobachten. Aber auch in Geweben (Darm, Lunge), welche einer Vielzahl von Bakterien ausgesetzt sind, treten TLR auf (215). TLR werden von Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, B-Zellen, MC und Epithelzellen exprimiert

(184). Monozyten und Makrophagen exprimieren bis auf TLR 3 alle Rezeptoren (136). Doch die Expression variiert sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen verschiedenen Zellsubtypen. Myeloide Dendritische Zellen exprimieren beispielsweise TLR 1, 2, 4, 5, und 8. Wohingegen plasmazytoide Dendritische Zellen lediglich TLR 7 und 9 exprimieren (75,79). Auch hinsichtlich der TLR-Verteilung auf der Zelloberfläche gibt es Unterschiede. So wird zum Beispiel TLR 5 ausschließlich an der basolateralen Oberfläche intestinaler Epithelzellen exprimiert (50).

## 1.6 Toll-like Rezeptor Liganden

Der wohl am besten untersuchte Rezeptor ist TLR 4. Dieser Rezeptor ist in der Lage Lipopolysaccharide (LPS), die die Hauptzellwandkomponente gram-negativer Bakterien darstellen, zu erkennen. Eine direkte Bindung von LPS an TLR 4 ist allerdings bisher nicht nachgewiesen worden (184). LPS bindet an LPS-binding-Protein und wird als LPS-LPS-binding-Protein-Komplex von CD14 erkannt. CD14 ist ein an Glycosylphosphatidylinositol verankertes Molekül, welches vor allem auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (184). MD-2 ist ein weiteres Molekül, welches in die LPS-TLR 4 Aktivierung involviert ist. Es bindet im endoplasmatischen Retikulum an TLR 4, wird als MD-2-TLR-4-Komplex an die Zelloberfläche transportiert (137) und erkennt dort das an CD14 und LPS-binding-Protein gebundene LPS (2,138). Des Weiteren wird LPS von extrazellulären Molekülen, wie Hitzeschockproteinen (HSP70, HSP90) und Chemokinrezeptoren (CXCR4) erkannt (184). Neben LPS erkennt TLR 4 ebenfalls virale Komponenten. TLR 4 defiziente Mäuse, die mit dem RSV infiziert wurden, wiesen eine verminderte inflammatorische Antwort und „bacterial clearance“ auf (61,92).

TLR 2 erkennt eine Reihe bakterieller Komponenten, wie zum Beispiel Lipoproteine gram-negativer Bakterien, Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien (6,100,165,194) und Zymosan von Pilzen (193). In TLR 2 defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Letalität nach Infektion mit dem gram-positiven *Staphylokokkus aureus* beobachtet werden (185).

Das Flagellin ist ein Bestandteil gram-negativer Bakterien, der von TLR 5 erkannt wird und der Fortbewegung von Bakterien dient. Die konservierten Amino- und Carboxyenden des Flagellins führten zu einer starken Immunmodulation, die sowohl in Tieren als auch in Pflanzen beobachtet wurde (35,52).

TLR 3 ist in der Lage doppelsträngige (ds) RNA zu erkennen, die während der replikativen Phase bei verschiedenen Viren entsteht. TLR 3 defiziente Mäuse wiesen eine verminderte Immunantwort gegenüber dsRNA und synthetischer dsRNA, wie zum Beispiel polyinosinic-polycytidylic acid (polyI:C), auf (5).



Bakterielle DNA ist ein potenter Aktivator verschiedener Immunzellen. In TLR 9 defizienten Mäusen konnte erstmalig gezeigt werden, dass TLR 9 für die Erkennung bakterieller DNA verantwortlich ist (64). Die immunmodulierende Komponente bakterieller DNA beruht auf unmethylierten CpG-Motiven, die bei Wirbeltieren aufgrund einer erhöhten Anzahl infrequenter Motive und Methylierungen an den Cysteinenden nicht vorkommen. Die Detektion genetischen Materials durch TLR 9 beschränkt sich aber nicht nur auf tierische CpG Motive, sondern schließt ebenfalls synthetisch hergestellte CpG-DNA ein (64).

Die natürlichen Liganden der TLR 7 und TLR 8 sind noch nicht bekannt (184). Neuesten Untersuchungen zur Folge bindet Imiquimod an TLR 7. Imiquimod ist ein Stoff der Imidazoquinolin-Gruppe, einer Gruppe von synthetischen Stoffen, die aufgrund antiviraler und antitumoröser Eigenschaften, durch eine starke Induktion von Interferon- $\alpha$  in verschiedenen Modellen getestet wurde und bei der Therapie genitaler Infektion durch Papilomaviren seinen Einsatz findet. Interessanterweise setzten Makrophagen aus MyD88- oder TLR 7 defizienten Mäusen im Gegensatz zu Makrophagen aus Wildtyp-Mäusen nach Stimulation durch Imiquimod keine inflammatorischen Mediatoren frei (63). Imiquimod weist erhebliche Ähnlichkeiten mit Nukleinsäuren auf. Möglicherweise besteht die Funktion der TLR7 in der Erkennung viraler Erreger.

## 1.7 Signalwege der Toll-like Rezeptoren

Der Signalweg aller TLR beinhaltet die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) sowie der MAP-Kinasen (mitogen-activated protein kinases) ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38 und JNK (c-Jun N-terminale kinase) (11). Der proximale Abschnitt des Signalweges ist abhängig von der Interaktion vorhandener Domänen. Eine dieser Domänen ist die TIR-Domäne, die sich in der zytosolischen Region aller TLR befindet. Diese TIR-Domäne bewirkt die Heterodimerisation bzw. Homodimerisation zwischen TLR und Adapterproteinen. Das Adapterprotein myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) ist Bestandteil des Signalweges aller TLR. In Studien an Makrophagen aus MyD88-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung inflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit Lipoproteinen, CpG DNA oder dsRNA MyD88 abhängig ist (5,57,63,186). MyD88 bindet durch die Interaktion der beiden TIR-Domänen an TLR, wodurch es zur Rekrutierung von Mitgliedern der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK)-Familie kommt. IRAK1 und IRAK2 sind Serinthreonin Kinasen, welche zur Phosphorylierung und Aktivierung von TRAF6 (tumor necrosis factor receptor associated factor 6) führen. TRAF6 ist weiterhin in der Lage die MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), welche auch TAK-1 (transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase) genannt wird, zu aktivieren. TAK-1 aktiviert im weiteren Verlauf den I $\kappa$ B $\alpha$  Kinase Komplex

(IKK). Die Phosphorylierung des  $I\kappa B\alpha$  führt zu dessen Abspaltung von  $NF\kappa B$ , welches in den Zellkern wandert und die Transkription  $NF\kappa B$ -abhängiger Gene veranlasst (11). Dieser MyD88-abhängige Signalweg ist bei allen TLR zu beobachten. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass TLR 3 und TLR 4 in der Lage sind, MyD88-unabhängige Signalwege zu aktivieren (210). In diesem Zusammenhang konnten mittlerweile 2 weitere Adapterproteine mit einer TIR-Domäne identifiziert werden. Ein Adapterprotein der Signalkaskade von TLR 2 und TLR 4 ist das TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein). Dieses Protein, welches auch MAL genannt wird, konnte in Zusammenhang mit anderen TLR nicht aufgezeigt werden (69,209). Ein weiteres Adapterprotein stellt das TRIF (Tir-domain-containing adaptor-inducing IFM- $\beta$ ) dar, welches in der Signalkaskade des TLR 3 und möglicherweise TLR 4 zu finden ist (211). TRIF bewirkt die Expression von  $INF-\alpha$  und  $INF-\beta$  (211). Dieser MyD88-unabhängige Signalweg führt zur Aktivierung des IRF3, einem Transkriptionsfaktor der Interferon-Gene (4).

Diese beschriebenen Signalwege haben zum Einen die Freisetzung von Zytokinen, welche durch den Transkriptionsfaktor  $NF\kappa B$  reguliert werden, zum Anderen die Bildung von Interferon- $\alpha$  und  $-\beta$  zur Folge. Da aber nach TLR-Aktivierung ein breites Spektrum an Mediatoren freigesetzt werden kann, ist anzunehmen, dass weitere Mechanismen und intrazelluläre Signalwege vorliegen, die noch nicht untersucht worden sind. Die bekannten Signalwege sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

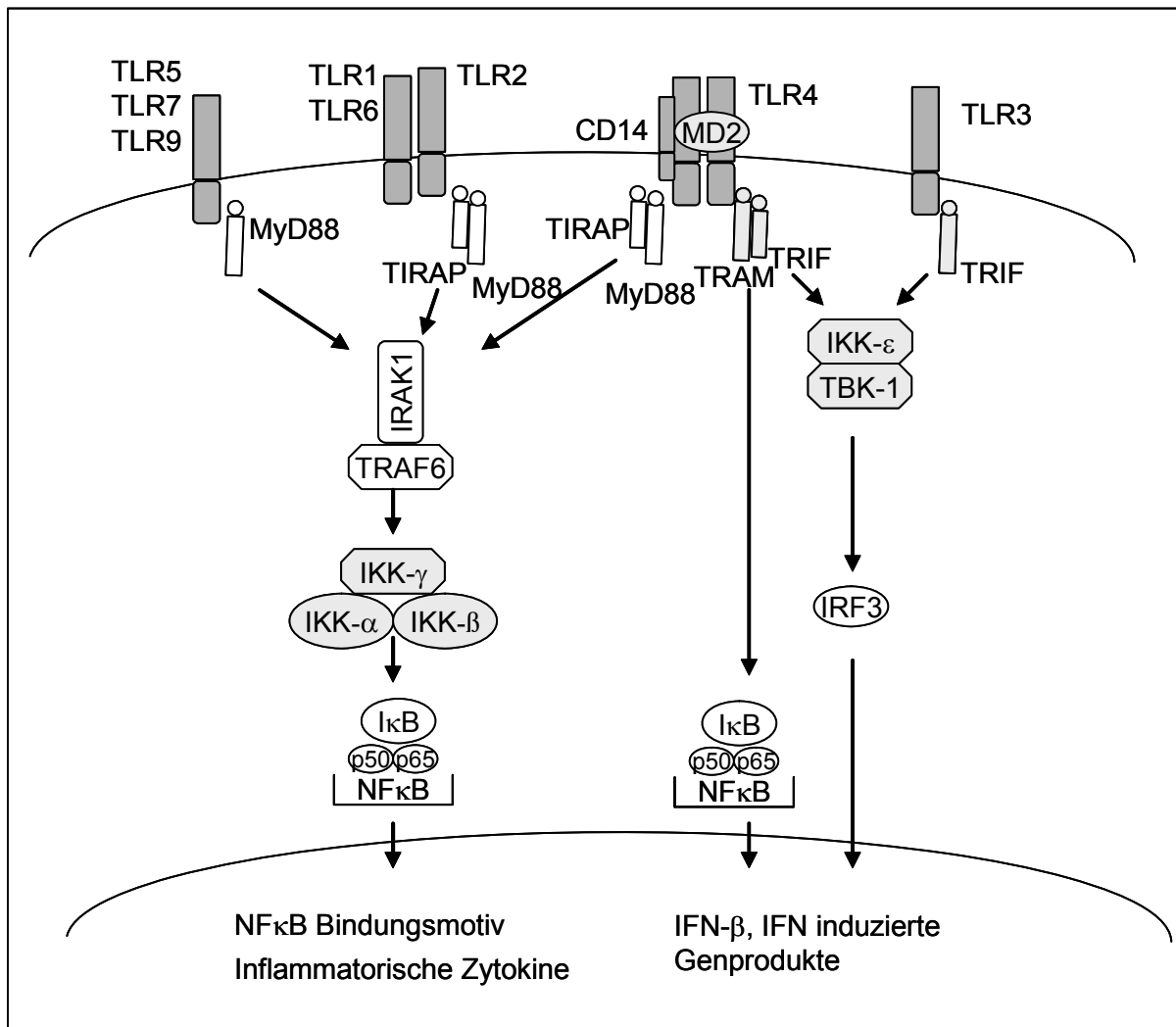


Abbildung 1: Signalwege der Toll-like Rezeptoren

nach Akira, S. et al. (4)

## 1.8 Modulation der Immunantwort durch TLR

Durch die spezifische Bindung bakterieller oder viraler Komponenten an TLR sind Zellen in der Lage sowohl die Bildung inflammatorischer und antiinflammatorischer Mediatoren zu induzieren, als auch das antigenspezifische adaptive Immunsystem zu aktivieren (184). Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung bakterieller oder viraler Komponenten durch TLR zur Freisetzung von Mediatoren in das umgebene Gewebe führt, wodurch weitere Immunzellen an den Ort der Infektion migrieren und eine Ausbreitung der Infektion verhindern. Eine Rolle hierbei spielen chemotaktische Stoffe, wie zum Beispiel Selektin, Chemokine oder Chemokinrezeptoren, welche nach der Bindung bakterieller oder

viraler Komponenten an TLR freigesetzt bzw. exprimiert werden und die Migration von Leukozyten in das Entzündungsareal regulieren (70). Eine Schlüsselrolle spielen hierbei IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$  und RANTES (74).

In MyD88-defizienten Mäusen konnte der Einfluss der TLR auf die Ausbildung des antigenspezifischen, adaptiven Immunsystems untersucht werden. MyD88-defiziente Mäuse zeigten nach Antigen Immunisierung mit Freund's Adjuvant eine verminderte Freisetzung von antigenspezifischen IgG2a und INF- $\gamma$  aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen (80,163). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TLR eine Rolle bei der Migration Dendritischer Zellen in die Lymphknoten und Differenzierung naiver T-Zellen in TH-1- bzw. TH-2-Zellen spielen (74,129).

Die Bildung antimikrobieller Peptide wird ebenfalls über TLR reguliert. Paneth Zellen des Gastrointestinaltraktes setzen nach Stimulation mit LPS  $\alpha$ -Defensine frei (8). In Mäusen konnte nach Stimulation mit LPS die Freisetzung von murinen  $\beta$ -Defensin-2, -3 und -6 beobachtet werden (95). Stimulation einer humanen Lungenepithelzelllinie mit TLR 2-Liganden führte zur Freisetzung von  $\beta$ -Defensinen (14). Auch Stickoxid-Freisetzung humaner und muriner Makrophagen konnte nach Stimulation des TLR 2 beobachtet werden (188).

## 1.9 Virulenzfaktoren

Das *E. coli* Bakterium kann unterschiedliche Wirtsorganismen besiedeln und als kommensaler oder als pathogener Mikroorganismus Wechselwirkungen mit dem Wirt eingehen. Als eine wichtige Voraussetzung für diese Prozesse gilt die Adhärenz der Mikroorganismen an Oberflächen von eukaryontischen Zellen. *E. coli* bildet eine große Anzahl unterschiedlicher Adhäsine. Einige Adhäsine kommen nur bei pathogenen Bakterien vor, andere, wie z.B. Typ 1-Fimbrien oder auch F1C-Fimbrien, sind sowohl bei pathogenen als auch bei apathogenen *E. coli*-Bakterien nachgewiesen worden (58). Die Gene der Fimbrienproteine sind meist auf Plasmiden lokalisiert, in einigen Fällen sind sie jedoch auch auf dem Chromosom zu finden (135). Die haarähnlichen Fimbrienproteine auf der Oberfläche des Bakteriums binden sehr spezifisch an kohlenhydrathaltige Rezeptoren auf der Wirtszelle und leiten so den Prozess der Kolonisierung ein (135). Einige dieser Rezeptoren, die Fimbrienproteine erkennen, sind mittlerweile bekannt. So konnte z.B. CD48 als Rezeptor für FimH, ein Typ 1-Fimbrienprotein identifiziert werden (110). *In vitro* und *in vivo* Studien zeigten, dass es durch die Bindung von FimH an den Rezeptor CD48 zur Phagozytose der *E. coli*-Bakterien und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren kommt (110).

Neben der Adhärenz besitzen einige Bakterien die Fähigkeit RTX-Toxine (repeats in toxin) freizusetzen. RTX-Toxine sind porenformende, zytolytische Proteine, die bei vielen pathogenen gram-negativen Bakterien vorkommen (93). Das RTX-Operon besteht aus vier Genen (RTX-C, A, B, D), wobei das Gen A das RTX-Toxin kodiert und die Gene B und D für die Proteine kodieren, die für die Ausschleusung des RTX-Toxins aus der Zelle zuständig sind. Das Gen C kodiert die Information für die posttranslationale Modifikation des Toxins, um das nach Translation inaktive Protein in die biologisch aktive Form zu überführen (93). RTX-Toxine sind aufgrund ihrer Wirtszellspezifität in zwei Untergruppen unterteilt. RTX-Hämolysin, wie z.B. das *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysin oder *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxI A wirkt auf eine Reihe von Zellen toxisch (26,43). RTX-Toxine, wie z.B. das Leukotoxin von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (LtxA) oder *Pasteurella hemolytica* (LktA) wirkt lediglich auf eine sehr limitierte Gruppe von Zellen toxisch (93). Lange Zeit wurden RTX-Toxine lediglich als zytolytische Proteine gesehen. In neueren Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass sublytische Konzentrationen des *E. coli*  $\alpha$ -Hämolyxins zur Bildung proinflammatorischer Mediatoren führen und erst mit steigendem Anstieg der Toxin-Konzentration die Zellyse einsetzt (54,158,162). Die Aktivierung und Lyse der Wirtszelle erfolgt in 2 Phasen, einer passiven Adsorptionsphase und einer Membran-Einlagerungs-Phase. Studien konnten zeigen, dass die Adsorptionsphase nicht unbedingt von der

Einlagerungs-Phase und der Zelllyse gefolgt sein muss. Dieser Prozess ist Zelltyp abhängig (134).

Einige Bakterien sind in der Lage, aktiv in Zellen einzudringen und diese zu aktivieren bzw. Apoptose oder Zelltod zu induzieren. Ein Vertreter invasiver Bakterien stellt *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) dar. Invasive Shigella-Stämme sezernieren bei Zellkontakt so genannte Invasine in das Zytoplasma verschiedener Zellen, die eine Umordnung des Zytoskeletts bewirken, wodurch die Bakterien durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Im Zytoplasma lysiert das Bakterium die umgebende, von der Wirtszelle gebildete Vakuolenschicht und besiedelt das Wirtszell-Zytoplasma (190). *In vitro* Studien zeigten, dass invasive *S. flexneri* sowohl Degranulation in humanen Neutrophilen (155), als auch Expression von Zytokinen in humanen Epithelzellen, Monozyten und Dendritischen Zellen induziert (37,59,150). Neben der Zytokininduktion konnte in Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen Apoptose beobachtet werden (37,59,161). Epithelzellen und Neutrophile Granulozyten zeigten keine Aktivierbarkeit apoptotischer Signalwege durch *S. flexneri* (115,161).

## 1.10 Ziel dieser Arbeit

Wie in den vorangestellten Kapiteln dargestellt, ist die Funktion der MC sehr vielseitig. Je nach Tierart und Gewebelokalisation unterscheiden sich MC zum Teil erheblich. Einige Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass MC in verschiedene Prozesse der Abwehr bakterieller Infektionen involviert sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass MC-defiziente Mäuse eine deutlich höhere Letalität nach experimentell induzierter Peritonitis aufweisen als Kontrolltiere. Daraus wurde gefolgert, dass MC eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Abwehr gegen Bakterien spielen. Murine und menschliche *in vitro* generierte MC exprimieren so genannte "Pattern-recognition-Rezeptoren" (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren (TLR) und sind in der Lage konservierte mikrobielle Strukturen zu erkennen. Der Großteil der Erkenntnisse über die biologische Funktion von MC im angeborenen Immunsystem wurde in tierexperimentellen Studien oder an menschlichen *in vitro* generierten MC gewonnen. Es ist unklar, wie menschliche Darm-MC durch Bakterien bzw. deren Produkte aktiviert werden, welche Rezeptoren involviert sind und welche Effektormechanismen getriggert werden, die antibakteriell wirken.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle menschlicher Darm-MC bei der Immunantwort gegen Pathogene näher zu charakterisieren und Mechanismen der Mastzellaktivierung durch Bakterien zu identifizieren. Hierfür sollten MC aus menschlichem Darmgewebe isoliert und die Expression und Funktionalität von TLR untersucht werden. Diese Ergebnisse sollten mit Ergebnissen von menschlichen *in vitro* generierten MC verglichen werden, um mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen MC-Subtypen aufzuzeigen. Des Weiteren sollten Co-Kultur-Experimente mit menschlichen Darm-MC und verschiedenen gram-negativen Bakterien durchgeführt werden und das Überleben menschlicher Darm-MC, die Regulation intrazellulärer Signalkaskaden und die Expression von Entzündungsmediatoren untersucht werden. Die für die Aktivierung menschlicher Darm-MC relevanten bakteriellen Virulenzfaktoren sollten durch die Herstellung bakterieller knock-out Mutanten identifiziert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Auflistung verwendeter Reagenzien und Puffer

**Antikörper:** anti-SCF-Rezeptor *c-kit* (anti-CD 117 YB5.B8, Pharmingen, Hamburg); Ziege-anti-Maus-IgG für MACS-System (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach); anti IgE-Rezeptor  $\alpha$ -chain (mAk 22E7, Hoffmann-La Roche, USA); anti-TLR 2 (Alexis, Schweiz); anti-TLR 3 (Alexis, Schweiz); anti-TLR 4 (Santa Cruz Biotechnology, USA); Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus-IgG (MoBiTec, Göttingen); isotypidentische Kontroll-mAk IgG2a (Southern Biotechnology, USA); phospho-ERK1/2 (BD Bioscience, USA).

**Zytokine und Inhibitoren:** Rekombinantes humanes SCF (Amgen, USA); rekombinantes humanes IL-4 (Novartis, Österreich); rekombinantes humanes IL-6 (Novartis, Österreich)

**Substanzen, Enzyme und Materialien für die Zellaufarbeitung:** Acetylcystein (ACC, Sigma Chemie GmbH, München); Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion IV, fettsäurefrei); Pronase; Collagenase D; DNase I; Elastase (alle Boehringer, Mannheim); Chymopapain (Sigma Chemie GmbH, München); Gelatine; HEPES (alle Sigma Chemie GmbH, München); 250  $\mu$ m Nybold-Filter (Swiss Silk Bolting Cloth Manufacturing Co. Ltd., Zürich); MACS-System und MACS-BS Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach); Ficolllösung (Ficoll-Hyaque, Amersham Pharmacia, USA); Ficollröhrchen (Falcon 3033, Kulturgewebsröhrchen, Becton Dickinson).

**Substanzen für die Zellkultur:** RPMI 1640; fetales Kälber-Serum (FCS) (beides Gibco Life Technologies, UK); HEPES (cell culture tested, Sigma Chemie GmbH, München); Penicillin/Streptomycin; Amphotericin B für die Zellkultur (Gibco Life Technologies, UK); Metronidazol (Fresenius, Bad Homburg), L-Glutamin (Gibco Life-Technologies, UK), 6-, 24- und 96-Well-Kulturplatten (NUNC, Wiesbaden). Kulturmedium: RPMI 1640 ohne Phenolrot, 10% (v/v) FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 100  $\mu$ g/ml Gentamycin und Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 0,5  $\mu$ g/ml Amphotericin.

**Färbelösungen:** Giemsa-Lösung; May-Grünwald-Lösung; Trypan-Blau (Sigma Chemie GmbH, München).

**Puffer:** Alle Puffer und Lösungen wurden mit sterilem, pyrogenfreiem Wasser ("Ampuwa", Fresenius, Bad Homburg) angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. PBS 10x (Gibco Life Technologies, UK); Tyrode-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,36 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,55 mM D-Glucose); ACC-Lösung (20  $\mu$ g ACC in 50 ml Tyrode-Puffer) TE-Puffer (2 mM EDTA in Tyrode-Puffer); TEA-Puffer (0,2% (v/v) Ampicillin, 0,4% (v/v) Gentamycin 50 mg/ml,



4% (v/v) Metronidazol, in TE-Puffer); TGMD-Puffer (1,23 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,015 mg/ml DNase, 5% (v/v) 2%ige Gelatine, in Tyrode-Puffer), PCh-Lösung (3 mg/ml Pronase; 0,75 mg/ml Chymopapain, in TE-Puffer); CE-Lösung (1,5 mg/ml Collagenase D, 0,15 mg/ml Elastase, in TGMD-Puffer); Hepes-Puffer (20 mM HEPES, 5 mM NaCl, 0,5 mM D-Glucose, 5 mM KCl); HA-Puffer (1 mg/ml BSA in Hepes-Puffer); HACM-Puffer (HA-Puffer mit je 1 mM CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>); FACS-Puffer (PBS+0,1% BSA, 0,1% sodium acid und 250 µg/ml Kaninchen IgG); PBS-Tween (PBS+0,25% (v/v) Tween).

**Nährmedien für Bakterien:** LB-Bouillon (20 g LB in 1 l destilliertem Wasser); Müller-Hinton-Agar (38 g Difco™-Müller-Hinton-Agar-Pulver in 1 l destilliertem Wasser); McConkey-Agar (2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Sorbit, 0,15% (w/v) Gallensalze Nr.3, 0,5% (w/v) NaCl, 0,0003% (w/v) Neutralrot, 0,00001% (w/v) Kristallviolett, 1,5% (w/v) Agar, pH 7,1); LB-Agar (Lennox) mit Ampicillin (200 µg/ml); LB-Agar (Lennox) mit Succrose (19%); LB-Agar (Lennox) mit Chloramphenicol (40 µg/ml); LB-Bouillon mit Chloramphenicol (40 µg/ml); SOB-Medium (20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl, 950 ml destilliertem Wasser, pH 7); SOC-Medium ( 50 µl MgSO<sub>4</sub> (1 M), 50 µl MgCl<sub>2</sub> (1 M), 100 µl Glucose (20%ig), 5 ml SOB).

**Mediatormessungen:** Histamin-RIA (Coulter-Immunotech, Hamburg); TNF-α und IL-8 ELISA (Biosource, Camarillo, CA) sLT (Biotrend, Köln).

**RNA Isolation/PCR:** RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden); RNase-freie DNase (Promega, USA); Superscript™ Reverse Transkriptase (Life Technologies, Eggenstein); Oligo dt Primer (Pharmacia, Upsala, Schweden); Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Eggenstein); Primer (synthetisiert bei Life Technologies, Eggenstein); SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), Optical tubes (Applied Biosystems, USA).

**Kalzium-Messung:** Fluo-3; Fura Red (beides Molecular Probes, USA); Probenacid (Sigma Chemie GmbH, München); Pluronic F-127 (Molecular Probes, USA).

**Restriktionsenzyme:** . *Xba*I, *Sac*I, *Hpa*I, *Bp*U10I (NEB, UK)

**DNA-Aufreinigung:** Jetsorb-Kit (Genomed, Bad Oeyenhausen)

**Plasmid-Präparation aus Bakterien:** Qiagen Plasmid Midi-Präp (Qiagen, Hilden), „Genelute Plasmid Mini-Prep Kit“ (Sigma, USA)

**Präparation genomischer DNA:** Genomic-tip 100 (Qiagen, Hilden)

**Enzyme, Antikörper und Lösungen für den Southern blot:** BpU10I (NEB, UK), Klenow Enzym (Boehringer, Mannheim), Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim), 4 M LiCl, Hexanukleotidgemisch, dNTP-Markierungsgemisch (1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM Dig-dUTP pH 6,5), Dig-DNA-Labeling-Detection-Kit (Boehringer, Mannheim)

**Puffer für den Western blot:** Extraktionspuffer: 25 mM Tris-HCl, pH7.5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,05% Triton X-100, Blottingpuffer: 0,1% SDS, 20% Methanol, 400 mmol/l Glycin, 50 mmol/l tris-HCL pH 8.3

**Puffer für den Southern blot:** Denaturierungspuffer: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M, Neutralisationspuffer: Tris-HCl pH 8,0 1,0 M ; NaCl 1,5 M, 20 x SSC: NaCl 3,0 M; NaCitrat 0,3 M pH mit HCl auf 7,4 einstellen, Hybridisierungslösung: EDTA pH 8,0 1,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2 250 mM SDS 7% (v/v), Wash-I: EDTA pH 8,0 1,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2 40 mM SDS 5% (v/v), Wash-II: EDTA pH 8,0 1,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2 40 mM SDS 1% (v/v), Chemilumineszens-Detektion Puffer 1: Maleinsäure 100 mM NaCl 150 mM pH mit NaOH auf 7,5 einstellen; autoklavieren, Puffer 2: 1% Blocking Reagenz verdünnt in Puffer 1, Puffer 3: Tris 100 mM NaCl 100 mM pH mit HCl auf 9,5 einstellen; autoklavieren, Waschpuffer: 0,3% (v/v) Tween 20 in Puffer 1, Blocking Solution (10 x): 10% (w/v) Blocking Reagenz in Puffer 1, Substratlösung: 1% CSPD (Tropix) verdünnt in Puffer 3

## 2.2 Erstellen der isogenen *E. coli* Hämolysin-Mutante

### 2.2.1 Prinzip

Die Herstellung isogener Hämolysin-Mutanten beruht auf homologer Rekombination mit einem so genannten Suizidvektor, der zur Replikation das  $\Pi$ -Protein benötigt. Dieses Protein wird vom *E. coli*-Stamm SM10 $\lambda$ pir exprimiert, nicht aber von den *E. coli* ATCC 25922 und 35218-Stämmen. Wird der Vektor durch Transformation in einen der *E. coli*-Stämme gebracht, so bleibt er in diesem nur erhalten, wenn die DNA mit der des Empfängers homolog rekombiniert und der Suizidvektor so in das Genom integriert wird. Die dreiteilige Klonierungsstrategie für den Suizidvektor wird nachfolgend vorgestellt, die zugehörige schematische Darstellung ist in Abbildung 2 aufgeführt.

#### 1. Klonierung eines Teils des Hämolysin-Gens in pUC19:

In einer PCR mit den Primern SK1 (5'-GCT CTA GAC CAC GAG TTA ATA ACT GAA GT-3') und SK2 (5'-CCG AGC TCC AAC TGA AAC CTC CTG CT-3') wurde ein 2136 bp langes Fragment aus den Untereinheiten A und B des Hämolysin-Gens amplifiziert. Dabei wurde durch überhängende Primer am 5'-Ende eine *Xba*I- und am 3'-Ende eine *Sac*I- Schnittstelle eingeführt. Durch einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Sac*I wurde das Plasmid pUC19 geschnitten und das entsprechende Fragment mittels Ligation eingebracht. Das entstandene Plasmid wurde mit pSK5 bezeichnet und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert.

#### 2. Einführen einer Mutation

Durch einen *Hpa*I-Verdau des Plasmids pSK5 und anschließender Ligation wurde ein 1043bp-Fragment der Untereinheit A (*hlyA*) des Hämolysin-Gens ausgeschnitten. Dies führte zur Inaktivierung des Hämolysins.

#### 3. Klonierung in den Vektor pMHH1

Die nun verkürzte Hämolysin A-Untereinheit wurde daraufhin mit Hilfe eines *Xba*I- und *Sac*I-Verdau in das Plasmid pMHH1 kloniert. Der dabei entstandene Suizidvektor wurde als pSK13 bezeichnet und durch Elektroporation in *E. coli* SM10 $\lambda$ pir eingebracht.

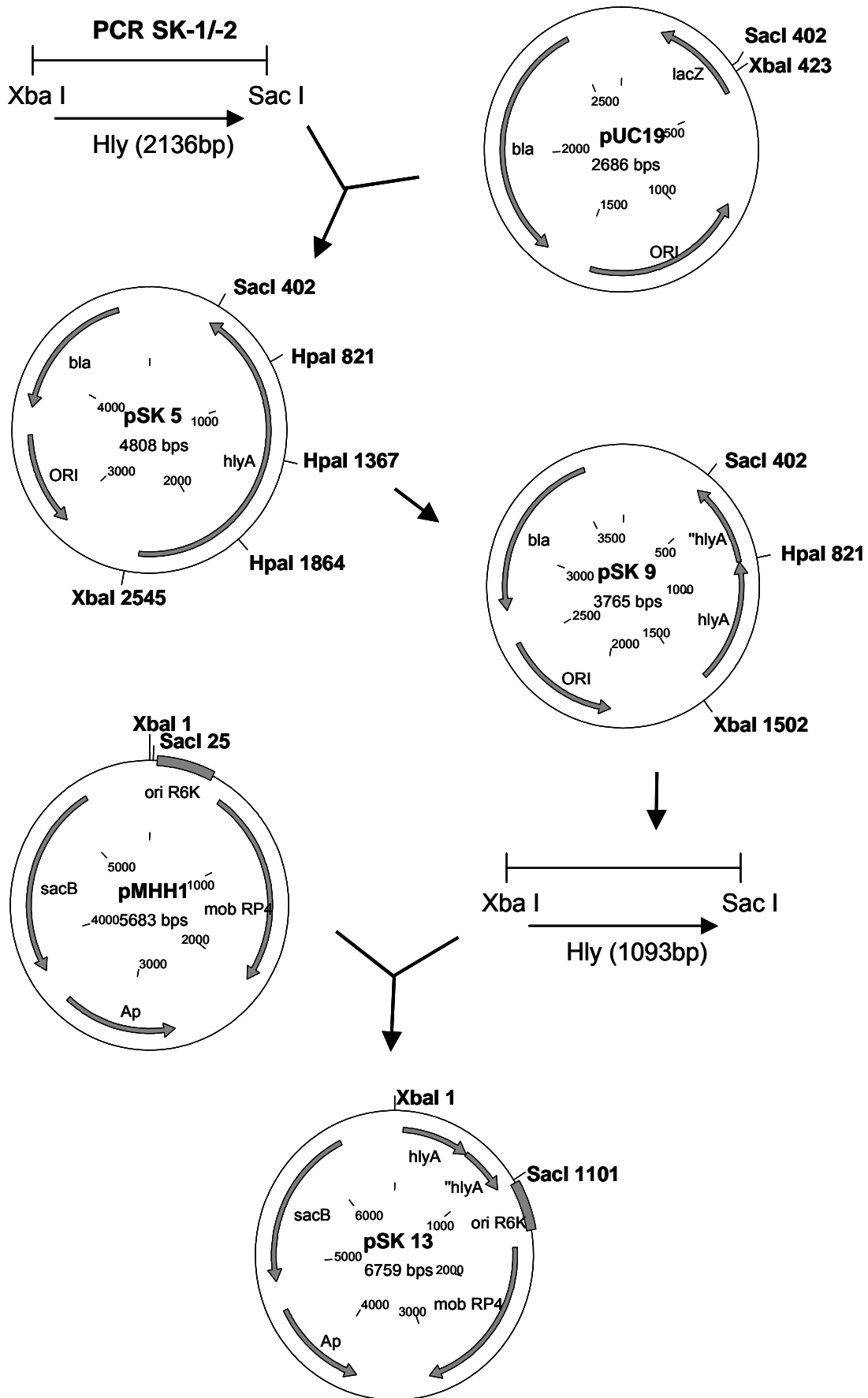


Abbildung 2: Klonierungsstrategie für die Herstellung einer isogenen Hämolsin-Mutante

Der Laborstamm *E. coli* SM10 $\lambda$ pir wurde als Donorstamm in der nachfolgenden Konjugation eingesetzt. Dabei gelangte der Suizidvektor pSK13 in den *E. coli* ATCC 25922 und 35218 Wildtyp-Stamm. Während der anschließenden Wachstumsphase auf Blutagar erfolgte eine homologe Rekombination, bei der die Vektorsequenzen in das *E. coli*-Genom integriert wurden. Dabei entstanden so genannte Transkonjuganten. Diese konnten anhand zweier Charakteristika gegenüber dem Rezipientenstamm ohne Suizidvektor bzw. dem Donorstamm differenziert werden. Das erste Charakteristikum ist die Kodierung der Ampicillin-Resistenz auf dem integrierten Plasmid. Somit konnten plasmidlose Rezipienten auf ampicillinhaltigen Platten nicht wachsen. Das zweite Charakteristikum bietet der Laktosestoffwechsel der Rezipientenstämmen auf McConkey-Indikatornährboden. *E. coli* ATCC 25922 und 35218 sind im Gegensatz zu *E. coli* SM10 $\lambda$ pir in der Lage, Laktose zu fermentieren. Folglich zeigten die Transkonjuganten auf McConkey-Platten morphologisch große, rosafarbene Kolonien, während der Donorstamm *E. coli* SM10 $\lambda$ pir kleine, farblose Kolonien ausbildete.

Das ebenfalls auf dem Suizidvektor liegende *sacB*-Gen kodiert für Levansucrase, ein Enzym aus *Bacillus subtilis*. Dieses setzt Sucrose in so genannte Levane um. Dabei handelt es sich um verzweigte Kohlenhydrate, die für gram-negative Bakterien toxisch sind, wodurch das Wachstum der Transkonjuganten auf sucrosehaltigen Nährböden gehemmt wird. In der zweiten homologen Rekombination während der Passage in ampicillinfreiem Flüssigmedium kam es zum Verlust der zuvor integrierten Vektorsequenzen und somit auch des Gens für die Levansucrase. Nach diesem Schritt zeigte sich auf Sucrose-Agar keine Wachstumsinhibition mehr. Die Levansucrase fungierte damit als positives Selektionssystem für die Detektion von Bakterien, die eine zweite homologe Rekombination durchlaufen hatten. Dabei kam es mit einer bestimmten Frequenz zum Austausch von *HlyA* aus dem Wildtypgenom durch ein mutagenisiertes *HlyA*, das über den Suizidvektor in die Zelle gelangt war. Ein Stamm, der ausschließlich das veränderte Toxin trägt, wird auch als isogene Mutante bezeichnet. Stämme, die nach diesem Vorgang keinerlei Austausch in ihrem Genom aufweisen, nennt man Revertanten.

### 2.2.2 DNA-Klonierung

Plasmide: pUC19 (in *E. coli* DH5 $\alpha$ ) ist ein häufig verwendetes *high-copy*-Plasmid, welches sich durch seine gute Transformierbarkeit auszeichnet und eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker trägt (213). pMHH1 (in *E. coli* SM10 $\lambda$ pir) ist ein Derivat des Plasmids pGP704 (66), bei dem über eine *Bgl*III-Schnittstelle das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* eingeführt wurde. Es trägt außerdem eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Das

Plasmid pMHH1 wird als Suizidvektor genutzt, da es zwar in *E. coli* SM10 $\lambda$ pir, nicht aber in den verwendeten *E. coli*-Stämmen replizieren kann.

Sequenzspezifische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen: Der DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Herstellerangaben bei 37 bzw. bei 60 °C. Plasmid-DNA wurde über 2 Stunden in einem Volumen von 20  $\mu$ l verdaut, während genomische DNA über Nacht in einem Volumen von 30  $\mu$ l verdaut wurde. Pro  $\mu$ g zu spaltender DNA wurden zwischen 1 und 2 Units des entsprechenden Enzyms (*Xba*I, *Sac*I, *Hpa*I, *Bp*U10I) eingesetzt. Jeder Verdau wurde durch anschließende Gelelektrophorese verifiziert.

Ligation: Die zueinander komplementären Enden von Vektor und Insert wurden ATP-abhängig durch eine Phosphodiesterbrücke zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe verknüpft. Diese Reaktion wird von der T4-DNA-Ligase (Gibco Life Technologies, UK) katalysiert. Der Vektor zeigt dabei häufig die Tendenz zur Religation ohne Einbau des Inserts. Um dieses Risiko zu minimieren wird das Insert im Überschuss gegenüber dem Vektor im Reaktionsgemisch angeboten. Die Menge des Inserts wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet.

$$\text{Insert-Menge (ng)} = \frac{\text{Vektor-Menge (ng)}}{\text{Faktor}} \times 3$$
$$\text{Faktor} = \frac{\text{Vektor-Größe (kb)}}{\text{Insert-Größe (kb)}}$$

### 2.2.3 DNA-Aufreinigung aus Agarose mit dem Jetsorb-Kit und DNA Präparation aus Bakterien

DNA-Aufreinigung aus Agarose: DNA bindet im Gegensatz zu Proteinen und anderen Verbindungen im hochsalzigen Milieu an Glasbestandteile. Auf dieser Eigenschaft basiert das Prinzip der DNA-Aufreinigung aus Agarose mit der Jetsorb-Glasmilch (Jetsorb-Kit, Genomed, Bad Oeyenhausen). Nach mehrmaligem Waschen wird die DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen wieder von ihrer Trägersubstanz gelöst und eluiert. Auf diese Weise können bis zu 70% der zuvor in der Agarose befindlichen DNA zurückgewonnen werden. Je 100 mg der unter der UV-Lampe ausgeschnittenen Gelstücke wurden nach Protokoll des Jetsorb-Kits aufgearbeitet.

Plasmid-Midi-Präparation (Plasmid-Midi-Kit; Qiagen, Hilden): Das für die Plasmidpräparation gewählte Ausgangsvolumen der Bakterienkultur richtete sich nach der Kopienzahl des entsprechenden Vektors. Es lag zwischen 25 ml für den High-Copy-Vektor

pUC19 und 100 ml für den Low-Copy-Vektor pMHH1. Zunächst wurden die Bakterien in einer Beckmann-Kühlzentrifuge bei Raumtemperatur für 15 min bei 3000g abzentrifugiert und nach Protokoll des Plasmid-Midi-Kit aufgearbeitet. Die gewonnene DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl TE-Puffer gelöst. Je nach benötigter DNA-Menge wurde alternativ das „Genelute Plasmid Mini-Prep Kit“ (Sigma, Missouri-USA) verwendet, das den gleichen Prinzipien folgt.

Im nächsten Schritt folgte die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung des eluierten Vektors im Eluat bei 260 nm in Micro-Quarz-Küvetten. Zu diesem Zweck wurden die Proben zunächst 1:100 verdünnt. Nach Bestimmung der Extinktion wurde die DNA-Konzentration anhand der Formel  $C = E_{260} \times 50 \mu\text{g DNA/ml Lösung}$  errechnet. Parallel wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der präparierten DNA zu und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Isolierung genomischer DNA: Die Präparation genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des Genomic-Tip 100 Kit (Qiagen, Hilden). Dazu wurden 25 ml einer Übernachtskultur bei 3.000g abzentrifugiert und nach Protokoll des Genomic-Tip 100 Kit aufgearbeitet. Die gewonnene DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und über Nacht bei 37 °C in 200 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Abschließend erfolgte analog zur Plasmid-DNA-Präparation eine spektralphotometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad der präparierten DNA. Darüber hinaus diente ein analytisches Agarosegel zur Qualitätsbeurteilung der gewonnenen genomischen DNA.

#### **2.2.4 Transformation**

Herstellung elektrokompeter Zellen: Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurde zunächst 150 ml einer Übernachtskultur (*E. coli* SM10λpir, *E. coli* DH5α) mit frischem LBB-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 angezchtet. Die Zellen wurden 3 Mal mit eiskaltem Aqua dest. gewaschen und bei 4000g für 10 Minuten abzentrifugiert. Es folgte die Aufnahme in 3 ml eiskaltem 10% Glycerin mit erneuter Zentrifugation bei 4000g für 10 Minuten. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 300 µl eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 40 µl in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Elektroporation: 40 µl der elektrokompenten Bakterien (*E. coli* SM10λpir, *E. coli* DH5α) wurden auf Eis aufgetaut, mit je 1 µl einer 1:10-Verdünnung eines Ligationsansatzes gemischt und die Lösung luftblasenfrei in die vorgekühlten Elektroporationsküvetten (Biorad, München) gegeben. Folgende Einstellungen wurden für den anschließenden Impuls am

Elektroporationsgerät Gene Pulser™ vorgenommen: Widerstand  $R = 400 \Omega$ , Kondensatorkapazität  $C = 25 \mu\text{F}$ , Spannung  $U = 2,5 \text{ kV}$ . Daraus resultierte eine Zeitkonstante von 3,9 ms. Unmittelbar nach dem Impuls wurden die Zellen in je 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Erholung der Zellen erfolgte durch anschließende einstündige Inkubation bei 37 °C im Überkopfschüttler. Danach folgte eine kurze Zentrifugation der Lösung. Das dabei entstehende Pellet wurde resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin (200  $\mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### 2.2.5 Erzeugung der Mutanten

Konjugation zur Herstellung von Transkonjuganten: Der Donorstamm (*E. coli* SM10 $\lambda$ pir) wurde über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Ampicillinzusatz angezüchtet. Parallel dazu erfolgt die Kultivierung des Rezipientenstammes (*E. coli* ATCC 25922 und 35218) in antibiotikafreiem LB-Medium. Am darauf folgenden Tag wurden beide Kulturen 1:100 in frischem Medium verdünnt und bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,5$  kultiviert. Die Rezipienten-Lösung wurde unmittelbar auf Eis gestellt, die Donorsuspension zunächst für 2 min. bei 5.000g abzentrifugiert und anschließend noch zweimal mit LB-Medium gewaschen, um Ampicillinreste vollständig zu entfernen. Nun wurden zu 1 ml Donorsuspension 0,5 ml Rezipientenlösung gegeben. Nach kurzer Zentrifugation des Gemisches wurde der Überstand verworfen und das in sich resuspendierte Bakterienpellet etwa fünfmarkstückgroß auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Diese wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden von der Platte abgenommen, in 1 ml LB-Medium resuspendiert und 1:10<sup>-1</sup> bis 1:10<sup>-3</sup> verdünnt. Je 100  $\mu\text{l}$  dieser Verdünnungsstufen wurden auf McConkey + Amp.-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Homologe Rekombination zur Herstellung von Mutanten: Die Transkonjuganten sollten nun eine zweite homologe Rekombination durchlaufen. Um die homologe Rekombination zu ermöglichen, bei der der eingefügte Suizidvektor wieder entfernt wird, werden die Stämme für 3-6 Std in ampicillinfreiem LB-Medium bei 37 °C angezogen. Dann werden LB-Platten sowie sucrosehaltige LB-Platten (10% Sucrose) mit je 50  $\mu\text{l}$  der Kultur bzw. Verdünnungen derselben von 1:10<sup>-1</sup> bis 1:10<sup>-4</sup> gleichmäßig beimpft. Die Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag für etwa 2 Std bei 37 °C gehalten, bis auf den sucrosehaltigen Platten kleine Kolonien sichtbar waren. Diese hatten das Levansucrase-kodierende Gen *sacB* verloren und waren somit potentielle Mutanten.



## 2.2.6 Genotypische Darstellung der *E. coli*-Mutanten im Southern Blot

Herstellung einer *E. coli* Hämolyysin spezifischen DNA-Sonde: Zunächst wurde mittels einer PCR mit den Primern Hly-1 (5'- TAT GAA TTC ACT CAT ATC AAT GG -3') und Hly-2 (5'- TCT GAA TTC TGA TTA GAG ATA TCA CCT GAC TC -3') ein 680 bp langer Bereich des Hämolyysin A -Gens aus *E. coli* ATCC 25922 amplifiziert. Dieser diente als Vorlage bei der anschließenden Sondenmarkierung. Zur Markierung der Sonden wurde der Dig DNA Labeling and Detektion Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet.

Sequenzspezifische Spaltung der genomischen DNA: Je 1 µg der gewonnenen genomischen DNA der zwei Mutanten sowie des Wildtyps wurde restriktionsspezifisch mit dem Enzym BpU10I gespalten. Nach Inkubation über Nacht wurde der Verdau auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen und über 6 Std bei 2 V/cm<sup>2</sup> elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Southern Blot: Nach erfolgter Elektrophorese mit anschließender Färbung im Ethidiumbromidbad und Betrachtung unter UV-Licht, wurde die DNA im Agarosegel für eine Stunde durch den alkalischen Denaturierungspuffer bei Raumtemperatur denaturiert. Daran schloss sich die Neutralisation durch einstündige Inkubation im Neutralisationspuffer an. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>-N Hybridization Transfer Membranes, Amersham, Braunschweig) erfolgte über Nacht durch Kapillarblotting. Am folgenden Tag wurde die Position der Geltaschen auf der Membran markiert. Diese wurde 30 min getrocknet und anschließend zur Bindung der DNA für 2 Std bei 80 °C gebacken.

Hybridisierung und Detektion: Die verwendete Sonde wurde durch Hitzebehandlung denaturiert. Um Hintergrundsignale durch unspezifisch gebundene Sonden zu minimieren, wurde die Membran vor der Hybridisierung zunächst prähybridisiert und später in mehreren Schritten gewaschen. Die Prähybridisierung wie die Hybridisierung der Membran fanden in Weithalshybridisierungsflaschen (Biometra, Göttingen) bei 65 °C im Hybridisierungssofen (HY 400, Bachofer, Reutlingen) statt. Dabei wurde die Membran zunächst für eine Stunde in 20 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm<sup>2</sup> Filterfläche präinkubiert. Die Lösung wurde anschließend verworfen. Zur Hybridisierung wurden 8 µl der Sondenlösung in 5 ml frischen Hybridisierungspuffer pro 100 cm<sup>2</sup> Filterfläche gegeben und für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Das Gemisch wurde unmittelbar auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Tags darauf wurde die Membran je 2 x 30 min bei 65 °C im Schüttelwasserbad zunächst in Puffer Wash-I, dann in Puffer Wash-II gewaschen. Die Detektion der hybridisierten Sonde im Blot erfolgte in zwei Schritten: Im ersten Schritt wurden mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper auf die Membran gegeben. Diese binden an den Digoxigeninanteil der Sonde. Anschließend wurde ein Substrat der alkalischen Phosphatase, das CSPD zugefügt. Dies wird im

alkalischen Milieu durch das Enzym zu einem instabilen Zwischenprodukt umgesetzt, bei dessen Zerfall Photonen frei werden, die autoradiographisch nachweisbar sind. Nach fünfminütiger Inkubation in Waschpuffer wurde die Membran für 30 min in Puffer 2 bei Raumtemperatur geschüttelt. Es folgte die Zugabe des Anti-Dig-Antikörperkonjugats im Verhältnis 1:10.000 in 50 ml Puffer 2 mit anschließender Inkubation für weitere 30 min. Der Filter wurde 3 x 10 min in je 50 ml Waschpuffer gewaschen und schließlich für 5 min in 20 ml Puffer 3 equilibriert. Mit der Oberseite nach unten wurde die Membran kurz mit einer Lösung aus CSPD und Puffer 3 in Kontakt gebracht und dann in gleicher Position für 5 min im Dunkeln gelagert. In einen Plastikbeutel eingeschweißt wurde sie 15 min bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und 20 min auf der Membran belassen.

### **2.3 Transformation des *E. coli* Nissle 1917**

Das Plasmid pSF4000 und das Kontrollplasmid pACYC 184 wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Dr. Gunzer zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pSF4000 unterscheidet sich von dem Kontrollplasmid pACYC 184 lediglich durch das Hämolyisin-Gen, welches aus *E. coli* J96 isoliert und amplifiziert wurde (203). Mittels Elektroporation wurden diese Plasmide in *E. coli* Nissle 1917 transformiert und anschließend auf Chloramphenicol-Platten ausplattiert. Die Bakterien, die das Plasmid mit dem Gen für die Chloramphenicol-Resistenz aufgenommen hatten, konnten auf diesen Platten wachsen.

### **2.4 Isolation von Mastzellen aus menschlichem Darmgewebe**

Alle Untersuchungen aus menschlichem Darmgewebe wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover und der Landesärztekammer Baden Württemberg genehmigt. Ausgangsmaterial für die Isolation von humanen intestinalen MC waren chirurgische Darmresektate. Bei diesen Operationsresektaten handelte es sich um Dünn- und Dickdarmgewebe, das hauptsächlich bei Darmtumoroperationen, aber auch im Rahmen von Erkrankungen wie Pankreas-Karzinom, chronischer Pankreatitis, Morbus Crohn oder Divertikulose entnommen werden musste. Die Gewebeproben (ca. 10 – 50 cm<sup>2</sup>) wurden aus makroskopisch unauffälligen, tumorfreen Arealen entnommen. Nach der Entnahme wurden diese über Nacht bei 4 °C in TEA-Puffer gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde die Tunica mucosa und Tela submucosa mit Hilfe einer Schere oder eines Skalpells präpariert. Die Inkubation des Gewebes für 10 bis 20 min in 50 ml ACC-Lösung im Schüttelwasserbad bei 37 °C entfernte den aus Becherzellen freigesetzten Schleim. Nun wurden die Epithelzellen in einem zweiten Inkubationsschritt für 20 min in Tyrode-Puffer mit 7 mM EDTA im Schüttelwasserbad bei 37 °C abgelöst. Nach Überführen des Gewebes in eine Petrischale erfolgte eine mechanische Zerkleinerung mit Hilfe einer Schere unter Zusatz

von 25 ml einer Pronase und Chymopapain enthaltenden Enzymlösung (PCH-Lösung) bis zu einer Gewebestückchengröße von ca. 1 mm<sup>2</sup>. Nachdem die Suspension durch einen 250 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 50 ml TE-Puffer gegeben wurde, erfolgte eine weitere Inkubation des Gewebes für 30 min in 25 ml PCH-Lösung im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Erneute Filtration durch einen 250 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 50 ml TGMD-Puffer und Inkubation der Gewebesuspension für 30 min in 25 ml Collagenase-Enzymlösung (CE-Lösung) im Schüttelwasserbad bei 37 °C folgten. Nach dem letzten Filtrationsschritt durch einen 250 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 75 ml TGMD-Puffer und Abzentrifugation (10 min bei 300g) der Einzelsuspension wurde das Pellet in Kulturmedium aufgenommen. Das im Filter verbliebene Gewebe wurde ein weiteres Mal für 30 min in 25 ml Collagenase-Enzymlösung inkubiert, filtriert und abzentrifugiert. Die Einzelsuspensions-Fractionen wurden vereinigt, durch einen 100 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 50 ml Kulturmedium filtriert und abzentrifugiert (10 min bei 300 g). Das Pellet wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und anschließend die Zellzahl (Trypanblau-Methode in Neubauer-Zählkammer) und –differenzierung (DiffQuick-gefärbte Zytospins) bestimmt. Die gewonnenen Einzelsuspensionen wurden über Nacht in Kulturmedium ohne Zytokin-Zusätze bei 37 °C kultiviert ( $2-4 \times 10^5$  Zellen pro ml) und am Folgetag der MC-Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation (Magnetic Cell Sorting, MACS) zugeführt.

## 2.5 Mastzellanreicherung durch magnetische Zellseparation

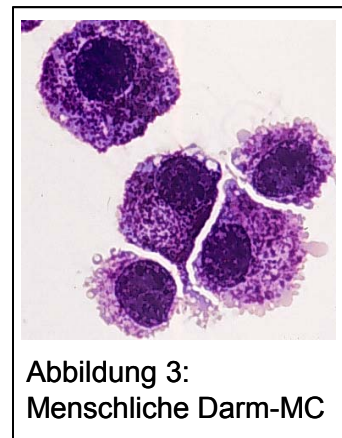
Das Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht auf der zelltypspezifischen Expression verschiedener Oberflächenantigene. Die Oberflächenantigene können mit Hilfe spezifischer Antikörper (Primärantikörper) detektiert werden. Die magnetische Markierung erfolgt durch vorangehende Kopplung paramagnetischer Partikel (Microbeads) an den Primärantikörper oder durch Bindung eines mit paramagnetischen Partikeln gekoppelten Sekundärantikörpers (Anti-Isotyp-Antikörper) an den Primärantikörper. Wird nun eine so vorbehandelte Zellsuspension über eine in einem magnetischen Feld platzierte Säule gegeben, kommt es zur Bindung der markierten Zellen an die magnetisierte Säulenmatrix. Zellen, die aufgrund der fehlenden Expression des jeweiligen Oberflächenantigens nicht magnetisch markiert worden sind, durchlaufen die Säule ohne an die Säulenmatrix zu binden (Negativfraktion). Wird die Säule anschließend aus dem magnetischen Feld entfernt, können die magnetisch markierten Zellen aus der Säule gespült werden (Positivfraktion). Je nachdem, ob sich die Zielzellen in der Positiv- oder der Negativfraktion befinden, wird von Positiv- oder Negativselektion gesprochen.

Zur Aufreinigung von MC aus der Suspension von Darmzellen wurde das Prinzip der Positivselektion verwendet. Als Zielantigen diente der SCF-Rezeptor *c-kit*, welcher im Darm

hauptsächlich von MC stark exprimiert wird. Die über Nacht kultivierten Darmzell-Suspension wurde abzentrifugiert (10 min bei 300 g), in HA-Puffer ( $1-4 \times 10^8$  Zellen pro ml) aufgenommen und mit einem Primärantikörper gegen *c-kit* (YB5.B8; Maus IgG1; 5 ng/ml) bei 4 °C inkubiert. Nach 30 min wurden die Zellen durch einen 30 µm Nybold-Filter unter Spülung mit 50 ml HA-Puffer filtriert und erneut abzentrifugiert (10 min bei 300 g). Die Zellen wurden in HA-Puffer ( $1-4 \times 10^8$  Zellen pro ml) aufgenommen und mit dem an paramagnetischen Partikeln gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 40 µl Antikörperlösung auf 250 µl Zellsuspension) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Erneutes Abzentrifugieren (10 min bei 300 g) und Aufnahme des Pellets in 2 ml HA-Puffer folgten. Die mit HA-Puffer beladene MACS-BS<sup>+</sup>-Säule wurde in einem Magnetfeld (MidiMACS Separator) angebracht, mit der Zellsuspension durchspült und mit 10 ml HA-Puffer gewaschen (Negativfraktion). Der folgende Waschschrift zur Gewinnung der Positivfraktion erfolgte außerhalb des Magnetfeldes. Die gewonnenen Zellen wurden gezählt (Trypanblau in Neubauer-Zählkammer) und differenziert (DiffQuick- gefärbte Zytospins). Die Positivfraktion enthielt 25 – 95% MC und wurde unter den im Folgenden beschriebenen Bedingungen kultiviert.

## 2.6 Kultur menschlicher Darmmastzellen

Die nach der magnetischen Zellseparation angereicherten MC wurden in RPMI (mit Zusatz von 10 Vol.-% FCS, 26 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Gentamycin und Streptomycin, 100 U/l Penicillin, 0,5 µg/ml Amphotericin) in Anwesenheit von rh-SCF (50 ng/ml) bis zu 21 Tage kultiviert. Je nach Experiment wurden dem Kulturmedium weitere Zytokine wie IL-4 (2 ng/ml) oder IL-6 (50 ng/ml) zugesetzt. Wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums gewechselt und die Zytokine erneut hinzugefügt. Die Reinheit nach Kultur betrug im Mittel  $98 \pm 2\%$ . Die Ermittlung der Zellzahl (lebend/tot) erfolgte nach der Trypanblau-Methode mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. In Abbildung 3 sind menschliche Darm-MC nach 2-wöchiger Kultur in Anwesenheit von SCF dargestellt.



## 2.7 Isolation und Kultur menschlicher *in vitro* generierter MC (CBMC)

CBMC (cord blood derived MC) wurden aus Vorläuferzellen des Nabelschnurblutes generiert. Dafür wurden 50 ml Nabelschnurblut mit einem Tropfen Heparin antikoaguliert. Eine folgende 90 minütige Dextran sedimentation diente zur Vernetzung der Erythrozyten durch Dextran (7,5 ml 6%iges Dextran), wodurch die Erythrozyten zum Röhrchenboden sedimentierten. 5 ml des Überstandes wurden in speziellen Röhrchen vorsichtig auf 5 ml Ficoll-Lösung gegeben und 30 min bei 200g ohne Bremse zentrifugiert. Neutrophile und eosinophile Granulozyten

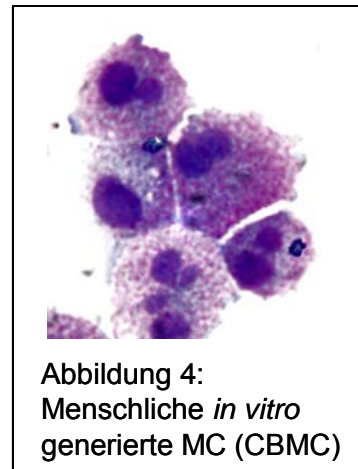


Abbildung 4:  
Menschliche *in vitro*  
generierte MC (CBMC)

palletierten, während die mononukleären Zellen, die sich zu 60 – 80% aus Lymphozyten, 20 – 40% aus Monozyten und 2% aus anderen Zellen zusammensetzen einen Ring oberhalb der Ficoll-Lösung ausbilden. Die Zellen der Ringfraktion wurden mit Hilfe einer Pipette gewonnen, gewaschen und in RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bis zu 9 Wochen mit SCF (100 ng/ml) und IL-6 (50 ng/ml) in einer 6-Well-Platte kultiviert. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurden die reinen Zellen mit IL-4 (2 ng/ml) kultiviert. Im Folgenden wurde mit diesen Zellen genauso verfahren wie mit den menschlichen Darm-MC (Medium, Mediumwechsel, Zytokinkonzentrationen, Temperatur etc.). In Abbildung 4 sind menschliche *in vitro* generierte MC dargestellt. Typischerweise treten vermehrt Zellen mit mehrlappigen Zellkernen auf.

## 2.8 Mastzellaktivierung

### 2.8.1 Mastzellaktivierung mit TLR-Liganden

Nach Kultur in Gegenwart von SCF, SCF und IL-4 (2 ng/ml) oder SCF und IL-6 (50 ng/ml) wurden die MC gewaschen, gezählt und differenziert.  $5 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  MC wurden in 200  $\mu$ l Medium in einer 96-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C mit TLR-Liganden für 1,5, 3, 6 oder 18 Stunden stimuliert. Folgende TLR-Liganden wurden eingesetzt: LPS von *E. coli* (1  $\mu$ g/ml), LTA von *S. faecalis* (100  $\mu$ g/ml), Zymosan von *S. cerevisiae* (1mg/ml), poly I:C (100  $\mu$ g/ml; alle Sigma, München), R848 (100  $\mu$ g/ml; freundlicherweise von G.B. Lipford zur Verfügung gestellt), CpG (10  $\mu$ M), Non-CpG (10  $\mu$ M; freundlicherweise von G.B. Lipford zur Verfügung gestellt). Als Kontrolle erfolgte die Aktivierung der MC durch Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors auf der MC-Oberfläche. Induziert wurde diese mit Hilfe von gegen die  $\alpha$ -Kette des IgE Rezeptors gerichteten Antikörper (Klon 22E7, 100 ng/ml).

### 2.8.2 Mastzellaktivierung durch Bakterien

Folgende Bakterien wurden eingesetzt: Humanes Stuhlisolat *E. coli* (O101:H-), der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917 (O6:H1, Mutaflor®, Ardeypharm GmbH, Herdecke), der hämolytische Stamm *E. coli* ATCC 25922 (O6:H1, American Type Culture Collection, Manassas, USA), der hämolytische Stamm *E. coli* ATCC 35218 (O6:H31, American Type Culture Collection, USA), der FimH-exprimierende Stamm *E. coli* ORN103(pSH2) (Plasmid kodiert alle Gene, die für die Expression der Typ-1 Fimbrien notwendig sind, inklusive des FimH-Proteins), *E. coli* ORN103(pUT2002) (isogene FimH-Mutante des *E. coli* ORN103(pSH2), bereits beschrieben in (112)), der invasive Stamm *S. flexneri* M90T (virulenter Wildtyp, Serotyp 5a), der nicht-invasive Stamm *S. flexneri* BS176 (nicht-virulent, nicht-invasives Derivat des M90T, bereits beschrieben in (155)), der hämolytische Stamm *E. coli* Nissle 1917(pSF4000), der nicht-hämolytische Kontrollstamm *E. coli* Nissle 1917(pACYC) (siehe Kapitel 2.3), isogene, Hämolysin-negative Mutanten des *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218 (siehe Kapitel 2.2), *E. coli* DH5 $\alpha$  (in diesen Stamm wurde der pUC19-Abkömmling pSK1 transformiert), *E. coli* SM10 $\lambda$ pir (in diesen Stamm wurde das Plasmid pSK13 transformiert).

Bakterien wurden in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 in einem Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert. Bei der Anzucht plasmidhaltiger Bakterien (*E. coli* ORN103(pSH2), ORN103(pUT2002), Nissle 1917 (pSF4000) und Nissle 1917 (pACYC184)) wurde dem LB-Medium 40 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Die MC ( $5 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  MC/Bedingung) wurden zweimal in Medium ohne Antibiotika gewaschen, resuspendiert, in 200 µl Medium aufgenommen und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Bei einer MOI (multiplicity of infection) von 1:100 wurden die MC mit den Bakterien für 1,5, 3, 6 oder 18 Std inkubiert. Um einen direkten Zell-Zell-Kontakt zu ermöglichen, wurden die Bakterien vor der Inkubation in der 96-Well-Platte abzentrifugiert (5 min, 500 g). In einigen Experimenten wurden die Zellen in 100 µl Medium aufgenommen und 100 µl Überstand einer Bakterien-Übernachtkultur hinzugegeben. Dafür wurde die Übernachtkultur von *E. coli* Nissle 1917(pSF4000) und *E. coli* ATCC 25922 10 min bei 4 °C und 6000g abzentrifugiert und durch einen 0.2 µm Filter sterilfiltriert. MC-Überleben wurde mittels Trypanblau-Färbung ermittelt.

### 2.9 Analyse intrazellulärer Bakterien

Die Analyse intrazellulärer Bakterien erfolgte mit Hilfe des „gentamycin protection assays“. MC wurden mit Bakterien, wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben, infiziert. Nach einer Stunde wurden die extrazellulären Bakterien durch die Zugabe von 100 µg/ml Gentamycin abgetötet. Nach einer weiteren Stunde wurden die MC gewaschen und 5 min mit einer 1%igen TritonX-100 in PBS-Lösung lysiert, um intrazelluläre Bakterien frei zu setzen. Lysate

wurden mit PBS logarithmisch verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zählung der Kolonien.

## 2.10 Inhibitoren

In einigen Experimenten wurden die MC vor Infektion bzw. Kreuzvernetzung des IgE-Rezeptors für 60 min mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert (22). Folgende Inhibitoren wurden eingesetzt: Nifedipine (100 mM, Sigma-Aldrich, Steinheim), Actinomycin D (1  $\mu\text{mol/l}$ ; Calbiochem, USA), Cyclosporin A (1  $\mu\text{mol/l}$ ; Novartis, Schweiz), Curcumin (50  $\mu\text{mol/l}$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim), Apigenin (20  $\mu\text{mol/l}$ ; Calbiochem, USA), Gö 6976 (2  $\mu\text{mol/l}$ ; Calbiochem, USA), Wortmannin (100 nmol/l; Calbiochem, USA).

## 2.11 Mediatormessung

Nach Zellaktivierung wurden die MC abzentrifugiert (5 min 350g, 4 °C) und die Überstände gewonnen. Bis zur Durchführung der Mediator-Messungen wurden diese aliquotiert bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. TNF- $\alpha$ , IL-8 (beide ELISA, Biosource, USA) und sLT (ELISA, Biotrend, Köln) wurden als spezifische Freisetzung angegeben, die durch Subtraktion der basalen von der induzierten Freisetzung berechnet wurde. Die spezifische Histamin-Freisetzung wurde mittels Radioimmunoassay (RIA, Coulter-Immunotech, Hamburg) ermittelt und als Anteil des Gesamthistamingehaltes ruhender MC bestimmt. Das intrazellulär gespeicherte, präformierte Histamin wurde in MC-Lysaten (Aufnahme in Wasser, Ultraschallbad für 5 min, Einfrier-Auftau-Zyklus) der jeweiligen Kulturbedingungen bestimmt. Die Apoptoserate der MC wurde mit Hilfe des Apo-ONE™ Homogeneous Caspase 3/7 Assay (Promega, USA) durchgeführt, wofür  $25 \times 10^3$  MC eingesetzt wurden.

## 2.12 RNA-Isolation, Reverse Transkription – Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und real-time RT-PCR

Gesamt-RNA wurde aus  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^5$  MC mit einer Reinheit von 98 – 100% isoliert. Hierfür wurden MC abzentrifugiert und in 350  $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer (RLT) aufgenommen und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die Gesamt-RNA wurde dann im Folgenden mit dem RNeasy Mini Kit isoliert und die Hälfte der RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurde die genomische DNA durch Inkubation mit 1U RNase freier DNase für 15 min bei  $37\text{ °C}$  verdaut. Nach Zugabe von 25 mM EDTA wurde die RNA bei  $70\text{ °C}$  für 10 min denaturiert. Die cDNA wurde schließlich durch Superscript Reverse Transkriptase in Anwesenheit von 20 pmol oligo dt Primern synthetisiert (60 min,  $37\text{ °C}$ ). Die PCR wurde mit 1,5  $\mu\text{l}$  cDNA, 1 U Taq-Polymerase und 20 pmol der

jeweiligen Primerpaare in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die Amplifikation der cDNA-Fragmente erfolgte in einem Peltier-Thermal-Cycler (PTC200, MJ Research, USA). 10 µl des PCR-Produktes wurden in einem 1%igen Agarosegel mit 500 ng/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht fotografiert. Zur Quantifizierung der cDNA wurde real-time RT-PCR angewandt, wofür 1,5 µl DNA (Probe oder Standard), 10,5 µl H<sub>2</sub>O, 12,5 µl SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) und 0,3 µl 20 µM sense und anti-sense Primer in Optical tubes (Applied Biosystems, USA) gegeben und in einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, USA) gemessen wurden. Als Negativkontrolle enthielt jede Amplifikation eine Reaktionsprobe ohne DNA. Für die Generation eines genspezifischen Standards wurde das PCR Fragment mit Hilfe des „QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden)“ aufgereinigt, durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm quantifiziert und logarithmisch verdünnt. Die relative Transkription der Gene wurde errechnet und im Verhältnis zu der Kopiezahl des „house keeping gens“ (GDH) dargestellt.

Die Primer, die in dieser Studie eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 3 und 4 beschrieben.

			Fragment- größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
GDH	5'- CAT CAC CAT CTT OCA GGA GC-3'	5'- GAG GCA GGG ATG ATG TTC TG-3	412	56
TLR 1	5'- CAA TTC AGT TTC OCA CCC ATC AG-3'	5'- GGC ACG TTT GCT CTT TTC CTT G-3'	724	56
TLR 2	5'- CAC OGT TTC CAT GGC CTG-3'	5'- GGA CTT TAT OGC AGC TCT-3'	525	56
TLR 3	5'- AAA TTG GGC AAG AAC TCA CAG G-3'	5'- GTG TTT OCA GAG CCG TGC TAA -3'	321	56
TLR 4	5'- CTG GCT GCA TAA AGT ATG GT-3'	5'- ATA GAT GTT GCT TOC TGC CA -3'	532	56
TLR 5	5'- CAC GGA AGG TTG TGA TGA AGA GG-3'	5'- CAG OCA TCT CTA AGG AAG TGT CTG C-3'	426	56
TLR 6	5'- OOC TTT AGG ATA GOC ACT GC-3'	5'- GTC AGA GAC CTG AAG CTC AG-3'	172	56
TLR 7	5'- CTC TTC AAC CAG AOC TCT AC-3'	5'- GTC CAG TCT GTG AAA GGA CG-3'	312	56
TLR 8	5'- OOC AGG AGA OCT TGA AGG AA-3'	5'- GCT GTA CAT TGG GGT TGT GG-3'	218	56
TLR 9	5'- OCT TOC CTG TAG CTG CTG TC-3'	5'- GGA GGA CAA GGA AAG GCT GG-3'	181	56
TLR 10	5'- CTC AGC CAA TGC TCT GAG ATC-3'	5'- GTT GGA GCA GTT GGT CAT CAG-3'	213	56
CD 14	5'- ACT TAT OGA OCA TGG AGC-3'	5'- AGG CAT GGT GOC GGT TA-3'	291	56
MD 2	5'- GAAGCTCAGAAGCAGTATTGGGTC-3'	5'- GGTGGTGTAGGATGACAACTCC-3'	422	56
MyD 88	5'- GCTOOGATTTCATGTACTAOGTC-3'	5'- TGTAGCTGAATCCOOGTTCC-3'	121	56
CD48	5'- CTC TGT CAC TOC TGG TGA CC-3'	5'- GGC TTG GGT ACT GGG TCA AG-3'	349	60
IL-3	5'- OCT TGA AGA CAA GCT GGG TT-3'	5'- ATT CAT TGG AGT CAC OGT CC-3'	296	56
IL-5	5'- OGA ACT CTG CTG ATA GOC AAT G-3'	5'- OCA CTC GGT GTT CAT TAC ACC AAG-3'	268	56
IL-6	5'- CAC ACA GAC AGC CAC TCA OCT C-3'	5'- CTC AGG CTG GAC TGC AGG AAC-3'	496	56
IL-8	5'- GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA G-3'	5'- GCA TCT GGC AAC OCT ACA ACA G-3'	365	56
TNF-α	5'- GOC CTC TGG OOC AGG CAG TCA G-3'	5'- CAG ATA GAT GGG CTC ATA OCA GGG-3'	237	56

**Tabelle 3:** Primer der konventionellen RT-PCR



			Fragment- größe (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
GDH	5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3'	5'-GAG GCA GGG ATG ATG TTC TG-3'	140	56
TNF- $\alpha$	5'-CAA GGC TGT AGC CCA TGT TG-3'	5'-AGA GGA CCT GGG AGT AGA TG-3'	151	56
IL-5	5'-ACT CTT GCA GGT AGT CTA GG-3'	5'-GGA ATA GGC ACA CTG GAG AGT CAA-3'	157	56
IL-8	5'-CTGAGA GTG ATT GAG AGT GG-3'	5'-ACA ACC CTC TGC ACC CAG TT-3'	112	56

**Tabelle 4:** Primer der quantitativen real-time RT-PCR

## 2.13 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der TLR-Expression kultivierter MC wurden pro Bedingung  $5 \times 10^4$  MC (Reinheit  $98 \pm 2\%$ ) eingesetzt. Nach einem Waschschrift in FACS-Puffer wurden die Zellen mit den Primärantikörpern gegen TLR 2 (5  $\mu\text{g/ml}$ , Isotyp IgG2a, Alexis, Schweiz), TLR 3 (5  $\mu\text{g/ml}$  Isotyp IgG1, Alexis, Schweiz) oder TLR 4 (5  $\mu\text{g/ml}$ , Isotyp IgG2a, Santa Cruz Biotechnology, USA) bzw. Isotyp- und Spezies-identische Kontrollantikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschriften erfolgte eine 30-minütige Inkubation in Blocking-Puffer mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1  $\mu\text{g/ml}$  MoBiTec Göttingen, Germany). Schließlich wurden die Zellen erneut gewaschen und mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickenson, USA) mittels CELLQuest-Software (Becton Dickenson, USA) gemessen und analysiert. Für die Analyse des pERK wurden MC für 10 min bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in 90% igen Methanol 30 min bei 4 °C permeabilisiert. Die MC wurden mit Alexa Fluor® 488-konjugierten phospho-ERK1/2 (T202/Y204, BD Bioscience, USA) Antikörper (10  $\mu\text{l}$  für  $5 \times 10^4$  Zellen, 1 Std bei Raumtemperatur) markiert.

## 2.14 Ca-Mobilisation

Für die Messung des im Zytosol befindlichen freien Kalziums wurden  $1 \times 10^5$  MC/Bedingung in RPMI gewaschen und resuspendiert. Die Zellen inkubierten mit Fluo-3, Fura Red (4  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$ , Molecular Probes, USA), Probenacid (4 mM, Sigma) und Pluronic F-127 (0,02%, Molecular Probes, USA) für 30 min bei 30 °C im Dunkeln. Nach weiterem zweimaligen Waschen wurden die Zellen in 500  $\mu\text{l}$  RPMI resuspendiert und mit 500  $\mu\text{l}$  Überstand der Übernachtskultur der Bakterienstämme *E. coli* ATCC 25922 oder deren isogenen Mutante (*E. coli*  $\Delta$  Hly) stimuliert. Die Extinktion wurde bei 488 nm in einem Durchflusszytometer (FACSCanto, Becton Dickinson, USA) gemessen. Das relative Verhältnis der emittierten Fluoreszenz bei 530 nm und 670 nm wurde als Maß für

intrazelluläres Kalzium aufgezeichnet. Die Proben wurden 6 bzw. 10 min gemessen und mit Hilfe der FlowJo software (Treestar, USA) analysiert.

## **2.15 Statistik**

Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  SEM. Signifikante Differenzen wurden mit Hilfe des Wilcoxon signed rank Test für gepaarte, nicht parametrische Daten bestimmt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant bewertet.

## 3 Ergebnisse

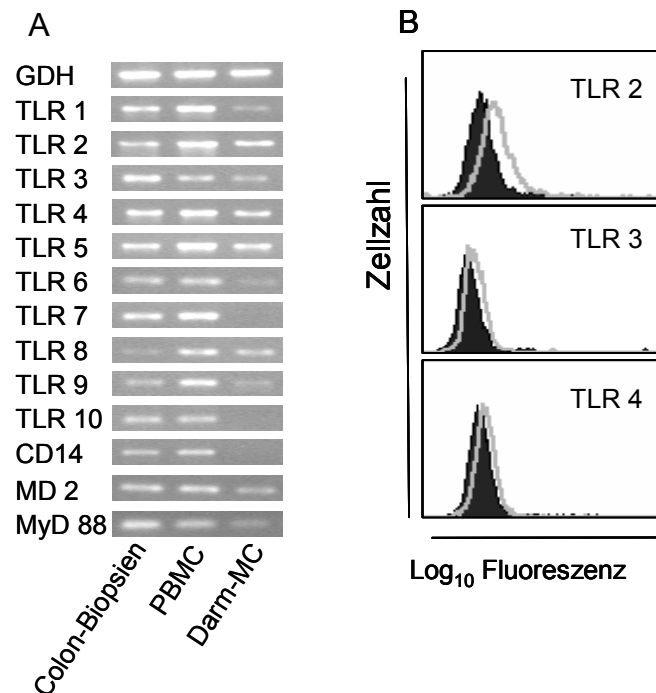
### 3.1 Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden

#### 3.1.1 Toll-like Rezeptor Expression in menschlichen Darmmastzellen

In murinen und *in vitro* hergeleiteten MC konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass MC TLR exprimieren. Allerdings variierte das Expressionsmuster zwischen den verschiedenen MC-Subpopulation zum Teil erheblich (124,146,197). In der vorliegenden Arbeit sollte nun analysiert werden, ob menschliche Darm-MC TLR exprimieren.

Die Analyse der TLR-Expression in menschlichen Darm-MC erfolgte mittels RT-PCR und Durchflusszytometrie. **Abbildung 5 A** zeigt die mRNA-Expression der TLR 1-10 sowie CD14, MD2 und MyD88 nach Kultur der MC für 14 Tage in Anwesenheit von SCF. Als Kontrolle dienten menschliche Colonbiopsien und PBMC (periphere Blutmononukleäre Zellen). Bei allen untersuchten MC-Kulturen fanden sich mRNA für TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 9 sowie das an TLR4 assoziierte Protein MD2 und MyD88, ein Adapter-Molekül der IL-1/TLR Signalkaskade. TLR 1, 3, 6 und 9 sind nur sehr schwach exprimiert, wohingegen TLR 2, 4, 5 und 8 stärker exprimiert sind. TLR 7 und 10 sowie der TLR 4 Corezeptor CD 14 konnten mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden.

Die Darstellung der Protein-Expression von TLR in kultivierten Darm-MC erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurden lediglich TLR 2-4 analysiert, deren Expression bereits bei einigen MC-Subtypen gezeigt werden konnte. Die Analyse der Protein-Expression zeigte, dass menschliche Darm-MC TLR 2-4 exprimieren. In Analogie zu den mRNA-Ergebnissen zeigte sich bei TLR 2 eine stärkere Expression als bei TLR 3. Allerdings konnte TLR 4 mittels Durchflusszytometrie nur schwach nachgewiesen werden (**Abbildung 5 B**). Kultivierung der Zellen mit IL-4 oder IL-6 veränderten das Expressionsmuster nicht.



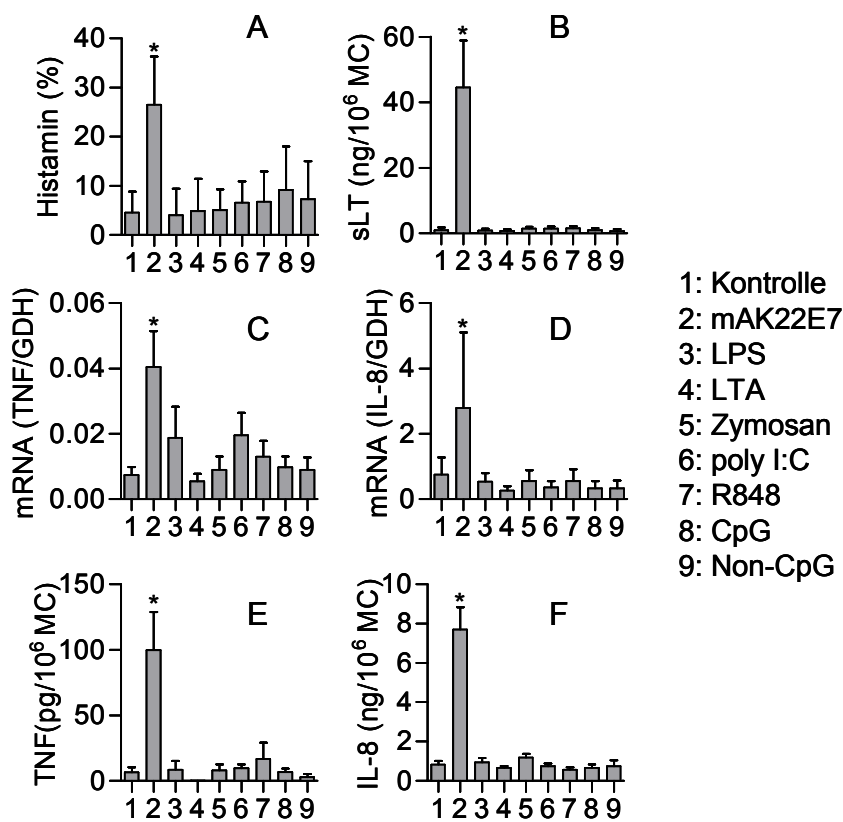
**Abbildung 5: Toll-like Rezeptor Expression in menschlichen Darm-MC. (A)** RT-PCR-Analyse zur Detektion von mRNA für TLR 1-10, CD 14, MD 2 und MyD 88 in menschlichen Colon-Biopsien, peripheren Blutmononukleären Zellen (PBMC) bzw. menschlichen Darm-MC nach zweiwöchiger Kultur in Anwesenheit von SCF (50 ng/ml) (n=5-7). **(B)** Durchflusszytometrische Darstellung der TLR 2, 3 und 4 Expression (n=4). Die schwarzen Flächen entsprechen der Isotyp-Kontrollfärbung.

### 3.1.2 Toleranz menschlicher Darmmastzellen gegenüber Toll-like Rezeptor-Liganden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass menschliche Darm-MC TLR exprimieren, sollte nun im nächsten Schritt analysiert werden, ob menschliche Darm-MC durch TLR-Liganden stimulierbar sind.

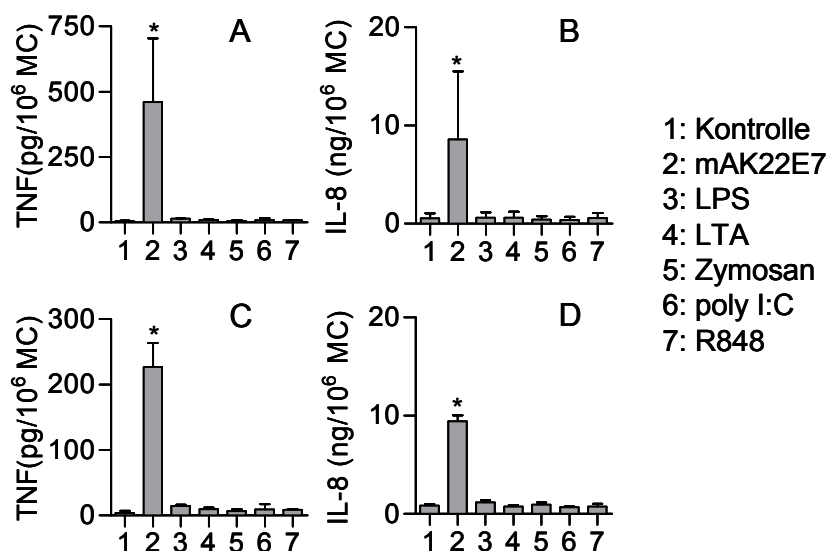
Nach einer Kulturdauer von 14 – 21 Tagen in Anwesenheit von SCF wurden die MC in Zellmedium gewaschen und mit LPS (Ligand für TLR 4), LTA (Ligand für TLR 2), Zymosan (Ligand für TLR 2), poly I:C (Ligand für TLR 3), R848 (Ligand für TLR 7/8), CpG (Ligand für TLR 9) bzw. Non CpG (nicht funktionale Kontrolle für CpG) stimuliert. Bei einem Teil der Zellen erfolgte die Aktivierung durch IgE-Kreuzvernetzung mittels mAk 22E7. Die in den Überstand freigesetzten Mediatoren Histamin, TNF- $\alpha$  und IL-8 wurden nach sechsständiger Inkubation gemessen. Die mRNA-Expression und die sLT-Freisetzung wurden nach dreistündiger Inkubation analysiert.

Die Stimulation der Zellen mit den gekennzeichneten TLR-Liganden führte weder zu einer signifikanten Freisetzung von Histamin (**Abbildung 6 A**), noch zu einer signifikanten Freisetzung von sLT (**Abbildung 6 B**). Die Analyse der mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  und IL-8 zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderung in Darm-MC nach Stimulation mit TLR-Liganden (**Abbildung 6 C+D**). Auf Proteinebene ließ sich weder für TNF- $\alpha$  (**Abbildung 6 E**) noch für IL-8 (**Abbildung 6 F**) eine Induktion erkennen. Auch nach Inkubationszeiten der Darm-MC von 90 min bzw. 3, 6 und 18 Std mit den verschiedenen TLR-Liganden konnte keine mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  und IL-8 bzw. Freisetzung der Proteine TNF- $\alpha$  und IL-8 sowie sLT und Histamin festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 6: TLR-Liganden führen nicht zur Aktivierung menschlicher Darm-MC.** Die MC wurden mit LPS [3], LTA [4], Zymosan [5], poly I:C [6], R848 [7], CpG [8], Non CpG [9] bzw. mAk 22E7 [2] stimuliert und die mRNA-Expression (C, D) sowie die Mediator-Freisetzung im Überstand (A, B, E, F) gemessen. **(A)** Histamin-Freisetzung nach sechsständiger Inkubation mit den gekennzeichneten TLR-Liganden (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). **(B)** sLT-Freisetzung nach dreistündiger Stimulation (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Real-time RT-PCR für TNF- $\alpha$  **(C)** und IL-8 **(D)** nach dreistündiger Stimulation menschlicher Darm-MC (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-8 **(E)** und **(F)** nach sechsständiger Inkubation (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5 bzw. 3). \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle

In Studien an CBMC konnte bereits gezeigt werden, dass IL-4 und IL-6 zu einer vermehrten Expression von TLR 2 und 4 sowie einer verstärkten Aktivierbarkeit führt (197). Aus diesem Grund wurden menschliche Darm-MC in Anwesenheit von IL-6 bzw. IL-4 kultiviert und danach mit TLR-Liganden stimuliert. **Abbildung 7** zeigt die TNF- $\alpha$  und IL-8 Freisetzung nach sechsstündiger Stimulation mit LPS, LTA, Zymosan, poly I:C, R848 bzw. mAk 22E7. Trotz Zugabe von IL-6 (**Abbildung 7 A+B**) bzw. IL-4 (**Abbildung 7 C+D**) führte die Stimulation der Darm-MC mit TLR-Liganden weder zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$  noch zu einer signifikanten Freisetzung von IL-8.



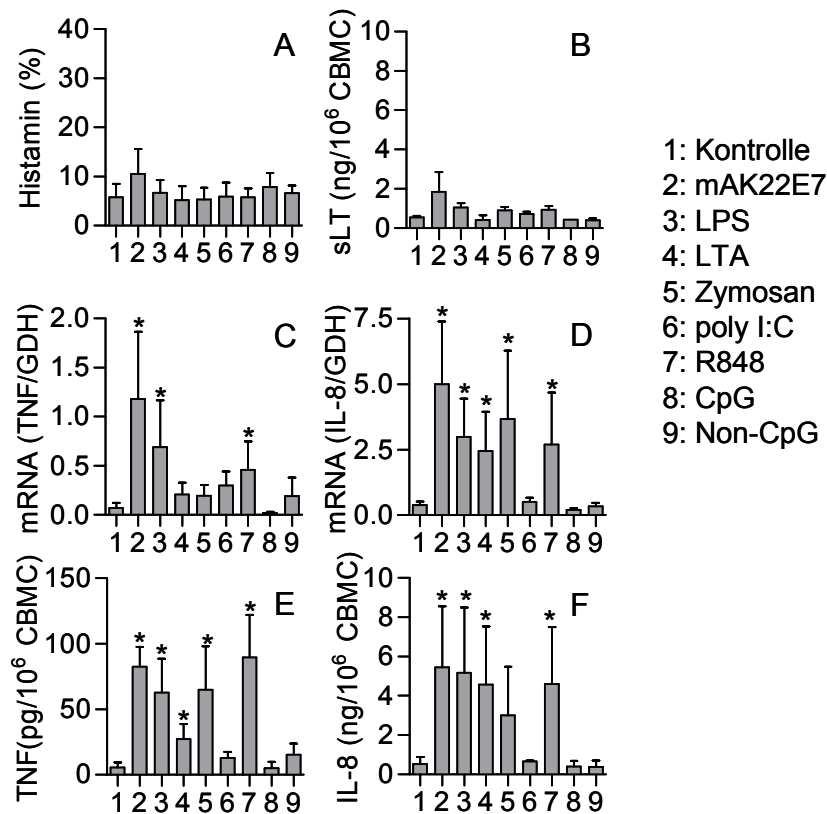
**Abbildung 7: Vorkultur menschlicher Darm-MC mit IL-6 bzw. IL-4 bewirkt keine Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-8 nach Stimulation durch TLR-Liganden.** Darm-MC wurden 2 Wochen in Anwesenheit von SCF (50 ng/ml) und IL-6 (50 ng/ml) (**A+B**) bzw. IL-4 (2 ng/ml) (**C+D**) kultiviert und anschließend mit LPS [3], LTA [4], Zymosan [5], poly I:C [6], R848 [7] bzw. mAk 22E7 [2] stimuliert. TNF- $\alpha$  (**A+C**) und IL-8 (**B+D**) wurden nach sechsstündiger Stimulation mit den gekennzeichneten TLR-Liganden im Überstand gemessen (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle

### 3.1.3 Aktivierung *in vitro* generierter Mastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden

Da wir in menschlichen Darm-MC im Gegensatz zu murinen und humanen *in vitro* generierten MC keine Aktivierung durch TLR-Liganden feststellen konnten, haben wir um unser System zu überprüfen, MC aus Nabelschnurblut generiert und die Stimulationsversuche an diesen Zellen erneut durchgeführt.

Die *in vitro* aus Progenitorzellen herangereiften MC (CBMC) wurden unter Anwesenheit von SCF (100 ng/ml) und IL-6 (50 ng/ml) bis zu einer Reinheit von 89-100% kultiviert. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Zellen nach einem Protokoll von Varadaradjalou et al. mit IL-4 kultiviert (2 ng/ml) (197). **Abbildung 8** zeigt die mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  und IL-8 nach dreistündiger Stimulation mit den gekennzeichneten TLR-Liganden. Die Messung von Histamin, TNF- $\alpha$  und IL-8 Protein erfolgte im Überstand nach sechsständiger Inkubation. Die Freisetzung von sLT wurde nach 3 Std gemessen.

Die Inkubation der CBMC mit LPS, LTA, Zymosan, poly I:C, R848, CpG bzw. Non-CpG führte nicht zu einer signifikanten Freisetzung von Histamin und sLT (**Abbildung 8 A+B**). Im Gegensatz zu den Darm-MC führte die Stimulation der CBMC mit LPS und R848 allerdings zu einer signifikanten mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  (**Abbildung 8 C**). Des Weiteren induzierten LPS, LTA, Zymosan und R848 eine signifikante mRNA-Expression von IL-8 (**Abbildung 8 D**). Entsprechend der Daten für die TNF- $\alpha$  mRNA-Expression, führte die Stimulation der CBMC mit LPS und R848 zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$  Protein (**Abbildung 8 E**). Die Menge des freigesetzten TNF- $\alpha$  entspricht der in der Literatur beschriebenen Menge zwischen 50 und 100 pg/10<sup>6</sup> CBMC nach Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml LPS (197). Neben LPS und R848 führte die Stimulation der CBMC mit LTA und Zymosan ebenfalls zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$ -Protein. **Abbildung 8 F** zeigt die Freisetzung von IL-8 nach Stimulation mit den gekennzeichneten TLR-Liganden. Eine signifikante Freisetzung von IL-8 konnte nach Stimulation der CBMC mit LPS, LTA, Zymosan und R848 aufgezeigt werden.



**Abbildung 8: TLR-Liganden führen zur Aktivierung *in vitro* herangereifter MC.** CBMC wurden mit LPS [3], LTA [4], Zymosan [5], poly I:C [6], R848 [7], CpG [8 ], Non-CpG [9] bzw. der Positiv-Kontrolle mAk 22E7 [2] stimuliert und die mRNA-Expression (C, D) sowie die Mediator-Freisetzung im Überstand (A, B, E, F) gemessen. **(A)** Histamin-Freisetzung nach sechsständiger Inkubation mit den gekennzeichneten TLR-Liganden (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). **(B)** sLT-Freisetzung nach dreistündiger Stimulation (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). Real-time RT-PCR für TNF- $\alpha$  **(C)** und IL-8 **(D)** nach dreistündiger Stimulation menschlicher Darm-MC (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). Freisetzung von TNF- $\alpha$  **(E)** und IL-8 **(F)** nach sechsständiger Inkubation (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5 bzw. 3). \* p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle



## 3.2 Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien

### 3.2.1 Mediator-Freisetzung menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien

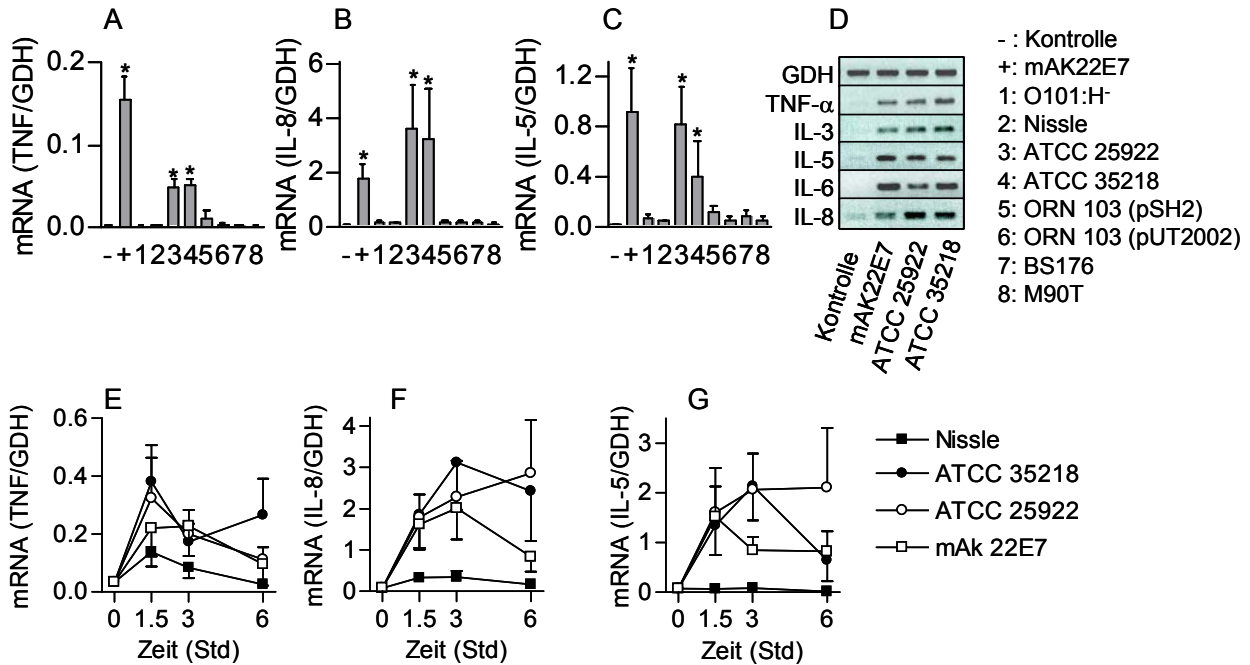
Nachdem isolierte TLR-Liganden nicht zu einer Aktivierung menschlicher Darm-MC führten, sollten nun MC mit lebenden Bakterien infiziert werden. Möglicherweise bedarf es einer kombinierten Aktivierung der TLR mittels unterschiedlicher Liganden oder anderer Trigger, die über weitere Rezeptoren wirken. Andere Arbeitsgruppen zeigten bereits in *in vivo* als auch *in vitro* Versuchen, dass verschiedene *E. coli* Stämme, insbesondere auch *E. coli* Stämme, die Typ 1 Fimbrienproteine exprimieren, welche an CD 48 binden, zu einer starken Freisetzung von Mediatoren wie TNF- $\alpha$  führen. Welchen Einfluss verschiedene *E. coli*- und Shigellen-Stämme auf menschliche Darm-MC haben, wurde im Folgenden untersucht.

Nach einer Kulturdauer von 14-21 Tagen und einer Reinheit der MC von 98 $\pm$ 2% wurden die Zellen gewaschen und in antibiotikafreiem Medium aufgenommen. Bakterien, die sich in dem Stadium des exponentiellen Wachstums (OD 0,5) befanden, wurden bei einer MOI (mode of infection) von 1:100 zu den Zellen gegeben. Folgende Bakterien wurden eingesetzt: humanes Stuhlisolat *E. coli* (O101:H-), der probiotische Stamm *E. coli* Nissle 1917, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, der FimH-exprimierende Stamm *E. coli* ORN103(pSH2) (Plasmid kodiert alle Gene, die für die Expression der Typ-1 Fimbrien, inklusive des FimH-Proteins, notwendig sind), *E. coli* ORN103(pUT2002) (isogene FimH-Mutante des *E. coli* ORN103(pSH2)), der invasive Stamm *S. flexneri* M90T (virulenter Wildtyp, Serotyp 5a), der nicht-invasive Stamm *S. flexneri* BS176 (nicht-virulent, nicht-invasive Derivat des M90T). Im Abbildungstext wird im Folgenden die Stammbezeichnung (*E. coli* bzw. *S. flexneri*) nicht mit aufgeführt.

Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte bei einigen Genen mittels konventioneller PCR, bei einigen Genen mittels quantitativer real-time RT-PCR. TNF- $\alpha$  und IL-8 Protein wurden im Überstand gemessen.

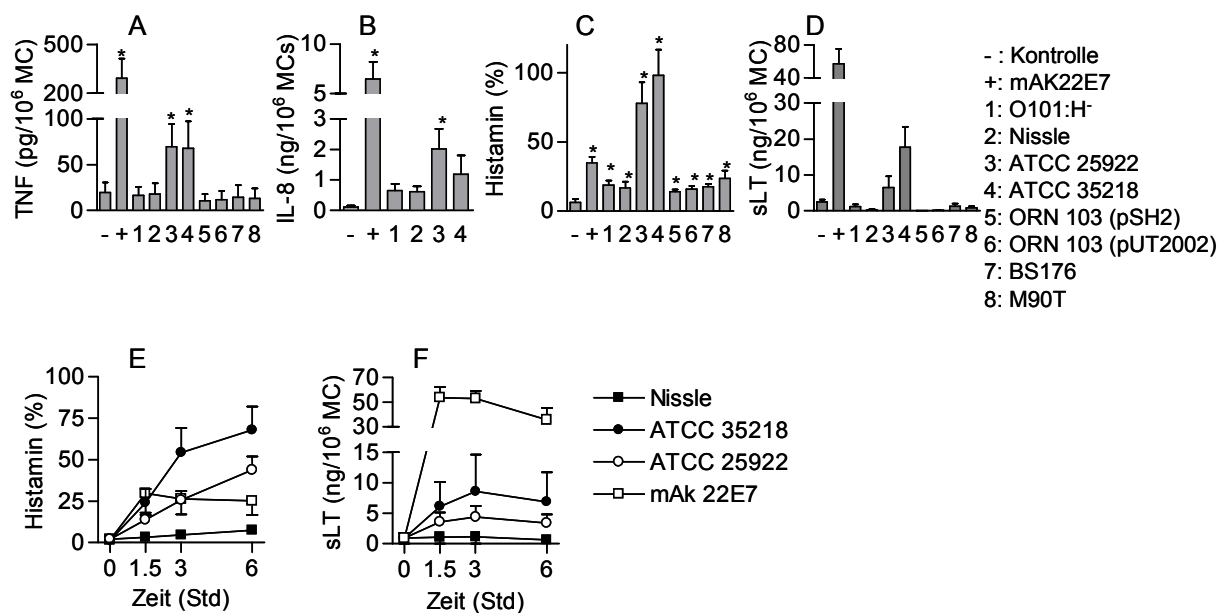
Nach sechsstündiger Inkubation mit den gekennzeichneten Bakterien-Stämmen führten lediglich die *E. coli*-Stämme ATCC 25922 und 35218 zu einem signifikanten Anstieg der m-RNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8 (**Abbildung 9 A-C**). Selbst die pathogenen Bakterien-Stämme *S. flexneri* M90T und der FimH-exprimierende *E. coli* ORN 103(pSH2) führten nicht zu einer signifikanten Aktivierung der Zellen. Bestätigt wurden diese Ergebnisse ebenfalls mit konventioneller PCR für IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, und TNF- $\alpha$ . **Abbildung 9 D** zeigt die mRNA-Expression nach sechsstündiger Infektion der Zellen mit *E. coli* ATCC 25922 und 35218 bzw. IgER-Kreuzvernetzung. Die mRNA-Induktion erfolgte bereits nach 90 min, wobei

die mRNA-Expression für die Interleukine IL-5 und IL-8 den stärksten Anstieg nach 3 bis 6 Std Stimulation aufwiesen (**Abbildung 9 E-G**).



**Abbildung 9: Expression von mRNA nach Infektion menschlicher Darm-MC mit verschiedenen *E. coli* und *S. flexneri* Stämmen.** MC wurden mit den gekennzeichneten Bakterien (MOI 1:100) inkubiert bzw. durch IgER-Kreuzvernetzung mit dem mAk 22E7 stimuliert. Die mRNA-Expression für **(A)** TNF- $\alpha$ , **(B)** IL-8 und **(C)** IL-5 nach sechsständiger Inkubation wurde mittels quantitativer real-time PCR analysiert (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). **(D)** Konventionelle RT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-6 und IL-8 nach sechsständiger Infektion mit *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218. Zeitkinetik der mRNA-Expression für **(E)** TNF- $\alpha$ , **(F)** IL-8 und **(G)** IL-5 (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3). \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.

Entsprechend der Daten für die mRNA-Induktion zeigten die MC ebenfalls eine vermehrte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-8 Protein nach Infektion mit *E. coli* ATCC 25922 und ATCC 35218 (**Abbildung 10 A+B**). **Abbildung 10 C** zeigt die Histamin-Freisetzung nach sechsständiger Infektion mit den gekennzeichneten Bakterienstämmen. Alle getesteten Bakterienstämme führten zu einer signifikanten Histamin-Freisetzung, wobei durch die *E. coli* Stämme ATCC 25922 und ATCC 35218 signifikant mehr Histamin freigesetzt wurde. Die Histamin-Freisetzung konnte bereits nach 1,5 Std verzeichnet werden und stieg nach sechs- bis siebenständiger Inkubation mit den *E. coli*-Stämmen ATCC 25922 und ATCC 35218 auf eine maximale Histamin-Freisetzung von 50-100% an, was auf eine Lyse der MC hinweist (**Abbildung 10 E**). Die *E. coli* Stämme ATCC 25922 und ATCC 35218 führten weiterhin zu einer Freisetzung von sLT (**Abbildung 10 D**). Die Freisetzung von sLT war nach dreistündiger Inkubation mit den *E. coli* Stämmen ATCC 25922 und ATCC 35218 maximal (**Abbildung 10 F**).



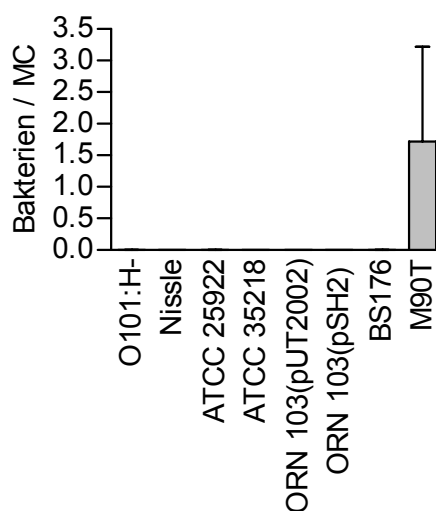
**Abbildung 10: Mediator-Freisetzung nach Infektion menschlicher Darm-MC mit verschiedenen *E. coli* und *S. flexneri* Stämmen.** TNF- $\alpha$  (**A**) und IL-8 (**B**) Protein nach sechsständiger Infektion mit den gekennzeichneten Bakterien (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4). (**C**) Histamin-Freisetzung nach sechsständiger Infektion mit den gekennzeichneten Bakterienstämmen (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 5). (**D**) Freisetzung von sLT nach dreistündiger Infektion (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 2). Zeitkinetik der Histamin- (**E**) und sLT- (**F**) Freisetzung nach Inkubation mit mAk 22E7, *E. coli* Nissle 1917, *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218 (Mittelwert von zwei Experimenten). \* p < 0.05 im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.2.2 Intrazelluläre Bakterien bei menschlichen Darmmastzellen

Bakterien können entweder aktiv in eine Zelle eindringen oder passiv von Zellen phagozytiert werden. Der FimH-exprimierende *E. coli* ORN 103 (pSH2) wird als naives Bakterium über einen Opsonin-unabhängigen Prozess von murinen MC erkannt und phagozytiert. Diese Opsonin-unabhängige Phagozytose erfolgt durch Bindung des Fimbrienproteins an CD48, den FimH-Rezeptor (110). Ein Vertreter invasiver Bakterien stellt *S. flexneri* dar. *S. flexneri* dringt aktiv in Zellen ein, um diese zu aktivieren bzw. Apoptose oder Zelltod zu induzieren. Die Bakterien werden durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma lysiert das Bakterium die umgebende, von der Wirtszelle gebildete Vakuolenschicht und besiedelt das Wirtszell-Zytoplasma (190).

Die Analyse intrazellulärer Bakterien erfolgte mittels „gentamycin protection assays“. Dieser Assay beruht auf der Tötung extrazellulärer Bakterien durch die Zugabe von Gentamycin. Im Folgenden werden die intrazellulären Bakterien durch Lyse der Zellen mit einer 1%igen TritonX-100 in PBS-Lösung freigesetzt. Diese Bakterien wurden mit PBS logarithmisch verdünnt, auf Agarplatten ausplattiert und am nächsten Tag ausgezählt.

Eine Stunde nach Infektion menschlicher Darm-MC konnte jedoch lediglich der invasive *Shigella flexneri* M90T intrazellulär nachgewiesen werden, wobei im Durchschnitt 1,7 Bakterien pro MC beobachtet wurden (**Abbildung 11**). *E. coli* Bakterien, inklusive des Fimbrien exprimierenden *E. coli* ORN 103 (pSH2), konnten intrazellulär nicht nachgewiesen werden.



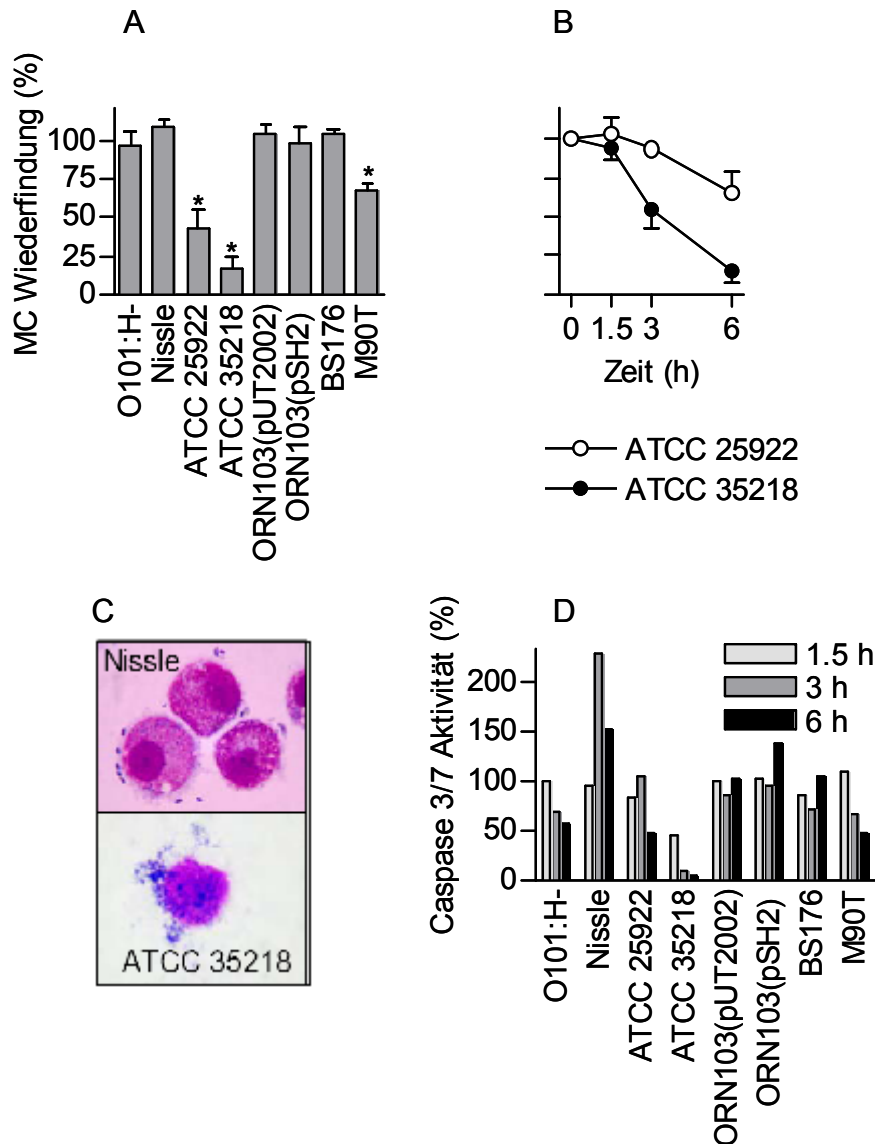
**Abbildung 11: Anzahl intrazellulärer Bakterien pro MC.** Analyse mittels gentamycin protection assays (n=3). Mittelwert ± SEM ist gezeigt.

### 3.2.3 Zellyse menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien

Bakterien sind in der Lage Zelltod durch Lyse oder Apoptose zu induzieren. In Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen führt *S. flexneri* zum Beispiel zur Apoptose (37,59,161). Verschiedene bakterielle Toxine dagegen induzieren eine Lyse der Zellen. Ob die in dieser Studie eingesetzten Bakterien Zelltod hervorrufen, sollte im Folgenden geklärt werden.

Die Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen in der Neubauer-Zählkammer erfolgte mit dem Farbstoff Trypanblau. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen blau und belässt lebende Zellen ungefärbt, da er eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Einen Hinweis auf Apoptoseinduktion lieferte die Analyse der Caspase 3/7 Aktivierung.

**Abbildung 12 A** zeigt die MC-Wiederfindung nach sechsständiger Inkubation. Der invasive *S. flexneri* M90T führte zu einer signifikant verminderten Wiederfindung der Zellen, die bei etwa 65% gegenüber dem Ausgangswert lag. Interessanterweise war bei den beiden *E. coli* Stämmen ATCC 25922 und ATCC 35218 lediglich eine MC-Wiederfindung von 20-30% zu verzeichnen. Der Zelltod nach Infektion mit *E. coli* ATCC 35218 trat bereits 1,5 Std nach Infektion ein, wobei eine MC-Wiederfindung von immer noch etwa 90% bestand (**Abbildung 12 B**). Der Zelltod nach Infektion mit *E. coli* ATCC 25922 trat erst nach 3 Std ein. Nach diesem Zeitraum waren immer noch 90% der Zellen vital. Die anderen getesteten Bakterien führten bis zu 6 Std nach Infektion nicht zum Zelltod. **Abbildung 12 C** zeigt MC nach Infektion mit *E. coli* Nissle 1917 bzw. eine zerstörte MC nach Infektion mit *E. coli* ATCC 35218. Die Untersuchungen der Caspase 3/7 Aktivität deuten darauf hin, dass es sich bei dem Zelltod nicht um Apoptose handelt (**Abbildung 12 D**). Weder nach Infektion mit den *E. coli* Stämmen ATCC 25922 und ATCC 35218 noch nach Infektion mit *S. flexneri* M90T konnte eine Aktivierung der Caspase 3/7 gemessen werden. *E. coli* Nissle 1917 induzierte einen leichten Anstieg der Caspase 3/7 Aktivität nach 3 Std, obwohl nach sechsständiger Inkubation kein Zelltod mittels Trypanblau Färbung aufgezeigt werden konnte (**Abbildung 12 A**). Diese schnelle Induktion des Zelltods nach Infektion mit *E. coli* ATCC 25922 und ATCC 35218 könnte eine Erklärung der niedrigen Freisetzung von IL-8-Protein, trotz starker mRNA Induktion und der teilweise vollständigen Histamin-Freisetzung nach Infektion menschlicher Darm-MC sein.

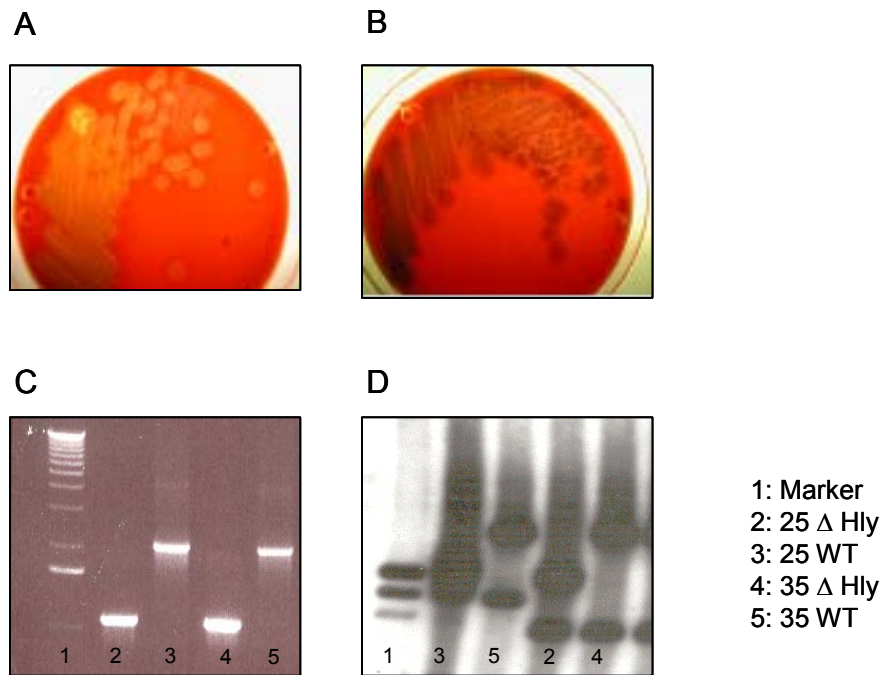


**Abbildung 12. Caspase 3/7 unabhängige Zelltodinduktion nach Infektion mit *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218. (A)** Anzahl vitaler MC nach sechsständiger Inkubation mit den gekennzeichneten Bakterien-Stämmen (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 5$ ). **(B)** Zeitkinetik des Zelltods induziert durch *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218 (Mittelwert  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). **(C)** Lichtmikroskopische Aufnahme der MC nach Inkubation mit *E. coli* Nissle 1917 und *E. coli* ATCC 35218 nach 6 Std **(D)** Caspase 3/7 Aktivität in MC nach Inkubation mit den gekennzeichneten Bakterien-Stämmen nach 90 min bzw. 3 und 6 Std Ergebnisse eines Experiments sind dargestellt. Ergebnisse für die *E. coli* Stämme ATCC 25922 und *E. coli* ATCC 35218 wurden in einem zweiten Experiment bestätigt (nicht gezeigt). \*  $p < 0.05$  im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.2.4 Geno- und Phänotypische Darstellung isogener Hämolysin Mutanten

Die Ergebnisse zeigen, dass menschliche Darm-MC durch *E. coli* ATCC 25922 und ATCC 35218 zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren angeregt werden. Weiterhin kommt es zur Induktion einer Zelllyse. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten wir die Hypothese auf, dass *E. coli* alpha Hämolysin, welches von den *E. coli* Stämmen ATCC 25922 und ATCC 35218, aber nicht von den anderen untersuchten Stämmen gebildet wird, für die Zellaktivierung mit anschließender Zelllyse verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Dissertation wurden daraufhin isogene Hämolysin-Mutanten der *E. coli* Stämme ATCC 25922 (25 $\Delta$ hly) und ATCC 35218 (35 $\Delta$ hly) und eine Transformante des nicht hämolytischen Stammes *E. coli* Nissle 1917 mit dem Plasmid pSF4000 (Hly+), welches Hämolysin kodiert bzw. dem Kontrollplasmid pACYC 184 (Hly-), generiert. Die Klonierungsstrategie und das Prinzip der Herstellung isogener Mutanten ist im Kapitel 2.2 detailliert beschrieben. Die phäno- und genotypische Darstellung der isogenen Hämolysin-Mutanten wird im Folgenden aufgezeigt.

Die phänotypische Darstellung des *E. coli* ATCC 25922 Wildtyps (25 WT) auf Blutagarplatten zeigt den hämolytischen Hof, der durch die hämolysinbedingte Lyse der Erythrozyten entsteht (**Abbildung 13 A**). Bei der isogenen Hämolysin-Mutante (**Abbildung 13 B**) ist diese Lyse nicht mehr zu beobachten. Die genotypische Darstellung erfolgte mittels konventioneller PCR (**Abbildung 13 C**) und Southern blot (**Abbildung 13 D**). **Abbildung 13 C** zeigt die Wildtypstämme *E. coli* ATCC 25922 und 35218 (von links Linie 3 und 5) und deren isogenen Mutanten (von links Linie 2 und 4). Die Amplifikate wurden mit den Primern pSK1 und pSK2, welche im Gen des Hämolysin A angreifen, erstellt. Im Rahmen der Mutagenese wurde dieses Fragment verkürzt und liegt bei den isogenen Mutanten im Vergleich zu den Wildtypstämmen um 1043 Basenpaare verkleinert vor. **Abbildung 13 D** zeigt die Ergebnisse der Southern blot Analyse. Der untere Balken zeigt die spezifische Bindung der Sonde an das nach der Spaltung mit dem Restriktionsenzym Bpu10I entstandene 9620 bp große Fragment (Linie 3 und 5) sowie das nach Mutation um 1043 bp verkürzte Fragment (Linie 2 und 4).

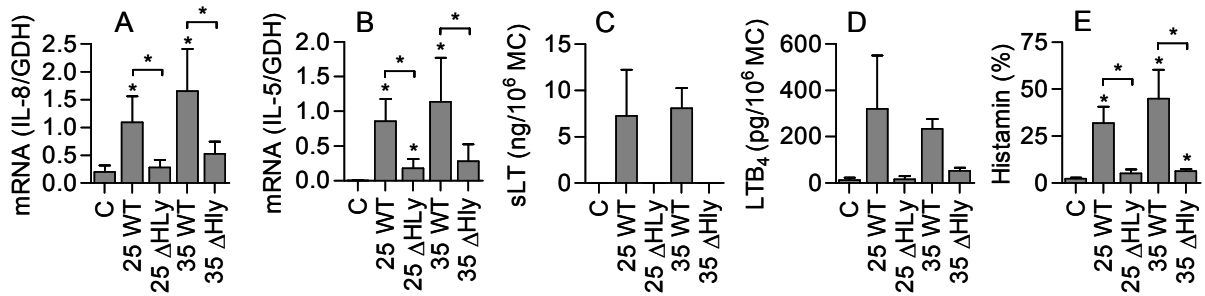


**Abbildung 13: Phäno- und Genotypische Darstellung der isogenen Hämolyysin Mutanten.** Phänotypische Darstellung (A) des Wildtyp *E. coli* ATCC 25922 (25 WT) und (B) der isogenen Mutante (25 $\Delta$ hly) auf Blutagarplatten. (C) Konventionelle PCR mit den Primern pSK1 und pSK2. DNA der isogenen Mutante *E. coli* ATCC 25922 (25 $\Delta$ hly) [2], des Wildtyps *E. coli* ATCC 25922 (25 WT) [3], der isogenen Mutante *E. coli* ATCC 35218 (35 $\Delta$ hly) [4] und des Wildtyps *E. coli* ATCC 35218 (35WT) [5]. (D) Southern blot nach restriktionsspezifischer Spaltung mit dem Enzym Bpu 10I.

### 3.2.5 *E. coli* alpha Hämolyysin stimuliert die Mediator-Freisetzung menschlicher Darmmastzellen

Die erstellten isogenen Hämolyysin-Mutanten *E. coli* ATCC 25922  $\Delta$  Hämolyysin (25 $\Delta$ hly) und *E. coli* ATCC 35218  $\Delta$  Hämolyysin (35 $\Delta$ hly) wurden nun in der Zellkultur getestet. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte 3 Std nach Infektion mittels real-time RT-PCR. Die Mediatoren sLT und LTB<sub>4</sub> wurden 3 Std nach Infektion im Überstand gemessen. Die Menge an Histamin im Überstand wurde 6 Std nach Infektion gemessen. 25 $\Delta$ hly und 35 $\Delta$ hly verhielten sich wie die anderen getesteten Hämolyysin-negativen Stämme (vergl. Abbildung 9 und 10). Sie haben eine stark verminderte Kapazität MC zu aktivieren, welches anhand der mRNA-Expression für IL-8 (Abbildung 14 A) und IL-5 (Abbildung 14 B), der sLT- (Abbildung 14 C) und LTB<sub>4</sub>- (Abbildung 14 D) sowie der Histamin-Freisetzung (Abbildung 14 E) gezeigt wird.





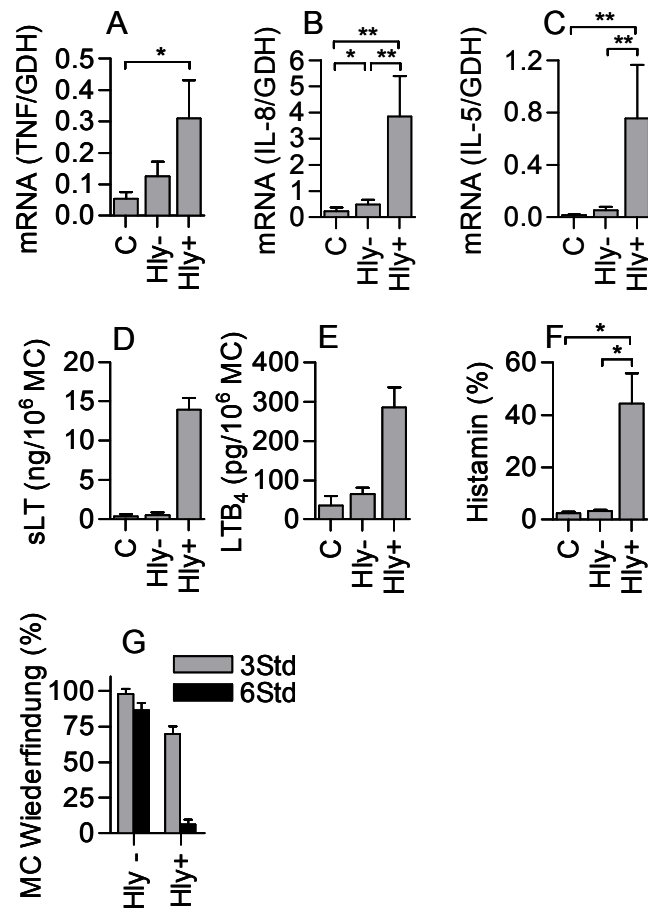
**Abbildung 14: *E. coli* Hämolyse bewirkt MC-Aktivierung. (A-F)** MC blieben unbehandelt [C] bzw. wurden mit *E. coli* ATCC 25922 [25 WT], ATCC 25922  $\Delta$  Hämolyse [25  $\Delta$ Hly], ATCC 35218 [35 WT], ATCC 35218  $\Delta$  Hämolyse [35  $\Delta$ Hly] infiziert. **(A)** IL-8, **(B)** IL-5 mRNA-Expression ( $n = 5$ ) und die Mediatoren **(C)** sLT und **(D)** LTB<sub>4</sub> ( $n = 3$ ) wurden nach 3 Std gemessen. **(E)** Histamin-Freisetzung nach 6 Std ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  im Vergleich zur Kontrolle bzw. wie gekennzeichnet. Mittelwert  $\pm$  SEM ist gezeigt.

### 3.2.6 Hämolytischer *E. coli* Nissle (pSF4000) führt zu Mediator-Freisetzung und Zelltod

Um die Hypothese, dass *E. coli* Hämolyse für die Zellaktivierung verantwortlich ist, zu untermauern, haben wir des Weiteren den transformierten *E. coli* Nissle 1917 mit dem Plasmid, welches das Hämolyse-Gen kodiert (pSF4000, Hly+), bzw. mit dem Kontrollplasmid (pACYC184, Hly-) in Infektionsversuchen an menschlichen Darm-MC getestet.

Im Gegensatz zu *E. coli* Nissle WT induziert *E. coli* Nissle Hly+ in MC die Expression von TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-5 mRNA, die Freisetzung von sLT, LTB<sub>4</sub> und Histamin. Vergleichbar mit *E. coli* Nissle WT hat *E. coli* Nissle (pACYC184, Hly-) keine bzw. geringfügige Effekte auf MC (**Abbildung 15 A-F**). Die MC Wiederfindung nach drei- bzw. sechsständiger Inkubation mit *E. coli* Nissle Hly+ war signifikant erniedrigt. Nach sechsständiger Inkubation belief sich die MC Wiederfindung auf 0 bis 12% (**Abbildung 15 G**).

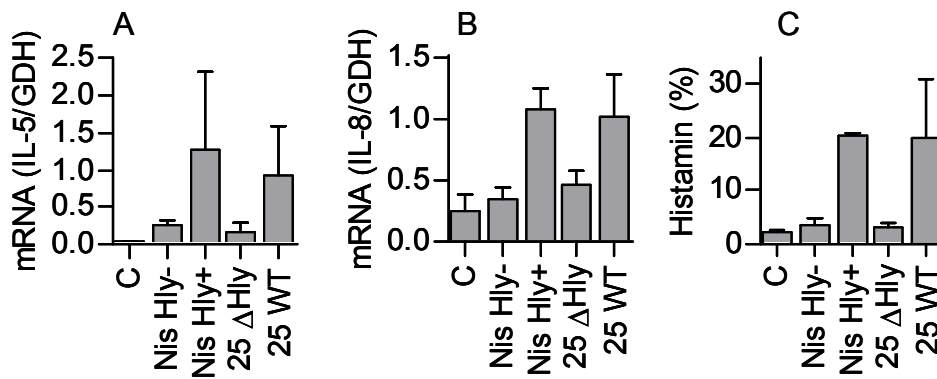
Mit Hilfe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass menschliche Darm-MC sensitiv für *E. coli* alpha Hämolyse sind und mit einer Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-8, Histamin, sLT und LTB<sub>4</sub> reagieren.



**Abbildung 15: Hämolysierender *E. coli* Nissle bewirkt MC-Aktivierung. (A-G)** MC blieben unbehandelt [C] bzw. wurden mit *E. coli* Nissle 1917 (pACYC184) [Hly-] und *E. coli* Nissle 1917 (pSF4000) [Hly+] infiziert. Expression der mRNA für **(A)** TNF- $\alpha$  (n = 8), **(B)** IL-8 (n = 8) und **(C)** IL-5 (n = 8) wurde nach 3 Std gemessen. Freisetzung von **(D)** sLT (n = 3), **(E)** LTB<sub>4</sub> (n = 3) und **(F)** Histamin (n = 5) wurden ebenfalls nach 3 Std gemessen. **(G)** MC-Wiederfindung nach 3 und 6 Std (n = 3). Mittelwert  $\pm$  SEM ist gezeigt. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle bzw. wie gekennzeichnet.

### 3.2.7 Kulturüberstand hämolytischer *E. coli* Bakterien bewirkt MC-Aktivierung

Im Folgenden wurde untersucht, ob die MC-Aktivierung durch hämolytische Bakterien einen Zell-Bakterien-Kontakt erfordert oder ob diese durch freigesetzte Faktoren im Überstand hervorgerufen werden kann. Aus diesem Grund wurden MC mit Kulturüberstand der Übernachtskulturen von *E. coli* Nissle 1917 (pSF4000) und *E. coli* ATCC 25922 bzw. deren Kontrollen 3 Std inkubiert. **Abbildung 16 (A-C)** zeigt die mRNA-Expression für IL-5 und IL-8 und die Histamin-Freisetzung. Überstand der Stämme *E. coli* Nissle 1917 (pSF4000) und *E. coli* ATCC 25922 führten zu einer starken Aktivierung der Zellen im Vergleich zu den Hämolsin-negativen Stämmen *E. coli* Nissle 1917 (pACYC184) und *E. coli* ATCC 25922  $\Delta$ Hly. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass kein direkter Zell-Bakterien Kontakt notwendig ist und dass das im Überstand befindliche Hämolsin zu der Aktivierung der MC führt.



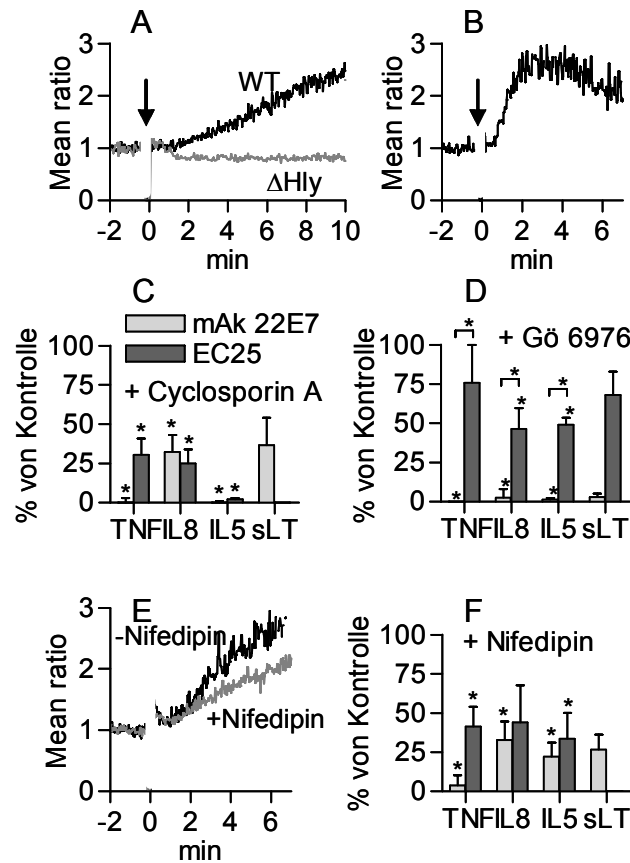
**Abbildung 16. Inkubation menschlicher Darm-MC mit Kulturüberstand hämolytischer *E. coli* Stämme.** MC wurden für 3 Std mit Kulturüberstand der Stämme *E. coli* Nissle 1917 (pACYC184) [Nis Hly-], *E. coli* Nissle 1917 (pSF4000) [Nis Hly+], *E. coli* ATCC 25922 [25 WT], *E. coli* ATCC 25922 Hly<sup>-</sup> [25  $\Delta$ Hly] oder Zellkulturmedium als Kontrolle [C] inkubiert. Expression der mRNA für (A) IL-5, (B) IL-8 und (C) Histamin-Freisetzung wurden gemessen. (Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 3).

### 3.2.8 *E. coli* alpha Hämolysin induziert Kalzium-Fluss

In den vergangenen Versuchen konnten wir zeigen, dass Hämolysin ein potenter Induktor proinflammatorischer Mediatoren in menschlichen Darm-MC darstellt. Die Mechanismen dieser Aktivierung sollten im Folgenden untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Inhibitoren der Signalkaskade eingesetzt und der Kalzium-Fluss nach Infektion der MC untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in **Abbildung 17 und 18** dargestellt.

Die Messung des im Zytosol befindlichen Kalziums wurde mit den Farbstoffen Fluo-3 und Fura Red durchgeführt. Die Extinktion erfolgte bei 488 nm in einem Durchflusszytometer. Das relative Verhältnis der emittierten Fluoreszenz bei 530 nm und 670 nm wurde als Maß für intrazelluläres Kalzium gemessen. MC wurden mit 500 µl Überstand einer Übernachtskultur der Bakterienstämme *E. coli* ATCC 25922 oder deren isogener Mutante (*E. coli*  $\Delta$  Hly) und mAk 22E7 stimuliert und der Kalzium-Fluss 6 bzw. 10 min gemessen.

Im Gegensatz zu der isogenen *E. coli* Hämolysin Mutante ( $\Delta$ Hly) führte *E. coli* ATCC 25922 WT zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (**Abbildung 17 A**). Dieser Kalzium-Anstieg erfolgte allerdings langsamer als nach Stimulation mit mAk 22E7 (**Abbildung 17 B**). Durch den Anstieg des intrazellulären Kalziums kann es beispielsweise zu einer Aktivierung von Calcineurin oder der Protein Kinase C (PKC) kommen. Diese Signalmoleküle können durch Cyclosporin A, ein Inhibitor des Calcineurin oder Gö 6976, ein Inhibitor der PKC inhibiert werden (152,167). Der Einsatz von Cyclosporin A führte bei menschlichen Darm-MC, die mit *E. coli* ATCC 25922 infiziert oder mAK 22E7 stimuliert wurden, zu einer starken Herabregulation der mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung (**Abbildung 17 C**). Interessanterweise inhibierte Gö 6976 zwar fast vollständig die Effekte nach Stimulation mit mAk 22E7 aber nur zu einem geringen Teil (50%) die Antwort der MC auf Hämolysin (**Abbildung 17 D**). In Studien an Epithelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Inhibition der spannungsgesteuerten L-Typ Kalziumkanäle die Aktivierung durch hämolytische Bakterien verhindert werden kann (192). Einen Inhibitor der L-Typ Kalziumkanäle stellt das Nifedipin dar, welches eine Stunde vor Stimulation der Zellen mit Überstand einer *E. coli* Übernachtskultur hinzugegeben wurde. In **Abbildung 17 E** ist der Anstieg intrazellulären Kalziums mit und ohne Vorbehandlung mit Nifedipin aufgezeigt. Die mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und die sLT-Freisetzung nach Stimulation mit Hämolysin bzw. mAk 22E7 konnte durch Nifedipin um 50-60% inhibiert werden (**Abbildung 17 F**).



**Abbildung 17: Kalzium-Fluss nach Stimulation mit *E. coli* alpha Hämolyisin. (A)** Kalzium Fluss nach Stimulation mit Überstand einer Übernachtskultur der Stämme *E. coli* ATCC 25922 (schwarze Linie) und *E. coli* ATCC 25922 Hly<sup>-</sup> (graue Linie) (n=4). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe des Überstandes an. **(B)** Kalzium Fluss nach Stimulation mit mAk 22E7 (n=4). MC wurden 60 min mit **(C)** Cyclosporin A (1  $\mu$ M) oder **(D)** Gö 6976 (2  $\mu$ M) vorinkubiert und mit *E. coli* ATCC 25922 und mAk 22E7 für 3 Std stimuliert. Expression der mRNA für TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-5 wurde mittels real-time RT-PCR, sLT im Überstand gemessen (n=4). **(E)** Kalzium Fluss (n=3) mit und ohne 15 minütiger Vorinkubation mit Nifedipin (100 mM) und folgender Stimulation mit *E. coli* ATCC 25922. **(F)** mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung nach Vorinkubation mit Nifedipin und folgender Stimulation mit *E. coli* ATCC 25922 und mAk 22E7 für 3 Std (n=4, Mittelwert  $\pm$  SEM). \* p < 0.05 im Vergleich zur Kontrolle bzw. wie gekennzeichnet.

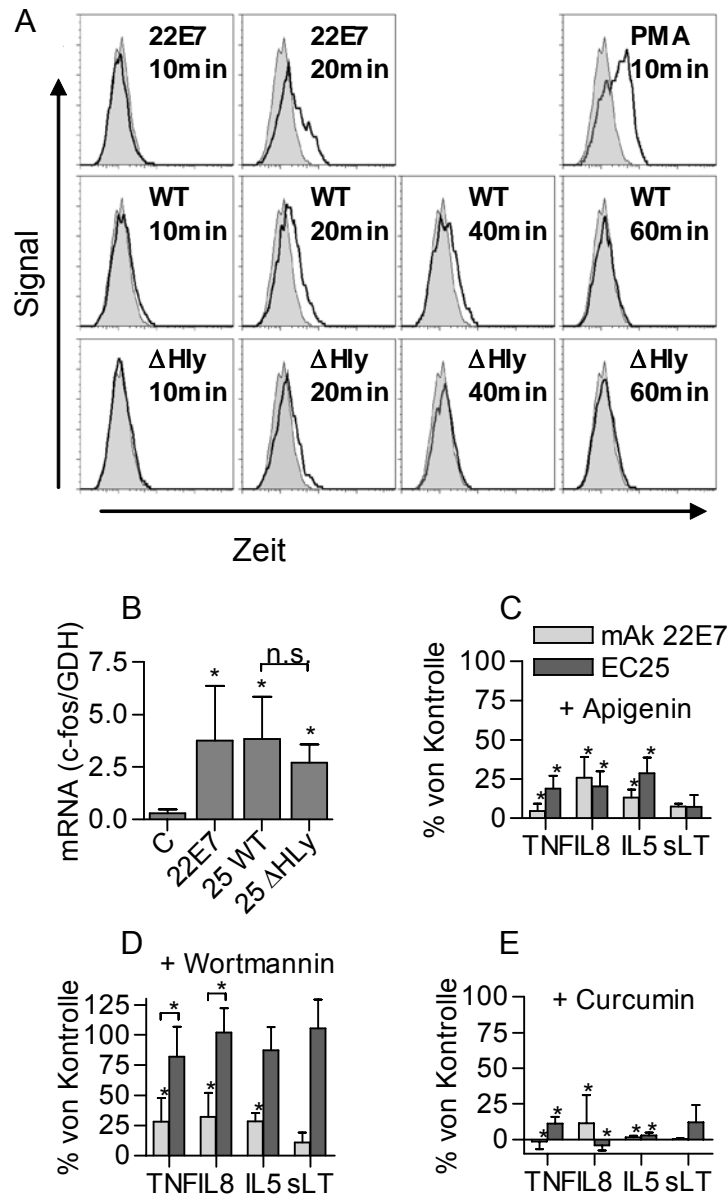
### 3.2.9 *E. coli* – Stämme aktivieren den extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 Signalweg

Die MAP-Kinase ERK spielt bei der Aktivierung menschlicher Darm-MC durch Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren mittels mAk 22E7 eine entscheidende Rolle (102). Bei anderen Zelltypen konnte gezeigt werden, dass ERK bei der Immunantwort gegenüber Pathogenen oder entzündlichen Reaktionen beteiligt ist.

**Abbildung 18 A** zeigt eine Zeitkinetik von pERK im Durchflusszytometer nach Stimulation menschlicher Darm-MC mit mAk 22E7 (erste Reihe), Überstand von *E. coli* ATCC 25922 WT (zweite Reihe) und Überstand von *E. coli* ATCC 25922  $\Delta$ Hly (dritte Reihe). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der hämolytische *E. coli* ATCC 25922 WT als auch die isogene Hämolysin-negative Mutante *E. coli* ATCC 25922  $\Delta$ Hly zur Phosphorylierung von ERK führt. Allerdings ist das Signal nach Stimulation mit Überstand von *E. coli* ATCC 25922 WT stärker als nach Stimulation mit *E. coli* ATCC 25922  $\Delta$ Hly (gezeigt ist eines von drei unabhängigen Experimenten). Das Signalmolekül c-Fos, welches der ERK nachgelagert ist, wird ebenfalls durch den hämolytischen *E. coli* ATCC 25922 WT und die isogene Hämolysin-negative Mutante *E. coli* ATCC 25922 ( $\Delta$ Hly) aktiviert (**Abbildung 18 B**). Ein signifikanter Unterschied zwischen *E. coli* ATCC 25922 WT und der Hämolysin-negativen Mutante *E. coli* ATCC 25922 ( $\Delta$ Hly) konnte nicht gezeigt werden. Die c-Fos Aktivierung wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. Diese Ergebnisse werden untermauert durch die Analyse mit Apigenin, einem Inhibitor des MAP-Kinase Signalweges (34). **Abbildung 18 C** zeigt, dass Apigenin zu einer 70 - 80%igen Reduktion der mRNA von TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung führt.

Interessanterweise führte Wortmannin, ein spezifischer Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase (214), nicht zu einer Inhibition der durch *E. coli* ATCC 25922 bedingten Aktivierung der mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8. Im Gegensatz dazu konnte die Aktivierung durch IgE-Kreuzvernetzung durch Wortmannin inhibiert werden (**Abbildung 18 D**). Des Weiteren bedingte eine Vorbehandlung der MC mit Curcumin, einem Inhibitor der NF- $\kappa$ B und AP-1-abhängigen Signalwege (172) eine komplette Blockade der durch *E. coli* ATCC 25922 oder mAk 22E7 induzierten mRNA-Expression (**Abbildung 18 E**).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aktivierung menschlicher Darm-MC durch *E. coli* alpha Hämolysin anderen Signalkaskaden unterliegt als die Aktivierung durch Kreuzvernetzung der IgE-Rezeptoren.



**Abbildung 18: Aktivierung des ERK 1/2 Signalweges durch *E. coli* alpha Hämolyisin.** (A) pERK1/2 wurde im Durchflusszytometer nach Stimulation menschlicher Darm-MC mit mAk22E7, PMA, *E. coli* 25922 WT und *E. coli* 25922 ΔHly gemessen. Graue Fläche entspricht der Isotyp-Kontroll-Färbung. Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. (B) c-Fos mRNA-Expression nach 30-minütiger Inkubation mit mAk22E7, *E. coli* 25922 WT [25 WT] und *E. coli* 25922 ΔHly [25 ΔHly]. (C-E) MC wurden 60 min mit (C) Apigenin (20 μM) (D) Wortmannin (100 nM) und (E) Curcumin (50 μM) vorinkubiert und dann mit *E. coli* 25922 WT und mAk 22E7 stimuliert. Expression der mRNA für TNF-α, IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung nach 3 Std. Dargestellt ist der relative Anteil (%) der spezifischen Induktion zur nicht vorbehandelten Kontrolle (Mittelwert ± SEM, n = 6, n = 3 für sLT). \* p < 0.05 im Vergleich zur Kontrolle bzw. wie gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

### 4.1 Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden

TLR spielen eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung von Pathogenen. Sie werden von einer Vielzahl an Zellen exprimiert, darunter Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Zellen, MC und Epithelzellen (184). In humanen Zellen wurden bisher 10 TLR beschrieben, die sich nicht nur aufgrund der Spezifität, sondern ebenfalls aufgrund des Expressionsmusters und der intrazellulären Signalwege unterscheiden. Mit Hilfe von TLR sind Zellen in der Lage, konservierte Motive wie Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Flagellin, CpG-DNA und doppelsträngige RNA zu erkennen. Durch die spezifische Bindung der Liganden an die TLR wird sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beeinflusst (184). Eine Schlüsselkomponente bei der Beeinflussung des angeborenen Immunsystems durch TLR ist die Initiation einer Entzündung durch die Freisetzung von Mediatoren wie zum Beispiel  $\text{TNF-}\alpha$ . Aber auch antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 oder  $\text{TGF-}\beta$  werden durch die Bindung der Liganden an die TLR freigesetzt. Eine direkte antibakterielle Wirkung wird durch Freisetzung von  $\text{O}_2^-$  Radikalen, NO bzw. Phagozytose bewirkt. Das antigenspezifische adaptive Immunsystem wird durch TLR beispielsweise über die Rekrutierung von Dendritischen Zellen in die Lymphknoten oder durch Differenzierung naiver T-Zellen in TH-1- bzw. TH-2-Zellen reguliert (74).

In den letzten Jahren sind einige Arbeiten publiziert worden, in denen die Expression von TLR in murinen und humanen MC-Subtypen untersucht wurde. McCurdy et al. untersuchten murine, aus Knochenmark isolierte MC (BMMC) und die murine MC-Linie MC/9. Sie konnten zeigen, dass sowohl BMMC als auch die Zelllinie MC/9 TLR 2, 4 und 6, jedoch nicht TLR 5 exprimieren (123,180). Supajatura et al. bestätigten diese Ergebnisse und erweiterten das Spektrum um TLR 8 (181). In einer weiteren Studie wurde die Expression der mRNA für TLR 2, 3, 4, 7 und 9 in murinen BMMC und murinen Haut-MC verglichen. TLR 2 und 4 konnte in beiden Zell-Subtypen nachgewiesen werden. Die Expression von TLR 3, 7 und 9 in murinen Haut-MC war im Vergleich zu der in BMMC erhöht (121). Untersuchungen an menschlichen *in vitro* generierten MC aus Nabelschnurblut (CBMC) bzw. peripherem Blut (PBMC) oder an menschlichen MC-Linien wiesen andere Ergebnisse auf. CBMC und die MC/Basophile Zelllinie KU812 exprimieren mRNA für TLR 1, 2 und 6, jedoch nicht TLR 4 (124). Durch Kultur der Zellen mit IL-4 konnte allerdings die Expression von TLR 4 induziert werden (197). In PBMC konnte die mRNA-Expression für TLR 4 durch Kultur mit  $\text{INF-}\gamma$  signifikant gesteigert wird (146). PBMC exprimieren neben



TLR 4 auch TLR 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 9 nach 4-wöchiger *in vitro* Kultur (91). Nach 8-wöchiger Kultur konnte TLR 8 allerdings weder auf mRNA, noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Die menschliche MC-Linie HMC-1 wies im Gegensatz zu menschlichen PBMC keine Expression von TLR 2 und 4 auf (91).

In der vorliegenden Arbeit wurde die TLR-Expression in menschlichen Darm-MC untersucht. Lediglich MC-Kulturen einer Reinheit von 98-100% wurden für die hochsensitive Methode der RT-PCR zur Analyse dieser Rezeptoren verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass menschliche Darm-MC mRNA für TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 9 exprimieren. Die Proteine für TLR 2, 3 und 4 wurden ebenfalls analysiert und nachgewiesen, wobei TLR 4 allerdings sehr schwach nachzuweisen war. Im Gegensatz zu Studien, in denen die TLR 4 Expression menschlicher MC durch IL-4 Kultur erhöht wurde, konnte dieser Effekt bei menschlichen Darm-MC jedoch nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt) (146,197). Weitere wichtige Cofaktoren des TLR-Signalweges, wie MD-2 und MyD88, konnten mittels RT-PCR ebenfalls gezeigt werden.

Stimulation menschlicher Darm-MC mit den TLR Liganden LPS (TLR 4), LTA (TLR 2), Zymosan (TLR 2), poly I:C (TLR 3), R848 (TLR 7/8), CpG (TLR 9) bzw. Non CpG führten weder zur Freisetzung von Histamin, Leukotrien, TNF- $\alpha$  oder IL-8 noch zur mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  oder IL-8. Die Aktivierbarkeit durch TLR-Liganden konnte weder durch veränderte Stimulationszeiten, noch durch Vorkultur mit IL-4 oder IL-6 beeinflusst werden. So stehen unsere Ergebnisse im Gegensatz zu den Ergebnissen von Studien an MC anderen Ursprungs. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Aktivierung menschlicher *in vitro* generierter und muriner MC durch TLR-Liganden zur Expression unterschiedlicher Mediatoren, wie NF $\kappa$ B regulierter Zytokine und Leukotriene führte. In murinen MC konnte nach Stimulation mit Peptidoglykan, dem TLR 2 Agonisten, die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13, aber nicht IL-1 $\beta$  beobachtet werden (71,121,180). Peptidoglykan wird zur Zeit als Ligand von NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) untersucht (179). Stimulation muriner MC mit LPS von *E. coli* führte zur Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-13, aber weder zur Freisetzung von IL-4 noch zu der von IL-5 (121,123,180). Gegensätzliche Daten wurden von einer anderen Arbeitsgruppe erhoben, welche nach Stimulation muriner MC mit LPS eine Induktion der TH<sub>2</sub>-Zytokine IL-5, IL-13 und IL-10 zeigen konnte (120). Murine Haut-MC antworteten des Weiteren auf Stimulation mit poly I:C, R848, CpG-DNA, den Agonisten von TLR 3, TLR 7 und TLR 9, mit der Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-6 und Chemokinen wie RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-2 (121). Eine Induktion dieser Mediatoren durch Poly I:C, R848 und CpG-DNA konnte bei BMMC nicht beobachtet werden (91,121). In BMMC induzierte poly I:C die

Freisetzung von INF- $\alpha$  und INF- $\beta$  (91). Interferone spielen in viralen Infektionen eine zentrale Rolle. Sie werden nach Interaktion der MC mit doppelsträngiger RNA, die während der replikativen Phase verschiedener Viren synthetisiert wird, gebildet. Die Expression von INF- $\alpha$  bzw. - $\gamma$  in menschlichen Darm-MC nach Stimulation mit poly I:C wurde in der vorliegenden Dissertation nicht untersucht.

Menschliche CBMC zeigten nach Stimulation mit LPS keine Freisetzung von TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$  oder Leukotrienen (124,197). Erst nach Kultur der Zellen mit IL-4 führte die Stimulation mit LPS zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$  (197). In einer weiteren Studie führte die Kultivierung menschlicher PBMC mit INF- $\gamma$  ebenfalls zu einer Hochregulation der TLR 4 Expression und Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach LPS Stimulation (146). Ikeda et al. zeigten, dass sowohl LPS als auch Peptidoglykan in der Lage sind, Metalloproteinase 9 in murinen MC zu induzieren (71). Eine Histamin-Freisetzung wurde lediglich nach Stimulation von CBMC mit Peptidoglykan beobachtet (197). Peptidoglykan führte des Weiteren zur Freisetzung geringer Mengen an  $\beta$ -Hexosaminidase in CBMC. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (124). Zymosan, ein TLR 2 Agonist aus Hefen, bewirkte in menschlichen CBMC die Freisetzung von GM-CSF, IL-1 $\beta$  und Leukotrienen (124).

Um unser System zu überprüfen, haben wir die Stimulationsversuche an CBMC wiederholt und konnten die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen bestätigen. Stimulation mit LPS, LTA, Zymosan oder R848 führten nach IL-4 Kultivierung zu einer signifikanten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und Leukotrienen sowie zu einer Induktion der IL-8 mRNA-Expression.

Die vorgestellten Ergebnisse lassen auf eine herunterregulierte Aktivierbarkeit der MC des menschlichen Gastrointestinaltraktes im Vergleich zu anderen MC-Subtypen schließen, welche möglicherweise durch das antiinflammatorische Milieu im Gastrointestinaltrakt bedingt ist. Diese Hypothese wird untermauert durch Ergebnisse, die andere Autoren für Monozyten bzw. intestinale Makrophagen erhoben haben. Blutmonozyten exprimieren TLR1-5 auf ihrer Oberfläche und sprechen auf verschiedene TLR-Liganden an. Nach Einwanderung der Zellen in die Darmschleimhaut und Ausdifferenzierung zu intestinalen Makrophagen liegt allerdings eine Toleranz gegenüber TLR-Liganden vor (60). Diese Toleranz könnte möglicherweise durch das im Darm vorliegende antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$  induziert worden sein. Smythies et al. konnten in *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass das im Darm von Epithelzellen und MC der Lamina propria exprimierte TGF- $\beta$  die durch LPS bedingte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus intestinalen

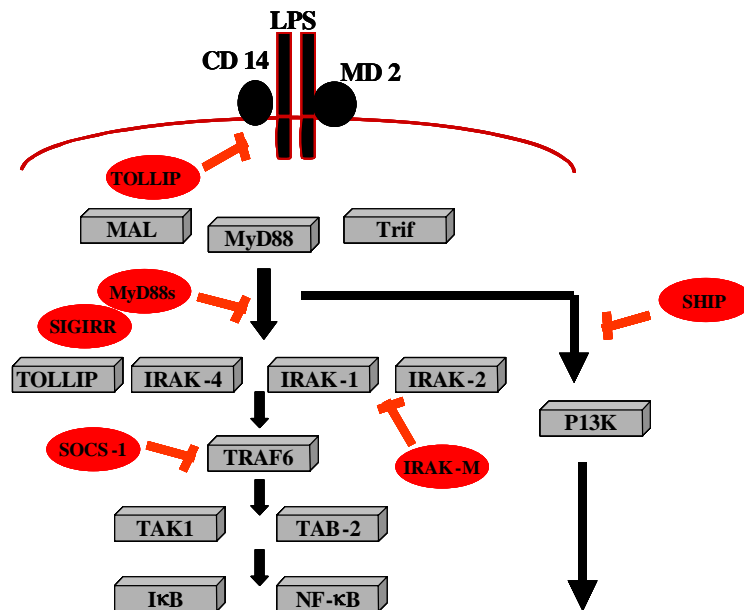
Makrophagen inhibiert. In *in vivo* Untersuchungen an TGF- $\beta$  oder SMAD3 defizienten Mäusen wurde des Weiteren eine erhöhte mRNA-Expression von TLR 4 in Leber, Lunge und Herz sowie eine Hyperaktivierbarkeit durch LPS gezeigt (122). SMAD3 ist ein Molekül des TGF- $\beta$ -Signalweges. Der Mechanismus ist allerdings bis jetzt nur teilweise geklärt. Eine mögliche Ursache konnte in Studien an SHIP-knock-out- (SH2 containing inositol 5'-phosphatase) Mäusen gezeigt werden. SHIP ist ein Inhibitor des phosphatidylinositol-3 kinase Signalweges, dessen Expression durch TGF- $\beta$  heraufreguliert wird (173,174). Makrophagen und MC, isoliert aus SHIP-knock-out-Mäusen, wiesen nach Stimulation mit LPS eine erhöhte Induktion für TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und NO auf (173,174). Die phagozytotische bzw. bakteriogene Aktivität wurde allerdings nicht beeinflusst (175). Auch bei der Hypoaktivierbarkeit menschlicher Darm-MC durch TLR-Liganden könnte TGF- $\beta$  eine Rolle spielen. In Studien unserer Arbeitsgruppe (48) konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  sowohl das Wachstum menschlicher Darm-MC als auch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel Histamin, sLT und TNF- $\alpha$  nach IgER-Kreuzvernetzung herunterreguliert. Die Produktion von Prostaglandin D2 sowie die Expression der Protease Chymase wurde allerdings gesteigert.

Ein weiteres antiinflammatorische Zytokin ist IL-10. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 ebenfalls die Induktion proinflammatorischer Zytokine in Dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS hemmt (136). Gerade im Darm trägt die Freisetzung von IL-10 maßgeblich zu dem antiinflammatorischen Milieu bei. Ein Mangel an IL-10 kann beispielsweise Entzündungen im Darm zur Folge haben, wie es in Studien an IL-10 defizienten Mäusen gezeigt werden konnte. IL-10 defiziente Mäuse entwickeln bei konventioneller Haltung eine spontan colitis-ähnliche Symptomatik. Wachsen diese Mäuse jedoch keimfrei auf, so entwickeln sie keine Entzündung (182). Interessanterweise führen aber nicht alle Bakterien zu einer Entzündung, wie in Studien an keimfreien Mäusen, die mit Monokulturen kolonisiert wurden, gezeigt werden konnte (107). Das im Darm vorliegende IL-10 könnte möglicherweise ein Grund für die Hypoaktivierbarkeit menschlicher Darm-MC gegenüber TLR-Liganden sein.

Eine Toleranz gegenüber TLR-Liganden konnte nach wiederholter Gabe von TLR Liganden beobachtet werden. Diese Erkenntnis wurde erstmalig bei Tieren gemacht, die eine letale Dosis bakterieller Endotoxine überlebten, wenn sie mit subletalen Konzentrationen vorbehandelt wurden (23). Dieser Mechanismus wird als Endotoxintoleranz bezeichnet. Sly et al. zeigten an murinen Makrophagen und MC, dass die Toleranzinduktion einer initialen LPS-Gabe von der Freisetzung von TGF- $\beta$  abhängig ist (174). LPS induziert die Freisetzung von TGF- $\beta$ , welches die Expression von SHIP erhöht und die Hyporeaktivität

verursacht (174). Eine ständige Präsenz spezifischer Bakterienkomponenten in der Zellkultur führt zu einer verminderten Ansprechbarkeit von intestinalen Epithelzellen (148). Dies drückt sich sowohl in einer verminderten Oberflächenexpression der TLR und Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle als auch in einer signifikanten Hochregulation des „Toll-interacting protein“ (Tollip) aus, welches inhibierend auf IL1 receptor-associated kinase (IRAK), ein Molekül der TLR-Signalkaskade, wirkt (98). Die Folge war eine reduzierte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (148). Interessanterweise konnte in dieser Studie eine Kreuztoleranzinduktion beobachtet werden. So führte zum Beispiel eine initiale Gabe von LPS ebenfalls zu einer Toleranz gegenüber LTA, dem Liganden des TLR 2 (148). Neben der beschriebenen Toleranzinduktion durch LPS und LTA können Peptidoglykan, Lipoproteine und Muramyl-dipeptid ebenfalls zur Endotoxintoleranz führen (40,128). In zwei Studien konnte nach Toleranzinduktion durch LPS eine erhöhte Freisetzung von IL-1 und IL-6 beobachtet werden (68,156).

Neben TLR aktivierenden Liganden wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Inhibitoren der TLR Signalwege analysiert. Ein Regulator stellt das IRAK-M dar, welches in Monocyten/Makrophagen identifiziert wurde. IRAK-M verhindert die Dissoziation von IRAK und IRAK-4 von MyD88 und die Formation des IRAK-TRAF6 Komplexes (90). Im Mausmodell konnte „single immunoglobulin IL-1-R-related protein“ (SIGIRR) eine inhibierende Wirkung der „TIR-IL-1R superfamily“ zugeschrieben werden. SIGIRR-defiziente Mäuse zeigten eine starke Aktivierbarkeit durch Stimulation mit LPS oder IL-1 (143). Weitere Inhibitoren der TLR-Kaskade sind MyD88s, SOCS-1 und TOLLIP (Toll-interacting protein) (98,143). Einige dieser Inhibitoren werden durch Rückkopplungsmechanismen der TLR-Liganden reguliert, d.h. Endotoxintoleranz könnte möglicherweise eine Folge der Hochregulation dieser Moleküle sein (148,173,174). Einige Inhibitoren der TLR-Signalkaskade sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Inhibitoren der TLR-Kaskade.** Dargestellt ist die MyD88-abhängige Signalkaskade des TLR4. Rot unterlegte Kreise stellen die Inhibitoren dar.

Für das Modell der humanen Darm-MC ergeben sich demnach zwei Möglichkeiten für die Entstehung einer Endotoxintoleranz. Zum Einen könnten die MC während der Aufarbeitung der Darmresektate und der Kulturdauer mit Bakterien bzw. Bakterienkomponenten in Kontakt gekommen sein, was möglicherweise die Toleranz induzierte. Dagegen spricht allerdings, dass mononukleare Zellen, die aus der Lamina propria des Darms nach dem selben Protokoll wie menschliche Darm-MC isoliert wurden, auf eine LPS-Stimulation mit der Freisetzung von TNF- $\alpha$  antworten (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Zum Anderen könnte die Toleranz bereits im Intestinaltrakt induziert worden sein (175). Im menschlichen Darm befinden sich etwa  $10^{14}$  Bakterien, was eine Gesamtmenge von etwa 1-2 kg des Körpergewichtes ausmacht. Schätzungen gehen davon aus, dass 400 verschiedene Arten vorkommen, von denen nur etwa 20-40% charakterisiert sind (166). Diese Bakterien stellen einen ständigen Stimulus für den Darm dar, was mittlerweile als notwendiges „Priming“ des Immunsystems angesehen wird. Die fehlende inflammatorische Reaktion unter physiologischen Bedingungen wird u.a. auf besondere immunologische Hemmmechanismen zurückgeführt. Unter pathophysiologischen Bedingungen führt dieser Stimulus zu einer inflammatorischen Reaktion, was möglicherweise auf eine gestörte Expression der Inhibitoren oder der TLR selbst zurückzuführen ist (101). In Studien an menschlichen Darmbiopsien wurde eine Hochregulation der Expression von TLR 2 und 4 in Makrophagen des entzündeten Gewebes

beobachtet (60). Diese Studie wurde an Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Einige Autoren erklären diese Befunde allerdings mit der Infiltration von Monozyten aus dem Blut in das entzündete Gewebe, da Monozyten im Vergleich zu ausdifferenzierten Makrophagen eine höhere TLR-Expression aufweisen (157,159). Möglich wäre ebenfalls, dass im Rahmen der Entzündung und des Verlustes der epithelialen Barriere die Zellen mit einer Vielzahl an Bakterien in Kontakt kommen, wodurch die TLR Expression induziert wird. Interessanterweise wurden die TLR 2 und TLR 4 positiven Makrophagen vor allem in unmittelbarer Nähe der Epithelschicht gefunden. Epithelzellen aus entzündetem Gewebe von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wiesen unterschiedliche Ergebnisse auf. TLR 3 war in Epithelzellen von Patienten mit Morbus Crohn stark exprimiert, bei Patienten mit Colitis ulcerosa allerdings nur sehr schwach nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war die TLR 4 Expression bei beiden Krankheitsbildern stark hochreguliert. Unverändert war die TLR 2 und 5 Expression bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden (25). Es ist nicht bekannt, ob die Entzündung zu einer veränderten Expression der TLR führt und dadurch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen verstärkt werden oder ob die veränderte TLR-Expression möglicherweise die Entzündung auslöst. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von TLR 2 zu einer erhöhten Integrität der Darmbarriere führt (24). Möglicherweise liegen Gendefekte, ähnlich wie bei NOD2, auch bei TLR von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vor. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor, der bakterielle Produkte wie Peptidoglykane erkennt. Bei bestimmten Mutationen eines Gens für NOD2 (CARD15) liegt ein 20-40faches Risiko vor an CED zu erkranken (20).

Das Darmimmunsystem steht allerdings nicht nur im Kontakt mit bakteriellen Antigenen, sondern auch mit einer Vielzahl von Antigenen aus der Nahrung. Unter physiologischen Bedingungen führen diese Antigene nicht zu einer Entzündung im Darm. Bei Nahrungsmittelallergien kann es allerdings nach Aufnahme bestimmter Antigene zu starker Flatulenz, Diarrhöen, Regurgitation oder Obstipation kommen. Die Mechanismen dieser allergischen Erkrankung, die in den letzten Jahren immer mehr zugenommen hat, sind bisher noch nicht geklärt, aber ein Zusammenhang mit viralen und bakteriellen Infektionen, bzw. Veränderungen wird immer häufiger diskutiert. Beispielsweise ist aufgefallen, dass Patienten mit atopischer Dermatitis häufig eine Infektion mit *S. aureus* aufwiesen (1,118). Ein weiteres Beispiel ist, dass durch die Gabe probiotischer Bakterien die Prävalenz an einer Allergie zu erkranken, gesenkt werden kann (81,82). Wie Bakterien die Entzündung im Rahmen einer allergischen Reaktion triggern ist jedoch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Aktivierung von TLR 4 bzw. TLR 2 und IgER von MC zu einer gesteigerten Produktion von IL-5, IL-10 und IL-13 führt. Die IgER-vermittelte Degranulation wird durch

TLR-Liganden allerdings nicht verstärkt (120,153). Die kombinierte Stimulation menschlicher Darm-MC durch IgER-Kreuzvernetzung mittels mAk 22E7 und TLR-Liganden wird zur Zeit von unserer Arbeitsgruppe untersucht.

MC sind langlebige Zellen, die das Mikromilieu im Darm beeinflussen. Es ist daher von großem Interesse die Mechanismen, die zur Freisetzung von Mediatoren aus MC führen, zu untersuchen, um gegebenenfalls pathophysiologische Prozesse besser verstehen zu können.

## 4.2 Regulation menschlicher Darmmastzellen durch Bakterien

Mit Hilfe MC-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass MC eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung akuter bakterieller Infektionen spielen. In einem infektiösen Peritonitis Modell in MC-defizienten Mäusen wiesen diese nach Infektion mit *E. coli* eine deutlich höhere Letalität im Vergleich zu Wildtypieren auf. Es wurde beobachtet, dass die antibakterielle Funktion von MC ganz wesentlich auf deren Produktion von TNF- $\alpha$  und Leukotrienen zurückzuführen ist, welche vor allem die Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das infizierte Gewebe bewirken (108,111). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass das durch MC freigesetzte TNF- $\alpha$  zur Infiltration von T-Lymphozyten in Lymphknoten führt (126). BMMC sind in der Lage Bakterien sowohl über einen Opsonin abhängigen als auch über einen Opsonin unabhängigen Weg zu phagozytieren. Internalisierte Bakterien werden getötet und T-Zellen über einen MHC I oder MHC II Weg präsentiert (114). Diese und weitere Ergebnisse weisen darauf hin, dass MC eine Verknüpfung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem darstellen. MC sind in der Lage Bakterien über verschiedene Wege zu erkennen. Eine Rezeptor-Gruppe, über die Bakterien erkannt werden, stellen die TLR dar. Aber auch Oberflächen-Moleküle wie CD 48, ein Rezeptor, der Typ 1 Fimbrienproteine erkennt, spielen bei der Abwehr bakterieller Infektionen eine große Rolle. Einige Bakterien dringen aktiv in Zellen ein und aktivieren diese beispielsweise über die intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2. Girardin et al. zeigten, dass invasive Shigellen in das Zytoplasma von Epithelzellen eindringen und über NOD1, welches LPS erkennt, zur Aktivierung führen (51).

Inwieweit diese Befunde auf menschliche Darm-MC übertragbar sind bzw. durch welche Mechanismen MC durch Bakterien aktiviert werden, wurde im weiteren Teil der vorliegenden Studie untersucht. Infektionen menschlicher Darm-MC mit dem humanen Stuhlisolat *E. coli* (O101:H-) oder dem probiotischen Stamm *E. coli* Nissle 1917 führten weder zur Freisetzung von Histamin, Leukotrienen, TNF- $\alpha$ , IL-5 oder IL-8 noch zur mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8. Selbst die pathogenen Bakterien-Stämme, wie der invasive *S. flexneri* M90T und der FimH-exprimierende *E. coli* ORN 103(pSH2) führten nicht zu einer signifikanten Aktivierung menschlicher Darm-MC.

FimH, eine Manose bindende Untereinheit der Typ 1 Fimbrien, induziert die Adhäsion der Bakterien an die Zellwand (110). Durch die Bindung an den FimH-Rezeptor CD 48 können Bakterien phagozytiert werden. Diese Phagozytose verläuft Opsonin unabhängig und endet nicht durch eine Fusionierung der Vakuole mit einem Lysosom, weshalb ein längeres Überleben der Bakterien in der Zelle beobachtet werden konnte (108,109,113). Nach der Phagozytose kommt es möglicherweise zur Aktivierung intraphagosomaler Reize,



was eine mögliche Erklärung für die Freisetzung von Entzündungsmediatoren nach Infektion mit FimH-exprimierenden Bakterien ist. Es konnte gezeigt werden, dass murine MC, die MC-Linie HMC1 und CBMC auf FimH exprimierende *E. coli* ansprechen, diese phagozytieren und als Antwort Leukotriene bzw. TNF- $\alpha$  freisetzen (108,110,113). Diese Ergebnisse konnten an menschlichen Darm-MC allerdings nicht bestätigt werden. Obwohl menschliche Darm-MC mRNA für CD 48, dem FimH Rezeptor, exprimieren, sind Darm-MC nicht in der Lage, FimH exprimierende *E. coli* zu phagozytieren. Die Analyse intrazellulärer Bakterien erfolgte mittels „gentamycin protection assay“. Dieser „Assay“ beruht auf der Abtötung extrazellulärer Bakterien durch Gentamycin und Auszählung der intrazellulären Bakterien nach Lyse der infizierten Zellen. Eine Stunde nach Infektion konnte lediglich der invasive *S. Flexneri* M90T intrazellulär nachgewiesen werden. Intrazelluläre FimH exprimierende Bakterien wurden nicht beobachtet.

Shigella Stämme sind in der Lage in die Darm-Mucosa einzudringen und dort eine akute und destruktive Entzündung hervorzurufen. Die invasiven Shigella-Stämme sezernieren bei Zellkontakt so genannte Invasine in das Zytoplasma, wodurch die Bakterien durch Pinozytose in die Zelle aufgenommen werden. Im Zytoplasma lysiert das Bakterium die umgebende, von der Wirtszelle gebildete Vakuolenschicht und besiedelt das Wirtszell-Zytoplasma (190). Der Einfluss der MC auf die Pathogenese von Shigellen Infektionen wurde anhand einer Reihe histologischer Studien aufgezeigt. Des Weiteren konnten während einer akuten Infektion mit *Shigella dysenteriae* Leukotriene im Stuhl gemessen werden, welche möglicherweise im Rahmen der Infektion von MC gebildet wurden (31,154). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass *S. flexneri* Degranulation von menschlichen Neutrophilen und Zytokin-Freisetzung von Epithelzellen, Monozyten und Dendritischen Zellen induziert (37,59,150,155). Makrophagen und Dendritische Zellen zeigten bereits nach einer kurzen Infektionsdauer und geringen Infektionsdosis des invasiven *S. flexneri* M90T eine starke Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und verminderte Überlebensdauer (37,59). Die Infektion menschlicher Darm-MC mit dem invasiven *S. flexneri* M90T führte zwar nicht zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, aber Zelltod konnte ebenfalls beobachtet werden. Nach 6 Stunden zeigte sich eine MC-Wiederfindung von lediglich 65%, was mit Hilfe der Trypan Blau Färbung analysiert wurde. Die nicht-invasive isogene Mutante *S. flexneri* BS176 induzierte dagegen keinen Zelltod. Neben Zelltod und Zytokininduktion konnte in Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen Apoptose beobachtet werden, welche Caspase 1-abhängig war (37,59,161). Epithelzellen und Neutrophile Granulozyten zeigten keine Aktivierbarkeit apoptotischer Signalwege durch *S. flexneri* (115,161), ähnlich wie die in dieser Studie verwendeten menschlichen Darm-MC. Apoptose wurde bei menschlichen Darm-MC durch die Messung der Caspase 3/7 Aktivität analysiert.

Interessanterweise induzierten die beiden hämolytischen *E. coli* Stämme ATCC 25922 und 35218 mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-5, IL-6 und IL-8 und bewirkten die Freisetzung von TNF- $\alpha$ - und IL-8-Protein, Leukotrienen und Histamin. Induktion der Transkription sowie die Freisetzung von Histamin und Leukotrienen konnte bereits 90 min nach Infektion beobachtet werden. Anhaltende Infektionen der MC mit *E. coli* ATCC 25922 und 35218 induzierten Zellnekrose, welche 3 Std nach Infektion auftrat. Diese zeitversetzte Aktivierung menschlicher Darm-MC deutet auf eine 2-Phasen Aktivierung durch diese Bakterien hin. In der ersten Phase kommt es zur Expression von Mediatoren, in der zweiten Phase zum Zelltod. Eine Aktivierung von Caspase 3/7 konnte nicht gemessen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung menschlicher Darm-MC durch *E. coli* ATCC 25922 und 35218 abhängig von der Hämolysin-Freisetzung dieser Bakterien ist. Das 96 kDa große Protein „*E. coli* alpha Hämolysin“ gehört zur Familie der RTX-Toxine (repeats in toxin), welche sich durch eine ständige Wiederholung von Nonapeptiden auszeichnen. Das Hämolysin Operon besteht aus den vier Genen HlyC, HlyA, HlyB und HlyD, welche in dieser Reihenfolge im Operon vorliegen. Das Gen HlyA kodiert das inaktive Prohämolysin, welches einer posttranslationalen Modifikation bedarf. Die Information für die posttranslationale Modifikation ist auf dem Gen HlyB kodiert. Die Genprodukte der Gene HlyC und HlyD sind für die Ausschleusung des Proteins notwendig. Aufgrund der porenformenden Eigenschaft wirkt es auf eine Reihe von Zellen toxisch und war lange Zeit als Virulenzfaktor mit zytolytischen Eigenschaften bekannt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass sublytische Hämolysinkonzentrationen proinflammatorische Mediatoren induzieren können. Hämolysin induziert beispielsweise die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Lipidmediatoren oder NO aus humanen Neutrophilen, Basophilen, Alveolarmakrophagen und Endothelzellen (54,55,158,162). Monozyten setzen nach Infektion mit hämolytischen *E. coli* Stämmen IL-1 $\beta$  frei (12). Ratten-MC antworteten auf eine Infektion mit hämolytischen *E. coli* Stämmen mit einer Freisetzung von Histamin (162).

Um unsere Hypothese zu belegen, wurde der nicht hämolytische Stamm *E. coli* Nissle 1917 mit dem Plasmid pSF4000 transformiert, welches das Hämolysin Operon kodiert. Des Weiteren wurden isogene Hämolysin-Mutanten der beiden hämolytischen *E. coli* Stämme erstellt, indem ein Stück aus dem Gen HlyA herausgeschnitten und das Protein dadurch inaktiviert wurde.

Infektion mit dem nach Transformation hämolytischen *E. coli* Nissle 1917 zeigte eine vergleichbare Aktivierung der MC, wie nach Infektion mit den Wildtyp-Stämmen *E. coli* ATCC 25922 und 35218. *E. coli* Nissle (pSF400) führte zur mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8 und bewirkte die Freisetzung von TNF- $\alpha$ - und IL-8-Protein, Leukotrienen und Histamin.

Auch die Analysen mit den isogenen Hämolysin-Mutanten bestätigten unsere Hypothese. Die isogenen Mutanten verhielten sich wie der nicht hämolytische *E. coli* Nissle 1917 oder das Stuhlisolat *E. coli* 101:H-.

In Epithelzellen der Harnwege zeigte die Messung des intrazellulären Kalziums sowohl bei Menschen als auch bei Ratten, dass sublytische Konzentrationen des *E. coli* Hämolysins zu einer geringen Kalzium-Oszillation führen (192). Der zytosolische Kalziumanstieg beruhte zum Einen auf einer Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern unter Kontrolle des Inositoltriphosphats (IP<sub>3</sub>), zum Anderen erfolgte der Kalziumeinstrom durch spannungsgesteuerte L-Typ-Kalzium-Kanäle (192). Hinweise darauf lieferten der Einsatz von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), einem Antagonisten des Inositoltriphosphatrezeptors (IP<sub>3</sub>R), und Nifedipin, einem Inhibitor spannungsgesteuerter L-Typ-Kalziumkanäle. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Hämolysin nicht die Plasmamembran permeabilisiert, sondern mit dieser interagiert und sowohl die Öffnung der L-Typ-Kalziumkanäle, welche den Einstrom extrazellulären Kalziums in das Zytosol ermöglichen, als auch die Aktivierung von IP<sub>3</sub>R, welche am endoplasmatischen Retikulum (ER) sitzen und den Kalziumeinstrom aus dem ER in das Zytoplasma initiieren, bewirkt. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Versuche mit einer nicht azylierten Form des Hämolysins. Dieses veränderte Molekül ist nicht in der Lage, mit der Zellmembran zu interagieren. Der Überstand von Bakterien, die dieses veränderte Hämolysin-Molekül exprimieren, führte interessanterweise nicht zu einer Kalzium-Oszillation in Epithelzellen (192). Um auszuschließen, dass *E. coli* LPS ein Cofaktor ist, wurden die Versuche mit Polymyxin B, welches LPS neutralisiert, wiederholt. Der Einsatz von Polymyxin B hatte allerdings keinen Einfluss auf die Kalziumoszillation, wodurch ein möglicher Einfluss des LPS widerlegt wurde. Die in dieser zitierten Studie gezeigte Kalzium-Oszillation führte zur Freisetzung von IL-6 und IL-8 in menschlichen Epithelzellen der Harnwege (192). In einer anderen Studie konnten Antikörper gegen CD11b und CD18 die Zellyse durch Hämolysin verhindern. CD11b und CD18 sind Untereinheiten des LFA-1 (lymphocyte-function-associated-antigen 1), einem  $\beta_2$ -Integrin, welches auch auf MC exprimiert wird (94,103,132).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Kulturüberstand des hämolytischen *E. coli* ATCC 25922, aber nicht der isogenen Hämolysin-negativen Mutante, einen langsamen intrazellulären Kalziumanstieg in menschlichen Darm-MC hervorruft. IgER-Kreuzvernetzung führte im Gegensatz dazu zu einem sehr schnellen Anstieg des intrazellulären Kalziums. Kalzium-Oszillation konnte mit dieser Methode nicht gezeigt werden. Allerdings konnten wir durch Inhibitionsstudien mit Nifedipin zeigen, dass L-Typ-Kalzium-Kanäle involviert sind. Inhibition der L-Typ-Kalzium-Kanäle durch Nifedipin führte zu

einem verminderten zytosolischen Kalziumstrom und einer starken Herabregulation der mRNA-Expression für TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8 und Freisetzung von Leukotrienen. Die Rolle von L-Typ-Kalzium-Kanälen in nicht erregbaren Zellen bleibt kontrovers, obwohl Studien deren Anwesenheit in MC belegen (22,127). Des Weiteren konnten wir Ergebnisse von Chand et al. bestätigen, dass Nifedipin die durch IgER-Kreuzvernetzung bedingte Histamin-Freisetzung inhibiert (Ergebnisse nicht gezeigt) (28). Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle dieser Kalzium-Kanäle in MC zu verstehen.

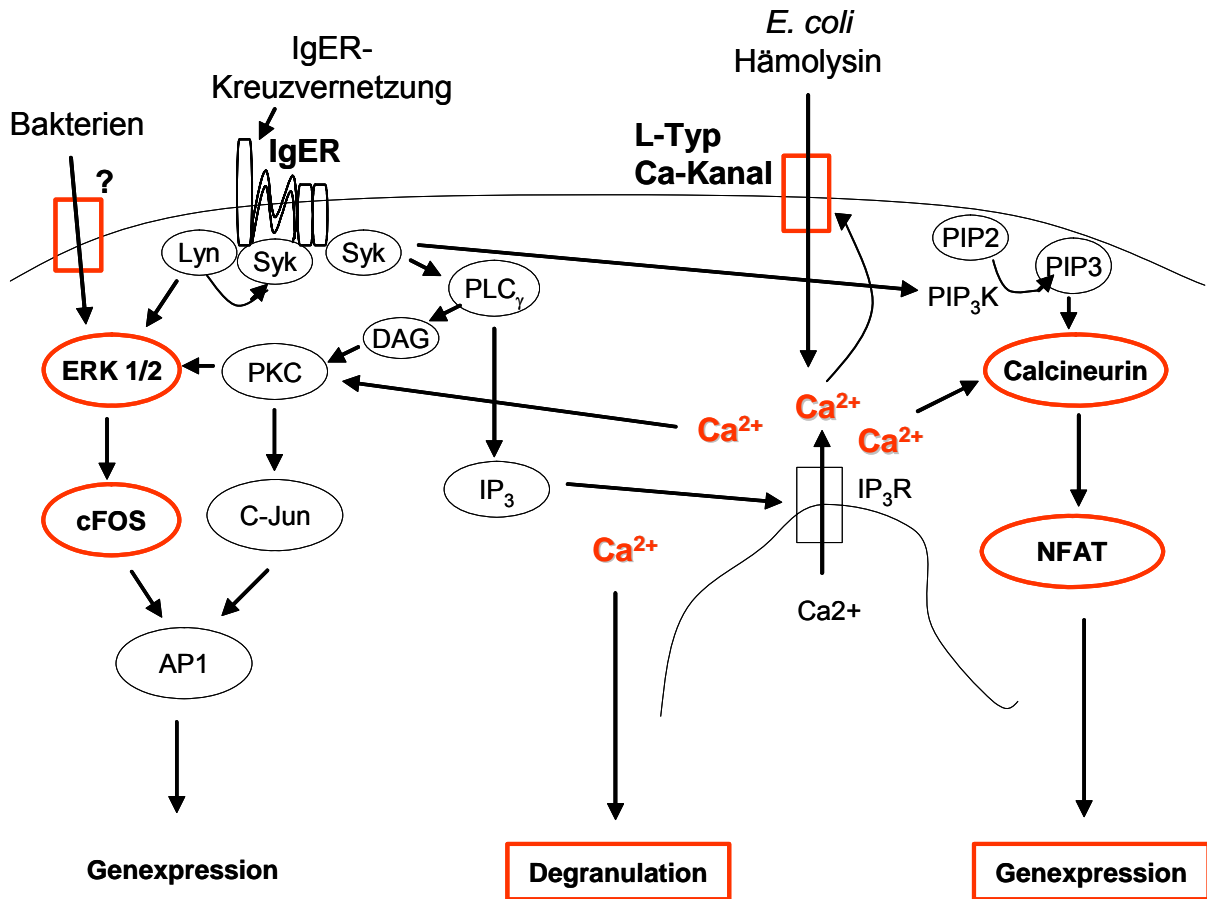
Im weiteren Teil der vorliegenden Dissertation wurden mögliche Signalwege untersucht, um den Mechanismus der Hämolyysin bedingten Aktivierung in menschlichen Darm-MC besser verstehen zu können. Durch den Anstieg des intrazellulären Kalziums kann es beispielsweise zu einer Aktivierung von Calcineurin oder der Protein Kinase C (PKC) kommen. Der Einsatz von Cyclosporin A, einem Inhibitor der Kalzium abhängigen Phosphatase Calcineurin, führte zu einer starken Reduktion der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8 nach Infektion mit dem hämolytischen *E. coli* Stamm ATCC 25922. Diese Ergebnisse zeigen, dass Calcineurin bei der Aktivierung menschlicher Darm-MC durch *E. coli* Hämolyysin involviert ist. Calcineurin befindet sich im Cytosol und dephosphoryliert bei einem intrazellulären Kalzium-Anstieg den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, welcher in den Zellkern wandert und die Transkription aktiviert. Gö 6976, ein Inhibitor der PKC, inhibierte zwar fast vollständig die Effekte nach Stimulation mit mAk 22E7, aber nur zu einem geringeren Teil (50%) die Antwort der MC auf Hämolyysin. Die Kalzium abhängige PKC scheint bei der MC-Aktivierung durch *E. coli* Hämolyysin keine große Rolle zu spielen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung durch mAk 22E7 bzw. *E. coli* Hämolyysin auf unterschiedlichen Signalwegen beruht. Die unterschiedlichen Signalwege werden auch beim Einsatz eines weiteren Inhibitors deutlich. Wortmannin, ein Inhibitor der Phosphatidylinositol 3-Kinase, führte bei der Aktivierung durch *E. coli* ATCC 25922 im Gegensatz zu der Aktivierung durch IgER-Kreuzvernetzung nicht zu einer verminderten Expression von TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MC-Aktivierung durch Hämolyysin von der Aktivierung der MAP (Mitogen-activated protein) -Kinase abhängt. Inhibition der MAP-Kinasen durch Apigenin führte zu einer 80%igen Reduktion der mRNA von TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-5 und sLT-Freisetzung. Bemerkenswerterweise induzierte nicht nur der hämolytische *E. coli* ATCC 25922, sondern ebenfalls die nicht-hämolytische isogene Mutante (*E. coli* ATCC 25922  $\Delta$  Hly) die MAP-Kinasen ERK1/2. Nach der Erkenntnis, dass es zu einer Aktivierung von ERK1/2 kommt, wurde die Expression von c-Fos, dem downstream target von ERK1/2, analysiert. Die Komponente c-Fos des Transkriptionsfaktors Activator Protein-1 (AP-1) wird

durch eine gesteigerte Transkription reguliert. Sowohl der hämolytische *E. coli* ATCC 25922 als auch die nicht-hämolytische isogene Mutante (*E. coli* ATCC 25922  $\Delta$  Hly) führte zur Expression von c-Fos. Die Höhe der Aktivierung war durch die Aktivierung der nicht-hämolytischen isogenen Mutante allerdings geringer. Die Ergebnisse wurden untermauert durch Versuche mit Curcumin, einem Inhibitor der NF- $\kappa$ B und AP-1 (Activator protein) abhängigen Signalwege. Curcumin führte zu einer kompletten Blockade der durch den hämolytischen *E. coli* ATCC 25922 oder mAk 22E7 induzierten mRNA-Expression und sLT-Freisetzung. Es hat den Anschein, dass menschliche Darm-MC *E. coli* Stämme erkennen und die MAP-Kinase abhängige Signaltransduktion aktiviert wird, dies jedoch nicht für eine vollständige Antwort ausreicht. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die eingesetzten Inhibitoren lediglich Hinweise auf einen möglichen Mechanismus liefern. Gerade Apigenin und Curcumin sind keine spezifischen Inhibitoren. Sie weisen vielmehr vielseitige pharmakologische Effekte auf.

In Abbildung 20 sind mögliche Signalwege, die bei der Aktivierung menschlicher Darm-MC durch *E. coli* alpha Hämolysin eine Rolle spielen, zusammengefasst.



**Abbildung 20: Mögliche Signalwege bei der durch *E. coli* Hämolyysin bedingten Aktivierung menschlicher Darm-MC.** *E. coli* alpha Hämolyysin interagiert mit der Plasmamembran und aktiviert den L-Typ-Kalzium-Kanal und den IP $_3$ -Rezeptor. Kalzium führt zur Aktivierung des Calcineurin, welches NFAT phosphoryliert und zur Expression von TNF- $\alpha$ , IL-5 und IL-8 führt. Die MAP-Kinasen ERK 1/2 und der Transkriptionsfaktor c-Fos wird durch hämolytische und nicht hämolytische Bakterien aktiviert. Diese Aktivierung führt allerdings nicht zur Genexpression. Die rot markierten Signalmoleküle sind bei der Aktivierung menschlicher Darm-MC durch *E. coli* alpha Hämolyysin involviert.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Abeck D, Mempel M. Staphylococcus aureus colonization in atopic dermatitis and its therapeutic implications. *Br J Dermatol* 139 Suppl 53: 13-6, 1998.
2. Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198: 1035-42, 2003.
3. Akdis CA, Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 112: 15-22, 2003.
4. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511, 2004.
5. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-8, 2001.
6. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285: 736-9, 1999.
7. Alizadeh H, Wakelin D. Genetic factors controlling the intestinal mast cell response in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Clin Exp Immunol* 49: 331-7, 1982.
8. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 1: 113-8, 2000.
9. Bannert N, Farzan M, Friend DS, Ochi H, Price KS, Sodroski J, Boyce JA. Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *J Virol* 75: 10808-14, 2001.
10. Baorto DM, Gao Z, Malaviya R, Dustin ML, van der MA, Lublin DM, Abraham SN. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* 389: 636-9, 1997.
11. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300: 1524-5, 2003.
12. Bhakdi S, Muhly M, Korom S, Schmidt G. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* 85: 1746-53, 1990.
13. Bienenstock J, MacQueen G, Sestini P, Marshall JS, Stead RH, Perdue MH. Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis* 143: S55-S58, 1991.
14. Birchler T, Seibl R, Buchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, Aguzzi A, Lauener RP. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 31: 3131-7, 2001.
15. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns MP. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 44: 643-52, 1999.

16. Bischoff SC, Sellge G, Lorentz A, Sebald W, Raab R, Manns MP. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8080-5, 1999.
17. Bischoff SC, Sellge G, Schwengberg S, Lorentz A, Manns MP. Stem cell factor-dependent survival, proliferation and enhanced releasability of purified mature mast cells isolated from human intestinal tissue. *Int Arch Allergy Immunol* 118: 104-7, 1999.
18. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, Maschek H, Stolte M, Gebel M, Manns MP. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 28: 1-13, 1996.
19. Bochner BS, Schleimer RP. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev* 179: 5-15, 2001.
20. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124: 521-36, 2003.
21. Borish L, Rosenwasser LJ. Update on cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 97: 719-33, 1996.
22. Bradding P, Okayama Y, Howarth PH, Church MK, Holgate ST. Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol* 155: 297-307, 1995.
23. Brooke MS. Conversion of immunological paralysis to immunity by endotoxin. *Nature* 206: 635-6, 1965.
24. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127: 224-38, 2004.
25. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68: 7010-7, 2000.
26. Cavalieri SJ, Bohach GA, Snyder IS. Escherichia coli alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev* 48: 326-43, 1984.
27. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. *Nature* 335: 88-9, 1988.
28. Chand N, Diamantis W, Pillar J, Sofia RD. Inhibition of allergic and non-allergic histamine secretion from rat peritoneal mast cells by calcium antagonists. *Br J Pharmacol* 83: 899-902, 1984.
29. Church MK, Clough GF. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 83: 471-5, 1999.
30. Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, Donovan PJ, Jenkins NA, Cosman D, Anderson D, Lyman SD, Williams DE. Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 63: 175-83, 1990.
31. Cruz JR, Cano F, Razin E, Acheson DW, Keusch GT. Fecal excretion of leukotriene C4 during human disease due to *Shigella dysenteriae*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20: 179-83, 1995.



32. Cumberbatch M, Dearman RJ, Griffiths CE, Kimber I. Langerhans cell migration. *Clin Exp Dermatol* 25: 413-8, 2000.
33. Daeron M, Sterk AR, Hirata F, Ishizaka T. Biochemical analysis of glucocorticoid-induced inhibition of IgE-mediated histamine release from mouse mast cells. *J Immunol* 129: 1212-8, 1982.
34. DeSilva DR, Jones EA, Favata MF, Jaffee BD, Magolda RL, Trzaskos JM, Scherle PA. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J Immunol* 160: 4175-81, 1998.
35. Eaves-Pyles TD, Wong HR, Odoms K, Pyles RB. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol* 167: 7009-16, 2001.
36. Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381: 75-7, 1996.
37. Edgeworth JD, Spencer J, Phalipon A, Griffin GE, Sansonetti PJ. Cytotoxicity and interleukin-1beta processing following *Shigella flexneri* infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 32: 1464-71, 2002.
38. Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 66: 303-12, 1966.
39. Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol* 23: 151-8, 2002.
40. Ferreira ME, Coelho MM, Pela IR. Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R162-R169, 2001.
41. Finkelman FD, Urban JF, Jr. The other side of the coin: the protective role of the TH2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 107: 772-80, 2001.
42. Frandji P, Tkaczyk C, Oskeritzian C, David B, Desaymard C, Mecheri S. Exogenous and endogenous antigens are differentially presented by mast cells to CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26: 2517-28, 1996.
43. Frey J, Meier R, Gygi D, Nicolet J. Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* 59: 3026-32, 1991.
44. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 328: 257-65, 1993.
45. Galli SJ, Gordon JR, Wershil BK. Mast cell cytokines in allergy and inflammation. *Agents Actions Suppl* 43: 209-20, 1993.
46. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6: 135-42, 2005.
47. Gebhardt T, Gerhard R, Bedoui S, Erpenbeck VJ, Hoffmann MW, Manns MP, Bischoff SC. beta2-Adrenoceptor-mediated suppression of human intestinal mast cell functions is caused by disruption of filamentous actin dynamics. *Eur J Immunol* 35: 1124-32, 2005.

48. Gebhardt T, Lorentz A, Detmer F, Trautwein C, Bektas H, Manns MP, Bischoff SC. Growth, phenotype, and function of human intestinal mast cells are tightly regulated by transforming growth factor beta1. *Gut* 54: 928-34, 2005.
49. Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Kollinger M, Scholmerich J, Falk W. Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 45: 210-7, 1999.
50. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 167: 1882-5, 2001.
51. Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep* 2: 736-42, 2001.
52. Gomez-Gomez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* 5: 1003-11, 2000.
53. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346: 274-6, 1990.
54. Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Potzsch B, Spriestersbach R, Bhakdi S, Suttorp N, Seeger W. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. *J Immunol* 159: 1909-16, 1997.
55. Grimminger F, Scholz C, Bhakdi S, Seeger W. Subhemolytic doses of *Escherichia coli* hemolysin evoke large quantities of lipoxigenase products in human neutrophils. *J Biol Chem* 266: 14262-9, 1991.
56. Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 4: 121-30, 2003.
57. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 192: 595-600, 2000.
58. Hacker J. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can J Microbiol* 38: 720-7, 1992.
59. Hathaway LJ, Griffin GE, Sansonetti PJ, Edgeworth JD. Human monocytes kill *Shigella flexneri* but then die by apoptosis associated with suppression of proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* 70: 3833-42, 2002.
60. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122: 1987-2000, 2002.
61. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol* 75: 10730-7, 2001.
62. Hedengren M, Asling B, Dushay MS, Ando I, Ekengren S, Wihlborg M, Hultmark D. Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol Cell* 4: 827-37, 1999.

63. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3: 196-200, 2002.
64. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-5, 2000.
65. Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10: 1-10, 2001.
66. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-67, 1990.
67. Higuchi M, Yanai K, Okamura N, Meguro K, Arai H, Itoh M, Iwata R, Ido T, Watanabe T, Sasaki H. Histamine H(1) receptors in patients with Alzheimer's disease assessed by positron emission tomography. *Neuroscience* 99: 721-9, 2000.
68. Hirohashi N, Morrison DC. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infect Immun* 64: 1011-5, 1996.
69. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420: 329-33, 2002.
70. Huang Q, Liu D, Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, Hacohen N. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294: 870-5, 2001.
71. Ikeda T, Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol Lett* 88: 21-6, 2003.
72. Irani AM, Craig SS, DeBlois G, Elson CO, Schechter NM, Schwartz LB. Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* 138: 4381-6, 1987.
73. Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T, Zsebo KM, Schwartz LB. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* 80: 3009-21, 1992.
74. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5: 987-95, 2004.
75. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 31: 3388-93, 2001.
76. Johnson M. Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol* 110: S282-S290, 2002.
77. Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol* 14: 735-40, 2002.

78. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413: 420-5, 2001.
79. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194: 863-9, 2001.
80. Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol* 14: 695-700, 2002.
81. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076-9, 2001.
82. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869-71, 2003.
83. Kimman TG, Terpstra GK, Daha MR, Westenbrink F. Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: evidence for the involvement of complement and mast cell mediators. *Am J Vet Res* 50: 694-700, 1989.
84. King CA, Anderson R, Marshall JS. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. *J Virol* 76: 8408-19, 2002.
85. King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol* 74: 7146-50, 2000.
86. Kinoshita T, Sawai N, Hidaka E, Yamashita T, Koike K. Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells. *Blood* 94: 496-508, 1999.
87. Kirshenbaum AS, Goff JP, Semere T, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD. Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13). *Blood* 94: 2333-42, 1999.
88. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146: 1410-5, 1991.
89. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med* 192: 1849-56, 2000.
90. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110: 191-202, 2002.
91. Kulka M, Alexopoulou L, Flavell RA, Metcalfe DD. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol* 114: 174-82, 2004.
92. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1: 398-401, 2000.

93. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* 7: 356-61, 1999.
94. Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK, Billings PC. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* 272: 30463-9, 1997.
95. Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14: 96-102, 2002.
96. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-83, 1996.
97. Levi-Schaffer F, Austen KF, Caulfield JP, Hein A, Gravalles PM, Stevens RL. Co-culture of human lung-derived mast cells with mouse 3T3 fibroblasts: morphology and IgE-mediated release of histamine, prostaglandin D<sub>2</sub>, and leukotrienes. *J Immunol* 139: 494-500, 1987.
98. Li X, Commane M, Jiang Z, Stark GR. IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4461-5, 2001.
99. Li Y, Li L, Wadley R, Reddel SW, Qi JC, Archis C, Collins A, Clark E, Cooley M, Kouts S, Naif HM, Alali M, Cunningham A, Wong GW, Stevens RL, Krilis SA. Mast cells/basophils in the peripheral blood of allergic individuals who are HIV-1 susceptible due to their surface expression of CD4 and the chemokine receptors CCR3, CCR5, and CXCR4. *Blood* 97: 3484-90, 2001.
100. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 274: 33419-25, 1999.
101. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5: 446-58, 2005.
102. Lorentz A, Klopp I, Gebhardt T, Manns MP, Bischoff SC. Role of activator protein 1, nuclear factor-kappaB, and nuclear factor of activated T cells in IgE receptor-mediated cytokine expression in mature human mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 111: 1062-8, 2003.
103. Lorentz A, Schuppan D, Gebert A, Manns MP, Bischoff SC. Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *Blood* 99: 966-72, 2002.
104. Lorentz A, Schuppan D, Gebert A, Manns MP, Bischoff SC. Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *Blood* 99: 966-72, 2002.
105. Lorentz A, Wilke M, Sellge G, Worthmann H, Klempnauer J, Manns MP, Bischoff SC. IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos. *J Immunol* 174: 6751-6, 2005.
106. Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli. *J Allergy Clin Immunol* 81: 590-7, 1988.

107. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 116: 1107-14, 1999.
108. Malaviya R, Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 67: 841-6, 2000.
109. Malaviya R, Abraham SN. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol Rev* 179: 16-24, 2001.
110. Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe PA, Abraham SN. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8110-5, 1999.
111. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381: 77-80, 1996.
112. Malaviya R, Ross E, Jakschik BA, Abraham SN. Mast-Cell Degranulation Induced by Type-1 Fimbriated *Escherichia-Coli* in Mice. *Journal of Clinical Investigation* 93: 1645-53, 1994.
113. Malaviya R, Ross EA, MacGregor JI, Ikeda T, Little JR, Jakschik BA, Abraham SN. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* 152: 1907-14, 1994.
114. Malaviya R, Twesten NJ, Ross EA, Abraham SN, Pfeifer JD. Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells. *J Immunol* 156: 1490-6, 1996.
115. Mandic-Mulec I, Weiss J, Zychlinsky A. *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. *Infect Immun* 65: 110-5, 1997.
116. Marone G, Crescenzo Gd, Patella V, Granata F, Verga L, Arbustini E, Genovese A. Human heart mast cells: immunological characterization in situ and in vivo. In: Marone G, Lichtenstein LM, Galli S.J., eds. *Mast cells and basophils*. Academic Press, 2000.
117. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol* 4: 787-99, 2004.
118. Masenga J, Garbe C, Wagner J, Orfanos CE. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis and in nonatopic dermatitis. *Int J Dermatol* 29: 579-82, 1990.
119. Masini E, Bechi P, Dei R, Di Bello MG, Sacchi TB. *Helicobacter pylori* potentiates histamine release from rat serosal mast cells induced by bile acids. *Dig Dis Sci* 39: 1493-500, 1994.
120. Masuda A, Yoshikai Y, Aiba K, Matsuguchi T. Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol* 169: 3801-10, 2002.
121. Matsushima H, Yamada N, Matsue H, Shimada S. 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: 531-41, 2004.
122. McCartney-Francis N, Jin W, Wahl SM. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway. *J Immunol* 172: 3814-21, 2004.

123. McCurdy JD, Lin TJ, Marshall JS. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 70: 977-84, 2001.
124. McCurdy JD, Olynych TJ, Maher LH, Marshall JS. Cutting edge: distinct Toll-like receptor 2 activators selectively induce different classes of mediator production from human mast cells. *J Immunol* 170: 1625-9, 2003.
125. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecnis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7761-6, 2003.
126. McLachlan JB, Hart JP, Pizzo SV, Shelburne CP, Staats HF, Gunn MD, Abraham SN. Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. *Nat Immunol* 4: 1199-205, 2003.
127. McRory JE, Hamid J, Doering CJ, Garcia E, Parker R, Hamming K, Chen L, Hildebrand M, Beedle AM, Feldcamp L, Zamponi GW, Snutch TP. The CACNA1F gene encodes an L-type calcium channel with unique biophysical properties and tissue distribution. *J Neurosci* 24: 1707-18, 2004.
128. Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, Lien E, Ingalls R, Fenton MJ, Golenbock DT, Vogel SN. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 167: 2257-67, 2001.
129. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1: 135-45, 2001.
130. Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cell-T cell interactions. *J Allergy Clin Immunol* 104: 517-23, 1999.
131. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033-79, 1997.
132. Mierke CT, Ballmaier M, Werner U, Manns MP, Welte K, Bischoff SC. Human endothelial cells regulate survival and proliferation of human mast cells. *J Exp Med* 192: 801-11, 2000.
133. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani AM, Schwartz LB, Inagaki N, Takei M, Ishizaka K, Zsebo KM, Gillis S, . Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 735-9, 1993.
134. Moayeri M, Welch RA. Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 65: 2233-9, 1997.
135. Muhldorfer I, Hacker J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog* 16: 171-81, 1994.
136. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164: 5998-6004, 2000.
137. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3: 667-72, 2002.

138. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3: 667-72, 2002.
139. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, Metcalfe DD. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10560-4, 1995.
140. Nakahata T, Toru H. Cytokines regulate development of human mast cells from hematopoietic progenitors. *Int J Hematol* 75: 350-6, 2002.
141. Nakano T, Sonoda T, Hayashi C, Yamatodani A, Kanayama Y, Yamamura T, Asai H, Yonezawa T, Kitamura Y, Galli SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 162: 1025-43, 1985.
142. Nilsson G, Johnell M, Hammer CH, Tiffany HL, Nilsson K, Metcalfe DD, Siegbahn A, Murphy PM. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J Immunol* 157: 1693-8, 1996.
143. O'Neill LA. SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 4: 823-4, 2003.
144. Ochi H, Hirani WM, Yuan Q, Friend DS, Austen KF, Boyce JA. T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* 190: 267-80, 1999.
145. Okayama Y, Hagaman DD, Metcalfe DD. A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol* 166: 4705-12, 2001.
146. Okumura S, Kashiwakura J, Tomita H, Matsumoto K, Nakajima T, Saito H, Okayama Y. Identification of specific gene expression profiles in human mast cells mediated by Toll-like receptor 4 and Fc epsilon RI. *Blood* 102: 2547-54, 2003.
147. Olsson N, Piek E, ten Dijke P, Nilsson G. Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol* 67: 350-6, 2000.
148. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1054-70, 2004.
149. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13766-71, 2000.
150. Pedron T, Thibault C, Sansonetti PJ. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Biol Chem* 278: 33878-86, 2003.
151. Poncet P, Arock M, David B. MHC class II-dependent activation of CD4<sup>+</sup> T cell hybridomas by human mast cells through superantigen presentation. *J Leukoc Biol* 66: 105-12, 1999.



152. Qatsha KA, Rudolph C, Marme D, Schachtele C, May WS. Go 6976, a selective inhibitor of protein kinase C, is a potent antagonist of human immunodeficiency virus 1 induction from latent/low-level-producing reservoir cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4674-8, 1993.
153. Qiao H, Andrade MV, Lisboa FA, Morgan K, Beaven MA. Fc $\epsilon$ RI and Toll-Like Receptors Mediate Synergistic Signals to Markedly Augment Production of Inflammatory Cytokines in Murine Mast Cells. *Blood* 2005.
154. Raqib R, Moly PK, Sarker P, Qadri F, Alam NH, Mathan M, Andersson J. Persistence of mucosal mast cells and eosinophils in Shigella-infected children. *Infect Immun* 71: 2684-92, 2003.
155. Renesto P, Mounier J, Sansonetti PJ. Induction of adherence and degranulation of polymorphonuclear leukocytes: A new expression of the invasive phenotype of Shigella flexneri. *Infection and Immunity* 64: 719-23, 1996.
156. Rodrick ML, Moss NM, Grbic JT, Revhaug A, O'Dwyer ST, Michie HR, Gough DB, Dubravec D, Manson JM, Saporoschetz IB, . Effects of in vivo endotoxin infusions on in vitro cellular immune responses in humans. *J Clin Immunol* 12: 440-50, 1992.
157. Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Gross V. Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9: 893-9, 1997.
158. Rose F, Kiss L, Grimminger F, Mayer K, Grandel U, Seeger W, Bieniek E, Sibelius U. E. coli hemolysin-induced lipid mediator metabolism in alveolar macrophages: impact of eicosapentaenoic acid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L100-L109, 2000.
159. Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* 35: 669-74, 1994.
160. Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in Drosophila. *J Immunol* 168: 1542-6, 2002.
161. Sansonetti PJ. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G319-G323, 2001.
162. Scheffer J, Konig W, Hacker J, Goebel W. Bacterial adherence and hemolysin production from Escherichia coli induces histamine and leukotriene release from various cells. *Infect Immun* 50: 271-8, 1985.
163. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2: 947-50, 2001.
164. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 23: 255-63, 2002.
165. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274: 17406-9, 1999.
166. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28: 405-40, 2004.

167. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11205-9, 1995.
168. Sher A, Hein A, Moser G, Caulfield JP. Complement receptors promote the phagocytosis of bacteria by rat peritoneal mast cells. *Lab Invest* 41: 490-9, 1979.
169. Shin JS, Gao Z, Abraham SN. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* 289: 785-8, 2000.
170. Shiohara M, Koike K. Regulation of mast cell development. *Chem Immunol Allergy* 87: 1-21, 2005.
171. Sillaber C, Sperr WR, Agis H, Spanblochl E, Lechner K, Valent P. Inhibition of stem cell factor dependent formation of human mast cells by interleukin-3 and interleukin-4. *Int Arch Allergy Immunol* 105: 264-8, 1994.
172. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem* 270: 24995-5000, 1995.
173. Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Buchse T, Krystal G. SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31: 1170-81, 2003.
174. Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Song CH, Krystal G. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* 21: 227-39, 2004.
175. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115: 66-75, 2005.
176. Sorden SD, Castleman WL. Virus-induced increases in airway mast cells in brown Norway rats are associated with enhanced pulmonary viral replication and persisting lymphocytic infiltration. *Exp Lung Res* 21: 197-213, 1995.
177. Steinman RM, Inaba K. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 66: 205-8, 1999.
178. Stellato C, de Paulis A, Ciccarelli A, Cirillo R, Patella V, Casolaro V, Marone G. Anti-inflammatory effect of cyclosporin A on human skin mast cells. *J Invest Dermatol* 98: 800-4, 1992.
179. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6: 9-20, 2006.
180. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* 109: 1351-9, 2002.
181. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167: 2250-6, 2001.
182. Sydora BC, Tavernini MM, Wessler A, Jewell LD, Fedorak RN. Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. *Inflamm Bowel Dis* 9: 87-97, 2003.

183. Tachimoto H, Hudson SA, Bochner BS. Acquisition and alteration of adhesion molecules during cultured human mast cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 107: 302-9, 2001.
184. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21: 335-76, 2003.
185. Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 165: 5392-6, 2000.
186. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164: 554-7, 2000.
187. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231: 59-65, 1999.
188. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291: 1544-7, 2001.
189. Toru H, Eguchi M, Matsumoto R, Yanagida M, Yata J, Nakahata T. Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood* 91: 187-95, 1998.
190. Tran VN, Bourdet-Sicard R, Dumenil G, Blocker A, Sansonetti PJ. Bacterial signals and cell responses during *Shigella* entry into epithelial cells. *Cell Microbiol* 2: 187-93, 2000.
191. Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6382-6, 1991.
192. Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A, Richter-Dahlfors A. Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 405: 694-7, 2000.
193. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-5, 1999.
194. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14459-63, 1999.
195. Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H, Strobl H, Geissler K, Bettelheim P, Lechner K. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 80: 2237-45, 1992.
196. van Schaik SM, Tristram DA, Nagpal IS, Hintz KM, Welliver RC, Welliver RC. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 103: 630-6, 1999.

197. Varadaradjalou S, Feger F, Thieblemont N, Hamouda NB, Pleau JM, Dy M, Arock M. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur J Immunol* 33: 899-906, 2003.
198. Wagner H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* 73: 329-68, 1999.
199. Wagner H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 14: 499-502, 2001.
200. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 624-31, 2000.
201. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 12: 624-31, 2000.
202. Weidner N, Austen KF. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of normal mast cells at multiple body sites. *J Invest Dermatol* 96: 26S-30S, 1991.
203. Welch RA, Hull R, Falkow S. Molecular cloning and physical characterization of a chromosomal hemolysin from *Escherichia coli*. *Infect Immun* 42: 178-86, 1983.
204. Wershil BK, Theodos CM, Galli SJ, Titus RG. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J Immunol* 152: 4563-71, 1994.
205. Woodbury RG, Miller HR, Huntley JF, Newlands GF, Palliser AC, Wakelin D. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature* 312: 450-2, 1984.
206. Wynn SR. Mast cell stabilizers, anticholinergics, corticosteroids, and troleandomycin. *J Allergy Clin Immunol* 84: 1100-3, 1989.
207. Xia HZ, Du Z, Craig S, Klisch G, Noben-Trauth N, Kochan JP, Huff TH, Irani AM, Schwartz LB. Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 159: 2911-21, 1997.
208. Yamamoto J, Watanabe S, Hirose M, Osada T, Ra C, Sato N. Role of mast cells as a trigger of inflammation in *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 50: 17-23, 1999.
209. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420: 324-9, 2002.
210. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4: 1144-50, 2003.
211. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169: 6668-72, 2002.
212. Yanagida M, Fukamachi H, Ohgami K, Kuwaki T, Ishii H, Uzunaki H, Amano K, Tokiwa T, Mitsui H, Saito H, Iikura Y, Ishizaka T, Nakahata T. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood* 86: 3705-14, 1995.

213. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-19, 1985.
214. Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 268: 25846-56, 1993.
215. Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168: 554-61, 2002.

## 6 Danksagung

Abschließend möchte ich allen recht herzlich danken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu erstellen.

Allen voran möchte ich Herrn Professor Dr. Stephan C. Bischoff für die Überlassung des vorliegenden Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Er ermöglichte mir unter seiner Anleitung selbständiges Arbeiten und förderte meine fachliche Weiterentwicklung.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Gernot Sellge. Er hat mich in das Gebiet der Mastzell-Immunologie eingearbeitet und stand mir immer mit wissenschaftlichem Rat zur Seite. Gernot Sellge und Stephan C. Bischoff haben einen wesentlichen Anteil daran, dass ich mich weiterhin für die immunologisch-mikrobiologische Forschung interessiere und anstrebe in meiner weiteren beruflichen Laufbahn wissenschaftlich zu arbeiten.

Ferner Danke ich Herrn Prof. Dr. F. Gunzer, der mir die mikrobiologische Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte. Die Erstellung der bakteriellen Mutanten wäre ohne seine wissenschaftliche Unterstützung in diesem kurzen Zeitraum nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Herrn Dr. Axel Lorentz danke ich für seinen wissenschaftlichen Beistand, sowohl in Hannover als auch in Stuttgart und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Frau Dr. Ina Bergheim möchte ich für die Hilfe bei der Übersetzung ins Englische danken. Nicht nur die wissenschaftliche Unterstützung, sondern auch die gute Atmosphäre haben dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit großer Freude durchgeführt habe. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Thomas Gebhardt, Frau Dr. Swantje Duncker, Frau Miriam Barkowsky und Herrn Hans Worthmann, mit denen ich auch außerhalb des Labors viele lustige Stunden verbracht habe. Frau Gisela Weier, Frau Antje Radtke und Frau Maike Hartmann gilt mein besonderer Dank für die technische Einarbeitung und die vielen Tipps und Tricks im Labor.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich im privaten Bereich unterstützt haben. Meiner Mutter Frau Gerlinde Krämer danke ich für den unbeschreiblichen Rückhalt und das Vertrauen in all meine Vorhaben. Meinen Schwestern Silvia Reich und Heidrun Krämer sowie meinem Freund Lars Röchter danke ich für die Geduld, die sie mir und dieser Arbeit gegenüber erbracht haben. Sie schafften es, mir auch in schweren Phasen ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern ;-)

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Sigrid Krämer  
Adresse: Tuttlinger Strasse 110, 70619 Stuttgart  
Geburtsdatum: 18.03.1977  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

1983 – 1987 Grundschule Frankfurt am Main  
1987 – 1996 Gymnasium Frankfurt am Main, Abschluss: Abitur  
1996 - 2002 Studium der Ökotrophologie an der Justus-Liebig Universität Gießen  
Abschluss: Diplom  
2000 – 2001 Diplomarbeit, Prof. Dr. med. H. Heckers, Gastroenterologie, Uniklinik Gießen  
„Darmflora bei Patienten mit atopischer Dermatitis“  
2002 – 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. med. S. C. Bischoff, Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover  
2005 – 2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. med. S. C. Bischoff, Institut für Biologische Chemie und Naturwissenschaft, Universität Hohenheim, Stuttgart

## 8 Publikationsliste

### 8.1 Originalarbeiten

**Krämer S**, Sellge G, Lorentz A, Feilhauer K, Gunzer F, Bischoff SC. Selective Activation of Human Intestinal Mast Cells by Escherichia coli Hemolysin. Journal of Immunology, in revision.

### 8.2 Ausgewählte Kongressbeiträge

**Krämer S**, Sellge G, Lorentz A, Sander LE, Abraham SN, Manns MP, Bischoff SC. Regulation of human intestinal mast cells by different *E. coli* strains. Immunobiology 208: 328, 2003

**Krämer S**, Sellge G, Lorentz A, Gunzer F, Abraham SN, Manns MP, Bischoff SC. Different *E. coli* strains activate human intestinal mast cells. Mast cells in Physiology, Host Defense and Disease: Beyond IgE. 2004, 313, 2004

Sellge G, **Krämer S**, Lorentz A, Gebhardt T, Manns MP, Gunzer F, Bischoff SC. Hemolysin-producing Escherichia coli strains activate human intestinal mast cells. Clinical and Investigative Medicine 27:97D, 2004

**Krämer S**, Sellge G, Lorentz A, Hoffman M, Manns MP, Bischoff SC. Mast cell tolerance to pathogen-associated molecular patterns. 12<sup>th</sup> international congress of mucosal immunology – from fundamental biology to human disease 52430, 2005



## 9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hohenheim zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Mechanismen der Mastzellaktivierung durch gram-negative Bakterien und  
Bakterienprodukte aus der Darmflora“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe.

Stuttgart, den 08.08.2006