

**Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

IgE-unabhängige Mastzellaktivierung in pollenassoziierter Entzündung

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Dr. rer. nat. Astrid Geldmacher

aus Erlangen

Datum der Promotion: 04.03.2022

VORWORT

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Metz, M., S. Gilles, A. Geldmacher, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann and M. Maurer. 2011. 'Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation'. *J Invest Dermatol*, 131(4): 987-990.

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis.....	7
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 Allergien – Typen, Auslöser und Symptome	13
1.2 Pathophysiologie der Allergien vom Typ I	15
1.3 Mastzellen	16
1.3.1 Entwicklung, anatomische Verteilung und Phenotypen von Mastzellen .	16
1.3.2 Mastzelldefiziente Mäuse	17
1.3.3 Aktivierung von Mastzellen.....	18
1.3.4 Effektormechanismen von Mastzellen.....	21
1.3.5 Mastzellen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen....	22
1.4 IgE-unabhängige Mastzellaktivierung	23
1.5 Gesamt IgE, spezifisches IgE und Allergien.....	25
1.6 Ziele der Arbeit.....	28
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Materialien.....	29
2.2 Spezifisches IgE in Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis	30
2.3 Aufreinigung von wässrigen Pollenextrakten.....	30
2.4 Mäuse	31
2.5 BMCMCs für <i>in vitro</i> Experimente und lokale Rekonstitution von mastzelldefizienten <i>Kit^W/Kit^{W-v}</i> Mäusen mit Mastzellen	32
2.6 PCMC für <i>in vitro</i> Versuche.....	33
2.7 Intradermale Injektion von Pollenextrakten und Ohrdickenmessung.....	33
2.8 Histologie und Alkaline Giemsa-Färbung von Mausgewebe	35
2.9 <i>In vitro</i> Freisetzung von β -Hexaminidase durch Mastzelldegranulation nach Inkubation mit Pollenextrakten	35
2.10 Graphiken und Statistik.....	37
3 ERGEBNISSE	39
3.1 Einige Patienten mit saisonalen allergischen Symptomen und einem positiven Pricktest auf Birke oder Traubenkraut weisen kein spezifisches IgE auf.....	39
3.2 Birkenpollen und Beifußpollen verursachen eine IgE-unabhängige Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen, die in Stärke und Kinetik einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt.....	40

3.3	Die von Birkenpollenextrakten verursachte Entzündungsreaktion ist assoziiert mit einem hohen Anteil an degranulierten Mastzellen in der Haut	42
3.4	In Wildtypmäusen, nicht aber in mastzelldefizienten Mäusen, verursachen Pollenextrakte eine dosisabhängige Entzündungsreaktion	43
3.5	Durch die lokale Mastzellrekonstitution wird die Reaktivität der mastzelldefizienten Mäuse auf Pollenextrakte wiederhergestellt	45
3.6	Auch <i>in vitro</i> induzieren wässrige Extrakte von Pollen des Traubenkrauts und der Birke eine Degranulation in murinen Mastzellen	48
3.7	Charakterisierung der für die mastzellabhängige Entzündungsreaktion verantwortlichen Substanzen in den Birkenpollenextrakten	50
3.8	Die Pollenextraktfraktion > 3 kDa ist für die von wässrigen Extrakten des gemeinen Beifußes (Art-APE) <i>in vitro</i> induzierte Degranulation von murinen Mastzellen verantwortlich	52
4	DISKUSSION	55
4.1	Typ I Allergie ohne spezifisches IgE – ein alternativer Pathomechanismus?.....	55
4.2	In der Maus induzieren Pollenextrakte auch ohne IgE eine Entzündungsreaktion, die sehr einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt	56
4.3	Die durch Pollen induzierte Entzündungsreaktion in der Maushaut ist mastzellabhängig	57
4.4	Hohe Dosen von Pollenextrakten induzieren in Mastzellen eine direkte und IgE-unabhängige Degranulation.....	59
4.5	Mastzellen werden von unterschiedlichen Pollenbestandteilen aktiviert	63
5	LITERATUR.....	66
	Eidesstattliche Versicherung	76
	Anteilsklärung an erfolgter Publikation	77
	Lebenslauf	78
	Publikationsliste.....	79
	Danksagung	81

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1.1 Ausgewählte murine Mastzellrezeptoren und Effektorsignale.	22
Tab. 1.2 Präformierte und neu synthetisierte Produkte von Mastzellen.	23
Tab. 3.1: Spezifisches IgE in Allergikern.	42
Abb. 1.1 Aktivierung und Effektormechanismen von Mastzellen.	21
Abb. 1.2 Konstellationen von spezifischem IgE, Symptomen und Skin Prick Test.	29
Abb. 2.1 Lokale Rekonstitution von Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen mit Mastzellen.	33
Abb. 2.2: Schema der intradermalen Injektion von Pollenextrakten.	36
Abb. 2.3 β -Hexaminidase Assay als Mastzelldegranulationsassay.	38
Abb. 3.1 Birkenpollenextrakte verursachen eine IgE-unabhängige Entzündungsreaktion in Ohren von Wildtypmäusen.	43
Abb. 3.2 Die durch Pollenextrakte der Birke verursachte Entzündungsreaktion in der Maushaut ist mit einem erhöhten Anteil an degranulierten Mastzellen assoziiert.	45
Abb. 3.3 Birkenpollenextrakte induzieren in Wildtypmäusen, aber nicht in mastzelldefizienten Mäusen eine starke dosisabhängige Entzündungsreaktion.	46
Abb. 3.4 Die in mastzelldefizienten Kit^W/Kit^{W-v} Mäusen nach lokaler Rekonstitution mit MC von Birkenpollenextrakten induzierte Entzündungsreaktion entspricht in ihrer Stärke und Kinetik der in Wildtypmäusen.	48
Abb. 3.5 Nur hohe Konzentrationen von Beifuß- und Birkenpollenextrakten induzieren direkt eine Degranulation von Mastzellen <i>in vitro</i> .	50
Abb. 3.6 Nur hohe Konzentrationen von Wiesenlieschgraspollenextrakten induziert eine geringe Mastzelldegranulation <i>in vitro</i> , Kieferpollenextrakte gar keine.	51
Abb. 3.7 Unfraktionierte Pollenextrakte der Birke induzieren eine stärkere Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen als größenfraktionierte.	54
Abb. 3.8 Die Fraktion > 3 kDa, nicht aber die Fraktion < 3 kDa der Beifußpollenextrakte induziert eine direkte Degranulation in Mausmastzellen aus dem Knochenmark.	55

Abb. 3.9: Die Fraktion > 3 kDa, nicht aber die Fraktion > 3 kDa der
Beifußpollenextrakte induziert eine Degranulation von Maus-
mastzellen aus dem Peritoneum.

56

Abkürzungsverzeichnis

Amb-APE	APE des Beifußblättrigen Traubenkrauts (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>)
APC	„antigen presenting cells“, Antigenpräsentierende Zellen
APE	„aqueous pollen extracts“, wasserlösliche Pollenextrakte
Art-APE	APE des Gemeinen Beifußes (<i>Artemisia vulgaris</i>)
Bet-APE	APE der Birke (<i>Betula pendula</i>)
BMCMC	„Bone marrow derived cultured mast cells“, kultivierte Mastzellen aus dem Knochenmark
CAP	"Carrier-Polymer-System"
CD	„Cluster of differentiation“, Oberflächenantigene auf Zellen
CCL	Chemokinligand
CPA	Carboxypeptidase A
CpG	Oligodinukleotide aus Cytosin-Phosphat-Guanin Nukleotiden
DC	„Dendritic cell“, Dendritische Zelle
ds RNA	Doppelstrang RNA
ET _A	Endothelinrezeptor A
ET _B	Endothelinrezeptor B
Exp.	Experiment
Fc	konstanter, nicht variabler Teil von Antikörpern
FcεR	Rezeptor für den Fc-Teil von IgE Antikörpern
g	„gravity“, Erdbeschleunigung
h	Stunde
HDM	„house dust mite“, Hausstaubmilben
5-HT	5-Hydroxytryptamine
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukine
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
MBP	„major basic protein“ von Eosinophilen sezerniert
MC	„mast cell“, Mastzelle
MHC	„major histocompatibility complex“
mSCF	membranständiges SCF
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

OD	Optische Dichte
PBS	„Phosphor buffered saline“, Phosphatgepufferte Salzlösung
Phl-APE	APE von Pollen des Wiesenlieschgrases (<i>Phleum spec.</i>)
Pin-APE	APE von Pollen der Kiefer (<i>Pinus spec.</i>)
PGD	Prostaglandin
PLA ₂	Phospholipase A ₂
p-NAG	para-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glukosamin
PNG	Polymorphonucleare Granulozyten
PPE1	E1-Phytprostane – Bestandteil von APEs
RANTES	„Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted“ (Synonym von CCL-5)
RBL	„Rat basophilic leukaemia cells“, Mastzelllinie aus Ratten
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffradikale
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute bei der Zentrifugation
SCF	„stem cell factor“, Stammzellfaktor
SD	"standard deviation", Standardabweichung
SE	"standard error", Standardfehler
SPT	„skin prick test“, Pricktest
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

Im nachfolgenden Text werden einfachheitshalber Patienten jeglichen Geschlechts unter dem Begriff "Patienten" zusammengefasst und die Mitglieder einer Arbeitsgruppe gleich welchen Geschlechts als "Kolleginnen" bezeichnet.

Zusammenfassung

Die Prävalenz von Allergien, wie der allergischen Rhinokonjunktivitis, ist in der westlichen Welt seit Jahren stetig steigend. Die Diagnose einer allergischen Rhinokonjunktivitis basiert auf klinischen Symptomen, sowie einem Hauttest mit den jeweiligen Antigenen (Pricktest). Ein positiver Pricktest wurde bisher als Indikator für eine IgE-vermittelte Mastzelldegranulation angesehen. Da es aber Hinweise gibt, dass Pollen nicht nur aus Allergenen, sondern auch bioaktiven Mediatoren bestehen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Pollen auch ohne spezifisches IgE eine inflammatorische Immunreaktion hervorrufen.

Zuerst wurden die allergenspezifischen IgE Serumtiter von 184 Patienten untersucht, die eine allergische Anamnese und einen positiven Pricktest gegen Birke oder Traubenkraut aufwiesen. In Übereinstimmung mit vorherigen Veröffentlichungen wurde in 13 % bzw. 30 % der Patienten kein spezifisches IgE gegen Birke bzw. Traubenkraut gefunden. Diese Ergebnisse implizieren, dass Pollen allergieähnliche Symptome in Abwesenheit von spezifischem IgE induzieren können.

Als nächstes wurde untersucht, ob Pollen *in vivo* eine IgE-unabhängige inflammatorische Reaktion in Mäusen hervorrufen. Dazu wurden wässrige Extrakte aus Pollen der Birke oder des Beifusses intradermal in die Ohren von Mäusen gespritzt, was zu einer Ohrschwellung führte, die einer IgE-abhängigen allergischen Hautentzündungsreaktion in Stärke und Kinetik sehr ähnelte. Da Mastzellen in IgE-abhängigen allergischen Reaktionen eine entscheidende Rolle spielen, wurde die Rolle von Mastzellen in der polleninduzierten IgE-unabhängigen Entzündung untersucht. Die quantitative Histomorphometrie zeigte, dass die Ohrschwellung mit einem hohen Prozentsatz stark degranulierter Mastzellen einherging. Um herauszufinden, ob die Entzündungsreaktion mastzellabhängig ist, wurden Birken- oder Beifußpollenextrakte in die Ohren von mastzelldefizienten kit^W/kit^{W-v} Mäusen injiziert, was zu einer signifikant geringeren Ohrschwellung führte als in den Wildtyp $Kit^{+/+}$ Wurfgeschwistern.

Kit^W/kit^{W-v} Mäuse weisen zusätzlich zu ihrer Mastzelldefizienz andere immunologische Mängel auf, die für das Ausbleiben der inflammatorischen Antwort auf Pollenextrakte verantwortlich sein könnten. Daher wurden kit^W/kit^{W-v} Mäuse vor Polleninjektion mit aus dem Knochenmark von Wildtypgeschwistern stammenden kultivierten Mastzellen lokal rekonstituiert, was zu einer

vollständigen Wiederherstellung der Entzündungsreaktion führte. Dies zeigt, dass Mastzellen für die von Birkenpollenextrakten hervorgerufene Entzündungsreaktion essentiell sind.

In vitro konnte gezeigt werden, dass Pollenextrakte nur in sehr hohen Konzentrationen direkt zu einer Mastzelldegranulation führen, was darauf hinweisen könnte, dass *in vivo* auch andere Immunzellen bei der polleninduzierte Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass manche Pollenallergiker kein spezifisches IgE im Serum aufweisen, dass Pollenextrakte direkt murine Mastzellen degranulieren und dass sie eine deutlich mastzellabhängige, aber IgE-unabhängige Entzündung in der Maushaut induzieren, die einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt. Dieser inflammatorische Effekt von Pollenbestandteilen ist vermutlich für die saisonalen Symptome von Allergikern mitverantwortlich.

Abstract

The prevalence of allergies like allergic rhinoconjunctivitis have been rising in the western world for years. The diagnosis of allergic rhinoconjunctivitis is based on clinical symptoms and a positive skin prick test which indicates an allergenspecific IgE driven mast cell degranulation. However, previous findings show that pollen harbour bioactive mediators next to pollen. Thus it has been investigated in the present study, if pollen can induce an inflammatory reaction without specific IgE.

First the titers of specific IgE against pollenallergens in 184 patients with allergic symptoms and a positive prick test to birch or ragweed were determined. In line with previous publications, 13 % or 30 % of the patients, respectively, had no specific IgE, implying that pollen can cause allergylike symptoms without specific IgE.

Next it was investigated if pollen can induce inflammation independent of specific IgE in mice. Aqueous pollenextracts of birch or mugwort were injected intradermally in the ears of naive mice, which led to a pronounced earswelling that was in strength and kinetic similar to an IgE dependent allergic reaction. As mast cells are the key players in allergies, their role in IgE independent inflammation induced by pollen was investigated. The swelling of the mouse ears was associated with an increased number of degranulated mast cells. In further experiments pollenextracts injected into the ears of mast cell deficient kit^W/kit^{W-v} mice induced a significantly smaller ear swelling compared to the ears of their wild type $Kit^{+/+}$ siblings.

Kit^W/kit^{W-v} mice harbor other immunological defects than the mast cell deficiency. To rule out that those defects are responsible for the much lower inflammatory response after pollen treatment, kit^W/kit^{W-v} mice were locally reconstituted with cultured mast cells from the bone marrow of wildtype $Kit^{+/+}$ mice before the injection of pollen extracts. This led to a complete restorage of the wild type phenotype, showing the importance of mast cells in the pollen induced inflammatory reaction.

In vitro only very high concentrations of pollenextracts induced a moderate mast cell degranulation, indicating that other immune cells are involved in the pollen induced inflammation *in vivo*.

Taken together, some patients with seasonal symptoms resembling allergic IgE depending symptoms have no specific IgE in their serum, pollen induce a strongly

mast cell dependent, but IgE independent inflammatory reaction in the mouse skin and they could degranulate mast cells directly. This inflammatory effect of pollen could add up to the clinical symptoms in patients.

1 EINLEITUNG

1.1 Allergien – Typen, Auslöser und Symptome

Anfang der 60er Jahre wurden Allergien von Coombs und Gell in vier verschiedene Typen eingeteilt: die Allergie vom Soforttyp (Typ I), vom zytotoxischen Typ (Typ II), vom Immunkomplexbedingten Typ (Typ III) und vom zellulär vermittelten Typ (Typ IV). In der vorliegenden Arbeit geht es um eine Art der Typ I Allergien, der Pollenallergie. Andere Stoffe, die eine Allergie vom Typ I auslösen können, sind z.B. Tierhaare, Hausstaubmilben, Insektengifte und Nahrungsmittel. Allergien vom Typ I zeigen klinisch ein diverses Bild. Während bei einer Typ I Nahrungsmittelallergie gastrointestinale Symptome dominieren, können Menschen mit Insektengiftallergie einen anaphylaktischen Schock nach Exposition erleiden. Menschen mit Pollenallergien leiden dagegen während der Pollensaison meist unter mildereren Symptomen, wie einer allergischen Rhinokonjunktivitis, die sich in einem Jucken und Fließen der Nase sowie Augenjucken äußert (Wise *et al.* 2018). Im Falle von allergischem Asthma kann es in der Pollensaison allerdings auch intermittierend zu schwereren Symptomen wie Atemnot kommen (u.a. Halken *et al.* 2017, Bastl *et al.* 2018, Siroux *et al.* 2019).

Die Prävalenz der allergischen Rhinokonjunktivitis ist weltweit steigend und beträgt 10-30 % bei den Erwachsenen und um die 40 % bei Kindern. In Europa liegt die Prävalenz der allergischen Rhinokonjunktivitis bei ca. 20 % (Brozek *et al.* 2010, Langen *et al.* 2013). Die WHO schätzt, dass 400 Mio Menschen weltweit von allergischer Rhinokonjunktivitis betroffen sind und 300 Mio von allergischem Asthma (Pawankar *et al.* 2013, Akdis *et al.* 2015)

Bisher ging man davon aus, dass die klinischen Symptome einer Pollenallergie ausschließlich durch eine allergische Soforttypreaktion über Immunglobulin E (IgE)-Antikörper spezifisch für Pollenallergene vermittelt werden. Durch den Kontakt mit dem Allergen in der Haut oder der Schleimhaut von Leuten, die unter einer Allergie leiden, kommt es zunächst zu einer Sensibilisierung, das heißt, es werden im Verlauf B Zellen aktiviert, die allergenspezifisches IgE bilden (siehe u.a. Janeway 2012). Wenn das Allergen erneut über die Haut oder Schleimhaut in den Körper gelangt, bindet es an spezifisches IgE, welches wiederum an die

hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen gebunden ist (u.a. Galli & Tsai 2012). Die Vernetzung von mehreren dieser allergenspezifischen IgEs durch Bindung an ein Allergen führt zur Aktivierung von Mastzellen und der dadurch bedingten Freisetzung u.a. von bereits vorher gebildetem und in den Granula der Zellen präformiert vorliegendem Histamin, sowie der Neuproduktion und Sezernierung von Leukotrienen, Prostaglandinen und Zytokinen, u.a. IL-4 und IL-5 (u.a. Metz & Maurer 2007, Maurer *et al.* 2019). Zusammengefasst ging man bisher davon aus, dass allergenspezifisches IgE essenziell für die klinischen Symptome einer Allergie ist.

Durch die meisten Studien wird die Theorie gestützt, dass Patienten mit allergischem Asthma eine bronchiale Hyperreagibilität aufweisen, die sich in der saisonalen Allergenexposition und damit verbundenen saisonal auftretenden klinischen Symptomatik widerspiegelt (zusammengefasst von Tilles & Bardana 1997). Allerdings konnte gezeigt werden, dass in ländlichen Gegenden mehr Pollen zu finden sind als in urbanen Gegenden (Bosch-Cano *et al.* 2011), Menschen in ländlichen Gegenden aber seltener an Allergien leiden als in urbanen Gegenden. Es gibt also Hinweise, dass das Auftreten von Pollen alleine nicht die Häufigkeit von Allergien erklärt. In die gleiche Richtung gehen Untersuchungen, die zeigten, dass die in der Umwelt am häufigsten gefundenen Pollen sich nicht in der Häufigkeit der Allergien gegen diese Pollen niederschlägt (Can *et al.* 2010). In Europa sind die Pollen der Birke einer der häufigsten Verursacher von allergischer Rhinokonjunktivitis (D'Amato *et al.* 2007, Caillaud *et al.* 2015). Die Schwere der Rhinokonjunktivitis bei Birkenpollenallergikern ist ab einer Mindestkonzentration linear zu der Konzentration von Birkenpollen in der Luft (Caillaud *et al.* 2014). All diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass die Aetiologie von Allergien multimodal ist, und es auch pollenintrinsic Charakteristika gibt, die eine Allergie begünstigen bzw. auslösen können (siehe u.a. Gilles *et al.* 2018).

Inzwischen mehren sich also die Hinweise, dass die klinischen allergischen Symptome wie Augenrötung, Nasenjucken und Rhinorrhoe keine reinen Typ I Reaktionen sind, da sie nicht alleine durch allergenspezifisches IgE vermittelt werden (Gilles *et al.* 2012), sondern dass manche Pollenbestandteile auch ohne

IgE eine Reaktion im Körper auslösen können, die einer allergischen Reaktion ähnelt.

1.2 Pathophysiologie der Allergien vom Typ I

Auch wenn es in der vorliegenden Arbeit um Immunreaktionen geht, die nicht durch IgE vermittelt werden, soll hier kurz die Pathophysiologie der Typ I Allergien geschildert werden. Um allergische Soforttypreaktionen, also Typ I Allergien entwickeln zu können, muss eine Sensibilisierung auf das jeweilige Allergen erfolgt sein. Hierzu ist als erster Schritt das Eindringen von potenziellen Allergenen in den Körper über die Haut oder die Schleimhäute erforderlich. Unter normalen Umständen kommen keine Allergene über die Haut in den Organismus, aber man weiß inzwischen, dass die Haut bei Menschen mit atopischer Dermatitis dysfunktional ist und Allergene die Hautbarriere passieren können (siehe u.a. Goleva *et al.* 2019). Auch für andere Typ I Allergien gibt es Hinweise, dass die Haut-/Schleimhautbarriere gestört sein muss, damit Allergene von außen in den Organismus gelangen können (zusammengefasst in Goleva *et al.* 2019). Nachdem die potenziellen Allergene in den Körper gelangt sind, werden sie von antigenpräsentierenden Zellen („antigen presenting cells“, APC) aufgenommen, prozessiert und in den lymphoiden Organen mittels „major histocompatibility complex“ (MHC) Molekülen den T-Helferzellen (Th Zelle) präsentiert (u.a. Humeniuk *et al.* 2017). Zusätzlich zu der Antigenpräsentation wird ein Gefahrensignal gebraucht, um die T-Zelle zu aktivieren. Vereinfacht dargestellt wird je nach Zytokinmilieu bei Überwiegen von Interleukin (IL)-12 aus der allergenspezifischen Th Zelle eine Th1 Zelle, die u.a. zytotoxische T Zellen in ihrer Reifung unterstützt. Bei Überwiegen von IL-4 wird die Bildung von Th2 Zellen unterstützt, die B Zellen u.a. zur IgE Antikörperproduktion anregen. Die Entstehung des Zytokinmilieus, die anderen T-Zellaktivierungsmechanismen und die Entscheidung von Th1 versus Th2 Zellen ist sehr komplex (siehe unten). Seit einigen Jahren sind die Rollen von anderen Zellen, wie den Th9 und Th17 Zellen (Berker *et al.* 2017) und vielleicht auch den NKT Zellen (Crosby & Kronenberg 2018) oder den sogenannten "innate lymphoid cells" (ICL2 Zellen) (Doherty & Broide 2019) bei der Genese von Allergien bekannt. Auf diese anderen Zellen soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Die allergenspezifischen IgE-Antikörper binden anschließend an die Fc epsilon Rezeptoren (FcεR) auf Mastzellen und Basophilen, die daraufhin den „Cluster of differentiation“ CD40 Ligand (CD40L) hochregulieren sowie vermehrt IL-4 sezernieren, was die IgE-Produktion der B Zellen zusätzlich erhöht. Dieser als „Sensibilisierung“ bezeichnete Vorgang führt nach erneutem Kontakt mit dem Allergen zu einer Kreuzvernetzung der IgE beladenen FcεR auf der Zelloberfläche. Dies führt zur Aktivierung einer Signalkaskade, die zur Degranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Prostaglandine durch Mastzellen führt.

1.3 Mastzellen

Mastzellen sind, wie man heute weiß, die wesentlichen Effektorzellen bei der allergischen Entzündungsreaktion. Sie wurden Mitte des 19. Jahrhunderts von dem Pathologen Dr. Friedrich Daniel von Recklinghausen lichtmikroskopisch als „Eiter- und Bindegewebkörperchen“ in verschiedenen tierischen Geweben untersucht. Von Recklinghausen beschrieben in diesen Geweben granuliert Zellen (von Recklinghausen 1863), die später "Plasmazellen" genannt wurden und sehr den Zellen ähneln, die heute Mastzellen genannt werden. Endgültig identifiziert wurden diese granulierten „Plasmazellen“ histologisch von Paul Ehrlich (Ehrlich 1877), der ihnen 1879 in einer Sitzung der Berliner Physiologischen Gesellschaft den Namen „Mastzellen“ gab (Ehrlich 1879).

Auch wenn die Mastzelle lange Jahre eher für ihre pathologische Funktion bei Allergien und Autoimmunität bekannt war, so mehren sich die Hinweise, dass eine Großzahl von Mastzellfunktionen physiologischer Natur sind (Maurer & Pucillo 2018 und Abschnitt 1.8 unten). Einige Funktionen von Mastzellen, wie ihre Aufgabe innerhalb des Immunsystems, die Regulation des Blutdrucks oder ihr Beitrag bei der Bildung von Fibrose, wurden in verschiedenen Arbeiten zusammengefasst (Metz *et al.* 2009, Bonnekoh *et al.* 2018, Bradding & Peijler 2018, Piliponsky & Romani 2018).

1.3.1 Entwicklung, anatomische Verteilung und Phenotypen von Mastzellen

Mastzellen finden sich in allen Geweben, und dort vor allem in unmittelbarer Nähe zu Blutgefäßen, Nerven, glatten Muskelzellen, mukösen Drüsen und Haarfollikeln. Besonders häufig sind sie in exponierten anatomischen Strukturen wie Haut,

Luftwegen und dem Gastrointestinaltrakt zu finden. Die Vorläuferzellen von Mastzellen sind hämatopoetischen Ursprungs, allerdings gelang eine genauere Charakterisierung bisher nicht. Mastzellen reifen zu ihrem endgültigen Phenotyp vermutlich in den jeweiligen Geweben heran, in denen sie auch verbleiben, wobei auch hier der genaue Prozess nicht endgültig geklärt ist (zusammengefasst in Metz *et al.* 2007). Die Heterogenität von Mastzellen, deren unterschiedliche Populationen verschiedenste biochemische und funktionelle Charakteristika aufweisen (Metz *et al.* 2007), ist weiterhin Gegenstand der derzeitigen Forschung (Cildir *et al.* 2017, Frossi *et al.* 2018).

In Nagern wie Maus und Ratte, aber auch im Menschen, geht man davon aus, dass es mindestens zwei verschiedene Mastzelltypen gibt, sogenannte "connective tissue type MC" (CTMC) z.B. in der Haut, und mukosale MC in Schleimhäuten. Die Mastzelltypen unterscheiden sich durch ihr Verteilungsmuster innerhalb des Körpers, Mediatoren, die sie ausschütten können, und die Zusammensetzung der Oberflächenrezeptoren (zusammengefasst in Katz *et al.* 1985, Metz & Maurer 2007, Frossi *et al.* 2018, Mukai *et al.* 2018).

1.3.2 Mastzelldefiziente Mäuse

Galli, Kitamura und Kolleginnen gelang es vor rund 40 Jahren, das erste Mausmodell zu entwickeln, das als adultes Tier aufgrund einer spontan aufgetretenen Doppelmutation im Gen der Tyrosinkinase c-Kit (CD117, „stem cell factor“ (SCF)-Rezeptor) und des damit verbundenen Fehlens der durch SCF aktivierten Signalkaskade praktisch keine Mastzellen aufweist (Kitamura *et al.* 1978, Nakano *et al.* 1985, Galli & Kitamura 1987).

Neben der Mastzelldefizienz kommt es aufgrund der fehlenden Expression des SCF Rezeptors c-Kit bei den sogenannten WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}* (*Kit^W/Kit^{W-v}*) Mäusen auch zu einer leichten Anämie, einer kompletten Melanozytendefizienz (weiße Mäuse mit schwarzen Augen) und zur Sterilität. Auch haben *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, wie alle mastzelldefizienten Mausstämme, eine reduzierte Anzahl von Basophilen. Obwohl das Immunsystem bis auf die Mastzelldefizienz und verringerte Basophilenanzahlen soweit bekannt keine wesentlichen Veränderungen aufweist (Galli & Kitamura 1987), werden zum Nachweis der

Bedeutung von Mastzellen in den jeweiligen Krankheitsmodellen mastzelldefiziente Mäuse und mastzelldefiziente Mäuse, die zuvor durch die Gabe von Mastzellen rekonstituiert wurden, verglichen (siehe Abschnitt 2.3 in Material und Methoden). Diese selektive Rekonstitution mit Mastzellen repariert ausschließlich die Mastzelldefizienz, nicht aber die anderen durch die c-kit Mutation entstandenen Defekte. Des Weiteren gibt es seit einigen Jahren neuere mastzelldefiziente Mausstämme, die nicht auf der c-kit Mutation beruhen (siehe Reber *et al.* 2012, Rodewald & Feierabend 2012).

Nach der Beschreibung des Kit^W/Kit^{W-v} Mausmodells konnte gezeigt werden, dass Mastzellen, wie bereits weit vorher vermutet, essentiell für die Auslösung der allergischen Reaktionen vom Typ I sind und auch an der Auslösung T-Zell-induzierter allergischer Reaktionen (Typ IV) und immunkomplexvermittelter Hypersensitivitätsreaktionen (Typ III) beteiligt sind. So konnten Strait und seine Arbeitsgruppe mittels mastzelldefizienter Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse zeigen, dass anti-IgE-induzierte Anaphylaxie in der Maus abhängig war von Mastzellen und von dem vor allem auf Mastzellen vorkommenden, hochaffinen IgE-Antikörperrezeptoren FcεRI (Strait *et al.* 2002). Bei allergischen Reaktionen vom Typ I spielen Mastzellen sowohl bei der Sensibilisierungsphase als auch bei der Reaktion vom Soforttyp eine Rolle (Übersichtsartikel von Metz *et al.* 2007). Dudeck und Kolleginnen und Kollegen (im folgenden einfachheitshalber "Kolleginnen" genannt, siehe auch Anmerkung in der Abkürzungsliste am Anfang dieser Arbeit) konnten zeigen, dass in einem Kontaktallergiemodell, einem Modell für Typ IV Allergie, Mastzellen für die Migration von Dendritischen Zellen und die damit einhergehende Induktion einer allergischen Antwort verantwortlich sind (Dudeck *et al.* 2011).

1.3.3 Aktivierung von Mastzellen

Zur klassischen und damit bestuntersuchten Aktivierung von Mastzellen kommt es durch die Kreuzvernetzung von allergenspezifischen IgE Antikörpern, die mit ihrem Fc Teil an die hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεR) auf der Oberfläche von Mastzellen binden (Kinet 1999) und durch das Binden des Allergens am Epitop zu einer Kreuzvernetzung führen. Für Allergene aus Birkenpollen konnten mehrere IgE Epitope dafür nachgewiesen werden (Gieras *et al.* 2011).

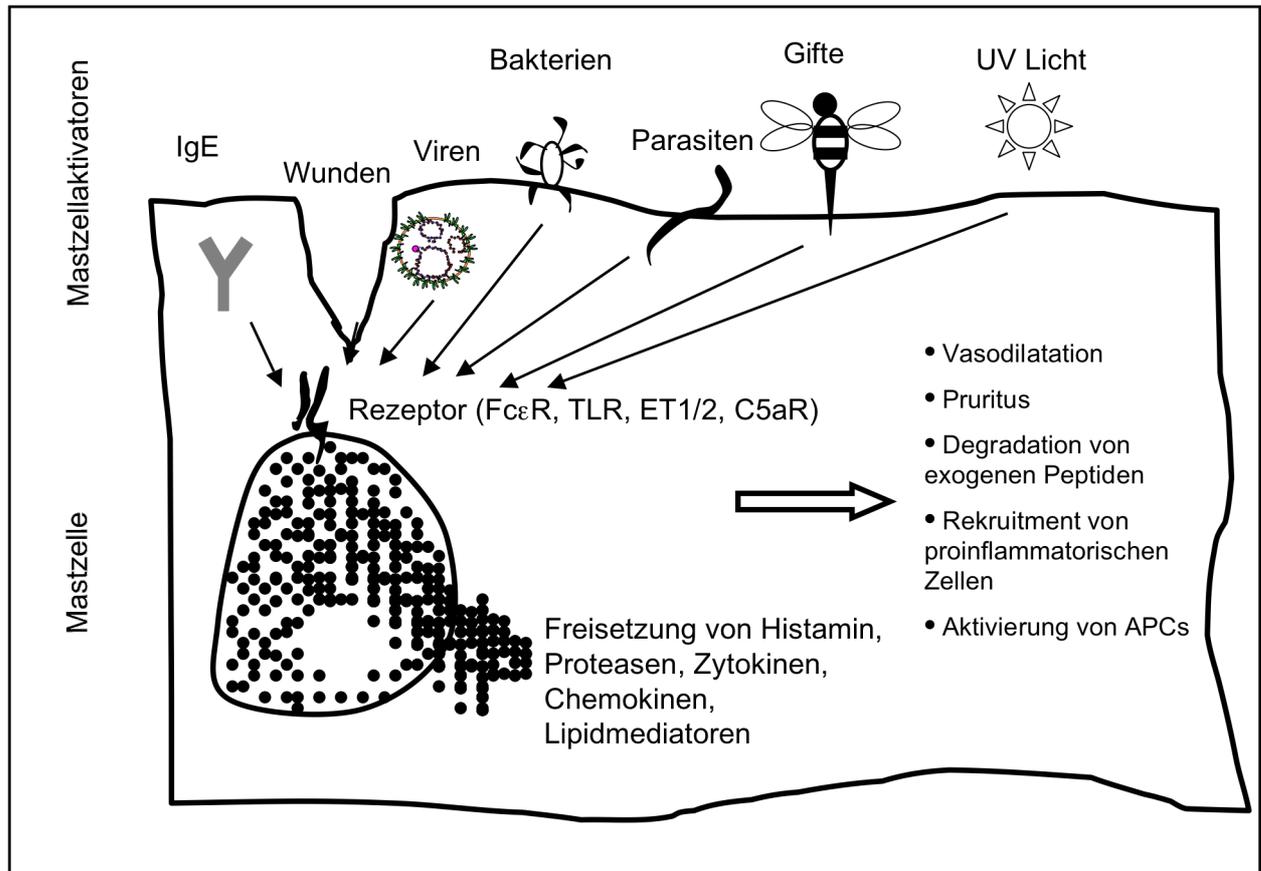


Abb. 1.1 Aktivierung und Effektormechanismen von Mastzellen (modifiziert nach Metz 2007). Mastzellen ("mast cell", MC) können über unterschiedlichste Mechanismen aktiviert werden. Viele davon sind rezeptorabhängig, wie das Binden von Bakterien- oder Virusbestandteile über "toll-like receptors" (TLR), von körpereigenen Signalstoffen wie z.B. Endothelin über den Endothelinrezeptor (ET) oder Komplementfaktor C5a über den Rezeptor C5aR. Am besten untersucht ist die Aktivierung der MC über die Bindung von antigenbindenden IgE an FcεRI. Nachdem die MC aktiviert wurde, kommt es entweder zur Freisetzung von vorgefertigten Mediatoren wie Proteasen und Histamin oder aber zur Neusynthese von z.B. Prostaglandinen. Das führt zur direkten Degradation exogener Proteine und Rekrutierung/Aktivierung anderer Immunzellen, z.B. antigenpräsentierende Zellen (APC).

Im Rahmen der Untersuchung von anaphylaktischen Reaktionen, die, wie die Pollenallergien, allergische Reaktionen vom Typ I sind, konnte gezeigt werden, dass Allergene mittels von Dendritischen Zellen stammenden Vesikeln in die Nähe des allergenspezifischen IgE auf den Mastzellen gebracht werden (Choi *et al.* 2018 Science, Levi-Schaffer & Scheffel 2018). Aber auch durch diverse andere, von IgE unabhängige Signale können Mastzellen aktiviert werden, z.B. durch die Bindung von IgG an den IgG-Rezeptor (FcγR), durch verschiedene Zytokine, Peptide oder auch chemische oder physikalische Stimuli (Abb. 1.1, zusammengefasst durch Metz *et al.* 2007).

Tab. 1.1 Ausgewählte murine Mastzellrezeptoren und Effektorsignale
(modifiziert nach Metz 2007, Gilfillan & Tkaczyk 2006).

Rezeptor	Liganden	Effektorsignale (Auswahl)	Referenz
FcεRI	IgE	IL-13, Degranulation	Segal <i>et al.</i> 1977
FcγRIII	IgG1	Degranulation	Metz <i>et al.</i> 2007
Komplement-rezeptoren	C3a, C5a, C3b, C4b	Zytokine, Degranulation	Marshall 2004
TLR 2	Peptidoglykane	IL-13, keine Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004a
TLR 3	ds RNA	TNF-α, IL-6, MIP-1α, MIP-2, RANTES, keine Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004a
TLR 4	LPS	TNF-α, IL-6, IL-13, MIP-1α, MIP-2, keine Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004a
TLR 7	ss GU-reiche RNA	TNF-α, IL-6, MIP-1α, MIP-2, RANTES, keine Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004a
TLR 9	CpG	TNF-α, IL-6, MIP-1α, MIP-2, RANTES, keine Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004a
ET _A , ET _B	Endothelin	TNF-α, IL-6, Degranulation	Matsushima <i>et al.</i> 2004b
CRH-R	CRH	Vaskuläre Permeabilität	Donelan <i>et al.</i> 2006

ET=Endothelinrezeptor; IFN=Interferon; Ig=Immunglobulin; IL=Interleukin; LT=Leukotriene; MIP="macrophage inflammatory protein"; RANTES="Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and Secreted"; TGF="tumor growth factor"; TLR="Toll like receptor"; TNF=Tumornekrosefaktor.

In der Expression von Oberflächenrezeptoren, und damit in der Aktivierung durch verschiedene Stimuli, bestehen Unterschiede zum einen zwischen humanen und murinen Mastzellen, aber auch zwischen den verschiedenen Mausmastzellpopulationen innerhalb einer Spezies. Dies konnte u.a. für die Unterschiede in der Expression der "toll like receptors" TLRs von murinen fetalen Haut- und murinen Knochenmarkmastzellen von Matsushima und seiner Arbeitsgruppe gezeigt werden (Tab. 1.1, Matsushima *et al.* 2004b).

Aber nicht nur Unterschiede in allergenspezifischen IgE Antikörpern und Unterschiede in der Aktivierung von Mastzellpopulationen können anscheinend zu einer Varianz in der Ausprägung von Allergien führen. In einer kleinen Studie mit 46 Probanden konnte gezeigt werden, dass Personen mit einem positiven „Skin Prick Test“ (SPT) gegenüber Birkenpollenallergenen, die keine allergische

Rhinokonjunktivitis aufwiesen, innerhalb von 3 Jahren häufiger eine allergische Rhinokonjunktivitis entwickelten als Personen, die SPT negativ waren (Bodtger *et al.* 2003). Bodtger und seine Arbeitsgruppe schlossen daraus, dass IgE und Effektorzellen auch in asymptomatischen Probanden mit negativem SPT in der Mukosa vorhanden sind, diese aber unter physiologischen Bedingungen durch suppressive Mechanismen unterdrückt werden (Bodtger *et al.* 2003). Ob dies in der Genese von Allergien eine Rolle spielt, ist bisher nicht geklärt.

Tab. 1.2 Präformierte und neu synthetisierte Produkte von Mastzellen (modifiziert nach den Zusammenfassungen von Metz 2003, Metz *et al.* 2007).

Präformierte Mastzellprodukte	<i>de novo</i> synthetisierte Mastzellprodukte
Histamin	Zytokine:
Serotonin	Interleukine
Glykosaminoglykane:	IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8,
Heparin	IL-10, IL-13, IL-15, IL-16,
Chondroitinsulfat	GM-CSF,
Proteasen:	TNF- α ,
Chymase	TGF- β_1 ,
Tryptase	NGF,
Carboxypeptidase	IFN,
β -Hexaminidase	MIP-1 α , MIP-2,
TNF- α	RANTES
VEGF	ET-1
	Lipide:
	Prostaglandin D ₂ ,
	LTD ₄ , LTE ₄ , LTB ₄ ,
	PAF

ET=endothelin; GM-CSF= „granulocyte-macrophage colony stimulation factor“; IFN=Interferon; IL=Interleukin; LT=Leukotriene; MIP=„macrophage inflammatory protein“; NGF=„nerve growth factor“; PAF=„platelet-activating factor“; RANTES=„Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and Secreted“; TGF=„tumor growth factor“; TNF=Tumornekrosefaktor; VEGF=„vascular endothelial growth factor“.

1.3.4 Effektormechanismen von Mastzellen

Die oben dargestellte Aktivierung von Mastzellen (Abb. 1.1) führt im Wesentlichen zu drei sofort einsetzenden Effektormechanismen. Erstens kommt es zu der Freisetzung von bereits vorgeformten Mediatoren wie Histamin und Proteasen

über die Degranulation (zusammengefasst in Espinosa & Valitutti 2017), zweitens zur vermehrten Bildung von Lipidmediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen und drittens zur Induktion von Cytokinen (siehe Tab. 1.2.). Diese führen u.a. zur Bildung von vaskulären Adhäsionsmolekülen, die andere Immunzellen wie Leukozyten anlocken.

Die in der allergischen Sofortreaktion vor allem durch Mastzellen freigesetzten Botenstoffe Histamin, Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Leukotrien LTC₄ sind hauptsächlich für die typischen Reaktionen des Körpers auf die Allergene verantwortlich: Rhinitis (Ellis & Tenn 2018), Konjunktivitis (Elieh Ali Komi *et al.* 2017), Niesen, Fließschnupfen, Quaddeln der Haut (Church 2017) und, als maximale Reaktion, einen anaphylaktischen Schock (Muñoz-Cano *et al.* 2017). Bei der bei Asthmatikern gefundenen Bronchokonstriktion und vermehrten Schleimhautsekretion des Bronchialsystems als Reaktion auf Allergene ist die Rolle von Mastzellen noch wenig geklärt und spielt vermutlich nur bei einigen Formen des allergischen Asthmas eine Rolle (Church 2017).

1.3.5 Mastzellen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Mastzellen sind seit ihrer Entdeckung bekannt für ihre Rolle in allergischen Reaktionen (u.a. Church 2017). In den letzten Jahren wurde herausgefunden, dass Mastzellen zusätzlich an einer überraschend großen Anzahl unterschiedlichster Immunreaktionen beteiligt sind. Eine Vielzahl von Arbeiten konnte zeigen, dass Mastzellen für die Abwehr von bakteriellen und parasitären Infektionen wichtig sind (zusammengefasst von Abraham & St John 2010). Auch für die Abwehr von Malaria scheinen Mastzellen eine Rolle zu spielen, vermutlich indem sie Dendritische Zellen in einer Art aktivieren, dass diese wiederum "die richtigen" malariaspezifischen T Zellen generieren (Guermónprez *et al.* 2013). Mastzellen scheinen den Körper bei der Virusabwehr zu unterstützen, zum Beispiel bei Denguevirusinfektionen, indem sie natürliche Killerzellen rekrutieren (St John *et al.* 2011).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass Mastzellen an der Entstehung von Typ IV Allergie, der Kontaktallergie (Dudeck *et al.* 2011) und Autoimmunerkrankungen wie einer bestimmten Form der Arthritis involviert sind (Schubert *et al.* 2015). In Hinsicht auf Wundheilung und Karzinogenese wird die Rolle von Mastzellen

weiterhin diskutiert (Eyerich *et al.* 2018, Aller *et al.* 2019, Zimmermann *et al.* 2019).

Bei einem murinen Modell der Multiplen Sklerose, der experimentellen Autoimmunenenzephalomyelitis (EAE), sah es aus, als würden Mastzellen eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie dieser Autoimmunerkrankung spielen (Gregory & Brown 2006). Mit der Einführung von neuen mastzelldefizienten Mausmodellen, die nicht auf *c-kit* Mutationen beruhen, wurde die Wichtigkeit von Mastzellen in der Entstehung von EAE jedoch in Frage gestellt (Feyerabend *et al.* 2011, Costanza *et al.* 2012). Auch bei der Peritonitis waren vorerst Mastzellen als wichtiger Faktor in der Pathogenese identifiziert worden (Echtenacher *et al.* 1996, de Jonge *et al.* 2004, Snoek *et al.* 2012), was sich aber durch die Einführung der neueren, nicht auf *c-kit* Mutationen basierenden Mausmodelle nicht bestätigen ließ (Gomez-Pinilla *et al.* 2014). Woher diese Diskrepanz in den Ergebnissen kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Dagegen konnte die zentrale Rolle von Mastzellen bei der Entstehung von Anaphylaxie in sowohl dem *c-kit*-abhängigen Mausmodell, als auch in einem neuen, *c-kit*-unabhängigen Mausmodell bestätigt werden (Rodewald & Feyerabend 2012).

Nicht nur in der Pathogenese, sondern auch in der Toleranzinduktion des Immunsystems spielen Mastzellen eine Rolle (Lu *et al.* 2006). Des Weiteren gibt es inzwischen eine Vielzahl von Arbeiten, die das Zusammenspiel von Mastzellen mit sowohl dem angeborenen als auch dem adaptiven Immunsystem untersuchen (zusammengefasst in Metz *et al.* 2007+2008, Rodewald & Feyerabend 2012). Unter anderem interagieren Mastzellen mit Dendritischen Zellen, was bisher vor allem innerhalb des Zellnetzwerkes der Haut untersucht wurde (Sumpter *et al.* 2019).

1.4 IgE-unabhängige Mastzellaktivierung

Wie beschrieben, gibt es zusätzlich zu dem IgE-abhängigen Weg viele IgE-unabhängige Substanzen, die Mastzellen aktivieren (zusammengefasst von Frossi *et al.* 2004, Redegeld *et al.* 2018 sowie Abb. 1.1 und Tab. 1.1). Zum Beispiel können pathogenassoziierte Substanzen Mastzellen über Oberflächenrezeptoren wie TLRs IgE-unabhängig aktivieren und auch

verschiedene körpereigene Substanzen, z.B. das von Eosinophilen freigesetzte „major basic protein“ oder Substanz P, eine Degranulation in Mastzellen direkt über „Mas-related G-protein-coupled receptor (MRGPR)-X2“ induzieren (Munitz *et al.* 2003, Bader *et al.* 2014, Oliverea *et al.* 2018). Mastzellen können auch durch die in *in vitro* Versuchen häufig genutzte Positivkontrolle, A23187 Calcium Ionophore, nicht rezeptorabhängig zur Degranulation angeregt werden. Es wird dabei Calcium über die Mastzelloberflächenmembran ins Zellinnere transportiert und so die Zelle zur Exozytose bereits hergestellter Mediatoren wie Histamin angeregt (Bennett *et al.* 1979; Liu & Hermann 1978). Auch das Lektin ConA kann Mastzellen zum Degranulieren bringen, vermutlich indem es an die Saccharidregion der Fc Region von IgE bindet, was aufgrund der ConA Tetravalenz zu einem Crosslink der Fc ϵ RI führt (zusammengefasst in Lagunoff *et al.* 1983) oder aber über die direkte Aktivierung eines G Proteins (zusammengefasst in Munitz *et al.* 2003).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress, wie er unter Umständen während allergischen und anderen immunologischen Reaktionen auftritt, Mastzellen aktivieren kann (Ohmori *et al.* 1979, Swindle *et al.* 2002, Frossi *et al.* 2003). Es konnte gezeigt werden, dass Mastzellen durch den Rauch von Zigaretten zur Chemokinsynthese angeregt werden (Mortaz *et al.* 2008). Abraham und Kolleginnen fanden in nicht sensibilisierten Schafen eine Entzündungsreaktion nach intradermaler Injektion von Brevetoxin aus Dinoflagellaten, die bereits nach 20 min einsetzte und durch Diphenhydramin, einen H1 Blocker, inhibiert werden konnte. Sie vermuteten daher, dass Brevetoxin eine mastzellabhängige, aber IgE-unabhängige Reaktion in den Schafen hervorruft (Abraham *et al.* 2005).

Es gibt Hinweise, dass auch humane Mastzellen IgE-unabhängig stimuliert werden können. Ratten RBL Zellen, die mit dem humanen Fc ϵ RI transfiziert wurden, zeigen nach 24 h Kultivierung mit humanem IgE und nach 15-minütiger Stimulierung mit Aspirin, LPS, Lektinen oder viralen Bestandteilen eine deutlich höhere Freisetzung von Serotonin und 5-Hydroxytryptamine (5-HT) als ohne IgE Vorinkubation (Machado *et al.* 1996). Aber auch ohne IgE konnte eine sich signifikant von der Negativkontrolle unterscheidende Freisetzung von Serotonin in humanisierten RBL Zellen nach Stimulation mit Aspirin, LPS und einigen der getesteten Lektinen induziert werden (Machado *et al.* 1996). Im Gegensatz zu

Calcium Ionophore A23187, das humane Mastzellen aus Kolon (Lowman *et al.* 1988, He *et al.* 2004), Lunge und Tonsillen zur Histaminausschüttung brachte, konnten Substanz P, Morphin, Poly-L-Lysin und Compound 48/80 nur die Mastzellen aus Brust- und Vorhaut zur Histaminausschüttung anregen (Lowman *et al.* 1988), was nahelegt, dass Mastzellen aus unterschiedlichen Geweben sich in ihrer IgE-unabhängigen Degranulationsfähigkeit unterscheiden.

Da Pflanzenpollen Symptome auslösen können und eine Vielzahl an Substanzen beinhalten (Gilles *et al.* 2009a, Aglas *et al.* 2018) und Mastzellen durch eine Vielzahl IgE-unabhängiger Mechanismen aktiviert werden können, liegt der Verdacht nahe, dass einige Substanzen in den Pollen Mastzellen IgE-unabhängig aktivieren können. Daher sollte innerhalb dieser Arbeit untersucht werden, ob Pollenbestandteile direkt eine IgE-unabhängige Mastzellaktivierung hervorrufen können, und welche der biologisch sehr unterschiedlichen Substanzen möglicherweise zu einer direkten Mastzellaktivierung führt.

1.5 Gesamt IgE, spezifisches IgE und Allergien

In vielen Studien wiesen die meisten Allergiker spezifisches IgE im Serum auf. So fanden Stenius und Kolleginnen in Studien mit 31 Personen, die klinisch eine Allergie gegen Hausstaubmilben (*Dermatophagoides pteronyssinus*) hatten, und 95 Pollenallergikern eine Korrelation zwischen spezifischem IgE und der Größe der durch das jeweilige Allergen im SPT induzierten Quaddel (Stenius *et al.* 1971). In einer anderen Studie wurde in 98 % der 242 Personen mit allergischer Rhinokonjunktivitis bzw. allergischem Asthma auch spezifisches IgE gegen Birkenallergene im Serum nachgewiesen (Movérare *et al.* 2002). In die gleiche Richtung gehen die Ergebnisse von Brown und Kolleginnen, die Daten von 344 Teilnehmern einer amerikanischen Longitudinalstudie über obstruktive Lungenerkrankungen analysierten, die allergische Rhinokonjunktivitis, Asthma oder keine allergische Anamnese hatten. Sie fanden eine starke Korrelation zwischen dem Durchmesser der durch Bermudagrasallegene im SPT induzierten Quaddel und der Höhe des spezifischen IgEs im Serum (Brown *et al.* 1979). Ebenso konnten Cho und seine Arbeitsgruppe in 100 Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis zeigen, dass der SPT stark mit der Konzentration der jeweiligen spezifischen IgEs im Serum korrelierte (Cho *et al.* 2014).

Zusammengefasst konnte in mehreren Studien allergenspezifisches IgE im Serum der Mehrheit der Allergiker nachgewiesen werden.

Allerdings berichten im klinischen Alltag immer wieder Patienten über saisonal auftretendes Augen- und Nasenjucken sowie tränende und gerötete Augen, ohne dass bei ihnen eine Sensibilisierung auf Pollenallergene nachgewiesen werden kann. Auch in einigen Studien wurden Patienten identifiziert, die klinisch unter einer saisonal auftretenden allergischen Symptomatik leiden, aber kein allergenspezifisches IgE im Serum aufweisen. Wie oben beschrieben, findet sich in fast allen Studien ein kleiner Anteil von Personen mit allergischer Symptomatik, bei denen kein spezifisches IgE im Serum gefunden wird, und in einigen hatten bis zu 1/4 der Allergiker kein allergenspezifisches IgE im Serum. So fanden Stokes *et al.*, dass 8 von 33 untersuchten Patienten (24 %) mit positiven SPT und allergischer Anamnese gegen Traubenkraut kein gegen Traubenkraut gerichtetes IgE aufwiesen (Stokes *et al.* 2005). Auch in der Studie von Stenius gab es Patienten mit positivem SPT gegenüber Hausstaubmilben, aber ohne allergenspezifisches IgE im Serum (Stenius 1973). Und Canis fand bei 96 % bzw. 81 % der Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis einen positiven SPT auf Beifuß- bzw. Traubenkrautpollen aber in 32 % bzw. 90 % kein IgE gegen die Beifussallergene Art-V1 und Art-V2, bzw das Traubenkrautallergen Amb-V1 (Canis *et al.* 2012). Desgleichen wiesen 37 % der Allergiker/Asthmatiker einen positiven SPT gegen Beifuß (*Artemisia vulgaris*) auf, von denen aber nur 33 % bzw. 16 % IgE, spezifisch für das Antigen Art V1 bzw. Art V4, im Serum aufwiesen (Orovitg *et al.* 2011). In einer über 1000 Allergiker einschließenden Studie mit 19 Testallergenen hatten 24 % einen positiven SPT, aber kein mittels Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) nachweisbares spezifisches IgE (Wüthrich & Kopper 1975). Auch drei Patienten mit Nahrungsmittelallergie, ebenfalls meist eine Typ 1 Allergie, wiesen in einer Studie trotz positivem Provokationstest kein allergenspezifisches IgE auf (von Ta *et al.* 2011). In einer anderen Studie mit Patienten, die anamnestisch eine Latexallergie und einen positiven SPT auf Latextrakt hatten, fand sich bei 15 % kein latexspezifisches IgE im Serum (Blanco *et al.* 1998). Andererseits können Patienten ohne allergenspezifisches IgE, ohne positiven SPT und mit einer negativen allergischen Anamnese auf eine Pollenexposition allergisch reagieren (zusammengefasst von Khan 2009).

Zusammengefaßt haben einige "Allergiker" kein spezifisches IgE im Serum (Abb. 1.2), was darauf hinweist, dass IgE-unabhängige allergieähnliche Symptomen existieren.

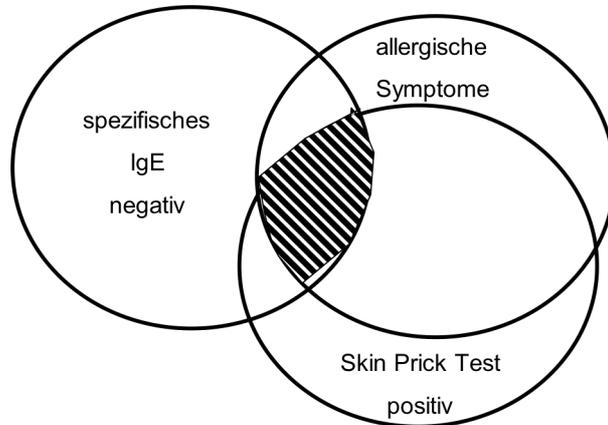


Abb. 1.2 Konstellationen von spezifischem IgE, Symptomen und Skin Prick Test. Die schraffierte Fläche bezeichnet die Patienten, die allergische Symptome aufweisen, einen positiven Skin Prick Test, aber kein allergenspezifisches IgE aufweisen.

1.6 Ziele der Arbeit

Es gibt Menschen, die klinisch eindeutig unter einer allergischen Rhinokonjunktivitis leiden, bei denen aber kein allergenspezifisches IgE nachweisbar ist. Da Allergien vom Typ I, zu denen die durch Pollen induzierte allergische Rhinokonjunktivitis gehört, aber durch spezifisches IgE vermittelt werden, leiden diese Patienten eventuell nicht unter einer IgE-vermittelten "herkömmlichen" Allergie. Einige Forschergruppen wiesen zudem nach, dass Pollen neben den eigentlichen Allergenen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Substanzen bestehen, die bei der durch Pollen induzierten Immunantwort, die nicht durch IgE vermittelt wird, eine Rolle spielen könnten. Des Weiteren existieren diverse biologische Stoffe, die Mastzellen, die Haupteffektorzellen allergischer Immunreaktionen, auch in Abwesenheit von IgE aktivieren können. Daraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Kann die Existenz von Patienten mit typischen allergischen Symptomen auf Pollen, die aber kein allergenspezifisches IgE aufweisen bestätigt werden?
2. Reagieren naive Mäuse auf Pollenextrakte mit einer Entzündung?
3. Sind Mastzellen an dieser polleninduzierten, IgE-unabhängigen Immunreaktion beteiligt?
4. Ist eine direkte Pollen/Mastzellinteraktion für die Immunreaktion essentiell oder sind andere Zellen ausschlaggebend?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden einerseits klinische Daten von Patienten mit Symptomen einer Pollenallergie analysiert und andererseits im Mausmodell überprüft, ob durch wässrige Pollenextrakte eine direkte, IgE-unabhängige Immunreaktion ausgelöst wird und ob Mastzellen daran beteiligt sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Wenn nicht anders vermerkt bei Raumtemperatur gelagert.

Anti-CD117 PE (Klon 2B8, 12-1171) und anti-Fc ϵ R1a FITC (Klon MAR1, 115898, beide eBioscience, San Diego) 4-8°C

Bidest (aus der Charitéanlage)

BSA Fraktion V, standard grade, lyophilisiert (Serva, Heidelberg, 11930) 4-8°C

Ethanol, 70%, vergällt (Roth, Karlsruhe, T913.3)

FCS (Biochrom AG, Berlin, S0115), inaktiviert -20°C

Giemsafärbelösung (Merck, Darmstadt, 1.09204.0500)

α -D(+)-Glukose Monohydrat (Roth, Karlsruhe, 6780.1)

HEPES (Sigma, Steinheim, H3375) 4-8°C

KCl (Merck, Darmstadt, 1.04936.1000)

L-Glutamin, 200 mM, low endotoxin (Biochrom AG, Berlin, K0283) 4-8°C

IL-3 rekombinant (eBioscience 34-8031-85), Stock 10 μ g/ml PBS/0,1 % BSA 80°C

IMDM Medium (Millipore, Merck, Darmstadt, SCM 063B)

Ionophore A23187 (Sigma, Steinheim, C7522) -20°C

MgCl₂ (Merck, Darmstadt, 9651155)

Monothioglycerol (Sigma, M6145)

NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, 63461000)

Na₂HPO₄ (Sigma, Steinheim, S0876)

Dinatriumtetraborat-10-hydrat (Merck, Darmstadt, 6308)

PBS, Dulbeccos ohne Ca²⁺, ohne Mg²⁺ (PAA Laboratories, H15-002)

Penicillin/Streptavidin, 10 000 U/ml / 10000 μ g/ml (Biochrom AG, A2213) -20°C

p-NAG (Sigma, Steinheim, N9376)

Pricktestlösungen (ALK, Linz, Österreich) 4-8°C

Saponin (Sigma, Steinheim, S7900)

Toluidinblau (Sigma, Steinheim, T3260)

Triton X-100 (Sigma USA, T8532)

RPMI 1640 (Biochrom AG, FG1215) 4-8°C

rekombinantes SCF (R&D 455-MC), Stocklösung 10 μ g/ml PBS/0,1 % BSA -80°C

Zitronensäure (Sigma, Steinheim, C2404)

2.2 Spezifisches IgE in Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis

Die Konzentration von birken- und traubenkrautspezifischem IgE im Serum von ambulanten Patienten des Allergie Zentrums der Charité wurde mittels gemessen ImmunoCAP (Phadia, Freiburg) gemessen und mir zur Verfügung gestellt. Die Patienten hatten anamnestisch eine Allergie gegen Birke (146 Patienten) oder Traubenkraut (38 Patienten). Alle Patienten wiesen einen positiven Hautpricktest („skin prick test“, SPT) auf das jeweilige Allergen auf.

2.3 Aufreinigung von wässrigen Pollenextrakten

Innerhalb dieser Arbeit wurden wasserlösliche Pollenextrakte von folgenden Pflanzen verwendet:

Beifußblättriges Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*, Amb-APE) - Englisch: "ragweed"

Gemeiner Beifuß (*Artemisia vulgaris*, Art-APE) - Englisch: "mugwort"

Birke (*Betula pendula*, Synonyme: *B. verrucosa*, *B. alba*, Bet-APE) - Englisch: "birch"

Kiefer (*Pinus spp.*, Pin-APE) - Englisch: "pine"

Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*, Phl-APE) - Englisch: "timothy grass"

Des Weiteren wurden wasserlösliche Pollenextrakte größenfraktioniert in den Experimenten verwendet, in Fraktionen größer und kleiner als 3 kDa. Die Extrakte wurden von Fr. Prof. Dr. med. Traidl-Hoffmann und deren Arbeitsgruppe in der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Technischen Universität München bereitgestellt und wie beschrieben aufgereinigt (Amb-APE und Art-APE siehe Gilles *et al.* 2011, Bet-APE siehe Gilles *et al.* 2009a, Phl-APE siehe Blume *et al.* 2009). Die Pollen wurden für 30 min bei 37 °C in einer Konzentration von 10 mg/ml in Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 20 µg/ml Gentamicin, 500 µmol/l 2-Mercaptoethanol) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (10 min, 3000 x g) und der Überstand mittels eines 0,2 µm Filters filtriert und in einer Konzentration von 50 mg/ml in D-PBS aliquotiert bei –80 °C gelagert. Die sterile Suspension wird im weiteren als APE ("aqueous pollen extracts", APE) bezeichnet. Die APEs wurden. Ein Teil der APEs wurden vorher in Fraktionen von größer und kleiner 3 kDa fraktioniert. Dazu

wurde die APE mittels YM-3 Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore, Schwalbach, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers separiert. Nach der Separation wurden die Fraktion kleiner als 3 kDa ($APE_{<3kDa}$) und die Fraktion größer als 3 kDa ($APE_{>3kDa}$) aliquotiert bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4 Mäuse

In den in dieser Arbeit geschilderten Versuchen wurden ausschließlich Mausweibchen verwendet, da es für die Versuche wichtig war, dass die Ohren frei von Wunden sind, wie sie bei Männchen durch Kämpfe oftmals vorkommen. Folgende Mäuse aus eigener Zucht wurden verwendet: C57BL/6 Mäuse, Wildtypmäuse vom Typ WBB6F1-+/+ (im folgenden *kit*+/+ Mäuse genannt) und mastzelldefiziente WBB6F1-*Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse (im folgenden *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse genannte). Die *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse weisen eine spontan aufgetretene Doppelmutation des SCF Rezeptors auf, der zu einer Unterbrechung der durch den Rezeptor normalerweise induzierten Signalkaskade führt. Das führt dazu, dass *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse keine Mastzellen aufweisen (Kitamura *et al.* 1978).

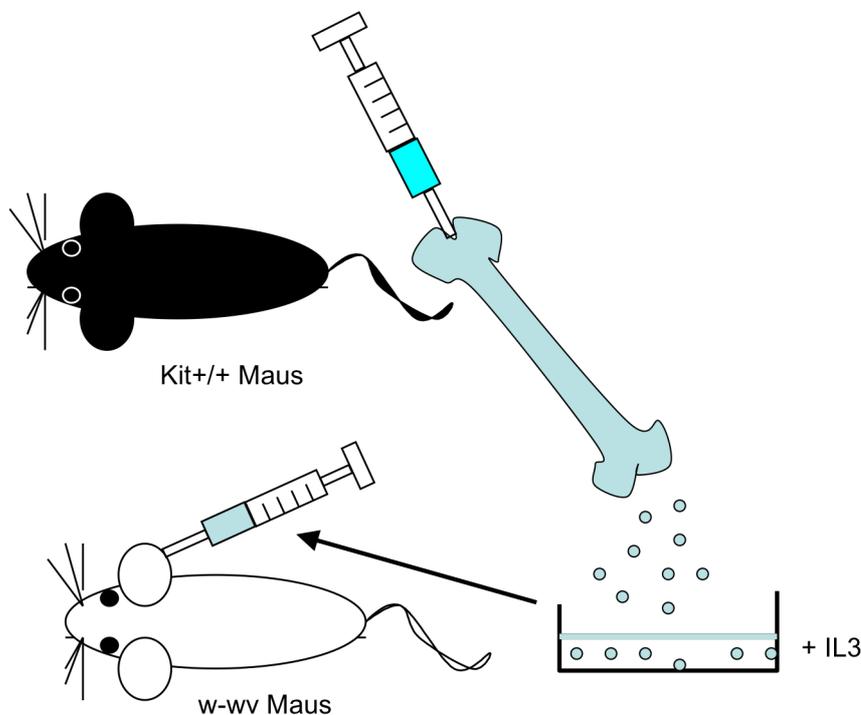


Abb. 2.1 Lokale Rekonstitution von *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen mit Mastzellen. Zur Generierung der Mastzellen aus dem Knochenmark ("BMCMC") wurden Zellen aus dem Knochenmark von *kit*+/+ Mäusen gelöst und mit IL-3 vier bis sechs Wochen kultiviert. Anschließend wurden zur lokalen Rekonstitution von mastzelldefizienten *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen mit Wildtyp-Mastzellen pro Ohr 1×10^6 BMCMCs von *kit*+/+ Wildtypmäusen in $20\text{ }\mu\text{l}$ 0,9% NaCl lokal ins Ohr injiziert.

Um zu beweisen, dass die in den Experimenten gefundenen Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und mastzelldefizienten Mäusen auf die An- bzw. Abwesenheit von Mastzellen zurückzuführen sind und nicht auf ein anderes immunologisches Defizit der *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse, wurden die mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäuse lokal mit Mastzellen rekonstituiert (Abb. 2.1). Zu diesem Zweck wurden vier bis fünf Wochen vor Pollenexposition in jedes Ohr 1×10^6 BMCMCs in 20 μ l 0.9 % NaCl injiziert, also pro *Kit^W/Kit^{W-v}* Maus 2×10^6 BMCMCs aus Wildtypmäusen (siehe auch Metz *et al.* 2006, Nakano *et al.* 1985).

Alle Mäuse wurden zu dritt bis sechst in Versuchstierkäfigen der Versuchstierställe der Charité in der Hessischen Straße unter speziellen pathogenfreien Bedingungen, bei konstanten klimatischen Bedingungen unter einem 12 Stunden Tag-Nacht Zyklus gehalten. Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten mit Genehmigung des Lageso (T0347/05 für die Gewinnung von BMCMCs und PCMCs für die *in vitro* Versuche; G0323/12 für die Entzündungsreaktion durch Pollen *in vivo*).

2.5 BMCMCs für *in vitro* Experimente und lokale Rekonstitution von mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-v}* Mäusen mit Mastzellen

Femur und Tibia von 6-12 Wochen alten *Kit* *+/+* Mäusen wurden präpariert und am Hüftgelenke disloziert, desinfiziert die Kondylen abgeschnitten. Das Knochenmark wurde mittels 10 ml Spritze mit einer 25 G Kanüle und Zellkulturmedium (IMDM) aus den Knochen gespült. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml Stabpipette wurde das Knochenmark aufgebrochen und anschließend bei 300 g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Pro Maus wurden die Zellen in 20 ml Vollmedium (IMDM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0.1 % Monothioglycerol, 10 ng/ml rekombinantes IL-3) resuspendiert und in eine 25 cm² Gewebezellkulturflasche überführt. Bis zur Verwendung nach 4-6 Wochen wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO² in humider Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Zweimal pro Woche wurden je nach Zelldichte (Ziel ca. 1 Mio Zellen/ml) und Mediumqualität ein Mediumwechsel oder nur eine Mediumzugabe (inklusive IL-3) durchgeführt und die Zellen bei Bedarf in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Die Reinheit der BMCMCs wurde mittels Oberflächenexpression von c-kit (CD117, anti-CD117 PE) und FcεR1a (anti-FcεR1a FITC) im Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) festgestellt und nur Kulturen mit einer Reinheit über 95 % verwendet.

2.6 PCMC für *in vitro* Versuche

Die Freisetzung von β-Hexaminidase ist ein Maß für die Degranulation von MCs. Zur Gewinnung von peritonealen MCs ("peritoneal cultured mast cells", PCMCs) für die *in vitro* β-Hexaminidasefreisetzungsversuche wurden *kit*^{+/+} Mäuse durch Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Bauchfell wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, das Peritoneum freigelegt und 5 ml RPMI Medium mit 5 ml Luft mittels einer 26G Kanüle in die Bauchhöhle injiziert. Anschließend wurde der Bauch für ca. 2-3 min massiert und die Flüssigkeit aus dem Peritoneum wieder abgezogen. Die peritoneale Lavage wurde auf Eis gekühlt, mit filtrierter Kimura Färbung (25 mg Toluidinblau, 25 ml 1,8 % NaCl, 11 ml Ethanol, 14 ml Bidest, 2,27 ml gesättigtes Saponinlösung in 50 % Ethanol, 22,7 ml 0,06 M NaH₂PO₄ x H₂O-Lösung) angefärbt (Kimura *et al.* 1973) und die Zellkonzentration mittels Neubauerkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm (300 x g) wurden die Zellen in komplettem RPMI Medium (500 ml RPMI, 10% FCS, 11 µl α-Monothioglycerol, 1 % Penicillin/Streptavidin) mit 10 ng/ml IL-3 und 30 ng/ml SCF in einer Konzentration von ca. 10⁵ Zellen in 25 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. An Tag zwei wurde der Überstand verworfen und neues komplettes Medium mit IL-3 und SCF zugegeben. An Tag fünf wurden 5 ml neues komplettes Medium mit IL-3 und SCF zur bereits bestehenden Kultur zugegeben. Für die Versuche wurden die Zellen am achten oder neunten Tag geerntet.

2.7 Intradermale Injektion von Pollenextrakten und Ohrdickenmessung

Zu Beginn des Versuchs wurden den weiblichen Mäusen unter Isofluran-inhalationsnarkose als erstes die Ohrdicken zum Zeitpunkt 0 gemessen mittels eines Dickenmessgeräts (Mitutoyo, USA, No 99MAG012B, Series 547,7300, 0 – 0.05 Inch, 0.0001 Inch Einteilung, +/- 0.0002 Genauigkeit). Anschließend wurden intradermal in je ein Ohr 10 µg bis 1000 µg APE in 20 µl PBS Puffer appliziert. Als Negativkontrolle wurden in den meisten Versuchen in das andere Ohr 20 µl PBS

ohne Pollen intradermal injiziert. Nur in den beiden Versuchen mit den mit BMCMCs rekonstituierten Tieren wurde Kontrolltieren das Vehicle PBS in beide Ohren injiziert. Die Versuche wurden mit gesamten wässrigen Pollenextrakten (APE) und größenfraktionierten Extrakten $APE_{<3kDa}$ oder $APE_{>3kDa}$ der Birke (*Betula pendula*, Bet-APE) und, in einigen Versuchen, des Beifußes (*Artemisia vulgaris*, Art-APE) durchgeführt..

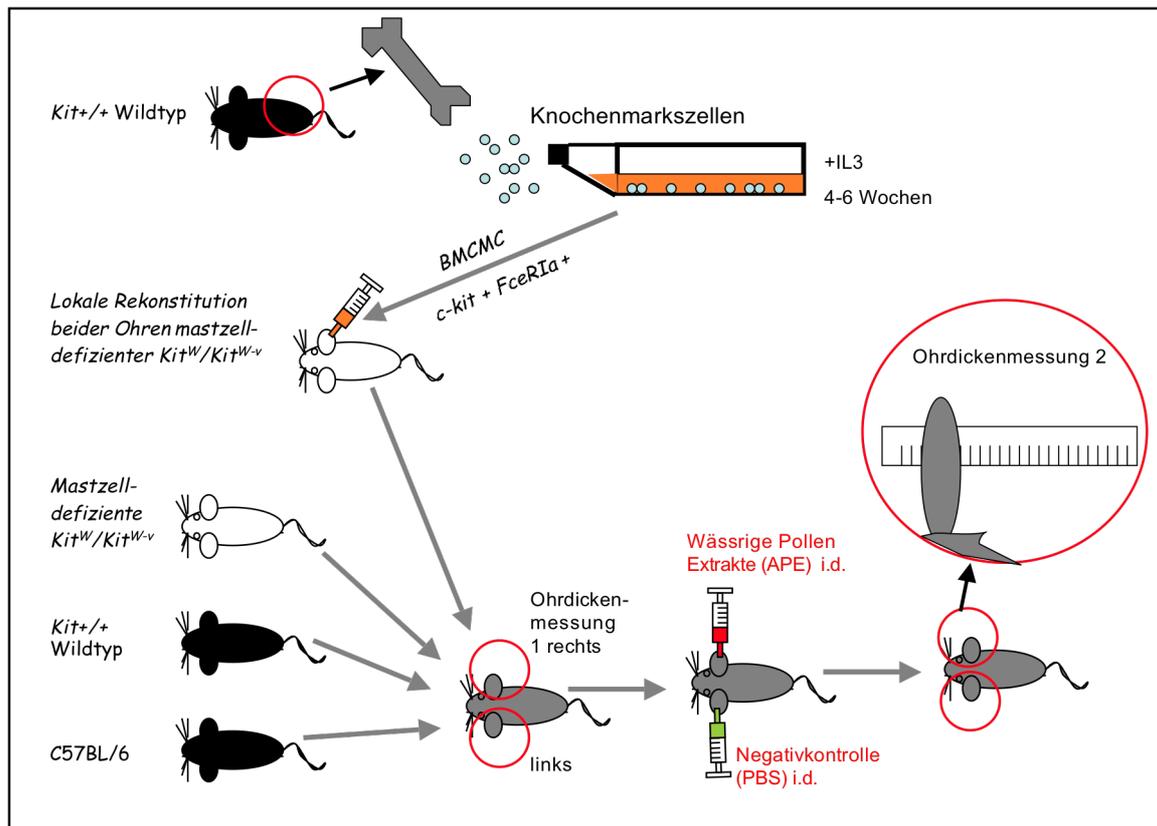


Abb. 2.2 Schema der intradermalen Injektion von Pollenextrakten. Je nach Versuch wurden weibliche C57BL/6 Mäuse, *kit*^{+/+} Wildtypmäuse, mastzelldefiziente *Kit*^W/*Kit*^{W-v} sowie *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäuse, die vor der Pollenexposition mit Mastzellen aus dem Knochenmark (BMCMCs mit IL-3 kultiviert, c-kit und FcεRa doppelpositiv, mindestens 95% rein) lokal rekonstituiert wurden verwendet. Es wurden 20 µl wässrige Pollenextrakte in das eine und PBS als Negativkontrolle in das andere Ohr intradermal unter Inhalationsnarkose injiziert. Nur in zwei Experimenten wurde in beide Ohren Pollenextrakt und in beide Ohren der Negativkontrolltiere PBS injiziert. Die Ohrendicke beider Ohren wurde jeweils vor Injektion, sowie 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h nach intradermaler Injektion gemessen.

Nach intradermaler Injektion wurde die Dicke beider Ohren 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h nach Injektion gemessen (Abb. 2.2) und die Basisdicke zum Zeitpunkt 0 von der Dicke nach Schwellung abgezogen, um den durch die Injektion der Pollenextrakte verursachten Dickenzuwachs zu berechnen. Da der Ohrschwellungsmesser amerikanische „Zehntel-Inches“ misst, wurde die in

Zehntausendstel inches gemessene Schwellung mit einem Faktor von 2,54 multipliziert, um die Dicke in μm zu berechnen.

2.8 Histologie und Alkaline Giemsa-Färbung von Mausgewebe

Zur Anfertigung der Ultradünnschnitten für histologische Untersuchungen wurden innerhalb eines weiteren Experimentes eine Stunde nach Injektion in die Mausohren von 100 μg Pollenextrakt in 20 μl PBS, bzw. nur PBS als Negativkontrolle, die Mäuse mit Isofluran betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Ohren wurden in Karnovsky's K2 Lösung (2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd, 0,1 M Dimethylarsinsäurepuffer („Cacodylate buffer“), 0.025 % CaCl_2 , pH 7.4) fixiert. Die Ultradünnschnitte wurden freundlicherweise von Fr. Schrade, Mitarbeiterin der Elektronenmikroskopie des Virchow Klinikums, angefertigt und auf Objektträger verbracht. Zur Färbung wurden die Objektträger 40 min in alkaliner Giemsa-Färbelösung (100 ml Giemsalösung, 450 ml 2 % Natriumborat, pH 8,2) gefärbt, in Wasser gespült, mit 50 % Ethanol behandelt, um die unspezifische Färbung zu entfernen, in destilliertem Wasser gewaschen und bei 60 °C für 2 Stunden getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Xylene getaucht, eingedeckelt und bei 100-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Es wurde jeweils ein Ohrschnitt pro Maus untersucht und die Anzahl von „nicht degranulierten“, „moderat degranulierten“ und „stark degranulierten“ Mastzellen gezählt und zueinander in prozentualen Bezug gesetzt.

2.9 *In vitro* Freisetzung von β -Hexaminidase durch Mastzelldegranulation nach Inkubation mit Pollenextrakten

Das Protokoll ist ein modifiziertes Protokoll nach Ortega *et al.* (1989). 200 000 BMCs (siehe Abschnitt 2.4) oder PCMCs (siehe Abschnitt 2.5) von *kit*^{+/+} Wildtypmäusen wurden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 mit wässrigen Extrakten von Beifußpollen (Art-APE) oder Birkenpollen (Bet-APE) in 100 μl in einer Mikrotiterplatte ("96 well plate") inkubiert (Abb. 2.3). In verschiedenen Experimenten wurden jeweils Endkonzentrationen von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Als Positivkontrolle wurde 1 μM Ionophore A23187 (Sigma) (Stammlösung $2 \cdot 10^{-3}$ M) verwendet.

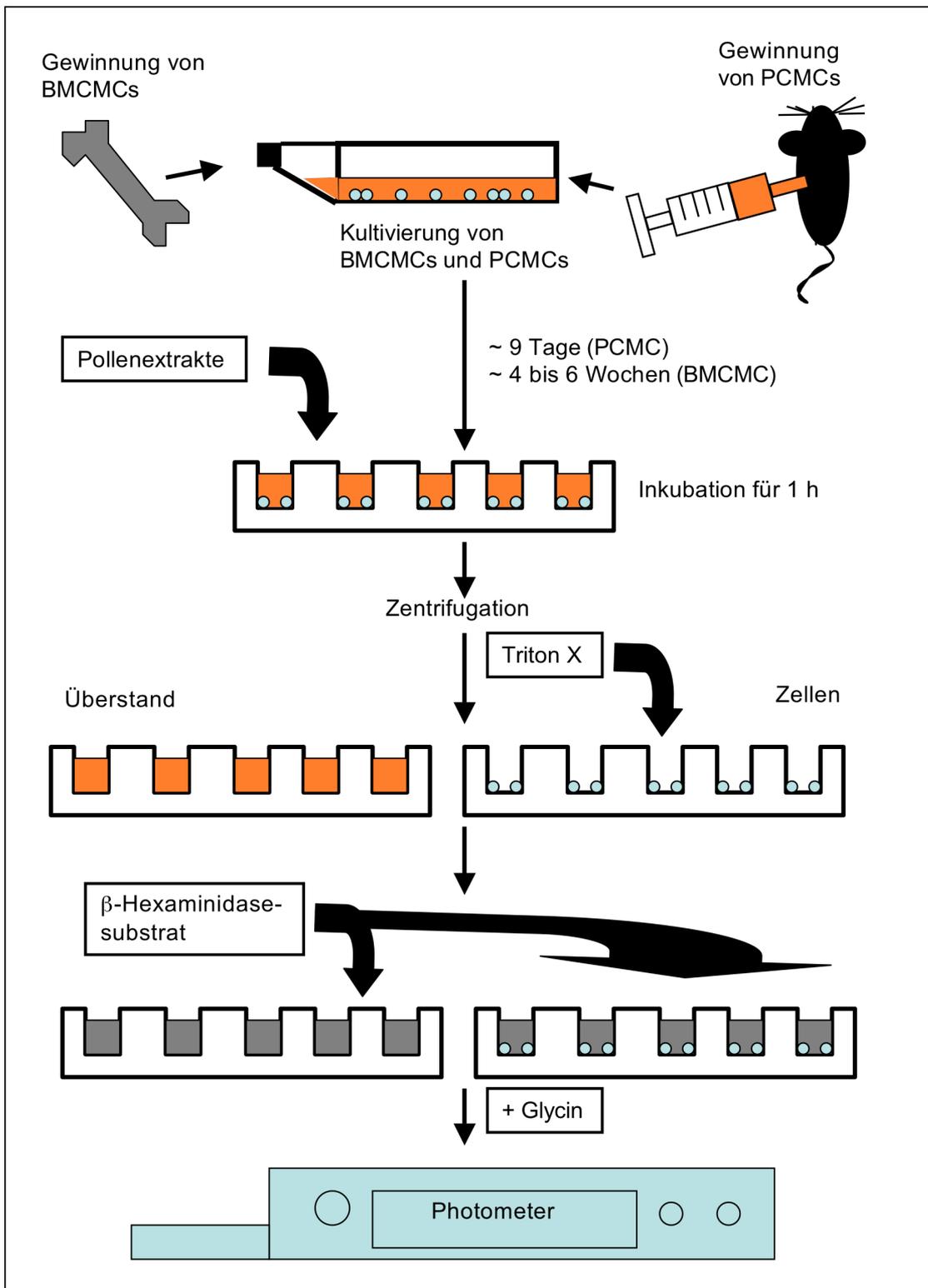


Abb. 2.3 β -Hexaminidase Assay als Mastzelldegranulationsassay. Schematische Übersicht über den β -Hexaminidase Assay. Für Details siehe Abschnitt 2.9 Material und Methoden.

Als Negativkontrolle und Lösungspuffer wurde Tyrodes Puffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,4 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, pH 7,4) mit frisch zugesetztem 5,6 mM Glukose und 0,01 % BSA benutzt. Anschließend wurde die Freisetzung von β -Hexaminidase durch die Mastzellen gemessen, indem nach der Inkubationszeit die Rundboden 96-Well Platte (Greiner) bei 1200 rpm (901 x g) 5 min zentrifugiert wurde, 20 μ l der Überstände in eine weitere 96-Well Platte (Flatbottom, Maxisorb, Nunc) überführt und anschließend der Restüberstand verworfen wurde. Die verbleibenden Zellen wurden mittels 100 μ l/Well Lysepuffer (0,5 v/v % Triton-X in Tyrodes Puffer) lysiert, 50 μ l/Well Zelllysate ebenfalls in die 96-Well Platte überführt und

jeweils 50 μ l/Well para-Nitrophenyl-N-Acethyl- β -D-Glukosamin (p-NAG) Substrat (4 mM p-NAG in 70 ml 0.2 M Na₂HPO₄ und 20 ml 0.4 M Citric Acid pH 4,5) zu Zelllysate bzw. Überstand hinzupipettiert und bei 37 °C 40 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mittels 140 μ l/Well 0,2 M Glycine (pH 10,7) gestoppt. Die Menge an β -Hexaminidase in Überstand und Zelllysate wurde indirekt mittels Messung der optischen Dichte (OD) von photometrisch messbarem ionisiertem 4-Nitrophenol bei 405 nm im Photometer Dynex MRX Version 1.33 (Dynatech, Chantilly, USA) gemessen. Dabei wurde ausgenutzt, dass β -Hexaminidase das Substrat p-NAG in 4-Nitrophenol umsetzt. Die Freisetzung von β -Hexaminidase wurde zur Gesamtmenge der im Mastzellenlysate befindlichen β -Hexaminidase folgendermaßen in Beziehung gesetzt:

$$\% \text{ Degranulation} = (\text{OD}_{\text{Überstand}} / (\text{OD}_{\text{Überstand}} + \text{OD}_{\text{Zelllysate}})) * 100$$

Nur Experimente, in denen die Negativkontrolle (Spontanfreisetzung) unter 8 %, und die Positivkontrolle durch Ionophore mindestens 25 % betrug, wurden berücksichtigt (> 85 % der Experimente).

2.10 Graphiken und Statistik

Die Graphiken wurden mit Power Point 11.0, Excel 11.0 (beide Microsoft, Redmond, Washington, USA) und Graph Pad Prism (GraphPad Software, La Jolla, Californien, USA) angefertigt. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS (IBM, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Die Ohrdicke der Mäuse war in den

meisten, aber nicht in allen Behandlungsgruppen normal verteilt (Shapiro Wilks Test), daher wurde für die Vergleiche der Mittelwerte der Mann-Whitney U Test zur Berechnung der p-Werte herangezogen. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Gezeigt sind, wenn nicht anders vermerkt, arithmetische Mittelwerte und Standardfehler (siehe auch Abbildungslegenden).

3 ERGEBNISSE

3.1 Einige Patienten mit saisonalen allergischen Symptomen und einem positiven Pricktest auf Birke oder Traubenkraut weisen kein spezifisches IgE auf

Innerhalb dieser Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob bei allen Patienten mit positivem Pricktest („skin prick test“, SPT) auf Birke bzw. Traubenkraut und einer Rhinokonjunktivitis auch spezifisches IgE gegen Birke oder Traubenkraut im Serum nachgewiesen werden kann.

Zu diesem Zweck wurden ambulante Patienten mit positiven SPT auf Birke (*Betula pendula*) bzw. auf das beifußblättrige Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*), die ebenfalls eine allergische Anamnese mit typischer saisonal auftretender Rhinokonjunktivitis aufwiesen, auf pollenspezifisches IgE im Serum untersucht. Im Weiteren werden die Patienten, die einen positiven SPT und eine positive allergische Anamnese aufweisen, als Allergiker bezeichnet.

Von den 146 ambulanten Birkenpollenallergikern hatten 19 (13 %) kein nachweisbares spezifisches IgE gegen Birkenallergene im Serum (Tab. 3.1). Ebenso hatten von den 37 Traubenkrautpollenallergikern 11 (29 %) kein nachweisbares spezifisches IgE gegen Traubenkraut im Serum.

Die Konzentration von allergenspezifischem IgE im Serum wird nach sogenannten CAP Klassen aufgeteilt, wobei die CAP Klasse 0 kein nachweisbares spezifisches IgE im Serum umfasst, und es bei Patienten mit CAP 0 damit keinen Hinweis auf eine atopische Genese der Symptomatik gibt. Ab CAP 4 (>17,5 kU/l) spricht man von einer sehr hohen spezifischen IgE Konzentration im Serum. Der größte Anteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten hatte eine mittlere Konzentration von spezifischem IgE im Serum (55 Birkenallergiker CAP 3 und 11 Traubenkrautallergiker CAP 2). 24 der Birkenallergiker (16,4 %) und drei der Traubenkrautallergiker (8,1 %) hatten ein sehr hohes spezifisches Serum IgE gegen Birken- bzw. Traubenkraut von über 50 kU/l (Tab. 3.1). Bei 13 % der Birkenallergiker und 29 % der Traubenkrautallergiker konnte kein spezifisches IgE gefunden werden (Tab.3.1).

Zusammengefasst kann bei einem Teil der Birken- und Traubenkrautallergiker kein spezifisches IgE gegen Birke bzw. Traubenkraut im Serum nachgewiesen

werden. Das deutet darauf hin, dass IgE-unabhängige Mechanismen eine Rolle bei saisonalen pollenassoziierten Symptomen spielen können.

Tab. 3.1 Spezifisches IgE in Allergikern. Verteilung der Patienten nach der Konzentration von IgE spezifisch auf die jeweiligen Allergene (< 0,35 bis > 100 kU/l) in Patienten mit positiven Hauttest (SPT) auf Birke bzw. Traubenkraut und allergischer Anamnese. Modifiziert, mit Erlaubnis von Elsevier übernommen aus "Journal of Investigative Dermatology 2011, Volume 131 (4), 987-990. Martin Metz, Stefanie Gilles, Astrid Geldmacher, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann, Marcus Maurer: Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation."

CAP Klasse	Spezifisches IgE (kU/l)	Patienten mit Allergie gegen Birke	Patienten mit Allergie gegen Traubenkraut
0	< 0,35	13,0 %	29,0 %
1	0,35 – 0,69	3,4 %	5,4 %
2	0,70 – 3,49	12,3 %	29,7 %
3	3,50 – 17,49	37,7 %	18,9 %
4	17,50 – 49,99	17,1 %	8,1 %
5	50,00 – 100,00	8,9 %	5,4 %
6	> 100,00	7,5 %	2,7 %

3.2 Birkenpollen und Beifußpollen verursachen eine IgE-unabhängige Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen, die in Stärke und Kinetik einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt

Wie im obigen Abschnitt geschildert, gibt es Menschen mit typischen Symptomen einer allergischen Rhinokonjunktivitis und einem positiven SPT, in deren Blut kein allergenspezifisches IgE nachzuweisen ist. Das könnte bedeuten, dass Pollenbestandteile typische Symptome von Typ I Allergien auch IgE-unabhängig auslösen können. Um diese Hypothese prüfen zu können, wurde ein murines Modell der mastzellabhängigen Hautentzündung verwendet. Hierzu wurde in naiven, nicht sensibilisierten Mäusen, die kein spezifisches IgE gegen Pollenallergene aufweisen, aufgereinigte wässrige Pollenextrakte (Bet-APE, Art-APE) ohne zusätzliche Adjuvantien intradermal in die Ohren gespritzt und die Ohrdicke als Maß der Entzündung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion gemessen.

Im Gegensatz zu der Injektion von PBS, führte die Injektion von Bet-APE zu einer deutlichen Entzündungsreaktion mit einer maximalen Ohrschwellung nach 1 Stunde (h). Sie betrug $130 \mu\text{m} (\pm 5,7 \mu\text{m SE})$ und nahm innerhalb der nächsten 47 Stunden sukzessive ab. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach Injektion von Bet-APE war die Schwellung des Ohres, in das die Pollenextrakte gespritzt wurden, bei jeder der Messungen signifikant höher als die Schwellung der Ohren, in die PBS gespritzt wurde (Abb. 3.1, $p < 0,001$). Nach 24 h war die Schwellung der Ohren soweit zurückgegangen, dass sie sich nicht mehr signifikant unterschied von der Ohrschwellung der Kontrollohren (Abb. 3.1, $p = 0,257$ zum Zeitpunkt 24 h, $p = 0,114$ 48 h nach Injektion). Auch Beifußpollen führten in C57BL/6 zu einer deutlichen Ohrschwellung ($132,1 \mu\text{m} \pm 29,3 \mu\text{m SD}$ Art-APE versus $43.2 \pm 6.7 \mu\text{m SD}$ Vehicle PBS, 1 h nach Injektion, 1 Exp. $N=3-4$, $p = 0,05$ (Mann-Whitney U Test), Daten nicht gezeigt).

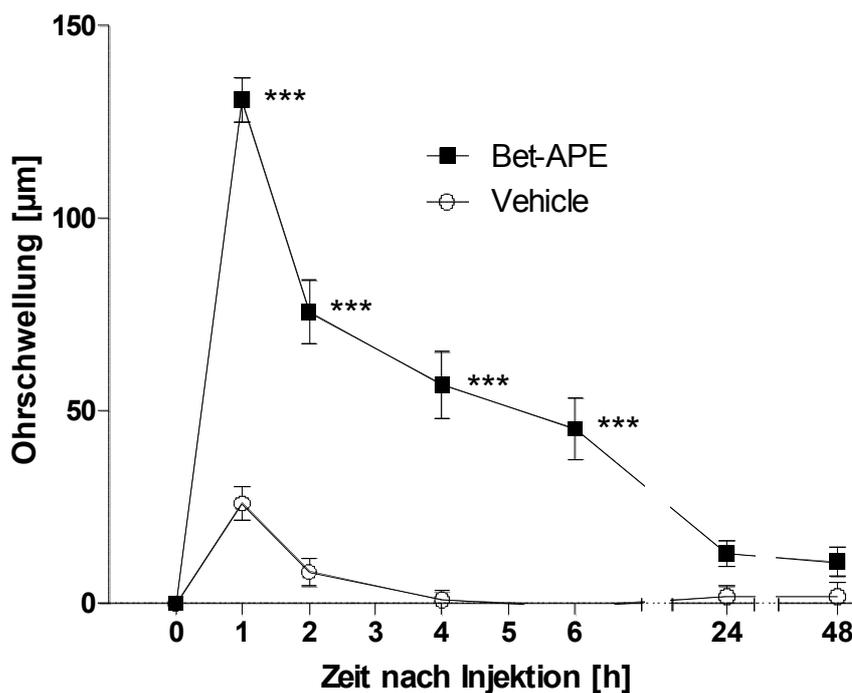


Abb. 3.1 Birkenpollenextrakte verursachen eine IgE-unabhängige Entzündungsreaktion in Ohren von Wildtypmäusen. 100 µg wässrige Pollenextrakte der Birke (Bet-APE) oder der Lösungspuffer PBS alleine wurde in jeweils ein Ohr von C57BL/6 Mäusen injiziert (Exp V6, $n=5-6$ Ohren Bet-APE / 6 Ohren PBS) oder jeweils in ein Ohr PBS und in das andere Bet-APE (Exp V5, $n=3$ Ohren Bet-APE / 3 Ohren PBS+V9, $n=2$ Ohren Bet-APE / 2 Ohren PBS, V9 Messungen nur bis 6 h nach Injektion). Anschließend wurde in zeitlichen Abständen die Dicke der Ohren gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Mann-Whitney U Test Bet-APE versus Vehicle PBS: *** $p < 0,001$, ohne Sternchen = nicht signifikant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Pollenextrakt in der Haut von Mäusen eine Entzündungsreaktion hervorruft, die in Stärke und Kinetik sehr einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt, wie sie im Mausmodell einer klassischen IgE-vermittelten Entzündungsreaktion wie der passiven kutanen Anaphylaxie zu finden ist. Bei der passiven kutanen Anaphylaxie kommt es in der sensibilisierten Maus 1 Stunde nach Allergengabe zu einer maximalen Ohrschwellung, die innerhalb 6 Stunden komplett rückläufig ist. Diese schnell ablaufende Entzündungsreaktion ist abhängig von Mastzellen (Giménez-Rivera *et al.* 2014). Dies ist der erste Hinweis darauf, dass die in der vorliegenden Arbeit gefundene Entzündungsreaktion im Ohr ebenfalls von Mastzellen abhängig sein könnte, die durch ihre zügige Freisetzung von u.a. Histamin auch ohne vorherige Sensibilisierung, also auch ohne IgE entscheidend zu dieser schnell einsetzenden Entzündungsreaktion beitragen.

3.3 Die von Birkenpollenextrakten verursachte Entzündungsreaktion ist assoziiert mit einem hohen Anteil an degranulierten Mastzellen in der Haut

Um zu überprüfen, ob Mastzellen tatsächlich in nicht sensibilisierten Mäusen an einer pollenextraktinduzierten Entzündungsreaktion involviert sind, wurden in einem weiteren Experiment histologische Schnitte von den Mäuseohren zum Zeitpunkt der maximalen Schwellung, also 1 Stunde nach Polleninjektion, angefertigt und histochemisch mit alkaliner Giemsa gefärbt. In den histologischen Schnitten wurde dann der Anteil von degranulierten Mastzellen durch quantitative Histomorphometrie bestimmt. Da in den weiteren Experimenten auch mastzelldefiziente Mäuse untersucht werden sollten, wurden bereits für dieses Experiment die Wildtypgeschwister der mastzelldefizienten Mäuse, also die *kit*^{+/+} Mäuse (siehe Material und Methoden) untersucht.

Durch die intradermale Injektion von 100 µg wässrige Pollenextrakte der Birke (Bet-APE, siehe Material und Methoden) in die Ohren wurde im Vergleich zu Injektionen mit dem Lösungspuffer PBS eine deutliche Schwellung der Ohren induziert. In den histologischen Schnitten der Ohren, in die Bet-APE injiziert wurde, konnte eine mit 48 % (\pm 9 % SD) signifikant höhere Anzahl von stark degranulierten Mastzellen gefunden werden im Vergleich zu den 27 % (\pm 9 % SD) stark degranulierten Mastzellen in den mit PBS injizierten Ohren (Abb. 3.2, p <

0,01, Mann-Whitney U Test). Dazu passend ist der Anteil an nicht degranulierten Mastzellen mit 47 % (\pm 5 % SD) signifikant höher in den mit dem Vehicle PBS injizierten Ohren als die 20 % (\pm 10 % SD) in den polleninjizierten Ohren (Abb. 3.2, $p < 0,005$, Mann-Whitney U Test).

Zusammengefasst führt die Injektion von wasserlöslichen Pollenextrakten zur Degranulation von Mäusehautmastzellen *in vivo*.

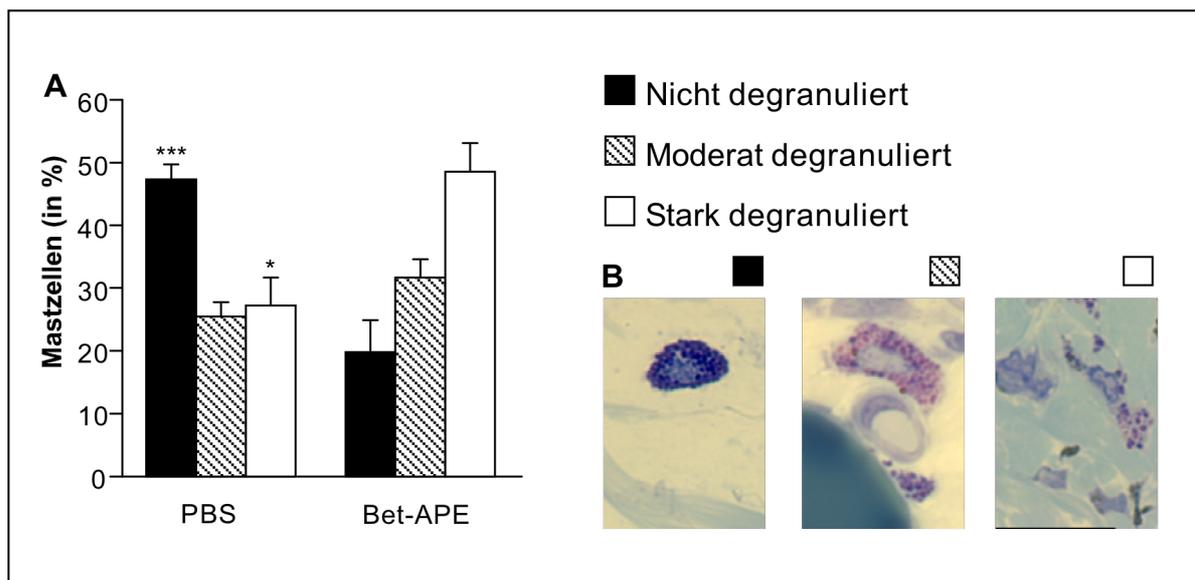


Abb. 3.2 Die durch Pollenextrakte der Birke verursachte Entzündungsreaktion in der Mauhaut ist mit einem erhöhten Anteil an degranulierten Mastzellen assoziiert. 100 μ g wässrige Pollenextrakte der Birke (Bet-APE) oder der PBS alleine wurde in das linke bzw. rechte Ohr von *kit*^{+/+} Wildtypmäusen injiziert. 1 h nach Injektion wurden Histologieproben der Ohren für Semidünnschnitte gewonnen. Mastzelldegranulation wurde mittels quantitativer Histomorphometrie in den mit Alkalinen Giemsa gefärbten Schnitten der Mausohren bestimmt, $n = 4$; PBS versus Bet-APE Signifikanz ***= $p < 0,005$, *= $p < 0,01$, Students t-Test. Bilder in B sind repräsentative nicht degranulierte (schwarzes Quadrat), moderat degranulierte (schaffriertes Quadrat) und stark degranulierte (weißes Quadrat) Mastzellen (100-fache Vergrößerung). Modifiziert, mit Erlaubnis von Elsevier übernommen aus "Journal of Investigative Dermatology 2011, Volume 131 (4), 987-990. Martin Metz, Stefanie Gilles, Astrid Geldmacher, Heidrun Behrendt, Claudia Traidl-Hoffmann, Marcus Maurer: Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation."

3.4 In Wildtypmäusen, nicht aber in mastzelldefizienten Mäusen, verursachen Pollenextrakte eine dosisabhängige Entzündungsreaktion

Um herauszufinden, ob Mastzellen für die polleninduzierte Entzündungsreaktion verantwortlich sind, wurden als nächstes unterschiedliche Mengen von löslichen Pollenextrakten in die Ohren von mastzelldefizienten *Kit*^W/*Kit*^{W-v} Mäusen sowie deren *Kit*^{+/+} Wildtypgeschwistern intradermal injiziert.

Die Pollenextrakte Bet-APE führten in *kit+/+* Wildtypmäusen, ebenso wie in den zuvor durchgeführten Untersuchungen an C57BL/6 Mäusen, nach intradermaler Injektion zu einer dosisabhängigen Ohrschwellung, mit der stärksten mittleren Ohrschwellung von 162 μm ($\pm 19 \mu\text{m}$ SE) 1 h nach Injektion von der höchsten getesteten Dosis von 1000 μg (Abb. 3.3 A). Durch die Injektion der drei höchsten Dosen 1000 μg , 500 μg und 100 μg wurde eine Ohrschwellung verursacht, die signifikant stärker war als die Ohrschwellung, die durch die Injektion der entsprechenden Negativkontrolle PBS verursacht wurde ($p < 0,001$). Die Ohrschwellung, die durch eine Injektion von 10 μg Bet-APE hervorgerufen wurde, unterschied sich nicht signifikant von der durch die Negativkontrolle PBS verursachte Schwellung.

A)

B)

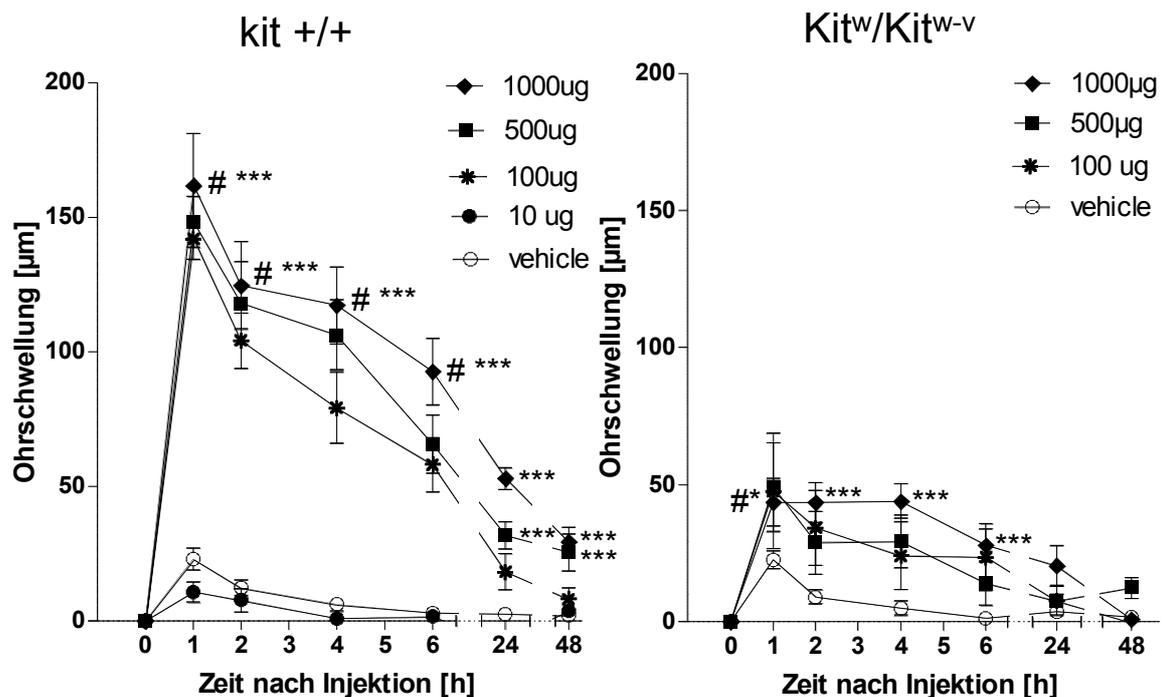


Abb. 3.3 Birkenpollenextrakte induzieren in Wildtypmäusen, aber nicht in mastzelldefizienten Mäusen eine starke dosisabhängige Entzündungsreaktion. Dosen von 10 μg (*kit+/+*) bzw. 100 μg (*Kit^W/Kit^{W-V}*) bis 1000 μg Bet-APE (linkes Ohr) oder PBS alleine (rechtes Ohr) wurden in die Ohren von Wildtypmäusen *kit+/+* injiziert (n=5-6 Ohren/Dosis und Zeitpunkt. Ausnahme Dosis 1000 ug: n=11 Ohren/Zeitpunkt) (A) und mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen (n=5-6 Ohren/Dosis und Zeitpunkt) (B) injiziert. Anschließend wurde nach 1, 2, 4, 6, 24 und 48 h die Dicke der Ohren gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Mann-Whitney U Test von den verschiedenen Konzentrationen Bet-APE versus Vehicle PBS: *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, alle Datenpunkte ohne Sternchen nicht signifikant. # Signifikanzen gelten für die drei (*kit+/+*) bzw. zwei (*Kit^W/Kit^{W-V}*) höchsten eingestellten Pollenextraktkonzentrationen, also für die durch 100 μg , 500 μg und 1000 μg (*kit+/+*) bzw 500 μg und 1000 μg (*Kit^W/Kit^{W-V}*) induzierte Ohrschwellung.

Zusammengefasst konnten die Ergebnisse aus dem C57BL/6 Mausmodell in den Wildtypmäusen *kit+/+* eines Mausmodells, zu dem es auch mastzelldefiziente Wurfgeschwister gibt, bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Entzündung abhängig war von der Dosis der injizierten Pollenextrakte.

Im Gegensatz zu der in den Wildtypmäusen induzierten Entzündung wiesen die mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse nach intradermaler Injektion von Bet-APE nur eine sehr geringe Ohrschwellung auf (Abb. 3.3 B). Nur in der zweithöchsten Dosis von 500 µg 1 h nach Injektion und in der höchsten Dosis von 1000 µg Bet-APE für die ersten 6 h nach Injektion konnte in den mastzelldefizienten Mäusen eine Schwellung induziert werden, die sich von der durch die Injektion der Negativkontrolle induzierten Schwellung signifikant unterschied (Abb. 3.3 A und B). Die Ohrschwellung lag mit einem Maximum von 49 µm (\pm 16 µm, 500 µg, 1h) signifikant unter der in den *kit+/+* Wildtypmäusen gemessenen Schwellung von 162 µm (\pm 19 µm SE, 1000 µg, 1h).

Auch 100 µg Beifußpollen Art-APE induzierten in *kit+/+* Wildtypmäusen eine signifikant stärkere Ohrschwellung als in den mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen (135 µm \pm 19 µm versus 64 µm \pm 32 µm SD, $p < 0.05$, 1h, 1 Experiment, N = 4, Daten nicht gezeigt)

Zusammengefasst ist die Entzündungsreaktion in der Haut der Mäuse abhängig von der Dosis des Pollenextraktes, und mastzelldefiziente Mäuse weisen eine deutlich geringere Schwellung nach Polleninjektion auf, und nur mit einer 10-fach höheren Dosis wurde überhaupt eine signifikante Schwellung in mastzelldefizienten Mäusen erreicht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei der durch Pollen induzierten Entzündungsreaktion um eine IgE-unabhängige, aber mastzellabhängige akute Entzündungsreaktion handelt.

3.5 Durch die lokale Mastzellrekonstitution wird die Reaktivität der mastzelldefizienten Mäuse auf Pollenextrakte wiederhergestellt

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hinweisen, dass die polleninduzierte Entzündungsreaktion in den Mausohren mastzellabhängig ist, aber nicht

ausgeschlossen werden konnte, dass das Ausbleiben der Entzündungsreaktion in mastzelldefizienten Mäusen auf anderen immunologischen Defiziten dieser Mäuse beruht, wurde weiter untersucht, ob die Haut von mastzelldefizienten Mäusen, die lokal mit Mastzellen rekonstituiert wurden, auf Pollenextrakte mit einer stärkeren Entzündung reagieren. Dazu wurden die Ohren von mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen mit Mastzellen aus dem Knochenmark vier bis fünf Wochen vor Polleninjektion lokal rekonstituiert.

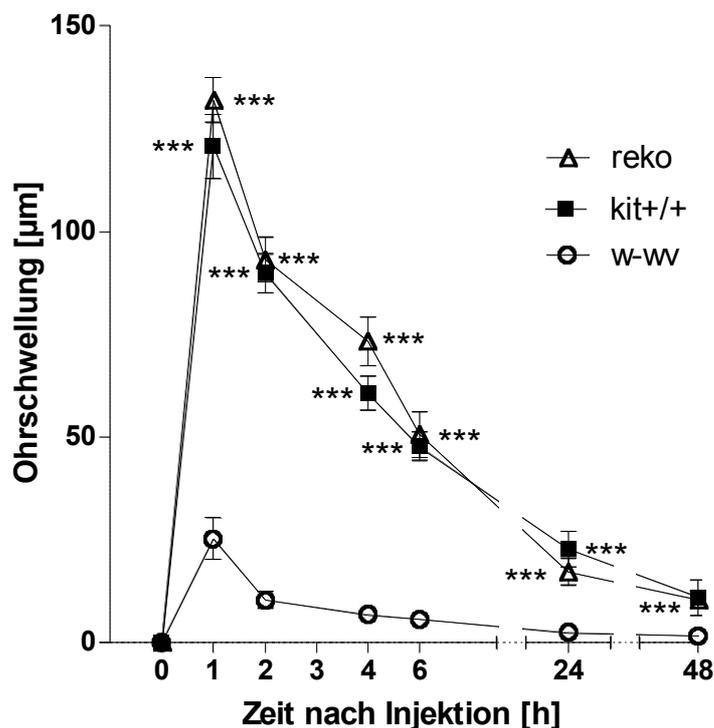


Abb. 3.4 Die in mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen nach lokaler Rekonstitution mit Mastzellen von Birkenpollenextrakten induzierten Entzündungsreaktion entspricht in ihrer Stärke und Kinetik der in Wildtypmäusen. Einmalig wurde in zwei Versuchen (V4+V6) eine Dosis von 100 µg Bet-APE in 20 µl PBS intradermal in jeweils beide Ohren von *kit+/+* Wildtypmäusen (n=14 Ohren), mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen (n=14 Ohren) und mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen, die vorher mit BMCMCs lokal rekonstituiert wurden ("reko", n=12 Ohren), injiziert. Anschließend wurde in verschiedenen zeitlichen Abständen die Dicke der Ohren gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Mann-Whitney U Test *Kit^W/Kit^{W-V}* versus *kit+/+* Wildtypmäuse bzw. versus mit MC rekonstituierter *Kit^W/Kit^{W-V}*. *** p < 0,001, Datenpunkte ohne Sternchen nicht signifikant. Die Ohrschwellung von Wildtypmäusen und rekonstituierten Mäusen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich.

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, zeigten mastzelldefiziente Mäuse keine wesentliche Ohrschwellung durch die intradermale Injektion von Pollenextrakten. Die Reaktivität konnte durch eine lokale Rekonstitution der mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse mit kultivierten Mastzellen aus dem Knochenmark (BMCMCs)

vor der intradermalen Injektion von Pollenextrakten wiederhergestellt werden (Abb. 3.4). Die Stärke der Ohrschwellung der rekonstituierten Mäuse entsprach in ihrer Stärke und Kinetik der der Wildtypmäuse, mit der stärksten Schwellung von $132 \mu\text{m}$ ($\pm 5,5 \mu\text{m SE}$) in den rekonstituierten Mäusen und $121 \mu\text{m}$ ($\pm 7,9 \mu\text{m SE}$) in den *kit+/+* Wildtypmäusen eine Stunde nach Injektion (Abb. 3.4). Die mittlere Ohrschwellung der rekonstituierten Mäuse war zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich von der der *kit+/+* Wildtypgeschwister. Andererseits war auch in diesen Experimenten zu allen Zeitpunkten die in den Wildtypmäusen und den mit MCs rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen durch Bet-APE Pollenextrakte hervorgerufene Ohrschwellung signifikant höher als die durch Vehicle PBS hervorgerufene Schwellung ($p \leq 0,001$ 1-24 h nach Injektion, 48 h nach Injektion $p = 0,022$ im Wildtyp, Mann-Whitney U Test). Auch war wie in den Versuchen für die Dosisfindung (Abb. 3.3) die Ohrschwellung in sowohl den Wildtieren, als auch den mit MC lokal rekonstituierten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen zu den Zeitpunkten bis 24 h signifikant höher als die der mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse ($p < 0,001$, Zeitpunkt 48 h Vergleich *kit+/+* versus *Kit^W/Kit^{W-V}* $p = 0,098$, Mann-Whitney U Test).

In den mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäusen war die maximale Schwellung in diesen Experimenten ebenfalls nach 1 h erreicht, betrug aber nur $25 \mu\text{m}$ ($\pm 5,0 \mu\text{m SE}$) und war in diesen Experimenten zu keinem Zeitpunkt signifikant höher als die Schwellung in den Ohren, in die nur der Vehicle PBS injiziert wurde.

Zusammengefasst kann durch eine lokale Rekonstitution der Haut von mastzelldefizienten Mäusen mit Mastzellen die Ohrschwellung und damit die Reagibilität auf die Pollen wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch Pollen verursachte Entzündungsreaktion in nichtsensibilisierten Mäusen wie in dem hier verwendeten Modell mastzellabhängig ist. Die ausbleibende Ohrschwellung in mastzelldefizienten Mäusen nach Polleninjektion liegt also tatsächlich an dem Fehlen der Mastzellen und nicht an anderen Immundefekten der mastzelldefizienten Mäuse.

In allen Experimenten führte die Provokation mit Art-APE, und zu einem geringeren Maße auch durch Bet-APE, in der höchsten Konzentration von 5 mg/ml zu einer Mastzelldegranulation mit einer deutlich höheren Betahexaminidasefreisetzung als die Negativkontrolle Tyrodespuffer. Im Mittel

war die durch 5 mg/ml Beifußpollen Art-APE, bzw. Birkenpollen Bet-APE hervorgerufene Betahexaminidasefreisetzung in BMCMCs 30,5 % (+/- 2,7 %) bzw. 7,1 % (+/- 0,6 %), und damit signifikant höher als die Spontanfreisetzung durch die Negativkontrolle Tyrodespuffer (4,6 % +/- 0,6 %, $p = 0,004$ (Art-APE) bzw. $p = 0,041$ (Bet-APE), siehe Abb. 3.5). In niedrigeren Dosierungen unter 5000 $\mu\text{g/ml}$ (für Bet-APE) bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$ (Art-APE) konnten keine Effekte auf die Mastzelldegranulation beobachtet werden (Abb. 3.5).

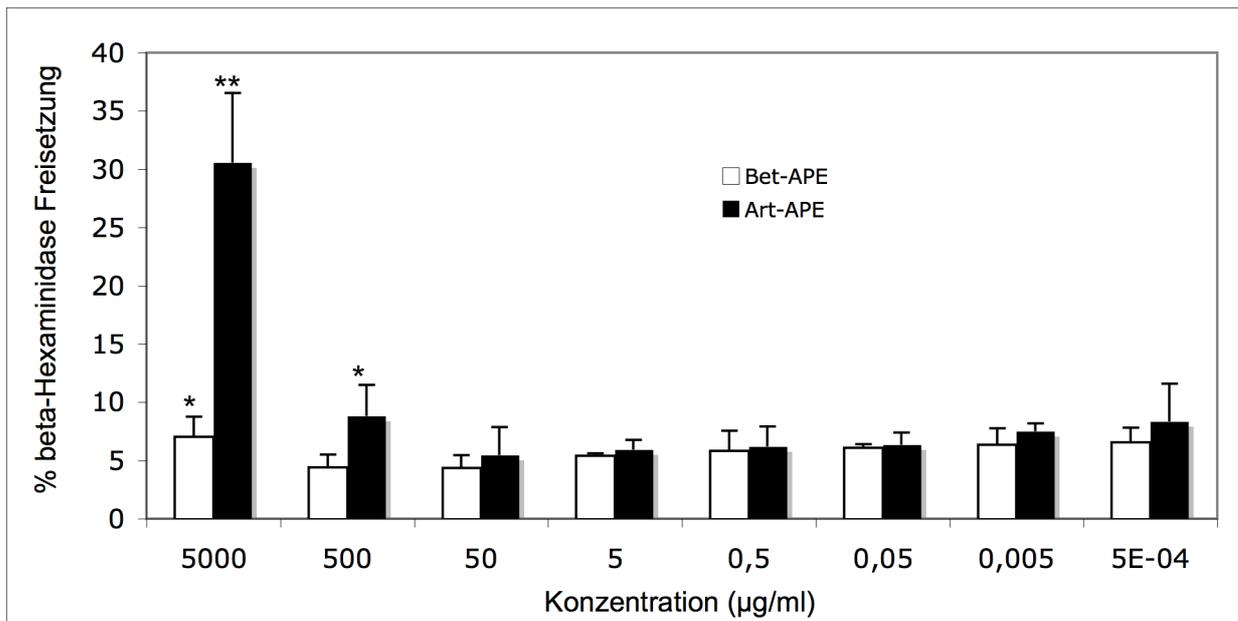


Abb. 3.5 Nur hohe Konzentrationen von Beifuß- und Birkenpollenextrakten induzieren direkt eine Degranulation von Mastzellen *in vitro*. Aus dem Knochenmark von *kit+/+* Wildtypmäusen stammende, kultivierte Mastzellen (BMCMCs) wurden mit wässrigen Extrakten von Beifußpollen (Art-APE) oder Birkenpollen (Bet-APE) 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von β -Hexaminidase durch die Mastzellen gemessen und zur Gesamtmenge der in den Mastzellen befindlichen β -Hexaminidase in Beziehung gesetzt. Als Negativkontrolle diente der in diesen Experimenten verwendete Lösungspuffer Tyrodespuffer (im Mittel 5 % β -Hexaminidasespontanfreisetzung). Als Positivkontrolle wurde 1 μM Ionophore verwendet (im Mittel 44 % β -Hexaminidasefreisetzung). Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte und Standardfehler. Zwei Experimente wurden nicht miteinbezogen, eines aufgrund einer β -Hexaminidasespontanfreisetzung durch Tyrodespuffer von über 10 %, eines aufgrund von einer zu niedrigen Betahexaminidasefreisetzung durch die Positivkontrolle Ionophore von 14 %. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test ermittelt: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

3.6 Auch *in vitro* induzieren wässrige Extrakte von Pollen des Traubenkrauts und der Birke eine Degranulation in murinen Mastzellen

Durch die histologischen Untersuchungen und Versuche mit mastzelldefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der durch die Pollenextrakte induzierten Entzündung um eine großteils mastzellabhängige Reaktion handelt.

Um festzustellen, ob es sich hierbei um eine direkte Interaktion von Substanzen in den Pollenextrakten und den Mastzellen handelt oder ob es in der Haut möglicherweise zu einer indirekten Mastzellaktivierung kommt, wurden als nächstes *in vitro* Untersuchungen an kultivierten Mastzellen durchgeführt.

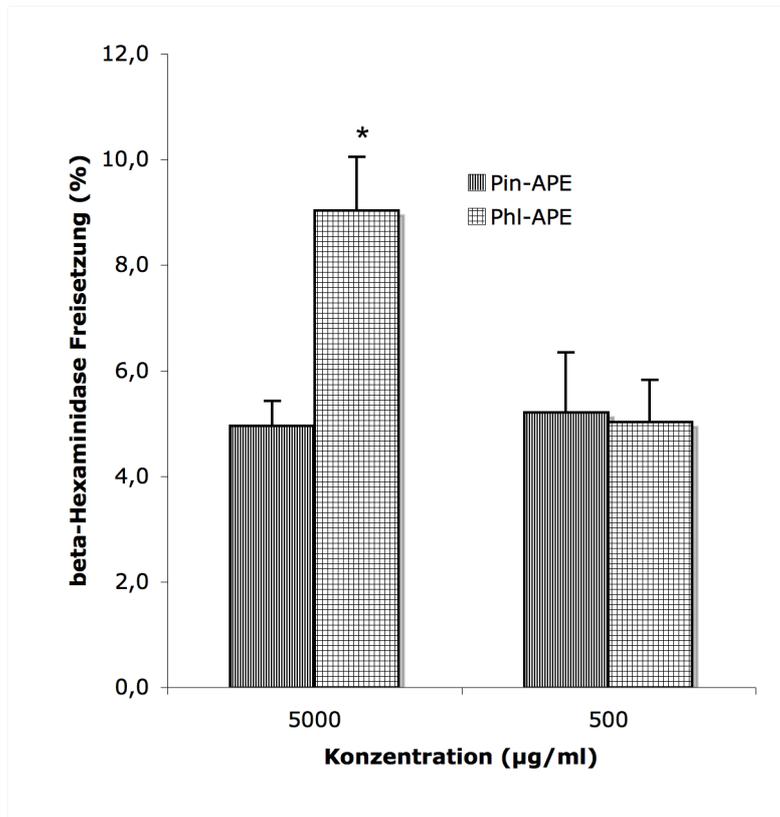


Abb. 3.6 Nur hohe Konzentrationen von Wiesenlieschgraspollenextrakten induzieren eine geringe Mastzelldegranulation *in vitro*, Kieferpollenextrakte gar keine. Aus dem Knochenmark von *kit+/+* Wildtypmäusen stammende, kultivierte Mastzellen (BMCMCs) wurden mit verschiedenen Konzentrationen der wässrigen Extrakten von Pollen des Lieschgras (*Phleum pratense*, Phl-APE) oder der Kiefer (*Pinus* sp, Pin-APE) inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von β -Hexaminidase gemessen und zur Gesamtmenge der in den Mastzellen befindlichen β -Hexaminidase in Beziehung gesetzt. Als Negativkontrolle diente Tyrodespuffer (5,8 % \pm 0,8 % β -Hexaminidasefreisetzung = Spontanfreisetzung), als Positivkontrolle 1 μ M Ionophore (55,4 % \pm 7,6 % β -Hexaminidasefreisetzung), beide nicht gezeigt. Die Werte sind die arithmetischen Mittelwerte und Standardfehler aus Mittelwerten von Triplets aus 2-3 Versuchen. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test ermittelt:

* $p = 0,05$.

Da man davon ausgeht, dass es sich bei BMCMCs um relativ unreife Mastzellen handelt und die eher dem Typ der mukosalen Mastzellen entsprechen, sollte in anschließenden Experimenten untersucht werden, ob die dem Typ der Bindegewebsmastzellen eher entsprechenden, reiferen kultivierten Mastzellen aus dem Peritoneum (PCMCs) eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den

Pollenextrakten aufweisen. Diese Mastzellen weisen eine größere Anzahl und höhere Dichte verschiedener, u.a. für die Mastzellaktivierung wichtige Oberflächenrezeptoren auf (Meurer *et al.* 2016).

Auch in den als reifer geltenden PCMCs konnte nur durch sehr hohe Konzentrationen von Pollenextrakten eine Degranulation induziert werden. So wurden nur durch die hohe Konzentration von 5 mg/ml Art-APE (29.2 % +/- 3.6 %, $p < 0.05$), nicht aber durch 5 mg/ml Bet-APE (5.6 % +/- 1.4 % $p > 0.1$) oder niedrigere Dosierungen beider Pollenextrakte eine von der Negativkontrolle (3.5 % +/- 0.6 %) signifikant unterschiedliche Degranulation induziert werden (3-4 Experimente, Daten nicht gezeigt).

Neben den wässrigen Pollenextrakten von Traubenkraut und Birke wurden auch Pollenextrakte des Lieschgrases (*Phleum* sp, Phi-APE) und der Kiefer (*Pinus* sp, Pin-APE) auf ihre Fähigkeit, eine Degranulation von Mastzellen zu induzieren, geprüft. Nur die höchste hier verwendete Konzentration von 5 mg/ml Pollenextrakten des Lieschgrases, Phi-APE, konnte in BMCMC eine geringe, aber signifikante Freisetzung von 10,3 % (+/- 1,3 %) β -Hexaminidase und damit eine höhere Freisetzung als die Negativkontrolle (5,3 % +/- 1,4 %, $p = 0,05$) induzieren (Abb. 3.6).

3.7 Charakterisierung der für die mastzellabhängige Entzündungsreaktion verantwortlichen Substanzen in den Birkenpollenextrakten

Die wasserlöslichen Extrakte der Birkenpollen enthalten zahlreiche, nur teilweise genauer charakterisierte Substanzen. In früheren Arbeiten konnten Gilles und ihre Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Traidl-Hoffmann zeigen, dass die Aufteilung des Bet-APE in die Molekülgröße kleiner bzw. größer 3 Kilodalton (kDa) zu einer Fraktion führt, in der v.a. Adenosin zu finden ist (<3 kDa), bzw. eine Fraktion ohne Adenosin, aber mit zahlreichen Proteinen (>3 kDa) (Gilles *et al.* 2011). Für Adenosin konnte bereits vor Jahrzehnten gezeigt werden, dass es ein hohes immunmodulatorisches Potential hat (u.a. Polosa *et al.* 1989, Feoktistov & Biaggioni 2011). Es wurde daher vermutet, dass Adenosin auch hier für die beobachtete mastzellabhängige Entzündungsreaktion mitverantwortlich ist. Um dies zu überprüfen, wurden größenfraktionierte (größer und kleiner 3 kDa) wässrige Pollenextrakte, sowie das in den vorherigen Versuchen verwendete

unfraktionierte wässrige Pollenextrakt intradermal in die Ohren der Wildtypmäuse *kit+/+* und der mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse gespritzt.

In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass das unfraktionierte wasserlösliche Pollenextrakt Bet-APE in *kit+/+* Wildtypmäusen zu allen Zeitpunkten eine signifikant stärkere Entzündungsreaktion verursachte als die Injektion der gleichen Menge an größenfraktionierten Pollenextrakt Bet-APE_{<3kDa} und Bet-APE_{>3kDa}. Auch wenn die Schwellung durch die größenfraktionierten Pollenextrakte geringer war als die Schwellung der unfraktionierten Extrakte, so war sie doch zu allen Zeitpunkten signifikant ausgeprägter ($p < 0,05$, Mann-Whitney U Test) als die durch die Negativkontrolle, das Vehikel PBS, induzierte Schwellung der Kontrollohren (Abb. 3.7).

Wie in den Versuchen mit nicht fraktioniertem Bet-APE (Abschnitt 3.2, Abb. 3.1) war die stärkste Ohrschwellung 1 h nach Injektion der größenfraktionierten Pollenextrakte zu messen. In den Ohren der mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse war 1 h nach Injektion der Pollenextrakte keine der mittleren Schwellungen signifikant unterschiedlich von der durch PBS induzierten Schwellung. Nichtsdestotrotz wiesen die Ohren der mastzelldefizienten *Kit^W/Kit^{W-V}* Mäuse, die mit Bet-APE_{>3kDa} behandelt wurden, 2 bis 6 h nach Injektion eine leichte ($20 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m SE}$ bis $20 \mu\text{m} \pm 8,9 \mu\text{m SE}$) signifikante Schwellung auf (Abb 3.7).

Interessanterweise induzierten in einem kleinen Experiment 100 μg der großen Beifußpollenfraktion Art-APE_{>3kDa} im Gegensatz zu Birkenpollen in C57BL/6 bzw. *kit+/+* Wildtypmäusen eine gleichstarke Ohrschwellung wie nicht fraktioniertes Art-APE (Art-APE_{>3kDa}: $160 \mu\text{m} \pm 8,8 \mu\text{m}$ (C57BL/6) bzw. $141 \mu\text{m} \pm 10,3 \mu\text{m SD}$ (*kit+/+*) versus unfraktioniertes Art-APE: $132 \mu\text{m} \pm 29,3 \mu\text{m}$ bzw. $135 \mu\text{m} \pm 18,9 \mu\text{m SD}$, 1 Experiment, N=3-4, Daten nicht gezeigt). Im Wiederholungsexperiment zeigten sich die gleichen Tendenzen.

Zusammengefasst haben die Pollenextrakte sowohl in der Fraktion <3 kDa als auch in der Fraktion >3 kDa eine Schwellung in Wildtypmäusen hervorgerufen, die bei Birkenpollen niedriger, bei Beifußpollen gleichstark war wie die durch die unfraktionierten Extrakte induzierten Ohrschwellungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der mastzellaktivierenden Substanz zumindest nicht alleine um Adenosin handelt. Eine nähere Charakterisierung konnte durch die hier durchgeführten Untersuchungen nicht erreicht werden, allerdings lässt sich

festhalten, dass die für die Entzündungsreaktion verantwortliche Substanz entweder um die 3 kDa groß ist (und daher in beiden Fraktionen zu finden ist) oder aber, dass es verschiedene Substanzen gibt, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen können. Diese Substanzen wären dann sowohl in der kleineren als auch in der größeren Fraktion der Birkenpollenextrakte zu finden.

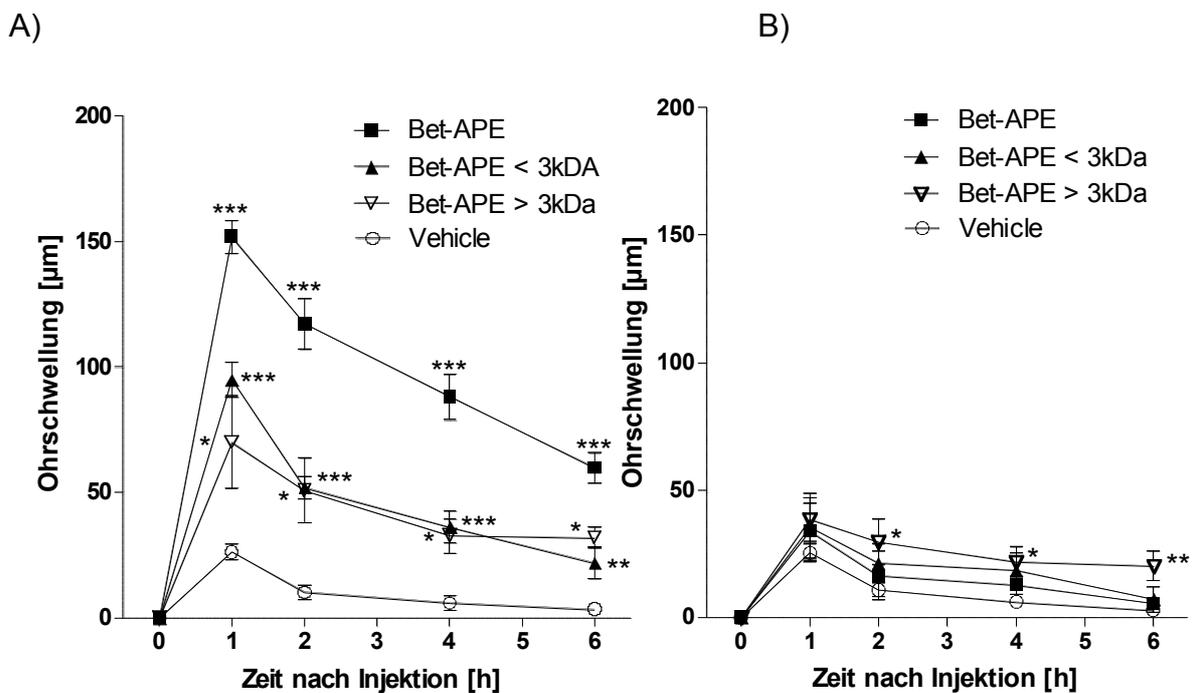


Abb. 3.7 Unfraktionierte Pollenextrakte der Birke induzieren eine stärkere Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen als großenfraktionierte. *kit*^{+/+} Wildtypmäusen (A) oder mastzelldefizienten *Kit*^{W/Kit}^{W-V} Mäusen (B) wurden mit 100 µg unfraktioniertem Pollenextrakt der Birke (Bet-APE, n=9 *kit*^{+/+}, n=7 *Kit*^{W/Kit}^{W-V}), der Pollenextraktfraktion mit einem Molekulargewicht von unter 3 kDa (Bet-APE_{<3kDa} n=8 *kit*^{+/+}, n=6 *Kit*^{W/Kit}^{W-V}) oder der Pollenextraktfraktion von über 3 kDa (Bet-APE_{>3kDa} n=7 *kit*^{+/+}, n=6 *Kit*^{W/Kit}^{W-V}) in 20 µl PBS intradermal ins linke Ohr injiziert. Das rechte Ohr diente jeweils als Negativkontrolle ("vehicle") und wurde mit 20 µl PBS Puffer intradermal injiziert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test ermittelt. Vehicle versus Bet-APE bzw. großenfraktionierten Bet-APE: *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05. Datenpunkte ohne Sternchen nicht signifikant.

3.8 Die Pollenextraktfraktion > 3 kDa ist für die von wässrigen Extrakten des gemeinen Beifußes (Art-APE) *in vitro* induzierte Degranulation von murinen Mastzellen verantwortlich

Zur weiteren Abklärung, welche Bestandteile der Pollen für eine Degranulation von Mastzellen verantwortlich sind, wurden wie in den *in vivo* Experimenten die

zwei größenfraktionierten Extrakte, jeweils die Fraktion kleiner und größer 3 kDa, auf ihre Fähigkeit, *in vitro* Mastzellen direkt zu degranulieren, getestet.

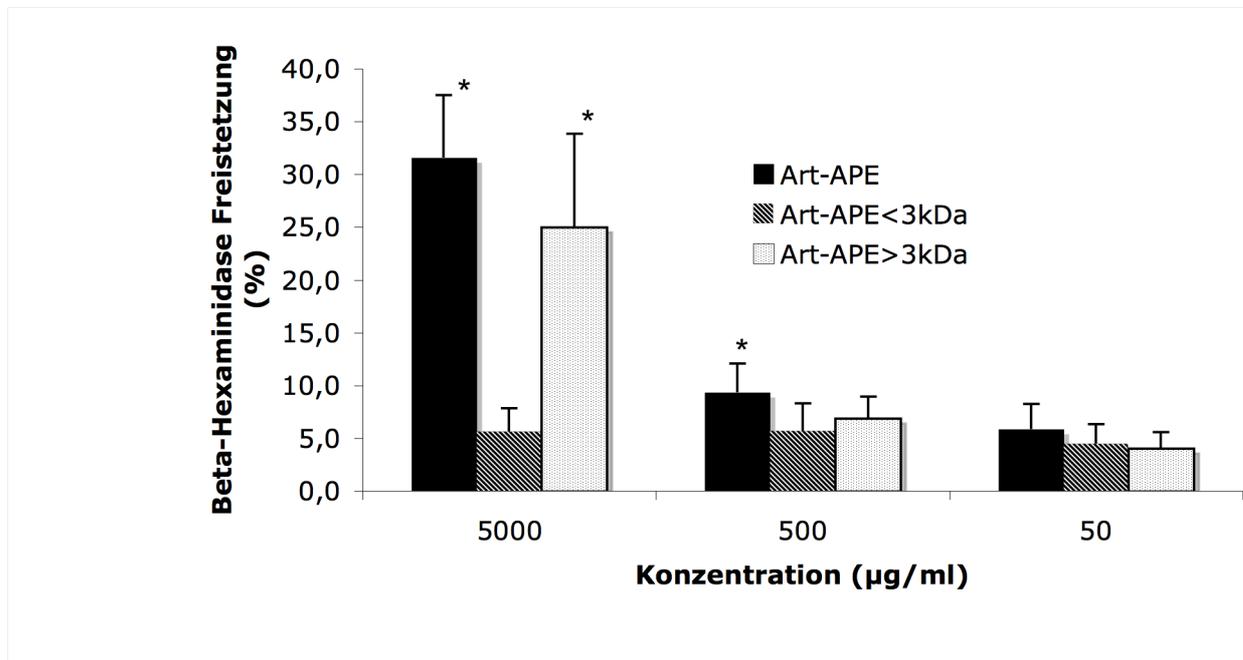


Abb. 3.8 Die Fraktion > 3 kDa, nicht aber die Fraktion < 3 kDa der Beifußpollenextrakte induziert eine direkte Degranulation in Mausmastzellen aus dem Knochenmark. Aus dem Knochenmark von *kit+/+* Wildtypmäusen stammende, kultivierte Mastzellen (BMCMCs) wurden mit den zwei größenfraktionierten (> bzw. < 3 kDa) wässrigen Beifußpollenextrakte (Art-APE) inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von β -Hexaminidase durch die Mastzellen gemessen und zur Gesamtmenge der in den Mastzellen befindlichen β -Hexaminidase in Beziehung gesetzt. Als Negativkontrolle diente Tyrodespuffer, als Positivkontrolle 1 μ M Ionophore. Die Werte sind arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen aus 6 Versuchen (Art-APE) bzw. 3 Versuchen (Art-APE_{<3kDa} und Art-APE_{>3kDa}). Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney U Test ermittelt. Vehicle versus Bet-APE, bzw. größenfraktionierten Bet-APE: * $p < 0,05$. Datenpunkte ohne Sternchen nicht signifikant.

Hier konnte in BMCMCs gezeigt werden, dass eine Konzentration von 5 mg/ml der größeren Fraktion, Art-APE_{>3kDa}, eine deutlich höhere Freisetzung an β -Hexaminidase (25.0 % +/- 5.1 %) als die kleinere Fraktion Art-APE_{<3kDa} (5.5 % +/- 0.9 %) induzierte (Abb. 3.8). Ebenso konnte auch in PCMCs nur die größere Fraktion der Beifußpollen, Art-APE_{>3kDa}, eine signifikante Degranulation induzieren (Abb. 3.9).

Für beide Größenfraktionen von Bet-APE konnte weder bei BMCMCs (drei Experimente, Daten nicht gezeigt) noch bei PCMCs (Abb. 3.9) eine signifikante Degranulation induziert werden.

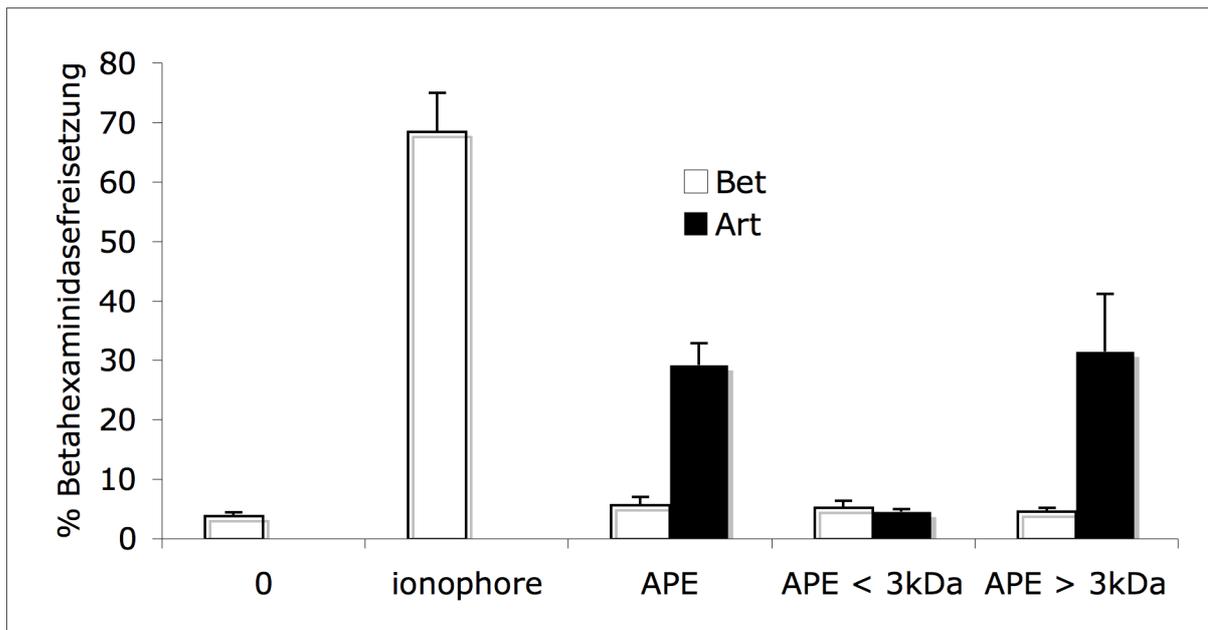


Abb. 3.9 Die Fraktion > 3 kDa, nicht aber die Fraktion < 3 kDa der Beifußpollenextrakte induziert eine Degranulation von Mausmastzellen aus dem Peritoneum. Aus dem Peritoneum von *kit+/+* Wildtypmäusen stammende, kultivierte Mastzellen (PCMCs) wurden mit kompletten, sowie größenfraktionierten (< oder > 3 kDa) wässrigen Extrakten von Gemeinen Beifußpollen (Art-APE) oder Birkenpollen (Bet-APE) inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von β -Hexaminidase durch die Mastzellen gemessen und zur Gesamtmenge der in den Mastzellen befindlichen β -Hexaminidase in Beziehung gesetzt. Als Positivkontrolle wurde 1 μ M Ionophore verwendet, als Negativkontrolle Tyrodespuffer. Die Werte sind die arithmetischen Mittelwerte aus 4 Experimenten sowie der Standardfehler.

4 DISKUSSION

4.1 Typ I Allergie ohne spezifisches IgE – ein alternativer Pathomechanismus?

Patienten, die saisonal auftretende, typisch allergische Beschwerden haben, aber kein spezifisches IgE gegen Pollenallergene im Serum aufweisen, existieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Allergiker, die anamnestisch unter typisch allergischen saisonal auftretenden Symptomen gegen Birke (146 Patienten) bzw. beifußblättriges Traubenkraut (38 Patienten) leiden und einen positiven Hauttest ("skin prick test", SPT) aufweisen, auch spezifisches IgE gegen die jeweiligen Allergene aufweisen. Wie geschildert, konnte in 13 % der Birkenallergiker und in 29 % der Traubenkrautallergiker kein spezifisches IgE gegen Birke bzw. Traubenkraut im Serum gefunden werden.

Es konnte in der Vergangenheit in vielen Arbeiten ein direkter Zusammenhang zwischen positiven Hautprovokationstests mit Allergenen und dem jeweiligen spezifischen IgE gefunden werden (Stenius *et al.* 1971, Brown *et al.* 1979, Cho *et al.* 2014, Bryant *et al.* 1975). Auch in der vorliegenden Arbeit hatte die Mehrzahl der Allergiker allergenspezifisches IgE im Serum, aber eben nicht alle. In anderen Studien wies der SPT eine stärkere Korrelation mit den klinischen allergischen Symptomen auf als mit der Konzentration von spezifischem IgE im Serum (Niederberger *et al.* 2001, Stenius 1973). In den meisten Arbeiten wurden in 2 % bis 24 % der Allergiker kein spezifisches IgE gefunden (u.a. Wüthrich & Kopper 1975, Movérare *et al.* 2002, Canis *et al.* 2012).

Warum einige Allergiker kein gegen die jeweiligen Antigene gerichtetes spezifisches IgE im Serum aufweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht und könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass die Allergiker spezifisches IgE im Serum hatten, das Allergenabschnitte erkennt, die in dem jeweiligen Testverfahren nicht eingesetzt wurden. Eine Arbeit, die diese Theorie stützt, fand in 37 % der untersuchten Allergiker/Asthmatiker einen positiven SPT gegen Beifuß (*Artemisia vulgaris*), von denen nur 33 % bzw. 16 % IgEs spezifisch für die in der IgE Diagnostik verwendeten Antigene Art V1 bzw. Art V4 im Serum aufwiesen (Orovitg *et al.* 2011). Des Weiteren wäre es möglich, dass es Allergiker gibt, deren IgEs

ausschließlich an native, natürlich gefaltete Epitope binden, die in der IgE Diagnostik nicht verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Hauptzahl der IgE Moleküle an Mastzellen im Gewebe gebunden und daher nicht im Serum messbar ist.

Eine andere Erklärung wäre, dass die Patienten, bei denen kein spezifisches IgE nachweisbar ist, tatsächlich kein spezifisches IgE haben, dass aber Bestandteile in den Pollen eine allergieähnliche Immunreaktion (ohne IgE) auslösen. Für diese Hypothese spricht, dass eine intrakutane Injektion einer hohen Konzentration von Hausstaubmilbenallergen zu einer Reaktivität der Haut von gesunden, nicht auf Hausstaub sensibilisierten Probanden führt (Stenius 1973). In eine ähnliche Richtung gehen Untersuchungen mit Bermudagrass- und Olivenpollen, die auch in Personen ohne allergische Anamnese einen positiven SPT induzieren konnten (Brown *et al.* 1979), sowie die Untersuchungen, in denen gesunde Probanden ohne saisonale Symptomatik und negativem SPT auf eine experimentelle Pollenexposition "allergisch" reagieren (zusammengefasst von Khan 2009).

Zusammengefasst ist die Diskrepanz zwischen positivem SPT auf Traubenkraut- oder Birkenpollen und dem Fehlen von spezifischem IgE im Serum von Patienten mit allergischer Rhinokunjunktivitis vermutlich auf mehrere Gründe zurückzuführen. Zum einen könnten Pollenkomponenten selbst in Abwesenheit von IgE eine Entzündungsreaktion hervorrufen, und zum anderen weisen einige Patienten vermutlich spezifisches IgE auf, das sich aber aus technischen Gründen nicht darstellen lässt.

4.2. In der Maus induzieren Pollenextrakte auch ohne IgE eine Entzündungsreaktion, die sehr einer allergischen Reaktion vom Typ I ähnelt

Da einige Allergiker eine entzündliche Reaktion in Form eines positiven SPT auf Pollenallergene haben und allergische Symptome aufweisen, ohne dass spezifisches IgE im Serum nachweisbar ist, sollte der dafür verantwortliche Pathomechanismus weiter untersucht werden. Dazu wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem wässrige Pollenextrakte von Birke bzw. Beifuss Mäusen intradermal gespritzt wurden. In naiven, nicht sensibilisierten Wildtypmäusen konnte in der vorliegenden Arbeit eine Entzündungsreaktion durch Pollenextrakte

in der Haut hervorgerufen werden, die ihr Maximum bereits eine Stunde nach Injektion der Pollenextrakte aufwies, und die damit in ihrer Kinetik und Stärke sehr einer IgE-/antigenvermittelten Hautreaktion vom Typ I (siehe Gimenez-Rivera *et al.* 2014) ähnelte. Da die Mäuse vorher nicht in Kontakt mit Pollen gekommen sind und daher kein pollenspezifisches IgE aufweisen können, ist die innerhalb der vorliegenden Arbeit durch Pollen induzierte Entzündungsreaktion sicher IgE-unabhängig.

Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Anaphylaxie, ebenfalls eine Entzündungsreaktion vom Typ I (Reber *et al.* 2017), auch in IgE Knock-out Mäusen stattfinden kann (Oettgen *et al.* 1994). Dazu wurden die Tiere mit dem Modellantigen Ovalbumin plus Adjuvanz sensibilisiert und ihnen drei Wochen später Ovalbumin intravenös injiziert. Interessanterweise unterschieden sich IgE Knock-out Mäuse und Wildtypmäuse nicht in Hinblick auf die durch diese Behandlung ausgelöste Extravasation, Histaminausschüttung und Mastzelldegranulation (Oettgen *et al.* 1994). Die IgE-unabhängige "Anaphylaxie" war auch unabhängig von der Neubildung von Komplementfaktoren. Dagegen mutmaßten die Autorinnen, dass die IgE-unabhängige "Anaphylaxie" abhängig von anderen Ig-Isotypen, wie IgG, sein könnte (Oettgen *et al.* 1994). Auch in anderen Arbeiten konnte ein Zusammenhang von IgG und allergieähnlicher Entzündungsreaktion gefunden werden (zusammengefasst von Scott-Taylor *et al.* 2018). Da die Tiere in der vorliegenden Arbeit nicht sensibilisiert wurden, und auch für die Generation von IgG (wie für IgE) mehrere Tage gebraucht werden, ist allergenspezifisches IgG an der Entzündungsreaktion in den Ohren der mit Pollen behandelten Mäuse aus der hier vorliegenden Arbeit nicht involviert.

4.3 Die durch Pollen induzierte Entzündungsreaktion in der Maushaut ist mastzellabhängig

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es bereits eine Stunde nach Polleninjektion zu einer starken Schwellung der Mausohren kommt. Die Kinetik deutet darauf hin, dass Zellen in diese Entzündungsreaktion involviert sein müssen, die nach Aktivierung innerhalb von Minuten Mediatoren freisetzen können, wie z.B. Mastzellen. Es konnte mittels histologischer Untersuchungen gezeigt werden, dass die in den Mäusen gefundene, durch Pollenextrakte induzierte Entzündungsreaktion mit einer hohen Anzahl von degranulierten Mastzellen

einhergeht. Ein weiterer starker Hinweis für die Mastzellabhängigkeit der Entzündungsreaktion war die nur sehr geringe Ohrschwellung in mastzelldefizienten *Kit^w/Kit^{w-v}* Mäusen nach intradermalen Gabe von Pollenextrakten. Da die *Kit^w/Kit^{w-v}* Mäuse neben der Mastzelldefizienz auch andere Defizite, wie fehlende Melanozyten, fehlende interstitielle Zellen vom Typ Cajal, sowie eine leichte Anämie aufweisen (siehe u.a. Metz *et al.* 2007), könnte die ausbleibende Entzündungsreaktion nach intradermaler Pollengabe auch durch mastzellunabhängige Unterschiede im Immunsystem verursacht werden. Dagegen spricht, dass die *Kit^w/Kit^{w-v}* Mäuse, die lokal mit Mastzellen rekonstituiert wurden, eine ebenso starke Entzündungsreaktion nach Pollenextraktinjektion aufweisen wie die Wildtypmäuse. Zusammen mit dem hohen Anteil an degranulierten Mastzellen in der Histologie von Ohren der pollenbehandelten Wildtypmäuse zeigt dies, dass Mastzellen bei dieser Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielen.

In den *in vivo* Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Dosis von 100 µg Birkenpollen in 20 µl (entspricht 5000 µg/ml) zwar eine starke Entzündungsreaktion in der Maushaut induziert wird, die mit fast 50 % an stark degranulierten Mastzellen einherging, aber *in vitro* 5000 µg/ml Birkenpollen nur eine sehr geringe Mastzelldegranulation von 7 % induzierte. Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede hinsichtlich der entzündungsfördernden Eigenschaften von Pollen *in vitro* und *in vivo* ist der Umstand, dass für die *in vivo* Versuche die Pollen in PBS gelöst wurden, für die *in vitro* Versuche hingegen in Tyrodespuffer. Auch wenn der pH Wert der beiden Substanzen identisch ist, beeinflusst vielleicht die Pufferzusammensetzung die Substanz in den Pollen, die für die Induktion der Entzündungsreaktion bzw. die Aktivierung von Mastzellen verantwortlich ist. Oder aber PBS und Tyrodespuffer unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft, Mastzellen für eine Reaktion auf die Pollenbestandteile zu sensibilisieren.

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die Diskrepanz von niedriger direkter *in vitro* Mastzelldegranulation durch wässrige Birkenpollenextrakte und der durch diese ausgelöste schnellen *in vivo* Entzündungsreaktion, die mit vielen degranulierten Mastzellen einhergeht, ist die Anwesenheit anderer Zellen bzw. deren Mediatoren in der Haut. Diese anderen Zellen oder deren Mediatoren könnten Mastzellen zur Degranulation anregen. So fanden Lyons und Kolleginnen eine Sekretion von IL-

6, nicht aber von IL-13 durch TGF β 1 oder SCF von nur mit IL-3 kultivierten BMCMCs. Die Sekretion war zwar deutlich niedriger als die durch IgE induzierte Sekretion, aber signifikant mehr als in den jeweiligen Negativkontrollen (Lyons *et al.* 2018). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass durch TGF β 1 das Oberflächenmolekül LAMP1 auf den BMCMCs hochreguliert wird, was ein Hinweis auf ein erhöhtes Maß an Degranulation ist (Lyons *et al.* 2018). Desweiteren könnten andere Zellen oder deren Mediatoren dafür sorgen, dass Mastzellen sensibler auf die Pollenextrakte reagieren, indem z.B. Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche modifiziert werden. Für Mastzellen ist weder in der vorliegenden Arbeit, noch in anderen Arbeiten untersucht worden, ob Pollenextrakte Mastzellrezeptoren modifizieren. Von einer Arbeitsgruppe konnte aber für unreife Dendritische Zellen gezeigt werden, dass wässrige Birkenpollenextrakte eine Hochregulierung von Oberflächenmolekülen wie den Chemokinrezeptor CXCR4 induzieren (Gilles *et al.* 2009a). Neben Dendritischen Zellen werden auch Eosinophile und Granulozyten von wässrigen Birkenpollenextrakten direkt aktiviert (Gilles *et al.* 2015+2009a, Bryce *et al.* 2010, Traidl-Hoffman *et al.* 2005, Plötz *et al.* 2004). Piliponski und Kolleginnen zeigten *in vitro* eine Aktivierung von humanen kultivierten Mastzellen aus Lunge und Nabelschnur durch „Eosinophil Major Basic Protein“, die durch membrangebundenen SCF moduliert wurde (Piliponski *et al.* 2003). Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass *in vivo* bei der Mastzelldegranulation andere Zellen beteiligt sein können.

Andere Immunzellen und deren Mediatoren wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, daher kann nur zusammengefasst werden, dass Mastzellen eine essenzielle Rolle bei der polleninduzierten Entzündungsreaktion in der Maushaut spielen.

4.4 Hohe Dosen von Pollenextrakten induzieren in Mastzellen eine direkte und IgE-unabhängige Degranulation

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit riefen hohe Konzentrationen von Pollenextrakten in der Maushaut eine Entzündungsreaktion hervor und degranulierten Mastzellen direkt und IgE-unabhängig. Niedrigere Konzentrationen von Pollenextrakten führten zu keiner direkten Degranulation *in vitro*. Auch wenn eine Konzentration von 5 mg/ml unnatürlich hoch erscheint, ist gezeigt worden,

dass Pollen in der Pollensaison sehr konzentriert vorkommen. Für Berlin können der aktuelle Pollenflug (<http://www.geo.fu-berlin.de/met/service/pollen/index.htm>) sowie die aktuellen und typischen Pollenflugzeiten in Berlin und Deutschland (<http://www.wetterdienst.de/Deutschlandwetter/Berlin/Pollenflug/>) siehe auch „Pollen-flugkalender“) online abgerufen werden. Wie zu sehen ist, fliegen die Pollen einiger Arten, wie z.B. der Birke, nur über einen sehr kurzen Zeitraum, in dem sie aber eine sehr hohe Konzentration erreichen können (Pfaar *et al.* 2017). Auch im klinischen Alltag werden im Skin Prick Test mit 10 mg/ml hohe Konzentrationen von reinen Allergenen verwendet (Stenius 1973), sodaß die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen, jedenfalls in Bezug auf die Allergene, deutlich niedriger waren als im Skin Prick Test im klinischen Alltag. Auch in anderen Arbeiten wird vermutet, dass die bioaktiven Substanzen in Pollen in der Pollensaison in genügend hohen Konzentrationen vorkommen, um ohne IgE klinische „allergoide“ Symptome zu verursachen (siehe u.a. Gilles *et al.* 2012 & 2015, Wimmer *et al.* 2015).

Die vorliegende Arbeit bestätigend fanden andere Arbeitsgruppen auch in Pollen Substanzen, die IgE-unabhängig zu einer Mastzelldegranulation führen. Endo und Kolleginnen zeigten, dass Pollen, in dem Fall einer amerikanischen Zypressenart (*Juniperus ashei*) humane Mastzellen der Linie HMC-1 IgE-unabhängig zur Degranulation bringen können (Endo *et al.* 2011). Die dort beschriebene Dosisabhängigkeit der Stärke der durch Pollen induzierten Mastzelldegranulation konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Chodaczek und Kolleginnen konnten *in vitro* keine Freisetzung von β -Hexaminidase durch die Mastzelllinie RBL-2H3 („Rat basophilic leukaemia cells“) nach Inkubation mit 100 μ g/ml kommerziell erhältlichen Pollenextrakten des Beifußblättrigen Traubenkraut finden (Chodaczek *et al.* 2009). In der hier vorliegenden Arbeit war eine Freisetzung von β -Hexaminidase durch BMCMC und PCMCs nach Inkubation mit 500 μ g/ml, nicht aber mit 50 μ g/ml Beifußpollenextrakt gezeigt worden. Eventuell war die von Chodowczek und Kolleginnen verwendete Konzentration von 100 μ g/ml Ambrosiapollenextrakten zu gering, um eine Mastzelldegranulation ohne IgE zu induzieren. Andererseits könnte der Unterschied zu der in dieser Arbeit gefundenen Mastzelldegranulation durch Pollen daran liegen, dass die Konzentration von inflammatorisch wirksamen Substanzen von Pflanzenart zu Pflanzenart unterschiedlich ist. In der

vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 5 mg/ml Birken-, Beifuß oder Lieschgraspollenextrakte eine Mastzelldegranulation direkt *in vitro* induzieren, aber in geringeren Dosen nur Beifußpollen eine Degranulation induzierten. Kiefernpollenextrakte konnten gar keine Mastzelldegranulation induzieren. Eventuell sind auch innerhalb der unterschiedlichen Pollenextraktzubereitungen die Konzentration der wirksamen Substanzen stark schwankend (Esch 1997). Auch die Stickstoff- und Sauerstoffradikalkonzentration während des Wachstums der Pflanzen sowie das Mikrobiom der Pflanzen scheinen eine Rolle für die Zusammensetzung von Pollen zu spielen (Obersteiner *et al.* 2016, Zhao *et al.* 2017). Des Weiteren ist es möglich, dass die hier verwendeten primären kultivierten Mausmastzellen aus dem Knochenmark (BMCMC) und dem Peritoneum (PCMC) andere Oberflächenrezeptoren als die von Chodoczek und Kolleginnen verwendete Zelllinie RBL haben (siehe auch 4.4) und damit auch durch andere Substanzen aktiviert werden können.

Einige Arbeiten fanden eine Assoziation von der Enzymaktivität der Substanzen und deren Fähigkeit Mastzellen zu degranulieren. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Mastzellen durch die Hydratisierung und damit u.a. von der Aktivierung der in den Pollenextrakten befindlichen NADP⁺ Oxidase in der Schleimhaut abhängt (Bacsi *et al.* 2005, Boldogh *et al.* 2005). Dudler und Kolleginnen fanden heraus, dass Bestandteile von Bienengift, Phospholipase A₂ (PLA₂), nicht aber die mutierte Variante von PLA₂, die ihre enzymatische Fähigkeit verloren hatte, eine IgE-unabhängige Serotoninausschüttung in RBL Zellen hervorruft (Dudler *et al.* 1995). Auch ein Hausstaubmilbenantigen mit katalytischen Fähigkeiten (Der p I) konnte auch ohne Beimischung von Allergikerserum, also ohne IgE, eine Histaminausschüttung in der Zelllinie RBL induzieren (Machado *et al.* 1996). In dieser Studie konnten u.a. auch Aspirin, Lektin aus der Linse, *Aspergillus* Protease und Phospholipase C eine hohe Serotonin-, bzw. Histaminfreisetzung ohne allergenspezifisches IgE auslösen (Machado *et al.* 1996). Auch in humanen Mastzellen konnte gezeigt werden, dass enzymatisch aktive Substanzen, wie das PLA₂ und Proteasen aus Hausstaubmilben oder Schistosomen in Kulturen von humanen Lungenzellen (10-20 % der Zellen wurden von Alcian Blau gefärbt, waren also Mastzellen) und humanen Hautzellen (2-5 % der Zellen wurden von Alcian Blau gefärbt) eine

Histaminausschüttung ohne IgE induzieren (Machado *et al.* 1996). Wie bereits für die Degranulation von Mausmastzellen gezeigt, war die von Machado gefundene IgE-unabhängige Mastzelldegranulation durch verschiedene Allergene abhängig von der Enzymaktivität. Da in den Versuchen Zellgemische verwendet wurden, bleibt unklar, ob PLA₂ und Protease direkt humane Mastzellen degranulieren oder über die Mediatoren anderer Zellen. Es verwundert, dass LPS in dieser Studie eine Freisetzung von Serotonin induzierte, da LPS in den meisten Untersuchungen zwar eine Zytokinproduktion, aber keine Degranulation in humanen und Nagermastzellen hervorruft (Leal-Berumen *et al.* 1994, Gupta *et al.* 2017). Ob die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Pollenextrakte enzymatische Fähigkeiten haben, oder ob die Mastzelldegranulation ROS abhängig war, wurde nicht weiter untersucht.

Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit gefundenen direkten Degranulation von kultivierten Mausmastzellen aus dem Knochenmark (BMCMCs) durch hohe Konzentrationen von Pollenextrakten reagierten in einer anderen Arbeitsgruppe BMCMCs erst auf die IgE-unabhängigen Stimuli Compound 48/80 und Substanz P, wenn sie für 4-6 Tage mit Fibroblasten und löslichem SCF inkubiert wurden (Ogasawara *et al.* 1997), eventuell weil SCF die BMCMCs reifen lässt. In den für reifer als BMCMCs angesehenen peritonealen Ratten- und Mausmastzellen induzieren Ionomycin, Thapsigargin, C48/80, Endothelin 1, Substanz P und Adenosin direkt eine IgE-unabhängige Degranulation (Oka *et al.* 2012). Demgegenüber konnten in der vorliegenden Arbeit auch die aus dem Peritoneum stammenden, für reifer als BMCMCs geltenden PCMCs nur durch sehr hohe Pollenextraktkonzentrationen zur direkten, IgE-unabhängigen Degranulation gebracht werden, vergleichbar mit den BMCMCs.

Auch bei den in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersuchten humanen Mastzellen scheint es Unterschiede zu geben. So wurde gezeigt, dass nur Mastzellen die Tryptase und Chymase enthalten und z.B. in der Haut und der intestinalen Submukosa vorkommen, nicht aber Schleimhautmastzellen, die nur Tryptase enthalten, IgE-unabhängig aktiviert werden können (Lowman *et al.* 1988).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, gibt es auch in anderen Arbeiten Hinweise darauf, dass es Allergene und andere sowohl körpereigene wie körperfremde Substanzen gibt, die IgE-unabhängig humane und Nagermastzellen zur Degranulation anregen können. Bei einigen Substanzen scheint dabei ihre Enzymaktivität wichtig.

4.5 Mastzellen werden von unterschiedlichen Pollenbestandteilen aktiviert

Interessanterweise konnte in den hier vorliegenden *in vivo* Versuchen gezeigt werden, dass beide wässrigen Fraktionen (kleiner und größer 3 kDa) von Birkenpollenextrakten eine starke Entzündungsreaktion in der Maushaut induzieren. Gilles und Kolleginnen fanden eine deutlich größere Entzündungsreaktion im Menschen, wenn Birkenpollenextrakte kleiner 3 kDa zu Allergenen hinzugefügt wurden (Gilles-Stein *et al.* 2016). In der vorliegenden Arbeit induzierten allerdings beide Fraktionen alleine eine deutlich geringere Ohrschwellung als das nicht fraktionierte Pollenextrakt, und *in vitro* induzierten beide Größenfraktionen von Birkenpollen überhaupt keine Mastzelldegranulation. Hingegen wurden durch die Beifußpollenfraktion von über 3 kDa Größe sowohl *in vitro* Mastzellen am stärksten degranuliert, als auch eine mindestens ebenso starke Ohrschwellung wie durch die nicht fraktionierten Beifußpollen in den Mausohren erwirkt. Dies ist ein Hinweis dafür, dass in Pollen unterschiedlicher Pflanzenarten verschiedene Bestandteile Mastzellen zur Degranulation anregen.

Wenn Pollen auf die Schleimhaut treffen, entlassen sie nicht nur Allergene, sondern auch eine Reihe an Protein- und Nichtproteinbestandteilen (Scheurer & Schülke 2018), wie u.a. pollenassoziierte Lipidmediatoren („pollen-associated lipid mediators“, PALMs, Gilles *et al.* 2009b), die das Immunsystem beeinflussen (zusammengefasst in Dahl 2018). Es gibt zwei Arten von PALMs, die eine stimuliert das angeborene Immunsystem, die andere führt dazu, dass humane Dendritische Zellen eine Th2 Immunantwort induzieren und damit eine „proallergische“ Immunreaktion fördern (zusammengefasst in Gilles 2009a). Verschiedenste PALMs wurden bisher u.a. in Birkenpollen identifiziert, z.B. pollenabgeleitete Phytoprostane (PP) E1, F1, A und B1. Das PPE1 weist dabei eine Sequenzhomologie zu humanen Prostaglandin E2 auf (Parchmann & Mueller 1998). Es konnte gezeigt werden, dass pollenassoziierte Phytoprostane aus

wässrigen Birkenpollenextrakten in Dendritischen Zellen die IL-12 Produktion inhibieren und T Helferzellen in Richtung Th2 polarisieren (Traidl-Hoffmann *et al.* 2005). In weitergehenden Experimenten könnte untersucht werden, ob dieser Mechanismus auch in der vorliegenden Arbeit eine Rolle bei der Entzündungsreaktion und der Induktion von Mastzelldegranulation durch Pollen spielt.

Auch weitere Arbeitsgruppen fanden neben Allergenen andere Pollensubstanzen, die als immunmodulatorische Mediatoren dienen könnten. Basci und Kolleginnen fanden heraus, dass Pollen des Beifußblättrigem Traubenkrauts nach Hydratation 0.5 – 4.5 µm große „Subpollenpartikel“ freisetzen, die unter anderem aus Antigen Amb a1 und anderen Proteinen bestehen, die ähnliche Qualitäten wie reduziertes Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺)-oxidase oder reduziertes NADP⁺-oxidaseaktivität besitzen (Basci *et al.* 2006). Durch die NAD⁺-oxidase beinhaltenden Subpollenpartikel konnten in Zellkultur die reaktiven Sauerstoffradikale (ROS) erhöht und im Mausmodell eine Entzündung in den Atemwegen induziert werden (Basci *et al.* 2006). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Pollenlipide Lipidmediatoren der Säugermastzelle "imitieren" (zusammengefasst von Dahl 2018).

Auch das Endotoxin LPS wurde auf Pollen des Gemeinen Beifußes gefunden, und dieses LPS war im Mausmodell für die polleninduzierte Entzündung in der Lunge verantwortlich (Oteros *et al.* 2019). In kommerziell erhältlichem Birkenpollenextrakt wurde 0,4 ng LPS pro µg Pollenextrakt gefunden (Aglas *et al.* 2018). Dass in der vorliegenden Arbeit Mastzellen vor allem durch eventuell in den Pollenextrakten befindlichen LPS direkt zur Degranulation gebracht wurden, ist unwahrscheinlich, da LPS zwar Mausmastzellen aktivieren (Bischoff 2007), aber nicht zur Degranulation bringen kann (Gupta *et al.* 2016, Leal-Berumen *et al.* 1994, zusammengefasst von Marshall & Jawdat 2004).

Traidl-Hoffmann und Kolleginnen fanden heraus, dass auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete wässrige Pollenextrakt Bet-APE u.a. monohydroxylierte Produkte wie Linolsäure und Linolensäure beinhaltet (Traidl-Hoffmann *et al.* 2002). Schon vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Linolsäure den durch TNF induzierten oxidativen Stress potenziert, dass sie die Calciumhomöostase zerstört und *in vitro* Apoptose in vaskulären Endothelzellen

verursacht (Toborek *et al.* 1997). Außerdem beinhalten Pollen eicosanoidähnliche Substanzen, die im ELISA mit anti-Leukotriene B4 kreuzreagieren (Behrend *et al.* 2001).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass wässrige Birkenpollenextrakte humane polymorphonukleäre Granulozyten aktivieren sowie die Migration von humanen Granulozyten und humanen Eosinophilen induzieren (Traidl-Hoffmann *et al.* 2002, Plötz *et al.* 2004). Dies und die Tatsache, dass die durch Birkenpollen induzierte Migration von Granulozyten durch Leukotriene B4 Rezeptor Antagonisten deutlich verringert werden konnte (Traidl-Hoffmann *et al.* 2002), impliziert, dass die durch Pollen induzierte Immunantwort teilweise durch die in Pollen vorhandenen LTB4 Rezeptoragonisten verursacht wird.

Einige der durch Pollenextraktbestandteile induzierten Signalkaskaden wurden bereits identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass Bet-APE eine starke cAMP Hochregulation in Dendritischen Zellen (DCs) induziert, die vermutlich auf Prostaglandin E ähnlichen Substanzen in Bet-APE beruht (Gilles *et al.* 2009b). Allerdings wurde gezeigt, dass der in Pollen gefundene, Prostaglandin E ähnliche Stoff E1-Phytostane (PPE1) zwar nur eine geringe Erhöhung von cAMP in DCs hervorruft, aber weiter unten in der Signalkaskade ebenso wie cAMP die NF κ B abhängige Kaskade eher inhibiert mithilfe von PPAR- γ (Gilles *et al.* 2009b).

Die Substanz in den Pollen, die für die Entzündungsreaktion und Mastzelldegranulation verantwortlich war, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, aber es liegt nahe, dass einige der oben beschriebenen Komponenten/Immunmechanismen eine Rolle spielen, jedoch nur die Substanzen, die auch in wässrigen Pollenextrakten gefunden werden, wie z.B. Linolsäure (Traidl-Hoffmann *et al.* 2002). Es wäre interessant, sowohl die Substanzen in den größenfraktionierten wässrigen Pollenextrakten als auch die *in vivo* an der durch Pollen induzierten Entzündungsreaktion beteiligten Immunzellen in einer folgenden Arbeit weiter zu untersuchen.

5 LITERATUR

Veröffentlichungen, die am 9.10.2020 nur elektronisch veröffentlicht waren und keine Bandnummer bzw. keine Seitenzahlen besitzen, wurden belassen.

Abraham, S. N., and A. L. St John. 2010. 'Mast cell-orchestrated immunity to pathogens', *Nat Rev Immunol*, 10: 440-52.

Abraham, W. M., A. J. Bourdelais, A. Ahmed, I. Serebriakov, and D. G. Baden. 2005. 'Effects of inhaled brevetoxins in allergic airways: toxin-allergen interactions and pharmacologic intervention', *Environ Health Perspect*, 113: 632-7.

Aglas, L., S. Gilles, R. Bauer, S. Huber, G. R. Araujo, G. Mueller, S. Scheibhofer, M. Amisi, H. H. Dang, P. Briza, B. Bohle, J. Horejs-Hoeck, C. Traidl-Hoffmann, and F. Ferreira. 2018. 'Context matters: TH2 polarization resulting from pollen composition and not from protein-intrinsic allergenicity', *J Allergy Clin Immunol*, 142: 984-87 e6.

Akdis C. A., P. W. Hellings, and I. Agache (Editoren) 2015. 'Global Atlas of Allergic Rhinitis and Chronic Rhinosinusitis' European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) available at http://www.eaaci.org/globalatlas/ENT_Atlas_web.pdf, 442 Seiten, abgerufen am 21.01.2019

Aller, M. A., A. Arias, J. I. Arias, and J. Arias. 2019. 'Carcinogenesis: the cancer cell-mast cell connection', *Inflamm Res*, 68: 103-16.

Bacsi, A., B. K. Choudhury, N. Dharajiya, S. Sur, and I. Boldogh. 2006. 'Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases', *J Allergy Clin Immunol*, 118: 844-50.

Bacsi, A., N. Dharajiya, B. K. Choudhury, S. Sur, and I. Boldogh. 2005. 'Effect of pollen-mediated oxidative stress on immediate hypersensitivity reactions and late-phase inflammation in allergic conjunctivitis', *J Allergy Clin Immunol*, 116: 836-43.

Bader, M., N. Alenina, M. A. Andrade-Navarro, and R. A. Santos. 2014. 'MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs', *Pharmacol Rev*, 66: 1080-105.

Bastl, K., M. Kmenta, and U. E. Berger. 2018. 'Defining Pollen Seasons: Background and Recommendations', *Curr Allergy Asthma Rep*, 18: 73.

Behrendt, H., A. Kasche, C. Ebner von Eschenbach, U. Risse, J. Huss-Marp, and J. Ring. 2001. 'Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization', *Int Arch Allergy Immunol*, 124: 121-5.

Bennett, J. P., S. Cockcroft, and B. D. Gomperts. 1979. 'Ionomycin stimulates mast cell histamine secretion by forming a lipid-soluble calcium complex', *Nature*, 282: 851-3.

Berker, M., L. J. Frank, A. L. Gessner, N. Grassl, A. V. Holtermann, S. Hoppner, C. Kraef, M. D. Leclaire, P. Maier, D. A. Messerer, L. Mohrmann, J. P. Nieke, D. Schoch, D. Soll, and C. M. Wopen. 2017. 'Allergies - A T cells perspective in the era beyond the TH1/TH2 paradigm', *Clin Immunol*, 174: 73-83.

Bischoff, S. C. 2007. 'Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data', *Nat Rev Immunol*, 7: 93-104.

Blanco, C., T. Carrillo, N. Ortega, M. Alvarez, C. Dominguez, and R. Castillo. 1998. 'Comparison of skin-prick test and specific serum IgE determination for the diagnosis of latex allergy', *Clin Exp Allergy*, 28: 971-6.

- Blume, C., S. Foerster, S. Gilles, W. Becker, J. Ring, H. Behrendt, A. Petersen and C. Traidl-Hoffmann. 2009. 'Human epithelial cells of the respiratory tract and the skin differentially internalize grass pollen allergens', *J invest. Dermat.* 129: 1935-1944
- Bodtger, U., L. K. Poulsen, and H. J. Malling. 2003. 'Asymptomatic skin sensitization to birch predicts later development of birch pollen allergy in adults: a 3-year follow-up study', *J Allergy Clin Immunol*, 111: 149-54.
- Boldogh, I., A. Bacsı, B. K. Choudhury, N. Dharajiyā, R. Alam, T. K. Hazra, S. Mitra, R. M. Goldblum, and S. Sur. 2005. 'ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation', *J Clin Invest*, 115: 2169-79.
- Bonnekoh, H., J. Scheffel, N. Kambe, and K. Krause. 2018. 'The role of mast cells in autoinflammation', *Immunol Rev*, 282: 265-75.
- Bosch-Cano, F., N. Bernard, B. Sudre, F. Gillet, M. Thibaudon, H. Richard, P. M. Badot, and P. Ruffaldi. 2011. 'Human exposure to allergenic pollens: a comparison between urban and rural areas', *Environ Res*, 111: 619-25.
- Bradding, P., and G. Pejler. 2018. 'The controversial role of mast cells in fibrosis', *Immunol Rev*, 282: 198-231.
- Brown, W. G., M. J. Halonen, W. T. Kaltenborn, and R. A. Barbee. 1979. 'The relationship of respiratory allergy, skin test reactivity, and serum IgE in a community population sample', *J Allergy Clin Immunol*, 63: 328-35.
- Brozek, J. L., J. Bousquet, C. E. Baena-Cagnani, S. Bonini, G. W. Canonica, T. B. Casale, R. G. van Wijk, K. Ohta, T. Zuberbier, H. J. Schunemann, Allergy Global, Network Asthma European, Development Grading of Recommendations Assessment, and Group Evaluation Working. 2010. 'Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision', *J Allergy Clin Immunol*, 126: 466-76.
- Bryant, D. H., M. W. Burns, and L. Lazarus. 1975. 'The correlation between skin tests, bronchial provocation tests and the serum level of IgE specific for common allergens in patients with asthma', *Clin Allergy*, 5: 145-57.
- Bryce, M., O. Drews, M. F. Schenk, A. Menzel, N. Estrella, I. Weichenmeier, M. J. Smulders, J. Buters, J. Ring, A. Gorg, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann. 2010. 'Impact of urbanization on the proteome of birch pollen and its chemotactic activity on human granulocytes', *Int Arch Allergy Immunol*, 151: 46-55.
- Caillaud, D. M., S. Martin, C. Segala, P. Vidal, J. Lecadet, S. Pellier, P. Rouzaire, A. Tridon, and B. Evrard. 2015. 'Airborne pollen levels and drug consumption for seasonal allergic rhinoconjunctivitis: a 10-year study in France', *Allergy*, 70: 99-106.
- Caillaud, D., S. Martin, C. Segala, J. P. Besancenot, B. Clot, M. Thibaudon, and Network French Aerobiology. 2014. 'Effects of airborne birch pollen levels on clinical symptoms of seasonal allergic rhinoconjunctivitis', *Int Arch Allergy Immunol*, 163: 43-50.
- Can, I. H., A. Islam, D. S. Karasoy, and E. E. Samim. 2010. 'Does regional pollen load affect the prevalence of clinical allergy to those pollen groups?', *J Laryngol Otol*, 124: 297-301.
- Canis, M., S. Becker, M. Groger, and M. F. Kramer. 2012. 'IgE reactivity patterns in patients with allergic rhinoconjunctivitis to ragweed and mugwort pollens', *Am J Rhinol Allergy*, 26: 31-5.
- Cho, J. H., J. D. Suh, J. K. Kim, S. C. Hong, I. H. Park, and H. M. Lee. 2014. 'Correlation between skin-prick testing, individual specific IgE tests, and a multiallergen IgE assay for allergy detection in patients with chronic rhinitis', *Am J Rhinol Allergy*, 28: 388-91.
- Chodaczek, G., A. Bacsı, N. Dharajiyā, S. Sur, T. K. Hazra, and I. Boldogh. 2009. 'Ragweed pollen-mediated IgE-independent release of biogenic amines from mast cells via induction of mitochondrial dysfunction', *Mol Immunol*, 46: 2505-14.

- Choi, H. W., J. Suwanpradid, I. H. Kim, H. F. Staats, M. Haniffa, A. S. MacLeod, and S. N. Abraham. 2018. 'Perivascular dendritic cells elicit anaphylaxis by relaying allergens to mast cells via microvesicles', *Science*, 362.
- Church, M. K. 2017. 'Allergy, Histamine and Antihistamines', *Handb Exp Pharmacol*, 241: 321-31.
- Cildir, G., H. Pant, A. F. Lopez, and V. Tergaonkar. 2017. 'The transcriptional program, functional heterogeneity, and clinical targeting of mast cells', *J Exp Med*, 214: 2491-506.
- Costanza, M., M. P. Colombo, and R. Pedotti. 2012. 'Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Int J Mol Sci*, 13: 15107-25.
- Crosby, C. M., and M. Kronenberg. 2018. 'Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells', *Nat Rev Immunol*, 18: 559-74.
- D'Amato, G., L. Cecchi, S. Bonini, C. Nunes, I. Annesi-Maesano, H. Behrendt, G. Liccardi, T. Popov, and P. van Cauwenberge. 2007. 'Allergenic pollen and pollen allergy in Europe', *Allergy*, 62: 976-90.
- Dahl, A. 2018. 'Pollen Lipids Can Play a Role in Allergic Airway Inflammation', *Front Immunol*, 9: 2816.
- de Jonge, W. J., F. O. The, D. van der Coelen, R. J. Bennink, P. H. Reitsma, S. J. van Deventer, R. M. van den Wijngaard, and G. E. Boeckxstaens. 2004. 'Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice', *Gastroenterology*, 127: 535-45.
- Doherty, T. A., and D. H. Broide. 2019. 'Airway innate lymphoid cells in the induction and regulation of allergy', *Allergol Int*, 68: 9-16.
- Donelan, J., W. Boucher, N. Papadopoulou, M. Lytinas, D. Papaliodis, P. Dobner, and T. C. Theoharides. 2006. 'Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 7759-64.
- Dudeck, A., J. Dudeck, J. Scholten, A. Petzold, S. Surianarayanan, A. Kohler, K. Peschke, D. Vohringer, C. Waskow, T. Krieg, W. Muller, A. Waisman, K. Hartmann, M. Gunzer, and A. Roers. 2011. 'Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens', *Immunity*, 34: 973-84.
- Dudler, T., D. C. Machado, L. Kolbe, R. R. Annand, N. Rhodes, M. H. Gelb, K. Koelsch, M. Suter, and B. A. Helm. 1995. 'A link between catalytic activity, IgE-independent mast cell activation, and allergenicity of bee venom phospholipase A2', *J Immunol*, 155: 2605-13.
- Echtenacher, B., D. N. Mannel, and L. Hultner. 1996. 'Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis', *Nature*, 381: 75-7.
- Ehrlich, P. 1877. 'Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik', *Arch mikr Anat*, 13: 263-278.
- Ehrlich, P. 1879. 'Beiträge zur Kenntniss der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Arch Anat Physiol, Physiologische Abteilung, 5: 166-169.
- Elieh Ali Komi, D., T. Rambasek, and L. Bielory. 2017. 'Clinical implications of mast cell involvement in allergic conjunctivitis', *Allergy*, 73: 528-39.
- Ellis, A. K., and M. W. Tenn. 2018. 'Advances in rhinitis-models and mechanisms', *Ann Allergy Asthma Immunol*, 121: 61-4.
- Endo, S., D. J. Hochman, T. Midoro-Horiuti, R. M. Goldblum, and E. G. Brooks. 2011. 'Mountain cedar pollen induces IgE-independent mast cell degranulation, IL-4 production, and intracellular reactive oxygen species generation', *Cell Immunol*, 271: 488-95.

- Esch, R. E. 1997. 'Allergen source materials and quality control of allergenic extracts', *Methods*, 13: 2-13.
- Espinosa, E., and S. Valitutti. 2017. 'New roles and controls of mast cells', *Curr Opin Immunol*, 50: 39-47.
- Eyerich, S., K. Eyerich, C. Traidl-Hoffmann, and T. Biedermann. 2018. 'Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network', *Trends Immunol*, 39: 315-27.
- Feoktistov, I., and I. Biaggioni. 2011. 'Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation', *Adv Pharmacol*, 61: 115-44.
- Feyerabend, T. B., A. Weiser, A. Tietz, M. Stassen, N. Harris, M. Kopf, P. Radermacher, P. Moller, C. Benoist, D. Mathis, H. J. Fehling, and H. R. Rodewald. 2011. 'Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody- and T cell-mediated autoimmunity', *Immunity*, 35: 832-44.
- Frossi, B., M. De Carli, K. C. Daniel, J. Rivera, and C. Pucillo. 2003. 'Oxidative stress stimulates IL-4 and IL-6 production in mast cells by an APE/Ref-1-dependent pathway', *Eur J Immunol*, 33: 2168-77.
- Frossi, B., M. De Carli, and C. Pucillo. 2004. 'The mast cell: an antenna of the microenvironment that directs the immune response', *J Leukoc Biol*, 75: 579-85.
- Frossi, B., F. Mion, R. Sibilano, L. Danelli, and C. E. M. Pucillo. 2018. 'Is it time for a new classification of mast cells? What do we know about mast cell heterogeneity?', *Immunol Rev*, 282: 35-46.
- Galli, S. J., and Y. Kitamura. 1987. 'Genetically mast-cell-deficient W/W^v and Sl/Sl^d mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo', *Am J Pathol*, 127: 191-8.
- Galli, S. J., and M. Tsai. 2012. 'IgE and mast cells in allergic disease', *Nat Med*, 18: 693-704.
- Gieras, A., P. Cejka, K. Blatt, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, S. Flicker, A. Stoecklinger, K. Marth, A. Drescher, J. Thalhamer, P. Valent, O. Majdic, and R. Valenta. 2011. 'Mapping of conformational IgE epitopes with peptide-specific monoclonal antibodies reveals simultaneous binding of different IgE antibodies to a surface patch on the major birch pollen allergen, Bet v 1', *J Immunol*, 186: 5333-44.
- Gilfillan, A. M., and C. Tkaczyk. 2006. 'Integrated signalling pathways for mast-cell activation', *Nat Rev Immunol*, 6: 218-30.
- Gilles-Stein, S., I. Beck, A. Chaker, M. Bas, M. McIntyre, L. Cifuentes, A. Petersen, J. Gutermuth, C. Schmidt-Weber, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann. 2016. 'Pollen derived low molecular compounds enhance the human allergen specific immune response in vivo', *Clin Exp Allergy*, 46: 1355-65.
- Gilles, S., C. Akdis, R. Lauener, P. Schmid-Grendelmeier, T. Bieber, G. Schappi, and C. Traidl-Hoffmann. 2018. 'The role of environmental factors in allergy: A critical reappraisal', *Exp Dermatol*, 27: 1193-200.
- Gilles, S., I. Beck, S. Lange, J. Ring, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann. 2015. 'Non-allergenic factors from pollen modulate T helper cell instructing notch ligands on dendritic cells', *World Allergy Organ J*, 8: 2.
- Gilles, S., H. Behrendt, J. Ring, and C. Traidl-Hoffmann. 2012. 'The pollen enigma: modulation of the allergic immune response by non-allergenic, pollen-derived compounds', *Curr Pharm Des*, 18: 2314-9.
- Gilles, S., A. Fekete, X. Zhang, I. Beck, C. Blume, J. Ring, C. Schmidt-Weber, H. Behrendt, P. Schmitt-Kopplin, and C. Traidl-Hoffmann. 2011. 'Pollen metabolome

analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses', *J Allergy Clin Immunol*, 127: 454-61 e1-9.

Gilles, S., V. Mariani, M. Bryce, M. J. Mueller, J. Ring, H. Behrendt, T. Jakob, and C. Traidl-Hoffmann. 2009a. 'Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response', *Allergy Asthma Clin Immunol*, 5: 3.

Gilles, S., V. Mariani, M. Bryce, M. J. Mueller, J. Ring, T. Jakob, S. Pastore, H. Behrendt, and C. Traidl-Hoffmann. 2009b. 'Pollen-derived E1-phytoprostanes signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms', *J Immunol*, 182: 6653-8.

Gimenez-Rivera, V. A., M. Metz, and F. Siebenhaar. 2014. 'Mast cell-mediated reactions in vivo', *Methods Mol Biol*, 1192: 239-47.

Goleva, E., E. Berdyshev, and D. Y. Leung. 2019. 'Epithelial barrier repair and prevention of allergy', *J Clin Invest*, 129: 1463-74.

Gomez-Pinilla, P. J., G. Farro, M. Di Giovangiulio, N. Stakenborg, A. Nemethova, A. de Vries, A. Liston, T. B. Feyerabend, H. R. Rodewald, G. E. Boeckstaens, and G. Matteoli. 2014. 'Mast cells play no role in the pathogenesis of postoperative ileus induced by intestinal manipulation', *PLoS One*, 9: e85304.

Gregory, G. D., and M. A. Brown. 2006. 'Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity', *Methods Mol Biol*, 315: 35-50.

Guermonprez, P., J. Helft, C. Claser, S. Deroubaix, H. Karanje, A. Gazumyan, G. Darasse-Jeze, S. B. Telerman, G. Breton, H. A. Schreiber, N. Frias-Staheli, E. Billerbeck, M. Dorner, C. M. Rice, A. Ploss, F. Klein, M. Swiecki, M. Colonna, A. O. Kamphorst, M. Meredith, R. Niec, C. Takacs, F. Mikhail, A. Hari, D. Bosque, T. Eisenreich, M. Merad, Y. Shi, F. Ginhoux, L. Renia, B. C. Urban, and M. C. Nussenzweig. 2013. 'Inflammatory Flt3l is essential to mobilize dendritic cells and for T cell responses during Plasmodium infection', *Nat Med*, 19: 730-8.

Gupta, K., C. Idahosa, S. Roy, D. Lee, H. Subramanian, A. Dhingra, K. Boesze-Battaglia, J. Korostoff, and H. Ali. 2017. 'Differential Regulation of Mas-Related G Protein-Coupled Receptor X2-Mediated Mast Cell Degranulation by Antimicrobial Host Defense Peptides and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide', *Infect Immun*, 85: e00246-17.

Gupta, K., H. Subramanian, and H. Ali. 2016. 'Modulation of host defense peptide-mediated human mast cell activation by LPS', *Innate Immun*, 22: 21-30.

Halken, S., D. Larenas-Linnemann, G. Roberts, M. A. Calderon, E. Angier, O. Pfaar, D. Ryan, I. Agache, I. J. Ansotegui, S. Arasi, G. Du Toit, M. Fernandez-Rivas, R. Geerth van Wijk, M. Jutel, J. Kleine-Tebbe, S. Lau, P. M. Matricardi, G. B. Pajno, N. G. Papadopoulos, M. Penagos, A. F. Santos, G. J. Sturm, F. Timmermans, R. van Ree, E. M. Varga, U. Wahn, M. Kristiansen, S. Dhimi, A. Sheikh, and A. Muraro. 2017. 'EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Prevention of allergy', *Pediatr Allergy Immunol*, 28: 728-45.

He, S. H., H. Xie, and Y. S. He. 2004. 'Induction of tryptase and histamine release from human colon mast cells by IgE dependent or independent mechanisms', *World J Gastroenterol*, 10: 319-22.

Humeniuk, P., P. Dubiela, and K. Hoffmann-Sommergruber. 2017. 'Dendritic Cells and Their Role in Allergy: Uptake, Proteolytic Processing and Presentation of Allergens', *Int J Mol Sci*, 18.

Janeway 2012: Immunobiology. 8th Edition by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, USA and UK. 868 pages.

Katz, H. R., R. L. Stevens, and K. F. Austen. 1985. 'Heterogeneity of mammalian mast cells differentiated in vivo and in vitro', *J Allergy Clin Immunol*, 76: 250-9.

- Khan, D. A. 2009. 'Allergic rhinitis with negative skin tests: does it exist?', *Allergy Asthma Proc*, 30: 465-9.
- Kimura, I., Y. Moritani, and Y. Tanizaki. 1973. 'Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy', *Clin Allergy*, 3: 195-202.
- Kinet, J. P. 1999. 'The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology', *Annu Rev Immunol*, 17: 931-72.
- Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka. 1978. 'Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation', *Blood*, 52: 447-52.
- Lagunoff, D., T. W. Martin, and G. Read. 1983. 'Agents that release histamine from mast cells', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 23: 331-51.
- Langen, U., R. Schmitz, and H. Steppuhn. 2013. '[Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]', *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56: 698-706.
- Leal-Berumen, I., P. Conlon, and J. S. Marshall. 1994. 'IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide', *J Immunol*, 152: 5468-76.
- Levi-Schaffer, F., and J. Scheffel. 2018. 'Dangerous liaisons in anaphylaxis', *Science*, 362: 640-41.
- Liu, C., and T. E. Hermann. 1978. 'Characterization of ionomycin as a calcium ionophore', *J Biol Chem*, 253: 5892-4.
- Lowman, M. A., P. H. Rees, R. C. Benyon, and M. K. Church. 1988. 'Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and nonimmunologic stimuli', *J Allergy Clin Immunol*, 81: 590-7.
- Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng, and R. J. Noelle. 2006. 'Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance', *Nature*, 442: 997-1002.
- Lyons, D. O., M. R. Plewes, and N. A. Pullen. 2018. 'Soluble transforming growth factor beta-1 enhances murine mast cell release of Interleukin 6 in IgE-independent and Interleukin 13 in IgE-dependent settings in vitro', *PLoS One*, 13: e0207704.
- Machado, D. C., D. Horton, R. Harrop, P. T. Peachell, and B. A. Helm. 1996. 'Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE', *Eur J Immunol*, 26: 2972-80.
- Marshall, J. S. 2004. 'Mast-cell responses to pathogens', *Nat Rev Immunol*, 4: 787-99.
- Marshall, J. S., and D. M. Jawdat. 2004. 'Mast cells in innate immunity', *J Allergy Clin Immunol*, 114: 21-7.
- Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada. 2004a. 'The effects of endothelin-1 on degranulation, cytokine, and growth factor production by skin-derived mast cells', *Eur J Immunol*, 34: 1910-9.
- Matsushima, H., N. Yamada, H. Matsue, and S. Shimada. 2004b. '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.
- Maurer, M., M. Koberle, M. Metz, and T. Biedermann. 2019. 'Mast cells: Promoters of health and modulators of disease', *J Allergy Clin Immunol*, 144: S1-S3.

- Maurer, M., and C. Pucillo. 2018. 'What we know (and don't know) about the biology and functions of mast cells and basophils', *Immunol Rev*, 282: 5-7.
- Metz, M. 2003. 'Die Mastzelle als Schlüsselzelle in der natürlichen Immunität bei septischer Peritonitis: Rolle von Endothelin-1', Dissertation im Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Metz, M., S. Gilles, A. Geldmacher, H. Behrendt, C. Traidl-Hoffmann, and M. Maurer. 2011. 'Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation', *J Invest Dermatol*, 131: 987-90.
- Metz, M., M. A. Grimaldeston, S. Nakae, A. M. Piliponsky, M. Tsai, and S. J. Galli. 2007. 'Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation', *Immunol Rev*, 217: 304-28.
- Metz, M., V. Lammel, B. F. Gibbs, and M. Maurer. 2006. 'Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells', *Am J Pathol*, 169: 815-22.
- Metz, M., and M. Maurer. 2007. 'Mast cells--key effector cells in immune responses', *Trends Immunol*, 28: 234-41.
- Metz, M., and M. Maurer.. 2009. 'Innate immunity and allergy in the skin', *Curr Opin Immunol*, 21: 687-93.
- Metz, M., F. Siebenhaar, and M. Maurer. 2008. 'Mast cell functions in the innate skin immune system', *Immunobiology*, 213: 251-60.
- Meurer, S. K., M. Ness, S. Weiskirchen, P. Kim, C. G. Tag, M. Kauffmann, M. Huber, and R. Weiskirchen. 2016. 'Isolation of Mature (Peritoneum-Derived) Mast Cells and Immature (Bone Marrow-Derived) Mast Cell Precursors from Mice', *PLoS One*, 11: e0158104.
- Mortaz, E., F. A. Redegeld, H. Sarir, K. Karimi, D. Raats, F. P. Nijkamp, and G. Folkerts. 2008. 'Cigarette smoke stimulates the production of chemokines in mast cells', *J Leukoc Biol*, 83: 575-80.
- Moverare, R., K. Westritschnig, M. Svensson, B. Hayek, M. Bende, G. Pauli, R. Sorva, T. Haahtela, R. Valenta, and L. Elfman. 2002. 'Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization', *Int Arch Allergy Immunol*, 128: 325-35.
- Mukai, K., M. Tsai, H. Saito, and S. J. Galli. 2018. 'Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors', *Immunol Rev*, 282: 121-50.
- Munitz, A., A. M. Piliponsky, and F. Levi-Schaffer. 2003. 'IgE-Independent Activation of Human Mast Cells Indicates their Role in the Late Phase Reaction of Allergic Inflammation', *Cell Tissue Bank*, 4: 25-8.
- Munoz-Cano, R., M. Pascal, G. Araujo, M. J. Goikoetxea, A. L. Valero, C. Picado, and J. Bartra. 2017. 'Mechanisms, Cofactors, and Augmenting Factors Involved in Anaphylaxis', *Front Immunol*, 8: 1193.
- Nakano, T., T. Sonoda, C. Hayashi, A. Yamatodani, Y. Kanayama, T. Yamamura, H. Asai, T. Yonezawa, Y. Kitamura, and S. J. Galli. 1985. 'Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells', *J Exp Med*, 162: 1025-43.
- Niederberger, V., P. Stubner, S. Spitzauer, D. Kraft, R. Valenta, K. Ehrenberger, and F. Horak. 2001. 'Skin test results but not serology reflect immediate type respiratory sensitivity: a study performed with recombinant allergen molecules', *J Invest Dermatol*, 117: 848-51.

- Obersteiner, A., S. Gilles, U. Frank, I. Beck, F. Haring, D. Ernst, M. Rothballer, A. Hartmann, C. Traidl-Hoffmann, and M. Schmid. 2016. 'Pollen-Associated Microbiome Correlates with Pollution Parameters and the Allergenicity of Pollen', *PLoS One*, 11: e0149545.
- Oettgen, H. C., T. R. Martin, A. Wynshaw-Boris, C. Deng, J. M. Drazen, and P. Leder. 1994. 'Active anaphylaxis in IgE-deficient mice', *Nature*, 370: 367-70.
- Ogasawara, T., M. Murakami, T. Suzuki-Nishimura, M. K. Uchida, and I. Kudo. 1997. 'Mouse bone marrow-derived mast cells undergo exocytosis, prostanoid generation, and cytokine expression in response to G protein-activating polybasic compounds after coculture with fibroblasts in the presence of c-kit ligand', *J Immunol*, 158: 393-404.
- Ohmori, H., K. Komoriya, A. Azuma, S. Kurozumi, and Y. Hashimoto. 1979. 'Xanthine oxidase-induced histamine release from isolated rat peritoneal mast cells: involvement of hydrogen peroxide', *Biochem Pharmacol*, 28: 333-4.
- Oka, T., J. Kalesnikoff, P. Starkl, M. Tsai, and S. J. Galli. 2012. 'Evidence questioning cromolyn's effectiveness and selectivity as a 'mast cell stabilizer' in mice', *Lab Invest*, 92: 1472-82.
- Olivera, A., M. A. Beaven, and D. D. Metcalfe. 2018. 'Mast cells signal their importance in health and disease', *J Allergy Clin Immunol*, 142: 381-93.
- Orovitg, A., P. Guardia, D. Barber, F. de la Torre, R. Rodriguez, M. Villalba, G. Salcedo, J. Monteseirin, and J. Conde. 2011. 'Enhanced diagnosis of pollen allergy using specific immunoglobulin E determination to detect major allergens and panallergens', *J Investig Allergol Clin Immunol*, 21: 253-9.
- Oteros, J., E. Bartusel, F. Alessandrini, A. Nunez, D. A. Moreno, H. Behrendt, C. Schmidt-Weber, C. Traidl-Hoffmann, and J. Buters. 2019. 'Artemisia pollen is the main vector for airborne endotoxin', *J Allergy Clin Immunol*, 143: 369-77 e5.
- Parchmann, S., and M. J. Mueller. 1998. 'Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants', *J Biol Chem*, 273: 32650-5.
- Pawankar, R., S. T. Holgate, G. W. Canonica, R. F. Lockey, M.S. Blaiss (Editoren). 2013. 'WAO White Book on Allergy', Updated 2013 (www.worldallergy.org/UserFiles/file/WhiteBook2-2013-v8.pdf) abgerufen am 21.01.2019
- Pfaar, O., K. Bastl, U. Berger, J. Buters, M. A. Calderon, B. Clot, U. Darsow, P. Demoly, S. R. Durham, C. Galan, R. Gehrig, R. Gerth van Wijk, L. Jacobsen, L. Klimek, M. Sofiev, M. Thibaudon, and K. C. Bergmann. 2017. 'Defining pollen exposure times for clinical trials of allergen immunotherapy for pollen-induced rhinoconjunctivitis - an EAACI position paper', *Allergy*, 72: 713-22.
- Piliponsky, A. M., G. J. Gleich, A. Nagler, I. Bar, and F. Levi-Schaffer. 2003. 'Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor', *Blood*, 101: 1898-904.
- Piliponsky, A. M., and L. Romani. 2018. 'The contribution of mast cells to bacterial and fungal infection immunity', *Immunol Rev*, 282: 188-97.
- Plötz, S. G., C. Traidl-Hoffmann, I. Feussner, A. Kasche, A. Feser, J. Ring, T. Jakob, and H. Behrendt. 2004. 'Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators', *J Allergy Clin Immunol*, 113: 1152-60.
- Polosa, R., S. T. Holgate, and M. K. Church. 1989. 'Adenosine as a pro-inflammatory mediator in asthma', *Pulm Pharmacol*, 2: 21-6.
- Reber, L. L., J. D. Hernandez, and S. J. Galli. 2017. 'The pathophysiology of anaphylaxis', *J Allergy Clin Immunol*, 140: 335-48.

- Reber, L. L., T. Marichal, and S. J. Galli. 2012. 'New models for analyzing mast cell functions in vivo', *Trends Immunol*, 33: 613-25.
- Recklinghausen von F. 1863. 'Ueber Eiter- und Bindegewebskörperchen' *Virchows Arch Path Anat* 28: 157-197
- Redegeld, F. A., Y. Yu, S. Kumari, N. Charles, and U. Blank. 2018. 'Non-IgE mediated mast cell activation', *Immunol Rev*, 282: 87-113.
- Rodewald, H. R., and T. B. Feyerabend. 2012. 'Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction?', *Immunity*, 37: 13-24.
- Scheurer, S., and S. Schulke. 2018. 'Interaction of Non-Specific Lipid-Transfer Proteins With Plant-Derived Lipids and Its Impact on Allergic Sensitization', *Front Immunol*, 9: 1389.
- Schubert, N., J. Dudeck, P. Liu, A. Karutz, S. Speier, M. Maurer, J. Tuckermann, and A. Dudeck. 2015. 'Mast cell promotion of T cell-driven antigen-induced arthritis despite being dispensable for antibody-induced arthritis in which T cells are bypassed', *Arthritis Rheumatol*, 67: 903-13.
- Scott-Taylor, T. H., S. C. Axinia, S. Amin, and R. Pettengell. 2018. 'Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy', *Immun Inflamm Dis*, 6: 13-33.
- Segal, D. M., J. D. Taurog, and H. Metzger. 1977. 'Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 2993-7.
- Siroux, V., A. Boudier, R. Nadif, C. Lupinek, R. Valenta, and J. Bousquet. 2019. 'Association between asthma, rhinitis, and conjunctivitis multimorbidities with molecular IgE sensitization in adults', *Allergy*, 74: 824-7.
- Snoek, S. A., S. Dhawan, S. H. van Bree, C. Cailotto, S. A. van Diest, J. M. Duarte, O. I. Stanisor, F. W. Hilbers, L. Nijhuis, A. Koeman, R. M. van den Wijngaard, C. J. Zuurbier, G. E. Boeckxstaens, and W. J. de Jonge. 2012. 'Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model', *Neurogastroenterol Motil*, 24: 172-84, e91.
- St John, A. L., A. P. Rathore, H. Yap, M. L. Ng, D. D. Metcalfe, S. G. Vasudevan, and S. N. Abraham. 2011. 'Immune surveillance by mast cells during dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 9190-5.
- Stenius, B. 1973. 'Skin and provocation tests with *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis. Comparison of prick and intracutaneous skin test methods and correlation with specific IgE', *Acta Allergol*, 28: 81-100.
- Stenius, B., L. Wide, W. M. Seymour, V. Holford-Strevens, and J. Pepys. 1971. 'Clinical significance of specific IgE to common allergens. I. Relationship of specific IgE against *Dermatophagoides* spp. and grass pollen to skin and nasal tests and history', *Clin Allergy*, 1: 37-55.
- Stokes, J., R. Kessler, G. Philip, and T. B. Casale. 2005. 'Ragweed skin test responsiveness correlates with specific immunoglobulin E levels', *Allergy Asthma Proc*, 26: 103-7.
- Strait, R. T., S. C. Morris, M. Yang, X. Qu, F. D. Finkelman 2002. 'Pathways of anaphylaxis in the mouse', *J Allergy Clin Immunol*, 109: 658-68.
- Sumpter, T. L., S. C. Balmert, and D. H. Kaplan. 2019. 'Cutaneous immune responses mediated by dendritic cells and mast cells', *JCI Insight*, 4.
- Swindle, E. J., J. A. Hunt, and J. W. Coleman. 2002. 'A comparison of reactive oxygen species generation by rat peritoneal macrophages and mast cells using the highly

- sensitive real-time chemiluminescent probe pholasin: inhibition of antigen-induced mast cell degranulation by macrophage-derived hydrogen peroxide', *J Immunol*, 169: 5866-73.
- Ta, V., B. Weldon, G. Yu, O. Humblet, S. Neale-May, and K. Nadeau. 2011. 'Use of Specific IgE and Skin Prick Test to Determine Clinical Reaction Severity', *Br J Med Med Res*, 1: 410-29.
- Tilles, S. A., and E. J. Bardana, Jr. 1997. 'Seasonal variation in bronchial hyperreactivity (BHR) in allergic patients', *Clin Rev Allergy Immunol*, 15: 169-85.
- Toborek, M., E. M. Blanc, S. Kaiser, M. P. Mattson, and B. Hennig. 1997. 'Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis, and apoptosis of cultured vascular endothelial cells', *J Lipid Res*, 38: 2155-67.
- Traidl-Hoffmann, C., A. Kasche, T. Jakob, M. Huger, S. Plotz, I. Feussner, J. Ring, and H. Behrendt. 2002. 'Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes', *J Allergy Clin Immunol*, 109: 831-8.
- Traidl-Hoffmann, C., V. Mariani, H. Hochrein, K. Karg, H. Wagner, J. Ring, M. J. Mueller, T. Jakob, and H. Behrendt. 2005. 'Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization', *J Exp Med*, 201: 627-36.
- Wimmer, M., F. Alessandrini, S. Gilles, U. Frank, S. Oeder, M. Hauser, J. Ring, F. Ferreira, D. Ernst, J. B. Winkler, P. Schmitt-Kopplin, C. Ohnmacht, H. Behrendt, C. Schmidt-Weber, C. Traidl-Hoffmann, and J. Gutermuth. 2015. 'Pollen-derived adenosine is a necessary cofactor for ragweed allergy', *Allergy*, 70: 944-54.
- Wise, S. K., S. Y. Lin, and E. Toskala. 2018. 'International consensus statement on allergy and rhinology: allergic rhinitis-executive summary', *Int Forum Allergy Rhinol*, 8: 85-107.
- Wüthrich, B., and E. Kopper. 1975. '[Determination of specific IgE serum antibodies using the Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) and its significance for the diagnosis of atopic allergy]', *Schweiz Med Wochenschr*, 105: 1337-45.
- Zhao, F., J. Durner, J. B. Winkler, C. Traidl-Hoffmann, T. M. Strom, D. Ernst, and U. Frank. 2017. 'Pollen of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.): Illumina-based de novo sequencing and differential transcript expression upon elevated NO₂/O₃', *Environ Pollut*, 224: 503-14.
- Zimmermann, C., D. Troeltzsch, V. A. Gimenez-Rivera, S. J. Galli, M. Metz, M. Maurer, and F. Siebenhaar. 2019. 'Mast cells are critical for controlling the bacterial burden and the healing of infected wounds', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 20500-04.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Astrid Geldmacher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "IgE-unabhängige Mastzellaktivierung in pollenassoziierter Entzündung" ("IgE independent mast cell activation in polleninduced inflammation") selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche, im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgter Publikation

Astrid Geldmacher hatte Anteil an der folgenden Publikation:

Metz M, Gilles S, Geldmacher A, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Maurer M 2011:
Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation.
Journal of Investigative Dermatology 131(4): 987-990

Ihr Beitrag bestand aus der Mithilfe bei Planung, Durchführung und Auswertung der Tierexperimente, die Grundlage für die in Abbildungen 1, 2, S1 - S4 gezeigten Daten sind, sowie Auswertung der histologischen Schnitte, die in Abbildung 1 b zu sehen sind. Desweiteren berechnete sie die in Tabelle S1 gezeigten Daten.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Wilke G, **Geldmacher A**, Kaelin R, Heppner FL, Metz M, Maurer M, Schröder NWJ: C-kit-dependent Induction of Pro-Inflammatory Cytokines in Dendritic Cells by Toll-like Receptor Ligands. **(to be resubmitted)**

Maurer M, Taube C, Schröder NWJ, Ebmeyer J, Siebenhaar F, **Geldmacher A**, Schubert N, Roers A **2019**: Mast cells drive IgE-mediated disease but might be bystanders in many other inflammatory and neoplastic conditions. J Allergy Clin Immunol. 144(4S):S19-S30

Sünder CA, Leist M, Åbrink M, Valentin P, **Geldmacher A**, Steinhoff M, Metz M, Maurer M **2018**: Mast cells are critical for the limitation of thrombin-induced skin inflammation. Exp. Dermat. 27(1): 50-57

Leist M, Sünder CA, Drube S, Zimmermann C, **Geldmacher A**, Metz M, Dudeck A, Maurer M **2017**: Cell bound Stem cell factor is the major but not only driver of fibroblast-induced skin mast cell differentiation. Exp. Dermat. 26(3): 255-262

Geldmacher A, Freier A, FO Losch & Walden P **2011**: Therapeutic vaccination for cancer immunotherapy. Antigen selection and clinical responses. Human Vaccines 7 Supplement: 108-114

Metz M, Gilles S, **Geldmacher A**, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, Maurer M **2011**: Evidence for non-allergic mast cell activation in pollen-associated inflammation. Journal of Investigative Dermatology 131(4): 987-990

Gross S, **Geldmacher A**, Sharav T, Losch FO & P Walden **2009**: Immunosuppressive mechanisms in cancer: Consequences for the development of therapeutic vaccines. Vaccine 27: 3398-3400

Geldmacher A, Skrastina D, Borisova G, Petrovskis I, Krüger DH, Pumpens P & R Ulrich **2005**: A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies. Vaccine 23: 3973-3983

Geldmacher A, Skrastina D, Petrovskis I, Borisova G, Berriman JA, Roseman AM, Crowther RA, Fischer J, Musema S, Gelderblom HR, Lundkvist Å, Renhofa R, Ose V, Krüger DH, Pumpens P & R Ulrich **2004**: An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. Virology 20(1): 108-119

Geldmacher A, Schmalzer M, Krüger DH & R Ulrich **2004**: Yeast-expressed hantavirus Dobrava nucleocapsid protein induces a strong, long-lasting and highly cross-reactive immune response in mice. Viral Immunol 17(1): 115-122

Ražanskienė A, Schmidt J, **Geldmacher A**, Ritzi A, Niedrig M, Lundkvist Å, Krüger DH, Meisel H, Sasnauskas K & R Ulrich **2004**: High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol 111(3): 319-333

Lundkvist A, Meisel H, Koletzki D, Lankinen H, Cifire F, **Geldmacher A**, Sibold C, Gott P, Vaheri A, Kruger DH & R Ulrich **2002**: Mapping of B-cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus. Viral Immunol 15: 177-192

Uiblein F, **Geldmacher A**, Köster FW, Kraus G & W Nellen **1999**: Species composition and depth distribution of fish species collected in the area of the Great Meteor Seamount, Eastern Central Atlantic, during Cruise M42/3, with seventeen new records. Inf Tecn ICCM 75: 47-85

Geldmacher A & K Wieland **1999**: Implications of mechanical deformation and formaldehyde preservation for the identification of stage-specific characteristics of Baltic cod eggs. J Appl Ichthyol 15: 75-79

Danksagung

Ich widme diese Arbeit meiner Uroma, Asta von Mallinckrodt-Haupt, die 1922 in der Dermatologie der Charité promovierte, und eine der ersten Professorinnen für Dermatologie wurde, sowie meiner Oma, Marika Geldmacher-von Mallinckrodt, die Doppelstudium und Promotion deutlich zügiger absolvierte als ich.

Als erstes danke ich Prof. Dr. med. Martin Metz für die Anregung zu diesem spannenden Thema sowie für die immer scharfsinnige, konstruktive Kritik zu dieser Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm für die exzellente und ausdauernde Betreuung und dafür, dass er auch nach Jahren gutgelaunt meine Fragen beantwortete.

Ausdrücklichem Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Maurer - allen voran Prof. Dr. med. Marcus Maurer für die immerwährende Unterstützung und dafür ein Labor mit so vielen tollen Leuten zu leiten, die immer bereit sind Wissenschaftliches zu diskutieren.

Insbesondere danke ich Sina Heydrich für die exzellente technische Unterstützung und hervorragende Dokumentation, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Fr. Armbrust danke ich ganz herzlich für die große Hilfe bei den IgE Titern.

Dr. Stefanie Gilles und Prof. Dr. Traidl-Hoffmann danke ich ganz herzlich für die Pollenextrakte.

Für ausdauerndes Korrekturlesen bedanke ich mich bei meiner Mutter Claudia, meinem Vater Jan, meinem Bruder Christof und meinem Mann Achim. Folgenden Freunden gilt besonderer Dank: Barry Sangster für das Durchsehen meiner englischen Zusammenfassung, Anne Schmidt für das Lesen und das kritische Hinterfragen der gesamten Arbeit, Anne Bredenkebeck für konstruktive Kritik an Zusammenfassung und Zielsetzung, Melanie Baumann für die (Um)Verteilung einer größeren Menge an Kommata, Claudia Solares de Hecht für Hilfe beim Literaturverzeichnis und Carmen Klaus für die riesige Hilfe bei der Formatierung.

Meiner Mutter danke ich zusätzlich dafür, dass sie mich dauerhaft daran erinnert hat, dass die Arbeit noch nicht fertig ist.