

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

DISSERTATION

**Der Einfluss der Mastzelle auf die kutane Wundheilung  
*Pseudomonas aeruginosa* infizierter Hautwunden**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Daniel Tröltzsch**

aus Karl-Marx-Stadt/ jetzt Chemnitz

Datum der Promotion: 04.09.2015

**Meinen Eltern gewidmet**

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMP	Antimikrobielles Peptid
β-ME	β-Mercaptoethanol
BMCMC	Bone marrow-derived cultured mast cell Aus dem Knochenmark stammende, kultivierte Mastzelle
BPI	Bakterien permeabilisierendes Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAP	Community-acquired pneumonia, ambulante erworbene Pneumonie
CCL20	Chemokine- (C-C motif)-ligand 20
CD117	Stem cell factor- Rezeptor
CFU	Colony forming unit, koloniebildende Einheit
CLP	Cecal ligation and puncture, Zäkumligation und Punktion
CPA	Composite Polyamide
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
c-Kit	= CD117
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRAMP	Cathelicidin
CTMC	Connective tissue mast cell, Bindegewebsmastzelle
CXCL	Chemokine- (C-X-C motif)-ligand
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FcεRI	Fc-epsilon-Rezeptor I
FcγRI	Fc-gamma-Rezeptor I
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
hBD-3	Humanes Beta-Defensin-3
hCBMC	Human cord blood mononuclear progenitor cell, der Nabelschnur entstammende Mastzelle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon Gamma
KCl	Kaliumchlorid
KGF	Keratinocyte growth factor, Keratinozytenwachstumsfaktor
<i>Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup></i>	WBB6F <sub>1</sub> -Kit <sup>W</sup> /Kit <sup>W-v</sup>
LBP	Lipopolysaccharide binding protein, Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
LL37	Cathelicidin

LPS	Lipopolysaccharid
LXA <sub>4</sub> , LXB <sub>4</sub>	Lipoxin A4, Lipoxin B4
MACS	Magnetic Cell Separation, Magnetische Zellseparation
MBD-4	Murines $\beta$ -Defensin 4
MC	Mast cell, Mastzelle
MCP	Mast cell protease, Mastzellprotease
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MMC	Mucosal mast cell, Mukosa-Mastzelle
MOI	Multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MZ	Mastzelle
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NET	Neutrophil extracellular trap
NGF	Nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAF	Platelet activating factor, plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCMC	Peritoneal cultured mast cell, Peritoneale, kultivierte Mastzelle
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
Plunc	Palate, lung, and nasal epithelium clone protein
PMC	Peritoneal mast cell, peritoneale Mastzelle
p-NAG	P- Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukoseaminidin
POMC	Proopiomelanocortin
q-RT-PCR	Quantitative Realtime-PCR
SCF	Stem cell factor, Stammzellfaktor
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SLPI	Antileukoproteinase
S100A7	S100 calcium-binding protein A7, Psoriasin
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSB	Tryptic soy broth
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
VV	Vaccinia Virus
3OC12-HSL	N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	
Abstract .....	
Zielsetzung .....	
1. Einleitung .....	1
1.1. Grundzüge der Mastzellbiologie .....	1
1.1.1. Einführung .....	1
1.1.2. Charakteristika von Mastzellen .....	2
1.1.3. Verteilungsmuster und Heterogenität .....	3
1.1.4. Herkunft und Entwicklung .....	5
1.1.5. Physiologie und Funktionen der Mastzelle .....	7
1.1.6. Immunologische Kompetenzen der Mastzelle .....	11
1.2. Rolle der Mastzelle im Rahmen der natürlichen Immunität gegen Bakterien .....	12
1.2.1. Allgemein .....	12
1.2.2. Das Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
1.2.3. Antimikrobielle Peptide und MZ-Proteasen, sowie deren Aufgabe im Rahmen der MZ-vermittelten Immunabwehr.....	15
1.3. Kutane Wundheilung.....	16
1.3.1. Überblick .....	16
1.3.2. Phasen und Mechanismen der Wundheilung.....	17
1.3.3. Wundheilung und Mastzellen - Stand der Forschung .....	20
2. Material und Methoden .....	22
2.1. Tiere.....	22
2.1.1. Das <i>Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup></i> - Mausmodell .....	22
2.1.2. Rekonstitution.....	23
2.2. Wundheilungsversuch mit Wildtyp- und MZ-defizienten Mäusen.....	23
2.2.1. Narkose .....	23
2.2.2. Wundsetzung, Infektion und Kontrolle .....	23

2.2.3. Wundvermessung .....	24
2.2.4. Histologie.....	25
2.3. Bakterienlast der Wunde .....	26
2.4. Zellen.....	27
2.4.1. Gewinnung und Kultivierung aus dem Knochenmark stammender, kultivierter MZ (BMCMCs) .....	27
2.4.2. Gewinnung peritonealer Mastzellen (PMCs) .....	28
2.4.3. Magnetische Zellseparation (MACS).....	28
2.4.4. Kultivierung der PCMCs .....	28
2.4.5. FACS-Analyse.....	29
2.5. Anzucht der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kultur .....	30
2.6. $\beta$ - Hexosaminidase-Assay .....	30
2.7. Bestimmung der bakteriellen Überlebensrate .....	31
2.8. Cytospin.....	32
2.9. Quantitative Realttime-PCR (q-RT-PCR).....	32
2.9.1. Primer .....	32
2.9.2. Stimulation der PCMCs.....	34
2.9.3. RNA-Isolierung .....	34
2.9.4. Reinheit und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	35
2.9.5. Umschreiben in cDNA .....	35
2.9.6. Ablauf PCR mit LightCycler .....	36
2.10. Statistische Analysen .....	37
3. Ergebnisse .....	39
3.1. Der Wundheilungsverlauf in MZ-defizienten $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen nach Infektion mit dem Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ist verzögert .....	39
3.2. Die normale Wundheilung <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infizierter Wunden ist Mastzell-abhängig.....	43
3.3. Histologische Bestätigung der erfolgreichen Rekonstitution MZ-defizienter $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse mit BMCMCs .....	46
3.4. Tiere mit <i>PA</i> -infizierten Wunden zeigen keine systemischen Infektionszeichen .....	49

3.5. MZ verringern die Bakterienlast <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infizierter Wunden .....	51
3.6. Das Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und dessen Bestandteile führen nicht zur Degranulation kultivierter, peritonealer Mastzellen (PCMCs) .....	53
3.7. MZ vermindern die Überlebensrate des Bakteriums <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Kokultur .....	55
3.8. Nachweis der Expression einer Auswahl durch MZ sezernierter antimikrobieller Peptide und Proteasen nach Stimulation mit LPS und PA .....	57
3.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und LPS verändern die Expression MZ-spezifischer Proteasen und antimikrobieller Peptide nach 4 und 24 Stunden Stimulation in geringem Umfang .....	59
3.10. Kultivierte peritoneale Mastzellen als Modell für Hautmastzellen .....	61
4. Diskussion .....	64
5. Literaturverzeichnis .....	77
6. Eidesstattliche Versicherung .....	99
7. Curriculum Vitae .....	100
8. Danksagung .....	101

## Zusammenfassung

Bislang war die Mastzelle (MZ) den meisten Menschen ausschließlich als leidige und potentiell lebensgefährdende Allergie zelle bekannt. In den letzten Dekaden erlangte sie jedoch in der Wissenschaftswelt zunehmend große Aufmerksamkeit durch ihre vielseitigen und bis dato noch unbekanntem physiologischen Funktionen. Man begann zu begreifen, dass die MZ nicht nur für pathologische Vorgänge verantwortlich zu machen ist, sondern ebenso in enormem Umfang physiologische Prozesse unseres Körpers unterstützt. Die Aktivierung von MZ in geweberegeneratorischen Prozessen wurde dargelegt, und 2007 gelang es, die Bedeutung dieser Zellen innerhalb der kutanen Wundheilung aufzuzeigen. Immunologisch sind sie zudem in der Lage einer induzierten Sepsis oder bakteriellen Hautinfektionen, beispielsweise durch *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöst, entgegenzuwirken, um hier nur zwei Beispiele zu nennen. In dieser Arbeit wurde unter Zuhilfenahme eines MZ-defizienten Hautinfektionsmodells die reelle und ubiquitär im Krankenhausalltag vertretene Situation der bakteriell infizierten Hautwunde untersucht. Dabei gelang der Nachweis eines deutlich verzögerten Wundheilungsverlaufs in MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*-Mäusen nach lokaler Infektion mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Mittels MZ-Rekonstitution wurde der Beweis der tatsächlichen MZ-Abhängigkeit geführt. Zudem konnte gezeigt werden, dass MZ zu einer herabgesetzten Bakterienlast in mit PA infizierten Wunden beitragen. Die *in vivo* gewonnenen Daten stützend, vermindern MZ ebenso in Ko-Kultur die Überlebensrate dieses Bakteriums. Als möglicher Mechanismus der bakteriellen Eliminierung konnte die MZ-Degranulation auf den Stimulus PA hin *in vitro* jedoch ausgeschlossen werden. Daher wurde das Expressionsverhalten antimikrobieller Peptide durch MZ auf RNA-Ebene untersucht. Bestimmte Peptide zeigten nach PA- und LPS-Stimulation veränderte Expressionsmuster, so beispielsweise Tryptase 1 und Cathepsin G, zwei von MZ produzierte Proteasen, welche in der Literatur mit der Abwehr bakterieller Infektionen assoziiert werden. Somit konnte im Rahmen dieser Dissertation der Einfluss der MZ nicht nur isoliert im Kontext der kutanen Wundheilung oder bakteriellen Abwehr betrachtet, sondern erstmalig auch das komplexe Zusammenspiel dieser beiden Szenarien als Ganzes untersucht werden. Mastzellen bekämpfen bakterielle Infektionen, was wiederum zu einer verbesserten Wundheilung führt. Es wurden in dieser Arbeit bekannte physiologische MZ-Funktionen bestätigt, wobei ebenso neue, weitreichende Erkenntnisse gewonnen werden konnten.



## Abstract

Asking people what to generally associate with mast cells (MC), their first and often only response will be “allergies” or maybe even “anaphylactic reaction”. But there is certainly way more to these extraordinary cells. By realizing that, our knowledge exponentially grew on very different aspects of MC functions within the past few decades. MCs are no longer only associated with pathological, but also with a variety of physiological processes. Apart from demonstrating the cardinal role of MCs in the regeneration of tissue, a publication in 2007 underlined the importance of MCs in cutaneous wound healing. Considering very different functional aspects, MCs are nowadays also known to play an important immunological role in the defense against bacterial infections, so proven in induced sepsis models and in the process of certain bacterial skin infections, such as *Pseudomonas aeruginosa* infections, just to mention two. Using inter alia a MC-deficient mouse model, this work the first time investigates an ubiquitous clinical situation of bacterially infected skin wounds. A significantly delayed wound closure was observed in MC- deficient *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- mice after local infection with *Pseudomonas aeruginosa*(*PA*). MC reconstitution was used to prove true MC dependency. Furthermore it could be shown that MCs are capable of lowering the bacterial load in *PA* infected wounds. Transferring these findings into an *in vitro* setting by co-culturing MC and *PA*, the bacterial survival rate was significantly lowered in the presence of MCs. Though MC degranulation after stimulation with *PA* as a possible mechanism of eliminating bacteria was to be excluded, other possible mechanisms were investigated. So the up- or downregulation of antimicrobial peptides (AMP) by MCs was analyzed on an mRNA-expression level via quantitative realtime- PCR. It could be shown that the expression levels of certain MC derived substances, so Tryptase-1 and Cathepsin G, two proteases produced by MCs, which we find associated with bacterial infection in the literature, were altered.

To resume, this work not only focuses on the relevance of MC in the context of cutaneous wound infections or isolated on bacterial defense mechanisms. It is rather the first time investigations were carried out to combine these to settings to understand them in an omnipresent, every day clinical scenario. MCs combat bacterial infections, which actually leads to an improved wound healing. In this thesis known physiological MC functions were validated and broad knowledge was gained to expand the global understanding of these magnificent cells.

## Zielsetzung

### in vivo:

1. Darlegung der veränderten Wundheilungstendenz von Wildtyp *Kit*<sup>+/+</sup> und MZ-defizienten *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>-Mäusen nach Infektion durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*(*PA*)
2. Beweisführung der MZ-Abhängigkeit bakteriell bedingter Wundheilungsstörungen via Rekonstitution MZ-defizienter Mäuse mittels BMCMCs
3. Vergleichende Bestimmung der Bakterienlast in Wunden von *Kit*<sup>+/+</sup> und *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>-Mäusen nach 24-stündiger *PA*-Infektion

### in vitro:

4. Untersuchung der Aktivierung von MZ durch *PA*, sowie durch ausgewählte Bestandteile dieses Bakteriums
5. Quantitativer Nachweis der direkten Eliminierung des *PA* durch MZ in Ko-Kultur
6. Identifizierung sezernierter antimikrobieller Peptide bzw. Proteasen der MZ nach bakterieller Stimulation und Quantifizierung der Expression dieser mittels quantitativer Realtime-PCR

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundzüge der Mastzellbiologie

### 1.1.1. Einführung:

Als es Dr. Friedrich Daniel von Recklinghausen 1863 erstmals gelang, einen damals noch unbekanntem Zelltypus in dem Mesenterium von Fröschen nachzuweisen (Recklinghausen, 1863), war vermutlich weder ihm, noch Paul Ehrlich, dem späteren Namensgeber der „Mastzelle“ (MZ), welche sich ihm aufgrund ihrer metachromatischen Granula in basischen Färbungen als „gemästet“ darstellte (Ehrlich, 1877), die Tragweite dieser Entdeckung bewusst. Heutzutage sind MZ der breiten Masse als „Allergiezellen“ bekannt (Hofmann and Abraham, 2009; Taylor and Metcalfe, 2001) und entsprechende Medikamente, welche deren Funktion hemmen, sind unter Heuschnupfengeplagten weit verbreitet.

Im Fortgang von 150 Jahren intensiver Forschung wurden der MZ indes weitreichendere Kompetenzen zugestanden, als lediglich die IgE-vermittelte Sofortreaktion im Kontext einer Allergie. Dazu zählen, neben der hier zu diskutierenden Rolle der MZ innerhalb des Wundheilungsprozesses bei additiver Wundinfektion durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*, diverse Funktionen bei Entzündungsprozessen, bei der Angiogenese, Funktionen bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort, während der Schwangerschaft, sowie im Prozess des Umbaus verschiedener Gewebe, um hier nur eine Auswahl zu nennen (Weller et al., 2011). Trotz aller Bestrebungen einer Vielzahl internationaler Forschungsgruppen, bestehen noch immer Unklarheiten und offene Fragestellungen bezüglich diverser Funktionen der MZ. Die hohe Quantität und Heterogenität der Publikationen zum Thema „Mastzelle“ in unterschiedlichsten Forschungsbereichen der Medizin spiegelt die Komplexität der funktionellen Eigenschaften von MZ wider. Dementsprechend erweitert sich das kollektive Wissen nahezu täglich um neue Erkenntnisse der Mastzellforschung, zusammengetragen aus unterschiedlichsten Bereichen der Wissenschaft, angefangen bei der initialen Regulation der Ödembildung des Gehirns bei ischämischen Prozessen (Strbian et al., 2006), über die Degradierung von Schlangengiften (Metz et al., 2006), bis hin zu immer neu entdeckten immunologischen Kompetenzen dieser Zellen (Abraham and St John, 2010; Galli et al., 1999).

### 1.1.2. Charakteristika von Mastzellen

Wie bereits kurz erwähnt, stellen die Mastzellgranula wohl das prominenteste Charakteristikum dieser ubiquitär im Bindegewebe vorkommenden, 6-17µm großen Zellen dar. Die Granula sind jedoch nicht, wie ursprünglich von Paul Ehrlich angenommen, auf die phagozytären Kompetenzen der MZ zurückzuführen (Ehrlich, 1877). Vielmehr enthalten die elektronendichten, metachromatischen und im Zytoplasma ansässigen Granula eine große Bandbreite eigenständig produzierter und gespeicherter, präformierter Substanzen. Zu ihnen zählen Entzündungsmediatoren, wie Histamin oder aber auch Proteoglycane, so das Heparin, sowie Enzyme, Chemokine, verschiedene Polypeptide, Phospholipidmediatoren und eine Reihe von Zytokinen, wobei der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wohl den bekanntesten Repräsentanten darstellt (**Graphik 1**). Die Besonderheit liegt hierbei jedoch in der Tatsache begründet, dass diese Substanzen nach Stimulation nicht erst zeitintensiv synthetisiert werden müssen, sondern schon präformiert und bereit zur unmittelbaren Exozytose in den Granula vorliegen (Theoharides et al., 2007). Ein weiteres, letztendlich die Mastzelle als Mastzelle definierendes Charakteristikum, ist die Koexistenz membranständiger Fc-epsilon-Rezeptoren (Fc $\epsilon$ RI), sowie c-Kit-Rezeptoren (Beaven and Metzger, 1993; Broide et al., 1989). Der Fc $\epsilon$ RI ist ein membranständiger IgE-Rezeptor, wobei der Fc-Teil des Immunglobulins E (IgE), nach Sensibilisierung während der allergischen Sofortreaktion hochaffin gebunden vorliegt. Über die Vernetzung mehrerer Rezeptoren kommt es zur Fusion multipler Granula bzw. dieser mit der Membran. Im Rahmen dessen wird eine Kaskade ausgelöst, die in der unmittelbaren Mediatorausschüttung von Histamin und anderen Substanzen aus präformierten Mastzellgranula gipfelt (Dembo et al., 1979). Diverse andere Rezeptoren beeinflussen zudem die MZ-Degranulation, so beispielsweise der Histaminrezeptor H4 (Mirzahassemi et al., 2013). Der c-Kit-Rezeptor stellt den Rezeptor für den Liganden stem cell factor (SCF) dar. Dieser ist, neben Interleukin-3 (IL-3), obligat für das Wachstum und die spätere Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen zu MZ (Lee et al., 2010; Kirshenbaum et al., 1991; Tsai et al., 1991). MZ sind in einer Vielzahl von Organen und Geweben zu finden.

### 1.1.3. Verteilungsmuster und Heterogenität

Obwohl MZ nahezu im gesamten Körper vorkommen, sind sie überproportional stark in Geweben repräsentiert, welche in direktem Kontakt zur Außenwelt stehen. Neben der hohen MZ-Dichte in der Mukosa der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes, ist in dieser Arbeit besonders die hohe Zahl von MZ in der Haut von weitreichender Bedeutung. Hierbei lassen sich wiederum die Mehrheit der MZ in der Nähe von Blutgefäßen, sensorischen Nervenfasern und Haarfollikeln lokalisieren (Galli, 1990a; Kitamura, 1989; Galli et al., 1984). Somit impliziert schon allein das Verteilungsmuster der Mastzellen innerhalb des menschlichen Organismus deren potentielle Bedeutung. Sie sind strategisch bestens lokalisiert um Invasionen diverser Pathogene und anderweitiger Umwelteinflüsse entgegenzuwirken (Galli et al., 1999).

Obschon bis jetzt stets von „der“ Mastzellen die Rede war, existiert diese global homogene MZ nicht. Neben sich unterscheidenden Populationen in verschiedenen Organismen, wird zudem eine hohe Variabilität innerhalb des gleichen Individuums beschrieben (Barrett and Metcalfe, 1987; Enerbäck, 1966; Maximow, 1905). So bedingen neben morphologischen Unterschieden, abweichende Stimuli die Ausprägung der einzelnen Mastzellsubtypen und Alterationen bezüglich derer Mediatorzusammensetzung (Beil et al., 2000; Galli, 1990a; Church et al., 1989).

Murine MZ werden in Mukosa-Mastzellen (mucosal mast cells, MMC) und Bindegewebsmastzellen (connective tissue mast cells, CTMC) unterteilt (Galli, 1990a). Die maßgeblich für diese Arbeit bedeutsamen MZ der Haut, sowie die aus dem Peritoneum gewonnenen MZ der *In-vitro* Experimente, gehören der CTMC-Fraktion an. Im Gegensatz dazu sind MZ der Gastrointestinaltraktmukosa und des Epithels der Bronchien in multiplen Aspekten von diesen abzugrenzen und dementsprechend den MMC zuzuordnen (detaillierte Ausführung siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1** Eigenschaften muriner Mukosa- und Bindegewebsmastzellen (Galli, 1990)

	<b>Mukosa-MZ (MMC)</b>	<b>Bindegewebs-MZ (CTMC)</b>
<b>Vorkommen</b>	Bronchialepithel, intestinale Mukosa	Haut, Lunge, Peritoneum
<b>Lebensspanne</b>	Etwa 40 Tage	Mehrere Monate bis Jahre
<b>Ultrastruktur der Granula</b>	Klein, heterogen elektronendicht	Groß, homogen, elektronendicht
<b>Entwicklung T-Zell-abhängig</b>	Ja	Nein
<b>prominentestes intragrannuläres Proteoglykan</b>	Chondroitinsulfat	Heparin
<b>Anfärbbarkeit mit</b>	Alzianblau	Alzianblau, Berberinsulfat, Safranin
<b>Histamingehalt der Granula</b>	Gering	Hoch
<b>Serotoningehalt der Granula</b>	Gering	Variabel
<b>Präsenz hochaffiner IgE-Rezeptoren</b>	Ja	Ja
<b>Aktivierung durch Compound 48/80</b>	Nein	Ja

Innerhalb humaner Mastzellpopulationen differenziert man hinsichtlich des Expressionsmusters der Tryptase und Chymase, zweier bekannter Mastzellproteasen. In der Haut sind Tryptase- und Chymase-positive Zellen ansässig, wohingegen in der Lunge die Tryptase-positiven Mastzellen dominieren (Irani et al., 1986; Miller and Schwartz, 1989; Welle et al., 1997).

#### 1.1.4. Herkunft und Entwicklung

MZ gehen aus hämatopoetischen Progenitorzellen hervor. Kürzlich konnten erstmalig spezifische Zwischenstufen dieser Zellen im Verlauf der Entwicklung zu ausgereiften MZ isoliert werden (Dahlin, Heyman, and Hallgren 2013). Über viele Jahre wurde angenommen, dass Makrophagen, Fibroblasten oder sogar T-Zellen als Vorläuferzellen der MZ zu verstehen sind (Zucker-Franklin et al., 1981; Burnet et al., 1977). Dieser Vermutung stellte sich die Arbeitsgruppe von Kitamura et al. 1977 mit wegweisenden Experimenten entgegen, wobei gezeigt werden konnte, dass sich MZ der Maus aus hämatopoetischen Progenitorzellen des Knochenmarks entwickeln. Er und seine Mitarbeiter transplantierten das Knochenmark von Wildtyp-Mäusen des genetischen Hintergrundes WBB6F<sub>1</sub>-+/+ bzw. von beigefarbenen C57BL/6-bg/bg- Mäusen in genetisch MZ-defiziente WBB6F<sub>1</sub>-*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> (*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>) bzw. WCB6F<sub>1</sub>-*Sl*/*Sl*<sup>d</sup> (*Sl*/*Sl*<sup>d</sup>) - Mäuse. Die MZ des transplantierten Knochenmarks proliferierten und migrierten in das Gewebe, wobei sie dort als eben diese transplantierten MZ identifiziert werden konnten (Kitamura and Miyoshi, 1978; Kitamura et al., 1977). Damit belegte er die Herkunft muriner MZ aus dem Knochenmark, wobei erst nahezu eine Dekade später eine, den Kriterien eines Mastzellvorläufers entsprechenden Mastzellpopulation aus fetalem Blut isoliert werden konnte (Rodewald et al., 1996). Anfang der 1990er Jahre gelang es von Kirshenbaum et al. abschließend zu zeigen, dass die CD34-positive Zellfraktion der hämatopoetischen Progenitorzellen den Ursprung der humanen MZ darstellen (Kirshenbaum et al., 1991). Nach Emigration aus dem Knochenmark, temporärer Zirkulation im Blut, Diapedese und Immigration in das periphere Gewebe, erfolgt dort die finale Differenzierung der Vorläuferzellen zu endgültigen, funktionsfähigen MZ. Dies ist interessanterweise vom biochemischen Milieu des Gewebes und den sie umgebenden Zellen, besonders T-Lymphozyten oder Fibroblasten, abhängig (Gurish and Austen, 2012; Kitamura et al., 1993). Es wurde in diesem Kontext demonstriert, dass transplantierte Zellen in unterschiedlichen Geweben jeweils die Charakteristika der dort residenten Zellen annehmen (Grabbe et al., 1994). Man geht davon aus, dass IL-4 und IL-5, neben zahlreichen weiteren Mediatoren, in der Lage sind, den MZ-Phänotyp zu modulieren (Ochi et al., 2000).

Übertragen auf *In-vitro*-Kultivierung hat sich gezeigt, dass bei der Anzucht aus dem Peritoneum gewonnener, kultivierter Mastzellen (PCMCs) die Zugabe des stem cell factors (SCF), IL-3 und

fetalem Kälberserum (FCS) zum Medium obligat ist, um ein entsprechendes Zellwachstum und die gewünschte Differenzierung zu generieren.

Gemeinhin ist weder die lokale MZ-Anzahl, noch der MZ-Typ als unveränderlich im Gewebe zu betrachten. Die Quantität der MZ ist physiologischen und pathologischen Umständen der Peripherie angepasst (Rothe et al., 1990; Mayrhofer and Fisher, 1979). Einer IgE-Aktivierung folgt sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* ein Anstieg der MZ-Anzahl (Takagi et al., 1989), da wahrscheinlich undifferenzierte Progenitorzellen in das Gewebe migrieren um dort auszudifferenzieren (Takagi et al., 1990). Es wäre ebenso vorstellbar, dass im Gewebe bereits undifferenzierte MZ ansässig sind, welche dann entsprechend beginnen auszureifen. Zudem könnten auch bereits ausdifferenzierte MZ beginnen vor Ort zu proliferieren (Jozaki et al., 1990; Kuriu et al., 1989).

Die Proliferation von MZ erfolgt jedoch nicht spontan, sondern wird durch multiple Chemokine bzw. durch den Einfluss von sowohl T-Zellen, als auch Fibroblasten reguliert. Beginnend 1985 zeigte Levi-Schaffer, dass die MZ-Differenzierung in Kokultur mit 3T3 Fibroblasten von eben diesen im Gewebe ansässigen Zellen deutlich beeinflusst wird (Levi-Schaffer et al., 1986, 1985). Wie bereits erwähnt konnte Burnet jedoch schon 1977 nachweisen, dass sich MZ T-Zell-abhängig differenzieren (Burnet et al., 1977), wobei bestimmte durch T-Lymphozyten sezernierte Faktoren die Proliferationsrate von MZ verstärken (Nabel et al., 1981). IL-3 in Kombination mit IL-4 sind nachgewiesenermaßen wichtige Stimulatoren der Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen zu MZ, wobei IL-4 die IL-3-Wirkung verstärkt (Dvorak and Kissell, 1991; Schmitt et al., 1987). Die T-Zell-Abhängigkeit im Zuge der Proliferation und Differenzierung trifft nur auf Mukosa-Mastzellen (MMC) zu, nicht aber auf Bindegewebsmastzellen (CTMC). Gezeigt wurde dies an athymischen Nacktmäusen, welche aufgrund des fehlenden Thymus eine T-Zell-Defizienz aufweisen. Entsprechend den Kontrolltieren mit Thymus gegenübergestellt, konnte in den athymischen Tieren eine vergleichbare Anzahl von Bindegewebsmastzellen nachgewiesen werden (Keller et al., 1976). Folglich scheint die Präsenz von T-Lymphozyten für die Reifung von CTMCs nicht obligat. Kitamura et al. beschreibt die über Fibroblasten gesteuerte Proliferation und Differenzierung als konstant ablaufenden Prozess, die T-Zell-abhängigen Prozesse jedoch als induzierbare Vorgänge (Kitamura et al., 1989).

Da man bis zum heutigen Tage eine MZ-Progenitorzelle aus dem Knochenmark noch nicht lückenlos bis zur ausdifferenzierten Gewebsmastzelle in ihrer Entwicklung verfolgen kann, gilt



der Tyrosinkinase-Rezeptor (c-Kit, CD117) als zeitlich erster Marker zur Identifikation von MZ. Zudem dient er der Differenzierung zwischen diesen und anderen hämatopoetischen Zellen, wie basophilen Granulozyten (Valent et al., 1995; Dvorak et al., 1994). Als CD117 wird der Rezeptor für den Liganden SCF bezeichnet, welches hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert wird. Zusätzlich sind humane MZ in der Lage sowohl zellmembranassoziiertes biologisch aktives SCF mittels der MZ-eigenen Chymase freizusetzen, als auch eigenhändig SCF zu synthetisieren (de Paulis et al., 1999; Welker et al., 1999). *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse weisen einen c-Kit-Rezeptordefekt auf, was mit einer MZ-Defizienz dieser Tiere einhergeht. Diese praktisch absolute Defizienz macht dieses Tiermodell für die Erforschung von MZ-Funktionen so bedeutsam. SCF bewirkt jedoch nicht nur die Ausdifferenzierung von Bindegewebsmastzellen, sondern beeinflusst die Überlebensrate von MZ zudem positiv (Bischoff et al., 1999).

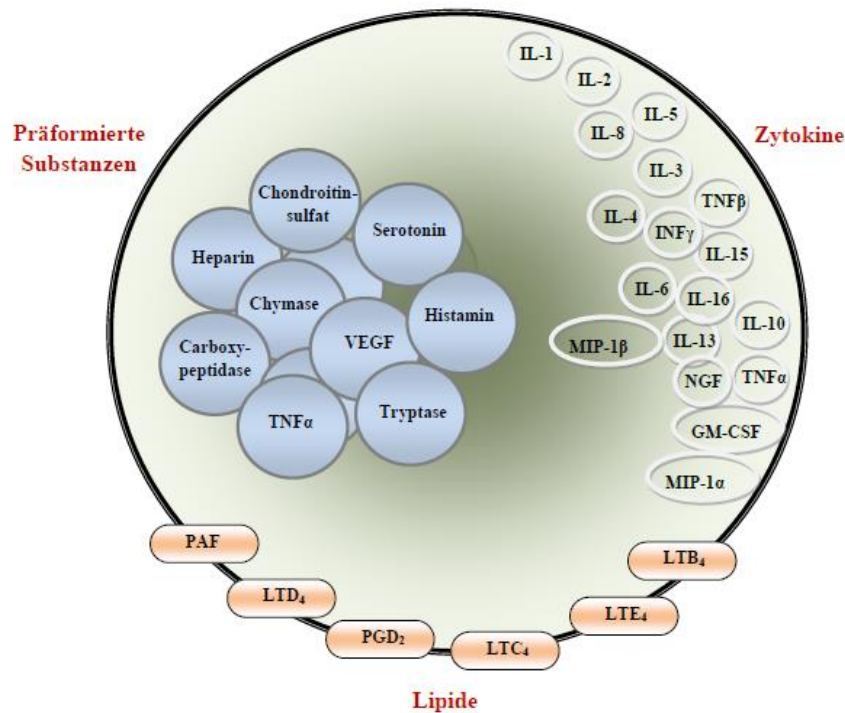
Zusammenfassend lässt sich zur Frage der Herkunft von MZ festhalten, dass das wahrscheinlichste Szenario die Rekrutierung von MZ-Progenitorzellen darstellt, welche folgend in das Gewebe immigrieren und extramedullär zu ausdifferenzierten, voll funktionsfähigen Phänotypen heranreifen. Die finalen Charakteristika der Population werden maßgeblich von dem die MZ umgebenden biochemischen Milieu und durch benachbarte Zellen im peripheren Organ beeinflusst (Gurish and Austen, 2012; Mecklenburg and Czarnetzki, 1986; Levi-Schaffer et al., 1985).

#### 1.1.5. Physiologie und Funktionen der Mastzelle

Das Spektrum potentieller Mastzellfunktionen ist entsprechend der von ihnen synthetisierten Substanzen überaus vielseitig. Wie man heute weiß, sind diese Zellen nicht nur an pathologischen, sondern auch an physiologischen Abläufen unseres Körpers beteiligt. Dies ist oftmals durch die Art und Quantität des jeweils sezernierten Mediators bedingt. Im Allgemeinen unterscheidet man präformierte Stoffe, welche in Mastzellgranula gespeichert und bei entsprechendem Trigger sofort und in großem Umfang sezerniert werden können, und *de novo* synthetisierte Zytokine und Lipide (**Graphik 1**). Die vielseitigen Mastzellmediatoren besitzen weitreichende Eigenschaften, welche von gesteigerter Vasoaktivität (PAF, Leukotriene), über die Funktion als Wachstumsfaktor (VEGF, NGF) oder chemotaktisch wirksamer Stoff (TNF $\alpha$ , IL-8), bis hin zur tragenden Rolle als proinflammatorischer Entzündungsmediator (Histamin,

Serotonin, Leukotriene, Prostaglandine, Heparin, Bradykinin) reichen, um jeweils nur einige Beispiele aufzuführen.

**Graphik 1** Auswahl präformierter und *de novo* synthetisierter Mastzellmediatoren



Nach: (Williams and Galli, 2000; Boesiger et al., 1998; Church and Levi-Schaffer, 1997; Okayama et al., 1995; Leon et al., 1994; Galli, 1990)

Entsprechend der immensen Anzahl unterschiedlichster Substanzen, unterscheiden sich auch die der Mastzelle eigenen Sezernierungswege, wobei der Freisetzung von Mediatoren zumeist eine Form der Aktivierung vorgeschaltet ist. Der wohl bekannteste Weg der MZ-Aktivierung erfolgt über die hochaffine Bindung des Immunglobulins E (IgE) an mehrere Fc $\epsilon$ RI- Rezeptoren, was zur allergischen oder gar anaphylaktischen Sofortreaktion führen kann. Jedoch gibt es neben der bekannten IgE-vermittelten Antigen-Antikörper-Reaktion, unterschiedlichsten physikalischen Stimuli oder psychogenen Auslösern, eine große Bandbreite von Substanzen, deren Interaktion mit MZ antigenunabhängig eine Aktivierung dieser Zellen bedingt. Neuropeptide, wie Substanz P, der Vasokonstriktor Endothelin-1, Wachstumsfaktoren wie NGF, Lipopolysaccharide bestimmter Bakterien, das Polymer Compound 48/80 wären hierfür Beispiele. Eine Auswahl potentieller Mastzell-Aktivatoren ist folgend in **Tabelle 2** dargestellt.

**Tabelle 2** Auswahl Antigen-unabhängiger MZ–Aktivatoren

Aktivator	Referenz
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplement-Anaphylatoxine: C3a, C5a</li> </ul>	(Peng et al., 2009; Schäfer et al., 2013)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bradykinin, Lysylbradykinin</li> </ul>	(Lawrence et al., 1989; Brenner et al., 1994)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuropeptide : Substanz P, Vasoactive intestinal polypeptide (VIP), Nerve growth factor (NGF)</li> </ul>	(Li et al., 2012; Ansel et al., 1993; Mazurek et al., 1986; Kulka et al., 2008)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasokonstriktive Peptide : Endothelin-1</li> </ul>	(Boros et al., 2002)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostaglandin E2</li> </ul>	(Abdel-Majid and Marshall, 2004)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interleukine: IL-1, IL-3, IL-4</li> </ul>	(Bradding et al., 1992; Wasserman, 1990)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakterielle Stimuli, Bsp. LPS</li> </ul>	(Malaviya et al., 1994; Yang et al., 2012)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• ACTH, Corticotropin Releasing Hormon</li> </ul>	(Singh et al., 1999; Maurer et al., 1997)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Opioide : Morphin, Codein</li> </ul>	(Sheen et al., 2007; Blunk et al., 2004)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calciumionophore (A23187)</li> </ul>	(Ludowyke et al., 1996; Verbsky et al., 1996)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TNF-<math>\alpha</math></li> </ul>	(Brzezińska-Błaszczyk and Pietrzak, 1997)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compound 48/80</li> </ul>	(Jozaki et al., 1990; Mousli et al., 1990)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chlorogensäure</li> </ul>	(Huang et al., 2010)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mechanische bzw. Thermostimulation, UV-Strahlung, psychischer Stress</li> </ul>	(Fowlkes et al., 2013; Michel et al., 1992) (Esposito et al., 2001; Singh et al., 1999)

Gleichsam der enormen Quantität MZ-eigener Substanzen, bedienen MZ ebenso verschiedene Arten der Sekretion. Neben der Antigen-vermittelten Degranulation mittels Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor, bestehen außerdem Hinweise auf eine durch den hochaffinen IgG-Rezeptor Fc $\gamma$ RI vermittelte

Granulaausschüttung, sofern eine vorangegangene Stimulation mit Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) erfolgte (Okayama et al., 2000). Kommt es bei dieser Art der Degranulation zur schubartigen Entleerung der Granula, findet die Mediatorfreisetzung während der Piecemeal Degranulation graduell statt (Dvorak et al., 2005), wie es im Zuge der kutanen Wundheilung beobachtet werden kann (Dvorak and Kissell, 1991). Des Weiteren wurde „Transgranulation“ als zusätzlicher Mechanismus der Granulafreisetzung durch MZ beschrieben. MZ interagieren über Zellkontakt mit Fibroblasten, wobei ein direkter Transfer der Granulamedioren in die Fibroblasten hinein erfolgt (Greenberg and Burnstock, 1983). Alternativ werden MZ-Medioren jedoch ebenso akut auf Stimuli hin synthetisiert und degranulationsunabhängig mittels Transzytose abgegeben. Dieser Vorgang wird so bei der Prostaglandin E<sub>2</sub>-induzierten Produktion von VEGF beschrieben (Abdel-Majid and Marshall, 2004).

Sowohl die Art der Mediatorfreisetzung, als auch die Mediatoren selbst determinieren in ihrer jeweiligen Kombination diverse Funktionen dieser Zellen und sind an entsprechende Bedürfnisse und Lokalisationen angepasst. Die bekannteste und wohl folgenschwerste „Funktion“ der Mastzelle, ist die IgE-vermittelte MZ-Degranulation samt akuter Histaminausschüttung, welche eine allergische Sofortreaktion bedingt (Borish and Joseph, 1992). Diese Reaktion ist jedoch kaum als (physiologische) „Funktion“ der MZ zu bezeichnen, da sie dem menschlichen Organismus nach heutigem Kenntnisstand keinen Nutzen bringt und sie als Reaktion auf eigentlich „harmlose“ Stimuli bisweilen sogar, im Zuge eines anaphylaktischen Schocks, zum Tode führt. Dementsprechend lag die Vermutung frühzeitig nahe, dass MZ noch weitere, protektive Aufgaben innehaben müssen, sonst hätte sich eine solche Zelle in der Evolution schlichtweg kaum durchgesetzt.

Die Liste potentieller Mastzelleigenschaften zeigt eine enorme Diversität. So kommt der MZ bei multiplen Erkrankungen der Haut eine weitreichende Bedeutung zu. Es konnte ein deutlicher Anstieg der MZ-Anzahl bzw. quantitative Veränderungen allgemein in malignen Melanomen (Duncan et al., 1998), Fibromen (Santos et al., 2011), Neurofibromen (Tucker et al., 2011), bei Psoriasis und atopischer Dermatitis (Harvima et al., 2010), Porphyrien (Lim et al., 1989), dem bullösem Pemphigoid (Ujii et al., 2012), sowie anderen Autoimmunkrankheiten wie, Multiple Sklerose oder Rheumatische Arthritis (Brown and Hatfield, 2012) beobachtet werden. Diese exemplarische Aufzählung verdeutlicht, dass MZ sowohl im Rahmen neoplastischer dermaler Erkrankungen, als auch in entzündlichen, allergischen, degenerativen und autoimmunen Krankheiten potenten Einfluss besitzen. Gemäß ihrer Präsenz in der Mukosa des

Gastrointestinaltraktes, stellen sich MZ ebenso bei Nahrungsmittelallergien (Kraneveld et al., 2012), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn (Roberts-Thomson et al., 2011), einer Gastritis, sowie Enteritis, hervorgerufen durch das Bakterium *Clostridium difficile* (Wershil et al., 1998), als bedeutsam dar. Die beschriebenen Funktionen stellen nur eine begrenzte Auswahl der teilweise noch wenig erforschten Aufgabengebiete der MZ dar.

#### 1.1.6. Immunologische Kompetenzen der MZ

Etwa 30 Jahre nach der Entdeckung durch v. Recklinghausen postulierte Élie Metchnikoff, welcher 1908 gemeinsam mit Paul Ehrlich den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen bekam, MZ könnten ein Teil des humanen Verteidigungssystems darstellen. Damals wurde allerdings die Phagozytose als alleiniges Mittel der Wahl zur bakteriellen Eliminierung angenommen (Metchnikoff, 1892). Obwohl dies nicht mehr dem aktuellen Wissenschaftsstand entspricht, gilt die Rolle der MZ im Zuge der Bekämpfung unterschiedlichster Krankheitserreger heutzutage als gesichert. Gezeigt werden konnte, dass parasitäre Infektionen nicht nur zu einer erhöhten Mastzellzahl im Gewebe führen, sondern sowohl vermehrt spezifische, als auch unspezifische Immunglobuline E (IgE) gebildet werden (Butterworth et al., 1984). Somit ist es dem Organismus möglich, eine gewisse Immunität aufzubauen (Warner and Kroegel, 1994; Mécheri and David, 1997). Doch nicht nur gegen Helminthen (Butterworth et al., 1984) und Bakterien (Echtenacher et al., 1996; Siebenhaar et al., 2007) scheinen MZ potentielle Abwehrstrategien entwickelt zu haben. Am Beispiel des *Vaccinia Virus* (VV) konnte gezeigt werden, dass MZ *in vitro* und *in vivo* in der Lage sind vor viralen Hautinfektionen zu schützen. Ähnlich zu einer der bakteriellen Abwehrmechanismen, scheinen antimikrobielle Peptide dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (Wang et al., 2012). Die Veröffentlichungen zum Thema MZ und Virus sind jedoch gleichsam divergent. In Versuchen mit dem hochpathogenen H5N1 Influenza Virus wurde zwar eine starke MZ-Aktivierung samt Degranulation nachgewiesen, was jedoch nicht dem Wohl des Individuums diene, sondern verstärkte Schädigungen der Lunge zur Folge hatte (Hu et al., 2012).

Ein nicht zu vernachlässigender Teil der Immunkompetenz von MZ besteht jedoch in ihrer Fähigkeit chemotaktisch wirksam zu sein und andere immunkompetente Zellen an den Ort des Geschehens zu dirigieren (Féger et al., 2002; Malaviya et al., 1996). Als weiterer möglicher

Verteidigungsmechanismus wurden Neutrophil extracellular traps (NETs) identifiziert, mittels welcher unter anderem Bakterien unschädlich gemacht werden können (von Köckritz-Blickwede et al., 2008).

Es gibt jedoch noch viele offene Fragen und teils auch Unstimmigkeiten, wie die Größenordnung und die tatsächlichen Kompetenzen von MZ im Kontext allumfassender immunologischer Vorgänge zu bewerten sind.

## **1.2. Rolle der Mastzelle im Rahmen der natürlichen Immunität gegen Bakterien**

### **1.2.1. Allgemein**

Bakterielle Infektionen stellen unsere heutige Medizin trotz aller Neuerungen noch immer vor immense Herausforderungen, weshalb aufgrund multiresistenter Bakterienstämme nach immer neuen Behandlungsmöglichkeiten gesucht wird. Postoperative Infektionen und Infektionen immungeschwächter Patienten, welche größtenteils nosokomial erworbenen Wundinfektionen, Pneumonien, Harnwegsinfekten oder primären Sepsen zuzuordnen sind, belasten nicht nur die Gesundheit der Patienten, sondern auch das Gesundheitssystem der Bundesrepublik. Darüberhinaus besteht ohne adäquate Behandlung im schlimmsten Fall die Möglichkeit einer phlegmonösen Ausbreitung bzw. einer generellen Bakteriämie, welche final zur Sepsis mit letalem Ausgang führen kann (Geffers and Gastmeier, 2011). Verschiedene immunologisch kompetente Zelltypen werden seit langem im Kontext bakterieller Infektionen beforscht, doch mit der Veröffentlichung über den Einfluss von MZ auf den Verlauf einer induzierten Peritonitis und folgender generellen Sepsis im Mausmodell, legte Dr. Bernd Echtenacher 1996 den Grundstein der Erforschung eines neuen Funktionsgebietes der Mastzelle: die Abwehr bakterieller Infektionen (Echtenacher et al., 1996). Diverse Arbeiten unter Zuhilfenahme dieses Sepsismodelles folgten, wobei die Sepsis allgemein durch Ligatur und Punktion des Ceacums initiiert wird (Gommerman et al., 2000; Maurer et al., 2004; Rosenkranz et al., 1998). Heutzutage ist als erwiesen anzusehen, dass MZ eine protektive Wirkung im Rahmen der angeborenen Immunabwehr gegen Bakterien ausüben (Echtenacher et al., 1996; Galli and Tsai, 2010; Maurer et al., 1998; Metz and Maurer, 2009). Dies ist nicht verwunderlich, sind MZ größtenteils in den Körper zur Außenwelt hin abschirmenden Geweben lokalisiert, ergo der Haut und den Mukosae des Gastrointestinaltraktes bzw. der Atemwege (Weber et al., 2003). Infolgedessen stehen sie mit Pathogenen in direktem Kontakt, wobei diese detektiert und

bekämpft werden können (Matsui et al., 2011; Maurer et al., 2006; Di Nardo et al., 2008; Siebenhaar et al., 2007). Mittels MZ-defizienter Mausmodelle wurde *in vivo* gezeigt, dass MZ unter anderem einen Immunschutz gegen *Mycoplasma pneumoniae*, *Escheria Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* bieten (Abel et al., 2011; Malaviya et al., 1994; Matsui et al., 2011; Michels et al., 2010; Siebenhaar et al., 2007). Bakterizide Strategien der MZ mit entsprechend protektiver Wirkung sind als vielseitig anzusehen und verschiedene Forschungsansätze werden heutzutage parallel verfolgt. So sind MZ befähigt Entzündungsreaktionen auf indirektem Wege über die Rekrutierung anderer Immunzellen zu beeinflussen (Abraham and St John, 2010; Galli and Tsai, 2010; Malaviya and Abraham, 2000). Beispielsweise wurde die potentiell bakterizide Wirkung neutrophiler Granulozyten, bedingt durch den chemotaktischen Einfluss von MZ, dargelegt (Enoksson et al., 2013; Malaviya et al., 1996). Ebenso ließen sich NK-Zellen durch das Chemokin CXCL-8, ausgeschüttet von MZ nach Virus-assoziiertes Stimulation, anlocken (Burke et al., 2008).

Auf direktem Wege scheinen jedoch der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Endothelin-1, sowie die Rezeptoren des Komplementsystems und der Toll-like Familie, besonders TLR-2 und TLR-4, eine bedeutsame Rolle in der bakteriellen Abwehr durch MZ zu spielen (Matsushima et al., 2004; Maurer et al., 2004; Prodeus et al., 1997; Rodriguez et al., 2012). Ein weiterer, derzeit untersuchter Mechanismus ist die Phagozytose durch MZ, wobei das SNARE-Protein SNAP29 eine potente Funktion in diesem Prozess einnimmt (Wesolowski et al., 2012). Sogenannte Neutrophil extracellular traps (NETs) wurden ebenso in MZ nachgewiesen und werden seitdem intensiv beforscht (Goldmann and Medina, 2012; Simon et al., 2013). Diese aus DNA, Granulainhalt und antimikrobiellen Peptiden bestehenden Netze, in welchen sich neben Bakterien auch Fungi, Viren und Protozoae „verfangen“, wurden erstmalig bei neutrophilen Granulozyten entdeckt (Matoszka et al., 2012). Auch antimikrobielle Peptide als eigenständig bakterizid wirksame Substanzen stellen einen möglichen Weg der MZ-Abwehr gegenüber bakteriellen Invasionen dar. Dieser Mechanismus ist bei Keratinozyten, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und auch teilweise bei Makrophagen beschrieben worden (Braff et al., 2005; Harder et al., 1997; Ong et al., 2002; Peschel et al., 2001) und erweckt aktuell großes Interesse im Rahmen der MZ-Forschung (Campagna et al., 2007; von Köckritz-Blickwede et al., 2008; Di Nardo et al., 2008). Am Beispiel des durch MZ sezernierten Cathelicidins, auch CRAMP oder LL37 genannt, konnte im Verlauf einer durch

$\beta$ -hämolyisierende A-Streptokokken hervorgerufenen Hautinfektion die protektive Wirkung von MZ aufgezeigt werden (Di Nardo et al., 2008).

### 1.2.2. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*

Einen im Krankenhaus omnipräsenten und gleichsam gefürchteten opportunistischen Erreger stellt das gramnegative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*(PA) dar. Für die investigativen Belange dieser Arbeit verkörpert PA ein hervorragendes Forschungsobjekt, da das Stäbchen ein typischer Keim von Wundinfektionen ist. Es vermehrt sich bevorzugt unter feuchten Bedingungen und bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 35°C, wie in unseren Hautwunden gegeben. Ummantelt von einer Zellmembran, der das Exopolysaccharid Alginat aufsitzt, ist es vermehrt vor Antikörperreaktionen und etwaiger Phagozytose geschützt. Ein polares Flagellum, größtenteils aus Flagellin bestehend (Campodonico et al., 2010), dient der Fortbewegung und Adhäsion. Aufgrund der Abschirmung nach Außen und der Fähigkeit konstitutionell  $\beta$ -Lactamasen zu exprimieren, sind PA-Infektionen sehr ernst zu nehmen. Verwendete Antibiotika-Regime sind Piperacillin, Carbapeneme, Cephalosporine, Aminoglykoside und Chinolone. Immer frequenter auftretende Mehrfachresistenzen verkomplizieren die Therapie einer PA-Infektion zunehmend, was besonders für Mukoviszidose-Patienten bei Infektion der Lunge zuweilen einem Todesurteil gleichkommt (Valencia et al., 2004).

Des Weiteren besitzt das etwa 0,5- 1,0  $\mu\text{m}$  x 4,0  $\mu\text{m}$  große, fakultativ anaerobe Stäbchen die Eigenschaft, Biofilme auf Oberflächen auszubilden, was häufig zu PA-assoziierten Harnwegsinfekten durch infizierte Blasenkatheter führt (Ferroni et al., 1998). Der Biofilm als solches besteht aus Nukleinsäuren und Exopolysacchariden, welche wiederum Proteine und Alginsäuren enthalten, wodurch die beständige Fixierung auf diversen Oberflächen ermöglicht wird (Bazzi et al., 2000). Interessanterweise zeigen neuste Veröffentlichungen, dass das antimikrobielle Peptid GL13K in der Lage ist den PA-Biofilm signifikant zu minimieren (Hirt and Gorr, 2013). Die eigentlichen Virulenzfaktoren dieses Bakteriums stellen jedoch dessen vier bekannte Toxine dar. Das Exoenzym A verstärkt die Adhärenz an das Epithel und ist in der Lage Filamente zu depolymerisieren und das normale Zytoskelett, sowie die Immunglobuline IgA und IgG, zu zerstören. Dies bedingt eine Gewebnekrose. Die Phospholipase C wirkt hitzestabil als Hämolyisin. Im Prozess einer chronischen Infektion ist PA des Weiteren mit Hilfe von Pyoverdinin



und Pyochelin, zwei Siderophore, befähigt, sich ohne externes Eisen zu replizieren. Die Kombination aller genannter Eigenschaften des *PA* macht dieses Bakterium zu einem unberechenbaren und gefährlichen Erreger für den Menschen (Ben Haj Khalifa et al., 2011).

### 1.2.3. Antimikrobielle Peptide und MZ-Proteasen, sowie deren Aufgabe im Rahmen der MZ-vermittelten Immunabwehr

Neben der Degranulation besitzen MZ ebenso die Eigenschaft spezifisch auf bestimmte Stimuli hin Substanzen *de novo* zu synthetisieren. So induziert Prostaglandin E<sub>2</sub> zum Beispiel den Wachstumsfaktor VEGF (Abdel-Majid and Marshall, 2004) oder bestimmte antimikrobielle Peptide (AMP). Diese Gruppe von Substanzen unterscheidet sich jedoch in ihrer Struktur und Wirkungsweise, wobei viele dieser Peptide  $\alpha$ -Helix-Strukturen besitzen, kationisch bzw. amphipatisch sind und aus bestimmten Aminosäuren, wie Tryptophan oder Histidin, bestehen (Epanand and Vogel, 1999). Andere AMP besitzen wiederum Thioether- Ringe oder makrolytische Cystein-Knoten. Die Zytotoxizität dieser Peptide beruht zumeist auf ihrer Eigenschaft, sich mittels amphipatischer Strukturen an die Zellmembran des Erregers zu binden und folgend die Integrität der äußeren und inneren Membranen zu zerstören. Zuvor hauptsächlich bei Keratinozyten identifiziert (Braff et al., 2005), konnten mittlerweile durch MZ sezernierte AMP nachgewiesen werden. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass bei der Aktivierung von MZ neben den bekannten Substanzen, wie Histamin, Heparin, Serotonin, verschiedenen Proteasen und Interleukinen, auch AMP sezerniert werden können. Eines der wohl bekanntesten AMP in der derzeitigen Mastzellforschung ist Cathelicidin, ebenso bekannt als CRAMP und LL37, welches nach Angaben einiger Autoren im Verlauf von Hautinfektionen protektiv wirkt (Cruse et al., 2010; Di Nardo et al., 2008). Neben Piscidin (Campagna et al., 2007), wurde ebenso Angiogenin (Kulka et al., 2009) und das murine  $\beta$ -Defensin 4 (MBD-4) (Campagna et al., 2007; Nardo et al., 2003) aus MZ stammend identifiziert. Neben AMP rücken in diesem Zusammenhang Interleukine zunehmend in den Fokus der derzeitigen MZ-Forschung. Erwähnenswert sind hierbei IL-23 (Ikeda et al., 2003), IL-33 (Hsu et al., 2010) und IL-25 (Angkasekwinai et al., 2013). Es wurde sowohl *in vitro*, als auch teils *in vivo* dargelegt, dass diese IL auf direktem oder indirektem Wege bakterizide Kompetenzen besitzen (Campagna et al., 2007; Lundquist and Pejler, 2011). Bekanntermaßen sind MZ zusätzlich in der Lage eine große Bandbreite sogenannter MZ-Proteasen, unter anderem Chymasen, Trypsasen, und

Granzyme, zu synthetisieren (Wastling et al., 1997; Pardo et al., 2007; Miller and Schwartz, 1989). Gezeigt wurde, dass sowohl die Stimulation mit gram-positiven Bakterien in Kokultur, als auch mit LPS *in vitro*, zu einer gesteigerten Granzym D-Expression in MZ führt (Rönnerberg et al., 2013). Gleichmaßen wird die Expression der Mastzellprotease-1 (MCP-1) während Nematoden-Infektionen hochreguliert (Wastling et al., 1997), um hier nur zwei Beispiele aufzuführen. Mastzell-Proteasen gehören zu den potentesten Waffen dieser vielfältigen Zellen, deren Wirkungsradius bis hin zur Degradierung von Schlangengiften reicht (Metz et al., 2006).

### 1.3. Kutane Wundheilung

#### 1.3.1. Überblick

Mit einer durchschnittlichen Gesamtoberfläche von 1,5- 2,0m<sup>2</sup> stellt die menschliche Haut als größtes Organ unseres Körpers eine lebensnotwendige Schutzbarriere gegenüber einer Vielzahl externer Einflussfaktoren dar. Die Bedeutung der kutanen Integrität wird oftmals erst bei Verlust eben dieser in vollem Umfang verstanden, so beispielsweise zu sehen bei großflächigen Verbrennungen oder durch mechanisch herbeigeführte Verletzungen, wie in dieser Arbeit thematisiert. Nicht nur primäre Schädigungen, sondern ebenso sekundäre Komplikationen, wie großvolumige Flüssigkeitsverluste oder Infektionen sind hochgradig gefährlich. Eine zeitnahe, regelrechte und komplikationslose dermale Regeneration bildet somit die Grundlage der Funktionalität dieses komplexen Schutzwalls und sichert dem Individuum im Zweifelsfall das Überleben. Aktiv am Defektschluss unserer Haut beteiligt sind Fibroblasten, Keratinozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen, in Kombination mit diversen Wachstumsfaktoren, wie dem Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und anderen Zytokinen (DiPietro et al., 1995; Ishii et al., 1995; Moulin et al., 1995; Peplow and Chatterjee, 2013). Im Verlauf der letzten Jahre kristallisierte sich die MZ ebenso als wichtige Effektorzelle der kutanen Wundheilung heraus (Younan et al., 2011; Shiota et al., 2010; Weller et al., 2006). So legte die AG Marcus Maurer dar, dass bereits das Setzen einer Wunde zur Mastzellaktivierung führt. MZ übernehmen zudem wichtige regulatorische Funktionen innerhalb der initialen inflammatorischen Phase der Wundheilung (Egozi et al., 2003; Weller et al., 2006). Sie beeinflussen unter anderem die Permeabilität von Gefäßen nach Wundsetzung, den Wundschluss selbst, sowie den Umfang der

lokalen Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. MZ stellen ein wichtiges Stellglied im Prozess der frühen Wundheilung dar, zu welcher sie letztendlich entscheidend beitragen (Egozi et al., 2003; Ng et al., 2010; Weller et al., 2006).

Die Wundheilung selbst wird zudem durch externe und interne Faktoren beeinflusst. Neben dem Zustand der Wunde selbst, interferiert das Lebensalter, der Ernährungszustand, etwaige bestehende Begleiterkrankungen bzw. eine entsprechende Medikation oder der Konsum von Drogen, Zigaretten und Alkohol, neben anderen Faktoren, mit dem Heilungsprozess des Gewebes (Ahn et al., 2008; Arnold and Barbul, 2006; Calabro and Yeh, 2007; Gosain and DiPietro, 2004; Kiecolt-Glaser et al., 1995; Rodriguez et al., 2008). Gesondert zu erwähnen, weil für diese Arbeit hochgradig bedeutungsvoll, sind Wundheilungsstörungen aufgrund von Wundinfekten, wobei MZ befähigt sind bakteriellen Infektionen der Haut direkt entgegenzuwirken (Siebenhaar et al., 2007). Dieses Wissen, in Kombination mit deren Einfluss auf den Prozess der Wundheilung, bildet das Fundament dieser Arbeit.

### 1.3.2. Phasen und Mechanismen der Wundheilung

Die Wundheilung als solches ist ein Prozess der sich vereinfacht dargestellt in 3 Phasen unterteilen lässt: eine Entzündungsphase, gefolgt von der Bildung des Granulationsgewebes, sowie der abschließenden Ausbildung und Reifung des Narbengewebes. Jedoch sind diese Phasen keinesfalls als statische Prozesse zu betrachten, die strikt voneinander getrennt zeitlich versetzt ablaufen. Man beobachtet eine dynamische Interaktion verschiedener Zelltypen, wobei nekrotisiertes Gewebe abgebaut und folgend Ersatzgewebe aufgebaut wird.

#### I) Hämostase und Entzündungsphase (unmittelbar nach Wundsetzung bis Tag 4-6).

Essentiell für eine effektive Wundheilung ist die Stillung der aktiven Blutung. Neben sofortiger Vasokonstriktion initiieren sowohl das Endothel, als auch Thrombozyten den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade (Gailani and Renné, 2007). Ein Thrombus, unter anderem bestehend aus Thrombozyten, Erythrozyten, Thrombin, Kollagen und Fibronektin wird geformt, wobei folgend Wachstumsfaktoren und Zytokine sezerniert werden, welche inflammatorisch auf das umliegende Gewebe wirken (Witte and Barbul, 1997). Der Thrombus selbst dient gleichermaßen als Gerüst für jegliche im Prozess der Wundheilung involvierten Zellen und erhöht die lokale Konzentration von Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Martin et al., 1997). Ein Defizit in der

Thrombusbildung durch beispielsweise einen Faktor XIII-Mangel, resultiert folglich in einer verminderten Wundheilung (Beck et al., 1961). Aufgrund der Akkumulation von Entzündungsmediatoren und Prostaglandinen kommt es im Verlauf zur peripherer Vasodilatation und Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, werden durch  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TNF-}\beta$ , IL-1,  $\text{TGF-}\beta$  oder PF4 in das Wundareal gelockt (Bevilacqua et al., 1985; Pohlman et al., 1986). Monozyten wandern in das ödematöse Gebiet ein und im Verlauf gelten Makrophagen als essentiell für den Übergang der Wunde von der Entzündungsphase zur Granulationsphase. Sie stimulieren zum einen die Angiogenese via VEGF, FGF und  $\text{TNF-}\alpha$ , aber auch die Bindegewebsbildung über verschiedenste Mediatoren und synthetisieren Stickstoffmonoxid (Witte and Barbul, 2002). Neutrophile Granulozyten reinigen den Wundbereich von Bakterien und toten Zellbestandteilen mittels Serin-Proteasen bzw. Metalloproteinasen und reaktive Sauerstoffspezies werden freigesetzt (Yager and Nwomeh, 1999). Makrophagen bilden bakterizid wirksame Hydroxyl- und Peroxynitritradikale und Fibroblasten bzw. Kerationozyten sezernieren Matrixmetalloproteinasen zur Reinigung des Gewebes (Abraham et al., 2000; Goldman et al., 2004). Es findet sich ein global entzündetes und gereinigtes Gebiet, welches die Grundlage für die Bildung des Granulationsgewebes darstellt. Lipoxine, wie  $\text{LXA}_4$  und  $\text{LXB}_4$ , in Kombination mit Neutrophilen, scheinen die provozierte Entzündung zu terminieren (Serhan and Chiang, 2004).

## II) Bildung von Granulationsgewebe/ Proliferationsphase (Tag 4-14)

Epithelzellen proliferieren peripher vom Wundrand aus, welche durch von Makrophagen und aktivierten Thrombozyten synthetisierten Mediatoren, so EGF und  $\text{TGF-}\alpha$ , dazu stimuliert werden (Grotendorst et al., 1989). Man nimmt an, dass die Entzündungsmediatoren IL-1 und  $\text{TNF-}\alpha$  die Keratinocyte growth factor- Genexpression (KGF) in Fibroblasten hochregulieren, woraufhin diese KGF-1, KGF-2 und IL-6 produzieren, welche wiederum andere Keratinozyten zur Migration und Proliferation stimulieren (Smola et al., 1993; Xia et al., 1999). Endothelzellen beginnen zudem auf den Stimulus VEGF hin, hauptsächlich durch Fibroblasten, aber auch durch Mastzellen synthetisiert, mit der Neoangiogenese. Die Hypoxie im Gewebe triggert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Endothelzellen, womit diese wiederum ihre eigene VEGF-Freisetzung stimulieren und eine Vasodilatation mit protektivem Effekt für das Gewebe hervorrufen (Goldman et al., 2004; Witte and Barbul, 2002). Fibroblasten, mittels PDGF und EGF aus Thrombozyten und Makrophagen in die Wunde gelockt, proliferieren ebenfalls und

provisorisches Kollagen Typ III, später zudem Kollagen Typ 1, wird synthetisiert. Fibrin, Fibronectin und Glykosaminoglycane sind gleichsam präsent (Regan et al., 1991). Bereits in der Wunde ansässige Fibroblasten wandeln sich unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  zu Myofibroblasten um, welche sich folgend kontrahieren um die Wundoberfläche signifikant zu verkleinern (Desmoulière et al., 1993; Grinnell et al., 2003).

### III) Bildung und Reifung von Narbengewebe (Tag 8 bis 1 Jahr)

Matrixarmes, zellreiches Mesenchym wird in matrixreiches, zellarmes Gewebe umgebaut. Probleme während dieses Prozesses können zu insuffizient stabilen Wunden oder hypertrophen Wundheilungsstörungen bzw. Kelloidbildung führen. Wie bereits beschrieben, besteht das Granulationsgewebe zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich aus von Fibroblasten synthetisiertem Fibrin bzw. Fibronectin, verbunden mit Glykosaminoglycanen, Proteoglycanen und anderen Proteinen (Witte and Barbul, 1997). Verschiedene Glycane bilden ein provisorisches Gerüst, welches durch organisiertere Kollagene ersetzt wird. Der Anteil an Kollagen Typ I nimmt, im Verhältnis zu Kollagen Typ III, im Verlauf der Narbenbildung zu (Ehrlich and Krummel, 1996). Der Gewebsumbau erfolgt mittels Matrixmetalloproteinasen, welche in ihrer Aktivität durch die Konzentration von Faktoren wie IL-1, PDGF, TGF- $\beta$  und EGF im Gewebe gesteuert werden. IL-6 und TGF- $\beta$  stimulieren im Gegenzug die Freisetzung von Metalloproteinasen aus Fibroblasten, welche die Aktivität der Metallomatrixproteinasen herabsetzen (Henry and Garner, 2003). Die dendritischen Ausläufer der Fibroblasten beginnen auf den Stimulus PDGF hin anzuschwellen und sich weiter peripher auszubreiten. Lysophosphatidsäure, welche aus der Zellmembran stimulierter Thrombozyten abgespalten wird, bewirkt das Zurückziehen dieser Ausläufer. Lysophosphatidsäure wirkt auf Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, sowie auf die glatten Muskelzellen der Gefäße im Kontext der Wundheilung, was die Kontraktionsfähigkeit, Aggregation, Modulation und Chemotaxe in diesem Prozess beeinflusst (Eichholtz et al., 1993; Goetzl and An, 1998). Von Fibroblasten synthetisiertes, zunächst parallel ausgerichtetes Kollagen wird in einem verflochtenen Muster angelegt um die Festigkeit zu erhöhen. Eine Hautwunde besitzt nach einer Woche etwa 3%, nach 3 Wochen etwa 30% und nach 3 Monaten und mehr etwa 80% ihrer ursprünglichen Stärke (Sabiston et al., 1997).

### 1.3.3. Wundheilung und Mastzellen - Stand der Forschung

Generell beeinflussen MZ den Wundheilungsverlauf, beginnend bei der initialen Entzündungsphase, Reepithelisierungsphase, in der Phase der Revaskularisation bis hin zum späteren Umbau des Narbengewebes (Noli and Miolo, 2001). Diverse Veröffentlichungen zufolge nimmt die lokale Mastzellanzahl als Reaktion auf eine Verletzung kurzzeitig drastisch ab, wobei diese 2 Tage nach dem Ereignis wieder auf ein normales Niveau zurückkehrt. Folgend steigt sie überschießend über das normale Niveau hinaus an (Hebda et al., 1993; Persinger et al., 1983). Man nimmt an, dass undifferenzierte Progenitorzellen in das Gewebe migrieren und sich dort folgend ausdifferenzieren (Takagi et al., 1990). Der Körper reagiert zum einen mit einer Änderung der MZ-Anzahl, zum anderen aber auch mit direkter Mastzellaktivierung, hervorgerufen durch die Penetration der Haut und der dabei entstandenen Scherkräfte. 2006 wurde gezeigt, dass MZ durch das Setzen einer Wunde direkt aktiviert werden und degranulieren (Weller et al., 2006). Damit werden eine Vielzahl präformierter Mediatoren in hoher Quantität innerhalb kürzester Zeit in das Wundgebiet entlassen (Galli et al., 1990a; Maurer et al., 2003). Hierzu zählen, neben diversen Wachstumsfaktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), auch Tryptase und Histamin, welche die Proliferation von Fibroblasten und Epithelien unterstützen und somit eine der Grundvoraussetzungen für eine adäquate Wundheilung darstellen (Abe et al., 2000). Zusätzlich gilt der transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) als hochpotenter Stimulator der Fibroplasia, sowie der Wundkontraktion (Clark et al., 1997; Desmoulière et al., 1993), wobei MZ einer der Hauptproduzenten dieses Stoffes sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch MZ sezerniertes Heparin einen positiven Effekt auf die Migrationseigenschaften von Endothelzellen ausübt (Azizkhan et al., 1980) und die von MZ sezernierten Chymasen und Tryptasen der Gefäßproliferation förderlich sind (Blair et al., 1997; Muramatsu et al., 2000). Die MZ-Tryptase ist befähigt die Kollagensynthese von Fibroblasten zu stimulieren, was die Wundheilung beschleunigt (Cairns and Walls, 1997). Darüberhinaus produzieren MZ eine große Bandbreite proinflammatorischer Zytokine (Gordon et al., 1990) und attrahieren Zellen, wie neutrophile Granulozyten, innerhalb des inflammatorischen Gewebes (Malaviya et al., 1996; Wershil et al., 1991). Einige in diesem Zusammenhang zu nennende, durch MZ sezernierte und auf Leukozyten innerhalb der Entzündungsphase chemotaktisch wirkende Substanzen, sind der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), das macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), sowie in besonderem Maße bei Menschen das IL-8 (Gordon and Galli, 1990;

Möller et al., 1993; Walsh et al., 1991; Williams and Coleman, 1995). Es wurde zudem am Menschen gezeigt, dass sich das Expressionsmuster der MZ-Chymase, MZ-Tryptase und VEGF in unterschiedlichen Narbenformen, wie hypertropher Narbe, Granulationsgewebe, Keloid und chirurgischer Narbe, unterscheiden (Gaber et al. 2014). Man weiß außerdem, dass MZ-Proteasen in der Lage sind, die die Wunde umgebende Extrazellulärmatrix für die Proliferationsphase vorzubereiten (Ng 2010). In MZ-Fibroblasten-Kokulturen dargelegt, beeinflussen MZ zudem die Antigenproduktion, Kollagensynthese und Proliferation der Fibroblasten positiv (Rubinchik and Levi-Schaffer, 1994). Auch die Interaktion mit Gewebsmakrophagen während der Entzündungsphase wird durch MZ-Proteasen beeinflusst. So steigerten *in vitro* differenzierte murine Makrophagen die Expression diverser Substanzen, wie beispielsweise IL-1 $\beta$ , nachdem sie mit einem Tryptase-Heparin-Komplex in Kontakt gelangten (Beckett et al. 2013). Durch Weller et al. konnte 2006 *in vivo* mittels MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen, normalen *Kit +/+*- Mäusen, sowie rekonstituierten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*-Mäusen dargelegt werden, dass Mastzellen für eine normale Wundheilung essentiell sind. Die Grundidee der Rekonstitution ist die lokale Applikation von MZ in ein MZ-defizientes Mausmodell, aufgrund dessen das MZ-Defizit lokal aufgehoben wird und somit wiederum ein dem Wildtyp nahezu identischer Phänotyp entsteht. Der Wundschluss in Abwesenheit von MZ war im Vergleich zu diesem in Wildtyp-Mäusen und rekonstituierten Tieren signifikant vermindert (Weller et al., 2006). Mastzellen sind somit für den physiologischen Wundheilungsprozess von herausragender Bedeutung, wobei deren Einfluss auf infizierte Wunden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig dargelegt wurde. Zurückzuführen ist dies in Theorie zum einen auf die Eigenschaft der MZ den Wundheilungsprozess besonders während der Entzündungsphase positiv zu beeinflussen, zum anderen sind MZ ebenso befähigt bakterizid zu wirken, wobei eine lokale, biologische Reinigung des Wundgrundes einen bestimmenden Faktor darstellen könnte. Neben all den positiven Attributen von MZ im Rahmen der Wundheilung, scheinen diese, besonders bei chronischer Aktivierung, auch andersweitig die dermale Regeneration zu beeinflussen. So wurde 1978 bereits gezeigt, dass MZ die Bildung von hypertrophen Narben begünstigen (Kischer, Bunce, and Shetlah 1978). In weiteren Versuchen mit MZ-defizienten Mäusen und Wildtypmäusen ist bei MZ-defizienten Tieren nach einer Verbrühungsverletzung eine signifikant geringere Narbenbildung im Vergleich zu MZ-kompetenten Tieren zu beobachten. Dies ist auf die MZ-Proteasen 4 und 5 zurückzuführen (Younan et al. 2010). Zudem konnte eine erhöhte MZ-Zahl in Keloiden bestimmt werden (Shaker, Ayuob, and Hajrah 2011).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden WBB6F<sub>1</sub>- *Kit*<sup>+/+</sup>/*Kit*<sup>+/+</sup>- Mäuse (*Kit*<sup>+/+</sup>), sowie genetisch Mastzell (MZ)-defiziente WBB6F<sub>1</sub>- *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>- Mäuse (*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>) verwendet. Die für alle Versuche eingesetzten Tiere entstammen der eigenen Nachzucht der tierexperimentellen Einrichtung der Charité- Universitätsmedizin Berlin. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, waren die Mäuse während der Experimente zwischen 6-10 Wochen alt, weiblich und befanden sich in der Telogenphase des Haarfollikelwachstums.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppenkäfigen mit bis zu maximal 3 Tieren pro Käfig unter konstanten und nach Außen abgeschirmten klimatischen Bedingungen. Alle Mäuse erhielten Standard-Laborfutter, sowie Wasser ad libitum während eines konstanten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Experimente wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, unter der Genehmigungsnummer G 0283/11, am 16.12.2011 genehmigt.

#### 2.1.1. Das *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> Mausmodell

1985 erstmalig von Galli und Kitamura beschrieben, stellt dieses Mausmodell einen Meilenstein der Mastzellforschung dar. Bedingt durch eine Spontanmutation beider Allele des c-Kit-Gens, ist es den MZ-Vorläuferzellen aufgrund einer fehlenden Aktivierung dieser Rezeptoren durch den Liganden stem cell factor (SCF) nicht möglich, regelrecht zu proliferieren bzw. sich zu differenzieren, was folglich eine MZ-Defizienz dieser Tiere bedingt. Wegweisende Eigenschaften und Funktionen der MZ konnten auf diesem Wege untersucht und dargelegt werden (Nakano et al., 1985). Dieser Rezeptordefekt führt jedoch, neben dem gewünschten Defizit an MZ, zusätzlich zu einem Defizit an Melanozyten (weiße Fellfarbe), zur Sterilität der Mäuse, sowie zu einer subtilen Anämie. Zu betonen gilt es, dass die Anzahl und Funktionalität immunrelevanter Zellen, so B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, und Granulozyten weiterhin gegeben ist und diese denen des Wildtyps entsprechen. Das Immunsystem der *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>-Mäuse unterliegt bewiesenermaßen keinen signifikanten Veränderungen (Galli and Hammel, 1994; Galli and Kitamura, 1987a; Mekori and Phillips, 1969). Um jedoch auszuschließen, dass gewisse Beobachtungen nicht durch die MZ-Defizienz, sondern durch das Fehlen anderer Zelltypen begründet sind, wurden in Folgeexperimenten MZ-defiziente *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>- Mäuse mit bone marrow-derived cultured mast cells (BMCMCs) auf verschiedenen Wegen rekonstituiert.



Die MZ-Defizienz und deren spezifische Folgeerscheinungen konnten auf diesem Wege fast vollständig behoben werden (Galli and Kitamura, 1987b). Das *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*-Mausmodell stellt somit ein hervorragendes Modell zur Erforschung spezifischer Eigenschaften, Funktionen und synthetisierter Produkte dieser Zellen dar.

### 2.1.2. Rekonstitution

Die Rekonstitution erfolgte durch MZ, welche aus Knochenmarksvorläuferzellen *in vitro* differenziert (Methodenteil 2.4.1. Gewinnung und Kultivierung aus dem Knochenmark stammender, kultivierter MZ (BMCMCs)) und 4 Wochen alten, MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*-Mäusen subkutan in die untere Rückenpartie injiziert wurden. Hierzu wurden 4cm<sup>2</sup> rasiert und 1x10<sup>6</sup> BMCMCs pro 1cm<sup>2</sup>, suspendiert in 100µl PBS, mittels einer 0,3x30mm Kanüle intradermal appliziert. Die Rekonstitution erfolgte an der Stelle, wo später die Hautstanzen gesetzt wurden. Zwischen MZ-Injektion und Beginn der Experimente lagen exakt 4 Wochen. Während dieser Zeit reiften die MZ lokal in dem sie umgebenden Zytokinmilieu.

## 2.2. **Wundheilungsversuch mit Wildtyp- und MZ-defizienten Mäusen**

### 2.2.1. Narkose

Als Mittel der Wahl wurde das Inhalationsanästhetikum Isofluran (Forene® der Firma Abbott, Abbott Park, USA) in Kombination mit Sauerstoff, verwendet. Dieses wurde mittels eines speziellen Isofluran-Verdampfers über eine Narkosekammer geleitet oder wahlweise direkt über eine Beatmungsmaske dem Tier nasal zugeführt.

### 2.2.2. Wundsetzung, Infektion und Kontrolle

Nach großflächiger Rasur und Hautdesinfektion mit 70% Ethanol, wurden sowohl den *Kit+/+-*-Mäusen, als auch den MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen identische Wunden im kaudalen Rückenbereich in der Vertebrallinie, etwa 1cm oberhalb des Schwanzansatzes, mittels einer 6mm Biopsiestanze der Firma Acuderm zugeführt. Die Stanze wurde unter kontinuierlichem Druck und leichter Drehbewegung in die rasierte Rückenhaut des Tieres appliziert. Die Hautstanzen reichten dabei durch alle Hautschichten, ohne die Muskelfaszie der autochthonen Rückenmuskulatur zu penetrieren. Die Wunden der einzelnen Tiere wurden randomisiert wahlweise mit 10µl einer standardisierten Bakteriensuspension des Bakteriums *Pseudomonas*

*aeruginosa* in einer Konzentration von  $6,5 \times 10^5$ /ml infiziert oder als Kontrolle mit 10µl PBS behandelt. Alle Tiere wurden folgend mit Softhalskrägen versehen und 24 Stunden in Einzelkäfigen gehalten. Nach diesem Zeitintervall wurden den Tieren die Krägen entfernt und diese, gemäß ihrer zugehörigen Gruppe, für weitere 8 Tage in Gruppenkäfigen gehalten. Die Wunden der Tiere wurden am Zeitpunkt der Wundetablierung = 0 Stunden, nach 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, und bis zum Tag 9 täglich fotografiert. An Tag 9 erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Während der gesamten Versuchsdauer wurden täglich die Körpertemperatur mittels rektaler Sonde und das Gewicht der Tiere erfasst. Alle Abbruchkriterien, die ein offensichtliches Leiden der Tiere implizierten, ausgedrückt durch verändertes Spontanverhalten, veränderte Motorik, Körperhaltung, Schlafhaltung, Sozialverhalten, das Fehlen von adäquatem Antwortverhalten auf künstliche Reize, sowie morphologische Veränderungen, wie Selbstverstümmelung oder mangelnde Eigenpflege, wurden beachtet. Morbide Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet.

Um zu bestätigen, dass es sich bei der applizierten Suspension um eine lebende Reinkultur des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* in der gewünschten Konzentration handelte, wurden die Bakteriensuspensionen auf LB-Agar Platten ausgestrichen, 12 Stunden bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

### 2.2.3. Wundvermessung

Um die spezifische Wundfläche der einzelnen Tiere zu bestimmen und diese in einer Kinetik abbilden zu können, wurden die Wunden zu folgenden Zeitpunkten fotografiert: Tag 0 (Zeitpunkt des Setzens der Hautstanzen), gefolgt von einem 6 Stunden Zeitpunkt, 12 Stunden, Tag 1, und im weiteren Verlauf täglich bis Tag 9. Am Tag 9 wurden alle Tiere getötet. Täglich wurden exakte Wundgrößen individuell per fototechnischer Flächenbestimmung unter Zuhilfenahme einer Skalierung ermittelt. Unter Verwendung des Computerprogrammes Adobe Photoshop CS2 (San José, USA) wurde für jedes Bild die Pixelanzahl auf einer Länge von 20mm mit jeweils einem Pixel Breite bestimmt. Mittels des Lasso-Werkzeuges konnte der genaue Umriss der Wunde festgelegt und unabhängig jeglicher geometrischer Form über die spezifische Pixelanzahl innerhalb der Wunde die genaue Wundfläche berechnet werden. Die Berechnung erfolgte über die Formel:  $A_{Wunde} = (x/y)^2 * z$ , wobei  $A_{Wunde}$  die zu ermittelnde Wundfläche darstellt,  $x$  die maßstabsgerechte Länge, in diesem Fall 20mm, auf welcher sich in einer Reihe  $y$  Pixel befinden;  $y$ , welches der Anzahl der Pixel der Länge  $x$  entspricht und  $z$ ,

welches die mittels Photoshop ermittelte Pixelanzahl der Wundfläche beschreibt. Somit konnten die exakten Wundgrößen trotz individuell auftretender Unregelmäßigkeiten des Wundrandes bestimmt und ins Verhältnis mit der Ursprungswundgröße am Zeitpunkt 0 gesetzt werden.

#### 2.2.4. Histologie

Für histologische Analysen wurde jeder Maus nach der Tötung unter Isofluran-Narkose an Tag 9 eine Hautstanze mit dem Durchmesser 12 mm entnommen, welche die ursprüngliche Wunde zentriert umschloss. Diese Biopsie wurde mit einer Schere halbiert und jeweils eine Hälfte mit 4% gepuffertem Formaldehyd (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) fixiert. Die Proben wurden so fixiert, dass später die Schnittfläche jeweils den Wundrand, gefolgt von der Wundkruste und wiederum den Wundrand umschließt. Die Einbettung der Schnitte in Paraffin erfolgte mittels der Shandon Citadel 1000 (Waltham, USA) nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 3** Einbettung der Paraffinschnitte

<b>Medium</b>	<b>Zeit der Applikation (in min)</b>
Aqua destilliert	20
70% Ethanol	50
70% Ethanol	60
96% Ethanol	50
96% Ethanol	60
Absoluter Ethanol	50
Absoluter Ethanol	60
Absoluter Ethanol	60
Xylol	50
Xylol	60
Paraffin	120
Paraffin	unbegrenzt

Nach der Einbettung wurden 5µm dicke Gewebeschnitte mit der Microtom Finesse 325 von Shandon (Waltham, USA) angefertigt. Diese wurden zum einen mittels Hämatoxylin-Eosin-

Färbung (HE-Färbung) gefärbt (siehe Protokoll HE-Färbung), womit zellunspezifisch Zellkerne und das Zytoplasma sichtbar gemacht wurden. Zusätzlich wurden die Schnitte mittels Giemsa-Färbung (siehe Protokoll Giemsa-Färbung) gefärbt, was der Detektion von MZ, aufgrund ihrer spezifischen Granula, dient.

#### **Tabelle 4/5 Färbungen an Paraffinschnitten**

##### HE-Färbung an Paraffinschnitten

<b>Färbeschritt</b>	<b>Zeit</b>
3x Xylol	10 min
2x absoluter Ethanol	5 min
2x 96% Ethanol	5 min
2x 70% Ethanol	5 min
3x Aqua destilliert	5 min
Hämatoxylin (frisch filtriert)	1 min
mit fließend Wasser spülen	10 min
Spülen in Aqua destilliert	1 min
Eosin	1 min
4x in Aqua destilliert spülen	1 min
70% Ethanol	3 min
96% Ethanol	3 min
absoluter Alkohol	3 min
Xylol	3 min
Eindecken mit Clarion environmentally safe permanent mounting Medium	

##### Giemsa-Färbung an Paraffinschnitten

<b>Färbeschritt</b>	<b>Zeit</b>
3x Xylol	10 min
2x absoluter Alkohol	5 min
2x 96% Ethanol	5 min
2x 70% Ethanol	5 min
3x Aqua destilliert	5 min
Giemsa Azur Eosin-Ethylenblau unverdünnt und filtriert	15 min
0,1 % Essigsäure	10 s
Spülen mit Aqua destilliert	1 min
3x absoluter Alkohol	10 s
3x Xylol	5 min
Eindecken mit Clarion environmentally safe permanent mounting Medium	

### **2.3. Bakterienlast der Wunde**

24 Stunden nach Infektion der Wunden, methodisch gleich dem Wundheilungsversuch (siehe 2.2.2. Wundsetzung, Infektion und Kontrolle), wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Die Wunden, samt des Randbereiches, wurden steril entnommen und in mit 1ml PBS gefüllten 1,5ml Eppendorf Röhrchen (Hamburg, Deutschland) überführt. Die Biopsien wurden

im Anschluss mittels der Präzisionswaage MC1 von Sartorius (Göttingen, Deutschland) gewogen. Im weiteren Verlauf wurden die Hautstanzen in Pufferlösung mechanisch zerkleinert. Von der so entstandenen Suspension wurden in serieller Verdünnung jeweils 100µl auf *Pseudomonas aeruginosa*-Selektionsplatten der Firma BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt. Die Berechnung erfolgte mittels der Formel:  $(CFU/0,1g \text{ Haut}) = \text{Anzahl der gezählten Kolonien pro Platte} \times (1/ \text{Verdünnung}) \times (0,1/ \text{Gewicht des homogenisierten Gewebes})$ , wobei *CFU* die bakteriellen koloniebildenden Einheiten (colony forming units) darstellt.

## **2.4. Zellen**

### 2.4.1. Gewinnung und Kultivierung aus dem Knochenmark stammender, kultivierter MZ (BMCMCs)

Die aus dem Knochenmark stammenden, kultivierten MZ (BMCMCs) wurden aus *Kit+/-*-Spendermäusen gewonnen. Die narkotisierten Mäuse wurden getötet und die Haut der hinteren Gliedmaßen wurde, mit einem zirkulären Schnitt nahe der Hüfte beginnend, in Richtung Fuß abgezogen. Nach Amputation des Beines wurden sämtliche Weichteile vom Knochen entfernt, die Fibula verworfen und sowohl der Femur, als auch die Tibia in 70% Ethanol geschwenkt, um die Knochen in Waschmedium überführt auf Eis zu lagern. Nach Absetzen der Epiphysen wurde mit Hilfe einer 20G Kanüle und Zellmedium das Knochenmark der gewonnenen Knochen ausgespült, bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und diese in steril gefiltertes IMD Zellmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA), versetzt mit 10% FCS (fetales Kälberserum), 0,002% Monothioglycerat, 1% Penicillin/Streptomycin und 10ng/ml IL-3, überführt. Durch Mediumwechsel alle 2 Tage und Zugabe von 10ng/ml IL-3 wurde aus einer Zellsuspension myelotischer Vorläuferzellen eine Mastzell-Suspension herangezogen. So konnte nach einer Inkubationsphase von 28 Tagen bei konstanten 37°C und einem Kohlendioxidgehalt von 5% eine zu über 95% reine Mastzellmonokultur gewonnen werden, welche im Folgenden verwendet wurde.

#### 2.4.2. Gewinnung peritonealer Mastzellen (PMCs)

Peritoneale Mastzellen (PMCs) wurden mittels peritonealer Lavage aus mindestens 12 Wochen alten, weiblichen *Kit+/+* - Mäusen, vorzugsweise ehemaligen Zuchtweibchen, gewonnen. Nach Tötung durch zervikale Dislokation in Isofluran-Narkose wurde den Tieren der Bauchbereich mit 70% Ethanol desinfiziert und die Haut des Bauches samt Muskeldecke eröffnet, ohne das Peritoneum parietale zu verletzen. Mittels einer 10ml Spritze und 26G Kanüle wurden 5ml Natriumchlorid (NaCl) und 5ml Luft zum Expandieren des Bauchraumes in die Bauchhöhle gespritzt. Mit gleichmäßigen Bewegungen über 5 Minuten wurden peritoneale Zellen aus der Bauchwand herausgelöst. Mittels einer 20G Kanüle wurde der Inhalt der Bauchhöhle in ein 50ml Falcon Röhrchen transferiert und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde bei 1000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die Zellen im Anschluss in FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 2mM EDTA) zu resuspendieren und der MZ-Separation zuzuführen.

#### 2.4.3. Magnetische Zellseparation (MACS)

Um die durch die peritoneale Lavage gewonnene Zellsuspension weiter aufzureinigen, wurde diese der magnetischen Zell Separation, auch Magnetic Activated Cell Sorting oder MACS genannt, unterzogen. Die gewonnenen Zellen aus 5 Mäusen wurden in 160µl FACS-Puffer aufgenommen und mittels eines 30µm Nylonnetzes filtriert um eventuelle Zellagglomerationen aufzulösen. Während der positiven Selektion wurden die MZ über CD117 mit Microbeads, an welche Eisenoxid gekoppelt war, markiert und im Anschluss wurden diese markierten Zellen mittels einer magnetischen Säule, entsprechend des mitgelieferten Standardprotokolles der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), von den anderen Zellen separiert. Alle verwendeten Utensilien entstammen der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Es wurden die Säulen der Art „LS“ verwendet, in Kombination mit dem Midi MACS Magnet (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

#### 2.4.4. Kultivierung der PCMCs

Im Anschluss an die magnetische Zellseparation wurden die nun aufgereinigten PMCs in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI Zellmedium der Firma Biochrom (Berlin, Deutschland) aufgenommen. Dieses wurde zuvor mit folgenden Substanzen versetzt und anschließend steril filtriert: 10% FCS, 0,002% Monothioglycerat, 1% Penicillin/Streptomycin. IL-3 (10ng/ml) und SCF (30ng/ml) waren von nun an dem Kulturmedium immer frisch

zuzugeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%. An Tag 2 wurde der Suspension 5ml RPMI Medium, inklusive SCF und IL-3, hinzugefügt. Das komplette Medium wurde an Tag 5 gewechselt. Hierzu wurde die Zellsuspension bei 1000rpm und Raumtemperatur 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Konzentration 5x10<sup>5</sup> PMC/ml in neuem Kulturmedium aufgenommen. SCF und IL-3 wurden entsprechend zugegeben. Am 8. Tag wurde noch einmal etwa 50% Zellmedium mit SCF und IL-3 hinzugefügt. Ab Tag 11 standen die peritonealen kultivierten Mastzellen (PCMCs), nach erneuter Begutachtung unter dem Mikroskop, Zählen in der Neubauer-Zählkammer (Anfärben mittels 10µl Kimura-Färbung auf 10µl Zellsuspension) und FACS-Analyse für Experimente in einer Reinheit von 95% zur Verfügung.

#### 2.4.5. FACS-Analyse

Um den Reinheitsgrad der Mastzellpopulation zu überprüfen bzw. zu objektivieren, wurde ein Aliquot der kultivierten PCMCs zunächst für 10 Minuten bei 300g zentrifugiert und anschließend in 2ml FACS-Puffer resuspendiert, um im weiteren Verlauf in spezielle FACS-Röhrchen (Eppendorf Hamburg, Deutschland) aufgenommen zu werden. Diese galt es bei 1200rpm und 4°C für 6 Minuten zu zentrifugieren. Nach dem Zentrifugieren in 100µl FACS-Puffer resuspendiert, wurden 6µl der Antikörperlösung hinzugefügt und die Suspension für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Hinzufügen eines weiteren Milliliters FACS-Puffer waren die Proben 6 Minuten lang mit 1200rpm bei 4°C zu zentrifugieren und abschließend in 500µl FACS-Puffer aufzunehmen. Folgende Antikörper wurden verwendet: für c-Kit (CD 117): Anti-Mouse CD117 (c-Kit) PE (eBioscience, Lot: E034734) aus der Ratte und für FcεRI: Anti-Mouse Fc epsilon Receptor I alpha (FceR1) FITC (eBioscience, Lot: E00731-1630) aus armenischem Hamster. DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma Aldrich) wurde zur Unterscheidung lebender und toter Zellen herangezogen. Alle Antikörper wurden gemäß des Protokolls von eBioscience mit FACS-Puffer verdünnt. Der FACS-Puffer bestand aus PBS, versetzt mit 1% FCS und 2mM EDTA. Alle FACS-Analysen wurden mit dem MACSQuant® Analyser von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt.

## 2.5. Anzucht der *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur

Zur Anzucht der *PA*-Kultur wurden dem ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*-Laborstamm, welcher bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, eine Spatelspitze zügig und steril entnommen. Der *PA*-Stock war ein Geschenk von Erich Gulbins, Universitätsklinikum Essen. Die entnommenen Bakterien wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf einer LB-Agarplatte inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese mit einem sterilen Spatel von der Oberfläche der Agarplatte geschabt und in 40ml des Flüssigmediums TSB (Tryptic soy broth, BD, Heidelberg, Deutschland) überführt. In einem 100ml Erlenmeyerkolben inkubierte die Suspension unter kontinuierlichem Schütteln bei 150rpm für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die gewünschte Bakterienkonzentration wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) der Bakteriensuspension mittels Eppendorf BioPhotometer (Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Berechnung der aktuellen Bakterienkonzentration erfolgte mit Hilfe der OD und der ermittelten Standard-Wachstumskurve für die verwendete *PA*-Kultur mittels folgender Formel:  $y = 8,2304 * x + 0,1465$ , wobei  $y$  die Anzahl der Bakterien (multipliziert mit  $10^8/\text{ml}$ ) und  $x$  die ermittelte OD darstellt. Das Abtöten erfolgte bei gewünschter Bakterienkonzentration durch 15-minütiges Erhitzen bei  $95^{\circ}\text{C}$ . Durch Ausstreichen der *PA*-Suspension auf LB-Agarplatten und anschließender Inkubation über 12 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde durch fehlende Koloniebildung der Tod der Bakterien bestätigt. Dieser so gewonnene Stock an totem *PA* wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

## 2.6. $\beta$ - Hexosaminidase-Assay

Zur Bestimmung der MZ-Degranulation auf verschiedene Stimuli hin, wurden auf Mikrotiterplatten (96 Well Platte mit V-Boden, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)  $10\mu\text{l}$  PCMCs ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Tyrodes Puffer) 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit  $10\mu\text{l}$  der folgenden Substanzen inkubiert: LPS (Lipopolysaccharid, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27316, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) in einer Konzentration von 500ng/ml, Flagellin (ein Protein des Flagellums, Enzo Life Science, Lörrach, Deutschland) in einer Konzentration von 100ng/ml, 3OC12-HSL (das Quorum sensing Signalmolekül N-3-Oxododecanoyl-L-Homoserin- Lakton, Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA) in einer Konzentration von ebenfalls 100ng/ml, sowie lebendem und totem *PA* in der MOI 10 (Multiplizität der Infektion von 10, d.h. 10x mehr Bakterien in Tyrodes gelöst als MZ). Als Positivkontrolle diente zum einen die Stimulation mit  $1\mu\text{M}$  Ionomycin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), zum anderen aber auch die Inkubation mit Tyrodes Puffer als Negativkontrolle, welcher folgender Zusammensetzung unterlag: 10ml 1M HEPES(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-



piperazinyl)-Ethansulfonsäure), 7,58g Natriumchlorid (NaCl), 0,37g Kaliumchlorid (KCl), 0,206g Kalziumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), 0,203g Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), 1,008 Glukose, und 1g Rinderserumalbumin (BSA), aufgefüllt auf 1 Liter mittels destilliertem Wasser. Nach Stimulation der Zellen wurden diese bei 1000rpm für 10 Minuten zentrifugiert und jeweils 15µl des Überstandes in die Vertiefungen einer 96 Well Mikrotiterplatte (Nunc Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) pipettiert. Die Pellets wurden mittels 15µl 0,5% Triton-X, in Tyrodes gelöst, lysiert. 35µl 4mM p-NAG (p- Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D- Glukoseaminidin), als Substrat der enzymatischen Umsetzung der β-Hexosaminidase fungierend, waren jedem Well der Überstände und Lysate zuzugeben, welches zuvor auf einen pH von 4,5 mittels 14,29g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 42,05g Zitronensäure, bezogen auf ein Volumen von 500ml, gepuffert wurde. Nach 40 Minuten Inkubation bei 37°C fungierten 150µl 0,2M Glycin, mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) auf pH 7,5 titriert, als Stop-Lösung. Die Messung der Absorption erfolgte bei 405nm mittels MRX Microplate Reader von Dynatech Laboratories (El Paso, USA). Mittels Bestimmung der β-Hexosaminidase-Aktivität im Überstand der stimulierten Zellen und im Lysat der gleichen PCMCs ließ sich die Freisetzung prozentual zum β-Hexosaminidase-Gesamtgehalt der Zellen mit folgender Formel ermitteln: Degranulation  $\hat{=}$  β-Hexosaminidase- Aktivität = (β-Hexosaminidase-Aktivität Überstand) / (β-Hexosaminidase-Aktivität Überstand + β-Hexosaminidase-Aktivität Lysat).

## **2.7. Bestimmung der bakteriellen Überlebensrate**

In einer Konzentration von  $6 \times 10^6$ /ml wurden PCMCs in 1ml RPMI-1640 Medium, versetzt mit 25mM HEPES, ohne FCS oder Antibiotika, resuspendiert und für 3 Stunden bei 37°C mit PA in einer MOI von 1 bzw. 10 (MOI 1:  $6 \times 10^6$ /ml und MOI 10:  $6 \times 10^7$ /ml) auf einer 96 Well Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kokultiviert. Die Anzucht des *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte zuvor in der gewünschten Konzentration. Als Kontrolle des Bakterienwachstums diente ein lediglich mit PBS kokultivierter Teil der PA-Population. Anschließend waren sowohl die Mastzell-Bakterien-Suspensionen, als auch die Bakterien-PBS-Kontrollen seriell verdünnt auf LB-Agarplatten aufzubringen und bei 37°C zu inkubieren. Nach 12 Stunden wurden die Kolonien ausgezählt. Die bakterielle Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil der Kontrollgruppe von PA angegeben, welche nicht mit MZ, sondern lediglich mit PBS zu genau den gleichen Bedingungen inkubiert wurden.

## 2.8. Cytospin

Zur Vorbehandlung der BMCMCs und PCMCs diente Tyrode-Puffer (siehe 2.6.  $\beta$ -Hexosaminidase-Assay) als Waschpuffer, wobei die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml nach zweimaligem Waschen mit Tyrodes in mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  versehenem PBS resuspendiert wurden. Zum Zentrifugieren von Zellen auf Objektträger bedarf es einer speziellen Zentrifugationsvorrichtung mit 1,5ml Mikroreaktionsgefäßen (Frötek, Osterode, Deutschland), welche ein Loch im Boden besitzen. Dieses Loch endet auf einem Objektträger, wobei dieses wiederum von einem Filter begrenzt wird. 50 $\mu$ l der Zellsuspension waren in jedes Zentrifugationsröhrchen zu geben und 7 Minuten bei 45g mit der Megafuge 1.0R von Hareus zu zentrifugieren. Anschließend war die Ummantelung zu entfernen und der Objektträger wurde luftgetrocknet. Die Fixierung direkt vor dem Färbevorgang erfolgte durch kurzes Eintauchen in auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühltes Aceton. Zum Färben der Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin bzw. Giemsa waren 100 $\mu$ l der Färbelösung als Tropfen zu applizieren. Im Anschluss an die 30-minütige Inkubation im Dunkeln erfolgte das zweimalige Waschen mit Tyrodes-Puffer, bevor die Objektträger an der Luft trocknen und fotografiert werden konnten.

## 2.9. Quantitative Realtime- PCR (q-RT-PCR)

### 2.9.1. Primer

Nach ausgiebiger Literaturrecherche wurden die mRNA-Sequenzen der potenziell von MZ exprimierten antimikrobiellen Peptide und Proteasen über die NCBI-Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) identifiziert. Anschließend wurden komplementäre Primersequenzen designt und von der TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH hergestellt. Die hier aufgeführten antimikrobiellen Peptide mit folgenden RNA-Sequenzen waren zu testen:

**Tabelle 6** Primersequenzen

antimikrobielles Peptid / Protease	Hersteller	Primer-Sequenz	
		Forward-Primer	Reverse-Primer
Angiogenin	TIB Molbiol	CTCTAGCTTCACACTGCAGGAC	CCATCTCTTCCAACAGAGATTCA
$\beta$ -Actin	TIB Molbiol	CCGTGAAAAGATGACCCAGAT	CTCAGCTGTGGTGGTGAAGC
BPI	TIB Molbiol	CGCTGGCCATTTCGCTCCAGCG CT	TCTTGGCATGGTAAGAAGGAA
Calgranulin A	Invitrogen	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT	TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT

Cathepsin G	TIB Molbiol	TCGGGAGTGGTTCAGAC	ACGGTTCTGGAAAGATGCAG
CCL20	Invitrogen	AACTGGGTGAAAAGGGCTGT	GTCCAATTCATCCCAAAA
Chromogranin B	TIB Molbiol	CCTCTCAAATGCCCTATCCA	CACCTTTGACCTCTTTTCCACT
Chymase-1	TIB Molbiol	ATCTGCTGCTCCTTCTCCTG	ACTCCGTGCCTCCAATGA
CPA-3	TIB Molbiol	GCTATTAATTCCTTATGGCTAC ACATT	GTGGCAATCCTTGCAACTTT
CRAMP	Invitrogen	GCCGCTGATTCTTTTGACAT	AATCTCTCCCCACCTTTGC
Cryptidin/ Defensin A	TIB Molbiol	AATTTTCGGAGGGTTTTGG	TGAAGAGACTAAAAGTGAAGGAGC A
CXCL-9	TIB Molbiol	TGGGGAATGCATTTTACCAT	CTTTTCTCTTGGGCATCAT
CXCL-10	TIB Molbiol	GCTGCCGTCATTTTCTGC	TCTCACTGGCCCGTCATC
CXCL-11	TIB Molbiol	CCATTCTTCAGGGTGGCTAT	GCTGCTGAGATGAACAGGAA
Cystatin M/E	TIB Molbiol	CTTCTTCAGCTCGACGCGACG	CCAAAGTCATCATCGATGCAAAA
Endothelin-1	TIB Molbiol	CTGCTGTTCTGTGACTTTCCA	TCTGCACTCCATTCTCAGCTC
Granzym A	TIB Molbiol	GGCCATCTCTTGCTACTCTCC	CGTGTCTCTCCAATGATTCT
Granzym B	TIB Molbiol	AGCATAACCAGATCTCTCAACG AT	GCTGCTCACTGTGAAGGAAGT
Lactoferrin	TIB Molbiol	TGCTTTCTATGTCCAAAGTCAG G	GGGCAAGTGCGGTTTAGTT
LPB	TIB Molbiol	CCATTGCTTTTGGAGGATTT	ACCTCTGACCTGCAGCCTTA
mBD14	TIB Molbiol	AACATGCATGACCAATGGAG	TCATCTTGCTGGTTCTTCATCT
MCPT-1	TIB Molbiol	CAGCGAGAGGTCGAGTTTG	GCACTTCTCTTGCCCTTCTGG
MCPT-4	TIB Molbiol	GCACTTCTCTTGCCCTTCTGG	ATGTAAGGGCGAGAATGTGG
MCPT-8	TIB Molbiol	TCTCGGCTCCAATGATCT	GGATGTTCTGCTCCTGGT
MCPT-9	TIB Molbiol	TAAGGACGGGAGTGTGGTCT	TGGCACTTCTCTTGCCCTTCT
OprL	TIB Molbiol	TCTCCCACGAGCCTGTTCT	ATGGAAATGCTGAAATTCGGC
Platelet factor 4	TIB Molbiol	TCTGGGATCCATCTTAAGCAC	CCATTCTTCAGGGTGGCTAT
Plunc	Invitrogen	ATCCCAGGAAGGAAGGCTAT	CAAGAGGCAGGAGACTGAGC
POMC	TIB Molbiol	GCATCGTGCATTCTTATCA	AGTGCCAGGACCTCACCA
S100A7	Invitrogen	GCCTCGCTTCATGGACAC	CGGAACAGCTCTGTGATGTAGT
SLPI	Invitrogen	ACGGTGCTCCTTGCTCTG	GGCTCCGATTTTGATAGCAT
Tryptase $\alpha/\beta$ 1	TIB Molbiol	TCCTCACTGTGTCCAAATGC	CCTTCTCGTGTGATAGCTGGA

Die in Pulverform gelieferten Forward- und Reverse-Primer wurden in insgesamt 50µl destilliertem Wasser aufgenommen. Dies stellte den Primer-Stock (100µM) dar. Für die Experimente galt es diese, 1:10 mit destilliertem Wasser auf 10µM verdünnt, zu jeweils 20µl in Eppendorf Röhrchen zu aliquotieren. Um die Wirkungsweise der einzelnen Primer zu optimieren, wurde für diese mittels Test-PCRs die jeweils individuelle  $Mg^{2+}$ -Konzentration über die Zugabe von  $MgCl_2$  (25mM) ermittelt.

### 2.9.2. Stimulation der PCMCs

$6 \times 10^5$  PCMC/ml wurden bei 37°C und 5%  $CO_2$  mit totem *PA* in einer MOI von 10 über einen Zeitraum von 4 bzw. 24 Stunden auf einer 24 Well Cellstar Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) kokultiviert. Als Kontrollen wurden die PCMCs zusätzlich mit LPS in einer Konzentration von 500ng/ml und mit PBS stimuliert. Tote *PA* wurden wie in 2.5. Anzucht der *Pseudomonas aeruginosa*-Kultur beschrieben, gewonnen. Nach abgelaufener Inkubationszeit galt es die PCMCs bei 300g 10 Minuten lang zu zentrifugieren. Der Überstand samt Bakterien wurde aspiriert, verworfen und die Zellen der RNA-Isolation zugeführt.

### 2.9.3. RNA-Isolierung

Zellpellets wurden in 600µl RLT- Puffer der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande), welches mit 10µl  $\beta$ -ME ( $\beta$ -Mercaptoethanol) pro 1ml RLT-Puffer versetzt wurde, resuspendiert, damit lysiert und anschließend in 1ml Eppendorf Röhrchen (Hamburg, Deutschland) überführt. Der Effekt des Lysierens wurde durch mehrmaliges hin- und herziehen in einer 26G Kanüle zusätzlich forciert. Dem Protokoll des RNeasy Kits von Qiagen (Venlo, Niederlande) folgend, wurden weiterhin 70% Ethanol, RWS (Qiagen, Venlo, Niederlande), RPE (Qiagen, Venlo, Niederlande), sowie die mitgelieferten RNeasy Spin Columns und Sammelröhrchen (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet. Nach vollzogener Isolierung wurde die gewonnene RNA in einem 1,5ml Sammelröhrchen in 30µl sterilem Wasser der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) eluiert.

#### 2.9.4. Reinheit und Konzentrationsbestimmung der RNA

Um die Reinheit der gewonnenen mRNA zu überprüfen, sowie deren Kontamination mit Proteinen auszuschließen, erfolgte die photometrische Bestimmung der OD mittels Eppendorf BioPhotometer (Hamburg, Deutschland), wobei die RNA-Suspension für die Messung mit RNase-freiem Wasser auf 1:50 zu verdünnen war. Nach dem Vortexen der 50µl Nukleinsäuresuspension erfolgte die Absorptionsmessung in einer UV- transparenten Kunststoff-Küvette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260nm. Zusätzlich wurden die Absorptionsmaxima bei 280nm ermittelt, um den Grad der Verunreinigung mit Proteinen mittels des Quotienten E260/E280 zu evaluieren. Als weitere Methode der Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden RNA-Proben mit dem Spektrophotometer Nanodrop 1000 (Waltham, USA) untersucht. Entsprechend ihres RNA-Gehaltes und unabhängig der Messmethode, wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche Konzentration von 1µg/ml verdünnt und bei -80°C weggefroren.

#### 2.9.5. Umschreiben in cDNA

Entsprechend dem für das Umschreiben von mRNA in cDNA verwendeten Quantitec Reverse Transcription Kits der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) wurden alle Nukleinsäuren dauerhaft auf Eis gekühlt. Die Reagenzien wurden so gewählt, dass genau 1µg RNA in cDNA umgeschrieben wurde. Somit wurde die spätere Vergleichbarkeit der quantitativen RNA-Expression gewährleistet. Um eventuelle DNA-Spuren in der RNA-Lösung zu entfernen, wurde diese, mit RNase-freiem Wasser der Konzentration entsprechend verdünnt, für 2 Minuten bei 42°C mit gDNA Wipeout Puffer (2µl) inkubiert. Im Anschluss wurde die gereinigte RNA-Suspension (14µl) mit der Quantiscript Reverse Transkriptase (1µl), dem Quantiscript RT Puffer (4µl) und dem RT Primermix (1µl) für weitere 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Um die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase, und damit die Reaktion zu beenden, wurde der Mix für 3 Minuten bei 92°C inaktiviert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C weggefroren.

### 2.9.6. Ablauf PCR mit LightCycler

Zu den 2µl der umgeschriebenen cDNA wurden 3µl eines Mastermixes, bestehend aus insgesamt 0,5µl Reverse- und Forward-Primer (jeweils 10µM), 0,5µl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green der Firma Roche (Basel, Schweiz), destilliertem Wasser und 0-0,8µl der vorher individuell bestimmten Magnesiumkonzentration, in 20µl LightCycler Kapillare (Roche, Basel, Schweiz) pipettiert. Diese wurden zu jedem Zeitpunkt durch einen auf 4°C gekühlten Eisenblock auf Temperatur gehalten. Die Glaskapillare wurden mit Deckkappen verschlossen, für 30 Sekunden bei 300rpm zentrifugiert und in den LightCycler 1,5 (Roche, Basel, Schweiz) überführt. Alle Arbeiten fanden mit Einmalhandschuhen, unter Zuhilfenahme einer Pinzette oder Pipette und in der Sterilbank statt, um Verunreinigungen der Mastzell-cDNA zu vermeiden. Die Temperaturen und Inkubationszeiten waren wie folgt gewählt:

**Tabelle 7** Ablauf PCR

	<b>Zieltemperatur (in °C)</b>	<b>Inkubationszeit (in min)</b>
Denaturation	95	10
Amplifikation	94	15
	60	30
	72	10
Schmelzkurve	95	0
	65	10
	95	0
Abkühlen	40	30

Bei jeder PCR wurde  $\beta$ -Actin als Housekeeping Gen zu gleichen Bedingungen für jeden Primer verfolgt und zusätzlich destilliertes Wasser, anstelle der Mastzell-DNA, getestet, um DNA-Verunreinigungen des Primermixes oder des Mastermixes zu detektieren. Die Schmelzkurven wurden zur Qualitätssicherung der PCR berücksichtigt.

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels relativer Quantifizierung auf der Grundlage des  $\beta$ -Actins als Housekeeping Gen, womit sich über folgende Formeln das Verhältnis stimulierter zu unstimulierter Probe (Ratio) bestimmen ließ:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{stimuliert}) - \Delta\text{Ct}(\text{unstimuliert})$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{Zielgen}) - \text{Ct}(\text{Housekeeping Gen}).$$

Der Ct-Wert (Cycle Theshold) beschreibt dabei den Zyklus der PCR, an welchem die Fluoreszenz erstmals signifikant ansteigt.

## 2.10 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der Resultate dieser Arbeit erfolgte nach folgender Methodik:

Berechnung des Mittelwertes  $M$  :

$$M = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$n$  – Anzahl der Messwerte

$x_i$  – Wert des Messwertes  $i$

Standardabweichung  $SD$  des Mittelwertes :

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}$$

Standardfehler  $SEM$  des Mittelwertes :

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Alle Datensätze wurden mittels zweiseitigem Student *t*-Test für unverbundene Stichproben auf Signifikanz analysiert:

Berechnung des *t* -Wertes:

$$t = \frac{(M_1 - M_2)}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}}$$

$M_1$  : Mittelwert der Stichprobe 1

$M_2$  : Mittelwert der Stichprobe 2

$SD_1$  Standardabweichung der Mittelwerte der Population 1

$SD_2$  Standardabweichung der Mittelwerte der Population 2

$n_1$  Anzahl der Messwerte der Stichprobe 1

$n_2$  Anzahl der Messwerte der Stichprobe 2

Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (probability value, [p]) von  $p < 0,005$  wurde als hoch signifikant (\*\*\*),  $p < 0,01$  als deutlich signifikant (\*\*),  $p < 0,05$  als signifikant (\*) und  $p > 0,05$  als nicht signifikant angesehen. Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SE dargestellt. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe der Computersoftware Statview (Statview für Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Der Wundheilungsverlauf in MZ-defizienten $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen nach Infektion mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist verzögert

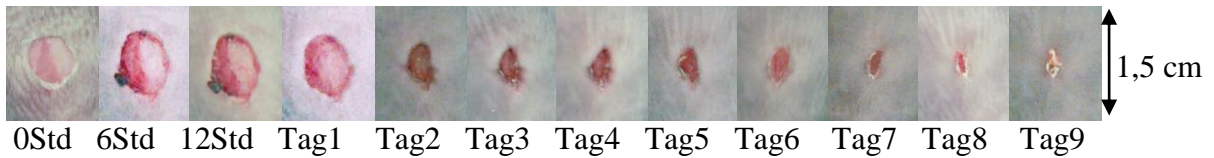
*In-vivo*-Experimente zeigten, dass der Wundheilungsverlauf in Abwesenheit von MZ deutlich verzögert ist. Die Versuchstiere wurden anästhesiert und anschließend am Rücken rasiert. Mittels einer Biopsie-Stanze wurde jedem Tier eine 6mm Wunde im kaudalen Rückenbereich gesetzt und diese anschließend mit  $6,5 \times 10^5$  PA/10 $\mu$ l infiziert.

In **Abbildung 1a und 1b** sind mit PA infizierte MZ-defiziente  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse ( $Kit^W/Kit^{W-v}$  (PA)), identisch infizierte Wildtyp-Mäuse ( $Kit^{+/+}$  (PA)), sowie nicht infizierte Kontrolltiere im visuellen Vergleich dargestellt. Die infizierten und nicht infizierten Wildtyp-  $Kit^{+/+}$ -Mäuse (**Abbildung 1a**) zeigen einen nahezu identischen, normalen Wundheilungsverlauf. Zwischen infizierten und nicht infizierten Versuchstieren lässt sich kein Unterschied ermitteln. Vergleicht man jedoch die infizierten und nicht infizierten MZ-defizienten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse (**Abbildung 1b**), so ist deutlich die verzögerte Wundheilung der infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse zu erkennen. Auffällig ist der absolute Größenunterschied der Wunden an Tag 3 und 4. Desweiteren ist bei infizierten  $Kit^{+/+}$ - und den Kontrolltieren an Tag 9 ein nahezu vollständiger Wundschluss zu erkennen. Dies ist bei den infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen nicht der Fall.

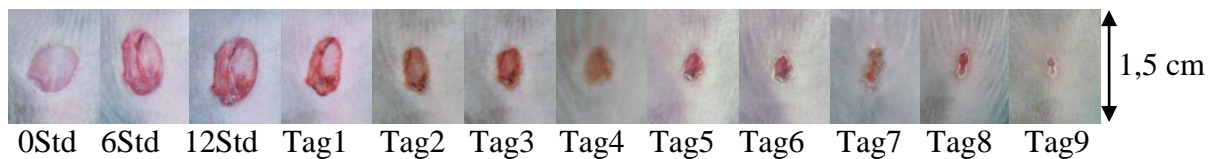
Die in **Abbildung 2** dargestellte Kinetik verdeutlicht den verlangsamten Wundheilungsverlauf der infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse, vergleichend aufgetragen zu den infizierten Wildtyp-Mäusen und den entsprechenden nicht infizierten Kontrolltieren. Innerhalb der ersten 24 Stunden erweiterten sich die Wunden der  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse maximal auf durchschnittlich  $159,1\% \pm 9,5$  SEM der initialen Wundflächen, die der anderen Tiere vergrößerten sich lediglich auf  $129,7\% \pm 4,9$  SEM bis  $132,6\% \pm 13,8$  SEM. Die Maximalausdehnung der Wunden war während der ersten 24 Stunden zu verzeichnen, danach granulierten alle Wunden kontinuierlich zu, wobei zwischen Tag 1 und Tag 2 der größte Fortschritt in der Heilung zu beobachten war. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies eine Verringerung der Wundfläche von  $132,1\% \pm 13,6$  SEM auf  $87,0\% \pm 6,4$  SEM bei den infizierten  $Kit^{+/+}$ - Mäusen,  $114,9\% \pm 4,9$  SEM auf  $79,1\% \pm 10,3$  SEM bei nicht infizierten  $Kit^{+/+}$ - Mäusen und  $132,6\% \pm 13,8$  SEM auf  $85,7\% \pm 9,9$  SEM bei nicht infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen. Die Wundflächen der infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse verkleinerten sich lediglich von  $154,2\% \pm 11,3$  SEM auf  $145,0\% \pm 14,5$  SEM. Evaluiert man die Wundgrößen der verschiedenen Gruppen in direktem Vergleich zu einem spezifischen Zeitpunkt, so lässt sich der größte Größenunterschied zwischen Tag 3 und 4 beobachten. Die Wundflächen der infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse lagen dabei bei  $112,4\% \pm 14,1$  SEM (Tag 3) bzw.  $107,2\% \pm 17,2$  SEM (Tag 4) der initialen Wunden, wobei die der anderen Gruppen auf  $38,7\% \pm 3,5$  SEM bis  $55,1\% \pm 5,5$  SEM (Tag 3) bzw.  $35,4\% \pm 3,6$  SEM bis  $48,8\% \pm 3,4$  SEM (Tag 4) sanken. Die Wundflächendifferenz zwischen infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen und infizierten Wildtypmäusen war an Tag 3 mit Signifikanzwerten von  $p= 0,0077$  und an Tag 4 mit  $p= 0,011$  als deutlich signifikant bzw. signifikant vergrößert anzusehen. Von diesem Zeitpunkt an erfolgte die Wundheilung bei allen Gruppen kontinuierlich und weitestgehend parallel, bis hin zum nahezu völligen Wundschluss der nicht infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse und der  $Kit^{+/+}$ - Tiere. Die Wundfläche der infizierten MZ-defizienten Mäuse lag im Vergleich zu denen der  $Kit^{+/+}$ - Tiere und der nicht infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse nach 9 Tagen noch immer bei durchschnittlich  $34,6\% \pm 8,4$  SEM.

### Abbildung 1a

*Kit*<sup>+/+</sup> (nicht infiziert)

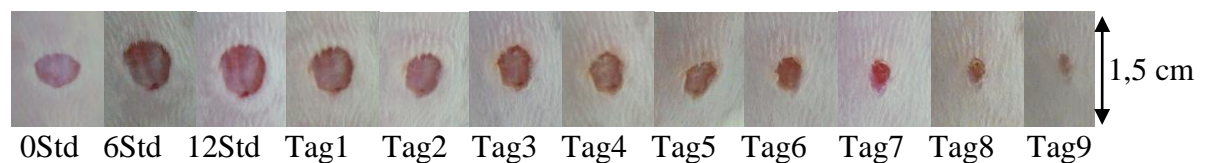


*Kit*<sup>+/+</sup> (infiziert)

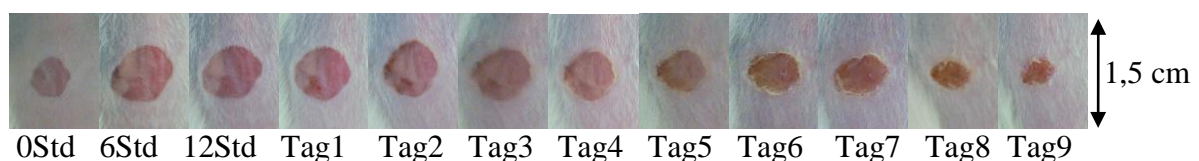


### Abbildung 1b

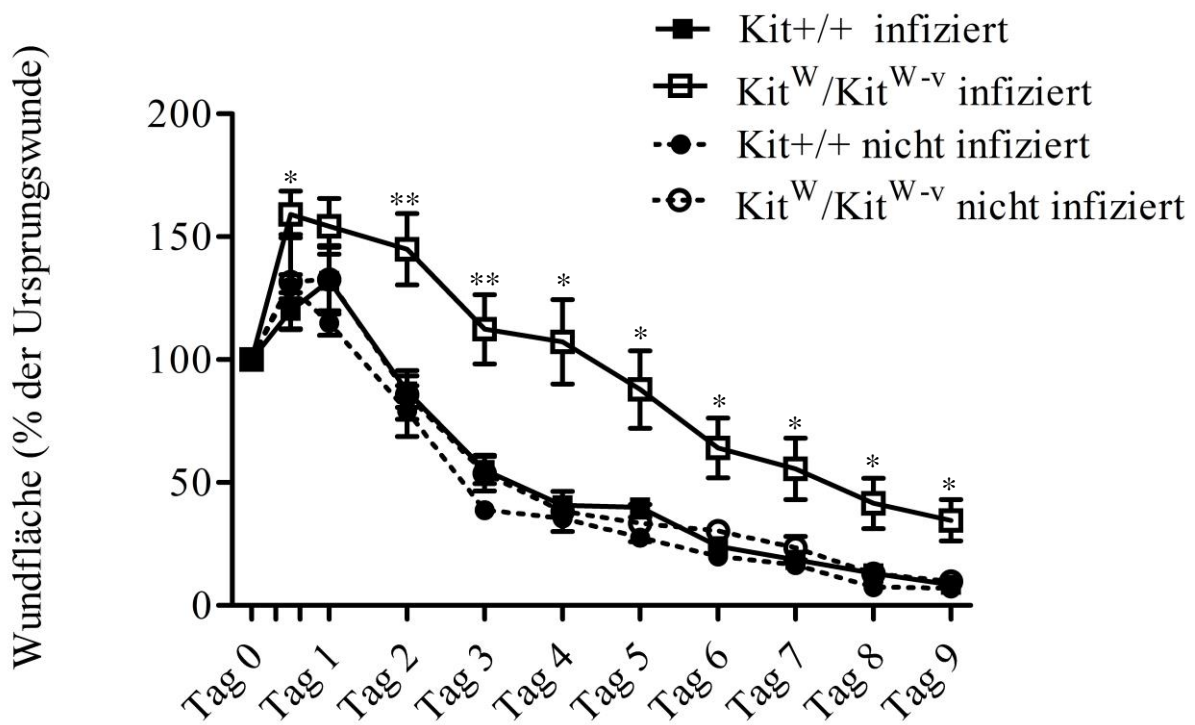
*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> (nicht infiziert)



*Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> (infiziert)



**Abbildung 1 a/b:** Die Wundfläche der mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten MZ-defizienten Mäuse ist vergrößert. Diesen Wunden wurden mit 10µl einer *Pseudomonas aeruginosa*-Suspension (PA) in der Konzentration  $6,5 \times 10^5$  PA/10µl oder mit 10µl PBS als Negativkontrolle infiziert und in den beschriebenen Zeitintervallen fotografiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder des Wundschlusses jeweils eines Tieres zu festgelegten Zeitpunkten bei identischer Skalierung von 1,5cm. **Abbildung 1a** Wildtyp *Kit*<sup>+/+</sup>- Mäuse, **Abbildung 1b** MZ-defiziente *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>- Mäuse.



**Abbildung 2: Der Wundheilungsverlauf von mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Wunden ist in MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen verzögert.** Infizierten *Kit+/+*- Mäusen (n=9), infizierten MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen (n=6), sowie den entsprechenden Kontrollen (n=10 bzw. n=6) wurden individuell Wunden im kaudalen Rückenbereich zugeführt, deren Heilung dokumentiert wurde. Dargestellt ist der Wundheilungsverlauf über 9 Tage, aufgetragen als prozentuale Wundfläche der an Tag 0 gestanzten Wunden. Die Daten sind aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefasst, mit n=6-10 Tieren pro Gruppe und angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.005$  (Student's t-test).

### 3.2. Die normale Wundheilung *Pseudomonas aeruginosa* infizierter Wunden ist Mastzell-abhängig

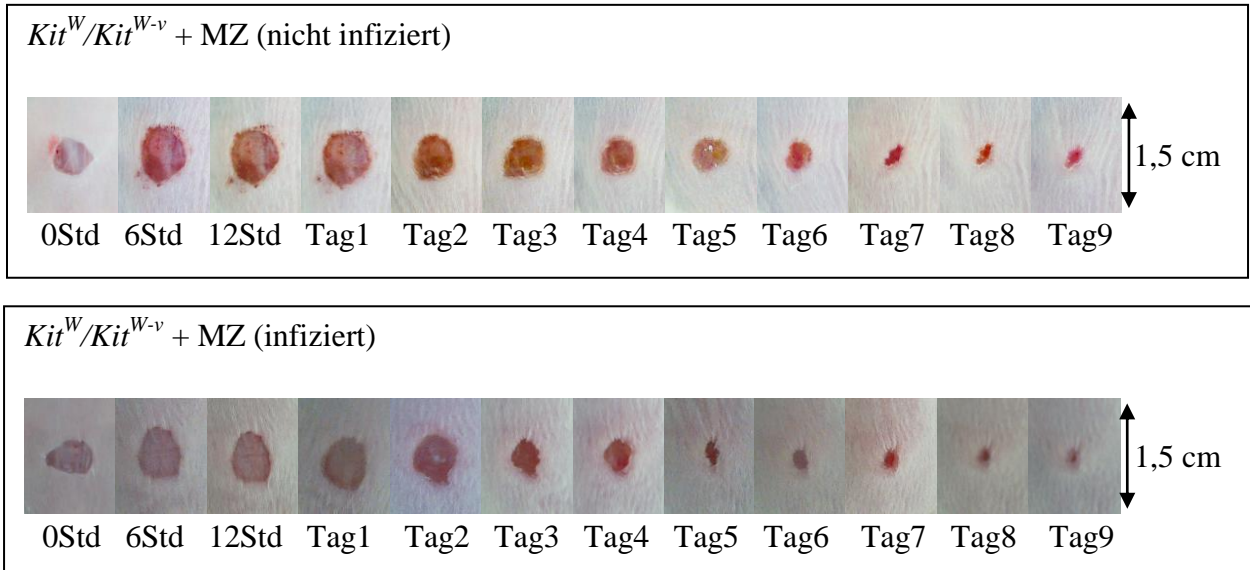
Um den Beweis zu führen, dass die verzögerte Wundheilung bei mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Wunden auf die Abwesenheit von Mastzellen zurückzuführen ist, wurden MZ-defiziente  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse mit BMCMCs intrakutan am späteren Ort der Wundsetzung rekonstituiert ( $Kit^W/Kit^{W-v}$  + MZ). Die verwendeten MZ wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-Tieren gewonnen, *in vitro* differenziert und in einer Reinheit von über 90% verwendet. Dargestellt wird die Reinheit der Population in den Histogrammen der FACS-Blots der zur Rekonstitution verwendeten BMCMCs (**Abbildungen 14a** und **14b**), wobei diese auf die Expression des Fcε-Rezeptors I und c-Kit-Rezeptors hin gefärbt wurden.

Folgend wurden die Wunden dieser Tiere, sowie jene der  $Kit^{+/-}$  Wildtyp-Mäuse und der MZ-defizienten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse mit  $6,5 \times 10^5$  PA/10µl infiziert und zusätzlich fungierten mit 10µl PBS behandelte, rekonstituierte  $Kit^W/Kit^{W-v}$  + BMCMC- Mäuse als Kontrolle.

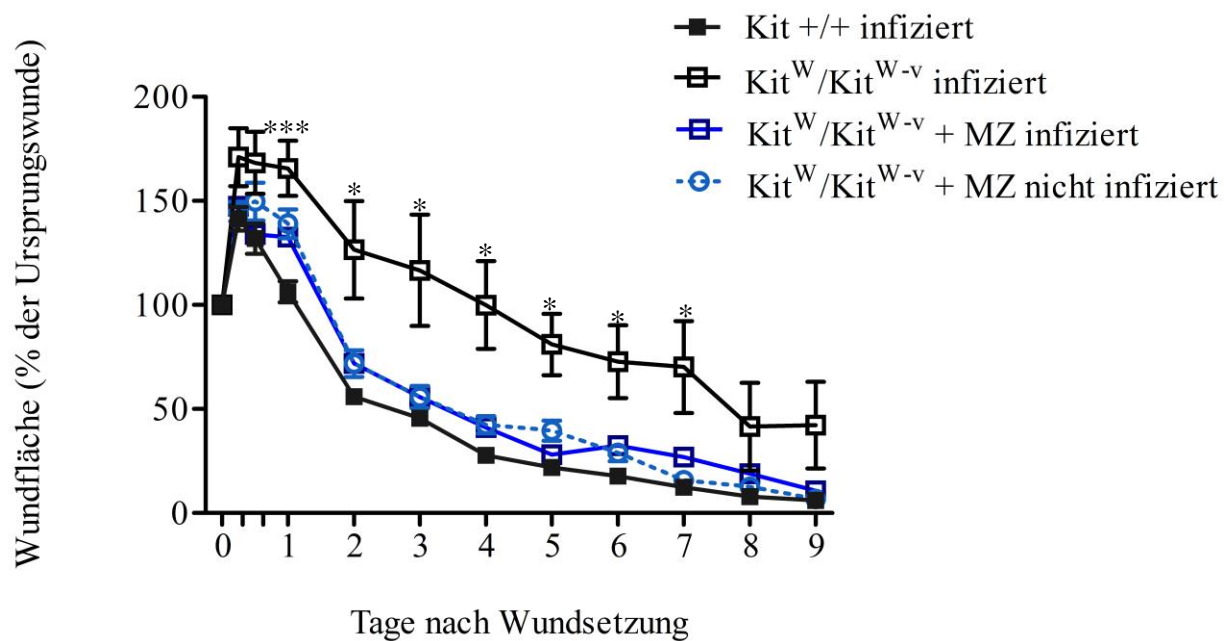
Die in **Abbildung 3** dargestellten rekonstituierten, MZ-defizienten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäuse weisen, im Vergleich zu den infizierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Tieren, wieder die ursprüngliche, beschleunigte Wundheilungstendenz der Wildtyp-Tiere auf. Der verzögerte Wundschluss, wie zuvor in den MZ-defizienten Mäusen beobachtet, konnte mittels Rekonstitution wieder auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse gebracht werden. Dies ist mittels repräsentativer Bilder jeweils eines Tieres im Wundheilungsverlauf dargelegt.

In **Abbildung 4** ist gezeigt, dass die infizierten, rekonstituierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$  + MZ- Mäuse, im Gegensatz zu den nicht rekonstituierten, infizierten MZ-defizienten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen, eine normale Wundheilung aufweisen. Die normale Wundheilung entspricht der Wundheilung der infizierten Wildtyp-Mäuse, sowie der mit PBS behandelten, rekonstituierten  $Kit^W/Kit^{W-v}$  + MZ-Mäuse. Somit ist gezeigt, dass die ungestörte Wundheilung von mit PA infizierten Wunden MZ-abhängig ist, da bei identischem Genotyp ( $Kit^W/Kit^{W-v}$ ) die applizierten und in das Gewebe migrierten MZ den Unterschied der Wundheilung bedingen.

**Abbildung 3**



**Abbildung 3: MZ-rekonstituierte *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse zeigen nach Infektion mit *PA* einen normalen Wundheilungsverlauf.** Die gesetzten Wunden MZ-defizienter, mit MZ rekonstituierter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse wurden mit *Pseudomonas aeruginosa* oder mit PBS als Negativkontrolle behandelt und in den beschriebenen Zeitintervallen fotografiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder des Wundschlusses jeweils eines Tieres zu festgelegten Zeitpunkten bei identischer Skalierung von 1,5cm.



**Abbildung 4: Mastzellen kontrollieren die Wundheilung der mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Wunden.** Die Wunden infizierter *Kit*<sup>+/+</sup> Mäuse (n=9), infizierter *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> Mäuse (n=6), rekonstituierter und infizierter *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> + MZ -Mäuse (n=10), sowie nicht infizierter Kontrolltiere (n=10) wurden mit *Pseudomonas aeruginosa* oder mit PBS, als Negativkontrolle, behandelt. Dargestellt ist der Wundheilungsverlauf über 9 Tage, aufgetragen als prozentuale Wundfläche der an Tag 0 gestanzten Wunden. Die Daten sind aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und angegeben ist der Mittelwert ± SEM; \*=*p*<0.05, \*\*=*p*<0.01, \*\*\*=*p*<0.005 (Student's t-test).

### 3.3. Histologische Bestätigung der erfolgreichen Rekonstitution MZ-defizienter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* - Mäuse mit BMCMCs

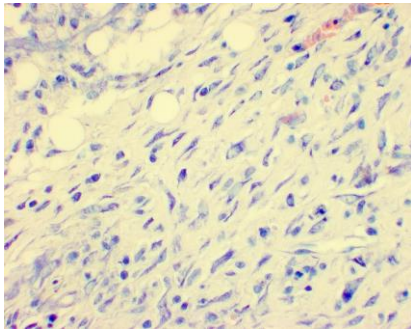
Das Ziel der Rekonstitution war es, MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen funktionsfähige MZ in den Ort der späteren Wundsetzung zu verbringen, um die MZ-Zahl damit lokal in den Zustand der *Kit<sup>+/+</sup>*- Wildtyp-Mäuse zu überführen. Um die erfolgreiche Rekonstitution zu bestätigen, wurden von allen Tieren Hautstanzen entnommen, welche in Paraffin eingebettet, auf 5µm geschnitten und Giemsa gefärbt wurden. Zum einen ist die erfolgreiche Rekonstitution mittels repräsentativer Bilder in den **Abbildungen 5a-c** dargestellt. So zeigt **Abbildung 5b** das Gewebe rekonstituierter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse, in welcher MZ bei 400-facher Vergrößerung in der Haut der ursprünglich MZ-defizienten Tiere zu sehen sind. **Abbildung 5a** stellt die MZ-defiziente Kontrolle der *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Tiere dar, wobei **Abbildung 5c** den Wildtyp repräsentiert.

Zum anderen wurden die MZ jedes Tieres im histologischen Schnitt im Blickfeld bei 200facher Vergrößerung ausgezählt, gepoolt und graphisch dargestellt, womit sich die erfolgreiche MZ-Rekonstitution numerisch belegen lässt (**Abbildung 6**). In MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen waren dabei  $0,41 \pm 0,26$  SEM MZ/Blickfeld, in rekonstituierten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* + MZ- Mäusen  $10,24 \pm 2,37$  SEM MZ/Blickfeld und in *Kit<sup>+/+</sup>*- Wildtyp-Mäusen waren  $31,37$  MZ/Blickfeld  $\pm 1,13$  SEM zu zählen.



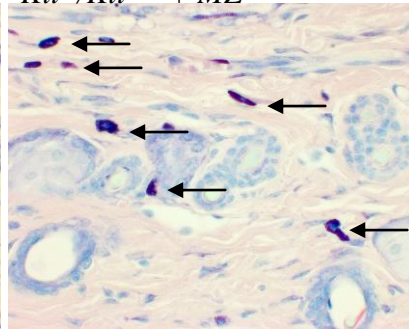
**Abbildung 5a**

*Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*



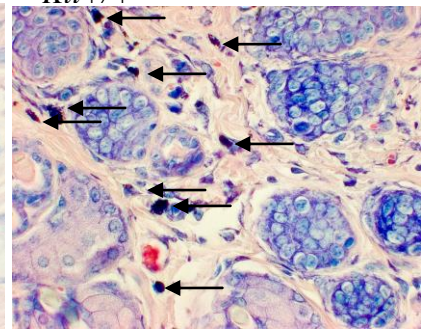
**Abbildung 5b**

*Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup> + MZ*

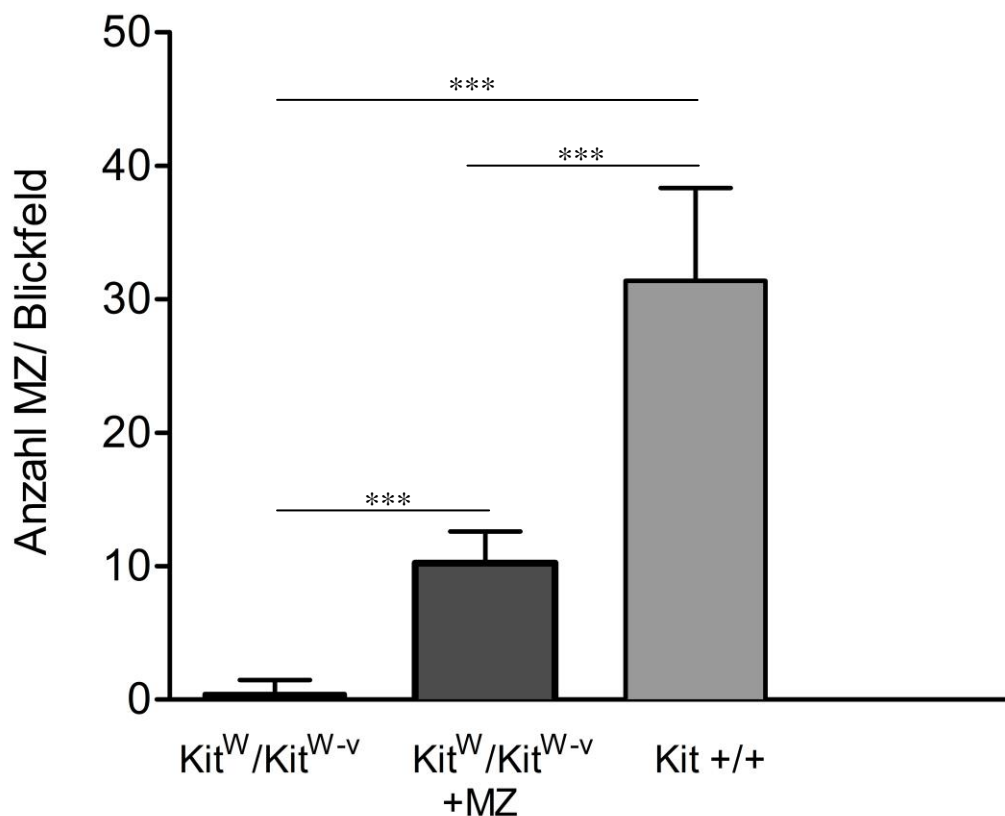


**Abbildung 5c**

*Kit+/+*



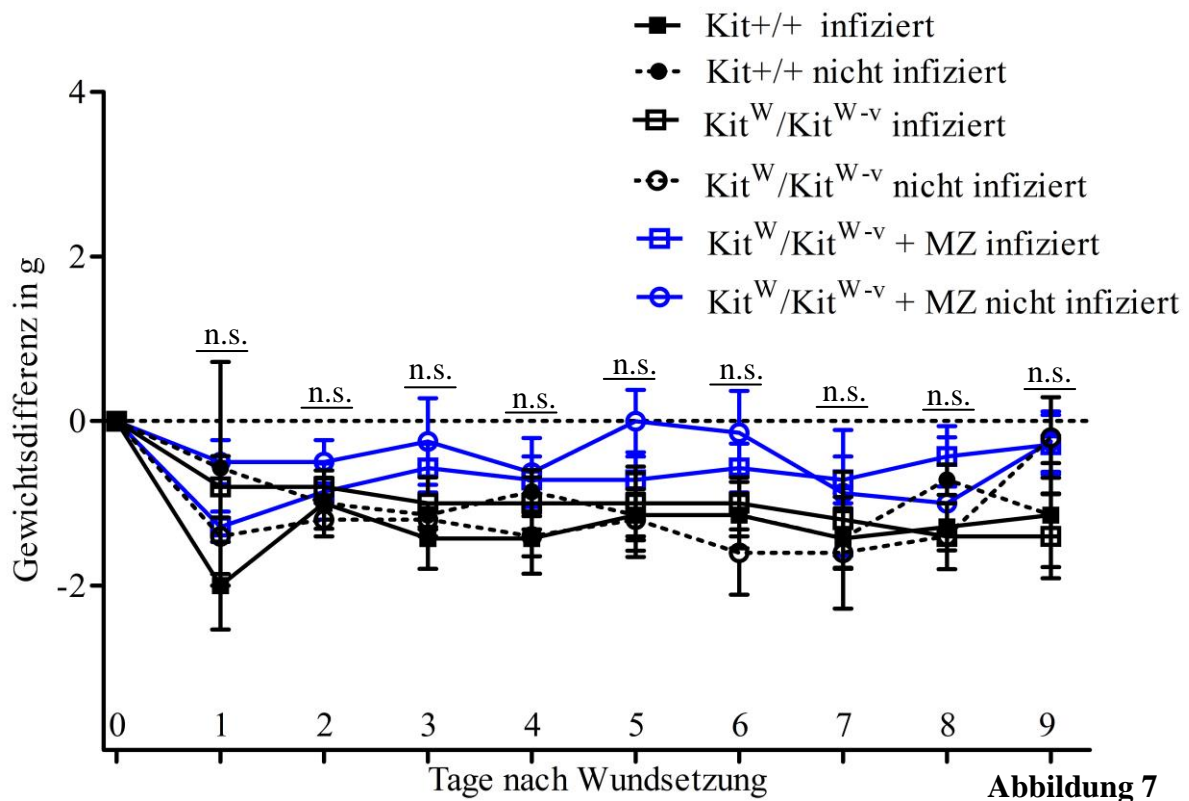
**Abbildung 5a-c: Histologischer Nachweis der erfolgreichen MZ-Rekonstitution.** In den Giemsa gefärbten Schnitten der an Tag 9 der Wundheilung biopsierten Hautstanzen sind in 400facher Vergrößerung deutlich die prominent hervortretenden MZ (Pfeile) im Gewebe zu erkennen. **Abbildung 5a** zeigt einen 5µm- Gewebsschnitt einer *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Maus, welche praktisch frei von MZ ist, wobei **Abbildung 5b** das Gewebe einer rekonstituierten, ursprünglich MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* - Maus repräsentiert. In **Abbildung 5c** sind Mastzellen in der Biopsie einer Wildtyp- *Kit+/+* - Maus dargestellt. Alle Aufnahmen entstammen einem Blickfeld identischer Größe, welches an den jeweiligen Wundrand grenzt.

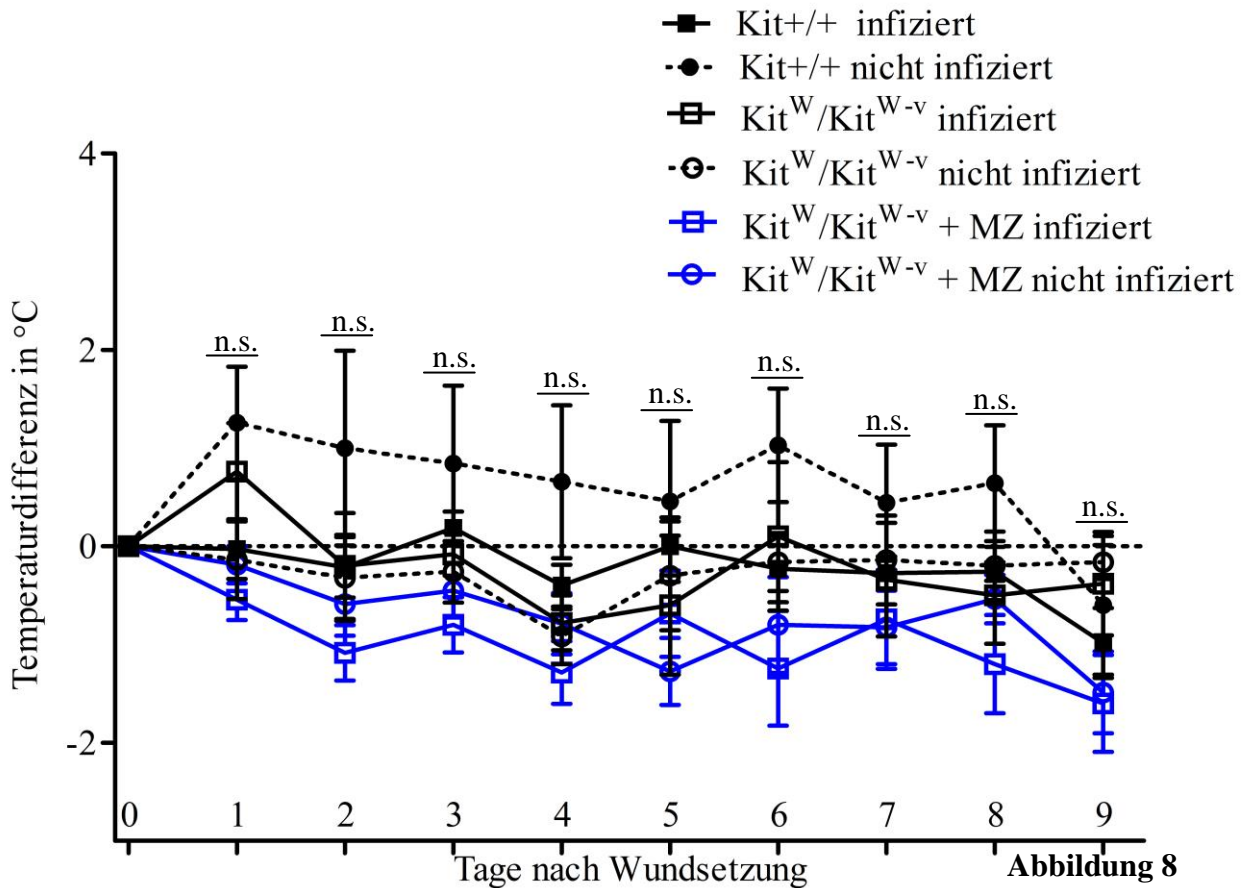


**Abbildung 6: Numerischer Nachweis der MZ-Rekonstitution vergleichend in  $Kit^W/Kit^{W-v}$ ,  $Kit^W/Kit^{W-v} + MZ$ , sowie  $Kit+/+$  Mäusen.** Die an Tag 9 der Wundheilung gewonnenen Wundbiopsien wurden in Paraffin eingebettet, auf 5µm geschnitten und Giemsa gefärbt. Folgend wurden die sich in einem Blickfeld bei 200facher Vergrößerung befindenden MZ ausgezählt und innerhalb der Gruppen  $Kit^W/Kit^{W-v}$ ,  $Kit^W/Kit^{W-v} + MZ$ , sowie  $Kit+/+$  aufgetragen. Die Daten sind aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefasst, mit jeweils n=19 Tieren pro Gruppe und angegeben ist der Mittelwert ± SEM; \*\*\*=p<0.005 (Student's t-test).

### 3.4. Tiere mit PA-infizierten Wunden zeigen keine systemischen Infektionszeichen

Um auszuschließen, dass die verminderte Wundheilungstendenz von mit PA infizierten, MZ-defizienten  $Kit^W/Kit^{W-v}$ - Mäusen durch eine allgemeine Schwächung oder eine sich ausbreitende Infektion der Tiere hervorgerufen ist, wurde täglich die Körpertemperatur und das Körpergewicht bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf nicht zu einem signifikanten Anstieg oder Abfall der Körpertemperatur (**Abbildung 7**) kam, wobei dieser Parameter als eines der determinierenden Zeichen einer systemischen Infektion oder potentiellen Sepsis gewertet wurde. Ebenso gab es keinerlei Auffälligkeiten bezüglich einer möglichen Gewichtsveränderung der Tiere (**Abbildung 8**).



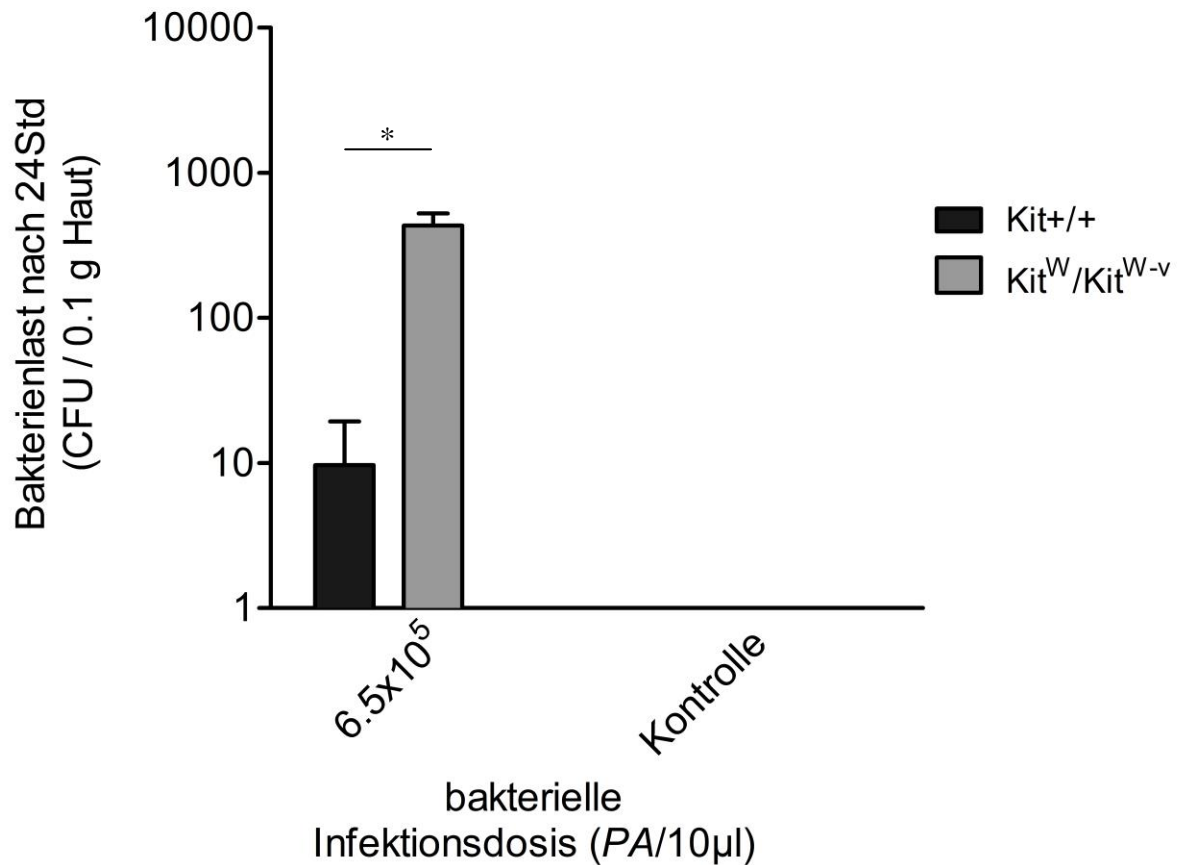


**Abbildung 7/8: Körpergewicht und Körpertemperatur infizierter und nicht-infizierter Mäuse.** Dargestellt ist die Kinetik der über 9 Tage ermittelten Gewichts- bzw. Temperatur-Differenz (Referenz: Tag 0) infizierter *Kit*<sup>+/+</sup>- Mäuse (n=7), infizierter *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup>- Mäuse (n=5) und infizierter rekonstituierter *Kit*<sup>W</sup>/*Kit*<sup>W-v</sup> + MZ- Mäuse (n=7), sowie deren mit PBS behandelten Kontrollen (entsprechend der Reihenfolge: n=7, n=5, n=8). Diese weisen unabhängig des Genotyps oder des Infektionstatus keine signifikanten Unterschiede auf. Die Daten sind aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefasst, angegeben als Mittelwert ± SEM; n.s. = nicht signifikant (Student's t-test).

### 3.5. MZ verringern die Bakterienlast *Pseudomonas aeruginosa* infizierter Wunden

Um der Frage nachzugehen, ob die verzögerte Wundheilungstendenz der mit *PA* infizierten MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse mit einer entsprechend höheren bakteriellen Belastung der Wunden korreliert ist, wurden sowohl die Wunden dieser Tiere, als auch die als Kontrolle fungierenden Wildtyp- *Kit+/+-* Mäuse nach 24 Stunden geerntet und die bakterielle Last bestimmt. Die verbliebene Bakterienlast der Wunden MZ-defizienter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse ist im Vergleich zu Wunden der *Kit+/+-* Wildtyp- Mäuse signifikant erhöht.

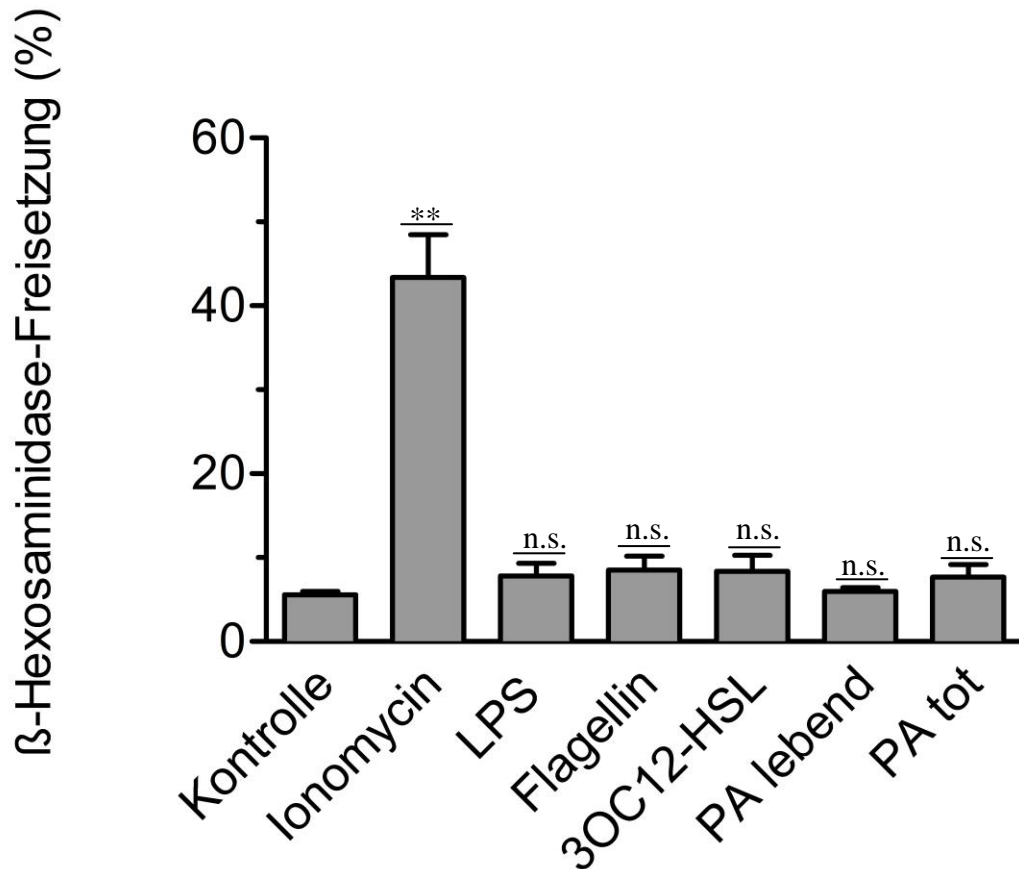
In **Abbildung 9** ist deutlich zu erkennen, dass die bakterielle Belastung der *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Wunden (432,3 CFU/0,1g Haut  $\pm$  93,4 SEM) im Vergleich zu den Wunden der Wildtyp-Mäuse (9,7 CFU/0,1g Haut  $\pm$  16,7 SEM) unter identischen Bedingungen um ein über 40faches erhöht ist ( $p=0,0137$ ). Eine Kontamination der Wunden der Tiere durch eigene oder ungewollt fremdübertragene Bakterien kann gleichsam ausgeschlossen werden, da die Ausstriche der Kontrollmäuse keinerlei bakterielle Belastungen aufweisen. Diese Kontrollexperimente sind von herausragender Bedeutung, da durch den Ausschluss einer Kontamination der Wunden mit andersartigen Keimen davon ausgegangen werden kann, dass die letztendlich beobachteten Effekte im Experiment auch reell als Resultat einer *PA*-Infektion zu verstehen sind und diese nicht ein zufällig, aufgrund einer Verschmutzung, generiertes Ergebnis darstellen.



**Abbildung 9: Die Bakterienlast der Wunden MZ-defizienter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* - Mäuse ist im Vergleich zu Wildtyp- Mäusen erhöht.** *Kit+/+* - Mäusen (n=3) und MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>* - Mäusen (n=3) wurden nach Protokoll Wunden gesetzt, welche infiziert und anschließend geerntet wurden. Nach Applikation der Wund-PBS-Suspension auf LB-Agarplatten und entsprechender Inkubation, wurden die koloniebildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Dargestellt sind die *PA*-CFU pro 0,1g Haut. Die Resultate entstammen einem Experiment mit n=3 Tieren pro Gruppe und angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM; \*=p<0.05 (Student's t-test).

### **3.6. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und dessen Bestandteile führen nicht zur Degranulation kultivierter, peritonealer Mastzellen (PCMCs)**

Um einen Mechanismus zu ergründen, wie MZ die bakterielle Elimination bewirken und um somit die verzögerte Wundheilung erklären zu können, wurde die Degranulation von PCMCs auf diverse Stimuli hin untersucht. Bekannt ist, dass während der Degranulation von MZ verschiedenste Chemokine, Zytokine, Entzündungsmediatoren und Proteasen, wie beispielsweise Chymasen, Trypsasen, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  etc. ausgeschüttet werden, worüber mittels ihrer direkt bakteriziden oder indirekt immunmodulierenden Eigenschaften die Überlebensrate von Bakterien gesenkt werden kann (Echtenacher et al., 1996; Galli and Tsai, 2010; Maurer et al., 1998; Metz and Maurer, 2009). Untersucht wurde die Degranulation von PCMCs mittels  $\beta$ -Hexosaminidase-Freisetzung nach Stimulation über 30 Minuten mit den Stimuli: toter und lebendiger *PA*, *PA* ATCC 2731 Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin und Quorum Sensing Molekül 3OC12-HSL (**Abbildung 10**). Die spontane Freisetzung aus den Mastzellen (Kontrolle) lag bei  $5,6\% \pm 0,4$  SEM, wo hingegen die maximale Aktivierung durch  $1\mu\text{M}$  Ionomycin eine Degranulation von  $43,4\% \pm 5,1$  SEM der Granula zur Folge hatte. Die Stimulation der PCMCs mit  $500\text{ng/ml}$  LPS ( $7,8\% \pm 1,5$  SEM Degranulation),  $100\text{ng/ml}$  Flagellin ( $8,5\% \pm 1,7$  SEM Degranulation) und  $100\text{ng/ml}$  3OC12-HSL ( $8,4\% \pm 1,9$  SEM Degranulation), sowie mit totem *PA* ( $6,0\% \pm 1,5$  SEM Degranulation) und lebendigem *PA* ( $7,7\% \pm 1,5$  SEM Degranulation) bewirkte keine signifikante Degranulation der PCMCs.

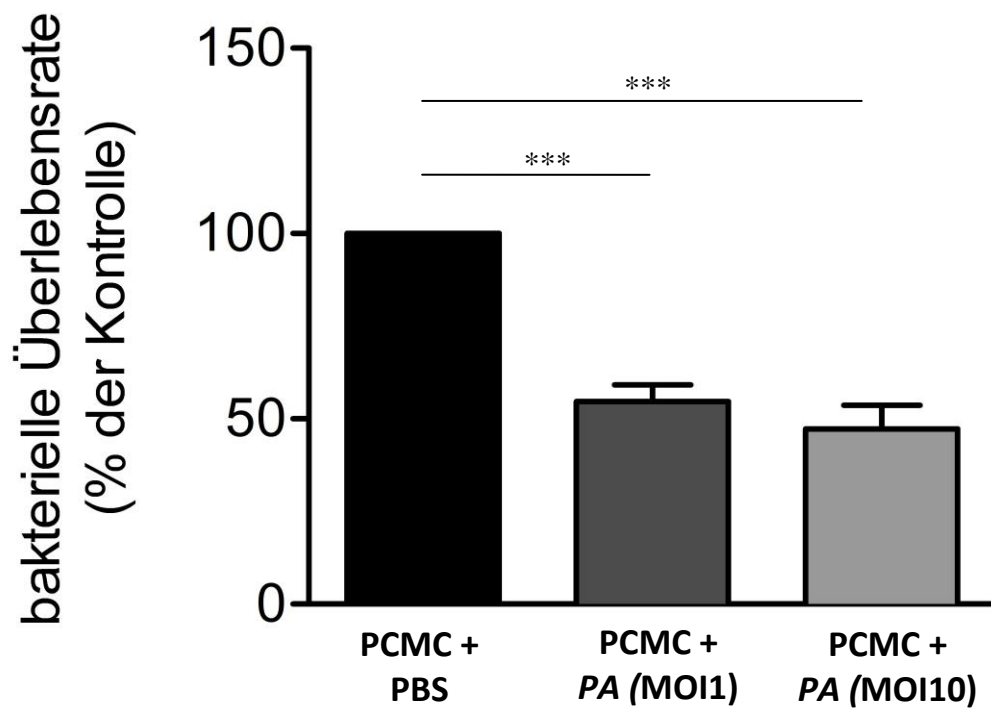


**Abbildung 10: Mastzellstimulation durch *Pseudomonas aeruginosa* und dessen Bestandteile LPS, Flagellin und 3OC12-HSL.** Kultivierte, peritoneale MZ (PCMCs) wurden für 30 Minuten mit dem PA ATCC 2731-Lipopolysaccharid (LPS, 500ng/ml), Flagellin (100ng/ml), dem Quorum Sensing Molekül 3OC12-HSL (100ng/ml), PA lebend (MOI 10), PA tot (MOI 10), sowie mit Ionomycin (1µM) und PBS stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale β-Hexosaminidase-Freisetzung und somit die Degranulation der PCMCs nach entsprechender Stimulation. Die Daten sind aus 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und angegeben als Mittelwert ± SEM; \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.005$ , n.s.= nicht signifikant (Student's t-test).



### 3.7. MZ vermindern die Überlebensrate des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* in Kokultur

Da bereits gezeigt wurde, dass Mastzellen *in vivo* die verbliebene Bakterienlast deutlich senken, galt es weiterführend den direkten Einfluss von MZ auf *Pseudomonas aeruginosa* unter isolierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen. Dazu wurden PCMCs mit dem Bakterium in der MOI 1 und der MOI 10 für 3 Stunden kokultiviert, um anschließend die Anzahl der überlebenden *PA*-Kolonien zu bestimmen und diese in das Verhältnis zum alleinigen *PA*-Wachstum (als 100%  $\pm$  0 SEM zur Referenz genommen, Kontrolle) zu setzen. Dabei zeigte sich eine stark verminderte Überlebensrate des Bakteriums, sowohl in der MOI 1 (Überlebensrate: 54,7%  $\pm$  4,5 SEM), als auch in der MOI 10 (Überlebensrate: 47,3%  $\pm$  6,4 SEM), womit gezeigt werden konnte, dass MZ auch *in vitro* die Überlebensfähigkeit von *Pseudomonas aeruginosa* negativ beeinflussen (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11: MZ senken die Überlebensrate von *Pseudomonas aeruginosa* in Kokultur.** Peritoneale, kultivierte MZ (PCMCs) wurden nach Protokoll mit *PA* (MOI 1 bzw. MOI 10) und PBS, als Kontrolle, kokultiviert. Seriell verdünnt wurden die Suspensionen auf LB-Agarplatten aufgetragen, inkubiert und die Kolonien wurden ausgezählt. Dargestellt ist die bakterielle Überlebensrate als prozentualer Anteil der lediglich mit PBS inkubierten *PA*-Kontrollgruppe. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten und angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM; \*\*\*= $p < 0.005$  (Student's t-test).

### 3.8. Nachweis der Expression einer Auswahl durch MZ sezernierter antimikrobieller Peptide und Proteasen nach Stimulation mit LPS und PA

Da Mastzellen, wie gezeigt, auf den Stimulus *PA* hin nicht degranulieren, sie die Überlebensrate des Bakteriums jedoch direkt beeinflussen, wurde folgend untersucht, inwiefern MZ antimikrobielle Peptide und Proteasen exprimieren, um den Mechanismus der bakteriellen Abwehr näher zu explorieren. Dabei wurde die mRNA-Expression von in der Literatur beschriebenden Proteasen und Peptiden mittels quantitativer Realtime-PCR (q-RT-PCR) bestimmt, nachdem die Zellen mit LPS oder *PA* 4 Stunden stimuliert wurden. Die exprimierten und nicht exprimierten Substanzen sind in **Tabelle 8** gelistet, wobei  $\beta$ -Actin das Housekeeping-Gen darstellt.

**Tabelle 8** Expressionsverhalten antimikrobieller Peptide und Proteasen

Substanz	mRNA-Expression nach 4-stündiger Stimulation mit		keine mRNA-Expression
	LPS	PA	
$\beta$ -Actin	x	x	
BPI (Bactericidal permeability-increasing protein)			x
Calgranulin A	x	x	
Cathepsin G	x	x	
Chymase-1	x	x	
CPA-3	x	x	
CRAMP			x
Cryptidin/Defensin A			x
Granzym A			x
Granzym B	x	x	
Lactoferrin			x
LPB(Lipopolysaccharide-binding protein)			x

mBD14 (Mouse Beta-Defensin 14)			X
MCPT-1	X	X	
MCPT-4	X	X	
MCPT-8	X	X	
MCPT-9	X	X	
Proopiomelanocortin			X
SLPI (Antileukoproteinase)			X
Thymosin- $\beta$ 4	X	X	
Tryptase 1	X	X	
S100A7 (Psoriasin)			X

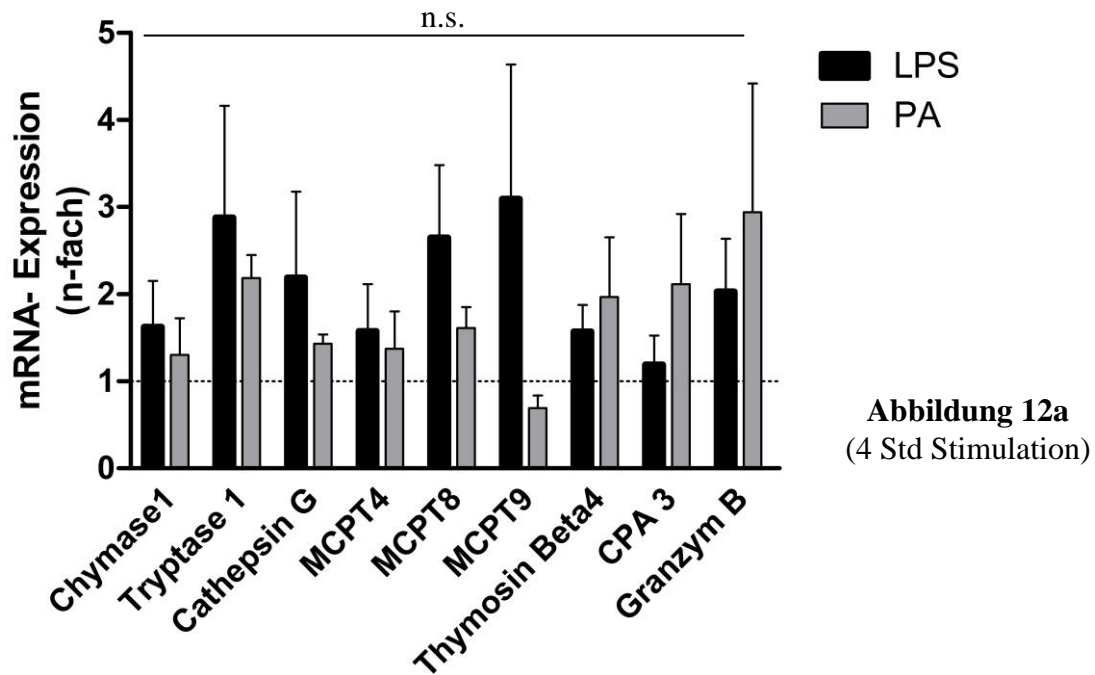
**Tabelle 8: Auflistung von PCMCs exprimierter bzw. nicht exprimierter antimikrobieller Peptide und Proteasen nach Stimulation mit LPS und PA.** Vor Durchführung der q- RT-PCR wurden  $6 \times 10^5$  PCMC/ml bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit totem PA in einer MOI von 10 über einen Zeitraum von 4 Stunden kokultiviert. Als Kontrollen wurden die PCMCs zusätzlich mit LPS (500ng/ml) und mit PBS behandelt. Aufgelistet sind die getesteten Substanzen (spezifische Primersequenzen siehe Methoden) und der Verweis auf die induzierte bzw. nicht induzierte mRNA-Expression nach Stimulation mit PA und LPS.

### **3.9. *Pseudomonas aeruginosa* und LPS verändern die Expression MZ-spezifischer Proteasen und antimikrobieller Peptide nach 4 und 24 Stunden Stimulation in geringem Umfang**

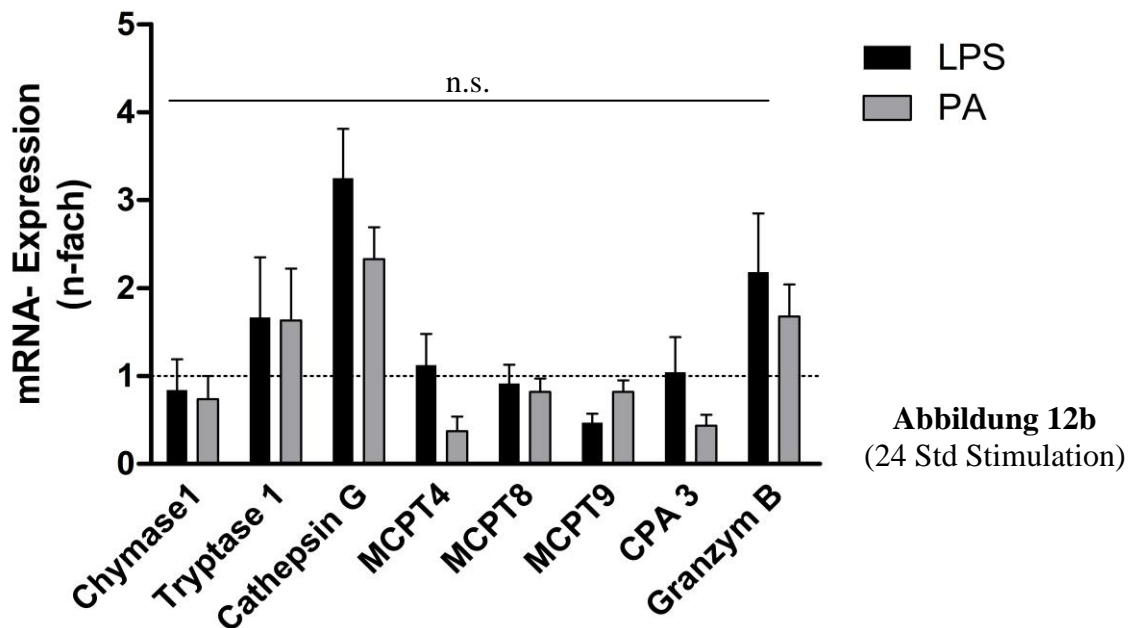
Um die veränderte Genexpression bestimmter antimikrobieller Peptide und Proteasen durch Mastzellen nach 4- bzw. 24-stündiger Stimulation auf die Stimuli LPS und PA hin zu untersuchen und damit einen Mechanismus der bakteriellen Eliminierung zu ergründen, wurde die mRNA-Expression dieser Peptide und Proteasen mittels q-RT-PCR untersucht. Nach 4 Stunden, in **Abbildung 12a** dargestellt, wurden eine Vielzahl der Peptide und Proteasen hochreguliert, wobei dies einem Wert  $>1$  entspricht, so beispielsweise geschehen mit Tryptase 1 unter LPS (2,9-fach  $\pm$  1,3 SEM) und PA (2,2-fach  $\pm$  0,3 SEM), Cathepsin G unter LPS (2,2-fach  $\pm$  1,0 SEM) und PA (1,4-fach  $\pm$  0,1 SEM), MCPT8 unter LPS (2,6-fach  $\pm$  0,8 SEM) und PA (1,6-fach  $\pm$  0,2 SEM), MCPT9 unter LPS (3,1-fach  $\pm$  1,5 SEM), sowie Granzym B unter LPS (2,0-fach  $\pm$  0,6 SEM) und unter PA (2,9-fach  $\pm$  1,5 SEM). Konträr dazu wurde die Expression von MCPT9 unter PA-Stimulation nach unten reguliert (0,7-fach  $\pm$  0,1 SEM). Eine Herunterregulation bestimmter Proteine und Proteasen wird durch Werte  $<1$  repräsentiert. Die meisten der restlichen getesteten Proteasen und antimikrobiellen Peptide blieben unter PA- bzw. LPS-Stimulation weitestgehend auf unverändertem Expressionslevel beziehungsweise war die Streuung der Werte zu hoch.

Nach 24 Stunden, in **Abbildung 12b** verdeutlicht, konnte die Hochregulierung von folgenden Proteasen gemessen werden: Tryptase 1 unter LPS (1,7fach  $\pm$  0,7 SEM) und PA (1,6fach  $\pm$  0,6 SEM), Cathepsin G unter LPS (3,3-fach  $\pm$  0,6 SEM) und PA (2,3-fach  $\pm$  0,4 SEM), sowie Granzym B unter LPS (2,2-fach  $\pm$  0,7 SEM) und unter PA (1,7fach  $\pm$  0,4 SEM). Die restlichen Proteasen und Peptide zeigten nach Stimulation über 24 Stunden eine unveränderte oder leicht nach unten regulierte Expression, wobei es hier ebenso die bedeutsame Streuung der Werte zu beachten gilt.

Alle Ergebnisse dieser Versuche sind lediglich als richtungsweisend zu werten, da die Signifikanzschwelle von  $p < 0,05$  nicht erreicht wurde. Der höchste Signifikanzwert wurde bei der Bestimmung der MCPT9-Expression nach 4-stündiger PA-Stimulation mit  $p = 0,0526$  erzielt.



**Abbildung 12a**  
(4 Std Stimulation)



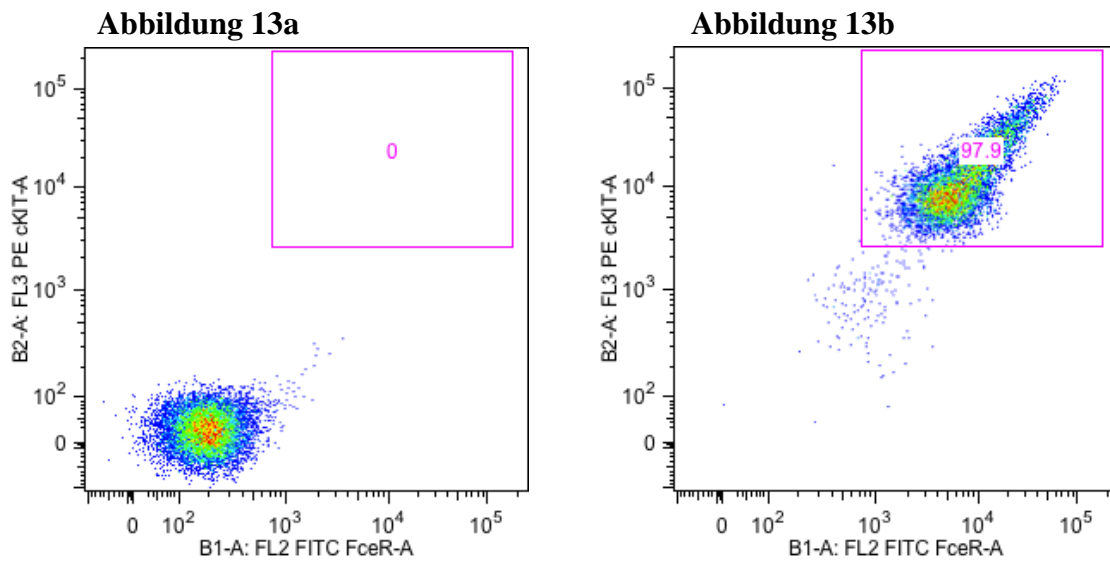
**Abbildung 12b**  
(24 Std Stimulation)

**Abbildung 12a/b: Veränderte mRNA-Expression MZ-spezifischer Proteasen und antimikrobieller Peptide infolge der PA- und LPS-Stimulation.** Die RNA zur Durchführung der quantitativen Realtime PCR wurde aus PCMCs gewonnen, welche nach Protokoll mit totem PA (MOI 10) über einen Zeitraum von 4 Stunden (**Abbildung 12a**) und 24 Stunden (**Abbildung 12b**) kokultiviert wurden. Als Kontrollen wurden die PCMCs zusätzlich mit LPS (500ng/ml) und PBS behandelt. Es wird die n-fache Hoch- bzw. Herunterregulation der mRNA-Expression nach 4- und 24-stündiger LPS- bzw. PA-Stimulation im Vergleich zur unstimulierten mRNA-Expression von PCMCs beschrieben. Die Daten sind aus 2 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM; n.s.= nicht signifikant (Student's t-test).

### 3.10. Kultivierte peritoneale Mastzellen als Modell für Hautmastzellen

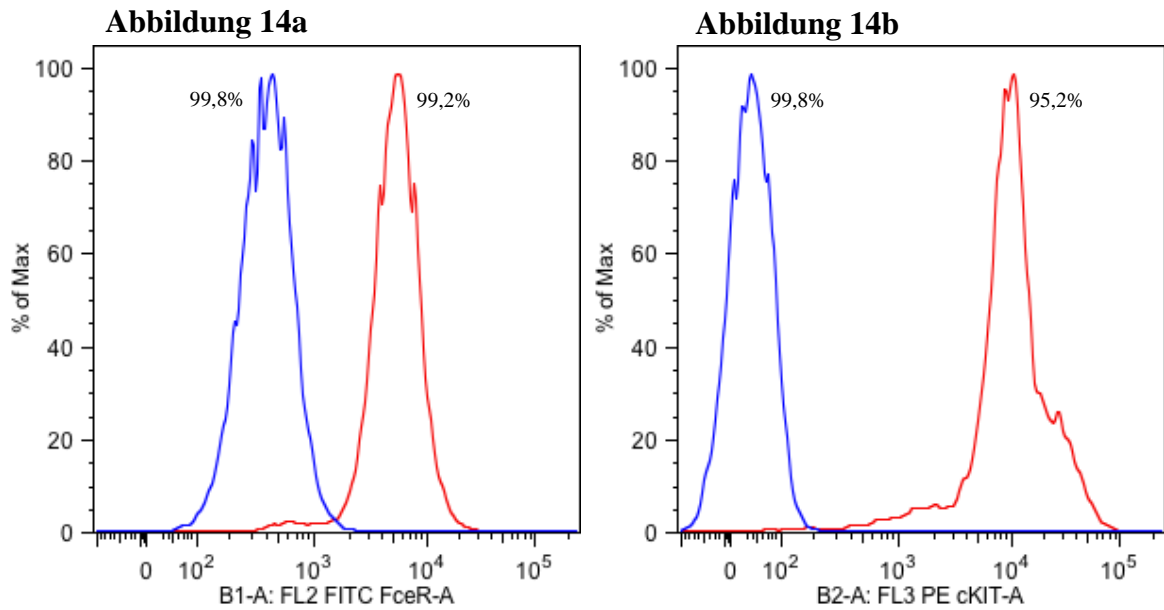
Die Entscheidung kultivierte peritoneale Mastzellen (PCMCs) als geeignetes Modell für Hautmastzellen zu verwenden, stützt sich zum einen auf deren sehr ähnliche Morphologie, zum anderen auf die phänotypischen und funktionellen Gemeinsamkeiten, welche bei den peritonealen MZ auch nach Kultivierung noch erhalten bleiben (Malbec et al., 2007). Um die Reinheit der PCMC-Population zu belegen, wurden diese, nach Aufreinigung und vor endgültiger Verwendung, auf ihren c-Kit-Rezeptor und FcεRezeptorI hin mittels Anti-Mouse-CD117-PE bzw. Anti-Mouse-Fcε-RezeptorI-α-FITC, sowie mit DAPI auf lebend/tot, gefärbt (**Abbildung 13b**). Dabei ist gezeigt, dass die PCMC-Population zu 97,9% doppelt positiv und dementsprechend rein ist. Die **Abbildung 13a** zeigt ergänzend einen FACS-Blot der gleichen, jedoch ungefärbten PCMCs. Wie zu erwarten verhält sich die ungefärbte MZ-Population zu 0% positiv, was als Kontrolle fungiert und Eigenfluoreszenz der Zellen ausschließen lässt. Die **Abbildungen 14a/14b** belegen indes die Reinheit der verwendeten BMCMC-Population. Es erfolgt die Darstellung des zu über 90% positiven Expressionsverhaltens des c-Kit-Rezeptors und des FcεRezeptorsI im FACS-Blot.

Die **Abbildungen 15a und 15b** präsentieren vergleichend jeweils eine mit Giemsa angefärbte, kultivierte peritoneale Mastzelle, sowie eine identisch gefärbte Hautmastzelle im Gewebe. Zu erkennen ist die sehr ähnliche Morphologie der beiden Zelltypen. Die Anfärbung der zytoplasmatischen Mastzellgranula mit Giemsa, möglich aufgrund der hohen Dichte saurer Proteoglykane, zeigt im Cytospin der PCMCs (**Abbildung 15a**) im Vergleich zu den im histologischen Schnitt dargestellten Hautmastzellen (**Abbildung 15b**) eine ebenfalls hohe Dichte von Granula, was zumindest nach morphologischen Kriterien für die Vergleichbarkeit der Zellpopulationen im Experiment spricht.



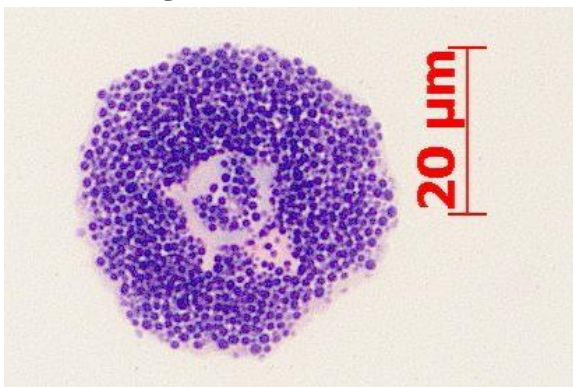
**Abbildung 13 a/b: FACS-Analyse der verwendeten PCMCs.** Um die Reinheit der Population darzulegen, wurden PCMCs auf ihren c-Kit- und FcεRI- Rezeptor hin, sowie auf lebend/tot, gefärbt. Dabei ist gezeigt, dass die PCMC-Population zu 97,9% doppelt positiv und dementsprechend rein ist (**Abbildung 13b**). In den FACS-Blots der **Abbildung 13a** sind ungefärbte PCMCs dargestellt, welche sich zu 0% positiv verhalten und somit beweisen, dass nur die verwendeten FACS-Antikörper die in **Abbildung 13b** gezeigten, spezifischen Signale auslösen.



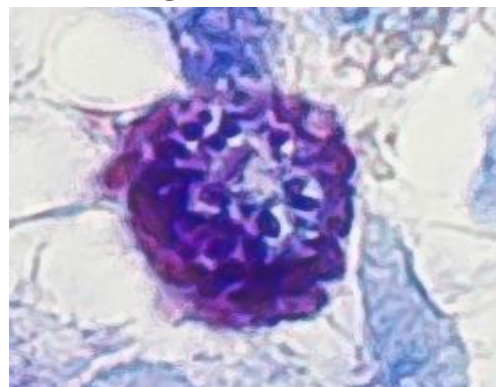


**Abbildung 14a/b: FACS-Analyse der verwendeten BMCMCs.** Um die Reinheit der Population darzulegen, wurden BMCMCs auf ihren c-Kit- und FcεRezeptorI hin gefärbt. Dabei ist mittels roter Peaks veranschaulicht, dass die BMCMCs zwischen 95,2% (c-Kit, **Abbildung 14a**) und 99,2% (FcεRI, **Abbildung 14b**) positiv sind. Die ungefärbten BMCMCs werden durch blaue Peaks repräsentiert.

**Abbildung 15a**



**Abbildung 15b**



**Abbildung 15a/b: PCMCs und Hautmastzellen im Gewebe zeigen morphologische Gemeinsamkeiten.** Dargestellt ist eine PCMC in 1000facher Vergrößerung mit entsprechender Skalierung (**Abbildung 15a**). Vergleichend dazu zeigt **Abbildung 15b** eine native Mastzelle der Haut im Gewebe, eingebettet in Paraffin im 5μm-Gewebeschnitt, ebenfalls Giemsa gefärbt und 1000-fach vergrößert.

## 4. Diskussion

### 4.1. Prolog

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Mastzelle neben ihrer Funktion als Vermittler allergischer Reaktionen noch weitere, bedeutende Aufgaben, so bei der Abwehr bakterieller Infektionen, einnimmt. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, ist es MZ nicht nur möglich bakterielle Stimuli mittels diverser Rezeptoren zu detektieren (Matsushima et al., 2004; Maurer et al., 2004; Prodeus et al., 1997; Rodriguez et al., 2012). Sie kann zusätzlich auf direktem und indirektem Wege Einfluss auf das immunologische Geschehen im Gewebe nehmen (Theoharides et al., 2007; McNeil, Adachi, and Stevens 2007; Gordon and Galli 1990; Sutherland et al., 2008). Ein häufiges auf der Haut zu findendes Bakterium ist *Pseudomonas aeruginosa*, wobei die Haut eine der Hauptlokalisationen von MZ darstellt.

Da Mastzellen über die letzten Jahrzehnte ebenso zunehmende Bedeutung in der Wundheilungsforschung erlangten und dies aktuell in der Wissenschaft stark thematisiert wird, ist es als logische Konsequenz zu verstehen, die Wundheilung im Kontext von Mastzellen und einer bakteriellen Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen. Des Weiteren galt es zudem den direkten Einfluss der MZ auf das Bakterium zu beleuchten.

### 4.2 Einfluss von Mastzellen auf die kutane Wundheilung im mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Mausmodell

Aufgrund der prädestinierten Lage der Mastzelle in oberflächennahem Gewebe und besonders in exponierten Körperregionen (Weber et al., 2003) lag für das bessere Verständnis der Mastzellfunktion die Untersuchung der Auswirkungen einer durch Bakterien hervorgerufenen Infektion einer Hautwunde nahe. In den vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe M. Maurer wurde *Pseudomonas aeruginosa* subkutan in die Haut injiziert, wobei gezeigt werden konnte, dass die induzierten Hautläsionen bei MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen mehr als doppelt so groß waren wie die Läsionen der Wildtyp *Kit<sup>+/+</sup>*- Mäuse (Siebenhaar et al., 2007). Die Bekämpfung einer durch *PA* hervorgerufenen Infektion der Haut ist folglich MZ-abhängig. Jedoch wurde bis dato nicht untersucht, wie sich der kutane Wundschluss im MZ-defizienten Tiermodell verhält, wenn die gestanzten Wunden zusätzlich bakteriell infiziert werden. Genau mit dieser Fragestellung in einem klinisch relevanten Hautinfektionsmodell beschäftigt sich

meine Dissertation. Das erklärte Ziel dieser Arbeit war es folglich, den Einfluss von MZ auf die kutane Wundheilung der mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Wunden im Tiermodell zu untersuchen. Daraus abgeleitet galt es eine Kausalkette der sich dahinter verbergenden möglichen Mechanismen zu erarbeiten und diese in dem begrenzten Rahmen meiner Arbeit darzulegen. Dieses gesteckte Ziel gilt als erreicht. Mastzellen sind als Schlüsselzellen der kutanen Wundheilung im infizierten Maus-Modell zu sehen. Noch tiefgründiger zu erforschen gilt es den entsprechenden Mechanismus der bakteriellen Abwehr, wobei durch diese Arbeit bereits einige Ansatzpunkte ausgeschlossen werden konnten, so beispielsweise die Degranulation der MZ auf den Stimulus *Pseudomonas aeruginosa* hin. Die Suche nach antimikrobiellen Peptiden, Proteasen und anderweitigen, durch MZ sezernierte Substanzen, wie zum Beispiel gewisse Zytokine, muss als aussichtsreicher Vorstoß verstanden werden. Daraus könnten sich vielversprechende Ansätze nicht nur in der Behandlung infizierter Wunden, sondern auch bei der Therapie von Wundheilungsstörungen ergeben.

Es konnte erstmalig im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Wundheilungsverlauf MZ-defizienter Mäuse stark beeinträchtigt ist, wenn die Wunden zusätzlich bakteriell infiziert wurden. Es erfolgte die Infektion durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*. Weiterführend wurde demonstriert, dass die verbliebene Bakterienlast der Wunden in Tieren ohne MZ um ein Vielfaches höher ist, als die bakterielle Belastung entsprechender Wunden in Wildtyp-Mäusen. Um die potentiellen Mechanismen dahinter zu erforschen, wurde diese Erkenntnis in *In-vitro*-Experimenten weiter verfolgt. Somit konnte in reinen Mastzell-*Pseudomonas aeruginosa*-Kokulturen verdeutlicht werden, dass sich die Überlebensrate der mit Mastzellen inkubierten Bakterien, vergleichend zu *Pseudomonas aeruginosa*-Reinkulturen, als deutlich reduziert darstellt. Eine durch die Bakterien selbst oder deren Bestandteile ausgelöste Degranulation der MZ, als eine der naheliegenden Abwehrstrategien denkbar, konnte unter gegebenen Bedingungen als Theorie widerlegt werden. Ein ebenfalls als wahrscheinlich diskutierter Mechanismus der bakteriellen Abwehr der MZ ist die Expression diverser Proteasen und antimikrobieller Peptide. Dieser Fragestellung der Genexpression potentiell bakterizider Substanzen wurde mittels quantitativer Realtime-PCR nachgegangen, wobei Hoch- und Herunterregulierungen der Genexpression gewisser Substanzen in geringem Umfang zu beobachten waren. Die absolute Aussagekraft dieser Ergebnisse, bezogen auf den Nutzen *in vivo*, gilt es jedoch kritisch zu betrachten.

### 4.3. Mastzellen und deren Einfluss auf die kutane Wundheilung

Es konnte gezeigt werden, dass infizierte MZ-defiziente Mäuse, im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren, besonders während der ersten Tage einen deutlich beeinträchtigten kutanen Wundschluss aufweisen. Dabei zeigte sich vornehmlich während der frühen Phase der Wundheilung zwischen Tag 1 und Tag 2 in der Gruppe der Kontrolltiere der größte Fortschritt im Sinne einer raschen Regeneration der Haut. Dieser physiologische Wundschluss blieb in *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäusen aus. Durch Rekonstitution konnte in diesem Modell die Abhängigkeit der Wundheilung von MZ bewiesen werden. Eine mögliche Erklärung der Wundheilungsdifferenz, besonders während der frühen Phase, ist die Tatsache, dass diese Phase neben der Entzündungsreaktion auch von der Kontraktion der Myofibroblasten geprägt ist. Darunter werden die Wundränder näher zusammengezogen und die zu granulierende Wundfläche verkleinert sich (Shin and Minn, 2004). Das Ausbleiben der Kontraktion könnte zumindest teilweise ursächlich für die anfänglichen Differenzen der Wundheilung MZ-defizienter Mäuse und der Wildtyp-Tiere sein. Es wurde bereits gezeigt, dass Wunden in ihrer Heilung sowohl MZ, als auch Fibroblasten zur suffizienten Kontraktion benötigen (Garbuzenko et al., 2002) und dass das Quorum Sensing Molekül 3OC12-HSL des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, neben der gesteigerten Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, auch zu einer gesteigerten Wundkontraktion führt (Nakagami et al., 2011). Dieser Effekt könnte im MZ-defizienten Mausmodell vermindert oder gänzlich nicht vorhanden sein. Andererseits legt die Anwendung des „MZ-Stabilisators“ Ketotifen samt des dabei weiterhin bestehenden Kontraktions-Effektes nahe, dass die physiologische Wundkontraktion nicht in erster Linie von der MZ-Degranulation abhängig ist (Gallant-Behm et al., 2008). Andere von MZ sezernierte Substanzen könnten jedoch in noch unbekanntem Ausmaß Einfluss auf die Wundkontraktion nehmen. Da über den Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Kontraktilität von Wunden keine Daten vorliegen und der verzögerte Wundschluss in unseren Versuchstieren lediglich bei mit *Pseudomonas aeruginosa*-infizierten MZ-defizienten Mäusen, nicht aber bei uninfizierten Tieren beobachtet werden konnte, und weil der Wundheilungsverlauf infizierter Mäuse bis zum Ende des Versuchs an Tag 9 dauerhaft beeinträchtigt blieb, galt es das Hauptaugenmerk weiterer Experimente im Kontext der Mastzell-Forschung auf die bakteriell bedingte Beeinträchtigung der Wundheilung zu legen. Im Gegensatz zu den Wunden der infizierten Tiere wurde bei den uninfizierten Mäusen beider Genotypen kein Unterschied in der Wundheilung beobachtet. Dies legt die Vermutung nahe, dass Mastzellen nur unter pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle in der Wundheilung

spielen, was wiederum konträr zu den Ergebnissen der 2006 veröffentlichten Arbeit (Weller et al., 2006) ist. In der genannten Veröffentlichung wurde gezeigt, dass MZ-defiziente Mäuse, im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren, besonders während der ersten Tage, einen deutlich beeinträchtigten kutanen Wundschluss aufweisen. In unseren Experimenten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied der Wundheilung MZ-defizienter *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse und Wildtyp *Kit+/+-* Mäuse ermittelt werden. Unterstützt wird unsere Beobachtung von einer Veröffentlichung die ebenfalls *in vivo* zeigt, dass MZ keinen proliferativen Effekt auf die Wundheilung ausüben (Egozi et al., 2003). Eine mögliche Ursache der Diskrepanz unserer Ergebnisse und derer von Dr. K. Weller könnten die bestehenden methodischen Unterschiede in der Durchführung der Experimente sein. So wurden alle Versuchstiere in unseren Experimenten die ersten 24 Stunden nach der Wundsetzung in Einzelkäfigen gehalten und mit Halskrägen versehen, was sowohl das Kratzen der Wunden, als auch das Ablecken dieser unterbindet. Dies könnte von Bedeutung sein, da dem Speichel positive Eigenschaften in der Wundheilung zugesprochen werden (Jia et al., 2012), was letztendlich zur Verfälschung der Ergebnisse führen könnte. Andererseits unterbinden die angewandten Maßnahmen ebenso eine mögliche Superinfektion der Wunden mit sowohl eigenen, als auch fremden Bakterien. Eine ungewollte bakterielle Infektion könnte im Gegenzug wiederum eine geminderte Wundheilungstendenz zur Folge haben, wie in dieser Arbeit am Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* bewiesen.

In den ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass infizierte Hautwunden in Abwesenheit von MZ einen verzögerten kutanen Wundschluss aufweisen. Da MZ bekanntermaßen diverse immunmodulatorische oder bakterizid wirkende Substanzen, wie Proteasen, Peptide oder anderweitige Zytokine sezernieren können (Gordon and Galli, 1990; McNeil et al., 2007; Nardo et al., 2003; Theoharides et al., 2007), die nachweislich Einfluss auf das Überleben von Bakterien nehmen, wurde in einem weiteren *In-vivo*-Experiment die verbliebene Bakterienlast der Wunden nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Dabei zeigte sich, dass die bakterielle Belastung der MZ-defizienten *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*- Mäuse die Belastung der Wildtypmäuse um mehr als das 40-fache übersteigt. Es liegt nahe, dass MZ entweder auf direkte Weise, beispielsweise mittels ihrer sezernierten Granula oder durch andere bekannte Sekretionsmechanismen, wie sekretorische Vesikel nach *de novo* Synthese (Theoharides et al., 2007), oder aber auf indirekte Art und Weise mittels Zytokinen und der Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems (Biedermann et al., 2000; Enoksson et al., 2013; Maurer et al., 2006; von Stebut et al., 2003) Einfluss auf die Eliminierung des *Pseudomonas aeruginosa* nehmen. Um diesen Gedanken in

*In-vitro*-Experimenten weiterzuführen, um damit die direkte Interaktion von Mastzellen und *Pseudomonas aeruginosa* zu untersuchen, wurden MZ mit dem Bakterium über 3 Stunden kokultiviert. Dabei zeigte sich eine mehr als 50% geringere Überlebensrate jener Bakterien, die mit kultivierten peritonealen Mastzellen (PCMCs) gemeinsam kultiviert wurden. Bereits beschrieben wurde, dass MZ direkt von Bakterien über Rezeptoren aktiviert werden können. So besitzen MZ, neben dem in der Genese der Allergie bekannten hochaffinen FcεRI, eine Vielzahl weiterer Rezeptoren, wie Toll-like-Rezeptoren verschiedener Subtypen, Endothelin-1-Rezeptoren und Rezeptoren des Komplementsystems, über welche sie von Bakterien oder deren Bestandteilen aktiviert werden können (Maurer et al., 2004; Supajatura et al., 2001; Takeuchi et al., 1999). Der wohl bekannteste Mechanismus der Mastzelle direkt auf ihre Umgebung Einfluss zu nehmen, ist die Degranulation, welche jedoch gerichtet nur nach entsprechender MZ-Aktivierung erfolgen kann. Durch die Ausschüttung vorgefertigter Granula lässt sich in kürzester Zeit eine Vielzahl immunmodulatorischer Substanzen, wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor-α, Leukotrien B<sub>4</sub>, Interferon-γ und IL-6 sezernieren (Dalrymple et al., 1996; Malaviya et al., 1996; Poll et al., 1997; Prodeus et al., 1997; Sutherland et al., 2008; Wershil et al., 1994). Dies ist jedoch nur nach adäquater Aktivierung der MZ mittels entsprechender Stimulation realisierbar. Generell ist bekannt, dass es bestimmten Bakterien, wie zum Beispiel dem ebenfalls gramnegativen *Escherichia coli* möglich ist, eine Degranulation der MZ auszulösen (Church et al., 1987; Malaviya et al., 1994; Scheffer et al., 1986). In dieser Arbeit wurden PCMCs über 3 Stunden mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (lebend und tot), sowie mit dem PA- ATCC 2731 -Lipopolysaccharid, dem Quorum Sensing Molekül 3OC12-HSL und einem Bestandteil des Flagellums, dem Flagellin, inkubiert. Jedoch konnte durch keinen der Stoffe unter diesen Bedingungen eine entsprechende MZ-Degranulation erwirkt werden. Es wurde gleichwohl in einer vorangegangenen Veröffentlichung dargelegt, dass es MZ *in vivo* möglich ist, im Vergleich zu der Situation *in vitro*, auf den Stimulus PA hin zu degranulieren (Maurer and Metz, 2005; Siebenhaar et al., 2007). Es ist vorstellbar, dass dies wie gezeigt zusätzlich von der Interaktion von MZ und Endothelin-1 abhängig und dementsprechend isoliert *in vitro* nicht reproduzierbar ist. Das Quorum Sensing Molekül 3OC12-HSL indes führt in Wunden zu erhöhter Kontraktilität und zu einer Steigerung der Entzündungsmediatorenfreisetzung (Nakagami et al., 2011). Zudem wird beschrieben, dass in Zellen der humanen Mastzelllinie-1 (HMC-1) die Degranulation durch 3OC12-HSL aktiviert wird, was in unseren Versuchen mit kultivierten, peritonealen Mastzellen (PCMCs) und von

externen Kollegen nicht bestätigt werden konnte (Li et al., 2009). Dies mag an den leicht divergenten Eigenschaften der verwendeten MZ-Populationen liegen. Flagellin, dessen Effekt bezogen auf die MZ-Degranulation bis dato noch unerforscht war, welches aber bekanntermaßen eine proinflammatorische Immunantwort über die Aktivierung des TLR-5 Rezeptors bei Infektionen auszulösen vermag (Salazar-Gonzalez and McSorley, 2005), konnte in den getätigten Experimenten keine Freisetzung der MZ-Granula bewirken. Die wohl am besten erforschten Bestandteile gramnegativer Bakterien sind die Lipopolysaccharide, wobei diese sowohl für eine Bakterienart an sich, als auch für die einzelnen Stämme des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* spezifisch sind (King et al., 2009). Verwendet wurde das PA-ATCC 2731–Lipopolysaccharid (LPS), wobei dieses bei PCMCs ebenfalls nicht zur Degranulation führte. Konträr dazu wurde beschrieben, dass Lipopolysaccharide eines anderen PA-Stammes in peritonealen Mastzellen, allerdings nicht in zusätzlich kultivierten MZ, die Degranulation über FcεRI auszulösen vermögen (Yang et al., 2012). Bekannt ist zudem der Effekt von LPS, die Expression der Proteasen Trypsin, Chymase, Carboxypeptidase und des SCF-Rezeptors (CD117) in MZ zu stimulieren, was jedoch keinen direkten Einfluss auf die Mastzell-Degranulation hat (Kirshenbaum et al., 2008). Da folglich ausgeschlossen werden konnte, dass eine durch das Bakterium ausgelöste Mastzellen-Degranulation zur Eliminierung des *Pseudomonas aeruginosa in vitro* bzw. in der Kokultur führte, wurde weiterführend die Expression potentiell bakterizid wirkender Proteasen und antimikrobieller Peptide, sowie deren Expressionsmuster, untersucht.

#### **4.4. Expression antimikrobieller Peptide und Proteasen durch Mastzellen**

Schon seit langem ist bekannt, dass es neben der Degranulation noch andere Arten der Mediatorausschüttung gibt, mit deren Hilfe MZ sowohl vorgefertigte, als auch neu synthetisierte Zytokine und andere Substanzen in das sie umgebende Gewebe entlassen (Theoharides et al., 2007). Zur Messung der Änderung der Syntheseaktivität der Mastzellen wurden mittels quantitativer Realtime PCR die Expressionsmuster verschiedener Gene untersucht. Allerdings werden Gene nicht nur entsprechend des „Alles-oder-Nichts-Prinzips“ an- und abgeschaltet und Mastzellen exprimieren auch nicht immer und konstant die gleichen Zytokine bzw. diese in gleicher Quantität. Bekannt ist, dass die von MZ sezernierten Substanzen variieren, je nachdem in welchem Milieu sie sich befinden. So wurde gezeigt, dass MZ in der Präsenz des

Stammzellfaktors (SCF) hauptsächlich proinflammatorische Zytokine produzieren. Wird dem SCF außerdem IL-4 zugefügt, werden von den MZ zusätzlich Th2- Zytokine sezerniert (Bischoff et al., 2001). Um ein weiteres Beispiel zu nennen, setzen humane MZ aus der Nabelschnur (hCBMCs) nach Vorstimulation mit IL-5 fünfmal mehr TNF- $\alpha$ , Makrophagen inflammatorisches Protein 1a (MIP-1a) und den Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) frei, als dies ohne IL-5 der Fall wäre (Ochi et al., 2000). Da Proteasen einerseits auf bakterielle Stimuli hin sezerniert werden (Lauw et al., 2000) und diese vor ernsthaften bakteriellen Infektionen schützen (Caughey et al., 2011), andererseits aber auch die protektive Wirkung von antimikrobiellen Peptiden bei durch Bakterien hervorgerufenen Infektionen bekannt ist (Di Nardo et al., 2008), galt es zuerst die verwendeten kultivierten, peritonealen Mastzellen (PCMCs) auf deren Vermögen hin zu untersuchen, spezifische Proteasen und Peptide auf den Stimulus *Pseudomonas aeruginosa* und LPS hin zu exprimieren.

Ausgewählt wurden nach Literaturrecherche Proteasen und Peptide hauptsächlich zweier Kategorien: bei der ersten Gruppe war bereits bekannt, dass diese allgemein von MZ sezerniert werden können, so zum Beispiel bestimmte Mastzellproteasen. Allerdings wurde nie untersucht, ob MZ diese Substanzen auch auf den bakteriellen Stimulus *Pseudomonas aeruginosa* hin exprimieren. Die zweite Gruppe schließt Substanzen ein, deren potente Wirkung bei Infektionen bereits in der Literatur beschrieben, eine Expression durch MZ aber noch nicht dargelegt wurde, so zum Beispiel Cryptdin. Im Einzelnen aufgearbeitet zeigte sich, dass elf der zu besprechenden zweiundzwanzig Substanzen von MZ exprimiert wurden, die anderen elf unter den gegebenen Bedingungen jedoch nicht. Die nicht exprimierten Substanzen werden nun zuerst besprochen. Das Unvermögen diese Stoffe zu exprimieren, könnte wie gesagt daran liegen, dass Mastzellen die Expressionsfähigkeit schlicht nicht gegeben ist oder aber auch, weil dies unter den Bedingungen mit PCMCs nicht möglich war.

Das Bactericidal permeability-increasing protein (BPI), ebenso wie die Antileukoproteinase (SLPI), deren Plasmakonzentrationen nachgewiesenermaßen bei ambulant erworbenen Pneumonien (CAPs) signifikant erhöht sind (Jendeberg et al., 2013), konnten mittels PCR nicht nachgewiesen werden. In der Literatur gilt SLPI ebenfalls als bakterizid auf das gramnegative Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* wirkend (Cooper et al., 2012), wobei es geteilte Meinungen zur Expression dieser Substanz in MZ gibt (Westin et al., 1999). Cryptdin, auch bekannt als  $\alpha$ -Defensin in der Maus, besitzt nachgewiesenermaßen bakterizide Eigenschaften



(Hadjicharalambous et al., 2008), wurde aber nicht von PCMCs exprimiert. Ebenso wie Cathelicidin (CRAMP, LL-37), was jedoch etwas verwunderlich ist, da CRAMP derzeit von einigen Arbeitsgruppen als das wichtigste von Mastzellen sezernierte Peptid der bakteriellen Abwehr, beispielsweise gegen *Streptokokken*, verstanden wird (Di Nardo et al., 2008; Nardo et al., 2003). Um sicherzustellen, dass es sich nicht um einen methodischen Fehler, im Sinne einer falsch generierten Primersequenz handelt, wurde die Genexpression von CRAMP nochmals mit neu synthetisierten, anderen Primern untersucht, was jedoch zu dem gleichen, negativen Ergebnis führte. Ein Erklärungsversuch wären die etwas divergenten Eigenschaften der verwendeten PCMCs, da die *in vitro* Daten der Arbeitsgruppe von A.D. Nardo aus kultivierten Knochenmarkmastzellen gewonnen wurden (Nardo et al., 2003). Des Weiteren sind Differenzen in der Kultivierung und der Stimulation der MZ denkbar, was ebenso zu einem andersartigen Expressionsverhalten geführt haben könnte. Lactoferrin, ein hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten sezernierter Stoff und ein wichtiger Teil der angeborenen Immunabwehr, welchem es in diesem Zusammenhang möglich ist mit Rezeptoren der MZ zu interagieren (Legrand and Mazurier, 2010) und welcher die Aktivität der Heparin-gebundenen Mastzell-Chymase zu beeinflussen vermag (Pejler et al., 1996), konnte in den durchgeführten Versuchen indes nicht autonom von MZ hergestellt werden. Dies gilt es auch über das Lipopolysaccharide-binding Protein (LPB) zu sagen, was in der Literatur als „benötigt für den Kampf gegen Infektionen“ (Schumann, 2011) beschrieben wird und bei bestimmten Patienten mit einer Pneumonie stark erhöht ist, wobei die LPB-Level bei den für die Infektion typischen Bakterien am höchsten sind (Zobel et al., 2012). Das antimikrobielle Peptid Mouse Beta-Defensin-14 (mBD-14), welches das Äquivalent des humanen Beta-Defensin-3 (hBD-3) darstellt (Hinrichsen et al., 2008), wurde beispielsweise bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen im Rahmen der Atopischen Dermatitis als wichtiger Faktor beschrieben (Jensen et al., 2011). Dieses konnte unter den in unseren Experimenten bestehenden Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden. Außerdem wurde das Proteins S100A7 (Psoriasin) untersucht, welches als wichtiges antimikrobielles Peptid der kutanen Abwehr zu verstehen ist (Schröder and Harder, 2006). In *Staphylococcus aureus*-positiven Patienten (Andresen et al., 2011), aber auch bei *Chlamydien*-Infektionen (*Chlamydia trachomatis*) wurden hohe Expressionsraten dieses Peptids beschrieben. In den von uns untersuchten MZ konnte es jedoch ebenfalls nicht gezeigt werden. Das eher als Prohormon bekannte Protein Proopiomelanocortin kann allgemein von Gewebsmastzellen produziert werden (Paus et al., 2006) und auch das von diesem Prohormon stammende  $\alpha$ -MSH zeigt eine

antibakterielle Wirkung gegenüber dem Biofilm der *Staphylokokken* (Madhuri et al., 2009). Nachweisen ließ sich die Expression der Proopiomelanocortin-mRNA in den PCMCs unter den gegebenen Bedingungen aber nicht. Die POMC-Expression in den Experimenten von Paus wurden an Gewebsmastzellen gezeigt, nicht jedoch an den in dieser Arbeit verwendeten kultivierten, peritonealen Mastzellen.

Die Überleitung meiner Ausführungen zu jenen Proteasen und antimikrobiellen Peptiden, welche in dieser Arbeit mittels PCR nachgewiesen werden konnten, bildet die Gruppe der Granzyme. Diese Serin Proteasen sind gemeinhin bekannt dafür bei viralen Infekten durch T-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert zu werden (Martinvalet et al., 2008; Trapani et al., 2001). Jedoch wurde dargelegt, dass sowohl Granzyme A, als auch Granzyme B als generelle Immunantwort auf eine Infektion mit gramnegativen Bakterien ausgeschüttet werden (Lauw et al., 2000). Des Weiteren werden Granzyme B als von MZ hergestellt beschrieben (Pardo et al., 2007), Granzyme A allerdings nicht. Dies spiegelt auch die Resultate unserer Untersuchungen wider. Die Expression aller im Folgenden genannten Proteasen und antimikrobieller Peptide konnte in dieser Arbeit mittels PCR bestätigt werden.

In der Literatur als von Keratinozyten sezerniertes S110 kalziumbindendes Protein beschrieben, wird Calgranulin A nachweislich bei der Stimulation mit gramnegativen Bakterien sezerniert (Abtin et al., 2010). Es ist bekannt, dass es ebenso von MZ exprimiert werden kann (Shimizu et al., 2011). Dies trifft laut Angaben der Literatur auch auf die Protease Cathepsin G zu (Ribatti et al., 2009). Cathepsin G hingegen stammt üblicherweise aus neutrophilen Granulozyten (Heutinck et al., 2010) und gilt im Allgemeinen als antibakteriell wirksam (Steinwede et al., 2012). Eine ebenfalls untersuchte Protease war Chymase-1. In einem Sepsismodell wurde gezeigt, dass die erhöhte Chymase-Aktivität der Mastzellen zu einer gesteigerten bakteriziden Wirkung auf gramnegative Erreger während der Infektion führt (Orinska et al., 2007). Über die Carboxypeptidase A3 (CPA3) wird indes berichtet, dass sie während einer septischen Peritonitis die systemische Toxizität einzuschränken vermag (Caughey et al., 2006). Die Rolle bei der direkten Bekämpfung von Bakterien ist jedoch nicht belegt. Laut Angaben in der Literatur wird die Expression der Mastzellprotease-1 (MCPT1) hauptsächlich bei Infektionen mit Nematoden (Fadenwürmer) hochreguliert (Scudamore et al., 1997; Wastling et al., 1997), ähnlich wie die Mastzellprotease-8 (MCPT8) im protektiven Zusammenhang mit Infektionen durch *Schistosoma mansoni* erwähnt wird (Lützelschwab et al., 1998). Die Mastzellprotease-4 (MCPT4) stellt das

Gegenstück zur humanen Mastzell-Chymase dar, welche die Überlebensrate im Verlauf einer induzierten Sepsis, mittels CLP hervorgerufen, erhöhen kann (Piliponsky et al., 2012). Die Mastzellprotease-9 (MCPT9) wird als eine Protease beschrieben, die fast ausschließlich im Uterus vorkommt (Hunt et al., 1997), wobei ihre Expression in den verwendeten PCMCs nachzuweisen war. Das Protein Thymosin beta-4 ist in MZ verschiedenster Gewebe, beispielsweise in normaler Haut und Kolonschleimhaut, zu finden (Nemolato et al., 2010). Neben der Induktion des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) durch Thymosin beta-4 in *Trichinella spiralis*-Infektionen (Kang et al., 2011) wurde gezeigt, dass während einer Infektion mit *Clostridium difficile* weniger Pseudopodien von diesen Bakterien ausgebildet werden (Ito et al., 2009). Abschließend gilt es noch die ebenfalls in den durchgeführten Experimenten detektierte Tryptase-1 aus MZ zu erwähnen, welche laut Literaturangaben bei einer Lungeninfektion durch *Klebsiella pneumoniae* im MZ-defizienten Mausmodell nach dessen Verabreichung zu einer Reduktion der Bakterienzahl im Lungengewebe führte (Huang et al., 2001).

Die auf den letzten Seiten diskutierten und in Tabelle 8 des Ergebnisteils übersichtlich aufgeführten Substanzen sind somit alle, in den Experimenten unter entsprechenden Bedingungen untersuchte, von PCMCs exprimierte oder auch nicht exprimierte Proteasen bzw. antimikrobielle Peptide, wobei diese auch als solche markiert wurden. Es konnte einerseits gezeigt werden, welchen Substanzen es in den vorangegangenen Experimenten theoretisch aufgrund ihrer Mastzell-Expression möglich wäre, das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* zu eliminieren. Dabei wurden die bereits bekannten Eigenschaften der einzelnen Substanzen im Kontext der gewonnenen Ergebnisse diskutiert. Andererseits konnte aufgrund der gewonnenen Daten eine Auswahl von sieben Proteasen und einem Peptid getroffen werden, deren genaues Expressionsverhalten es mittels der quantitativen Realtime-PCR weiter zu untersuchen galt. Es war darzulegen, wie sich eine Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* und LPS über 4 bzw. 24 Stunden auf ihre mRNA-Expression auswirkt. Um dabei eine Aussage über die relative Quantität der einzelnen Expressionsmuster treffen zu können, wurden alle Daten mit unstimulierten Proben und  $\beta$ -Actin als Housekeeping Gen in mehreren unabhängigen Experimenten erhoben.

Die aufgestellte Hypothese, dass Mastzellen aufgrund der Stimulation durch das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* antimikrobielle Peptide hochregulieren und diese somit den Phänotyp dieses Mausmodells erklären, konnte nicht bestätigt werden. Jedoch sind die Experimente als

richtungsweisende Versuche zu werten. Leider konnte eine Signifikanz der Expressionswerte ( $p < 0,005$ ) nicht erreicht werden. Es konnte jedoch bei 4-stündiger Stimulation mit *Pseudomonas aeruginosa* eine deutliche Hochregulierung der mRNA-Expression bestimmter Proteasen nachgewiesen werden. Andere Proteasen blieben unverändert oder wurden nach unten reguliert, was in Zellen nicht ungewöhnlich ist, wenn andere Gene zeitgleich hochreguliert werden. Neben den Proteasen und Peptiden, bei denen es zu keinen nennenswerten Alternationen der Expression kam, konnte ein anschaulicher Anstieg der Genexpression der Tryptase-1, im Vergleich zu unstimulierten MZ, beobachtet werden. Dies ist sehr interessant, da bis dato in der Literatur nichts über die Induktion der Expression bei PA-Stimulation und nur wenig über den antibakteriellen Effekt dieser Protease geschrieben steht. Einer der wenigen Bezüge zu bakteriellen Infekten war die bereits beschriebene Reduzierung der Bakterienzahl im Lungengewebe bei Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae* (Huang et al., 2001). Die biologische Relevanz der Tryptase-1, wie auch die des Cathepsin G, ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, ist im genannten Kontext jedoch kritisch zu hinterfragen. Jedoch gilt die bakterizide Wirkung des meist aus neutophilen Granulozyten stammenden Cathepsin G als belegt (Steinwede et al., 2012). Gleich des ebenfalls nach oben regulierten Cathepsin G, eine Chymase-ähnliche Protease der MZ, gilt diese, gemeinsam mit der Tryptase, als vorgefertigter Hauptbestandteil der Mastzellgranula (Caughey et al., 2007). Dies wäre im Rahmen einer bakteriellen Infektion von großem Vorteil, da die Granula samt Proteasen mittels Degranulation bei entsprechender Aktivierung schnell sezerniert werden könnte. Allerdings würde dies nicht den bakteriziden Effekt der MZ auf *Pseudomonas aeruginosa* in der *In-vitro*-Kokultur vorangegangener Experimente erklären, da in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt wurde, dass das Bakterium unter den getesteten Bedingungen keine Mastzelldegranulation auslöst. Folglich muss es noch weitere Mechanismen der bakteriellen Abwehr von MZ geben. Zudem kann nicht nur von einer direkten Aktivierung der MZ durch das Bakterium ausgegangen werden, sondern es müssen auch indirekte Aktivierungswege in Betracht gezogen werden. Anzunehmen ist außerdem, dass es nicht den einen universell wirksamen Mechanismus der Abwehr gibt und dass diese Aufgabe wahrscheinlich auch nicht durch MZ allein bewältigt werden kann. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass es sich um ein Zusammenspiel mehrere Immunzellen handelt, wobei Mastzellen eine wichtige Rolle spielen. So könnten beispielsweise MZ mittels ihrer Toll-like-Rezeptoren TLR2 und TLR4 Bakterien oder deren Bestandteile detektieren (Takeuchi et al., 1999), wodurch es folglich zu einer Ausschüttung von Mediatoren, wie zum Beispiel  $\text{TNF-}\alpha$ ,

kommt, infolge dessen dann wiederum andere Zellen, so beispielsweise neutrophile Granulozyten, rekrutiert werden könnten (Wershil et al., 1991). Diesen wäre dann die Möglichkeit gegeben bakterizid wirksam zu werden, in diesem speziellen Beispielfall durch reaktive Sauerstoffspezies (Segal et al., 2005). Vorstellbar wären als Effektorzellen, neben den genannten neutrophilen Granulozyten, auch die in der Haut ubiquitären Keratinozyten, deren Vermögen antimikrobielle Peptide auf den Stimulus einer bakteriellen Infektion hin zu sezernieren in der Literatur vielseitig beschrieben wird (Ommori et al., 2012).

Es konnte gezeigt werden, welche Proteasen und antimikrobiellen Peptide allgemein von kultivierten peritonealen Mastzellen nach Stimulation mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* sezerniert werden und wie sich das Expressionsverhalten bestimmter Substanzen nach 4 bzw. 24-stündiger Stimulation mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und dessen Bestandteil Lipopolysaccharid verändert. Additiv bedarf es weitreichenderen Untersuchungen, welche den Mechanismus der Eliminierung der Bakterien durch die detektierten und von MZ freigesetzten Mediatoren aufzuzeigen vermögen.

Um die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse vor der geplanten Veröffentlichung innerhalb eines größeren Projektes weiter zu festigen, laufen weitere Experimente um diese Daten noch einmal in weiteren Mausmodellen und Zelllinien zu bestätigen.

#### **4.5. Epilog**

Um die Diskussion und damit inhaltlich auch meine medizinische Dissertation abzuschließen, möchte ich noch einmal darlegen, dass Mastzellen einen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Abwehr und in diesem Zusammenhang auf die kutane Wundheilung ausüben. Dies wurde in *In-vivo*-Experimenten gezeigt und mittels Rekonstitution bewiesen. MZ vermindern die verbliebene Bakterienlast in Wunden. Da der Anspruch an diese Arbeit bestand, eine Kausalkette möglicher Mechanismen darzulegen, die letztendlich einen Erklärungsversuch der *in vivo* generierten Daten liefert, wurde folgend *in vitro* nach weiteren MZ-Eigenschaften und Funktionen geforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass MZ auch in Kokultur Bakterien zu eliminieren vermögen, die Mastzell-Degranulation als möglicher Weg der bakteriellen Abwehr jedoch auszuschließen ist. Potenzielle von MZ exprimierte Proteasen und antimikrobielle Peptide wurden getestet und auch das genaue Expressionsverhalten ausgewählter Substanzen konnte dargelegt werden. Dabei zeigte sich unter anderem eine Hochregulierung der Tryptase-1, des

Cathepsin-G und des Granzym B nach 4 bzw. 24 Stunden Stimulation mit LPS und *Pseudomonas aeruginosa*.

Es konnte somit ein möglicher Mechanismus der wundheilungsfördernden Eigenschaften der Mastzelle im mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Mausmodell aufgezeigt werden, der sowohl durch weitere Versuche *in vitro*, wie auch *in vivo*, bestätigt und ausgebaut werden muss. Dementsprechend laufen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertation fortführende Versuche mit verschiedenartigen Mausmodellen im Rahmen eines größeren Projektes, wodurch die bestehenden Datensätze vor der geplanten Veröffentlichung noch weiter expandiert werden. So handelt es sich beispielsweise bei dem Tiermodell der ergänzenden Experimente, im Gegensatz zu dem *Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>*-Mausmodell, welches eine spontane Doppelmutation des c-Kit-Rezeptors besitzt, um Mäuse mit einer Kit-unabhängigen transgenen MZ-Deletion. Dementsprechend sind auch diese Mäuse MZ-defizient, allerdings auf eine andere Art und Weise entstanden (Müsch et al., 2008). Zusätzlich zu dem Nachweis der verminderten Wundheilung bei MZ-Defizienz, konnte ebenso die Hypothese belegt werden, dass MZ antimikrobielle Eigenschaften ausweisen.

Somit stellt meine medizinische Dissertation eine gute Basis für nachfolgende wissenschaftliche Arbeiten dar. Mögliche Kernpunkte wären dabei eine ausgedehnte Untersuchung antimikrobieller Peptide, beispielsweise in anderen Mastzellpopulationen, oder die Interaktion von MZ mit anderen Zellen, wie neutrophile Granulozyten oder Keratinozyten im Rahmen der bakteriell beeinflussten Wundheilung, um nur einige zu nennen. Da Mastzellen keinesfalls mehr alleinig als „Allergiezellen“ bezeichnet werden können, sondern weitreichende Funktionen in sämtlichen Bereichen, von der Tumorgenese (Dalton and Noelle, 2012) bis hin zur Degradierung von Schlangengiften (Metz et al., 2006) ausüben, bedienen sie ein großes Spektrum mit einer Vielzahl interessanter Forschungsansätze. Besonders die Fusion verschiedenster Forschungsbereiche, wie in dieser Arbeit die Kombination der Wundheilung mit der bakteriellen Abwehr, macht die Mastzelle auch in Zukunft zu einem spannenden Objekt der Forschung.

## 5. Literaturverzeichnis

Abdel-Majid, Raja M., and Jean S. Marshall

2004 Prostaglandin E2 Induces Degranulation-Independent Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Mast Cells. *The Journal of Immunology* 172(2): 1227–1236.

Abe, M, M Kurosawa, Y Igarashi, O Ishikawa, and Y Miyachi

2000 Influence of IgE-Mediated Activation of Cultured Human Mast Cells on Proliferation and Type I Collagen Production by Human Dermal Fibroblasts. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106(1 Pt 2): S72–77.

Abel, Jens, Oliver Goldmann, Christina Ziegler, et al.

2011 Staphylococcus Aureus Evades the Extracellular Antimicrobial Activity of Mast Cells by Promoting Its Own Uptake. *Journal of Innate Immunity* 3(5): 495–507.

Abraham, D J, X Shiwen, C M Black, et al.

2000 Tumor Necrosis Factor Alpha Suppresses the Induction of Connective Tissue Growth Factor by Transforming Growth Factor-Beta in Normal and Scleroderma Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 275(20): 15220–15225.

Abraham, Soman N, and Ashley L St John

2010 Mast Cell-Orchestrated Immunity to Pathogens. *Nature Reviews. Immunology* 10(6): 440–452.

Abtin, Arby, Leopold Eckhart, Regine Gläser, et al.

2010 The Antimicrobial Heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) Is Upregulated by Bacterial Flagellin in Human Epidermal Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* 130(10): 2423–2430.

Ahn, Chulhyun, Peter Mulligan, and Richard Sal Salcido

2008 Smoking-the Bane of Wound Healing: Biomedical Interventions and Social Influences. *Advances in Skin & Wound Care* 21(5): 227–236; quiz 237–238.

Andresen, Ellen, Christoph Lange, Daniela Strodthoff, et al.

2011 S100A7/psoriasin Expression in the Human Lung: Unchanged in Patients with COPD, but Upregulated upon Positive S. Aureus Detection. *BMC Pulmonary Medicine* 11: 10.

Angkasekwina, Pornpimon, Potjanee Srimanote, Yui-Hsi Wang, et al.

2013 IL-25 Promotes Efficient Protective Immunity against T. Spiralis Infection by Enhancing Antigen-Specific IL-9 Response. *Infection and Immunity*.

Ansel, J. C., J. R. Brown, D. G. Payan, and M. A. Brown

1993 Substance P Selectively Activates TNF-Alpha Gene Expression in Murine Mast Cells. *The Journal of Immunology* 150(10): 4478–4485.

Arnold, Meghan, and Adrian Barbul

2006 Nutrition and Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7 Suppl): 42S–58S.

Azizkhan, R G, J C Azizkhan, B R Zetter, and J Folkman

1980 Mast Cell Heparin Stimulates Migration of Capillary Endothelial Cells in Vitro. *The Journal of Experimental Medicine* 152(4): 931–944.

Barrett, K E, and D D Metcalfe

1987 Heterogeneity of Mast Cells in the Tissues of the Respiratory Tract and Other Organ Systems. *The American Review of Respiratory Disease* 135(5): 1190–1195.

Bazzi, Wael, Ahmad Sabra, Lama Zahreddine, et al.

2000 The Inhibitory Effect of Micafungin on Biofilm Formation by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biofouling* 0(0): 1–7.

Beaven, M A, and H Metzger

1993 Signal Transduction by Fc Receptors: The Fc Epsilon RI Case. *Immunology Today* 14(5): 222–226.

Beck, E, F Duckert, and M Ernst

1961 The Influence of Fibrin Stabilizing Factor on the Growth of Fibroblasts in Vitro and Wound Healing. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 6: 485–491.

Beckett, Emma L., Richard L. Stevens, Andrew G. Jarnicki, et al.

2013 A New Short-Term Mouse Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Identifies a Role for Mast Cell Tryptase in Pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(3): 752–762.

Beil, W J, M Schulz, and U Wefelmeyer

2000 Mast Cell Granule Composition and Tissue Location--a Close Correlation. *Histology and Histopathology* 15(3): 937–946.

Bevilacqua, M P, J S Pober, M E Wheeler, R S Cotran, and M A Gimbrone Jr

1985 Interleukin 1 Acts on Cultured Human Vascular Endothelium to Increase the Adhesion of Polymorphonuclear Leukocytes, Monocytes, and Related Leukocyte Cell Lines. *The Journal of Clinical Investigation* 76(5): 2003–2011.

Biedermann, T, M Kneilling, R Mailhammer, et al.

2000 Mast Cells Control Neutrophil Recruitment during T Cell-Mediated Delayed-Type Hypersensitivity Reactions through Tumor Necrosis Factor and Macrophage Inflammatory Protein 2. *The Journal of Experimental Medicine* 192(10): 1441–1452.

Bischoff, S C, G Sellge, M P Manns, and A Lorentz

2001 Interleukin-4 Induces a Switch of Human Intestinal Mast Cells from Proinflammatory Cells to Th2-Type Cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 124(1-3): 151–154.

Bischoff, S C, G Sellge, S Schwengberg, A Lorentz, and M P Manns

1999 Stem Cell Factor-Dependent Survival, Proliferation and Enhanced Releasability of Purified Mature Mast Cells Isolated from Human Intestinal Tissue. *International Archives of Allergy and Immunology* 118(2-4): 104–107.

Blair, R J, H Meng, M J Marchese, et al.

1997 Human Mast Cells Stimulate Vascular Tube Formation. Tryptase Is a Novel, Potent Angiogenic Factor. *The Journal of Clinical Investigation* 99(11): 2691–2700.

Blunk, James A., Martin Schmelz, Susanne Zeck, et al.

2004 Opioid-Induced Mast Cell Activation and Vascular Responses Is Not Mediated by M-Opioid Receptors: An In Vivo Microdialysis Study in Human Skin. *Anesthesia & Analgesia* 98(2): 364–370.



- Boesiger, J, M Tsai, M Maurer, et al.  
1998 Mast Cells Can Secrete Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Exhibit Enhanced Release after Immunoglobulin E-Dependent Upregulation of Fc Epsilon Receptor I Expression. *The Journal of Experimental Medicine* 188(6): 1135–1145.
- Borish, L, and B Z Joseph  
1992 Inflammation and the Allergic Response. *The Medical Clinics of North America* 76(4): 765–787.
- Boros, Mihály, László Szalay, and József Kaszaki  
2002 Endothelin-1 Induces Mucosal Mast Cell Degranulation and Tissue Injury via ETA Receptors. *Clinical Science (London, England: 1979)* 103 Suppl 48: 31S–34S.
- Bradding, P., I. H. Feather, P. H. Howarth, et al.  
1992 Interleukin 4 Is Localized to and Released by Human Mast Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 176(5): 1381–1386.
- Braff, Marissa H, Mohamed Zaiou, Joshua Fierer, Victor Nizet, and Richard L Gallo  
2005 Keratinocyte Production of Cathelicidin Provides Direct Activity against Bacterial Skin Pathogens. *Infection and Immunity* 73(10): 6771–6781.
- Brenner, T, D Soffer, M Shalit, and F Levi-Schaffer  
1994 Mast Cells in Experimental Allergic Encephalomyelitis: Characterization, Distribution in the CNS and in Vitro Activation by Myelin Basic Protein and Neuropeptides. *Journal of the Neurological Sciences* 122(2): 210–213.
- Broide, D H, S I Wasserman, J Alvaro-Gracia, N J Zvaifler, and G S Firestein  
1989 Transforming Growth Factor-Beta 1 Selectively Inhibits IL-3-Dependent Mast Cell Proliferation without Affecting Mast Cell Function or Differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 143(5): 1591–1597.
- Brown, Melissa A, and Julianne K Hatfield  
2012 Mast Cells Are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why Is There Still Controversy? *Frontiers in Immunology* 3: 147.
- Brzezińska-Błaszczyk, E, and A Pietrzak  
1997 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-Alpha) Activates Human Adenoidal and Cutaneous Mast Cells to Histamine Secretion. *Immunology Letters* 59(3): 139–143.
- Burke, Sarah M, Thomas B Issekutz, Karkada Mohan, et al.  
2008 Human Mast Cell Activation with Virus-Associated Stimuli Leads to the Selective Chemotaxis of Natural Killer Cells by a CXCL8-Dependent Mechanism. *Blood* 111(12): 5467–5476.
- Burnet, F M  
1977 The Probable Relationship of Some or All Mast Cells to the T-Cell System. *Cellular Immunology* 30(2): 358–360.
- Butterworth, A E  
1984 Cell-Mediated Damage to Helminths. *Advances in Parasitology* 23: 143–235.
- Cairns, J A, and A F Walls  
1997 Mast Cell Tryptase Stimulates the Synthesis of Type I Collagen in Human Lung Fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation* 99(6): 1313–1321.

- Calabro, Paolo, and Edward T Yeh  
2007 Obesity, Inflammation, and Vascular Disease: The Role of the Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Sub-Cellular Biochemistry* 42: 63–91.
- Campagna, Sylvie, Nathalie Saint, Gérard Molle, and André Aumelas  
2007 Structure and Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Piscidin. *Biochemistry* 46(7): 1771–1778.
- Campodonico, Victoria L., Nicolas J. Llosa, Martha Grout, et al.  
2010 Evaluation of Flagella and Flagellin of *Pseudomonas Aeruginosa* as Vaccines. *Infection and Immunity* 78(2): 746–755.
- Caughey, George H  
2006 A Pulmonary Perspective on GASPIDs: Granule-Associated Serine Peptidases of Immune Defense. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2(39): 263–277.  
2007 Mast Cell Trypsases and Chymases in Inflammation and Host Defense. *Immunological Reviews* 217: 141–154.  
2011 Mast Cell Proteases as Protective and Inflammatory Mediators. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 716: 212–234.
- Church, M K, and F Levi-Schaffer  
1997 The Human Mast Cell. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99(2): 155–160.
- Church, M K, M A Lowman, C Robinson, S T Holgate, and R C Benyon  
1989 Interaction of Neuropeptides with Human Mast Cells. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 88(1-2): 70–78.
- Church, M K, S Norn, G J Pao, and S T Holgate  
1987 Non-IgE-Dependent Bacteria-Induced Histamine Release from Human Lung and Tonsillar Mast Cells. *Clinical Allergy* 17(4): 341–353.
- Clark, R A, G A McCoy, J M Folkvord, and J M McPherson  
1997 TGF-Beta 1 Stimulates Cultured Human Fibroblasts to Proliferate and Produce Tissue-like Fibroplasia: A Fibronectin Matrix-Dependent Event. *Journal of Cellular Physiology* 170(1): 69–80.
- Cooper, Morris D, Melissa H Roberts, Ona L Barauskas, and Gary A Jarvis  
2012 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Binds to *Neisseria Gonorrhoeae* Outer Membrane Opacity Protein and Is Bactericidal. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 68(2): 116–127.
- Cruse, Glenn, Vitor E Fernandes, Jose de Salort, et al.  
2010 Human Lung Mast Cells Mediate Pneumococcal Cell Death in Response to Activation by Pneumolysin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184(12): 7108–7115.
- Dahlin, J. S., B. Heyman, and J. Hallgren  
2013 Committed Mast Cell Progenitors in Mouse Blood Differ in Maturity between Th1 and Th2 Strains. *Allergy* 68(10): 1333–1337.
- Dalrymple, S. A., R. Slattery, D. M. Aud, et al.  
1996 Interleukin-6 Is Required for a Protective Immune Response to Systemic *Escherichia Coli* Infection. *Infection and Immunity* 64(8): 3231–3235.

Dalton, Dyana K, and Randolph J Noelle

2012 The Roles of Mast Cells in Anticancer Immunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61(9): 1511–1520.

Dembo, M, B Goldstein, A K Sobotka, and L M Lichtenstein

1979 Degranulation of Human Basophils: Quantitative Analysis of Histamine Release and Desensitization, due to a Bivalent Penicilloyl Hapten. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 123(4): 1864–1872.

Desmoulière, A, A Geinoz, F Gabbiani, and G Gabbiani

1993 Transforming Growth Factor-Beta 1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 122(1): 103–111.

DiPietro, L A

1995 Wound Healing: The Role of the Macrophage and Other Immune Cells. *Shock (Augusta, Ga.)* 4(4): 233–240.

Duncan, L M, L A Richards, and M C Mihm Jr

1998 Increased Mast Cell Density in Invasive Melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 25(1): 11–15.

Dvorak, A M, and S Kissell

1991 Granule Changes of Human Skin Mast Cells Characteristic of Piecemeal Degranulation and Associated with Recovery during Wound Healing in Situ. *Journal of Leukocyte Biology* 49(2): 197–210.

Dvorak, A. M., R. A. Seder, W. E. Paul, E. S. Morgan, and S. J. Galli

1994 Effects of Interleukin-3 with or without the c-Kit Ligand, Stem Cell Factor, on the Survival and Cytoplasmic Granule Formation of Mouse Basophils and Mast Cells in Vitro. *The American Journal of Pathology* 144(1): 160–170.

Dvorak, Ann M.

2005 Piecemeal Degranulation of Basophils and Mast Cells Is Effected by Vesicular Transport of Stored Secretory Granule Contents. *In Chemical Immunology and Allergy* Pp. 135–184. Basel: KARGER. <http://www.karger.com/Article/Abstract/86516>, accessed August 6, 2013.

Echtenacher, B, D N Männel, and L Hültner

1996 Critical Protective Role of Mast Cells in a Model of Acute Septic Peritonitis. *Nature* 381(6577): 75–77.

Egozi, Eric I, Ahalia M Ferreira, Aime L Burns, Richard L Gamelli, and Luisa A Dipietro

2003 Mast Cells Modulate the Inflammatory but Not the Proliferative Response in Healing Wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 11(1): 46–54.

Ehrlich, H P, and T M Krummel

1996 Regulation of Wound Healing from a Connective Tissue Perspective. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 4(2): 203–210.

- Ehrlich, P.  
1877 Beitrag Zur Kenntnis Der Anilinfärbungen Und Ihrer Verwendung in Der Mikroskopischen Technik. *Arch Mikr Anat* 1877,13,263–277, 1877.
- Eichholtz, T, K Jalink, I Fahrenfort, and W H Moolenaar  
1993 The Bioactive Phospholipid Lysophosphatidic Acid Is Released from Activated Platelets. *The Biochemical Journal* 291 ( Pt 3): 677–680.
- Enerbäck, L  
1966 Mast Cells in Rat Gastrointestinal Mucosa. I. Effects of Fixation. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 66(3): 289–302.
- Enoksson, Mattias, Christine Möller-Westerberg, Grzegorz Wicher, et al.  
2013 Intraperitoneal Influx of Neutrophils in Response to IL-33 Is Mast Cell-Dependent. *Blood* 121(3): 530–536.
- Epanand, R M, and H J Vogel  
1999 Diversity of Antimicrobial Peptides and Their Mechanisms of Action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1462(1-2): 11–28.
- Esposito, P, D Gheorghe, K Kandere, et al.  
2001 Acute Stress Increases Permeability of the Blood-Brain-Barrier through Activation of Brain Mast Cells. *Brain Research* 888(1): 117–127.
- Féger, Frédéric, Sonia Varadaradjalou, Zhimin Gao, Soman N Abraham, and Michel Arock  
2002 The Role of Mast Cells in Host Defense and Their Subversion by Bacterial Pathogens. *Trends in Immunology* 23(3): 151–158.
- Ferroni, A, L Nguyen, B Pron, et al.  
1998 Outbreak of Nosocomial Urinary Tract Infections due to *Pseudomonas Aeruginosa* in a Paediatric Surgical Unit Associated with Tap-Water Contamination. *The Journal of Hospital Infection* 39(4): 301–307.
- Fowlkes, Vennece, Christopher G Wilson, Wayne Carver, and Edie C Goldsmith  
2013 Mechanical Loading Promotes Mast Cell Degranulation via RGD-Integrin Dependent Pathways. *Journal of Biomechanics* 46(4): 788–795.
- Gaber, Mohamed A., Iman A. Seliet, Nermin A. Ehsan, and Mohamed A. Megahed  
2014 Mast Cells and Angiogenesis in Wound Healing. *Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology* 36(1): 32–40.
- Gailani, David, and Thomas Renné  
2007 Intrinsic Pathway of Coagulation and Arterial Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27(12): 2507–2513.
- Gallant-Behm, Corrie L, Kevin A Hildebrand, and David A Hart  
2008 The Mast Cell Stabilizer Ketotifen Prevents Development of Excessive Skin Wound Contraction and Fibrosis in Red Duroc Pigs. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16(2): 226–233.

Galli, S J

1990 New Insights into “the Riddle of the Mast Cells”: Microenvironmental Regulation of Mast Cell Development and Phenotypic Heterogeneity. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 62(1): 5–33.

Galli, S J, A M Dvorak, and H F Dvorak

1984 Basophils and Mast Cells: Morphologic Insights into Their Biology, Secretory Patterns, and Function. *Progress in Allergy* 34: 1–141.

Galli, S J, and I Hammel

1994 Mast Cell and Basophil Development. *Current Opinion in Hematology* 1(1): 33–39.

Galli, S J, and Y Kitamura

1987 Genetically Mast-Cell-Deficient W/W<sup>v</sup> and Sl/Sl<sup>d</sup> Mice. Their Value for the Analysis of the Roles of Mast Cells in Biologic Responses in Vivo. *The American Journal of Pathology* 127(1): 191–198.

Galli, S J, M Maurer, and C S Lantz

1999 Mast Cells as Sentinels of Innate Immunity. *Current Opinion in Immunology* 11(1): 53–59.

Galli, Stephen J, and Mindy Tsai

2010 Mast Cells in Allergy and Infection: Versatile Effector and Regulatory Cells in Innate and Adaptive Immunity. *European Journal of Immunology* 40(7): 1843–1851.

Garbuzenko, E., A. Nagler, D. Pickholtz, et al.

2002 Human Mast Cells Stimulate Fibroblast Proliferation, Collagen Synthesis and Lattice Contraction: A Direct Role for Mast Cells in Skin Fibrosis. *Clinical & Experimental Allergy* 32(2): 237–246.

Geffers, Christine, and Petra Gastmeier

2011 Nosocomial Infections and Multidrug-Resistant Organisms in Germany: Epidemiological Data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Deutsches Ärzteblatt International* 108(6): 87–93.

Goetzl, E J, and S An

1998 Diversity of Cellular Receptors and Functions for the Lysophospholipid Growth Factors Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-Phosphate. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12(15): 1589–1598.

Goldman, Robert

2004 Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. *Advances in Skin & Wound Care* 17(1): 24–35.

Goldmann, Oliver, and Eva Medina

2012 The Expanding World of Extracellular Traps: Not Only Neutrophils but Much More. *Frontiers in Immunology* 3: 420.

Gommerman, J L, D Y Oh, X Zhou, et al.

2000 A Role for CD21/CD35 and CD19 in Responses to Acute Septic Peritonitis: A Potential Mechanism for Mast Cell Activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165(12): 6915–6921.

- Gordon, J R, P R Burd, and S J Galli  
1990 Mast Cells as a Source of Multifunctional Cytokines. *Immunology Today* 11(12): 458–464.
- Gordon, J R, and S J Galli  
1990 Mast Cells as a Source of Both Preformed and Immunologically Inducible TNF-Alpha/cachectin. *Nature* 346(6281): 274–276.
- Gosain, Ankush, and Luisa A DiPietro  
2004 Aging and Wound Healing. *World Journal of Surgery* 28(3): 321–326.
- Grabbe, J, N Haas, and B M Czarnetzki  
1994 [The mast cell]. *HNO* 42(6): 375–384.
- Greenberg, G, and G Burnstock  
1983 A Novel Cell-to-Cell Interaction between Mast Cells and Other Cell Types. *Experimental Cell Research* 147(1): 1–13.
- Grinnell, Frederick  
2003 Fibroblast Biology in Three-Dimensional Collagen Matrices. *Trends in Cell Biology* 13(5): 264–269.
- Grotendorst, G R, Y Soma, K Takehara, and M Charette  
1989 EGF and TGF-Alpha Are Potent Chemoattractants for Endothelial Cells and EGF-like Peptides Are Present at Sites of Tissue Regeneration. *Journal of Cellular Physiology* 139(3): 617–623.
- Gurish, Michael F, and K Frank Austen  
2012 Developmental Origin and Functional Specialization of Mast Cell Subsets. *Immunity* 37(1): 25–33.
- Hadjicharalambous, Chrystalleni, Tania Sheynis, Raz Jelinek, et al.  
2008 Mechanisms of Alpha-Defensin Bactericidal Action: Comparative Membrane Disruption by Cryptdin-4 and Its Disulfide-Null Analogue. *Biochemistry* 47(47): 12626–12634.
- Ben Haj Khalifa, Anis, Didier Moissenet, Hoang Vu Thien, and Mohamed Khedher  
2011 [Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation]. *Annales de biologie clinique* 69(4): 393–403.
- Harder, J, J Bartels, E Christophers, and J M Schröder  
1997 A Peptide Antibiotic from Human Skin. *Nature* 387(6636): 861.
- Harvima, I T, G Nilsson, and A Naukkarinen  
2010 Role of Mast Cells and Sensory Nerves in Skin Inflammation. *Giornale Italiano Di Dermatologia E Venereologia: Organo Ufficiale, Società Italiana Di Dermatologia E Sifilografia* 145(2): 195–204.
- Hebda, P A, M A Collins, and M D Tharp  
1993 Mast Cell and Myofibroblast in Wound Healing. *Dermatologic Clinics* 11(4): 685–696.
- Henry, Ginard, and Warren L Garner  
2003 Inflammatory Mediators in Wound Healing. *The Surgical Clinics of North America* 83(3): 483–507.

- Heutinck, Kirstin M, Ineke J M ten Berge, C Erik Hack, Jörg Hamann, and Ajda T Rowshani  
2010 Serine Proteases of the Human Immune System in Health and Disease. *Molecular Immunology* 47(11-12): 1943–1955.
- Hinrichsen, Kerstin, Rainer Podschun, Sabine Schubert, et al.  
2008 Mouse Beta-Defensin-14, an Antimicrobial Ortholog of Human Beta-Defensin-3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(5): 1876–1879.
- Hirt, Helmut, and Sven-Ulrik Gorr  
2013 The Antimicrobial Peptide GL13K Is Effective in Reducing Biofilm of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Hofmann, Alison M, and Soman N Abraham  
2009 New Roles for Mast Cells in Modulating Allergic Reactions and Immunity against Pathogens. *Current Opinion in Immunology* 21(6): 679–686.
- Hsu, Chia-Lin, Colleen V Neilsen, and Paul J Bryce  
2010 IL-33 Is Produced by Mast Cells and Regulates IgE-Dependent Inflammation. *PloS One* 5(8): e11944.
- Hu, Yanxin, Yi Jin, Deping Han, et al.  
2012 Mast Cell-Induced Lung Injury in Mice Infected with H5N1 Influenza Virus. *Journal of Virology* 86(6): 3347–3356.
- Huang, C, G T De Sanctis, P J O'Brien, et al.  
2001 Evaluation of the Substrate Specificity of Human Mast Cell Tryptase Beta I and Demonstration of Its Importance in Bacterial Infections of the Lung. *The Journal of Biological Chemistry* 276(28): 26276–26284.
- Huang, Fang-hua, Xin-yue Zhang, Lu-yong Zhang, et al.  
2010 Mast Cell Degranulation Induced by Chlorogenic Acid. *Acta Pharmacologica Sinica* 31(7): 849–854.
- Hunt, J E, D S Friend, M F Gurish, et al.  
1997 Mouse Mast Cell Protease 9, a Novel Member of the Chromosome 14 Family of Serine Proteases That Is Selectively Expressed in Uterine Mast Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272(46): 29158–29166.
- Ikeda, Kei, Hiroshi Nakajima, Kotaro Suzuki, et al.  
2003 Mast Cells Produce Interleukin-25 upon Fc Epsilon RI-Mediated Activation. *Blood* 101(9): 3594–3596.
- Irani, A A, N M Schechter, S S Craig, G DeBlois, and L B Schwartz  
1986 Two Types of Human Mast Cells That Have Distinct Neutral Protease Compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(12): 4464–4468.
- Ishii, Y  
1995 [Expression and subtype analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (flt-1) in human ovarian tumors]. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* 47(2): 133–140.

- Ito, Mai, Kazuhiro Iguchi, Shigeyuki Usui, and Kazuyuki Hirano  
2009 Overexpression of Thymosin beta4 Increases Pseudopodia Formation in LNCaP Prostate Cancer Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32(6): 1101–1104.
- Jendeberg, Anna Lange, Kristoffer Strålin, and Olof Hultgren  
2013 Antimicrobial Peptide Plasma Concentrations in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*.
- Jensen, Jens-Michael, Kerstin Ahrens, Josef Meingassner, et al.  
2011 Differential Suppression of Epidermal Antimicrobial Protein Expression in Atopic Dermatitis and in EFAD Mice by Pimecrolimus Compared to Corticosteroids. *Experimental Dermatology* 20(10): 783–788.
- Jia, Jinjing, Ying Sun, Huan Yang, et al.  
2012 [Effect of Human Saliva on Wound Healing]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi = Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi = Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* 26(5): 563–566.
- Jozaki, K, A Kuriu, N Waki, et al.  
1990 Proliferative Potential of Murine Peritoneal Mast Cells after Degranulation Induced by Compound 48/80, Substance P, Tetradecanoylphorbol Acetate, or Calcium Ionophore A23187. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145(12): 4252–4256.
- Kang, Yun-Jeong, Jin-Ok Jo, Min-Kyoung Cho, et al.  
2011 *Trichinella Spiralis* Infection Induces Angiogenic Factor Thymosin  $\beta$ 4 Expression. *Veterinary Parasitology* 181(2-4): 222–228.
- Keller, R, M W Hess, and J F Riley  
1976 Mast Cells in the Skin of Normal, Hairless and Athymic Mice. *Experientia* 32(2): 171–172.
- Kiecolt-Glaser, J K, P T Marucha, W B Malarkey, A M Mercado, and R Glaser  
1995 Slowing of Wound Healing by Psychological Stress. *Lancet* 346(8984): 1194–1196.
- King, Jerry D, Dana Kocíncová, Erin L Westman, and Joseph S Lam  
2009 Review: Lipopolysaccharide Biosynthesis in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Innate Immunity* 15(5): 261–312.
- Kirshenbaum, A S, S W Kessler, J P Goff, and D D Metcalfe  
1991 Demonstration of the Origin of Human Mast Cells from CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146(5): 1410–1415.
- Kirshenbaum, Arnold S, Emily Swindle, Marianna Kulka, Yalin Wu, and Dean D Metcalfe  
2008 Effect of Lipopolysaccharide (LPS) and Peptidoglycan (PGN) on Human Mast Cell Numbers, Cytokine Production, and Protease Composition. *BMC Immunology* 9: 45.
- Kischer, C. W., H. Bunce, and M. R. Shetlah  
1978 Mast Cell Analyses in Hypertrophic Scars, Hypertrophic Scars Treated with Pressure and Mature Scars. *The Journal of Investigative Dermatology* 70(6): 355–357.
- Kitamura, Y  
1989 Heterogeneity of Mast Cells and Phenotypic Change between Subpopulations. *Annual Review of Immunology* 7: 59–76.



- Kitamura, Y, T Kasugai, N Arizono, and H Matsuda  
1993 Development of Mast Cells and Basophils: Processes and Regulation Mechanisms. *The American Journal of the Medical Sciences* 306(3): 185–191.
- Kitamura, Y, and I Miyoshi  
1978 Development and Differentiation of Mast Cells and Basophils. *Nihon Ketsueki Gakkai Zasshi: Journal of Japan Haematological Society* 41(6): 1251–1259.
- Kitamura, Y, M Shimada, K Hatanaka, and Y Miyano  
1977 Development of Mast Cells from Grafted Bone Marrow Cells in Irradiated Mice. *Nature* 268(5619): 442–443.
- Von Köckritz-Blickwede, Maren, Oliver Goldmann, Pontus Thulin, et al.  
2008 Phagocytosis-Independent Antimicrobial Activity of Mast Cells by Means of Extracellular Trap Formation. *Blood* 111(6): 3070–3080.
- Kraneveld, Aletta D, Seil Sagar, Johan Garssen, and Gert Folkerts  
2012 The Two Faces of Mast Cells in Food Allergy and Allergic Asthma: The Possible Concept of Yin Yang. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822(1): 93–99.
- Kulka, Marianna, Nobuyuki Fukuishi, and Dean D Metcalfe  
2009 Human Mast Cells Synthesize and Release Angiogenin, a Member of the Ribonuclease A (RNase A) Superfamily. *Journal of Leukocyte Biology* 86(5): 1217–1226.
- Kulka, Marianna, Cecilia H Sheen, Brian P Tancowny, Leslie C Grammer, and Robert P Schleimer  
2008 Neuropeptides Activate Human Mast Cell Degranulation and Chemokine Production. *Immunology* 123(3): 398–410.
- Kuriu, A, S Sonoda, Y Kanakura, et al.  
1989 Proliferative Potential of Degranulated Murine Peritoneal Mast Cells. *Blood* 74(3): 925–929.
- Lauw, Fanny N., Andrew J. H. Simpson, C. Erik Hack, et al.  
2000 Soluble Granzymes Are Released during Human Endotoxemia and in Patients with Severe Infection Due to Gram-Negative Bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 182(1): 206–213.
- Lawrence, I D, J A Warner, V L Cohan, et al.  
1989 Induction of Histamine Release from Human Skin Mast Cells by Bradykinin Analogs. *Biochemical Pharmacology* 38(2): 227–233.
- Lee, Haneul Nari, Chul Hwan Kim, Gwan Gyu Song, and Sung-Weon Cho  
2010 Effects of IL-3 and SCF on Histamine Production Kinetics and Cell Phenotype in Rat Bone Marrow-Derived Mast Cells. *Immune Network* 10(1): 15–25.
- Legrand, Dominique, and Joël Mazurier  
2010 A Critical Review of the Roles of Host Lactoferrin in Immunity. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 23(3): 365–376.
- Leon, A, A Buriani, R Dal Toso, et al.  
1994 Mast Cells Synthesize, Store, and Release Nerve Growth Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(9): 3739–3743.

Levi-Schaffer, F, K F Austen, J P Caulfield, et al.

1985 Fibroblasts Maintain the Phenotype and Viability of the Rat Heparin-Containing Mast Cell in Vitro. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 135(5): 3454–3462.

Levi-Schaffer, F, K F Austen, P M Gravallesse, and R L Stevens

1986 Coculture of Interleukin 3-Dependent Mouse Mast Cells with Fibroblasts Results in a Phenotypic Change of the Mast Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(17): 6485–6488.

Li, Hongtao, Lili Wang, Lu Ye, et al.

2009 Influence of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecule N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone on Mast Cells. *Medical Microbiology and Immunology* 198(2): 113–121.

Li, Wen-Wu, Tian-Zhi Guo, De-yong Liang, et al.

2012 Substance P Signaling Controls Mast Cell Activation, Degranulation, and Nociceptive Sensitization in a Rat Fracture Model of Complex Regional Pain Syndrome. *Anesthesiology* 116(4): 882–895.

Lim, H W

1989 Mechanisms of Phototoxicity in Porphyria Cutanea Tarda and Erythropoietic Protoporphyrin. *Immunology Series* 46: 671–685.

Ludowyke, R I, L L Scurr, and C M McNally

1996 Calcium Ionophore-Induced Secretion from Mast Cells Correlates with Myosin Light Chain Phosphorylation by Protein Kinase C. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 157(11): 5130–5138.

Lundequist, Anders, and Gunnar Pejler

2011 Biological Implications of Preformed Mast Cell Mediators. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 68(6): 965–975.

Lützelshwab, C, M R Huang, M C Kullberg, M Aveskog, and L Hellman

1998 Characterization of Mouse Mast Cell Protease-8, the First Member of a Novel Subfamily of Mouse Mast Cell Serine Proteases, Distinct from Both the Classical Chymases and Trypsases. *European Journal of Immunology* 28(3): 1022–1033.

Madhuri, Tahsina Shireen, S K Venugopal, et al.

2009 In Vitro Antimicrobial Activity of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone against Major Human Pathogen *Staphylococcus Aureus*. *Peptides* 30(9): 1627–1635.

Malaviya, R, and S N Abraham

2000 Role of Mast Cell Leukotrienes in Neutrophil Recruitment and Bacterial Clearance in Infectious Peritonitis. *Journal of Leukocyte Biology* 67(6): 841–846.

Malaviya, R, T Ikeda, E Ross, and S N Abraham

1996 Mast Cell Modulation of Neutrophil Influx and Bacterial Clearance at Sites of Infection through TNF-Alpha. *Nature* 381(6577): 77–80.

Malaviya, R, E Ross, B A Jakschik, and S N Abraham

1994 Mast Cell Degranulation Induced by Type 1 Fimbriated *Escherichia Coli* in Mice. *The Journal of Clinical Investigation* 93(4): 1645–1653.

- Malbec, Odile, Karine Roget, Cécile Schiffer, et al.  
2007 Peritoneal Cell-Derived Mast Cells: An in Vitro Model of Mature Serosal-Type Mouse Mast Cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 178(10): 6465–6475.
- Martin, P  
1997 Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* (New York, N.Y.) 276(5309): 75–81.
- Martinvalet, Denis, Jerome Thiery, and Dipanjan Chowdhury  
2008 Granzymes and Cell Death. *Methods in Enzymology* 442: 213–230.
- Matoszka, Natalia, Joanna Działo, Beata Tokarz-Deptuła, and Wiesław Deptuła  
2012 [NET and NETosis--new phenomenon in immunology]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* (Online) 66: 437–445.
- Matsui, Hidenori, Yukie Sekiya, Tetsufumi Takahashi, et al.  
2011 Dermal Mast Cells Reduce Progressive Tissue Necrosis Caused by Subcutaneous Infection with *Streptococcus Pyogenes* in Mice. *Journal of Medical Microbiology* 60(Pt 1): 128–134.
- Matsushima, Hironori, Nobuo Yamada, Hiroyuki Matsue, and Shinji Shimada  
2004 TLR3-, TLR7-, and TLR9-Mediated Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines from Murine Connective Tissue Type Skin-Derived Mast Cells but Not from Bone Marrow-Derived Mast Cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 173(1): 531–541.
- Maurer, M, B Echtenacher, L Hültner, et al.  
1998 The c-Kit Ligand, Stem Cell Factor, Can Enhance Innate Immunity through Effects on Mast Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 188(12): 2343–2348.
- Maurer, M, E Fischer, B Handjiski, et al.  
1997 Activated Skin Mast Cells Are Involved in Murine Hair Follicle Regression (catagen). *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 77(4): 319–332.
- Maurer, M, T Theoharides, R D Granstein, et al.  
2003 What Is the Physiological Function of Mast Cells? *Experimental Dermatology* 12(6): 886–910.
- Maurer, Marcus, Susanna Lopez Kostka, Frank Siebenhaar, et al.  
2006 Skin Mast Cells Control T Cell-Dependent Host Defense in *Leishmania* Major Infections. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(14): 2460–2467.
- Maurer, Marcus, and Martin Metz  
2005 The Status Quo and Quo Vadis of Mast Cells. *Experimental Dermatology* 14(12): 923–929.
- Maurer, Marcus, Jochen Wedemeyer, Martin Metz, et al.  
2004 Mast Cells Promote Homeostasis by Limiting Endothelin-1-Induced Toxicity. *Nature* 432(7016): 512–516.
- Maximow, Alexander  
1905 Über die Zellformen des lockeren Bindegewebes. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 67(1): 680–757.

Mayrhofer, G, and R Fisher

1979 Mast Cells in Severely T-Cell Depleted Rats and the Response to Infestation with *Nippostrongylus Brasiliensis*. *Immunology* 37(1): 145–155.

Mazurek, N., G. Weskamp, P. Erne, and U. Otten

1986 Nerve Growth Factor Induces Mast Cell Degranulation without Changing Intracellular Calcium Levels. *FEBS Letters* 198(2): 315–320.

McNeil, H Patrick, Roberto Adachi, and Richard L Stevens

2007 Mast Cell-Restricted Tryptases: Structure and Function in Inflammation and Pathogen Defense. *The Journal of Biological Chemistry* 282(29): 20785–20789.

Mécheri, S, and B David

1997 Unravelling the Mast Cell Dilemma: Culprit or Victim of Its Generosity? *Immunology Today* 18(5): 212–215.

Mecklenburg, G, and B M Czarnetzki

1986 In Vitro and in Vivo Migratory Response of Connective Tissue Mast Cells to Inflammatory Mediators. *Agents and Actions* 19(5-6): 344–345.

Mekori, T, and R A Phillips

1969 The Immune Response in Mice of Genotypes W-Wv and Sl-Sld1. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 132(1): 115–119.

Metz, Martin, and Marcus Maurer

2009 Innate Immunity and Allergy in the Skin. *Current Opinion in Immunology* 21(6): 687–693.

Metz, Martin, Adrian M Piliponsky, Ching-Cheng Chen, et al.

2006 Mast Cells Can Enhance Resistance to Snake and Honeybee Venoms. *Science* (New York, N.Y.) 313(5786): 526–530.

Michel, L, M Arock, and L Dubertret

1992 [Studying the mast cell. Recent data]. *Pathologie-biologie* 40(2): 147–159.

Michels, N M, H W Chu, S C LaFasto, et al.

2010 Mast Cells Protect against Airway *Mycoplasma Pneumoniae* under Allergic Conditions. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40(9): 1406–1413.

Miller, J S, and L B Schwartz

1989 Human Mast Cell Proteases and Mast Cell Heterogeneity. *Current Opinion in Immunology* 1(4): 637–642.

Mirzahosseini, Arash, Balázs Dalmadi, and Péter Csutora

2013 Histamine Receptor H4 Regulates Mast Cell Degranulation and IgE Induced FcεRI Upregulation in Murine Bone Marrow-Derived Mast Cells. *Cellular Immunology* 283(1-2): 38–44.

Möller, A, U Lippert, D Lessmann, et al.

1993 Human Mast Cells Produce IL-8. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 151(6): 3261–3266.

- Moulin, V  
1995 Growth Factors in Skin Wound Healing. *European Journal of Cell Biology* 68(1): 1–7.
- Mousli, M., C. Bronner, Y. Landry, J. Bockaert, and B. Rouot  
1990 Direct Activation of GTP-Binding Regulatory Proteins (G-Proteins) by Substance P and Compound 48/80. *FEBS Letters* 259(2): 260–262.
- Muramatsu, M, J Katada, M Hattori, I Hayashi, and M Majima  
2000 Chymase Mediates Mast Cell-Induced Angiogenesis in Hamster Sponge Granulomas. *European Journal of Pharmacology* 402(1-2): 181–191.
- Müsch, Werner, Anja K Wege, Daniela N Männel, and Thomas Hehlhans  
2008 Generation and Characterization of Alpha-Chymase-Cre Transgenic Mice. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 46(3): 163–166.
- Nabel, G, S J Galli, A M Dvorak, H F Dvorak, and H Cantor  
1981 Inducer T Lymphocytes Synthesize a Factor That Stimulates Proliferation of Cloned Mast Cells. *Nature* 291(5813): 332–334.
- Nakagami, Gojiro, Takeo Minematsu, Mayumi Asada, et al.  
2011 The *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum-Sensing Signal N-(3-Oxododecanoyl) Homoserine Lactone Can Accelerate Cutaneous Wound Healing through Myofibroblast Differentiation in Rats. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 62(2): 157–163.
- Nakano, T., T. Sonoda, C. Hayashi, et al.  
1985 Fate of Bone Marrow-Derived Cultured Mast Cells after Intracutaneous, Intraperitoneal, and Intravenous Transfer into Genetically Mast Cell-Deficient W/W<sup>v</sup> Mice. Evidence That Cultured Mast Cells Can Give Rise to Both Connective Tissue Type and Mucosal Mast Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 162(3): 1025–1043.
- Nardo, Anna Di, Antonella Vitiello, and Richard L. Gallo  
2003 Cutting Edge: Mast Cell Antimicrobial Activity Is Mediated by Expression of Cathelicidin Antimicrobial Peptide. *The Journal of Immunology* 170(5): 2274–2278.
- Di Nardo, Anna, Kenshi Yamasaki, Robert A Dorschner, Yuping Lai, and Richard L Gallo  
2008 Mast Cell Cathelicidin Antimicrobial Peptide Prevents Invasive Group A *Streptococcus* Infection of the Skin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180(11): 7565–7573.
- Nemolato, S, T Cabras, M U Fanari, et al.  
2010 Thymosin Beta 4 Expression in Normal Skin, Colon Mucosa and in Tumor Infiltrating Mast Cells. *European Journal of Histochemistry: EJH* 54(1): e3.
- Ng, Michael FY  
2010 The Role of Mast Cells in Wound Healing. *International Wound Journal* 7(1): 55–61.
- Noli, C, and A Miolo  
2001 The Mast Cell in Wound Healing. *Veterinary Dermatology* 12(6): 303–313.
- Ochi, H, N H De Jesus, F H Hsieh, K F Austen, and J A Boyce  
2000 IL-4 and -5 Prime Human Mast Cells for Different Profiles of IgE-Dependent Cytokine Production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19): 10509–10513.

- Okayama, Y, P Bradding, J M Tunon-de-Lara, S T Holgate, and M K Church  
1995 Cytokine Production by Human Mast Cells. *Chemical Immunology* 61: 114–134.
- Okayama, Yoshimichi, Arnold S. Kirshenbaum, and Dean D. Metcalfe  
2000 Expression of a Functional High-Affinity IgG Receptor, FcγRI, on Human Mast Cells: Up-Regulation by IFN-γ. *The Journal of Immunology* 164(8): 4332–4339.
- Ommori, Rie, Noriko Ouji, Fumiko Mizuno, et al.  
2012 Selective Induction of Antimicrobial Peptides from Keratinocytes by Staphylococcal Bacteria. *Microbial Pathogenesis*.
- Ong, Peck Y, Takaaki Ohtake, Corinne Brandt, et al.  
2002 Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. *The New England Journal of Medicine* 347(15): 1151–1160.
- Orinska, Zane, Marcus Maurer, Farhad Mirghomizadeh, et al.  
2007 IL-15 Constrains Mast Cell-Dependent Antibacterial Defenses by Suppressing Chymase Activities. *Nature Medicine* 13(8): 927–934.
- Pardo, J, R Wallich, K Ebnet, et al.  
2007 Granzyme B Is Expressed in Mouse Mast Cells in Vivo and in Vitro and Causes Delayed Cell Death Independent of Perforin. *Cell Death and Differentiation* 14(10): 1768–1779.
- De Paulis, A, G Minopoli, E Arbustini, et al.  
1999 Stem Cell Factor Is Localized In, Released From, and Cleaved by Human Mast Cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 163(5): 2799–2808.
- Paus, Ralf, Theoharis C Theoharides, and Petra Clara Arck  
2006 Neuroimmunoendocrine Circuitry of the “Brain-Skin Connection.” *Trends in Immunology* 27(1): 32–39.
- Pejler, G  
1996 Lactoferrin Regulates the Activity of Heparin Proteoglycan-Bound Mast Cell Chymase: Characterization of the Binding of Heparin to Lactoferrin. *The Biochemical Journal* 320 ( Pt 3): 897–903.
- Peng, Qi, Ke Li, Steven H Sacks, and Wuding Zhou  
2009 The Role of Anaphylatoxins C3a and C5a in Regulating Innate and Adaptive Immune Responses. *Inflammation & Allergy Drug Targets* 8(3): 236–246.
- Peplow, Philip V, and Marissa P Chatterjee  
2013 A Review of the Influence of Growth Factors and Cytokines in in Vitro Human Keratinocyte Migration. *Cytokine* 62(1): 1–21.
- Persinger, M.a., Patricia Lepage, J.-P. Simard, and G.h. Parker  
1983 Mast Cell Numbers in Incisional Wounds in Rat Skin as a Function of Distance, Time and Treatment. *British Journal of Dermatology* 108(2): 179–187.
- Peschel, A, R W Jack, M Otto, et al.  
2001 Staphylococcus Aureus Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor MprF Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine. *The Journal of Experimental Medicine* 193(9): 1067–1076.

- Piliponsky, Adrian M, Ching-Cheng Chen, Eon J Rios, et al.  
 2012 The Chymase Mouse Mast Cell Protease 4 Degrades TNF, Limits Inflammation, and Promotes Survival in a Model of Sepsis. *The American Journal of Pathology* 181(3): 875–886.
- Pohlman, T H, K A Stanness, P G Beatty, H D Ochs, and J M Harlan  
 1986 An Endothelial Cell Surface Factor(s) Induced in Vitro by Lipopolysaccharide, Interleukin 1, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Increases Neutrophil Adherence by a CDw18-Dependent Mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136(12): 4548–4553.
- Poll, Tom van der, Christopher V. Keogh, Xavier Guirao, et al.  
 1997 Interleukin-6 Gene-Deficient Mice Show Impaired Defense against Pneumococcal Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 176(2): 439–444.
- Prodeus, A P, X Zhou, M Maurer, S J Galli, and M C Carroll  
 1997 Impaired Mast Cell-Dependent Natural Immunity in Complement C3-Deficient Mice. *Nature* 390(6656): 172–175.
- Recklinghausen, Dr F. v  
 1863 Ueber Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* 28(1-2): 157–197.
- Regan, M C, S J Kirk, H L Wasserkrug, and A Barbul  
 1991 The Wound Environment as a Regulator of Fibroblast Phenotype. *The Journal of Surgical Research* 50(5): 442–448.
- Ribatti, D, B Nico, N Finato, E Crivellato, and C A Beltrami  
 2009 Co-Localization of Tryptase and Cathepsin-G in Mast Cells in Cutaneous Mastocytosis. *Cancer Letters* 279(2): 209–212.
- Roberts-Thomson, Ian C, James Fon, Wendy Uylaki, Adrian G Cummins, and Simon Barry  
 2011 Cells, Cytokines and Inflammatory Bowel Disease: A Clinical Perspective. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 5(6): 703–716.
- Rodewald, H R, M Dessing, A M Dvorak, and S J Galli  
 1996 Identification of a Committed Precursor for the Mast Cell Lineage. *Science (New York, N.Y.)* 271(5250): 818–822.
- Rodriguez, Annette R, Jieh-Juen Yu, M Neal Guentzel, et al.  
 2012 Mast Cell TLR2 Signaling Is Crucial for Effective Killing of *Francisella Tularensis*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188(11): 5604–5611.
- Rodriguez, Paola G, Frances N Felix, David T Woodley, and Elisabeth K Shim  
 2008 The Role of Oxygen in Wound Healing: A Review of the Literature. *Dermatologic Surgery: Official Publication for American Society for Dermatologic Surgery [et Al.]* 34(9): 1159–1169.
- Rönnerberg, Elin, Gabriela Calounova, Bengt Guss, Anders Lundequist, and Gunnar Pejler  
 2013 Granzyme D Is a Novel Murine Mast Cell Protease That Is Highly Induced by Multiple Pathways of Mast Cell Activation. *Infection and Immunity* 81(6): 2085–2094.
- Rosenkranz, A R, A Coxon, M Maurer, et al.  
 1998 Impaired Mast Cell Development and Innate Immunity in Mac-1 (CD11b/CD18, CR3)-Deficient Mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161(12): 6463–6467.

Rothe, M J, M Nowak, and F A Kerdel

1990 The Mast Cell in Health and Disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* 23(4 Pt 1): 615–624.

Rubinchik, E, and F Levi-Schaffer

1994 Mast Cells and Fibroblasts: Two Interacting Cells. *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 24(3): 139–142.

Sabiston, D.

1997 *Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*, vol.15. St. Louis.

Salazar-Gonzalez, Rosa Maria, and Stephen J McSorley

2005 Salmonella Flagellin, a Microbial Target of the Innate and Adaptive Immune System. *Immunology Letters* 101(2): 117–122.

Santos, Pedro Paulo de Andrade, Cassiano Francisco Weege Nonaka, Leão Pereira Pinto, and Lélia Batista de Souza

2011 Immunohistochemical Expression of Mast Cell Tryptase in Giant Cell Fibroma and Inflammatory Fibrous Hyperplasia of the Oral Mucosa. *Archives of Oral Biology* 56(3): 231–237.

Schäfer, Beatrix, Adrian M Piliponsky, Tatsuya Oka, et al.

2013 Mast Cell Anaphylatoxin Receptor Expression Can Enhance IgE-Dependent Skin Inflammation in Mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131(2): 541–548.e1–9.

Scheffer, J, K Vosbeck, and W König

1986 Induction of Inflammatory Mediators from Human Polymorphonuclear Granulocytes and Rat Mast Cells by Haemolysin-Positive and -Negative E. Coli Strains with Different Adhesins. *Immunology* 59(4): 541–548.

Schmitt, E, B Fassbender, K Beyreuther, et al.

1987 Characterization of a T Cell-Derived Lymphokine That Acts Synergistically with IL 3 on the Growth of Murine Mast Cells and Is Identical with IL 4. *Immunobiology* 174(4-5): 406–419.

Schröder, Jens-Michael, and Jürgen Harder

2006 [Innate Antimicrobial Peptides in the Skin]. *Médecine Sciences: M/S* 22(2): 153–157.

Schumann, Ralf R

2011 Old and New Findings on Lipopolysaccharide-Binding Protein: A Soluble Pattern-Recognition Molecule. *Biochemical Society Transactions* 39(4): 989–993.

Scudamore, C L, L McMillan, E M Thornton, et al.

1997 Mast Cell Heterogeneity in the Gastrointestinal Tract: Variable Expression of Mouse Mast Cell Protease-1 (mMCP-1) in Intraepithelial Mucosal Mast Cells in Nematode-Infected and Normal BALB/c Mice. *The American Journal of Pathology* 150(5): 1661–1672.

Segal, Anthony W

2005 How Neutrophils Kill Microbes. *Annual Review of Immunology* 23: 197–223.

Serhan, Charles N, and Nan Chiang

2004 Novel Endogenous Small Molecules as the Checkpoint Controllers in Inflammation and Resolution: Entrée for Resoleomics. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 30(1): 69–95.



- Shaker, Soad Ali, Nasra Naeim Ayuob, and Nahid Hassan Hajrah  
 2011 Cell Talk: A Phenomenon Observed in the Keloid Scar by Immunohistochemical Study. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM / Official Publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 19(2): 153–159.
- Sheen, C. H., R. P. Schleimer, and M. Kulka  
 2007 Codeine Induces Human Mast Cell Chemokine and Cytokine Production: Involvement of G-Protein Activation. *Allergy* 62(5): 532–538.
- Shimizu, Yuri, Hitomi Fujishiro, Kanako Matsumoto, et al.  
 2011 Chronic Exposure to Arsenite Induces S100A8 and S100A9 Expression in Rat RBL-2H3 Mast Cells. *The Journal of Toxicological Sciences* 36(1): 135–139.
- Shin, Dongmin, and Kyung Won Minn  
 2004 The Effect of Myofibroblast on Contracture of Hypertrophic Scar. *Plastic and Reconstructive Surgery* 113(2): 633–640.
- Siebenhaar, Frank, Wolfgang Syska, Karsten Weller, et al.  
 2007 Control of *Pseudomonas Aeruginosa* Skin Infections in Mice Is Mast Cell-Dependent. *The American Journal of Pathology* 170(6): 1910–1916.
- Simon, D, H U Simon, and S Yousefi  
 2013 Extracellular DNA Traps in Allergic, Infectious, and Autoimmune Diseases. *Allergy* 68(4): 409–416.
- Singh, Leena K., Xinzhu Pang, Nicholas Alexacos, Richard Letourneau, and Theoharis C. Theoharides  
 1999 Acute Immobilization Stress Triggers Skin Mast Cell Degranulation via Corticotropin Releasing Hormone, Neurotensin, and Substance P: A Link to Neurogenic Skin Disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 13(3): 225–239.
- Smola, H, G Thiekötter, and N E Fusenig  
 1993 Mutual Induction of Growth Factor Gene Expression by Epidermal-Dermal Cell Interaction. *The Journal of Cell Biology* 122(2): 417–429.
- Von Stebut, Esther, Martin Metz, Genevieve Milon, Jürgen Knop, and Marcus Maurer  
 2003 Early Macrophage Influx to Sites of Cutaneous Granuloma Formation Is Dependent on MIP-1alpha /beta Released from Neutrophils Recruited by Mast Cell-Derived TNFalpha. *Blood* 101(1): 210–215.
- Steinwede, Kathrin, Regina Maus, Jennifer Bohling, et al.  
 2012 Cathepsin G and Neutrophil Elastase Contribute to Lung-Protective Immunity against Mycobacterial Infections in Mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188(9): 4476–4487.
- Strbian, Daniel, Marja-Liisa Karjalainen-Lindsberg, Turgut Tatlisumak, and Perttu J Lindsberg  
 2006 Cerebral Mast Cells Regulate Early Ischemic Brain Swelling and Neutrophil Accumulation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26(5): 605–612.
- Supajatura, V, H Ushio, A Nakao, et al.  
 2001 Protective Roles of Mast Cells against Enterobacterial Infection Are Mediated by Toll-like Receptor 4. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167(4): 2250–2256.

Sutherland, Rachel E, Joanna S Olsen, Andrew McKinstry, S Armando Villalta, and Paul J Wolters  
2008 Mast Cell IL-6 Improves Survival from Klebsiella Pneumonia and Sepsis by Enhancing Neutrophil Killing. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 181(8): 5598–5605.

Takagi, M, K Koike, and T Nakahata  
1990 Antiproliferative Effect of IFN-Gamma on Proliferation of Mouse Connective Tissue-Type Mast Cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 145(6): 1880–1884.

Takeuchi, O, K Hoshino, T Kawai, et al.  
1999 Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components. *Immunity* 11(4): 443–451.

Taylor, Marcia L., and Dean D. Metcalfe  
2001 Mast Cells in Allergy and Host Defense. *Allergy and Asthma Proceedings* 22(3): 115–119.

Theoharides, Theoharis C., Duraisamy Kempuraj, Michael Tagen, Pio Conti, and Dimitris Kalogeromitros  
2007 Differential Release of Mast Cell Mediators and the Pathogenesis of Inflammation. *Immunological Reviews* 217(1): 65–78.

Trapani, J A  
2001 Granzymes: A Family of Lymphocyte Granule Serine Proteases. *Genome Biology* 2(12): REVIEWS3014.

Tsai, M, L S Shih, G F Newlands, et al.  
1991 The Rat c-Kit Ligand, Stem Cell Factor, Induces the Development of Connective Tissue-Type and Mucosal Mast Cells in Vivo. Analysis by Anatomical Distribution, Histochemistry, and Protease Phenotype. *The Journal of Experimental Medicine* 174(1): 125–131.

Tucker, Tracy, Vincent M Riccardi, Margaret Sutcliffe, et al.  
2011 Different Patterns of Mast Cells Distinguish Diffuse from Encapsulated Neurofibromas in Patients with Neurofibromatosis 1. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 59(6): 584–590.

Ujiie, Hideyuki, Wataru Nishie, and Hiroshi Shimizu  
2012 Pathogenesis of Bullous Pemphigoid. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 32(2): 207–215, v.

Valencia, Isabel C, Robert S Kirsner, and Francisco A Kerdel  
2004 Microbiologic Evaluation of Skin Wounds: Alarming Trend toward Antibiotic Resistance in an Inpatient Dermatology Service during a 10-Year Period. *Journal of the American Academy of Dermatology* 50(6): 845–849.

Valent, P  
1995 Cytokines Involved in Growth and Differentiation of Human Basophils and Mast Cells. *Experimental Dermatology* 4(4 Pt 2): 255–259.

Verbsky, J W, P K McAllister, and D G Malone  
1996 Mast Cell Activation in Human Synovium Explants by Calcium Ionophore A23187, Compound 48/80, and Rabbit IgG Anti-Human IgE, but Not Morphine Sulfate. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 45(1): 35–41.

- Walsh, L J, G Trinchieri, H A Waldorf, D Whitaker, and G F Murphy  
1991 Human Dermal Mast Cells Contain and Release Tumor Necrosis Factor Alpha, Which Induces Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(10): 4220–4224.
- Wang, Zhenping, Yuping Lai, Jamie J Bernard, et al.  
2012 Skin Mast Cells Protect Mice against Vaccinia Virus by Triggering Mast Cell Receptor S1PR2 and Releasing Antimicrobial Peptides. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 188(1): 345–357.
- Warner, J A, and C Kroegel  
1994 Pulmonary Immune Cells in Health and Disease: Mast Cells and Basophils. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 7(7): 1326–1341.
- Wasserman, S I  
1990 Mast Cell Biology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86(4 Pt 2): 590–593.
- Wastling, J M, C L Scudamore, E M Thornton, G F Newlands, and H R Miller  
1997 Constitutive Expression of Mouse Mast Cell Protease-1 in Normal BALB/c Mice and Its up-Regulation during Intestinal Nematode Infection. *Immunology* 90(2): 308–313.
- Weber, A, J Knop, and M Maurer  
2003 Pattern Analysis of Human Cutaneous Mast Cell Populations by Total Body Surface Mapping. *The British Journal of Dermatology* 148(2): 224–228.
- Welker, P, J Grabbe, B Gibbs, T Zuberbier, and B M Henz  
1999 Human Mast Cells Produce and Differentially Express Both Soluble and Membrane-Bound Stem Cell Factor. *Scandinavian Journal of Immunology* 49(5): 495–500.
- Welle, M.  
1997 Development, Significance, and Heterogeneity of Mast Cells with Particular Regard to the Mast Cell-Specific Proteases Chymase and Trypsin. *Journal of Leukocyte Biology* 61(3): 233–245.
- Weller, Charlotte L, Sarah J Collington, Tim Williams, and Jonathan R Lamb  
2011 Mast Cells in Health and Disease. *Clinical Science* (London, England: 1979) 120(11): 473–484.
- Weller, Karsten, Kerstin Foitzik, Ralf Paus, Wolfgang Syska, and Marcus Maurer  
2006 Mast Cells Are Required for Normal Healing of Skin Wounds in Mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(13): 2366–2368.
- Wershil, B K, I Castagliuolo, and C Pothoulakis  
1998 Direct Evidence of Mast Cell Involvement in Clostridium Difficile Toxin A-Induced Enteritis in Mice. *Gastroenterology* 114(5): 956–964.
- Wershil, B K, C M Theodos, S J Galli, and R G Titus  
1994 Mast Cells Augment Lesion Size and Persistence during Experimental Leishmania Major Infection in the Mouse. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 152(9): 4563–4571.

- Wershil, B K, Z S Wang, J R Gordon, and S J Galli  
1991 Recruitment of Neutrophils during IgE-Dependent Cutaneous Late Phase Reactions in the Mouse Is Mast Cell-Dependent. Partial Inhibition of the Reaction with Antiserum against Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Journal of Clinical Investigation* 87(2): 446–453.
- Wesolowski, Jordan, Vernon Caldwell, and Fabienne Paumet  
2012 A Novel Function for SNAP29 (synaptosomal-Associated Protein of 29 kDa) in Mast Cell Phagocytosis. *PLoS One* 7(11): e49886.
- Westin, U, A Polling, I Ljungkrantz, and K Ohlsson  
1999 Identification of SLPI (secretory Leukocyte Protease Inhibitor) in Human Mast Cells Using Immunohistochemistry and in Situ Hybridisation. *Biological Chemistry* 380(4): 489–493.
- Williams, C M, and J W Coleman  
1995 Induced Expression of mRNA for IL-5, IL-6, TNF-Alpha, MIP-2 and IFN-Gamma in Immunologically Activated Rat Peritoneal Mast Cells: Inhibition by Dexamethasone and Cyclosporin A. *Immunology* 86(2): 244–249.
- Williams, C M, and S J Galli  
2000 The Diverse Potential Effector and Immunoregulatory Roles of Mast Cells in Allergic Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105(5): 847–859.
- Witte, M B, and A Barbul  
1997 General Principles of Wound Healing. *The Surgical Clinics of North America* 77(3): 509–528.
- Witte, Maria B, and Adrian Barbul  
2002 Role of Nitric Oxide in Wound Repair. *American Journal of Surgery* 183(4): 406–412.
- Xia, Y P, Y Zhao, J Marcus, et al.  
1999 Effects of Keratinocyte Growth Factor-2 (KGF-2) on Wound Healing in an Ischaemia-Impaired Rabbit Ear Model and on Scar Formation. *The Journal of Pathology* 188(4): 431–438.
- Yager, D R, and B C Nwomeh  
1999 The Proteolytic Environment of Chronic Wounds. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 7(6): 433–441.
- Yang, Chengbin, Xucheng Mo, Jingzhang Lv, et al.  
2012 Lipopolysaccharide Enhances FcεRI-Mediated Mast Cell Degranulation by Increasing Ca<sup>2+</sup> Entry through Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels: Implications for Lipopolysaccharide Exacerbating Allergic Asthma. *Experimental Physiology* 97(12): 1315–1327.
- Younan, George, Freeman Suber, Wei Xing, et al.  
2010 The Inflammatory Response after an Epidermal Burn Depends on the Activities of Mouse Mast Cell Proteases 4 and 5. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185(12): 7681–7690.
- Zobel, Katrin, Peter Martus, Mathias W Pletz, et al.  
2012 Interleukin 6, Lipopolysaccharide-Binding Protein and Interleukin 10 in the Prediction of Risk and Etiologic Patterns in Patients with Community-Acquired Pneumonia: Results from the German Competence Network CAPNETZ. *BMC Pulmonary Medicine* 12: 6.

## 6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniel Tröltzsch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss der Mastzelle auf die kutane Wundheilung *Pseudomonas aeruginosa* infizierter Hautwunden“ 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 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.

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

Datum

---

Unterschrift

## **7. Curriculum Vitae**

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

## 8. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all den lieben Menschen, die mich mit viel Geduld, Ratschlägen, Hilfestellungen, Ideen, aber auch mit produktiver Kritik und nicht zuletzt mit ihrer positiven Lebenseinstellung und der Freude an der Forschung bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

**Prof. Dr. med. Marcus Maurer**, der wahrscheinlich sympathischste und charismatischste Professor der Republik, für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und für all die Unterstützung, die er mir auf dem Weg meiner Promotion hat zukommen lassen.

**Dr. med. Frank Siebenhaar**, mein direkter Betreuer und Vertrauter, der mich in jeder einzelnen Phase meiner Promotion mit großem Engagement unterstützt hat. Nicht zuletzt unserem unkomplizierten und freundschaftlichen Verhältnis, gepaart mit seiner enormen fachlichen Kompetenz, ist es zu verdanken, dass ich diese Arbeit so erfolgreich zum Abschluss bringen konnte.

**Carolin Sieber**, eine überaus talentierte Molekular-Medizinerin, ohne die das gesamte Projekt schlichtweg nicht möglich gewesen wäre. Angefangen beim Erlernen diverser Labortechniken, über die Planung und Durchführung verschiedener Experimente, bis hin zur finalen Korrektur konnte ich ausnahmslos auf ihre Unterstützung bauen. Caro, somit wird der „kleine Mediziner“ wohl immer in deiner Schuld stehen.

Zudem danke ich natürlich dem gesamten **Team der Arbeitsgruppe Maurer** für all die Ratschläge und die gute Zusammenarbeit. Danke, **Prof. Martin Metz, Evelyn** (besonders für die Unterstützung bei der Histologie), **Sina und Andrey**, um hier nur einige Namen zu nennen.

Zu guter Letzt gilt mein Dank natürlich meiner geliebten **Familie**, die mich immer aufopferungsvoll bei allem „Unsinn“, wenn auch mit zeitweiligem Unverständnis, unterstützt hat.

Dies gilt ebenso für meine guten **Freunde, Pin Gă und Louise**, ohne all jene das Leben nur halb so bunt wäre. Schön, dass es EUCH gibt.

*Lebe, wie du wünschen wirst gelebt zu haben, wenn du stirbst!*

*nach C.F. Gellert*