

---

## 2. Literatur

### 2.1. Entdeckung

Mastzellen wurden vor mehr als 100 Jahren von Paul EHRLICH im Bindegewebe des Menschen entdeckt (EHRLICH, 1878 und 1879). Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihrer charakteristischen, das Zytoplasma nahezu ausfüllenden, metachromatisch anfärbbaren Granula. EHRLICH beschrieb sie als "gemästete" Zellen. Seitdem sind sie im Bindegewebe von Säugetieren, Fischen, Reptilien und Vögeln nachgewiesen worden (zusammengefaßt in RILEY, 1959; SELYE, 1965).

### 2.2. Herkunft und Entwicklung

Die Herkunft der Mastzellen war lange Zeit unklar. Es wurde vermutet, dass sie sich aus T-Lymphozyten, Fibroblasten oder mononukleären Phagozyten entwickeln (BURNET, 1977; ZUCKER-FRANKLIN et al., 1981; CZARNETZKI et al., 1982). Seit den Untersuchungen von KITAMURA et al. (1978) weiß man, dass Mastzellen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks abstammen. 1991 haben KIRSHENBAUM et al. gezeigt, dass die Mastzellen des Menschen von CD34+ Progenitoren des Knochenmarks abstammen.

Im Gegensatz zu anderen Abkömmlingen der pluripotenten Stammzellen, beenden Mastzellen ihre Differenzierung jedoch nicht im hämatopoetischen Gewebe. Im Blut sind deshalb auch keine reifen Mastzellen, sondern nur morphologisch nicht identifizierbare Vorläuferzellen der Mastzellen nachweisbar. Diese wandern in das Bindegewebe ein und differenzieren sich hier zu morphologisch identifizierbaren Mastzellen (KITAMURA et al. 1987; PEARCE, 1986). Im Gegensatz zu anderen ausgereiften hämatopoetischen Zellen besitzen Mastzellen noch proliferatives Potential (KURIU et al., 1989).

Mukosamastzellen von Ratte und Maus benötigen zur Proliferation und Differenzierung bestimmte, von T-Lymphozyten freigesetzte Faktoren (RUITENBERG und ELGERSMA, 1976). Der wichtigste Mastzell-Wachstumsfaktor ist Interleukin 3 (IL-3). IL-4, -9 und -10 haben einen unterstützenden Effekt (KITAMURA et al., 1993; IHLE et al., 1983; SMITH und RENNICK, 1986; HÜLTNER et al., 1989 und 1990; THOMPSON-SNIPES et al., 1990). Die Bindegewebsmastzellen dagegen brauchen für ihre Entwicklung Wachstumsfaktoren, die von Fibroblasten produziert werden. Der wichtigste Faktor ist hierbei der von Fibroblasten produzierte SCF (stem cell factor) (KITAMURA et al., 1993).

Die CD34+ Progenitoren der Mastzellen des Menschen benötigen für ihre Proliferation und Differenzierung ebenfalls SCF (ZSEBO et al., 1990; MITSUI et al., 1993). Werden sie mit Zellkulturüberständen von 3T3 Fibroblasten alleine oder zusammen mit IL-3 oder mit

Zellkulturüberständen einer Mastozytose-Zelllinie kultiviert, wird die Differenzierung in die verschiedenen Mastzellsubtypen induziert (FURITSU et al., 1989; KIRSHENBAUM et al., 1991 und 1992; LI et al., 1996).

Untersuchungen über die Verteilung von Mastzellsubtypen in entzündetem Gewebe und Beobachtungen an Patienten mit Immunschwäche sprechen dafür, dass bei der Entwicklung der T-Mastzellen des Menschen T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen (IRANI et al., 1987a; HARVIMA et al., 1990; VALDIMARSON et al., 1986; IRANI und SCHWARTZ, 1994).

### **2.3. Morphologie und Histochemie**

Mastzellen sind runde bis langgestreckte Zellen mit einem Durchmesser von ca. 10-20 µm. Ihre Zellform ist an das umgebende Gewebe angepaßt. Im lockeren Bindegewebe sind sie eher rund bis oval, im kollagenen Bindegewebe und um Blutgefäße eher langgestreckt. Sie haben einen runden oder ovalen bis nierenförmigen Kern und zytoplasmatische Granula. Diese Mastzellgranula färben sich typischerweise metachromatisch (EHRlich, 1878; ENERBÄCK, 1966a und b).

Die Metachromasie entsteht durch Bindung kationischer Farbstoffmoleküle an die anionischen Polymere in den Mastzellgranula, wodurch sich die Farbe verändert. Der anionische Komplex besteht aus einem basischen Proteinkern, an den Heparin oder ein verwandtes Glykosaminoglykan gebunden ist (PEARCE, 1986).

### **2.4. Mastzellinhaltsstoffe**

Mastzellen werden anhand der in ihren Granula synthetisierten und gespeicherten Inhaltsstoffe identifiziert und charakterisiert. Es werden drei Gruppen von Mastzellmediatoren unterschieden: präformierte Mediatoren, nach einer Mastzellaktivierung neu synthetisierte Mediatoren und Mastzellzytokine, welche teilweise schon präformiert in den Granula gespeichert vorliegen und teilweise erst nach Mastzellaktivierung neu produziert werden. Einen Überblick über die Mastzell-Mediatoren gibt die Tabelle 1 (Seite 5).

Tab. 1 Mastzell-Mediatoren bei Ratte, Maus, Mensch und Hund

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| <b>1.</b> | <b>Präformierte Mediatoren</b>  |   |
| 1.1       | Proteoglykane:  |   |
|           | Heparin,<br>Chondroitinsulfat A,<br>Chondroitinsulfat Di-B,<br>Chondroitinsulfat E  | TAS und BERNDSEN, 1977; ENERBÄCK et al., 1985;<br>STEVENS et al., 1986b (Ratte)<br>RAZIN et al., 1983; SERAFIN et al., 1986 (Maus)<br>METCALF et al., 1980; SCHWARTZ, 1994; THOMPSON et al., 1988<br>(Mensch)   |
| 1.2       | neutrale Proteasen:   |   |
|           | Tryptase,<br>Chymase,<br>Carboxypeptidase,<br>Cathepsin G   | GLENNER und COHEN, 1960 (allgemein)<br>EVERITT und NEURATH, 1980; KIDO et al., 1985 (Ratte)<br>SERAFIN et al., 1987 (Maus)<br>HRP MILLER et al., 1989 (Ratte und Maus)<br>IRANI et al., 1986; SCHWARTZ et al., 1981a und 1987a;<br>GOLDSTEIN et al., 1987; SCHECHTER et al., 1990 (Mensch)<br>CAUGHEY et al., 1987 und 1988b; SCHECHTER et al., 1988 (Hund) |
| 1.3       | biogene Amine   |   |
|           | Histamin,<br>Serotonin,   | BEFUS et al., 1982; PEARCE et al., 1984 (Ratte)<br>FLINT et al., 1985 (Mensch)<br>BENDITT et al., 1963 (allgemein)  |
| 1.4       | saure Hydrolasen  | PUGH und WALKER, 1961 (allgemein)<br>SCHWARTZ et al., 1981b (Mensch)  |
| <b>2.</b> | <b>neu synthetisierte Mediatoren</b>  |   |
|           | Leukotriene (LT),<br>Prostaglandine (PG),<br>Thrombozyten- aggregierender<br>Faktor   | HEAVY et al., 1988 (Ratte)<br>MURPHY et al., 1979; RAZIN et al., 1983 (Maus)<br>SCHWARTZ und AUSTEN, 1984 (Mensch)<br>THOMAS et al., 1992; MENGLUNG et al., 1993 (Hund)   |
| <b>3.</b> | <b>Mastzellzytokine</b>   |   |
|           | Interleukine,<br>Tumor-Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),<br>Granulocyte macrophage-colony<br>stimulating Factor (GM-CSF),<br>Macrophage inflammatory<br>protein-1 (MIP-1),<br>Transforming growth factor- $\beta$<br>(TGF- $\beta$ ),<br>Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) | Übersichten in<br>GORDON et al., 1990;<br>BRADDING et al., 1995;  |

Auf die wichtigsten Charakteristika und Funktionen aller Mastzellmediatoren kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Im Folgenden sollen nur die Proteoglykane und neutralen Proteasen besprochen werden, da diese in der anschließend vorgestellten Untersuchung als Kriterien für die Identifizierung und Charakterisierung der Mastzellen des Hundes verwendet worden sind.

### 2.4.1 Proteoglykane

Proteoglykane bestehen aus einem zentralen basischen Proteinkern und daran gebundenen Seitenketten aus für das jeweilige Proteoglykan charakteristischen Glykosaminoglykanen. Die wichtigsten Glykosaminoglykane sind Heparin und Chondroitinsulfat. Nach ihrer Freisetzung können die Proteoglykane die Aktivität (SCHICK und AUSTEN, 1986), die Stabilität, die Diffusionsrate und die Substratspezifität der beiden Haupt-Mastzellproteasen Tryptase und Chymase beeinflussen (SERAFIN et al., 1986; LE TRONG et al., 1987; SCHWARTZ und

BRADFORD, 1986; SAYAMA et al., 1987). Proteoglykane können histochemisch durch Bindung von metachromatischen oder nicht-metachromatischen Farbstoffen an ihre Sulfat- und Carboxylgruppen dargestellt werden (ENERBÄCK et al. 1986). Zu den metachromatischen Farbstoffen gehören Thiazinfarbstoffe wie Toluidinblau und Methyleneblau sowie Giemsa (ROMEIS, 1989), zu den nicht-metachromatischen Farbstoffen gehören Alzianblau, Astrablau, Avidin, Berberinsulfat und Safranin (ENERBÄCK 1966a; OSBORNE et al., 1989).

### 2.4.2 Mastzellspezifische neutrale Proteasen

Die in den Mastzellgranula gespeicherten Proteasen sind serine Proteine, welche nach der Mastzellaktivierung in katalytisch aktiver Form freigesetzt werden (CAUGHEY et al., 1988a; SCHWARTZ, 1990a). Zu den wichtigsten Mastzellproteasen gehören *Tryptase* und *Chymase*, daneben *Carboxypeptidase* und *Cathepsin G* (IRANI et al., 1989a und 1991; SCHECHTER et al., 1990). Enzym- und immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass Tryptase und Chymase in biologisch relevanten Mengen nur in Mastzellen vorkommen (SCHWARTZ, 1985; SCHECHTER et al., 1986 und 1988; IRANI et al., 1986; CASTELLS et al., 1987).

Sie werden in hoher Konzentration intrazellulär in den sekretorischen Granula und hier, in nicht-kovalenter Bindung an Proteoglykane gebunden, gespeichert (SCHWARTZ et al., 1981a und c; SERAFIN et al., 1986).

Immunologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Tryptase und Chymase aus Hautmastzellen und Mastzelltumoren des Hundes mit den entsprechenden Enzymen des Menschen kreuzreagieren (SCHECHTER et al., 1988). Beide Proteasen sind immunologisch näher mit den jeweils entsprechenden Proteasen des Menschen verwandt, als untereinander oder mit denen der Ratte (CAUGHEY et al., 1987, 1988b und 1990; SCHECHTER et al., 1988; VANDERSLICE et al., 1989; J.S. MILLER et al., 1989).

Die Immunreaktivität beider Proteasen ist geringer, wenn das Gewebe in Formalin und nicht in Carnoy fixiert ist (CRAIG et al., 1986 (Tryptase); SCHECHTER et al., 1986; IRANI et al., 1987a und ALDENBORG und ENERBÄCK, 1994 (Chymase)). Für Tryptase trifft dies im Dünndarm und in der Lunge, nicht aber in der Haut zu (CRAIG et al., 1986).

### Tryptase

Tryptase ist eine serine Protease mit trypsin-ähnlicher Substratspezifität (HOPUSU und GLENNER, 1963). Sie wird als aktives Enzym gespeichert und freigesetzt (SCHWARTZ et al., 1981b; CAUGHEY et al., 1988a). Die Tryptase der Mastzellen des Menschen ist wie die des Hundes ein Tetramer, welches aus vier - in nicht-kovalenter Bindung miteinander verbundenen - Untereinheiten besteht (SCHWARTZ et al., 1981a; CAUGHEY et al., 1987; SCHECHTER et al., 1988). Das relative Molekulargewicht ( $M_r$ ) des gesamten Enzyms beträgt beim Menschen 120.000  $M_r$  (FRÄKI und HOPUSU-HAVU, 1975; HARVIMA et al., 1988a) bzw. 134.000  $M_r$  (2 x 33.000  $M_r$  + 2 x 34.000  $M_r$ ) (SCHWARTZ et al., 1981a), beim Hund ~132.000  $M_r$  (4 x 30.000  $M_r$  - 32.000  $M_r$ ) bzw. ~140.000  $M_r$  (CAUGHEY et al., 1987; SCHECHTER et al., 1988). Nur das intakte Tetramer ist enzymatisch aktiv. Die Dissoziation in inaktive Monomere wird durch die Bindung an Heparin verhindert (SCHWARTZ und

BRADFORD, 1986). Der Zerfall in inaktive Monomere wird durch bivalente Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  (ALTER et al., 1989) und durch Heparin-bindende Proteine wie Antithrombin III (ALTER et al., 1990) ausgelöst. Bei der Rattentryptase, einem Tetramer, dessen Untereinheiten ein Molekulargewicht von 30 und 40 kD haben, fehlt dagegen diese Stabilisierung durch Heparin (BRAGANZA und SIMMONS, 1991).

Mit Hilfe von DNA-Analysen können inzwischen sowohl inter- als auch intraspezifische Unterschiede zwischen den vorkommenden Tryptasen nachgewiesen werden. So können beim Menschen vier verschiedene Monomere ( $\alpha$ , I, II/ $\beta$  und III), beim Hund zwei verschiedene Monomere unterschieden werden (J.S. MILLER et al., 1989; VANDERSLICE et al., 1990) (CAUGHEY et al., 1987). Bei der Maus werden die beiden Tryptasen (MMCP 6 und 7) unterschieden (REYNOLDS et al., 1991; McNEIL et al., 1992).

Die dog mast cell protease-3 (dMCP-3) stimmt in ihrer Aminosäuren-Sequenz zu 49% mit der Tryptase des Hundes überein (VANDERSLICE et al., 1989) und ist ein offensichtlich ebenfalls an Heparin gebundenes Oligomer (CAUGHEY, 1995) mit einem Molekulargewicht von je  $\sim 36$  kD (YEZZI et al., 1994). Bei der Ratte ist bisher eine Tryptase nachgewiesen worden (KIDO et al., 1985; BRAGANZA und SIMMONS, 1991; CHEN et al., 1993).

Die Tryptase des Menschen und des Hundes ist gegenüber der Inaktivierung durch die im Plasma, in der Lunge und im Urin vorhandenen klassischen Inhibitoren seriner Esterasen, wie dem  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor resistent (FRÄKI und HOPUSU-HAVU, 1975; SCHWARTZ et al., 1981a; CAUGHEY et al., 1987; HARVIMA et al., 1988a; ALTER et al., 1990). Im Gegensatz zu anderen serinen Proteasen ist sie auch durch Limabohnen-, Sojabohnen- und Ovomuroid Trypsin Inhibitoren nicht zu inhibieren (ALTER et al., 1990). Sie kann jedoch bei Mensch und Hund durch niedrigmolekulare Substanzen wie Leupeptin und Diisopropyl-Fluorophosphat (DFP) (ALTER et al., 1990), Benzamidin und seine Derivate (STÜRZEBECKER et al., 1992; Caughey et al., 1988a) gehemmt werden. Inhibitoren der Tryptaseaktivität sind beim Menschen unter anderem auch bivalente Ionen wie Kalzium (ALTER et al., 1989), beim Hund auch Aprotinin und Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon (TLCK) (CAUGHEY et al., 1988a und CAUGHEY, 1990). Hohe  $\text{NaCl}$ - und  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen inhibieren die Tryptase des Hundes reversibel (CAUGHEY et al., 1987).

Im Gegensatz zur Tryptase des Menschen und des Hundes ist die Tryptase aus Peritonealmastzellen der Ratte sowohl durch den Sojabohnen Trypsin Inhibitor als auch durch  $\alpha_1$ -Antitrypsin inhibierbar. Vergleichbar mit der Tryptase des Hundes wird die Tryptase aus Hautmastzellen der Ratte auch durch Aprotinin inhibiert (BRAGANZA und SIMMONS, 1991), während die Tryptase aus Hautmastzellen des Menschen durch Aprotinin nicht inhibiert wird (HARVIMA et al., 1988b).

## Chymase

Entdeckt und erstmals charakterisiert wurde die Chymase 1951 von GOMORI. Sie ist, wie Tryptase, eine kationische Serinprotease, die in nicht-kovalenter Bindung an anionische, sulfatierte Proteoglykane (bei Mensch und Hund Heparin) in den sekretorischen Granula der Mastzelle gebunden ist (SCHWARTZ et al., 1981c; SERAFIN et al., 1986; SAYAMA et al., 1987; GOLDSTEIN et al., 1992; SOMMERHOFF et al., 1992).

Zusammen mit diesen wird sie bei der Mastzelldegranulation freigesetzt (SCHWARTZ et al., 1981c; SERAFIN et al., 1986; CAUGHEY et al., 1988a). Im Gegensatz zu Tryptase liegt

Chymase als Monomer vor und ist auch in nicht gebundener Form aktiv (SAYAMA et al., 1987). Ihr Molekulargewicht beträgt beim Menschen (FRÄKI und HOPUSU-HAVU, 1975; SCHECHTER et al., 1983) und beim Hund ~30 kD (CAUGHEY, 1990; (RAYMOND und CAUGHEY, 1989). Während die Chymase des Menschen (SCHECHTER et al., 1990) und des Hundes (RAYMOND und CAUGHEY, 1989; CAUGHEY et al., 1990) als Glykoprotein vorliegt, sind die verschiedenen Chymasen der Ratte nicht glykosyliert (WOODBURY et al., 1978b). Zwischen der Chymase aus Hautmastzellen des Menschen bzw. der Chymase des Hundes (CAUGHEY et al., 1987, 1988b, 1990; SCHECHTER et al., 1988; VANDERSLICE et al., 1989) und der rat mast cell protease (RMCP) I der Ratte besteht keine Kreuzreaktivität (SCHECHTER et al., 1983).

Auch bei der Chymase bestehen inter- und intraspeziesspezifische Strukturunterschiede zwischen den bisher nachgewiesenen Chymasen. Die speziesspezifischen Unterschiede bei den verschiedenen Chymasen sind jedoch größer als bei den Tryptasen.

So können bei der Maus fünf (SERAFIN et al., 1990 und 1991; REYNOLDS et al., 1990; HUANG et al., 1991), bei der Ratte zwei verschiedene Chymasen unterschieden werden (LAGUNOFF und BENDITT, 1963; WOODBURY et al., 1978a). Beim Menschen und beim Hund gibt es, nach dem jetzigen Kenntnisstand, jeweils nur eine Chymase (CAUGHEY et al., 1991; GOLDSTEIN und WINTROUB, 1993; Caughey, 1990).

Wie Tryptase und Carboxypeptidase weist Chymase sowohl Esterase- als auch Peptidase-Aktivität auf (GOLDSTEIN und WINTROUB, 1993).

Im Gegensatz zur Tryptase, wird die gereinigte Chymase des Hundes und des Menschen durch im Blutplasma vorhandene Inhibitoren ( $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor) (SCHECHTER et al., 1989), die des Hundes auch durch den Sojabohnen-Trypsin Inhibitor inaktiviert (CAUGHEY et al., 1988b). Alle Chymasen sind durch niedrigmolekulare Inhibitoren wie Cymostatin, L-1-Tosylamide-2-Phenyläthyl- Chlormethylketon (TPCK) und wie Tryptase durch Diisopropyl-Fluorophosphat (DFP) inaktivierbar (Caughey et al., 1988a; Caughey, 1990; WINTROUB et al., 1986). Die Resistenz der Hunde-Chymase gegenüber Aprotinin ist ein nützliches Charakteristikum, um sie vom neutrophilen Cathepsin G des Menschen, aber auch von der Hunde-Tryptase unterscheiden zu können (Caughey, 1990). Die aus Hautmastzellen des Menschen stammenden Proteasen Chymase und Tryptase werden dagegen beide nicht durch Aprotinin inhibiert (HARVIMA et al., 1988b und 1990).

Aufgrund der gemeinsamen Freisetzung von Tryptase, Chymase und Histamin wird vermutet, dass diese drei Mastzellmediatoren beim Menschen (CRAIG et al., 1988) und beim Hund (CAUGHEY et al., 1988a) in sekretorischen Granula gespeichert werden. Untersuchungen von GOLDSTEIN et al. (1992) sprechen dafür, dass Tryptase getrennt von Chymase und Carboxypeptidase synthetisiert und gespeichert wird. Auch CAUGHEY et al. (1988c) berichtet, dass in Mastzellen, die sowohl Chymase- als auch Tryptase-positive Granula enthielten, die beiden Proteasen meistens in verschiedenen Granula gespeichert wurden. Im Gegensatz dazu wiesen andere Untersucher beide neutralen Proteasen in ein und denselben Granula nach (CRAIG et al., 1988; IRANI und SCHWARTZ, 1994). WHITAKER-MENEZES et al. (1993) konnten mit Hilfe elektronenmikroskopischer

Untersuchungen zeigen, dass Tryptase, Chymase und Carboxypeptidase in unterschiedlichen Regionen ein und derselben Granula gespeichert werden.

## 2.5. Funktion

### 2.5.1 Biologische Bedeutung der Mastzellen allgemein

Mastzellen kommen in fast allen Organen und Geweben des Körpers vor und haben weitreichende, aufgrund ihrer Vielfältigkeit jedoch noch längst nicht vollständig geklärte Bedeutungen. Sie spielen bei einer breiten Vielfalt biologischer Prozesse und zwar sowohl physiologischer als auch immunologischer und pathologischer Art eine Rolle.

Prädisponiert für diese Funktionen sind sie aufgrund:

- ihrer exponierten Lage im Gewebe,
- der in ihrer Zellmembran lokalisierten IgE-Rezeptoren (METZGER und KINET, 1988) und
- der in ihren Granula gespeicherten Mediatoren.

Die höchste Mastzellendichte findet man in Geweben und Lokalisationen des Gewebes, die in direktem Kontakt zur Außenwelt stehen (PEARCE, 1986). Damit befinden sich Mastzellen in einer Position, in der sie leicht in Interaktion mit Antigenen und anderen Agentien treten können (PEARCE, 1986). Die Mastzellaktivierung kann durch Bindung von Immunglobulin E (IgE-abhängig), aber auch durch verschiedene andere Substanzen und Mechanismen (IgE-unabhängig) ausgelöst werden (ENERBÄCK und NORRBY, 1989; LAGUNOFF et al., 1983). Bei der anschließenden Mastzelldegranulation kommt es zur Freisetzung neu synthetisierter und/oder präformierter Mediatoren (ENERBÄCK und NORRBY, 1989; LAGUNOFF et al., 1983). Aufgrund der Vielfalt der Wirkung dieser Mastzell-Mediatoren spielen Mastzellen nicht nur in der Immunpathologie, sondern auch bei zahlreichen physiologischen Prozessen (siehe z.B. Übersichten in ROTHE et al., 1990 und HUNTLEY, 1992) eine wichtige Rolle. So sind sie z.B. von Bedeutung bei der Wundheilung (wegen ihres Effektes auf die Kollagenbildung, Gefäßpermeabilität und Angiogenese, siehe Übersicht in ROTHE et al., 1990), beim Knochengewebsumbau und bei der Homöostase vaskulärer, muskulärer, glandulärer und entzündlicher Funktionen (TAM, 1995) sowie bei der intestinalen Homöostase und Immunität, da sie über das Nervensystem Einfluß auf die Immunantwort nehmen (MARSHALL et al., 1989).

Mehr noch sind Mastzellen jedoch für ihre Beteiligung an immunpathologischen Reaktionen bekannt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunpathologie allergischer Reaktionen vom Soforttyp wie z.B. dem Bronchialasthma, der allergischen Rhinitis und der Urtikaria (Übersicht in PDAWER, 1978), sind aber auch bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (ASKENASE und VAN LOVEREN, 1983) beteiligt.

Die immunpathologischen Mechanismen sind bei beiden Reaktionen unterschiedlich: Während bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp die Mastzelldegranulation im Mittelpunkt steht, kommt es bei der Immunreaktion vom Spättyp zu einer Mastzellhyperplasie ohne Degranulation (BIENENSTOCK et al., 1986). Der Mastzellakkumulation geht eine T-

Lymphozytenaggregation voraus (LEMANSKE und KALINER, 1988).

Mastzellen sind auch an der Pathogenese verschiedener nicht allergischer Erkrankungen beteiligt (GALLI, 1993) wie z.B. bei der Narbengewebsbildung, insbesondere in Keloiden, bei der Kallusbildung, bei osteoporotischen Erkrankungen und verschiedenen peripheren Neuropathien (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990; BIENENSTOCK et al. 1986).

Mastzellen spielen auch eine Rolle bei entzündlichen Reaktionen wie interstitiellen Pneumonien, ulzerativer Kolitis, intestinalen Helminthosen (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990) und einzelnen Fällen ektodermaler Parasitosen. Auch im Zusammenhang mit der Pigmentspeicherung bei Fibrosen, der Infiltration von Tumoren, bei chronischer Bronchitis, zystischer Fibrose, atopischer Dermatitis und Psoriasis (SOMMERHOFF, 1995) und bei systemischer Mastozytose in Knochen, Gelenken, lymphatischen Geweben und im Darm (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990) wird von einer Mastzellbeteiligung berichtet. Während Mastzellen im Rahmen der Anaphylaxie lebensbedrohliche Wirkung haben können, können sie aber auch, wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, eine lebenserhaltende Funktion bei der Abwehr bakterieller Infekte haben (ECHTENACHER et al., 1996; MALAVIYA et al., 1996).

Wie bei den allergischen Reaktionen kann es auch bei diesen nicht-allergischen Reaktionen sowohl zu einer Erhöhung der Mastzellzahl als auch zu einer, vermutlich komplementvermittelten, Degranulation der Zellen kommen (BIENENSTOCK et al., 1986).

### 2.5.2. Biologische Bedeutung der mastzellspezifischen Proteasen

Die mastzellspezifischen Proteasen Tryptase und Chymase sind aufgrund ihres hohen Gehaltes in den Mastzellgranula (SCHWARTZ et al., 1987a), ihrer schnellen Freisetzung bei der Degranulation und ihrer biochemischen Fähigkeiten von wesentlicher Bedeutung für die Funktion der Mastzellen (SOMMERHOFF, 1995).

Die biologische Bedeutung beider Proteasen ist jedoch noch immer weitgehend ungeklärt und die im Folgenden detailliert beschriebenen Funktionen beruhen meist auf in vitro Untersuchungen.

#### 2.5.2.1 Bedeutung der Mastzellproteasen im Respirationstrakt

##### *vermehrte Sekretion*

Soweit bisher bekannt ist, ist die *Mastzell-Chymase* der potenteste Sekretionsauslöser für submuköse, seröse Drüsenzellen in den Atemwegen (SOMMERHOFF et al., 1989a).

In Zellkulturen stimuliert Chymase die Degranulation seröser Drüsenzellen der Atemwege (SOMMERHOFF et al., 1989a) und hydrolysiert Bestandteile der Glykokalix epithelialer Zellen der Trachea (VARSAÑO et al., 1987). Damit löst sie eine erhöhte oder abnorme Sekretionsaktivität aus, die für entzündliche Atemwegserkrankungen, wie Asthma, chronische Bronchitis und zystische Fibrose charakteristisch ist (SOMMERHOFF, 1995). Tryptase dagegen hat keinen merklichen Einfluß auf die Drüsenzellen (SOMMERHOFF et al., 1989a).

##### *Bronchokonstriktion*

*Tryptase* potenziert bei sensibilisierten Menschen (JOHNSON et al., 1997) und beim Hund (SEKIZAWA et al., 1989) die Histamin-vermittelte Bronchokonstriktion durch die Erhöhung

der Sensitivität der glatten Muskulatur gegenüber den Bronchokonstriktoren Histamin und Serotonin.

Außerdem erhöht sie die Kontraktilität der glatten Muskulatur dadurch, dass sie bronchodilatatorisch wirkende Neuropeptide, wie vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und peptide histidine methione (PHM) spaltet (TAM und CAUGHEY, 1990; CAUGHEY et al., 1988d).

Die *Mastzell-Chymase* dagegen spaltet sowohl das bronchodilatatorisch wirkende VIP als auch bronchokonstriktorisch wirkende Peptide wie z.B. Bradykinin und Kallidin (REILLY et al., 1985; CAUGHEY et al., 1988d). Weiterhin kann Chymase durch die Degradation von Substanz P die Mastzelldegranulation limitieren (CAUGHEY et al., 1988d).

Schließlich ist Tryptase ein Mitogen für Epithelzellen und stimuliert in diesen die IL-8 Produktion (CAIRNS und WALLS, 1996). Beim Hund ist es auch ein potentes Mitogen für glatte Muskelzellen (BROWN et al., 1995). Beide Funktionen implizieren eine Beteiligung der Tryptase an entzündlichen und allergischen Erkrankungen des Respirationstraktes.

### 2.5.2.2 Bedeutung der Mastzellproteasen beim Gewebeumbau

#### *Fibroblastenproliferation*

*Tryptase* ist ein potentes Mitogen für Fibroblasten (SOMMERHOFF, 1995). Neben anderen Mastzell-Mediatoren wie z.B. Histamin (RUSSEL et al., 1977), Leukotrienen, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und dem transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), kann es die Fibroblastenproliferation beim Menschen und beim Hund *in vitro* direkt induzieren (RUOSS et al., 1991). Andererseits aktiviert Tryptase wie Heparin und Heparansulfat den basic fibroblast growth factor (bFGF) und induziert damit die Fibroblastenproliferation auch indirekt (BASHKIN et al., 1989; LEVI-SCHAFFER, 1995).

### 2.5.2.3 Bedeutung der Mastzellproteasen bei Entzündungen

#### *Vasodilatation und Extravasation*

*Chymase* spielt bei entzündlichen Veränderungen aufgrund verschiedener Mechanismen eine wichtige Rolle. Zum einen kann sie Histamin-degradierende Enzyme inaktivieren und den Histamineffekt über die Induzierung einer Vasodilatation verstärken (RUBINSTEIN et al., 1990). Für den vasodilatativen Effekt der Chymase entscheidend ist ihre Bedeutung beim Erhalt des calcitonin gene-related peptide (CGRP), welches nach seiner Freisetzung aus sensorischen Nerven eine Vasodilatation induziert (BRAIN und WILLIAMS, 1988). Außerdem potenziert Chymase [RMCP II] in der Haut von Ratte, Mensch und Hund die durch Histamin verursachte Extravasation von Blutplasma und fördert damit die "wheal formation" (SEPPA, 1980 (Ratte); FRÄKI, 1977 (Mensch); RUBINSTEIN et al., 1990 (Hund)). Ob Chymase dabei direkt auf die Endothelzellen wirkt, so wie es für Cathepsin G und Thrombin gezeigt werden konnte (PETERSON et al., 1987; GARCIA et al., 1986), oder indirekt über den Umbau von IL-1 $\beta$  zu aktivem IL-1 (MIZUTANI et al., 1991), ist noch nicht geklärt.

#### *Matrixdegradation*

Weiterhin kann *Chymase* wie *Tryptase* aufgrund ihrer hydrolytischen Aktivität zu einer Degradation verschiedener Elemente des interzellulären Bindegewebes (z.B. Kollagen,

Proteoglykane u.a. Proteine wie Fibronectin) führen und damit zu einer Auflockerung der Interzellulärmatrix und einer erleichterten Ausbreitung der austretenden Blutflüssigkeit beitragen (RUBINSTEIN et al., 1990 (Hund); GRUBER und SCHWARTZ, 1990). In vitro Untersuchungen haben wohl gezeigt, dass die Ratten-Chymase zur Degradation von Elementen des Bindegewebes führen kann (SEPPA et al., 1979), indem sie Kollagen vom Typ IV und Fibronectin spaltet (SAGE et al., 1979; VARTIO et al., 1981), die Wirkung der Chymase des Menschen auf Kollagen und Laminin ist jedoch noch strittig. Sichtbare Veränderungen in der Haut des Menschen sind ein Verlust der "anchoring filaments" und eine Verbreiterung der Lamina lucida der dermoepidermalen "junctions" (BRIGGAMAN et al., 1984). Dadurch kommt es zu einer Separierung der Epidermis von der Dermis in der Lamina lucida, die makroskopisch als Blasenbildung sichtbar ist (BRIGGAMAN et al., 1984). *Tryptase* aus der Haut des Menschen kann sowohl direkt Typ VI Kollagen spalten (KIELTY et al., 1993) als auch indirekt Kollagenase vom Typ IV und Fibronectin spalten kann (LOHI et al., 1992).

Tryptase des Menschen und aus caninen Mastzelltumoren gewonnene Proteasen können die Matrixdegradation weiterhin fördern, indem sie *in vitro* Prokollagenase aus Fibroblastenkulturen aktivieren (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1976). Tryptase und Chymase wirken dabei indirekt über die Aktivierung von Pro-Stromelysin zu Stromelysin (Metalloproteinase III (MMP-3)) (LEES et al., 1994), welches wiederum Prokollagenase aktiviert (GRUBER et al., 1989).

Durch die Spaltung und *Inaktivierung von Fibrinogen* hemmt Tryptase zudem die Blutgerinnung und fördert die "wheal formation" (SCHWARTZ et al., 1985b).

Neben der erhöhten Gefäßpermeabilität kann auch die *Leukozytenemigration* bei Entzündungen auf die Wirkung der Tryptase zurückgeführt werden. Einerseits inhibiert sie Thrombin und damit dessen mitogenen Effekt auf vaskuläre glatte Muskelzellen (FRÄKI, 1977). Andererseits stimuliert Tryptase in Epithelzellen die Freisetzung von IL-8 und die Expressierung von interzellulärem Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und fördert damit die Ansammlung von Granulozyten (CAIRNS und WALLS, 1996).

Entgegen bisheriger Annahmen beeinflusst Tryptase offensichtlich nicht das Komplement Anaphylatoxin oder die Bradikininbildung (SCHWARTZ, 1990b).

### *Kontrollfunktion der Mastzellaktivität*

Eine wichtige Kontrollfunktion der Mastzellaktivität übernimmt *Chymase* in der Haut, indem sie hier durch die Inaktivierung des Histaminliberators Substanz P eine weitergehende Mastzelldegranulation limitieren kann (CAUGHEY et al., 1988d).

#### **2.5.2.4 Bedeutung der Mastzellproteasen bei der Regulierung des Blutdrucks**

*In Vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass bei Ratten und beim Menschen (REILLY et al., 1982; WINTROUB et al., 1984 und 1986) *Chymase* (unabhängig vom Angiotensin converting enzyme) Angiotensin I zu Angiotensin II, einem potenten lokalen Vasokonstriktor, konvertiert und damit eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutdruckes spielt.

In den Tabellen 2 und 3 werden die wichtigsten biologischen Funktionen der Mastzellproteasen Tryptase und Chymase kurz zusammengefaßt.

**Tab. 2** Enzymaktivität und potentielle biologische Bedeutung der **Chymase**

| Enzymaktivität   | Potentielle Bedeutung  |
|--|--|
| Stimulierung der Degranulation seröser Zellen              | erhöhte oder abnorme Sekretion in den Atemwegen  |
| Hydrolyse der Glykokalix von Bronchialepithelien           | erhöhte oder abnorme Sekretion in den Atemwegen  |
| Spaltung von VIP   | verringerte endogene bronchodilatatorische Aktivität   |
| Spaltung von Bradykinin, Kallidin und Substanz P           | verringerte endogene bronchokonstriktorische Aktivität   |
| Inaktivierung von Substanz P                               | Limitierung der Mastzelledegranulation   |
| Degradierung von Kollagen IV, Proteoglykanen und Proteinen | Auflockerung der Interzellulärmatrix und Lockerung der dermoepidermalen "junctions"  |
| Aktivierung der Prokollagenase                             | Auflockerung der Interzellulärmatrix und Lockerung der dermoepidermalen "junctions"  |
| Spaltung von CGRP in der Haut (oder Erhalt?)               | Limitierung (oder Förderung?) der Vasodilatation   |
| Inaktivierung Histamin-degradierender Enzyme               | Potenzierung der Histamin-induzierten vaskulären Permeabilität und Förderung der Extravasation von Blutplasma: "wheal formation" |
| Induzierung einer Vasodilatation                           | Förderung der Extravasation von Blutplasma "wheal formation"   |
| Aktivierung von IL- $\beta$                                | Förderung der Granulozyteninfiltration   |
| Konvertierung von Angiotensin I zu Angiotensin II          | Regulierung des Blutdruckes  |

**Tab. 3** Enzymaktivität und potentielle biologische Bedeutung der **Tryptase**

| Enzymaktivität  | Potentielle Bedeutung   |
|---|---|
| Verstärkung der Histamin-induzierten Bronchokonstriktion          | Bronchokonstriktion   |
| Degradation von CGRP, VIP und PHM                                 | verringerte endogene bronchodilatatorische Aktivität                  |
| Aktivierung von Pro-Stromelysin                                   | Aktivierung von Prokollagenase, Matrixdegradation                     |
| Inaktivierung von Fibronectin und Degradation von Kollagen VI     | Förderung der "wheal formation", Auflockerung der Interzellulärmatrix |
| Inhibierung des mitogenen Effekts von Thrombin                    | Erhöhung der Kapillarpermeabilität                                    |
| Stimulation der Fibroblastenproliferation (Mitogen)               | Gewebsumbau, verstärkte Fibrogenese oder Wundheilung                  |
| Stimulation der DNA Synthese in bronchialen Epithelzellen         | Mitogen   |
| Stimulierung der IL-8 Freisetzung, Erhöhung der ICAM-1 Expression | Förderung der Leukozyteninfiltration, Epithelreparation               |
| Inaktivierung von Fibrinogen                                      | Antikoagulanzen   |

## 2.6. Heterogenität

Erste Hinweise für eine bestehende Mastzellheterogenität lieferten die Untersuchungen von HARDY und WESBROOK (1895) und MAXIMOW (1906). Enerbäck et al. (1966a und b) legten den Grundstein für die bis heute gebräuchliche Klassifizierung der Mastzelltypen bei Ratte und Maus.

Heute ist unbestritten, dass Mastzellen eine heterogene Zellpopulation repräsentieren, da sie eine beträchtliche Variation in ihren morphologischen, histochemischen, ultrastrukturellen (Pearce, 1986) und biochemischen Eigenschaften aufweisen und sich in ihrer Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli unterscheiden (Huntley, 1992; IRANI und SCHWARTZ, 1989; LEE et al., 1985).

Als Ursache für die Mastzellheterogenität wird zur Zeit noch folgende Hypothesen diskutiert:

1. Die verschiedenen Mastzelltypen repräsentieren unterschiedliche Reifungsstadien der gleichen Zelllinie (CAUGHEY et al., 1988c).
2. Sie stammen von unterschiedlichen Vorläuferzellen ein und derselben undifferenzierten Stammzelle ab (IRANI et al., 1987a; FURITSU et al., 1989; IRANI et al., 1992a; MITSUI et al., 1993).
3. Die von den gleichen Progenitoren abstammenden Mastzelltypen differenzieren sich abhängig vom anatomischen Microenvironment (KITAMURA et al., 1986 und 1987).

Die dritte These wird durch kombinierte in vitro und in vivo Studien bei Mäusen unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass sich IL-3 abhängige Mastzellen unter dem Einfluß von Fibroblasten zu Bindegewebsmastzellen entwickeln (LEVI-SCHAFFER et al., 1986).

KITAMURA et al. (1986) haben gezeigt, dass sich Mastzellen vom mukosalen Typ - über eine Dedifferenzierung zur Vorläuferzelle und nachfolgender Redifferenzierung - in den Bindegewebstyp transdifferenzieren können und umgekehrt.

Neuere Untersuchungen befassen sich mit einer Transdifferenzierung zwischen T-, TC- und C- Mastzellen (LI et al., 1996). Gegen eine lineare Entwicklung von T- aus TC-Mastzellen und umgekehrt sprechen ultrastrukturelle Unterschiede, die schon bei unreifen Mastzellen bestehen (CRAIG et al., 1989). Gegen eine lineare Entwicklung von TC- aus T-Mastzellen spricht zudem die Tatsache, dass bei Patienten mit Immunschwäche und damit verbundenem T-Lymphozyten-Mangel wohl ein Defizit an T-Mastzellen, nicht jedoch an TC-Mastzellen besteht (IRANI et al., 1987a).

Welche Mechanismen bei der Transdifferenzierung die entscheidende Rolle spielen, ist bisher noch unbekannt. Mehrere Arbeitsgruppen fanden jedoch Hinweise dafür, dass die Mastzellheterogenität auf die in dem jeweiligen Umgebungsmilieu vorhandenen Zytokine zurückzuführen ist (KITAMURA, 1989; GALLI, 1990; SCHWARTZ, 1989; STEVENS und AUSTEN, 1989; LI et al., 1996).

Das Konzept der Mastzellheterogenität hat sich als ein fundamentales Prinzip für das Verständnis der möglichen Bedeutungen der Mastzellen im gesunden und im kranken Organismus erwiesen. Die Nomenklatur, die zur Unterscheidung der Mastzelltypen verwendet wird, variiert abhängig von der Spezies, der Lokalisation im Gewebe oder den biochemischen Charakteristika, die gerade untersucht werden.

## 2.6.1 Heterogenität der Mastzellen der Nager

Beim Nager werden zwei Mastzelltypen unterschieden:

Bindegewebsmastzellen (connective tissue type mast cells: CTMC) und Mukosamastzellen (mucosal type mast cells: MMC).

Sie können aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation im Gewebe, aber auch aufgrund ihrer Fixations- und Färbe-Eigenschaften (ENERBÄCK, 1966a und b) sowie ihres Proteoglykan- (STEVENS et al., 1986a) und ihres Proteasengehaltes unterschieden werden (WOODBURY et al., 1978c). Weitere Unterscheidungskriterien sind ihr Histamingehalt und ihre Reaktion auf Histaminliberatoren (BEFUS et al., 1982) und antiallergische Komponenten (PEARCE et al., 1984), Morphologie, Mediatorengleichgewicht und -produktion sowie die Abhängigkeit von T-Lymphozyten (BIENENSTOCK et al., 1989).

Die wichtigsten Unterscheidungskriterien der Mastzellsubtypen bei Ratte und Maus sind in den Tabellen 4 (Seite 16) und 5 (Seite 17) zusammengestellt.

### 2.6.1.1 Unterscheidung nach Fixations- und Färbeeigenschaften

Die Bindegewebsmastzellen (CTMC) werden auch als typische, formalinresistente Mastzellen bezeichnet, weil sie sich unabhängig von der gewählten Fixierung durch metachromatische Anfärbung ihrer Granula nachweisen lassen. Sie kommen vor allem in der Haut, dem Peritoneum (ENERBÄCK, 1966a), in der Submukosa, sowie in den serosalen und muskulären Schichten vom Magen-Darm-Trakt (SAAVEDRA-DELGADO et al. 1984) und in der Submukosa, Adventitia, Pleura und dem Parenchym des Respirationstraktes vor (TAM et al., 1988).

Die Mukosamastzellen (MMC) dagegen werden als atypisch und formalinsensitiv bezeichnet, weil sie nur nach Fixation mit Mota's Bleiazetat oder Carnoy'scher Lösung (Enerbäck, 1966a), nicht aber in formalinfixiertem Gewebe metachromatisch anfärbbar sind. Sie kommen vorwiegend in der Mukosa des Magen-Darm- (ENERBÄCK, 1966a) und des Atmungstraktes (TAM et al., 1988) vor.

Die unterschiedliche Formalinempfindlichkeit und Anfärbbarkeit der beiden Mastzelltypen beruht auf ihrem stark differierendem Proteoglykangehalt (Marshall und Bienenstock, 1990).

Während die Mukosamastzellen viel Chondroitinsulfat enthalten, ist in

Bindegewebsmastzellen überwiegend Heparin gespeichert (TAS und BERNDSEN, 1977; LEE et al., 1985; H.R.P. MILLER et al., 1989). Der Proteoglykangehalt von Mastzellen ist jedoch auch von deren Reifungsstadium abhängig (Marshall und Bienenstock, 1990).

Entsprechend der geringen Sulfatierung von Chondroitinsulfat haben Mukosamastzellen keine Affinität zu Safranin und färben sich nur mit Alzianblau (ENERBÄCK, 1966b).

Bindegewebsmastzellen, welche überwiegend höhersulfatiertes Heparin enthalten, färben sich dagegen mit Alzianblau und Safranin an. Bei der Kombination der beiden Farbstoffe färben sich die Granula der Mukosamastzellen blau, die Mehrzahl der Granula in Bindegewebsmastzellen dagegen blau und rot oder nur rot (ENERBÄCK, 1966a und b).

**Tab. 4** Eigenschaften von Mukosa- und Bindegewebsmastzellen (modifiziert nach ENERBÄCK, 1987, IRANI und SCHWARTZ, 1989, HUNTLEY, 1992)

| Eigenschaften                    | Mukosamastzellen  | Bindegewebsmastzellen   | Quelle                                  |
|----------------------------------|---|---|---|
| Vorkommen                        | Darm- u. Bronchial-Schleimhaut, interalveoläres Bindegewebe                                     | Submukosa von Darm, Trachea u. Bronchien, Haut, Skelettmuskulatur, seröse Oberflächen | (1)                                     |
| Morphologie                      | Kleinere Zellen, variable Gestalt, weniger und verschieden große Granula (Durchmesser < 0,2 µm) | größere Zellen, mehr und gleichförmige Granula (Durchmesser 0,2- 0,4 µm)              | (4)                                     |
| Färbung mit Alzianblau/ Safranin | Blau  | rot oder blau und rot   | (1),(2),(5)                             |
| Färbung mit Safranin             | -   | +   | (1),(2),(5)                             |
| Färbung mit Berberin             | -   | +   | (3)                                     |
| Fixation                         | Formalinsensitiv  | formalinresistent   | (1),(2),(6)                             |
| Glykosaminoglykane               |   |   |   |
| Heparin                          | -   | +   | (3)                                     |
| Chondroitinsulfat Di-B           | +   | -   | (7),(8),(9),(10)                        |
| Chondroitinsulfat A              | +   | -   |   |
| Chondroitinsulfat E              | +   | +   |   |
| Serinproteasen                   |   |   | (5),(6),(11), (12),(13),(14), (15),(20) |
| RMCP I                           | -/+   | + (20-30 pg/Mz)   |   |
| RMCP II                          | + (10-40 pg/Mz)   | -/+   |   |
| Tryptase                         | -   | + (0,5 pg/Mz)   | (16),(20)                               |
| Carboxypeptidase                 | -   | + (10-25 pg/Mz)   | (20)                                    |
| Histamingehalt                   | Gering: < 2 pg/ Zelle   | 10-35 pg/ Zelle   | (4),(17)                                |
| Abhängigkeit von                 | T-Lymphozyten Faktoren  | Fibroblasten  | (18),(19)                               |
| Lebensdauer                      | Kurz (half life < 40 Tage)  | lang (half life > 6 Monate)   | (4)                                     |
| Mediatoren                       | Leukotriene C <sub>4</sub> u. B <sub>4</sub>  | Prostaglandin D <sub>2</sub>  | (20)                                    |

RMCP: rat mast cell protease; Mz: Mastzelle; µm: Mikrometer; pg: Pikogramm

(1) und (2) ENERBÄCK, 1966a und b; (3) ENERBÄCK, 1974; (4) ENERBÄCK, 1987; (5) GIBSON et al., 1987; (6) NEWLANDS et al., 1984; (7) STEVENS et al., 1983; (8) KATZ et al., 1986; (9) STEVENS et al., 1986b; (10) ENERBÄCK et al., 1985; (11), (12) und (13) WOODBURY et al., 1978a, b und c; (14) GIBSON und MILLER, 1986; (15) HUNTLEY et al., 1990; (16) CHEN et al., 1993; (17) BEFUS et al., 1982; (18) RAZIN et al., 1987; (19) LEVI-SCHAFFER et al., 1986; (20) Übersicht in IRANI und SCHWARTZ, 1989.

Aufgrund der zwischen Heparin und Chondroitinsulfat bestehenden Unterschiede in der negativen Ladungsdichte sind die unterschiedlichen Fixierungs- und Färbeeigenschaften der MMC und CTMC dem zwischen ihnen bestehenden Unterschied im Proteoglykangehalt zugeschrieben worden (ENERBÄCK, 1981).

Ein anderer - zur Differenzierung des Proteoglykangehaltes der Mastzellgranula geeigneter - Farbstoff ist Berberin (Pearce, 1986). Berberin ist ein kationischer Farbstoff, der unabhängig von der Fixierung (SOMMERHOFF et al., 1989b) mit Heparin, nicht aber mit Chondroitinsulfat (SOMMERHOFF et al., 1989b) einen stark fluoreszierenden Komplex bildet (WINGREEN und ENERBÄCK, 1983), und deshalb auch nur die heparinhaltigen Bindegewebsmastzellen und nicht die chondroitinsulfathaltigen Mukosamastzellen der Ratte anfärbt und zudem für die Quantifizierung des Heparinergehaltes einsetzbar ist (ENERBÄCK, 1974).

### 2.6.1.2 Unterscheidungskriterium Proteasengehalt

Wie der Tabelle 5 zu entnehmen ist, unterscheiden sich die Mastzellen von Ratte und Maus in ihrem Gehalt an mastzellspezifischen Proteasen. Bei der Ratte ist in den Bindegewebsmastzellen die rat mast cell protease I (RMCP I) und in den Mukosamastzellen die RMCP II lokalisiert (KATUNUMA et al., 1975; WOODBURY et al., 1978c; GIBSON und MILLER, 1986). Im peribronchialen Gewebe haben HUNTLEY et al. (1990) aber auch Mastzellen nachgewiesen, die beide Proteasen enthalten.

Bei der Maus enthalten die Bindegewebsmastzellen mouse mast cell protease 3, 4, 5, 6 und 7 (MMCP 3, 4, 5, 6 und 7) (REYNOLDS et al., 1990 und 1991; McNEIL et al., 1992, SERAFIN et al., 1991; HUANG et al., 1991) und die Mukosamastzellen MMCP 1 und 2 (SERAFIN et al., 1990; HUANG et al., 1991).

**Tab. 5** Dominierende Mediatoren in den Granula der Mastzellen von Ratte und Maus im Vergleich (aus SCHWARTZ, 1994 modifiziert)

| Mastzelltyp                 | Biogene Amine                      | Neutrale Proteasen                       | Proteoglykane                   |
|-----------------------------|------------------------------------|--|---------------------------------|
| <b>Maus:</b>                |                                    |  |                                 |
| Mukosamastzelle (MMC)       | Histamin                           | MMCP 1, 2                                | Chondroitinsulfat E             |
| Bindegewebsmastzelle (CTMC) | Histamin und Serotonin             | MMCP 3, 4, 5, 6, 7<br>Carboxypeptidase   | Heparin                         |
| <b>Ratte:</b>               |                                    |  |                                 |
| Mukosamastzelle (MMC)       | Histamin (< 2pg/Mz)                | RMCP II                                  | Chondroitinsulfat Di-B, A, E    |
| Bindegewebsmastzelle (CTMC) | Histamin (< 35pg/Mz) und Serotonin | RMCP I,<br>Carboxypeptidase,<br>Tryptase | Heparin,<br>Chondroitinsulfat E |

MMCP: mouse mast cell protease; RMCP: rat mast cell protease; pg: Pikogramm

Die RMCP der Ratte und die meisten Serinproteasen der Maus sind Chymasen, welche chymotrypsin-ähnliche Substratspezifität aufweisen (MMCP 1 (HUANG et al., 1991); MMCP 2 (SERAFIN et al., 1990); MMCP 3 (REYNOLDS et al., 1990); MMCP 4 (SERAFIN et al., 1991); MMCP 4A (SERAFIN et al., 1991); MMCP 4B (HUANG et al., 1991); MMCP L (SERAFIN et al., 1991); MMCP 5 (HUANG et al., 1991).

Obwohl sich die verschiedenen Mastzellchymasen in vielen Aspekten (YOSHIDA et al., 1980) ähneln, können sie auf der Basis physikalischer, chemischer, struktureller und immunologischer Eigenschaften (WOODBURY et al., 1978a und 1978b) unterschieden werden.

MMCP 6 und 7 der Bindegewebsmastzellen der Maus sind Trypsasen mit trypsin-ähnlicher Substratspezifität (MMCP 6 (REYNOLDS et al., 1991); MMCP 7 (McNEIL et al., 1992)). Trypsase konnte inzwischen auch in einem Teil der Peritoneal- (KIDO et al., 1985) und Haut-Mastzellen der Ratte (BRAGANZA und SIMMONS, 1991), aber nicht in Darmmukosamastzellen nachgewiesen werden (CHEN et al., 1993).

### 2.6.2 Heterogenität der Mastzellen des Menschen

Beim Menschen ist eine strikte Klassifizierung in formalinsensitive Mukosa- und formalinresistente Bindegewebsmastzellen nicht eindeutig möglich, obwohl aufgrund einiger histochemischer Kriterien ähnliche Typen wie beim Nager unterschieden werden können (STROBEL et al., 1981 und RUITENBERG et al., 1982, Intestinum; BEFUS et al., 1985; FLINT et al. 1985, Lunge; MARSHALL et al., 1987, Haut).

Als wesentlich präziserer Marker für die Heterogenität der Mastzellen des Menschen gilt ihr unterschiedlicher Gehalt an den mastzellspezifischen Proteasen Chymase und Trypsase (IRANI et al., 1986).

Die wichtigsten Merkmale der Mastzelltypen des Menschen sind in der Tabelle 6 (Seite 19) aufgelistet.

#### 2.6.2.1 Unterscheidung nach Fixations- und Färbeeigenschaften

Wie bei der Ratte gibt es beim Menschen in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes (STROBEL et al., 1981; RUITENBERG et al., 1982 und BEFUS et al., 1985), in der Lunge (FLINT et al., 1985; TAINSH et al., 1991), im Uterus (TAINSH et al., 1991) und in der Haut (MARSHALL et al., 1987; TAINSH et al., 1991) formalinresistente und formalinempfindliche Mastzellen.

Die entsprechenden Mastzelltypen sind jedoch nicht, wie bei der Ratte, bestimmten Gewebelokalisationen zuzuordnen (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990), sondern beide kommen in allen bisher untersuchten Lokalisationen nebeneinander vor (BEFUS et al., 1985; MARSHALL et al., 1987; STROBEL et al., 1981). Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass - im Gegensatz zur Ratte - in allen untersuchten Mastzellen des Menschen sowohl Heparin, als auch Chondroitinsulfat nachgewiesen werden kann (METCALFE et al., 1979 und 1980; THOMPSON et al., 1988; STEVENS et al., 1988; CRAIG et al., 1993). Dieser Unterschied in der Proteoglykanverteilung führt möglicherweise dazu, dass beim Menschen eine Unterscheidung verschiedener Mastzelltypen anhand ihrer Farbreaktion auf Safranin, das bevorzugt an Heparin bindet, nicht möglich ist. Ob der Tatbestand, dass beim Menschen trotzdem formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen unterschieden werden können, möglicherweise auf einen Unterschied in der quantitativen oder qualitativen Zusammensetzung der Proteoglykane zurückzuführen ist, ist bislang noch nicht geklärt. Die meisten der Mastzellen der Lunge, der intestinalen Mukosa, aber auch der Haut sind Alzianblau-positiv und Berberin- bzw. Safranin-negativ (FLINT et al., 1985; MARSHALL et al., 1987; STROBEL et al., 1981) und entsprechen damit den Mukosamastzellen der Ratte. Die meisten Mastzellen im Dünndarm, in der Lunge und im Uterus sind formalinsensitiv (84 -

93%) (STROBEL et al., 1981; TAINSH et al., 1991; FLINT et al., 1985), während die Hautmastzellen häufiger bzw. meist formalinresistent sind (50 - 84%) (MARSHALL et al., 1987; TAINSH et al., 1991).

**Tab. 6** Eigenschaften der Mastzelltypen des Menschen

| Eigenschaften   | T-Mastzellen  | TC-Mastzellen                                     | C-Mastzellen  | Quelle         |
|---|---|---|---|----------------|
| Vorkommen   | Darm- und Bronchial-Schleimhaut, Alveolarwände            | Haut, Muskulatur, Submukosa vom Darm, Lymphknoten | Mukosa und Submukosa von Magen-Darmtrakt, Lunge und Lymphknoten | (1-3),(5)      |
| Morphologie   | 10-15 µm  |   |   | (6)            |
|   | kleiner, enthalten weniger Granula                        | größer, enthalten viele Granula                   |   | (7)            |
| Charakteristische Kennzeichen der Ultrastruktur der Mastzellgranula | diskrete, konzentrisch geschichtete Ringe (Lunge, Mukosa) | gitterförmige Struktur                            |   | (3),(4),(8-10) |
| Färbung mit Alzianblau/ Safranin                                    | blau (wenige: rot oder blau und rot)                      | blau (wenige: rot oder blau und rot)              |   | (7),(11)       |
| Färbung mit Safranin  | - (wenige +)  | - (wenige +)                                      |   | (7),(11)       |
| Färbung mit Berberin  | - und +   | - und +   |   | (7),(11)       |
| Fixation  | Formalinresistente und formalinsensitive Mastzellen       | keine aldehydbedingte Proteinblockierung          |   | (7), (11-14)   |
| Glykosaminoglykane  | Heparin   | Heparin   |   | (15)           |
|   | Chondroitinsulfat A, E                                    | Chondroitinsulfat A, E                            |   | (15)           |
| Serinproteasen  | Tryptase (10-12 pg/Zelle)                                 | Tryptase (35 pg/Zelle)                            |   | (17),(21)      |
|   |   | Chymase (4,5 pg/Zelle)                            | Chymase   | (4),(17)       |
|   |   | Carboxypeptidase (10 pg/Zelle)                    | Carboxypeptidase  | (4),(19)       |
|   |   | Cathepsin G                                       | -   | (20)           |
| Abhängigkeit von  | T-Lymphozyten, Fibroblasten                               | Fibroblasten                                      |   | (22-27)        |
| Histamingehalt  | 1,5 -2,6 pg/ Zelle  | 1,9 pg/ Zelle                                     |   | (17),(18)      |
| Zytokine  | IL-4, -5 und -6   | IL-4  |   | (16)           |

T-Mastzellen: Tryptase-haltige Mastzellen; TC-Mastzellen: Tryptase- und Chymase-haltige Mastzellen; C-Mastzellen: Chymase-haltige Mastzellen; µm: Mikrometer; pg: Pikogramm; IL: Interleukin

(1) und (2) IRANI et al., 1986 und 1989a; (3) und (4) WEIDNER und AUSTEN, 1990 und 1991; (5) GOROSPE et al., 1994; (6) EADY et al., 1979; (7) STROBEL et al., 1981; (8) ORR, 1977, (Lunge); (9) HIBBS et al., 1960; (10) CRAIG et al., 1988; (11) MARSHALL et al., 1987; (12) BEFUS et al., 1985; (13) RUITENBERG et al., 1982; (14) FLINT et al., 1985; (15) CRAIG et al., 1993; (16) BRADDING et al., 1995; (17) SCHWARTZ et al., 1987a; (18) TAINSH et al., 1991; (19) IRANI et al., 1991; (20) SCHECHTER et al., 1990; (21) CASTELLS et al., (1987); (22) FURITSU et al., 1989; (23) und (24) KIRSHENBAUM et al., 1991 und 1992; (25) IRANI et al., 1992a; (26) MITSUI et al., 1993; (27) LI et al., 1996.

### 2.6.2.2 Unterscheidungskriterium Proteasengehalt

Mastzellen des Menschen werden aufgrund ihres unterschiedlichen Gehaltes an den mastzellspezifischen Proteasen Chymase und Tryptase unterschieden. Es werden Mastzellen, die nur Tryptase enthalten, die sogenannten *T-Mastzellen*, von denen unterscheiden, die Tryptase und Chymase enthalten, den sogenannten *TC-Mastzellen* (IRANI et al., 1986, 1989a). 1993 konnten WEIDNER und AUSTEN noch einen dritten Mastzelltyp nachweisen: die nur Chymase enthaltenden *C-Mastzellen*.

Immunhistochemisch wurde die Tryptase von SCHWARTZ et al. (1981a und 1985a) in Lungen- und Hautmastzellen, die Chymase von SCHECHTER et al. (1983) in Hautmastzellen des Menschen dargestellt. Als weitere Proteasen findet sich in den chymasehaltigen TC- und C- Mastzellen auch *Cathepsin G* (SCHECHTER et al., 1990) und *Carboxypeptidase* (HMC-CP) (GOLDSTEIN et al., 1987; IRANI et al., 1991; WEIDNER und AUSTEN, 1991).

Cathepsin G kommt auch in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vor, ist also nicht mastzellspezifisch (SCHECHTER et al., 1990).

Da in Lunge, Haut und Dünndarm des Menschen alle metachromatisch als Mastzellen identifizierte Zellen auch Tryptase-positiv reagierten, wurde geschlossen, dass alle Mastzellen Tryptase enthalten (CRAIG et al., 1985; SCHWARTZ, 1985; SCHWARTZ et al., 1985a). Enzymhistochemische Untersuchungen von OSMAN et al. (1989) und HARVIMA et al. (1989b) haben dies bestätigt.

Wie der Tabelle 7 (Seite 21) zu entnehmen ist, sind die aufgrund ihres Proteasengehaltes definierten Mastzellsubtypen in einer relativ gewebespezifischen Weise verteilt (IRANI et al., 1986; SCHWARTZ et al., 1987a; WEIDNER und AUSTEN, 1991).

### Zusammenfassung

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Mastzellen beim Menschen nicht in formalinsensitive Mukosa- und formalinresistente Bindegewebsmastzellen unterteilt werden können, sondern der Gehalt an neutralen Proteasen als wichtigstes Unterscheidungskriterium zu Grunde gelegt werden sollte (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990). Möglicherweise ist die Mastzellheterogenität beim Menschen aber auch wesentlich komplexer als die beim Nager (MARSHALL und BIENENSTOCK, 1990), bei der bestehenden Einteilung werden jedoch nur Extremtypen berücksichtigt.

**Tab. 7** Verteilung der Mastzellproteasen in verschiedenen Gewebelokalisationen beim Menschen nach Fixierung in Carnoy'scher Lösung

| Gewebelokalisation                                   | Prozentuale Verteilung |                    |                   | Quelle  |
|--|------------------------|--------------------|-------------------|---------|
|  | T-Mastzellen<br>%      | TC-Mastzellen<br>% | C-Mastzellen<br>% |         |
| <b>• Magen</b>                                       |                        |                    |                   |         |
| Magen-Mukosa   | 51,7                   | 39                 | 9,3               | (1)     |
| Magen-Submukosa                                      | 0                      | 73,5               | 26,5              | (1)     |
| <b>• Darm</b>  |                        |                    |                   |         |
| Dünndarm-Mukosa                                      | 98 / 81                | 2 / 19             | -                 | (2 / 3) |
|  | 94-97                  | 3-6                | -                 | (4)     |
|  | 78                     | 22                 | -                 | (5)     |
|  | 65                     | 30,8               | 4,2               | (1)     |
|  | 10                     | 90                 | -                 | (6)     |
| Dünndarm-Submukosa                                   | 13 / 23                | 87 / 77            | -                 | (2 / 3) |
|  | 10-12                  | 88-90              | -                 | (4)     |
|  | 0                      | 75,8               | 24,2              | (1)     |
| Darm-Mukosa  | 57,5                   | 34,9               | 7,6               | (1)     |
| Darm-Submukosa                                       | 0                      | 83,2               | 16,8              | (1)     |
|  | 2-5                    | 95-98              | -                 | (6)     |
| Kolon-Mukosa   | 75                     | 25                 | -                 | (4)     |
|  | 53                     | 37                 | 10                | (1)     |
|  | 30                     | 70                 | -                 | (6)     |
| Kolon-Submukosa                                      | 8                      | 92                 | -                 | (4)     |
|  | 0                      | 95,5               | 4,5               | (1)     |
| <b>• Lunge</b>                                       |                        |                    |                   |         |
| Alveolen   | 90,9                   | 8,4                | 0,7               | (1)     |
| Alveolarwand   | 95                     | 5                  | -                 | (5)     |
|  | 93                     | 7                  | -                 | (3)     |
| Bronchiolen  | 78,4                   | 9,6                | 12                | (1)     |
| Bronchialepithel                                     | 99                     | 1                  | -                 | (7)     |
| Bronchien, subepithelial                             | 77                     | 23                 | -                 | (2)     |
|  | 65                     | 35                 | -                 | (8)     |
| Bronchien, Submukosa                                 | 77                     | 23                 | -                 | (9)     |
| Submukosa, periglandulär                             | 27                     | 73                 | -                 | (8)     |
| Dispergierte Mastzellen                              | 90                     | 10                 | -                 | (2)     |
| <b>• Uterus (sekretorische/ proliferative Phase)</b> |                        |                    |                   | (10)    |
| - Endometrium  | 83/84                  | 17/16              | -                 |         |
| - lumbales Myometrium                                | 22/ 4                  | 78/ 96             | -                 |         |
| - äußeres Myometrium                                 | 44/ 50                 | 56/ 50             | -                 |         |
| <b>• Achsel-Lymphknoten</b>                          | 1                      | 96,7               | 2,3               | (1)     |
| <b>• Haut</b>  | 0                      | 100                | -                 | (5)     |
|  | 12 / 0,3               | 88 / 99,7          | -                 | (2 / 3) |
|  | 0,8                    | 98,7               | 0,5               | (1)     |
|  | 27                     | 73                 | -                 | (11)    |

T-Mastzellen: Tryptase-haltige Mastzellen; TC-Mastzellen: Tryptase- und Chymase-haltige Mastzellen; C-Mastzellen: Chymase-haltige Mastzellen; - : keine Angaben; / : Ergebnisse bei Verwendung eines polyklonalen anti-Chymase-Antikörpers / Ergebnisse bei Verwendung eines monoklonalen anti-Chymase-Antikörpers.

(1) WEIDNER und AUSTEN, 1993; (2) und (3) IRANI et al., 1986 und 1989a; (4) IRANI et al., 1987a; (5) CRAIG et al., 1993; (6) ALDENBORG und ENERBÄCK, 1994; (7) IRANI und SCHWARTZ, 1989; (8) MATIN et al., 1992; (9) BRADDING et al., 1995; (10) MORI et al., 1997; (11) HARVIMA et al., 1990.

### 2.6.3 Heterogenität der Mastzellen des Hundes

Die in Geweben gesunder Hunde vorkommenden Mastzellen sind bei weitem nicht so umfassend untersucht, wie die des Menschen und der Nager. Bisher vorliegende Studien zeigen, dass Unterschiede in ihrer Anfärbbarkeit mit metachromatischen und fluoreszierenden Farbstoffen in Abhängigkeit von dem gewählten Fixationsmittel bestehen (BECKER et al., 1985; SOMMERHOFF et al., 1989b). Jedoch scheinen die Mastzellen des Hundes, wie die des Menschen, nicht in das beim Nager benutzte Schema der Unterteilung in formalinsensitive Mukosa- und formalinresistente Bindegewebsmastzellen zu passen (OSBORNE et al., 1989).

Seit dem histochemischen und biochemischen Nachweis von Tryptase und Chymase in Hundemastzellen (GLENNER und COHEN, 1960; GLENNER et al., 1962), werden die mastzellspezifischen Proteasen auch beim Hund als wichtige Kriterien für die Mastzellheterogenität verwendet.

Morphologische, histochemische, ultrastrukturelle Kriterien wurden noch nicht einzelnen Subtypen zugeordnet und sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

**Tab. 8** Eigenschaften der Mastzelltypen des Hundes

| Eigenschaften                     | Formalinsensitive Mastzellen   | Formalinresistente Mastzellen                                       | Quelle                  |
|-----------------------------------|--|---|-------------------------|
| Vorkommen                         | Darm-Mukosa, Trachea, Lunge, Haut,   | Haut, Submukosa, Muskularis und Adventitia von Darm, Trachea, Lunge | (1),(2),(3),(4),(5),(6) |
| Morphologie                       | 13-18 µm (Tumormastzellen);<br>13-15 µm (Lungenmastzellen);<br>5-9 µm (Mesenterial-Mastzellen) |   | (7),(11),(14)           |
| Mastzellgranula                   | klein, uniform in ihrer Größe, evtl. halbmondförmig oder rund (Lunge)                          |   | (8),(9)                 |
| Ultrastruktur der Mastzellgranula | homogen oder granuliert, dicht   |   | (8),(9),(10)            |
| Histamingehalt                    | 4,9 pg / Hautmastzelle;<br>1-24 pg / Mesenterial-Mastzelle                                     |   | (13),(14)               |
| Färbung mit Alzianblau            | +  | +   | (12)                    |
| Färbung mit Berberin              | -/+  | +   | (12)                    |
| Serinproteasen                    | Chymase<br>(Chloracetatesterase-Aktivität)   | Chymase   | (1),(6),(7),(12)        |
|                                   | Tryptase   | Tryptase  | (7)                     |

µm: Mikrometer; pg: Pikogramm

(1) und (2) BECKER et al., 1985 und 1987; (3) SOMMERHOFF et al., 1989b; (4) TURNER et al., 1989; (5) HIRSHMAN et al., 1986; (6) COLBATZKI et al. 1991; (7) CAUGHEY et al., 1988c; (8) BEHRENDT et al., 1978; (9) BEHRENDT, 1979; (10) CALONICO et al., 1985; (11) MENGLUNG et al., 1993; (12) OSBORN et al., 1986; (13) MORA et al., 1993; (14) SCHMUTZLER et al., 1978.

### 2.6.3.1 Unterscheidung nach Fixations- und Färbeeigenschaften

Verschiedene Autoren haben auch beim Hund die Formalinsensitivität als Unterscheidungskriterium für die vorkommenden Mastzelltypen herangezogen. So konnten COLBATZKI et al. (1991) formalinsensitive "Mukosamastzellen in der Schleimhaut des Jejunums nachweisen. Formalinresistente "Bindegewebsmastzellen" fanden sie in der Submukosa, der Tunica adventitia und der Tunica muscularis des Jejunums. Andere Autoren konnten formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen bei der Untersuchung von Tracheal- und Hautmastzellen des Hundes nachweisen (BECKER et al., 1985 und 1987; SOMMERHOFF et al., 1989b; TURNER et al., 1989; HIRSHMAN et al., 1986). Unter den aus Lungenspülproben gewonnenen Mastzellen des Hundes fanden BECKER et al. (1987) und SOMMERHOFF et al. (1989b) Mastzellen, die formalinsensitiv und Alzianblau-positiv waren.

In einer anderen Studie konnten OSBORNE et al. (1986) jedoch zeigen, dass aus Lungenspülproben gewonnene, formalinsensitive Mastzellen auch Berberin-positiv sein können. Berberin ist ein spezifischer Farbstoff zum Nachweis von Heparin. Bei der Ratte sind die formalinsensitiven Mukosamastzellen Berberin-negativ, da sie nur wenig Heparin enthalten. Offensichtlich enthalten demnach die Lungenmastzellen des Hundes, ähnlich wie die des Menschen, Heparin (ENERBÄCK, 1987).

OSBORNE et al. (1989) und SOMMERHOFF et al. (1990) haben außerdem gezeigt, dass bei Verwendung verschiedener Farbstoffe, wie Methylenblau, Alzianblau, Berberin und Toluidinblau, auch unterschiedlich viele Mastzellen als formalinsensitiv bzw. -resistent identifiziert werden. Das für den Nager sinnvolle Einteilungssystem in formalinsensitive Mukosa- und formalinresistente Bindegewebsmastzellen ist daher ihrer Ansicht nach nicht auf die Mastzellen aus dem Atmungstrakt des Hundes übertragbar.

Wie schon beim Menschen diskutiert, müssen die Begriffe "Mukosa-" und "Bindegewebs-" Mastzelle auch beim Hund mit Vorsicht benutzt werden, da die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, dass auch beim Hund formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen sowohl in der Mukosa als auch im Bindegewebe nachgewiesen werden können.

### 2.6.3.2 Unterscheidungskriterium Proteasengehalt

Wie die Mastzellen des Menschen enthalten auch die des Hundes *Chymase* und *Tryptase*, Carboxypeptidase (CAUGHEY et al., 1990) und vermutlich auch Cathepsin G (SCHECHTER et al., 1988). Intrazelluläre trypsin-ähnliche und chymotrypsin-ähnliche proteolytische Aktivität in Hautmastzellen des Hundes wurde erstmals von GLENNER und COHEN (1960) und GLENNER et al. (1962) nachgewiesen. Mit Hilfe enzymhistochemischer Nachweisreaktionen konnte gezeigt werden, dass beide Aktivitäten innerhalb ein und derselben Mastzelle vorhanden sein können (Caughey, 1990; Caughey et al., 1988c).

CAUGHEY et al. (1988c) fanden in ihren Untersuchungen Unterschiede im Chymasegehalt im Vergleich zum Tryptasegehalt bei Tumormastzellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien. Sie schlossen daraus, dass die beiden Enzyme während der Mastzellentwicklung asynchron exprimiert werden können (CAUGHEY et al., 1990).

Bisher wurden beide Proteasen in Hautmastzellen (GLENNER und COHEN, 1960; GLENNER et al., 1962; SCHECHTER et al., 1988), in durch Lungenspülungen gewonnenen

Mastzellen (CAUGHEY et al., 1988c), in Mastzelltumoren (CAUGHEY et al., 1987) und in aus solchen gewonnenen Zelllinien nachgewiesen (CAUGHEY et al., 1988a und c).

In aus Mastzelltumoren gewonnenen Zellsuspensionen ermittelten CAUGHEY et al. (1988c) mit Hilfe einer Kombination zweier enzymzytochemischer Reaktionen neben Mastzellen, die nur Tryptase enthielten und solchen, die nur Chymase enthielten auch solche, die sowohl Chymase- als auch Tryptase-positive Granula enthielten, wobei bei letzteren die beiden Proteasen meistens in verschiedenen Granula gespeichert wurden.

In durch Lungenspülungen gewonnenen Zellsuspensionen ermittelten sie mit dergleichen Methode, dass etwa gleich viele Zellen Chymase-positiv wie Tryptase-positiv waren und dem Anteil der nach Mota's Bleiazetat-Fixierung metachromatisch anfärbbaren Zellen entsprach (CAUGHEY et al., 1988c). Sie schlossen daraus, dass die meisten Lungenmastzellen des Hundes sowohl Tryptase als auch Chymase enthalten.

Vergleichbar mit den Ergebnissen von CAUGHEY et al. (1988c) konnten BECKER et al. (1985) in der Haut von atopischen Hunden mit Hilfe der Naphtol AS-D- Chlorazetatesterase-Reaktion gleich viele Mastzellen nachweisen, wie nach Fixation in Mota's Bleiazetat und metachromatischer Färbung. Demnach waren alle Hautmastzellen (formalinsensitive und formalinresistente) Chymase-positiv. COLBATZKI et al. teilten 1991 mit, dass der Nachweis der Chlorazetatesterase auch im Darm, der Trachea und der Lunge beide Mastzellpopulationen erfaßt.

Die *Dog Mast Cell Protease-3* (dMCP-3) wurde bisher in Mastzelltumoren (VANDERSLICE et al., 1989; YEZZI et al., 1994) und in intrazellulären Granula normaler Gewebemastzellen des Hundes in Haut, Jejunum, Trachea und Lungenparenchym (YEZZI et al., 1994) nachgewiesen. Diese Protease konnte aber auch in den Granula zirkulierender, polymorphkerniger, neutrophiler Leukozyten nachgewiesen werden (YEZZI et al., 1994) und scheint damit nicht mastzellspezifisch zu sein.

Im Kapitel 4 der vorliegenden Arbeit werden neue und weiterführende Ergebnisse zur Heterogenität der Mastzellen des Hundes ausführlich dargestellt. Teile dieser Studie sind bereits in Form von Vorträgen und Veröffentlichungen vorgestellt worden (KUBE et al., 1994 und 1998; KUBE und WELLE, 1994; WELLE et al., 1997b und 1997c).

Die wichtigsten und in Kapitel 4 ausführlich dargestellten Ergebnisse sind:

1. Beim Hund gibt es formalinsensitive und formalinresistente T-, TC- und C-Mastzellen.
2. T, TC und C Mastzellen sind vornehmlich lokalisationspezifisch verteilt, formalinsensitive und formalinresistente Mastzellen sind vornehmlich lokalisationsunabhängig verteilt.
3. Die unterschiedlichen Gewebelokalisationen innerhalb eines Organs weisen unterschiedliche Mastzellichten auf.
4. Die Wahl des Fixationsmittels hat Einfluß auf die Anzahl der nachweisbaren Mastzellen und Mastzellsubtypen.

## 2.6.4 Beteiligung der Mastzellsubtypen an Erkrankungen

### 2.6.4.1 T- und TC-Mastzellen beim Menschen

Pathologische Prozesse können einen großen Einfluß auf die Verteilung von T- und TC-Mastzellen haben (IRANI und SCHWARTZ (1989)). Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass es im Rahmen akuter oder chronischer entzündlichen Reaktionen zu einer Vermehrung der T-Mastzellen kommt, während bei Erkrankungen, bei denen keine entzündlichen Infiltrate auftreten eher eine Proliferation von TC-Mastzellen zu beobachten ist.

So haben z.B. IRANI et al. (1990a) bei Untersuchungen über die Mastzellbeteiligung an verschiedenen Hauterkrankungen gezeigt, dass es in Hautläsionen, wie sie bei der Mastozytose zu beobachten sind, ausschließlich zur Hyperplasie der TC-Mastzellen kommt. Dagegen konnten in akuten Hautläsionen wie bei der atopischen Dermatitis, bei frühen Läsionen von "scleroderma" und bei Keloiden vornehmlich T-Mastzellen nachgewiesen werden (IRANI et al., 1989b; IRANI et al., 1992b; IRANI, 1995).

HARVIMA et al. fanden zum einen in der Haut von Patienten mit Lichen planus (HARVIMA et al., 1991) und zum anderen in der unmittelbaren Nähe von den Hautläsionen bei Psoriasis (HARVIMA et al., 1989a und 1990) eine Vermehrung der Tryptase-haltigen Mastzellen vor allem in der subepidermalen Dermis und in der Epidermis. Bei beiden Hauterkrankungen konnten sie in diesen Lokalisationen eine Abnahme der Chymase-haltigen Mastzellen beobachten.

Bei verschiedenen Formen der Konjunktivitis, wie z.B. der "giant papillary conjunctivitis" und der "vernal conjunctivitis", wiesen IRANI et al. (1990b) die im gesunden Gewebe nicht vorkommenden T-Mastzellen nach und fanden diese zudem auch in Lokalisationen, in denen sonst gar keine Mastzellen nachzuweisen sind. Die Dichte der hier physiologischerweise vorkommenden TC-Mastzellen war in allen Fällen unverändert (IRANI et al., 1990b).

Bei Untersuchungen zum Auftreten der Mastzellsubtypen bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis haben IRANI et al. (1987b) in den entzündeten Arealen ebenfalls vermehrt T-Mastzellen nachweisen können. In den fibrotischen Regionen dagegen fanden sie wie in der unveränderten Synovia fast ausschließlich TC-Mastzellen (IRANI et al., 1987b).

Noch ist nicht geklärt, ob die abnorme Verteilung der beiden Mastzellsubtypen eine Folge des lokalen Erkrankungsprozesses ist oder primär auf eine Störung in der Mastzellrekrutierung und Entwicklung zurückzuführen ist (IRANI und SCHWARTZ, 1994).

So ist eine Hypothese für die Abnahme des Anteils Chymase-haltiger Mastzellen in entzündetem Gewebe die selektive Inhibierung der Enzymaktivität der Chymase (HARVIMA et al., 1990). Mit dem ins entzündete Gewebe einströmenden Plasma gelangen auch Inhibitoren in das entzündete Gewebe und inaktivieren hier die Chymase. Im Gegensatz zur Chymase ist die Mastzell-Tryptase durch die Serumproteine nicht inhibierbar (FRÄKI und HOPUSU-HAVU, 1975; HARVIMA et al., 1988a).

Die Vermehrung von T-Mastzellen im akut oder chronisch entzündeten Gewebe spricht nach der Ansicht von IRANI und SCHWARTZ (1994) dafür, dass T-Helferzellen bei der Rekrutierung und Entwicklung dieses Mastzellsubtyps eine Rolle spielen. Für den Einfluß von

T-Lymphozyten auf Tryptase-haltige Mastzellen spricht auch die in Psoriasisläsionen neben einer Vermehrung von Tryptase-positiven Mastzellen (HARVIMA et al., 1990) zu beobachtende Vermehrung von T-Helferzellen (VALDIMARSSON et al., 1986).

Ein weiteres Beispiel für das gehäufte Auftreten von T-Mastzellen in pathologisch verändertem Gewebe lieferten die Untersuchungen von BENTLEY et al. (1992) und KAWABORI et al. (1992). Sie konnten zeigen, dass sowohl bei der allergischen Rhinitis, als auch bei nasalen Polypen die Anzahl der T-Mastzellen im Epithel zunimmt. Schließlich ist auch im Bronchialepithel bei Patienten mit Asthma eine Erhöhung der T-Mastzellen nachgewiesen worden (BRADLEY et al., 1991).

Ein selektiver Mangel an T-Mastzellen wurde bei Patienten mit - angeborener und erworbener- Immunschwäche und damit verbundenem T-Lymphozyten-Mangel beschrieben (IRANI et al., 1987a). Darin sehen IRANI und SCHWARTZ (1989) einen weiteren Hinweis dafür, dass T-Lymphozyten in das Wachstum und die Entwicklung von T-Mastzellen involviert sind.

Eine Erkrankung, bei der es zu einer Vermehrung der TC-Mastzellen kommt, ist die zystische Fibrose (IRANI et al., 1988). Schon im gesunden Lungengewebe kommen Chymase-haltige Zellen im bronchialen Epithel in höherer Konzentration vor als im peripheren Lungengewebe, und in besonders hoher Konzentration sind sie in den basalen Abschnitten der submukösen Bronchialdrüsen zu finden (IRANI et al., 1986; MATIN et al., 1992). Bei der durch Hypersekretion gekennzeichneten zystischen Fibrose nimmt der prozentuale Anteil Chymase-haltiger Mastzellen dramatisch zu (SCHWARTZ et al., 1987b). Vermutlich führt die Degranulation dieser Mastzellen zu einer hohen lokalen Konzentration von Chymase, wodurch die serösen Drüsenzellen zu vermehrter Sekretion stimuliert werden (SOMMERHOFF et al., 1992).

Obwohl die Bedeutung der Verschiebung von Mastzellsubtypen noch nicht geklärt ist, wird angenommen, dass die mit der Vermehrung des jeweiligen Mastzellsubtyps verbundene Zunahme der Enzymaktivität, insbesondere wenn sie mit der Abnahme der Aktivität des jeweils anderen Enzyms verbunden ist, zu einer Imbalanz im biochemischen Regulationssystem führen kann (HARVIMA et al., 1990), was pathomechanistisch von Bedeutung ist.

Ein Beispiel für die möglichen Folgen eine solche Imbalanz wurde bei der zystischen Fibrose besprochen. Als Beispiel für eine Erkrankung, in der es gerade zu einer umgekehrten Verschiebung kommt, soll kurz die schon erwähnte Psoriasis besprochen werden. Durch den Verlust von Chymase bei entzündlichen Erkrankungen wie der Psoriasis kommt es zu einem Ausbleiben der Degradierung von Substanz P, die beim Hund nur durch Chymase, nicht aber durch Tryptase möglich ist (CAUGHEY et al., 1988d). Dieser Zusammenhang erklärt den von NAUKKARINEN et al. (1989) beobachtete Anstieg an Substanz P-enthaltenden Nerven in den durch die Psoriasis bedingten Hautläsionen. Substanz P wiederum fördert die Freisetzung von Histamin aus Hautmastzellen (LOWMAN et al., 1988). Insgesamt kommt es durch die Abnahme der Mastzell-Chymase zu einem Verlust der Regulierung der durch Substanz P-vermittelten neurogenen Entzündung.

#### **2.6.4.2 T- und TC-Mastzellen beim Hund**

Bei den Untersuchungen der Haut von atopischen Hunden wurde in der Dermis keine Verschiebung im Verhältnis der drei Mastzelltypen im Vergleich zu gesunden Hunden festgestellt. In der Subkutis dagegen war der Anteil der T-Mastzellen bei den Hunden mit atopischer Dermatitis auffallend niedriger als bei den Kontrolltieren (WELLE et al., 1997c). Die Werte der Kontrolltiere stammen aus der im Folgenden vorgestellten Studie.

Shar Peis mit kutaner Muzinose weisen verglichen mit gesunden Hunden (den hier untersuchten Hunden) in der Dermis einen höheren Anteil an T- und C-Mastzellen auf (WELLE et al., 1997b).