

**ISOLIERUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG  
HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von

**Dipl. Biol. Silke Schwengberg**

geb. am 26.09.1967 in Lünen/Westf.

1998

Referent: Prof. Dr. M.P. Manns

Korreferent: Prof. Dr. K. Resch

Tag der Promotion: 24. 11. 1998

Datum der Veröffentlichung: Dezember 1998

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit gelang es, Mastzellen aus humaner Darmschleimhaut zu isolieren (Reinheit ca. 5 %) und sowohl mittels Magnetseparation als auch durch Langzeitkultur unter Zusatz von SCF bis auf 100 % anzureichern. Durch Dichtegradientenzentrifugation, wie sie für Rattenmastzellen beschrieben wurde, konnte dagegen keine nennenswerte Anreicherung erzielt werden.

In einem neu etablierten Kultursystem konnte nachgewiesen werden, daß SCF nicht nur die Reifung von Mastzell-Vorläufern, sondern auch das Überleben und die Proliferation reifer, aus humanem Gewebe isolierten Mastzellen induziert. Interleukin-3, ein wichtiger Wachstumsfaktor für murine Mastzellen, hatte keinen Einfluß auf das Überleben der Mastzellen in unserem Kultursystem.

SCF beeinflusste ebenfalls die Mediatorfreisetzung aus intestinalen Mastzellen, indem es sowohl die durch IgE-Rezeptor Quervernetzung hervorgerufene Mediatorfreisetzung verstärkte, als auch bei kultivierten Mastzellen selbst zu einer Mediatorfreisetzung führte. Damit konnte SCF als erstes Zytokin identifiziert werden, das die Mediatorfreisetzung aus humanen Mastzellen induziert.

Es konnte gezeigt werden, daß Neuropeptide, die die Freisetzung von Histamin aus humanen Haut- und Lungenmastzellen induzieren können, und Chemokine, die basophile Granulozyten aktivieren können, keinen Einfluß auf die Mediatorfreisetzung aus humanen intestinalen Mastzellen haben. Nicht aktivierte intestinale Mastzellen exprimieren keine Rezeptoren für bestimmte Neuropeptide, die Tachykinine, allerdings konnte nach IgE-Rezeptor Quervernetzung einer der Rezeptoren, der NK-1 Rezeptor, durch RT-PCR und Immunzytochemie nachgewiesen werden.

Durch IgE-Rezeptor Quervernetzung konnten humane intestinale Mastzellen zur Produktion der Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-5 angeregt werden, wodurch zum ersten Mal eine Zytokinproduktion durch humane intestinale Mastzellen nachgewiesen werden konnte. Auch intestinale Bakterien sowie Lipopolysaccharid aus *E. coli* stimulierten die TNF- $\alpha$  Produktion, hatten aber nur einen geringen Einfluß auf die Freisetzung von Histamin und Sulfidoleukotrienen, was auf unterschiedliche Regulationmechanismen hindeutet.

**Schlagnworte:** humane intestinale Mastzellen, Mediatorfreisetzung, Zytokine

## ABSTRACT

In the present study, mast cells from human intestinal mucosa were isolated (about 5 % purity) and purified up to 100 % either by magnetic separation or by long-term culture in SCF-containing medium. Density gradient centrifugation over Percoll gradients, which was described for rodent mast cells before, did not raise mast cell purity in these experiments.

Using a new long-term culture system it was demonstrated that SCF not only causes mast cell maturation from their progenitors, but also induces survival and proliferation of mature mast cells isolated from human intestinal tissue. Interleukin-3, which is a potent growth factor for rodent mast cells, did not affect the survival of mast cells in this culture system.

SCF also had effects on the mediator release of human intestinal mast cells, either by enhancing the release after IgE-receptor crosslinking, or by inducing mediator release by itself from cultured mast cells. Therefore, SCF was identified as the first cytokine inducing mediator release from human intestinal mast cells.

It was shown that several neuropeptides known to induce histamine release from human skin and rodent mast cells, and chemokines, which activates mediator release from human basophils, failed to induce the release of histamine, sulfidoleukotrienes or TNF- $\alpha$  from human intestinal mast cells. Moreover, resting mast cells did not express receptors for some of the neuropeptides, the tachykinins, but become positive for the NK-1 receptor (RT-PCR and immunocytochemistry) after activation by IgE receptor-crosslinking.

After IgE receptor crosslinking, human intestinal mast cells produced and released the cytokines TNF- $\alpha$  and interleukin-5. Therefore it could be demonstrated for the first time, that human intestinal mast cells are capable of producing cytokines. Intestinal bacteria and lipopolysaccharide from *E. coli* also induced TNF- $\alpha$  release, but only marginal amounts of histamine and sulfidoleukotrienes, suggesting different regulation mechanisms for the production of these mediators.

**Keywords:** human intestinal mast cells, mediator release, cytokines

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>MASTZELLEN</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>BAU UND FUNKTION DER DARMSCHLEIMHAUT</b>	<b>14</b>
<b>1.3</b>	<b>PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER MASTZELLEN IM GASTROINTESTINALTRAKT</b>	<b>18</b>
<b>1.4</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>22</b>
2.1.1	GEWEBEPROBEN ZUR ISOLATION VON ZELLEN AUS HUMANER DARMSCHLEIMHAUT	22
2.1.2	REAGENZEN UND SUBSTANZEN	22
2.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLISOLATION	25
2.1.4	ZELLKULTUR	26
2.1.5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN-BLOT	27
<b>2.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>29</b>
2.2.1	ISOLATION VON MASTZELLEN AUS HUMANER DARMSCHLEIMHAUT	29
2.2.2	ANREICHERUNG VON MASTZELLEN DURCH DICHTEZENTRIFUGATION	30
2.2.3	ANREICHERUNG VON MASTZELLEN DURCH MAGNETSEPARATION	30
2.2.4	ZELLKULTUR	31
2.2.5	ZELLZÄHLUNG UND -DIFFERENZIERUNG	31
2.2.6	KULTUR UNGEREINIGTER MASTZELL-PRÄPARATIONEN MIT ZYTOKIN-INHIBIERENDEN ANTIKÖRPERN	32
2.2.7	PRÄPARATION INTESTINALER BAKTERIEN	33
2.2.8	MEDIATOR-FREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	33
2.2.8.1	KURZZEIT-STIMULATION (WASSERBAD-EXPERIMENTE)	33
2.2.8.2	LANGZEIT-STIMULATION	35
2.2.8.3	STIMULATION MIT INTESTINALEN BAKTERIEN	35

2.2.9	QUANTITATIVER NACHWEIS VON MASTZELL-MEDIATOREN MITTELS IMMUNOASSAY	35
2.2.10	QUALITATIVER NACHWEIS VON TNF- $\alpha$ DURCH SDS-POLYACRYLAMID- GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) UND WESTERN-BLOT	36
2.2.11	RT-PCR MIT PRIMERN GEGEN HUMANE TACHYKININ-REZEPTOREN	37
2.2.12	IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS DES NEUROKININ-1 REZEPTORS (NK-1) AUF ISOLIERTEN MASTZELLEN	38
2.2.13	STATISTIK	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>ISOLATION VON MASTZELLEN AUS HUMANER INTESTINALER MUKOSA</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>ANREICHERUNG UND KULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN</b>	<b>43</b>
3.2.1	ANREICHERUNG HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN DURCH DICHTEGradientENZENTRIFUGATION (PERCOLL)	43
3.2.2	ANREICHERUNG HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN MITTELS MAGNETSEPARATION	44
3.2.3	LANGZEITKULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN	45
<b>3.3</b>	<b>EINFLUß ZYTOKIN-INHIBIERENDER ANTIKÖRPERN AUF ÜBERLEBEN UND HISTAMINGEHALT HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN</b>	<b>53</b>
3.4.1	EINFLUß DER KULTUR MIT SCF AUF DIE FREISETZUNG VON HISTAMIN UND SULFIDOLEUKOTRIENEN AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	53
3.4.2	EINFLUß VON NEUROPEPTIDEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	56
3.4.3	EINFLUß VON CHEMOKINEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN	60
<b>3.5</b>	<b>ZYTOKINPRODUKTION DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN</b>	<b>62</b>
3.5.1	PRODUKTION VON TNF- $\alpha$ UND EINFLUß VON BAKTERIEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	62
3.5.2	PRODUKTION VON INTERLEUKIN-5 (IL-5) DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN	64

<b>3.6</b>	<b>EXPRESSION DES NEUROKININ-REZEPTORS NK-1 DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN</b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>ANREICHERUNG UND KULTUR HUMANER INTESTINALER MASTZELLEN UND DEREN EINFLUß AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG</b>	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>EINFLUß VON NEUROPEPTIDEN UND CHEMOKINEN AUF DIE MEDIATORFREISETZUNG AUS HUMANEN INTESTINALEN MASTZELLEN</b>	<b>76</b>
<b>4.3</b>	<b>ZYTOKIN-PRODUKTION DURCH HUMANE INTESTINALE MASTZELLEN</b>	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>ROLLE DER MASTZELLEN AN DER GASTROINTESTINALEN BARRIERE</b>	<b>86</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>EIDESTÄTTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>111</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>112</b>

## 1 EINLEITUNG (GEKÜRZT)

Mastzellen sind Gewebszellen, die in fast allen Bindegeweben des Körpers vorkommen. Besonders häufig sind sie in Geweben zu finden, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen, wie z.B. der Haut und der Schleimhaut des Respirations- und des Gastrointestinaltraktes (1,2). Mastzellen wurden zuerst im Jahr 1878 von *Paul Ehrlich* (5) beschrieben, der im Rahmen seiner Dissertation über histologische Färbungen einen Zelltyp fand, dessen Granula sich mittels des Farbstoffes Anilinblau tief violett anfärben ließen.

Mastzellen sind große, runde bis ovale mononukleäre Zellen, deren Zytoplasma mit sekretorischen Granula gefüllt ist (6). In diesen sind präformierte Mediatoren in kristalliner Form an eine Matrix aus Proteoglykanen gebunden. Wird die Zelle aktiviert, gehen die Mediatoren in eine lösliche Form über und werden über Exozytose ausgeschleust ("Degranulation"). Neben der Freisetzung von präformierten Mediatoren werden nach entsprechender Stimulation außerdem Lipidmediatoren (Leukotriene und Prostaglandine) *de novo* synthetisiert (7).

Neuere Untersuchungen zeigten, daß Mastzellen auch in der Lage sind, Zytokine zu produzieren (8-11). Murine Mastzellen exprimieren Interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , und TNF- $\alpha$  (9). Diese Befunde konnten für humane Mastzellen nur teilweise bestätigt werden. So sind humane Hautmastzellen und Lungenmastzellen in der Lage, TNF- $\alpha$  zu produzieren und auch *in vitro* nach Stimulation freizusetzen (12,13). Die Beobachtung, daß Mastzellen in der Lage sind, Zytokine zu produzieren, eröffnet eine neue Sichtweise auf die bislang weitgehend unbekanntes physiologische Bedeutung der Mastzellen.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für humane Mastzellen sind Stem cell factor (SCF oder *c-kit* Ligand) sowie Interleukin-3 (IL-3), wobei der Effekt von IL-3 in der Bereitstellung von Vorläuferzellen, die den SCF-Rezeptor *c-kit* tragen, besteht (22-25). Reife humane Mastzellen haben keinen IL-3 Rezeptor auf ihrer Oberfläche und unterscheiden sich dadurch von basophilen Granulozyten (26,27). Im murinen System dagegen ist IL-3 neben SCF ein wichtiger Wachstumsfaktor auch für reife Mastzellen, es sind aber auch eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren (IL-4; IL-9; IL-10; nerve growth factor, NGF; granulocyte/macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) bekannt, die *in vitro* die Entwicklung von murinen Mastzellen aus

Vorläuferzellen ermöglichen (20). Humane Mastzellen benötigen den Wachstumsfaktor SCF nicht nur in ihrer frühen Entwicklung, sondern er ist auch für die Differenzierung und Reifung der Zellen im Gewebe sowie für ihr Überleben verantwortlich. Daher tragen Mastzellen aller Entwicklungsstufen den Rezeptor für SCF, *c-kit* (CD117), auf ihrer Oberfläche, während er bei anderen Knochenmarkszellen nur in unreifen Stadien exprimiert wird. So haben reife basophile Granulozyten z.B. kein CD117 auf ihrer Oberfläche (27-29).

Humane Mastzellen werden nach ihrem Protease-Gehalt in zwei Gruppen unterteilt: Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren ( $M_T$ ) und Mastzellen, die sowohl Tryptase als auch Chymase exprimieren ( $M_{TC}$ ) (35-37). Die physiologische Bedeutung der Mastzell-Subtypen ist noch nicht geklärt. Erste Untersuchungen deuten aber auf eine pathologische Bedeutung hin. In einer weiteren Arbeit wurde berichtet, daß sich die Mastzell-Subtypen auch aufgrund der Zytokine, die bei der Aktivierung der Mastzellen ausgeschüttet werden, voneinander unterscheiden (15).

Mastzellen können durch unterschiedliche Substanzen stimuliert und zur Degranulation sowie zur Neusynthese von Mediatoren angeregt werden. Dabei unterscheiden sich sowohl die Mastzell-Subtypen des Menschen untereinander als auch die Mastzellen verschiedener Spezies erheblich in ihrer Fähigkeit, durch IgE-unabhängige Stimuli wie z.B. Neuropeptide, Chemokine oder Anaphylatoxine aktiviert zu werden (25,42-44). Die wichtigste physiologische Aktivierung von Mastzellen aller Spezies geschieht durch Quervernetzung der auf ihrer Oberfläche befindlichen hochaffinen Rezeptoren für Immunglobulin E (IgE), den  $Fc_\epsilon RI$  (45). Diese Rezeptoren binden IgE-Moleküle über ihren Fc-Teil und sind *in vivo* immer mit IgE-Molekülen beladen. Wird nun ein multivalentes Antigen ("Allergen") von mehreren dieser IgE-Molekülen erkannt und gebunden, kommt es zu einer Quervernetzung ("crosslinking") der IgE-Moleküle und damit auch der Rezeptoren, was zu einer Aktivierung der Zelle und zur Freisetzung der Mediatoren führt. *In vitro* kann eine IgE-Rezeptor Quervernetzung durch Antikörper gegen den IgE-Rezeptor hervorgerufen werden (46). Neben der IgE-Rezeptor Quervernetzung gibt es eine Reihe sog. "nicht-immunologischer", d.h. von IgE-Molekülen unabhängiger Stimuli für Mastzellen. Für humane Hautmastzellen und Mastzellen aus Ratten und Mäusen sind verschiedene nicht-immunologische Stimuli beschrieben. Im Gegensatz dazu sind für humane Mastzellen aus der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt kaum nicht-immunologische Stimuli bekannt (43). Diese Befunde machen deutlich, daß es

sowohl zwischen den Spezies als auch innerhalb einer Spezies große funktionelle Unterschiede zwischen den Mastzell-Subtypen gibt.

Obwohl Mastzellen histologisch schon lange in vielen Geweben und Organen des menschlichen Körpers beschrieben wurden, ist ihre physiologische Bedeutung nach wie vor nicht geklärt. Das breite Wirkungsspektrum der von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren legt die Vermutung nahe, daß sie auch bei nicht-allergischen Entzündungsprozessen im Körper eine Rolle spielen können. Die in neuerer Zeit gewonnene Erkenntnis, daß Mastzellen in der Lage sind, Zytokine zu produzieren (8), erweitert das Spektrum ihrer Bedeutung von einer reinen Effektorzelle hin zu einer Zelle mit immunregulatorischen Funktionen. Die physiologische Bedeutung der Mastzellen für die gastrointestinale Barriere ist weitgehend unklar. Schon länger ist bekannt, daß Mastzellen gehäuft bei bestimmten gastrointestinalen Entzündungsprozessen wie der *Colitis ulcerosa* vorkommen (61). Die von Mastzellen sezernierten Mediatoren haben einen Einfluß auf Gewebshomöostase und Gewebsdurchblutung sowie auf die Kontraktion glatter Muskulatur. Die von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren stimulieren darüber hinaus den Ionentransport an der humanen intestinalen Mukosa (64), dieser Vorgang kann *in vitro* an isolierter Mukosa (Ussing-Kammer Experimente) durch IgE Rezeptor Quervernetzung induziert werden (65,66). In der humanen Darmschleimhaut sind Mastzellen häufig in direkter Nachbarschaft zu Nervenendigungen zu finden (67). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß von den Nervenzellen ausgeschüttete Botenstoffe die Mediatorfreisetzung aus Mastzellen aktivieren können. Bislang konnte allerdings für humane intestinale Mastzellen diese Annahmen nicht bestätigt werden (43). Im Tiermodell konnte aber gezeigt werden, daß die von Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren in der Lage sind, ihrerseits die Nervenzellen der intestinalen Mukosa zu stimulieren (68,69).

Im Tiermodell konnte vor kurzem gezeigt werden, daß Mastzellen im Gastrointestinaltrakt durch das von ihnen ausgeschüttete TNF- $\alpha$  eine protektive Rolle bei der Abwehr von pathogenen Keimen spielen können (77,78). Auch humane Hautmastzellen können nach Stimulation TNF- $\alpha$  freisetzen (13), für humane intestinale Mastzellen liegen allerdings noch keine derartigen Ergebnisse vor. Auch ist die Wirkung von Bakterien oder bakteriellen Antigenen auf humane Mastzellen bisher nicht untersucht worden.