

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

Prozessierung und Lokalisierung der Tryptasen γ und δ in HMC-1 Mastzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tobias Schmidt

aus

Berlin

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Peter Fraunberger
Priv. Doz. Roghieh Djafarzadeh-Pütz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2016

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Prozessierung und Lokalisierung der Tryptasen γ und δ in HMC-1 Mastzellen“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

.....
(Tobias Schmidt)

Abkürzungsverzeichnis	1
A Zusammenfassung	3
B Einleitung	5
B.1 Mastzellen	5
B.2 Tryptasen	7
B.2.1 Tryptase β	7
B.2.2 Tryptase α	9
B.2.3 Tryptase γ	10
B.2.4 Tryptase δ	11
B.3 Die HMC-1 Mastzelllinie	12
B.4 Ziele und geplantes Vorgehen	14
C Material und Methoden	17
C.1 Materialien	17
C.1.1 Geräte	17
C.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
C.1.3 Bakterienstamm E. coli TOP10F'	18
C.1.4 Chemikalien und biologische Stoffe	18
C.1.5 Kulturmedien und Zusätze	19
C.1.6 Puffer und Lösungen	20
C.1.7 Vektoren	21
C.1.8 Referenzsequenzen	23
C.1.9 Software	23
C.2 Methoden	23
C.2.1 Zellkultur	23
C.2.2 Transiente Transfektion	25
C.2.3 Stabile Transfektion	26
C.2.4 Molekularbiologie	28
C.2.5 Proteinchemische Verfahren	34
C.2.6 Flowzytometrie	36
C.2.7 Fluoreszenzmikroskopie von Cytospins	38
C.2.8 Konfokale Mikroskopie	39
D Ergebnisse	41
D.1 Tryptase- γ - und - δ -cDNA-Konstrukte	41
D.1.1 Vektordesign	41
D.1.2 Tryptase- γ -Konstrukt	42
D.1.3 Tryptase- δ -Konstrukt	45
D.2 Transiente Transfektion	46
D.2.1 Etablierung der transienten Transfektion von HMC-1 Mastzellen	46
D.2.2 Transiente Transfektion von HMC-1 Mastzellen mit Tryptase- Fluoreszenzprotein-Konstrukten	48
D.2.3 Transiente Transfektion weiterer Zelllinien mit den Tryptase- Fluoreszenzprotein-Konstrukten	50
D.2.4 Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie	53
D.2.5 Immunoblot-Analyse der exprimierten Tryptase-Fusionsproteine	56
D.3 Tryptase-Konstrukte der 2. und 3. Generation	58
D.3.1 Tryptase-Konstrukte der 2. Generation	58
D.3.2 Tryptase-Konstrukte der 3. Generation	65

D.4	Tryptase- α - und - β -Konstrukte	70
D.5	Generierung stabiler HMC-1 Klone	72
D.5.1	Stabile Transfektion von HMC-1 Mastzellen.....	72
D.5.2	Nachweis des klonalen Ursprungs stabiler HMC-1 Klone	73
D.5.3	Charakterisierung der stabilen HMC-1 Klone mittels Flowzytometrie.....	74
D.5.4	Prozessierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine in HMC-1 Klonen	75
D.5.5	Lokalisierung der stabil exprimierten Tryptase-Fusionsproteine durch konfokale Mikroskopie	79
E	Diskussion.....	85
E.1	Nachweis von Tryptasen mittels Reportergenen	85
E.2	Transfektion von HMC-1 Mastzellen	86
E.2.1	Etablierung der transienten Transfektion von Mastzellen	86
E.2.2	Transiente Transfektion mit den Tryptase- γ - und δ -Fusionsprotein- Konstrukten	87
E.2.3	Stabile Transfektion	87
E.3	Analyse der Tryptase-Fluoreszenzproteine	89
E.3.1	Charakterisierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine.....	89
E.3.2	Stabilisierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine durch Sequenz- optimierung	89
E.3.3	Expression der Tryptase-Fluoreszenzproteine in stabil transfizierten HMC-1 Mastzellen.....	91
E.3.4	Abspaltung der Transmembrandomäne der Tryptase γ	92
E.4	Lokalisierung der Tryptase-Fusionsproteine in HMC-1.....	93
E.4.1	Lokalisierung der Tryptase- γ -Fluoreszenzproteine	93
E.4.2	Lokalisierung der Tryptase- δ -Fluoreszenzproteine	94
E.4.3	Lokalisation der Tryptase- α - und - β -Fluoreszenzproteine	94
E.5	Synopsis und Ausblick	97
F	Literaturverzeichnis	99
G	Anhang	105
G.1	Originalsequenzen der Fusionsproteine	105
G.1.1	Sequenz des Tryptase- γ -eYFP-Konstrukts	105
G.1.2	Sequenz des Tryptase- δ -eYFP-Konstrukts.....	107
G.2	Immunoblot mit dem Anti-His6-Tag-Antikörper.....	109
G.3	Digitaler Anhang	109
H	Danksagung	111
I	Curriculum Vitae	113

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
c	Zellen
Cat	Cathepsin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CSF	colony stimulating factor
Chr.	Chromosom
eCFP	enhanced cyan fluorescent protein
ECL	Elektrochemolumineszenz
eGFP	enhanced green fluorescent protein
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FBS	fetales bovines Serum
FP	Fluoreszenzprotein
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen colony stimulating factor
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HEK	humane embryonale Nierenzelllinie
HFTR	HEK 293 Flip-in T-Rex (Zellen)
HMC-1	human mast cell Line 1
His6/H6	Sequenzabfolge von 6 Histidin-Resten in Folge
HRP	Meerrettich-Peroxidase
MCS	multiple cloning cite
mMCP	Maus Mastzell-Protease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NGF	nerve growth factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RFU	relative fluorescence unit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler (Standard Error of Mean)
SCF	Stammzellfaktor
SCF-R	Stammzellfaktor-Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STAT	Signal Transducer and Activator (Protein)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett

A Zusammenfassung

Der Begriff ‚Tryptase‘ subsumiert vier Trypsin-ähnliche Serinproteasen, die beim Menschen nahezu selektiv in Mastzellen exprimiert werden. Die Tryptasen α und β sind strukturell und funktionell bereits gut charakterisiert und der Tryptase β wird ein wichtiger Beitrag zu den physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Mastzelle zugeschrieben. Über die erst 1999 identifizierten Tryptasen γ und δ und ihre Rolle in der Mastzellbiologie ist dagegen weitaus weniger bekannt.

Tryptase δ besitzt ~82% Sequenzidentität zu den Tryptasen α und β . Das δ -Gen wurde zunächst als Pseudogen eingestuft, da eine Expression nicht nachgewiesen werden konnte und das Protein C-terminal um 40 Aminosäuren verkürzt ist. Wang et al. (2002) konnten Tryptase δ später allerdings in humanen Gewebeproben detektieren und nachweisen, dass ein in *E. coli* exprimiertes rekombinantes Protein geringfügige enzymatische Aktivität besitzt [1]. Tryptase γ grenzt sich durch eine geringe Sequenzidentität (~48%) und einen eigenen Aktivierungsmechanismus von den Tryptasen α und β ab. Außerdem besitzt diese Tryptase eine C-terminale hydrophobe Domäne, die eine Bindung an die Zellmembran wahrscheinlich macht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Prozessierung und Lokalisierung der Tryptasen γ und δ in Mastzellen am Modell der HMC-1 Zelllinie zu untersuchen. Da eine immunologische Unterscheidung insbesondere der Tryptasen δ , α und β wegen der großen Sequenzübereinstimmung nicht zuverlässig möglich erschien, wurden die Tryptasen γ und δ (sowie als Kontrolle α und β) mit Fluoreszenzproteinen markiert. Dazu wurden cDNA-Konstrukte generiert, die für Fusionsproteine der Tryptasen in C-terminaler Verbindung über eine kurze Linker-Sequenz mit eYFP kodieren. Diese Konstrukte wurden in den Transfektionsvektor pcDNA3.1/Hygro+ eingefügt. Die transiente Transfektion von HMC-1 Mastzellen wurde zunächst mit dem Kontroll-Plasmid pcDNA3.1/eYFP etabliert und dessen Expression durch Flowzytometrie quantifiziert. Unter 15 evaluierten Transfektionsmethoden erwies sich die Lipofektion mit Lipofectamin 2000 mit einer Transfektionsrate von $45 \pm 5\%$ (Mittelwert \pm SEM, $n \geq 10$) und geringer Toxizität ($5 \pm 1\%$) als am besten geeignet. Analog wurden HMC-1 Mastzellen mit den Fusionskonstrukten Tryptase- γ -eYFP und - δ -eYFP transfiziert, wobei die Transfektionsraten bei ähnlicher Toxizität geringer ausfielen ($26 \pm 3\%$ bzw. $20 \pm 2\%$).

Der immunologische Nachweis mittels Immunoblot mit eGFP- und Tryptase-Antikörpern zeigte, dass mit durchschnittlich $67 \pm 6\%$ des Tryptase- γ -eYFP und $38 \pm 6\%$ des Tryptase- δ -eYFP ein großer Anteil beider Fusionsproteine im Bereich der Linker-Sequenz zwischen Tryptase und eYFP gespalten wird. Durch die sukzessive Elimination von zwei basischen Aminosäuren aus der Linker-Sequenz als potentielle Angriffspunkte für tryptische Enzymaktivität wurde die Prozessierung der γ - bzw. δ -Fusionsproteinkonstrukte auf $21 \pm 5\%$ bzw. $19 \pm 7\%$ der Gesamtexpression reduziert.

Um den zeit- und kostenaufwändigen Vorgang der Lipofektion zu vermeiden, wurden mittels ‚Limited Dilution‘ HMC-1 Zellklone isoliert, die die Tryptase- γ - und - δ -Fluoreszenzproteine stabil exprimieren. In einigen stabilen Klonen lag die Prozessierungsrate der beiden optimierten Fusionsproteine der 3. Generation deutlich unter 10%. In Tryptase- γ -eYFP-exprimierenden Klonen wurden im Immunoblot zudem neue Spaltfragmente detektiert, deren Masse eYFP kombiniert mit der γ -typischen C-terminalen Transmembrandomäne entspricht.

Durch konfokale Mikroskopie konnten die Tryptase-eYFP-Fusionsproteine in ruhenden HMC-1 Mastzellen lokalisiert werden. Tryptase- γ -eYFP ist primär an der Membran der Mastzellgranula nachweisbar; zusammen mit dem Nachweis der isolierten Transmembrandomäne macht dies eine Freisetzung durch das sogenannte ‚Membrane-Shedding‘ wahrscheinlich. Im Gegensatz zu den Kontrollkonstrukten Tryptase- α - und - β -eYFP ist Tryptase- δ -eYFP nicht in Mastzellgranula nachweisbar, sondern verteilt sich in feinen Clustern im Zytosol, so dass ein alternativer Prozessierungs- und Sekretionsmechanismus unabhängig von der Degranulation der Mastzellen wahrscheinlich ist.

B Einleitung

B.1 Mastzellen

Mastzellen haben ihren Ursprung in CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Sie zirkulieren in unreifem Zustand im Blutstrom [2], ihre vollständige Differenzierung erfolgt erst nach der Extravasation in Mucosa und Bindegewebe. In höherer Dichte finden sich Mastzellen in der Zunge, der Haut, dem Gastrointestinaltrakt und den Atemwegen [3, 4], also an den Kontaktflächen des Körpers mit der Umwelt. Studien an Mäusen und anderen Säugetieren haben gezeigt, dass die Morphologie reifer Mastzellen sowie das Profil der von ihnen produzierten Mediatoren und somit ihre Funktion stark vom jeweiligen Zielgewebe abhängen [5-7]. Charakteristisches Merkmal reifer Mastzellen sind die in variierender Anzahl vorkommenden, häufig dicht gepackten, basophilen Granula im Zytoplasma (s. Abb. B-1). Je nach Phänotyp enthalten sie präformierte Mediatoren wie Histamin, die Proteasen Trypsin, Chymase und Carboxypeptidase A sowie

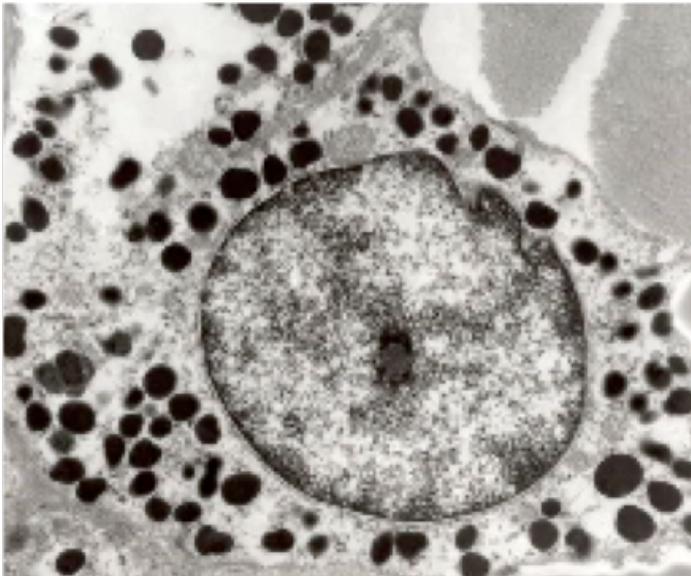


Abb. B-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mastzelle: Die dicht mit Mediatoren gefüllten Granula sind elektronendicht und erscheinen deshalb tiefschwarz [Université de Fribourg, Faculté des sciences, Département de médecine, Unité d'Anatomie].

Glukosaminoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat), die nach Aktivierung der Zelle durch Degranulierung rasch freigesetzt werden. Außerdem wird je nach Stimulus eine Vielzahl an neu formierten Mediatoren sezerniert (Prostaglandine, Leukotriene, Plättchen-aktivierender Faktor, Wachstums- und Komplement-faktoren, diverse Interleukine) [8].

In den über hundert Jahren seit der Erstbeschreibung durch den Nobelpreisträger Paul Ehrlich sind Mastzellen vor allem als Effektoren der IgE-abhängigen Typ I Hypersensitivitätsreaktion bekannt geworden. Dabei binden multivalente Allergene an membrangebundene IgE-Moleküle und bewirken so die Quervernetzung und Aggregation hochaffiner IgE-Rezeptoren (Fc ϵ RI), die Aktivierung der Mastzelle und die Ausschüttung ihrer Mediatoren. Sukzessive kommt es zu den typischen, mit einer Allergie assoziierten, IgE-

vermittelten Effekten wie gesteigerter Gefäßpermeabilität, Kontraktion glatter Muskulatur und gesteigerter Sekretion an Schleimhäuten, die in Symptomen wie allergischer Rhinitis, Urtikaria, bronchialer Obstruktion oder dem komplexen Bild einer potentiell lebensgefährlichen anaphylaktischen Reaktion münden können [9, 10]. Seit Langem sind Mastzellen und ihre Mediatoren deshalb Ziel der Pharmakotherapie allergischer Reaktionen, z.B. durch Mastzellstabilisatoren, Histamin-Rezeptorantagonisten und Leukotrienantagonisten.

Erst in den letzten 20 Jahren hat sich das Bild der Mastzelle vom alleinigen Effektor akuter allergischer Reaktionen zu dem einer pleomorphen Zelle gewandelt, die durch Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe in der Lage ist, ihre vielseitigen Funktionen wechselnden Erfordernissen anzupassen [8]. Dazu hat u.a. die Beschreibung IgE-unabhängiger Aktivierungswege über Toll-like- und IgG-Rezeptoren [11, 12] sowie die Charakterisierung ihres breiten Spektrums exprimierter Zytokine (s.o.) und Zytokinrezeptoren (z.B. für Il-4, -6, -9, -10, SCF und NGF) beigetragen [8]. So hat die Mastzelle viele physiologische Funktionen bei der Abwehr schädlicher Einflüsse auf den Körper in der angeborenen und adaptiven Immunität (Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen), bei Angiogenese, Hämostase und Wundheilung [8, 13]. Dem gegenüber steht ihre Rolle in der Pathogenese zumeist chronisch entzündlicher Erkrankungen. Im Rahmen allergischer Reaktionen ist die Mastzelle auch nach der Sofortreaktion in späteren Phasen der allergischen Inflammation involviert, bis hin zur chronischen Phase mit Gewebsumbau und Fibrosierung [14], und wird so als wichtiger Faktor in der chronisch-allergischen Rhinosinusitis, bei Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis angesehen [15, 16]. Weiterhin werden Mastzellen unter anderem mit der Entstehung des M. Crohn, der Formation atherosklerotischer Plaques bei kardiovaskulären Erkrankungen, überschießender Narbenbildung und mit der Genese verschiedener Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose, Typ I Diabetes mellitus und Sjögren-Syndrom in Verbindung gebracht [8, 13].

Besonders kontrovers diskutiert wird die Rolle der Mastzelle bei der Entstehung und Ausbreitung von Krebserkrankungen. Einerseits werden ihr anti-neoplastische Effekte wie die Induktion von Apoptose, Inhibierung des Zellwachstums sowie Förderung der inflammatorischen Tumorabwehrreaktion zugeschrieben. Andererseits korreliert im Fall einiger maligner Tumorerkrankungen (z.B. Hodgkin-Lymphom,

Melanom und Adenokarzinom der Prostata) die Mastzellanzahl in der Tumorumgebung mit einer schlechten Prognose. Deshalb wird vermutet, dass Mastzellen und ihre Mediatoren durch Förderung von Angiogenese sowie durch Degradierung und Umstrukturierung der Extrazellulärmatrix das Wachstum und die lokale Ausbreitung und Metastasierung von malignen Tumoren begünstigen können [17].

Zusammenfassend muss davon ausgegangen werden, dass das Ausmaß und die Art der Aktivierung sowie die Anzahl der aktivierten Zellen beeinflussen, ob Mastzellen einen protektiven physiologischen Effekt oder eine pathophysiologische Wirkung entfalten. Grundlage hierfür ist die Vielfalt der Aktivierungs- und Interaktionswege der Mastzelle durch ihre und mit ihrer Mikroumgebung [8, 13, 15].

B.2 Tryptasen

Die Familie der Mastzell-Tryptasen umfasst vier Trypsin-ähnliche Serinproteasen (α , β , δ und γ), die durch die Gene TPSAB1, TPSB2, TPSD1 und TPSG1 auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 (Chr. 16p13.3) kodiert werden. Tryptasen werden nahezu ausschließlich in Mastzellen und in geringeren Mengen auch in basophilen Granulozyten exprimiert. In Mastzellen machen sie bis zu 25% des Proteingehalts aus, so dass es nahe lag, ihnen eine wichtige Rolle in der Mastzellfunktion zuzuschreiben [18].

B.2.1 Tryptase β

Tryptase β ist das am besten charakterisierte und prototypische Mitglied der Tryptase-Familie. Sie wird in Mastzellen als Präpro-Protein exprimiert, das sofort durch Autokatalyse und unter Beteiligung von Heparin und der Dipeptidyl-Peptidase Cathepsin C aktiviert wird [19, 20]. Neuere Studien beschreiben auch einen alternativen Aktivierungsweg des β -Zymogens durch die ebenfalls in den Mastzellgranula vorkommenden Peptidasen Cathepsin B und L [21]. Die Aktivität der reifen Tryptase β in den Mastzellgranula wird wahrscheinlich durch die dichte Packung mit Proteoglykanen und das saure Milieu unterdrückt. Bei der Degranulation der Mastzellen wird Tryptase β zusammen mit Heparin, Histamin und anderen präformierten Mediatoren ausgeschüttet und entfaltet ihre enzymatische Aktivität im Extrazellulärraum [22, 23].

Tryptase β ist in Form eines Tetramers enzymatisch aktiv (s. Abb. B-2), in dem die Monomere einen rechteckigen, flachen Rahmen bilden, bei dem die aktiven Zentren auf eine zentrale Pore hin ausgerichtet sind [24-26]. Die Monomer-Monomer-Kontaktflächen werden durch Anlagerung negativ geladener Proteoglykane wie Heparin überbrückt, die so das Tetramer stabilisieren. In Abwesenheit von Proteoglykanen dissoziiert das Tetramer rasch in enzymatisch weitgehend inaktive Monomere, was die Aktivität limitiert [27-30]. Diese tetramere Quartärstruktur mit der für große oder unflexible Substrate unzugänglichen zentralen Pore (\varnothing ca. 15x40 Å) bedingt auch die ungewöhnliche Substratspezifität der Tryptase β und ihre Resistenz gegen Inaktivierung durch endogene Proteinaseinhibitoren wie Serpine und α -2-Makroglobulin, was Tryptase β von nahezu allen anderen humanen Serinproteasen und den Tryptasen anderer Spezies unterscheidet [18, 24].

Nicht zuletzt aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften und der starken und selektiven Expression in Mastzellen wird Tryptase β eine wichtige Beteiligung an den pathophysiologischen und physiologischen Funktionen der Mastzelle zugeschrieben. In diversen Studien wurde nachgewiesen, dass Tryptase β durch Spaltung von Peptiden und Proteinen und durch Aktivierung weiterer Zellen proinflammatorische Prozesse sowie Bindegewebsdegradierung und -umbau fördert [13, 31]. Auf diese Weise trägt sie zur Pathogenese von Erkrankungen wie Asthma bronchiale, rheumatoider Arthritis, Colitis ulcerosa und Krebs bei [17, 32, 33]. Darüber hinaus wird Tryptase β als laborchemischer Marker für akute allergische Reaktionen und Anaphylaxie in der Klinik eingesetzt [34].

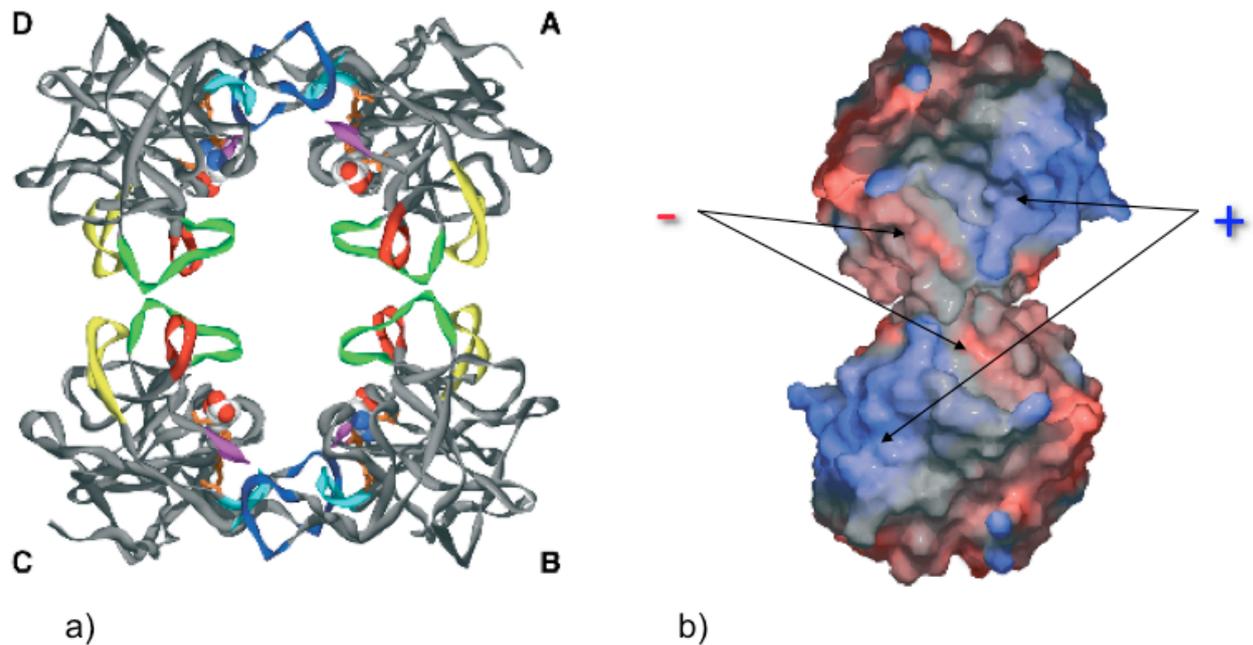


Abb. B-2: Struktur und Oberflächenladung des β -Tetramers: a) Das Tryptase-Tetramer besteht aus vier identischen, nicht-kovalent verbundenen β -Monomeren (A-D). Die Anordnung im Strukturmodell entspricht einem planen Rechteck, dessen Ecken jeweils von einem Monomer besetzt sind. Alle aktiven Zentren mit der katalytischen Triade weisen in Richtung einer zentralen Pore. Der co-kristallisierte Inhibitor 4-Aminobrenztraubensäure ist als Kalottenmodell dargestellt. Die sechs spezifischen Schleifen, welche die Bindung zwischen den Monomeren über zwei verschiedene Bindungsstellen realisieren, sind bunt eingefärbt. b) Im Oberflächenmodell des Tryptase-Tetramers in der Seitenansicht (Monomere A und B sichtbar) sind negativ geladene Areale in rot und positiv geladene in blau dargestellt. Ein negativ geladenes Heparinmolekül könnte an die positive Oberflächenladung an der Rückseite von Monomer A und der Vorderseite von Monomer B binden und das Tryptase-Tetramer stabilisieren (Modifiziert nach Sommerhoff und Schaschke, 2007 [18]).

B.2.2 Tryptase α

Obwohl die Aminosäure-Sequenzen der Trypsasen α und β zu $\sim 90\%$ übereinstimmen, unterscheiden sich die Eigenschaften der beiden Proteasen wesentlich. Ein Aminosäure-Austausch an Position -3 des Präpropeptids verhindert die Aktivierung des Tryptase- α -Zymogens durch Autohydrolyse zusammen mit Cathepsin C, wie sie für das β -Zymogen nachgewiesen wurde [19]. Auch in Mastzelllinien wurde nachgewiesen, dass Tryptase α nicht in den Granula gespeichert, sondern hauptsächlich als inaktives Zymogen sezerniert wird [35]. Allerdings könnte der von Le et al. identifizierte alternative Aktivierungsweg des β -Zymogens durch Cathepsin B und L auch zu einer Aktivierung von Tryptase α führen [21].

Darüber hinaus zeigt auch aktivierte rekombinante Tryptase α im Vergleich zu β nur eine sehr geringe proteolytische Aktivität. Durch Strukturaufklärung und Mutationsanalysen wurde dies auf den Aminosäure-Austausch Gly216Asp

zurückgeführt, der die S1-Bindungstasche verlegt und somit die Bindung von potentiellen Substraten verhindert [36-38].

Die Rolle der Tryptase α in der Mastzellbiologie wird auch dadurch in Frage gestellt, dass rund 30% aller Personen α -defizient sind, da sich am Genlokus TPSAB1, der Tryptase α und/oder β_1 kodiert, zwei β_1 -Allele befinden [39]. Ob sich das fehlende α -Allel auf die Prävalenz von Tryptase-assoziierten Erkrankungen (s. B.2.1) auswirkt oder Tryptase α auf einem anderen Wege die Mastzellfunktionen beeinflusst, bleibt noch zu klären.

B.2.3 Tryptase γ

Tryptase γ wurde erst 1999 von Wong et al. durch rtPCR-Analysen humaner Gewebe identifiziert. Das zugehörige Gen befindet sich im selben Serinprotease-Cluster auf Chr. 16p13.3, in dem auch die aller weiteren Tryptasen liegen. Mit nur ~50% ist die Sequenzidentität im Vergleich mit den anderen Tryptasen gering. Eine vergleichbare Sequenzübereinstimmung besteht mit membranständigen Serinproteasen wie Prostasin und Testisin. Tryptase γ unterscheidet sich von den anderen Tryptasen auch durch eine hydrophobe Transmembrandomäne sowie ein anderes Propeptid, das eine Aktivierung durch tryptische Serinproteasen (z.B. Tryptase β) ermöglicht. Daraus resultiert eine Zweikettenform, in der das Propeptid über eine Disulfidbrücke mit der katalytischen Domäne verbunden bleibt (s. Abb. B-3) [40-43]. Die Expression der Tryptase γ wurde auf mRNA-Level in diversen menschlichen Organen detektiert. Immunologisch konnte die Protease zusammen mit Tryptase β vornehmlich in den Granula von Gewebsmastzellen nachgewiesen werden. Basierend auf der carboxyterminalen hydrophoben Domäne wird angenommen, dass Tryptase γ nach Aktivierung und Degranulation der Mastzelle in der Membran verankert an deren Oberfläche verbleibt [41]. Versuche mit chimären Peptidasen, die Teile der murinen Tryptase γ enthalten, haben gezeigt, dass alternativ auch eine Freisetzung durch 'Shedding' von der Membran möglich ist [44]. Rekombinante lösliche Tryptase γ ist enzymatisch aktiv, wobei sich ihr Substrat- und Inhibitorenspektrum deutlich von dem der Tryptase β unterscheidet [42].

Tryptase γ hat eine proinflammatorische Wirkung *in vivo* und verursacht nach Applikation in den Atemwegen von Mäusen bronchiale Hyperreagibilität. Dieser Effekt wird indirekt durch Stimulation der Freisetzung von IL-13 durch T-Zellen

ausgelöst und ist abhängig von der Expression der IL-4-R α -Untereinheit und von STAT6 [41]. Obwohl Tryptase γ evolutionär hoch konserviert ist, was einen potentiell essentiellen Beitrag zur Mastzellbiologie andeuten kann, sind die Informationen über diese Protease noch sehr limitiert [45]. Insbesondere sind essentielle Fragen zum Aktivierungsmechanismus, der Freisetzung und der biologischen Funktion offen.

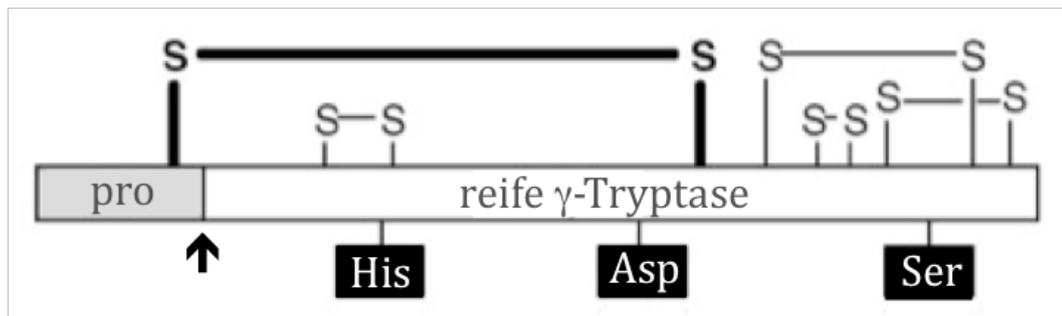


Abb. B-3: Schematische Darstellung des Tryptase- γ -Zymogens: Die intramolekulare Disulfid-Brücke zwischen der Prosequenz und der reifen Tryptase-Sequenz (Cysteine in Position -12 und 108) ist fett hervorgehoben. Die schwarzen Boxen markieren die katalytische Triade. Nach Aktivierung durch proteolytische Spaltung zwischen Propeptid und katalytischer Domäne (\rightarrow) nimmt das Enzym eine Zwei-Ketten-Form an. (Modifiziert nach Wong et al., 2002 [41])

B.2.4 Tryptase δ

Wie auch Tryptase γ wurde Tryptase δ durch PCR-Screening entdeckt [46]. Mit einer Aminosäure-Sequenzidentität von >80% ist Tryptase δ eng mit den Tryptasen α und β verwandt. Wie bei Tryptase α verhindert ein Glutamin-Rest an Position -3 des Präpropeptids die Zymogenaktivierung durch Autolyse und Cathepsin C, so dass ein alternativer Aktivierungsweg anzunehmen ist. Im Vergleich zu α und β ist Tryptase δ C-terminal um 40 Aminosäuren verkürzt. Durch diese C-terminale Verkürzung fehlt ein Teil der Begrenzung der Substratbindungsstelle (s. Abb. B-4), so dass aus struktureller Sicht die Faltung, Stabilität und Aktivität der Tryptase δ fraglich sind [1, 46].

Das Tryptase- δ -Gen wurde initial als Pseudogen bezeichnet, da in menschlichen Geweben zunächst keine Transkripte nachgewiesen werden konnten [47]. Später gelangen allerdings sowohl der Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene als auch die immunologische Detektion der translatierten Protease in menschlichen Gewebsmastzellen. Eine in *E. coli* exprimierte rekombinante Tryptase δ zeigte nur limitierte Aktivität [1]. Ob Tryptase δ aktiviert werden kann (z.B. durch Cathepsin B oder L, analog α und β [21]), ob und wie die Protease sezerniert wird und ob sie trotz der limitierten Aktivität zur Mastzellbiologie beiträgt, ist bis dato nicht untersucht.

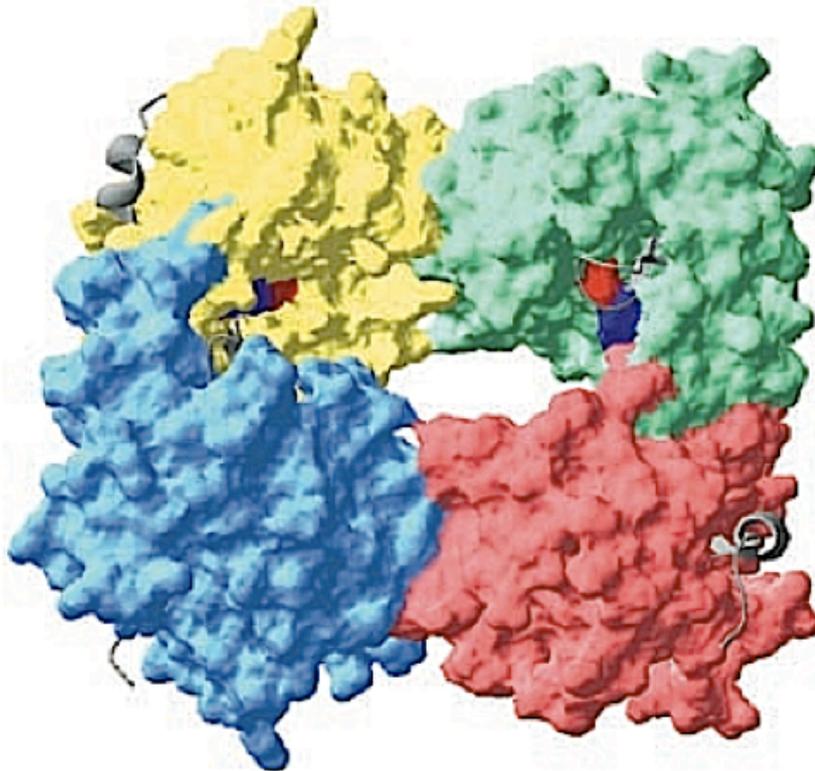


Abb. B-4: Strukturelle Besonderheit der Trypsase δ : Die dreidimensionale Oberflächenpräsentation zeigt ein Tetramer aus Trypsase- β II-Monomeren (dargestellt in hellblau, gelb, grün und rot), deren katalytische Histidin- und Serinreste dunkelblau bzw. rot gefärbt sind. Als graue Schleife lassen sich in jedem Monomer die 40 C-terminal gelegenen AS erkennen, die in der Sequenz der δ -Trypsase im Vergleich zu α und β deletiert sind. Zu beachten sind die Vergrößerung der zentralen Pore und die veränderte Zugänglichkeit, die durch den Wegfall des Carboxy-Terminus verursacht wird. (Modifiziert nach Wang et al., 2002 [1])

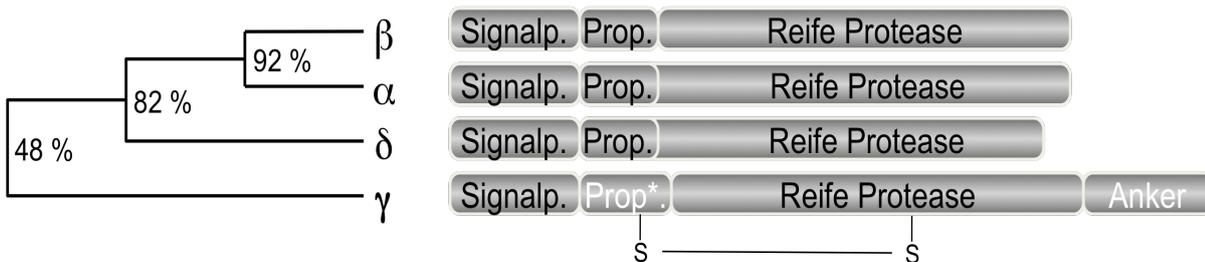


Abb. B-5: Schematischer Vergleich von Aminosäure-Sequenz und Domänenstruktur der Trypsasen: Trypsase δ ähnelt trotz der C-terminalen Verkürzung stark α und β , während γ eine wesentlich geringere Sequenzidentität aufweist. Besondere Charakteristika von γ -Trypsase sind der durch das veränderte Propeptid (*) einzigartige Aktivierungsmodus, der eine Zwei-Ketten-Form ergibt, und die C-terminale hydrophobe Sequenz, die wahrscheinlich als Membran-Anker dient. [Modifiziert nach Sommerhoff]

B.3 Die HMC-1 Mastzelllinie

Ein zentrales methodisches Problem für die Mastzell-Forschung war über lange Zeit das Fehlen eines adäquaten Zellmodells, das Funktionsstudien unter reproduzierbaren Bedingungen ermöglicht. Mastzellen sind im peripheren Blut rar

und auch aus Agarkulturen menschlichen Knochenmarks lassen sich nur geringe Zahlen isolieren [48]. Somit ist die primäre Kultivierung von Mastzellen sehr zeitaufwändig und teuer bei lediglich geringer Ausbeute.

1988 konnten Butterfield et al. eine kontinuierlich wachsende Mastzelllinie aus dem peripheren Blut eines Patienten mit Mastzelleukämie etablieren und dauerhaft kultivieren [56]. Diese Suspensionszelllinie „Human Mast Cell Line 1“ (HMC-1) weist Merkmale unreifer Mastzellen auf: Morphologisch sind die Zellen sehr heterogen mit rundlicher bis ovaler Form und mit charakteristischen Mastzellgranula in stark variierender Dichte im Zytoplasma. HMC-1 Zellen haben eine ausgeprägte Tendenz, in Suspension Zellcluster zu bilden, können aber auch – insbesondere in Abwesenheit von FCS im Kulturmedium – an Zellkulturplastik adhären.

Das unter den Mastzelllinien einzigartige, kontinuierliche Wachstum der HMC-1 ist bedingt durch eine Mutation des c-kit Protoonkogens, welche die konstitutive Aktivierung des Stammzellefaktor-Rezeptors (SCF-R) „kit“ zur Folge hat [49]. Der nicht-aktivierte Rezeptor entfaltet seine Tyrosin-Kinase-Aktivität normalerweise nach Bindung des Stammzellefaktors und beeinflusst so die Proliferation, Differenzierung, Migration, Aktivierung und das Überleben von Mastzellen [50]. C-kit-Mutationen führen auch bei tierischen Mastzellneoplasien, bestimmten Formen der Mastozytose und gastrointestinalen Stromatumoren zur Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung und unkontrollierten Aktivität des Rezeptors [51-54]. HMC-1 Mastzellen, die mindestens zwei Subzelllinien definieren, unterscheiden sich in der Anzahl der c-kit-Mutationen (HMC-1⁵⁶⁰, HMC-1^{560,816}) und in der Ausprägung einiger anderer Eigenschaften. Die konstitutionelle Phosphorylierung und Aktivierung von „kit“ liegt in beiden Subpopulationen aber auf einem fast identischen Niveau [55].

Analog ausdifferenzierten Gewebsmastzellen enthalten die Granula der HMC-1 Mastzellen präformierte Mediatoren wie Proteoglykane, Histamin sowie Tryptase β und andere Proteasen [56, 57], allerdings in deutlich geringeren Mengen. Tryptase β ist auch in HMC-1 die prädominante Mastzellprotease und zeigte Aktivität in Zelllysaten und nach Proteinaufreinigung [58]. Da die HMC-1 Mastzelllinie von einem Patienten ohne α -Allel abstammt, produzieren die Zellen keine Tryptase α .

HMC-1 Mastzellen unterscheiden sich von Gewebsmastzellen durch die fehlende Oberflächenexpression von intakten Fc ϵ RI (hoch affine IgE-Rezeptoren). Somit ist die Aktivierung von HMC-1 durch Bindung von IgE und Kreuzvernetzung der Fc ϵ RI (s. B.1) nicht möglich [55, 56].

Ein Vorteil der HMC-1 Mastzelllinie ist die rasche Proliferationsgeschwindigkeit unter einfachen Kulturbedingungen, die insbesondere Experimente mit hohem Zellumsatz deutlich vereinfacht [59]. Die geringe Differenzierung beschränkt allerdings die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gegebenheiten *in vivo*.

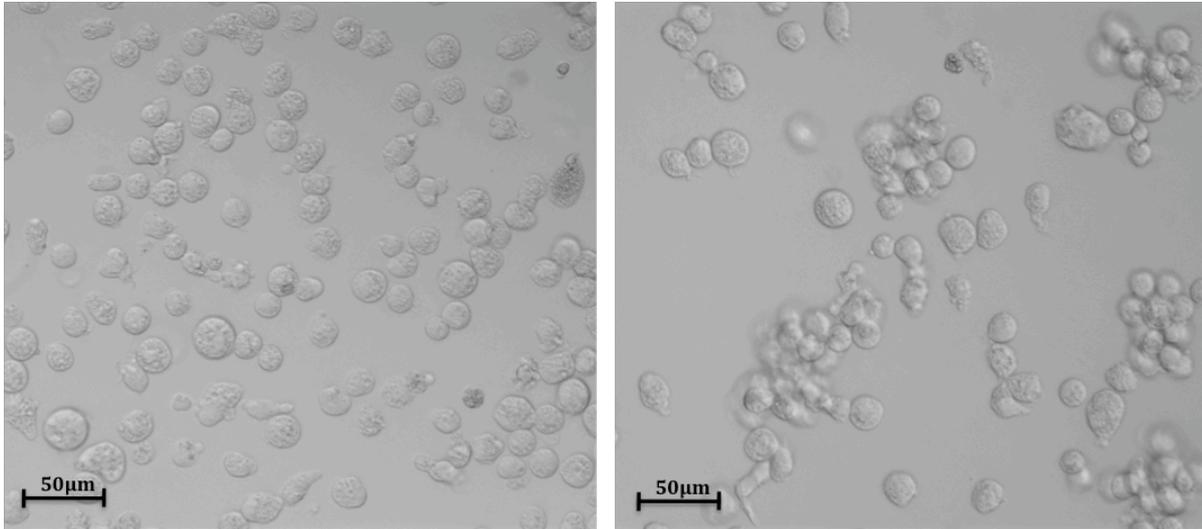


Abb. B-6: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) von HMC-1 in Suspensionskultur: Im linken Bild sind die ovalen bis rundlichen HMC-1 Zellen nach Vereinzelung durch Pipettieren zu erkennen. Auffällig sind die von Zelle zu Zelle variierende Zellgröße und Dichte der Granula im Zytoplasma. Die rechte Aufnahme zeigt die Adhäsionstendenz der HMC-1 untereinander nach 96 Stunden in Suspensionskultur. Zell-Cluster sind nach ein bis zwei Tagen in Kultur und mäßiger Zelldichte schon mit dem bloßen Auge erkennbar (Eigene Aufnahmen).

B.4 Ziele und geplantes Vorgehen

Ziel dieser Arbeit war es, die Tryptasen γ und δ rekombinant in HMC-1 Mastzellen zu exprimieren, um Informationen über die Lokalisierung in der Zelle und die Effekte auf die Mastzellmorphologie zu gewinnen.

Da HMC-1 Zellen auch native Tryptasen exprimieren (s. B.3) und Antikörper nicht zwischen endogener und rekombinanter Tryptase (insbesondere α , β und δ) unterscheiden, sollten die Tryptasen in Fusion mit eYFP als Reporter-Gen exprimiert werden. So sollte sowohl die Lokalisierung der Tryptasen in lebenden HMC-1 Zellen anhand der Fluoreszenz als auch ihr immunologischer Nachweis ermöglicht werden. Zur Etablierung der Transfektion von HMC-1 Zellen sollten zunächst eYFP und der Vektor pcDNA3.1/Hygro+ verwendet und die Effizienz unterschiedlicher Transfektionsmethoden mittels des Anteils fluoreszierender Zellen im Flowzytometer bestimmt werden. Nach Transfektion der HMC-1 Zellen mit Tryptase- γ - und - δ -eYFP-cDNA sollte anschließend die Stabilität der Fusionsproteine mittels Immunoblot

untersucht und ihre Lokalisierung in HMC-1 Zellen, gegebenenfalls vor und nach Zellaktivierung, mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie beschrieben werden.

C Material und Methoden

C.1 Materialien

C.1.1 Geräte

Autoklav LTA 400	Zirbus, Bad Grund
Begasungsinubator Forma 3035	Forma Scientific, USA
Blotting Apparatur XCell Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
DynaMag-Spin Magnet	Invitrogen Dynal, Norwegen
Elektrophoresekammern Perfect Blue	PeqLab, Erlangen
Elektrophorese-Tank XCell Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Elektroporationseinheit Gene Pulser	Bio-Rad, München
Flowzytometer Epics XL-MCL	Beckman Coulter, Krefeld
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-70	Olympus Optical, Hamburg
Gel Imager	Intas UV Systeme, Göttingen
Zellanalyser CASY 1	Schärfe System, Reutlingen
Inkubationsschüttler Typ ITH-1	Braun, Melsungen
Inkubationsschüttler Typ SM30	Johanna Otto GmbH, Bodelshausen
Live Imaging Kamera Sensicam QE	Pro Computer Optics, Kelheim
Laminar-Flow-Werkbank SterilGard SG600E	The Baker Company, USA
Laminar-Flow-Werkbank Uniflow UVUB 1200	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl
Konfokales Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Lichtmikroskop Typ IMT-2	Olympus, Japan
Magnetrührer IKA Mag Reo	Bachofer, Reutlingen
Magnetrührer mit Heizplatte Monotherm	Variomag, USA
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter Inolab pH Level 2	WTW, Weilheim
Photometer Nano Drop 1000	PeqLab, Erlangen
Photometer Smart Spec 3000	Bio-Rad, München
Photometer SPEX FluoroMax	Instruments S.A., D+Edison, USA
Präzisionswaage 2842	Sartorius, Göttingen
Stickstofftank	Thermolyne, USA

C.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tris-Gly-Gradienten-Gele (12/15-Bahn)	Anamed, Darmstadt
---------------------------------------	-------------------

MATERIAL UND METHODEN

Küvetten, Acryl	Sarstedt, Nümbrecht
Membranfilter-Einheit 0,20 µm (Rotrand)	Schleicher & Schuell, Dassel
Membranfilter (Rotrand) FP30/0,2 CA-S	Whatman, Dassel
IbiTreat 1µ-8-well-slide	Ibidi, Martinsried
PVDF-Membran BioTrace	Pall Cooperarion, USA
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Gilson, USA
Pipettenfilterspitzen (10, 200, 1000 µl)	Biozym, Oldendorf
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nümbrecht
Schwammeinlagen für die Blotkammer	Invitrogen, USA
Serologische Pipetten (1, 5, 10, 25, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
SuperFrost Plus Oblekträger	R. Langenbrink, Teningen
Zellkulturflaschen (T25, T75, T125)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten Falcon(1-,6-,12-,24-,96well)	Becton Dickinson, Frankreich

C.1.3 Bakterienstamm *E. coli* TOP10F'

Stamm	Organismus	Genotyp	Bezugsquelle
TOP10F'	<i>E. coli</i>	F' { <i>proAB</i> , <i>lacIq lacZΔM15</i> , Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mrcBC</i>), Δ80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , λ- <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

C.1.4 Chemikalien und biologische Stoffe

DNA-Längenstandard 100 bp Leiter	MBI Fermentas, Litauen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Mannheim
Kernfärbung Hoechst #33342	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Loading Dye	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Mannheim
Methanol	Merck, Mannheim
Propidiumiodid	Calbiochem, USA
ECL-Western-blot-Standard Magic Mark XP	Invitrogen, Karlsruhe

Kit-Systeme:

Amersham ECL Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare, Großbritannien
Dynabeads Protein G	Invitrogen Dynal, Norwegen
MinElute PCR Purification Kit (50)	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen, Hilden
QIAPrep Maxi Kit (25)	Qiagen, Hilden
QIAPrep Miniprep Kit (250)	Qiagen, Hilden
Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Enzyme:

Goldstar-DNA-Polymerase	Eurogentec, Belgien
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
	New England Biolabs, USA
Trypsin-EDTA	PAA, Österreich
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

Antikörper:

Anti-GFP, monoklonal	Roche, Mannheim
Anti-Human-Tryptase, polyklonal	AG Sommerhoff
Anti-Human-Tryptase-Gamma, polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Actin, polyklonal	Santa Cruz, USA

C.1.5 Kulturmedien und Zusätze

Ampicillin-Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Bacto-Trypton	Becton Dickinson, Frankreich
Bacto-Pepton	Becton Dickinson, Frankreich
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Frankreich
DMEM High Glucose mit L-Glutamin	PAA, Österreich
FBS Gold	PAA, Österreich
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson, Frankreich
Hygromycin B	PAA, Österreich
IMDM mit L-Glutamin	PAA, Österreich
L-Glutamin	PAA, Österreich
PBS ohne Ca ²⁺ o. Mg ²⁺	PAA, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Österreich
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

MATERIAL UND METHODEN

Zeocin

Invivogen, Frankreich

LB Medium

Herstellung: 100 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, mit H₂O dest. auf 1 L auffüllen, autoklavieren

LB Platten

Herstellung: 100 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 13 g Bacto-Agar, mit H₂O dest. auf 1L auffüllen, autoklavieren und aufteilen auf sterile Zellkulturplatten

SOC Medium

Herstellung: 0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose (nach Sterilisieren)

C.1.6 Puffer und Lösungen

Aqua ad iniectabilia

Braun, Melsungen

Casyton

Schärfe System, Reutlingen

Dulbecco's PBS

Biochrom AG Berlin

Glyzin

Merck, Mannheim

Isoton

Beckman Coulter, Krefeld

T4-Ligase-Puffer

Roche, Mannheim

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Merck, Mannheim

10% Tween 20 Lösung

Bio-Rad, München

Blotting-Puffer

39 mM Glyzin, 0,037% SDS, 20% Methanol

4 x Lämmli-Probenpuffer

200 mM Tris/HCl, pH 6,8, Bromphenolblau 0,4%, 40% Glycerol, 8% SDS

1x TAE-Puffer

40 mM Tris/Acetat (pH 8,0), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 0,1% SDS

Tris/Glyzin-Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8,3, 250 mM Glyzin

C.1.7 Vektoren

C.1.7.1 pcDNA3.1/Hygro+

Zur Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen wurde der Vektor pcDNA3.1 gewählt. Durch den CMV-Promotor zur starken Überexpression des Zielproteins und die Polyadenylierungsstelle zur Stabilisierung der mRNA in Säugerzellen eignet er sich für die Genexpression in vielen Säugerzelllinien. Der Selektion dient in *E. coli* das Resistenzgen gegen Ampicillin, während für die Selektion in HMC-1 (u.a.) die Resistenz gegen Hygromycin gewählt wurde.

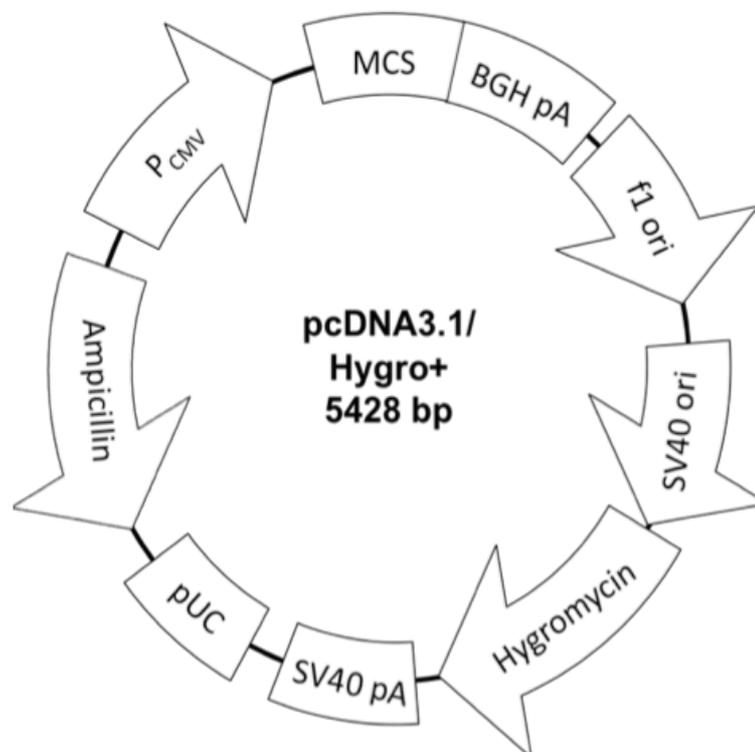


Abb. C-1: Schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1/Hygro+: P_{CMV} = CMV-Promotor; MCS = Multiple Klonierungsregion; BGH pA = Polyadenylierungsstelle; f1 ori = Replikationsursprung des f1 filamentösen Phagen; SV40 ori = Replikationsursprung des SV40 Virus; Hygromycin = Hygromycin-Resistenzgen; SV40 pA = Polyadenylierungsstelle des SV40 Virus; pUC ori = alternativer Replikationsursprung, der hohe Kopienzahlen in *E. coli* erlaubt; Ampicillin = Ampicillin-Resistenzgen (modifiziert nach pcDNA3.1 Manual, Invitrogen)

C.1.7.2 pCR2.1-TOPO

Der Vektor pCR2.1-TOPO zeichnet sich durch überhängende Thymidin-Basen an beiden Enden des Vektors aus, der inmitten der MCS gespalten und dadurch linearisiert ist. Er ist dadurch für die Ligation und folgende Subklonierung von PCR-Produkten mit überhängenden Adenosin-Basen geeignet, die unter anderem von der Goldstar Polymerase produziert werden. Der Vektor wird im Kit mit bereits

gebundener Topoisomerase I geliefert. Dies erhöht die Effektivität der Ligation und schützt zudem die Überhänge vor Degradierung.

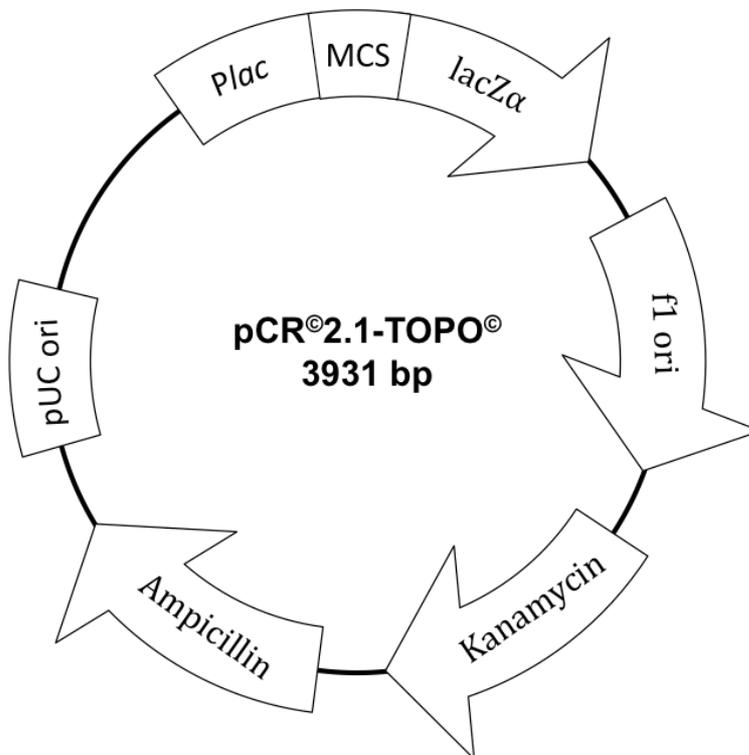


Abb. C-2: Schematische Darstellung des Vektors pCR2.1-TOPO: Plac = Promotor des β -Galactosidasegens; MCS = Multiple Klonierungsregion; lacZ α = Gen für das α -Peptid der β -Galactosidase; f1 ori = Replikationsursprung des f1 filamentösen Phagen; Kanamycin = Kanamycin-Resistenzgen; Ampicillin = Ampicillin-Resistenzgen; pUC ori = alternativer Replikationsursprung, der hohe Kopienzahlen erlaubt (modifiziert nach pCR2.1-TOPO Manual, Invitrogen)

Die durch β -Galactosidase vermittelte Farbreaktion erlaubt nach der Ligation eines Inserts, der Zirkularisierung des Vektors und Transformation von *E. coli* die direkte Identifizierung von rekombinanten Klonen auf Indikatorplatten. Zur Selektionierung dienen die Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin.

C.1.8 Referenzsequenzen

Bezeichnung der cDNA	Genbank-Nummer
Tryptase δ I (TPSD1)	NM_012217
Tryptase δ II (TPSD2)	AF_206664
Tryptase γ I (TPSG1)	NM_012467
Tryptase γ II (TPSG2)	AF_19550
Tryptase α I (TPSA1)	AAA_86934
Tryptase β II (TPSB2)	S_55551
eGFP	DQ_768212
eYFP	AAQ96629.1
eCFP	CQ_831237

C.1.9 Software

Image Pro Plus 5.0	Media Cybernetics, USA
MacVector	Accelrys, USA
4Peaks	A. Griekspoor, Tom Groothuis
Office-Paket	Microsoft, USA
ImageJ 1.43	National Institutes of Health, USA

C.2 Methoden

C.2.1 Zellkultur

C.2.1.1 Bestimmung der Zellkonzentration in Suspension

Zur Bestimmung der Konzentration wurden Zellen in ihrem Kulturmedium zunächst vorsichtig vollständig mit der Pipette resuspendiert und vereinzelt. 30 μ l der Zellsuspension wurden in 6 ml isotonischer Messlösung (1:200) verdünnt und im Casy Zellanalyzer gezählt. Die Zellkonzentration wird als Mittelwert von drei automatisch durchgeführten Einzelmessungen für einen vorher eingestellten Zellgrößenbereich (z.B. \varnothing 10-60 μ m für HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen) berechnet.

C.2.1.2 Kultivierung der HMC-1 Zelllinie

Die humane Mastzelllinie HMC-1 wurde in IMDM-Medium unter Zusatz von 10% FBS und 1,2 mM α -Thioglycerol (HMC-1 Kulturmedium) als Suspensionszelllinie in Gewebekulturflaschen im Inkubator bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Die Einzelkulturen wurden wöchentlich nach Bestimmung der Zelldichte mit frischem Medium auf eine Ausgangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt. Da HMC-1 Zellen in Suspension zur Bildung von Aggregaten neigen, war es nötig, die Zellen vor der experimentellen Verwendung sorgfältig zu vereinzeln.

Um das Medium vollständig auszutauschen, wurde die Suspension bei ca. 190x g und Raumtemperatur 10 min zentrifugiert. Nach dem Trennen von Zellpellet und Mediumüberstand wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Um auch Rückstände verbrauchten Mediums zu entfernen, wurden die Zellen ggf. mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

C.2.1.3 Kultivierung der HEK-293-Flip-in-T-Rex Zelllinie

Die HEK-293-FTR Zelllinie ist eine Nieren-Zelllinie humanen embryonalen Ursprungs, die eine in ihr Genom integrierte „Flip-in-Sequenz“ besitzt, welche die stabile Integration von Fremdgenen stark erleichtert. Die HEK-293-FTR wachsen schnell und zuverlässig adhärent an Zellkulturplastik und lassen sich mit hoher Effizienz via Lipofektion transfizieren.

HEK-293-FTR Zellen wurden in DMEM Medium (High Glucose mit L-Glutamin) unter Zusatz von 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin in Gewebekulturflaschen bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die Kulturen bei 80-90% Konfluenz geteilt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt, die adhären Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch einminütige Inkubation unter einem dünnen Film Trypsin-EDTA (0,5mg/ml) vom Zellkulturplastik gelöst. Nach Resuspension in frischem Medium (mit FBS zur Neutralisation der Trypsin-Lösung) wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen wurden in der gewünschten Dichte (i.d.R. 1×10^5 c/ml) ausgesät.

C.2.1.4 Kultivierung von Jurkat

Als kontinuierlich proliferierende Suspensionszelllinie, die ebenfalls von menschlichen Leukozyten abstammt, wurden Jurkat im Vergleich zu HMC-1 in Transfektions- und Expressionsexperimenten eingesetzt. Die T-Lymphozyten-Linie Jurkat stammt von einem Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie [60] und wurde in RPMI1640 Medium unter Zusatz von 10% FBS in Gewebekulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Einzelkulturen wurden wöchentlich nach Bestimmung der

Zelldichte mit frischem Medium auf eine Ausgangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt.

C.2.2 Transiente Transfektion

C.2.2.1 Grundlagen der Lipofektion

Zum Einschleusen von Expressionsvektoren in HMC-1 Zellen und andere ausgewählte Zelllinien wurde die Methode der Lipofektion mit dem Reagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) verwendet. Dieses Reagenz enthält kationische Lipide, die Komplexe mit DNA-Molekülen bilden, deren negative Ladungen abschirmen, und diese so gebunden durch die Doppellipidschicht der Zellmembran hindurch transportieren können. Im Zellkern werden die cDNA-Moleküle zu mRNA transkribiert und diese dann an Ribosomen translatiert. Somit kommt es zur Expression des eingeschleusten Genkonstrukts.

C.2.2.2 Allgemeines Vorgehen

Die Transfektionen wurden in der Regel in 12-Well-Platten (Falcon) durchgeführt. Dazu wurden die zu transfizierenden Zellen in Kulturmedium (4×10^5 c/ml) suspendiert und je 1 ml in die Wells ausgesät. Während der folgenden Vorbereitungsschritte wurden die Zellen unter Kulturbedingungen (siehe C.2.1) im Inkubator gelagert.

Anschließend wurden 3 μ g Plasmid-DNA und 6 μ l Transfektionsreagenz in jeweils 100 μ l Kulturmedium ohne FBS in einem sterilen Reaktionsgefäß vermengt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Transfektion für pcDNA3.1/eXFP-Plasmide optimiert worden war, wurde die Menge der eingesetzten Plasmid-DNA entsprechend ihrer Größe angeglichen, um die Anzahl der eingesetzten Plasmide konstant zu halten. Nach gründlichem Vermengen der Plasmid- mit der Lipofectamin-Lösung folgte eine weitere Inkubationsphase (20 min, RT), um die Bildung von DNA-Lipid-Komplexen zu ermöglichen. Danach wurde die Transfektionslösung (200 μ l) zu dem Well mit den vorbereiteten Zellen gegeben, die danach für 48 h im Inkubator kultiviert wurden.

C.2.2.3 Zelllinien-bedingte Anpassungen

HMC-1 Zellen wurden vor der Transfektion für 24 h in Kulturmedium ohne α -Thioglycerol unter den üblichen Kulturbedingungen inkubiert. Für die Transfektion

wurden dieses Vorkulturmedium durch Zentrifugieren entfernt und die Zellen in normalem Kulturmedium resuspendiert.

HEK-293-FTR Zellen wurden als adhären wachsende Zelllinie 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von 2×10^5 c/ml (1 ml/Well) in der 12-Well-Platte ausgesät, so dass zum Transfektionszeitpunkt die empfohlene Konfluenz von >90% erreicht wurde. Nach der 48-stündigen Inkubationsphase wurden die HEK-293-FTR Zellen mit Trypsin/EDTA vom Zellkulturplastik gelöst (siehe C.2.1.3), vereinzelt und passagiert, um weitere Analysen zu ermöglichen.

C.2.3 Stabile Transfektion

C.2.3.1 Selektionierung transfizierter Zellen

Der stabilen Transfektion liegt die Beobachtung zu Grunde, dass nach einer transienten Transfektion der eingesetzte DNA-Vektor in seltenen Fällen zufällig in das Wirtsgenom integriert wird. Wird die Wirtszelle dabei nicht in essentiellen Funktionen gestört, kann es zur Expression der eingefügten Gene kommen. Weitere Voraussetzungen einer stabilen Transfektion von Plasmid-DNA sind die Linearisierung und Integration des Vektors in das Genom auf eine Weise, die die Sequenz der zu exprimierenden genetischen Information und die Beziehung zum Promotor erhält. In diesem Fall kann die stabil transfizierte Zelle mittels der im Vektor enthaltenen Antibiotikaresistenz selektioniert werden, da transient transfizierte Zellen das Resistenzgen allmählich verlieren.

Die Selektion stabil transfizierter HMC-1 Zellen wurde unter üblichen Kulturbedingungen (s. C.2.1) unter Zusatz von 400 µg/ml Hygromycin B durchgeführt. Um die Aktivität des Hygromycin B auf möglichst stabilem Niveau zu halten, wurde das Medium alle vier Tage gewechselt. Wöchentlich wurden die Zellzahl und der Anteil transfizierter/fluoreszierender Zellen bestimmt. Sobald eine Kultur unter dem Selektionsdruck stabiles Wachstum zeigte und der Anteil fluoreszierender Zellen konstant blieb oder anstieg, wurde mit der Subklonierung begonnen.

C.2.3.2 'Limited Dilution' Klonierung

Um stabil transfizierte Zellen zu gewinnen, die neben der Resistenz gegen Hygromycin auch tatsächlich das gewünschte Konstrukt exprimieren, wurden die Zellen mittels 'Limited Dilution' isoliert. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension

zunächst bei 190x g zentrifugiert und die Zellen in einer Dichte von $1,37 \times 10^5$ c/ml in einem speziellen Klonierungsmedium resuspendiert, das aus 75% HMC-1 Kulturmedium und 25% „spent“ Medium sowie 400 µg/ml Hygromycin bestand; die darin enthaltenen parakrinen Wachstumsfaktoren der HMC-1 können in der Folge die Proliferation isolierter Zellen stimulieren. Das „spent“ Medium wurde zuvor gewonnen, indem HMC-1 Zellen für mindestens 24 h in Kulturmedium kultiviert und die Zellen durch Zentrifugieren und Filtern durch einen Membranfilter aus dem Medium entfernt wurden.

Die Zellsuspension (300 µl) wurde in das Eckwell einer 96-Well-Platte gegeben und von dort ausgehend in sieben Verdünnungsschritten entlang der Wells H1→A1 mit vorgelegtem Klonierungsmedium jeweils im 1:2-Verhältnis verdünnt. Analog folgte dann eine weitere 1:2-Verdünnungsreihe mit der Acht-Kanal-Pipette entlang der gesamten Breite der Multiwell-Platte (1→12), so dass den theoretischen Berechnungen nach mehrere Wells jeweils nur eine Zelle enthielten (s. Abb. C-3).

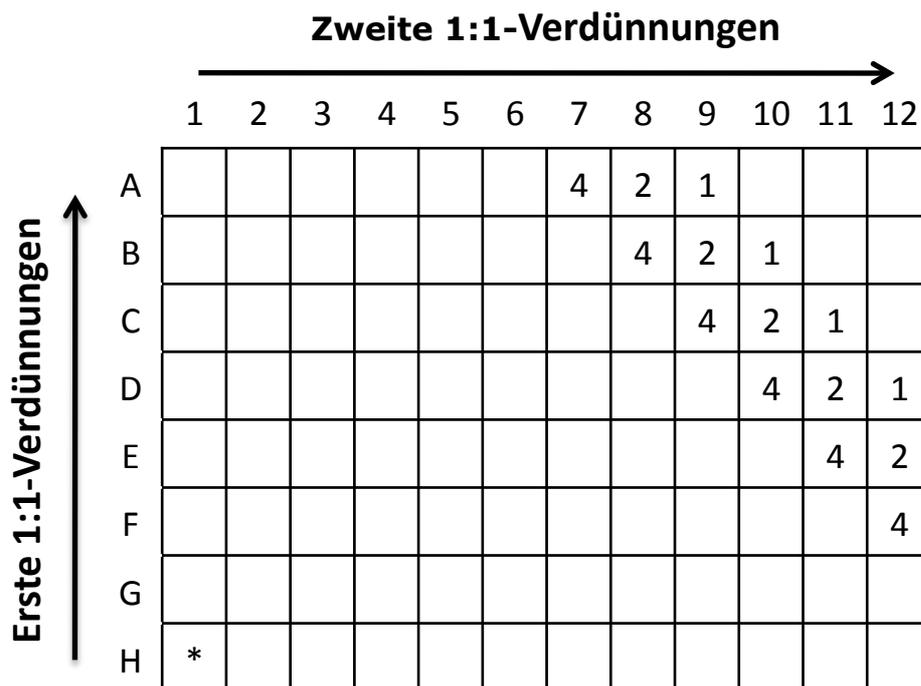


Abb. C-3: Darstellung der ‘Limited Dilution’ Klonierung in einer 96-Well-Platte: Von einem Well in der Ecke der Platte ausgehend (*) wurden die Zellen in mehreren 1:2-Verdünnungsschritten über die Platte verteilt. Die theoretischen Zellzahlangaben in den Wells ergeben sich durch die gleichmäßige Verdünnung einer Zellsuspension mit der Ausgangskonzentration $1,37 \times 10^5$ c/ml.

Einige Stunden nach der Aussaat wurden alle Wells markiert, die eine einzelne fluoreszierende Zelle enthielten. Nach einer Woche wurden die markierten Wells erneut mikroskopisch untersucht und gleichzeitig proliferierende und fluoreszierende

Klone mit 100 µl frischem Kulturmedium versorgt. Gut proliferierende Zellklone wurden mit einer Pipette in ein größeres Kulturvolumen transferiert. Dabei wurde der Selektionsdruck durch den Zusatz von Hygromycin B stets aufrechterhalten. Nach weiterer Proliferation wurde die Dichte der Zellsuspension im Casy-Analyser und der Anteil bzw. die Intensität fluoreszierender (stabil transfizierter) HMC-1 Zellen mittels Flowzytometer bestimmt. Um sicherzustellen, dass die isolierten Zellklone klonalen Ursprungs sind, wurden sie ein zweites Mal mittels 'Limited Dilution' kloniert.

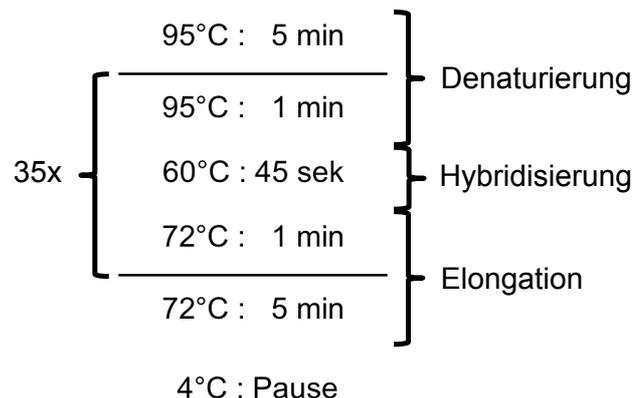
C.2.4 Molekularbiologie

C.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde mit Goldstar®-Polymerase unter Zusatz der vom Hersteller empfohlenen, unten aufgelisteten Substanzen durchgeführt. Diese taq-Polymerase fügt am 3'-Ende jedes Amplikons Template-unabhängig einen überhängenden Desoxyadenosin-Rest an, der eine anschließende Ligation in einen geeigneten Vektor (TA-Klonierung, z.B. pCR2.1-TOPO, s. C.1.7) ermöglicht. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 ng DNA-Template
- je 0,5 µM Primer (vw/rw)
- 20 µM dNTP-Mischung
- 3,75 mM MgCl₂
- 5 µl Reaktionspuffer
- 1,5 U Goldstar®-Polymerase
- H₂O ad 50 µl

Die PCR lief über Nacht nach folgendem Protokoll im Thermocycler ab:



C.2.4.1.1 Analyse und Isolation des PCR-Produkts

Im Anschluss an die PCR wurde ein 5 μ l-Aliquot des PCR-Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt (s. C.2.4.7). War ein Produkt der gewünschten Größe nachweisbar, wurde der Rest des PCR-Ansatzes durch präparative Gel-Elektrophorese aufgetrennt, die Amplikon-Bande unter UV-Licht-Kontrolle aus dem Gel geschnitten und das Produkt mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ isoliert.

C.2.4.1.2 TA-Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde der linearisierte Vektor pCR2.1TOPO (Invitrogen) verwendet. Dessen endständig überstehende Thymidin-Reste sind komplementär zu den durch die taq-Polymerase angehängten Adenosin-Resten des Amplikon und erleichtern so dessen Einbau. An beiden Enden des Vektors befindet sich außerdem eine Topoisomerase I, die unter Lösung ihrer kovalenten Bindung das eingepasste Amplikon unabhängig von dessen Sequenz mit dem Vektor ligiert. Die Ligation wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zur weiteren Amplifikation wurde *E. coli* mit dem neu entstandenen Vektor transformiert.

C.2.4.2 Transformation elektrokompenter *E. coli*

Zur Amplifikation neu ligierter Plasmide wurden *E. coli* mit dem betreffenden Vektor durch Elektroporation transformiert. Zunächst wurden 50 μ l einer Suspension elektrokompenter *E. coli* TOP10F' für 30 min mit 1-10 μ l des Ligationsansatzes oder einer anderen Plasmidlösung (<10 ng DNA) auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch in eine eisgekühlte, trockene Elektroporationsküvette überführt und im Elektroporator einem elektrischen Impuls ausgesetzt.

Geräte-Einstellungen:

Pulse Controller	200 Ω
Gene Pulser	25 μ F; 2,5 kV

Sofort nach der Impulsgabe wurde die Zellsuspension in 750 μ l eisgekühltes SOC-Medium gegeben und in einem sterilen Reaktionsgefäß (15 ml) für 1 h bei 37 °C, ausreichender O₂-Zufuhr und 100 rpm geschüttelt. Anschließend wurden zwei bis

drei Fraktionen der Suspension (z.B. 50, 100 und 250 μL) auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die zur Selektion transformierter Zellen mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin und ggf. X-Gal versetzt worden waren.

C.2.4.3 Transformation chemokompetenter *E. coli*

Zur Transformation chemokompetenter *E. coli* XL1-Blue[®] wurden 50 μl der Bakterienzellsuspension mit 2 μl der Plasmidlösung vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation erfolgte durch Erhitzen der Probe auf 42 °C für 45 sek. Nach einer zweiminütigen Abkühlphase auf Eis wurde der Ansatz in 300 μl SOC Medium (42 °C) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C, ausreichender O₂-Zufuhr und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots der *E. coli*-Suspension (z.B. 50, 100 und 250 μL) auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die zur Selektion transformierter Zellen mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin versetzt worden waren.

C.2.4.4 Blau-Weiß-Selektion und Kultivierung von *E. coli* in Flüssigmedium

Im verwendeten Klonierungsvektor pCR2.1TOPO ist die MCS innerhalb der α -Peptid-kodierenden Region des Enzyms β -Galaktosidase lokalisiert. Im Falle der Religation des leeren Klonierungsvektors vermittelt die in *E. coli* exprimierte β -Galaktosidase durch die Umsetzung des Substrats X-Gal eine Farbreaktion, deren Produkt die jeweilige Bakterienkolonie blau anfärbt. Die Ligation eines Inserts in die MCS verhindert hingegen die Expression intakter β -Galaktosidase und die Umsetzung von X-Gal, so dass nicht gefärbte *E. coli*-Klone als Träger von Plasmiden mit Insert identifiziert werden können.

Zur Farbreaktion wurden die Agarplatten vor dem Ausstreichen des Transformationsansatzes mit 20 μL X-Gal-Lösung (40 mg/mL in DMSO) bestrichen. Nach Inkubation bei 37 °C ü.N. wurden die weiß gefärbten Kolonien (ohne Umsatz von X-Gal) mit einer Impföse aufgenommen, auf einer weiteren Agarplatte ausgestrichen und diese erneut ü.N. inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 3 mL flüssiges LB-Medium + Ampicillin mit einem einzelnen *E. coli*-Klon beimpft und die Suspension für 24 h im Rüttler (150 rpm) bei 37 °C inkubiert. Aus diesen Minikulturen wurden zu analytischen Zwecken die Plasmid-DNA präpariert oder größere Kulturen angelegt.

C.2.4.5 DNA-Präparation aus *E. coli*

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterienkulturen im analytischen Maßstab wurde das QIAPrep Miniprep Kit (250)*, im präparativen Maßstab das QIAPrep Maxi Kit (25)* verwendet. Die Anwendung beider Kits erfolgte nach Herstelleranweisung.

C.2.4.6 Restriktionsverdau von Plasmiden und linearen Vektoren

Für den Restriktionsverdau wurden jeweils 0,2 - 2 µg eines Plasmids bzw. 10 µL eines PCR-Produkts mit je 1 µL eines Restriktionsenzym (s. Tab. C-1) sowie den von den Herstellern (NEB, Boehringer) angegebenen Puffern versetzt und der Ansatz auf 20 µL aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese (s. C.2.4.7) aufgetrennt und das gesuchte DNA-Fragment ggf. unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel isoliert. Bei rein analytischen Restriktionsverdauen wurde die Inkubationszeit auf 30 min verkürzt, um die unspezifische Aktivität der verwendeten Restriktionsenzyme zu reduzieren.

C.2.4.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese nutzt die negative Ladung von DNA-Molekülen. Im elektrischen Feld wandert die DNA in Richtung der Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Porengröße des Agarosegels und der Größe, sowie im Falle von Plasmiden auch vom Coiling, des DNA-Moleküls abhängig.

Zur Vorbereitung wurde Agarose in einer Konzentration von 1-2% in 1 x TAE Puffer durch Erhitzen gelöst, die Lösung in eine Gelkammer gegossen, ein Probenkamm eingesetzt und sofort Ethidiumbromid (0,5 µg/mL Endkonzentration) zugesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Probenkamm entfernt und der Laufpuffer (1 x TAE) zugegeben. Die mit DNA-Auftragspuffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen gefüllt und die Trennung bei einer Spannung von 100-130 V durchgeführt. Durch die Bindung von Ethidiumbromid an die DNA können die einzelnen Banden unter UV-Licht ($\lambda = 205 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und Ihre Größe anhand des mitgelaufenen DNA-Längenstandards bestimmt werden.

C.2.4.8 Die 'Sticky-End'-Ligation

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten und linearisierten Plasmiden wurde in der Regel die 'Sticky-End'-Strategie verwendet, da durch kompatible Enden das Fragment nur in eine Richtung eingebaut werden kann. Zur Berechnung der korrekten Zusammensetzung eines Ligationsansatzes wurde zunächst die Konzentration der eingesetzten DNA-Lösungen bestimmt. Dazu wurde 1 μL der jeweiligen DNA-Lösungen auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und die Konzentration anhand der Fluoreszenz der „DNA-Spots“ unter UV-Licht ($\lambda = 205 \text{ nm}$) im Vergleich zu einer Lösung mit bekannter Konzentration abgeschätzt. Im Ligationsansatz lagen Insert und Plasmid in einem äquimolaren Verhältnis vor, wobei 0,5 – 1,0 μg des Inserts eingesetzt wurden. Die Ligation vermittelt durch T4-Ligase erfolgte ü.N. bei 12 °C im Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung:

- Vektor-Insert-Gemisch
- H₂O ad 12,5 μl
- 1,5 μl T-4 Ligase-Puffer (10x)
- 1 μl T4-Ligase (3 U/ μl)

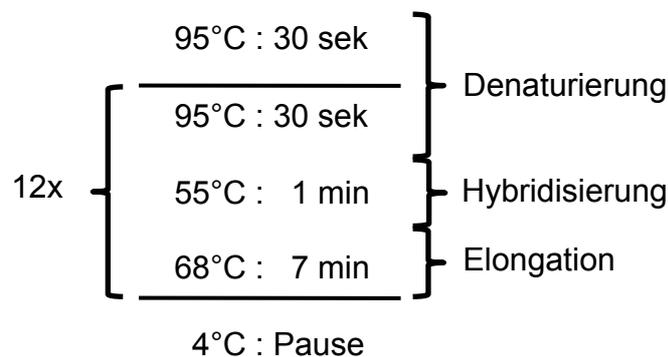
Anschließend wurde *E. coli* zur weiteren Amplifikation mit dem neu ligierten Plasmid transformiert (s. C.2.4.2).

C.2.4.9 Zielgerichtete Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese ermöglicht das Einfügen von Mutationen in Plasmid-DNA, d.h. den Austausch einzelner bzw. weniger zusammenhängender Basenpaare in Plasmiden. In dieser Arbeit wurde dazu das Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit[®] (Stratagene) verwendet. Für jede Reaktion wurden zwei Oligonukleotid-Primer bestellt, die mittig die gewünschte Mutation, flankiert von den komplementären Nukleotiden der Zielsequenz, tragen und die an jeweils einen der Plasmid-DNA-Einzelstränge binden. Analog zur PCR (s. C.2.4.1) wurde die veränderte Plasmid-DNA amplifiziert und die parentale (methylierte) Plasmid-DNA anschließend durch die Endonuklease Dpn I verdaut (2 min auf Eis). Der Reaktionsansatz der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- Template-DNA (5-50 ng)
- Je 125 ng Primer (vorwärts/rückwärts)
- 1,0 µl dNTP mix
- 5,0 µl Reaktionspuffer (10x)
- H₂O ad 49 µl
- 1µl Pfu Turbo DNA Polymerase

Die PCR lief über Nacht nach folgendem Protokoll im Thermocycler ab:



Beide Stränge der neu entstandenen Plasmide sind als Folge der Amplifikation an nicht komplementären Stellen noch nicht geschlossen (sog. „nicked“ Plasmid-DNA). Erst nach Transformation von *E. coli* (s. C.2.4.2) werden die „nicks“ durch die DNA-Reparaturfunktion der Bakterienzelle geschlossen und die Plasmide weiter amplifiziert.

C.2.4.10 Sequenzierung der cDNA-Vektoren

Zur Erfolgskontrolle der Klonierungsschritte wurden alle Plasmide sequenziert (Metabion, München). Die Sequenzierprimer-Bindungsstellen zu beiden Seiten der MCS des Plasmids pcDNA.3.1/Hygro+ (T7 und BGHR) dienten als Startpunkt der 5'- bzw. 3'-Sequenzierung. Die Sequenzen wurden mit den Referenzsequenzen (s. C.1.8) mittels der Software MacVector[®] verglichen.

C.2.5 Proteinchemische Verfahren

C.2.5.1 Probenvorbereitung

Für den spezifischen Nachweis zellulärer Proteine wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugieren (5 min, 190x g, 4°C) und anschließendes Dekantieren des Überstands vom Kulturmedium befreit. Um Reste des Mediums zu entfernen, wurden die Zellen in PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) resuspendiert und unter den o.g. Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in Lämmli-Probenpuffer mit 0,1 M DTT in einer Konzentration von 2-3 x 10⁵ Zellen/10 µl Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mittels Ultraschall lysiert und Protein bei 95 °C für 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

C.2.5.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen mittels PAGE beruht auf der Ladung von Protein-SDS-Komplexen und deren unterschiedlicher Retention in einem Polyacrylamid-Gel in Abhängigkeit von ihrer Größe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fertige Gele mit einem Polyacrylamid-Gradienten von 4-20% (Anamed) verwendet. Sie wurden nach Herstellerangaben in die Gelapparatur eingespannt und anschließend mit den vorbereiteten Proben beladen. Die Trennung erfolgte über 1 h bei einer Spannung von 225 V. Die Fertiggele dienten sowohl der Auftrennung unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen, da sie kein SDS enthalten. Als Größenstandard wurde der kommerzielle Magic Mark XP® (Invitrogen) verwendet.

C.2.5.3 Transfer von Proteinen auf die PVDF-Membran

Der Proteintransfer aus dem Polyacrylamidgel auf PVDF-Membranen erfolgte mit Hilfe einer Elektrobloiting-Apparatur (Invitrogen). Vor Beginn des Transfers wurden die PVDF-Membranen in 100% Methanol äquilibriert und in der Regel zwei Gele gleichzeitig in der wannenförmigen Kathode der Apparatur mit Bloiting-Schwämmen und Whatman-Papier ohne Lufteinschlüsse nach dem Schema in Abb. C-4 positioniert. Alle Materialien waren zuvor in Bloiting-Puffer getränkt worden. Die Apparatur wurde mit der Anode verschlossen und in den Tank eingespannt. Die innere Kammer wurde mit Bloiting-Puffer, die äußere zur Kühlung mit destilliertem Wasser befüllt. Der Proteintransfer erfolgte für ca. 1 h bei 40 mA.

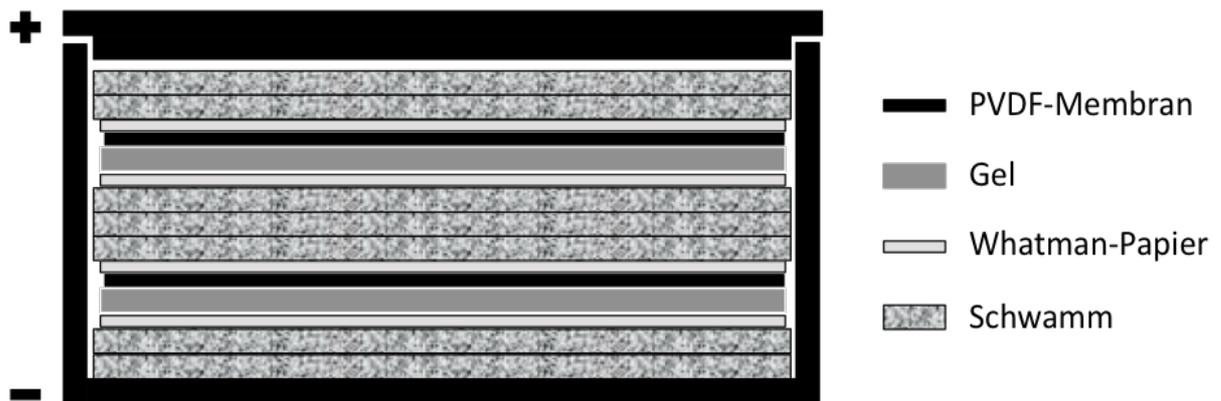


Abb. C-4: Schematischer Aufbau der Blotkammer zum Proteintransfer von zwei Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen.

C.2.5.4 Immunnachweis von Protein

Der immunologische Nachweis von Protein auf der PVDF-Membran beruht auf der Bindung spezifischer Antikörper an bestimmte Epitope. Die so gebundenen Antikörper können wiederum durch Inkubation mit einem zweiten Antikörper markiert werden, der gegen das Spezies-spezifische Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist. Zur visuellen Detektion ist dieser zweite Antikörper an Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelt, die Farb- oder Chemolumineszenzreaktionen vermittelt.

Verwendete Lösungen:

Blockierungsreagenz	5% Magermilchpulver oder 3% BSA in PBS
Wasch-/und Inkubationspuffer	0,05% Tween 20 in PBS
Antikörper	Verdünnung nach Angaben des Herstellers in Inkubationspuffer

Arbeitsschritte des Immunnachweises:

<u>Vorgang</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Inkubation</u>
Sättigung der freien Bindungsstellen auf der Membran	Blockierungsreagenz	1 h schütteln bei RT oder ÜN bei 4°C
	Waschpuffer	3 x 5 min schütteln
Bindung an das gesuchte Epitop	1. Antikörper	1 h schütteln
	Waschpuffer	3 x 5 min schütteln
Bindung an das Fc-Fragment des 1. Antikörpers	2. Antikörper	1 h schütteln
Beseitigung von Tween	PBS	3 x 5 min schütteln
Chemolumineszenzreaktion vermittelt durch HRPO	ECL-Reagenz 1 + 2	1 min

Im Anschluss an die Inkubation mit den ECL-Reagenzien wurde die PVDF-Membran mit einer lichtdurchlässigen Folie abgedeckt, um direkten Kontakt zwischen Membran und lichtsensitivem ECL-Film zu vermeiden. Die Belichtung, Entwicklung und Fixierung des Films fanden in der Dunkelkammer statt, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde.

C.2.5.5 Semiquantitative Auswertung von Immunoblots mittels Densitometrie

Immunoblots wurden mit dem ImageJ® Bildverarbeitungsprogramm densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden die Blots zunächst mit einem handelsüblichen Farbdokumentenscanner digitalisiert und die Farbtintensität definierter Bildausschnitte (z.B. einer Lane) bestimmt, die mit der Menge des angefärbten Proteins korreliert. Durch den Vergleich einzelner Banden auf dem Westernblot konnten so u.a. die Gesamtexpressionen sowie das Ausmaß der Prozessierung eines Proteins (z.B. der Tryptase-Fluoreszenzproteine) semiquantitativ bestimmt werden.

C.2.6 Flowzytometrie

C.2.6.1 Allgemeines

Die Flowzytometrie ermöglicht die simultane Bestimmung verschiedener Parameter wie der relativen Größe, der Granularität und der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen. Dazu werden Zellen in Suspension mit einem Hüllstrom in einer Quarzküvette einzeln an dem fokussierten Lichtstrahl eines Argon-Lasers (488 nm, 15 mW) vorbeigeleitet. Der einfallende Lichtstrahl wird an der Membran und den Organellen

der Zelle gebrochen und die gestreuten Lichtstrahlen werden von Detektoren aufgenommen. Der entlang der Einfallssachse ausfallende Teil der Strahlung (FS: „forward scatter“) wird als Maß für die Zellgröße und der im rechten Winkel ausfallende Lichtanteil (SS; „side scatter“) als Maß für die Granularität ausgewertet. Durch den Laserstrahl angeregte Fluoreszenzfarbstoffe werden durch Filter in drei verschiedenen Wellenlängen (FL-1 = 537 nm; FL-2 = 597 nm; FL-3 = 650 nm) detektiert und in relativen Fluoreszenzeinheiten (engl. RFU) wiedergegeben.

Für die Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität von Reporter-Gen-tragenden Zellen wurden Histogramme verwendet, auf deren x- und y-Achse die jeweilige RFU bzw. die dazugehörige Zellzahl dargestellt ist. Durch Definition eines Schwellenwertes für die Fluoreszenzintensität wurde der Prozentanteil der Reporter-Gen-exprimierenden Zellen ermittelt. Dieser Wert wurde allgemein als Transfektionseffizienz bezeichnet.

	FS	SS	FL1	FL2	FL3	FL4	AUX
Voltage	50	1000	500	641	541	375	505
Integral	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	10.0
	FS	SS	FL1	FL2	FL3	FL4	AUX
Discriminator	100	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
	FL1	FL2	FL3	FL4			
FL1		0	0.3	0			
FL2	0		0	0			
FL3	45	0		0			
FL4	0	0	0				
Laser Power (mW)	15.00						

Tab. C-1: Geräteeinstellungen des Flowzytometers Coulter Epics XL-MCL

Zur Differenzierung vitaler und toter Zellen wurde Propidiumiodid (PI) eingesetzt, das sich im Kern von Zellen mit beschädigter Zellmembran an die DNA anlagert, von intakten Zellen dagegen nicht aufgenommen wird. Mit PI vorbehandelte tote und beschädigte Zellen emittieren Licht mit einem Maximum bei $\lambda = 617$ nm. Nach Definition eines Schwellenwerts wurde der Anteil toter Zellen im 'dot plot' dargestellt und als Prozentwert der Gesamtzellzahl angegeben.

C.2.6.2 Probenvorbereitung

500 µl der zu analysierenden Zellsuspension (1×10^5 bis 1×10^6 c/ml) wurden in ein Reaktionsgefäß mit 1 ml Isoton-Puffer gegeben und mit 5 µl 1 mM Propidiumiodid-Lösung versetzt. Zum Start der Messung wurde das Probengefäß in die Aufnahmevorrichtung eingespannt. Um den zytotoxischen Effekt des Propidiumiodid möglichst gering zu halten, wurden die Proben nach Zusatz zügig verarbeitet.

C.2.7 Fluoreszenzmikroskopie von Cytospins

Um die Lokalisation der Fluoreszenzprotein-markierten Tryptasen mittels der Fluoreszenzmikroskopie möglichst genau und ohne störende Bewegungsartefakte zu bestimmen, wurden die sonst in Suspension kultivierten HMC-1 Mastzellen mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge auf einen gläsernen Objektträger aufgebracht. Dazu wurden die Zellen mit einem speziellen Zylinderaufsatz aus der Suspension direkt auf den Objektträger zentrifugiert (5 min, 190x g, RT). Nach dem Dekantieren des Kulturmediums wurden die am Objektträger haftenden Zellen mit PBS (37 °C) gewaschen und unter Einschluss eines dünnen Films PBS ohne vorherige Fixierung mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurden die Zellen in Öl-Immersionstechnik mit bis zu 60-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-70 betrachtet und digitale Aufnahmen angefertigt. Dabei wurden die Zellen in nativen Aufnahmen morphologisch und die Lokalisation der Fusionsproteine unter Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe eYFP, eGFP oder eCFP beurteilt. Zur Detektion des Fluoreszenzsignals wurden Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe beachtet und Filter eingesetzt, die zur Anregung nur Licht einer Wellenlänge nahe am Exzitationsmaximum der jeweiligen Fluorophore passieren lassen (s. Tab. C-2).

Fluoreszenzprotein	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	in vivo Struktur	Relative Helligkeit (% von eGFP)
EGFP	484	507	Monomer	100
EYFP	514	527	Monomer	151

Tab. C-2: Eigenschaften verwendeter Fluoreszenzproteine

C.2.8 Konfokale Mikroskopie

Um eYFP-markierte Tryptasen in lebenden Mastzellen detaillierter zu lokalisieren, wurden Zellen stabiler HMC-1 Klone mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie ist dadurch die räumliche Auflösung von Lichtsignalen möglich, wodurch Unschärfen vermieden werden, die durch Summation von Licht- oder Fluoreszenzsignalen aus mehreren Ebenen eines Objekts verursacht werden. Dazu wurden 300 μl der HMC-1 Mastzellen-Suspension in Kulturmedium ($1\text{-}2 \times 10^5$ Zellen/ml) in ein Well einer 1 μ -slide-8-Well-Platte (Fa. Ibidi) ausplattiert und anschließend bei Raumtemperatur mit 6 μl des Kernfarbstoffs Hoechst #33342 für mindestens 15 min bei RT inkubiert. Mit dem Mikroskop LSM S10 mit Objektiv Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC (jeweils von Zeiss®) wurden Übersichtsaufnahmen mit einer optischen Schichtdicke von 1 μm und Detailaufnahmen von 0,7 μm angefertigt. Die Filtereinstellungen (Longpass von 385 nm und Bandpass von 530-600 nm) waren auf die Detektion von eYFP und des Kernfarbstoffs ausgelegt. Justierungen an Vergrößerung, optischer Schärfe und Kontrast der Aufnahmen wurden mit dem LSM Image Examiner vorgenommen und die resultierenden digitalen Aufnahmen mit ImageJ bearbeitet.

D Ergebnisse

D.1 Tryptase- γ - und - δ -cDNA-Konstrukte

D.1.1 Vektordesign

Um eine spezifische Detektion und Lokalisation der Tryptasen γ und δ nach Expression in HMC-1 Mastzellen durch den direkten Nachweis von Fluoreszenz zu ermöglichen, wurden Expressionsvektoren konstruiert, die für Fusionsproteine der Tryptasen mit dem Fluoreszenzprotein eYFP als Reporter gen kodieren. Außerdem war für einen immunologischen Nachweis die Kopplung mit einem Tag unumgänglich, da existierende Tryptase-Antikörper nicht spezifisch genug sind (Kreuzreaktion von δ -Ak mit Tryptase β) und insbesondere auch in HMC-1 Zellen transfizierte Tryptasen von nativ produzierten unterschieden werden sollten.

Die erforderlichen cDNA-Komponenten lagen in der Arbeitsgruppe in unterschiedlichen Plasmiden vor (s. Tab. D-1) und wurden nach dem „Baukastensystem“ durch Restriktionsenzymverdau (s. C.2.4.2) und ‘Sticky-End-Ligation’ in die ‘Multiple Cloning Site’ (MCS) des Plasmids pcDNA3.1/Hygro+ eingefügt (s. C.2.4.4).

cDNA-Insert	Ursprungskonstrukt	Träger-Vektor/ Resistenz	Schnittstellen
δ -Tryptase	δ H6eYFP/CFP	pSC-B/Amp/Kan	NheI-HindIII
γ -Tryptase	γ^* eGFP (defekt)	pcDNA3.1/Zeo	-----
eYFP	δ H6eYFP/CFP	pcDNA5/FRT/Zeo	BamHI-XhoI
\emptyset	pcDNA3.1/Hygro+ (leer)	pcDNA3.1/Hygro+ (leer)	MCS

Tab. D-1: Zu Beginn der Arbeit vorhandene Konstrukte und Vektoren

Alle cDNA-Konstrukte sind aus der jeweiligen die Präprotryptase kodierenden Sequenz zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme NheI und HindIII (einschließlich des Start-Codons am 5'-Ende) und der eYFP-Sequenz zwischen BamHI und XhoI (mit dem Stop-Codon am 3'-Ende) aufgebaut. Diese beiden Komponenten sind durch eine „Linker-Sequenz“ zwischen den Schnittstellen HindIII und BamHI verbunden, die in den Konstrukten dieser 1. Generation eine für sechs Histidin-Reste kodierende Sequenz enthält (His-6-Linker, s. Abb. D-1).

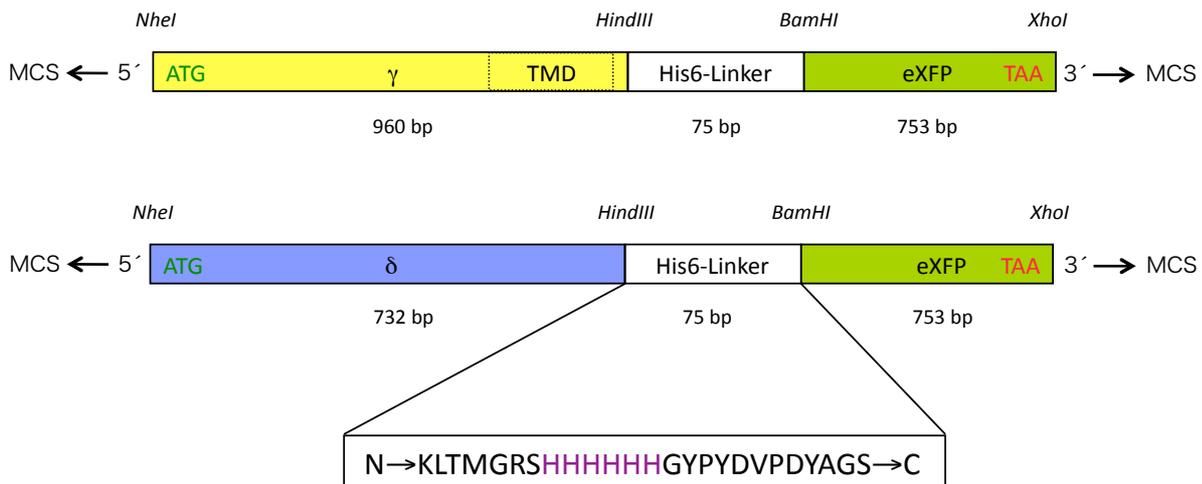


Abb. D-1: Schematische Darstellung der Tryptase-Fusionskonstrukte: Die Abbildung zeigt die Expressionsvektoren der Tryptase-Fluoreszenzproteine der 1. Generation γ -His6eYFP und δ His6eYFP. Die Konstrukte bestehen aus der γ - (gelb) bzw. δ -cDNA (blau) am 5'-Ende und der Fluoreszenzprotein-cDNA (FP-cDNA, grün) am 3'-Ende. Die für die Transmembrandomäne kodierende Sequenz der γ -cDNA ist gesondert gekennzeichnet (TMD). Beide Konstrukte enthalten einen 75 bp langen Linker mit His6-Tag kodierendem Abschnitt. Die Translation der Linker-Sequenz ist im Buchstabencode dargestellt.

Das so hergestellte γ -Konstrukt γ His6eYFP mit einer Länge von 1788 bp und das δ -Konstrukt δ His6eYFP mit 1560 bp (jeweils Start bis Stop) wurde in das Plasmid pcDNA3.1/Hygro+ ligiert. Ausgehend von diesen Konstrukten wurden im Verlauf der Arbeit die Konstrukte der 2. und 3. Generation durch Modifikationen im Linker-Bereich hergestellt (s. D.3).

Ein eYFP-exprimierender Vektor diente im Verlauf der Arbeit zur Etablierung der transienten Transfektion der Mastzelllinie HMC-1 (s. D.2.2) sowie als Positivkontrolle in allen Transfektionsexperimenten. Er wurde analog durch Ligation der 753 bp langen eYFP kodierenden cDNA zwischen den Schnittstellen BamHI und XhoI in die MCS des Vectors pcDNA3.1/Hygro+ hergestellt.

D.1.2 Tryptase- γ -Konstrukt

D.1.2.1 Modifikation der γ -cDNA durch PCR und Subklonierung

Die DNA-Sequenzierung der zu Beginn dieser Arbeit als Template im Plasmid pcDNA3.1/ γ *eGFP/Zeocin vorliegenden Tryptase γ -cDNA zeigte die Deletion eines Basenpaares an Position 951 der γ -Präprosequenz, die zu einer Leserasterverschiebung nahe des 3'-Endes führte. Außerdem war die γ -Sequenz nicht von den benötigten Restriktionsschnittstellen NheI und HindIII eingefasst.

Name	Primer-Sequenz (5'-3')	Richtung
Primer A (NheI)	AT <u>AGCTAGCGACACCATGGCCCTTGGGGCCTGTG</u>	vW
Primer B (KeinStopHindIII)	ATA <u>AAGCTTGT</u> CAGGGGGC <u>G</u> GGGAAGGG	rW

Tab. D-2: Primer für die Amplifikation und Korrektur der Tryptase γ -cDNA: Die eingeführten Restriktionsenzymststellen sind unterstrichen. Das Guanin (Box) beseitigt die Deletion, die im Template-Konstrukt zu einer Leserasterverschiebung führt.

Aufgrund der Nähe der Deletion zum 3'-Ende des Konstrukts konnten durch PCR mit entsprechend konstruierten Primern (s. Tab. D-2) sowohl die Leserasterverschiebung beseitigt als auch die gewünschten Schnittstellen eingefügt werden (s. C.2.4.1).

Das PCR-Produkt, das durch PCR mit der Goldstar-Polymerase endständig jeweils mit einem überhängenden Desoxyadenosin-Rest versehen wurde, wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese aus dem PCR-Mix isoliert und aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde es in pCR2.1-TOPO ligiert (s. C.2.4.1.1 und C.2.4.1.2) und die entstandenen Plasmide wurden zur Transformation von *E. coli* Top10F' verwendet (s. C.2.4.5). In den folgenden Schritten wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* aufgereinigt (s. C.2.4.6) und das γ -Insert durch Restriktionsverdau mit NheI und HindIII an den neu eingefügten Schnittstellen aus dem Plasmid isoliert (s. C.2.4.2). Nach erneuter Auftrennung des DNA-Fragments mittels Gel-Elektrophorese und Extraktion aus dem Agarose-Gel erfolgte die 'Sticky-End-Ligation' des korrigierten γ -Inserts in den mit NheI und HindIII linearisierten Zielvektor pcDNA3.1/His6eYFP.

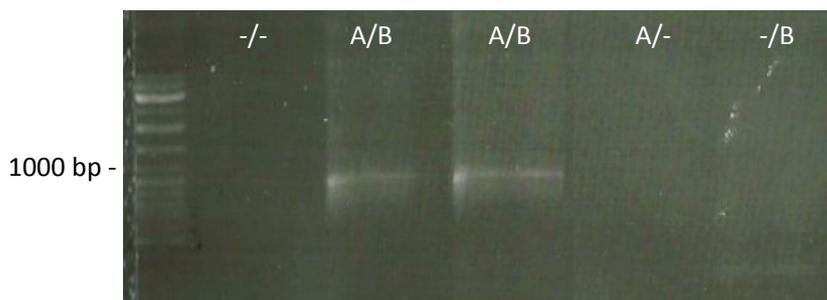


Abb. D-2: Agarosegel-Elektrophorese des Tryptase- γ -PCR-Produkts: Nur in PCR-Ansätzen mit den Vorwärts- und Revers-Primern A und B war das PCR-Produkt mit 960 bp als Bande nachweisbar.

Zur weiteren Amplifikation wurden *E. coli* Top10F' mit dem neuen Plasmid transformiert, der Erfolg der Ligationsreaktion nach Aufreinigung des Plasmids aus der Bakterienkultur mittels Restriktionsverdau verifiziert und ausgewählte Bakterienklone für die Präparation der Plasmid-DNA in präparativem Maßstab kultiviert (s. C.2.4.4).

D.1.2.2 Sequenzierung und Referenzabgleich des Tryptase- γ -Konstrukts

TPSG1-eYFP	1	MALGACGLLLLLLAVPGVSLR	TLQPGCGRPQVSDAGGR	IVGGHAAPAGAWPWQASL	RLRRMHVCGG	65
GamH6eY_fw	1	XXLGACGLLLLLLAVPGVSLR	TLQPGCGRPQVSDAGGR	IVGGHAAPAGAWPWQASL	RLRRVHVCGG	65
		***** ↑ *****				
TPSG1-eYFP	66	SLLSPQWVLTAAHCFSGSLN	SSDYQVHLGELEITLSPHF	STVRQIILHSSPSGQPGT	SGDIALVE	130
GamH6eY_fw	66	SLLSPQWVLTAAHCFSGSLN	SSDYQVHLGELEITLSPHF	STVRQIILHSSPSGQPGT	SGDIALVE	130

TPSG1-eYFP	131	LSVPVTLSSRILPVCLPEAS	DDFCPGIRCWVTGWGYTRE	GEPLPPPYSLREVKVSV	VDTETCRRD	195
GamH6eY_fw	131	LSVPVTLSSRILPVCLPEAS	DDFCPGIRCWVTGWGYTRE	GEPLPPPYSLREVKVSV	VDTETCRRD	195

TPSG1-eYFP	196	YPGPGGSILQPDMLCARGP	GDACQDDSGGPLVCQVNG	AWVQAGIVSWGEGCGRP	NRPGVYTRVPA	260
GamH6eY_fw	196	YPGPGGSILQPDMLCARGP	GDACQDDSGGPLVCQVNG	AWVQAGIVSWGEGCGRP	NRPGVYTRVPA	260

TPSG1-eYFP	261	YVNWIRRHITASGGSESGY	PRLPLLAGFFLPGLFLLL	VSCVLLAKCLLHPSADG	TFFPAPD*--	321
GamH6eY_fw	261	YVNWIRRHITASGGSESGY	PRLPLLAGFFLPGLFLLL	VSCVLLAKCLLHPSADG	TFFPAPDKLTM	325

TPSG1-eYFP	322	-----M	VSKEELFTGVVPI	LVLDGDVNGHKFSV	SGEGEDATYGKLT	365
GamH6eY_fw	326	GRSHHHHHGYPYDVPDYAGS	MVSKEELFTGVVPI	LVLDGDVNGHKFSV	SGEGEDATYGKLT	390

TPSG1-eYFP	366	LKFICTTGKLPVPWPTLV	TTFGYGLQCFARYPDHM	KQHDFFKSAMPEGYVQ	ERTIFFKDDGNYKT	430
GamH6eY_fw	391	LKFICTTGKLPVPWPTLV	TTFGYGLQCFARYPDHM	KQHDFFKSAMPEGYVQ	ERTIFFKDDGNYKT	455

TPSG1-eYFP	431	RAEVKFECDTLVNRIELK	GIDFKEDGNILGHKLE	YNYNSHNVI	IMADKQKNGIKVNF	KIRHNIED 495
GamH6eY_fw	456	RAEVKFECDTLVNRIELK	GIDFKEDGNILGHKLE	YNYNSHNVI	IMADKQKNGIKVNF	KIRHNIED 520

TPSG1-eYFP	496	GSVQLADHYQQNTPIGD	GPVLLPDNHYSYQSALS	KDPNEKRDHMLLEFV	TAAAGITLGMDELYK	560
GamH6eY_fw	521	GSVQLADHYQQNTPIGD	GPVLLPDNHYSYQSALS	KDPNEKRDHMLLEFV	TAAAGITLGMDELYK	585

TPSG1-eYFP	561	*---	561			
GamH6eY_fw	586	*LESR	590			
			*			

Abb. D-3: Aminosäuresequenz des Tryptase γ -Fusionskonstrukts γ His6eYFP: Die DNA-Sequenzierungen des 1788 bp langen γ -Konstrukts (γ His6eYFP) wurden editiert, translatiert (untere Reihe) und mit den Referenzsequenzen Tryptase γ I (TPSG1) und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Aminosäure-Übereinstimmungen sind mit Sternchen markiert. Prä- und Pro-Sequenz am N-Terminus sind dunkel- und hellgrau unterlegt, die potentielle Transmembrandomäne unterstrichen und der His6-Linker schwarz unterlegt. Einer von zwei Basenaustauschen führt im Vergleich zur Referenz TPSG1 zu einem AS-Austausch (Met60Val **↑**), der auch in der Sequenz der Tryptase γ II (TPSG2) vorkommt.

Um den korrekten Aufbau des γ -Fusionskonstrukts zu verifizieren, wurde das hergestellte γ -Plasmid sequenziert (s. C.2.4.8.). Die DNA-Sequenz bestätigte den Einbau des Fusionsgens in der richtigen Orientierung ohne Leserasterverschiebung, Deletion oder Insertion. Alle wichtigen Sequenzabschnitte wie die Präpro-Sequenz, die potentielle Transmembrandomäne und die katalytische Domäne, alle Restriktionsschnittstellen (s. Abb. D-1) sowie der eingefügte His6-Linker und die Fluoreszenzprotein-Sequenz sind intakt. Im Vergleich zur Referenzsequenz der Tryptase γ I (TPSG1) lagen in allen Konstrukten zwei Punktmutationen vor (s. Anhang, Abb. G-1). Ein Austausch von Thymin gegen Cytosin 300 bp nach dem

Startcodon (T300C) bleibt dabei in der Translation stumm, während der Austausch A180G den Aminosäure-Austausch von Methionin gegen Valin an Position 60 des Zymogens bewirkt. Dieser Austausch liegt bereits im verwendeten γ -Template vor und ist Teil der Sequenz der allelischen Variante Tryptase γ II (TPSG2).

D.1.3 Tryptase- δ -Konstrukt

D.1.3.1 Subklonierung des Tryptase- δ -Konstrukts

Die cDNA der Tryptase δ lag aus Vorarbeiten mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme NheI und HindIII ohne Stop-Codon und in Fusion mit dem in Abb. D-1 dargestellten His6-Linker und eYFP im Klonierungsvektor pSC-B/Amp/Kan vor. Um dieses Fusionskonstrukt exprimieren zu können, wurde es durch Restriktionsverdau mit NheI und XhoI aus dem Klonierungsvektor geschnitten und durch Agarosegel-Elektrophorese von den größeren Plasmid-Fragmenten getrennt. Anschließend wurde das entstandene δ His6eYFP-Fragment aus dem Gel aufgereinigt und mittels 'Sticky-End-Ligation' in den mit NheI und XhoI linearisierten Expressions-Vektor pcDNA3.1/Hygro+ ligiert (s. C.2.4.5.-C.2.4.7). Zur weiteren Amplifikation wurden *E. coli* Top10F' mit dem neuen Plasmid transformiert (s. C.2.4.2) und der Erfolg der Ligationsreaktion nach Aufreinigung des Plasmids aus der Bakterienkultur mittels Restriktionsverdau verifiziert. Ausgewählte Bakterienklone wurden dann für die Aufreinigung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab kultiviert (s. C.2.4.4).

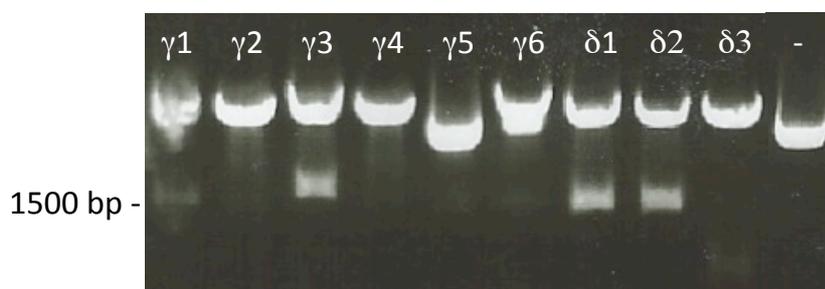


Abb. D-4: Restriktionsanalyse der Tryptase-Plasmide mit NheI und XhoI: In den mit pcDNA3.1/ γ His6eYFP transformierten *E. coli*-Klonen 1 und 3 sowie den mit pcDNA3.1/ δ His6eYFP transformierten Klonen 1 und 2 ist das entsprechende Fusionskonstrukt als Bande bei ca. 1800 bzw. 1600 bp nachweisbar.

D.1.3.2 Sequenzierung und Referenzabgleich des Tryptase- δ -Konstrukts

Auch das Tryptase- δ -Konstrukt wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Im Vergleich zu den Referenzsequenzen der Tryptase δ I (TPSD1) und eYFP wurde der korrekte Einbau der cDNA-Sequenz in der richtigen Orientierung ohne Leserasterverschiebung, Deletion oder Insertion bestätigt. Alle wichtigen Sequenzabschnitte wie die Präpro-Sequenz, die katalytische Domäne, alle Restriktionsschnittstellen (s. Abb. D-1), der eingefügte His6-Linker und die Fluoreszenzprotein-Sequenz sind intakt. Der Austausch der Basen c174t und c204a ist in beiden Fällen in der Translation stumm.

```

TPSD1-eYFP      1  -----MLLLAPQMLSLLLLLALPVLASPAYVAPAGQALQQTGIVGGQEAPRSKWPQVSLRVR  58
DelH6eY_fw     -7  XAXLAATMLLLAPQMLSLLLLLALPVLASPAYVAPAGQALQQTGIVGGQEAPRSKWPQVSLRVR  58
                *****

TPSD1-eYFP     59  GPYWMHFCGGSLIHPQWLTAACHVEPDIKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIVVHPQFYII 123
DelH6eY_fw     59  GPYWMHFCGGSLIHPQWLTAACHVEPDIKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIVVHPQFYII 123
                *****

TPSD1_eYFP    124  QTGADIALLELEEPVNISSHIHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNNVHLPYPLKEVEVP 188
DelH6eY_fw    124  QTGADIALLELEEPVNISSHIHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNNVHLPYPLKEVEVP 188
                *****

TPSD1_eYFP    189  VVENHLCNAEYHTGLHTGHSFQIVRDDMLCAGSENHSDSCQDGGPLVCKVNGT*----- 243
DelH6eY_fw    196  VVENHLCNAEYHTGLHTGHSFQIVRDDMLCAGSENHSDSCQDGGPLVCKVNGTPKLTMGRSHH 253
                *****

TPSD1_eYFP    244  -----MVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTTLKFICT 292
DelH6eY_fw    254  HHHGYPYDVPDYAGSMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTTLKFICT 318
                *****

TPSD1_eYFP    293  TGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKF 358
DelH6eY_fw    319  TGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKF 383
                *****

TPSD1_eYFP    359  EGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNShNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 423
DelH6eY_fw    384  EGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNShNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA 448
                *****

TPSD1_eYFP    424  DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK*--- 483
DelH6eY_fw    449  DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK*LESR 512
                *****
    
```

Abb. D-5: Sequenzierung des Tryptase δ -Fusionskonstrukts δ His6eYFP: Die cDNA-Sequenzen des 1560 bp langen δ -Konstrukts (δ His6eYFP) wurden editiert, translatiert (untere Reihe) und mit den kombinierten Referenzsequenzen von TPSD1 und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Aminosäure-Übereinstimmungen sind mit Sternchen markiert. Die N-terminale Präpro-Sequenz ist grau, der His6-Linker schwarz unterlegt. Die beiden Punktmutationen in der DNA-Sequenz sind in der Aminosäure-Sequenz stumm.

D.2 Transiente Transfektion

D.2.1 Etablierung der transienten Transfektion von HMC-1 Mastzellen

Um eine effiziente, aber möglichst wenig toxische Methode der Transfektion der Mastzelllinie HMC-1 zu etablieren wurden in Kooperation mit N. Buchmann und F.

Brennfleck diverse Transfektionsreagenzien und -methoden evaluiert. Dazu wurden Effizienz und Toxizität der jeweiligen Methode mittels Flowzytometrie ermittelt. Die Effizienz wurde über den Anteil fluoreszierender Zellen quantifiziert, die Toxizität über Zellen, die Propidiumiodid aufgrund einer gestörten Membranintegrität aufnahmen.

Zunächst wurden HMC-1 Zellen entsprechend den jeweiligen Protokollen bzw. Herstellerangaben mit dem Kontroll-Vektor pcDNA3.1/Hygro+/eYFP transfiziert. Nach einem vom Hersteller empfohlenen Zeitintervall wurde erst die Zellzahl im Hämocytometer bestimmt und im Anschluss die Flowzytometeranalyse durchgeführt. Mit den meisten der so überprüften Methoden wurde lediglich eine mittlere Transfektionseffizienz unter zehn Prozent erzielt. Die besten Ergebnisse erbrachte die Lipofektion mit Lipofectamin 2000 nach Optimierung des Protokolls mit einer Effizienz von $45 \pm 5\%$ transfizierter Zellen und einer sehr niedrigen Toxizität von $5 \pm 1\%$ ($n=12$).

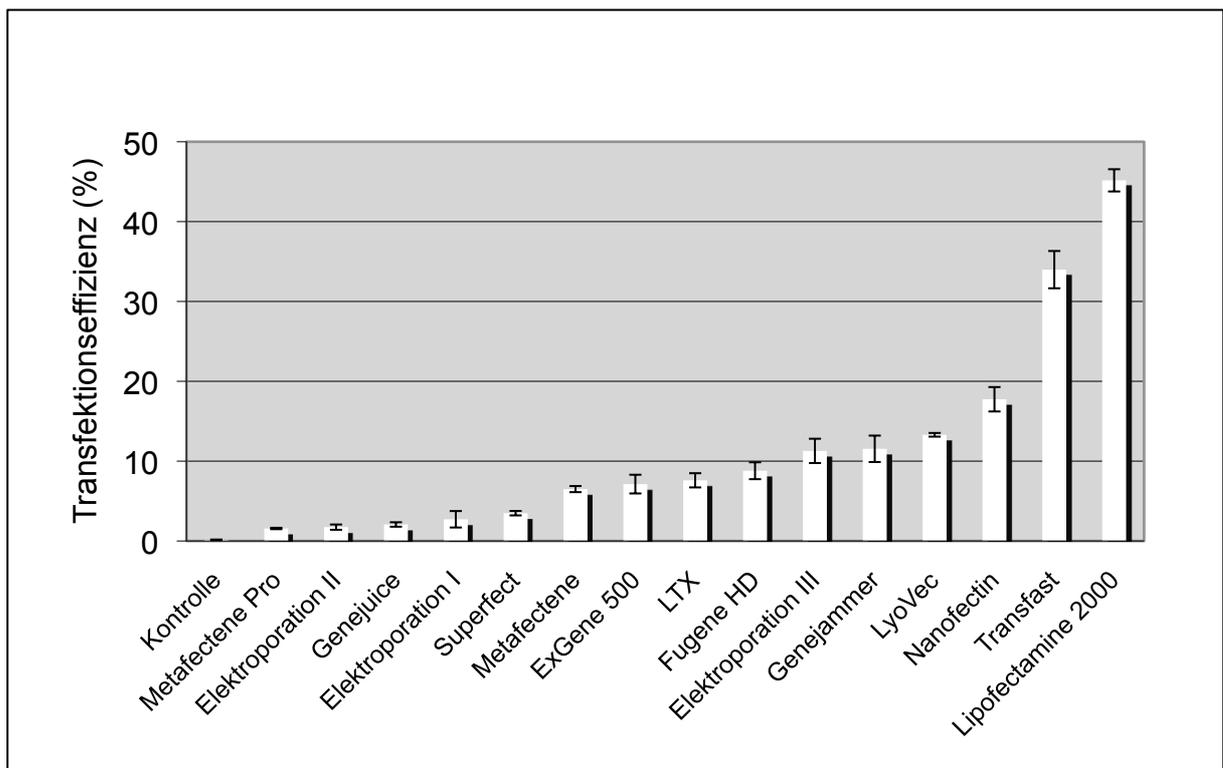


Abb. D-6: Evaluation der Effizienz verschiedener Transfektionsmethoden im Vergleich: Alle Methoden der Transfektion entsprechend dem Protokoll des jeweiligen Herstellers durchgeführt ($n = 3-12$). Die durchschnittlichen Transfektionseffizienzen sind für alle Methoden aufsteigend aufgetragen (Mittelwert \pm SEM). Die höchste Effizienz von ca. 45% wurde mit Lipofectamin 2000 erreicht.

D.2.2 Transiente Transfektion von HMC-1 Mastzellen mit Tryptase-Fluoreszenzprotein-Konstrukten

Nach Etablierung der Lipofektion von HMC-1 Zellen wurde in einem nächsten Schritt überprüft, inwieweit die Methodik auch für die Transfektion mit Vektoren geeignet ist, die für Fusionsproteine von Tryptasen mit eYFP als 'Fluoreszenz-Tag' kodieren. Dazu wurden HMC-1 Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1/ γ H6eYFP und pcDNA3.1/ δ H6eYFP, die für Fusionsproteine der Tryptase γ bzw. δ mit eYFP kodieren, sowie dem bisher verwendeten Kontrollvektor pcDNA3.1/eYFP (s. C.2.2) entsprechend dem optimierten Protokoll (s. C.2.1) transfiziert. Um den Einfluss des Lipofektionsreagens und der Plasmid-DNA auf die Zellen zu erfassen, wurden in jedem Versuch Kontrollansätze ohne Plasmid-DNA, d.h. nur mit Lipofectamin 2000, mitgeführt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die Zellzahl im Casy-Zählgerät gemessen und die Transfektionsrate als Anteil eYFP-exprimierender, fluoreszierender Zellen sowie der Anteil toter, d.h. Propidiumiodid aufnehmender Zellen mittels Flowzytometrie bestimmt (s. C.2.6). Ansätze, in denen die Transfektionseffizienz von HMC-1 mit dem eYFP-Kontrollplasmid unter 20% lag, wurden nicht in die Wertung einbezogen. Die Toxizität der Lipofektion mit den drei verwendeten Vektoren war vergleichbar: 48 Stunden nach Transfektion wurden $5,1 \pm 1,7\%$, $5,1 \pm 0,5\%$ und $5,2 \pm 0,6\%$ tote, Propidiumiodid aufnehmende Zellen nach Transfektion mit pcDNA3.1/eYFP, pcDNA3.1/ γ His6eYFP bzw. pcDNA3.1/ δ His6eYFP gemessen. Diese Werte liegen im Bereich der während der Protokolloptimierung beobachteten Toxizität (s. D.2.1). Da in den 'Mock'-Ansätzen ohne Plasmid-DNA mit Lipofectamin ein niedrigerer Anteil toter Zellen ($1,0 \pm 0,1\%$) beobachtet wurde, ist diese Toxizität zumindest zum Teil auf die cDNA zurückzuführen. Auch die Gesamtzellzahl reflektiert die geringe und für die drei Vektoren nahezu identische Toxizität: Ausgehend von $4,0 \times 10^5$ Zellen/ml am Anfang des Experiments stieg die Zellzahl innerhalb von 48 h durch Proliferation in den 'Mock'-Kontrollen auf $7,7 \pm 0,2 \times 10^5$ /ml schneller als nach Transfektion mit den eYFP- sowie Tryptase-eYFP-Vektoren (zwischen $6,5 \pm 0,3$ und $6,8 \pm 0,3 \times 10^5$ Zellen/ml).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das optimierte Lipofectamin-2000-Protokoll prinzipiell auch für die Transfektion mit Vektoren geeignet ist, die die Tryptase-eYFP-Fusionsproteine kodieren. Im Vergleich zum eYFP-Kontrollvektor ist die Transfektionseffizienz jedoch deutlich niedriger.

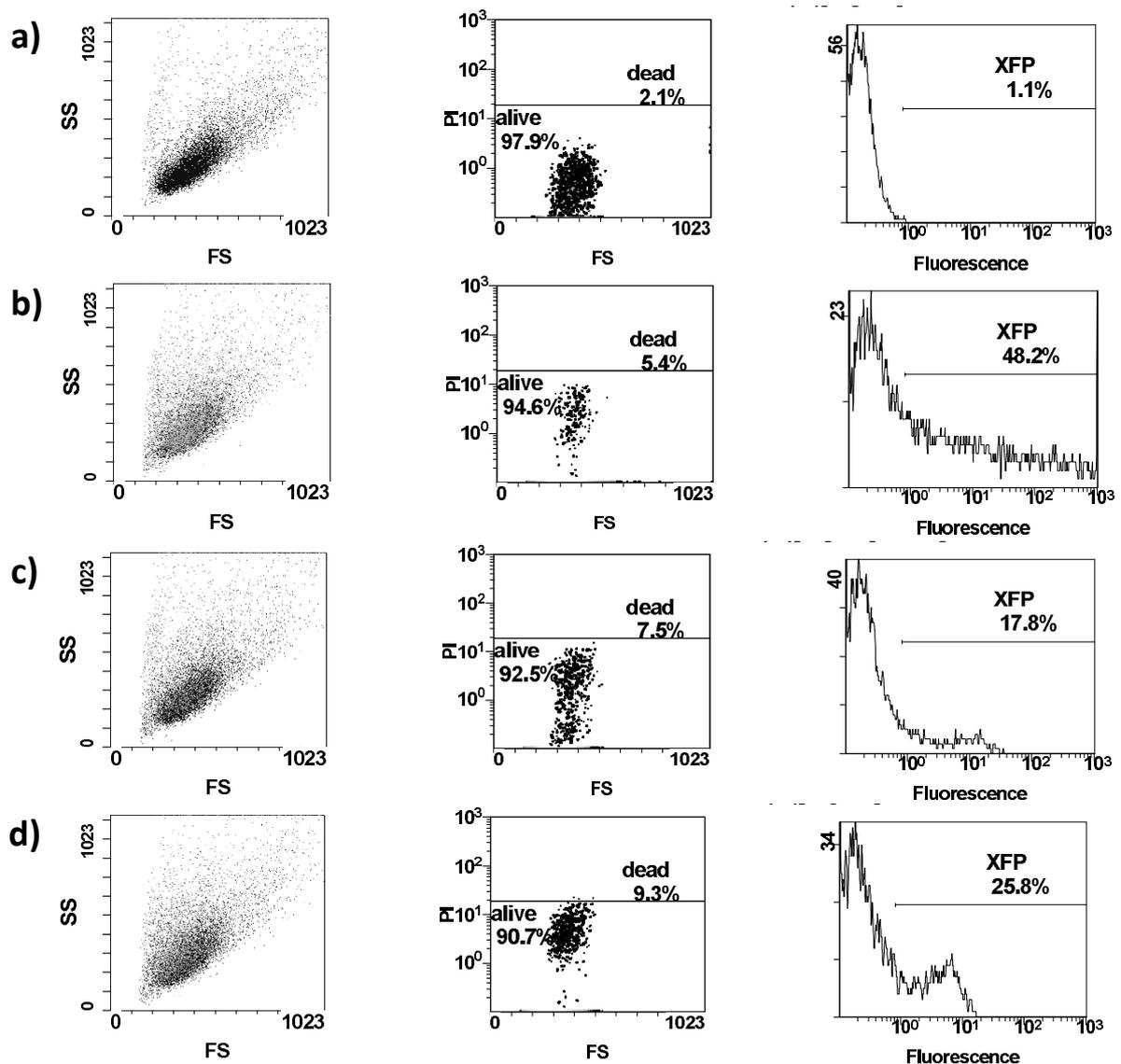


Abb. D-7: Flowzytometrische Analyse der transienten Transfektion von HMC-1 Mastzellen: HMC-1 Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1/eYFP (b, Positivkontrolle), den Fusionskonstrukten pcDNA3.1/γHis6eYFP (c) und pcDNA3.1/δHis6eYFP (d) sowie nur mit Lipofectamin 2000 (a, Negativkontrolle) transfiziert. In jeder Messung wurden insgesamt 10.000 Zellen (Events) registriert und deren Forward und Side Scatter repräsentativ für Zellgröße und -granulierung gegeneinander aufgetragen (linke Spalte). Durch den Auftrag der Intensität der von Propidiumiodid ausgehenden Fluoreszenz gegen den Forward Scatter wurde der Anteil toter Zellen bestimmt (mittlere Spalte). Die relative Fluoreszenzintensität ausgehend von eYFP ist auf einer logarithmischen Skala gegen die absolute Anzahl der Events aufgetragen (rechte Spalte). Ein Schwellenwert bestimmt hier die Unterteilung in transfizierte und nicht transfizierte Zellen. Die Verteilung der Fluoreszenzintensität dargestellt als Histogramm weist auf das Ausmaß der Genexpression hin.

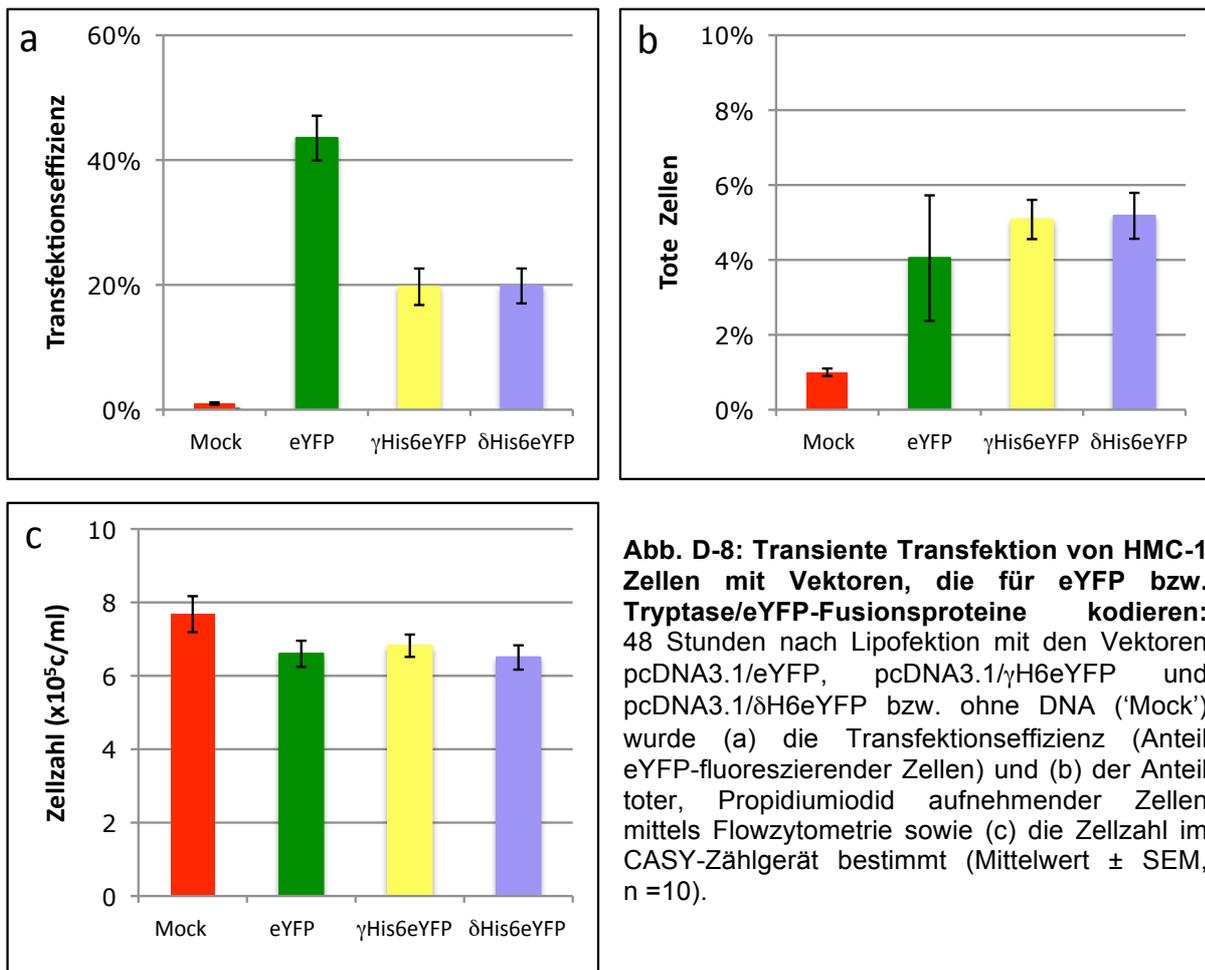


Abb. D-8: Transiente Transfektion von HMC-1 Zellen mit Vektoren, die für eYFP bzw. Tryptase/eYFP-Fusionsproteine kodieren: 48 Stunden nach Lipofektion mit den Vektoren pcDNA3.1/eYFP, pcDNA3.1/ γ H6eYFP und pcDNA3.1/ δ H6eYFP bzw. ohne DNA ('Mock') wurde (a) die Transfektionseffizienz (Anteil eYFP-fluoreszierender Zellen) und (b) der Anteil toter, Propidiumiodid aufnehmender Zellen mittels Flowzytometrie sowie (c) die Zellzahl im CASY-Zählgerät bestimmt (Mittelwert \pm SEM, n = 10).

D.2.3 Transiente Transfektion weiterer Zelllinien mit den Tryptase-Fluoreszenzprotein-Konstrukten

Um zu überprüfen, inwieweit die deutlichen Unterschiede zwischen der Transfektionseffizienz des eYFP-Vektors und der Tryptase-eYFP-Fusionsprotein-Vektoren von der Empfängerzelllinie HMC-1 abhängig sind, wurde zunächst die Transfektion anderer Zelllinien untersucht. Für diese Versuche wurde die Zelllinie HEK-293-FTR, eine von embryonalen Nierenzellen abstammende, adhären wachsende Zelllinie, gewählt. Außerdem wurde die Zelllinie Jurkat verwendet, die ausgehend von einer T-Zell-Leukämie etabliert wurde und damit, wie auch HMC-1 Zellen, hämatogenen Ursprungs ist und in Suspension kultiviert wird. Beide Zelllinien sowie HMC-1 Zellen wurden entsprechend dem optimierten Protokoll (s. C.2.2) mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1/eYFP und den Tryptase-eYFP-Fusionsproteine kodierenden Vektoren pcDNA3.1/ γ His6eYFP und pcDNA3.1/ δ His6eYFP transfiziert.

Anschließend wurde die Zellzahl im Casy-Zählgerät sowie die Transfektionseffizienz als Anteil fluoreszierender Zellen und der Anteil toter, Propidiumiodid-aufnehmender Zellen mittels Flowzytometrie bestimmt.

In HEK-293-FTR, einer erfahrungsgemäß gut zu transfizierenden Zelllinie, lagen die Effizienzen für alle Konstrukte deutlich über denen, die in HMC-1 erzielt wurden. Die Transfektionseffizienz mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1/eYFP lag bei $66 \pm 3\%$, mit den für die Tryptase-eYFP-Fusionsproteine kodierenden Plasmiden deutlich niedriger bei $46 \pm 2\%$ bzw. $52 \pm 1\%$ (jeweils $n = 5$). In der Jurkat Zelllinie war das verwendete Lipofektions-Protokoll ineffizient; die Transfektionsraten lagen unter 3% (pcDNA3.1/eYFP $2,4 \pm 0,2\%$; pcDNA3.1/ γ His6eYFP, pcDNA3.1/ δ His6eYFP und 'Mock' jeweils $\leq 0,2\%$, $n \geq 4$). Die Toxizität war in allen Versuchen vergleichbar. Der Anteil toter Zellen lag bei $\leq 3\%$.

In Hinblick auf die wesentlich effizientere Lipofektion wurde die Zelllinie HEK-293-FTR als Kontrolle in weiterführenden Experimenten eingesetzt. Trotz der in den drei Zelllinien extrem unterschiedlichen Transfektionsraten ist auffallend, dass die Transfektionsraten mit den für Tryptase-eYFP-Fusionsproteine kodierenden Plasmiden im Vergleich zum eYFP-Kontrollvektor jeweils deutlich niedriger sind. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Transfektionseffizienz einerseits wesentlich vom verwendeten Plasmid bzw. dessen Eigenschaften (z.B. Größe, offenkettige bzw. supercoiled Form, GC-Anteil oder Sequenz) abhängt. Andererseits hat auch die Zielzelllinie Einfluss auf die Transfektionseffizienz, was an der größeren Diskrepanz in der Effizienz zwischen dem Kontroll- und dem Tryptase-Vektor in HMC-1 im Vergleich zu HEK-293-FTR zu erkennen ist (s. Abb. D-9). Da die Transfektionseffizienz indirekt über den Nachweis der Expression des C-terminalen eYFP-Tag quantifiziert wurde, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass auch Eigenschaften des eingeführten Gens bzw. exprimierten Proteins (z.B. das Ausmaß der Expression, die Lokalisation und Degradierung) bzw. eYFP-Fluoreszenzausbeuten die Bestimmung beeinflussen und somit Unterschiede vortäuschen.

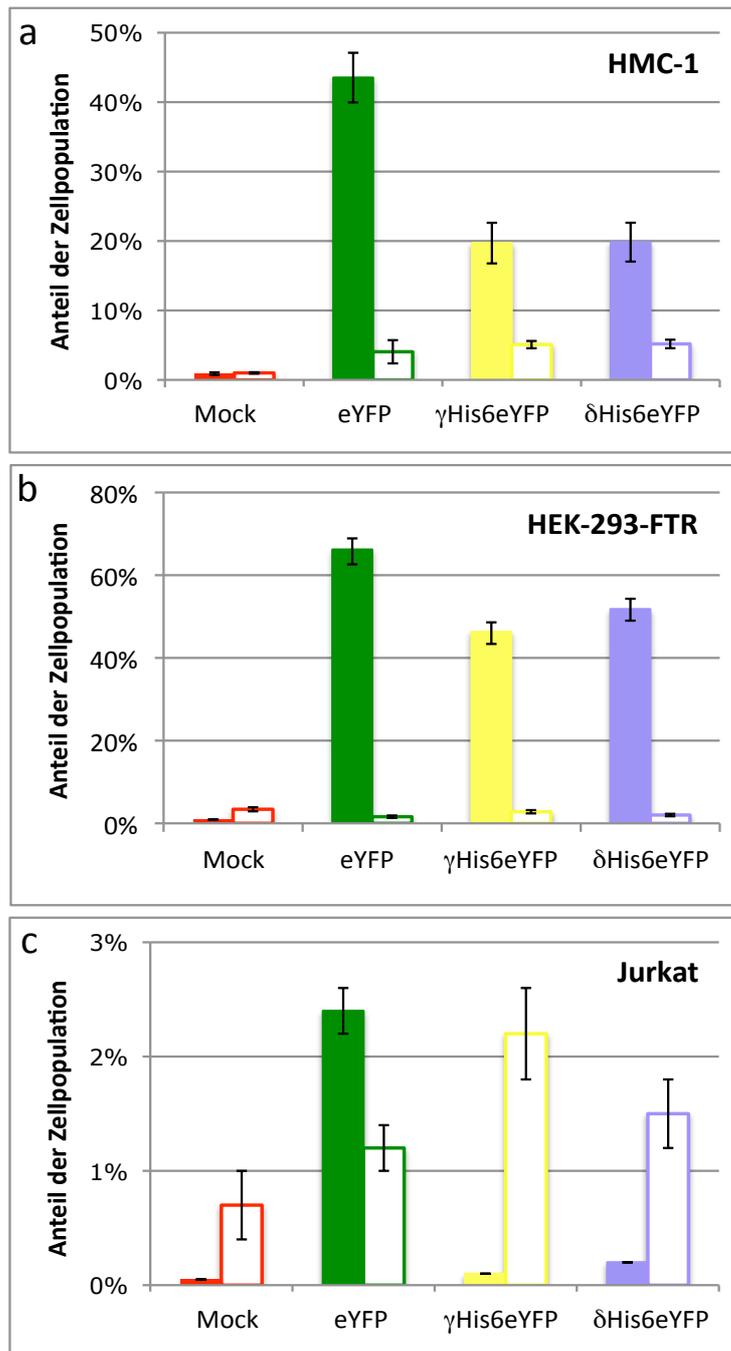


Abb. D-9: Vergleich der Transfektionseffizienz in mehreren Zelllinien: Die Suspensions-Zelllinien Jurkat und HMC-1 (a, c) sowie die adherent proliferierende Zelllinie HEK-293-FTR (b) wurden mit den Vektoren pcDNA3.1/eYFP, pcDNA3.1/ γ His6eYFP und pcDNA3.1/ δ His6eYFP transfiziert. 48 Stunden nach Lipofektion wurde die Transfektionseffizienz (Anteil eYFP positiver Zellen; ■) und der Anteil toter, Propidiumiodid aufnehmender Zellen (□) mittels Flowzytometrie bestimmt (Mittelwert \pm SEM, n \geq 4).

D.2.4 Nachweis der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie

Um einen weiteren Nachweis für die Expression der Konstrukte zu erbringen und sie in Zellen zu lokalisieren, wurden die Zelllinien HMC-1 und HEK-293-FTR mit den Tryptase-Konstrukten pcDNA3.1/ γ His6eYFP und pcDNA3.1/ δ His6eYFP sowie dem Kontrollvektor pcDNA/eYFP transient transfiziert. Die Zellen wurden durch Cytospin auf einen Glasobjektträger aufgebracht (s. C.2.7.2) und Fluoreszenzaufnahmen sowie native Aufnahmen von repräsentativen Bildausschnitten angefertigt.

HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen, die mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1/eYFP transfiziert wurden, zeigten ein kräftiges Fluoreszenzsignal, das nur kurze Belichtungszeiten von unter 100 ms erforderte. Die diffuse, relativ gleichmäßig verteilte Fluoreszenz, in der der Kern und große Zellorganellen als Aussparung zu erkennen sind, weist auf eine vornehmlich zytosolische Lokalisation des Fluoreszenzproteins hin. Diese entsprach den Erwartungen, da die eYFP-cDNA nicht für eine Signalsequenz kodiert, die das Protein für den Transport in andere Zellkompartimente markieren würde.

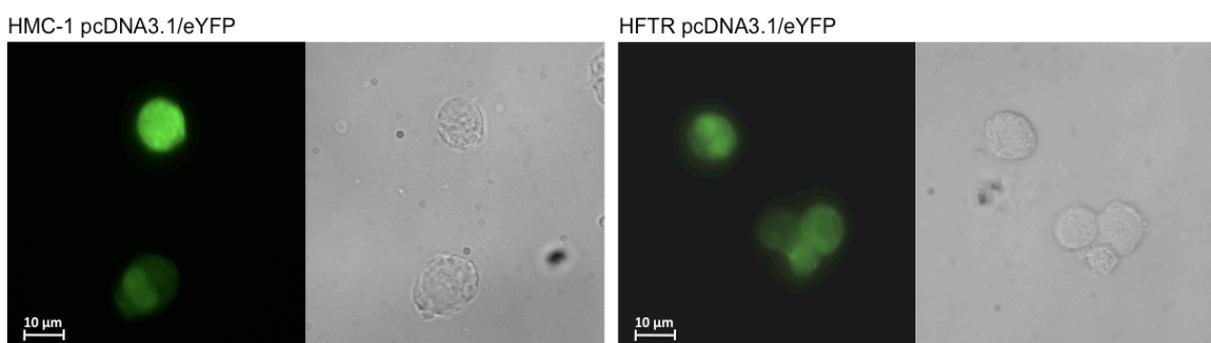


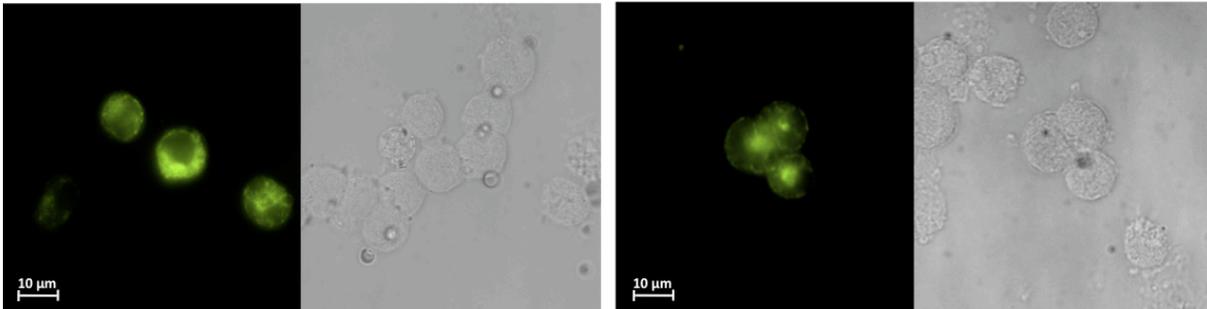
Abb. D-10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HMC-1 und HEK-293-FTR (Cytospin) nach Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3.1/eYFP: Die diffuse Fluoreszenzverteilung weist auf die erwartete zytosolische Lokalisation von eYFP hin. In der lichtmikroskopischen Kontrollaufnahme der jeweiligen Bildausschnitte erscheinen die Zellen intakt.

Transient mit dem γ -Fusionskonstrukt pcDNA3.1/ γ His6eYFP transfizierte HMC-1 und HEK-293-FTR zeigten im Vergleich zu den jeweiligen eYFP-Kontrollen eine geringere Fluoreszenzintensität, die längere Belichtungszeiten von 300-900 ms erforderlich machte. In beiden Zelllinien ist ein vornehmlich fein-granuläres Fluoreszenzmuster mit perinukleärer Betonung zu erkennen, von dem sich die Zellkerne als dunkle Aussparungen absetzen. In einigen Zellen ist zusätzlich der Zellmembran sowie, besonders in HMC-1, auch der Membran größerer Granula ein verstärktes Fluoreszenzsignal im Sinne einer spezifischen Lokalisation zuzuordnen.

ERGEBNISSE

Darüber hinaus liegt auch ein diffuses Fluoreszenzsignal ausgehend vom Zytosol vor. Auch zur Detektion des Fluoreszenzsignals von δ His6eYFP in HMC-1 und HEK-293-FTR waren längere Belichtungszeiten von 300-900 ms erforderlich. Wieder fällt in der Fluoreszenzverteilung eine Betonung perinukleärer Strukturen auf. HMC-1 Zellen zeigen zusätzlich eine gemischt fein-granuläre und zytosolische Färbung, von der sich der Zellkern und weitere Granula ungefärbt abheben. HEK-293-FTR lassen hauptsächlich eine diffuse, zytosolische Fluoreszenz erkennen, in der der Zellkern und wenige große Granula ausgespart bleiben.

HMC-1 pcDNA3.1/GammaH6eYFP



HFTR pcDNA3.1/GammaH6eYFP

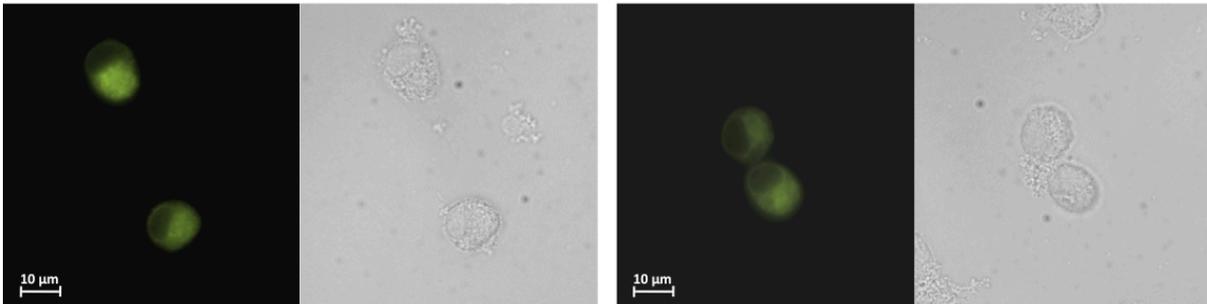
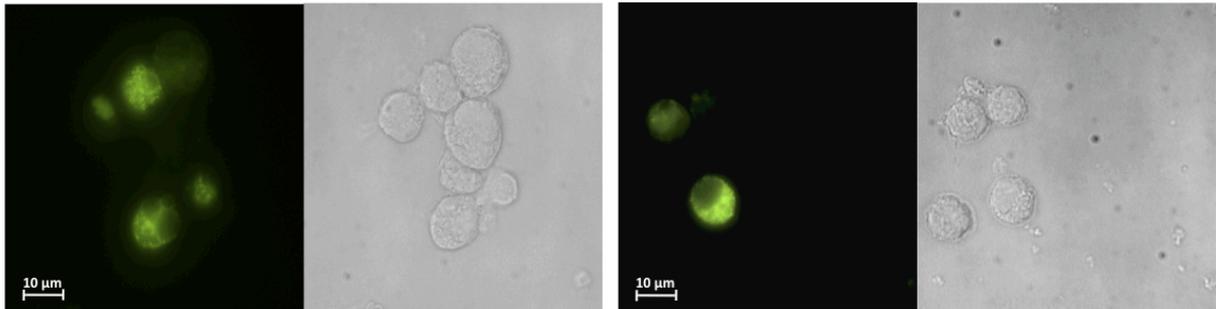


Abb. D-11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HMC-1 und HEK-293-FTR (Cytospin) nach Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3.1/ γ His6eYFP: Sowohl in HMC-1 als auch in HEK-293-FTR stellt sich das Fluoreszenzmuster als gemischt fein-granulär und diffus dar. Besonders in HMC-1 Zellen ist eine Betonung der Zellmembran und der Membran größerer Granula zu erkennen. In der lichtmikroskopischen Kontrollaufnahme der jeweiligen Bildausschnitte sind die Zellen intakt.

HMC-1 pcDNA3.1/DeltaH6eYFP



HFTR pcDNA3.1/DeltaH6eYFP

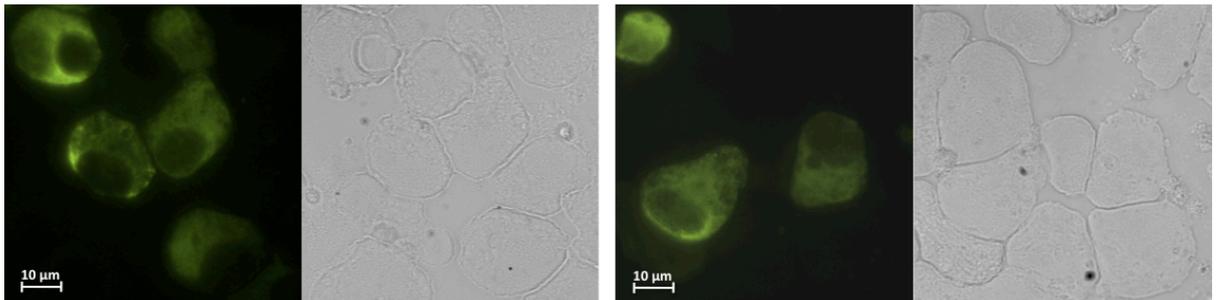


Abb. D-12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HMC-1 und HEK-293-FTR (Cytospin) nach Transfektion mit dem Plasmid ocDNA3.1/ δ His6eYFP: HMC-1 zeigen eine gemischte Lokalisation der Fluoreszenz in feinen Granula und im Zytosol, während in HEK-293-FTR hauptsächlich das Zytosol angefärbt war. In der nativen Kontrollaufnahme sind die Zellen intakt.

Zusammenfassend betrachtet waren beide Tryptase-Fusionskonstrukte γ His6eYFP bzw. δ His6eYFP nach transients Transfektion in HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen über die Fluoreszenz der eYFP-Komponente mikroskopisch nachweisbar. Verlängerte Belichtungszeiten zur Darstellung der Fusionsproteine im Vergleich mit dem Kontrollvektor eYFP lassen auf eine geringere Expression beider Tryptase-Fluoreszenzproteine schließen. Im Fluoreszenzmuster beider Tryptase-Konstrukte ist eine perinukleäre Verdichtung erkennbar, welche dem rER und dem Golgi-Apparat als Ort von Synthese bzw. Glykosylierung entsprechen könnte. Nur das γ -Fusionskonstrukt zeigt in einigen Zellen beider Linien eine spezifische Lokalisation mit Betonung der Zellmembran und der Membran großer Granula, was die Hypothese zur Funktion des hydrophoben C-Terminus der Tryptase γ als Membrananker bekräftigt. Das δ -Fluoreszenzprotein hingegen ist keiner Zellstruktur eindeutig zuzuordnen. In allen transfizierten Zellen ist ein diffuses, vom Zytosol ausgehendes Fluoreszenzsignal nachweisbar, das dem Signal in eYFP-exprimierenden Zellen entspricht. Dies könnte z.B. auf eine partielle Spaltung der Fusionsproteine mit Freisetzung der eYFP-Komponente zurückzuführen sein.

D.2.5 Immunoblot-Analyse der exprimierten Tryptase-Fusionsproteine

Da die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung transient mit den Tryptase-Fusionskonstrukten transfizierter HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen Hinweise auf die Spaltung des C-terminalen eYFP-Anteils ergeben hatten, wurden die Expression und Stabilität der Fusionsproteine mittels Immunoblot überprüft. Dazu wurden HMC-1 und die Kontrollzelllinie HEK-293-FTR mit pcDNA3.1/ γ His6eYFP, pcDNA3.1/ δ His6eYFP und dem eYFP-Kontroll-Vektor transfiziert (s. C.2.2.2). Nach Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden jeweils 2×10^5 Zellen jedes Transfektionsansatzes (s. C.2.5.1) mittels SDS-PAGE (s. C.2.5.2) und Immunoblot nach Transfer auf eine PVDF-Membran (s. C.2.5.3) analysiert. Der spezifische immunologische Nachweis wurde mit einem monoklonalen Primärantikörper gegen GFP bzw. eYFP durchgeführt (s. C.2.5.5). Nach Belichtung der ECL-Filme wurden die Aufnahmen digitalisiert und die Stärke einzelner Proteinfractionen durch Densitometrie semiquantitativ bestimmt (s. C.2.5.6).

Mit dem eGFP-Ak konnten die Fusionsproteine γ His6eYFP und δ His6eYFP in beiden Zelllinien jeweils als kräftige Bande in der erwarteten Laufhöhe von ~67 kDa bzw. ~57 kDa neben einer Reihe unspezifischer Banden nachgewiesen werden. Dafür waren 200.000 Zellen mit einer Transfektionsrate von minimal 16% (γ His6eYFP in HMC-1) ausreichend. Nach Transfektion mit dem eYFP-Kontrollvektor war eYFP als kräftige Doppelbande bei ~28 kDa detektierbar. Auf dieser Laufhöhe war auch nach Transfektion mit den Fusionskonstrukten eine spezifische Bande (~28 kDa) sichtbar als Nachweis der partiellen Spaltung der rekombinanten Fusionsproteine γ His6eYFP und δ His6eYFP. Die Größe des Fragments zeigt, dass die Schnittstelle vermutlich innerhalb des Linkers zwischen Tryptase- und Fluoreszenzprotein-Anteil lokalisiert ist. Das Ausmaß dieser Spaltung war vom Tryptase-Konstrukt und der transfizierten Zelllinie abhängig. In der Densitometrie war die prozessierte Fraktion von γ His6eYFP mit einem Anteil von 52% bzw. 48% jeweils deutlich größer als die von δ His6eYFP mit 29% bzw. 1%. Gleichzeitig wurden die Fusionskonstrukte in HMC-1 stärker gespalten als in HEK-293-FTR Zellen.

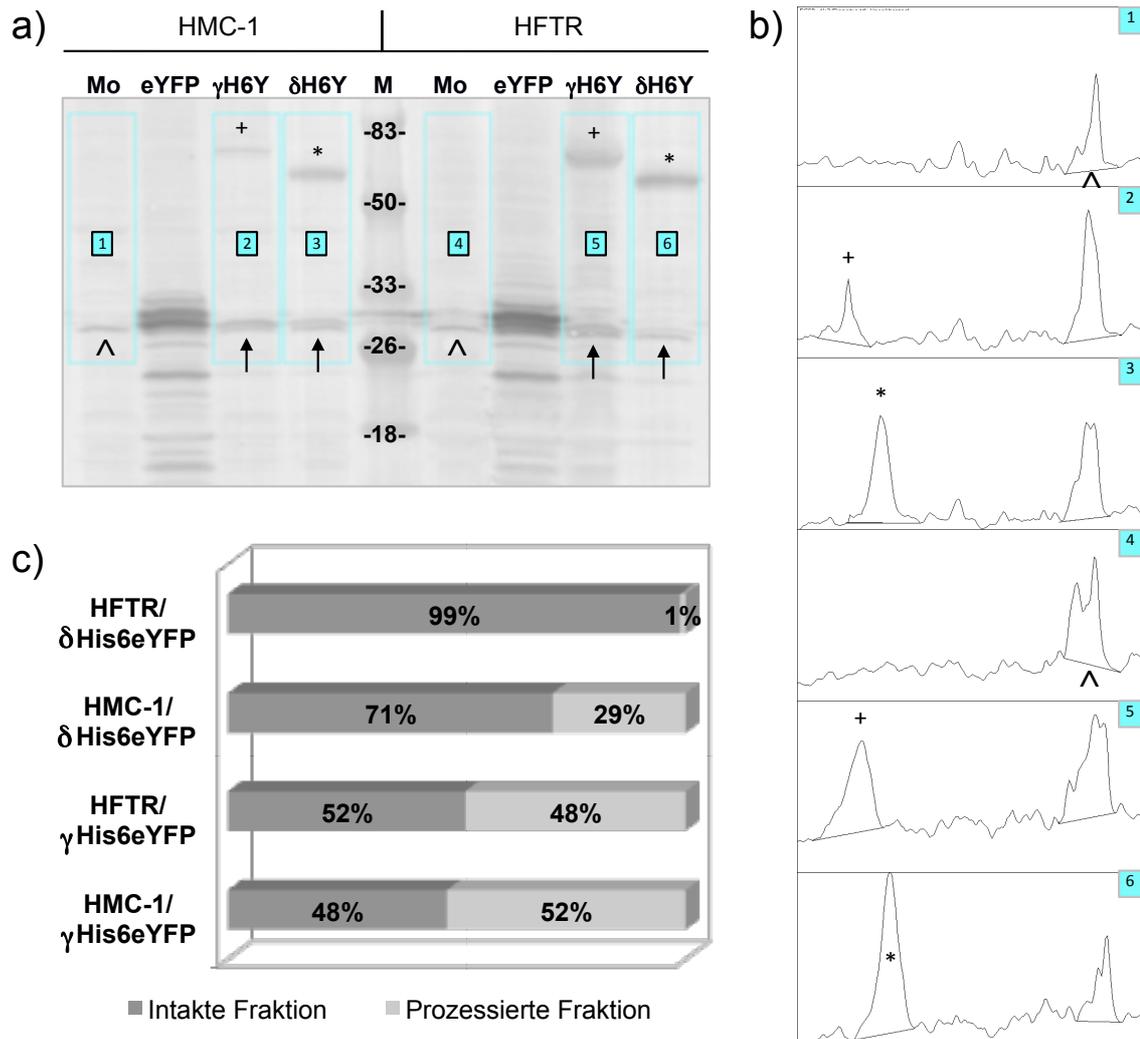


Abb. D-13: Immunoblot-Analyse der in HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen exprimierten Konstrukte γ - und δ -TryptaseHis6eYFP: (a) Nachweis der beiden Fusionskonstrukte γ His6eYFP (\dagger) und δ His6eYFP (*) in HMC-1 (links, Transfektionsrate: eYFP = 52%, γ His6eYFP = 16%, δ His6eYFP = 26%) bzw. HEK-293-FTR (rechts, Transfektionsrate: eYFP = 81%, γ His6eYFP = 62%, δ His6eYFP = 63%) sowie von Spaltprodukten in Laufhöhe der eYFP-Kontrolle (\uparrow) durch GFP-Ak. (b) Densitometrie der Spuren 1-6 des Immunoblots. (c) Darstellung des Verhältnisses von intaktem zu gespaltenem Fusionsprotein. Da die Fragmentbanden auf diesem Immunoblot optisch nicht von einer nahe gelegenen, unspezifischen Bande getrennt werden konnten, wurde deren eigentlicher Dichtewert durch Subtraktion der Dichte der korrelierenden unspezifischen Bande aus der Spur der 'Mock'-transfizierten Zellen (>) vom gemessenen Dichtewert errechnet.

Um die Schnittstelle genauer zu lokalisieren, wurde versucht die His6-Sequenz im Linker-Bereich der Fusionsproteine immunologisch zu detektieren. In mehreren Ansätzen war zwar eine His6-Positivkontrolle nachweisbar, nicht jedoch die Fusionsproteine (s. Anhang, Abb. G-3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fusionsproteine in den Zelllinien HMC-1 und HEK-293-FTR exprimiert werden, dass jedoch bis zu 52% des Proteins gespalten wird. Für weitere Experimente zur Lokalisation und Prozessierung sind die Fusionskonstrukte daher nicht optimal geeignet.

D.3 Tryptase-Konstrukte der 2. und 3. Generation

Basierend auf der Größe der Fragmente ist anzunehmen, dass die in HMC-1 und HEK-293-FTR exprimierten Tryptase γ/δ -eYFP-Fusionsproteine im Bereich des Linkers zwischen Protease und eYFP gespalten werden. Dieser Linker enthält einen Lysin- sowie einen Arginin-Rest, d.h. basische Aminosäuren, die eine autokatalytische Spaltung durch die exprimierten Tryptasen erlauben würden. Um diese Spaltung zu reduzieren, wurde zunächst Arginin durch Restriktionsverdau (Konstrukte der 2. Generation) und anschließend Lysin durch zielgerichtete Mutagenese (Konstrukte der 3. Generation) entfernt.

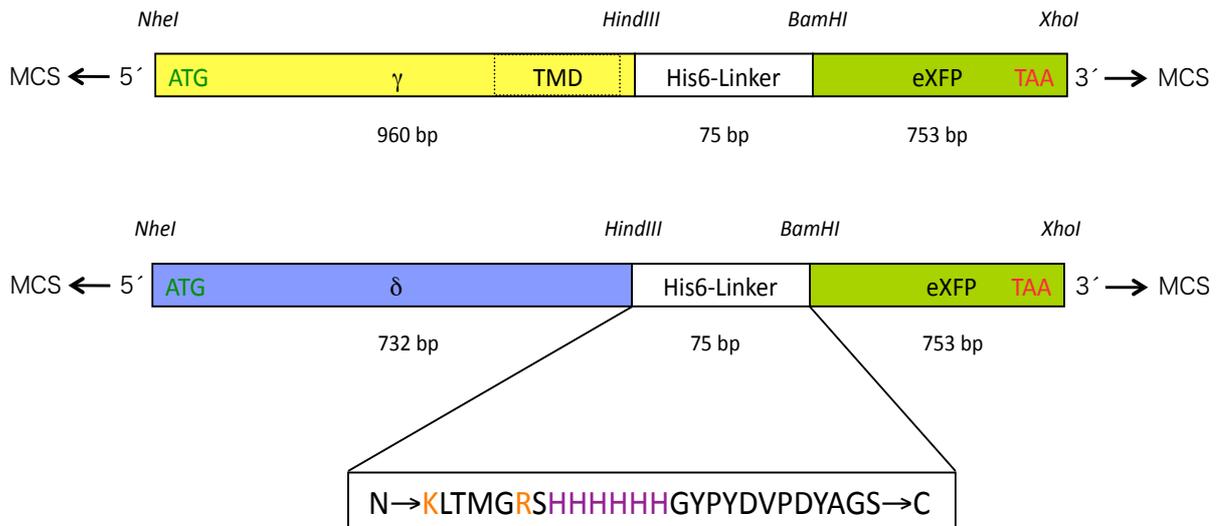
D.3.1 Tryptase-Konstrukte der 2. Generation

D.3.1.1 Subklonierung und Sequenzierung der Tryptase-Konstrukte der 2. Generation

Im γ - und δ -Konstrukt der 1. Generation befindet sich der Arginin-Rest im Bereich des His6-Linkers, sechs Aminosäuren C-terminal vom Ende der katalytischen Domäne der Tryptase. Zur Stabilisierung der Fusionsproteine wurde er mitsamt der Linker-Sequenz durch Restriktionsverdau eliminiert. Dazu wurde die Tryptase-cDNA mit NheI und HindIII und die eYFP-cDNA mit BamHI und XhoI aus dem Plasmid geschnitten und somit von der Linker-Sequenz isoliert. Anschließend wurden beide Fragmente nacheinander durch Sticky-End-Ligation in die MCS des leeren, entsprechend geschnittenen Vektors pcDNA3.1/Hygro+ eingefügt (s. C.2.4.5 bis C.2.4.7). So entstanden die Tryptase-Konstrukte der 2. Generation, in denen die neue Linker-Sequenz zwischen Tryptase- und Fluoreszenzprotein-Anteil nur noch aus 24 bp der MCS des pcDNA3.1/Hygro+-Vektors besteht. Dieser Linker enthält damit nur noch eine potentielle proteolytische Angriffsstelle für Tryptasen: den Lysin-Rest kodiert durch die Schnittstelle NheI (s. Abb. D-14).

Die so generierten Plasmidvektoren wurden in *E. coli* TOP10F' amplifiziert (s. C.2.4.2 und C.2.4.3) und anschließend aufgereinigt (s. C.2.4.4). Die Sequenzierung (s. C.2.4.9) bestätigte die erfolgreiche Entfernung des 51 bp langen His6-Linkers einschließlich des Arginin-Rests sowie die korrekte Religation der cDNA-Fragmente. Die neuen Tryptase-Konstrukte wurden als γ eYFP (1737 bp) und δ eYFP (1503 bp) bezeichnet (s. Abb. D-15).

1. Generation



2. Generation

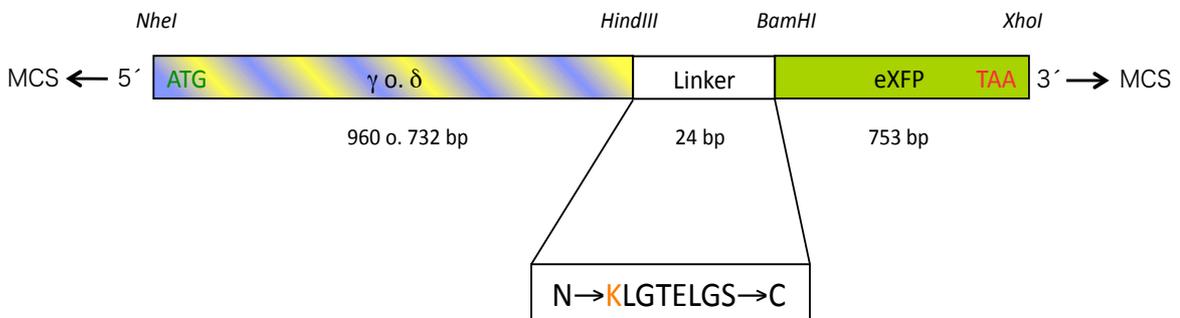


Abb. D-14: Schematische Darstellung der Trypsase-eXFP-Fusionskonstrukte der 1. und 2. Generation: Im Vergleich zu den Konstrukten der 1. Generation γ - bzw. δ His6eYFP (a) enthalten die Konstrukte der 2. Generation γ - bzw. δ eYFP (b) einen aus 24 bp der MCS von pcDNA3.1 bestehenden Linker ohne His6-Tag. Ein Arginin-Rest als potentielle Schnittstelle für tryptische Serinproteasen bzw. Trypsasen wurde entfernt.

Zusammenfassend betrachtet wurden bei der transienten Transfektion und Expression der Tryptase-Fusionskonstrukte der 2. Generation Effizienzen erreicht, die mit denen der 1. Generation vergleichbar sind, während die Toxizität geringfügig höher, bei Werten unter 10% aber akzeptabel ist.

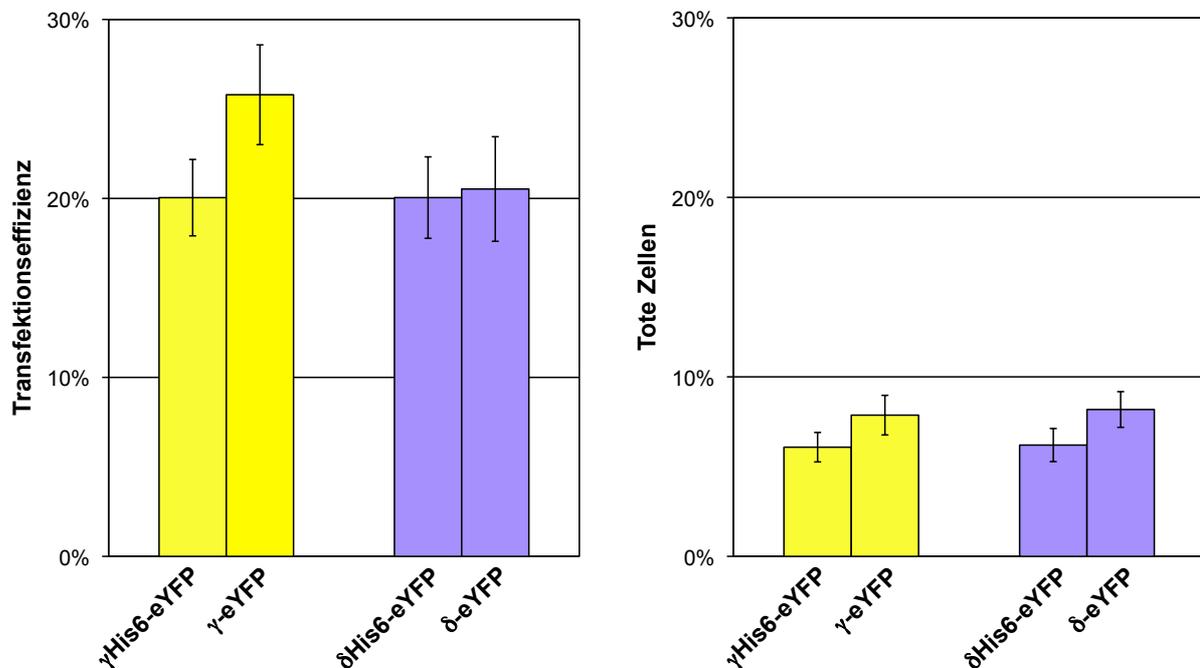


Abb. D-16: Vergleich der durchschnittlichen Transfektionsrate und des Anteils toter Zellen von HMC-1 Zellen nach transienter Transfektion mit den Tryptase- γ - und - δ -Fluoreszenzprotein-Konstrukten der 1. und der 2. Generation mit bzw. ohne His6-Linker (Mittelwert \pm SEM; n = 15-16).

D.3.1.3 Immunoblot-Analyse der Fusionsproteine der 2. Generation

Um zu überprüfen, ob die Stabilität der Tryptase-Konstrukte der 2. Generation durch die Entfernung der potentiellen Schnittstelle im His-6-Linker zugenommen hatte, wurden HMC-1 und HEK-293-FTR parallel mit den γ - und δ -Konstrukten der 1. und 2. Generation transfiziert. 200.000 Zellen jedes Ansatzes wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert. Die Fusionskonstrukte wurden über die eYFP-Komponente mit den monoklonalen eGFP-Ak (Roche) detektiert. Außerdem wurden polyklonale Ak gegen humane Tryptase γ (R&D Systems) und Tryptase β (AG Sommerhoff) eingesetzt. Ein β -Actin-Ak (Santa Cruz) diente als Ladungskontrolle. Das Verhältnis von intaktem zu gespaltenem Fusionsprotein wurde durch Densitometrie der Immunoblots semiquantitativ bestimmt (s. C.2.5.6).

D.3.1.3.1 Nachweis der Fusionsproteine mit dem Anti-GFP-Ak

Durch den Austausch der Blockierungsreagenz (Magermilchpulver statt BSA) konnte bei diesem Immunoblot eine deutliche Reduktion der unspezifischen Antikörperbindung erzielt werden. Insbesondere waren unspezifische Banden auf Höhe der eYFP-Bande (vgl. Abb. D-13) nicht mehr nachweisbar. Die Ladungskontrolle β -Actin war in allen Gelbahnen bei ~ 48 kDa detektierbar.

Im Vergleich zu den Konstrukten der 1. Generation, γ - und δ His6eYFP, die als Banden bei ~ 67 kDa bzw. ~ 57 kDa nachweisbar sind, wandern die Fusionsproteine der 2. Generation entsprechend der Verkürzung der Linker-Sequenz um 17 Aminosäure-Reste mit einer um ~ 2 kDa geringeren Masse.

Auch die Fusionsproteine der 2. Generation werden zum Teil im Bereich des Linkers gespalten, so dass Banden auf Höhe der eYFP-Kontrolle nachweisbar sind. Jedoch ist die Stabilität der Konstrukte der 2. Generation zumindest in HMC-1 Zellen deutlich höher: So sind die Banden der intakten Fusionsproteine wesentlich deutlicher erkennbar, während die Banden der Spaltprodukte schwächer imponieren. Dieser Eindruck wird durch die Densitometrie bestätigt, in der der Anteil gespaltenen γ eYFPs mit 39% nur etwa halb so groß ausfällt wie beim γ -Fusionsprotein der 1. Generation mit 81%. Das Ausmaß der Spaltung von δ eYFP liegt mit 30% im Vergleich zu seinem Vorgängerkonstrukt (43%) etwa um ein Viertel niedriger.

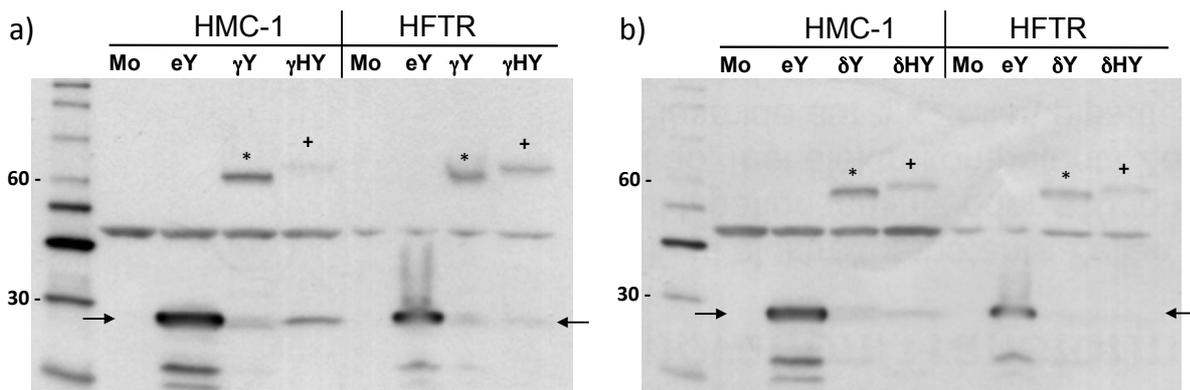


Abb. D-17: Immunoblot-Analyse der Tryptase-eYFP-Fusionsproteine der 1. und 2. Generation: Dargestellt ist der immunologische Nachweis der γ -Fusionsproteine (a) und der δ -Fusionsproteine (b) mittels Anti-GFP-Ak in transient transfizierten HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen (2×10^5 c/Lane; Transfektionsraten in HMC-1 zwischen 35% für δ His6eYFP und 50% für eYFP; in HEK-293-FTR Zellen zwischen 39% für γ His6eYFP und 50% für eYFP). Die β -Actin-Ladungskontrolle ist in allen Lanes bei ~ 48 kDa nachweisbar. Die größeren Tryptase-Fusionsproteine der 1. Generation (+) besitzen eine größere Masse als die entsprechenden Fusionsproteine der 2. Generation (*). In allen Bahnen mit Fusionskonstrukten sind eYFP-Fragment-Banden zu erkennen ($\rightarrow \leftarrow$).

In HEK-293-FTR war der Anteil gespaltenen γ - und δ -Fusionsproteins weitgehend unverändert (γ His6eYFP und γ eYFP: 23% vs. 26%; δ His6eYFP und δ eYFP: 20% vs. 19%), wobei zu berücksichtigen ist, dass das Ausmaß der Prozessierung bei diesen Zellen insgesamt deutlich niedriger liegt als bei HMC-1 Zellen.

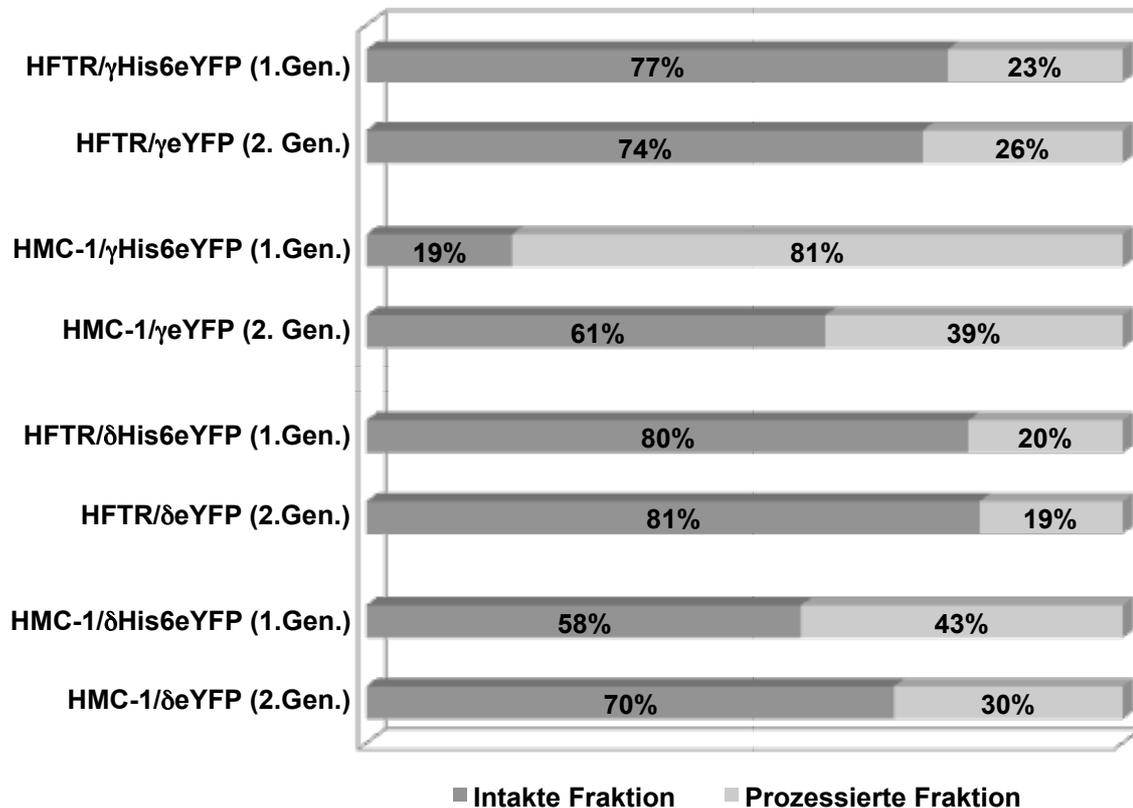


Abb. D-18: Ermittlung der Protein-Spaltungsrate durch Densitometrie: Die Stärke der in Abb. D-17 dargestellten Banden intakten sowie gespaltenen Proteins aller Transfektionsansätze (Y-Achse) wurde mittels Densitometrie quantifiziert und ihr Verhältnis zueinander auf der X-Achse dargestellt. Der Vergleich der so ermittelten Spaltungsraten zeigt einen Stabilitätsgewinn der Fusionsproteine der 2. Generation γ - und δ -eYFP in HMC-1.

D.3.1.3.2 Nachweis der Fusionsproteine mit Anti-Tryptase-Antikörpern

Analog zum immunologischen Nachweis mittels Anti-GFP-Ak wurden die Fusionsproteine in HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen auch mit Antikörpern gegen humane Trypsasen detektiert. Ein polyklonaler γ -Ak detektierte neben der Positivkontrolle (80 ng rekombinante Trypsase γ) in HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen alle exprimierten γ -Fusionsproteine mit den erwarteten Massen von > 60 kDa (s. Abb. D-19a). Ein Spaltprodukt, das hinsichtlich seines Laufverhaltens bei ~34 kDa der Trypsase γ entsprechen könnte, ist nur nach Expression von γ His6eYFP (1.Generation) nachweisbar (s. Abb. D-19c). In 'Mock'- bzw. eYFP-transfizierten

ERGEBNISSE

HMC-1 Zellen ist Tryptase- γ -Immunoreaktivität nicht nachweisbar, was die vergleichsweise geringe intrinsische Produktion von Tryptase γ in HMC-1 Zellen belegt.

Der polyklonale β/δ -Ak detektiert rekombinante β_3 -Tryptase (10 ng) als deutliche 3-fach-Bande entsprechend der heterogenen Glykosylierung des Proteins. In HMC-1 und HEK-293-FTR Zellen wurden die intakten δ -Fusionskonstrukte mit erwarteter Masse von 56-58 kDa nachgewiesen. In HMC-1 Zellen ist außerdem die intrinsische Expression von Tryptase β nachweisbar, deren Abbauprodukte im Bereich zwischen \sim 37 und 10 kDa den spezifischen Nachweis potentieller δ -Spaltprodukte verhindern (s. Abb. D-19b).

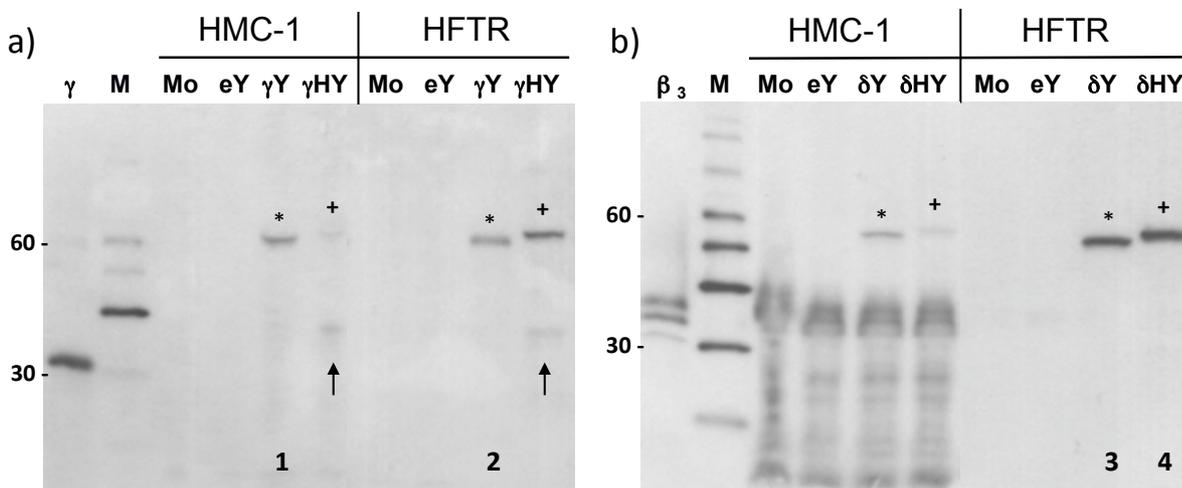
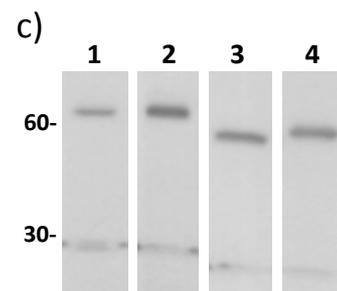


Abb. D-19: Vergleichende Immunoblot-Analyse der Tryptase-eYFP-Fusionsproteine der 1. und 2. Gen. mit Tryptase-Ak:

Immunologischer Nachweis der γ -Fusionsproteine mit einem polyklonalen γ -Ak (a) und der δ -Fusionsproteine mit einem polyklonalen β/δ -Ak (b) im Zelllysats transient transfizierter HMC-1 und HEK-293-FTR (2×10^5 c/Lane; Transfektionsrate in HMC-1 zwischen 20,6% für δ eYFP und 65,0% für eYFP und in HEK-293-FTR zwischen 47,8% für γ His6eYFP und 54,0% für eYFP). Neben den Fusionsproteinen der 1. (+) und 2. (*) Generation wird native Tryptase β in HMC-1 nachgewiesen. Eine Spaltung wird nur bei dem Fusionsprotein γ His6eYFP (\uparrow) durch die Tryptase-Ak detektiert. Die parallele Analyse der identischen Proben mit dem eGFP-Ak (Auszüge in c) weist dagegen die Spaltung aller Fusionsproteine nach.



Tryptase- δ -Spaltprodukte waren jedoch auch in HEK-293-FTR Zellen mit dem β/δ -Ak nicht detektierbar, während die Spaltung in den identischen Proben mit dem GFP-Ak deutlich nachgewiesen werden konnte (s. Abb. D-19c), was vermutlich auf die höhere Sensitivität dieses Antikörpers zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ausgedrückt wurde durch die Deletion des His6-Linkers einschließlich des angrenzenden Arginin-Rests eine deutliche Stabilisierung beider Tryptase-Fusionsproteine erreicht, die bei γ eYFP und in HMC-1 Zellen besonders ausgeprägt ist. Allerdings werden auch die Fusionsproteine der 2. Generation weiterhin in relevantem Ausmaß proteolytisch gespalten. Der Nachweis von Spaltprodukten, deren Massen denen der jeweiligen Tryptasen entsprechen, stützt die Annahme, dass die Fusionsproteine im Linker-Bereich zwischen Tryptase- und eYFP-Anteil gespalten werden.

D.3.2 Tryptase-Konstrukte der 3. Generation

D.3.2.1 Subklonierung und Sequenzierung der Tryptase-Konstrukte der 3. Generation

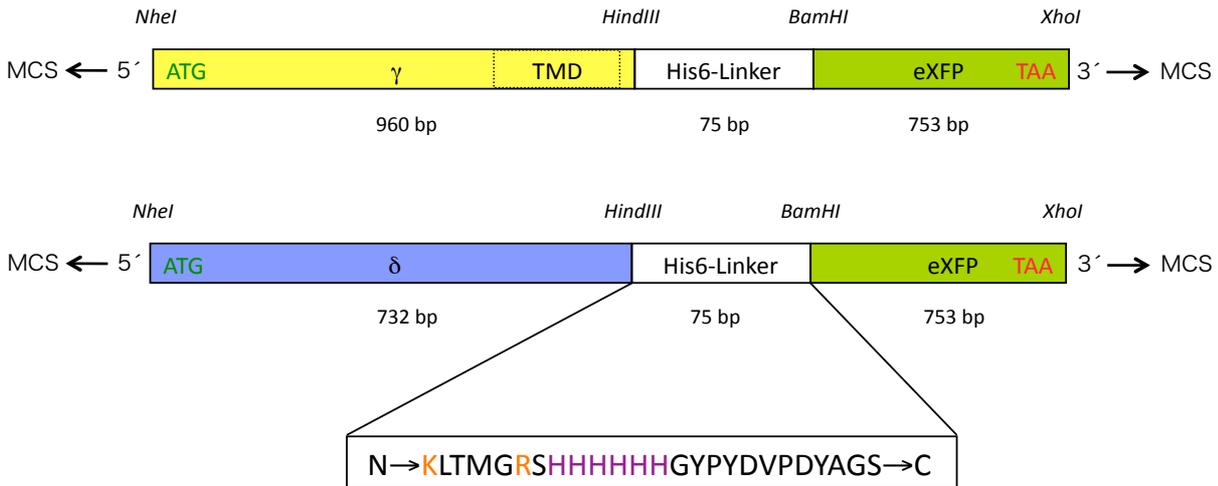
Für die Generierung der Konstrukte der 3. Generation wurde der Lysin-Rest als verbleibende tryptische Schnittstelle im Linker-Bereich durch zielgerichtete Mutagenese gegen einen neutralen Glyzin-Rest ausgetauscht (s. Abb. D-20). Dazu wurden Nukleotid-Primer entworfen (s. Tab. D-3), die im γ - bzw. δ -eYFP-Plasmid das Ziel-Triplet im Rahmen einer PCR (s. C.2.4.9) unter Verwendung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) austauschen.

Name	Primer-Sequenz 5'-3'	Richtung
GammaFP_K322G-vw	CCCCGCCCCTGAC <u>GGG</u> CCTTGGTACCGAG	vw
GammaFP_K322G-rw	CTCGGTACCAAG <u>CCC</u> GTCAGGGGCGGGG	rw
DeltaFP_K244G-vw	GTGAATGGCACCCCG <u>GGG</u> CCTTGGTACCGA GCT	vw
DeltaFP_K244G-rw	AGCTCGGTACCAAG <u>CCC</u> CGGGGTGCCATT CAC	rw

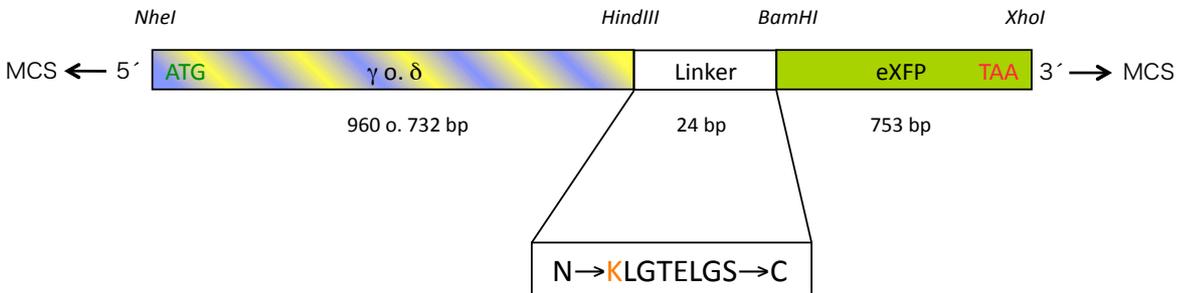
Tab. D-3: Primer für die zielgerichtete Mutagenese der Fusionskonstrukte (2. Generation): Das Lysin kodierende Triplet wurde durch ein Glyzin kodierendes ersetzt (unterstrichen).

ERGEBNISSE

1. Generation



2. Generation



3. Generation

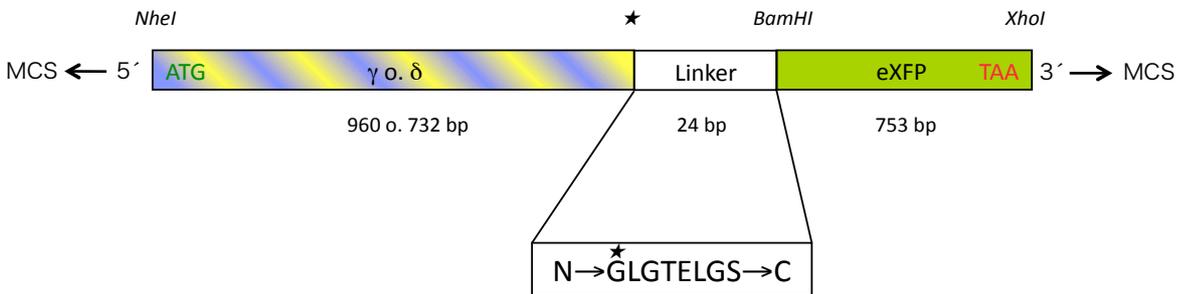
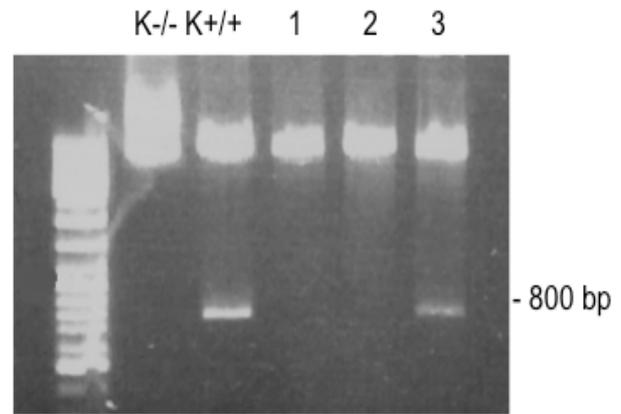


Abb. D-20 Schematische Darstellung der Tryptase-eXFP-Fusionskonstrukte aller Generationen: Der His-6-Linker einschließlich des Arginin-Rests aus der 1. Generation (γ - bzw. δ His6eYFP) (a) ist in der 2. Generation (γ - bzw. δ eYFP) (b) deletiert. Durch gezielte Mutagenese wurde mit dem Lysin-Rest in den Konstrukten der 3. Generation γ K322GeYFP bzw. δ K244GeYFP (c) auch die zweite tryptische Schnittstelle aus der Linker-Sequenz entfernt. Durch diesen Aminosäure-Austausch (★ Lys → Gly an Position 322 der γ - bzw. Position 244 der δ -Zymogen-Sequenz) wird auch die HindIII-Schnittstelle zerstört.

Abb. D-21: Kontrolle der zielgerichteten Mutagenese durch Restriktionsverdau von pcDNA3.1/δK244GeYFP mit NheI und HindIII: Durch die Mutagenese des Lysin-kodierenden Basentriplets in der Linker-Sequenz wird die Restriktionsschnittstelle HindIII zerstört. Die fehlende Abspaltung eines Tryptase-cDNA-Fragments aus der in den *E. coli*-Klonen 1 und 2 amplifizierten Plasmid-DNA belegt die erfolgreiche Mutagenese. Als Positivkontrolle (K+/+) diente pcDNA3.1/δeYFP (2. Gen.).



Nach der PCR-Amplifikation wurden die Template-Plasmide pcDNA3.1/γ- und δeYFP durch die Endonuklease DpnI selektiv verdaut und *E. coli* XL1-Blue mit den neu entstandenen Plasmiden der 3. Generation transformiert (s. C.2.4.3). Die Plasmid-DNA wurde anschließend aus *E. coli* aufgereinigt und der Erfolg der Mutagenese durch den Nachweis der Zerstörung der HindIII-Schnittstelle mittels Restriktionsverdau verifiziert (s. Abb. D-21). Die anschließende Basensequenzierung bestätigte ebenfalls den erfolgreichen Austausch des Nukleotid-Triplets „aag“ gegen das Triplet „ggg“ in beiden Konstrukten. Aufgrund des Austauschs von Lysin durch Glyzin an Position 322 des γ- bzw. an Position 244 des δ-Fusionsproteins werden die neuen Konstrukte der 3. Generation als γK322GeYFP und δK244GeYFP bezeichnet.

a) pcDNA3.1/γK322GeYFP/Hygro+

GamK322GeY_fw	311	N→SADGTPFPAPD	GLGTELGSMVSKGEELFTGVVPILV→C	346
GameY_fw	311	N→SADGTPFPAPD	KLGTELGSMVSKGEELFTGVVPILV→C	346
		*****	↑*****	

b) pcDNA3.1/δK244GeYFP/Hygro+

DelK244GeY_fw	233	N→GPLVCKVNGTP	GLGTELGSMVSKGEELFTGVVPILV→C	268
DeleY_fw	233	N→GPLVCKVNGTP	KLGTELGSMVSKGEELFTGVVPILV→C	268
		*****	↑*****	

Abb. D-22: Sequenzierung und Referenzabgleich der Tryptase-Konstrukte der 3. Generation: Die cDNA-Sequenzen von γK322GeYFP (a) und δK244GeYFP (b) in pcDNA3.1/Hygro+ wurden editiert, translatiert (untere Reihe) und mit den Konstrukten der 2. Generation als Referenz (untere Reihe) abgeglichen. Aminosäure-Übereinstimmungen sind mit Sternchen markiert. Der basische Lysin-Rest zu Beginn der Linker-Sequenz wurde erfolgreich gegen einen Glyzin-Rest ausgetauscht (↑).

D.3.2.2 Transfektion der Konstrukte der 3. Generation

Die Transfektionseffizienz und Toxizität der neuen Konstrukte wurde analog denen der 1. und 2. Generation in HMC-1 Mastzellen untersucht (s. D.2.2 und D.3.1.2).

Die mittlere Transfektionsrate von γ K322GeYFP war mit $19 \pm 3\%$ ($n = 6$) etwas niedriger als die des γ -Konstrukts der 2. Generation ($26 \pm 3\%$) und somit ähnlich dem der 1. Generation ($20 \pm 2\%$). Die Transfektionsrate von δ K244GeYFP war dagegen mit $12 \pm 2\%$ ($n = 5$) deutlich niedriger als die der 1. und 2. Generation ($20 \pm 2\%$ bzw. $21 \pm 3\%$). Die mittlere Effizienz der Kontrolltransfektionen mit eYFP erreichte das Niveau vorausgegangener Versuchsreihen. Der Anteil toter Zellen lag mit je 8% erneut unter 10%.

Ein deutlicher Effekt der Entfernung des Lysin-Rests auf die Transfektionseffizienz in HMC-1 Zellen ist somit nur für das δ -Konstrukt der 3. Generation erkennbar.

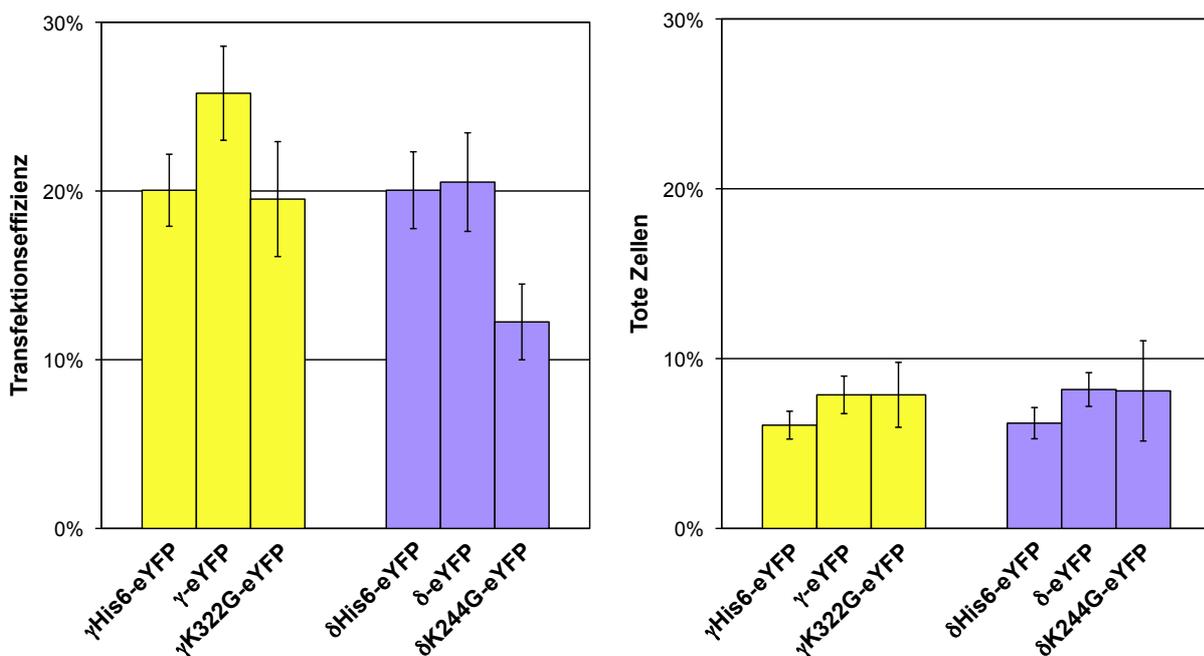


Abb. D-23: Vergleich der durchschnittlichen Transfektionsrate und des Anteils toter Zellen von HMC-1 nach transientser Transfektion mit den Tryptase- γ - und - δ -Fluoreszenzprotein-Konstrukten der 1. und 2. Generation mit bzw. ohne His6-Linker ($n = 15-16$) sowie der 3. Generation ($n = 5$) mit dem Lysin/Glyzin-Austausch in der Linker-Sequenz (Mittelwert \pm SEM).

D.3.2.3 Immunoblot-Analyse der Konstrukte der 3. Generation

Analog den vorausgehenden Versuchen wurden HMC-1 Zellen mit γ K322GeYFP und δ K244GeYFP sowie den Plasmiden der 1. und 2. Generation transfiziert und die Expression mittels Immunoblot mit dem Anti-GFP-Ak analysiert (s. D.2.5).

Die Banden der Fusionsproteine der 1. Generation mit vollständigem His6-Linker sind bei ~67 kDa (γ His6eYFP) bzw. ~57 kDa (δ His6eYFP) sichtbar. Die Fusionsproteine der 2. Generation sowie die sich nur durch eine Aminosäure unterscheidenden Konstrukte der 3. Generation haben eine um ~2 kDa geringere Masse.

Die Fusionsproteine der 3. Generation werden – wie auch die der anderen Generationen – im Bereich des Linkers gespalten. Trotz der Entfernung des Lysin-Rests ist die Spaltung bei γ K322GeYFP mit 34% ausgeprägter als in den Konstrukten der 2. Generation (13%), aber immer noch geringer als bei der 1. Generation (65%). Die Prozessierung der δ -Konstrukte der 2. und 3. Generation ist dagegen unverändert (14% und 12% bei δ eYFP bzw. δ K244GeYFP) und damit geringer ausgeprägt als bei dem δ -Konstrukt der 1. Generation (24%).

Insgesamt wurde durch die Mutagenese des Lysin-Rests und die damit verbundene Entfernung der verbleibenden tryptischen Schnittstelle im Linker keine wesentliche Reduktion der Fragmentierung beider Fusionsproteine erreicht. Daher muss davon ausgegangen werden, dass weitere tryptische Schnittstellen in der Umgebung der Linker-Sequenz existieren oder aber andere Proteasen an der Prozessierung beteiligt sind. Dafür spricht auch der Nachweis mehrerer eYFP-Fragment-Banden, die sich hinsichtlich Ihrer Massen nur geringfügig unterscheiden.

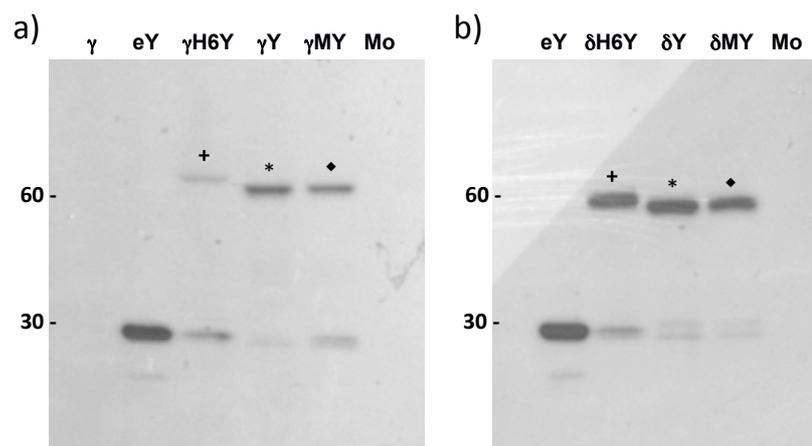


Abb. D-24: Immunoblot-Analyse der Tryptase-eYFP-Fusionsproteine der drei Generationen: Nachweis der eYFP-Komponente der γ -Fusionsproteine (a) und der δ -Fusionsproteine (b) im Zelllysat transient transfizierter HMC-1 Mastzellen (2×10^5 c/Lane; Transfektionsraten zwischen 8,9% für δ K244GeYFP und 43,7% für eYFP). Die Tryptase-Fusionsproteine der 1. Generation (+) besitzen eine größere Masse als die entsprechenden Fusionsproteine der 2. (*) und 3. Generation (\blacklozenge). In allen Spuren mit Fusionskonstrukten sind zum Teil zwei eYFP-Fragment-Banden zu erkennen.

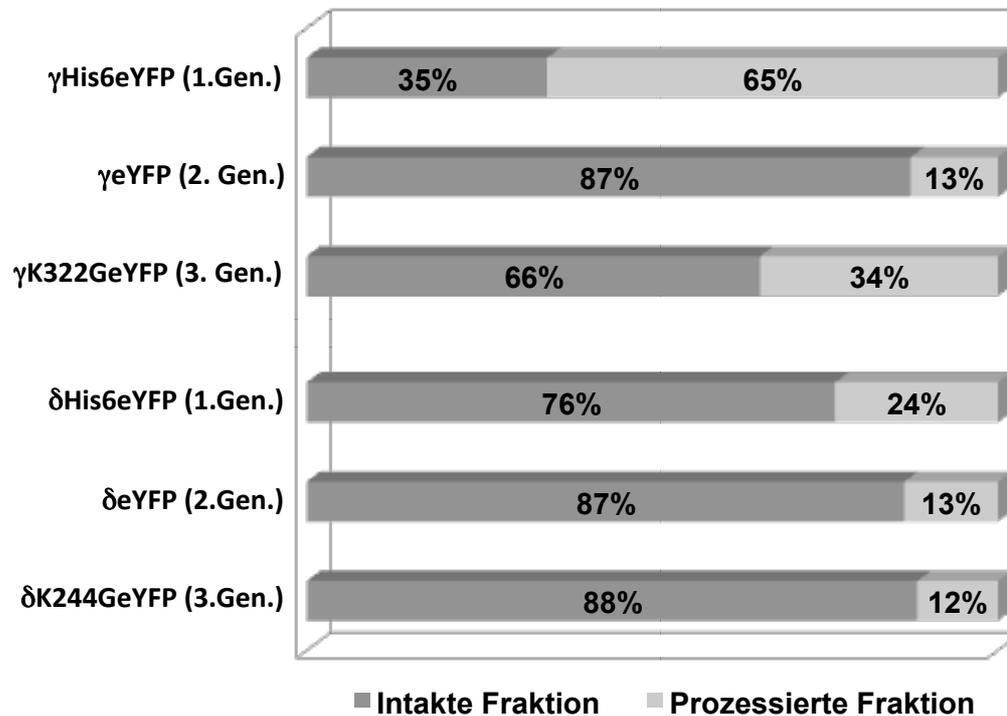


Abb. D-25: Ermittlung der Protein-Spaltungsrate durch Densitometrie: Die Stärken der in Abb. D-24 dargestellten Banden des intakten sowie gespaltenen Proteins aller Transfektionsansätze wurde mittels Densitometrie quantifiziert und ihr Verhältnis zueinander dargestellt.

D.4 Tryptase- α - und - β -Konstrukte

Um die Tryptasen γ und δ mit den wesentlich besser charakterisierten Tryptasen α und β vergleichen zu können, wurden auch für diese Tryptasen eYFP-Fusionskonstrukte hergestellt. Die cDNAs der Präpro-Enzyme von Tryptase α_1 und β_2 lagen bereits mit den Restriktionsschnittstellen NheI und HindIII im Plasmid pcDNA3.1/Zeo vor. Sie wurden nach dem „Baukastensystem“ durch Restriktionsverdau (s. C.2.4.6) und ‘Sticky-End-Ligation’ in die ‘Multiple Cloning Site’ des entsprechend linearisierten Plasmids pcDNA3.1/eYFP/Hygro+ eingefügt (s. C.2.4.8). Der prinzipielle Aufbau der so entstandenen Plasmidvektoren α_1 - und β_2 eYFP entspricht dem der γ - und δ -Konstrukte der 2. Generation mit nur noch einer basischen Aminosäure in der minimalen Linker-Sequenz (s. Abb. D-26). Sie werden im Folgenden α eYFP und β eYFP genannt.

Die α - und β eYFP-Plasmide wurden in *E. coli* TOP10F’ amplifiziert (s. C.2.4.2 und C.2.4.3), aufgereinigt (s. C.2.4.4) und der korrekte Aufbau durch Sequenzierung (s. C.2.4.9) bestätigt (s. Abb. D-27 und Abb. D-28). Auch in diesem Fall wurden HMC-1 Zellen wiederholt nach dem etablierten Protokoll mit den neuen Plasmiden

transient transfiziert und die Expression von α - und β eYFP mittels Flowzytometrie erfolgreich nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf der Experimente wurden beide Konstrukte zur stabilen Transfektion von HMC-1 eingesetzt und dienten als Positivkontrollen (s. D.5).

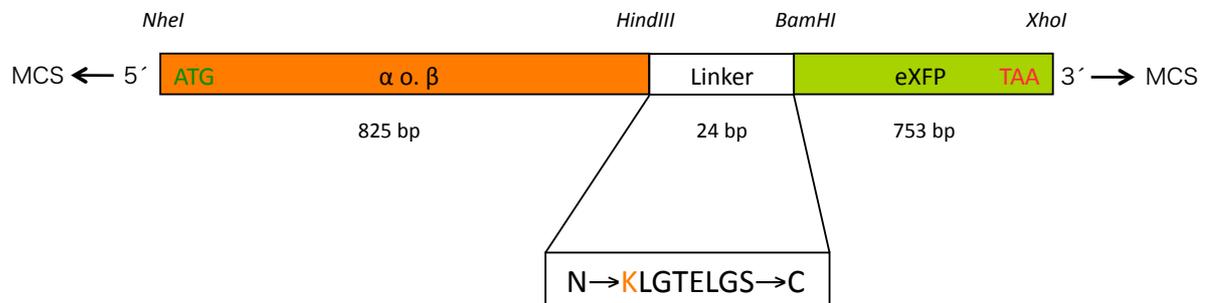


Abb. D-26: Schematische Darstellung der Tryptase- α/β -Fluoreszenzprotein-Fusionskonstrukte: Die Expressionsvektoren für die α - bzw. β -Tryptase-Fluoreszenzproteine enthalten einen minimalen Linker, der dem der 2. Generation der γ - bzw. δ -Tryptase-Konstrukte entspricht.

TPSA-eYFP	1	-----MLSLLLLALPVLASRAYAAPAPVQALQQAGIVGGQEAPRSKWPQVSLRVRDRY	54
Alph1eY_fw	-6	XXXXXXLSLLLALPVLASRAYAAPAPVQALQQAGIVGGQEAPRSKWPQVSLRVRDRY	54

TPSA-eYFP	55	WMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCLGPDVKDLATLRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFY	114
Alph1eY_fw	55	WMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCLGPDVKDLATLRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFY	114

TPSA-eYFP	115	IIQTGADIALLEEELPVNISSRVHTVMLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNDEPLPPFP	174
Alph1eY_fw	115	IIQTGADIALLEEELPVNISSRVHTVMLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNDEPLPPFP	174

TPSA-eYFP	175	LKQVKVPI MENHICDAKYHLGAYTGDDVRIIRDMLCAGNSQRDSCKGDSGGPLVCKVNG	234
Alph1eY_fw	175	LKQVKVPI MENHICDAKYHLGAYTGDDVRIIRDMLCAGNSQRDSCKGDSGGPLVCKVNG	234

TPSA-eYFP	235	TWLQAGVVS WDEGCAQPNRPGIYTRVYYLDWIHHYVPKKP-----MVSKGEELFTG	286
Alph1eY_fw	235	TWLQAGVVS WDEGCAQPNRPGIYTRVYYLDWIHHYVPKKPKLGTTELGS MVSKGEELFTG	394

TPSA-eYFP	287	VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQC	346
Alph1eY_fw	295	VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQC	354

TPSA-eYFP	347	FARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF	406
Alph1eY_fw	355	FARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF	414

TPSA-eYFP	407	KEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD	466
Alph1eY_fw	415	KEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD	474

TPSA-eYFP	467	GPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFEVTAAGITLGMDELYK*----	515
Alph1eY_fw	475	GPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFEVTAAGITLGMDELYK*LESX	527

Abb. D-27: Sequenzierung des Tryptase- α -Fusionskonstrukts α eYFP: Die cDNA-Sequenzen des 1582 bp langen α -Konstrukts wurden editiert, translatiert (untere Reihe) und mit den kombinierten Referenzsequenzen der Tryptase α (hier als TPSA bezeichnet) und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Aminosäure-Übereinstimmungen sind mit Sternchen markiert. Die N-terminale Prä-Pro-Sequenz ist grau, der Linker schwarz unterlegt.

ERGEBNISSE

```
TPSB2-eYFP 1 -----MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPY 54
Beta2eY_fw -6 XXXXXXXLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPY 64
*****

TPSB2-eYFP 55 WMHFCGGS LIHPQWVL TAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSR IIVHPQFY 114
Beta2eY_fw 55 WMHFCGGS LIHPQWVL TAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSR IIVHPQFY 114
*****

TPSB2-eYFP 115 TAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPFP 174
Beta2eY_fw 115 TAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPFP 174
*****

TPSB2-eYFP 175 LKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVIRVDDMLCAGNTRRDSCQGDSSGGLVCKVNG 234
Beta2eY_fw 175 LKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVIRVDDMLCAGNTRRDSCQGDSSGGLVCKVNG 234
*****

TPSB2-eYFP 235 TWLQAGVVS WEGECAQPNRPGIYTRVTTYLDWIHHYVPKKP-----MVSKEELFTG 286
Beta2eY_fw 235 TWLQAGVVS WEGECAQPNRPGIYTRVTTYLDWIHHYVPKKP KLGTELGS MVSKEELFTG 394
*****

TPSB2-eYFP 287 VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWP TLVTTFGYGLQC 346
Beta2eY_fw 295 VVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWP TLVTTFGYGLQC 354
*****

TPSB2-eYFP 347 FARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF 406
Beta2eY_fw 355 FARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF 414
*****

TPSB2-eYFP 407 KEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD 466
Beta2eY_fw 415 KEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD 474
*****

TPSB2-eYFP 467 GPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLL EFTVTAAGITLGMDELYK*---- 514
Beta2eY_fw 475 GPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLL EFTVTAAGITLGMDELYK*LESX 526
*****
```

Abb. D-28: Sequenzierung des Tryptase- β -Fusionskonstrukts β eYFP: Die cDNA-Sequenzen des 1582 bp langen β -Konstrukts wurden editiert, translatiert (untere Reihe) und mit den kombinierten Referenzsequenzen von TPSB2 und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Aminosäure-Übereinstimmungen sind mit Sternchen markiert. Die N-terminale Prä-Pro-Sequenz ist grau, der Linker schwarz unterlegt.

D.5 Generierung stabiler HMC-1 Klone

Trotz akzeptabler Transfektionsraten der Tryptase-Fusionskonstrukte waren Umfang und Reproduzierbarkeit der Versuchsansätze durch die limitierte Zellzahl eines Transfektionsansatzes und die inhomogene Verteilung der Plasmide auf die Zellen eingeschränkt. Um außerdem den großen Zeit- und Materialaufwand der transienten Transfektion im Vorlauf zu weiteren Experimenten zu umgehen, wurden stabil mit den Tryptase-Fluoreszenzprotein-Konstrukten transfizierte HMC-1 Klone generiert.

D.5.1 Stabile Transfektion von HMC-1 Mastzellen

Im ersten Schritt zur Generierung stabiler Zellklone wurden HMC-1 Mastzellen mit allen bisher hergestellten Konstrukten (eYFP, den drei Generationen der γ - und δ -Plasmide sowie α - und β eYFP) transfiziert und unter antibiotischem Druck selektioniert. Erfolgreich transfizierte, überlebende Zellen, die die Plasmid-DNA stabil

in Ihr Genom integriert haben, wurden anschließend durch 'Limited Dilution' kloniert (s. C.2.3). Die so isolierten Klone wurden dann einer zweiten 'Limited Dilution' unterzogen, um den klonalen Ursprung sicher zu stellen. Mit Erreichen einer Kulturdichte zwischen 1×10^5 und 1×10^6 c/ml wurden Rückstellproben dieser zweifach klonierten HMC-1 Klone eingefroren und für die weitere Analytik in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Tryptase- γ - und Tryptase- δ -Fluoreszenz-Konstrukte aller drei Generationen sowie für eYFP konnte jeweils mindestens ein stabil transfizierter HMC-1 Klon isoliert werden. Zusätzlich wurde zu Vergleichszwecken jeweils ein Tryptase- β_2 -eYFP- und Tryptase- α_1 -eYFP-exprimierender HMC-1 Klon generiert (s. Tab. D-4).

D.5.2 Nachweis des klonalen Ursprungs stabiler HMC-1 Klone

Um die Abstammung der stabilen Klone aus einer einzigen Zelle zu überprüfen, wurde das Expressionsmuster des jeweiligen Konstrukts anhand des Fluoreszenzmusters im Flowzytometer untersucht. Zellen eines Klons besitzen in der Regel ein ähnliches Expressionsmuster; das Histogramm der Fluoreszenzintensitäten zeigt einen schmalen Peak. Nur Klone mit dieser Eigenschaft wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Kulturen, deren Fluoreszenzintensität mehrere Peaks oder eine breite Streuung aufwies, wurden als polyklonal bewertet und von weiteren Experimenten ausgeschlossen (s. Abb. D-29).

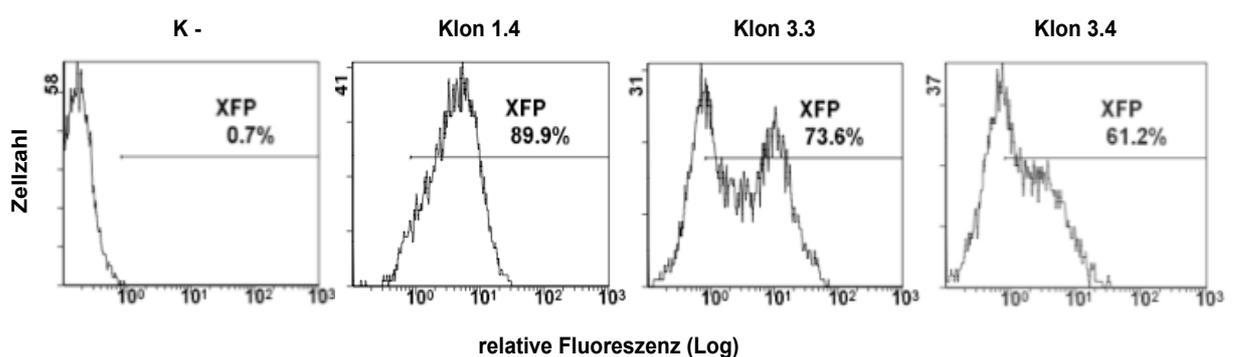


Abb. D-29: Fluoreszenzverteilung δ eYFP-exprimierender HMC-1 Klone (2. Gen.) im Vergleich: Nach zwei Passagen zeigt der Klon 1.4 einen Peak in der Fluoreszenzverteilung. Die zwei Peaks in der Analyse von Klon 3.3 sowie die inhomogene Fluoreszenzverteilung von Klon 3.4 lassen auf einen polyklonalen Ursprung der beiden Zellpopulationen schließen. Native HMC-1 als Negativkontrolle (K-); Passagedauer (P) = 7 Tage.

Um außerdem die stabile Expression der Tryptase-Fusionsproteine zu bestätigen, wurden alle stabilen Klone wiederholt ($n \geq 4$) bis zu 24 Passagen nach dem Auftauen (≈ 24 Wochen) im Flowzytometer auf ihr Fluoreszenzmuster hin untersucht. Alle Klone, die für weiterführende Untersuchungen verwendet wurden, zeigten dabei eine konstante Fluoreszenzintensitätsverteilung als Ausdruck gleichmäßiger Konstruktexpression (s. Abb. D-30). Auch der Anteil fluoreszierender Zellen und die mittlere Fluoreszenzintensität bleiben über die Zeit weitgehend unverändert (s. Tab. D-4).

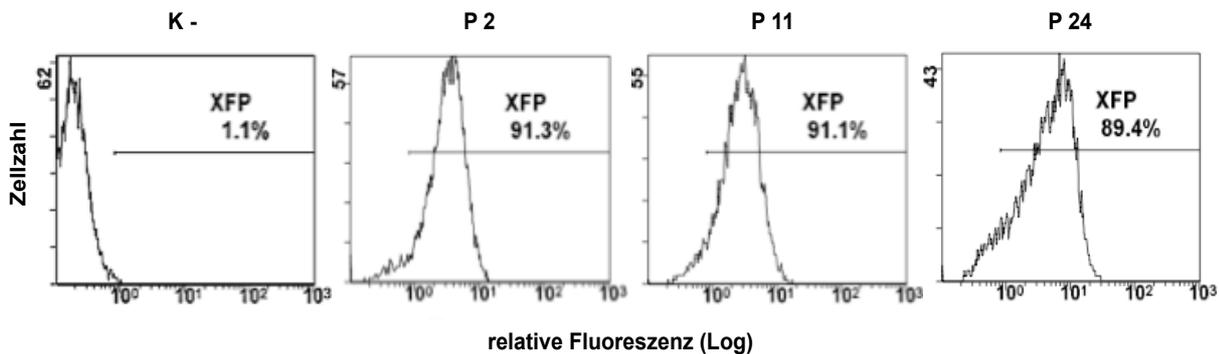


Abb. D-30: Fluoreszenzintensität des stabilen HMC-1 Klons γ eYFP6.1 (2. Gen.) im Verlauf der Kultur: Die Fluoreszenzintensität des Klons (10.000 Zellen) zeigt einen schmalen Peak als Ausdruck einer homogenen Proteinexpression, der auch nach 11 und 24 Passagen unverändert ist. Native HMC-1 als Negativkontrolle (K-); Passagedauer (P) = 7 Tage.

D.5.3 Charakterisierung der stabilen HMC-1 Klone mittels Flowzytometrie

Die Eigenschaften der stabilen Klone, d.h. der Anteil fluoreszierender und PI-positiver (toter) Zellen und ihre mittlere Fluoreszenzintensität, wurden mittels wiederholter Flowzytometer-Analysen bestimmt. Der eYFP-Klon (B8) zeigt die höchste mittlere Fluoreszenzintensität (248 ± 45 RFU); der Anteil der eYFP-positiven Zellen liegt hier bei 100% (s. Tab. D-4). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Tryptase-Fluoreszenzprotein-exprimierenden Klone liegen mit 3,2 bis 7,0 RFU deutlich niedriger. Da die Fluoreszenzintensität der Zellen zum Teil unter der Nachweisgrenze des Flowzytometers liegt (s. Abb. D-30), wird bei allen Fusionsprotein-exprimierenden Klonen der Anteil fluoreszierender Zellen als $<100\%$ berechnet. Auffällig ist, dass die mittlere Fluoreszenzintensität aller sechs Tryptase- γ -Klone (4,3 – 7,0 RFU) die der drei Tryptase- δ -Klone übertrifft. Die Expressionsintensität des α_1 eYFP- bzw. des β_2 eYFP-exprimierenden Klons entspricht dem der δ -Klone.

HMC-1 Klon	Konstrukt-generation	Anteil fluoreszierend (%; n = 4-5)	Mittlere Fluoreszenzintensität (RFU; n = 4-5)	Anteil tot (%; n = 4-5)
eYFP (B8)	---	99 ± 1	247 ± 45	3 ± 0,7
γHis6eYFP2.2	γ1	86 ± 2	4,3 ± 0,2	6 ± 0,7
γHis6eYFP2.5		94 ± 1	7,0 ± 0,8	2 ± 0,3
γeYFP6.1	γ2	93 ± 2	5,2 ± 0,6	1 ± 0,1
γK322GeYFP11.1	γ3	83 ± 6	4,5 ± 0,4	3 ± 0,6
γK322GeYFP13.1		87 ± 3	5,6 ± 0,6	2 ± 0,3
γK322GeYFP15.1		86 ± 3	6,0 ± 0,4	3 ± 0,5
δHis6eYFP1.1	δ1	80 ± 6	3,2 ± 0,5	2 ± 0,2
δeYFP1.4	δ2	81 ± 4	3,8 ± 0,6	3 ± 0,6
δK244GeYFP8.1	δ3	73 ± 4	3,8 ± 0,7	3 ± 0,6
αeYFP(D11F4)	α(2)	83 ± 4	3,8 ± 0,2	3 ± 0,9
βeYFP(D10B8)	β(2)	92 ± 3	4,6 ± 0,6	2 ± 0,5

Tab. D-4: Charakterisierung und Vergleich stabiler HMC-1 Klone durch Flowzytometrie: Die Fluoreszenzeigenschaften und die Viabilität aller stabil mit den Tryptase-Fluoreszenzprotein-Konstrukten transfizierten Klone wurden in mindestens vier unterschiedlichen Passagen analysiert (Darstellung als Mittelwerte ± SEM).

Unter allen Klonen lag der Anteil toter Zellen mit Werten zwischen 2% und 6% niedriger als nach transienter Transfektion der entsprechenden Konstrukte. Trotz dauerhafter Überexpression ist der zytotoxische Effekt der Tryptase-Fluoreszenzproteine auf die HMC-1 Mastzelle also gering (vgl. D.3.2.2).

Insgesamt weist die Flowzytometeranalyse die dauerhafte und gleichmäßige Expression der Tryptase-Fluoreszenzproteine aller Generationen in HMC-1 Mastzellklonen ohne erhöhte Toxizität nach. Unterschiede in der Stärke des Fluoreszenzsignals scheinen nicht zufällig verteilt und können von Expression, Abbau oder Sekretion der Fusionsproteine abhängig sein.

D.5.4 Prozessierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine in HMC-1 Klonen

Im nächsten Schritt wurde ermittelt, welchen Einfluss die dauerhafte Überexpression auf die Stabilität der Tryptase-Fusionsproteine besitzt. Analog zum Vorgehen nach

transienter Transfektion (s. z.B. D.2.5) wurde die Proteinexpression der HMC-1 Klone untersucht.

In den Tryptase- γ -Fluoreszenzprotein-exprimierenden HMC-1 Klonen aller drei Generationen wurden die intakten Fusionsproteine mit den bekannten Massenverhältnissen nachgewiesen. Alle Klonen weisen YFP-Fragmente als Zeichen der posttranslationalen Prozessierung auf. Im Gegensatz zur transienten Transfektion detektierte der eYFP-Ak in allen Klonen ein weiteres Spaltfragment mit einer Masse zwischen 30 und 40 kDa. Da dieses Fragment in der 1. Generation (langer His6-Linker) auch größer ausfällt, muss es aus der eYFP- und der Linker-Sequenz sowie einem C-terminalen Anteil der Tryptase- γ -Sequenz bestehen (s. Abb. D-31). Das neue Fragment macht in allen Klonen zwischen 4% und 11% der Gesamtexpression aus und bildet damit – besonders in Klonen mit insgesamt niedriger Spaltungsrate – teilweise die größere prozessierte Fraktion.

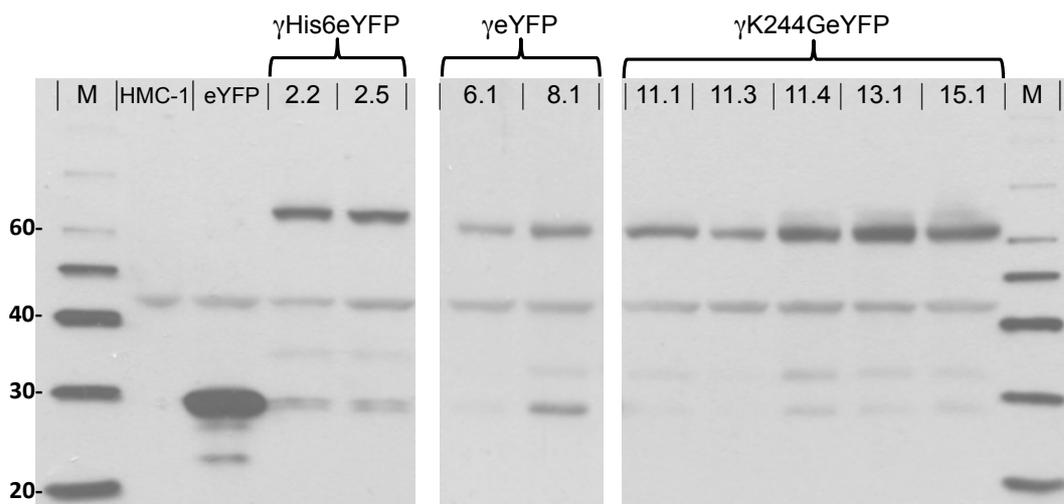


Abb. D-31: Immunoblot-Analyse der stabilen Expression der γ eYFP-Fusionsproteine in HMC-1 Mastzellen: Nachweis der Fusionsproteine im Lysat von jeweils 2×10^5 Zellen mittels eYFP-Ak. Die γ -Fusionsproteine der 1. Generation mit His6-Linker besitzen eine größere Masse als die der 2. und 3. Generation. Die Spaltung im Linker-Bereich aller Fusionsproteine ist anhand von eYFP-Fragmentbanden zu erkennen. Alle Klone bringen außerdem eine weitere Spaltproduktbande hervor, deren Masse dem eYFP-Segment inklusive der Transmembrandomäne der γ -Tryptase entspricht. β -Actin-Ladungskontrolle bei ~ 48 kDa.

Das allgemeine Ausmaß der Spaltung lag – unter Berücksichtigung beider Spaltproduktbanden – in den meisten Klonen niedriger als bei der transienten Transfektion (vgl. D.3.2.3). Die Klone der 3. Generation ohne basische Aminosäuren im Linker zeigten zum größten Teil Gesamtsplaltungsraten unter 10%. In den Klonen

der instabileren 1. Generation lag der Anteil gespaltenen γ -Fusionsproteins mit 36% bzw. 27% erwartungsgemäß deutlich höher. Als Ausnahme bot der Klon γ eYFP6.1 der 2. Generation die größte prozessierte Fraktion, die damit auch die durchschnittliche Spaltungsrate der 2. Generation nach transienter Transfektion übersteigt (s. Abb. D-32).

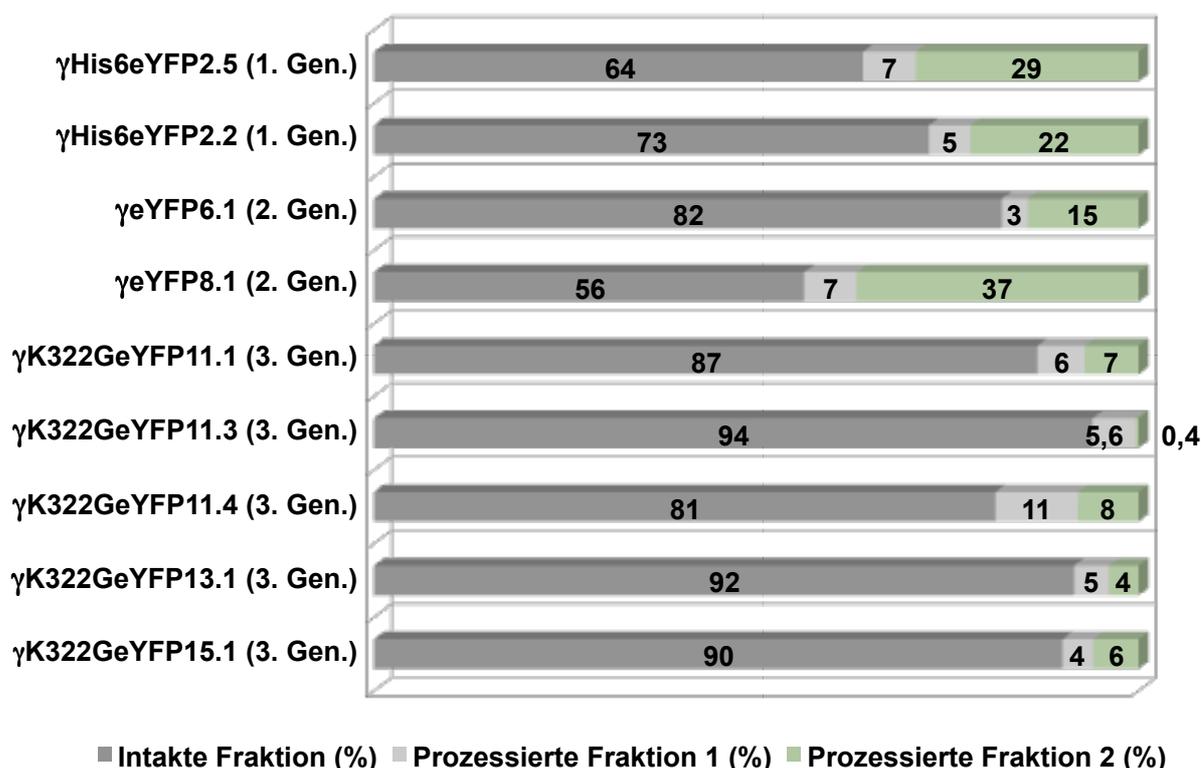


Abb. D-32: Ermittlung der Protein-Spaltungsrate durch Densitometrie: Die Dichte der in Abb. D-31 dargestellten Banden intakten und gespaltenen Tryptase γ -Fusionsproteins aller Klone wurde mittels Densitometrie quantifiziert und im Verhältnis zueinander dargestellt. Die geringste Fraktion gespaltenen Proteins zeigt der Klon „ γ K322GeYFP11.3“ der 3. Generation. Das neu aufgetretene, größere Spaltprodukt (prozessierte Fraktion 1) nimmt zwischen 4 und 11% der Gesamtexpression ein.

Wie schon nach der transienten Transfektion sind die intakten δ -Fluoreszenzproteine mit Massen von ~55 - 57 kDa nachweisbar.

Spaltproduktbanden sind mit bloßem Auge nur in den Klonen der 1. Generation deutlich sichtbar, während die Spaltung in den anderen Klonen nur mittels Bildverarbeitungsprogramm detektierbar ist. Die höchste Spaltungsrate besitzt der Klon δ His6eYFP2.3 (19%); die Spaltungsraten der anderen Klone liegen Generationen übergreifend zwischen 2% und 7% und somit deutlich niedriger als nach transienter Transfektion (vgl. z.B D.3.2.3).

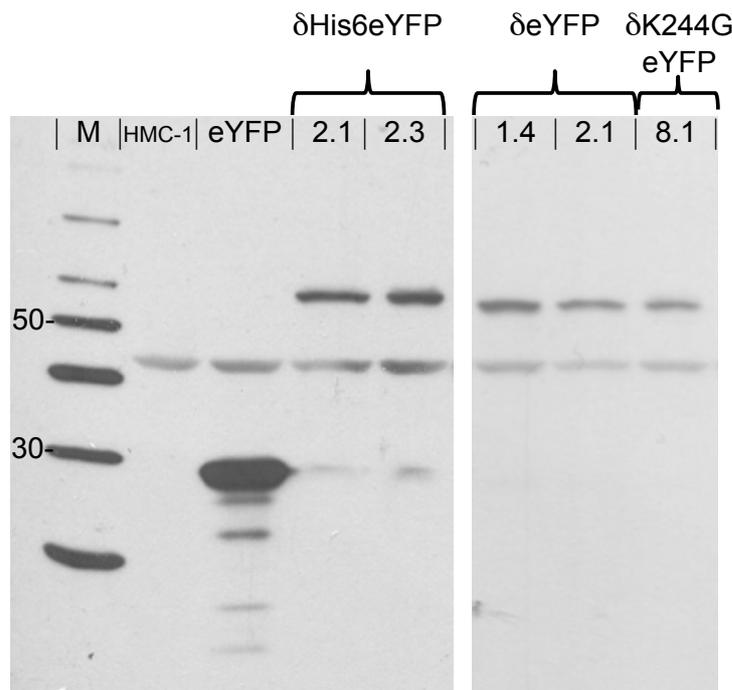


Abb. D-33: Immunoblot-Analyse der stabilen Expression aller δ - eYFP-Fusionsproteine in HMC-1 Mastzellen: Nachweis der Fusionsproteine im Lysat von jeweils 2×10^5 Zellen mittels eYFP-Ak. Die δ -Fusionsproteine der 1. Generation mit His6-Linker besitzen eine größere Masse als die der 2. und 3. Generation und zeigen eYFP-Spaltproduktbanden. β -Actin-Ladungskontrolle bei ~ 48 kDa.

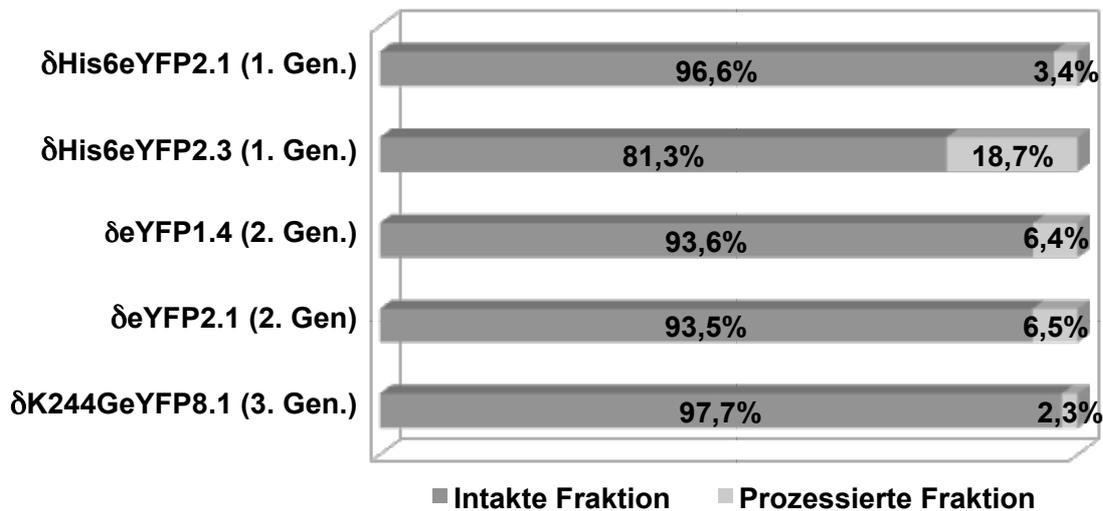


Abb. D-34: Ermittlung der Protein-Spaltungsrate durch Densitometrie: Die Dichten der in Abb. D-33 dargestellten Banden der intakten sowie gespaltenen Tryptase-Fusionsproteine aller Klone wurden mittels Densitometrie quantifiziert und im Verhältnis zueinander dargestellt.

In den als Kontrollen generierten Klonen, die Tryptase- α -YFP und Tryptase- β -YFP exprimieren, wurde eine starke Überexpression der Fusionsproteine mit einer Masse von ~ 59 kDa detektiert. Obwohl diese Konstrukte analog denen der 2. Generation der δ - und γ -Fluoreszenzproteine aufgebaut sind, mit kurzem Linker-Anteil und nur einer basischen Aminosäure als potentieller Tryptase-Schnittstelle, werden über 70% der exprimierten Proteine prozessiert.

D.5.5 Lokalisierung der stabil exprimierten Tryptase-Fusionsproteine durch konfokale Mikroskopie

Zur Beurteilung und Lokalisierung der Tryptase-Fusionsproteine wurden stabile HMC-1 Klone im Vergleich mit nativen HMC-1 mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. Während der Aufnahmen waren die Zellen bei 37°C in Kulturmedium suspendiert. Zur weiteren morphologischen Differenzierung und Beurteilung der Zellviabilität wurden die Zellkerne bei einigen Untersuchungen mit dem Kernfarbstoff Hoechst #33342 angefärbt.

D.5.5.1 Native HMC-1 Mastzellen

Native HMC-1 Mastzellen zeigen in starker Vergrößerung ihre typische Morphologie mit einem Zelldurchmesser von 10-15 μm sowie zahlreichen Vesikeln und Granula unterschiedlicher Größe im Zytoplasma. Die Zellmembran ist intakt. Unter Anregung mit Laserlicht sind die Zellkerne als ovale bis nierenförmige Strukturen in blauer Färbung zu erkennen. Eine Eigenfluoreszenz anderer Zellorganellen ist unter den gewählten Filtereinstellungen nicht detektierbar.

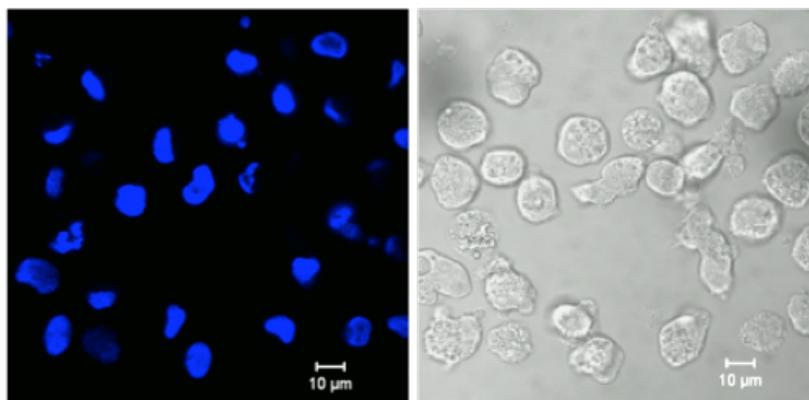


Abb. D-35: Native HMC-1 Mastzellen unter dem konfokalen Mikroskop: Kernfärbung mit Hoechst #33342 (links) neben lichtmikroskopischer Aufnahme.

D.5.5.2 eYFP-exprimierende HMC-1 Klone

Der eYFP-exprimierende Zellklon eYFP(B8) zeigt im Vergleich zu nativen HMC-1 Zellen eine weitgehend unveränderte Morphologie. Deutlich lässt sich ein gleichmäßiges, zytosolisches Fluoreszenzmuster detektieren, von dem sich die Granula der Zellen als dunkle Aussparungen abheben. Die prominenten Zellkerne zeichnen sich als dunkle Schatten mit schwacher Fluoreszenz ab, was für die Diffusion des eYFP in den Kern sprechen könnte.

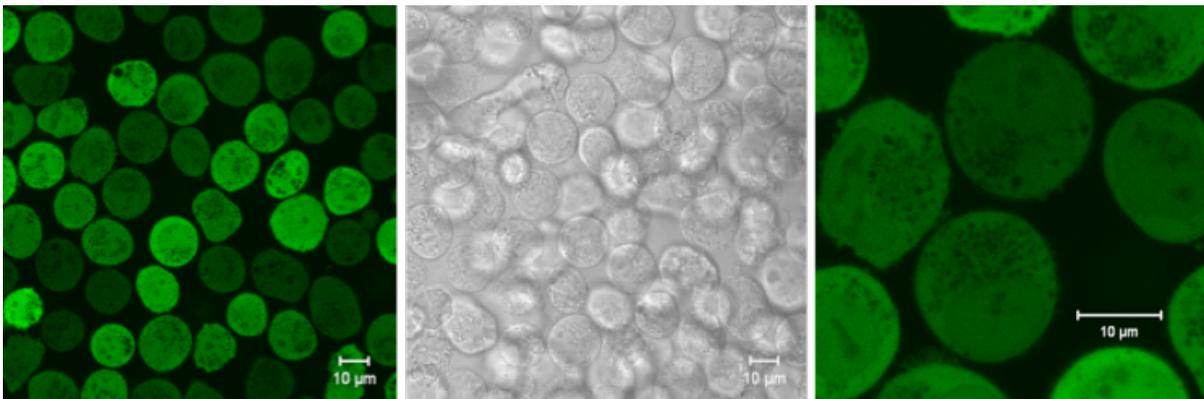


Abb. D-36: Konfokale Mikroskopie des stabilen HMC-1 Klon eYFP(B8): Lichtmikroskopische Aufnahme (Mitte) und Verteilung des eYFP-Signals in der Übersichts- (links) und Detailaufnahme (rechts). Auf eine gesonderte Darstellung der Zellkerne wurde aufgrund von Überlagerungseffekten verzichtet.

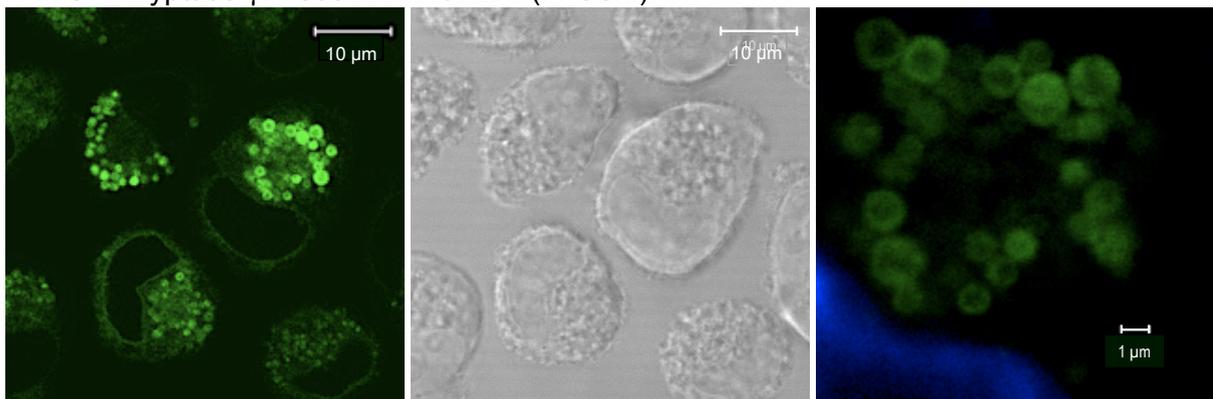
D.5.5.3 Tryptase- γ -Fluoreszenzprotein-exprimierende Klone

Morphologisch zeigt der Klon γ His6eYFP2.2 (1. Generation) eine auffällige Variabilität der Zellgröße mit häufigem Auftreten von besonders großen Zellen von über 20 μ m Durchmesser, die oft polygonal geformt sind. Die Binnenstruktur wirkt unter lichtmikroskopischer Betrachtung durch dicht gepackte, große Granula besonders unruhig. Das stärkste Fluoreszenzsignal konzentriert sich auf mehrere größere Granula jeweils auf einer Seite des randständigen Zellkerns. In mittlerer und starker Vergrößerung lässt sich in vielen Granula eine zentrale Abblassung der Fluoreszenz erkennen, welche auf eine Lokalisation der Fusionsproteine an der Membran der Granula hinweist. Zusätzlich verdichtet sich das Fluoreszenzsignal an der Kernmembran. Dies lässt auf eine zusätzliche Lokalisation des Fusionsproteins in der Kernmembran und/oder der Membran des aufliegenden rER schließen. Eine Konzentration des eYFP-Signals an der Zellmembran war nicht detektierbar.

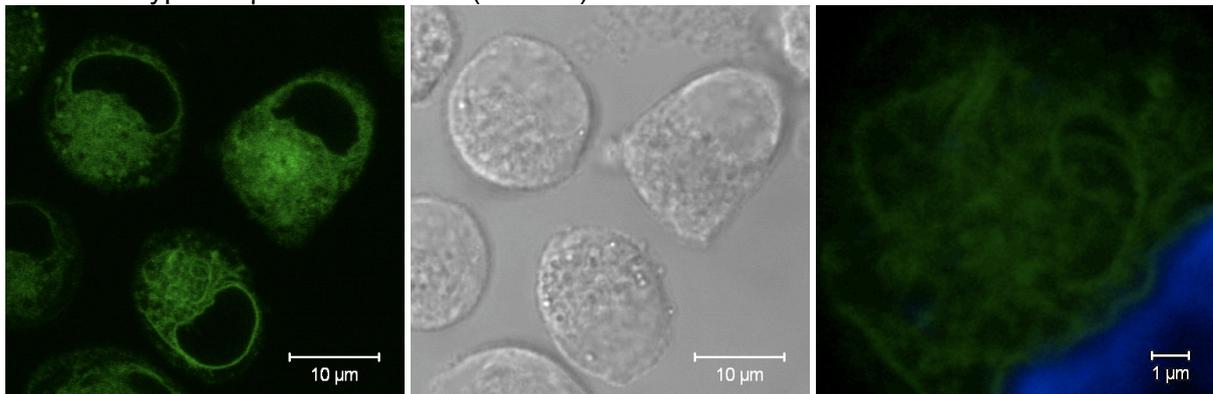
Der HMC-1 Klon γ eYFP6.1 (2. Generation) bietet im Gegensatz zu den Klonen der 1. Generation keine morphologischen Auffälligkeiten. Nur einzelne Zellen sind über die

Norm vergrößert oder lassen eine höhere Anzahl bzw. besonders große Granula erkennen. In den Fluoreszenzaufnahmen verteilt sich das eYFP-Signal auf eine Vielzahl kleiner Granula, was das Muster fast diffus erscheinen lässt. Allerdings wird bei genauerer Betrachtung eine Verteilung der Fluoreszenz entlang der Membran der Granula sowie anderer membranöser Strukturen (womöglich des Golgi-Apparats) deutlich. Wieder ist linear entlang der Kern- aber nicht der Zellmembran ein deutliches Fluoreszenzsignal detektierbar.

HMC-1/Tryptase- γ -His6eYFP Klon 2.2 (1. Gen.)



HMC-1/Tryptase- γ -eYFP Klon 6.1 (2. Gen.)



HMC-1/Tryptase- γ -K322GeYFP Klon 13.1 (3. Gen.)

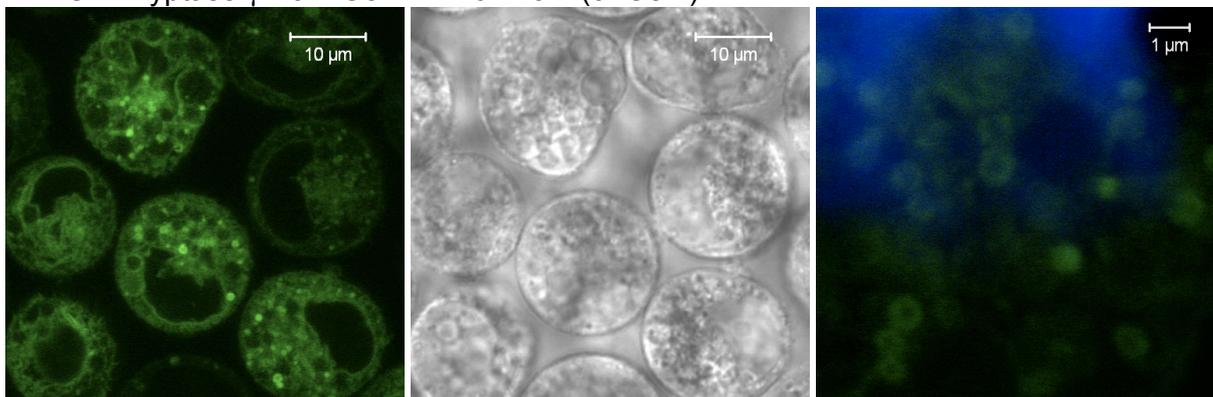


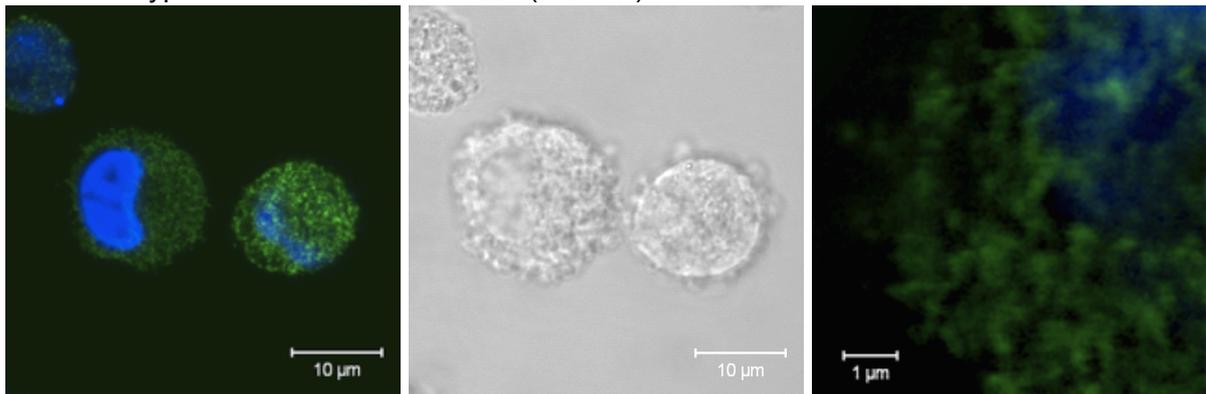
Abb. D-37: Konfokale Mikroskopie Tryptase- γ -eYFP-exprimierender HMC-1 Klone: Zellmorphologie in der lichtmikroskopischen Aufnahme (Mitte) und Verteilung des eYFP-Signals in der Übersichtsaufnahme (links) und Detailaufnahme (rechts) für jeweils einen stabil transfizierten HMC-1 Klon der 1. (obere Reihe), 2. (mittlere Reihe) und 3. Generation (untere Reihe). In den Übersichtsaufnahmen wurde zugunsten der Darstellbarkeit der Signalanreicherung entlang der Kernmembran auf die Kernfärbung in blau verzichtet.

Der Klon γ K322GeYFP13.1 (3. Generation) besteht, wie alle weiteren Klone seiner Generation, aus uniform wirkenden, auffällig großen Einzelzellen mit zahlreichen prominenten Granula. Letztere zeigen teils außergewöhnlich große Durchmesser von bis zu 5 μm . Das eYFP-Signal konzentriert sich erneut auf die Membran der Granula und den Randbereich des Zellkerns, weshalb auch in diesem Fall die Integration des Fusionsproteins in die Granulummembran über den „Membrananker“ der γ -Sequenz angenommen werden kann.

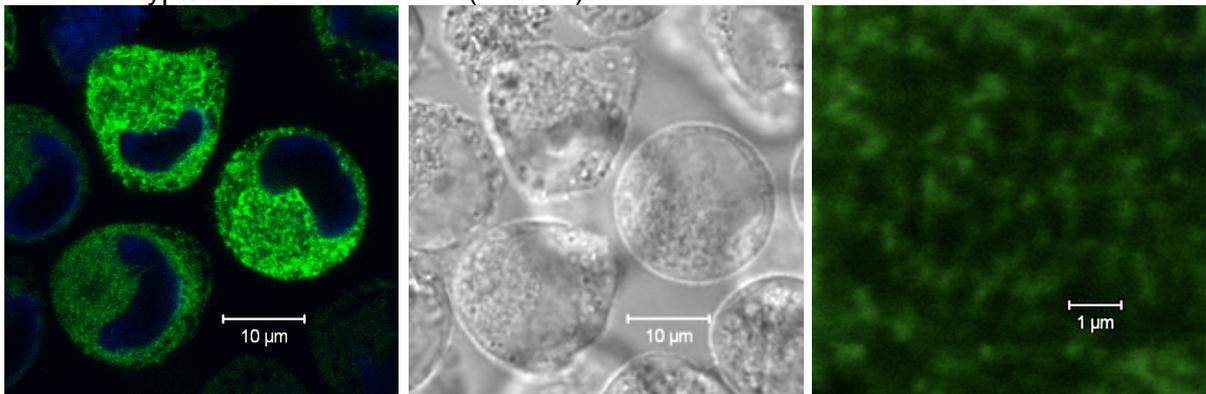
D.5.5.4 Tryptase- δ -Fluoreszenzprotein-exprimierende Klone

Die Beurteilung der Tryptase- δ -eYFP-exprimierenden HMC-1 Klone (δ His6eYFP2.1, δ eYFP1.4, δ K244GeYFP8.1) zeigt für alle Klone ein ähnliches Bild: Im Vergleich zu nativen HMC-1 ist die Morphologie weitgehend unverändert. Das Fluoreszenzmuster ist jeweils fein granulär strukturiert und streng auf das Zytoplasma beschränkt gleichmäßig in den Zellen verteilt. Die Granula der Zelle imponieren als dunkle Aussparungen. Eine Färbung von Kern-, Zell- oder Granulummembran ist nicht erkennbar. Die Zellkerne sind wiederum scharf in blauer Färbung vom eYFP-Signal abgrenzbar. Eine Speicherung der δ -Fluoreszenzproteine der drei Generationen in den Mastzellgranula ist damit unwahrscheinlich. Das Protein ist nicht wie eYFP homogen im Zytoplasma verteilt, sondern in kleinen Clustern an anderen zytoplasmatischen Strukturen lokalisiert, deren Identität unklar ist.

HMC-1/Tryptase- δ -His6eYFP Klon 2.1 (1. Gen.)



HMC-1/Tryptase- δ -eYFP Klon 1.4 (2. Gen.)



HMC-1/Tryptase- δ -K244GeYFP Klon 8.1 (3. Gen.)

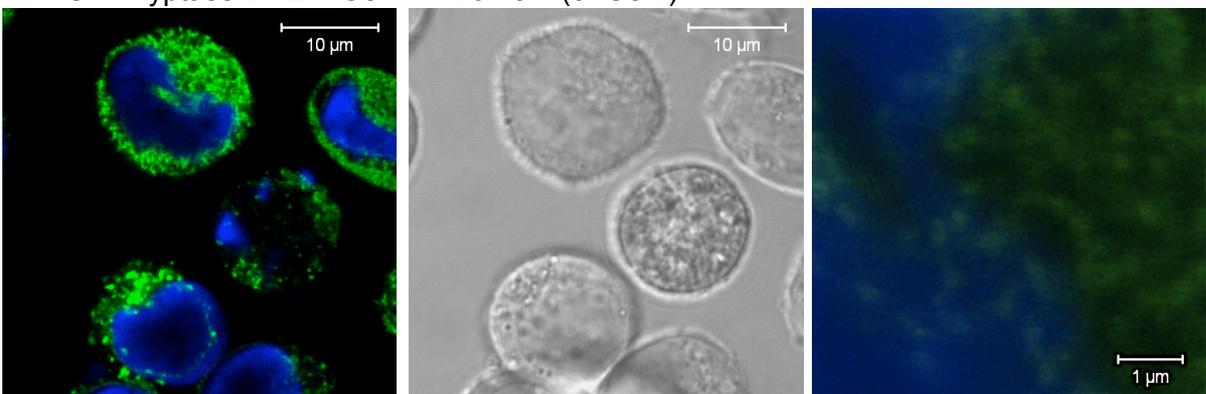


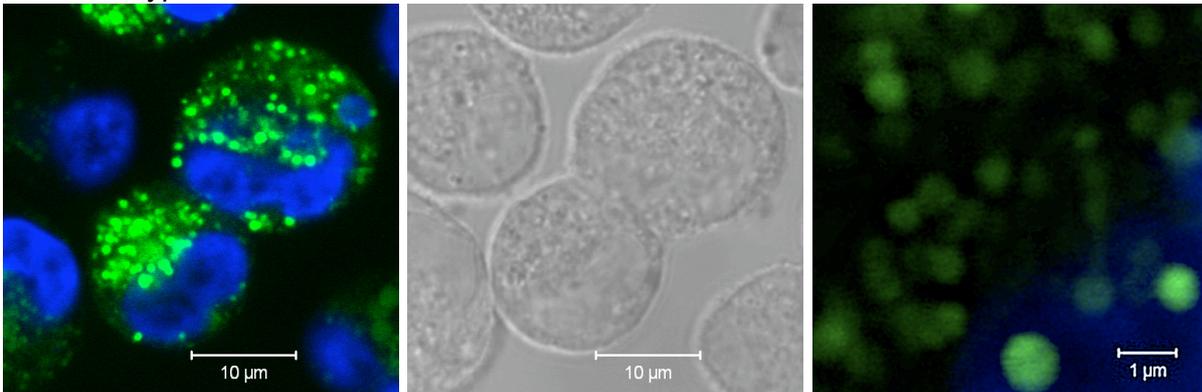
Abb. D-38: Konfokale Mikroskopie Tryptase- δ -eYFP-exprimierender HMC-1 Klone: Zellmorphologie in der lichtmikroskopischen Aufnahme (Mitte) und Verteilung des eYFP-Signals in der Übersichts- (links) und Detailaufnahme (rechts) für jeweils einen stabil transfizierten HMC-1 Klon der 1. (obere Reihe), 2. (mittlere Reihe) und 3. Generation (untere Reihe). Kernfärbung in blau.

D.5.5.5 Der Tryptase- α -eYFP- und der Tryptase- β -eYFP-exprimierende Klon

Die Morphologie der Zellen beider Klone unterscheidet sich von nativen HMC-1 nur durch eine Zunahme der Granulierung bei gleicher Zellgröße. Die Granula variieren in ihrer Größe nur leicht, imponieren im Vergleich zu den γ -Klonen deutlich kleiner und sind in beiden Klonen die Hauptlokalisation des Fluoreszenzsignals. Die am stärksten fluoreszierenden Granula konzentrieren sich oft auf der konvexen Seite des

nierenförmigen Zellkerns, der sich als vollständige Aussparung des eYFP-Signals in blauer Kernfärbung darstellt. Eine Affinität zu Membranstrukturen ist nicht erkennbar. Nur die Zellen des Tryptase- β -Klons enthalten vereinzelte Granula mit schwächerem Signal, die eine zentrale Abnahme der Fluoreszenz aufweisen.

HMC-1/Tryptase- α -eYFP Klon D11F4



HMC-1/Tryptase- β -eYFP Klon D10B8

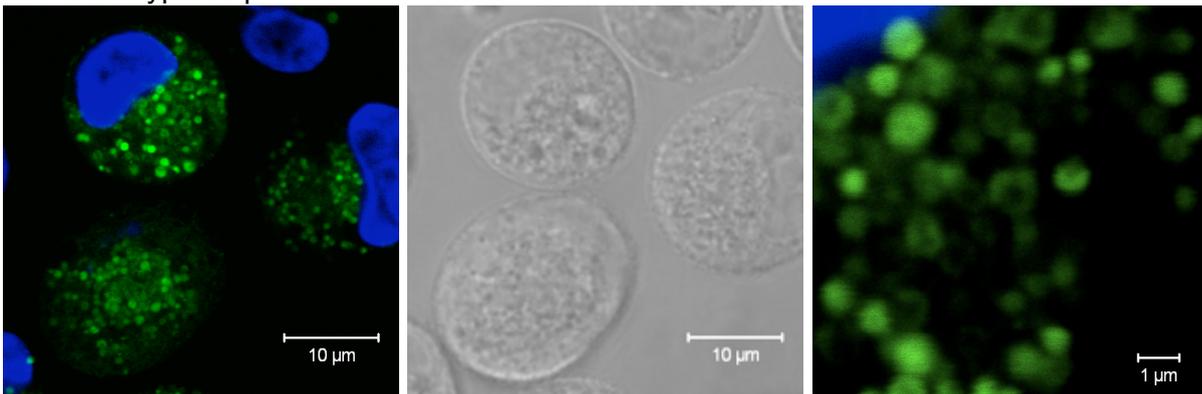


Abb. D-39: Konfokale Mikroskopie Tryptase- α -eYFP-exprimierender (obere Reihe) und Tryptase- β -eYFP-exprimierender (untere Reihe) HMC-1 Klone: Zellmorphologie in der lichtmikroskopischen Aufnahme (Mitte) und Verteilung des eYFP-Signals in der Übersichts- (links) und Detailaufnahme (rechts) jeweils eines stabil transfizierten HMC-1 Klons. Kernfärbung in blau.

E Diskussion

E.1 Nachweis von Trypsasen mittels Reportergenen

Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur Untersuchung der Lokalisierung und Prozessierung der Trypsasen γ und δ in Mastzellen zu entwickeln. Der in solchen Studien oft verwendete immunologische Nachweis erschien problematisch, da die vier beim Menschen bekannten Trypsasen (α , β , γ und δ) untereinander 48-92% Sequenzidentität zeigen. Deshalb konnten z.B. trotz intensiver Bemühungen bisher keine Antikörper generiert werden, die zwischen den Trypsasen α und β (92% Sequenzidentität) diskriminieren [35]. Auch der von Wang et al. als spezifisch bezeichnete Trypsase- δ -Antikörper muss kritisch gesehen werden, da die Sequenzidentität zwischen Trypsase δ und α bzw. β mit 82 % ebenfalls sehr groß ist [1]. Darüber hinaus werden die Trypsasen β (und α) in Mastzellen ausgesprochen stark exprimiert und in großen Mengen gespeichert, so dass ein falsch-positiver Nachweis auch bei niedriger Kreuzreaktivität der Antikörper zu erwarten ist.

Als alternativer Ansatz wurden cDNA-Konstrukte generiert, mit denen Trypsase γ bzw. δ in Fusion mit dem Reporter gen eYFP exprimiert wird. Als zusätzliche immunologische Detektionsmöglichkeit wurde ein His-6-Tag in die verbindende Linker-Sequenz integriert. Mit diesem Ansatz und dem eYFP-Tag wurde ein gut erprobtes Reporter-System gewählt. GFP und seine Derivate werden sehr häufig verwendet, um Proteine aller Art zu markieren, Zellorganellen zu lokalisieren und auch komplexe Vorgänge in Zellen (z.B. Aufbau des Zytoskeletts, Proteinsekretion, Membrantransport) *in vivo* zu beobachten [61]. Trotz der Größe des eYFP-Tags (251 Aminosäuren) bleiben Funktion und Lokalisation der markierten Proteine in der Regel erhalten [62]. Dieser Sachverhalt wird der stabilen Tertiärstruktur der eGFP-Derivate zugeschrieben [63]. Generell kann aber das „Trafficking“ des markierten Proteins in der Zelle gestört sein. Außerdem können die Fusionskonstrukte gespalten werden. Dabei scheint der Aufbau der Linker-Sequenz zwischen den beiden Untereinheiten der fusionierten Proteine eine Rolle zu spielen [64].

Alternative zur Markierung von Proteinen verwendete Tags wie Poly-His-, c-Myk- oder FLAG-Tags sind bedeutend kleiner und interferieren so potentiell weniger mit dem markierten Protein. Allerdings ist der Nachweis von intrazellulären Proteinen über diese Tags durch Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie in der Regel nur nach Fixierung möglich [65, 66]. Da aber Trypsasen in den Granula von Mastzellen

lokalisiert und die Prozessierung in lebenden Zellen verfolgt werden sollten, wurde eYFP als Reporter-gen bevorzugt. Andere Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in lebenden Zellen wie FIAsh- und ReAsH-Tag [67] haben auch den Nachteil, dass sie keine Detektion mittels Immunoblot erlauben.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fusionskonstrukte haben den Vorteil, dass sie nicht nur die Detektion und Lokalisation der markierten Tryptasen ermöglichen, sondern auch den Nachweis einer erfolgten Transfektion. Allerdings müssen die Stabilität der Fusionsprodukte und ggf. der Einfluss des Fluoreszenz-Tags auf die Funktion und die Lokalisation der markierten Tryptase kritisch geprüft werden.

E.2 Transfektion von HMC-1 Mastzellen

E.2.1 Etablierung der transienten Transfektion von Mastzellen

Primäre Kulturen von Mastzellen sind äußerst aufwändig, langwierig und kostspielig herzustellen und die Ausbeute ist niedrig und variabel. Daher wurde eine bereits etablierte Mastzelllinie als Zellmodell verwendet, da sie einfache und reproduzierbare Bedingungen zur Etablierung der Transfektion und anderer Methoden bietet [48] [59]. Die am besten charakterisierten humanen Mastzelllinien sind HMC-1 und LAD1 sowie LAD2 [56, 59, 68]. Die LAD1 und LAD2 Zellen sind deutlich differenzierter als HMC-1 und ähneln durch die stärkere Expression von Chymase und Tryptase sowie IgE- und IgG-Rezeptoren primären Mastzellen. Allerdings proliferieren sie nur in Gegenwart von Stammzellfaktor (SCF) und nur langsam mit einer Verdopplungsrate von bis zu drei Wochen. HMC-1 Zellen sind weniger differenziert, proliferieren aufgrund der Mutation des SCF-Rezeptors c-Kit aber SCF-unabhängig und mit einer Verdopplungszeit von nur zwei bis drei Tagen. Ebenfalls für die HMC-1 Zelllinie sprachen Berichte über ihre erfolgreiche Transfektion durch Specks et al. [69]; weitere Veröffentlichungen zu diesem Thema oder ein Protokoll wurden seit 1996 jedoch nicht publiziert.

Um die Transfektion der HMC-1 Mastzelllinie neu zu etablieren, wurden 15 Methoden der Lipofektion, Elektroporation und Kalziumphosphat-Transfektion zur Transfektion von HMC-1 mit dem Reporter-Gen-Vektor pcDNA3.1/eYFP verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lipofektion mit Lipofectamin 2000 mit einer durchschnittlichen Transfektionsrate von $45 \pm 5\%$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 12$) bei geringer Toxizität von $5 \pm 1\%$ und einer relativ großen absoluten Zahl transfizierter

Zellen am effizientesten ist (s. E.2.1). Im Verlauf der Untersuchungen wurde in ähnlicher Weise die Lipofektion von HMC-1 Mastzellen zur Expression der α -Untereinheit des $Fc\epsilon$ -Rezeptors unter Verwendung des Transfectin Lipid Reagent[®] von Xia et al. beschrieben. Protokolldetails oder Angaben zur Effizienz der Transfektion wurden jedoch nicht veröffentlicht [70].

E.2.2 Transiente Transfektion mit den Tryptase- γ - und δ -Fusionsprotein-Konstrukten

Nach der Etablierung der transienten Transfektion wurden HMC-1 Zellen auch mit den Tryptase- γ - und δ -Fusionskonstrukten mittels des optimierten Protokolls transfiziert. Dabei fiel auf, dass die Transfektionsraten mit $26 \pm 3\%$ bzw. $20 \pm 2\%$ für γ - bzw. δ His6eYFP deutlich niedriger liegen als mit eYFP alleine ($45 \pm 5\%$). Durch Analyse des Anteils toter HMC-1 Zellen und der Proliferationsrate konnten toxische und Wachstums-inhibierende Effekte der Fusionsproteine als Ursache für die niedrigeren Transfektionsraten weitgehend ausgeschlossen werden (s. Abb. D-8).

Zum Vergleich wurden deshalb weitere Zelllinien auf gleiche Weise transfiziert. Mit Jurkat Zellen konnten nur sehr niedrige Transfektionsraten von $< 3\%$ erzielt werden; sie wurden nicht für weitere Vergleiche herangezogen. Dagegen liegt der Anteil transfizierter Zellen in HEK-293-FTR Zellen für alle Plasmide höher als in HMC-1 (s. Abb. D-9). Welche Einflussgrößen, wie z.B. die räumliche Struktur der Plasmide ('Coiling') oder ihre Basenzusammensetzung, für die Effizienzunterschiede verantwortlich sind, bleibt unklar. Der Umstand, dass sich die Transfektionsraten in HMC-1 Zellen deutlicher unterscheiden als in HEK-293-FTR Zellen weist darauf hin, dass auch der biologische Kontext der Zielzelle eine Rolle für das Ergebnis der Transfektion spielt. Insgesamt betrachtet sind die Transfektionsraten aber ausreichend, um die Expression der Fusionsproteine durch Immunoblot und Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen (s. E.3).

E.2.3 Stabile Transfektion

Um die Variabilität einer repetitiven transienten Transfektion sowie um den Aufwand und die Kosten zu reduzieren, aber vor allem um reproduzierbare Bedingungen zu schaffen, wurden stabil mit den Tryptase-Fluoreszenzproteinen transfizierte HMC-1 Zellklone isoliert. Dies wurde durch 'Limited-Dilution'-Klonierung erreicht, eine Methode, die bereits 1996 von Specks et al. zur stabilen Expression der humanen

Protease 3 in HMC-1 Zellen angewandt wurde [69]. Xia et al. haben alternativ 'Fluorescence-Activated Cell Sorting' (FACS) verwendet, um nach transienter Transfektion eine HMC-1 Zellpopulation zu isolieren, die die α -Untereinheit des IgE-Rezeptors stabil exprimiert [70]. Dabei wird jedoch kein Zellklon im eigentlichen Sinne geschaffen, der die Abstammung einer genetisch einheitlichen Zellpopulation von einer einzelnen Zelle voraussetzt.

Durch 'Limited Dilution' wurden mehrere Zellklone isoliert, die jeweils ein Tryptase- γ - oder - δ -eYFP-Konstrukt bzw. die Kontrollkonstrukte eYFP, Tryptase- β -eYFP und Tryptase- α -eYFP exprimieren (s. D.5). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Klone unterlag über bis zu 24 Passagen hinweg nur geringfügigen Schwankungen als Ausdruck gleichbleibender Expression der Tryptase-Fluoreszenzproteine. Allgemein lag das Ausmaß der stabilen Expression gemessen als Fluoreszenzintensität jedoch deutlich unter den Werten nach transienter Transfektion. Die Fluoreszenzintensitäten der stabilen Klone bzw. Zellen unterschritten zum Teil sogar die für die transiente Transfektion von eYFP definierte Schwelle positiver Fluoreszenz. Deshalb lag der im Flowzytometer errechnete Anteil von fluoreszierenden Zellen oft unter 100% (s. Abb. D-30), obwohl alle Zellen das jeweilige Fusionsprotein exprimieren. Dass die Fluoreszenzemission im eYFP-exprimierenden Kontrollklon um das 80-fache höher liegt, während die der Tryptase- γ - bzw. der Tryptase- δ -eYFP-exprimierenden Klone alle auf dem selben niedrigen Niveau liegen (s. Tab. D-4), kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass ein höheres Maß an Expression der Fusionsproteine vermutlich das Zellwachstum inhibiert oder zytotoxisch wirkt. Entsprechend liegt die Toxizität in den meisten stabilen Klonen, trotz dauerhafter Überexpression der Fusionsproteine, stabil unter den vergleichbaren Werten nach transienter Transfektion (< 5 %).

Durch die Herstellung der stabilen Klone steht nun eine quasi unbegrenzte Anzahl Fusionsprotein-exprimierender HMC-1 Zellen für weitere Experimente zur Verfügung. Außerdem entfällt der ungünstige Einfluss des Transfektionsvorgangs auf die Viabilität und die Funktion der Mastzellen. Der Nachteil der Klonierung mittels 'Limited Dilution' liegt sicherlich im großen Zeitaufwand von ca. 2 Monaten, den die Herstellung jedes Klons bedeutet. Änderungen an den Fusionskonstrukten können deshalb nur eingeschränkt flexibel in die Experimente einfließen.

E.3 Analyse der Tryptase-Fluoreszenzproteine

E.3.1 Charakterisierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine

Bereits die ersten Versuche zur Lokalisierung der Fusionsproteine in HMC-1 mittels Fluoreszenzmikroskopie ergaben – besonders im Fall von Tryptase- γ -eYFP – durch die Detektion eines diffusen, zytosolischen Fluoreszenzsignals (s. D.2.4) Hinweise auf eine Spaltung der Fusionsproteine mit Freisetzung der im Zytosol löslichen eYFP Komponente. Um die Expression und die Stabilität der Tryptase-Fusionskonstrukte zu überprüfen, wurden die Lysate transient transfizierter HMC-1 Zellen unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Fusionsproteine bzw. die Fragmente mittels Westernblot mit eGFP- und Tryptase-Antikörpern detektiert. Dies geschah mit der Absicht, den Anteil einzelner Fragmente durch Densitometrie semiquantitativ zu bestimmen.

Alle Tryptase- γ - und - δ -Fluoreszenzproteine sowie eYFP werden mit der jeweils erwarteten Masse exprimiert. Die Fusionsproteine (der 1. Generation, s. E.3.2) werden jedoch in beträchtlichem Ausmaß gespalten ($67 \pm 6\%$ von γ His6eYFP und $38 \pm 6\%$ von δ His6eYFP). Die Massen der Spaltprodukte deuten darauf hin, dass sich die primäre Schnittstelle im Bereich des His6-Linkers zwischen den Tryptase- und den eYFP-Anteilen des Fusionsproteins befindet. Diese in den Konstrukten identische Linker-Sequenz enthält basische Aminosäurereste, die eine Fragmentierung durch Autokatalyse oder andere tryptische Proteasen ermöglichen [71, 72].

E.3.2 Stabilisierung der Tryptase-Fluoreszenzproteine durch Sequenz-optimierung

Die beiden potentiellen Schnittstellen, ein Arginin-Rest zwei Aminosäuren N-terminal der His6-Sequenz gelegen und ein Lysin-Rest am N-terminalen Ende der Linker-Sequenz (s. Abb. D-14), wurden sukzessive entfernt mit dem Ziel, die ungewollte Spaltung der Fusionsproteine nach transienter Transfektion zu reduzieren. Im ersten Schritt wurden durch Entfernung des Arginin-Rests mitsamt dem His-6-Linker die Tryptase-eYFP-Konstrukte der 2. Generation hergestellt. In einem zweiten Schritt wurde auch der Lysin-Rest mittels zielgerichteter Mutagenese durch einen Glycin-Rest ersetzt.

Die Optimierung der Konstrukte bewirkte eine deutliche Reduktion der durchschnittlichen Spaltungsraten bei beiden Fusionsproteinen (s. Abb. E-1). Im

DISKUSSION

Falle des δ -Fusionsproteins wurde in beiden Optimierungsschritten eine sukzessive Reduktion der prozessierten Fraktion um jeweils ca. 10 % bis auf $19 \pm 7\%$ (3. Generation; $n = 2$) erreicht. Dagegen wurde das γ -Fusionsprotein nur durch Entfernung des His-6-Linkers (2. Generation) deutlich stabilisiert und die Spaltungsrate von $67 \pm 6\%$ ($n = 6$) auf $21 \pm 5\%$ ($n = 6$) reduziert. Die 3. Generation des γ -eYFP, in der auch die zweite potentielle Schnittstelle eliminiert war, wird wieder etwas stärker gespalten ($31 \pm 6\%$ prozessiert; $n = 3$).

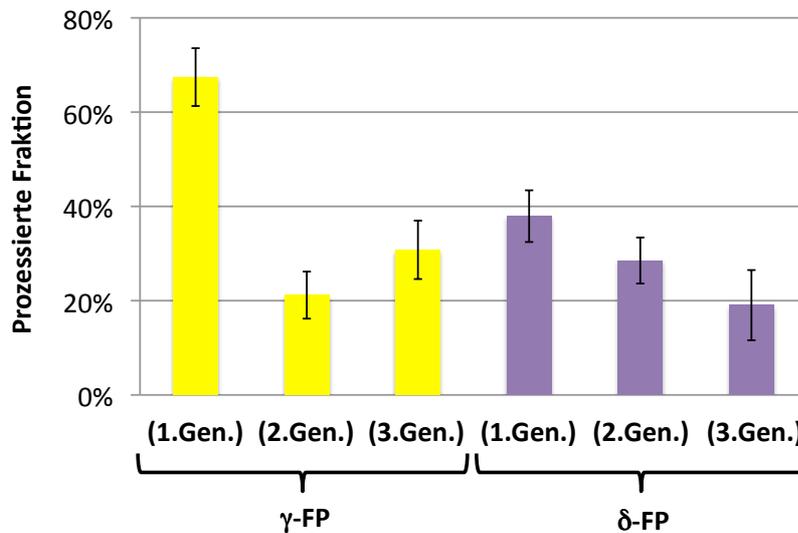


Abb. E-1: Vergleich der Spaltungsrate der δ - und γ -Konstrukte aller Generationen nach transienter Transfektion von HMC-1 (Mittelwert \pm SEM, $n=2-6$)

Damit waren die Maßnahmen zur Konstruktstabilisierung weitgehend erfolgreich. Allerdings werden weiterhin 20-30% der jeweils stabilsten γ - und δ -Fluoreszenzproteine gespalten. Eine ähnlich starke Prozessierung wurde auch in HEK-293-FTR Zellen festgestellt, die bis zur 2. Generation der Fusionsproteine als Kontrolle parallel transient transfiziert wurden. Hier liegt die Spaltungsrate für die Konstrukte auch in der 1. Generation (vor der Optimierung) mit rund 20% niedriger als in HMC-1 Zellen und ändert sich durch die Entfernung des His-6-Linkers nicht (s. Abb. D-18). Dieser Vergleich stützt einerseits die Vermutung, dass die von HMC-1 produzierten nativen Proteasen (wohl hauptsächlich Trypsin β), die in HEK-293-FTR Zellen nicht vorkommen, für die Spaltung der Fusionsproteine verantwortlich sind. Andererseits muss auch angenommen werden, dass weitere Proteasen mit nicht-tryptischer Aktivität an der Spaltung der Fusionsproteine beteiligt sind. Mit solchen Proteasen kommen die Fusionsproteine wahrscheinlich im Rahmen der Lipofektion in Kontakt, unter deren toxischem Einfluss es vermutlich vermehrt zur

Freisetzung von Proteasen aus den Granula und anderen Zellkompartimenten der HMC-1 kommen kann. Dies belegen die geringeren Spaltungsraten bei kontinuierlicher Expression der Tryptase-Fusionsproteine nach stabiler Transfektion von HMC-1 Zellen (s. D.5.4).

Trotz Optimierung war bei den γ - und δ -Fusionsproteinen ein Spaltfragment mit einer ähnlichen Masse wie die eYFP-Kontrolle nachweisbar, weshalb sich die verbleibende Spaltstelle ebenfalls in oder zumindest in der Nähe der kurzen Linker-Sequenz der Fusionsproteine befinden muss. Da sich im Falle der δ -Fusionsproteine der 2. und 3. Generation auf dem Immunoblot eine Aufteilung der eYFP-Spaltproduktbande in zwei einzelne Banden mit beinahe identischer Masse zeigte (s. Abb. D-24), muss die Existenz gleich mehrerer potentieller Schnittstellen in der Umgebung der kurzen Linker-Sequenz angenommen werden.

E.3.3 Expression der Tryptase-Fluoreszenzproteine in stabil transfizierten HMC-1 Mastzellen

Auch die stabil transfizierten HMC-1 Klone wurden mittels Immunoblotanalyse hinsichtlich der Expression der Tryptase-Fluoreszenzproteine untersucht. Abhängig vom jeweiligen Klon wurden unter dauerhafter Überexpression deutlich geringere Spaltungsraten nachgewiesen als nach transients Transfektion. In den meisten δ -Fluoreszenzprotein-exprimierenden Klonen werden nur zwischen 2% und 7% der exprimierten Fusionsproteine gespalten (s. Abb. D-34). Unter den γ -Klonen zeigen selbst die Klone, die die besonders instabilen Konstrukte der 1. Generation exprimieren, deutlich reduzierte Abspaltungsraten des eYFP von 22% bzw. 29% gegenüber 67 % nach transients Transfektion. Im Unterschied zur transients Transfektion sind die γ -Fluoreszenzproteine der 3. Generation die stabilsten mit den geringsten Fraktionen von eYFP-Fragmenten zwischen 1% und 8% (s. Abb. D-32).

Neben dem bereits erwähnten fehlenden toxischen Einfluss der Lipofektion auf die HMC-1 Zellen (s. E.3.2) trägt vermutlich auch das an der Fluoreszenzintensität gemessene, niedrigere Ausmaß der Überexpression der Fusionsproteine im Vergleich zur transients Transfektion zu den geringeren Spaltungsraten bei. Da alle isolierten Klone ein niedriges Expressionslevel an Tryptase-Fluoreszenzproteinen aufweisen, kann im Umkehrschluss gefolgert werden, dass eine stärkere Expression Stress für die HMC-1 Zelle bedeutet, verbunden mit verminderter Proliferationsfähigkeit, Zelluntergang und Freisetzung endogener Proteasen und so

vermutlich vermehrter Spaltung der Fusionsproteine. Dieser Stress entfällt durch die stabile Transfektion, so dass die Lokalisierung und Prozessierung der Tryptasen γ und δ nun unter stabilen reproduzierbaren Bedingungen und im Vergleich zwischen mehreren Klonen beobachtet werden können. Außerdem ist die (Co-)Transfektion der stabilen Klone mit anderen Tryptasefluoreszenzproteinen oder Zellaktivitätsmodulierenden Faktoren (z.B. RasGRP4) nun einfacher möglich.

E.3.4 Abspaltung der Transmembrandomäne der Tryptase γ

In allen stabil mit Tryptase- γ -eYFP-Fusionsprotein transfizierten Klonen war mittels eYFP-Ak ein weiteres Spaltfragment mit einer Masse von ca. ~35 kDa (1. Gen.) bzw. ~33 kDa (2. und 3. Gen.) nachweisbar (s. Abb. D-31). Die Fraktion liegt in den γ -Klonen maximal bei 11%, aber meist deutlich unter 10% der Gesamtexpression. Aufgrund seiner Masse muss das Fragment eYFP den Linker (mit His6-Sequenz in der 1. Gen.) und einen Teil der C-terminalen Tryptase- γ -Sequenz inklusive der Transmembrandomäne enthalten [73]. Die korrespondierende Proteaseschnittstelle lässt sich rechnerisch auf ca. 50 Aminosäurereste vor dem C-terminalen Ende der γ -Sequenz taxieren (s. Abb. E-2). Dort finden sich an Position 266 und 267 der Zymogen-Sequenz zwei Arginin-Reste, d.h. eine typische dibasische Prozessierungsstelle z.B. für Furin-ähnliche Proteasen [74]. Eine Spaltung an dieser Prozessierungsstelle führt zur Freisetzung der katalytischen Domäne, während der C-terminale Anteil in der Membran zurück bleibt. Der hier geführte experimentelle Nachweis des C-terminalen Sequenzanteils in Kombination mit eYFP in Zelllysaten belegt damit erstmals, dass die katalytische Domäne der Tryptase γ durch 'Shedding' freigesetzt wird, und zwar vermutlich durch Furin-ähnliche Proteasen.

264 N→WIRRHITASGGSESGYPRLPLLAGFFLPGLFLLLVSCVLLAKCLLHPSADGTPFPAPDGLGTELGS→C 329
 ↑↑
 266/267

Abb. E-2: Potentielle Tryptase-Schnittstelle im C-terminalen Abschnitt der Tryptase γ : Dargestellt sind die 58 C-terminalen Aminosäuren der γ -Domäne des Tryptase- γ -eYFP-Zymogens der 3. Generation inklusive Linker-Sequenz (grau). Prozessierung nach den markierten Arginin-Resten ($\uparrow\uparrow$), z.B. durch eine Furin-artige Protease, spaltet ein 54 Aminosäurereste langes Fragment von der katalytischen Domäne der Tryptase γ ab, inklusive des hydrophoben Transmembransegments (unterstrichen). Die Positionsangaben beziehen sich auf die Zymogensequenz.

E.4 Lokalisierung der Tryptase-Fusionsproteine in HMC-1

Die initialen Versuche, die Tryptase- γ - und - δ -eYFP-Fusionsproteine der 1. Generation nach transienter Transfektion in HMC-1 durch Fluoreszenzmikroskopie zu lokalisieren, zeigten ein hohes Maß an zytosolischer Fluoreszenz. Dieses diffuse Fluoreszenzsignal konnte später durch die starke Spaltung der Tryptase-Fluoreszenzproteine der 1. Generation und Freisetzung von eYFP erklärt werden. Durch die Konstruktoptimierung und die stabile Transfektion wurden dann die toxischen Effekte der transienten Lipofektion und der Überexpression und somit die Spaltung der Fusionsproteine deutlich reduziert. Durch diese Optimierung kombiniert mit der größeren räumlichen Auflösung der konfokalen Mikroskopie war die spezifische Lokalisierung der rekombinanten γ - und δ -Fluoreszenzproteine in HMC-1 möglich.

E.4.1 Lokalisierung der Tryptase- γ -Fluoreszenzproteine

Alle drei Generationen der stabilen γ -eYFP-Transfektanden zeigen ein ähnliches Fluoreszenzsignal, das primär in den Granula lokalisiert ist. Das Signal beschränkt sich vornehmlich auf die Membran der Granula, so dass eine Bindung über die Transmembrandomäne angenommen werden kann. Die Zellmembran ist in den (nicht aktivierten, ruhenden) HMC-1 Zellen nicht gefärbt. Überraschenderweise ist γ -eYFP an der Kernmembran und an weiteren Membranstrukturen im Zytoplasma nachweisbar. Ob es sich dabei um das raue endoplasmatische Retikulum an der Kernmembran und den Golgi-Apparat handelt, kann ohne spezifische Gegenfärbung zunächst nur vermutet werden.

Zusammenfassend betrachtet bestätigen und erweitern diese Ergebnisse frühere Untersuchungen zur Lokalisation der Tryptase γ [41]. Durch die Markierung mit eYFP und die Verwendung der konfokalen Mikroskopie ist jetzt eine exakte und detaillierte Lokalisierung der Tryptase γ an subzellulären (Membran-) Strukturen möglich. Bei weiterführenden Studien muss aber einschränkend beachtet werden, dass die Protease- und die eYFP-Anteile bedingt durch den Aufbau der Fusionsproteine voraussichtlich auf entgegengesetzten Seiten der Membran lokalisiert sind. Deshalb ist ein 'Shedding' der γ -Proteasedomäne mikroskopisch nicht nachweisbar, da Transmembran- und eYFP-Domäne an der Zellmembran verbleiben. Der Nachweis der Freisetzung der Tryptase γ muss deshalb über andere Konstrukte mit N-

terminalem eYFP-Anteil oder alternativ z.B. durch den immunologischen Nachweis der γ -Spaltfragmente im Kulturüberstand erfolgen.

E.4.2 Lokalisierung der Tryptase- δ -Fluoreszenzproteine

Die δ -eYFP-Fusionsproteine zeigen in allen Generationen stabiler Klone ein feines granuläres Fluoreszenzmuster, das sich weder den Granula noch einem anderen Zellkompartiment eindeutig zuordnen lässt. Es unterscheidet sich auch von der diffusen Verteilung des (löslichen) eYFP im Zytosol der eYFP-Kontroll-Klone, so dass man eine Akkumulation an anderen, noch unbestimmten zytoplasmatischen Strukturen annehmen kann. Hervorzuheben ist, dass Tryptase δ trotz der hohen Sequenzidentität zu den Tryptasen α und β nicht in den HMC-1 Granula nachweisbar ist. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass sich die Lokalisation von Tryptase δ in Mastzellen, und somit vermutlich auch die Prozessierung, deutlich von der der anderen Tryptasen unterscheidet. Außerdem bestätigen sie den methodischen Ansatz, die Tryptasen durch Markierung mit Fluoreszenzproteinen und nicht immunologisch nachzuweisen. Eine subzelluläre Lokalisation der Tryptase δ mit den bisher verfügbaren Antikörpern [1] ist aufgrund von Kreuzreaktivität nicht möglich.

E.4.3 Lokalisation der Tryptase- α - und - β -Fluoreszenzproteine

Auch die Kontrollkonstrukte Tryptase- α - und - β -eYFP wurden in HMC-1 stabil exprimiert und zum Vergleich mit den Tryptase- γ - und - δ -Fluoreszenzproteinen durch konfokale Mikroskopie lokalisiert. Das Fluoreszenzsignal sowohl von Tryptase- β - als auch - α -eYFP ist vornehmlich in den Granula der Mastzellen nachweisbar und zeigt im Gegensatz zu den γ -Klonen keine Affinität zur Granulummembran oder anderen Zellorganellen. Durch den Vergleich mit den γ - und δ -Fluoreszenzproteinen wird die Spezifität der Lokalisation der eYFP-markierten Tryptasen hier erneut bestätigt. Auch die Tryptasen α und β wurden in dieser Arbeit erstmals in lebenden (HMC-1) Mastzellen selektiv nachgewiesen. Ob die α - und β -Fluoreszenzproteine, entsprechend den bisherigen Erkenntnissen auch als aktive Protease gespeichert werden, kann anhand der hier gesammelten Daten nicht bestimmt werden. In der korrespondierenden Immunoblotanalyse besitzen beide Fusionsproteine die gleiche Masse, befinden sich also wahrscheinlich im gleichen Aktivierungszustand (s. Abb. D-35). Der Nachweis von Tryptase β (-eYFP) in den Granula entspricht der

Lehrmeinung, während die Lokalisation von Tryptase α (-eYFP) in den Granula (s. Abb. D-39) unerwartet ist. Bisher wird davon ausgegangen, dass Tryptase α hauptsächlich (wie auch ein geringer Anteil der (pro-)Tryptase β) nicht in den Granula gespeichert, sondern als Zymogen von ruhenden Mastzellen spontan sezerniert wird. Tryptase β dagegen wird hauptsächlich als reifes Enzym in den Mastzellgranula gespeichert und durch Degranulierung ausgeschüttet. Allerdings erfolgte der Nachweis der spontanen α -Zymogensekretion nur indirekt durch Analyse von Zelllysaten und Mediumüberständen, da eine spezifische immunologische Unterscheidung der (pro-)Tryptasen α und β aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit bisher nicht möglich war [35]. Der hier erfolgte Nachweis von Tryptase- α -eYFP in den HMC-1 Granula legt jedoch nahe, dass beide Tryptasen, β und α , in Mastzellgranula gespeichert und durch Degranulation freigesetzt werden können. Einschränkend bleibt zu beachten, dass die Überexpression der stabil transfizierten Proteasen und die Markierung mit eYFP durchaus Einfluss auf deren Lokalisation in der Zelle nehmen könnten.

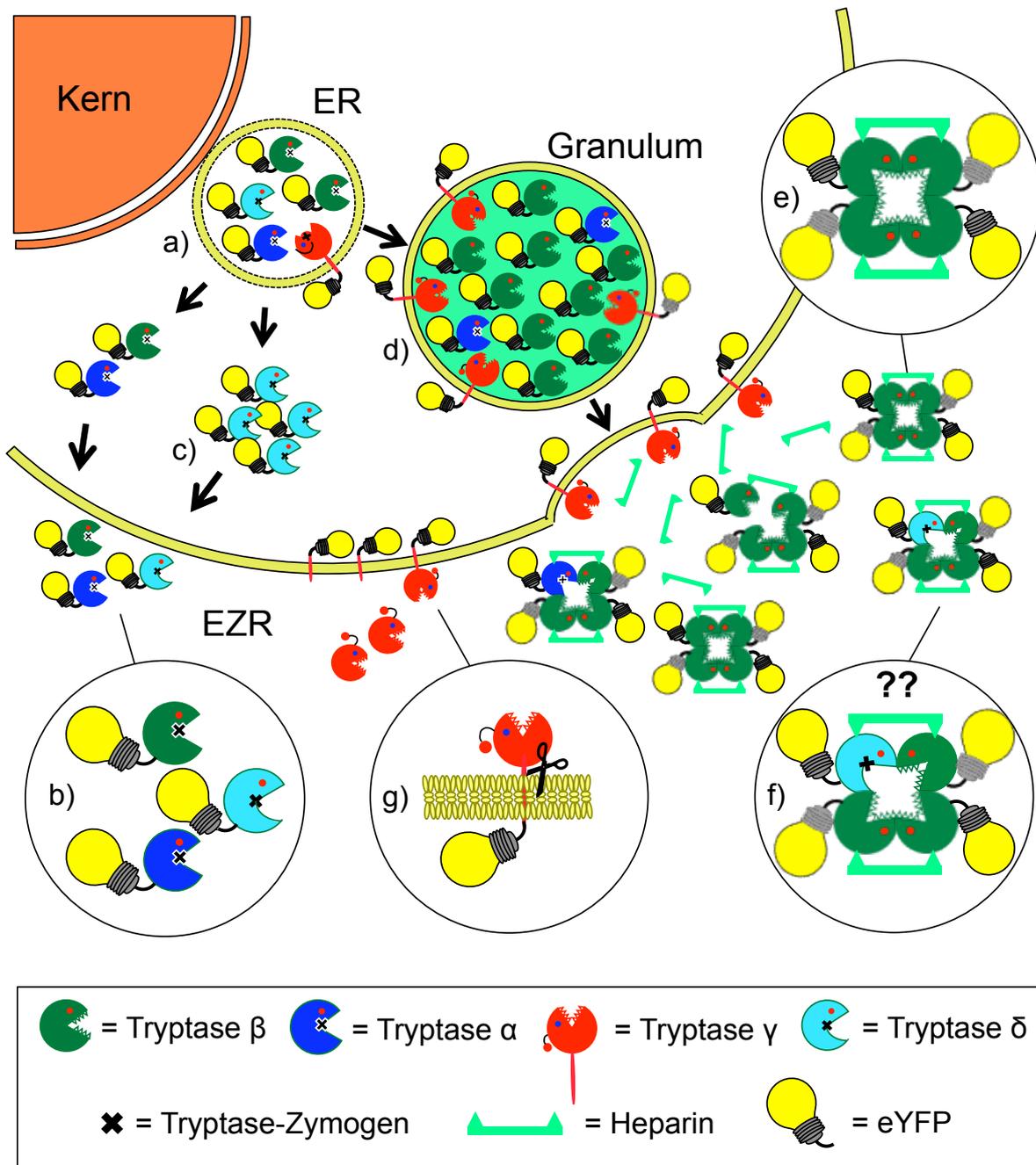


Abb. E-3: Schematische Darstellung einer Mastzelle mit potentiellen Prozessierungs- und Sekretionswegen der Tryptase-Fusionsproteine: Nach der Expression liegen alle Tryptasen im endoplasmatischen Retikulum (ER) zunächst als Zymogen vor (a). Nicht durch Autokatalyse aktivierbares Tryptase- α -Zymogen und zufällig nicht aktiviertes β -Zymogen werden vermutlich konstitutiv aus der Zelle ausgeschleust (b). δ -Fusionsprotein lagert sich in Clustern im Zytosol ab. Da Tryptase- δ -Zymogen die gleiche Pro-Sequenz-Mutation wie α besitzt, erscheint eine konstitutive Sekretion ebenfalls möglich (c). Tryptase β , γ und, wie gezeigt werden konnte, auch α werden als Fusionsprotein in den Mastzell-Granula gespeichert (d). Wird die Mastzelle aktiviert, erfolgt durch Degranulierung die Freisetzung der Tryptasen zusammen mit anderen präformierten Mediatoren. Stabilisiert durch Heparinmoleküle formieren sich die typischen Tryptase- β -Tetramere (e). Ob die Tetramer-Formation durch die Fusion mit eYFP eventuell behindert wird, ist unklar. Die Bildung von Heterotetrameren unter Beteiligung von Tryptase δ muss aufgrund der fehlenden Co-Lokalisierung bezweifelt werden (f). Das nach seiner Aktivierung doppelkettige γ -Fusionsprotein ist über die Transmembrandomäne in der Membran der Granula verankert und verbleibt nach der Degranulation an der Oberfläche der Mastzelle. Der Nachweis entsprechender Spaltfragmente weist auf eine Freisetzung von der Zelloberfläche durch „Shedding“ hin (g). In diesem Fall bleibt eYFP an der Innenseite der Zellmembran zurück. [Modifiziert nach Sommerhoff und Caughey]

E.5 Synopsis und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zu den bisher kaum erforschten Tryptasen γ und δ bestätigen die Wahl der experimentellen Ansätze und Methoden. Erstmals konnten die Tryptasen γ und δ und die Kontrollen, Tryptasen α und β , rekombinant in einer humanen Mastzelllinie exprimiert werden. Durch die Markierung der rekombinanten Tryptasen mit Fluoreszenzproteinen konnte das Problem der Kreuzreaktivität von Tryptase-Antikörpern umgangen werden, so dass die einzelnen Tryptasen jetzt selektiv und sensitiv nachgewiesen werden können. Die Fluoreszenzmarkierung erlaubt gleichzeitig eine rasche quantitative Auswertung von Transfektionsversuchen sowie die exakte subzelluläre Lokalisierung der Tryptasen in HMC-1, z.B. mittels konfokaler Mikroskopie, und damit Rückschlüsse auf die Prozessierung und Sekretionswege. Um zu klären, ob Tryptase δ nach der Zellaktivierung aktiv sezerniert wird und ob Tryptase γ , wie vermutet, nach Degranulation der Mastzelle in der Zellmembran verbleibt, können Stimulationsexperimente, z.B. mit Kalziumionophore oder PAR-2-Rezeptoragonisten, durchgeführt werden.

Die bisher durchgeführten Experimente lassen keine Aussage darüber zu, ob die rekombinanten Tryptase-Fluoreszenzproteine nach der Expression als Zymogene oder reife Protease vorliegen und welchen Einfluss der Aktivierungszustand auf die Lokalisation hat. Durch die Expression weiterer Konstrukte, z.B. nicht aktivierbarer Zymogene mit modifiziertem Propeptid oder durch Markierung des Propeptids mit einem kurzen Tag, wie dem FLAG-Tag, könnte diese Frage untersucht werden.

Die einfachen Kulturbedingungen und die hier etablierte Lipofektion von HMC-1 Mastzellen bieten gute Voraussetzungen für die notwendigen Experimente mit raschem Zellumsatz. Allerdings benötigt die Herstellung optimaler Bedingungen, d.h. die Isolierung stabil transfizierter Klone, einen nicht unerheblichen Zeitaufwand, der durch die Einführung eines zielgebundenen Rekombinationssystems in die HMC-1 Zelllinie deutlich reduziert werden könnte. Dadurch könnten modifizierte cDNA-Konstrukte direkt stabil in das HMC-1 Genom eingefügt und schneller zur Expression gebracht werden. Der Versuch, das „Flp-In System“ (Fa. Invitrogen) in HMC-1 zu etablieren war bislang jedoch leider erfolglos.

Nicht zuletzt müssen die gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden, indem andere, besser differenzierte Mastzelllinien mit den Tryptase-Konstrukten transfiziert werden. Dafür kommen LAD1/2 Zellen oder die erst 2011 isolierte Zelllinie LUVA, die

DISKUSSION

unabhängig von c-kit-Mutationen immortalisiert und hoch differenziert ist, in Frage [75].

F Literaturverzeichnis

1. Wang, H.W., et al., *Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 5145-52.
2. Kirshenbaum, A.S., et al., *Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells*. J Immunol, 1991. **146**(5): p. 1410-5.
3. Kube, P., et al., *Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques*. Histochem Cell Biol, 1998. **110**(2): p. 129-35.
4. Kuther, K., et al., *Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques*. Cell Tissue Res, 1998. **293**(1): p. 111-9.
5. Friend, D.S., et al., *Reversible expression of tryptases and chymases in the jejunal mast cells of mice infected with Trichinella spiralis*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5537-45.
6. Xing, W., et al., *Protease phenotype of constitutive connective tissue and of induced mucosal mast cells in mice is regulated by the tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(34): p. 14210-5.
7. Miller, H.R. and A.D. Pemberton, *Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut*. Immunology, 2002. **105**(4): p. 375-90.
8. da Silva, E.Z., M.C. Jamur, and C. Oliver, *Mast cell function: a new vision of an old cell*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(10): p. 698-738.
9. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 931-72.
10. Siraganian, R.P., *Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(6): p. 639-46.
11. Marshall, J.S., *Mast-cell responses to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 787-99.
12. Tkaczyk, C., et al., *Fc gamma receptors on mast cells: activatory and inhibitory regulation of mediator release*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **133**(3): p. 305-15.
13. Douaiher, J., et al., *Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing*. Adv Immunol, 2014. **122**: p. 211-52.
14. Grimaldeston, M.A., et al., *Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(6): p. 751-60.
15. Pawankar, R., *Mast cells in allergic airway disease and chronic rhinosinusitis*. Chem Immunol Allergy, 2005. **87**: p. 111-29.
16. Williams, C.M. and S.J. Galli, *The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 847-59.
17. Maciel, T.T., I.C. Moura, and O. Hermine, *The role of mast cells in cancers*. F1000Prime Rep, 2015. **7**: p. 09.
18. Sommerhoff, C.P. and N. Schaschke, *Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(3): p. 313-32.

19. Sakai, K., S. Ren, and L.B. Schwartz, *A novel heparin-dependent processing pathway for human tryptase. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 988-95.
20. Sheth, P.D., et al., *Inhibition of dipeptidyl peptidase I in the human mast cell line HMC-1: blocked activation of tryptase, but not of the predominant chymotryptic activity*. Biochem Pharmacol, 2003. **66**(11): p. 2251-62.
21. Le, Q.T., et al., *Promiscuous processing of human alphabeta-protryptases by cathepsins L, B, and C*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7136-43.
22. Goldstein, S.M., et al., *Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2475-82.
23. Lindstedt, K.A., J.O. Kokkonen, and P.T. Kovanen, *Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1425**(3): p. 617-27.
24. Pereira, P.J., et al., *Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 306-11.
25. Sommerhoff, C.P., et al., *The structure of the human betall-tryptase tetramer: fo(u)r better or worse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10984-91.
26. Sommerhoff, C.P., et al., *The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 75-89.
27. Addington, A.K. and D.A. Johnson, *Inactivation of human lung tryptase: evidence for a re-activatable tetrameric intermediate and active monomers*. Biochemistry, 1996. **35**(42): p. 13511-8.
28. Ren, S., K. Sakai, and L.B. Schwartz, *Regulation of human mast cell beta-tryptase: conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4561-9.
29. Fukuoka, Y. and L.B. Schwartz, *Human beta-tryptase: detection and characterization of the active monomer and prevention of tetramer reconstitution by protease inhibitors*. Biochemistry, 2004. **43**(33): p. 10757-64.
30. Strik, M.C., et al., *Intracellular serpin SERPINB6 (PI6) is abundantly expressed by human mast cells and forms complexes with beta-tryptase monomers*. Blood, 2004. **103**(7): p. 2710-7.
31. Pejler, G., et al., *Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4981-90.
32. Hamilton, M.J., et al., *Essential role for mast cell tryptase in acute experimental colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(1): p. 290-5.
33. Cairns, J.A., *Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(1): p. 55-66.
34. Schwartz, L.B., et al., *Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis*. N Engl J Med, 1987. **316**(26): p. 1622-6.
35. Schwartz, L.B., et al., *Tryptase precursors are preferentially and spontaneously released, whereas mature tryptase is retained by HMC-1 cells, Mono-Mac-6 cells, and human skin-derived mast cells*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5667-73.
36. Huang, C., et al., *Human tryptases alpha and beta/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19670-6.

37. Selwood, T., et al., *Diverse stability and catalytic properties of human tryptase alpha and beta isoforms are mediated by residue differences at the S1 pocket*. Biochemistry, 2002. **41**(10): p. 3329-40.
38. Marquardt, U., et al., *The crystal structure of human alpha1-tryptase reveals a blocked substrate-binding region*. J Mol Biol, 2002. **321**(3): p. 491-502.
39. Soto, D., et al., *Genetic deficiency of human mast cell alpha-tryptase*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(7): p. 1000-6.
40. Wong, G.W., Y. Tang, and R.L. Stevens, *Cloning of the human homolog of mouse transmembrane tryptase*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 419-21.
41. Wong, G.W., et al., *Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 41906-15.
42. Yuan, J., et al., *Expression and characterization of recombinant gamma-tryptase*. Protein Expr Purif, 2006. **49**(1): p. 47-54.
43. Caughey, G.H., et al., *Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostaticin gene families*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6566-75.
44. Verghese, G.M., M.F. Gutknecht, and G.H. Caughey, *Prostaticin regulates epithelial monolayer function: cell-specific Gpld1-mediated secretion and functional role for GPI anchor*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(6): p. C1258-70.
45. Trivedi, N.N., et al., *Mast cell alpha and beta tryptases changed rapidly during primate speciation and evolved from gamma-like transmembrane peptidases in ancestral vertebrates*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6072-9.
46. Pallaoro, M., et al., *Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3355-62.
47. Min, H.K., N. Kambe, and L.B. Schwartz, *Human mouse mast cell protease 7-like tryptase genes are pseudogenes*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(2): p. 315-21.
48. McCarthy, J.H., et al., *The presence of mast cells in agar cultures*. Exp Hematol, 1980. **8**(5): p. 562-7.
49. Furitsu, T., et al., *Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1736-44.
50. Nilsson, G. and D.D. Metcalfe, *Contemporary issues in mast cell biology*. Allergy Asthma Proc, 1996. **17**(2): p. 59-63.
51. Hirota, S., et al., *Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors*. Science, 1998. **279**(5350): p. 577-80.
52. Longley, B.J., Jr., et al., *Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1609-14.
53. Ma, Y., et al., *Clustering of activating mutations in c-KIT's juxtamembrane coding region in canine mast cell neoplasms*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(2): p. 165-70.

54. Tsujimura, T., et al., *Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line RBL-2H3*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **106**(4): p. 377-85.
55. Sundstrom, M., et al., *Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene*. *Immunology*, 2003. **108**(1): p. 89-97.
56. Butterfield, J.H., et al., *Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia*. *Leuk Res*, 1988. **12**(4): p. 345-55.
57. Nilsson, G., et al., *Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1*. *Scand J Immunol*, 1994. **39**(5): p. 489-98.
58. Butterfield, J.H., et al., *Purification of tryptase from a human mast cell line*. *J Leukoc Biol*, 1990. **47**(5): p. 409-19.
59. Guhl, S., et al., *Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines*. *Exp Dermatol*, 2010. **19**(9): p. 845-7.
60. Weiss, A., R.L. Wiskocil, and J.D. Stobo, *The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level*. *J Immunol*, 1984. **133**(1): p. 123-8.
61. Chalfie, M., *Green fluorescent protein*. *Photochem Photobiol*, 1995. **62**(4): p. 651-6.
62. Gerdes, H.H. and C. Kaether, *Green fluorescent protein: applications in cell biology*. *FEBS Lett*, 1996. **389**(1): p. 44-7.
63. Margolin, W., *Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells*. *Methods*, 2000. **20**(1): p. 62-72.
64. Huang, L., et al., *Potential pitfalls and solutions for use of fluorescent fusion proteins to study the lysosome*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e88893.
65. Terpe, K., *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003. **60**(5): p. 523-33.
66. Song, Z., et al., *A novel nonsense mutation in the MIP gene linked to congenital posterior polar cataracts in a Chinese family*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119296.
67. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. *Science*, 1998. **281**(5374): p. 269-72.
68. Kirshenbaum, A.S., et al., *Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI*. *Leuk Res*, 2003. **27**(8): p. 677-82.
69. Specks, U., et al., *Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA*. *FEBS Lett*, 1996. **390**(3): p. 265-70.
70. Xia, Y.C., et al., *Human mast cell line-1 (HMC-1) cells transfected with FcepsilonRIalpha are sensitive to IgE/antigen-mediated stimulation demonstrating selectivity towards cytokine production*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(8): p. 1002-11.
71. Furlong, S.T., et al., *Synthesis and physical characterization of a P1 arginine combinatorial library, and its application to the determination of the substrate specificity of serine peptidases*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**(11): p. 3637-47.

72. Gosalia, D.N., et al., *High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(5): p. 626-36.
73. Wong, G.W., et al., *Identification of a new member of the tryptase family of mouse and human mast cell proteases which possesses a novel COOH-terminal hydrophobic extension*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30784-93.
74. Nakayama, K., *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins*. Biochem J, 1997. **327 (Pt 3)**: p. 625-35.
75. Laidlaw, T.M., et al., *Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcepsilonRI*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 815-22 e1-5.

G Anhang

G.1 Originalsequenzen der Fusionsproteine

Im Anhang finden sich die editierten cDNA-Sequenzen des Tryptase- γ - und - δ -eYFP-Fusionskonstrukts der 1. Generation im Vergleich mit den jeweiligen Referenzsequenzen inklusive Translation. Da die Sequenzierungen der Konstrukte der 2. und 3. Generation bis auf die absichtlich eingefügten Veränderungen identische Ergebnisse lieferten, wurde auf deren gesonderte Darstellung verzichtet. Zur Vermeidung von Redundanz ist zudem der eYFP-Sequenzanteil nur für das γ -Konstrukt aufgeführt.

G.1.1 Sequenz des Tryptase- γ -eYFP-Konstrukts

a)

```

TPSG1-eYFP      1  --ATGGCCCTTGGGGCCTGTGGCCTCTGCTGCTCTGGCTGTGCCCGTGTGTCCCTCAGGACT
GamH6eY_fw      1  NCNTGGNCCTTGGGGCCTGTGGCCTCTGCTGCTCTGGCTGTGCCCGTGTGTCCCTCAGGACT
                *** *****
TPSG1-eYFP      64  TTGCAGCCAGGGTGTGGCCGGCCGAGGTTTCGGATGCAGGCGGCCGGATCGTGGGGGGTTCACGC
GamH6eY_fw      66  TTGCAGCCAGGGTGTGGCCGGCCGAGGTTTCGGATGCAGGCGGCCGGATCGTGGGGGGTTCACGC
                *****
TPSG1-eYFP      129 TCCCCCGGCCGCGCATGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCGCCTGCGGAGGATGCACGTGTGCGGGC
GamH6eY_fw      131 TCCCCCGGCCGCGCATGGCCATGGCAGGCCAGCCTCCGCCTGCGGAGGATGCACGTGTGCGGGC
                *****
TPSG1-eYFP      194 GGTCACTGCTCAGCCCCAGTGGGTGCTCACAGTGCCTACTGCTTCTCCGGGTCCTGAACTCA
GamH6eY_fw      196 GGTCACTGCTCAGCCCCAGTGGGTGCTCACAGTGCCTACTGCTTCTCCGGGTCCTGAACTCA
                *****
TPSG1-eYFP      259 TCCGACTACCAGGTGCACCTGGGGGAAGTGGAGATCACTTTGTCTCCCACTTCTCCACCGTGAG
GamH6eY_fw      261 TCCGACTACCAGGTGCACCTGGGGGAAGTGGAGATCACTTTGTCTCCCACTTCTCCACCGTGAG
                *****
TPSG1-eYFP      324 GCAGATCATCTGCACTCCAGCCCTCAGGACAGCCGGGGACCAGCGGGGACATCGCCCTGGTGG
GamH6eY_fw      326 GCAGATCATCTGCACTCCAGCCCTCAGGACAGCCGGGGACCAGCGGGGACATCGCCCTGGTGG
                *****
TPSG1-eYFP      389 AGCTCAGTGTCCCCGTGACCTCTCCAGCCGGATCCTGCCCGTCTGCCTCCCGGAGGCCTCAGAT
GamH6eY_fw      391 AGCTCAGTGTCCCCGTGACCTCTCCAGCCGGATCCTGCCCGTCTGCCTCCCGGAGGCCTCAGAT
                *****
TPSG1-eYFP      454 GACTTCTGCCCTGGGATCCGGTGTGGGTGACCGGCTGGGGCTATACGCGGGAGGGAGAGCCTCT
GamH6eY_fw      456 GACTTCTGCCCTGGGATCCGGTGTGGGTGACCGGCTGGGGCTATACGCGGGAGGGAGAGCCTCT
                *****
TPSG1-eYFP      519 GCCACCCCGTACAGCCTGCGGGAGGTGAAAGTCTCCGTGGTGGACACAGAGACCTGCCGCCGGG
GamH6eY_fw      521 GCCACCCCGTACAGCCTGCGGGAGGTGAAAGTCTCCGTGGTGGACACAGAGACCTGCCGCCGGG
                *****
TPSG1-eYFP      584 ACTATCCCGGCCCGGGGGCAGCATCCTTCAGCCCGACATGCTGTGTGCCCGGGGCCCGGGGAT
GamH6eY_fw      586 ACTATCCCGGCCCGGGGGCAGCATCCTTCAGCCCGACATGCTGTGTGCCCGGGGCCCGGGGAT
                *****
TPSG1-eYFP      649 GCCTGCCAGGACGACTCCGGGGGCTCTGGTCTGCCAGGTGAACGGTGCCTGGGTGCAGGCTGG
GamH6eY_fw      651 GCCTGCCAGGACGACTCCGGGGGCTCTGGTCTGCCAGGTGAACGGTGCCTGGGTGCAGGCTGG
                *****
TPSG1-eYFP      714 CATTGTGAGCTGGGGTGGGGCTGCGGCCGCCCAACAGGCCGGGAGTCTACACTCGTGTCCCTG
GamH6eY_fw      716 CATTGTGAGCTGGGGTGGGGCTGCGGCCGCCCAACAGGCCGGGAGTCTACACTCGTGTCCCTG
                *****
TPSG1-eYFP      779 CCTACGTGAACTGGATCCGCCGCCACATCACAGCATCAGGGGGCTCAGAGTCTGGGTACCCAGG
GamH6eY_fw      781 CCTACGTGAACTGGATCCGCCGCCACATCACAGCATCAGGGGGCTCAGAGTCTGGGTACCCAGG
                *****
TPSG1-eYFP      844 CTCCCCCTCCTGGCTGGCTTCTTCTCCCCGGCCTTCTCTTCTGCTAGTCTCCTGTGTCTCTGCT
GamH6eY_fw      846 CTCCCCCTCCTGGCTGGCTTCTTCTCCCCGGCCTTCTCTTCTGCTAGTCTCCTGTGTCTCTGCT
    
```

```

*****
TPSG1-eYFP 909 GGCCAAGTGCCTGCTGCACCCATCTGCGGATGGTACTCCCTTCCCCGCCCTGACTGA-----
GamH6eY_fw 911 GGCCAAGTGCCTGCTGCACCCATCTGCGGATGGTACTCCCTTCCCCGCCCTGACAAGCTTACCA
*****

TPSG1-eYFP 967 -----
GamH6eY_fw 976 TGGTTCGGTCTCATCATCATCATCATGGATATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGGATCC

TPSG1-eYFP 967 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
GamH6eY_fw 1041 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA
*****

TPSG1-eYFP 1032 CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA
GamH6eY_fw 1106 CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGA
*****

TPSG1-eYFP 1097 CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTC
GamH6eY_fw 1171 CCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTC
*****

TPSG1-eYFP 1162 GGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTC
GamH6eY_fw 1236 GGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTC
*****

TPSG1-eYFP 1227 CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
GamH6eY_fw 1301 CGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
*****

TPSG1-eYFP 1292 CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC
GamH6eY_fw 1366 CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC
*****

TPSG1-eYFP 1357 TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTA
GamH6eY_fw 1431 TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTA
*****

TPSG1-eYFP 1422 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
GamH6eY_fw 1496 TATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
*****

TPSG1-eYFP 1487 ACGGCAGCGTGCAGTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCAGCGGCCCGTGTG
GamH6eY_fw 1561 ACGGCAGCGTGCAGTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCAGCGGCCCGTGTG
*****

TPSG1-eYFP 1552 CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
GamH6eY_fw 1626 CTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA
*****

TPSG1-eYFP 1617 TCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
GamH6eY_fw 1691 TCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
*****

TPSG1-eYFP 1682 AGTAA----- 1686
GamH6eY_fw 1756 AGTAACTCGAGTCTAGA 1772
****

```

b)

```

TPSG1-eYFP 1 MALGACGLLLLLLAVPGVSLRTLQPGCGRPQVSDAGGRIVGGHAAPAGAWPWQASLRLRRMHVCGG
GamH6eY_fw 1 XLGACGLLLLLLAVPGVSLRTLQPGCGRPQVSDAGGRIVGGHAAPAGAWPWQASLRLRRVHVC GG
*****

TPSG1-eYFP 66 SLLSPQWVLTAAHCFSGSLNSSDYQVHLGELEITLSPHFSTVRQIILHSSPSGQPGTSGDIALVE
GamH6eY_fw 66 SLLSPQWVLTAAHCFSGSLNSSDYQVHLGELEITLSPHFSTVRQIILHSSPSGQPGTSGDIALVE
*****

TPSG1-eYFP 131 LSVPVTLSSRILPVCLPEASDDFCPIRCWVTGWGYTREGEPLPPPYSLREVKVSVDTETCRRD
GamH6eY_fw 131 LSVPVTLSSRILPVCLPEASDDFCPIRCWVTGWGYTREGEPLPPPYSLREVKVSVDTETCRRD
*****

TPSG1-eYFP 196 YPGPGGSILQPDMLCARGPGDACQDDSGGPLVCQVNGAWVQAGIVSWGEGCGRPNRPGVYTRVPA
GamH6eY_fw 196 YPGPGGSILQPDMLCARGPGDACQDDSGGPLVCQVNGAWVQAGIVSWGEGCGRPNRPGVYTRVPA
*****

TPSG1-eYFP 261 YVNWIRRHITASGGSESYPRLPLLLAGFPLPLLLVSCVLLAKCLLHPSADGTFPPAPD-----
GamH6eY_fw 261 YVNWIRRHITASGGSESYPRLPLLLAGFPLPLLLVSCVLLAKCLLHPSADGTFPPAPDKLTM
*****

TPSG1-eYFP 322 -----MVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
GamH6eY_fw 326 GRSHHHHHHGYPYDPDYAGSMVSKEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
*****

```

TPSG1-eYFP	366	LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT
GamH6eY_fw	391	LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT *****
TPSG1-eYFP	431	RAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED
GamH6eY_fw	456	RAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED *****
TPSG1-eYFP	496	GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK
GamH6eY_fw	521	GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHLYSYQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK *****
TPSG1-eYFP	561	---- 560
GamH6eY_fw	586	LESR 589

Abb. G-1: Sequenzierung und Referenzabgleich von pcDNA3.1/Hygro+/γHis6eYFP (1.Gen.): a) Die Originalsequenzen (untere Reihe) von Vorwärts- und Rückwärtslauf der Sequenzierung des 1758 bp großen γ-eYFP-Konstrukts der 1. Generation wurden zusammengefügt, editiert und in der Orientierung von 5' nach 3' mit der cDNA-Referenz von TPSG1 und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Sternchen markieren die Basenübereinstimmung. Die Startcodons sind in grau, die Stopcodons unterstrichen dargestellt. Der His6-Linker zwischen Tryptase- und YFP-Sequenz ist schwarz unterlegt. Das Stopcodon an dieser Stelle wurde für die Expression des Fusionskonstrukts erfolgreich entfernt. Bis auf den bekannten Austausch zweier einzelner Basen **↑** entspricht die Sequenz der ausgewählten Referenz.

b) Die Translation der DNA-Sequenz beweist die Vollständigkeit des Fusionsproteins. Wichtige Strukturmerkmale wie die Prä- und die Pro-Sequenz am N-Terminus (dunkel- und hellgrau unterlegt), die Transmembrandomäne (unterstrichen) und der His6-Linker (schwarz unterlegt) stellen sich wie erwartet dar. Deutlich wird, dass lediglich der erste Basenaustausch **↑** aus a) im Vergleich zur Referenz TPSG1 zu einer Variation der Aminosäuresequenz führt, die allerdings in der allelischen Variante Tryptase γ II zu finden ist. Die zweite Punktmutation bleibt in der Translation stumm.

G.1.2 Sequenz des Tryptase-δ-eYFP-Konstrukts

a)

TPSD1-eYFP	1	-----ATGCTCCTCCTTGCTCCCCAGATGCTGAGCCTGCTGCTGCTGG
DelH6eY_fw	1	CNNGGCATGNCTAGCCGCCACCATGCTCCTCCTTGCTCCCCAGATGCTGAGCCTGCTGCTGCTGG *****
TPSD1-eYFP	44	CGCTGCCCGTCTGCGAGCCCGGCTACGTGGCCCTGCCAGGCCAGGCCCTGCAGCAAACG
DelH6eY_fw	66	CGCTGCCCGTCTGCGAGCCCGGCTACGTGGCCCTGCCAGGCCAGGCCCTGCAGCAAACG *****
TPSD1-eYFP	109	GGCATTGTTGGGGGGCAGGAGGCCCCAGGAGCAAGTGGCCCTGGCAGGTGAGCCTGAGAGTCCG
DelH6eY_fw	131	GGCATTGTTGGGGGGCAGGAGGCCCCAGGAGCAAGTGGCCCTGGCAGGTGAGCCTGAGAGTCCG *****
TPSD1-eYFP	174	CGGCCATACTGGATGCACTTCTGCGGGGGCTCCCTCATCCACCCCAAGTGGGTGCTAACC GCGG
DelH6eY_fw	196	TGCCCATACTGGATGCACTTCTGCGGGGGATCCCTCATCCACCCCAAGTGGGTGCTAACC GCGG ↑ ***** ↑ *****
TPSD1-eYFP	239	CGCACTGCGTGGAAACCGGACATCAAGGATCTGGCCGCCCTCAGGGTGCAACTGCGGGAGCAGCAC
DelH6eY_fw	261	CGCACTGCGTGGAAACCGGACATCAAGGATCTGGCCGCCCTCAGGGTGCAACTGCGGGAGCAGCAC *****
TPSD1-eYFP	304	CTCTACTACCAGGACCAGCTGCTGCCGGTCAGCAGGATCATCGTGACCCACAGTTCTACATCAT
DelH6eY_fw	326	CTCTACTACCAGGACCAGCTGCTGCCGGTCAGCAGGATCATCGTGACCCACAGTTCTACATCAT *****
TPSD1-eYFP	369	CCAGACCGGGGCGGACATCGCCCTGCTGGAGCTGGAGGAGCCCGTGAACATCTCCAGCCACATCC
DelH6eY_fw	391	CCAGACCGGGGCGGACATCGCCCTGCTGGAGCTGGAGGAGCCCGTGAACATCTCCAGCCACATCC *****
TPSD1-eYFP	434	ACACGGTCACGCTGCCCTGCCTCGGAGACCTTCCCCCGGGGATGCCGTGCTGGGTCACTGGC
DelH6eY_fw	456	ACACGGTCACGCTGCCCTGCCTCGGAGACCTTCCCCCGGGGATGCCGTGCTGGGTCACTGGC *****
TPSD1-eYFP	499	TGGGGCGACGTGGACAATAATGTGCACCTGCCGCCGCCATACCCGCTGAAGGAGGTGGAAGTCCC
DelH6eY_fw	521	TGGGGCGACGTGGACAATAATGTGCACCTGCCGCCGCCATACCCGCTGAAGGAGGTGGAAGTCCC *****
TPSD1-eYFP	564	CGTAGTGGAAAACACCTTTGCAACCGGGAATATCACACCGGCCCTCCATACGGGCCACAGCTTTC

ANHANG

```

DelH6eY_fw 586 CGTAGTGGAAAACCACTTTGCAACGCGGAATATCACACCGCCTCCATACGGGCCACAGCTTTC
*****
TPSD1-eYFP 629 AAATCGTCCGCGATGACATGCTGTGTGCGGGGAGCGAAAATCACGACTCCTGCCAGGGTGACTCT
DelH6eY_fw 651 AAATCGTCCGCGATGACATGCTGTGTGCGGGGAGCGAAAATCACGACTCCTGCCAGGGTGACTCT
*****
TPSD1-eYFP 694 GGAGGGCCCCTGGTCTGCAAGGTGAATGGCACCTAA-----
DelH6eY_fw 716 GGAGGGCCCCTGGTCTGCAAGGTGAATGGCACCCCGAAGCTTACCATGGGTCGGTCTCATCATCA
*****
TPSD1-eYFP 731 -----ATG...
DelH6eY_fw 781 TCATCATCATGGATATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGGATCCATG...
*****

```

b)

```

TPSD1-eYFP 1 -----MLLLAPQMLSLLLLLALPVLASPAYVAPAGQALQQTGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVR
DelH6eY_fw 1 XAXLAATMLLLAPQMLSLLLLLALPVLASPAYVAPAGQALQQTGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVR
*****↑
TPSD1-eYFP 59 GPYWMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCVEPDIKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYII
DelH6eY_fw 66 GPYWMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCVEPDIKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYII
*****↑
TPSD1_eYFP 124 QTGADIALLELEEVNIISSHIHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNNVHLPPPYPLKEVEVP
DelH6eY_fw 131 QTGADIALLELEEVNIISSHIHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNNVHLPPPYPLKEVEVP
*****
TPSD1_eYFP 189 VVENHLCNAEYHTGLHTGHSFQIVRDDMLCAGSENHDS CQGDSSGGLVCKVNGT-----
DelH6eY_fw 196 VVENHLCNAEYHTGLHTGHSFQIVRDDMLCAGSENHDS CQGDSSGGLVCKVNGT PKLTMGRSHHH
*****
TPSD1_eYFP 243 -----MVS
DelH6eY_fw 261 HHHGYPYDVPDYAGSMVS...
*****

```

Abb. G-2: Sequenzierung und Referenzabgleich von pcDNA3.1/Hygro+/ δ His6eYFP (1.Gen.) a)

Die Originalsequenzen (untere Reihe) von Vorwärts- und Rückwärtslauf der Sequenzierung des 1530 bp großen δ -Konstrukts der 1. Generation wurden zusammengefügt, editiert und in der Orientierung von 5' nach 3' mit der cDNA-Referenz von TPSD1 und eYFP (obere Reihe) abgeglichen. Alle Startcodons sind in grau, die Stopcodons unterstrichen dargestellt. Der His6-Linker, der die Tryptase-Sequenz von der eYFP-Sequenz (nicht vollständig dargestellt) trennt, ist schwarz unterlegt. Wie im γ -Konstrukt wurde das Stopcodon an dieser Stelle für die Expression des Fusionskonstrukts erfolgreich entfernt. Bis auf den Austausch zweier einzelner Basen ↑ entspricht die Sequenz der ausgewählten Referenz.

b) Die theoretische Translation der DNA-Sequenz beweist die Vollständigkeit des Fusionsproteins. Wichtige Strukturmerkmale wie die N-terminale Prä-Pro-Sequenz (grau unterlegt), der His6-Linker (schwarz unterlegt) und die C-terminale eYFP-Sequenz (nicht vollständig dargestellt) präsentieren sich wie erwartet. Keine der beiden Punktmutationen aus a) führt zu einem Aminosäureaustausch ↑.

G.2 Immunoblot mit dem Anti-His6-Tag-Antikörper

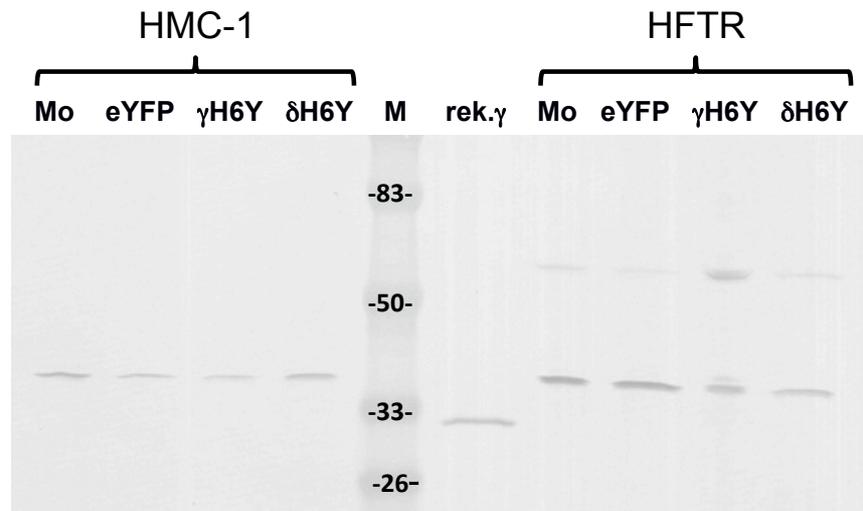


Abb. G-3: Fehlender spezifischer Nachweis der Tryptase-Konstrukte mit dem His6-Tag-Antikörper: Weder in HMC-1 Zellen noch in HEK-293-FTR Zellen ließen sich die Tryptase-Konstrukte der 1. Generation (γ H6Y, δ H6Y) über den im Linker enthaltenen His6-Tag nachweisen. Rekombinante Tryptase γ wird dagegen spezifisch erkannt. Weitere detektierte Banden waren auch in 'Mock'-transfizierten Zellen (Mo) nachweisbar und wurden als unspezifisch identifiziert.

G.3 Digitaler Anhang

Im digitalen Anhang finden sich die editierten DNA-Sequenzen der Tryptase- γ - und - δ -eYFP-Konstrukte sowie der Tryptase- α - und - β -eYFP-Konstrukte in voller Länge.

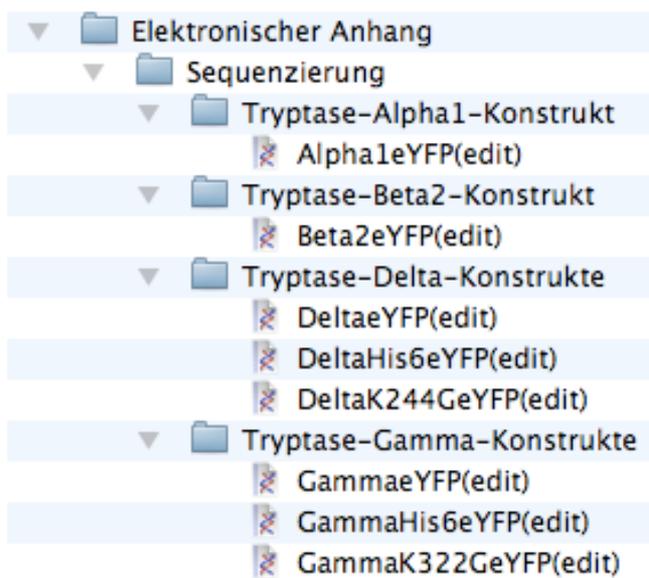


Abb. G-4: Ordnerhierarchie des digitalen Anhangs: Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierungen aller in dieser Arbeit zur Transfektion verwendeten Tryptase-Fusionskonstrukte wurden editiert und jeweils als MacVector-Datei wie dargestellt gespeichert.

H Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Leiterin Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum) und dem Institut für Laboratoriumsmedizin (Leiter Prof. Dr. med. Daniel Teupser), Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, angefertigt. Die Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare und Systembiologische Medizin“ im Programm „Förderung für Forschung und Lehre“ an der LMU München gefördert.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Sommerhoff für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen und außerdem für den inspirierenden wissenschaftlichen Austausch sowie für seine Geduld, Unterstützung und die vielen Anregungen bei der Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch und besonders meinen Laborkollegen und Mitdoktoranden Dr. Dusica Gabrijelcic-Geiger, Erika Falk, Stefan Simon, Maresa Grundhuber, Nikolaus Buchmann und Frank Brennfleck für ihre wissenschaftliche und moralische Unterstützung, aber auch für ihre persönliche Freundschaft mit vielen geselligen Stunden abseits von Werkbank und Computer. Für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung bedanken.

Für die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Zahler aus der Abteilung für Pharmazie an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, ohne die mein Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären, und die mich moralisch sowie tatkräftig bei der Rechtschreibkorrektur unterstützt haben. Danke auch an meine Schwester Andrea, die mir immer ein Vorbild war, und Katharina, die mir besonders in Tiefphasen zur Seite stand.