

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

Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressions-Systems
zur Untersuchung des Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktors 4
in der humanen Mastzelllinie HMC-1

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

vorgelegt von
Frank Werner Brennfleck

aus
Frankfurt am Main

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: PD Dr. Dejana Mokranjac

PD Dr. Philipp Alexander Greif

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Etablierung eines Tetrazyklin-induzierbaren Genexpressions-Systems zur Untersuchung des Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktors 4 in der humanen Mastzelllinie HMC-1“ 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.

Regensburg, den 26.11.2018

.....

(Frank W. Brennfleck)

Meinen Eltern
und
meiner geliebten Frau
Ann-Kathrin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
A Zusammenfassung	11
B Einleitung	13
B.1 Mastzellen	13
B.2 Mastzellmodelle.....	15
B.2.1 Primäre Mastzellen.....	15
B.2.2 Humane Mastzelllinie 1 (HMC-1).....	16
B.2.3 LAD 1 und LAD 2	17
B.3 Transfektion der HMC-1 Zelllinie	18
B.4 RasGRP4	18
B.5 Zielsetzung	20
C Materialien	21
C.1 Geräte	21
C.2 Reagenzien	22
C.3 Kits	23
C.4 Materialien.....	23
C.5 Zellkultur.....	24
C.6 Antikörper	25
C.7 Puffer.....	25
C.8 Bakterienmedien.....	25
C.9 Zellkulturmedien	26
C.9.1 Spent HMC-1 Medium.....	26
C.10 Bakterienstämme.....	27
C.11 Vektoren	28
C.11.1 pcDNA3.1Hygro(+)	28
C.11.2 pTet-On-Advanced.....	29
C.11.3 pTRE-Tight.....	30
C.12 Referenzsequenzen	31
D Methoden	33
D.1 Mikrobiologie	33
D.1.1 PCR.....	33
D.1.2 Restriktionsverdau.....	34
D.1.3 Ligation.....	34
D.1.4 Transformation von Bakterien	35
D.1.5 DNA-Extraktion aus Bakteriensuspensionen.....	35
D.1.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	35
D.1.7 Zielgerichtete Mutagenese	36
D.1.8 DNA-Sequenzierung	37
D.2 Zellkultur.....	37
D.2.1 Kultivierung von HMC-1 Zellen.....	37

D.2.2	Bestimmung der Zellkonzentration	37
D.2.3	Einfrieren von HMC-1 Zellen	37
D.2.4	Auftauen von HMC-1 Zellen	38
D.2.5	Kultivierung von HMC-1-TetOn Zellen (HMC-T-1).....	38
D.2.6	Kultivierung von Hek-293 Zellen.....	38
D.3	Transfektion.....	38
D.3.1	Transfektion von Hek-293 Zellen.....	38
D.3.2	Transfektion von HMC-1 Zellen.....	39
D.3.3	Selektion stabiler Transfektanden	39
D.3.4	Subklonierung stabiler Transfektanden	39
D.3.5	Ernte der Einzelzellklone	40
D.4	Immunelektrophorese.....	40
D.4.1	Herstellung der Zelllysate	40
D.4.1.1	Herstellung von Hek-293-Lysaten	40
D.4.1.2	Herstellung von HMC-1- und HMC-T-1-Lysaten	41
D.4.2	SDS-PAGE.....	41
D.4.3	Proteintransfer auf PVDF Membranen	41
D.4.4	Immunologischer Proteinnachweis.....	42
D.5	Durchflusszytometrie	42
D.5.1	Durchflusszytometrische Messungen.....	43
D.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	44
D.6.1	Vorbereitungen zur Mikroskopie.....	44
D.6.2	Immunfluoreszenz von HMC-1 Zellen	44
E	Ergebnisse.....	47
E.1	Konstitutive Expression von humanen und murinen RasGRP4- sowie RasGRP4-eYFP-Fusionsproteinen in HMC-1 Mastzellen	47
E.1.1	Konstruktion und Klonierung der Expressionsvektoren	47
E.1.2	Mutagenese der hRasGRP4-cDNA.....	49
E.1.3	Überprüfung der korrekten Konstruktion und der Expression der Expressionsvektoren durch immunologischen Nachweis	50
E.1.4	Wirkung von Hygromycin B auf HMC-1 Zellen	52
E.1.5	Transiente Transfektion.....	53
E.1.6	Stabile Transfektion.....	54
E.2	Doxyzyklin-induzierbare Genexpression in HMC-1 Zellen.....	57
E.2.1	Klonierung induzierbarer Expressionskonstrukte	57
E.2.2	Wirkung von Neomycin und Puromycin auf HMC-1 Zellen.....	58
E.2.3	Herstellung von HMC-1-Transaktivatorzellen	59
E.2.3.1	Transfektion und Selektion.....	59
E.2.3.2	Überprüfung der HMC-T-1 Klone	60
E.2.4	Induzierbare Expression von eYFP in HMC-1 Zellen	61
E.2.4.1	Kotransfektion mit pTRE-tight-eYFP und linPur	61
E.2.4.2	Subklonierung stabiler Transfektanden	62
E.2.4.3	Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels Durchflusszytometrie.....	63

E.2.4.4	Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels Fluoreszenz-mikroskopie	64
E.2.4.5	Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels immuno- logischem Nachweis des Transgens	65
E.3	Überexpression von RasGRP4 in HMC-T-1 Zellen	67
E.3.1	Stabile Transfektion.....	67
E.3.1.1	Selektion der hRasGRP4-eYFP/linPur-Transfektanden	67
E.3.1.2	Selektion der mRasGRP4-eYFP/linPur-Transfektanden	68
E.3.2	Subklonierung der mRasGRP4-eYFP/linPur HMC-T-1-Zellen	69
E.3.3	Immunologischer Nachweis des mRasGRP4-eYFP Transgens.....	70
E.3.4	Charakterisierung der mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klone	71
E.3.4.1	Durchflusszytometrische Analyse der Zellvitalität	71
E.3.4.2	Durchflusszytometrische Analyse der Zellgröße und Granularität.....	72
E.3.5	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Tryptase	75
E.3.6	Stabilitätskontrolle nach Frier-Tau-Prozess.....	76
F	Diskussion	77
F.1	Mastzellen und Mastzellmodelle.....	77
F.1.1	Mastzelllinien.....	78
F.1.2	Primäre Mastzell-Kulturen	79
F.2	Mastzellendifferenzierung.....	79
F.2.1	Charakteristika differenzierter Mastzellen	79
F.2.2	RasGRPs	79
F.2.3	RasGRP4	80
F.3	Überexpression von RasGRP4 in HMC-1 Zellen.....	82
F.3.1	Plasmid-Design	82
F.3.2	Transiente Überexpression	83
F.3.3	Stabile Überexpression	83
F.3.4	Doxyzyklin-induzierbare Überexpression	84
F.3.4.1	Etablierung des Systems.....	84
F.3.4.2	Überexpression von RasGRP4 in HMC-T-1-Zellen.....	85
F.3.5	Pilotstudien zur Charakterisierung der HMC-T-1-mRasGRP4-eYFP Klone	86
F.4	Synopsis und Ausblick.....	88
G	Literaturverzeichnis	90
H	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CCL-20	Chemokin-Ligand 20
CPA	Carboxypeptidase A
ECL-Substrat	Enhanced Chemiluminescence Substrat
eYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
Hek-293	Humane embryonale Nierenzelllinie 293
HMC-1	Humane Mastzelllinie 1
HMC-T-1; HMC-1-TetOn	Stabil pTet-On-Advanced überexprimierende HMC-1 Zelllinie
IgE	Immunglobulin E
IL 3,4,6,8,10	Interleukin 3,4,6,8,10
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PI	Propidiumiodid
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RasGRP4	Ras-Guanin-Nucleotide- Exchange-Faktor 4
RF	Relative Fluoreszenz
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
wt-	Wildtyp

A Zusammenfassung

Mastzellen sind ubiquitär im Körper vorkommende Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität. Durch die Expression von Proteasen, Zytokinen, Vasodilatoren, Chemokinen und Lipidmediatoren nehmen sie eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten und Bakterien sowie der Entgiftung von Toxinen ein. Daneben sind Mastzellen bei der Entstehung von Krankheiten wie dem allergischen Asthma bronchiale, allergischen Reaktionen und der Rheumatoiden Arthritis beteiligt. Neben der zeit- und kostenintensiven Isolation und Kultivierung primärer humaner Mastzellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder Gewebeproben, die einen rasch seneszenten Wachstumsverlauf zeigen, werden die humanen Mastzelllinien HMC-1 und LAD1 für zellbiologisch orientierte Studien von Mastzellen genutzt. Die Humane Mastzelllinie 1 (HMC-1), die aus dem Blut eines Mastozytosepatienten etabliert wurde, proliferiert rasch, ist phänotypisch jedoch wenig differenziert; die aus dem Blut eines Mastzellsarkompatienten etablierte LAD1 Zelllinie hat einen deutlich differenzierteren Phänotyp, proliferiert aber sehr langsam.

2002 wurde ein neuer Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor (RasGRP4) entdeckt, der fast ausschließlich in Mastzellen vorkommt. In HMC-1 Zellen wurde eine inaktive Splicevariante nachgewiesen; nach Überexpression einer murinen Isoform des RasGRP4 wurde eine Änderung des Phänotyps von HMC-1 Zellen beobachtet, sodass auf eine Beteiligung an Zelldifferenzierungsprozessen geschlossen wurde.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Überexpression des murinen und des humanen wt-RasGRP4 in der HMC-1 Zelllinie zur Überprüfung des Einflusses auf die Zelldifferenzierung. Zunächst wurden sowohl die murine als auch die humane Isoform 1 als Fusionskonstrukt mit eYFP, sowie als Kontrollen eYFP und eYFP-Tryptase-Fusionskonstrukte, in das konstitutive Expressionsplasmid pcDNA3.1Hygro(+) kloniert und die Plasmide durch Sequenzierung überprüft. Durch Transfektion der Zelllinie Hek-293 und anschließende Immunblot-Analysen wurde die korrekte Expression und Funktionalität der Fusionskonstrukte überprüft. Anschließend wurden HMC-1 Zellen mit den Konstrukten erfolgreich transient transfiziert. Dabei wurden Transfektionseffizienzen von 62 ± 9 % mit den eYFP-Plasmiden, $12 \pm 1,5$ % mit RasGRP4-eYFP-Konstrukten und 16 ± 3 % mit den Tryptase-eYFP-Konstrukten erreicht. Im Gegensatz zu den eYFP- und Tryptase-eYFP-Konstrukten gelang es

jedoch in 4 unabhängigen Experimenten nicht, durch Selektion stabil RasGRP4 überexprimierende Klone zu etablieren.

Als Alternative zur konstitutiven Expression wurde daher ein System zur Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression in HMC-1 Zellen etabliert. Nach Transfektion der HMC-1 Zellen mit dem Transaktivatorplasmid pTet-On-Advanced konnten 6 induzierbare HMC-1 Zellklone selektiert werden. Nach transienter Transfektion mit den Plasmiden pTRE-tight-eYFP und pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP zeigte sich nach Induktion eine Zunahme der eYFP-Fluoreszenz. Durch Selektion und Subklonierung wurden induzierbar eYFP überexprimierende HMC-1 Zellen generiert. Diese zeigen eine geringe basale mittlere Fluoreszenz pro Zelle; nach Induktion konnte die eYFP-Expression um den Faktor 60 gesteigert und mittels Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenz und Immunblot nachgewiesen werden. Analog hierzu wurden durch Selektion und Subklonierung induzierbare HMC-1-murinesRasGRP4-eYFP Klone generiert; auch hier wurde die Transgenexpression immunologisch und durchflusszytometrisch nachgewiesen. Dagegen konnten hRasGRP4-eYFP exprimierende induzierbare HMC-1-Klone bisher nicht etabliert werden.

Pilotstudien mit den ersten murinen RasGRP4-eYFP Transfektanden zeigen eine Beeinflussung des Zellphänotyps. Neben der Zunahme der Zellgranularität, des Zelldurchmessers und der Änderung der Vitalität zeigen erste Daten, dass vermehrt Trypsase exprimiert wird. Das etablierte System zur Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression erscheint daher als sinnvoller Ansatz zur Untersuchung zytotoxischer und differenzierender Effekte von RasGRP4 und anderen Genen in HMC-1 Zellen.

B Einleitung

B.1 Mastzellen

Mastzellen sind ubiquitär im Körper vorkommende Zellen, die insbesondere immunologische Aufgaben haben. Sie entstehen im Knochenmark und verlassen dieses als Vorläuferzellen in die Blutbahn. Nach Migration ins Zielgewebe differenzieren sie in verschiedene Mastzellsubtypen, die durch ihren Mediatorbestand charakterisiert sind. Ein Großteil der Mediatoren wird in zytoplasmatischen Granula gespeichert, die nach adäquatem Stimulus mit der Membran fusionieren und die Mediatoren in den Extrazellularraum ausschütten können. Erstmals beschrieben wurden Mastzellen von Paul Ehrlich im Jahr 1878 im Rahmen seiner Dissertation (1). Er bezeichnete die bis dato als granulierten Bindegewebszellen benannten Zellen als Mastzellen und verglich sie in ihrer physiologischen Funktion mit Fettzellen. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mastzellen sind die zahlreichen zytoplasmatischen Granula, derer die Zellen ihren Namen verdanken, deutlich erkennbar.

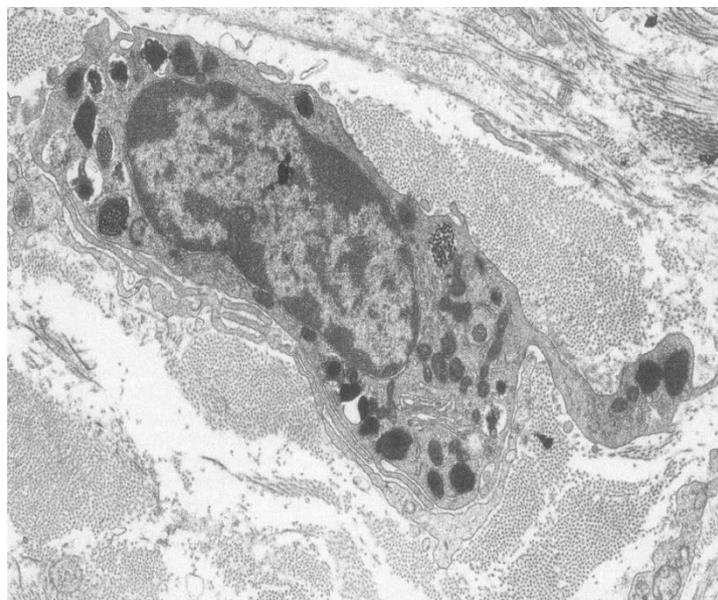


Abb. B.1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Bindegewebsmastzelle.
Aus Metcalfe *et al.*, *Physiol. Rev.*, 1997 (2)

Mastzellen entstammen CD34+ Progenitorzellen des Knochenmarks (3) und zirkulieren als Vorläuferzellen im Kreislauf, bevor sie sich nach dem sog. Homing in ihrer Differenzierung dem jeweiligen Gewebe anpassen. Mastzellen reagieren dabei sehr sensibel auf das umgebende Gewebe, Art und Menge der exprimierten

Mediatoren hängen stark vom Gewebemilieu ab. Wichtigste Stimulatoren der Mastzellendifferenzierung sind der Stammzellofaktor (SCF) (4–6) und die Interleukine 3, 4, 6 und 10 (IL3, IL4, IL6, IL10) (7, 8).

Mastzellen können in zwei Subgruppen zusammengefasst bzw. unterschieden werden. Wichtigstes Unterscheidungskriterium ist hierbei die vorherrschende Expression von Tryptase in MC_T versus einer Kombination aus Tryptase und Mastzellchymase in MC_{TC} (9). Während MC_T vornehmlich im Mucosagewebe des Respirations- sowie Gastrointestinaltraktes zu finden sind und ihre Anzahl während entzündlicher Erkrankungen der Schleimhäute deutlich zunimmt, findet man die MC_{TC} überwiegend im Bindegewebe, vor allem in der gastrointestinalen Submucosa, der Dermis, dem Herzen, den Konjunktiven und den perivaskulären Geweben (10).

Wichtige Mediatoren der Mastzellen sind die konstitutiv exprimierten, in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Proteoglykane Heparin und Chondroitinsulfat, das Histamin, die Serin-Proteasen Tryptase (11) und Chymase (12), sowie die Carboxypeptidase A (13). Dabei bilden die Proteoglykane mit dem Histamin und den Proteasen stabile Komplexe, die erst nach Aktivierung der Zelle und anschließender Degranulierung in ihre Einzelbestandteile dissoziieren (14).

Weitere wichtige Mediatoren von Mastzellen sind die Eicosanoide, die nach Aktivierung aus membranständigen Arachidonsäuren gebildet werden. Hierbei handelt es sich um verschiedene Leukotriene (15) und Prostaglandine (16). Diese wirken chemotaktisch auf Neutrophile, T-Zellen und Eosinophile, bronchokonstriktorisch, erhöhen die Mukusproduktion und steigern die Gefäßpermeabilität.

Die bisher bekannten physiologischen Aufgaben von Mastzellen liegen insbesondere in ihrer immunologischen Funktion. Hier fungieren sie als eine Art Bindeglied zwischen erworbener und angeborener Immunität gegen Pathogene. Neben der Fähigkeit Antigene zu phagozytieren, zu prozessieren und letztlich zu präsentieren (17–20), um somit eine B- bzw. T-Zell vermittelte Immunantwort zu initiieren, führt die Freisetzung ihrer Mediatoren im Rahmen der angeborenen Immunabwehr zur Aufrechterhaltung und Progredienz der Entzündungsreaktion (21). Insbesondere in der Abwehr parasitärer Erkrankungen nehmen Mastzellen mit ihrer IgE vermittelten Abwehrreaktion eine Schlüsselfunktion ein (22).

Neben einer vasoaktiven Wirkung, die den Blutfluss und gleichzeitig die Gefäßpermeabilität erhöht, führt die Aktivierung von Mastzellen zu einem gesteigerten

Tonus der glatten Bronchialmuskulatur, um die Austreibung möglicher Pathogene zu fördern. Zudem führen die Mediatoren zur Schleimbildung im Bereich der Schleimhäute der Körperoberflächen (23). Die Sekretion chemotaktischer Chemokine wie z.B. Eotaxin, IL-8 oder TNF- α führt zur Migration und Aktivierung von Eosinophilen, Neutrophilen und Natürlichen Killerzellen. Zusätzlich wirken Mastzellen über Mediatoren wie z.B. TNF- α , CCL-20 oder Histamin positiv auf die Reifung und Migration von dendritischen Zellen und T-Effektorzellen. Außerdem können sie, wie oben bereits erwähnt, direkt Antigen-präsentierend wirken.

Besser bekannt ist die Mastzelle allerdings im Kontext ihrer Beteiligung an pathophysiologischen Vorgängen. Die in diesem Kontext am häufigsten genannte Erkrankung ist die allergische Reaktion vom Soforttyp (Typ I). Streng genommen liegt dieser Erkrankung allerdings keine Fehlfunktion der Mastzelle zu Grunde. Sie wirkt hierbei lediglich als Effektor einer Fehlfunktion der Plasmazelle. Nach Erstkontakt mit einem Antigen, das bei Gesunden zu keiner Reaktion führen würde, kommt es zur Bildung eines gegen das Antigen gerichteten IgE-Antikörpers durch Plasmazellen. Bei Auftreten des Zweitkontaktes kommt es schließlich zur Ausschüttung dieser Antikörper. Die Mastzelle exprimiert IgE-Rezeptoren, die unspezifisch Fc-Teile von IgE Molekülen binden können. Zu einer IgE-vermittelten Aktivierung der Mastzelle kommt es allerdings erst, wenn mehrere gebundene IgE-Moleküle durch Bindung des Antigens miteinander quervernetzt werden. Die anschließende Ausschüttung der Mediatoren, hier insbesondere Histamin, Tryptase und Chymase, führt zur Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität und demzufolge Bildung eines lokalen Ödems, Sensitivierung der Nozizeptoren und Erhöhung des Blutflusses. Durch Potenzierung und Rekrutierung weiterer Mastzellen kann sich aus der zunächst lokalen Entzündungsreaktion in wenigen Augenblicken eine systemische Reaktion ausbilden, die nicht selten in einem lebensgefährlichen Schockzustand endet.

B.2 Mastzellmodelle

B.2.1 Primäre Mastzellen

Primäre Mastzellen stellen unter den in der biomedizinischen Forschung verwendeten *in vitro*-Mastzell-Modellen weiterhin den Goldstandard dar. Je nach Protokoll können primäre Mastzellen aus CD34+ Progenitorzellen des Knochenmarkes (BMMCs) (6) oder aus CD133+ Vorläuferzellen des Blutes oder Nabelschnurblutes gewonnen

werden (24, 25). Ebenso ist eine Differenzierung aus fetalem Lebergewebe beschrieben (4). Je nach Herkunft der verwendeten Vorläuferzellen wird ein mehr oder weniger zur wt-Mastzelle ähnlicher Phänotyp erzielt. Zur Definition des Phänotyps werden neben der Expression des KIT-Rezeptors CD117 und des FcεRI-Rezeptors auch die Expression von Mastzell-typischen Mediatoren wie Tryptase und Chymase (26, 27) verwendet.

Die Kultivierung primärer Mastzellen ist zeitaufwendig und teuer. In der Regel werden mehrere Wochen bis Monate benötigt, um eine verwertbare Zellzahl zu generieren (28). Mit den bis heute beschriebenen Protokollen kann nur eine limitierte Zellzahl erreicht werden, bevor die Population in die Seneszenz übergeht; die Herstellung einer kontinuierlich proliferierenden Kultur primärer Mastzellen ist bisher nicht gelungen. Daneben variiert der Phänotyp der Kultur je nach zugegebenen Wachstumsfaktoren (SCF und Interleukine); jede Verunreinigung in den Reagenzien, jede Umstellung der verwendeten Produkte und letztlich jeder Chargenwechsel z.B. des verwendeten Serums kann Ergebnisse durch Änderung des Phänotyps beeinflussen. Aufgrund der notwendigen Wachstumsfaktoren ist die Kultivierung vergleichsweise kostenintensiv.

Für kleinere Studien sind primäre Mastzellen als adäquates Modellsystem etabliert. Wird jedoch ein Modellsystem benötigt, in dem z.B. die Wirkung vieler verschiedener Substanzen auf die Zellen untersucht werden soll, sind die Grenzen des Modellsystems rasch erreicht, sowohl in Hinblick auf die Heterogenität der Spender, als auch in finanzieller Hinsicht.

B.2.2 Humane Mastzelllinie 1 (HMC-1)

Die erste permanente Zelllinie humaner Mastzellen („humane Mastzelllinie-1“, HMC-1) wurde 1988 von Butterfield *et al.* aus dem Blut eines an einer Mastzelleukämie erkrankten Patienten etabliert (29). Es wird davon ausgegangen, dass die permanente Proliferation durch zwei Punktmutationen (D816V, V559G) im Gen des Stammzellfaktorrezeptors (c-KIT) begründet ist (30). Dies führt zu einer Liganden-unabhängigen Phosphorylierung des Rezeptors mit konsekutiver, dauerhafter Aktivierung. Daraus resultiert eine immortalisierte, rasch replizierende Zelllinie, die jedoch im Gegensatz zu primären Mastzellen einen deutlich niedrigeren Differenzierungsgrad aufweist (29). Die HMC-1 Zelllinie dient als einfaches und kostengünstig zu handhabendes Mastzellmodell; die Kultivierung erfolgt unabhängig

von teuren Wachstumsfaktoren. Eine Verdopplung der Zellzahl dauert im Durchschnitt zwischen 48 und 72 Stunden.

Die primär von Butterfield et al. beschriebene Zelllinie ist heterogen. 2003 verglichen Sundström et. al. zwei HMC-1 Subpopulationen, die sich in der c-KIT Mutation unterscheiden; HMC-1.1 Zellen besitzen nur eine Punktmutation (V559G) und zeigen ein deutlich langsames Zellwachstum und eine größere Zellmorphologie verglichen mit den HMC-1.2 Zellen, die zwei Punktmutationen (V559G, D816V) aufweisen.

Alle HMC-1 Zellen haben deutlich weniger zytoplasmatische Granula als primäre Mastzellen. Abb. B.2.1 zeigt das elektronenmikroskopische Bild einer HMC-1 Mastzelle. Verglichen mit Abb. B.1.1 enthält die Zelle weitaus weniger Granula als die Bindegewebsmastzelle. Zudem exprimieren sie deutlich niedrigere Mengen Tryptase, kaum Histamin und Heparin (31). Chymase wird nicht exprimiert, ein funktionsfähiger Fcε-Rezeptor ist ebenfalls nicht vorhanden.

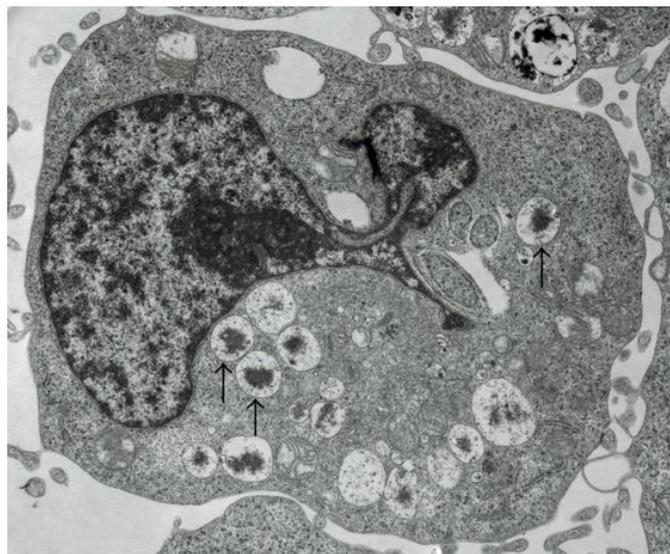


Abb. B.2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HMC-1 Mastzelle
Aus Walia et al., *Mediators of inflammation*, 2012 (32)

B.2.3 LAD 1 und LAD 2

Die Zelllinien LAD 1 und LAD 2 wurden 2002 aus dem Knochenmark eines 44-jährigen Patienten etabliert, der unter einer besonders aggressiven Form der Mastzelleukämie litt. Wichtigster Unterschied zur Mastzelllinie HMC-1 ist das Fehlen von Mutationen im c-KIT-Gen, woraus eine Abhängigkeit von Stammzellefaktor resultiert. Auch in Gegenwart von rekombinantem SCF proliferiert die Zelllinie nur langsam. Die durchschnittliche Passagezeit beträgt ca. 2 Wochen. LAD-Zellen zeichnen sich durch

einen deutlich Mastzell-ähnlicheren Phänotyp aus, als ihn die HMC-1 Zelllinie aufweist. Neben Tryptase und Histamin exprimiert die Zelllinie auch Chymase und einen funktionsfähigen FcεRI Rezeptor (33).

B.3 Transfektion der HMC-1 Zelllinie

Die systematische Literaturrecherche in der Datenbank Pubmed mit den Suchbegriffen „HMC-1“ und dem Wortstamm „transfect*“ ergab im Suchzeitraum 1990 bis 2011 nur 36 Einträge, während die Kombination der Begriffe „Hek-293“ und „transfect*“ im gleichen Zeitraum 3705 Publikationen ergab. Nach Durchsicht der 36 Einträge wurden 17 Publikationen identifiziert, in denen eine erfolgreiche Transfektion der HMC-1 Mastzelllinie berichtet wird. In 4 Fällen wurde nur ein RNA-Transfer durchgeführt (34–36), lediglich in 13 Veröffentlichungen wird über einen erfolgreichen Transfer von DNA berichtet. Hierbei erfolgte in 9 Fällen eine transiente Transfektion (37–45) und nur in 4 die Generierung stabil transfizierter Klone (46–49). Die Etablierung der induzierbaren Genexpression in der Zelllinie wurde bisher nicht beschrieben.

B.4 RasGRP4

2002 beschrieben Yang *et al.* einen bisher nicht bekannten Ras-Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (RasGRP), der aufgrund der Sequenzhomologie mit den bereits bekannten RasGRP1-3 RasGRP4 benannt wurde (44). RasGRPs fungieren als Aktivatoren des Ras und anderer assoziierter kleiner GTPasen. Ihr Vorkommen ist bisher lediglich in haematopoetischen Zellen nachgewiesen, wo sie Einfluss auf den Phänotyp der jeweiligen Zelle nehmen. Die Expression des RasGRP4 beschränkt sich neben Mastzellen nach neuem Kenntnisstand auf T-Lymphozyten und Makrophagen (50, 51).

In der o.g. Arbeit beschrieben Yang *et al.*, dass die HMC-1 Mastzelllinie lediglich die inaktive Splicevariante 3 des RasGRP4 exprimiert. Nach transienter Transfektion der Zelllinie mit dem wt-murinen RasGRP4 konnten sie in einigen wenigen Transfektanden deutliche morphologische Veränderungen nachweisen. Neben einer erhöhten Expression der Tryptase β konnten die zuvor nicht exprimierten Carboxypeptidase A und MC-Chymase in geringen Mengen nachgewiesen werden. Ebenso verzeichneten sie eine deutliche Zunahme der Granularität der transfizierten Zellen (44). Mittels PCR konnte neben der Splicevariante 1, die für ein 170 aa großes Protein kodiert, die Variante 2 nachgewiesen werden, die in einem 659 aa großen Protein resultiert.

Variante 1 wurde ausgehend von Mastzellen von Patienten mit Mastozytose und Asthma Bronchiale amplifiziert, Variante 2 lediglich von Asthmatikern. Aus Mastzellen gesunder Probanden konnte keine der Varianten amplifiziert werden.

In einer anschließenden Publikation wurde 2008 die stabile Transfektion der HMC-1 Mastzelllinie mit einer vermutlich funktionsfähigen Isoform des humanen RasGRP4 beschrieben. In dieser Arbeit konnte entgegen der initialen Publikation kein Effekt auf die Expression der Tryptase nachgewiesen werden (52).

2011 konnten Hashimoto *et al.* nachweisen, dass RasGRP4 in CD14+ PBMCs exprimiert wird. Durch RT-PCR konnten insgesamt 10 Splicevarianten unterschiedlicher Länge nachgewiesen werden. Die am häufigsten vorkommenden Varianten sind, neben den bereits 2002 beschriebenen Isoformen, in Tab. 1 mit ihren jeweiligen GenBank-Einträgen aufgeführt. Insbesondere die Isoformen c und d wurden häufig bei Arthritis- und Autoimmunpatienten nachgewiesen.

Tab. 1: Übersicht über die bis 2011 beschriebenen Isoformen des humanen RasGRP4

Isoform	Länge	Nachweis	Vorkommen
A	673aa	NM_1700604	Mastzellen, Basophile, CD14+ PBMCs
b /Variante 2	659aa	NM_001146202	Asthma Bronchiale Patienten (44)
Variante 1	170aa	(44)	Mastozytose, Asthma bronchiale
Variante 3	<170aa	(44)	HMC-1 Zellen
C	581aa	NM_001146203	PBMCs bei Rheumatoider Arthritis, Autoimmunerkrankungen, Gesunden (53)
D	604aa	NM_001146204	PBMCs bei Rheumatoider Arthritis, Autoimmunerkrankungen, Gesunden (53)
E	639aa	NM_001146205	PBMCs bei Autoimmunerkrankungen, Gesunden (53)
F	484aa	NM_001146206	PBMCs bei Autoimmunerkrankungen, Gesunden (53)

B.5 Zielsetzung

Für zellbiologisch orientierte Untersuchungen von humanen Mastzellen stehen nur wenige *in vitro* Modelle zur Verfügung. Neben primären Mastzellen und der nur langsam proliferierenden Zelllinie LAD wird die humane Mastzelllinie 1 (HMC-1) am häufigsten verwendet, da sie kostengünstig und mit wenig Aufwand kultiviert werden kann. Die in der HMC-1 Zelllinie gewonnenen Erkenntnisse lassen sich jedoch nur begrenzt auf reife Mastzellen übertragen, da die HMC-1 Zelllinie vergleichsweise gering differenziert ist und wichtige morphologische Merkmale der wt-Mastzelle nicht aufweist.

Ausgehend von den publizierten Daten, die darlegen, dass RasGRP4 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Mastzellen spielt und dass HMC-1 Zellen nur eine verkürzte inaktive Isoform exprimieren, erscheint eine Differenzierung der Zelllinie durch Überexpression von RasGRP4 möglich. Primäres Ziel dieser Arbeit war es, wt-RasGRP4 in HMC-1 Zellen zu exprimieren und dessen Einfluss auf die Morphologie und die Differenzierung der Zelllinie zu untersuchen. Hierzu sollte die Transfektion von HMC-1 Zellen optimiert und ein System zur Überexpression adäquater Mengen des Transgens entwickelt werden. Anschließend sollten die etablierten RasGRP4-exprimierenden Zellen hinsichtlich morphologischer und phänotypischer Veränderungen mit der Ausgangszelllinie verglichen werden.

C Materialien

C.1 Geräte

Gerätebezeichnung

Autoklav LTA 400

Begasungsinubator Forma 3035

Brutschrank Typ Tv30u

DynaMag-Spin Magnet

Eismaschine AF10

Elektrophoresekammern Perfect Blue

Model MiniS 7x8 cm, 30 ml Gelvolumen

Model MiniExM 23x14 cm, 290 ml Gelvolumen

Elektrophorese-Tank XCell Sure Lock

Elektroporationseinheit Gene Pulser

Flowzytometer Epics XL-MCL

Fluoreszenzmikroskop Axioskop

Gel Imager

Gene Pulser Xcell Elektroporationssystem

Gene Pulser

Capacity Extender

Pulse Controller

Zellzählgerät CASY 1

Inkubationsschüttler Typ ITH-1

Inkubationsschüttler Typ SM30

Laminar-Flow-Werkbank SterilGuard SG600E

Laminar-Flow-Werkbank Uniflow UVUB 1200

Lichtmikroskop Typ IMT-2

Magnetrührer IKA Mag Reo

Magnetrührer mit Heizplatte Monotherm

Mikrowellenofen HMT84M421

Hersteller

Zirbus, Bad Grund

Forma Scientific, USA

Memmert, Schwabach

Thermo Fisher Scientific Dynal,
Norwegen

Scotsman, USA

Peq Lab, Erlangen

Thermo Fisher Scientific,
Karlsruhe

Bio-Rad, München

Beckman Coulter, Krefeld

Zeiss, Jena

Intas UV Systeme, Göttingen

Bio-Rad, Hercules, USA

Schärfe System, Reutlingen

Braun, Melsungen

Johanna Otto GMBH,
Bodelshausen

The Baker Company, USA

Luft- und Reinraumtechnik
GMBH, Sonnenbühl

Olympus, Japan

Bachofer, Reutlingen

Variomag, USA

Bosch, Gerlingen

Materialien

Mikrozentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pierce Fast Semi Dry Blotter	Thermo-Scientific, USA
Kolbenhubpipetten in versch. Größen	Gilson, USA
pH-Meter Inolab pH Level 2	WTW, Weilheim
Photometer Nano Drop 1000	PeqLab, Erlangen
Pierce Fast Semi-Dry Blotter	Pierce, Thermo Scientific, Schwerte
Präzisionswaage 2842	Sartorius, Göttingen
Stickstofftank	Thermolyne, USA
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, München
UV- Transilluminator 302nm	Bachofer, Reutlingen

C.2 Reagenzien

Reagenz

6x DNA Loading Dye

Agarose Broad Range

Ampicillin

Bacto-Agar

Bacto Peptone

Bacto Trypton

dNTP-Mischung (40mM)

dATP 100 mM

dGTP 100 mM

dCTP 100 mM

dTTP 100 mM

Gene Ruler DNA Ladder Mix

Hefe Extrakt

Hind III

Kodak processing chemicals for autoradiography

Hersteller

Thermo Scientific, Rockford,
USA

Carl Roth, Karlsruhe

Life Technologies, Darmstadt

BD Bioscience, Bedford, USA

BD Bioscience, Bedford, USA

BD Bioscience, Bedford, USA

Roche, Penzberg

Thermo Scientific, Rockford,
USA

BD Bioscience, Bedford, USA

New England Biolabs, Frankfurt

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Films GBX developer/replenisher	
Kodak processing chemicals for autoradiography	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Films GBX fixer/replenisher	
Ligase T4	Roche, Penzberg
Ligasepuffer	Roche, Penzberg
Magic Mark XP Western Protein Standard	Life Technologies, Darmstadt
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe
NEB 3 Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
Not I	New England Biolabs, Frankfurt
Phusion Flash Polymerase	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
Vectashield Hard Set Antifade Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xba I	New England Biolabs, Frankfurt

C.3 Kits

Kit

MiniElute Gelextraktions-Kit
QIAprep Spin Miniprep Kit
QIAprep Spin Maxiprep Kit
QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit

Hersteller

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Stratagene, La Jolla, USA

C.4 Materialien

Gerätebezeichnung

Amersham Hyperfilm ECL
Bio Trace PVDF – Polyvinylidene Fluoride
Transfer Membran 0,45 µm
Erlenmeyerkolben mit Schikanen
Filterpapier 1,2 – 1,5 mm
Gel-Blotting- Papier
Kryoröhrchen

Hersteller

GE Healthcare, Großbritannien
Pall, Dreieich
Nalgene, Thermo Scientific
Whatman, Dassel
Schleicher und Schuell, Dassel
Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

Materialien

Tris-Gly-Gradienten-Gele 4-20% (12-Bahn)	Anamed, Darmstadt
Membranfilter (Rotrand) FP30/0,2 CA-S	Whatman, Dassel
PVDF-Membran BioTrace	Pall Cooperation, USA
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrink, Teningen
Universal Elektroporationsküvette 2mm	Eurogentec, Köln
Zellkulturflaschen (T25,T75,T125)	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkulturplatten Falcon (1-,6-,12-,24-,96well)	Becton Dickinson, Frankreich

C.5 Zellkultur

IMDM	PAA, Cölbe
FBS Gold	PAA, Cölbe
FBS Tetrazyklin negativ	PAA, Cölbe
Alpha-Thioglycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific
G-418 Sulfat (Neomycin)	PAA, Cölbe
Hygromycin B	PAA, Cölbe
Puromycin	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS (Zellkultur)	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA 0,05%/0,02% in PBS	PAA, Cölbe

C.6 Antikörper

Primärantikörper:

Antigen	Spezies	Klonalität	Hersteller
RasGRP4	Ziege	Polyklonal	Santa Cruz Biotech
Humanes RasGRP4	Maus	Monoklonal	Santa Cruz Biotech
Murines RasGRP4	Hase	Polyklonal	Covalab
eGFP/ eYFP	Maus	Monoklonal	Roche
Humane Tryptase	Hase	Polyklonal	AG Sommerhoff

Sekundärantikörper:

Antigen	Spezies	Hersteller
Maus IgG	Ziege	Dianova, Hamburg
Kaninchen IgG	Ziege	Dianova, Hamburg

C.7 Puffer

Blockierungslösung	1xPBST, 5 % Milchpulver
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBST	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 0,05% Tween pH 7,4
Tris-Glycin-Laufpuffer, 10x	0,25 M Tris-Base, 2,5M Glycin, 1 % SDS, pH 8,3-8,5
Tris-Glycin-Probenpuffer, 4x	0,4 M Tris-HCL, 20% Glycerin, 8% SDS, Bromphenolblau, pH 6,8
TAE-Puffer, 1x	40 mM Tris/Acetat (pH 8,0), 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 0,1% SDS

C.8 Bakterienmedien

LB-Medium	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,5
LB-Agar	1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,5, 2% Agar, pH 7,5
SOC- Medium	2 % Bacto Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 M Glukose

C.9 Zellkulturmedien

Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien

Bezeichnung	Basismedium	Serum	Zusatz	Antibiotikum
HMC-1 Medium	IMDM	10% FCS	α -Thioglycerol	-----
Vorkulturmedium	IMDM	10% FCS	-----	-----
Einfriermedium	IMDM	10% FCS	α -Thioglycerol 10%DMSO	-----
Transfektionsmedium	IMDM	-----	α -Thioglycerol	-----
HMC-T-1-Medium	IMDM	10% Tet-free FCS	α -Thioglycerol	400 μ g/ml Neomycin
Hek-293	DMEM	10% FCS	584mg/L L-Glutamin 4,5% Glukose	1% Pen/Strep
Hek-293 Einfriermedium	DMEM	10% FCS	584mg/L L-Glutamin 4,5% Glukose 5% DMSO	1% Pen/Strep

C.9.1 Spent HMC-1 Medium

Zur Subklonierung mittels Verdünnungsreihen muss dem Medium 25 % „Spent Medium“ zugegeben werden, da die vereinzelt Zellen zur Aufnahme der Expansion die darin enthaltenen, parakrin sezernierten Mediatoren benötigen. Für die Herstellung wird nach Zentrifugation der Zellsuspension bei Routine-Mediumwechsel der Zelllinie HMC-1 der zellfreie Überstand steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

C.10 Bakterienstämme

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

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>	Thermo Fisher Scientific
XL-Blue Super-competent	<i>E. coli</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene

C.11 Vektoren

C.11.1 pcDNA3.1Hygro(+)

Zur konstitutiven Überexpression von Transgenen in eukaryotischen Zellen wurde das Plasmid pcDNA3.1Hygro(+) (Abb. C.11.1) verwendet. Unter einem starken CMV Promoter wird die in den Polylinker klonierte cDNA konstitutiv transkribiert. Eine am 3' Ende des Polylinkers gelegene Poly-Adenylierungssequenz stabilisiert die mRNA in Eukaryoten. Zur Selektion stabiler Transfektanden kodiert das Plasmid die Hygromycin-Transferase, zur Selektion transformierter Prokaryoten eine Ampicillin-spezifische Betalactamase (ampR).

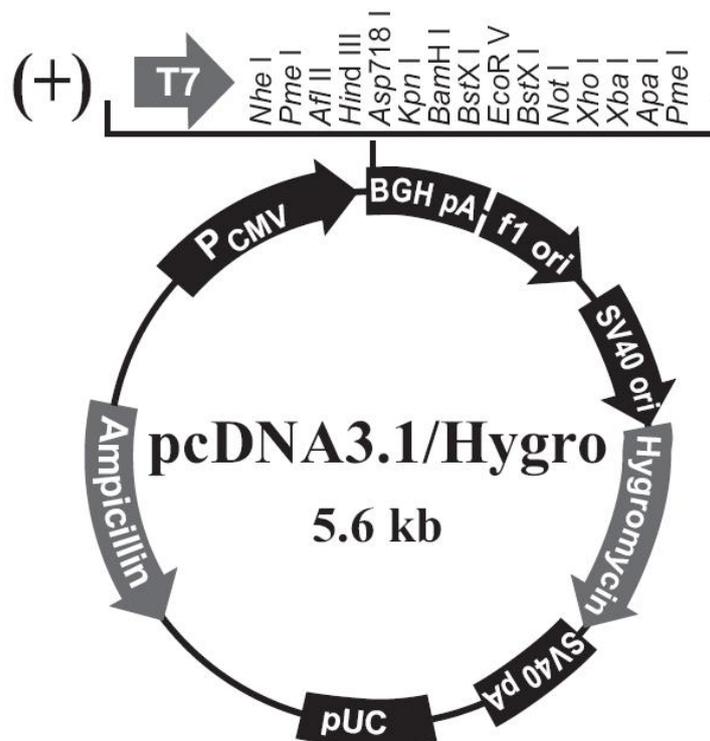


Abb. C.11.1: Schematische Darstellung des pcDNA3.1Hygro(+) Expressionsplasmids.

Quelle: Thermo Fisher Life Science

C.11.2 pTet-On-Advanced

Das Plasmid pTet-On-Advanced (Abb. C.11.2) kodiert das optimierte, umgekehrte Tetrazyklin-sensitive Transaktivator-Protein (rtTA-Advanced). Exprimiert wird ein Fusionsprotein bestehend aus dem mutierten Tetrazyklin-abhängigen Repressor (TetR) und mehreren aufeinanderfolgenden VP16 Transkriptions-Aktivierungs-Domänen des Herpes-Simplex-Virus. Das Fusionsprotein wurde für die Bindung von Doxyzyklin optimiert. Zur Selektion stabil transfizierter Eukaryoten enthält das Plasmid die Neomycin-Phosphotransferase (Neo^r), zur Selektion transformierter Prokaryoten die Ampicillin spezifische-Betalactamase (Amp^r).

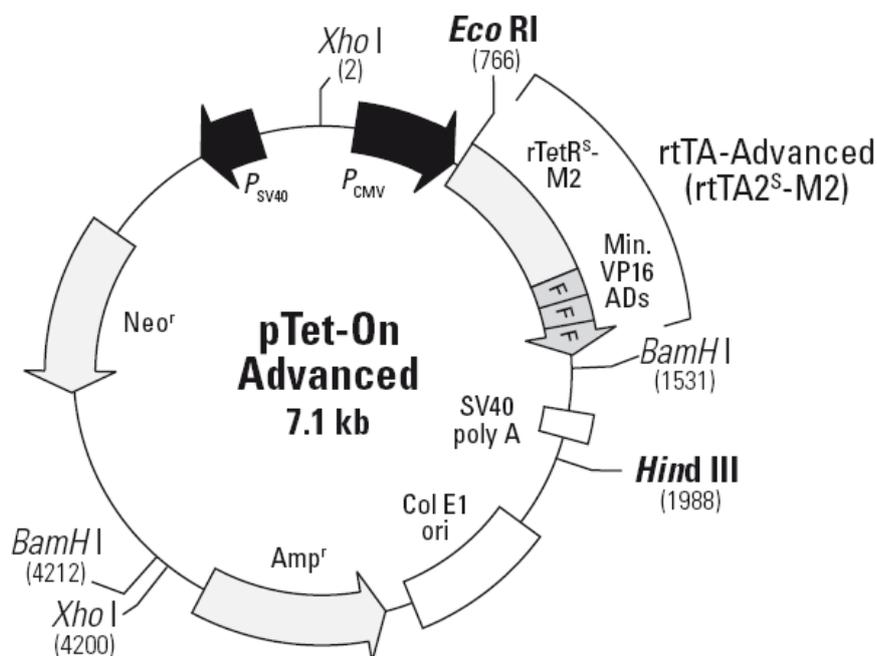


Abb. C.11.2: Schematische Darstellung des Plasmids pTet-On-Advanced.

Quelle: Clontech

C.12 Referenzsequenzen

Tab. 4: Referenzsequenzen der verwendeten cDNAs.

Bezeichnung der cDNA	Genbank-Nummer
Humanes RasGRP4 (Isoform a)	AF448437.1
Murines RasGRP4 (Isoform X)	BC146526.1
eYFP	AAQ96629.1

D Methoden

D.1 Mikrobiologie

D.1.1 PCR

Um cDNA in Expressionsplasmide zu klonieren, wurden die entsprechenden Sequenzen mittels präparativer PCR amplifiziert und spezifische Restriktions-Schnittstellen am 5' und am 3' Ende eingeführt. Die hierzu verwendeten Primer codieren neben ca. 20 komplementären Basen des Amplifikats die Sequenz der anzufügenden Restriktions-Schnittstelle. Da es bei der präparativen PCR auf größtmögliche Genauigkeit ankommt, wurde eine Proofreadingpolymerase (Phusion Flash, Thermo Fisher Scientific) mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 9.5×10^{-7} Basen verwendet. Die jeweils 50 μl Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 10 ng Template
- je 0,5 μM Primer (fwd/ rev)
- 25 μl Phusion Flash Polymerasemix
- H₂O ad 50 μL

Die anschließende PCR wurde unter Verwendung folgender Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Tab. 5 Reaktionsbedingungen der PCR

Initiale Denaturierung	98 °C 10 s	} 35 Zyklen
Denaturierung	98 °C 1 s	
Hybridisierung	61 °C 5 s	
Elongation	72 °C 15 s (eYFP)	
	72 °C 45 s (RasGRP4)	
Finale Elongation	72 °C 1 min	
Pause	4 °C	

Nach erfolgter PCR wurden die Produkte mittels Gelelektrophorese im Agarosegel (1 %) entsprechend ihrer Größe getrennt. Anschließend wurde die Bande mit der entsprechenden DNA-Fragmentgröße aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gel Elution Kit (miniElute, Qiagen) von Gelrückständen befreit.

D.1.2 Restriktionsverdau

Zur Vorbereitung der Ligation, sowie zu analytischen Zwecken nach erfolgter Ligation und Amplifikation der Plasmide, wurden sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Amplifikate mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

- 1 µl DNA Lösung
- 1 µl Reaktionspuffer
- 1 µl 10 x BSA
- 1 µl Enzym 1
- 1 µl Enzym 2
- ad 10 µl H₂O

Aufgrund unterschiedlicher Enzymaktivitäten in verschiedenen Puffern wurden für die verwendeten Enzymkombinationen folgende Puffer gewählt:

- | | |
|----------------|---------|
| HindIII + NotI | → NEB 2 |
| NotI + XbaI | → NEB 3 |
| DpnI | → NEB 1 |

Die Proben wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, die Endonukleasen anschließend für 20 Minuten bei 65 °C Hitze-inaktiviert und die Fragmente anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (1 %) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

D.1.3 Ligation

Zur Ligation von cDNA-Fragmenten mit den Expressionsplasmiden wurde eine T4-DNA Ligase (Roche, Penzberg) verwendet. Folgende Reaktionsansätze wurden hierzu bei 16 °C über Nacht inkubiert:

Tab. 6: Reaktionsansätze zur Ligation

	eYFP (750Bp→1:3)	RasGRP4 (2,3Kbp→1:2)
Insert	0,8 ng	1,7 ng
Vektor	1 ng	1 ng
Puffer	3 µl	3 µl
T4-Ligase	1 µl	1 µl
Ad aqua	10 µl	10 µl

D.1.4 Transformation von Bakterien

Nach erfolgter Ligation der Plasmide wurden elektrokompetente *E. coli* TOPO 10F' mit den entstandenen Plasmiden transformiert. Hierzu wurden 100 µl der Bakteriensuspension mit 10 µl des Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Überführung des Gemisches in eine gekühlte Elektroporationsküvette erfolgte die Transformation durch einen mit dem Elektroporator erzeugten Impuls (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV).

Unmittelbar im Anschluss wurde die Bakteriensuspension in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC Medium überführt und bei 37 °C und 100 rpm für 1 Stunde inkubiert. Abschließend wurden zwei Fraktionen (50 µl und 100 µl) der Suspension auf LB-Agar Nährböden mit 50 µg/ml Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

D.1.5 DNA-Extraktion aus Bakteriensuspensionen

Zur Extraktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakteriensuspensionen wurden im analytischen Maßstab das QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen) und im präparativen Maßstab das QIAprep Maxiprep Kit (Qiagen) nach Herstelleranweisung verwendet.

D.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Molekülgröße wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wird 1 % Agarose in 1x TAE Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenofen gelöst und nach Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegeben. Anschließend wird ein Probenkamm eingesetzt und das Gel bei Zimmertemperatur durch Abkühlung ausgehärtet. Nach Entfernung des Probenkammes und Zugabe von 1x TAE Puffer in die Elektrophoresekammer können die einzelnen mit DNA-Loading-Dye versetzten Proben in die Probenkammern des Agarosegels aufgetragen werden. Nach Anlage

einer Spannung von 100 V wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode, wobei kleinere DNA-Moleküle schneller wandern als die größeren. Anhand eines aufgetragenen DNA-Größenstandards kann die Molekülgröße abgeschätzt werden.

D.1.7 Zielgerichtete Mutagenese

Zum Austausch einzelner Basenpaare in Plasmid DNA wurde das Quick Change Mutagenese Kit (Stratagene) verwendet. Das Kit nutzt PCR mit jeweils einem Sense- und einem Antisense-Primer, die die gewünschte Mutation mittig tragen. Beim Primerdesign müssen die vom Hersteller vorgegebenen Parameter wie Schmelztemperatur ($T_m > 78\text{ °C}$) und Länge (25-40 Bp) beachtet werden. Für die PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

- 50 ng Template
- je 125 ng Primer (fwd/rev)
- 1 μ l Phusion Flash Polymerasemix
- 5 μ l 10x Reaktionspuffer
- H₂O ad 50 μ L

Tab. 7: Reaktionsbedingungen der PCR.

Initiale Denaturierung	95 °C 30 s	} 12 Zyklen
Denaturierung	95 °C 30 s	
Hybridisierung	55 °C 1 min	
Elongation	68 °C 7 min	

Nach Abschluss des letzten Zyklus wurde das Reaktionsgefäß für zwei Minuten auf Eis gekühlt und anschließend das Restriktionsenzym DpnI zugegeben. Dieses Restriktionsenzym schneidet methylierte DNA und entfernt damit Reste des paternalen Plasmids aus dem Ansatz. Daraufhin wurden die mitgelieferten XL-Blue Supercompetent *E. coli* Zellen mit den übriggebliebenen linearen DNA-Fragmenten transformiert. Dieser Stamm ist in der Lage, die linearen Fragmente wieder zu zirkulären, replikationsbereiten Plasmiden zu ligieren. Mittels antibiotischer Selektion (Ampicillin) und Dreiösenausstrich wurden einzelne Bakterienklone selektiert, die Plasmid-DNA mittels miniPrep isoliert und die Mutagenese durch DNA-Sequenzierung (Eurofins, Martinsried) überprüft.

D.1.8 DNA-Sequenzierung

Alle hergestellten Expressionsplasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung (Eurofins, Martinsried) verifiziert. Zur Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet:

pcDNA3.1hygro(+) fwd; T7
5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

pcDNA3.1hygro(+) rev; BGH
5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3'

Zur Sequenzierung der pTRE-tight Plasmide wurden die in Tab. 11 aufgeführten Insert-spezifischen Primer verwendet.

D.2 Zellkultur

D.2.1 Kultivierung von HMC-1 Zellen

Die humane Mastzelllinie HMC-1 wurde in IMDM-Medium mit 10 % FCS und 1,2 mM α -Thioglycerol im Inkubator bei 37 °C und 7 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurden die Kulturen wöchentlich mit frischem Medium auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Auf die Zugabe von Antibiotika wurde verzichtet. Regelmäßige Mycoplasmentests verliefen negativ.

D.2.2 Bestimmung der Zellkonzentration

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Kulturen der Suspensionszelllinie HMC-1 zunächst sorgfältig resuspendiert, um Verklumpungen zu lösen. Im Anschluss wurden 30 μ l der Suspension in 6 ml isotonischem Messpuffer verdünnt (1:200). Nach drei automatischen Einzelmessungen im Casy-Zellzählgerät wurde der Mittelwert der Messungen für einen definierten Zellgrößenbereich (HMC-1 und Hek-293 = 10-50 μ m) in Zellen/ml ausgegeben.

D.2.3 Einfrieren von HMC-1 Zellen

Die Zellzahl von HMC-1 Kulturen wurde wie oben beschrieben bestimmt und Aliquots bei 190 g für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden nun in 1ml-Portionen in Kryoröhrchen (Merck, Darmstadt) über 24 h bei -80 °C unter zu Hilfenahme einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe langsam tiefgefroren. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitkonservierung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

D.2.4 Auftauen von HMC-1 Zellen

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden die jeweiligen Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und auf Trockeneis zum Zellkulturarbeitsplatz gebracht. Hier wurden die Zellen nun rasch im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 9 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert. Um alle Reste des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu entfernen wurden die Zellen nach einer 6 stündigen Equilibrierungsphase erneut zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert.

D.2.5 Kultivierung von HMC-1-TetOn Zellen (HMC-T-1)

Die im Rahmen des Projekts etablierten Transaktivator-exprimierenden Zellen (HMC-T-1) wurden analog den HMC-1-wt Zellen kultiviert. Dabei wurden dem Medium ein garantiert Tetrazyklin-freies bovines Serum (PAA, Coelbe) und 400 µg/ml Neomycin zugesetzt.

D.2.6 Kultivierung von Hek-293 Zellen

Die adhärent wachsende Zelllinie Hek-293 wurde in DMEM mit 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen zunächst zweifach mit 37 °C warmem, sterilem PBS gewaschen und anschließend für 2 Minuten mit Trypsin/EDTA Lösung von den Zellkulturflaschen gelöst. Anschließend erfolgte die Resuspension im Verhältnis 1/10 in frischem Medium.

D.3 Transfektion

D.3.1 Transfektion von Hek-293 Zellen

Zur Transfektion der Hek-293 Zellen wurde das in der Arbeitsgruppe für diese Zelllinie bereits etablierte Verfahren der Lipofektion gewählt. Nach Aussaat von 2 x 10⁵ Zellen je Vertiefung einer 12-well Platte wurden die Zellen 48 h kultiviert und nach Mediumwechsel wie folgt mit Lipofectamin 2000 (Thermo Fisher Scientific) transfiziert.

Zunächst wurden jeweils 6 µl Lipofectamin mit 94 µl Transfektionsmedium gemischt. Ebenfalls wurden jeweils 3 µg Plasmid-DNA in 100 µl Transfektionsmedium verdünnt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden die 100 µl Lipofectamingemisch auf das DNA-Gemisch gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Reagenz vorsichtig auf die mit 1 ml Medium benetzten Zellen gegeben und die Zellen anschließend für 48 h bebrütet.

D.3.2 Transfektion von HMC-1 Zellen

Die Transfektion von HMC-1 Zellen erfolgte analog zur Transfektion von Hek-293 Zellen. Im Gegensatz zu Hek-293 Zellen wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen transfiziert.

D.3.3 Selektion stabiler Transfektanden

Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurden die transfizierten Zellpopulationen mit einem dem jeweiligen Expressionsplasmid entsprechenden Selektionsantibiotikum kultiviert. Die dazu benötigte Konzentration wurde für jedes Antibiotikum in Vorversuchen ermittelt (s. E.1.4 und E.2.2). Die Dauer der Inkubation richtete sich nach den Eigenschaften des Antibiotikums sowie deren zu beobachtender zytotoxischer Wirkung. Nach anfänglicher Depression der Zellproliferation und einer optisch avital wirkenden Zellpopulation bildeten sich unter Selektionsdruck nach 3 bis 5 Wochen einzelne optisch wahrnehmbare Zellpopulationen. Zu diesem Zeitpunkt konnte von erneut stabil stattfindendem Zellwachstum unter Selektionsdruck ausgegangen werden, sodass die Population unter Verwendung von Verdünnungsreihen vereinzelt und klonal expandiert wurde.

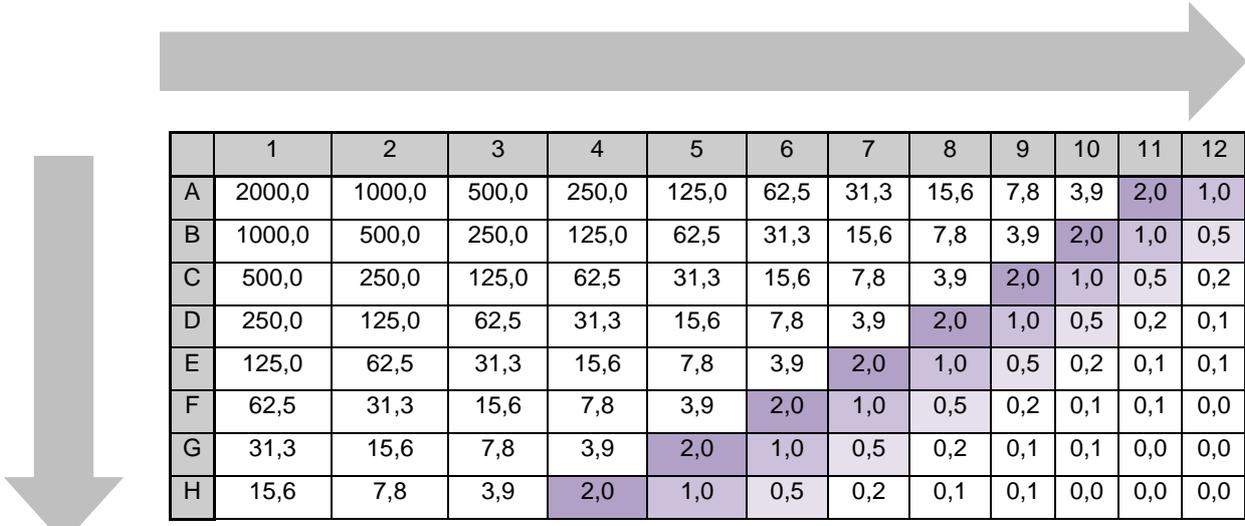
D.3.4 Subklonierung stabiler Transfektanden

Zur Subklonierung der stabilen Transfektanden wurde die Methode des „limited dilution cloning“ verwendet. Dazu wurden die Transfektanden unter ständiger Selektion mittels Verdünnungsreihen in 96-well Platten vereinzelt. Dem hierfür verwendeten Medium wurde zuvor 25 % spent Medium und die benötigte Konzentration des jeweiligen Selektionsantibiotikums zugefügt.

Zu Beginn des Verdünnungsverfahrens wurden alle Vertiefungen mittels 8- oder 12-Kanalpipette mit 100 μ l Mediumgemisch befüllt und eine Zellsuspension von 1×10^4 Zellen/ ml hergestellt. Anschließend wurden 100 μ l dieser Zellsuspension in die erste Vertiefung links oben auf der Platte gegeben. Die hierin enthaltenen 4000 Zellen in 200 μ l Medium wurden durch Entnahme von 100 μ l in die darunterliegende Vertiefung halbiert. Dieser Schritt wurde bis zur Entnahme von 100 μ l aus der untersten Vertiefung fortgesetzt. Die überschüssigen 100 μ l aus dem untersten Well wurden verworfen. Nachdem die zuvor präparierte Reihe mit der 8-Kanal Pipette mit 100 μ l frischem Medium befüllt wurde, wurden nach gründlicher Verdünnung erneut 100 μ l

Medium entnommen. Dieser Schritt wurde in allen 12 Reihen von links nach rechts nacheinander durchgeführt. Abschließend wurden alle Wells mit jeweils 100 µl frischem Medium aufgefüllt und die Platte zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Am Folgetag wurden die jeweiligen Wells lichtmikroskopisch auf Einzelzellklone überprüft.

Abb. D.3.1 zeigt schematisch die Versuchsanordnung mit der errechneten Zellzahl pro Vertiefung.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2000,0	1000,0	500,0	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0
B	1000,0	500,0	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5
C	500,0	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2
D	250,0	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1
E	125,0	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,1
F	62,5	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0
G	31,3	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0
H	15,6	7,8	3,9	2,0	1,0	0,5	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

Abb. D.3.1: Schematische Darstellung der nach Verdünnungsreihen erwarteten Zellkonzentration pro Well.

D.3.5 Ernte der Einzelzellklone

Nach ausreichender Proliferation der Einzelzellklone wurden diese im wöchentlichen Abstand in jeweils größere Kulturvolumina überführt. Anschließend wurden die Klone mittels Immunelektrophorese oder Durchflusszytometrie auf die Expression des rekombinanten Proteins überprüft.

D.4 Immunelektrophorese

D.4.1 Herstellung der Zelllysate

D.4.1.1 Herstellung von Hek-293-Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten für die Analyse im Immunblot wurden die Hek-293-Kulturen zunächst zweifach mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit Trypsin/EDTA Lösung von der Zellkulturschale abgelöst. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet erneut mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 2x Tris-

Glycin-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten auf 100 °C erhitzt. Abschließend wurden die Proben mittels Ultraschallnadel behandelt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

D.4.1.2 Herstellung von HMC-1- und HMC-T-1-Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Suspensionszellen zunächst zweifach durch Zentrifugation und Resuspension mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu D.4.1.1.

D.4.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen wurden jeweils 20 µl Zelllysate-Probenpuffergemisch pro Probentasche der 4-20 % Tris-Glycin-Gradientengele (Anamed) aufgetragen. Als Größenstandard wurde der Magic Mark XP Marker (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach Einspannen der Gele in die Gelapparatur und Befüllen der Gelelektrophoresekammer mit Tris-Glycin Laufpuffer wurden die Proteine bei 225 V für 60 bis 90 Minuten aufgetrennt, bis die Markerbande das Gelende erreicht hatte.

D.4.3 Proteintransfer auf PVDF Membranen

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine zur immunologischen Detektion auf eine PVDF Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran zunächst einige Sekunden mit Methanol aktiviert, in destilliertem Wasser gewaschen und in 1x Pierce Semi-Dry Transferpuffer (Thermo Fisher Scientific) equilibriert. Gleichzeitig wurde das Polyacrylamidgel zweimal in destilliertem Wasser gewaschen und für 10 Minuten in Pierce Semi-Dry Transferpuffer (1x) equilibriert. Anschließend wurden Gel und Membran in direktem Kontakt zueinander nach Herstellerangabe in die Pierce Fast Western Transfer Einheit eingespannt (s. Abb. D.4.1). Der Transfer erfolgte für 10 Minuten bei einer angelegten Spannung von 25 V.

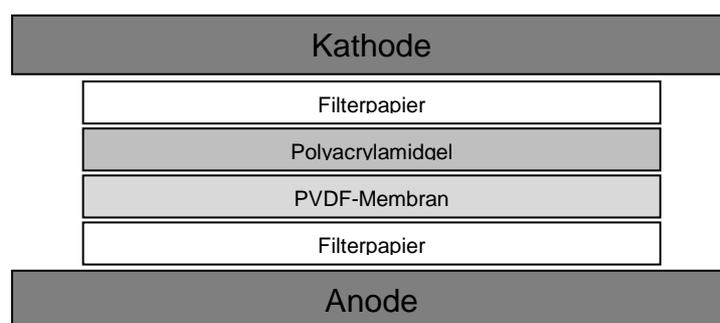


Abb. D.4.1: Schematischer Aufbau der Transferapparatur.

D.4.4 Immunologischer Proteinnachweis

Um die zuvor auf die PVDF Membran übertragenen Proteine immunologisch nachzuweisen wurden die Membranen zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBST mit 5 % Magermilchpulver unter ständigem Rütteln inkubiert. Hiermit wurden die freien Membranbindungsstellen blockiert. Nach Abgießen des Milchpuffers wurde die Membran für eine Stunde mit dem Erstantikörper gegen das zu detektierende Antigen inkubiert. Nach Waschen mit PBST wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert (s. Tab. 8.)

Tab. 8: Übersicht über die einzelnen Reaktionsschritte des Immunblots.

Reaktionsschritt	Reagenz	Zeit
Inkubation mit erstem Antikörper zur Detektion des gesuchten Proteins	Verdünnt in PBST (i.d.R. 1:1000)	1 Stunde, gerüttelt
Dreimaliges Waschen	PBST	3 x 5 Minuten, gerüttelt
Inkubation mit dem Sekundärantikörper	Verdünnt in PBST (1:10000)	1 Stunde, gerüttelt
Zweimaliges Waschen	PBST	2 x 5 Minuten
Einmaliges Waschen	PBS	Mind. 10 Minuten

Anschließend wurde die gründlich gewaschene Membran vorsichtig auf Filterpapier von überschüssigem PBS befreit und anschließend in eine Entwicklungskassette eingelegt. Nach einminütiger Inkubation mit der ECL-Substratlösung wurde die Membran mit einer Klarsichtfolie abgedeckt um einen direkten Kontakt zwischen Membran und Röntgenfilm zu vermeiden. Die Detektion, Entwicklung und Fixierung der Filme wurde in der Dunkelkammer streng nach den Herstellerangaben der einzelnen Komponenten durchgeführt.

D.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem Epics XL (Beckmann Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die Wellenlänge des Lasers beträgt 488 nm, neben dem Side Scatter (SSC) und dem Forward Scatter (FSC) können bis zu 4 Fluoreszenzsignale erfasst werden. Neben Propidiumiodid (Em nach DNA-Interkalierung 617 nm) wurde die Fluoreszenz des in Fusionsproteinen verwendeten eYFP detektiert, das Emissionsmaximum liegt hier bei 527 nm. Die verwendeten Grundeinstellungen des Durchflusszytometers Epics XL sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Grundeinstellungen des Durchflusszytometers Epics XL.

	FSC	SSC	FL 1	FL 2	FL 3	FL 4	AUX
Voltage	50	1000	500	641	541	375	505
Integral	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	10.0
	FSC	SSC	FL 1	FL 2	FL 3	FL 4	AUX
Discriminator	100	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
	FL 1	FL 2	FL 3	FL 4			
FL 1		0	0.3	0			
FL 2	0		0	0			
FL 3	45	0		0			
FL 4	0	0	0				
Laser Power (mW)	15.00						

D.5.1 Durchflusszytometrische Messungen

Zur Analyse wurden jeweils 500 µl Zellsuspension in Medium verwandt. Die Suspension wurde mittels mehrfachen Pipettierens durchmischt, in die dafür vorgesehenen Probenröhrchen gefüllt und anschließend für 5 Minuten mit 5 µl 10 M Propidiumiodid inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung mit gleichzeitiger Ergebnisauswertung. Die Rohdaten der Messungen werden im sogenannten Flowchart dargestellt. Neben einer Darstellung der gemessenen Daten in tabellarischer Form werden die Messwerte graphisch in Blots ausgegeben. Die gemessenen Rohdaten enthalten Events in den Kanälen:

SS	Side Scatter
FS	Forward Scatter
FL 1	Fluoreszenzkanal 1 (eYFP)
FL 2	Fluoreszenzkanal 2 (ungenutzt)
FL 3	Fluoreszenzkanal 3 (Propidiumiodid)
FL 4	Fluoreszenzkanal 4 (ungenutzt)

Alle ermittelten Rohdaten werden durch die Software in vorher definierte Gates eingeordnet. Hier werden z.B. Events, deren Signal keiner Zelle entspricht herausgerechnet oder einzelne Messwerte miteinander kombiniert wie z.B. eYFP

positiv + Propidiumiodid positiv = eYFP alive. Die für diese Arbeit verwendeten Gates sind in Abb. D.5.1 dargestellt.

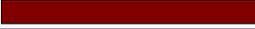
(F1)[Cells] eyfp-B8 00007187 2009-11-08.LMD : Legend				
Color	Stat	% Gated	% Total	Number
	alive	99.08	97.88	9788
	Egfp alive	98.95	97.75	9775
	dead	0.92	0.91	91
	Cells	100.00	98.79	9879
	Egfp dead	0.92	0.91	91

Abb. D.5.1: Tabellarische Übersicht über zuvor definierte Gates.

D.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zum visuellen Nachweis überexprimierter Proteine wurde entweder deren Eigenfluoreszenz (z.B. eYFP) oder alternativ die Bindung von fluoreszenten Antikörpern mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

D.6.1 Vorbereitungen zur Mikroskopie

Für die mikroskopische Untersuchung der in Suspension wachsenden Zellen wurden sog. Cytospins hergestellt. Dazu wurden jeweils ca. 5×10^4 Zellen in $200 \mu\text{l}$ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS aufgenommen und diese Proben mittels Zytocentrifuge bei 500 rpm für 10 Minuten auf Superfrost Objektträger zentrifugiert. Die auf den Objektträgern entstandenen Zellspots wurden anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

D.6.2 Immunfluoreszenz von HMC-1 Zellen

Zum visuellen, immunologischen Nachweis von Proteinen in der HMC-1 Zelllinie wurden die Zellen wie in D.6.1 beschrieben auf Objektträger zentrifugiert und anschließend in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem PBS gewaschen. Nach Fixierung mit einem Aceton-Glyoxalgemisch, Permeabilisierung mit 0,05 % Tween und Blockade freier Bindungsstellen mit 3 % BSA wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach abschließender Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Objektträger mit DAPI enthaltendem Mounting Medium zur Kernfärbung und Signalverstärkung eingebettet (s. Tab. 10). Anschließend erfolgte die Untersuchung der Proben im Fluoreszenzmikroskop.

Tab. 10: Übersicht über die Arbeitsschritte der Immunfluoreszenz.

Inkubationsschritt	Reagenz	Inkubationsdauer
Fixierung	Aceton 50 ml/ Glyoxal 250 μ l	30 Sekunden
Waschen	PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei)	3x 5 Minuten
Permeabilisierung	0,05 % Tween in PBS	15 Minuten
Waschen	PBST	2x kurzzeitig eintauchen
Blockierung freier Bindungsstellen	3 % BSA in PBS	30 Minuten bei RT
Detektion des Zielantigens	Primärantikörper in PBS + 1 % BSA	1 Stunde bei RT
Waschen	PBST	3x 5 Minuten
Detektion der gebundenen Primärantikörper	Sekundärantikörper in PBS + 1 % BSA	1 Stunde bei RT im Dunkeln
Gegenfärbung/ Konservierung/ Signalverstärkung	Mounting Medium mit DAPI	Auftragen und mit Deckglas bedecken, härtet an der Luft aus

E Ergebnisse

E.1 Konstitutive Expression von humanen und murinen RasGRP4- sowie RasGRP4-eYFP-Fusionsproteinen in HMC-1 Mastzellen

E.1.1 Konstruktion und Klonierung der Expressionsvektoren

Zur Untersuchung des Einflusses von RasGRP4 auf die Mastzelllinie HMC-1 mittels konstitutiver Überexpression wurden zunächst die dafür notwendigen Expressionskonstrukte bzw. -vektoren hergestellt. Als Expressionsvektor wurde das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte und erfolgreich zur Transfektion von HMC-1 Zellen verwendete Plasmid pcDNA3.1Hygro(+) (Thermo Fisher Scientific) verwendet, das als Selektionsmarker zur stabilen Transfektion eine Hygromycinresistenz kodiert und zur starken Überexpression des Zielgenes einen Cytomegalievirus (CMV) Promoter besitzt. Neben den Expressionsplasmiden pcDNA3.1Hygro(+)-humanesRasGRP4 (pcDNA3.1-hRasGRP4) und pcDNA3.1Hygro(+)-murinesRasGRP4 (pcDNA3.1-mRasGRP4) wurden auch Expressionsplasmide für RasGRP4-eYFP Fusionskonstrukte hergestellt (pcDNA3.1-hRasGRP4-eYFP, pcDNA3.1-mRasGRP4-eYFP), um die Transfektions- und Expressionseffizienzen zu analysieren. Zudem wurde ein pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP (pcDNA3.1-eYFP) Kontrollplasmid gefertigt. Abb. E.1.1 zeigt den schematischen Aufbau der verschiedenen Expressionskonstrukte.

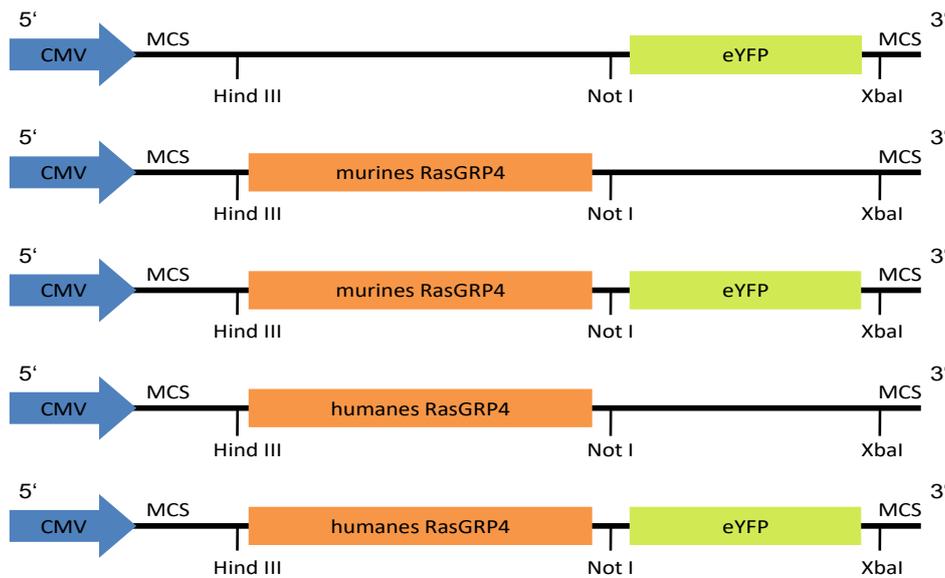


Abb. E.1.1: Schematische Darstellung der eYFP-, RasGRP4- und RasGRP4-eYFP-Fusionskonstrukte.

Zur Klonierung der humanen und der murinen RasGRP4-cDNA sowie der eYFP-cDNA wurde die humane RasGRP4-Isoform a und die murine Isoform 1, die im pcDNA3.2-V5dest-Gateway Vektor vorlag (Thermo Fisher Scientific), sowie ein in der Arbeitsgruppe vorhandenes pcDNA3.1Hygro(+)-Tryptase-eYFP Plasmid mittels PCR mit Hilfe der in Tab. 11 dargestellten Primern amplifiziert und dabei 5' sowie 3' Restriktionsschnittstellen eingeführt.

Tab. 11: Übersicht über die zur PCR-Amplifikation verwendeten Primer und die eingeführten Restriktionsschnittstellen.

Zielgen	Restriktions-Enzym	Primersequenz
eYFP-fwd	NOT I	5' ATA GCG GCC GCA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG 3'
eYFP-rev	XbaI	5' ATA TCT AGA TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC 3'
RasGRP4-fwd	HIND III	5' GTT AAG CTT CAA GTT TGT ACA AAA AAG CAG 3'
RasGRP4-rev	NOT I	5' ATA GCG GCC GCA ACC ACT TTG TAC AAG AAA GCT 3'

Nach der präparativen PCR und Reinigung mittels Gelelektrophorese wurden die Amplifikate sowie der native pcDNA3.1-Hygro(+) Expressionsvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (s. D.1.2) und anschließend erneut mittels Agarosegelelektrophorese aus dem Ansatz isoliert. Anschließend wurden die RasGRP4- bzw. eYFP-Fragmente und das linearisierte pcDNA3.1Hygro(+) Plasmid ligiert und zur Transformation von *E. coli* verwendet. Nach Dreiösenausstrich wurden

Einzelzellklone auf das Vorhandensein intakter Expressionsplasmide untersucht. Abb. E.1.2 zeigt die Gelelektrophorese nach analytischem Restriktionsverdau der pcDNA3.1-hRasGRP4- und pcDNA3.1-hRasGRP4-eYFP-Plasmide. Neben den nicht verdauten zirkulären Plasmiden (Spur 1, 5 und 9) sind die linearisierten Plasmide aufgetragen, die im Agarosegel etwas langsamer laufen (Spur 2-4, 6 und 7, 10 und 11). In den Spuren 8, 12 und 13 sind neben den linearisierten Plasmiden auch die aus dem Polylinker herausgeschnittenen hRasGRP4- (8), hRasGRP4-eYFP (12,13) und eYFP-cDNA (13) abgebildet.

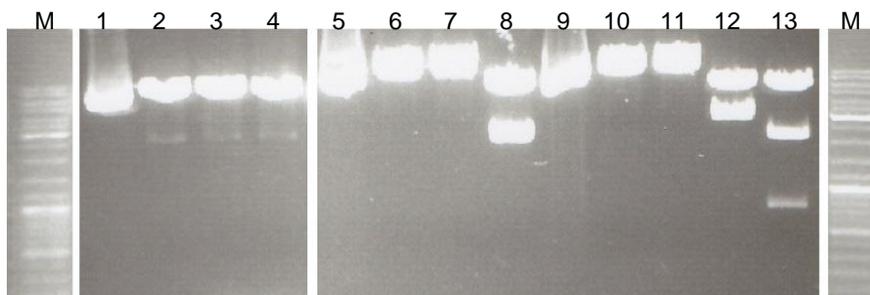


Abb. E.1.2: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau: pcDNA3.1Hygro(+), pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4 und pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP

Tab. 12: Gelelektrophorese-Proben in Abb. E.1.2.

Bande	Plasmid	Enzym I	Enzym II	Enzym III
1	pcDNA3.1Hygro(+)/leer	X	X	
2	pcDNA3.1Hygro(+)/leer	XbaI	NotI	
3	pcDNA3.1Hygro(+)/leer	HindIII	NotI	
4	pcDNA3.1Hygro(+)/leer	HindIII	XbaI	
5	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4	X	X	
6	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4	HindIII	X	
7	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4	NotI	X	
8	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4	HindIII	NotI	
9	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP	X	X	
10	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP	HindIII	X	
11	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP	XbaI	X	
12	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP	HindIII	XbaI	
13	pcDNA3.1Hygro(+)/hRasGRP4-eYFP	HindIII	XbaI	NotI
M	Marker	X	X	X

Nach Überprüfung der hergestellten Expressionsvektoren mittels analytischem Restriktionsverdau und Gelelektrophorese wurden alle Plasmide sequenziert (Eurofins, Martinsried) und somit Insertionen, Deletionen und Punktmutationen ausgeschlossen. Die jeweiligen *E. coli* Einzelzellklone wurden zur Langzeitaufbewahrung bei -196 °C gelagert.

E.1.2 Mutagenese der hRasGRP4-cDNA

Zur transgenen Expression des hRasGRP4-eYFP Fusionsproteins musste das in der hRasGRP4-cDNA vorhandene Stopcodon entfernt werden. Hierzu wurde das „Site Directed Mutagenesis“ Kit (Stratagene) entsprechend dem in D.1.7 beschriebenen Protokoll mit folgende Primern verwendet:

fwd: 5' C TCC AAG CTG GAT TCC **TCG** AAC CCA GCT TTC TTG T 3'

rev: 5' A CAA GAA AGC TGG GTT **CGA** GGA ATC CAG CTT GGA G 3'

Nach der Mutagenese wurden die Plasmide erneut sequenziert und so der Austausch des Stopcodons gegen ein Serin Codon verifiziert (Abb. E.1.3).

	2260		2270		2280
wt-hRasGRP4	C A A G C T G G A T T C C T A			G A A C C C A G C T T T C T T	
wt-hRasGRP4-mut	C A A G C T G G A T T C C T C			G A A C C C A G C T T T C T T	

Abb. E.1.3: Vergleich der hRasGRP4-DNA-Sequenzen vor und nach Mutagenese. Die Sequenz des hRasGRP4-eYFP-Plasmids nach Mutagenese wurde in silico mit der Referenzsequenz verglichen. Es zeigt sich ein erfolgreicher Basenaustausch und somit eine Änderung des Stopcodons in ein Serincodon.

E.1.3 Überprüfung der korrekten Konstruktion und der Expression der Expressionsvektoren durch immunologischen Nachweis

Zur Überprüfung der korrekten Konstruktion und Expression der RasGRP4 Fusionsproteine wurden Hek-293-Zellen transient mit den pcDNA3.1Hygro(+)-Expressionsvektoren transfiziert und nach 48 Stunden eYFP sowie humanes und murines RasGRP4 mittels Immunblot detektiert. Durch den Anti-eGFP-Antikörper (Roche, Penzberg) wurden Proteine mit korrekter Masse für eYFP (ca. 27 kDa), humanes RasGRP4-eYFP (ca. 100 kDa) und murines RasGRP4-eYFP (ca. 100 kDa) detektiert (Abb. E.1.4 a). Humanes RasGRP4 und humanes RasGRP4-eYFP wurden durch den Anti-humanes-RasGRP4-Antikörper (Santa Cruz Biotech) (Abb. E.1.4 b), murines-RasGRP4 und das entsprechende eYFP-Fusionsprotein durch den Anti-murines-RasGRP4-Antikörper (Covalab) (Abb. E.1.4 c) detektiert. Die Antiseren zeigen keine Kreuzreaktivität in humanen Zellen. Die Anti-RasGRP4-Antikörper detektieren die Antigene Spezies-spezifisch. Ein weiterer Antikörper, der RasGRP4 Spezies-unabhängig detektieren soll, erbrachte kein Signal, sodass dieses Antiserum nicht verwendet wurde (Abb. E.1.4 d). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expressionsvektoren korrekt konstruiert und die Transgene in eukaryotischen Zellen mit korrekter Masse translatiert werden. Zur Detektion der Fusionsproteine ist der Anti-eGFP-Antikörper (Roche), zur Detektion von RasGRP4 und dem entsprechenden Fusionsprotein der jeweils Spezies-spezifische Anti-RasGRP4-Antikörper geeignet.

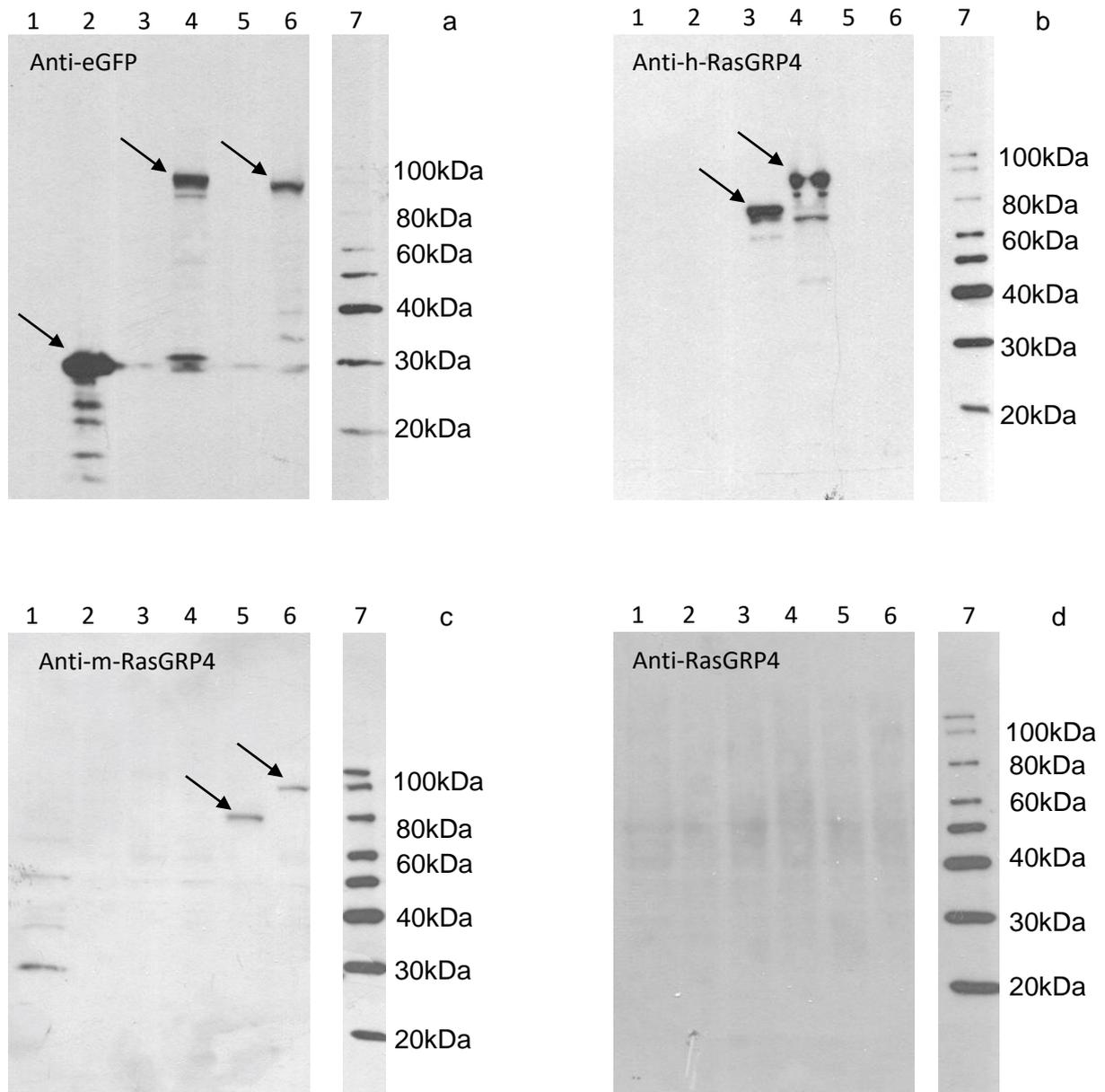


Abb. E.1.4: RasGRP4 und RasGRP4-Fusionsproteine im Immunblot. Detektiert wurde mit Anti-eGFP-Antikörper (a), Anti-humanes-RasGRP4-Antikörper (b), Anti-murines-RasGRP4-Antikörper (c) und Anti-RasGRP4-Antikörper (d).

Tab. 13: In Abb. E.1.4 verwendete Gelproben

Bande	Auftrag
1	Wt-HMC-1 Zellen
2	pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP in Hek-293
3	pcDNA3.1Hygro(+)-humanesRasGRP4 in Hek-293
4	pcDNA3.1Hygro(+)-humanesRasGRP4-eYFP in Hek-293
5	pcDNA3.1Hygro(+)-murinesRasGRP4 in Hek-293
6	pcDNA3.1Hygro(+)-murinesRasGRP4-eYFP in Hek-293
7	Größenstandard

E.1.4 Wirkung von Hygromycin B auf HMC-1 Zellen

Um die für eine Selektion stabiler Transfektanten notwendige Hygromycin B-Konzentration zu ermitteln wurde zunächst die Toxizität des Selektionsantibiotikums für die HMC-1 Zelllinie untersucht. Hierzu wurden HMC-1 Zellen ausgesät (10^5 Zellen/ml) und für fünf Tage mit Hygromycin B (0-800 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. An Tag 5 wurde die Zellzahl bestimmt und das Medium gewechselt. An Tag 10 und 17 wurde erneut die Zellzahl bestimmt (Abb. E.1.5).

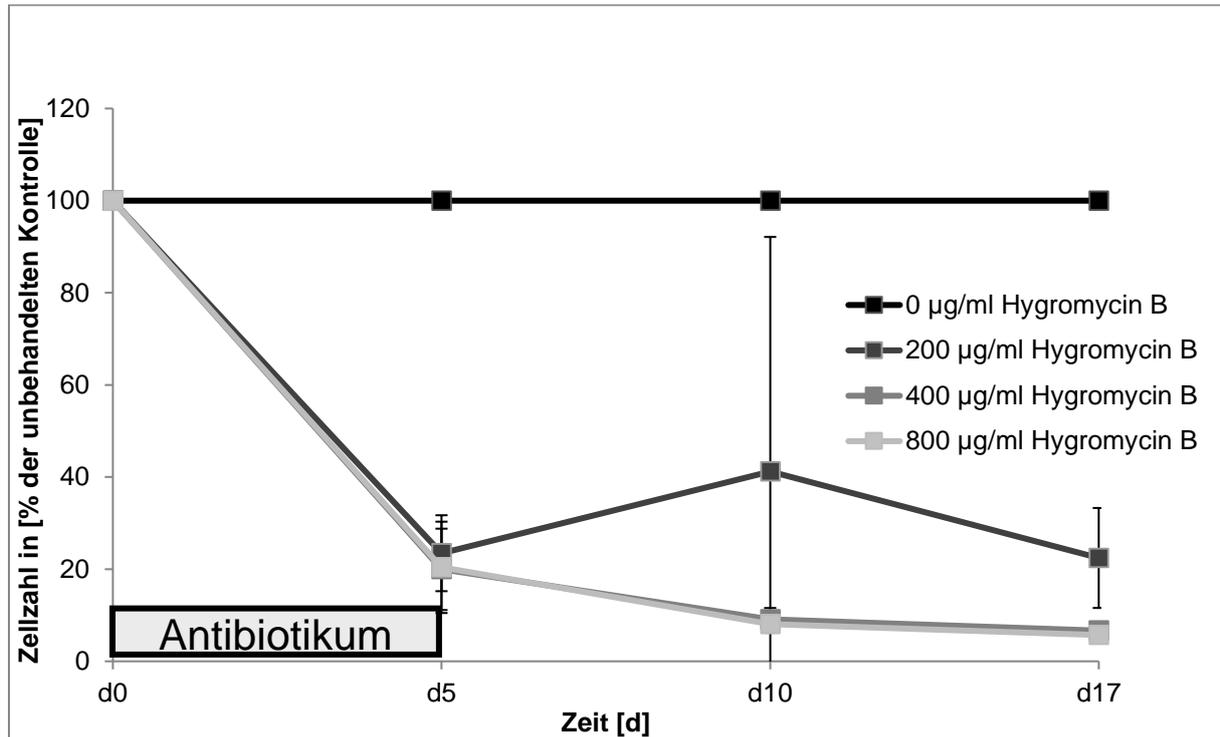


Abb. E.1.5: Dosis-Toxizitätskurve für Hygromycin B. Während Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums Hygromycin B wurde die Zellkonzentration jeweils an d 0, 5, 10 und 17 mittels Casy-Zellzählgerät bestimmt. Die Daten wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B einen vergleichsweise variablen Effekt auf die Zellen hat (s. große Standardabweichungen an d 10 und d 17 in Abb. E.1.5), während Konzentrationen ≥ 400 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B die Zellproliferation deutlich unterdrücken. Für die Selektion stabiler Transfektanten wurde daher eine Konzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B verwendet.

E.1.5 Transiente Transfektion

Um die Expression des murinen und des humanen RasGRP4 in HMC-1 Zellen zu untersuchen wurden die Zellen mit den pcDNA3.1Hygro(+)-h/mRasGRP4-eYFP Expressions-Plasmiden transient transfiziert (s. D.3.2). Neben den Vektoren, die für Fusionsproteine von hRasGRP4 und mRasGRP4 mit eYFP kodieren, wurde der leere Vektor, der pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP Vektor, sowie zwei Vektoren, die für Tryptase-eYFP-Fusionskonstrukte kodieren, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die eYFP-Fluoreszenz der Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. D.5) quantifiziert.

Die Transfektionseffizienz mit dem 6,3 kBp großen eYFP-Expressionsvektor ist mit $62 \pm 9 \%$ ($n=3$) in HMC-1 Zellen reproduzierbar. Die Transfektionseffizienzen aller Fusionskonstrukte liegen dagegen mit $12,5 \pm 1,7 \%$ und $11,3 \pm 1,2 \%$ ($n=3$) für die ca. 8,3 kBp großen h- und m-RasGRP4-eYFP-Vektoren sowie $14,3 \pm 4,4 \%$ und $19,41 \pm 2,88 \%$ ($n=3$) für die ca. 7,5 kBp großen β/γ -Tryptase-eYFP-Plasmide deutlich niedriger (Abb. E.1.6 a).

Die mittlere Fluoreszenz pro Zelle als Maß für das Ausmaß der Expression erreicht nach Transfektion mit dem eYFP kodierenden Vektor reproduzierbar Werte von 59 ± 17 RF ($n=3$). Deutlich niedriger liegen die Werte für h- und m-RasGRP4-eYFP mit $3,2 \pm 1,3$ RF und $3,7 \pm 0,6$ RF ($n=3$) sowie $2,57 \pm 0,45$ RF und $4,4 \pm 0,36$ RF ($n=3$) nach Transfektion mit β/γ -Tryptase-eYFP (Abb. E.1.6 b).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die transiente Transfektion der HMC-1 Zelllinie und die Expression von RasGRP4-eYFP Fusionsproteinen prinzipiell möglich ist. Die Transfektionsrate und das Ausmaß der Expression für die Fusionsproteine sind jedoch deutlich geringer als für eYFP. Analysen von RasGRP4 in HMC-1 Zellen nach transienter Transfektion erscheinen aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienzen und der geringen Expression problematisch.

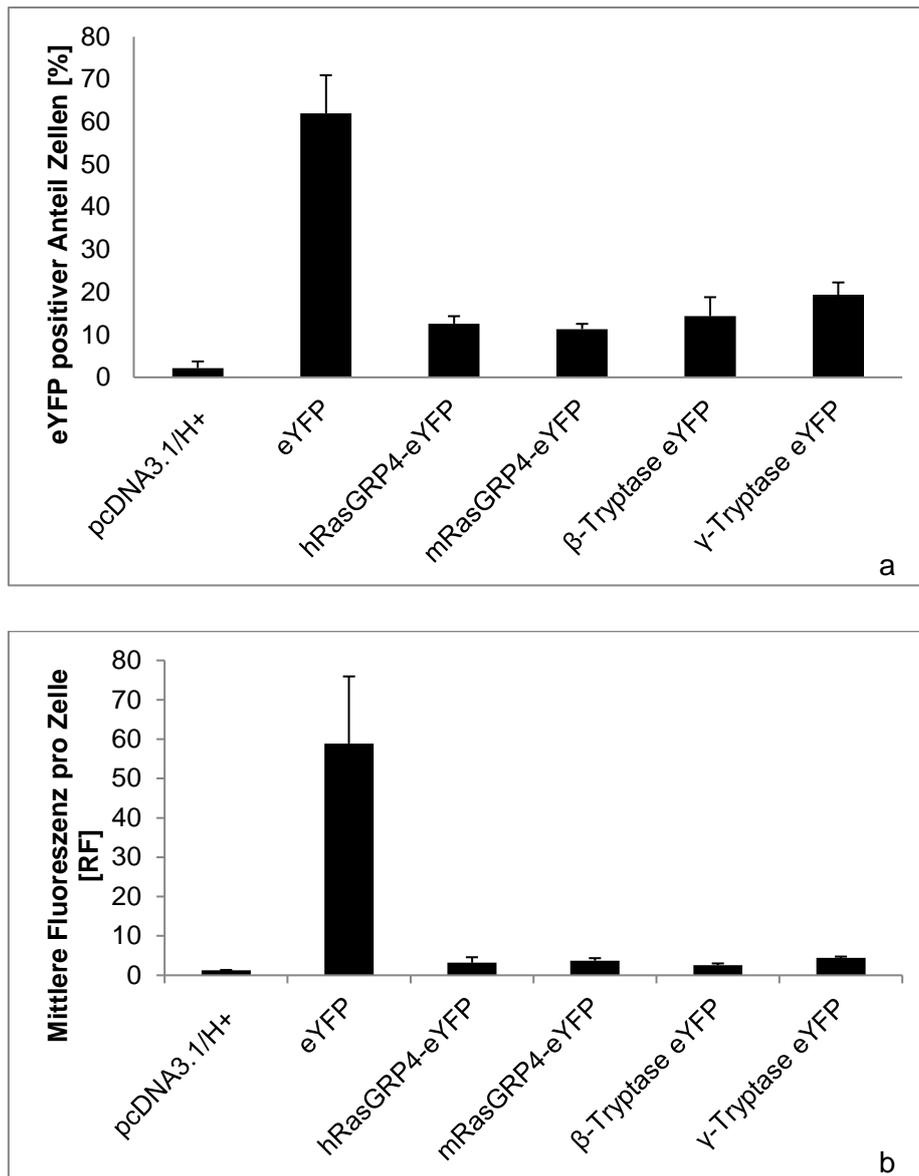


Abb. E.1.6: Transfektionseffizienzen mit verschiedenen Plasmiden in HMC-1 Zellen. Anteil eYFP-positiver Zellen (a) und mittlerer Fluoreszenz pro Zelle (b) nach Transfektion von HMC-1 Zellen mit dem pcDNA3.1/Hygro+ Plasmid bzw. verschiedenen Expressionskonstrukten in diesem Vektor. Die Fluoreszenz wurde 48 h nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt, n=3.

E.1.6 Stabile Transfektion

Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz und niedrigen Expression bei der transienten Transfektion der RasGRP4-eYFP-Konstrukte wurde versucht, stabile Transfektanten zu selektieren. Dazu erfolgte nach der transienten Transfektion (s. D.3.2) die Selektion mit Hygromycin B (400 μ g/ml). Der erste Mediumwechsel erfolgte an Tag 7. Anschließend wurde das Hygromycin B-freie Medium in wöchentlichem Abstand gewechselt. An den Tagen 2, 12, 30 und 46 wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtpopulation durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. E.1.7).

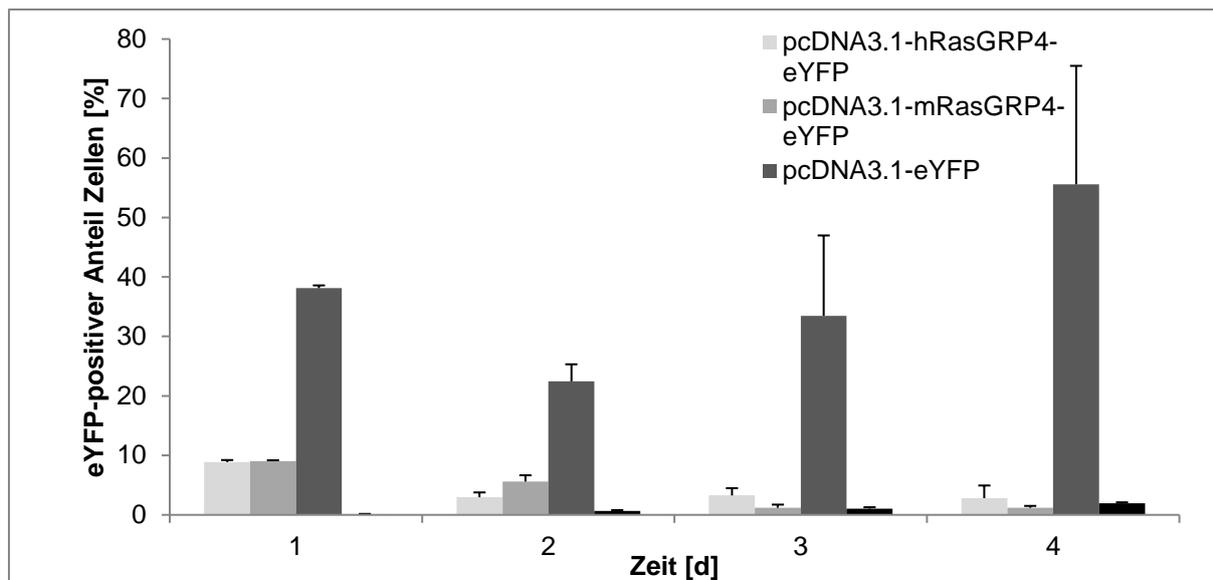


Abb. E.1.7: Entwicklung der Fluoreszenz transfizierter Zellen während der Selektion stabiler Transfektanden. (n=4)

Die an Tag 2 bestimmte Transfektionseffizienz lag für hRasGRP4-eYFP und mRasGRP4-eYFP transfizierte Zellen bei vergleichbaren $8,8 \% \pm 0,3 \%$ und $9,1 \% \pm 0,1 \%$ sowie bei $38,1 \% \pm 0,4$ nach Transfektion mit dem pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP-Plasmid. Diese Werte entsprechen weitgehend denen, die auch bei anderen transienten Transfektionen erzielt wurden (s. E.1.5). Nach der Transfektion mit pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP fällt der Anteil eYFP-positiver Zellen im Verlauf zunächst ab und steigt ab Tag 30 wieder an, als Zeichen der Selektion stabil transfizierter Zellen, die gegen das Selektionsantibiotikum resistent sind. Nach Transfektion mit pcDNA3.1Hygro(+)-hRasGRP4-eYFP und pcDNA3.1Hygro(+)-mRasGRP4-eYFP sinkt der Anteil eYFP positiver Zellen jedoch stetig, an Tag 46 sind nur noch ca. 1% der Zellen eYFP positiv. Die als Kontrolle mit dem nativen pcDNA3.1Hygro(+)-Vektor transfizierten Zellen zeigen keine Fluoreszenz.

Auch in weiteren Versuchen konnten keine stabilen hRasGRP4-eYFP- und mRasGRP4-eYFP-Transfektanden selektiert werden, während die Etablierung von stabilen eYFP und Tryptase-eYFP Fusionsprotein-exprimierenden Zellen als Kontrollen gelang. Es ist daher anzunehmen, dass humanes und murines RasGRP4 die Herstellung oder Purifikation stabiler Transfektanden negativ beeinflusst, in dem es z.B. die Differenzierung der Zellen erhöht und die Proliferation reduziert. Als Alternative zu einer stabilen, konstitutiven Expression wurde daher ein System zur induzierbaren Genexpression etabliert.

E.2 Doxyzyklin-induzierbare Genexpression in HMC-1 Zellen

Als Alternative zur konstitutiven Expression der RasGRP4-Fusionsproteine wurde ein System zur induzierbaren Genexpression in HMC-1 Zellen etabliert und Vektoren für eine transiente oder stabile induzierbare Expression der RasGRP4-Konstrukte hergestellt. Hierzu wurden die cDNAs von hRasGRP4, mRasGRP4 und eYFP sowie der RasGRP4-eYFP-Fusionskonstrukte in die Expressionsvektoren des Systems umkloniert. Anschließend wurden die minimal toxischen Konzentrationen der im System verwendeten Selektionsantibiotika Neomycin und Puromycin für die HMC-1 Zelllinie ermittelt. Nach Herstellung der Transaktivatorzelllinien durch stabile Transfektion des Plasmids pTet-On-Advanced und anschließende Subklonierung wurden die Zellen transient mit dem induzierbaren eYFP-Expressionsplasmid transfiziert, um deren Funktionalität zu überprüfen.

E.2.1 Klonierung induzierbarer Expressionskonstrukte

Für die Doxyzyklin-induzierbare Expression wurden die in Abb. E.2.1 schematisch dargestellten Plasmide kloniert. Hierzu wurden die pcDNA3.1-Expressionsplasmide mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten (s. D.1.2), die Expressionskassetten mittels Elektrophorese isoliert und in den Polylinker des induzierbaren Expressionsvektors pTRE-tight ligiert. Nach anschließender Transformation von *E. coli* (s. D.1.4) wurden die entstandenen Plasmide sequenziert (s. D.1.8). Neben dem korrekten Einbau der Konstrukte in den Polylinker des Vektors wurden die Sequenzen ohne Insertionen oder Deletionen bestätigt.

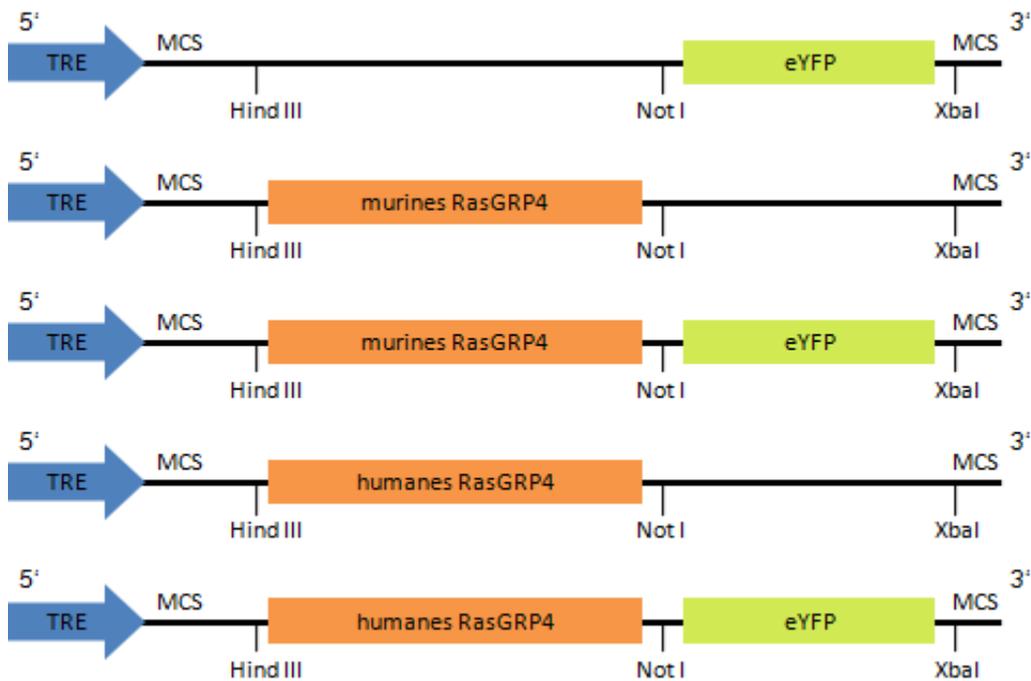


Abb. E.2.1: Schematische Darstellung der pTRE-tight-Expressionsplasmide. Die Expressionskassetten wurden in den Polylinker downstream des Tet-Response-Elements im Promoter kloniert.

E.2.2 Wirkung von Neomycin und Puromycin auf HMC-1 Zellen

Zur Selektion stabiler Transfektanden nach Transfektion mit dem Transaktivatorplasmid pTet-On-Advanced bzw. den pTRE-tight Folgeplasmiden wurden Dosis-Toxizitäts-Kurven mit den Selektionsantibiotika Neomycin (G418) und Puromycin erstellt (zum Vorgehen s. E.1.4). Konzentrationen $\geq 400 \mu\text{g/ml}$ Neomycin und $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ Puromycin reduzieren die Proliferation der HMC-1 Zelllinie dauerhaft (s. Abb. E.2.2 a und b). Diese Konzentrationen wurden deshalb im Folgenden zur Selektion stabiler Transfektanden eingesetzt.

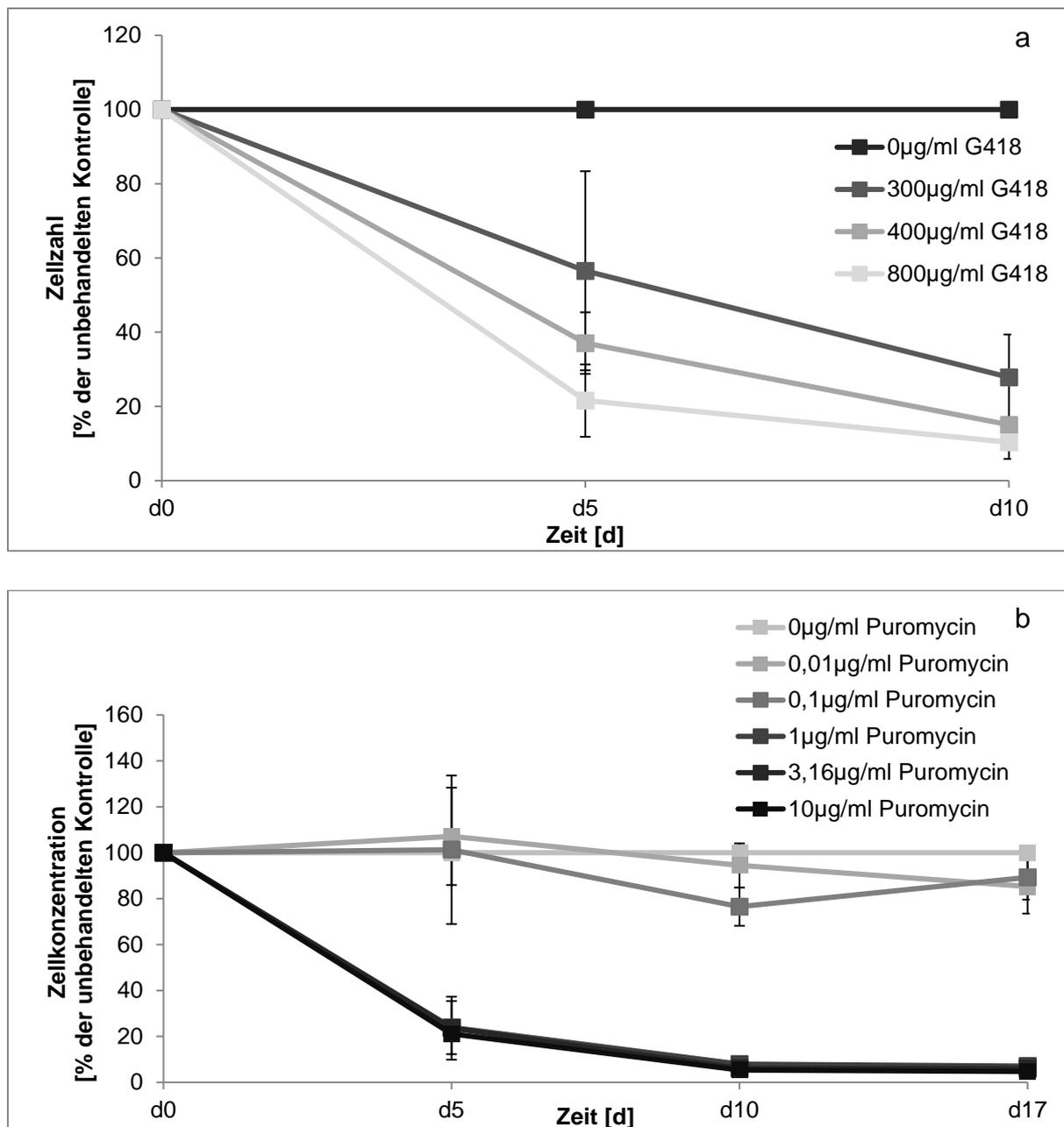


Abb. E.2.2 a und b: Dosis-Toxizitätskurve für Neomycin (a) und Puromycin (b). Die HMC-1 Zellen wurden an Tag 0 ausgesät (10^5 Zellen/ml) und mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Neomycin (a) bzw. Puromycin (b) für fünf Tage inkubiert. An Tag 5 wurde das Medium gewechselt, an Tag 5, 10 und 17 (b) wurde die Zellzahl bestimmt.

E.2.3 Herstellung von HMC-1-Transaktivatorzellen

E.2.3.1 Transfektion und Selektion

Zur Herstellung einer HMC-1-Transaktivatorzelllinie (HMC-T-1) wurden die Zellen mittels Lipofektion mit dem Transaktivatorplasmid pTet-On-Advanced transfiziert (s. D.3.2). Da das Transaktivatorplasmid kein Reportergen kodiert war eine Überprüfung der Transfektionseffizienz nicht möglich. Daher wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit Neomycin ($400 \mu\text{g/ml}$; s. E.2.2) selektioniert. Nach Erreichen einer

Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen pro ml wurden 9 klonale Zelllinien mittels „limited dilution cloning“ (s. D.3.4) hergestellt und bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

E.2.3.2 Überprüfung der HMC-T-1 Klone

Zur indirekten Überprüfung der HMC-T-1-Klone auf Expression des Transaktivators und zur Auswahl eines geeigneten Klons für weiterführende Experimente wurden die 9 Einzelzellklone transient mit dem induzierbaren Expressionsvektor pTRE-tight-eYFP (s. Abb. E.2.1) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellpopulationen geteilt, jeweils eine Hälfte wurde mit $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin und die andere Hälfte ohne Doxyzyklin für weitere 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Fluoreszenz von eYFP untersucht (Abb. E.2.3).

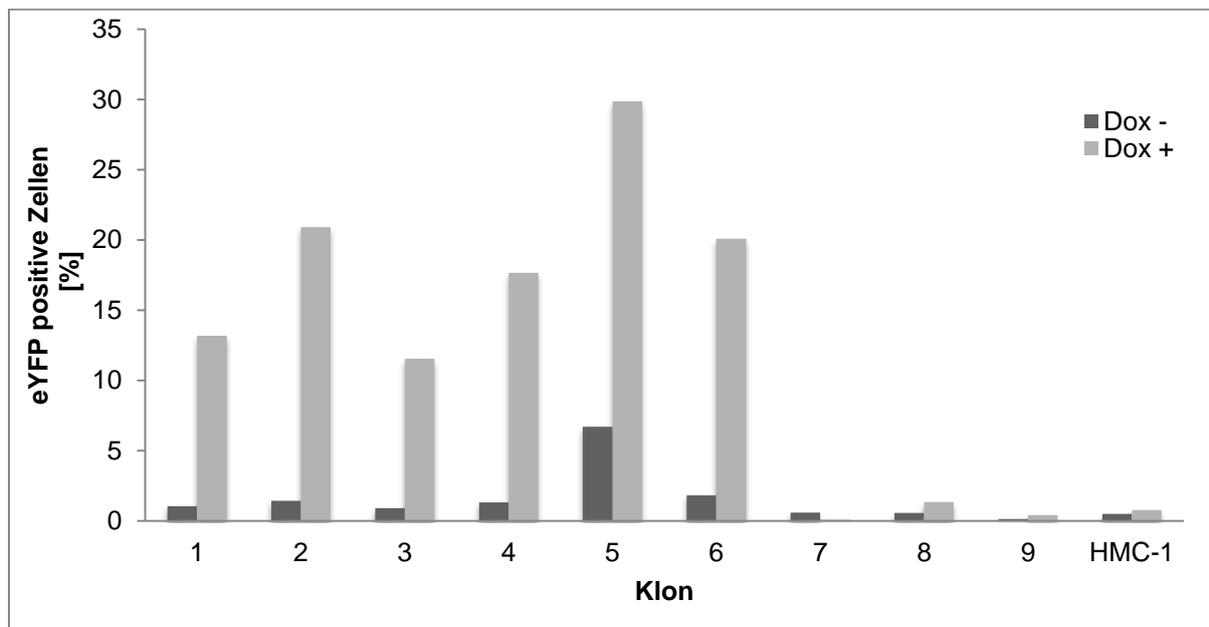


Abb. E.2.3: Überprüfung der Funktionalität des Doxyzyklin-induzierbaren Genexpressionssystems in HMC-T-1 durch transiente Transfektion mit pTRE-tight-eYFP und anschließender Induktion. Die Zellen wurden transient mit dem Plasmid pTRE-tight-eYFP transfiziert, ohne bzw. mit $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin induziert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Die Klone 1-6 zeigen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz nach Induktion, sie unterscheiden sich auch hinsichtlich der basalen Expression im nicht-induzierten Zustand. In den Klonen 7-9 sowie in der wt-HMC-1 Kontrolle ist eine Expression von eYFP vor und nach Induktion nicht nachweisbar.

Zur Auswahl des für die induzierbare Genexpression in HMC-1 Zellen am besten geeignete Klons wurde neben dem prozentualen Anteil fluoreszierender Zellen (Abb.

E.2.3) auch die mittlere Fluoreszenz pro Zelle als Maß für die Menge des exprimierten Transgens ermittelt (Abb. E.2.4). Im Vergleich zu allen anderen Klonen zeigte Klon 5 eine deutlich höhere Fluoreszenz, aber gleichzeitig auch eine hohe basale Fluoreszenz.

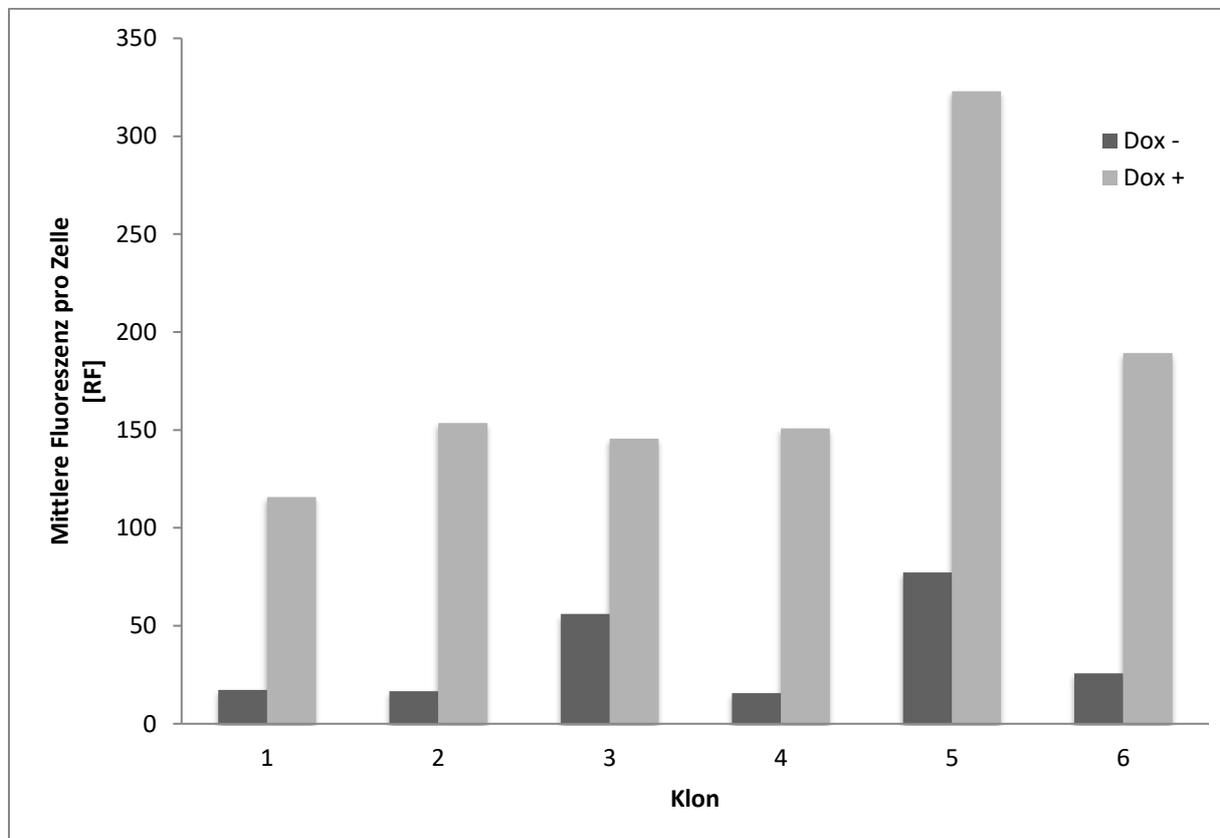


Abb. E.2.4: Durchflusszytometrische Analyse der induzierbaren HMC-T-1 Zellklone. Darstellung der mittleren Fluoreszenz pro Zelle der in Abb. E.2.3 dargestellten transient mit pTRE-tight-eYFP transfizierten HMC-T-1 Klone 1-6.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Klone 1-6 das Transaktivatorpeptid und unterschiedliche Mengen eYFP nach Transfektion mit dem induzierbaren Plasmid pTRE-tight-eYFP und Induktion exprimieren. Für weiterführende Experimente wurde der HMC-T-1 Klon 2 verwendet, der bei geringer basaler Expression die größte induzierbare Expression des eYFP zeigt.

E.2.4 Induzierbare Expression von eYFP in HMC-1 Zellen

E.2.4.1 Kotransfektion mit pTRE-tight-eYFP und linPur

Zur Herstellung doppelt stabil transfizierter HMC-T-1 Zellen wurde der in E.2.3 hergestellte Klon 2 mit dem Expressionsvektor pTRE-tight-eYFP und der linearen Puromycinresistenz (linPur) in einer Ratio von 1:10 transfiziert und anschließend unter Selektionsdruck mit Puromycin (1 µg/ml) über 30 Tage kultiviert. Zur Untersuchung der

selektierten Zellpopulation auf stabile Kotransfektanden wurde die relative Fluoreszenz der Zellen bei einer Konzentration von 10^4 Zellen pro ml vor und nach Induktion mit Doxyzyklin (1 $\mu\text{g/ml}$, 48 h) durchflusszytometrisch ermittelt. Nach Induktion nehmen sowohl der Anteil fluoreszierender Zellen an der heterogenen Zellpopulation als auch die relative Fluoreszenz pro Zelle deutlich zu. Diese Daten zeigen, dass in der selektierten pTRE-tight-eYFP/linPur transfizierten HMC-T-1 Population stabile Transfektanden enthalten sind.

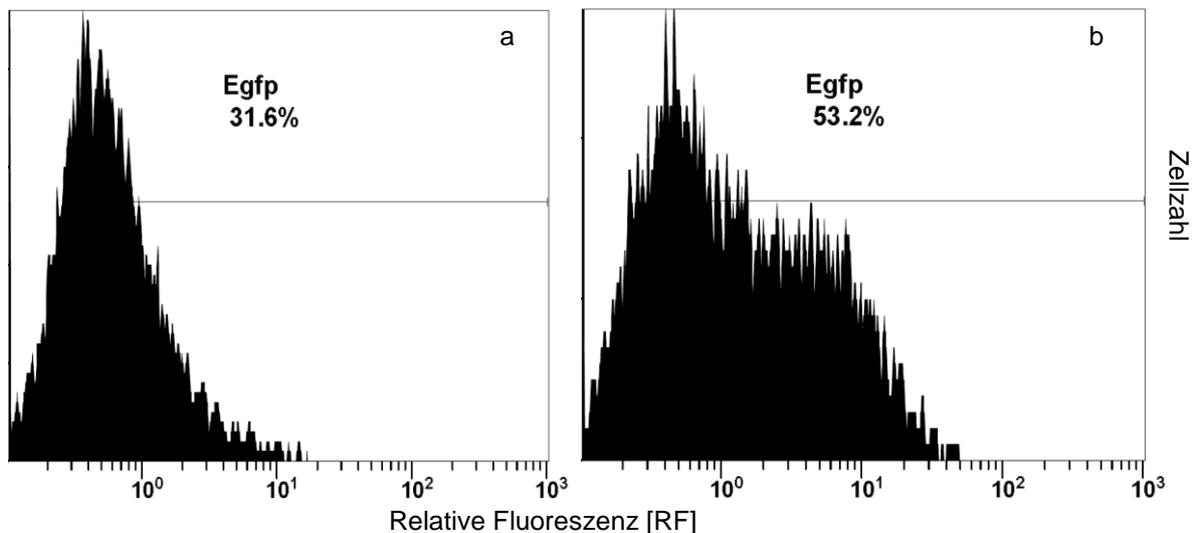


Abb. E.2.5: Durchflusszytometrische Messung der Induzierbarkeit einer mit pTRE-tight-eYFP/linPur kotransfizierten und mit Puromycin selektierten Zellpopulation. Die Zellen wurden vor und nach Induktion mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin durchflusszytometrisch auf Fluoreszenz untersucht.

E.2.4.2 Subklonierung stabiler Transfektanden

Zur Generierung klonaler pTRE-tight-eYFP exprimierender Subzelllinien wurden die mit Puromycin selektionierten Zellen nach Erreichen einer Zellkonzentration von ca. 1×10^4 Zellen/ml mittels „limited dilution cloning“ subkloniert (s. D.3.4). Die so entstandenen sieben Einzelzellklone wurden nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl von ca. 1×10^4 Zellen/ml auf induzierbare eYFP-Expression überprüft.

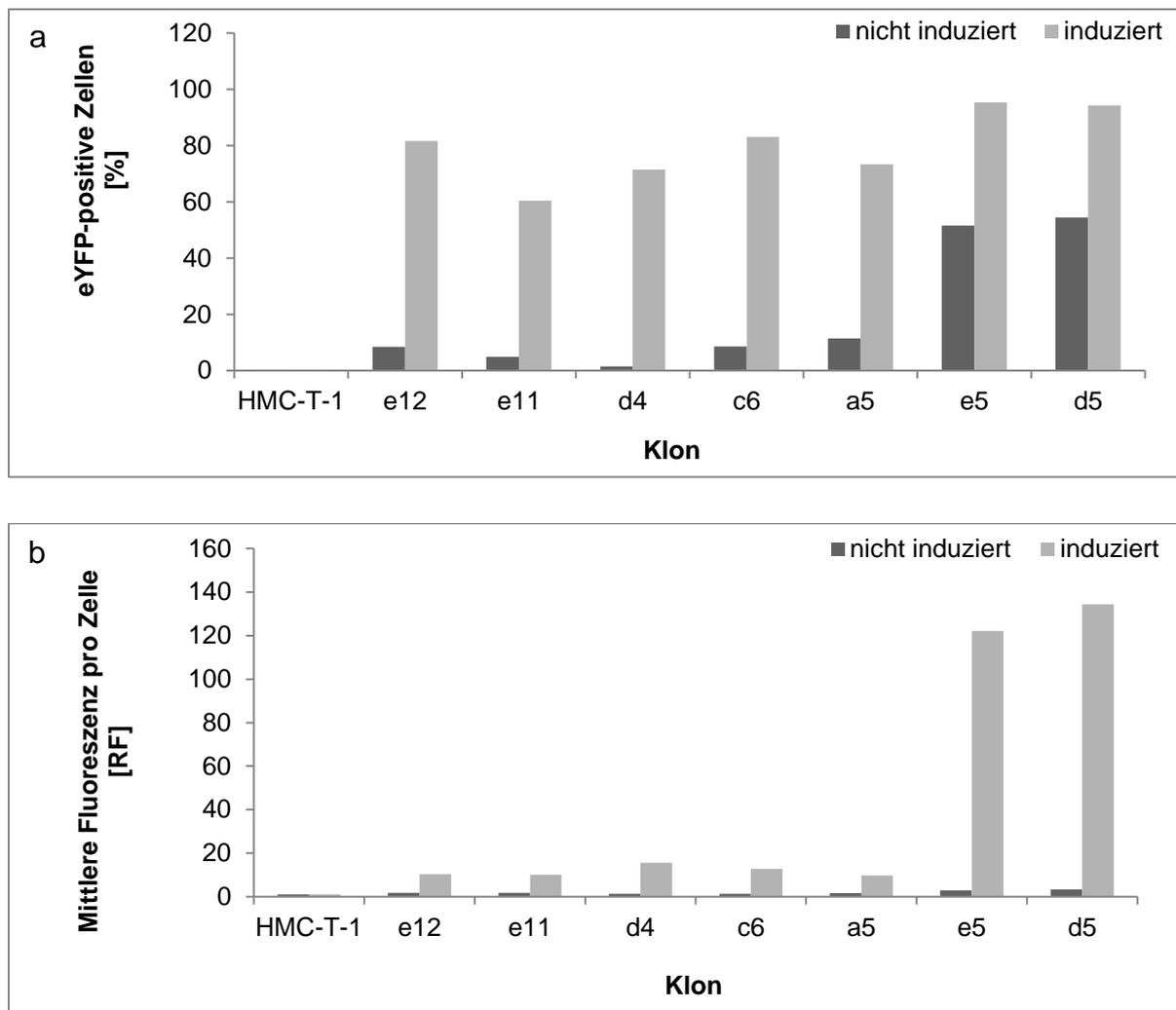


Abb. E.2.6 a und b: Überprüfung der klonalen pTRE-Tight-eYFP/linPur exprimierenden Subzelllinien auf Fluoreszenz. Die klonierten Subzelllinien wurden durchflusszytometrisch analysiert.

Im Gegensatz zu der als Kontrolle mitgeführte Transaktivator-Zelllinie HMC-T-1 sind die subklonierten Zellen Doxzyklin-induzierbar und 60 - 95 % der Gesamtpopulationen sind nach Induktion eYFP positiv (Abb. E.2.6 a). Die einzelnen klonalen Subzelllinien unterscheiden sich jedoch deutlich im Ausmaß der eYFP-Expression (Abb. E.2.6 b). Von den 7 klonalen pTREtight-eYFP/linPur Subzelllinien wurden die zwei Klone, bei denen das Ausmaß der Expression nach Induktion am stärksten zunimmt (e5 und d5), für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

E.2.4.3 Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels Durchflusszytometrie

Um zu untersuchen, inwieweit das Ausmaß der Induktion der Expression von eYFP von der Doxzyklin-Konzentration abhängt, wurden die etablierten Zellklone e5 und d5 (s. Abb. E.2.3) sowie wt-HMC-1 Zellen und HMC-T-1 Zellen als Kontrollen jeweils für 48 Stunden mit unterschiedlichen Doxzyklin-Konzentrationen (0, 10, 100 und 1000

ng/ml) induziert. Anschließend wurde die eYFP-Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert.

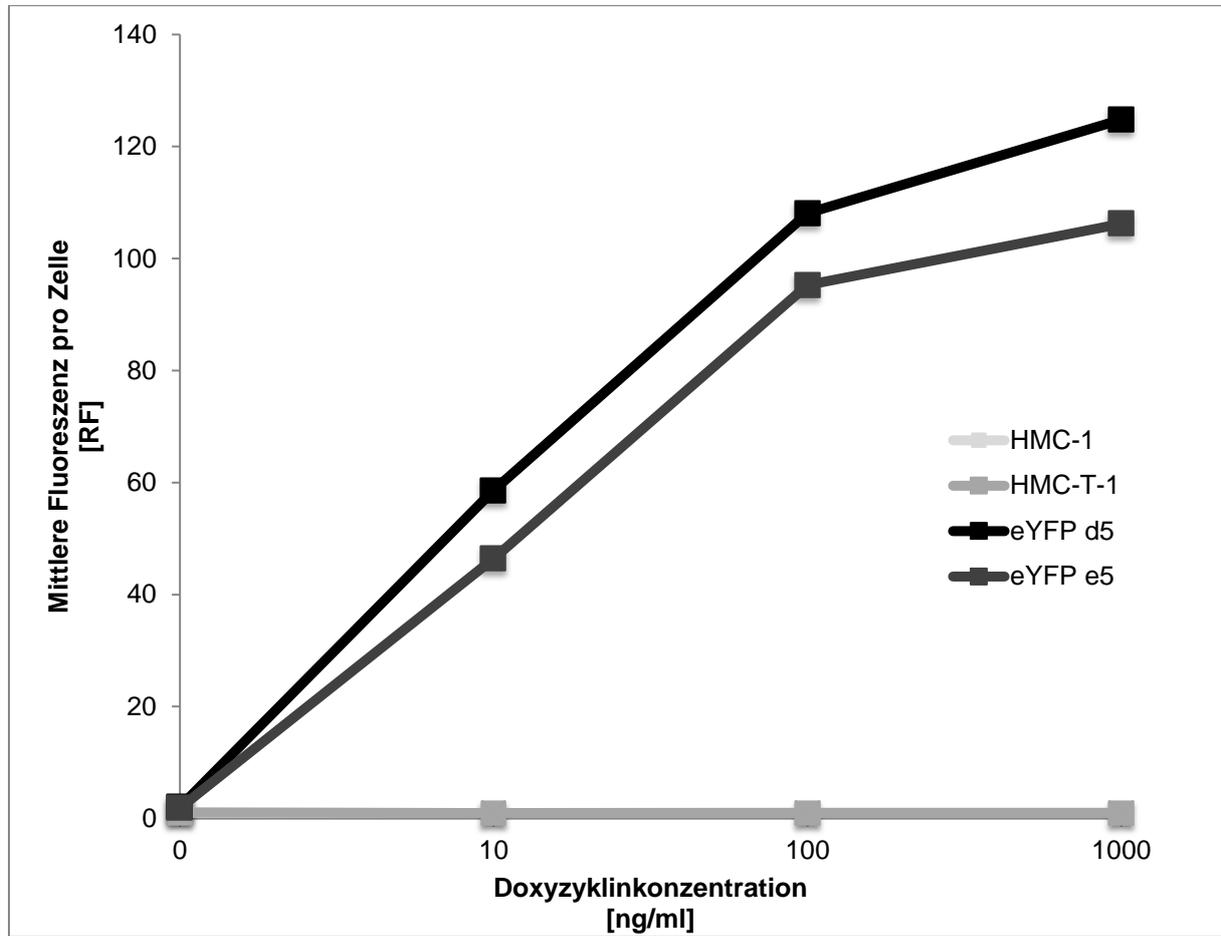


Abb. E.2.7: Doxycyclin-Konzentrationsabhängige Zunahme der eYFP-Fluoreszenz. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Doxycyclin-Konzentrationen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Fluoreszenz pro Zelle nimmt mit steigender Doxycyclin-Konzentration zu. Bei höheren Doxycyclin-Konzentrationen flacht die Steigung der Kurve ab und das System erreicht bei 1000 ng/ml Doxycyclin eine annähernd maximale Induktion (Abb. E.2.7). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die stabilen pTRE-Tight-eYFP/linPur Klone konzentrationsabhängig induzieren lassen und dass die erforderlichen Doxycyclin-Konzentrationen weitgehend den Angaben des Herstellers für andere Zelllinien und Transgene entsprechen.

E.2.4.4 Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels Fluoreszenzmikroskopie

Parallel zur Durchflusszytometrie wurden die Induzierbarkeit der stabilen pTRE-tight-eYFP/linPur-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden jeweils 5x

10^4 Zellen für 10 Minuten bei 500 rpm in der Zytocentrifuge auf Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Mountingmedium benetzt, mikroskopiert und fotografiert (s. D.6).

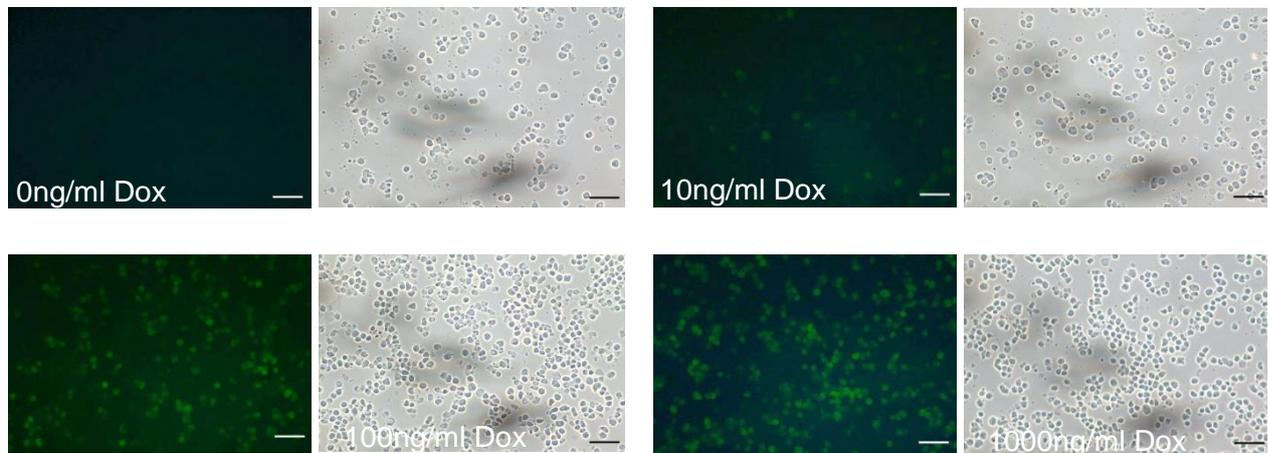


Abb. E.2.8: Fluoreszenzmikroskopische Überprüfung der eYFP-Überexpression nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Doxyzyklin (Klon d5). Die Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Fluoreszenz überprüft. Alle Aufnahmen wurden mit exakt der gleichen Belichtungszeit und Lichtempfindlichkeit aufgenommen. Der Balken zeigt 100 nm. Neben den Fluoreszenzaufnahmen ist eine lichtmikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnittes zu abgebildet.

Die in E.2.4.3 dargestellte konzentrationsabhängige Zunahme der eYFP-Fluoreszenz ist fluoreszenzmikroskopisch nachvollziehbar (Abb. E.2.8). Die bei der initialen Charakterisierung durchflusszytometrisch nachgewiesene basale Fluoreszenz (s. Abb. E.2.6) ist jedoch nicht sichtbar.

E.2.4.5 Charakterisierung der HMC-T-1-eYFP/linPur Klone mittels immunologischem Nachweis des Transgens

Um das eYFP-Transgen auch auf immunologischer Ebene nachzuweisen wurde der HMC-T-1-pTRE-tight-eYFP Klon d5 nach 48 stündiger Induktion mit Doxyzyklin (0, 10, 100 und 1000 ng/ml) lysiert (D.4.1). Anschließend wurde ein Immunblot (D.4) durchgeführt. Es wurden jeweils 100.000 lysierte Zellen pro Spur aufgetragen. Zur Detektion wurde ein monoklonaler Anti-GFP Antikörper (Roche) verwendet.

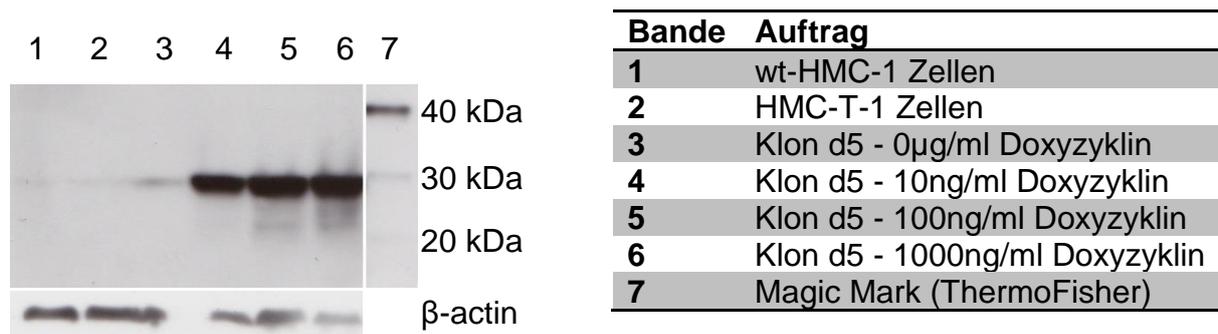


Abb. E.2.9: Immunologischer Nachweis von eYFP im induzierten pTRE-tight-eYFP/linPur Klon d5. Der Immunblot wurde mittels eines Anti-GFP Antikörpers (Maus-monoklonal, Roche, 1:1000) detektiert.

Der Western Blot zeigt deutlich, dass die Menge des exprimierten eYFP mit steigender Doxyzyklin-Konzentration zunimmt. Die Zunahme ist zwischen 0 und 10 ng/ml Doxyzyklin am größten (Spur 3-6 Abb. E.2.9). Die nicht induzierten Zellen exprimieren eine kaum nachweisbare eYFP-Menge (Spur 3 Abb. E.2.9).

Zusammenfassend zeigen diese und die vorausgegangenen Experimente E.2.4.3 und E.2.4.4 übereinstimmend die Funktionalität des Doxyzyklin-induzierbaren Expressionssystems und der eYFP-Expression in HMC-1-Zellen.

E.3 Überexpression von RasGRP4 in HMC-T-1 Zellen

E.3.1 Stabile Transfektion

Zur Herstellung stabiler Klone, die Fusionsproteine des hRasGRP4 bzw. mRasGRP4 mit eYFP induzierbar exprimieren, wurde der HMC-T-1 Klon 2 mit pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP bzw. pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP sowie pTRE-tight-eYFP und linPur kotransfiziert (s. a. E.2.4.1). Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurden Aliquots der Zellen nach 48 h mit Doxyzyklin (0 bzw. 1000 ng/ml, 48 h) induziert und die eYFP-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

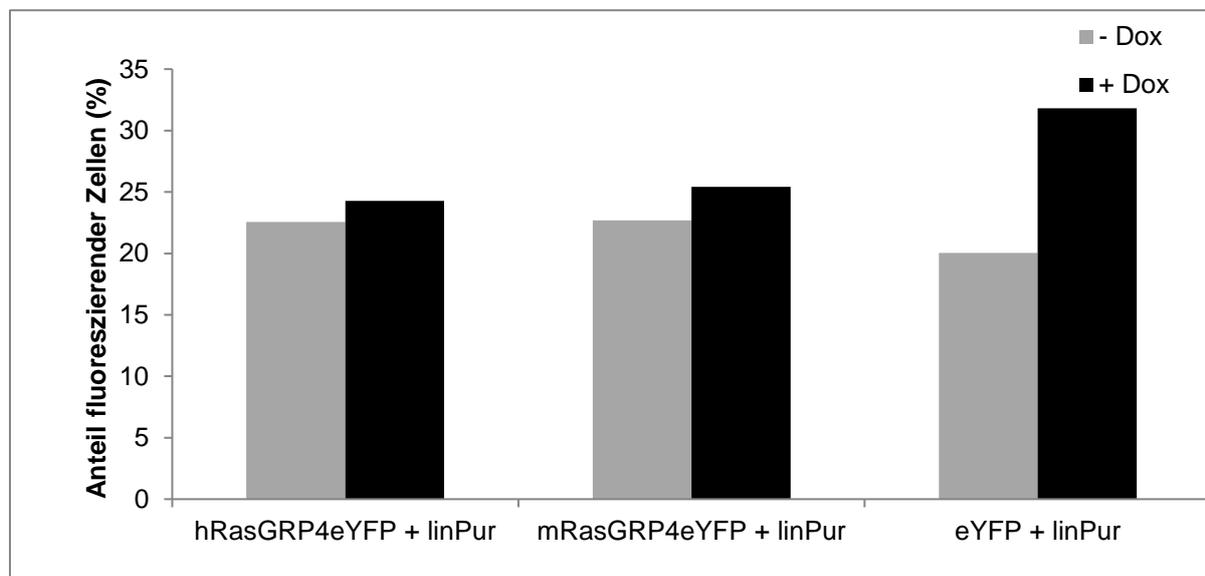


Abb. E.3.1: Ko-Transfektion des HMC-T-1 Klons 2 mit h/mRasGRP4-eYFP und linPur. Der HMC-T-1 Klon 2 wurde jeweils mit pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP, pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP sowie pTRE-tight-eYFP und der linearen Puromycinresistenz (linPur) mit einer Ratio von 10:1 kotransfiziert.

Nach Doxyzyklin-Induktion steigt der Anteil eYFP-positiver Zellen in den pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP-linPur bzw. pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP-linPur Transfektanden um 1,7 % und 2,7 %, bei den pTRE-tight-eYFP-linPur Transfektanden dagegen um 11 %. Dieses Ergebnis belegt die erfolgreiche Transfektion, zeigt aber gleichzeitig die deutlich höhere Transfektionsrate bzw. Transgenexpression von eYFP im Vergleich zu h- und mRasGRP4-eYFP (vgl. Abb. E.1.6).

E.3.1.1 Selektion der hRasGRP4-eYFP/linPur-Transfektanden

Um stabile Klone zu generieren, wurde die Zellpopulation nach Transfektion mit pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP/linPur (E.3.1) mit Puromycin (1 µg/ml) selektiert. Über mehrere Wochen war in der Kultur mikroskopisch keine Proliferation sichtbar. Es gelang auch

in mehreren Transfektions-Experimenten nicht, stabile hRasGRP4-eYFP-Transfektanden zu selektieren.

E.3.1.2 Selektion der mRasGRP4-eYFP/linPur-Transfektanden

Vier Wochen nach Beginn der Selektion mit Puromycin (1 µg/ml) war in den Kulturen nach Transfektion mit pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP/linPur mikroskopisch eine Zunahme der Zellzahl nachweisbar. Nach ca. 10 Wochen wurde eine Zelldichte von 1×10^4 Zellen/ml erreicht, sodass ausreichend Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen zur Verfügung standen. Aliquots der Population wurden hierzu mit Doxyzyklin (0 und 1000 ng/ml, 48 h) induziert und anschließend untersucht (s. Abb. E.3.2 a und b).

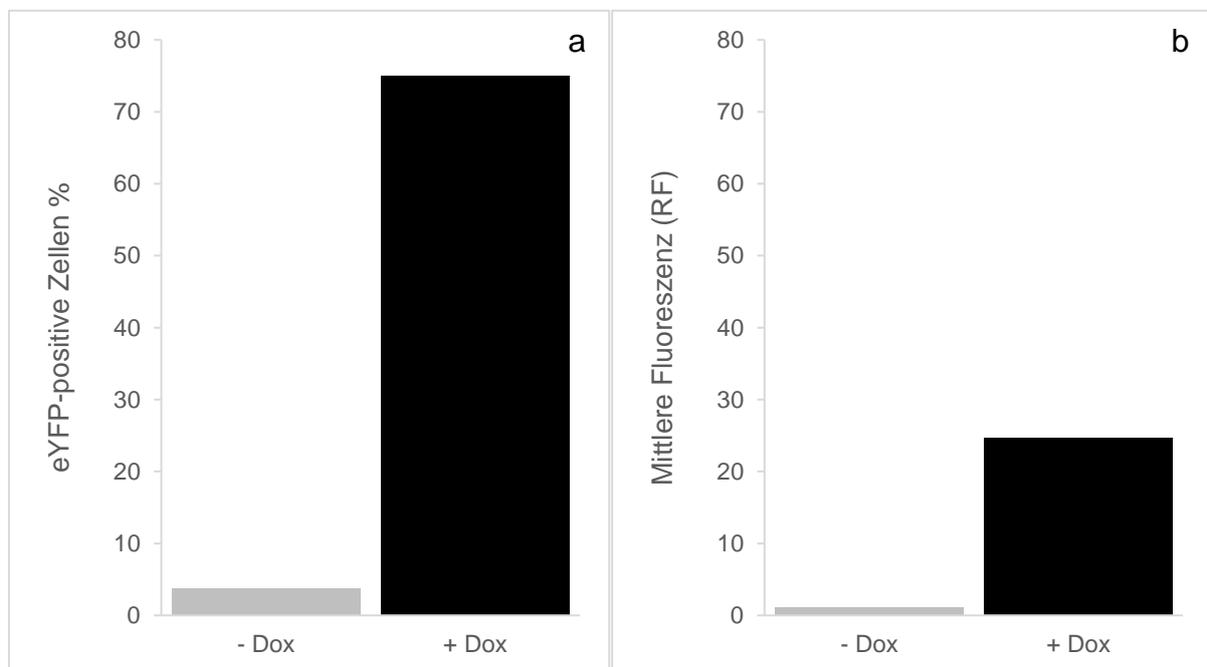


Abb. E.3.2: Durchflusszytometrische Untersuchung der pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP/linPur transfizierten Zellen nach Puromycinselektion. Die Zellen (HMC-T-1-Klon 2) wurden nach Transfektion mit pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP und linPur für 4 Wochen mit 1 µg/ml Puromycin selektiert. a: Anteil eYFP-positiver Zellen; b: Mittlere Fluoreszenz.

Nach Induktion mit Doxyzyklin nimmt der Anteil der eYFP positiven Zellen um 72 % zu (Abb. E.3.2 a). Das Ausmaß der Expression nimmt um ca. 23 % zu (Abb. E.3.2 b). Die basale Expression ist gering. Diese Ergebnisse zeigen, dass die HMC-T-1-Zellen stabil mit mRasGRP4-eYFP/linPur transfiziert wurden.

E.3.2 Subklonierung der mRasGRP4-eYFP/linPur HMC-T-1-Zellen

Ausgehend von den selektionierten mRasGRP4-eYFP/linPur-Transfektanten wurden mittels „limited dilution cloning“ (s. D.3.4) 3 Subklone generiert. Zum Nachweis der Transgen-Expression wurden Aliquots der Subklone mit Doxyzyklin (0-1000 ng/ml, 48 h) induziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (Abb. E.3.3).

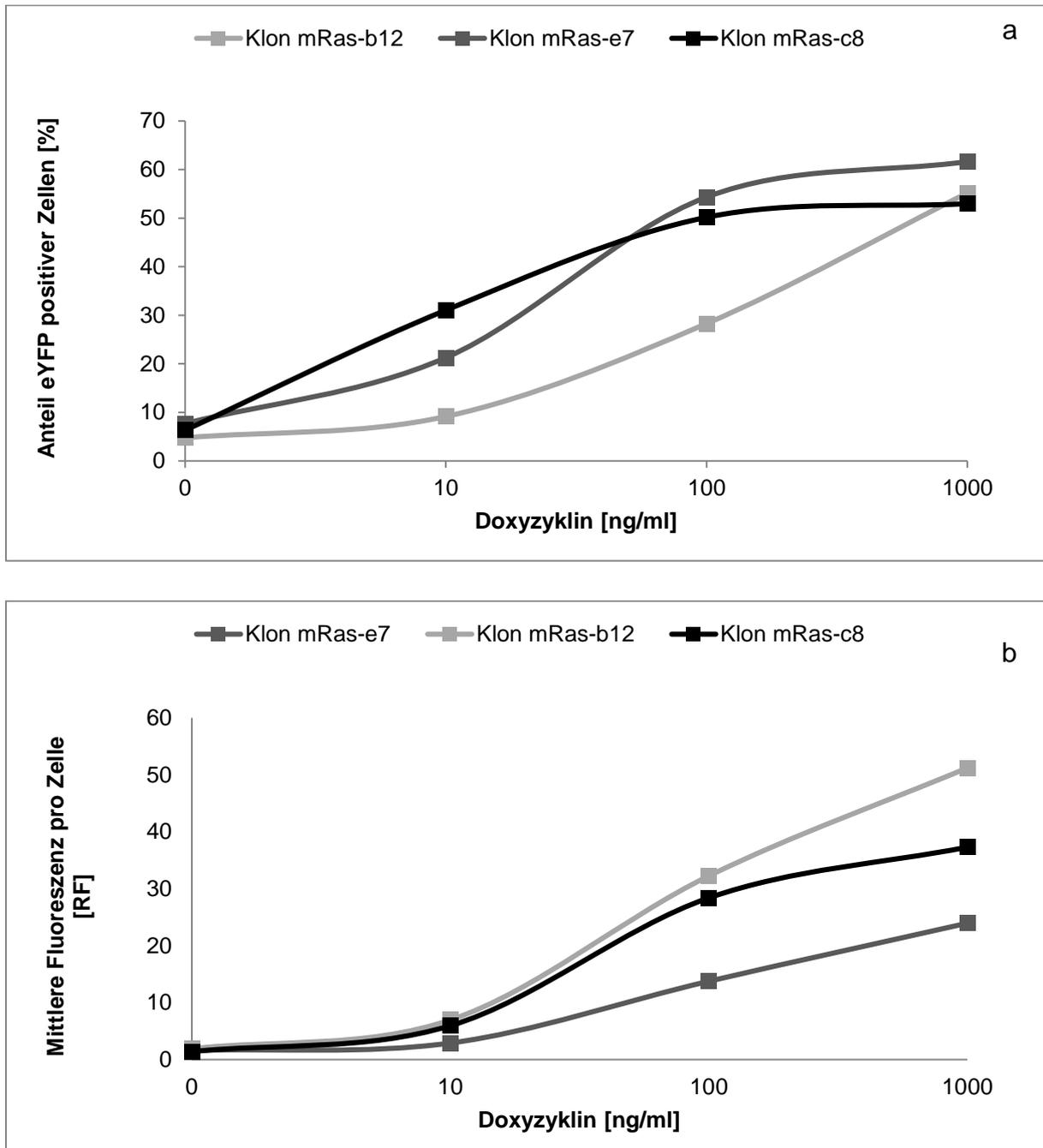


Abb. E.3.3: Charakterisierung der Klone nach „Limited dilution cloning“ von stabil mRasGRP4-eYFP transfizierten HMC-T-1-Zellen. Die Klone wurden mit Doxyzyklin induziert und durchflusszytometrisch analysiert. a: Anteil eYFP-positiver Zellen; b: Mittlere Fluoreszenz

Alle 3 Klone zeigen eine Doxyzyklin-abhängige Zunahme der Fluoreszenz. Insgesamt sind nach maximaler Induktion mit 1000 ng/ml Doxyzyklin ca. 60 % der Zellen eYFP positiv (Abb. E.3.3 a). Die Zunahme der Expression nach Induktion ist bei Klon b12 am größten, bei Klon e7 am geringsten (Abb. E.3.3 b). Diese Daten zeigen, dass die 3 klonalen HMC-T-1-Subzelllinien das mRasGRP4-eYFP-Fusionsprotein Doxyzyklin-induzierbar exprimieren.

E.3.3 Immunologischer Nachweis des mRasGRP4-eYFP Transgens

Zum immunologischen Nachweis der induzierbaren Expression des murinen RasGRP4-eYFP Fusionsproteins wurde Klon C8 über 48 Stunden mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen (0, 10, 100 und 1000 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurden Zellysate mittels Immunblot analysiert (s. D.4) und die Fusionsproteine mit dem sensitiven Anti-GFP-Antikörper (Roche) detektiert.

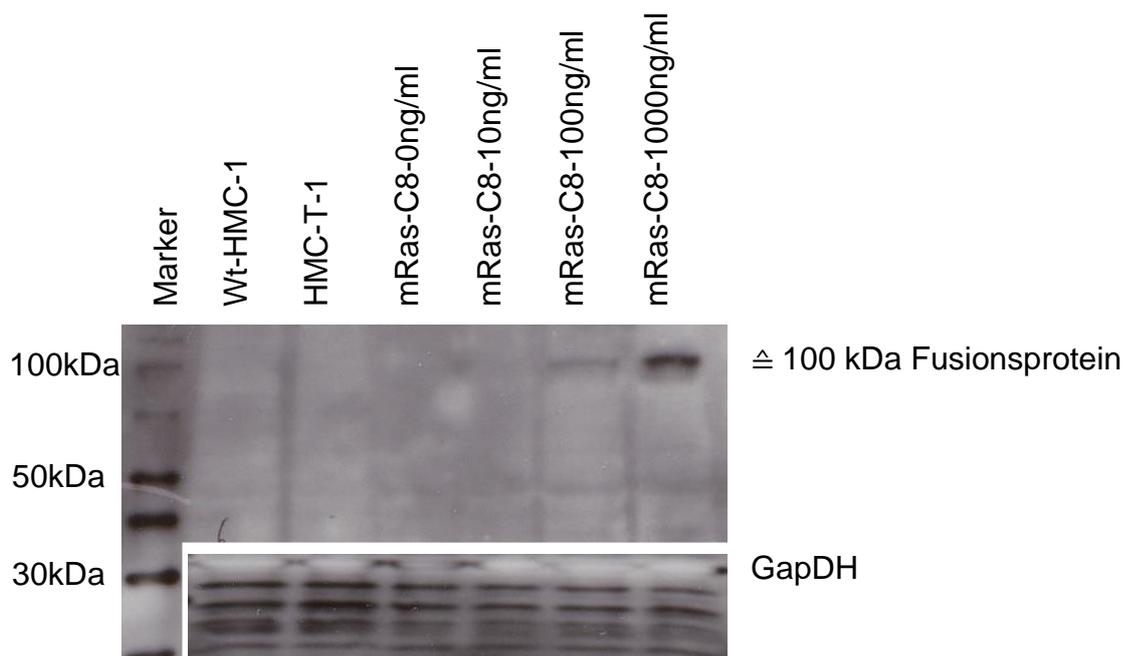


Abb. E.3.4: Immunologischer Nachweis des murinen-RasGRP4-eYFP Fusionsproteins (Anti-GFP Maus Monoklonal, Roche, 1:1000). Es wurden 250.000 Zellen pro Spur aufgetragen

Der Immunblot in Abb. E.3.4 zeigt, dass die Zellen geringe Mengen des mRasGRP4-eYFP Fusionsproteins exprimieren, das bei der erwarteten Masse von 100 kDa vom Anti-GFP-Antikörper detektiert wird. Das Ausmaß der Expression ist von der zur Induktion eingesetzten Doxyzyklin-Konzentration abhängig, das Fusionsprotein wird nach Induktion mit 100 ng/ml und 1000 ng/ml Doxyzyklin detektiert, nicht aber in den

Kontrollen. Diese Daten bestätigen den durchflusszytometrischen Nachweis der Expression des mRasGRP4-eYFP Fusionsproteins und zeigen darüber hinaus, dass das Fusionsprotein die erwartete Masse besitzt.

E.3.4 Charakterisierung der mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klone

E.3.4.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellvitalität

Zur Ermittlung des Einflusses von mRasGRP4-eYFP auf die Zellvitalität wurden die 3 pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP Klone sowie die entsprechenden Kontrollen für 48 Stunden mit Doxyzyklin (0 und 1000 ng/ml) inkubiert und anschließend die Aufnahme von Propidiumiodid durchflusszytometrisch analysiert (Tab. 14).

Tab. 14: Anteil PI positiver Zellen an der Gesamtpopulation verschiedener stabiler Klone.

Klon	PI-positive Zellen Kontrolle	PI-positive Zellen 1000 ng/ml Doxyzyklin
HMC-T-1	0,9 %	1,3 %
eYFP a5	1,6 %	1,8 %
mRasGRP4-eYFP c8	23,7 %	41,5 %
mRasGRP4-eYFP b12	26,2 %	33,1 %
mRasGRP4-eYFP e7	30,2 %	36,9 %

Im Gegensatz zu den Kontrollen ist der Anteil PI-aufnehmender und damit avitaler Zellen bei allen mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1 Klonen bereits im nicht-induzierten Zustand deutlich größer und nimmt nach Induktion nochmals zu. Die Expression von mRasGRP4-eYFP beeinflusst die Aufnahme von Propidiumiodid negativ. Dieser Einfluss ist nicht durch den eYFP-Anteil bedingt, da der eYFP-HMC-T-1-Klon eine ähnliche Aufnahme wie die HMC-T-1 Kontrolle zeigt.

E.3.4.2 Durchflusszytometrische Analyse der Zellgröße und Granularität

Parallel zur Vitalität wurden die Zellgröße und Granularität mittels Durchflusszytometrie über die Parameter Forward Scatter (FS) bzw. Side Scatter (SC) bestimmt (Abb. E.3.5 und Abb. E.3.6). Die Größenverteilung von HMC-1 Zellen und des eYFP-HMC-T-1-Klons a5 verlaufen annähernd deckungsgleich (Abb. E.3.5 a und b). Die Induktion dieser Zellen mit Doxyzyklin führt nicht zu einer Veränderung der Zellgröße. Die mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klone e7 und b12 zeigen im nicht-induzierten Zustand einen breiteren Kurvenverlauf, nehmen nach Induktion jedoch noch an Größe zu (Abb. E.3.5 c und d). Klon C8 zeigt nicht induziert einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die Kontrollen und nimmt nach Induktion deutlich an Zellgröße zu (Abb. E.3.5 e).

Auch die Granularitätskurven (Side Scatter; SS) der HMC-T-1 und eYFP-HMC-T-1 Kontrollen verlaufen annähernd deckungsgleich (Abb. E.3.6 a und b), die Induktion des eYFP Klons führt nicht zu einer Zunahme der Zellgranularität (Abb. E.3.6 b). Die Klone e7 und b12 sind nicht induziert bereits granulärer als die Kontrollen, nach Induktion nimmt deren Granularität zu (Abb. E.3.6 c und d). Die Granularitätskurve des mRasGRP4-eYFP-Klons C8 verläuft im nicht induzierten Zustand ähnlich der Kontrollen, nach Induktion verbreitert und verschiebt sich die Kurve zu Gunsten der Granularität (Abb. E.3.6 e). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von m-RasGRP4-eYFP die Größe und Granularität der HMC-T-1 Zellen positiv beeinflusst, während eYFP keinen Einfluss hat.

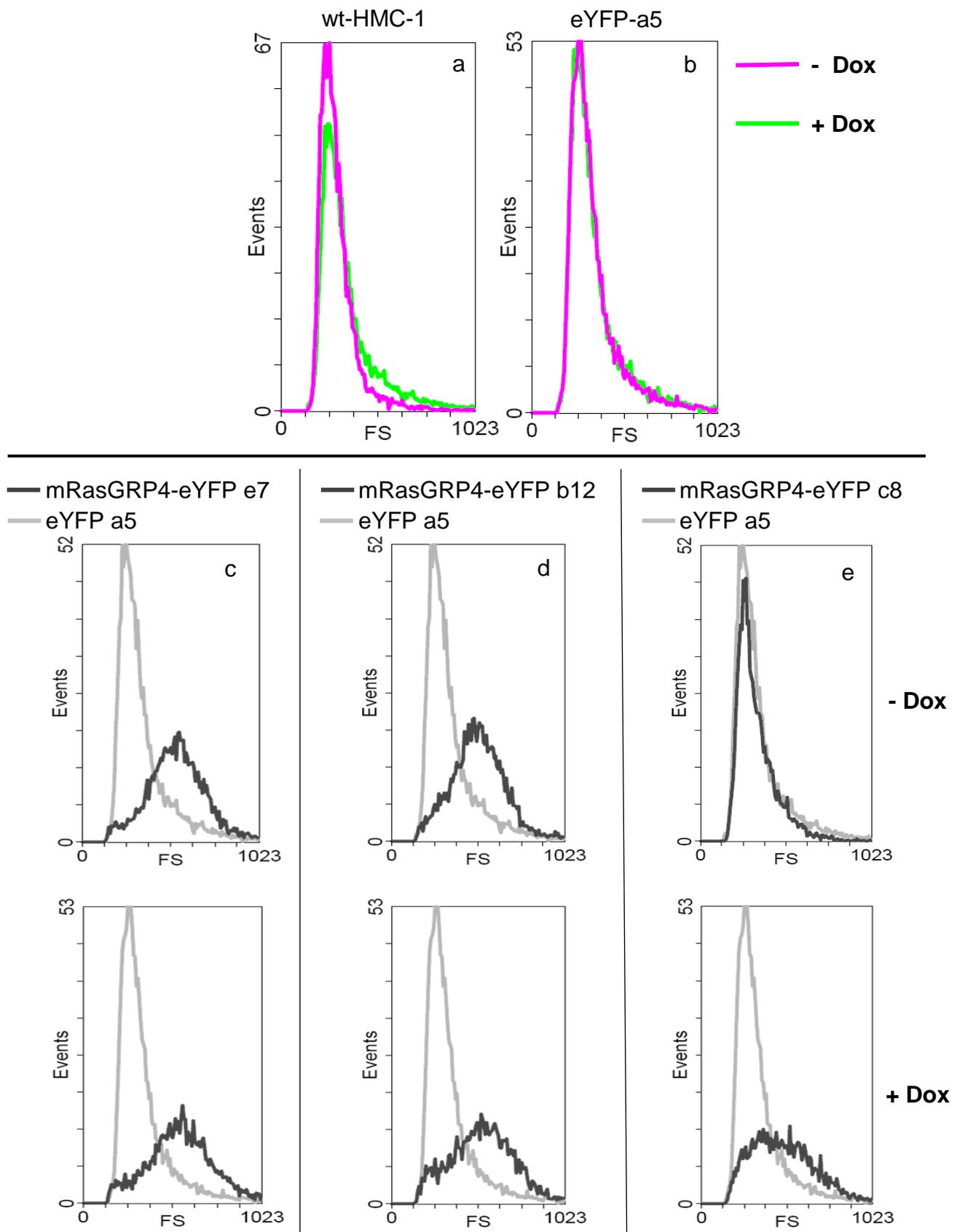


Abb. E.3.5 (a-e): Vergleich der Zellgröße der mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klone vor und nach Induktion. Neben wt-HMC-1 Zellen (a) und dem eYFP Klon a5 (b) wurde die Zellgröße der mRasGRP4-eYFP Klone e7 (c), b12 (d) und c8 (e) durchflusszytometrisch vor und nach Induktion mit 1000 ng/ml Doxozyklin durchflusszytometrisch über den Parameter Forward Scatter (FS) bestimmt.

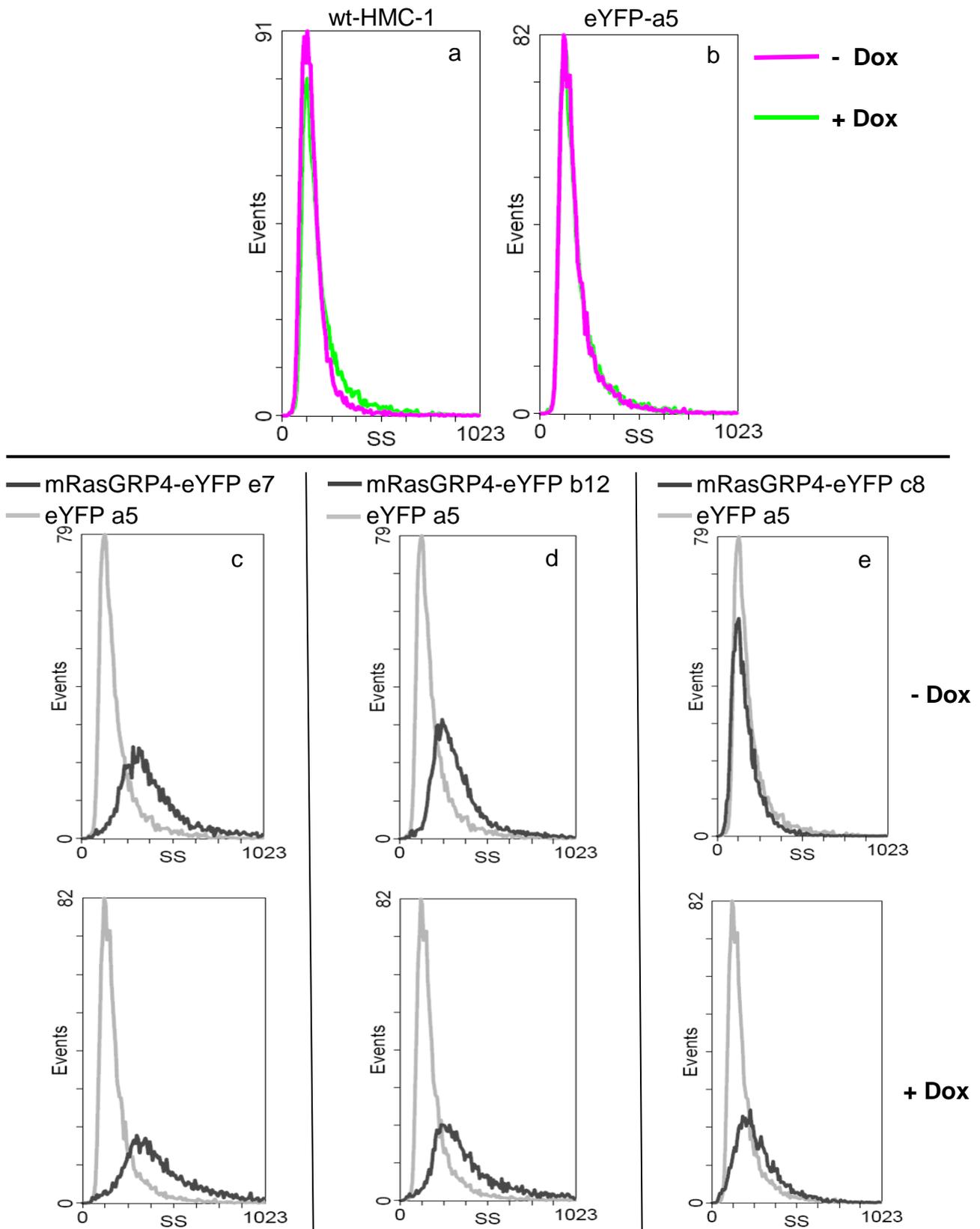


Abb. E.3.6 (a-e): Vergleich der Zellgranularität der mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klone vor und nach Induktion. Neben wt-HMC-1 Zellen (a) und dem eYFP Klon a5 (b) wurde die Zellgranularität der mRasGRP4-eYFP Klone e7 (c), b12 (d) und c8 (e) durchflusszytometrisch vor und nach Induktion mit 1000 ng/ml Doxyzyklin durchflusszytometrisch über den Parameter Side Scatter (SS) bestimmt.

E.3.5 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Tryptase

In einer Pilotstudie wurde die Expression der Tryptase in den mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1 Klonen mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Dazu wurden Zytospins ausgehend vom (nicht induzierten) mRasGRP4-eYFP Klon b12 und als Kontrolle eYFP Klon a5 angefertigt und entsprechend D.6 zur Immunfluoreszenz vorbereitet. Detektiert wurde mit einem Tryptaseantikörper (AG Sommerhoff) in einer Verdünnung von 1:200. Nach Kernfärbung mit DAPI und Fixierung wurden die Zellen mikroskopiert und mit einer Sensorempfindlichkeit ISO 100 und der Belichtungszeit 1/10 s fotografiert.

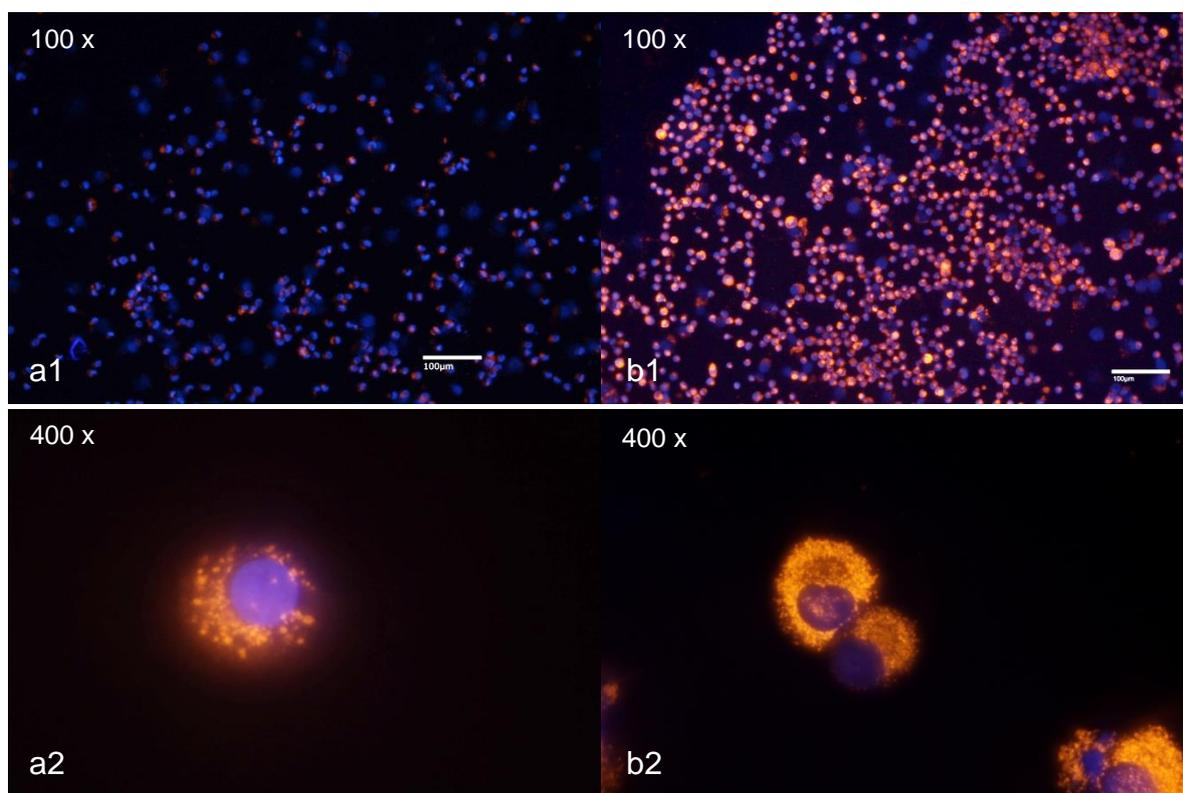


Abb. E.3.7: Analyse der Expression von Tryptase im mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klon b12 und dem eYFP-HMC-T-1-Klon a5. Der weiße Balken entspricht 100 µm.

Abb. E.3.7 zeigt, dass der nicht induzierte mRasGRP4-eYFP Klon b12 deutlich mehr Tryptase als der eYFP Klon a5 exprimiert. In der 400 x Vergrößerung zeigen die Zellen deutlich mehr mit Tryptase gefüllte zytoplasmatische Granula.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die basale Überexpression von mRasGRP4 in einer deutlichen Steigerung der Expression der Tryptase resultiert. Gleichzeitig bestätigt die Zytologie die bereits durchflusszytometrisch nachgewiesene Zunahme der Granularität.

E.3.6 Stabilitätskontrolle nach Frier-Tau-Prozess

Zum Nachweis der erhaltenen Transgen-Expression und Induzierbarkeit nach der Kryokonservierung der Zellen wurde ein zuvor bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerter HMC-T-1-mRasGRP4-eYFP Klon C8 aufgetaut und über mehrere Passagen kultiviert. Nach 48 stündiger Induktion mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen wurde der Klon durchflusszytometrisch analysiert (Abb. E.3.8).

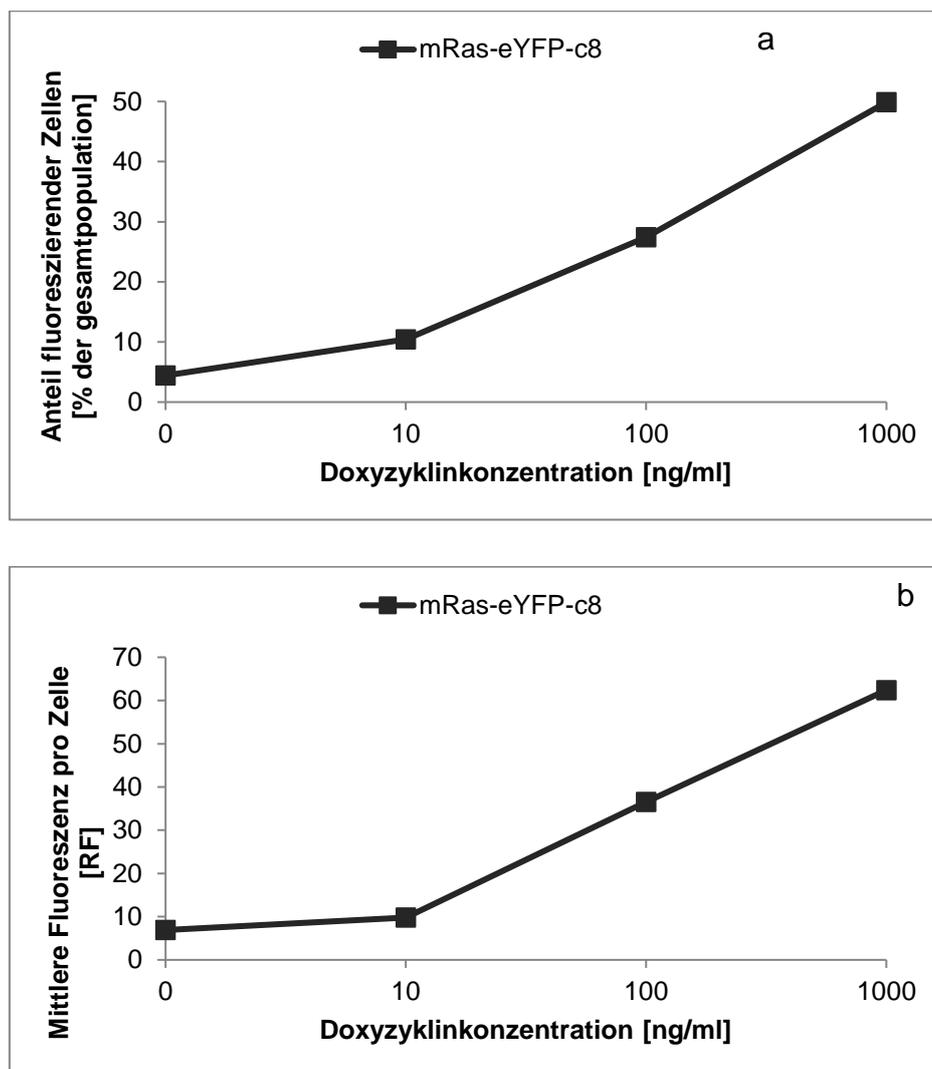


Abb. E.3.8: Induzierbare Expression des HMC-T-1-mRasGRP4-eYFP-Klons C8 nach dem Auftauen. a: Anteil eYFP-positiver Zellen; b: Mittlere Fluoreszenz

Sowohl der Anteil fluoreszierender Zellen an der Gesamtpopulation (Abb. E.3.8 a) als auch die mittlere Fluoreszenz pro Zelle (Abb. E.3.8 b) zeigen die Doxyzyklinkonzentrationsabhängige Zunahme der Transgenexpression. Die Daten entsprechen weitgehend Abb. E.3.3. Damit kann davon ausgegangen werden, dass nach Kryokonservierung die Doxyzyklin-Konzentrationsabhängige Expression des mRasGRP4-eYFP erhalten bleibt.

F Diskussion

F.1 Mastzellen und Mastzellmodelle

Die ubiquitär im Körper vorkommenden Mastzellen stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Durch Phagozytose und Antigenpräsentation sind sie an der Initiierung einer B- und T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt. Einerseits treten sie als IgE-aktivierte Effektorzellen auf und setzen durch Degranulierung Mediatoren wie Histamin, Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A und multiple Arachidonsäuremetaboliten frei, die zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen und chemotaktisch auf Neutrophile, T-Zellen und Eosinophile wirken. Sie spielen damit eine wichtige Rolle in der Abwehr insbesondere von Parasiten und der Homöostase von Entzündungsreaktionen. Andererseits sind sie an pathophysiologischen Prozessen wie allergischen Reaktionen, dem allergischen Asthma bronchiale oder der Rheumatoiden Arthritis beteiligt.

Zur biomedizinischen Untersuchung der heterogenen Zellpopulation von Mastzellen werden verschiedene Modellsysteme verwendet. *In vivo* werden hauptsächlich Mausmodelle verwendet. Die am weitesten verbreiteten Mastzell-defizienten Mausmodelle sind dabei WBB6F₁ *Kit^W/Kit^{W-v}* und C57BL/6 *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}* (54), deren Mastzell-Verlust durch eine „loss of function“-Mutation im c-KIT Rezeptor bedingt ist, die dadurch jedoch weitere Funktionsverluste hämatopoetischer Zellen aufweisen. Ebenso finden *in vivo* murine knock-in Modelle (55) und kutane Xenotransplantations-Modelle in Mäusen Verwendung (56). *Ex vivo* steht die Untersuchung von Geweben und Organen im Vordergrund, deren Ergebnisse maßgeblich durch die Heterogenität der Spender beeinflusst werden. Zur *in vitro* Untersuchung von Mastzellen wurden zu Beginn der Arbeit neben primären Mastzellen zwei gängige humane Zelllinien HMC-1 (57) und LAD1/2 (33) genutzt; im Verlauf der Arbeit wurden zusätzlich die Zelllinien LUVA (44) und ROSA (58) etabliert. Daneben existieren eine Reihe von Nagetier-Mastzelllinien. Ein Großteil der Daten über Mastzellen stammt aus murinen Modellen, obwohl der Vergleich von Mastzellen unterschiedlicher Spezies problematisch ist, da z.B. allergische Erkrankungen in Nagetieren nicht vorkommen und auch die Expression wichtiger Mediatoren teilweise deutlich differiert. Daher ist die Weiterentwicklung bestehender und Etablierung neuer humaner Mastzellmodellsysteme weiterhin von großer biomedizinischer Bedeutung.

F.1.1 Mastzelllinien

Die erste humane Mastzelllinie HMC-1 wurde 1988 von Butterfield *et al.* etabliert (29). Sie zeichnet sich durch ein immortalisiertes, SCF-unabhängiges rasches Wachstum aus, ihre durchschnittliche Passagezeit liegt bei 48 Stunden. Der Phänotyp weist jedoch nur wenige mastzelltypische Charakteristika auf. So exprimieren HMC-1-Zellen keinen IgE-Rezeptor, nur geringe Mengen der Tryptase und keine Chymase (31). Die 2002 etablierten Zelllinien LAD 1 und LAD 2 exprimieren neben Tryptase und Histamin auch Chymase und einen funktionsfähigen IgE-Rezeptor. Die Proliferation ist von SCF abhängig und mit einer Passagezeit von 2 Wochen vergleichsweise langsam (33). Eine weitere Mastzelllinie, LUVA, wurde nach Beginn dieser Arbeit 2011 durch Laidlaw *et al.* bei dem Versuch, primäre Mastzellen aus CD34+ Vorläufer-Zellen des Blutes eines an Aspirin induziertem Asthma Bronchiale erkrankten Patienten zu gewinnen, etabliert. Phänotypisch ähnelt die Zelllinie einer ausdifferenzierten Mastzelle mit Expression eines funktionsfähigen IgE-Rezeptors und hohem Tryptase-Gehalt bei SCF unabhängiger, langsamer Proliferation (28). 2014 beschrieben Saleh *et al.* die Zelllinie Rosa (58), die bei der Differenzierung primärer Mastzellen aus CD34+ Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (59) etabliert wurde. Eine Mutation des Stammzellfaktor-Rezeptors c-KIT (CD 117) wurde molekulargenetisch ausgeschlossen. Anschließend transfizierte die Arbeitsgruppe die so entstandene Zelllinie mit der D816V mutierten Variante des c-KIT Rezeptors, um die SCF-unabhängig proliferierende, phänotypisch Mastzell-artige Zelllinie Rosa zu generieren. Die Etablierung von zwei Zelllinien im Verlauf dieser Arbeit unterstreicht das Interesse an und die Notwendigkeit der Etablierung weiterer, besserer humaner Mastzellmodelle. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz, eine Stammzellfaktor-unabhängig proliferierende, wenig differenzierte Zelllinie durch Überexpression eines Transkriptionsfaktors zu differenzieren ist letztendlich (invers) verwandt mit dem Vorgehen von Saleh *et al.*, der die Proliferation einer differenzierten Mastzelllinie durch Transfektion mit einem, durch Mutation permanent aktiven c-KIT-Rezeptor, induziert hat. Der hier gewählte Ansatz birgt allerdings den Vorteil, durch Steuerung der Expression des Wachstumsfaktors dessen Funktion untersuchen und potentiell verschiedene Mastzell-Phänotypen generieren zu können.

F.1.2 Primäre Mastzell-Kulturen

Primäre Kulturen von Mastzellen sind den Mastzellen *in vivo* phänotypisch am ähnlichsten. Sie werden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks oder Blutes durch aufwendige Protokolle vermehrt (4, 6, 24, 25, 59). Je nach Herkunft, Spender und Protokoll variieren jedoch der Phänotyp und die Menge der exprimierten Mediatoren, was die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst. Zudem ist die Generierung primärer Mastzellen zeit- und kostenintensiv und die Zellen gehen rasch in die Seneszenz, sodass die Anzahl und die Lebensdauer *in vitro* begrenzt ist.

F.2 Mastzellendifferenzierung

F.2.1 Charakteristika differenzierter Mastzellen

Mastzellen zeichnen sich morphologisch durch zahlreiche basophile zytoplasmatische Granula aus. Wichtige charakteristische Oberflächenantigene sind der aus mehreren Untereinheiten bestehende IgE-Rezeptor und der Wachstumsfaktorrezeptor c-KIT (CD117). Die großen Mengen des in den Granula gespeicherten Histamin charakterisieren die Zellen ebenso wie die Granula-assoziierten Serin-Proteasen Tryptase (11), Chymase (12) und die Carboxypeptidase A (13), wobei die Expression von Tryptase und Chymase zur Klassifikation der Zellen in die zwei Subtypen MC_T und MC_{TC} verwendet werden.

F.2.2 RasGRPs

Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (RasGRPs) fungieren als Aktivatoren des Ras und weiterer kleiner GTPasen in multiplen intrazellulären Signalwegen, die die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflussen (60). Bisher sind 4 RasGRPs beschrieben, die jeweils aus den 4 gleichen aufeinanderfolgenden Domänen bestehen (s.Abb. F.2.1).

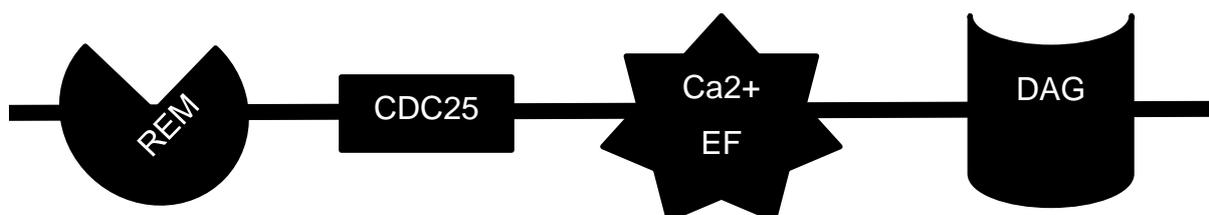


Abb. F.2.1 Schematische Darstellung der verschiedenen Motive der RasGRPs. Dem N-terminalen Ras-Austauschmotiv (REM) folgt die katalytische Domäne (CDC25), zwei Ca²⁺ bindende EF-Hände (Ca²⁺ EF) und die DAG-bindende Domäne (DAG). Nach Stone, 2011.

Die Expression von RasGRPs ist bisher vor allem in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen worden. Durch Bindung von Ca^{2+} und DAG werden die RasGRPs aktiviert und tauschen folglich am Ras Protein GDP gegen GTP aus. Sie sind u.a. an der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren wie dem T- und B-Zell-Rezeptor, Zytokin-Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (61) und dadurch an Stimulus-bedingten Zell-Differenzierungsprozessen beteiligt.

F.2.3 RasGRP4

2002 haben Yang *et al.* den bis dahin unbekanntes Ras-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor 4 (RasGRP4) beschrieben (44), der selektiv in Mastzellen nachgewiesen wurde. Zeitgleich isolierten Reuther *et al.* die cDNA Sequenz des RasGRP4 aus Leukozyten von AML-Patienten (62). Die Proteinsequenz des RasGRP4 unterscheidet sich in beiden Arbeiten an den Positionen 120, 261 und 671, Auswirkung und Grund dieses gefundenen Unterschieds sind unklar. Yang *et al.* und später Hashimoto *et al.* (53) konnten zeigen, dass Patienten mit Mastzell-assoziierten Erkrankungen sowie die HMC-1 Zelllinie nur inaktive Splice-Varianten des RasGRP4 exprimieren. Zudem klonierten Yang *et al.* eine murine Isoform des RasGRP4 und konnten durch deren transiente Überexpression in HMC-1 Zellen eine Zunahme der Tryptase-, Chymase- und Carboxypeptidase A-Expression induzieren. Basierend auf diesen Ergebnissen nahmen die Autoren eine Beteiligung des RasGRP4 an der Ausbildung des Mastzellphänotyps und der Regulation der Expression wichtiger Mastzellmediatoren durch Mitwirkung an der Signaltransduktion des Wachstumsfaktorrezeptors c-KIT an. Ebenso folgerten sie aus ihren Ergebnissen, dass die HMC-1 Zelllinie auf Grund der inaktiven RasGRP4 Splicevarianten und dadurch fehlenden Ras Aktivierung im c-KIT Signalweg einen weniger Mastzell-artigen Phänotyp aufweist. Basierend auf diesen Daten wurde die initiale Hypothese der vorliegenden Arbeit generiert, dass durch Überexpression von wt-RasGRP4 in der HMC-1-Mastzelllinie der Phänotyp und das Expressionslevel wichtiger Mediatoren wie Tryptase und Chymase positiv beeinflusst werden kann.

Im Gegensatz zu Yang *et al.* konnten später Katsoulotos *et.al* (2008) durch Überexpression von humanem RasGRP4 in HMC-1 Zellen zwar mehr als 100 Gene identifizieren, die durch die Überexpression von humanem RasGRP4 hochreguliert werden, eine Veränderung der Expression von Tryptase konnten sie jedoch nicht

zeigen. Diese nach Beginn der vorliegenden Arbeit publizierten Daten müssen zumindest in Bezug auf die Expression von Mastzell-Tryptase kritisch gewertet werden, da wir nach Überexpression des murinen RasGRP4 in HMC-1 Zellen eine Zunahme der Tryptase-Expression beobachten konnten.

In einem von Zhu *et al.* (2012) beschriebenen murinen RasGRP4-knock-out-Modell (50) entwickelten die Tiere entgegen den Erwartungen reife, differenzierte Mastzellen, deren IgE-vermittelte Immunantwort jedoch abgeschwächt verlief. Die Autoren vermuteten darin zum einen einen Hinweis auf die Beteiligung von RasGRP4 im IgE Signalweg, zum anderen vermuteten sie, dass wichtige Signalwege durch mehrere RasGRPs abgesichert sind. So zeigten bereits Liu *et al.*, dass die Ras Aktivierung im Fc ϵ -Rezeptor-1 Signalweg ebenso durch RasGRP1 erfolgt (63). Der sich aus dem Vergleich mit den Daten von Yang (44) und Hashimoto *et al.* (53) ergebende Widerspruch, dass die Inaktivität von RasGRP4 zu Differenzierungsverlust führt, könnte potentiell durch Speziesunterschiede bedingt sein.

Der Grund für die gezeigten widersprüchlichen Daten ist unklar. Vermutlich spielt das Ausmaß der Überexpression von RasGRP4 in den verschiedenen Modellen eine wichtige Rolle. Zudem könnte auch die jeweils verwendete Isoform des RasGRP4 einen Einfluss auf die zu beobachtenden Effekte nehmen, zumal die bisher beschriebenen Isoformen in Ihrer biologischen Wirksamkeit nicht charakterisiert sind. Ebenso erscheinen speziesspezifische Unterschiede zwischen Mastzellen des Menschen und der Maus eine Rolle zu spielen. Die bisherige Datenlage zu RasGRP4 und seiner Funktion ist zudem schwach.

F.3 Überexpression von RasGRP4 in HMC-1 Zellen

Basierend auf dem Nachweis einer inaktiven Splicevariante des RasGRP4 in HMC-1 Zellen und den nach Überexpression des murinen RasGRP4 durch Yang *et al.* (44) in HMC-1 Zellen beobachteten morphologischen Veränderungen wurde eine Beteiligung des RasGRP4 an Zelldifferenzierungsprozessen in Mastzellen angenommen. Deshalb sollte durch Überexpression der wt-Formen des murinen und humanen RasGRP4 in HMC-1-Mastzellen der Einfluss auf die Morphologie, Differenzierung und Mediatorexpression der Zellen untersucht werden.

F.3.1 Plasmid-Design

Die zur Überexpression von RasGRP4 in HMC-1 Zellen klonierten Expressionsplasmide basieren auf dem pcDNA3.1Hygro(+) Expressionssystem, das in der Arbeitsgruppe bereits durch Schmidt *et al.* erfolgreich zur Transfektion der HMC-1 Zelllinie verwendet wurde (64). Zur Überprüfung der Expression und zur Lokalisation der Transgene wurden auch Fusionskonstrukte aus RasGRP4 und eYFP kloniert. EGFP und seine Varianten wie eYFP gelten als gute, nicht-toxische Reporter in Zellen der hämatopoetischen Zellreihe (65), die den Nachweis der Transgene in vitalen Zellen und eine genaue intrazelluläre Lokalisation der Fusionskonstrukte erlauben. Sowohl durch Schmidt *et al.* (64), als auch im Rahmen dieser Arbeit konnten keine zytotoxischen Effekte des eYFP auf HMC-1 Zellen und kein Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. Die zur Klonierung der Expressions-Plasmide verwendete Isoform des humanen RasGRP4 ist die von Yang *et al.* (44) aus Mastzellen gesunder Probanden Isolierte Isoform a. Nach aktuellem Kenntnisstand wird davon ausgegangen, dass diese Variante eine biologisch aktive Isoform darstellt. Zwischenzeitlich wurden jedoch weitere Isoformen isoliert, Die insbesondere bei Patienten mit Mastzell-assoziierten Erkrankungen wie Asthma Bronchiale oder Rheumatoider Arthritis nachgewiesen wurden. Diese Isoformen unterscheiden sich teils nur um wenige Aminosäuren, eine Charakterisierung ist bis dato nicht erfolgt (53). Die in der Arbeit verwendete murine Isoform 1 wurde bereits erfolgreich von Yang *et al.* (44) zur Transfektion von Hek293 und HMC-1 Zellen verwendet und gilt unter den 2 bisher bekannten Isoformen als die biologisch aktive.

Durch Überexpression der Plasmide in Hek293 Zellen konnte mittels immunologischem Nachweis gezeigt werden, dass Proteine und Fusionsproteine

korrekter Masse translatiert und durch die vorhandenen Antiseren selektiv detektiert werden (Abb. E.1.4).

F.3.2 Transiente Überexpression

Zur transienten Überexpression von murinem und humanem RasGRP4 und deren eYFP-Fusionsproteine wurde die HMC-1 Zelllinie mittels Lipofektion transfiziert. Während mit den ca. 8,3 kBp großen pcDNA3.1Hygro(+)-h/m-RasGRP4-eYFP-Plasmiden Transfektionseffizienzen von $13 \pm 2 \%$ und $11 \pm 1 \%$ erreicht wurden, wurden mit den 7,5 kBp großen pcDNA3.1Hygro(+)- β/γ -Tryptase-eYFP-Plasmiden $14 \pm 4 \%$ und $19 \pm 3 \%$ und mit den 6,3 kBp großen pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP-Plasmiden von $62 \pm 9 \%$ erreicht. Dies scheint weniger am Transgen selbst, als an der Plasmidgröße zu liegen, da unterschiedliche Transgene transfiziert wurden und die Transfektionseffizienzen mit steigender Plasmidgröße abnehmen (Abb. E.1.6). Eine negative Korrelation zwischen Plasmidgröße und Transfektionseffizienz wurde auch in anderen Systemen beobachtet und systematisch untersucht (66). Eigene Versuche, die Transfektionseffizienz z.B. durch Anpassung der verwendeten Plasmidmenge an die Plasmidgröße oder die Lipofektanz-DNA-Ratio zu optimieren, scheiterten. Die Änderung der Lipofektanz-DNA-Ratio führte zur Zunahme avitaler Zellen und niedrigeren Transfektionseffizienzen, was bereits 2007 auch von anderen Autoren in anderen Zellmodellen beschrieben wurde (67). Es erschien daher kaum möglich, einen ausreichend großen Anteil einer HMC-1 Zellpopulation mit RasGRP4-eYFP transient zu transfizieren, um anschließend Aussagen über Änderungen der Zellmorphologie und Kultureigenschaften machen zu können.

F.3.3 Stabile Überexpression

Um die Probleme der niedrigen Transfektionseffizienzen zu umgehen und homogene Zellpopulationen zu generieren, wurde versucht, HMC-1 Zellen mit den pcDNA3.1Hygro(+)-RasGRP4-eYFP-Plasmiden stabil zu transfizieren. Dabei musste jedoch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass RasGRP4 durch eine Beeinflussung der Zelldifferenzierung die Proliferation verlangsamt und deshalb die Etablierung stabiler RasGRP4-eYFP-HMC-1-Zelllinien unter konstitutiver Überexpression nicht möglich sein könnte. Nach transienter Transfektion der pcDNA3.1Hygro(+)-RasGRP4-eYFP- und pcDNA3.1Hygro(+)-eYFP-Konstrukte zeigten die pcDNA3.1Hygro(+)-RasGRP4-eYFP transfizierten Kulturen keine Proliferation. Dagegen konnten jedoch durch antibiotische Selektion stabile eYFP

exprimierende HMC-1-Kulturen etabliert werden, die sich morphologisch und in Bezug auf die Zellvitalität nicht von HMC-1 Zellen unterscheiden (Abb. E.1.7). Zudem gelang es in parallelen Projekten in der Arbeitsgruppe mit zu den pcDNA3.1Hygro(+)-RasGRP4-eYFP- vergleichbar großen pcDNA3.1Hygro(+)-Tryptase-eYFP-Plasmiden stabile, gut proliferierende Zellklone zu etablieren (64). Daher scheint die Beeinflussung durch das exprimierte RasGRP4-Transgen ursächlich für die ausbleibende Etablierung stabiler Transfektanden zu sein.

Demgegenüber stehen die Daten von Katsoulotos *et al.*, die 2008 humanes RasGRP4-eYFP in HMC-1 Zellen stabil konstitutiv überexprimierten. Die Gruppe verwendete im Gegensatz zu der in dieser Arbeit eingesetzten Lipofektion mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) den Nucleofector (Amaxa) zur Elektroporation. Es gelang ihnen 8 stabile Klone, die unterschiedliche Transgenmengen exprimieren, zu etablieren (52). Eine Veränderung der exprimierten Tryptase-Menge oder der Proliferationsrate zeigten sie nicht. Hier wären Sequenzierungsdaten der transfizierten cDNA interessant, um Mutationen in relevanten Domänen des RasGRP4 auszuschließen und zu evaluieren, ob ggf. eine biologisch weniger aktive Isoform des RasGRP4 transfiziert wurde.

Nach mehreren erfolglosen Versuchen der Etablierung stabiler RasGRP4-eYFP-HMC-1 Klone unter konstitutivem Promoter wurde daher ein alternativer Ansatz gewählt und ein System zur Zeit- und Mengengesteuerten Genexpression etabliert, um mögliche Beeinflussungen der Proliferation und Vitalität der Zellen durch überexprimiertes RasGRP4 zu umgehen.

F.3.4 Doxyzyklin-induzierbare Überexpression

F.3.4.1 Etablierung des Systems

Das zur induzierbaren Überexpression von RasGRP4 verwendete pTetOn-Advanced System wurde ausgewählt, da es bereits mehrfach erfolgreich in Eukaryoten eingesetzt wurde, verschiedene Expressionsvektoren für unterschiedliche Anforderungen existieren und die konzentrationsabhängige Transgenexpression durch geringe Doxyzyklin-Konzentrationen erreicht werden kann. Nach stabiler Transfektion der HMC-1 Zelllinie mit dem Transaktivatorplasmid (E.2.3.1) wurde die entstandene HMC-Transaktivator-1 Zelllinie (HMC-T-1) durch transiente Überexpression von pTRE-tight-eYFP auf ihre Induzierbarkeit überprüft (E.2.3.2); die von Zhou *et al.* für andere Zelllinien beschriebene (68) Doxyzyklin-Konzentrationsabhängige Transgen-Expression bei geringer basaler Expression konnte im

Wesentlichen bestätigt werden. Je nach Klon konnte nach transienter Transfektion mit pTRE-tight-eYFP eine bis zu 9-fache Überexpression der Transgenmenge nach Induktion erreicht werden. Nach Selektion stabiler Klone wurde je nach Klon eine bis zu 44-fache Zunahme des überexprimierten eYFP nach Induktion beobachtet. Die entstandene Transaktivator-Zelllinie HMC-T-1 unterscheidet sich in der Zellmorphologie nicht von der HMC-1 Zelllinie. Sowohl Fife *et al.* (69) als auch Son *et al.* (70) beschrieben eine Doxyzyklin-bedingte reduzierte Proliferationsrate und Induktion von Apoptose in verschiedenen Zelllinien. Unsere Ergebnisse in E.3.4.1 zeigen dagegen keine Zunahme der PI-Aufnahme als Ausdruck einer Zunahme avitaler Zellen durch die von uns verwendeten Doxyzyklin-Konzentrationen. Eine Beeinträchtigung der Proliferationsrate zeigte sich ebenfalls nicht.

F.3.4.2 Überexpression von RasGRP4 in HMC-T-1-Zellen

Analog zur Etablierung stabiler eYFP-HMC-T-1-Transfektanden wurden HMC-T-1 Zellen mit pTRE-tight-hRasGRP4-eYFP transfiziert (E.3.1). Trotz vergleichbarer Transfektionseffizienzen zu pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP gelang es durch antibiotische Selektion nicht, stabile hRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Zellen zu generieren.

Im Gegensatz zu hRasGRP4-eYFP konnte nach Transfektion der HMC-T-1 Zellen mit pTRE-tight-mRasGRP4-eYFP eine stabil transfizierte Subpopulation der Zellen selektiert und mittels „limited dilution cloning“ 3 stabile Klone etabliert werden. Diese Zellen zeigen eine basale Expression des Transgens und eine Doxyzyklin-Konzentrations-abhängige Expressionszunahme des mRasGRP4-eYFP (Abb. E.3.3), proliferieren jedoch.

Eine mögliche Ursache für die frustrierten Versuche der Selektion stabiler hRasGRP4-eYFP-Klone könnte in der Durchlässigkeit des Systems und der damit verbundenen basalen Expression des Transgens liegen, sofern die Hypothese, dass die Überexpression von RasGRP4 zu Wachstumsarrest und Apoptose führt, zutrifft. Die Tatsache, dass die mRasGRP4-eYFP Klone trotz basaler Expression proliferieren, könnte für eine schwächere biologische Wirksamkeit der murinen RasGRP4 Isoform in humanen Mastzellen sprechen.

Eine mögliche Verringerung der Durchlässigkeit des Systems könnte durch Transfektion eines spezifischen, für das System erhältlichen Silencers erreicht werden. Dieser wurde jedoch für die erste Generation des TetOn Systems entwickelt und kann laut Hersteller nicht mit dem von uns verwendeten System der zweiten Generation

verwendet werden. 2010 beschrieben Loew *et al.* (71) die Weiterentwicklung des Transaktivators zur Reduktion der basalen Expression. Dies resultierte in einer neuen Vektorgeneration, die kommerziell erhältlich ist und eine deutliche Reduktion der basalen Expression bei Zunahme der Sensitivität gegenüber Doxyzyklin verspricht. Erstmals ist mit der dritten Generation auch die Möglichkeit gegeben, Transaktivator und Transgen auf einem Plasmid zu codieren und somit einen Transfektionsschritt einzusparen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse erscheint die weitere Reduktion der basalen Expression insbesondere im Fall des humanen RasGRP4 ein wichtiger Schritt zur Etablierung stabil induzierbarer hRasGRP4 überexprimierender HMC-T-1 Klone zu sein.

F.3.5 Pilotstudien zur Charakterisierung der HMC-T-1-mRasGRP4-eYFP Klone

Zur Überprüfung der Kryostabilität der stabilen mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1 Klone wurden Aliquots bei -196°C konserviert und getaut (E.3.6). Es zeigte sich kein Verlust der induzierbaren Transgenexpression. Anschließende Vergleiche der PI-Aufnahme zum Nachweis avitaler Zellen zwischen wt-HMC-T-1-, eYFP-HMC-T-1- und mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Zellen zeigen bereits im nicht-induzierten Zustand eine deutlich höhere PI-Aufnahme der mRasGRP4-eYFP-Zellen, die nach Induktion noch zunimmt (Tab. 14). Dabei überrascht es, dass eine Zellpopulation, die kontinuierlich 20-30 % avitale Zellen aufweist, proliferiert. Murines RasGRP4-eYFP scheint die Zellvitalität zu beeinflussen und zytotoxisch zu wirken. Ob dies durch Induktion von Apoptose geschieht, muss in weiteren Experimenten z.B. durch PI-Annexin-V Doppelfärbung untersucht werden. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die stabile, konstitutive Überexpression von RasGRP4 in HMC-1 Zellen nicht möglich ist, da bereits geringe Mengen des überexprimierten RasGRP4 die Zellvitalität negativ beeinflussen. Zudem hat sich die Passagezeit der Zellen merklich verlängert, was in folgenden Proliferationsstudien zu quantifizieren sein wird.

Die stabilen mRasGRP4-eYFP Klone zeigen in der Durchflusszytometrie bereits im nicht induzierten Zustand eine deutliche Zunahme der Zellgröße und Granularität (Abb. E.3.5 u. Abb. E.3.6). Durch den Vergleich mit HMC-T-1 und HMC-T-1-eYFP-Zellen als Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass diese Zunahme durch die Überexpression des Transaktivators und/oder eYFP bedingt ist. Auch klonale Effekte, die bei subklonierten Zelllinien immer als Störfaktoren in Betracht gezogen werden müssen, konnten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Zur initialen Charakterisierung der mRasGRP4-eYFP Klone wurde in einem Pilotexperiment der Tryptase-Gehalt des mRasGRP4-eYFP-HMC-T-1-Klons b12 mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. E.3.7). Neben der Zunahme der Granularität konnte hier eine größere Tryptase-Menge in den zytoplasmatischen Granula gegenüber HMC-T-1 Zellen nachgewiesen werden. Da Tryptase als wichtiger Marker für den reifen Mastzellphänotypen gilt, lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass bereits durch die basale Expression von murinem RasGRP4-eYFP ein Differenzierungsprozess zu einem Mastzell-ähnlicheren Phänotyp initiiert wurde. Yang *et al.* zeigten 2002 ebenfalls eine Zunahme der Tryptase-Menge nach Überexpression von mRasGRP4-eYFP in HMC-1. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den 2008 von Katsoulotos *et al.* gemachten Beobachtungen, dass humanes RasGRP4 keinen Einfluss auf die Expression der Tryptase nimmt (52). Inwiefern sich hier Unterschiede in der Wirkung von murinem und humanem RasGRP4 auf die HMC-1 Zellen widerspiegeln, muss durch weitere Untersuchungen gezeigt werden, die vorerst aufgeschoben wurden, da zunächst durch Optimierung des Expressions-Systems die Etablierung stabiler hRasGRP4-eYFP-HMC-T-1, mRasGRP4-HMC-T-1 und hRasGRP4-HMC-T-1 Klone im Vordergrund steht. Ebenso sollen verschiedene Isoformen des RasGRP4 zur Untersuchung der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit überexprimiert werden.

F.4 Synopsis und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde murines RasGRP4 in der HMC-1 Mastzelllinie durch Überexpression untersucht. Durch die Etablierung des pTet-On-Advanced Systems zur Tetrazyklin-induzierbaren Genexpression gelang es, murines RasGRP4-eYFP stabil in HMC-1 Zellen zu exprimieren und in Pilotstudien zu untersuchen. Erste Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Zellgröße und Granularität sowie eine Zunahme avitaler Zellen in der Population. Zudem konnte die Zunahme der Granula-assoziierten Tryptase-Menge beobachtet werden.

Zur weiteren Untersuchung von RasGRP4 sollen jetzt zunächst die entstandenen mRasGRP4-eYFP exprimierenden HMC-T-1-Zellen charakterisiert werden. Aufgrund der deutlich verlangsamten Proliferation und des erhöhten Anteils avitaler Zellen in der Population der mRasGRP4-eYFP basal exprimierenden HMC-T-1 Zellen sind diese Untersuchungen äußerst zeitaufwendig. Neben der Untersuchung der Expression wichtiger charakteristischer Oberflächenantigene wie der aus mehreren Untereinheiten bestehende IgE-Rezeptor und der Wachstumsfaktorrezeptor c-KIT (CD117) muss auch die quantitative und qualitative Analyse der Granula-assoziierten Mediatoren Histamin, Tryptase (11), Chymase (12) und Carboxypeptidase A erfolgen. Das zur Überexpression von RasGRP4-eYFP verwendete pTet-On-Advanced System weist in HMC-1 Zellen eine basale Expressionsrate auf, die so gering ist, dass das in den stabilen mRasGRP4-eYFP-Klonen exprimierte eYFP fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar ist. Lediglich in der sehr sensitiven Durchflusszytometrie kann eine gering erhöhte Fluoreszenz der Transfektanden gezeigt werden. Diese Zellen zeigen jedoch eine Veränderung der Zellmorphologie und des Proliferationsverhaltens.

Humanes RasGRP4-eYFP exprimierende Klone konnten bisher nicht etabliert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine im Vergleich zur murinen Isoform höhere biologische Aktivität sein, so dass die basale Expression bereits zur Negativselektion ausreicht. Um die zur Charakterisierung von RasGRP4 benötigten weiteren stabilen HMC-T-1-Klone, die hRasGRP4-eYFP, hRasGRP4 und mRasGRP4 induzierbar überexprimieren zu etablieren, erscheint eine stärkere Unterdrückung der basalen Expression notwendig. Hier könnte das pTetOn-Advanced System der 3. Generation genutzt werden, das eine deutlich niedrigere basale Expression der Transgene verspricht.

Ein alternativer Ansatz zur Untersuchung des RasGRP4 in Mastzellen könnte der kurzfristige Knock-out mittels siRNA sein. Neben den aufwendig zu generierenden und kultivierenden primären Mastzellen könnte hierzu die neu etablierte Mastzelllinie ROSA eingesetzt werden. Zusätzlich könnte, basierend auf den Ergebnissen aus dem 2012 beschriebenen Knock-out-Mausmodell, die sequenzielle Ausschaltung sämtlicher RasGRPs in humanen und murinen Mastzellen zur Untersuchung ihres jeweiligen Einflusses auf den Differenzierungsgrad interessant sein. Für einen längerfristigen Knock-out von RasGRPs in Mastzellen könnte auf das mittlerweile gut etablierte genome-editing mittels CrisprCas9 zurückgegriffen werden (72). Vorstellbar wäre hier auch das Einfügen der „gain of function“ Mutation D816V des c-KIT Gens zur Etablierung immortalisierter primärer Mastzellen oder die gezielte Mutation des RasGRP4 Gens zur Untersuchung der biologischen Bedeutung der verschiedenen Splicevarianten.

Zusammenfassend erscheint die Überexpression von RasGRP4 zur Beeinflussung der Differenzierung von HMC-1 Mastzellen prinzipiell möglich. Insbesondere die zeit- und mengengesteuerte Genexpression scheint hier ein vielversprechendes Instrument zur Etablierung stabiler, proliferierender RasGRP4-HMC-T-1-Klone zu sein. Nach stärkerer Unterdrückung der basalen Expression der induzierbaren RasGRP4-Expressionsplasmide erscheint es möglich, induzierbar differenziertere HMC-1 Zellen herzustellen und als weiteres humanes Mastzell-Modellsystem zu etablieren.

G Literaturverzeichnis

1. Ehrlich P. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung [Dissertation]. Leipzig: Universität Leipzig; 1878.
2. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiological reviews* 1997; 77(4):1033–79.
3. Kirshenbaum AS, Kessler SW, Goff JP, Metcalfe DD. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 1991; 146(5):1410–5.
4. Irani AM, Nilsson G, Miettinen U, Craig SS, Ashman LK, Ishizaka T et al. Recombinant human stem cell factor stimulates differentiation of mast cells from dispersed human fetal liver cells. *Blood* 1992; 80(12):3009–21.
5. Mitsui H, Furitsu T, Dvorak AM, Irani AM, Schwartz LB, Inagaki N et al. Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(2):735–9.
6. Valent P, Spanblochl E, Sperr WR, Sillaber C, Zsebo KM, Agis H et al. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 1992; 80(9):2237–45.
7. Kinoshita T, Sawai N, Hidaka E, Yamashita T, Koike K. Interleukin-6 directly modulates stem cell factor-dependent development of human mast cells derived from CD34(+) cord blood cells. *Blood* 1999; 94(2):496–508.
8. Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *The Journal of experimental medicine* 1991; 173(2):507–10.
9. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of leukocyte biology* 1997; 61(3):233–45.
10. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112(4):946–56.

11. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells. Purification and characterization. *The Journal of biological chemistry* 1981; 256(22):11939–43.
12. Schechter NM, Choi JK, Slavin DA, Deresienski DT, Sayama S, Dong G et al. Identification of a chymotrypsin-like proteinase in human mast cells. *J Immunol* 1986; 137(3):962–70.
13. Goldstein SM, Kaempfer CE, Proud D, Schwartz LB, Irani AM, Wintroub BU. Detection and partial characterization of a human mast cell carboxypeptidase. *J Immunol* 1987; 139(8):2724–9.
14. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. Regulation of the activity of secreted human lung mast cell tryptase by mast cell proteoglycans. *Biochimica et biophysica acta* 1998; 1425(3):617–27.
15. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 2010; 85(6):336–49.
16. Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts, L. J., 2nd. Prostaglandin D₂ generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol* 1982; 129(4):1627–31.
17. Kambayashi T, Allenspach EJ, Chang JT, Zou T, Shoag JE, Reiner SL et al. Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. *J Immunol* 2009; 182(8):4686–95.
18. Gaudenzio N, Espagnol N, Mars LT, Liblau R, Valitutti S, Espinosa E. Cell-cell cooperation at the T helper cell/mast cell immunological synapse. *Blood* 2009; 114(24):4979–88.
19. Galli SJ, Naka S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 2005; 6(2):135–42.
20. Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M. Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Experimental dermatology* 2001; 10(1):1–10.
21. Marshall JS. Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews. Immunology* 2004; 4(10):787–99.

22. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB et al. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological reviews* 2004; 201:139–55.
23. Kemp SF, Lockey RF. Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002; 110(3):341–8.
24. Andersen HB, Holm M, Hetland TE, Dahl C, Junker S, Schiotz PO et al. Comparison of short term in vitro cultured human mast cells from different progenitors - Peripheral blood-derived progenitors generate highly mature and functional mast cells. *Journal of immunological methods* 2008; 336(2):166–74.
25. Holm M, Andersen HB, Hetland TE, Dahl C, Hoffmann HJ, Junker S et al. Seven week culture of functional human mast cells from buffy coat preparations. *Journal of immunological methods* 2008; 336(2):213–21.
26. Irani AM, Schwartz LB. Human mast cell heterogeneity. *Allergy proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 1994; 15(6):303–8.
27. Shiohara M, Koike K. Regulation of mast cell development. *Chemical immunology and allergy* 2005; 87:1–21.
28. Laidlaw TM, Steinke JW, Tinana AM, Feng C, Xing W, Lam BK et al. Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcεRI. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 127(3):815-22 e1-5.
29. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia research* 1988; 12(4):345–55.
30. Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U 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. *The Journal of clinical investigation* 1993; 92(4):1736–44.
31. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, Kjellen L, Butterfield JH, Sundstrom C et al. Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scandinavian journal of immunology* 1994; 39(5):489–98.

32. Walia DS, Sharma M, Raveendran VV, Zhou J, Sharma R, Stechschulte DJ et al. Human mast cells (HMC-1 5C6) enhance interleukin-6 production by quiescent and lipopolysaccharide-stimulated human coronary artery endothelial cells. *Mediators of inflammation* 2012; 2012:274347.
33. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, Rottem M, Goff JP, Beaven MA 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. *Leukemia research* 2003; 27(8):677–82.
34. Belot MP, Abdennebi-Najar L, Gaudin F, Emilie D, Machelon V. Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation. *Journal of cellular biochemistry* 2007; 102(5):1271–80.
35. Kim JY, Kim DY, Ro JY. Granule formation in NGF-cultured mast cells is associated with expressions of pyruvate kinase type M2 and annexin I proteins. *International archives of allergy and immunology* 2008; 146(4):287–97.
36. Yu S, Zhang R, Zhu C, Cheng J, Wang H, Wu J. MicroRNA-143 downregulates interleukin-13 receptor alpha1 in human mast cells. *International journal of molecular sciences* 2013; 14(8):16958–69.
37. Kim SH, Kang YM, Cho BY, Ye YM, Hur GY, Park HS. Histamine N-methyltransferase 939A>G polymorphism affects mRNA stability in patients with acetylsalicylic acid-intolerant chronic urticaria. *Allergy* 2009; 64(2):213–21.
38. Jeong HJ, Moon PD, Kim SJ, Seo JU, Kang TH, Kim JJ et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 regulates human histidine decarboxylase expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009; 66(7):1309–19.
39. Ma Z, Jhun B, Jung SY, Oh CK. Binding of upstream stimulatory factor 1 to the E-box regulates the 4G/5G polymorphism-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression in mast cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; 121(4):1006-1012 e2.
40. Park HJ, Yoon SH, Zheng LT, Lee KH, Kim JW, Chung JH et al. Association of the -2510A/G chemokine (C-C motif) ligand 2 polymorphism with knee osteoarthritis in a Korean population. *Scandinavian journal of rheumatology* 2007; 36(4):299–306.

41. Park HH, Lee S, Oh JM, Lee MS, Yoon KH, Park BH et al. Anti-inflammatory activity of fisetin in human mast cells (HMC-1). *Pharmacological research* 2007; 55(1):31–7.
42. Belot MP, Abdennebi-Najar L, Gaudin F, Lieberherr M, Godot V, Taieb J et al. Progesterone reduces the migration of mast cells toward the chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 with an accompanying decrease in CXCR4 receptors. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2007; 292(5):E1410-7.
43. Yang J, Hu G, Wang SW, Li Y, Martin R, Li K et al. Calcineurin/nuclear factors of activated T cells (NFAT)-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein (CNAIP), a novel ITAM-containing protein that activates the calcineurin/NFAT-signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278(19):16797–801.
44. Yang Y, Li L, Wong GW, Krilis SA, Madhusudhan MS, Sali A et al. RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. Identification of defective variants of this signaling protein in asthma, mastocytosis, and mast cell leukemia patients and demonstration of the importance of RasGRP4 in mast cell development and function. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277(28):25756–74.
45. Nickel RG, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes KC, Plunkett BS et al. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol* 2000; 164(3):1612–6.
46. Xia YC, Sun S, Kuek LE, Lopata AL, Hulett MD, Mackay GA. Human mast cell line-1 (HMC-1) cells transfected with FcepsilonRIalpha are sensitive to IgE/antigen-mediated stimulation demonstrating selectivity towards cytokine production. *International immunopharmacology* 2011; 11(8):1002–11.
47. Nakayama F, Muller K, Hagiwara A, Ridi R, Akashi M, Meineke V. Involvement of intracellular expression of FGF12 in radiation-induced apoptosis in mast cells. *Journal of radiation research* 2008; 49(5):491–501.
48. Ali H, Ahamed J, Hernandez-Munain C, Baron JL, Krangel MS, Patel DD. Chemokine production by G protein-coupled receptor activation in a human mast cell

-
- line: roles of extracellular signal-regulated kinase and NFAT. *J Immunol* 2000; 165(12):7215–23.
49. Specks U, Fass DN, Fautsch MP, Hummel AM, Viss MA. Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA. *FEBS letters* 1996; 390(3):265–70.
50. Zhu M, Fuller DM, Zhang W. The role of Ras guanine nucleotide releasing protein 4 in Fc epsilonRI-mediated signaling, mast cell function, and T cell development. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287(11):8135–43.
51. Suire S, Lecureuil C, Anderson KE, Damoulakis G, Niewczas I, Davidson K et al. GPCR activation of Ras and PI3Kc in neutrophils depends on PLCb2/b3 and the RasGEF RasGRP4. *The EMBO journal* 2012; 31(14):3118–29.
52. Katsoulotos GP, Qi M, Qi JC, Tanaka K, Hughes WE, Molloy TJ et al. The Diacylglycerol-dependent translocation of ras guanine nucleotide-releasing protein 4 inside a human mast cell line results in substantial phenotypic changes, including expression of interleukin 13 receptor alpha2. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283(3):1610–21.
53. Hashimoto T, Yasuda S, Koide H, Kataoka H, Horita T, Atsumi T et al. Aberrant splicing of the hRasGRP4 transcript and decreased levels of this signaling protein in the peripheral blood mononuclear cells in a subset of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2011; 13(5):R154.
54. Grimbaldston MA, Chen C-C, Piliponsky AM, Tsai M, Tam S-Y, Galli SJ. Mast Cell-Deficient *W-sash* c-kit Mutant *Kit^{W-sh/W-sh}* Mice as a Model for Investigating Mast Cell Biology in Vivo. *The American Journal of Pathology* 2005; 167(3):835–48.
55. Nakano T. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal, and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient *W/W^v* mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 1985; 162(3):1025–43.
56. Christofidou-Solomidou M, Longley BJ, Whitaker-Menezes D, Albelda SM, Murphy GF. Human skin/SCID mouse chimeras as an in vivo model for human cutaneous mast cell hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1997; 109(1):102–7.

57. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, Gleich GJ. Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia research* 1988; 12(4):345–55.
58. Saleh R, Wedeh G, Herrmann H, Bibi S, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I et al. A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection. *Blood* 2014; 124(1):111–20.
59. Arock M, Le Nours A, Malbec O, Daeron M. Ex vivo and in vitro primary mast cells. *Methods Mol Biol* 2008; 415:241–54.
60. Stone JC. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer* 2011; 2(3):320–34.
61. Ksionda O, Limnander A, Roose JP. RasGRP Ras guanine nucleotide exchange factors in cancer. *Front Biol (Beijing)* 2013; 8(5):508–32.
62. Reuther GW, Lambert QT, Rebhun JF, Caligiuri MA, Quilliam LA, Der CJ. RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 2002; 277(34):30508–14.
63. Liu Y, Zhu M, Nishida K, Hirano T, Zhang W. An essential role for RasGRP1 in mast cell function and IgE-mediated allergic response. *J Exp Med* 2007; 204(1):93–103.
64. Schmidt T. Prozessierung und Lokalisierung der Tryptasen γ und δ in HMC-1 Mastzellen [Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2015.
65. Tao W, Evans B-G, Yao J, Cooper S, Cornetta K, Ballas CB et al. Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-express fluorescent protein is not. *Stem Cells* 2007; 25(3):670–8.
66. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, Airiau M et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic acids research* 1999; 27(19):3792–8.
67. Nguyen LT, Atobe K, Barichello JM, Ishida T, Kiwada H. Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2007; 30(4):751–7.

68. Tian X, Wang G, Xu Y, Wang P, Chen S, Yang H et al. An improved tet-on system for gene expression in neurons delivered by a single lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 2009; 20(2):113–23.
69. Fife RS, Rougraff BT, Proctor C, Sledge, G. W., Jr. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1997; 130(5):530–4.
70. Son K, Fujioka S, Iida T, Furukawa K, Fujita T, Yamada H et al. Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Anticancer research* 2009; 29(10):3995–4003.
71. Loew R, Heinz N, Hampf M, Bujard H, Gossen M. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnol* 2010; 10:81.
72. Le Cong, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121):819–23.

H Danksagung

An erster Stelle möchte ich meine zutiefst empfundene Dankbarkeit meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Christian P. Sommerhoff ausdrücken. Neben der Auswahl und Überlassung des Themas wurde ich von ihm freundlich und herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und es entwickelten sich fruchtbare, teils stundenlange wissenschaftliche Diskussionen und Gespräche, in denen stets mein Ansporn und Interesse geweckt und mit der Zeit mein zunehmendes wissenschaftliches Selbstverständnis geschaffen und geprägt wurde. Hierbei stand generell das Hinführen zur selbstständigen Lösungsfindung im Vordergrund. Die Möglichkeit, mein Thema selbst mitgestalten und in verschiedene Richtungen lenken zu können, lerne ich mehr und mehr zu schätzen und weiß heute, dass dies nicht als selbstverständlich gilt. Auch unter Inkaufnahme eines zeit- und ressourcenzehrenden Fehlversuches konnte ich eigene wissenschaftliche Ansätze und Ideen umsetzen und an Erfahrung gewinnen. Ich werde stets mit Freude auf jene Zeit der gemeinsamen, wissenschaftlichen Arbeit mit Herrn Professor Sommerhoff zurückblicken.

Zwei besonderen Menschen möchte ich zudem für die vielen methodisch/wissenschaftlichen Ratschläge, Tipps, Hilfestellungen und ausgelassenen (Abend-)Stunden danken! Dr. rer. nat. Maresa Grundhuber und Dr. rer. nat. Larisa Ring. Vielen Dank!

Technisch und menschlich begleitet wurde ich insbesondere durch Erika Falk, die mir vor allem in der Anfangszeit das Rüstzeug beibrachte und mir bis zuletzt geduldig in allen technisch/methodischen Fragen zur Seite stand und Stefan Simon, der mich tatkräftig in allen molekularbiologischen Fragen unterstützte.

Zudem möchte ich auch den anderen Mitgliedern der „AG Sommerhoff“ ein herzliches Dankeschön entgegenbringen, es war eine gute, erfahrungsreiche Zeit.

Die Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“ des Förderprogrammes für Forschung und Lehre (FöFoLe) der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München gefördert. Stellvertretend danke ich den damaligen Leitern des Promotionsstudienganges Frau Prof. Jochum und Herrn Prof. Heesemann für die Unterstützung der Arbeit.

Zum Schluss Danke ich hier meiner geliebten Frau Ann-Kathrin, die mich in der nicht immer leichten Zeit uneingeschränkt unterstützt hat und meinen Eltern, die mir stets zur Seite stehen und mir mit viel Liebe und Engagement das Hochschulstudium und folglich die Promotion ermöglicht haben.