

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibnitz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften
Abteilung: Molekulare Immunologie
Leiterin: Dr. Kyeong-Hee Lee
Direktor: Professor Dr. Ulrich Schaible

**Die funktionelle Rolle der
Membrantransportregulatoren RIN3 und Lyst in
der Mastzelldegranulation**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Beate Bozena Schurek
aus Ruda Slaska
Lübeck, 2011

-
1. Berichtstatter: Prof. Dr. Ulrich Schaible
 2. Berichtstatter: Prof. Dr. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.06.2012

Inhaltsverzeichnis

A. Abbildungsverzeichnis	iv
B. Tabellenverzeichnis	v
C. Abkürzungsverzeichnis	vi
1. Einleitung	1
1.1. Membrantransportprozesse in eukaryotischen Zellen	1
1.2. Sekretorische Granula in Immunzellen	2
1.3. Mastzellen	4
1.3.1. Abstammung, Bildung und Lokalisation von Mastzellen	4
1.3.2. Mastzellmediatoren	6
1.3.3. Mastzellen in der angeborenen und erworbenen Immunität	7
1.3.4. Degranulationsprozesse	9
1.3.5. Die Regulation der Degranulationsprozesse	12
1.4. RIN3	16
1.5. Lyst	18
2. Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methode	23
3.1. Material	23
3.1.1. Laborgeräte	23
3.1.2. Labormaterialien	24
3.1.3. Medien, Puffer, Lösungen	25
3.1.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	27
3.1.5. Antikörper	30
3.1.6. Reaktionskomplementausstattungen	31
3.1.7. Plasmide und Konstrukte	32
3.1.8. Oligonukleotide	33
3.1.9. miRNA Sequenzen	34
3.1.10. Tierstämme, Zelllinien und <i>E.coli</i> -Stämme	34
3.1.11. Software	35

3.2. Methode	36
3.2.1. Zellkultur	36
3.2.1.1. Kultivierung von Zellen	36
3.2.1.2. Zellzählung, Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
3.2.1.3. Transfektion von Säugerzellen	43
3.2.2. Molekularbiologische Methoden	44
3.2.2.1. RNA Isolation	44
3.2.2.2. cDNA Synthese	45
3.2.2.3. Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung	45
3.2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
3.2.2.5. Quantitative <i>real-time</i> PCR	48
3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.2.7. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen	49
3.2.2.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	49
3.2.2.9. Klonierung	50
3.2.2.10. Plasmidisolierungen	52
3.2.2.11. Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	53
3.2.2.12. DNA-Sequenzierung	53
3.2.3. RNAi Design und lentivirale Transfektion	53
3.2.3.1. Design von RIN3 spezifischen miRNAs	53
3.2.3.2. Produktion des Lentivirus in HEK293FT Zellen	54
3.2.3.3. Lentivirale Infektion von MC9 und RBL-2H3 Zellen	55
3.2.3.4. Generierung von stabilen Zellen	56
3.2.4. Biochemische Methoden	56
3.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten	56
3.2.4.2. Immunopräzipitation	56
3.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	57
3.2.4.4. Coomassie-Färbungen von SDS-Polyacrylamidgelen	57
3.2.4.5. Western-Blot	58
3.2.4.6. Durchflusszytometrie	58
3.2.5. Funktionelle Analysen von Mastzellen	59
3.2.5.1. Degranulation von Mastzellen (Lamp-1 Assay)	59
3.2.5.2. Degranulation von Mastzellen (β -Hexosaminidase Assay)	60
3.2.5.3. Zytokinproduktion (ELISA)	60
3.2.5.4. konfokale Mikroskopie	61
3.2.5.5. Statistische Analysen	62

4.	Ergebnisse	63
4.1.	RIN3	63
4.1.1.	Die relative Expression von RIN3 in unterschiedlichen Immunzellen	63
4.1.2.	Klonierung von muriner RIN3 cDNA	66
4.1.3.	Die zelluläre Lokalisation von RIN3 in Mastzellen	69
4.1.4.	Etablierung eines RIN3 Gen- <i>knock-down</i> in Mastzellen durch Benutzung eines lentiviralen miRNA Vektorsystems	75
4.1.4.1.	Der RIN3 Gen- <i>knock-down</i> durch miRNA	75
4.1.4.2.	Die Generierung von RIN3 spezifischen miRNA Konstrukten	76
4.1.4.3.	Die lentivirale Transfektion der RIN3 spezifischen miRNAs in MC9 Zellen	78
4.1.5.	Die Auswirkung des RIN3 <i>knock-down</i> auf die Degranulation von Mastzellen	80
4.1.6.	Die Auswirkung des RIN3 <i>knock-down</i> auf die Zytokinausschüttung von Mastzellen	82
4.2.	Lyst	85
4.2.1.	Lyst-mutante peritoneale Mastzellen weisen vergrößerte Lysosomen und eine veränderte Granularität im Vergleich zu Wildtyp Mastzellen auf	85
4.2.2.	Die Expression von FcεRI und c-Kit ist in Lyst-mutanten Mastzellen nicht beeinflusst	89
4.2.3.	Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die Degranulation von Mastzellen	90
4.2.4.	Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die Zytokinausschüttung von Mastzellen	92
4.2.5.	Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die FcεRI-abhängige Signalweiterleitung	94
5.	Diskussion	96
5.1.	RIN3 ist ein Regulator der Degranulation von Mastzellen	96
5.2.	Lyst ist ein Regulator der Lysosomengröße in Mastzellen und zeigt eine regulatorische Funktion in der Mastzelldegranulation	101
5.3.	Ausblick	104
6.	Zusammenfassung	106
7.	Literatur	108

A. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Degranulation von Mastzellen	11
Abbildung 1.2:	Schematische RIN3 Proteinstruktur	17
Abbildung 1.3:	Schematische Lyst Proteinstruktur	19
Abbildung 4.1:	Die relative Genexpression von RIN3 und RIN2 in unterschiedlichen Immunzellen und Zelllinien	65
Abbildung 4.2:	Schematische Darstellung der funktionellen RIN3 Proteindomänen	66
Abbildung 4.3:	Klonierung von muriner RIN3 cDNA in verschiedene Vektorsysteme	68
Abbildung 4.4:	Keine Koloalisation von RIN3-GFP mit Proteinen der Rab-Familie in Mastzellen	70
Abbildung 4.5:	RIN3 kolokalisierte mit kortikalem filamentären Aktin an der Plasmamembran	71
Abbildung 4.6:	RIN3 relokalierte nach Stimulation von der Plasmamembran in das Zytoplasma	73
Abbildung 4.7:	RIN3 relokalierte nach Stimulation von der Plasmamembran in das Zytoplasma und verlor die Assoziation mit kortikalem filamentären Aktin	73
Abbildung 4.8:	RIN3 kolokalisierte nicht signifikant mit dem Golgi-System	74
Abbildung 4.9:	Generierung von vier verschiedenen RIN3 spezifischen miRNAs	77
Abbildung 4.10:	Transfektion von MC9 Zellen mit RIN3 miRNA Konstrukten	79
Abbildung 4.11:	RIN3 knock-down Effizienz der miRIN3 transienten MC9 Zelllinien	80
Abbildung 4.12:	Die Degranulation von MC9 Zellen, die mit RIN3 spezifischen miRNAs transfiziert wurden, war erhöht	82
Abbildung 4.13:	Die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6 von MC9 Zellen, die mit RIN3 spezifischen miRNAs transfiziert wurden, war nach Stimulation erhöht	84
Abbildung 4.14:	Lyst-mutante peritoneale Mastzellen wiesen vergrößerte Lysosomen und eine veränderte Granularität auf, wohingegen die Gesamtmenge Lamp-1 nicht verändert war	88
Abbildung 4.15:	Die Oberflächenexpression von Fc ϵ RI und c-Kit war in Lyst ^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen nicht verändert	90
Abbildung 4.16:	Die Degranulation von Lyst ^{bg-J} Mastzellen war erniedrigt	91
Abbildung 4.17:	Die Zytokinausschüttung von Lyst ^{bg-J} Mastzellen war erniedrigt	93
Abbildung 4.18:	Die Aktivierung der Fc ϵ RI-abhängigen Signalkaskade in Lyst ^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen wies keinen detektierbaren Unterschied auf	95

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Übersicht der drei Hauptklassen von Mastzellmediatoren	7
Tabelle 3.1:	Laborgeräte	23
Tabelle 3.2:	Labormaterialien	24
Tabelle 3.3:	Chemikalien und Reagenzien	27
Tabelle 3.4:	Enzyme	30
Tabelle 3.5:	Primärantikörper	30
Tabelle 3.6:	Sekundärantikörper	31
Tabelle 3.7:	Antikörper-Kits	31
Tabelle 3.8:	Reaktionskomplementausstattungen (Kits)	31
Tabelle 3.9:	Plasmide	32
Tabelle 3.10:	Plasmidkonstrukte	32
Tabelle 3.11:	Oligonukleotide (Primer)	33
Tabelle 3.12:	RIN3 spezifische miRNA Sequenzen	34
Tabelle 3.13:	Zellen, Zelllinien, E.coli-Stämme	34
Tabelle 3.14:	Software	35
Tabelle 3.15:	Nukleofektor Programme und Lösungen	44
Tabelle 3.16:	PCR für Klonierungszwecke	46
Tabelle 3.17:	PCR für analytische Zwecke	47
Tabelle 3.18:	quantitative real-time PCR	48
Tabelle 3.19:	miRNA Sequenzen	54

C. Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gama
∞	unendlich
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Δ	delta
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ARM	<i>Armadillo-like repeats</i>
ATCC	<i>american type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMDC	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
BMDM	<i>bone marrow derived macrophages</i>
BMMC	<i>bone marrow derived mast cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHS	Chediak-Higashi-Syndrom
Ck2 β	<i>casein-kinase-II-β-subunit</i>
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concanavalin A
CTMC	<i>connective tissue mast cells</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2'-phenylindol- dihydrochlorid</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNP	Dinitrophenol
DNP-HSA	<i>dinitrophenol-human serum albumin</i>
dNTP	<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
EAA1	<i>early endosome marker 1</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EmGFP	<i>emerald green fluorescence protein</i>
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FcεRI	<i>Fc epsilon receptor I</i>
FKS	fötales Kälberserum
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward-scatter</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
Gab2	<i>GRB2-associated binder 2</i>
GalNAc-T2	N-acetylgalactosaminyltransferase 2
GC	Guanin, Cytosin
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GDI	<i>Rab-GDP dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>Guanosindiphosphat</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP-AV	<i>horseradish peroxidase avidin D</i>
HRS	<i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
HSA	<i>human serum albumin</i>

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IKK2	<i>inhibitory κB kinase-β</i>
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
Inc.	<i>incoperated</i>
INF	Interferon
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motiv</i>
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Lamp	<i>lysosome-associated membrane protein</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTB ₄	<i>Leukotrien B₄</i>
LTC ₄	<i>Leukotrien C₄</i>
Lyst	<i>lysosome trafficking regulator</i>
M	Molar
mA	Miliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	<i>mast cell</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating-factor</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	micro RNA
MIRR	<i>multi-chain immune recognition receptor</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMC	<i>mucosal mast cells</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Munc	<i>mammalian homologue of Unc</i>
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid

Abkürzungsverzeichnis

NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogram
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK	<i>natural killer cell</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NT3	Neurotrophin 3
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
OD	<i>optical density</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE	<i>Prostaglandin E</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI(3)K	<i>phosphatidylinositol-3-OH kinase</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC-γ	Phospholipase Cγ
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetat</i>
pmol	Picomol
PRD	<i>prolin rich domain</i>
<i>p-value</i>	<i>probability value</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>quantitative real time PCR</i>
p90RSK	<i>p90 ribosomal S6 kinase</i>
RA	<i>Ras-associaten</i>
Rab	<i>ras-related in brain</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RBL-2H3	<i>rat basophilic leukemia-2H3</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RH	<i>RIN-homology</i>
RIN3	<i>ras and rab interactor 3</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>

Abkürzungsverzeichnis

rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
shRNA	<i>short hairpin ribonuclein acid</i>
siRNA	<i>short interfering ribonuclein acid</i>
SNAP	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SSC	<i>sideward-scatter</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
S6-RP	<i>S6 ribosomal protein</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
Tab.	Tabelle
TAE	<i>Tris-Acetat-EDTA</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris buffered saline and Tween 20</i>
TE	<i>Tris-HCl and EDTA</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H 2	<i>T helper cell</i>
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
Ub	<i>ubiquitin homology domain</i>
U/μl	Unit/ Mikroliter
USA	<i>United states of America</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
V	Volt
VAMP	<i>vesicular-associated membrane fusion proteins</i>
V/cm	Volt/centimeter
Vps9	<i>vacuolar protein sorting 9</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
<i>g</i>	<i>gravity force</i>

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1. Membrantransportprozesse in eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen entwickelten mit zunehmender Komplexität die Fähigkeit eigene Syntheseprodukte in membranumhüllte Transportvesikel zu verpacken und an die Zellmembran zu transportieren, wo sie ihren Inhalt durch die Fusion der Plasmamembran mit der Vesikelmembran nach außen abgeben konnten. Dieser Prozess der Sekretion wird Exozytose genannt. Im Gegensatz dazu ist es eukaryotischen Zellen des Weiteren möglich durch den Vorgang der Endozytose Inhaltsstoffe aus dem äußeren Milieu in die Zelle aufzunehmen. Diese sekretorischen und endozytischen Wege ermöglichen es der Zelle Proteine und Lipide in ihrem Inneren zu transportieren. Dazu werden die zu transportierenden Inhaltsstoffe in Vesikel verpackt und in der Zelle zu ihren Bestimmungsorten geleitet.

Die Vorgänge der Exozytose können dabei konstitutiv oder signalabhängig ablaufen. Die konstitutive Exozytose ist Teil des kontinuierlichen vesikulären Transportsystems, das der Kommunikation zwischen den einzelnen Kompartimenten der Zelle und der Kommunikation der Zelle mit ihrer äußeren Umgebung dient. Durch dieses System kann die Zelle die charakteristische Zusammensetzung jedes Kompartiments bewahren und Syntheseprodukte durch Exozytose nach außen abgeben. Bei der konstitutiven Exozytose werden Syntheseprodukte in sekretorische Vesikel eingeschlossen, diese von der Donormembran abgeschnürt und an die Plasmamembran transportiert. Die sekretorischen Vesikel und die Plasmamembran fusionieren und der Inhalt der Vesikel wird exozytiert (Kirchhausen; 2000; Burgoyne und Morgan; 2003).

Bei der regulierten signalabhängigen Exozytose hingegen werden sekretorische Granula von bestimmten Zellen in ihrem Zytoplasma angereichert und können dort in einem ruhenden Stadium verweilen, um zu einem späteren Zeitpunkt aufgrund eines Stimulus durch Exozytose sekretiert zu werden. Sekretorische Granula sind spezialisierte intrazelluläre Organellen, in denen Syntheseprodukte der Zelle über längere Zeit aufbewahrt werden. Die Aktivierung der Zelle kann dabei neben der Einleitung der regulierten Exozytose auch zur Veränderung der Genexpression und Geninduktion führen. Unter ruhenden Bedingungen ist das Zytoplasma dieser

spezialisierten sekretorischen Zellen angereichert mit reifen sekretorischen Granula, die die Morphologie der Zelle bestimmen können (Arvan und Castle; 1998), wie dies unter anderem bei Mastzellen der Fall ist. Aufgrund der konstitutiven oder signalabhängigen Exozytose ist es der Zelle möglich sekretorische Produkte entsprechend zu sortieren und die unterschiedlichen Exozytosevorgänge zu regulieren.

1.2. Sekretorische Granula in Immunzellen

Sekretorische Granula kommen in vielen unterschiedlichen Zelltypen vor. Unter anderem sind sie in Neuronen zu finden, wo sie Neurotransmitter aufgrund eines Stimulus zur Reizweiterleitung in den synaptischen Spalt entlassen. Des Weiteren findet man sekretorische Granula in endokrinen und neuroendokrinen Zellen, in denen Peptide und Hormone gelagert werden und in exokrinen Zellen, die Verdauungsenzyme sekretieren (Burgoyne und Morgan; 2003). Eine wesentliche Rolle kommt sekretorischen Granula auch in Immunzellen zu. Man findet sie in Blutplättchen, T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK, *natural killer cell*), Makrophagen, dendritischen Zellen (DC, *dendritic cell*), Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen und Mastzellen (Burgoyne und Morgan; 2003; Blott und Griffiths; 2002). Fast alle Zellen des Immunsystems haben die Fähigkeit durch signalinduzierte regulierte Exozytose ihre immunologische Funktion auszuüben. Die Zellen des Immunsystems exozytieren dabei proinflammatorische und immunmodulatorische Mediatoren aus ihren sekretorischen Granula in das äußere Milieu. Diese sekretorischen Granula können dabei im Zytoplasma angereichert werden und über lange Zeit gelagert werden. Die sekretorischen Granula in Zellen hämatopoetischen Ursprungs zeigen dabei ähnliche Eigenschaften wie Lysosomen. In vielen Zellen können konventionelle Lysosomen auch durch einen Stimulus mit der Plasmamembran fusionieren, was vermuten lässt, dass sekretorische Granula aus einem lysosomalen Vorgänger hervorgegangen sein könnten (Burgoyne und Morgan; 2003).

Zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen erkennen infizierte und tumorgene Zellen und zerstören diese durch die Sekretion von zytolytischen Proteinen wie Perforin und Granzym, die in ihren sekretorischen Lysosomen gelagert werden. Im

Fälle der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen werden die sekretorischen Lysosomen auch als lytische Granula bezeichnet (Blott und Griffiths; 2002). Die Formation einer immunologischen Synapse an der Kontaktstelle zwischen der Effektorzelle und der Zielzelle erlaubt die Erkennung des Antigens im Komplex mit MHC-Klasse-I (MHC, *major histocompatibility complex*), das im Falle der T-Zellen durch den T-Zell-Rezeptor erkannt wird. Daraufhin werden die lytischen Granula entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert und sekretiert (Holt *et al.*; 2006).

Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen präsentieren CD4⁺ T-Helferzellen Antigene, die in einem Komplex mit dem MHC-Klasse-II assoziiert sind. Diese Antigen-präsentierenden Zellen degradieren und prozessieren endozytiertes Material, damit dieses später an MHC-II-Moleküle gebunden werden kann. Bis sich der MHC-Peptid-Komplex formt, werden das Antigen und das MHC-II-Molekül in einem MHC-II-Kompartiment gelagert, das einige Merkmale mit sekretorischen Lysosomen teilt (Blott und Griffiths; 2002).

Blutplättchen stammen von Megakaryozyten des Knochenmarks ab. Sie exozytieren Gerinnungsfaktoren, die sie zuvor in ihren Granula lagern, und leiten so die Gerinnung ein. Sie enthalten drei Sorten von sekretorischen Granula: α -Granula, dichte Granula und Lysosomen. Dichte Granula enthalten Serotonin, Calcium, ATP, ADP und Pyrophosphatase. Ihr Lumen ist weniger säurehaltig als das von Lysosomen, aber es wird angenommen, dass sie dennoch aus einem lysosomalen Vorgänger hervorgehen (Dell'Angelica *et al.*; 2000).

Neutrophile sind phagozytische Zellen, die im peripheren Blut zirkulieren und eine Rolle in der Abwehr eindringender Bakterien spielen. Sie enthalten drei Arten von sekretorischen Granula: azurophile, spezifische und Gelatinase-haltige Granula (Dell'Angelica *et al.*; 2000). Neutrophile nehmen exogene Partikel durch Endozytose in Phagosomen auf, in denen sich antibakterielle Agenzien, wie Defensine und Azurocidin, befinden. Diese Phagosomen fusionieren mit Lysosomen, um ein Phagolysosom zu bilden. In diesem wird das zu phagozytierende Material degradiert um anschließend eventuell sekretiert zu werden, wenn das Phagolysosom degranuliert (Blott und Griffiths; 2002).

Basophile und Mastzellen haben sekretorische Granula in ihrem Zytoplasma angereichert, die Mediatoren wie Histamin, Serotonin, Heparin und die Proteasen Trypsinase und Chymase enthalten. Ihre Ausschüttung bewirkt eine inflammatorische

Antwort im umliegenden Gewebe. Zusätzlich enthalten die Granula lysosomale Hydrolasen und lysosomale Membranproteine, wie Lamp-1 (*lysosome-associated membrane protein 1*), Lamp-2 und Lamp-3. Die Exozytose dieser Granula führt zu der Relokalisation dieser Membranproteine an die Zelloberfläche. Mit Hilfe von Clathrin-umhüllten-Vesikeln werden sie schnell wieder internalisiert und teilweise wieder zu den sekretorischen Granula recycelt (Dell'Angelica *et al.*; 2000). Die sekretorischen Granula der Mastzellen werden auch als Lysosom-ähnliche Granula bezeichnet (Burgoyne und Morgan; 2003). Der Inhalt ihrer Granula besteht hauptsächlich aus Proteinen, die in nicht-hämatopoetischen Zellen fast ausschließlich in den Lysosomen vorkommen. Daher werden die Granula der Mastzelle auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet (Blott und Griffiths; 2002).

1.3. Mastzellen

Mastzellen wurden zum ersten Mal ausführlich 1878 von Paul Ehrlich im Rahmen seiner Doktorarbeit beschrieben (Ehrlich; 1878). Er erkannte, dass das Zytoplasma dieser Zellen dicht gefüllt ist mit metachromatischen Granula und spekulierte, dass Mastzellen dieses Erscheinungsbild durch gesteigerte Phagozytose erhalten (Metcalf; 2008). Inzwischen weiß man, dass Mastzellen ihre zytoplasmatischen Granula selbst bilden und in ihrem Zytoplasma anreichern (Blank und Rivera; 2004).

1.3.1. Abstammung, Bildung und Lokalisation von Mastzellen

Mastzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks ab (Kitamura *et al.*; 1977, 1978, 1981). Mastzellvorläufer zirkulieren in kleiner Zahl im Blut und wandern von dort in die peripheren Gewebe, wo sie vollständig reifen. Diese Vorläuferzellen werden dabei entweder auf einen Subtyp festgelegt und selektiv in die Gewebe rekrutiert, oder sie nehmen gewebespezifische Merkmale an, nachdem sie den Umgebungsfaktoren ausgesetzt waren. Erst nach der Einwanderung in die verschiedenen Körpergewebe differenzieren sie zu reifen und langlebigen Mastzellen (Nakano *et al.*; 1985, Marshall; 2004). Reife Mastzellen kommen in den meisten Körpergeweben vor und können aufgrund ihrer Lokalisation eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von eindringenden Pathogenen spielen. Man findet sie vor

allem mit Blutgefäßen und Nerven assoziiert und in der Nähe von Körperoberflächen, die an die externe Umgebung anschließen, wie z.B. die Haut, die Luftwege und den Darm (Galli *et al.*; 1999, Marshall; 2004).

Das Wachstum und die Differenzierung der Mastzellen werden von verschiedenen Zytokinen beeinflusst, wie z.B. IL-3, SCF, IL-4, IL-9, IL-10 und NGF (Marshall; 2004; Metcalfe *et al.*; 1997). Die wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Reifung der Mastzelle stellen IL-3 (Interleukin-3) und SCF (*stem cell factor*) dar. Aus murinen Knochenmarkskulturen gewonnene Zellen, die unter dem Einfluss von IL-3 kultiviert werden, differenzieren innerhalb von vier bis fünf Wochen zu mindestens 85 % zu Mastzellen (Rottem *et al.*; 1993, Yung und Moore; 1984). IL-3 ist somit notwendig für die Differenzierung von murinen Mastzellen *in vitro* und wird in der Kultivierung von murinen Mastzellen aus Knochenmarkskulturen eingesetzt (Razin *et al.* 1984). SCF, der Ligand für den c-Kit-Rezeptor, ist ebenfalls ein essentieller Wachstumsfaktor für Mastzellen. Er induziert die Reifung und Proliferation von Mastzellen *in vitro* und *in vivo* (Zsebo *et al.*; 1990, Tsai *et al.*; 1991, Metcalfe *et al.*; 1997). Mäuse, die eine defekte SCF-Expression aufweisen oder einen defekten c-Kit-Rezeptor exprimieren, sind mastzelldefizient (Grimbaldeston *et al.*; 2005; Kitamura *et al.*; 1978). Nachdem Mastzellen in den Körpergeweben ansässig und ausdifferenziert sind, können sie lokal nur in bestimmten Situationen proliferieren (Marshall; 2004; Metcalfe *et al.*; 1997).

Mastzellpopulationen sind heterogen und lassen sich in zwei verschiedene Subtypen einteilen. Diese spezifischen Subtypen kommen in verschiedenen Körpergeweben vor, zeigen unterschiedliche funktionelle Eigenschaften und unterscheiden sich in ihrer Mediator-Zusammensetzung. In Nagern sind diese zwei Subtypen als Bindegewebsmastzellen (*connective tissue mast cells*, CTMC) und Schleimhautmastzellen (*mucosal mast cells*, MMC) beschrieben worden. Bindegewebsmastzellen kommen hauptsächlich in der Haut und der Peritonealhöhle vor, Schleimhautmastzellen dagegen in der intestinalen Lamina propria (Metcalfe *et al.*; 1997). Diese Subtypen unterscheiden sich in ihrer Größe, ihren unterschiedlichen Färbereigenschaften, ihrer Histamin-Konzentration und Proteoglykan- und Protease-Komposition. Beim Menschen kommen zwei analoge Mastzellpopulationen vor: MC^T und MC^{TC} (Marshall; 2004). Diese zwei Subtypen werden anhand der

unterschiedlichen Proteasen ihrer Granula definiert. MC^T enthalten nur Tryptase und dominieren in den Alveolar-Wänden der Lunge und der intestinalen Mucosa. Der MC^{TC} Subtyp enthält Tryptase und Chymase und kommt hauptsächlich in der Haut und der intestinalen Submucosa vor (Marshall; 2004, Metcalfe *et al.*; 1997).

1.3.2. Mastzellmediatoren

Mastzellen sind 10-15 µm große Zellen, die in ihrem Zytoplasma 50-200 metachromatische sekretorische Granula lagern. Diese sekretorischen Granula enthalten drei Hauptklassen von Mediatoren: vorgefertigte Granula-assoziierte Mediatoren, *de novo* synthetisierte Lipidmediatoren und verschiedene Zytokine und Chemokine (Tab.1.1). Aufgrund eines Stimulus werden die vorgefertigten Mediatoren durch regulierte Exozytose ausgeschüttet, bzw. wird die *de novo* Synthese initiiert (Marshall; 2004).

Eine besondere Rolle kommt dabei der FcεRI-abhängigen Stimulation der Mastzellen zu. Die Aggregation der Fcε-Rezeptoren löst eine Signalkaskade aus, die zur Verschmelzung der sekretorischen Granula mit der Plasmamembran führt und zur Ausschüttung der vorgefertigten Granula-assoziierten Mediatoren (Galli *et al.*; 2005a). Diese Mediatoren haben proinflammatorische, antiinflammatorische und immunregulatorische Effekte (Galli *et al.*; 2005b). Zu ihnen gehören hauptsächlich Histamin, neutrale Proteasen (Chymase, Tryptase), Proteoglykane (Heparin) und CarboxypeptidaseA (Metcalfe *et al.*; 1997). Die Aktivierung der Mastzelle führt des Weiteren zur *de novo* Synthese Lipid-basierender Mediatoren. Zu ihnen gehören die Leukotriene LTC₄ und LTB₄. LTC₄ erhöht die Gefäßpermeabilität und LTB₄ fördert die Rekrutierung von Neutrophilen. Zu den synthetisierten Zytokinen gehören proinflammatorische Mediatoren wie TNF-α, ebenso wie antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 und verschiedene Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren. Weiterhin kann es zur Produktion von Chemokinen, wie CCL2 oder CCL3, kommen (Marshall; 2004).

Tabelle 1.1: Übersicht der drei Hauptklassen von Mastzellmediatoren

Klasse	Mediatoren	Effekt
vorgefertigte Granula-assozierte Mediatoren	Tryptase, Chimase, Carboxypeptidase	Umgestaltung des Gewebes und Rekrutierung von Zellen
	Histamin	Gefäßpermeabilität
	Heparin, Peptidoglykane	fördert die Zytokin- und Chemokinfunktionen
de novo synthetisierte Lipid-basierende Mediatoren	LTC ₄ , LTB ₄ , PGD ₂ , PGE ₂	Rekrutierung von Effektorzellen
	PAF	induziert Entzündungen
Zytokine	TNF, IL-6, GM-CSF, INF- α , IFN- β	induziert Entzündungen
	IL-10, TGF- β	Regulation von Entzündungen
Chemokine	CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2	Rekrutierung von Effektorzellen

1.3.3. Mastzellen in der angeborenen und erworbenen Immunität

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von allergischen Entzündungen. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche dauerhaft den Fc ϵ RI (*type I Fc ϵ receptor*), der einen hochaffinen Rezeptor für IgE (*high affinity IgE receptor*) darstellt. An ihn bindet sich monomeres IgE, das von multivalenten Antigenen vernetzt wird, so dass es zu einer Quervernetzung der Rezeptoren und zu einer Aktivierung der Mastzellen kommt (Abramson und Pecht; 2007). Die Aktivierung der Mastzelle führt zur Degranulation der Mastzellmediatoren aus den sekretorischen Granula in das umliegende Gewebe. Eine Allergie wird ausgelöst, indem ein Allergen an den mit IgE beladenen Fc ϵ RI bindet. Es kommt zunächst zur Ausbildung einer frühen Phase der allergischen Immunantwort (*early phase reaction*) und im weiteren Verlauf zur Ausbildung einer späten Phase (*late phase reaction*) (Bischoff; 2007). Die Degranulation der Mastzelle führt zur Ausschüttung von Histamin, Leukotrien C₄

(LTC₄) und Prostaglandin D₂ (PGD₂). Die frühe Phase der allergischen Reaktion wird eingeleitet. Die freigesetzten Mediatoren lösen innerhalb von Sekunden bis Minuten allergische Reaktionen aus, wie etwa allergische Rhinitis (Heuschnupfen), allergisches Asthma oder auch einen anaphylaktischen Schock. Die ausgeschütteten Mediatoren wechselwirken mit den Schleimhäuten, den Blutgefäßen und den sensorischen Nerven. Andere Mastzellmediatoren, wie IL-3, IL-5, IL-8, TNF, Neurotrophin 3 (NT3) und diverse Proteasen tragen zu der Initiation der späten Phase der allergischen Reaktion bei (Bischoff; 2007). Es kommt zur Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen, Neutrophilen und T_H2-Zellen und zur Interaktion mit Gewebezellen wie Nervenzellen, den Muskelzellen der glatten Muskulatur, Endothelzellen und dem Epithelium (Bischoff; 2007). Mastzellen können also für einige pathologische Krankheitsbilder verantwortlich sein, wie Allergien, Asthma und Anaphylaxis, bei der eine abnormale chronische oder systemische Aktivierung der Mastzellen zu einer Schädigung des Gewebes führt (Abraham und John; 2010).

Neben dieser früh entdeckten Rolle der Mastzellen in Entzündungsreaktionen, zeigten Mastzellen im Laufe der Zeit viele weitere Eigenschaften und Funktionen. Mastzellen können aufgrund ihrer Lage in den Geweben in der Nähe von Körperoberflächen innerhalb von Sekunden auf eindringende Pathogene reagieren. Zu Beginn einer Infektion spielen sie dabei eine wichtige Rolle in der Interaktion mit anderen Zellen, die sich ebenfalls in der Nähe der Infektion aufhalten oder in den Lymphknoten angesiedelt sind (Abraham und John; 2010). Mastzellen schütten aufgrund eines Stimulus Mediatoren aus ihren sekretorischen Granula aus. Auf diese Weise interagieren sie mit verschiedenen Immunzellen wie den Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophilen. Ebenso können sie mit epithelialen und endothelialen Zellen, sowie mit Neuronen und der glatten Muskulatur in Kontakt treten (Abraham und John; 2010). Mastzellen können dabei als Effektorzellen der angeborenen und der erworbenen Immunität dienen. Sie exprimieren diverse Toll-like-Rezeptoren (TLR) durch die sie im Rahmen der angeborenen Immunität gegen eindringende Pathogene vorgehen. Zudem interagieren sie mit B-Zellen und T-Zellen und tragen so zu einer Funktion in der erworbenen Immunität bei. Des Weiteren exprimieren sie MHC-Klasse-II-Moleküle und kostimulatorische Moleküle, durch die sie befähigt sind Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren (Stelekati *et al.*; 2007). In ihren diversen Funktionen

können sie dabei sowohl als positive, als auch als negative Regulatoren auftreten (Galli *et al.*; 2008). Mastzellen haben eine zentrale Rolle in der Abwehr von Bakterien und Parasiten, durch die Ausschüttung von Zytokinen und anderen Mediatoren werden Neutrophile, Eosinophile und T_H2-Zellen (*T helper cell*) zum Infektionsherd geleitet (Marshall; 2004, Malaviya und Georges; 2002). Sie sind an der Beseitigung von Bakterien durch Phagozytose und der Sekretion von anti-mikrobiellen Peptiden beteiligt. Zudem erhöhen sie durch die Ausschüttung von Histamin die Gefäßpermeabilität (Galli *et al.*; 2008). Des Weiteren sind sie an der Degradierung von toxischen endogenen Peptiden und Komponenten von Giften beteiligt. Mastzellen haben positive immunmodulatorische Funktionen. Sie nehmen Einfluss auf die Migration, Entwicklung, Differenzierung und Funktion von Immunzellen, durch die Sekretion von Mediatoren, wie TNF, Chemokinen, Histamin, Leukotrien B₄ (LTB₄) und Proteasen (Galli *et al.*; 2008). Sie können T-Zellen Antigene präsentieren oder an IgE gebundene Antigene durch den FcεRI abfangen und dann Apoptose begehen. Des Weiteren fördern sie durch die Sekretion von IL-4 die Produktion von IgE durch B-Zellen. Sie rekrutieren Immunzellen durch die Produktion von TNF und anderen Mediatoren, die die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen erhöhen. Sie fördern T_H2 Antworten durch die Effekte von Prostaglandin D₂ auf die Reifung von dendritischen Zellen. Mastzellen sind auch an negativen immunmodulatorischen Funktionen beteiligt, unter anderem unterdrücken sie die Zytokinproduktion von T-Zellen und Monozyten durch die Sekretion von IL-10 (Galli *et al.*; 2008).

1.3.4. Degranulationsprozesse

Mastzellen zeichnen sich dadurch aus, dass ihr Zytoplasma angereichert ist mit einer Vielzahl sekretorischer Granula, die eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und proinflammatorischen Mediatoren enthalten. Diese werden aufgrund eines Stimulus durch regulierte Exozytose nach außen abgegeben. Die Vorgänge, die zur Degranulation der Mastzelle und somit zur Ausschüttung der Mediatoren führen sind umfangreich. Sie können sowohl IgE-abhängig als auch IgE-unabhängig erfolgen (Sayed *et al.*; 2008). Man unterscheidet zwischen der allmählichen Degranulation (*piecemeal degranulation*) und der anaphylaktischen Degranulation (*anaphylactic degranulation*). Bei der allmählichen Degranulation transportieren kleine Vesikel

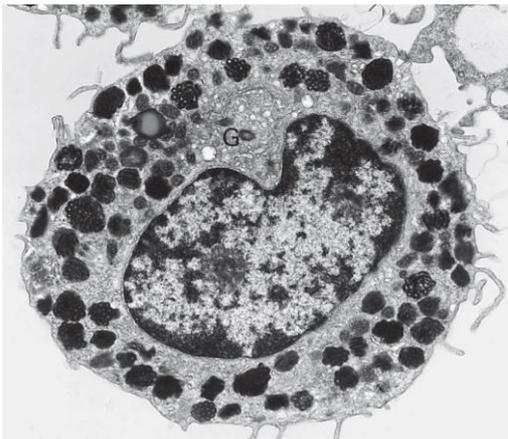
Granula-Inhalte von den zytoplasmatischen Granula an die Plasmamembran. Bei der anaphylaktischen Degranulation hingegen erfolgt die Mediatorausschüttung aufgrund einer IgE-vermittelten Quervernetzung des FcεRI, nachdem ein multivalentes Antigen an das IgE gebunden hat (Galli *et al.*; 2005a).

Die IgE-abhängige Aktivierung der Mastzelle erfolgt über den FcεRI, der zur MIRR-Proteinfamilie (*multi-chain immune recognition receptor*) gehört. Dieser besteht aus einem tetrameren Molekül, das sich aus drei Polypeptid-Untereinheiten zusammensetzt (Abramson und Pecht; 2007). Der extrazelluläre Teil der α-Untereinheit besteht aus zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die mit hoher Affinität an den Fc-Teil des monomeren IgE Antikörpers binden. Zwei identische γ-Untereinheiten stellen ein Homodimer dar, das durch Disulfidbrücken vernetzt ist. Die γ-Untereinheiten sind für die initialen Ereignisse der Signalgebung des Rezeptors verantwortlich. Sie besitzen jeweils ein ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), das für die Initiation der Signalgebung phosphoryliert wird. Die membrandurchspannende β-Untereinheit kann die Signalgebung des γ-Homodimers verstärken oder unterdrücken (Abramson und Pecht; 2007). Die Quervernetzung der Rezeptoren führt zur Initiation einer Signalkaskade in der Proteinkinasen, Phosphatasen und Adapterproteine aktiviert werden. Zu Beginn kommt es zur Aktivierung der Kinase Lyn, welche wiederum die ITAMs der γ-Untereinheit phosphoryliert und die Kinase Syk aktiviert. Lyn und Syk phosphorylieren diverse Adaptermoleküle und Enzyme, die die Aktivierung der Mastzelle regulieren. Des Weiteren wird die Kinase Fyn während der Signalkaskade aktiviert, die wiederum das Adapterprotein Gab2 phosphoryliert, das im weiteren Verlauf den PI(3)K-Signalweg (*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*) aktiviert (Kalesnikoff und Galli; 2008). Es kommt zur Ausschüttung von Calcium (Ca^{2+}) und somit zum Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration und im weiteren Verlauf zur Gentranskription und zur Degranulation der zytoplasmatischen Granula.

Die Aktivierung von Mastzellen resultiert sowohl in der Degranulation von vorgefertigten Mediatoren, die sich in den sekretorischen Granula befinden, als auch in der *de novo* Synthese von Lipid-basierenden Mediatoren, Zytokinen und Chemokinen (Abraham und John; 2010). Die Degranulation erfolgt innerhalb von Sekunden und beinhaltet die Ausschüttung von vorgefertigten, nicht-löslichen

Mediatoren in das umgebende Medium (Abb.1.1). Schon während der ersten Minuten der Degranulation beginnt die *de novo* Synthese von Eicosanoiden. In einer zweiten Antwort, die einige Minuten bis Stunden nach der Stimulierung erfolgen kann, beginnen Mastzellen die neusynthetisierten Mediatoren, wie Eicosanoide, Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine (unter anderem TNF, IL-4) auszuschütten. Nach der Degranulation können Mastzellen ihre Granula wieder regenerieren und mit anderem Inhalt als zuvor auffüllen, je nach erhaltenem Stimulus. Mastzellen sind im Gegensatz zu anderen Zellen des angeborenen Immunsystems einzigartig darin, für längere Zeit nach ihrer Aktivierung zu überleben. Anhand bestimmter Stimuli können Mastzellen innerhalb der Gewebe proliferieren (Abraham und John; 2010).

A



B

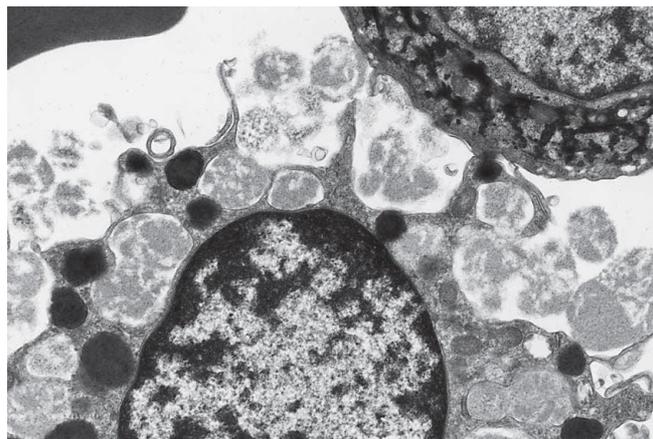


Abbildung 1.1: Degranulation von Mastzellen

A) Humane Mastzelle mit einer Vielzahl zytoplasmatischer sekretorischer Granula, dem Zellkern und einer Golgi-Region (G). B) Degranulierte humane Mastzelle der Haut nach dreiminütiger Stimulation mit anti-IgE. Die sekretorischen Granula sind in das umgebende Milieu exozytiert worden, einige Granula sind im Zytoplasma verblieben. (Dvorak; 2005: Ultrastructure of mast cells and basophils)

Die sekretorischen Granula von Mastzellen werden auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet, da sie eine Vielzahl von Proteinen enthalten, die in nicht-hämatopoetischen Zellen fast ausschließlich in den Lysosomen vorkommen (Blott und Griffiths; 2002). Unter anderem bewirkt die Stimulation der Mastzellen über den $Fc\epsilon R1$, die Ausschüttung von lysosomalen Hydrolasen, wie β -Hexosaminidase und Cathepsin D, neben anderen Syntheseprodukten wie Serotonin und Histamin

(Metcalf *et al.*; 1997). Neben diesen sekretorischen Lysosomen besitzen Mastzellen auch konventionelle Lysosomen, die ebenfalls mit der Plasmamembran fusionieren können, wenn die Mastzelle einen starken Calcium-Influx erfährt oder, wenn es zu einer intensiven Vernetzung des FcεRI kommt (Baram *et al.*; 1999). Sekretorische Lysosomen nehmen in der Zelle eine duale Funktion ein. Sie haben neben der konventionellen Funktion der Degradierung von Proteinen, auch die Fähigkeit neusynthetisierte sekretorische Proteine zu lagern und durch eine regulierte Exozytose abzugeben. Der stärkste Hinweis, dass sich konventionelle und sekretorische Lysosomen unterscheiden, wird aufgrund genetischer Krankheiten geliefert, durch die die Funktion von sekretorischen Lysosomen beeinträchtigt ist (Blott und Griffiths; 2002).

1.3.5. Die Regulation der Degranulationsprozesse

Die Exozytose der sekretorischen Lysosomen wird ausgelöst durch einen externen Stimulus, was zu einer Mobilisierung von Ca^{2+} innerhalb der Zelle führt und bewirkt, dass die sekretorischen Lysosomen zur Plasmamembran transportiert werden und degranulieren. Die Verschmelzung der zwei Membranen unterliegt Regulationsmechanismen, die hauptsächlich durch Proteine der Rab-Familie und durch SNARE-Proteine (*N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) gewährleistet werden. Den kleinen GTPasen der Rab-Familie kommt dabei eine wichtige Rolle bei der Spezifität des vesikulären Transportes zu. SNARE Proteine hingegen leiten und regulieren die Fusion der zwei zu fusionierenden Membranen.

Rab-Proteine

Rab-Proteine stellen die größte Familie innerhalb der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen dar (Grosshans *et al.*; 2006). Jedes Rab-Protein ist assoziiert mit einem membranumschlossenen Organell des sekretorischen oder endozytischen Signalwegs und verantwortlich für die Selektivität des vesikulären Transportes. Aufgrund ihrer Verteilung auf den membranumschlossenen Organellen, können sie als Marker fungieren, die sowohl auf den Transportvesikeln, als auch auf der Zielmembran lokalisiert sind. Diese komplementären Marker dienen der Erkennung der zwei zu fusionierenden Membranen. Rab-Proteine leiten daher Transportvesikel zu der korrekten Andockstelle an der Zielmembran. Sie kommen sowohl in einer

inaktiven Form, als auch in einer aktiven Form vor. In ihrer inaktiven Form sind sie im Zytosol lokalisiert und an GDP (Guanosindiphosphat) gebunden. Des Weiteren ist dieser Komplex aus Rab-GDP an GDI (*Rab-GDP dissociaten inhibitor*) gebunden, durch den es löslich im Zytosol gehalten wird. In ihrer aktiven Form hingegen sind sie an GTP (Guanosintriphosphat) gebunden und liegen membrangebunden an einem Organell oder Transportvesikel vor. In den aktiven GTP-gebundenen Zustand gehen sie nach Aktivierung durch GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) über und werden dabei über einen hydrophoben Lipid-Anker in der Membran befestigt (Grosshans *et al.*; 2006, Alberts *et al.*; 2007). In diesem aktiven Zustand binden sie an weitere Proteine, die Rab-Effektoren genannt werden. Diese ermöglichen den Transport, die Anlagerung und die Fusion der zwei Membranen. Rab-Effektor Proteine interagieren über aktivierte Rab-Proteine, um den Kontakt zwischen zwei fusionierenden Membranen herzustellen. Rab-Effektor Proteine interagieren des Weiteren mit Proteinen der SNARE-Familie, die wiederum für die Fusion der zwei Membranen verantwortlich sind (Alberts *et al.*; 2007).

Verschiedene Rab-Proteine sind beschrieben worden, denen eine Rolle bei den Degranulationsprozessen der Mastzelle zukommt. Nicht alle davon sind spezifisch mit den sekretorischen Lysosomen der Mastzellen assoziiert. Rab3d gilt als Regulator der Exozytose von sekretorischen Granula in Mastzellen, da die Überexpression von Rab3d in RBL-2H3-Zellen (*rat basophilic leukemia*) in einer Reduktion der Exozytose resultiert (Roa *et al.*; 1997). Allerdings ist die Sekretion der Mastzellen in Rab3d *knock-out* Mäusen nicht beeinflusst (Riedel *et al.*; 2002). Rab37 wurde auch an sekretorischen Lysosomen von RBL-2H3-Zellen nachgewiesen (Tuvim *et al.*; 1999). Beide Rab-Proteine sind nicht ausschließlich spezifisch für sekretorische Lysosomen. Mastzellen exprimieren des Weiteren beide Isoformen von Rab27. Rab27a und Rab27b werden in Mastzellen (BMNC) exprimiert und lokalisieren an den sekretorischen Lysosomen. Rab27a scheint dabei eine Rolle als positiver Regulator der Sekretion in konventionellen Granula in exokrinen oder endokrinen Zellen, oder in Lysosom-verwandten Organellen in hämatopoetischen Zellen und Melanozyten zu spielen (Mizuno *et al.*; 2007). Eine Rab27a Defizienz im Menschen ist assoziiert mit dem Griscelli-Syndrom. Es wird angenommen, dass Rab27a eine Rolle bei der Bewegung der sekretorischen Lysosomen entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran spielt (Blott und Griffiths; 2002). Des Weiteren

steigern Rab27a und sein Effektor Munc13-4 die FcεRI-abhängige Degranulation von Mastzellen (Neeft *et al.*; 2005). Rab27b hingegen ist ein wichtiger Regulator der Degranulation von Mastzellen. Rab27b *knock-out* Mäuse und Rab27a und b doppel-*knock-out* Mäuse zeigten sekretorische Defekte in der Ausschüttung von β-Hexosaminidase *in vitro* und bei der passiven kutanen Anaphylaxie *in vivo*. Rab27b kommt dabei wahrscheinlich eine Rolle bei der Freigabe von Granula zu, die vor der Exozytose in der Nähe der Plasmamembran zurückgehalten werden (Mizuno *et al.*; 2007).

SNARE-Proteine

SNARE-Proteine sind eine Familie von membrangebundenen Proteinen, die die Fusion und Spezifität des vesikulären Transports regulieren. SNARE-Proteine können unterteilt werden in Vesikel-assoziierte V-SNAREs und Zielmembran-assoziierte T-SNAREs (Martens und McMahon; 2008). SNARE Proteine katalysieren dabei die Fusion der zwei verschmelzenden Membranen und kontrollieren, dass nur die korrekten Membranen miteinander verschmelzen. Ein V-SNARE ist ein Typ-2 integrales Membranprotein und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, wohingegen ein T-SNARE aus zwei bis drei Polypeptidketten zusammengesetzt ist. Drei verwandte SNARE-Proteine auf den zu verschmelzenden Membranen fusionieren durch hydrophobe Interaktionen ihrer *coiled-coil* Domänen, und bilden ein vier-helikales Bündel. Dieser Komplex wird als *trans*-Komplex bezeichnet. Durch diese stabile Bindung werden die zwei Membranen in direkte Nachbarschaft gebracht und die Fusion dieser zwei Membranen ermöglicht. Durch die Fusion der Membranen, liegen die SNARE-Proteine in einer thermodynamisch stabilen *cis*-Konfiguration vor (Puri *et al.*; 2003). Rab-Proteine regulieren bei diesen Prozessen die Verfügbarkeit der SNARE-Proteine. T-SNAREs auf der Zielmembran sind oftmals assoziiert mit inhibitorischen Proteinen. Rab-Proteine und ihre Effektoren regulieren die Ablösung dieser Inhibitoren. Für den korrekten Ablauf des Vesikeltransports müssen Transportvesikel daher sowohl Rab-Proteine, wie auch SNARE-Proteine involvieren (Alberts *et al.*; 2007).

In die Regulation von Mastzellen involvierte V-SNAREs beinhalten Proteine der VAMP-Familie (*vesicular-associated membrane fusion proteins*) und involvierte T-SNAREs beinhalten Proteine der SNAP- (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor*

attachment protein) und Syntaxin-Familie (Tiwari *et al.*; 2008). T-SNAREs können als Heterodimere vorkommen, die aus einem Protein der Syntaxin-Familie und einem der SNAP-Familie bestehen. In Mastzellen exprimierte VAMP-Proteine sind VAMP-2, VAMP-3, VAMP-7 und VAMP-8 (Paumet *et al.*; 2000, Hibi *et al.*; 2000). Frühere Studien zeigten, dass in der IgE-abhängigen Degranulation SNAP-23 und Syntaxin-4 involviert sind (Guo *et al.*; 1998, Paumet *et al.*; 2000, Vaidyanathan *et al.*, 2001). Zusätzlich sind weitere akzessorische Proteine, wie NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), an der Formation des SNARE-Komplexes beteiligt (Puri *et al.*; 2003). Studien zeigten, dass nach Stimulierung VAMP-8 partiell mit sekretorischen Granula in Mastzellen (BMMC, *bone marrow derived mast cell*) kolokalisierte. Dies war assoziiert mit einer vermehrten SNARE-Komplex-Formation mit SNAP-23 und Syntaxin-4. Zudem zeigten VAMP-8-defiziente Mastzellen eine reduzierte Degranulation nach Fc ϵ RI-abhängiger Stimulation. Die Ausschüttung von β -Hexosaminidase und Histamin *in vitro* war um 50 % reduziert und die VAMP-8-defizienten Mäuse wiesen während der passiven systemischen Anaphylaxis eine geringere Histamin-Konzentration im Blut auf (Tiwari *et al.*; 2008). Neben den Defekten von VAMP-8-defizienten Mastzellen in der Fc ϵ RI-abhängigen Exozytose, konnte gezeigt werden, dass der Defekt die Sekretion jener sekretorischen Granula betraf, die Serotonin und Cathepsin D enthielten, wohingegen die regulierte Exozytose von sekretorischen Granula, die Histamin und TNF- α enthielten, normal war. Dies deutet darauf hin, dass Mastzellen verschiedene sekretorische Granula enthalten und, dass diese unterschiedliche SNARE-Isoformen für die Exozytose benutzen. In diesem Zusammenhang scheint VAMP-8 ein Regulator der Serotonin und Cathepsin D Ausschüttung in Mastzellen zu sein (Puri und Roche; 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in RBL-2H3-Zellen (*rat basophilic leukemia*) die Überexpression von Syntaxin-4 zu einer Inhibierung der Fc ϵ RI-abhängigen Degranulation führt (Paumet *et al.*; 2000). Zudem führt die Phosphorylierung von SNAP-23 an den Serin-Resten der Position 95 und 120 zur Modulation der Exozytose in Mastzellen (Hepp *et al.*; 2005). Diese zwei spezifischen Serin-Reste werden dabei durch die IKK2 (*inhibitory κ B kinase- β*) phosphoryliert (Suzuki und Verma; 2008). Die Inhibierung von Syntaxin-4, SNAP-23, VAMP-7 oder VAMP-8 blockierte die Fc ϵ RI-induzierte Ausschüttung von Histamin in humanen Mastzellen, wohingegen dies bei Inhibierung von VAMP-2 oder VAMP-3 nicht der Fall war (Sander *et al.*; 2008). Des Weiteren sind diverse Chaperone, wie Munc18 in die

Zusammenführung des *trans*-SNARE-Komplexes involviert (Jahn; 2000). Andere Proteine, wie NSF, sowie die löslichen NSF assoziierten Proteine, könnten an dem Abbau des *cis*-SNARE-Komplexes beteiligt sein (Haas und Wickner; 1996, Mayer *et al.*; 1996, Nichols *et al.*; 1997). In RBL-2H3-Zellen führte die Überexpression von mutiertem NSF, das keine ATPase-Aktivität mehr besitzt, zu einem verminderten Abbau und zu einer Ansammlung der SNARE-Komplexe (Puri *et al.*; 2003).

1.4. RIN3

RIN3 (*Ras and Rab interactor 3*) ist ein potentieller Regulator des Membrantransports im Immunsystem. Allerdings sind die Informationen, die über das RIN3 Protein bis zum heutigen Zeitpunkt zur Verfügung stehen, stark limitiert. Das zytoplasmatische Protein RIN3 wurde zum ersten Mal im Jahr 2003 von Kajihō *et al.*, als ein potentieller Interaktionspartner der kleinen GTPase Rab5 beschrieben. Das in dieser Studie charakterisierte Protein wies eine ähnliche Sequenz auf, wie zwei weitere Proteine, der RIN-Proteinfamilie, RIN1 und RIN2. Aufgrund dessen wurde dieser neu entdeckte Interaktionspartner der kleinen GTPase Rab5 der RIN-Proteinfamilie zugeordnet und RIN3 genannt (Kajihō *et al.*; 2003). Die drei bisher analysierten Mitglieder der RIN-Proteinfamilie zeichnen sich durch eine gewebsspezifische Genexpression in unterschiedlichen Säugetiergeweben aus (Bliss *et al.*; 2006). RIN1 wurde zum ersten Mal von Colicelli *et al.* (1991) identifiziert. Die höchste Expression von RIN1 wird in Strukturen des Vorderhirns gefunden, sowie in den Hoden der Maus (Dhaka *et al.*; 2003) und in Epithelzellen der Brust (Hu *et al.*; 2005). RIN2 wurde von Saito *et al.* (2002) beschrieben und wird generell in Mausgeweben exprimiert, wobei eine erhöhte Expression in der Lunge, den bronchialen Epithelzellen, der Plazenta und dem Uterus gefunden wird (Bliss *et al.*; 2006). RIN3 wiederum zeigt eine präferentielle Expression in hämatopoetischen Geweben wie den Zellen des Knochenmarks, sowie den T-Zellen und B-Zellen. Des Weiteren ist die RIN3 Expression besonders in humanem peripheren Blut erhöht (Kajihō *et al.*; 2003).

Die Proteinstruktur von RIN3 weist verschiedene Domänen auf (Abb.1.2), wie sie auch in RIN1 und RIN2 vorkommen. Am N-Terminus befindet sich eine SH2-Domäne (*Src homology 2*). Auf diese folgen drei PRD-Domänen (*prolin rich domain*), eine RH-

Domäne (*RIN-homology*) und eine Vps9-Domäne (*vesicular protein sorting 9*), die die katalytische Domäne der GEF-Proteine (*guanine nucleotide exchange factor*) darstellt (Burd *et al.*; 1996; Carney *et al.*; 2006). Am C-Terminus befinden sich eine RA-Domäne (*Ras-associaten*) (Kajiho *et al.*; 2003) und eine Ubiquitin-homologe-Domäne.



Abbildung 1.2: Schematische RIN3 Proteinstruktur

Frühere Studien zeigten, dass überexprimiertes humanes RIN3 in einem GDP-Dissoziation- bzw. einem GTP-Bindungsassay eine spezifische GEF-Aktivität für die kleine GTPase Rab5 aufwies (Kajiho *et al.*; 2003). In weiterführenden Lokalisationsstudien in HeLa Zellen, kolokalisierte überexprimiertes RIN3 mit Rab5 positiven-Vesikeln, wohingegen sich keine Kolokalisation mit dem frühen Endosomenmarker EAA1 (*early endosome marker 1*) feststellen ließ. Allerdings schien Transferrin teilweise durch die RIN3-positiven Vesikel zu den frühen Endosomen transportiert zu werden (Kajiho *et al.*; 2003). RIN3 könnte daher sowohl für die Stimulation, als auch die Stabilisierung von Rab5 in einem endozytischen Transportweg von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen, verantwortlich sein (Kajiho *et al.*; 2003). Weitere Studien zeigten, dass überexprimiertes RIN3 in HeLa Zellen aus dem Zytoplasma in Rab5-positive frühe endozytische Vesikel translokiert wurde, wobei die RA- und RH-Domäne des RIN3 Proteins kritische Rollen in der Translokation spielen (Yoshikawa *et al.*; 2008). Diese Studien lassen vermuten, dass RIN3 eventuell an der Regulation von Rab5 vermittelten endosomalen Funktionen beteiligt sein könnte.

Die kleine GTPase Rab5 spielt eine wichtige Rolle im endozytischen Signalweg und hat dabei eine Funktion in den Fusionsprozessen von frühen Endosomen, in der Formation von Clathrin-umhüllten Vesikeln von der Plasmamembran und dem Transport dieser zu den frühen Endosomen. Es ist noch unklar, ob sich die GEF-

Aktivität von RIN3 ausschließlich auf Rab5 beschränkt. RIN3 könnte neben der bisher untersuchten Rolle als GEF für die kleine GTPase Rab5, auch noch weitere Funktionen haben und dabei mit weiteren Interaktionspartnern, wie auch anderen GTPasen interagieren. In den bisherigen Studien wurde der Fokus auf die Überexpression des RIN3 Proteins in spezifischen Zelllinien gelegt. Eine generelle Aussage über die physiologische Rolle von RIN3 lässt sich daraus noch nicht klar ableiten. Um die physiologische Rolle von RIN3 zu analysieren sind weitere Studien in einem RIN3 *knock-down* oder *knock-out* System nötig. RIN3 wird in hämatopoetischen Zellen und dabei besonders ausgeprägt in Mastzellen (unpublizierte Daten) exprimiert. Daher ist die biologische Rolle von RIN3 in Immunzellen und insbesondere in Mastzellen von besonderem Interesse.

1.5. Lyst

Das Protein Lyst (*lysosome trafficking regulator*) gehört zur BEACH Proteinfamilie, deren zugehörige Proteine eine BEACH-Domäne aufweisen, der man eine Rolle in Membrantransportprozessen beimisst. Lyst hat ein Molekulargewicht von etwa 430 kDa und es wird angenommen, dass es sich um ein zytoplasmatisches Protein handelt, da die Sequenzvorhersage keine Transmembrandomäne oder Signalsequenz aufweist (Tchernev *et al.*; 2002). Eine Lyst-Defizienz führt im Menschen zur Ausbildung des Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) und das entsprechende Mausmodell ist die *beige* Maus. Zellen, die funktionell von der Lyst-Defizienz betroffen sind, sind Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Baetz *et al.*; 1995). Das Chediak-Higashi-Syndrom ist eine seltene autosomal-rezessive Krankheit, die durch schwere immunologische Defekte, wie wiederauftretende bakterielle Infektionen, beeinträchtigte Chemotaxis, defektive zytolytische T-Zell-Funktionen, beeinträchtigte NK-Zell-Funktionen und eine verringerte Migration der Neutrophilen und Monozyten charakterisiert ist (Shiflett *et al.*; 2002). Die wiederauftretenden bakteriellen Infektionen werden durch gram-negative und gram-positive Bakterien, sowie durch Pilze ausgelöst. Besonders betroffen sind dabei die Haut, die Atemwege und die Schleimhäute. Die beeinträchtigte bakterizide Aktivität wird wahrscheinlich durch die starke Verminderung der Neutrophilen im Blut (Neutropenie) verursacht (Rudolph *et al.*; 2002), sowie durch weitere Defekte protektiver Effektorfunktionen anderer Immunzellen. Ein wichtiges charakteristisches

Merkmal dieser Krankheit sind die stark vergrößerten Lysosomen, Melanosomen, MHC-Klasse-II-Kompartimente, lysischen Granula und azurophilen Granula (Dell'Angelica *et al.*; 2000) diverser immunologischer Zellen.

Das entsprechende Mausmodell des Chediak-Higashi-Syndroms ist die *beige* Maus, die viele Charakteristika von CHS zeigt, wie die wiederkehrenden Infektionen und auch die charakteristisch stark vergrößerten Lysosomen (Kaplan *et al.*; 2008). Studien zeigten, dass die Fibroblasten der *beige* Maus auch die stark vergrößerten Lysosomen aufwies. Dieser Effekt konnte durch die Expression von Wildtyp Lyst in diesen Lyst-mutanten Fibroblasten rückgängig gemacht werden (Perou *et al.*; 1997a). Dies lässt vermuten, dass Lyst eine Rolle in der Regulation der Größe der Lysosomen zukommt. Die Analyse von Mastzellen und pankreatischen Zellen in Lyst-defizienten Mäusen zeigte, dass die sekretorischen Granula der *beige* Maus, die Fähigkeit haben wahllos mit anderen sekretorischen Granula zu fusionieren. Dies lässt vermuten, dass Lyst ein negativer Regulator der Granula-Granula-Fusion sein könnte (Hammel *et al.*; 2010).

Die Proteinstruktur von Lyst weist am N-Terminus ARM/HEAT Wiederholungen auf (Abb.1.3). ARM-Motive sind für Membraninteraktionen verantwortlich und HEAT-Wiederholungen kommt eine Rolle im Vesikel-Transport zu. Des Weiteren enthält Lyst eine Perilipin Domäne, die wahrscheinlich mit Lipiden assoziiert ist. Die C-terminale BEACH-Domäne kommt in vielen eukaryotischen Proteinen vor und besteht aus einem WIDL-Motiv und einer Serie von WD-40-Wiederholungen. Sie ist für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich (Shiflett *et al.*; 2002, Kaplan *et al.*; 2008).

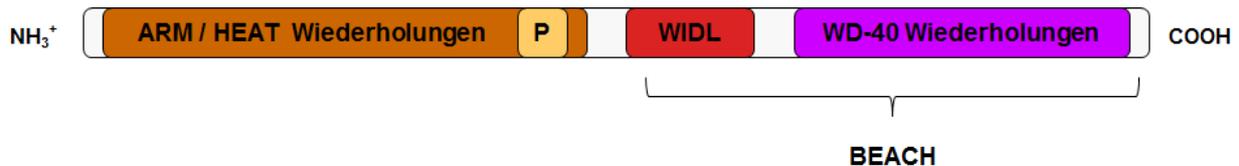


Abbildung 1.3: Schematische Lyst Proteinstruktur

Studien zu potentiellen Interaktionspartnern des Lyst Proteins wurden mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems durchgeführt. Dazu wurden cDNA-Fragmente, die für verschiedene Lyst-Domänen codierten, zur Durchsuchung humaner cDNA-Bibliotheken verwendet. Dabei konnte eine Interaktion von Lyst mit den Proteinen HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), 14-3-3 τ und Ck2 β (*casein-kinase-II- β -subunit*) im Hefe-2-Hybrid-System festgestellt werden (Tchernev *et al.*; 2002). Diesen Proteinen kommt eine potentielle Rolle im vesikulären Transport und in der Signaltransduktion zu. Eine potentielle Interaktion von Lyst mit HRS, könnte auf eine Beteiligung von Lyst an SNARE-Proteinen hindeuten, da HRS an das SNARE-Protein SNAP-25 bindet. In diesem Zusammenhang deutet diese Studie darauf hin, dass Lyst eventuell als ein Gerüst für SNARE-Proteine dienen könnte (Tchernev *et al.*; 2002).

Der murine *beige* Phänotyp kann ausgelöst werden durch unterschiedliche Mutationen im *Lyst* Gen der Maus. Die *bg* Mutation war die erste Mutation des murinen *Lyst* Gens die charakterisiert wurde. In diesem Fall führt die Insertion eines LINE-1 Elements in das *Lyst* Gen zur Expression eines verkürzten Proteins, in dem die WD-40 und die BEACH-Domäne nicht mehr exprimiert werden (Perou *et al.*; 1996, Perou *et al.*; 1997b). In der *Lyst*^{bg-11J} Maus wiederum ist das *Lyst* Gen durch eine 5 Kilobasen Deletion zerstört und in *Lyst*^{bg-8J} Mäusen verursacht eine Punktmutation eine Verschiebung des Leserasters und führt zu einem verfrühten Translationsstop. In beiden Fällen kommt es zur Expression eines verkürzten Proteins. Die *Lyst*^{bg-grey} Mutation hingegen wird hervorgerufen durch die Deletion des Exon 25, wobei der Leserahmen erhalten bleibt und es zur Ausbildung eines instabilen Proteins kommt, das die WD-40 und die BEACH-Domäne noch enthält (Runkel *et al.*; 2006). Eine weitere Mutation in der C57BL/6J Mauslinie (*Lyst*^{bg-J}) ist auf die Deletion von 3 Basenpaaren in der WD-40 Domäne im Exon 52 zurückzuführen, so dass die Aminosäure Isoleucin nicht mehr translatiert wird (unpublizierte Daten Laborgruppe Dr. Lee, Trantow *et al.*; 2009). Das mutierte *Lyst* Protein kann in diesem Fall wahrscheinlich noch exprimiert werden.

Die vollständige biologische Funktion des *Lyst* Proteins ist noch nicht bekannt und muss noch ausführlicher in einem physiologischen Rahmen studiert werden. Die Relevanz der auffällig vergrößerten Lysosomen ist in Immunzellen bei funktionellen

Aspekten, wie unter anderem bei Fusionsprozessen, von speziellem Interesse. Die biologische Rolle von Lyst in Mastzellen, ist in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben, da Mastzellen sich durch ihre zytoplasmatischen Granula und ihre Fähigkeit diese zu degranulieren auszeichnen. Lyst könnte eventuell eine regulatorische Rolle bei diesen Vorgängen zukommen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Mastzellen spielen aufgrund ihrer in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Mediatoren und den bei Aktivierung der Mastzelle neusynthetisierten Mediatoren eine entscheidende Rolle bei allergischen und inflammatorischen Krankheiten. Die Ausschüttung dieser Mediatoren setzt einen spezifisch regulierten Vesikeltransport und Membranfusionsprozesse während der Mastzelldegranulation voraus. Die molekularen Mechanismen, die für den intrazellulären Transport der Mastzellgranula und die regulierte Fusion dieser mit der Plasmamembran verantwortlich sind, sind noch weitgehend unbekannt.

Die Zielsetzung der Arbeit war es die biologische Funktion zweier unterschiedlicher Regulatoren, RIN3 und Lyst, in Mastzellen zu untersuchen. Um diese Fragestellung zu klären, wurde ein RIN3 *knock-down* in einer Mastzelllinie etabliert und für Untersuchungen der Lyst Funktion in Mastzellen wurde das *beige* Mausmodell verwendet. Ein besonderes Interesse galt dabei der regulatorischen Funktion, die RIN3 und Lyst bei der Degranulation der Mastzellmediatoren spielen könnten. Die gewonnenen Erkenntnisse zur biologischen Funktion von RIN3 und Lyst können zum besseren Verständnis der komplexen Regulationsprozesse beim Membrantransport und der Vesikelfusion in Mastzellen beitragen.

3. Material und Methode

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Tabelle 3.1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Anthos fluido (Waschgerät)	Anthos, Labtec Instruments, Österreich
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Finnpipette	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschrank	Privileg, Stuttgart
Gel Doc XR (Geldokumentation)	Bio-Rad, München
Glasware	Duran Group, Mainz
Infinite M200 (ELISA Reader)	Tecan, Schweiz
Inkubator Heracell 150	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Inkubator Innova 4230	New Brunswick scientific, Edison, N, USA
Kodak X-OMAT M35	Kodak, Stuttgart
Kühlschrank	Liebherr profiline, Deutschland
Kühltruhe -80 °C	Forma scientific, Göttingen
Light Cycler	Roche, Mannheim
Light Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Light Cycler Zentrifugenadapter	Roche, Mannheim
Mikrowelle 1026L	Sharp, Hamburg
Mikroskop Leica TCS SP5	Leica, Wetzlar
Mikroskop Motic	Beyersdörfer GmbH, St. Ingbert
Mikroskop Nikon Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Zeiss ID03	Zeiss, Jena
Nukleofektor-Device	Lonza, Schweiz
pH Meter	Schott, Mainz
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Rotator Drive STR4	Bibby, Stuart scientific, England
Schüttler Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Stickstofftank	Messer, Österreich
Sterilbank	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg

Voltmeter	Consort, Belgien
Vortex Reax Top	Heidolph, Schwabach
Waage	Kern, Balingen-Frommern
Wasser-Aufreinigungssystem Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wide Mini sub cell GT	Bio-Rad, München
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.2. Labormaterialien

Tabelle 3.2: Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
Centricon Plus-20	Millipore, Schwalbach
Deckgläser (24 x 40 mm)	Roth, Karlsruhe
ELISA Platte	Greiner Bio One, Frickenhausen
FACS Röhrchen (5 ml, 75 x 12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Filter (0,2µM, 0,45µM)	Nalgene Labware, Dänemark
Gel Blot Papier	Whatman, Dassel
Kryoröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen
Mikroskopie µ-Slide	Ibidi, München
Nadeln (23 G, 27 G)	BD Biosciences, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda Königshofen
Novex-Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger (76 x 26 mm)	R.Langenbrinck, Emmendingen
Petrischale (100 x 15 mm, sterile)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning Amsterdam
Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF Transfermembran	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Reagiergefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Silva Küvette	Hellma, Müllheim
Spritze (1 ml, 5 ml, 10 ml)	BD Biosciences, Heidelberg

Stericup	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-, 12-, 24-, 48-, 96-well	Corning, Amsterdam

3.1.3. Medien, Puffer, Lösungen

Zellkulturmedien

dendritische Zellen Kulturmedium (BMDC): RPMI-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin

HEK293 Kulturmedium: DMEM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin

HEK293FT Kulturmedium: DMEM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin, 500 μ g/ml Geneticin

HeLa Kulturmedium: DMEM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin

Makrophagen Kulturmedium (BMDM): DMEM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, 1 % HEPES,

Mastzellen Kulturmedium (BMMC): IMDM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin, 1x MEM-Vitamine, 5 ng/ml IL-3

MC9 Kulturmedium: DMEM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 10 % ConA-Milzüberstand, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 0,05 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin

Milz Kulturmedium: RPMI-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin, 2 μ g/ml Concanavalin A (ConA)

RBL-2H3 Kulturmedium: IMDM-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1x nicht-essentielle Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, 1x Penicillin/Streptomycin

Medien, Puffer und Lösungen

Für alle Medien und Lösungen wurde Wasser, das über ein Milli-Q-System (Millipore, Schwalbach) aufgereinigt wurde, der Qualität *Aqua bidest* verwendet. Die pH-Werte wurden mit NaOH oder HCl eingestellt, sofern dies erforderlich war. Die Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min oder durch Sterilfiltrieren mit Sterilfiltern der Ausschlussgrenze 0,22 µm sterilisiert. Die Medien, Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben hergestellt.

Ammoniumpersulfat 5 %: 100 mg Ammoniumpersulfat ad 2 ml H₂O

Blockierungspuffer: 2 % Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x PBS

Blotpuffer 1x: 39 mM Glycin, 48 mM Tris-HCl, 1,28 mM SDS, 20 % Methanol

Citratpuffer: 100 mM Na-Citrat, pH 4,5

DNA-Ladepuffer 6x: 250 mg Bromphenolblau, 50 ml Glycerin ad 100 ml H₂O; Lagerung erfolgte bei 4 °C

Glycinpuffer: 200 mM Glycin, pH 10,7

Einfriermedium: 10 % DMSO in 90 % FKS

Erythrozytenlysepuffer: 4,15 g Ammoniumchlorid, 0,84 g Natriumcarbonat, 1 mM EDTA ad 500 ml H₂O, pH 7,3; Sterilfiltration

LB-Agar: LB-Medium mit 1,2 % Agar wurde autoklaviert und mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) supplementiert

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml H₂O; Sterilisation

NP-40 Lysepuffer 1x: 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM NaOV, 10 mM NaF, 1x Proteaseinhibitoren

SDS 10 %: 10 g SDS ad 100 ml H₂O

SDS-PAGE-Laufpuffer 1x: 25 mM Tris, 192,3 mM Glycin; 0,1 % SDS ad 1000 ml H₂O; pH 8,3 (HCl)

SDS-PAGE-Probenpuffer 4x: 250 mM Tris (pH 6,5), 40 % Glycerol, 8 % SDS, 0,008 % Bromphenolblau; 2 ml β-Mercaptoethanol, ad 10 ml H₂O

Sucrose 50 %: 50 g Sucrose ad 100 ml H₂O

TAE 50x: 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml H₂O

TBST 1x: 145 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 % Tween 20

Tris-HCl 1M, pH 8,8: 30,3 g Tris, ad 250 ml H₂O, pH 8,8

Tris-HCl 0,375M, pH 6,8: 11,4 g Tris, ad 250 ml H₂O, pH 6,8

Trypan-Blau: 0,05 % *Trypan blue staining solution* in 0,9 % NaCl

Tyrodespuffer 1x: 10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,4 mM CaCl₂, 1 mM, MgCl₂, 5,6 mM Glucose, 0,1 % BSA, pH 7,4

3.1.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse (p.A.)“ bzw. in höchstmöglicher Reinheit verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden nach den Angaben des Herstellers mit den jeweils dazugehörigen Arbeitspuffern verwendet. Alle Enzyme wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Accutase	eBioscience, San Diego, USA
Acrylamid/Bis-acrylamid, 37,5 % Lösung	Bio-Rad, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Aminosäuren	PAA Laboratories, Cölbe
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
anti-DNP-spezifisches IgE	Sigma-Aldrich, München
anti-Flag M2 affinity gel	Sigma-Aldrich, München
anti-GFP Agarose	Santa Cruz, Heidelberg
Aqua B. Braun H ₂ O	B.Braun, Melsungen
Bacto Agar	BD Pharmingen, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Biotinylated Protein Ladder	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Blasticidin	PAA Laboratories, Cölbe
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe

Material und Methode

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Concanavalin A	GE Healthcare, München
Cyprofloxacinhydrochlorid	Waldapotheke, Wahlstedt
DAPI (<i>nucleic acid stain</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
Detection reagent Western	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe
DNP-konjugiertes-HSA	Sigma-Aldrich, München
dNTPs (10 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Geneticin	PAA Laboratories, Cölbe
Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	PAA, Laboratories, Cölbe
Ibidi mounting medium	Ibidi, München
IL-3	R+D Systems, Wiesbaden
IMDM	PAA Laboratories, Cölbe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Light cycler universal probe library	Roche, Mannheim
L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
MEM-Vitamine	PAA Laboratories, Cölbe

Material und Methode

Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	PAA Laboratories, Cölbe
4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P-40	AppliChem, Darmstadt
Nukleofektor-Lösung	Lonza, Schweiz
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE 4-12 % NOVEX [®] Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Oxalsäure-Dihydrat (C ₂ H ₆ O ₆)	Sigma-Aldrich, München
Page blue protein staining solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Page ruler plus prestained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München
PMA	Sigma-Aldrich, München
Poly-L-Lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, München
Prolong gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, München
Real-Time PCR Master Mix	Roche, Mannheim
RPMI-1640	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	AppliChem, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, München
Sigma Fast Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, München
Spectinomycin	Sigma-Aldrich, München
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
Super Aqua Blue ELISA substrate	eBioscience, San Diego, USA

Superblock T20 blocking buffer	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Tris	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypan blue staining solution	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA in PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Trypton	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Vira Power Packaging Mix	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3.4: Enzyme

Enzym	Hersteller
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Finnland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
HRP-konjugiertes-Avidin D	eBioscience, San Diego, USA

3.1.5. Antikörper

Tabelle 3.5: Primärantikörper

primäre Antikörper	Hersteller
Alexa Flour 647 anti-mouse CD107a (Lamp-1)	eBioscience, San Diego, USA
Alexa Flour 647 rat IgG2a Isotype Control	eBioscience, San Diego, USA
APC rat anti-mouse CD 117	BD Biosciences, Heidelberg
Biotin rat anti-mouse IL-6	eBioscience, San Diego, USA
Biotin rat anti-mouse TNF- α	eBioscience, San Diego, USA
FITC hamster anti-mouse Fc ϵ R1 α	eBioscience, San Diego, USA
FITC hamster IgG Isotype Control	eBioscience, San Diego, USA
FITC rat anti-mouse CD117 (c-Kit)	BD Biosciences, Heidelberg
FITC rat anti-mouse T1/ST2	mdBiosciences, Schweiz
FITC rat IgG2b, κ Isotype Control	BD Biosciences, Heidelberg
HRP Flag-M2-Peroxidase	Sigma-Aldrich, München
PE armenian hamster anti-mouse Fc ϵ RI	BioLegend, San Diego, CA, USA
rabbit anti-GFP	Cell signaling, Danvers, MA, USA
rat anti-mouse CD16/CD32	BD Biosciences, Heidelberg
rat anti-mouse IL-6	eBioscience, San Diego, USA

rat anti-mouse TNF- α	eBioscience, San Diego, USA
------------------------------	-----------------------------

Tabelle 3.6: Sekundärantikörper

sekundäre Antikörper	Hersteller
Alexa-546 F(ab) ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe
donkey anti-rabbit IgG (H+L) F(ab') ₂ fragment-PO	Jackson Immuno Research, England

Tabelle 3.7: Antikörper-Kits

Antikörper-Kits	Hersteller
MAPK Family Antibody Sampler Kit	Cell signaling, Danvers, MA, USA
PathScan® Multiplex Western Cocktail I	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Rab family antibody sampler Kit	Cell signaling, Danvers, MA, USA
Cell Light Golgi-RFP BacMam 2.0	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6. Reaktionskomplementausstattungen

Tabelle 3.8: Reaktionskomplementausstattungen (Kits)

Kit	Hersteller
Amaya cell line Kit	Lonza, Schweiz
B Cell isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BLOCK-iT Lentiviral Pol II miR RNAi expression system	Invitrogen, Karlsruhe
BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit	Invitrogen, Karlsruhe
BLOCK-iT Pol II miR RNAi expression vector reagent with EmGFP	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway BP clonase II enzyme mix	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway LR clonase II enzyme mix	Invitrogen, Karlsruhe
Fast Lane cell cDNA Kit	Qiagen, Hilden
Light Cycler TaqMan Master Kit	Roche, Mannheim
Pan T cell isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PureLink™ Micro-to-Midi total RNA Purification System	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript™ III CellsDirect™ cDNA Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

QIAquick gel extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen, Hilden

3.1.7. Plasmide und Konstrukte

Tabelle 3.9: Plasmide

Plasmid	Hersteller
pcDNA6.2-GW/EGFP-miR	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA6.2-GW/EGFP-miR negativ control	Invitrogen, Karlsruhe
pLenti6/V5-DEST	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR TM 201	Invitrogen, Karlsruhe
pENTR/D-Topo	Invitrogen, Karlsruhe
pIRES2-EGFP	Clontech, Frankreich
pEGFP-C1	Clontech, Frankreich

Tabelle 3.10: Plasmidkonstrukte

Konstrukt	Vektor	Insert
miRIN3-1-pcDNA6.2	pcDNA6.2-GW/EGFP-miR	mi-mRIN3-1
miRIN3-2-pcDNA6.2	pcDNA6.2-GW/EGFP-miR	mi-mRIN3-2
miRIN3-3-pcDNA6.2	pcDNA6.2-GW/EGFP-miR	mi-mRIN3-3
miRIN3-4-pcDNA6.2	pcDNA6.2-GW/EGFP-miR	mi-mRIN3-4
miNegative-pcDNA6.2	pcDNA6.2-GW/ miR-neg	mi-RNA-Negative
miRIN3-1-pLenti6	pLenti6/V5-DEST	mi-mRIN3-1
miRIN3-2-pLenti6	pLenti6/V5-DEST	mi-mRIN3-2
miRIN3-3-pLenti6	pLenti6/V5-DEST	mi-mRIN3-3
miRIN3-4-pLenti6	pLenti6/V5-DEST	mi-mRIN3-4
miNegative-pLenti6	pLenti6/V5-DEST	mi-RNA-Negative
RIN3-TOPO	pENTR-D-Topo	murin RIN3
RIN3-plenti6 (RIN3-V5)	pLenti6/V5-DEST	murin RIN3
RIN3-pIRES (RIN3-IRES-GFP)	pIRES2-EGFP	murin RIN3
RIN3-pEGFP-C1 (RIN3-GFP)	pEGFP-C1	murin RIN3

3.1.8. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Es handelte sich um unmodifizierte Oligonukleotide in HPLC-Qualität.

Tabelle 3.11: Oligonukleotide (Primer)

Name	5'-3'-Sequenz
BS-RIN3 s	CAC CAT GCG ACG CGC CGA AGC G
BS-RIN3 as	CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC GCC TCC TAG GAA GTT GGG TTC
EMGFP	GGC ATG GAC GAG CTG TAC AA
miRNA-LoopF	GTT TTG GCC ACT GAC TGAC
M13F	GTA AAA CGA CGG CCAG
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
HPRT LEFT	TCC TCC TCA GAC CGC TTT T
HPRT RIGHT	CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC
mRIN3-tag101-F	ACT CAA AGC CTT GGT GGA AC
mRIN3-tag101-R	TGT ACA AGG CTG ACT CCA CTA TG
mRIN2-tag-F	CAG CCA AGA CGG AGT CTC A
mRIN2-tag-R	TGC TGA GGA GCT CCA AAA AT
WJ-Rin3-FLAG-sense	CACC ATG GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG CGA CGC GCC GAA GCG CCC TCG
WJ-RIN3-antisense without end code	TAG GAA GTT GGG TTC CCG CAC
WJ-FLAG-BglII-sense-RIN3	GAA GAT CTA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGC GAC GCG CCG AAG CGC CCT CG
WJ-RIN3-EcoRI-antisense	CGG AAT TCT TAT AGG AAG TTG GGT TCC CGC AC

3.1.9. miRNA Sequenzen

Tabelle 3.12: RIN3 spezifische miRNA Sequenzen

Name	5'-3'-Sequenz oberer Strang	5'-3'-Sequenz unterer Strang
miRIN3-1	TGCTGAACGCAATCAGTCTGAAGATG GTTTTGGCCACTGACTGACCATCTTCA CTGATTGCGTT	CCTGAACGCAATCAGTGAAGAT GGTCAGTCAGTGGCCAAAACC ATCTTCAGACTGATTGCGTTC
miRNA-2	TGCTGTTTCATGGGTGGTTGGTTTGAG TTTTGGCCACTGACTGACTCAAACCAC ACCCATGAAA	TGCTGTTTCATGGGTGGTTGGT TTGAGTTTTGGCCACTGACTGA CTCAAACCACACCCATGAAAC
miRIN3-3	TGCTGTTCTTATACAGTTTGCGGTCGG TTTTGGCCACTGACTGACCGACCGCA CTGTATAAGAA	CCTGTTCTTATACAGTGCGGTC GGTCAGTCAGTGGCCAAAACC GACCGCAAACGTATAAGAAC
miRIN3-4	TGCTGCGAAGTGGAAGTCTCGTTTGG GTTTTGGCCACTGACTGACCCAAACG ACTTCCACTTCG	CCTGCGAAGTGGAAGTCGTTTGG GGTCAGTCAGTGGCCAAAACC CAAACGAGACTTCCACTTCGC

3.1.10. Tierstämme, Zelllinien und *E.coli*-Stämme

Tabelle 3.13: Zellen, Zelllinien, *E.coli*-Stämme

Tierstämme	Hersteller
C57BL/6	The Jackson Laboratory, Main, USA
C57BL/6J-Lyst ^{bg-J}	The Jackson Laboratory, Main, USA
Zelllinien	Hersteller
3T3	Immunbiologie, FZB
A20	ATCC, Manassas, VA, USA
EL4	ATCC, Manassas, VA, USA
HEK 293 FT	Invitrogen, Karlsruhe
HEK 293 WT	Angeborene Immunität, FZB
HeLa	Veterinär-Infektiologie und -Immunologie
MC9	Immunbiologie, FZB
RBL-2H3	Immunbiologie, FZB
Bakterienstämme	Hersteller
One Shot TOP10	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.11. Software

Tabelle 3.14: Software

Software	Hersteller
BioEdit	Ibis Therapeutics, Carlsbad, USA
Cell Quest	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo	Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA
LAS AF Lite	Leica, Wetzlar
Light Cycler Software version 3	Roche, Mannheim
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Magellan	Tecan, Schweiz

3.2. Methode

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien, sowie die dendritischen Zellen (BMDC) und Makrophagen (BMDM) wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95 % Humidität und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert, Mastzellen (BMDC) hingegen bei 37 °C, 95 % Humidität und einer Atmosphäre von 7,5 % CO₂.

MC9 Zellen

MC9 Zellen wurden in DMEM Medium kultiviert, das mit den entsprechenden Kulturzusätzen supplementiert war. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 0,25 x 10⁵ Zellen/ml ausgesät und alle 3 Tage passagiert. Transfizierte MC9 Zellen wurden in Kulturmedium kultiviert, das mit dem entsprechenden Antibiotikum (10 µg/ml Blastocidin oder 2 mg/ml Geneticin) versetzt war. Die Kultivierung erfolgt bei 5 % CO₂.

MC9 Kulturmedium

DMEM-Medium

10 % fötales Kälberserum

10 % ConA-Milzüberstand

1x nicht-essentielle Aminosäuren

0,05 mM β-Mercaptoethanol

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

Der für die Kultivierung benötigte ConA-aktivierte-Milzüberstand wurde durch die Aufarbeitung von Milzen aus C57BL/6 Mäusen gewonnen. Dafür wurden die Milzen zunächst präpariert, eine Einzelzellsuspension hergestellt und eine anschließende 15 minütige Erythrozytenlyse bei Raumtemperatur in einem Gesamtvolumen von 5 ml durchgeführt. Zum Stoppen der Lyse wurden 20 ml 5 % FKS/PBS hinzugefügt und es folgte eine Zentrifugation bei 290 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Das Pellet

wurde in 10 ml 5 % FKS/PBS gewaschen, abzentrifugiert und in 10 ml Milz-Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium mit 2 µg/ml Concanavalin A ausgesät. Es folgte eine Inkubation für 48 Stunden bei 5 % CO₂ und 37°C, bevor die Zellen geerntet, der Überstand durch einen 0,2 µm Filter (Nalgene Labware, Dänemark) filtriert und anschließend bei -20 °C gelagert wurde.

Milz Kulturmedium

RPMI-Medium

10 % fötales Kälberserum

1x nicht-essentielle Aminosäuren

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

RBL-2H3 Zellen

RBL-2H3 Zellen wurden in IMDM Medium kultiviert, das mit entsprechenden Kulturzusätzen supplementiert war. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät und alle 3 Tage passagiert. Transfizierte RBL-2H3 Zellen wurden in Kulturmedium kultiviert, das mit dem entsprechenden Antibiotikum (10 µg/ml Blastocidin oder 1,5 mg/ml Geneticin) versetzt war. Für die Passagierung wurde der Kulturüberstand aus der Zellkulturflasche entfernt und die adhärennten RBL-2H3-Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 10 ml 1x Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37 °C abgelöst und in 20 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 290 x g für 10 Minuten zentrifugiert, ausgesät und bei 5 % CO₂ kultiviert.

RBL-2H3 Kulturmedium

IMDM-Medium

10 % fötales Kälberserum

1x nicht-essentielle Aminosäuren

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

HEK293 Zellen

HEK293 Wildtyp oder HEK293FT Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit entsprechenden Kulturzusätzen versetzt war. Im Fall der HEK293FT Zellen wurde dem Kulturmedium 500 µg/ml Geneticin hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und alle 3 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die verbleibenden adhärennten Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen abzulösen, wurden diese in 10 ml Trypsin/EDTA für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde 10 ml Kulturmedium zu den abgelösten Zellen hinzugefügt und diese in ein 50 ml steriles Falcon überführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 290 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, ausgezählt und ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 5 % CO₂.

HEK293 Kulturmedium

DMEM-Medium

10 % fötales Kälberserum

1x nicht-essentielle Aminosäuren

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, das mit entsprechenden Kulturzusätzen versetzt war. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und alle 3 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die verbleibenden adhärennten Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Um die adhärennten Zellen abzulösen, wurden diese in 10 ml Trypsin/EDTA für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde 10 ml Kulturmedium zu den abgelösten Zellen hinzugefügt und diese in ein 50 ml steriles Falcon überführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 290 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das überstehende Medium

abgenommen, die Zellen erneut in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, ausgezählt und ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 5 % CO₂.

HeLa Kulturmedium

DMEM-Medium

10 % fötales Kälberserum

1x nicht-essentielle Aminosäuren

0,05 mM β-Mercaptoethanol

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

3T3, EL4 und A20 Zellen

Diese Zelllinien wurden direkt vor ihrer Verwendung erhalten und sofort weiterverwendet (3.2.2.2).

Mastzellen aus Knochenmarkskulturen (BMMC)

Um Mastzellen aus Knochenmarkskulturen (BMMC, *bone marrow derived mast cells*) zu präparieren, wurde zunächst das Knochenmark aus Femur und Tibia von C57BL/6 Wildtyp oder C57BL/ Lyst^{bg-j} Mäusen isoliert, indem es mit PBS aus den vorher präparierten Knochen gespült wurde. Die gewonnenen Zellen wurden bei 290 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Lyse wurden 20 ml Kulturmedium hinzugefügt und die Zellen erneut pelletiert. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe des Wachstumsfaktors IL-3 (5 ng/ml). Die Passagierung der Zellen erfolgte einmal pro Woche, wobei in den ersten zwei Wochen zusätzlich das Antibiotikum Ciprofloxacinhydrochlorid (10 µg/ml) hinzugefügt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 7,5 % CO₂ und 37° C. Sechs Wochen nach Präparation der Mastzellen (BMMC) wurden diese durch FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) auf die Oberflächenexpression von CD117 (c-Kit) und FcεRI getestet (3.2.4.6).

Mastzellen Kulturmedium

IMDM-Medium

10% fötales Kälberserum

1x nicht-essentielle Aminosäuren

0,05 mM β -Mercaptoethanol

1 mM Natriumpyruvat

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

1x MEM-Vitamine

5 ng/ml IL-3

peritoneale Mastzellen

Für die Gewinnung peritonealer Mastzellen wurden C57BL/6 Wildtyp oder C57BL/Lyst^{bg-J} Mäusen präpariert. Für die Isolierung der Zellen wurden 8 ml PBS in die Leibeshöhle der Maus (*peritoneal cavity*) injiziert. Das PBS wurde in der Leibeshöhle durch Massage verteilt, um eine vollständige Verteilung im Peritoneum zu gewährleisten. Anschließend wurde das PBS mit den isolierten Zellen durch eine Spritze abgezogen und sofort für die folgenden Experimente eingesetzt (3.2.4.6, 3.2.5.4).

dendritische Zellen aus Knochenmarkskulturen (BMDC)

Für die Gewinnung dendritischer Zellen (BMDC, *bone marrow derived dendritic cells*) wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia von C57BL/6 Wildtyp Mäusen isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden bei 290 x g für 10 Minuten bei 4° C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Erythrozytenlysepuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Lyse wurden 10 ml Kulturmedium hinzugefügt und die Zellen erneut pelletiert. Anschließend wurden sie mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in einer Petrischale ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (20 ng/ml) bei 5 % CO₂. Sechs Tage nach dem Ansatz der Kultur wurde das Medium aus der Petrischale entfernt, die sich noch im Überstand befindenden Zellen wurden pelletiert, in neuem Kulturmedium aufgenommen und wieder in die Petrischale überführt. Acht Tage nach dem Ansatz der Kultur wurden die adhärenenten Zellen mit Hilfe von Accutase abgelöst, geerntet und für die Generierung von cDNA eingesetzt (3.2.2.2).

dendritische Zellen Kulturmedium

RPMI-Medium

10 % fötales Kälberserum

0,05 mM β-Mercaptoethanol

2 mM L-Glutamin

1x Penicillin/Streptomycin

Makrophagen aus Knochenmarkskulturen (BMDM)

Für die Gewinnung von Makrophagen (BMDM, *bone marrow derived macrophages*) wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia von C57BL/6 Wildtyp Mäusen isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden bei 180 x g für 10 Minuten bei 4 °C pelletiert und anschließend über Nacht in Kulturmedium ausgesät. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe des Wachstumsfaktors M-CSF (50 ng/ml) bei 5 % CO₂. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und erneut ausgesät, um kontaminierende Fibroblasten auszuschließen. Vier Tage nach dem Ansatz der Kultur wurden die Zellen geerntet, für weitere drei Tage kultiviert und im Anschluss für die Generierung von cDNA eingesetzt (3.2.2.2).

Makrophagen Kulturmedium

DMEM-Medium

10 % fötales Kälberserum

1 mM Natriumpyruvat

4 mM L-Glutamin

1 % HEPES

B-Zell und T-Zell-Isolation aus Splenozyten

Für die Aufarbeitung von Splenozyten wurden Milzen aus C57BL/6 Mäusen präpariert. Es wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, die für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Erythrozytenlysepuffer in einem Gesamtvolumen von 5 ml lysiert wurden. Zum Abstoppen der Lyse wurden 20 ml 5 % FKS/PBS hinzugefügt und es folgte eine Zentrifugation bei 290 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde in 10 ml 5 % FKS/PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Aus den gewonnenen Splenozyten wurden im weiteren Verlauf B- und T-Zellen aufgereinigt. Dazu wurde das „Pan T cell isolation Kit“ bzw. das „B cell isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden 1×10^7 Splenozyten pro Ansatz magnetisch-markiert, anschließend erfolgte die magnetische Separation über MS-Säulen mit Hilfe des MACS-Separators (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Die aufgereinigten B- und T-Zellen wurden für die Generierung von cDNA eingesetzt (3.2.2.2).

3.2.1.2. Zellzählung, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellzählung erfolgte mit einem optischen Mikroskop mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer Zählkammer; Paul Marienfeld, Lauda Königshofen). Für die Zählung wurde Trypanblau verwendet, wodurch tote Zellen ausgeschlossen werden konnten. Durch die Permeation des Trypanblau durch die Zellmembran toter Zellen erscheinen diese blau. Das Trypanblau wurde mit einer Verdünnung von 1:10 in 0,9 % NaCl gelöst. Die zu zählenden Zellen wurden wiederum 1:10 in dieser Arbeitslösung verdünnt.

Die Zelllinien wurden zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden 10×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und bei $290 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in kaltem Einfriermedium (10 % DMSO in FKS) resuspendiert und in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen mit den Zellen wurde wiederum in einer Einfrierbox, die mit Isopropanol gefüllt war, für 2 Tage bei $-80^\circ C$ eingefroren. Anschließend erfolgte die Langzeitlagerung der Zellen in einem flüssigen Stickstofftank.

Das Auftauen der Zellen erfolgte, indem diese aus dem Stickstofftank entnommen wurden und sofort bei $37^\circ C$ im Wasserbad für 30 Sekunden aufgetaut wurden. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml ihres entsprechenden warmen Kulturmediums resuspendiert und bei $290 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt, die das entsprechende, vorgewärmte Kulturmedium enthielt.

3.2.1.3. Transfektion von Säugerzellen

Transfektion mittels Elektroporation

MC9, RBL-2H3 und Mastzellen aus Knochenmarkskulturen (BMMC) wurden mit dem „Amaxa Nucleofector Device“ (Lonza, Schweiz) und der entsprechenden Nucleofektor Lösung (Lonza, Schweiz) nach den Herstellerangaben transfiziert. Je nach Zelltyp wurde die entsprechende optimale Zellzahl bei $290 \times g$ für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in $100 \mu l$ der Nucleofektor-Lösung mit $8-10 \mu g$ der Plasmid-DNA transfiziert. Nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen sofort in 4 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium in eine 6-Well-Platte überführt und bei $37^\circ C$ und 5 % CO_2 (MC9, RBL-2H3) bzw. 7,5 % CO_2 (BMMC) kultiviert. Die für die Transfektion der unterschiedlichen Zelltypen eingesetzten Nucleofektor-Programme, sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tabelle 3.15: Nukleofektor Programme und Lösungen

Zelllinie	Zellzahl	Programm	Lösung	DNA-Menge
Mastzellen (BMMC)	3×10^6	T16	T-Lösung	10 µg/ml
RBL-2H3	2×10^6	X01	T-Lösung	5 µg/ml
MC9	1×10^6	T30	V-Lösung	10 µg/ml

Transfektion mittels Lipid-basierender Reagenzien

HEK293 Wildtyp-Zellen wurden mit DNA-Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Dafür wurden 9 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in 0,5 ml Opti-MEM® I Medium (Invitrogen, Karlsruhe) ohne Serum gelöst. Parallel dazu wurden 18 µl Lipofectamine™ 2000 in 0,5 ml Opti-MEM® I Medium gelöst und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die gelöste Plasmid-DNA und das gelöste Lipofectamine™ 2000 zusammengeführt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden $1,2 \times 10^6$ HEK293 Wildtyp-Zellen/ml in Opti-MEM® I Medium, das mit Serum (FKS) supplementiert war, aber kein Antibiotikum enthielt, resuspendiert. Die DNA-Lipofectamine™ 2000 Komplexe wurden in einer 6-Well-Platte mit 1,8 ml der Zellsuspension gemischt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. RNA Isolation

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde das „PureLink™ Micro-to-Midi total RNA Purification System“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden zunächst 5×10^7 Zellen bei 4 °C durch Zentrifugation bei 2000 x g für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 600 µl Lysepuffer, der β-Mercaptoethanol enthielt, resuspendiert und solange auf dem Vortex gemischt bis das Zellpellet vollständig gelöst war. Das Lysat wurde im Anschluss zehnmal durch eine Nadel der Größe 18-21-gauge gepresst, die an eine RNase freie Spritze angeschlossen war. Dieses Zellhomogenat wurde mit 70 % Ethanol gemischt, in eine

Spin-Kartusche überführt und bei 12,000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Spin-Kartusche mehrmals mit Waschpuffer I und II gewaschen. Anschließend wurde die RNA mit 30 µl Rase-freiem Wasser eluiert. Die RNA Qualität und Quantität wurde bei 260 nm UV-Absorbierung bestimmt (3.2.2.3).

3.2.2.2. cDNA Synthese

Für die Herstellung von cDNA (*complementary DNA*) wurde das „Superscript™ III CellsDirect™ cDNA Synthesis System“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden die verwendeten Zellen zunächst geerntet und eine Zellzahl von 1-10.000 Zellen/µl eingestellt, bevor die Zellen lysiert wurden. Anschließend wurde kontaminierende DNA durch DNase I verdaut und Erststrang cDNA synthetisiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Für die quantitative *real-time* PCR Analyse, wurde cDNA mit dem „Fast Lane Cell cDNA Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers hergestellt. Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.2.3. Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch mit Hilfe des Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Dafür wurde eine 1:100 Verdünnung der Nukleinsäure in H₂O angesetzt, in eine Silika-Küvette (Hellma, Müllheim) überführt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA basiert dabei auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe der Basen bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum für Proteine basiert auf den aromatischen Aminosäureresten und liegt bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm zeigt die Reinheit der DNA bzw. RNA-Lösung an. Eine reine DNA bzw. RNA-Lösung zeigt ein Verhältnis von $\lambda_{260\text{nm}}/\lambda_{280\text{nm}}$ zwischen 1,8–2. Ist sie dagegen mit Proteinen kontaminiert, ist der Wert kleiner.

Für die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde folgende Gleichung verwendet:

$$[\text{RNA in } \mu\text{g/mL}] = \lambda_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

$$[\text{DNA in } \mu\text{g/mL}] = \lambda_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

3.2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion wurde durchgeführt, um eine DNA-Sequenz aus einer cDNA oder einem rekombinanten Plasmid zu amplifizieren.

PCR für Klonierungszwecke

Für Klonierungszwecke wurde die „Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase“ (Finnzymes, Finnland) verwendet. Diese besitzt eine *proof-reading*-Funktion, wodurch während der Amplifizierung entstehende Fehler minimiert werden können. Für die Amplifikation wurden bis zu 30 Zyklen verwendet (Tab.3.16) und eine H₂O-Kontrolle hinzugefügt, um eine Kontaminierung in den Ansätzen auszuschließen. Die Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide war abhängig von ihrer Länge und ihrem GC-Gehalt. Die Elongationsdauer hing von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz ab. Die diversen verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in Tabelle 3.11 aufgelistet. PCR-Produkte wurden über ein Agarose-Gel (3.2.2.6) elektrophoretisch aufgetrennt. Für weitere Klonierungszwecke wurde das Amplifikat aus dem Agarose-Gel eluiert (3.2.2.8).

Tabelle 3.16: PCR für Klonierungszwecke

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	5 Minuten
Denaturierung	94 °C	30 x 1 Minute
Primeranlagerung	58 °C	
Elongation	72 °C	
Elongation	72 °C	10 Minuten
Ende	4 °C	∞

PCR für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurde ein 50 µl PCR-Reaktionsansatz, unter Verwendung von 1 Unit der *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe), auf Eis angesetzt. Die diversen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.11 aufgelistet. Die Proben wurden in einem DNA Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung von 30 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus beinhaltete dabei eine initiale Denaturierung und eine finale Elongation (Tab.3.17).

PCR für die Analyse von Bakterienkolonien

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen in rekombinanten Plasmiden wurden ebenfalls analytische PCR-Reaktionen durchgeführt. Dafür wurden die Plasmide vorher nicht aufgereinigt, sondern Bakterienkulturen oder Bakterienkolonien in der PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Es wurde 1 µl Bakterienkultur verwendet oder eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und direkt in dem PCR-Ansatz gelöst. Der PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 25 µl. Im weiteren Verlauf wurde er elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt (3.2.2.6). Zu jedem PCR-Ansatz wurde zusätzlich eine H₂O-Kontrolle hinzugefügt. Von positiven Klonen wurde eine DNA-Mini-Präparation (3.2.2.10) durchgeführt und die DNA-Sequenzen der rekombinanten Plasmide durch Sequenzierung (3.2.2.12) überprüft.

Tabelle 3.17: PCR für analytische Zwecke

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	5 Minuten
Denaturierung	95 °C	1 Minute
Primeranlagerung	55 °C	1 Minute
Elongation	72 °C	1-4 Minuten
Elongation	72 °C	10 Minuten
Ende	4 °C	∞

} 30 x

3.2.2.5. Quantitative *real-time* PCR

Für das Ansetzen der quantitativen *real-time* PCR wurde der „Real-Time PCR Master Mix“ (Roche, Mannheim) verwendet. Dafür wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl, 0,1 µM einer markierten Sonde, 1 pmol eines jeden Oligonukleotids und 1 µl Template cDNA verwendet. Die entsprechenden optimalen Oligonukleotide für das zu untersuchende Gen waren mit der „Probe Finder“ Software (Roche, Mannheim) bestimmt worden. In jedem durchgeführten Experiment wurde HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) als Referenzgen verwendet. Die quantitative *real-time* PCR wurde in dem LightCycler 1.5 (Roche, Mannheim) unter Verwendung des in Tabelle 3.18 aufgeführten Protokolls durchgeführt. Für die Analyse wurden die relativen mRNA Expressionslevel bestimmt.

Tabelle 3.18: quantitative *real-time* PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	95 °C	45 x 10 Sekunden 30 Sekunden 5 Sekunden
Primeranlagerung	55 °C	
Elongation	72 °C	
Kühlung	40 °C	30 Sekunden

3.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE durch Aufkochen gelöst, auf 55 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gelvolumen) versetzt. Anschließend wurde die gelöste Agarose in einen entsprechenden Gehäuseeinsatz gegossen, der einen passenden Kamm enthielt. Die DNA-Proben hatten ein Volumen von 20 µl und wurden mit 4 µl eines 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Zusätzlich zu den Proben wurde das Gel mit 0,1 µg eines DNA-Markers beladen. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen

Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) bei 7-10 V/cm Gellänge in 1x TAE Laufpuffer. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht analysiert und fotografiert (Gel Doc XR Apparat und Software, Bio-Rad, München).

3.2.2.7. DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA-Fragmenten erfolgte entweder analytisch oder präparativ. Für die präparative Restriktion wurden Plasmid-DNA oder durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Frankfurt) restringiert. 3 Unit eines jeden Restriktionsenzymen wurden für 5 µg Plasmid-DNA oder für 1 µg DNA-Fragment verwendet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug dabei 50 µl. Die Restriktion erfolgte im für das Enzym optimalen Arbeitspuffer (New England Biolabs, Frankfurt) über Nacht bei 37 °C. Die restringierte DNA wurde im Anschluss über ein Agarosegel aufgetrennt (3.2.2.6) und aus diesem eluiert (3.2.2.8).

Die analytische Restriktion wurde angewandt, um die DNA im Vorfeld einer Sequenzierung (3.2.2.12), auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 10 µl, 500 ng DNA und 1-3 Unit der entsprechenden Restriktionsenzyme verwendet. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C über Nacht in einem den Enzymen entsprechenden optimalen Arbeitspuffer und wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

3.2.2.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem „QIAquick gel extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung wurde nach einer Restriktion (3.2.2.7) und anschließender Elektrophorese (3.2.2.6) von DNA-Fragmenten durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende DNA zunächst unter UV-Licht aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und anschließend

aufgereinigt. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 30 µl dH₂O eluiert und entweder sofort eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Aufreinigung aus Lösungen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen erfolgte mit dem „QIAquick PCR purification Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Sie wurde nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau eingesetzt. Die Elution der DNA erfolgte mit 30 µl dH₂O, die DNA wurde entweder sofort eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

3.2.2.9. Klonierung

Klonierung durch Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor erfolgte unter Verwendung der T4-DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt). Dazu wurde die zu ligierende DNA und der entsprechende Vektor zunächst restringiert, um kompatible Schnittstellen zu bekommen. Es wurden 50 ng Vektor und der dreifach molare Überschuss an DNA-Fragment (Ratio 1:3) eingesetzt. Hinzu kamen 2 µl 10x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) und H₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 µl des Ligationsansatzes für die Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen eingesetzt (3.2.2.11). Der restliche Ansatz wurde bei -20 °C eingefroren.

Klonierung von RIN3-Expressionsvektoren mit Hilfe des Gateway-Systems

Die Gateway-Technologie von Invitrogen ist eine Klonierungsmethode, die sich Rekombinationsvorgänge zunutze macht. Mit dieser Methode lassen sich DNA-Sequenzen effizient in diversen Vektorsystemen umklonieren, wobei die Orientierung und der Leserahmen erhalten bleiben. Zunächst wird dabei die entsprechende Sequenz in einen Eingangsvektor kloniert und im weiteren Verlauf aus diesem in diverse Expressionsvektoren durch Rekombination umkloniert. Mit Hilfe dieses Systems wurde RIN3 cDNA in unterschiedliche Expressionsvektoren kloniert (Tab.3.9).

Um eine Klonierung gemäß dem Gateway-System (Invitrogen, Karlsruhe) durchzuführen, wurde das zu klonierende Produkt nach Aufreinigung aus dem Agarosegel (3.2.2.8) in den entsprechenden Eingangsvektor ligiert und anschließend durch zwei Rekombinationen in die Zielvektoren überführt.

BP Rekombination:

Das zu klonierende Produkt (15-150 ng) wurde mit 150 ng des Eingangsvektors pDONR™201 (Invitrogen, Karlsruhe) vermischt. Hinzu kamen BP Reaktionspuffer und 2 µl „Gateway BP Clonase™ Enzym Mix“ (Invitrogen, Karlsruhe). Der Gesamtansatz betrug 10 µl und wurde für 1 Stunde bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 1 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt und der Ansatz wurde für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

LR Rekombination:

Der Reaktionsansatz aus der vorangegangenen BP-Klonierung wurde in der LR-Klonierung weiterverwendet. Der Eingangsvektor (50-150 ng) wurde mit dem Zielvektor (150 ng) in der LR-Reaktion vermischt. Hinzu kamen LR Reaktionspuffer und 2 µl „Gateway LR Clonase™ enzyme mix“ (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 25 °C inkubiert, bevor zuletzt 2 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt wurden und der Ansatz für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde.

Klonierung von lentiviralen miRNA-Expressionsvektoren

Die miRNA-Expressionsvektoren wurden gemäß des „Block-iT™ Pol II miRNAi Expression Vector Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers kloniert. Dazu wurden zunächst die vorher designten Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide (3.2.3.1) in TE-Puffer rekonstituiert, um eine Ausgangskonzentration von 200 µM zu erreichen. Anschließend wurden die Oligonukleotide für den oberen und den unteren Strang der miRNA aneinandergelagert. Dazu wurde eine *Annealing*-Reaktion bei Raumtemperatur, aus jeweils 50 µM der Einzelstrang-Oligonukleotide für den oberen und unteren Strang, 2 µl des 10x Oligo-*Annealing*-Puffer und DNase/RNase freiem H₂O angesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl. Dieser Ansatz wurde für 4 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt, so dass sich die Einzelstrang-Oligonukleotide

aneinanderlagern konnten. Auf diese Weise entstand eine 50 μM Stocklösung aus doppelsträngiger DNA (dsDNA). Diese wurde auf eine 10 nm Lösung verdünnt und für die Ligation in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR Vektor eingesetzt. Für die Ligation wurden 1 nm miR-Doppelstrang-Oligonukleotid, 2 μl des linearisierten pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR Vektors, 1 μl T4 DNA Ligase (1 U/ μl) (5 ng/ μl) und DNase/RNase freies H₂O in einem Gesamtvolumen von 20 μl angesetzt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in One Shot TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) kompetente *E. coli* (3.2.2.11) transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Spectinomycin-selektiven (50 $\mu\text{g/ml}$) Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien durch PCR überprüft. Mit positiven Kolonien wurde LB-Medium angeimpft, das 50 $\mu\text{g/ml}$ Spectinomycin enthielt. Aus angewachsenen Kulturen wurden Plasmide präpariert (3.2.2.10) und durch Sequenzierung überprüft (3.2.2.12). Im weiteren Verlauf wurden die pre-miRNA-Expressions-Kassetten durch Rekombination gemäß dem Gateway-System in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti6/V5-Dest umklont. Zusätzlich wurde die miRNA-negativ-Kontrollkassette aus dem pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-neg-control Vektor in den pLenti6/V5-Dest Vektor umklont. Bei den Rekombinationsvorgängen wird dabei das EmGFP mit in den pLenti6/V5-Dest Vektor umklont, so dass transfizierte Zellen im Anschluss anhand von GFP-Expression detektiert werden können.

3.2.2.10. Plasmidisolierungen

DNA-Plasmid-Minipräparationen wurden mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) und DNA-Plasmid-Maxipräparationen mit dem „PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden antibiotikumhaltige LB-Kulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Plasmide präpariert und aufgereinigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in dH₂O. Die aufgereinigten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.2.11. Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden kompetenten *E.coli*-Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Je 100 µl der Zellen wurden mit 2 µl einer Ligationsreaktion oder 10 ng gereinigter Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der Ansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt, bevor jeder Ansatz mit 200 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt wurde. Diese Ansätze wurden für 45-60 Minuten bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren (Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml)), ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.12. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 800 ng Plasmid-DNA mit 1 µl eines Sequenzierprimers (10 pmol/µl) vorgelegt und mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Elektropherogrammen mit der BioEdit Software (Ibis Therapeutics, USA).

3.2.3. RNAi Design und lentivirale Transfektion

3.2.3.1. Design von RIN3 spezifischen miRNAs

Es wurden vier verschiedene RIN3 spezifische miRNAs designt, welche vier verschiedene Regionen der RIN3 mRNA (Genbank-Akzessionsnummer NM_177620) targetieren. Die Sequenzen der miRNAs sind in Tabelle 3.19 aufgelistet. Sie wurden gemäß des „Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers zunächst in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR Vektor kloniert. Anschließend wurden sie durch Rekombination in den pLenti6/V5-Dest Expressionsvektor umkloniert (3.2.2.9).

Tabelle 3.19: miRNA Sequenzen

miRNA	Zielsequenz
miRIN3-1	CAT CTT CAG ACT GAT TGC GTT
miRIN3-2	TCA AAC CAA CCA CCC ATG AAA
miRIN3-3	CGA CCG CAA ACT GTA TAA GAA
miRIN3-4	CCA AAC GAG ACT TCC ACT TCG
Kontroll- miRNA	GTC TCC ACG CAG TAC ATT TCA

3.2.3.2. Produktion des Lentivirus in HEK293FT Zellen

Um die Expression von RIN3 in Mastzellen herunterzuregulieren oder eine RIN3 Überexpression in Mastzellen zu erhalten, wurde ein lentivirales Transfektionssystem benutzt. Für das miRNA Expressionssystem wurden vier RIN3-spezifische Lentiviren, sowie eine miRNA Negativkontrolle gemäß dem „Block-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System“ (Invitrogen, Karlsruhe) hergestellt (3.2.2.9). Dazu wurden die pre-miRNA-Kassetten zunächst in den pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR Vektor kloniert und im weiteren Verlauf in den pLenti6/V5-Dest Vektor umklontiert (3.2.2.9). Die Kontroll-miRNA targetiert kein bekanntes Vertebraten-Gen und kann somit als Kontrolle eingesetzt werden. Für die Überexpression von RIN3, wurde murine RIN3 cDNA zunächst in den Eingangsvektor pENTR/D-Topo gemäß dem Gateway-System kloniert und anschließend in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti6/V5-DEST umklontiert (3.2.2.9).

Für die Produktion der Lentiviren wurden zunächst DNA-Lipofectamine™ 2000 Komplexe generiert und HEK293FT Zellen transfiziert. HEK293FT Zellen dienen hierbei als Produktionszelllinie (*producer cell line*) für den Lentivirus. Es wurden 9 µg ViraPower™ Packaging Mix und 3 µg der entsprechenden pLenti6/V5 Expressionkonstrukte in 1,5 ml Opti-MEM® I Medium ohne Serum gemischt. Parallel wurden 36 µl Lipofectamine™ 2000 ebenfalls in 1,5 ml Opti-MEM® I-Medium ohne Serum gemischt, nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur die DNA- und die verdünnte Lipofectamine™ 2000-Lösung miteinander vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 2×10^6 HEK293FT

Zellen/ml in Opti-MEM[®] I Medium mit Serum ohne Antibiotika, angesetzt. Die DNA-Lipofectamine[™] 2000 Komplexe wurden in eine T75 Zellkulturflasche, die 5 ml Kulturmedium mit Serum, aber kein Antibiotikum enthielt, überführt. Dazu wurden 5 ml der HEK293FT Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch normales Kulturmedium ersetzt. Der virushaltige Überstand wurde 72 Stunden nach der Transfektion geerntet, indem er in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellreste bei 2500 x g für 5 Minuten bei 4 °C pelletiert wurden. Der lentivirale Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter (Nalgene Labware, Dänemark) gefiltert und durch Ultrafiltration konzentriert. Dafür wurde zunächst das „Centricon Plus-20 centrifugal filter device“ (Millipore, Schwalbach) mit 20 ml 70 % Ethanol und dann zweimal mit 20 ml sterilem PBS gewaschen. Der filtrierte lentivirale Überstand wurde in das Filterbehältnis überführt und mit 3500 x g bei 4 °C zentrifugiert, bis er sich vollständig im Sammelbehältnis befand. Das Virus wurde geerntet, das Volumen bestimmt, die Konzentration eingestellt und entweder sofort benutzt oder Aliquots der konzentrierten Viren bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.3. Lentivirale Infektion von MC9 und RBL-2H3 Zellen

MC9 und RBL-2H3 Zellen wurden mit den vorher in HEK293FT produzierten Lentiviren transfiziert, um stabile RIN3 *knock-down* oder Überexpressions-Zellen zu generieren. Es wurden 1 x 10⁶ Zellen pro Ansatz verwendet. Diese wurden gewaschen, in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 12-Well-Platte überführt. Im Falle der MC9 Zellen wurde Kulturmedium ohne ConA-Milzüberstand benutzt. Zu den Zellen wurden 0,5 ml des konzentrierten Virus und 5 µg/ml Protaminsulfat (Sigma-Aldrich, München) gegeben. Anschließend wurden die Zellen in der 12-Well-Platte für 2 Stunden bei 1500 x g zentrifugiert, um eine bessere Interaktion zwischen den Viruspartikeln und den Zellen herzustellen. Dann wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und, um die transfizierten Zellen zu selektieren, nach weiteren zwei Tagen das Antibiotikum Blastocidin hinzugefügt.

3.2.3.4. Generierung von stabilen Zellen

Für die Generierung von stabilen Zellklonen, die miRNA oder cDNA exprimieren, wurden die transfizierten Zellen, 5 Tage nach Beginn der Selektion mit dem Antibiotikum Blastocidin, in 96-Well-Platten in unterschiedlichen Verdünnungsstufen unter Selektionsdruck ausgesät. Die Verdünnungen wurden so angesetzt, dass sich in jedem Well weniger als 10 Zellklone befanden. Die Zellen wurden für 14 Tage kultiviert und anschließend auf Vermehrung überprüft. Zellen, die sich vermehrt hatten, wurden in eine 24-Well-Platte überführt und weiter expandiert, bevor sie analysiert wurden.

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Gesamtllysaten und Proben für die Immunopräzipitation wurden die entsprechenden Zellen in 1x NP40-Lysepuffer für 30 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate bei 16.000 x g für 10 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände für Gesamtlysate wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Wurden die Lysate für die Immunopräzipitation verwendet, wurden die Überstände abgenommen und weiterverwendet (3.2.4.2).

3.2.4.2. Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden „Anti-Flag-M2-Agarose-Beads“ (Sigma-Aldrich, München) oder „Anti-GFP-Agarose-Beads“ (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet. Auf diese Weise konnten Fusionsproteine, die ein FLAG-Tag oder GFP enthielten präzipitiert werden. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. 40 µl der Anti-Flag-M2-Agarose-Beads oder 20 µl der Anti-GFP-Agarose-Beads je Ansatz wurden vorgelegt und zweimal mit je 1 ml 1x NP-40-Lysepuffer gewaschen. Die zuvor hergestellten Zelllysate (3.2.4.1) wurden zu den *Beads* hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C in 1 ml 1x NP40-Puffer in einem Über-Kopf-Schüttler (*Bibby Stuart Scientific, England*) inkubiert. Anschließend wurden die Agarose-assoziierten

Proteine durch Zentrifugation bei 2000 x g und 4 °C für 5 Minuten geerntet, dreimal in 1x NP-40 gewaschen und bei 2000 x g und 4 °C durch Zentrifugation geerntet. Im Anschluss wurden 40-50 µl 2x SDS reduzierender Probenpuffer zu jeder Probe hinzugefügt und die Proteine durch Kochen bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Zum Schluss wurden die Proben für 5 Minuten, bei Raumtemperatur und 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein Neues Eppendorf-Tube überführt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.2.4.3) und durch einen Western-Blot (3.2.4.5) detektiert.

3.2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden entweder Polyacrylamidgele verwendet, die sich aus 8-12 %-igen Trenngelen und 4 %-igen Sammelgelen mit 40 % Acrylamid-/Bisacrylamid zusammensetzten. In diesem Fall wurde als Laufpuffer SDS-Laufpuffer verwendet. Andererseits wurden „NuPAGE 4-12 % NOVEX[®] Bis-Tris Gele“ (Invitrogen, Karlsruhe), unter Benutzung von „NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer“ (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Die Auftrennung erfolgte in einer „Xcell SureLock™ Mini-Cell“-Kammer (Invitrogen, Karlsruhe). Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Polyacrylamidgel mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 80-120 V angelegt und die Proben für 2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.4.5).

3.2.4.4. Coomassie-Färbungen von SDS-Polyacrylamidgelen

Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit „Page Blue Protein staining solution“ (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers gefärbt. Die Entfärbung erfolgte solange in dH₂O bis der Hintergrund aufklarte.

3.2.4.5. Western-Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine (3.2.4.3) wurden durch das „XCell II™ Blot Module“ (Invitrogen, Karlsruhe) auf eine PVDF-Membran der Porengröße 0,45 µm (Thermo scientific, USA) transferiert. Dazu wurden die SDS-PAGE-Gele zunächst in dem entsprechenden Transferpuffer (NuPAGE bzw. Blotpuffer) für 5 Minuten equilibriert. Die PVDF-Membran wurde in 100 % Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in Transferpuffer equilibriert. Dann wurden die Proteine durch Elektroblothing bei 950 mA für 2 Stunden unter Verwendung von „NuPAGE Transferpuffer“ (Invitrogen, Karlsruhe) oder von Blotpuffer von dem SDS-Gel auf die PVDF-Membran übertragen. Im Anschluss wurde die Membran mit 1x TBST für 5 Minuten gewaschen, um Acrylamid-Reste zu entfernen.

Die PVDF-Membran, auf der sich nun die immobilisierten Proteine befanden, wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml Superblock T20 Blockingpuffer (Thermo scientific, USA) unter Schütteln geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, der in Superblock verdünnt wurde (Verdünnung: 1:2000 - 1:4000), über Nacht unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 2 x 5 Minuten in 1x TBST bei Raumtemperatur gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:30.000) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 4 x 15 Minuten mit 1 x TBST bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem „Detection reagent“ (Thermo scientific, USA). Dazu wurde der Blot für 2 Minuten in der Lösung inkubiert und anschließend auf dem „Amersham Hyperfilm ECL“ (GE Healthcare, München) exponiert. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde mit Hilfe eines Proteinmarkers bestimmt.

3.2.4.6. Durchflusszytometrie

Oberflächenfärbungen

Für FACS-Färbungen der Zelloberfläche wurden 3×10^5 Zellen pro Ansatz mit PBS gewaschen und in 100 µl 5 % FKS/PBS mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in 5 ml FACS-Tubes für 30 Minuten auf Eis gefärbt. Ungefärbte Zellen oder mit

entsprechenden Isotyp-Kontrollen gefärbte Zellen dienten in jedem Experiment als Kontrolle. Vor jeder Färbung wurden die Zellen zunächst in CD16/CD32 Mouse BD Fc Block (BD Biosciences, Heidelberg) für 30 Minuten auf Eis blockiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Antikörper in einer Konzentration von 0,2 µg/ml eingesetzt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen mit 5 % FKS/PBS gewaschen und im „FACS Calibur flow cytometer“ (BD Biosciences, Heidelberg) gemessen. Die Analyse erfolgte mit der FlowJo Software (Tree Star, Inc., USA).

Intrazelluläre Färbungen

Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen zunächst mit 4 % PFA/PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden sie mit PBS gewaschen und mit 0,2 % Triton-X-100 für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es folgte die Blockierung mit 2 % BSA bei Raumtemperatur für 30 Minuten und die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper für 1 Stunde auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zur Messung im FACS eingesetzt.

3.2.5. Funktionelle Analysen von Mastzellen

3.2.5.1. Degranulation von Mastzellen (Lamp-1 Assay)

MC9, RBL-2H3 und Mastzellen (BMMC) wurden entweder mit 10 ng/ml PMA (Phorbol 12-Myristat-13-Acetat) und 500 ng/ml Ionomycin oder mit 20 ng/ml DNP-HSA bei 37 °C stimuliert, wobei im letzteren Fall eine Vorinkubation mit 200 ng/ml anti-DNP-spezifischen IgE über Nacht bei 37 °C stattfand. Pro Ansatz wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen verwendet, in jedem Versuch dienten unstimulierte Zellen als Kontrolle.

MC9 Zellen wurden ausgezählt, mit PBS gewaschen und über Nacht in Kulturmedium, das keinen ConA-Milzüberstand enthielt, inkubiert. RBL-2H3 Zellen wurden ausgezählt, gewaschen und über Nacht in ihrem Kulturmedium inkubiert. Bei Mastzellen (BMMC) erfolgte die Inkubation über Nacht in Kulturmedium, das 1 ng/ml IL-3 enthielt. Im Falle einer Stimulation mit DNP-HSA wurden dem Kulturmedium zusätzlich 200 ng/ml anti-DNP-IgE hinzugefügt. Am folgenden Tag wurden die Zellen

geerntet und mit PBS gewaschen. Es folgte die Stimulierung mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin oder mit 20 ng/ml DNP-HSA in einem Gesamtvolumen von 200 µl bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit eiskaltem 5 % FKS/PBS gestoppt und die Zellen sofort auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C pelletiert.

Im weiteren Verlauf wurden die stimulierten Zellen zunächst mit CD16/CD32 Mouse BD Fc Block (BD Biosciences, Heidelberg) für 30 Minuten auf Eis blockiert, anschließend mit dem Degranulationsmarker Lamp-1 (eBioscience, USA) gefärbt und im FACS vermessen (3.2.4.6).

3.2.5.2. Degranulation von Mastzellen (β-Hexosaminidase Assay)

Mastzellen (BMMC) wurden mit 200 ng/ml anti-DNP spezifischen IgE über Nacht bei 37 °C vorinkubiert. Pro Versuch wurden $0,3 \times 10^6$ Zellen verwendet, wobei in jedem Versuch unstimulierte Zellen als Kontrolle dienten. Die Vorinkubation erfolgte in Kulturmedium, das mit 1 ng/ml IL-3 versetzt war. Am folgenden Tag wurden die Zellen geerntet und in Tyrodespuffer gewaschen. Anschließend folgte die Stimulierung mit 20 ng/ml DNP-HSA in 100 µl Tyrodespuffer für 15 Minuten bei 37 °C in einer 96-Well-Platte. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Zellen sofort nach der Stimulation auf Eis gelagert und bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Duplikaten in eine 96-Well-ELISA-Platte (Greiner Bio One, Frickenhausen) überführt und auf Eis gelagert. Die Zellpellets wurden in 1 % Triton/Tyrodespuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur lysiert und ebenfalls in Duplikaten in die 96-Well-ELISA-Platte überführt. Anschließend wurde der Überstand bzw. das Lysat mit dem Substrat 4-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, das in Citratpuffer gelöst war, für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Glycinpuffer gestoppt und die OD bei 405 nm gemessen.

3.2.5.3. Zytokinproduktion (ELISA)

Für den ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) wurden die passenden Zytokin-Antikörper gegen TNF-α und IL-6 (eBioscience, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurden ELISA-Platten (Greiner Bio One,

Frickenhausen) über Nacht mit 2 µg/ml Primärantikörper bei 4 °C inkubiert, anschließend dreimal mit PBS/Tween-20 gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 2 % BSA geblockt. Am folgenden Tag wurden im Falle von MC9 Zellen 1 x 10⁶ Zellen pro Ansatz mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Mastzellen (BMMC) dagegen wurden am vorhergehenden Tag mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE vorinkubiert und am folgenden Tag mit 20 ng/ml DNP-HSA stimuliert. Die Stimulierung erfolgte für 2 bzw. für 4 Stunden. In jedem Experiment dienten unstimulierte Zellen als Kontrolle. Nach Stimulierung wurden die Zellen geerntet, entsprechend in PBS verdünnt und in der präparierten ELISA-Platte in Duplikaten für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde ein Standard aufgetragen. Nach der Inkubation wurde die ELISA-Platte für 1 Stunde mit 1 µg/ml Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Meerrettich-Peroxidase-Avidin D (*horseradish peroxidase avidin D*, HRP-AV) für 30 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von der Entwicklung mit „Super Aqua Blue ELISA Substrate“ (eBioscience, USA) bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit 0,625 M Oxalsäure gestoppt und der Farbumschlag bei 405 nm gemessen.

3.2.5.4. konfokale Mikroskopie

Für die konfokale Mikroskopie wurden transfizierte RBL-2H3 oder Mastzellen (BMMC) entweder auf Glasplättchen (Roth, Karlsruhe) oder in µ-Slides VI (Ibidi, München) ausplattiert. Diese wurden zunächst, wenn der Versuch dies erforderte, mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, München) beschichtet. Dafür wurden die jeweiligen Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,2 % Triton-X-100 permeabilisiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Blockierung mit 2 % BSA für 30 Minuten bei Raumtemperatur, die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur und die folgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:2000) für 30 Minuten. Zusätzlich wurden die Zellen für 30 Minuten mit fluoreszenzmarkierten-Phalloidin und für 15 Minuten mit DAPI gefärbt. Im Anschluss folgten Waschschrte für 4 x 15 Minuten mit PBS. Auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden mit „Pro long gold antifade reagent“ (Invitrogen, Karlsruhe) auf

Objektträgern eingedeckelt und in μ -Slides gefärbte Zellen mit „ibidi Mounting Medium“ (Ibidi, München) fixiert. Die Analyse der Fluoreszenzfärbungen erfolgte durch konfokale Lasermikroskopie mit dem „Leica TCS SP5“ (Leica, Wetzlar).

Für die Färbung des Glogi-Systems wurde das „Cell Light Golgi-RFP BacMam“-System (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurden die Zellen über Nacht in dem entsprechenden „Cell Light“-Reagenz inkubiert, am folgenden Tag geerntet, mit PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert.

3.2.5.5. Statistische Analysen

Die statistische Analyse erfolgte mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-Test. Als statistisch signifikant wurden Werte ab $p < 0.05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Funktion der zytoplasmatischen Proteine RIN3 und Lyst in Mastzellen untersucht, denen eine regulatorische Funktion in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten zukommt.

4.1. RIN3

4.1.1. Die relative Expression von RIN3 in unterschiedlichen Immunzellen

Die Proteine der RIN-Familie zeichnen sich durch eine spezifische Genexpression in unterschiedlichen Säugetiergeweben aus, was auf eine gewebespezifische Funktion hindeutet. RIN1 wird stark in den Geweben des Gehirns exprimiert, wohingegen RIN2 eine erhöhte Expression in den Geweben des Herzens, der Niere und der Lunge aufweist. RIN3 wiederum wird vorzugsweise in hämatopoetischen Geweben exprimiert (Kajiho *et al.*; 2003).

Insbesondere die Analyse humaner RIN3 Mikroarray-Daten zeigte, dass humanes RIN3 hauptsächlich in den Zellen der lymphoiden Organe exprimiert wird (Abbas *et al.*; 2005). Um die immunspezifische Expression von RIN3 näher zu untersuchen, wurde die Expression von murinem RIN3 in unterschiedlichen primären Immunzellen und in verschiedenen Zelllinien untersucht. Für die Gewinnung der primären Immunzellen wurden zunächst Gesamt-Splenozyten aus C57BL/6 Mäusen isoliert und aus diesen T-Zellen und B-Zellen aufgereinigt. Sofort nach der Aufreinigung dieser Zellen wurde ihre Gesamt-RNA aus den T-Zellen, B-Zellen und Gesamt-Splenozyten extrahiert und aus dieser durch reverse Transkription cDNA generiert. Im Gegensatz dazu wurde für die Gewinnung von Makrophagen (BMDM), dendritischen Zellen (BMDC) und Mastzellen (BMMC) das Knochenmark aus C57BL/6 Mäusen isoliert und die Zellen anschließend unter definierten Kulturbedingungen differenziert. Neben primären Immunzellen wurde die RIN3 Expression auch in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dazu wurde aus Mastzellen (MC9), Fibroblasten (3T3), T-Zellen (EL4) und B-Zellen (A20) Gesamt-RNA

extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Die relative Expression der RIN3 mRNA aus den primären Zellen und den Zelllinien wurde anschließend anhand quantitativer *real-time* PCR (Taqman-Methode) in Bezug auf die HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) Expression bestimmt.

RIN3 wurde in allen untersuchten Immunzellen exprimiert. Auffallend hoch war dabei die RIN3 Expression in Mastzellen (BMMC) (Abb.4.1A). Die Expression in B-Zellen, T-Zellen, dendritischen Zellen und Splenozyten war hingegen deutlich geringer ausgeprägt. Mastzellen zeigten eine etwa 75 % höhere RIN3 Expression im Vergleich zu den anderen analysierten Zellen. Makrophagen (BMDM) wiesen die geringste RIN3 Expression unter den untersuchten primären Zellen auf. Unter den Zelllinien konnte lediglich in der Mastzelllinie MC9 eine Expression von RIN3 detektiert werden. (Abb.4.1A). In 3T3-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie), EL4-Zellen (T-Zelllinie) und A20-Zellen (B-Zelllinie) wurde keine RIN3 Expression nachgewiesen. Im Folgenden sollte die Expression von RIN2 in den gleichen primären Immunzellen und Zelllinien studiert werden, die zuvor auf ihre RIN3 Expression analysiert worden waren (Abb.4.1B). Im Gegensatz zu der Expression von RIN3, die in allen primären Zellen detektierbar war, konnte keine RIN2 Expression in murinen Mastzellen, Splenozyten, dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen oder Makrophagen festgestellt werden. In den Zelllinien zeigten nur 3T3 Zellen (Fibroblasten) eine RIN2 Expression, während in den Zelllinien MC9 (Mastzellen), EL4 (T-Zellen) und A20 (B-Zellen) RIN3 nicht exprimiert wurde (Abb.4.1B).

Insgesamt ergab die Analyse, dass RIN3 stark in Mastzellen exprimiert wird, jedoch wiesen die untersuchten primären Immunzellen keine RIN2 Expression auf. Diese zwei Proteine der RIN-Familie scheinen daher differentiell exprimiert zu werden. Aufgrund der markanten RIN3 Expression in Mastzellen wurden diese Immunzellen für die Untersuchung der biologischen Funktion von RIN3 im murinen System ausgewählt.

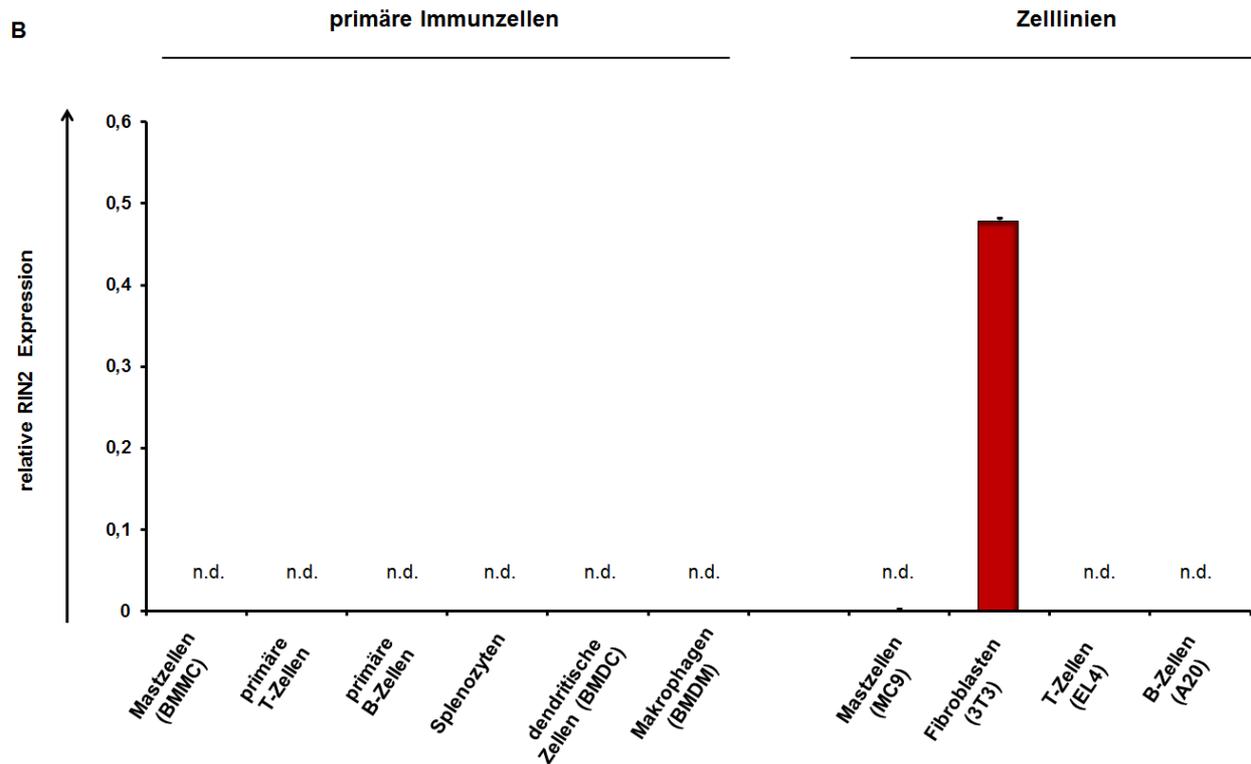
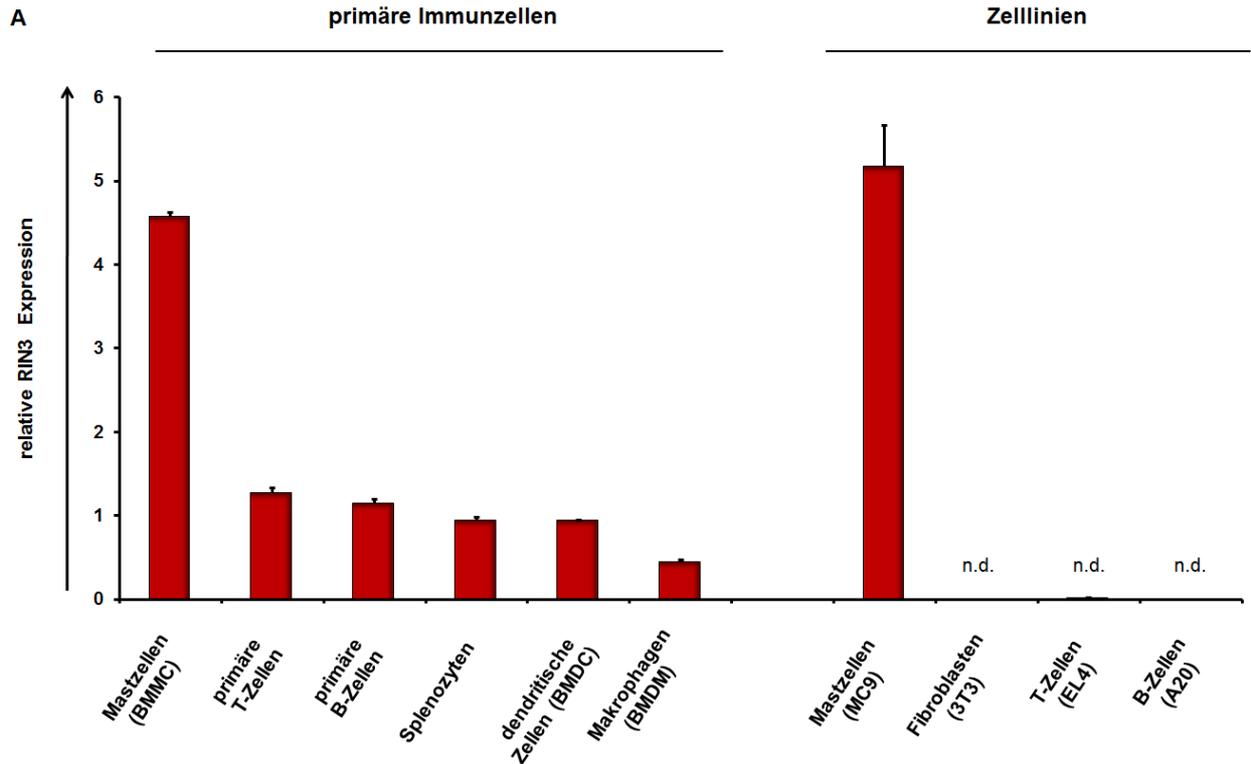


Abbildung 4.1: Die relative Genexpression von RIN3 und RIN2 in unterschiedlichen Immunzellen und Zelllinien

Quantitative real-time PCR Analyse der A) RIN3 mRNA Expression und der B) RIN2 mRNA Expression in verschiedenen Immunzellen und Zelllinien. Die relative RIN3 und RIN2 Genexpression wurde in Bezug zur HPRT Expression bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung angezeigt. n.d.: nicht detektierbar

4.1.2. Klonierung von muriner RIN3 cDNA

Aufgrund der ausgeprägten RIN3 Expression in murinen Mastzellen (BMMC) wurden diese für die Klonierung von RIN3 cDNA eingesetzt. Unter Verwendung von RIN3 spezifischen Primern konnte RIN3 cDNA in einer PCR amplifiziert werden. Das Amplifikat der murinen RIN3 cDNA zeigte ein Molekulargewicht von knapp 3 kb (Abb.4.3A). Dieses PCR-Produkt wurde sequenziert und als identisch mit einer Sequenz von 2940 bp identifiziert, die unter der Genbank-Akzessionsnummer NM_177620 für den offenen Leserahmen von murinem RIN3 angegeben ist und ein Protein aus 980 Aminosäuren codiert. Die murine RIN3 Proteinstruktur weist auf unterschiedliche funktionelle Domänen hin (Abb.4.2). N-terminal befindet sich eine SH2-Domäne (*Src homology 2*), auf die drei PR-Domänen (*prolin rich domain*) und eine RH-Domäne (*Rin homolgy domain*) folgen. An diese schließt sich eine Vps9 Domäne (*vesicular protein sorting 9, GEF*) an, auf die C-terminal eine RA (*Ras-associaten*) und eine Ubiquitin-homolge-Domäne folgen (Abb.4.2).

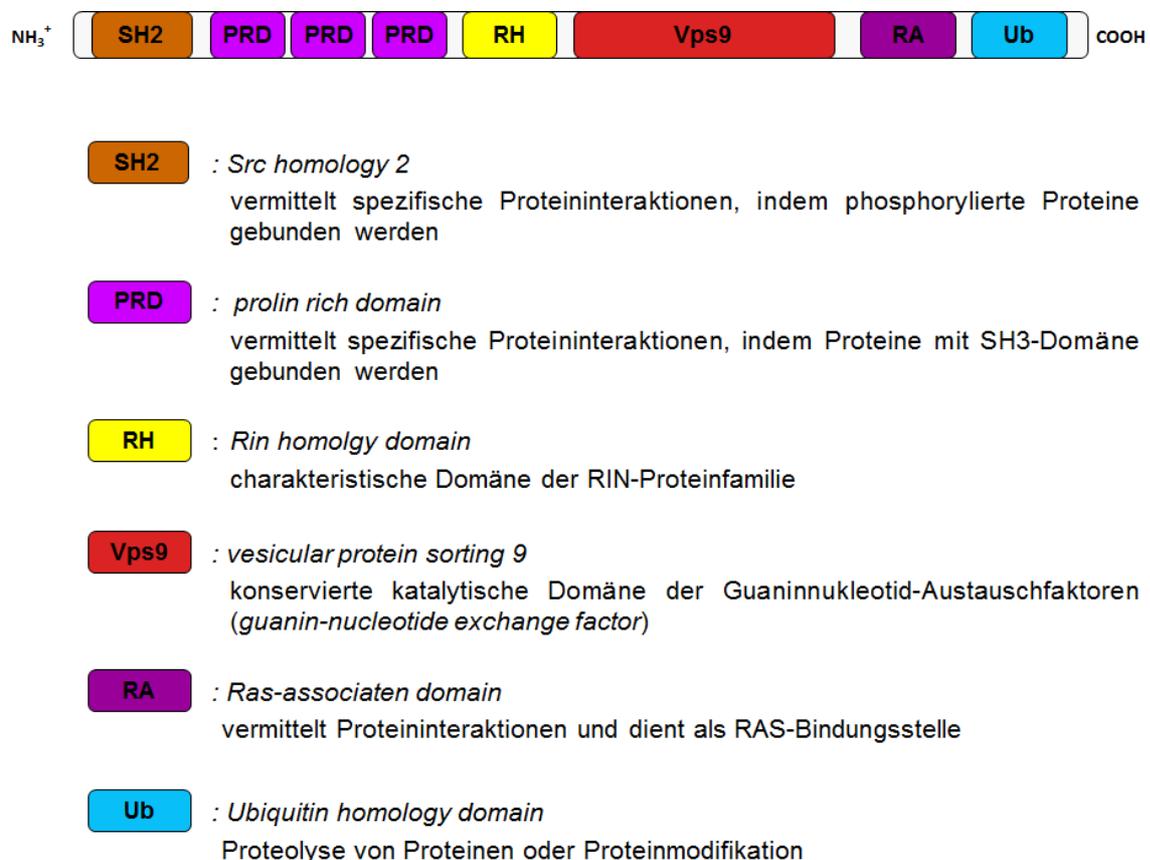
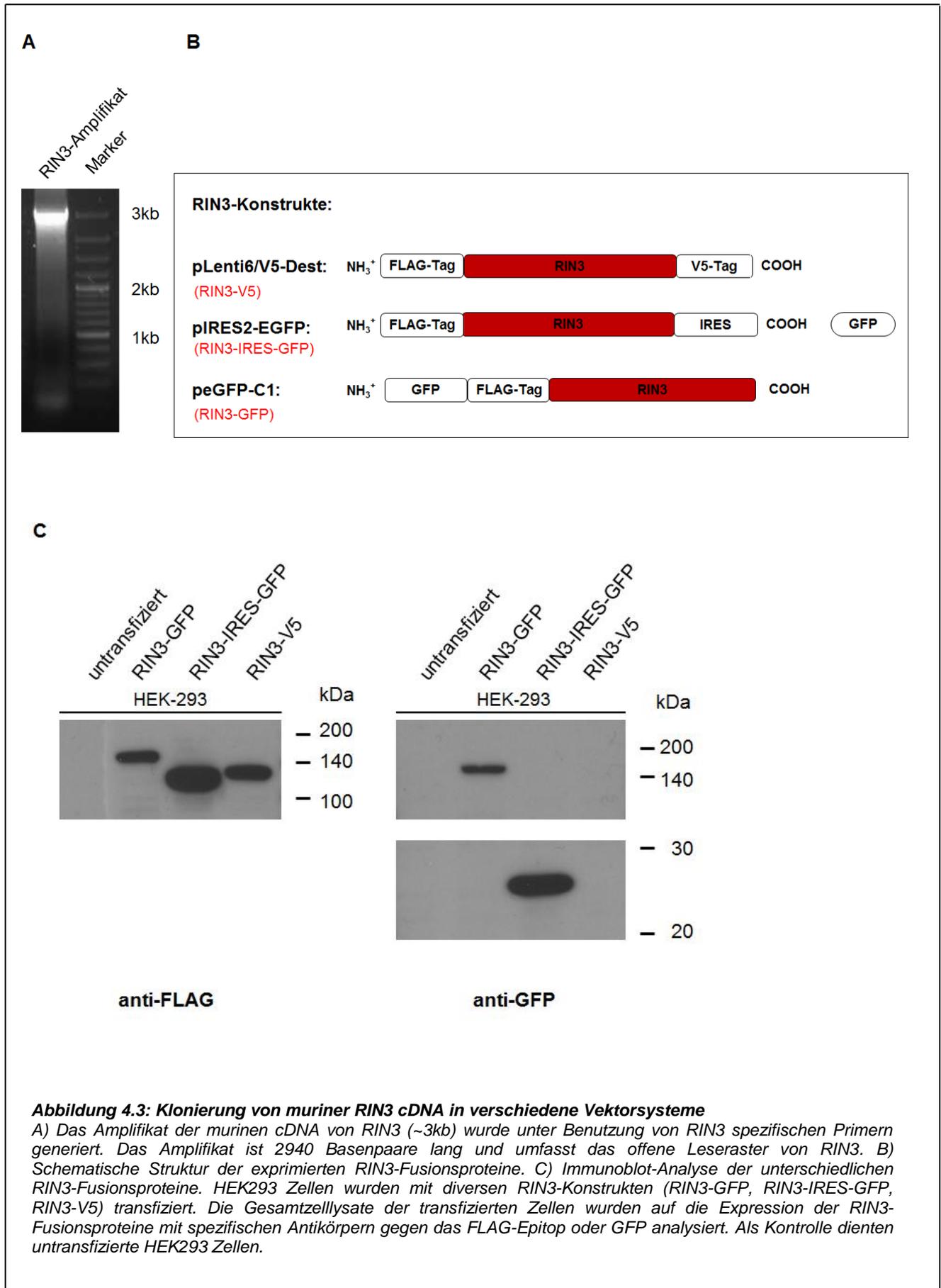


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der funktionellen RIN3 Proteindomänen

Die murine RIN3 cDNA wurde in verschiedene Vektorsysteme kloniert (Abb.4.3B). Dabei wurden unterschiedliche RIN3-Expressionskonstrukte, die ein FLAG-Epitop oder GFP enthielten, generiert, indem entsprechende Vektoren eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde ein RIN3 Expressionskonstrukt generiert, indem der bicistronische Vektor pIRES2-EGFP (Clontech) verwendet wurde. Dieser Vektor enthält eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) und erlaubt eine unabhängige Translation des RIN3-Proteins und des GFP, basierend auf einer einzelnen bicistronischen mRNA. Aufgrund dieser verwendeten Vektorsysteme konnten transfizierte Zellen anhand ihrer Epitop-Tags durch Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

Die unterschiedlichen RIN3-Konstrukte wurden in HEK293 Zellen exprimiert. Die Expression der RIN3-V5-, der RIN3-IRES-GFP oder der RIN3-GFP-Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Der Proteinnachweis auf dem Western-Blot erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das FLAG-Epitop oder GFP. Zellysate von untransfizierten HEK293 Wildtyp-Zellen zeigten, wie erwartet, weder mit dem FLAG-spezifischen Antikörper noch mit dem GFP-spezifischen Antikörper ein Signal (Abb.4.3C). Lysate von HEK293 Zellen, die mit dem RIN3-GFP Fusionsprotein transfiziert worden waren, zeigten in beiden Fällen ein Signal bei knapp 150 kDa, bei dem es sich um das Fusionsprotein aus RIN3 und GFP handelte. Die Zellysate von RIN3-IRES-GFP exprimierenden HEK293 Zellen wiesen bei der Detektion gegen das FLAG-Epitop ein Signal von etwa 120-130 kDa auf und zeigten darüber hinaus ein Signal von 25 kDa im Falle des gegen GFP gerichteten Antikörpers. Dies entspricht den Erwartungen, da in diesem Fall RIN3 zwar mit FLAG fusioniert ist, aber GFP unabhängig exprimiert wird. In Lysaten aus mit RIN3-V5 transfizierten HEK293 Zellen konnte nur ein Signal mit dem Flag-spezifischen Antikörper bei etwa 120-130 kDa detektiert werden. In allen drei Fällen wurde gezeigt, dass das murine RIN3-Protein ein Molekulargewicht von etwa 130 kDa hat (Abb.4.3C).



4.1.3. Die zelluläre Lokalisation von RIN3 in Mastzellen

Die intrazelluläre Lokalisation von RIN3 ist noch weitgehend unbekannt und sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Mastzellen untersucht werden. Zudem wurde ausgehend von vorherigen experimentellen Befunden (Kajiho *et al.*; 2003), eine potentielle Kolokalisation von RIN3 mit verschiedenen Proteinen der Rab-Familie analysiert. Dazu wurden aus Knochenmark-differenzierte Mastzellen (BMMC) transient mit dem RIN3-GFP Fusionskonstrukt transfiziert und mit Rab-spezifischen, fluoreszenzmarkierten-Antikörpern gegen Rab5, Rab4 und Rab11 gefärbt. Rab5 stellt einen frühen Endosomen-Marker dar, wohingegen Rab11 ein Marker für Recycling-Endosomen ist. Rab4 lokalisiert an späten Endosomen. Durch die Überlagerung der fluoreszierenden Signale konnte eine mögliche Kolokalisation der Proteine detektiert werden.

RIN3-GFP war größtenteils an der Plasmamembran lokalisiert und wurde in einem geringeren Ausmaß in einer diffusen Verteilung im Zytoplasma detektiert (Abb.4.4; A-C2). Zudem zeigten sich auffällige, intensiv fluoreszierende, punktuelle *dot*-Strukturen im Zytoplasma (Abb.4.4; A-C2), die meistens vereinzelt vorkamen. Das Protein Rab5 war in definierten, punktuellen Strukturen über das Zytoplasma verteilt (Abb.4.4; A3), zeigte allerdings keine Kolokalisation mit RIN3 (Abb.4.4; A1 *overlay*). Rab4 und Rab11 wiesen ein ähnliches zytoplasmatisches Verteilungsmuster auf (Abb.4.4; B-C3), aber auch in diesem Fall war keine Kolokalisation mit RIN3 detektierbar (Abb.4.4; B-C1 *overlay*).

Die stark ausgeprägte Lokalisation von RIN3 an der peripheren Membranstruktur von Mastzellen, führte zu der Fragestellung, ob RIN3 mit der Plasmamembran assoziiert sein könnte. Daher wurden die Zellen zusätzlich mit Phalloidin gefärbt. Phalloidin bindet an polymerisiertes F-Aktin (filamentäres Aktin) und kann für den Nachweis des kortikalen Aktin unter der Plasmamembran verwendet werden (Abb.4.5).

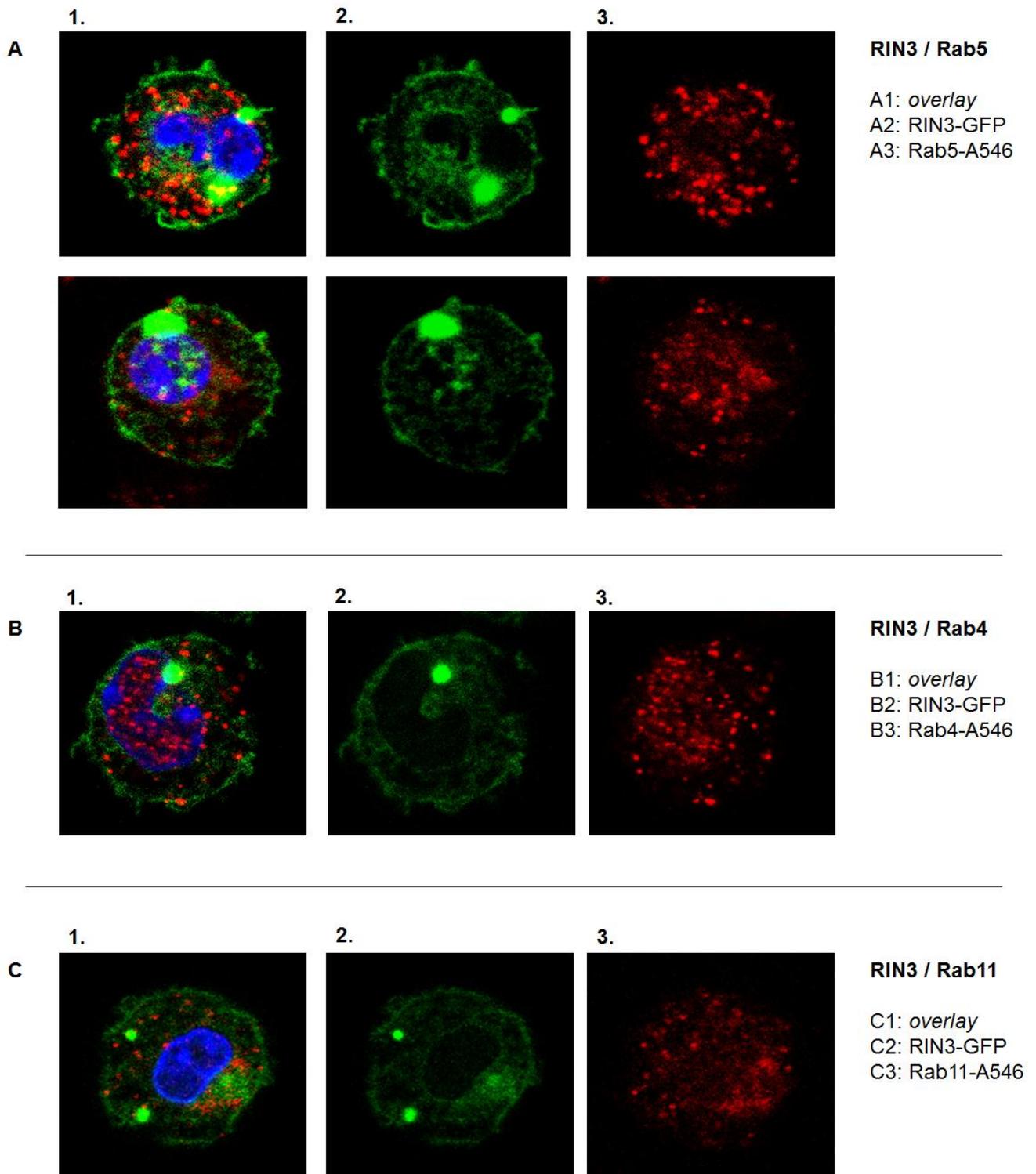


Abbildung 4.4: Keine Kolokalisation von RIN3-GFP mit Proteinen der Rab-Familie in Mastzellen

Mastzellen (BMMC) wurden mit dem RIN3-GFP-Fusionskonstrukt (A-C2: grün) transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen A) Rab5 (A3: rot), B) Rab4 (B3: rot) oder C) Rab11 (C3: rot) gefärbt. Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI (A-C1: overlay, blau) gefärbt.

Interessanterweise kolokalisierte RIN3 mit kortikalem filamentärem Aktin (F-Aktin) an der Plasmamembran von Mastzellen (BMMC) (Abb.4.5; A-B1 *overlay*). Die Kolokalisation zeigte sich entlang der gesamten Plasmamembran, wurde aber insbesondere an den Membranausstülpungen detektiert, wie die vergrößerten Ausschnitte zeigen (Abb.4.5; A-B2). Die zusätzliche Färbung mit Rab5 (Abb.4.5; B1 *overlay*) bestätigte, die vorherigen Ergebnisse und zeigte keine Kolokalisation mit RIN3.

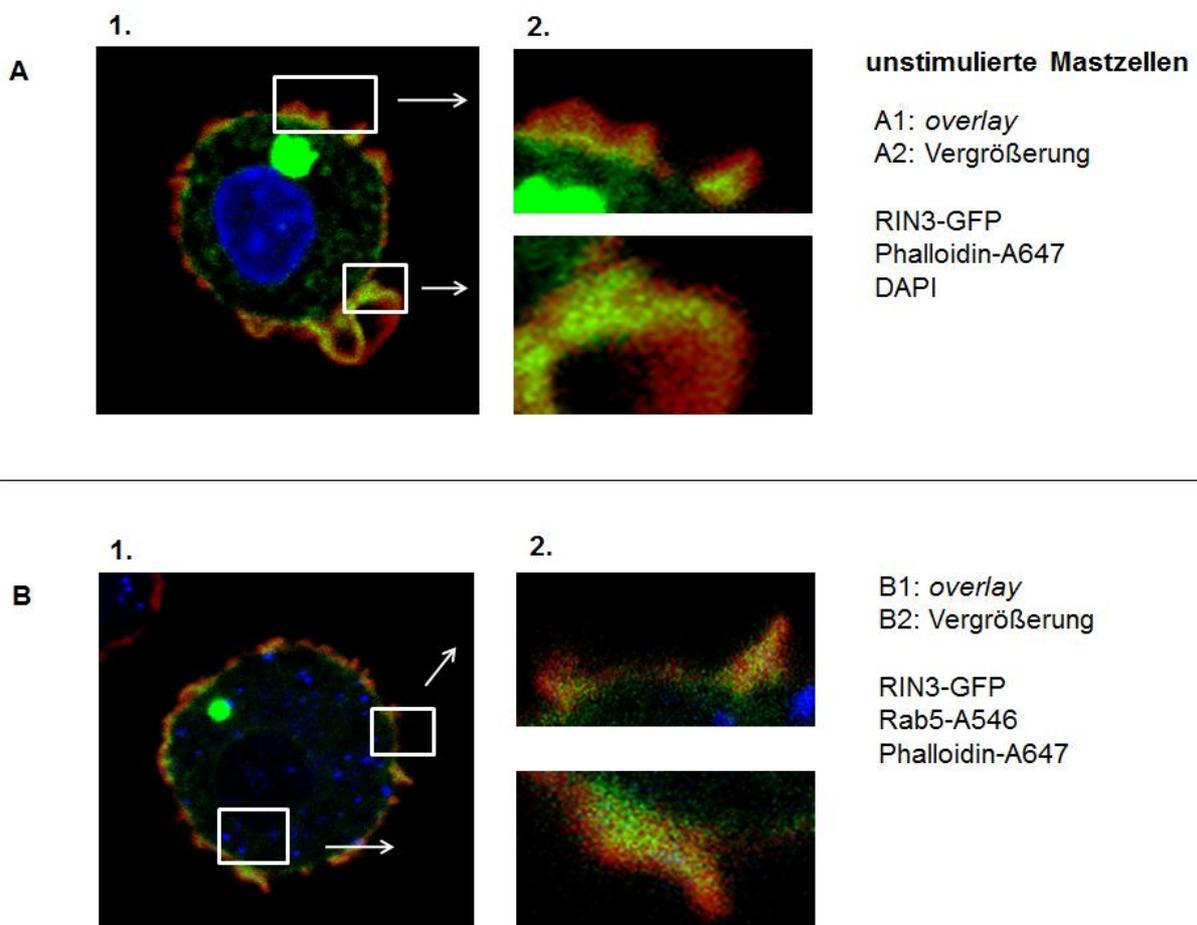


Abbildung 4.5: RIN3 kolokalisierte mit kortikalem filamentärem Aktin an der Plasmamembran

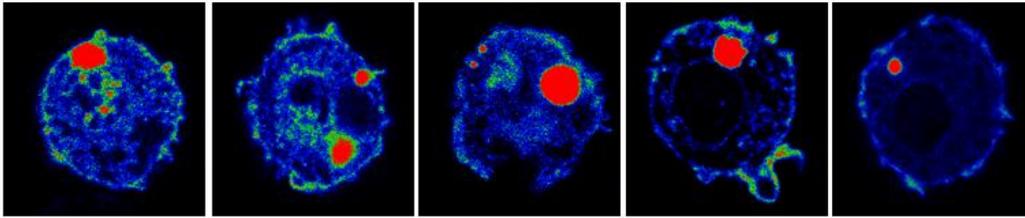
A) Unstimulierte, mit RIN3-GFP transfizierte Mastzellen wurden mit Phalloidin-A647 (rot) und DAPI (A1: *overlay*, blau) gefärbt. A2 zeigt die Vergrößerung des markierten Kastens aus A1. B) Unstimulierte, mit RIN3-GFP transfizierte Mastzellen wurden mit Phalloidin-A647 (rot) und Rab5 (B1: *overlay*, blau) gefärbt. B2 zeigt die Vergrößerung des markierten Kastens aus B1.

Die Lokalisation von RIN3 an der Plasmamembran und die Kolo­kalisierung von RIN3 mit kortikalem filamentärem Aktin, führte zu der Frage, ob sich diese Lokalisation nach Stimulierung der Zellen eventuell verändert. Daher wurden die RIN3-GFP exprimierenden Mastzellen für 10 Minuten mit PMA und Ionomycin stimuliert (Abb.4.6). Die RIN3 Lokalisation wurde vor und nach Stimulierung anhand der Fluoreszenzintensität von RIN3-GFP analysiert.

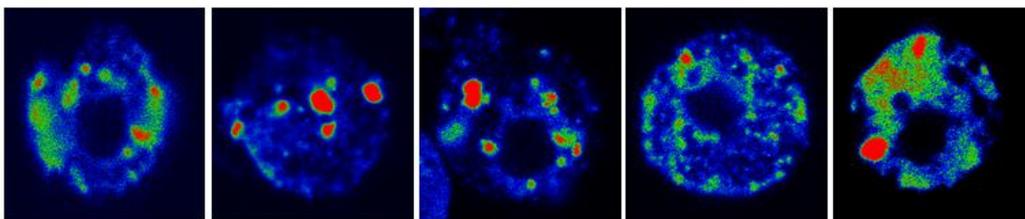
Vor der Stimulation mit PMA und Ionomycin exprimierten die Mastzellen RIN3 verstärkt an der Plasmamembran (grün) und nur zu einem geringen Teil im Zytoplasma (grün) (Abb.4.6A). Die vereinzelt vorkommenden, auffälligen RIN3 *dots* (rot), die sich im Zytoplasma befanden, ließen sich im unstimulierten Zustand ebenfalls detektieren (Abb.4.6A). Nach 10 minütiger Stimulation mit PMA und Ionomycin relokalierte RIN3 in das Zytoplasma (grün) und zeigte eine gering ausgeprägte Lokalisation an der Plasmamembran (Abb.4.6B). Die RIN3 *dots* (rot) waren auch nach Stimulation noch im Zytoplasma detektierbar, zeigten allerdings eine differenzierte Verteilung. Nach Stimulation waren die vorher vereinzelt vorkommenden *dot*-Strukturen in mehreren kleinen punktuellen Strukturen zu sehen (Abb.4.6B). Somit erfolgte durch die Stimulierung eine Relokalisation von RIN3 von der Plasmamembran in das Zytoplasma. Die Assoziation von RIN3 an die Plasmamembran schien dabei durch die Stimulierung verloren zu gehen.

Dieses veränderte Verteilungsmuster von RIN3 deutete darauf hin, dass die Kolo­kalisierung von RIN3 mit dem kortikalem filamentärem Aktin (F-Aktin) an der Plasmamembran ebenfalls beeinflusst sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden RIN3-GFP exprimierende Mastzellen für 10 Minuten mit PMA und Ionomycin stimuliert und zusätzlich mit Phalloidin gefärbt. Tatsächlich kam es in stimulierten Mastzellen zu einer Beeinträchtigung der Kolo­kalisierung von RIN3 und den kortikalen filamentären Aktinfilamenten. RIN3 kolokalierte nur noch partiell mit kortikalen filamentären Aktin (Abb.4.7; 2). Insbesondere die Kolo­kalisierung an den Membranausstülpungen war nicht mehr detektierbar. Der größte Teil des RIN3-GFP war stattdessen diffus im Zytoplasma verteilt (Abb.4.7; 1 *overlay*). Es scheint, dass es durch die Stimulierung der Zellen zu einer Relokalisation von RIN3 von der Plasmamembran in das Zytoplasma kommt und die potentielle Bindung von RIN3 mit F-Aktin verloren geht (Abb.4.7; 2).

A unstimulierte Mastzellen



B stimulierte Mastzellen

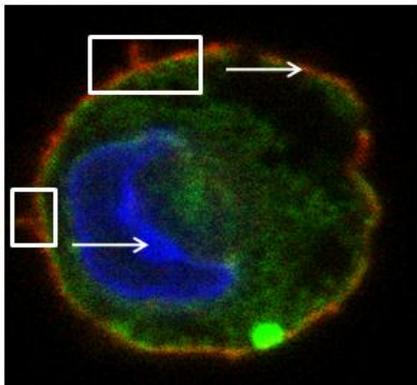


RIN3 Fluoreszenzintensität: hoch niedrig

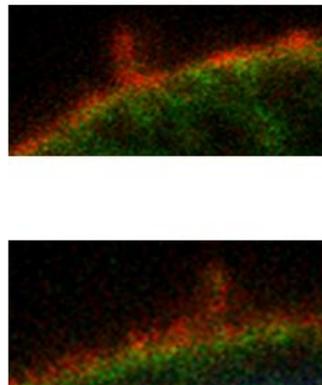
Abbildung 4.6: RIN3 relokalierte nach Stimulation von der Plasmamembran in das Zytoplasma

Mastzellen wurden mit dem RIN3-GFP-Fusionskonstrukt transfiziert. Dargestellt ist die RIN3-Fluoreszenzintensität A) vor Stimulation und B) nach 10 minütiger Stimulation mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin. Die höchste Fluoreszenzintensität wird durch die Farbe rot dargestellt, eine niedrige Fluoreszenzintensität durch die Farbe blau.

1.



2.



stimulierte Mastzellen

1: overlay
2: Vergrößerung

RIN3-GFP
Phalloidin-A647
DAPI

Abbildung 4.7: RIN3 relokalierte nach Stimulation von der Plasmamembran in das Zytoplasma und verlor die Assoziation mit kortikalem filamentärem Aktin

Mit RIN3-GFP transfizierte Mastzellen wurden für 10 min mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert und mit Phalloidin-A647 (rot) und DAPI (overlay, blau) gefärbt. Die Vergrößerung des markierten Kastens ist in 2 dargestellt.

Basierend auf den vorherigen Ergebnissen wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob die auffälligen zytoplasmatischen RIN3 *dot*-Strukturen eventuell mit einem zellulären Kompartiment kolokalisieren. Dabei könnte es sich möglicherweise um das Golgi-System handeln. Um dies zu analysieren wurden RIN3-GFP exprimierende HeLa Zellen mit Hilfe des Cell-Light-BacMam-Systems von Invitrogen (Karlsruhe) mit dem Golgi-Marker GalNAc-T2 (N-acetylgalactosaminyltransferase 2) kotransfiziert. In diesem System ist das Protein GalNAc-T2 an RFP (*red fluorescent protein*) gekoppelt und wird mit Hilfe eines Signalpeptids in das Golgi-Systems transportiert. Somit kann das Golgi-System anhand der Expression des GalNAc-T2-RFP Fusionsproteins detektiert werden.

In HeLa Zellen wurde RIN3-GFP in mehreren großen *dot*-Strukturen im Zytoplasma exprimiert (Abb.4.8). Der Golgi-Marker GalNAc-T2-RFP (rot) wurde ebenfalls in definierten, punktuellen Strukturen über das Zytoplasma verteilt detektiert. Es konnte aber keine präferentielle Kolokalisation von RIN3-GFP mit dem Golgi-System festgestellt werden.

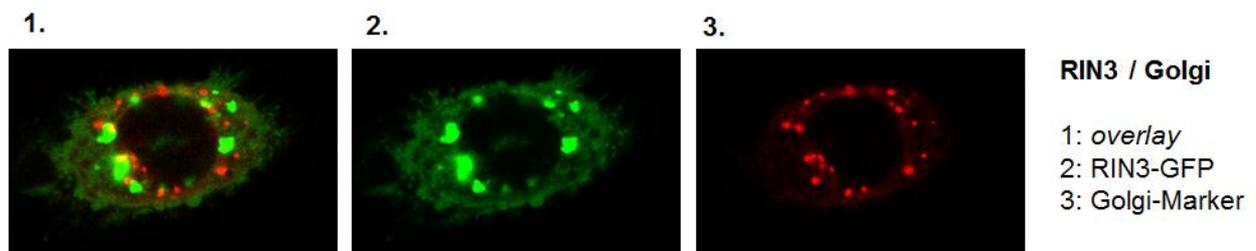


Abbildung 4.8: RIN3 kolokalisierte nicht signifikant mit dem Golgi-System

HeLa Zellen wurden mit dem RIN3-GFP-Fusionskonstrukt (2: grün) und dem Golgi-Marker GalNAc-T2-RFP (3: rot) kotransfiziert. Eine potentielle Kolokalisation wäre als gelbe Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz detektierbar (1: overlay).

Durch die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass RIN3 in Mastzellen an der Plasmamembran lokalisiert war und dort mit kortikalen filamentären Aktin kolokalisierte. Nur in einem geringem Ausmaß wurde RIN3 diffus im Zytoplasma detektiert, auffälligerweise kolokalisierte aber keines der analysierten Rab-Proteine Rab5, Rab4 oder Rab11 mit RIN3 in Mastzellen. Zudem zeigte sich ein dominanter RIN3 *dot* im Zytoplasma, dessen Bedeutung noch analysiert werden muss. Nach Stimulation verlor RIN3 seine Assoziation mit der Plasmamembran und kolokalisierte nicht mehr mit dem kortikalen filamentären Aktin, sondern relokalisierte in das Zytoplasma.

4.1.4. Etablierung eines RIN3 Gen-*knock-down* in Mastzellen durch Benutzung eines lentiviralen miRNA Vektorsystems

Um die biologische Rolle von RIN3 in murinen Mastzellen zu untersuchen, wurde ein genspezifischer *knock-down* Ansatz gewählt. Dazu wurde die RIN3 Expression unter Benutzung von RNA-Interferenz (RNAi) in diesen Zellen herunterreguliert, indem ein RIN3 spezifisches miRNA Vektorsystem verwendet wurde. Dieses lentivirale Vektorsystem gewährleistet eine effiziente und stabile Expression der RIN3 spezifischen miRNA in Mastzellen und führt zu einem RIN3 Gen-*knock-down*.

4.1.4.1. Der RIN3 Gen-*knock-down* durch miRNA

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, bei dem die Formation von homologen RNA-Duplexen aus kleinen, nicht-kodierenden RNAs und endogener mRNA zur Degradierung der endogenen mRNA führt. Dieser Mechanismus kann benutzt werden, um die eukaryotische Genexpression zu inhibieren und einen Funktionsverlust auszulösen, so dass die Effekte spezifischer Gene phänotypisch untersucht werden können. Prinzipiell lässt sich durch diese Methode die Expression jedes Gens hemmen, so dass der resultierende Phänotyp entsprechend einem spezifischen Gen zugeordnet werden kann. RNAi kann in Zellen durch unterschiedliche Strategien ausgelöst werden. Dazu gehören das Einbringen von siRNA (*short interfering RNA*) oder die Transfektion von shRNAs (*short hairpin RNA*) in eukaryotische Zellen. Für die dauerhafte Inaktivierung eines Gens ist es

notwendig, die verwendeten Plasmide, welche die Expression der entsprechenden shRNAs auslösen, stabil in das Genom der zu transfizierenden Zelle zu integrieren. Zu Beginn wurden RNA-Polymerase-III-Promotoren verwendet, um eine permanente shRNA Expression zu erzielen, in neueren Systemen werden miRNAs (*micro RNA*) unter Benutzung des RNA-Polymerase-II-Promotors verwendet, um die Expression von Vorläufer miRNAs auszulösen.

Die physiologische Funktion von RIN3 in Mastzellen wurde mithilfe eines lentiviralen miRNA Vektorsystems (BLOCK-iT Lentiviral Pol II miR RNAi expression system, Invitrogen) untersucht. Dafür wurde RIN3 spezifische miRNA generiert, um einen RIN3 *knock-down* in Mastzellen zu etablieren. Die Prozessierung von miRNAs verläuft über Primärtranskripte (pri-miRNAs), die von der Ribonuklease Drosha im Zellkern zu Haarnadelstruktur-ähnlichen pre-miRNAs prozessiert werden. Die pre-miRNAs wiederum gelangen in das Zytoplasma, wo sie von der Ribonuklease Dicer zu reifen miRNAs geschnitten und einzelsträngig in den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut werden. Es kommt zur Erkennung und Basenpaarung zwischen der miRNA und der spezifisch homologen mRNA, wodurch diese im weiteren Verlauf degradiert wird.

4.1.4.2. Die Generierung von RIN3 spezifischen miRNA Konstrukten

Vier RIN3 spezifische miRNAs wurden generiert, die sich jeweils gegen eine andere Region der murinen RIN3 mRNA Sequenz richten (Abb.4.9). Für die Auswahl der entsprechenden miRNA Sequenzen wurde die RIN3 cDNA Sequenz basierend auf der Genbank-Akzessionsnummer NM_177620 herangezogen. Zusätzlich wurde ein Kontroll-miR-Plasmid generiert, welches eine Kontroll-miRNA-Sequenz enthielt, die zwar in eine reife miRNA prozessiert wird, aber kein bekanntes Säugergen targetiert. Dieses Kontroll-Plasmid wurde als Negativkontrolle in den Experimenten verwendet. Für die Klonierung der miRNA-Konstrukte wurde das Gateway-System (Invitrogen) benutzt, in dem die entsprechenden Sequenzen durch homologe Rekombination zwischen den unterschiedlichen Vektoren ausgetauscht werden können. Im ersten Schritt wurden die RIN3 spezifischen miRNA-Kassetten in den miRNA-Expressionsvektor pcDNA6.2-GW/EGFP-miR kloniert. Im weiteren Verlauf wurden sie in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti6/V5-Dest gemäß dem Gateway-System durch

Rekombination umkloniert. Der Expressionsvektor pLenti6/V5-Dest ermöglicht eine lentivirale Transfektion. Er enthält einen CMV-Promotor, der durch die RNA-Polymerase II reguliert wird. In diesem System kommt es zur co-cistronischen Expression des EmGFPs mit der miRNA, so dass die miRNA Expression in transfizierten Zellen anhand der EmGFP-Expression verfolgt werden konnte.

Sequenzen der RIN3 spezifischen (miRIN3) und der Kontroll-miRNA

	miRIN3-1	miRIN3-2	miRIN3-3	miRIN3-4	
	617 - 637	1188 - 1208	1994 - 2014	3058 - 3078	bp
					RIN3 Gen 3863 bp
miRIN3-1:	CAT CTT CAG ACT GAT TGC GTT				
miRIN3-2:	TCA AAC CAA CCA CCC ATG AAA				
miRIN3-3:	CGA CCG CAA ACT GTA TAA GAA				
miRIN3-4:	CCA AAC GAG ACT TCC ACT TCG				
Kontroll- miRNA:	GTC TCC ACG CAG TAC ATT TCA				

Abbildung 4.9: Generierung von vier verschiedenen RIN3 spezifischen miRNAs

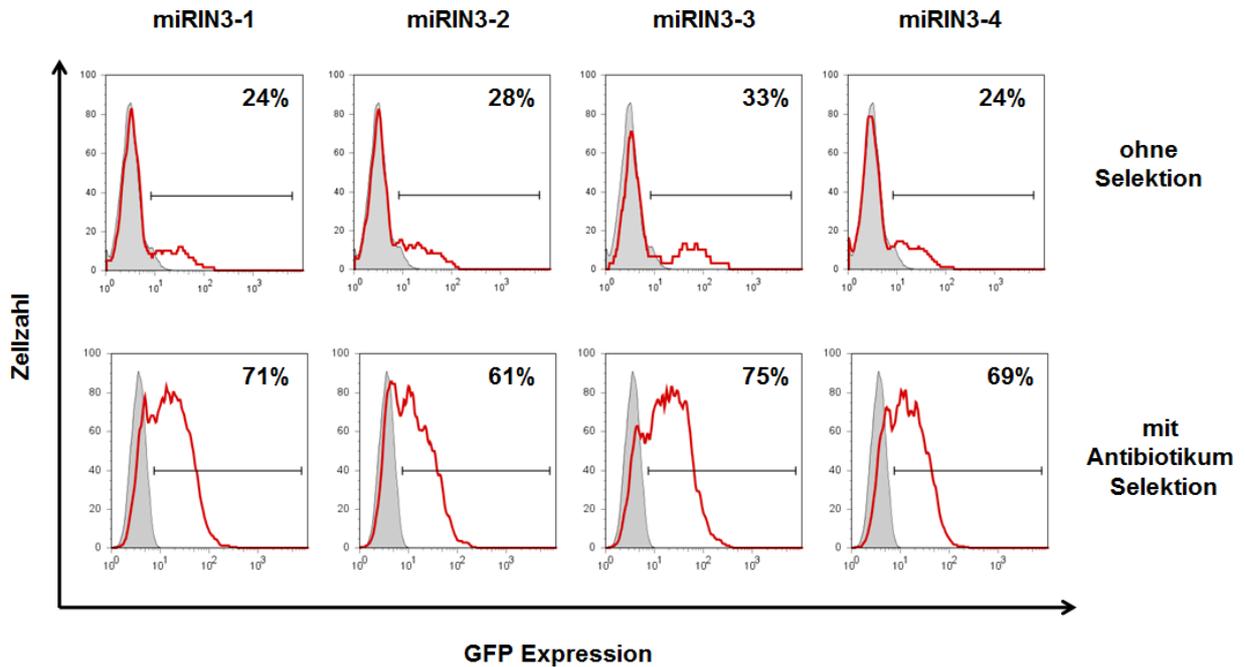
Dargestellt sind die Sequenzen, der vier verschiedenen RIN3 spezifischen miRNAs und ihre Zielregionen im RIN3-Gen, sowie die Sequenz der Kontroll-miRNA.

4.1.4.3. Die lentivirale Transfektion der RIN3 spezifischen miRNAs in MC9 Zellen

Die murine Mastzelllinie MC9 wurde mittels lentiviraler Transfektion mit dem Expressionsvektor pLenti6/V5-Dest transfiziert, der die miRNA/EmGFP-Kassetten enthielt. Die Transfektionseffizienz wurde anhand der GFP Expression nachgewiesen, da es in erfolgreich transfizierten Zellen zur Expression von GFP kommt. Im ersten Schritt wurden die Zellen transient transfiziert und zeigten bei den verschiedenen miRNA Konstrukten eine GFP Expression von 24 bis 33 % (Abb.4.10A, obere Reihe). Im weiteren Verlauf wurden die transfizierten Zellen anhand des Antibiotikums Blastocidin selektiert, so dass sich eine stabil transfizierte Pool-Population der miRNA/GFP exprimierenden MC9 Zellen anreichern konnte. Diese Pool-Population wies eine GFP Expression von 61 bis 75 % auf (Abb.4.10A, untere Reihe). Des Weiteren wurden Zellklone vereinzelt (*single clone*), indem sie von verschiedenen Zellverdünnungen ausgehend, anhand des Antibiotikums Blastocidin selektiert wurden. Im Vergleich war klar erkennbar, dass die selektierten Zellklone eine erhöhte GFP-Expression von 97 bis 100 % aufzeigten (Abb.4.10B). Sie wurden in den folgenden funktionellen Experimenten verwendet.

Die Effizienz des RIN3 *knock-down* in MC9 Zellen, die mit den verschiedenen RIN3 spezifischen miRNAs oder der Kontroll-miRNA transfiziert worden waren, wurde anhand quantitativer *real-time* PCR bestimmt. Die Analyse zeigte, dass die relative RIN3 Expression in allen miRNA transfizierten Zelllinien deutlich unter der von MC9 Wildtypzellen bzw. unter der Kontroll-miRNA lag (Abb.4.11). Die RIN3 miRNA exprimierenden Zellen zeigten eine *knock-down* Effizienz von 74 bis 89 %. Die RIN3 spezifische miRNA, die die höchste *knock-down* Effizienz herbeiführte, wurde ausgewählt und für die folgenden Transfektionen verwendet.

A Transient transfizierte MC9 Zellen



B Stabile MC9 Zelllinien

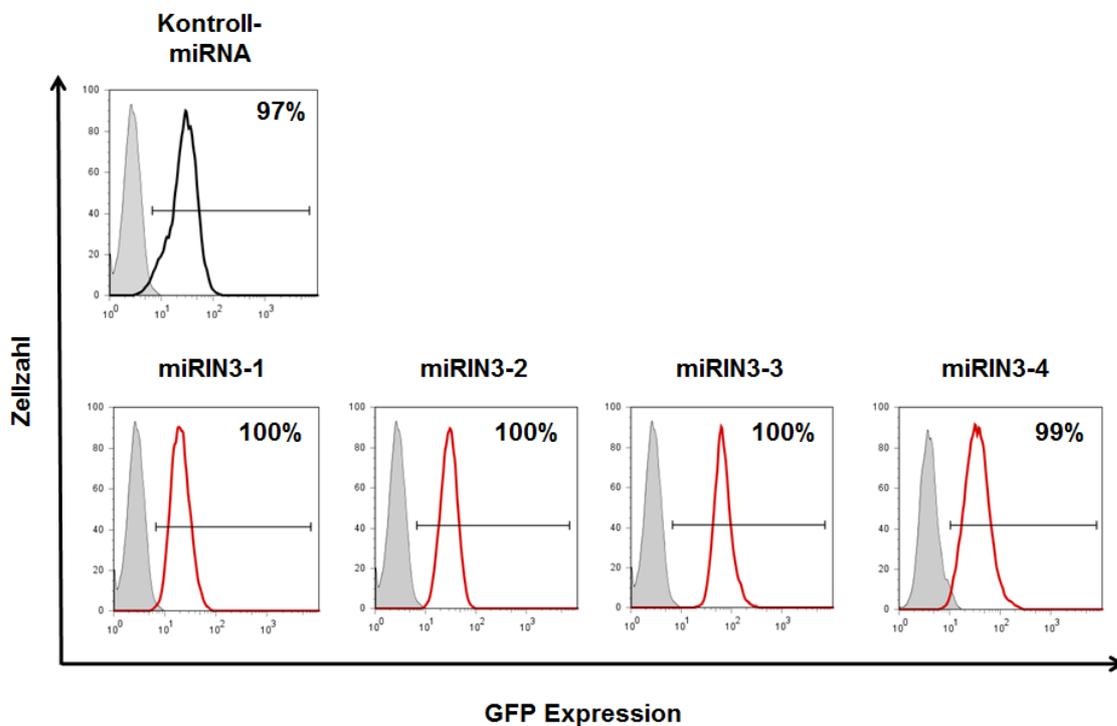


Abbildung 4.10: Transfektion von MC9 Zellen mit RIN3 miRNA Konstrukten

A) FACS-Analyse von GFP-positiven, transient transfizierten MC9 Zellen, die eine der RIN3 spezifischen miRNAs (rot) exprimierten, nach Transfektion und nach Anreicherung durch die Selektion durch das Antibiotikum Blasticidin B) FACS- Analyse von GFP-positiven, stabil transfizierten MC9 Zellen, die eine der RIN3 spezifischen miRNAs (rot) oder eine Kontroll-miRNA (schwarz) exprimierten. Nicht transfizierte MC9 Wildtypzellen dienten als Kontrolle (grau hinterlegt).

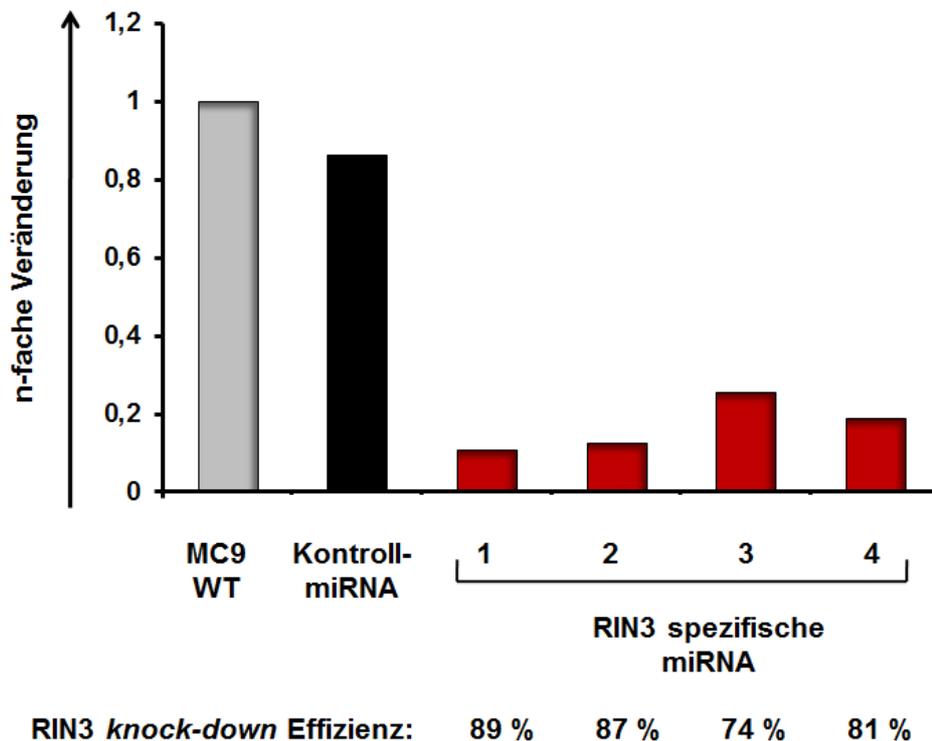


Abbildung 4.11: RIN3 knock-down Effizienz der miRIN3 transienten MC9 Zelllinien

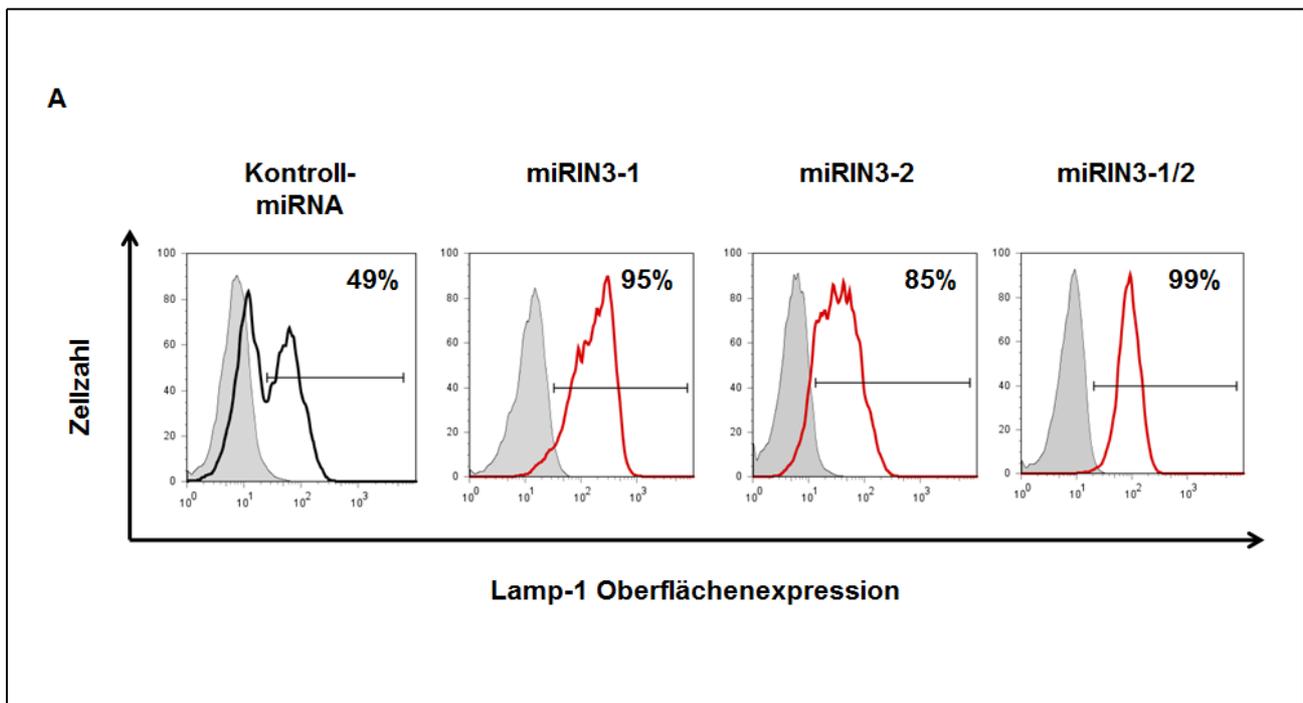
Quantitative real-time PCR Analyse zur Bestimmung der RIN3 knock-down Effizienz in MC9 Zellen. Die Analyse wurde mit stabil transfizierten MC9 Zelllinien durchgeführt, die entweder eine Kontroll-miRNA (schwarz) oder eine RIN3 spezifische miRNA (rot) exprimierten. Die knock-down Effizienz wurde anhand der Genexpression der endogenen RIN3-mRNA in MC9 Wildtypzellen (grau) bestimmt. Die RIN3 Expression wurde in Bezug zur HPRT Expression analysiert. Repräsentative Daten von 3 unabhängigen Experimenten.

4.1.5. Die Auswirkung des RIN3 knock-down auf die Degranulation von Mastzellen

Die folgenden Experimente legten ein besonderes Augenmerk auf die exozytischen Vorgänge der Degranulation von Mastzellen. Mastzellen sind gekennzeichnet durch die sekretorischen Granula, mit denen ihr Zytoplasma angereichert ist. Diese Granula enthalten eine Vielzahl unterschiedlicher, vorgefertigter Mediatoren, die aufgrund eines Stimulus durch regulierte Exozytose nach außen abgegeben werden. Diesen Prozess der Mediatorausschüttung nennt man Degranulation. Dieser Vorgang kann aufgrund der Oberflächenexpression des Proteins Lamp-1 (*lysosome-associated membrane protein 1*) an der Plasmamembran nachgewiesen werden, da Lamp-1 durch Stimulation von seiner Lage an intrazellulären lysosomalen Kompartimenten an die Plasmamembran transportiert wird (Grützkau *et al.*; 2004).

Unter Verwendung von Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) kann dieser Vorgang nachgewiesen werden.

Die mit miRIN3 bzw. der Kontroll-miRNA transfizierten MC9 Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert, deren Konzentration vorher austitriert worden war. Die Stimulation mit Ionomycin führt zu einer Mobilisierung der intrazellulären Calcium-Speicher und die Stimulierung durch PMA zu einer Aktivierung der Proteinkinase-C und der Ras-Signalwege. Interessanterweise wiesen MC9 Zellen, in denen die Expression von RIN3, durch eine stabile Expression der RIN3 spezifischen miRNA herunterreguliert war, eine erhöhte Degranulation auf, im Vergleich zu MC9 Zellen, die mit der Kontroll-miRNA transfiziert worden waren. Nach 20 minütiger Stimulation zeigten miRIN3 exprimierende Zellen eine Degranulation von 85 bis 95 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abb.4.12A). Exprimierten die MC9 Zellen zwei verschiedene RIN3 spezifische miRNAs, degranulierten sie zu 99 %. Hingegen zeigten MC9 Zellen, die die Kontroll-miRNA exprimierten, eine niedrigere Degranulation von 49 %. Der RIN3 *knock-down* in MC9 Zellen führte somit zu einer Erhöhung der Degranulation (Abb.4.12B).



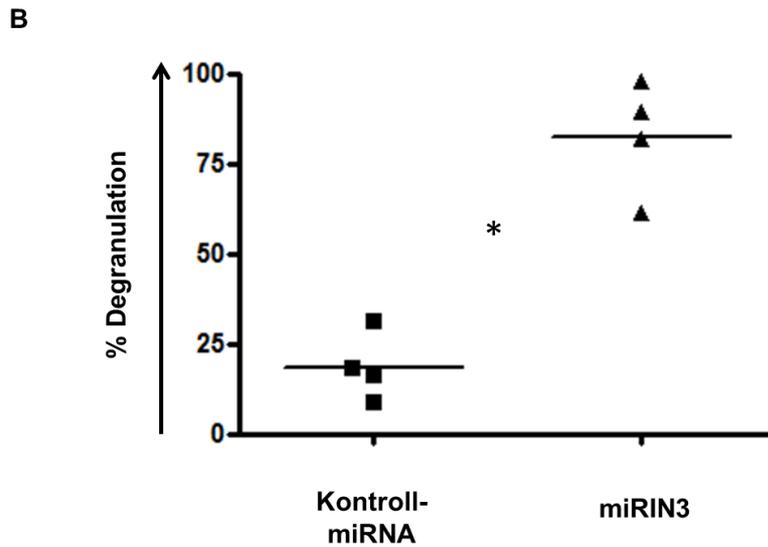


Abbildung 4.12: Die Degranulation von MC9 Zellen, die mit RIN3 spezifischen miRNAs transfiziert wurden, war erhöht

MC9 Zellen, die entweder eine Kontroll-miRNA (schwarz) oder eine RIN3 spezifische miRNA (rot) exprimierten, wurden für 20 Minuten mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert, mit einem Lamp-1 spezifischen Antikörper (Degranulationsmarker) gefärbt und im FACS analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (grau hinterlegt). B) Statistische Auswertung der Daten von 4 unabhängigen Experimenten mittels des Mann-Whitney-Test (* $p < 0.05$).

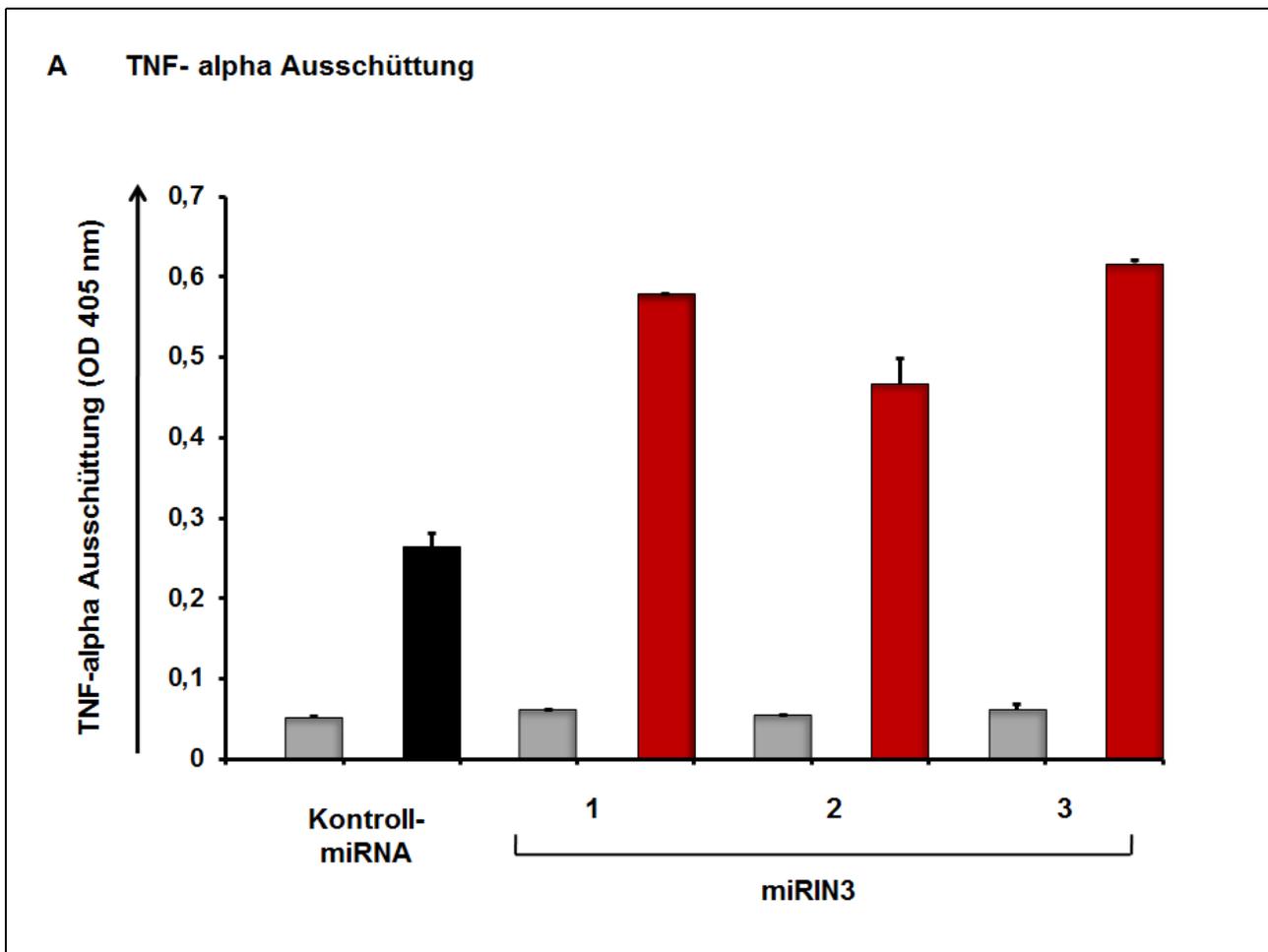
4.1.6. Die Auswirkung des RIN3 *knock-down* auf die Zytokinausschüttung von Mastzellen

Die Aktivierung von Mastzellen führt einerseits zur schnellen Exozytose der sekretorischen Granula und somit zur Degranulation und andererseits zur *de novo* Synthese von Zytokinen, Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese werden einige Minuten bis Stunden nach der Stimulierung ausgeschüttet. Zu den Zytokinen, die während der *de novo* Synthese gebildet und in das umliegende Gewebe ausgeschüttet werden, gehören TNF- α und Interleukin-6.

Basierend auf den vorher erzielten Ergebnissen, wurde anschließend der Effekt des RIN3 Gen-*knock-down* auf die Zytokinsynthese und Ausschüttung in Mastzellen untersucht. Dazu wurde die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6 in miRIN3 exprimierenden MC9 Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin durch einen

ELISA detektiert. Nach Stimulation zeigten miRIN3 exprimierende MC9 Zellen eine deutlich erhöhte TNF- α Ausschüttung, im Vergleich zu den MC9 Zellen, die die Kontroll-miRNA exprimierten (Abb.4.13A). Die TNF- α Ausschüttung war um 44 bis 58 % erhöht. Dasselbe galt für die Ausschüttung von IL-6. Nach Stimulation wurde eine erhöhte IL-6 Ausschüttung von 66 bis 79 % in miRIN3 exprimierenden MC9 Zellen detektiert (Abb.4.13B).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass ein RIN3 *knock-down* in Mastzellen, der durch die Anwendung eines RIN3 spezifischen lentiviralen miRNA Vektorsystems etabliert wurde, zu einer erhöhten Sensitivität der Degranulation und einer erhöhten Ausschüttung der *de novo* synthetisierten Zytokine TNF- α und IL-6 in Mastzellen führte.



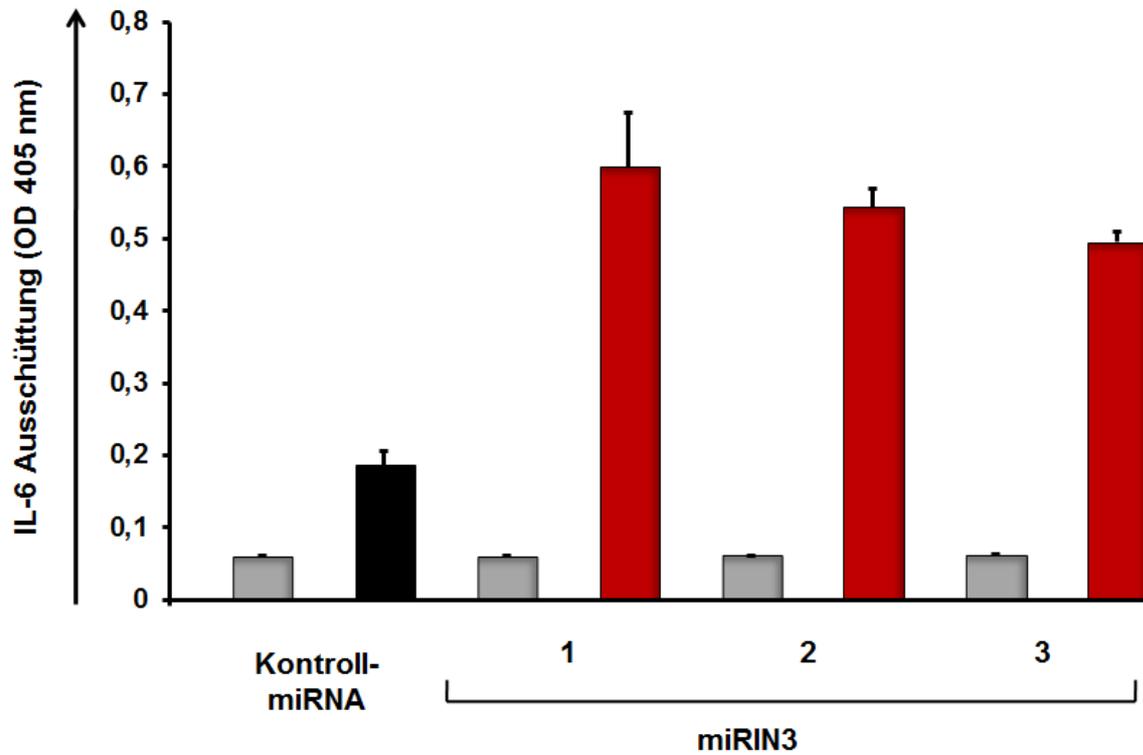
B IL-6 Ausschüttung

Abbildung 4.13: Die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6 von MC9 Zellen, die mit RIN3 spezifischen miRNAs transfiziert wurden, war nach Stimulation erhöht

A) MC9 Zellen, die entweder eine Kontroll-miRNA (schwarz) oder eine RIN3 spezifische miRNA (rot) exprimierten, wurden für 2 Stunden mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Die TNF- α Ausschüttung in das umgebende Medium wurde durch einen ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (grau). B) IL-6 Ausschüttung nach vierständiger Stimulation mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin. Repräsentative Daten von 3 unabhängigen Experimenten. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung angezeigt.

4.2. Lyst

Lyst codiert für ein zytosolisches Protein welches ubiquitär exprimiert wird, dessen exakte biologische Funktion jedoch noch weitgehend unbekannt ist. Die Mutation des *Lyst* Gens führt zu Störungen im Lysosomen-Haushalt der Zelle und ist die Ursache des Chediak–Higashi-Syndroms (CHS). Ein wichtiges charakteristisches Merkmal dieser Immunschwäche-Krankheit sind die stark vergrößerten Lysosomen diverser Immunzellen. Das entsprechende Mausmodell des Chediak-Higashi-Syndroms ist die *beige* Maus, die viele Charakteristika von CHS zeigt.

Für die Experimente wurde die mutante Mauslinie C57BL/6J-*Lyst*^{bg-J}/J (*Lyst*-mutant) und die Wildtyp-Mauslinie C57BL/6 verwendet. Die Mutation des *Lyst* Gens befindet sich im Falle der C57BL/6J-*Lyst*^{bg-J}/J Mauslinie in der WD-40 Domäne im Exon 52 und führt dazu, dass eine einzige Aminosäure (Isoleucin) nicht mehr translatiert wird. Mastzellen aus Knochenmarkskulturen (BMMC) wurden isoliert und für sieben Wochen mit IL-3 kultiviert. Peritoneale Mastzellen wurden isoliert und anschließend umgehend für die weiteren Versuche verwendet.

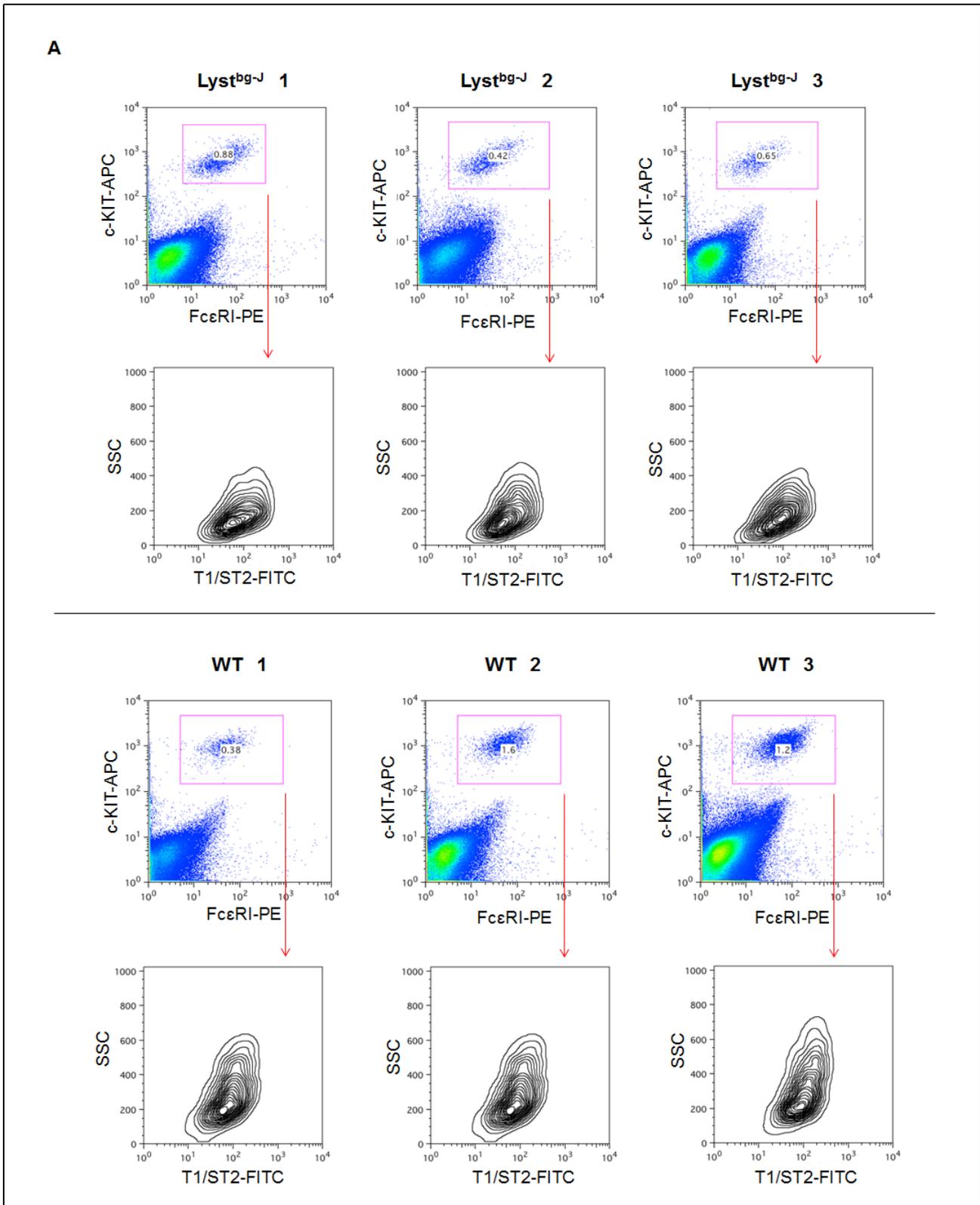
4.2.1. *Lyst*-mutante peritoneale Mastzellen weisen vergrößerte Lysosomen und eine veränderte Granularität im Vergleich zu Wildtyp Mastzellen auf

Das charakteristische Merkmal der *beige* Maus bzw. des Chediak-Higashi-Syndrom des Menschen sind die stark vergrößerten Lysosomen (Dell'Angelica *et al.*; 2000) diverser immunologischer Zellen. In einem ersten Schritt sollte daher die zentrale Frage beantwortet werden, inwiefern sich das lysosomale Kompartiment und die Granularität von peritonealen Mastzellen der verwendeten mutanten Mauslinie C57BL/6J-*Lyst*^{bg-J} im Vergleich zu Wildtyp Mastzellen unterscheiden. Daher wurden zunächst peritoneale Mastzellen von *Lyst*^{bg-J} und Wildtypmäusen isoliert und anschließend für Färbungen und die Analyse im konfokalen Mikroskop eingesetzt. Um die peritonealen Mastzellen von den anderen peritonealen Zellen zu unterscheiden, wurden die Mastzellen über den Marker c-Kit identifiziert und die c-Kit positiven Mastzellen isoliert. Für die Färbung des lysosomalen Kompartiments und der Mastzellgranula wurde der Marker Lamp-1 (*lysosome-associated membrane protein 1*) verwendet. *Lyst*-mutante (*Lyst*^{bg-J}) peritoneale Mastzellen zeigten ein

deutlich verändertes lysosomales Kompartiment im Vergleich zu Wildtyp peritonealen Mastzellen (Abb.4.14C). Im Zytoplasma der *Lyst*^{bg-J} Mastzellen waren die Lysosomen bzw. Granula deutlich vergrößert und konnten in definierten, zusammenhängenden Strukturen verteilt, detektiert werden (Abb.4.14C). Es zeigten sich intensiv gefärbte, große lysosomale-Strukturen. Wildtypzellen hingegen wiesen deutlich kleinere Lysosomen auf, die sich im gesamten Zytoplasma verteilten.

Um den auffälligen Unterschied im lysosomalen Kompartiment von *Lyst*^{bg-J} peritonealen Mastzellen mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurde die Granularität der *Lyst*^{bg-J} Mastzellen analysiert. Dazu wurden *Lyst*^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen im FACS quantifiziert. Die Eigenschaften einer Zelle werden in der Durchflusszytometrie anhand des Streulichts bestimmt. Das Vorwärtsstreulicht (FCS, *forward scatter*) hängt hauptsächlich von der Größe einer Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward-scatter*) hingegen wird von der Komplexität, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in der Zelle beeinflusst. Zeichnet sich eine Zelle durch viele granuläre Strukturen aus, besitzt sie eine hohe Granularität, was im FACS zu einem höheren Seitwärtsstreulicht führt. Somit kann anhand des SCC die Quantifizierung der Granularität erfolgen. Um die Mastzellen aus den gesamten peritonealen Zellen zu isolieren, wurden diese mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten, spezifischen Antikörpern gegen die Mastzellmarker c-Kit-APC, FcεRI-PE und T1/ST2-FITC gefärbt (Abb.4.14A). Anhand dieser Färbung wurden zunächst die c-Kit und FcεRI-positiven peritonealen Mastzellen identifiziert (Abb.4.14A *dot-plot*). Diese Subpopulation wurde dann anhand des SSC, der gegen die T1/ST2-Färbung betrachtet wurde, analysiert (Abb.4.14A *contour-plot*). Auf diese Art und Weise ließ sich die Granularität der peritonealen Mastzellen bestimmen. Dabei zeigte sich, dass sich die Granularität von *Lyst*^{bg-J} peritonealen Mastzellen im Gegensatz zu Wildtyp peritonealen Mastzellen deutlich unterschied (Abb.4.14A). Betrachtet man den durchschnittlichen SSC von *Lyst*^{bg-J} peritonealen Mastzellen aus fünf verschiedenen Mäusen, wird die unterschiedliche Granularität der *Lyst*^{bg-J} und WT peritonealen Mastzellen verdeutlicht (Abb.4.14B). Basierend auf den vorherigen Ergebnissen wurde im Anschluss die Gesamtmenge Lamp-1 von *Lyst*^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen verglichen (Abb.4.14D). Interessanterweise wiesen *Lyst*^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen keinen signifikanten Unterschied in ihrer intrazellulären Lamp-1 Expression auf und die

Gesamtmenge waren relativ vergleichbar. In Lyst-mutanten Mastzellen betrug die MFI (*mean fluorescence intensity*) 1623 und in Wildtypzellen 1815. Die Gesamtmenge Lamp-1 scheint somit in Lyst^{bg-J} nicht wesentlich verändert zu sein, obwohl sich die Granularität der Lyst^{bg-J} Mastzellen deutlich von der von Wildtyp Mastzellen unterschied.



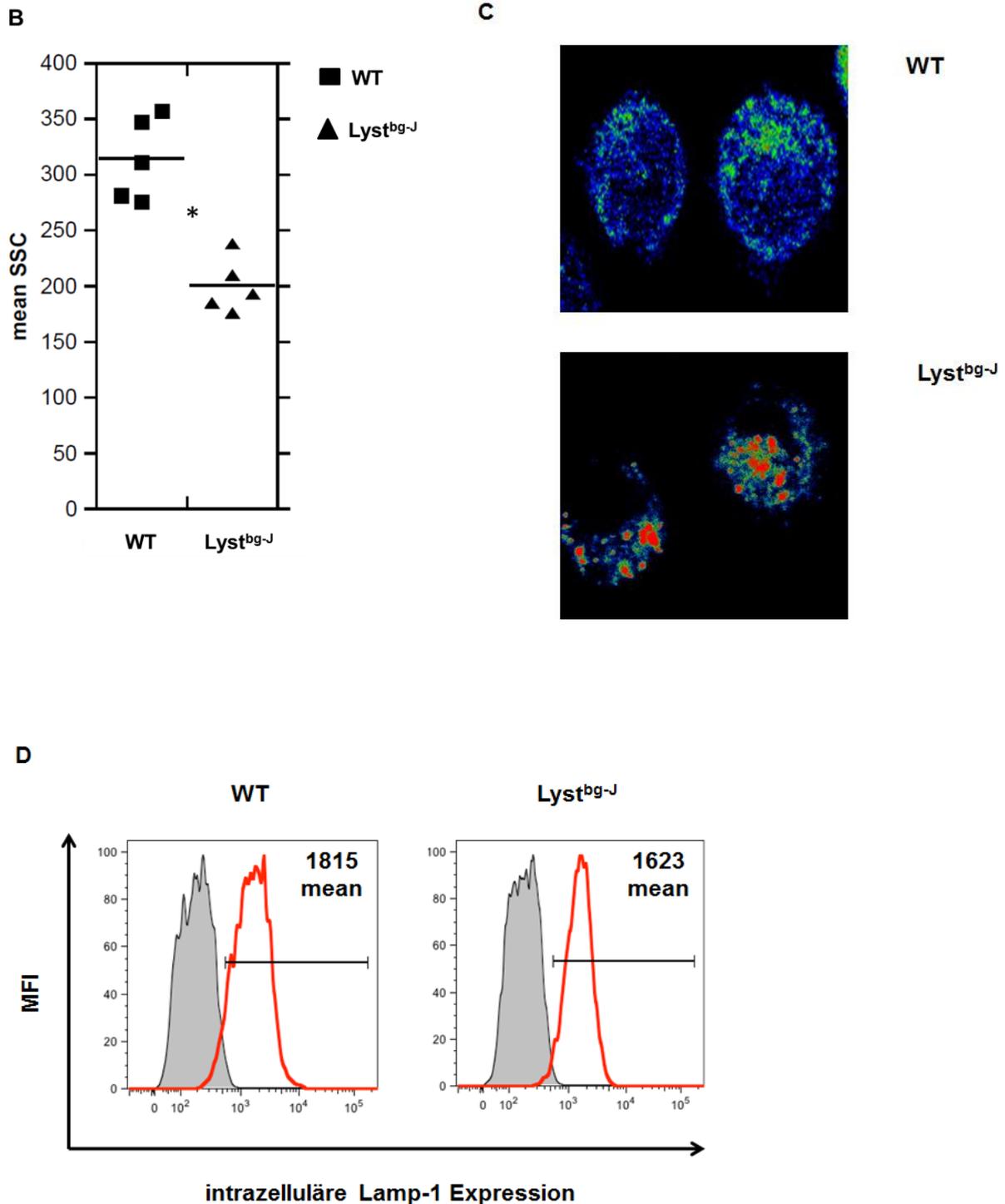


Abbildung 4.14: Lyst-mutante peritoneale Mastzellen wiesen vergrößerte Lysosomen und eine veränderte Granularität auf, wohingegen die Gesamtmenge Lamp-1 nicht verändert war

A) FACS-Analyse von Lyst^{tg-J} und Wildtyp peritonealen Mastzellen, die mit spezifischen Antikörpern gegen c-KIT-APC, FcεRI-PE und T1/ST2-FITC gefärbt wurden. B) Statistische Auswertung der Daten von 5 unabhängigen Experimenten mittels des Mann-Whitney-Test (* p < 0.05). C) Konfokale Mikroskopie von Lyst^{tg-J} und Wildtyp peritonealen Mastzellen, die mit einem spezifischen Antikörper gegen Lamp-1 gefärbt wurden. D) FACS-Analyse von Lyst^{tg-J} und Wildtyp Mastzellen (BMMC), die auf die intrazelluläre Expression von Lamp-1 analysiert wurden (rot). Dazu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Lamp-1 verwendet. Als Kontrolle dienten entsprechende Isotyp-Kontrollen (grau hinterlegt). Dargestellt ist die mean fluorescence intensity (MFI).

4.2.2. Die Expression von FcεRI und c-Kit ist in Lyst-mutanten Mastzellen nicht beeinflusst

Mastzellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche unterschiedliche Rezeptoren. Der FcεRI (*type I Fcε receptor*) und der c-Kit Rezeptor (CD117) sind dabei charakteristische Expressionsmarker von Mastzellen. Der c-Kit Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor und sein Ligand SCF (*stem cell factor*) ein essentieller Wachstumsfaktor für Mastzellen. Der FcεRI- Rezeptor hingegen ist hochaffin für IgE (*high affinity IgE receptor*) und wird dauerhaft auf der Oberfläche von Mastzellen exprimiert. An ihn bindet monomeres IgE, das im Anschluss von multivalenten Antigenen vernetzt wird, so dass es zur Quervernetzung der Rezeptoren und zu einer Aktivierung der Mastzellen kommt.

Um zu untersuchen, ob die Oberflächenexpression des FcεRI und des c-Kit Rezeptors in Lyst^{bg-J} Mastzellen (BMMC) nach ihrer Differenzierung verändert ist, wurden Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen mit FITC-markierten, spezifischen anti-FcεRI und anti-c-Kit Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Expression des FcεRI und des c-Kit Rezeptors auf (Abb.4.15). Dies ist von besonderer Bedeutung, da diese Zellen in den folgenden Experimenten FcεRI-abhängig stimuliert wurden. So konnte von Beginn an eine unterschiedliche Expression des FcεRI auf Lyst-mutanten Mastzellen ausgeschlossen werden. Dies deutet auf eine normale Entwicklung der Lyst-mutanten Mastzellen hin.

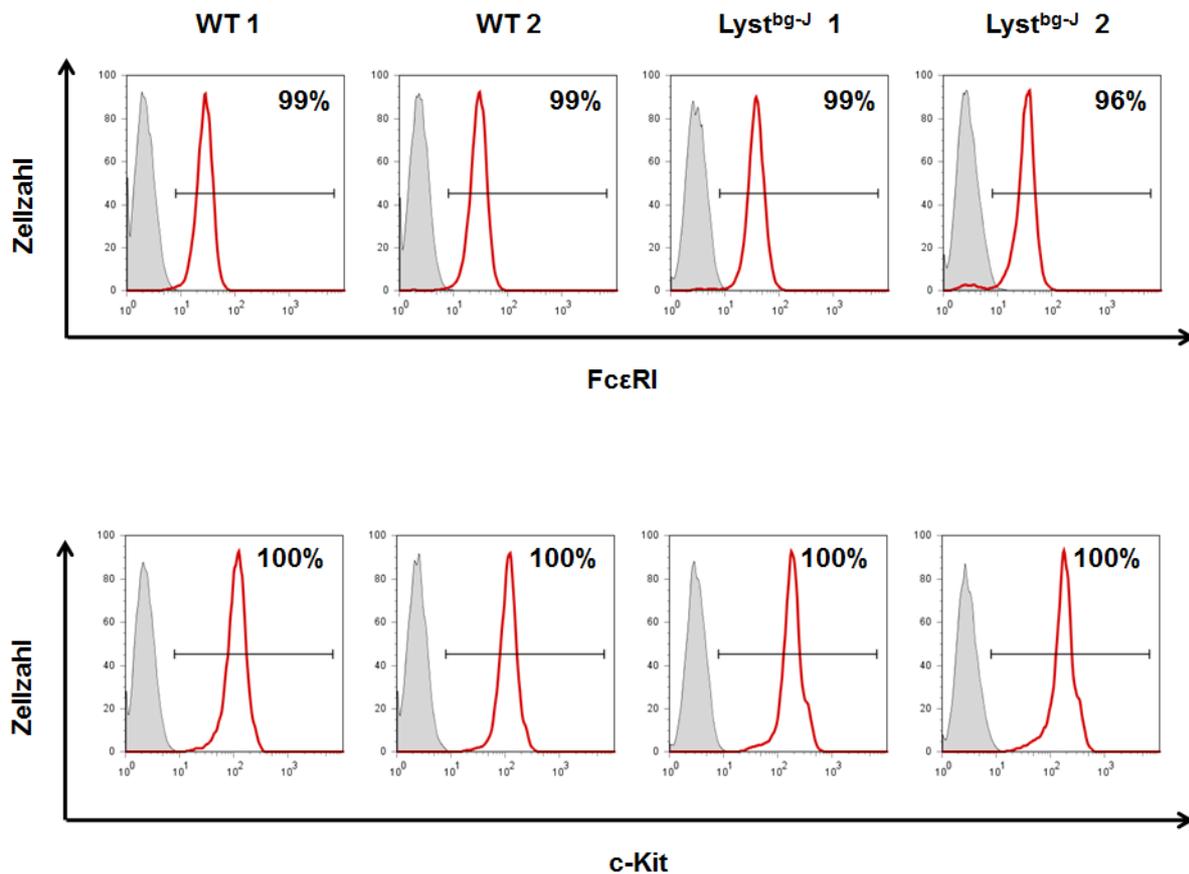


Abbildung 4.15: Die Oberflächenexpression von FcεRI und c-Kit war in Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen nicht verändert

FACS- Analyse von Lyst^{bg-J} und Wildtp Mastzellen (BMMC), die mit FITC-markierten anti-FcεRI und anti-c-Kit spezifischen Antikörpern gefärbt wurden (rot). Als Kontrolle dienten entsprechende Isotyp-Kontrollen (grau hinterlegt).

4.2.3. Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die Degranulation von Mastzellen

Das Chediak-Higashi-Syndrom des Menschen zeichnet sich unter anderem durch wiederkehrende Infektionen aus, die auf die Falschsortierung sekretorischer Granula-Proteine und eine gestörte Leukozyten-Exozytose zurückzuführen sind. Im Folgenden wurde untersucht, welche funktionelle Relevanz sich aus den vergrößerten Lysosomen und der veränderten Granularität der Lyst^{bg-J} Mastzellen ergibt. Besonderes Interesse galt dabei der Frage, ob die Lyst-Mutation Auswirkungen auf die exozytotischen Vorgänge der Degranulation dieser Mastzellen hat.

Mutierte $Lyst^{bg-J}$ und Wildtyp Mastzellen (BMBC) wurden $Fc\epsilon RI$ -abhängig stimuliert und die Degranulation wurde anhand des Degranulationsmarker Lamp-1 analysiert. Dazu wurden sie über Nacht mit anti-DNP-spezifischem IgE sensibilisiert und am folgenden Tag mit dem HSA-gekoppelten-Antigen DNP (DNP-HSA) für 15 Minuten stimuliert. Nach der Antigen-Stimulation zeigten die Wildtyp Mastzellen eine Degranulation von bis zu 85 %. Die $Lyst^{bg-J}$ Mastzellen degranulierten lediglich zu 44 bis 48 % (Abb.4.16A). Es wurden jeweils zwei Wildtyp und zwei $Lyst^{bg-J}$ Chargen analysiert und die verringerte Degranulation wurde bei beiden $Lyst^{bg-J}$ Chargen beobachtet. Die Defizienz von $Lyst$ führt in murinen Mastzellen somit zu einer deutlich verringerten Degranulation (Abb.4.16B).

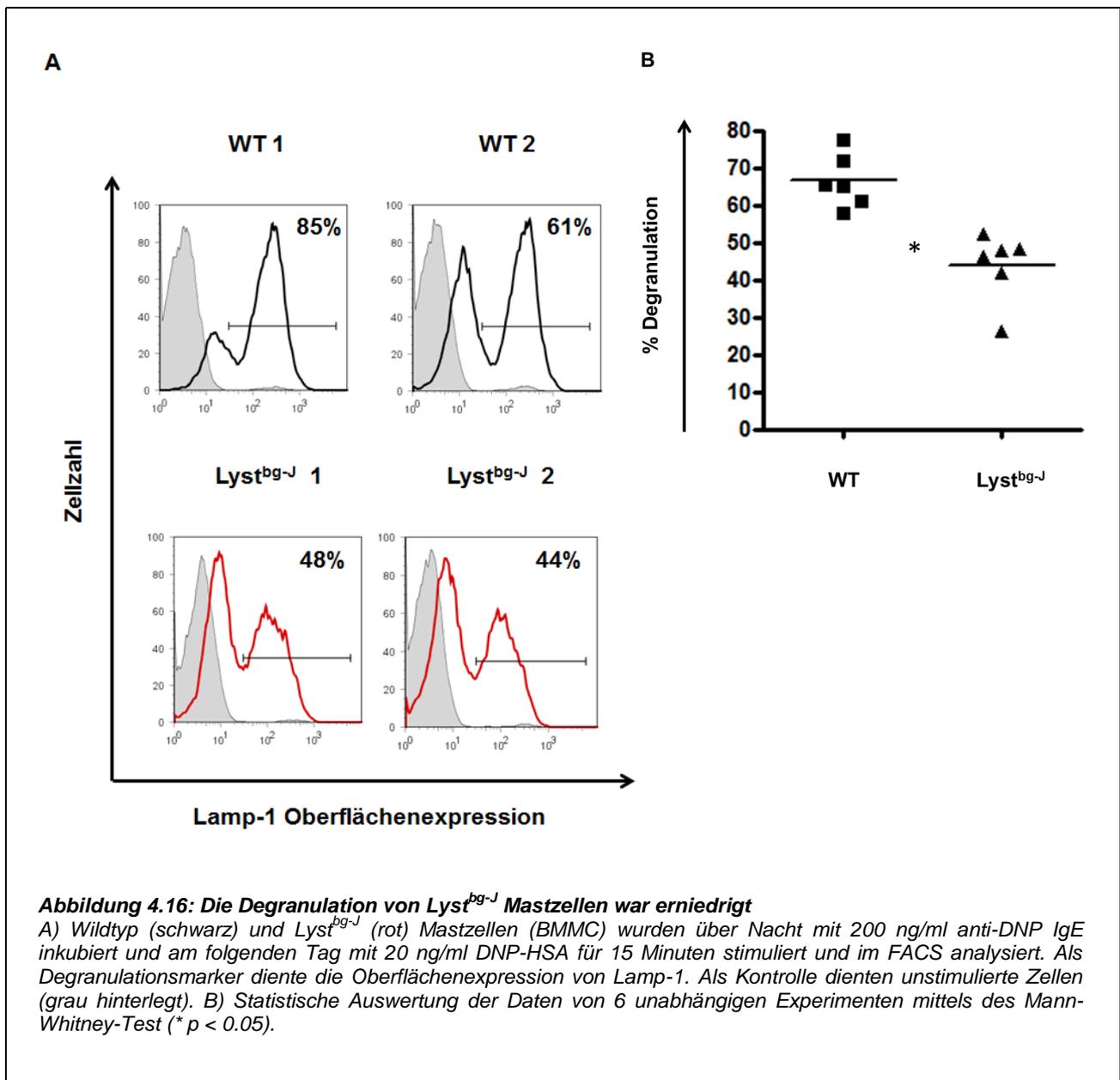


Abbildung 4.16: Die Degranulation von $Lyst^{bg-J}$ Mastzellen war erniedrigt

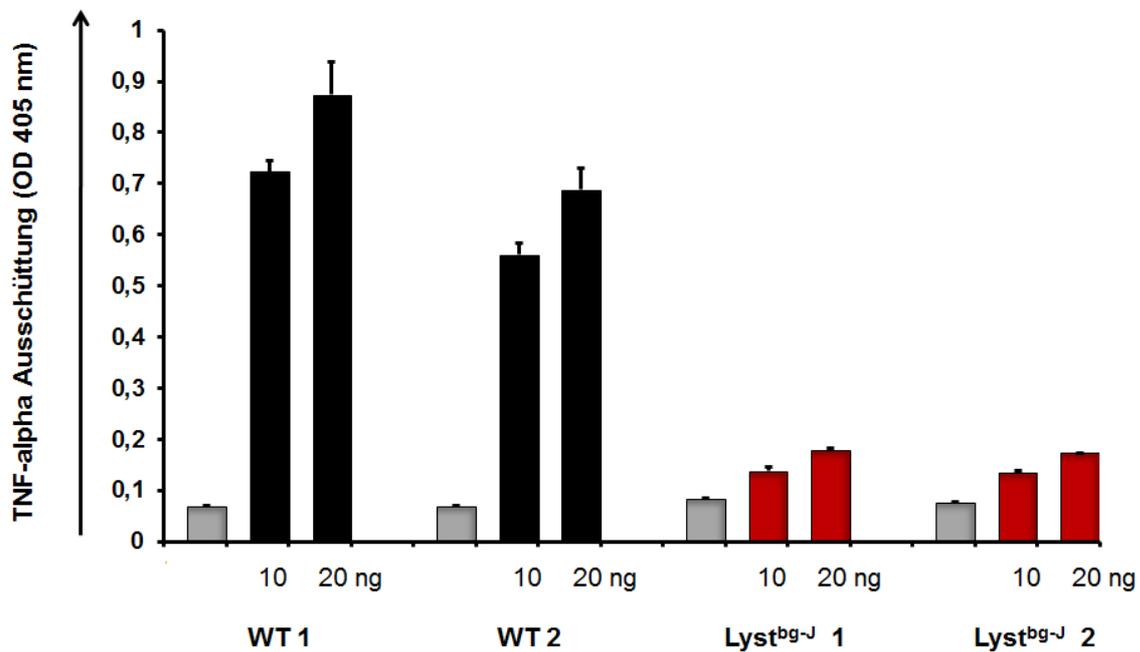
A) Wildtyp (schwarz) und $Lyst^{bg-J}$ (rot) Mastzellen (BMBC) wurden über Nacht mit 200 ng/ml anti-DNP IgE inkubiert und am folgenden Tag mit 20 ng/ml DNP-HSA für 15 Minuten stimuliert und im FACS analysiert. Als Degranulationsmarker diente die Oberflächenexpression von Lamp-1. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen (grau hinterlegt). B) Statistische Auswertung der Daten von 6 unabhängigen Experimenten mittels des Mann-Whitney-Test (* $p < 0.05$).

4.2.4. Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die Zytokinausschüttung von Mastzellen

Die erniedrigte Degranulation der Lyst-mutanten Mastzellen (BMMC) ließ vermuten, dass die FcεRI-abhängige Ausschüttung der *de novo* synthetisierten Zytokine TNF-alpha und IL-6 ebenfalls beeinträchtigt sein könnte. Neben den vorgefertigten Mediatoren, die innerhalb von Sekunden aufgrund eines Stimulus aus den sekretorischen Granula der Mastzellen degranuliert werden, spielen diese neusynthetisierten Mediatoren, die zu einem späteren Zeitpunkt exozytiert werden, eine weitere wichtige Rolle für die Mastzellfunktion.

Wildtyp und Lyst^{bg-J} Mastzellen (BMMC) wurden über Nacht mit DNP-spezifischem IgE beladen, um am folgenden Tag die Ausschüttung der Zytokine TNF-α und IL-6 nach Stimulation mit dem Antigen DNP-HSA zu analysieren. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines ELISA, womit der Zytokingehalt im Medium nach der Degranulation bestimmt wurde. Die Lyst-mutanten Lyst^{bg-J} Mastzellen wiesen nach Stimulation mit DNP-HSA eine deutlich reduzierte TNF-alpha-Ausschüttung auf, im Vergleich zu Wildtypzellen (Abb.4.17A). Dies galt sowohl für die Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml DNP-HSA, als auch für die Stimulation mit 20 ng/ml DNP-HSA. Die Reduktion der TNF-α Ausschüttung betrug dabei etwa 75 bis 80 %. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Ausschüttung von IL-6 gezeigt werden. Nach Stimulation mit 10 ng/ml DNP-HSA war die IL-6-Ausschüttung von Lyst^{bg-J} Mastzellen im Vergleich zu der von Wildtypzellen um etwa 61 bis 69 % reduziert (Abb.4.17B). Für den Versuch wurden jeweils Mastzellen von zwei Wildtyp und zwei Lyst^{bg-J} Mäuse analysiert. Die Reduktion der Zytokinausschüttung wurde dabei in den Mastzellen beider Lyst-mutanter Mäuse beobachtet.

A TNF- alpha Ausschüttung



B IL-6 Ausschüttung

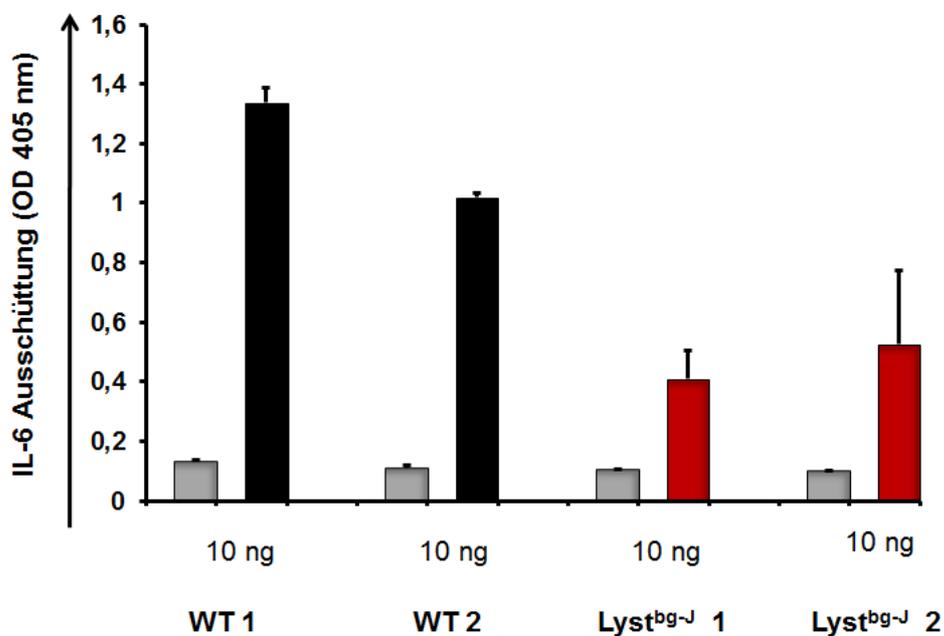


Abbildung 4.17: Die Zytokinausschüttung von *Lyst^{bg-J}* Mastzellen war erniedrigt

A) Wildtyp (schwarz) und *Lyst^{bg-J}* (rot) Mastzellen (BMMC) wurden über Nacht mit 200 ng/ml anti-DNP IgE inkubiert und am folgendem Tag mit 10 bzw. 20 ng/ml DNP-HSA für 4 Stunden stimuliert. Die TNF- α Ausschüttung in das umgebende Medium wurde durch einen ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen (grau). B) IL-6 Ausschüttung nach vierstündiger Stimulation mit 10 ng/ml DNP-HSA. Repräsentative Daten von 3 unabhängigen Experimenten (TNF- α) bzw. von 2 unabhängigen Experimenten (IL-6). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

4.2.5. Die Auswirkung der Lyst-Mutation auf die FcεRI-abhängige Signalweiterleitung

Die Antigen-induzierte Aggregation des FcεRI auf Mastzellen führt zu einer zellulären Signalweitergabe, in deren Verlauf diverse Proteine durch Phosphorylierung aktiviert werden. Zunächst kommt es durch die Vernetzung des FcεRI zur Aktivierung der Kinase Lyn, welche die ITAMs der γ-Untereinheit des FcεRI phosphoryliert und des Weiteren die Kinase Syk aktiviert. Nachfolgend phosphorylieren Lyn und Syk diverse Adapterproteine und Enzyme. Es kommt zur Signalweiterleitung in deren Verlauf es zur Aktivierung der PLC-γ (*phospholipase C gama*), der PKC (*protein kinase C*), der MAPK-Kaskade (*mitogen-activated protein kinase*) und zur Geninduktion kommt.

Zur Analyse der zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege, die durch die FcεRI-abhängige Stimulierung aktiviert werden, wurde beispielhaft die Phosphorylierung der Proteine p90RSK (90 kDa), Akt (60 kDa), p44 (ERK1; 44 kDa) p42 (ERK2; 42 kDa) und S6-RP (32 kDa) detektiert. Dazu wurde das „PathScan® Multiplex Western Cocktail Kit“ verwendet, mit dem die Phosphorylierung dieser Proteine simultan detektiert werden kann. Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen (BMMC) wurden über Nacht mit anti-DNP-IgE inkubiert und am folgenden Tag für 5 bzw. 15 Minuten mit DNP-HSA stimuliert. Im Anschluss wurden die Gesamtzelllysate über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Nach fünf bzw. fünfzehnminütiger Induktion der Phosphorylierung nach Antigen-Stimulation, wiesen die Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen jedoch keinen wesentlichen Unterschied in der Aktivierung der Proteine p90RSK, Akt, p44/p42 (ERK) und S6-RP auf (Abb.4.18A). Im Falle von p90RSK wiesen auch die unstimulierten Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen eine Aktivierung auf, die nach fünf- bzw. fünfzehnminütiger Stimulation konstant blieb. Nach fünfminütiger Stimulation konnte die Phosphorylierung von Akt sichtbar gemacht werden, die sich nach fünfzehnminütiger Stimulation kaum erhöhte. Dies galt gleichermaßen für Lyst^{bg-J}, als auch für Wildtyp Mastzellen. Im Falle von p44/p42 (ERK) zeigten die unstimulierten Zellen ebenfalls eine Grundaktivierung, die sich nach fünf bzw. fünfzehnminütiger Stimulation in Lyst^{bg-J} und Wildtypzellen jedoch gleichermaßen erhöhte. Im Falle des ribosomalen Proteins S6-RP zeigte sich keine Aktivierung nach Stimulation in Lyst^{bg-J} oder Wildtyp

Mastzellen. Um zu gewährleisten, dass stets gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurden die Zelllysate zusätzlich auf Gesamt-Erk-Protein analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Proben eine vergleichbare Gesamtmenge Erk vorhanden war (Abb.4.18B). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die untersuchten FcεRI-abhängigen Signale in Lyst-mutanten Mastzellen keinen nachweisbaren Unterschied zu denen in Wildtyp Mastzellen aufwiesen.

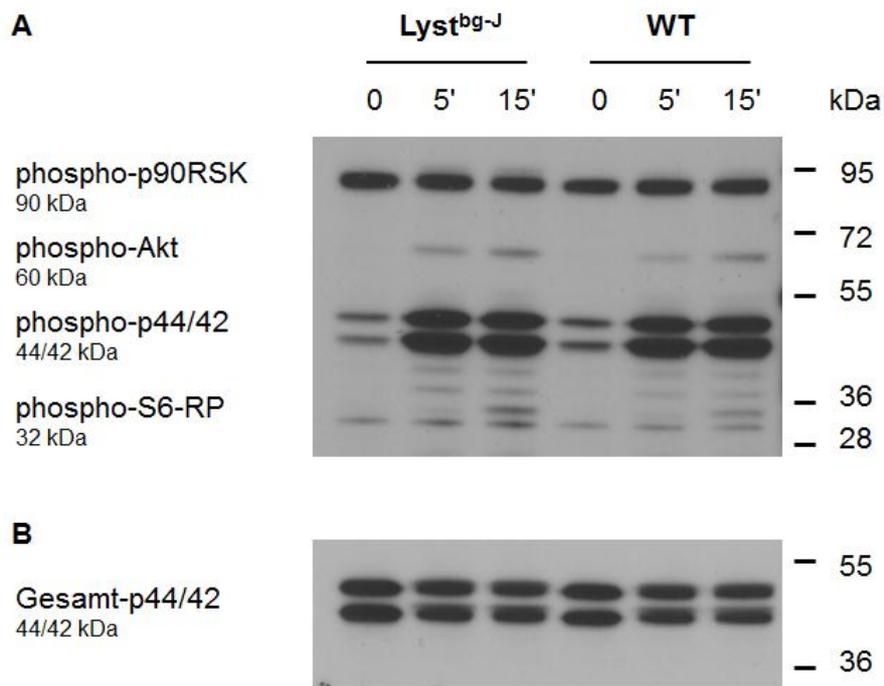


Abbildung 4.18: Die Aktivierung der FcεRI-abhängigen Signalkaskade in Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen wies keinen detektierbaren Unterschied auf
Lyst^{bg-J} und Wildtyp Mastzellen (BMMC) wurden über Nacht mit 200 ng/ml anti-DNP-IgE inkubiert und am folgenden Tag mit 20 ng/ml DNP-HSA für 5 bzw. 15 Minuten stimuliert. A) Die Gesamtzelllysate wurden durch Western-Blot mit Hilfe des PathScan® Multiplex Western Cocktail I oder B) mit einem spezifischen Antikörper gegen ERK (p44/42) des MAPK Family Antibody Sampler Kit analysiert. (0': unstimuliert; 5': fünfminütige Stimulation; 15': fünfzehnminütige Stimulation)

Die vorliegenden funktionellen *in vitro* Studien zeigten eine deutlich beeinträchtigte Degranulation in Lyst-mutanten Mastzellen (BMMC). Die Sensitivität der Degranulation und die Ausschüttung der Zytokine TNF-α und IL-6 war in Lyst-mutanten Mastzellen vermindert. Die FcεRI-abhängige Aktivierung der Proteine p90RSK, Akt, p44/p42 und S6-RP zeigte hingegen keinen nachweisbaren Unterschied zwischen Lyst-mutanten und Wildtyp Mastzellen.

5. Diskussion

Die Degranulation von Mastzellen ist eine hochsensible Reaktion auf verschiedenste physiologische und pathologische Stimuli, die durch Freisetzung einer Vielzahl biologisch-aktiver Substanzen gekennzeichnet ist. Die freigesetzten Mediatoren lösen innerhalb von Sekunden bis Minuten allergische Reaktionen aus, wie etwa allergische Rhinitis, allergisches Asthma oder auch einen anaphylaktischen Schock. Unentbehrlich für die Mastzelldegranulation ist hierbei eine gezielte Umorganisation der Mastzellgranula, die an Membranfusions- und Membrantransportprozesse beteiligt sind, welche bislang nur unzureichend charakterisiert sind. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine RIN3 und Lyst sind neuartige Regulatoren von Membrantransportprozessen und haben eine regulatorische Funktion bei der Mastzelldegranulation.

5.1. RIN3 ist ein Regulator der Degranulation von Mastzellen

Die Analyse der relative Genexpression von RIN3 zeigte eine auffallend hohe Expression in Mastzellen und führte zu der Hypothese, dass dem RIN3 Protein eine spezifische Rolle in diesen Immunzellen zukommen könnte. RIN3 könnte dabei eine neue Rolle in den Mastzellfunktionen aufweisen. Unter Verwendung eines lentiviralen auf miRNA-basierenden RIN3 *knock-down* Ansatzes, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass RIN3 in die Mastzelldegranulation involviert ist. Interessanterweise führte der *knock-down* von RIN3 in der Mastzelllinie MC9 tatsächlich zu einer erhöhten Degranulation, sowie zu einer erhöhten Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6. Diese deutliche Beeinträchtigung der Degranulationsprozesse weist auf die negative regulatorische Funktion des RIN3 Proteins bei diesen Vorgängen in Mastzellen hin. Der dahinterstehende Mechanismus ist noch unbekannt.

Eine mögliche Ursache wäre, dass die Signalweiterleitung in RIN3 *knock-down* Mastzellen beeinträchtigt ist. RIN3-aktivierte Signalwege könnten dabei zur Degranulation der zytoplasmatischen Granula führen. In dem verwendeten System, wurde eine nicht-rezeptorvermittelte Aktivierung verwendet. Die Stimulierung der Mastzellen erfolgte durch den generellen Aktivator PMA und Ionomycin, da die

verwendeten MC9 Zellen nur in geringem Maße auf eine FcεRI-abhängige Stimulierung ansprechen. Im Falle von PMA und Ionomycin ist die Aktivierung rezeptor-unabhängig und es erfolgt eine generelle Stimulation der Mastzellen, die eine vollständige Aktivierung der Signaltransduktion zur Folge hat. Trotz dieser vollständigen Aktivierung aller Signalwege konnte ein Unterschied in der Degranulation von miRIN3 exprimierenden Mastzellen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die verstärkte Degranulation in miRIN3 exprimierenden Mastzellen wahrscheinlich nicht auf eine beeinträchtigte Signaltransduktion zurückzuführen ist. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, dass es sich um eine mechanistische Ursache handelt, die in den Prozessen des Membrantransports oder der Membranfusion begründet liegt. Hypothetisch könnte RIN3 in die kontrollierenden Mechanismen involviert sein, die den Transport der sekretorischen Granula an die Plasmamembran, die Fusion dieser Granula mit der Plasmamembran oder die Sekretion ihres Inhalts regulieren. In Mastzellen werden der Transport der sekretorischen Granula und die Fusion dieser Granula mit der Plasmamembran durch Proteine der SNARE- oder der RAB-Familie reguliert. Verschiedenen SNARE-Proteinen und ihren Regulatoren kommt eine Funktion in den exozytotischen Vorgängen der Degranulation zu (Kalesnikoff und Galli; 2008). Der Mechanismus, der zu der verstärkten Degranulation in miRIN3 Mastzellen führt ist noch unbekannt. Allerdings zeigen verschiedene SNARE-Proteine eine regulatorische Funktion in den Degranulationsprozessen der Mastzellen und könnten hypothetisch mit einem regulatorischen Protein wie RIN3 interagieren. Es wurde gezeigt, dass VAMP-8 defiziente Mastzellen eine reduzierte Degranulation aufweisen (Tiwari *et al.*; 2008). Des Weiteren zeigten Studien, dass SNAP-23 und Syntaxin-4 in die IgE-abhängige Degranulation involviert sind (Guo *et al.*; 1998, Paumet *et al.*; 2000, Vaidyanathan *et al.*, 2001). Die Interaktion von RIN3 mit den SNARE-Proteinen VAMP-8, SNAP-23 und Syntaxin-4 wurde in dieser Arbeit durch Ko-Immunopräzipitation analysiert. Es konnte bisher allerdings noch keine Interaktion von RIN3 mit einem dieser SNARE-Proteine nachgewiesen werden. Es ist noch unklar, ob dies darauf schließen lässt, dass keine Interaktion von RIN3 mit VAMP-8, SNAP-23 und Syntaxin-4 vorliegt oder, ob es sich bisher um ein technisches Problem handelt, durch das ein Nachweis noch nicht erbracht werden konnte. Die verwendeten Antikörper sind zum Teil nur humanspezifisch verfügbar und bieten eventuell keine optimale Detektionsmöglichkeit. Neben SNARE-Proteinen wird die Mastzelldegranulation

durch Proteine der Rab-Familie reguliert. Rab27b ist ein wichtiger Regulator der Degranulation von Mastzellen. Rab27b kommt dabei wahrscheinlich eine Rolle bei der Freigabe von Granula zu, die vor der Exozytose in der Nähe der Plasmamembran zurückgehalten werden (Mizuno *et al.*; 2007). Eine Interaktion von RIN3 mit Rab27b bleibt noch zu analysieren. RIN3 könnte durch die Interaktion mit einem regulatorischen Protein der SNARE oder Rab-Familie an der Regulation der Degranulation von Mastzellen beteiligt sein. Durch die Herunterregulierung von RIN3 in Mastzellen könnte der Transport der sekretorischen Granula zur Plasmamembran oder die Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran beeinträchtigt sein. Auf diese Weise könnte RIN3 als negativer Regulator der Mastzelldegranulation wirken.

Kajiho *et al.* charakterisierten RIN3 in vorangegangenen Studien und zeigten, dass die Proteinstruktur von RIN3 unter anderem eine Vps9-Domäne aufweist (Kajiho *et al.*; 2003). Dies gibt Aufschluss darüber, dass dem RIN3 Protein eine Funktion als Guanin-Nukleotid austauschfaktor zukommt (GEF), da die Vps9-Domäne eine hoch konservierte katalytische Domäne darstellt und Proteine, die diese Domäne exprimieren eine GEF-Aktivität aufweisen (Carney *et al.*; 2006). Es ist noch unklar welche Rolle die GEF-Aktivität des RIN3 Proteins in der Degranulation von Mastzellen spielt und die Klärung dieser Fragestellung bedarf ebenfalls noch weiterer Studien. In diesem Zusammenhang ist ein weiteres Protein RabGEF1 (Rabex-5) als Beispiel zu nennen. RabGEF1 beinhaltet in seiner Proteinstruktur ebenfalls die konservierte Vps9-Domäne, die für die GEF-Aktivität verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass RabGEF1^{-/-} Mastzellen eine erhöhte Degranulation von Lipidmediatoren und Zytokinen nach FcεRI-abhängiger Stimulierung aufweisen. Die Aktivierung von Ras-abhängigen Signalwegen in Mastzellen, sowie die Sekretion von Mediatoren und Zytokinen wird durch RabGEF1 ebenfalls negativ reguliert. RabGEF1 wurde somit als negativer Regulator der Mastzellaktivierung beschrieben (Tam *et al.*; 2004, Kalesnikoff *et al.*; 2007). Rabex-5 und RIN3 teilen einige charakteristische Merkmale, wie die Vps9-Domäne und die damit verbundene GEF-Aktivität. Auffällig ist weiterhin, dass die Abwesenheit von RIN3 oder Rabex-5 in Mastzellen zu einer erhöhten Degranulation führt. Rabex-5 wird eine Rolle als negativer Regulator der Mastzelldegranulation zugeschrieben und RIN3 könnte eine

ähnliche Rolle aufweisen. Dies unterstützt die Annahme, dass RIN3 ebenfalls als ein negativer Regulator der Mastzelldegranulation dienen könnte.

Des Weiteren zeigten die Studien von Kajihō *et al.*, dass RIN3 wahrscheinlich als Regulator von intrazellulären Vesikeltransportprozessen dienen könnte. RIN3 wurde dabei als spezifisches GEF für die kleine GTPase Rab5 und kürzlich zudem als GEF für die kleine GTPase Rab31 beschrieben (Kajihō *et al.*; 2003; Yoshikawa *et al.*; 2008; Kajihō *et al.*; 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kajihō *et al.* keine signifikante Interaktion von RIN3 und Rab5 durch Ko-Immunopräzipitation detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls zeigten Kolokalisationsstudien in Mastzellen keine Kolokalisation von RIN3 und Rab5, sowie auch keine Kolokalisation von RIN3 mit Rab4 und Rab11 aufzeigbar war. Diese Diskrepanz kann durch verschiedene noch unklare Ursachen hervorgerufen werden. Zum einen wurde in dieser Arbeit die Kolokalisation von murinem RIN3 mit Rab5 untersucht, Kajihō *et al.* hingegen studierten humanes RIN3. Zum anderen wurden die Studien in verschiedenen Zelltypen durchgeführt. In dieser Studie wurde die Kolokalisation von murinem RIN3 in Mastzellen untersucht, wohingegen Kajihō *et al.* HeLa Zellen verwendeten (Kajihō *et al.*; 2003). Die potentielle Rolle von RIN3 als GEF für die kleine GTPase Rab5 muss demnach in Mastzellen kritisch betrachtet werden. Neu publizierte Daten dieser Arbeitsgruppe wiesen kürzlich auf eine Interaktion von RIN3 mit einer weiteren kleinen GTPase, Rab31, hin (Kajihō *et al.*; 2011). Dies zeigt, dass sich das Wirkungsspektrum von RIN3 nicht auf Rab5 beschränken lässt und es wahrscheinlich weitere Funktionen und andere Interaktionspartner neben diesen GTPasen geben könnte. Die Interaktion von RIN3 mit der kleinen GTPase Rab31 wurde in dieser Arbeit nicht weiter analysiert, da diese neuen Erkenntnisse erst kürzlich publiziert worden sind. Es bedarf weiterer Analysen, um klar aufzuzeigen, ob die GEF-Aktivität von RIN3 nur für Rab5 und Rab31 spezifisch ist, oder es zu einer Interaktion von RIN3 mit weiteren Proteinen kommt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine weitere Funktion von RIN3 als potentieller Regulator des Aktinzytoskeletts in Mastzellen hin. In Mastzellen scheint RIN3 somit nicht mit den frühen Endosomen assoziiert zu sein. Unterstützt wird dieser Befund durch die intrazelluläre Lokalisation von RIN3 vor und nach der

Degranulation. In unstimulierten Mastzellen ist RIN3 an der Plasmamembran lokalisiert und kolokalisiert dort mit kortikalem F-Aktin, allerdings geht diese Assoziation mit dem Aktinzytoskelett nach Stimulation bzw. während der Degranulation verloren und RIN3 relokalisiert in das Zytoplasma. Dieser Befund ist von besonderer Wichtigkeit, da die Rolle des Aktinzytoskeletts in der Degranulation von Mastzellen zwar bekannt, aber noch unzureichend charakterisiert ist. Die Rolle des Zytoskeletts in der Mastzelldegranulation ist in früheren Studien untersucht worden. Die Stimulation der Mastzellen führt zur Degranulation und während dieses Prozesses kommt es zur Polymerisation von Aktin. In der Zelle liegt Aktin sowohl in monomerischer Form (G-Aktin) als auch polymerisiert in Filamenten (F-Aktin) vor. Durch die FcεRI-abhängige Aktivierung polymerisiert das monomerisch vorliegende Aktin in Mikrofilamente (Frigeri und Apgar; 1999). In RBL-2H3 Antigen-stimulierten Zellen, konnte eine Korrelation zwischen der Inhibierung der Aktin-Polymerisation und einer erhöhten Degranulation festgestellt werden (Frigeri und Apgar; 1999). Unter dem Einfluss der Inhibitoren Latrunculin und Cytochalasin D zeigten RBL-2H3 Zellen eine verstärkte Degranulation (Frigeri und Apgar; 1999). Bisher sind die regulatorischen Mechanismen dieser Vorgänge noch relativ unbekannt. Einige Hinweise lassen auf den Zusammenhang der SNARE-Maschinerie und des Zytoskeletts schließen (Martin-Verdeaux *et al.*; 2003). Der Degranulationsvorgang ist eine Abfolge von Signalkaskaden, in der interagierende Moleküle die aktivierten Signale, mit der SNARE-Maschinerie koppeln (Martin-Verdeaux *et al.*; 2003). Die Moleküle dieser Maschinerie wiederum können Veränderungen des Zytoskeletts während der Sekretion auslösen (Martin-Verdeaux *et al.*; 2003). In diesem Zusammenhang kann über die Rolle von RIN3 spekuliert werden. RIN3 könnte eines der interagierenden Moleküle in diesen Prozessen sein und eventuell ebenfalls eine Verbindung zwischen der SNARE-Maschinerie und den Veränderungen des Zytoskeletts darstellen. Die regulatorische Funktion von RIN3 könnte durch die Relokalisation in das Zytoplasma zum Tragen kommen und RIN3 eventuell einen unkontrollierten Transport der sekretorischen Granula an die Plasmamembran verhindern. Des Weiteren könnte RIN3 als Regulator des Aktinzytoskeletts die Reorganisation der Aktinfilamente während der Degranulation kontrollieren. Um die Funktion des RIN3 Proteins als Regulator in den Prozessen des Membrantransports oder der Reorganisation des Aktinzytoskeletts weiter zu charakterisieren, bedarf es weiterführender Studien.

Die physiologische Rolle von RIN3 ist noch unbekannt. Die Verfügbarkeit der RIN3 *knock-out* Maus wird weitere Möglichkeiten zur Charakterisierung von RIN3 ermöglichen. Diese wurde im Verlauf dieser Arbeit generiert und ist demnächst verfügbar. Mit Hilfe dieser *knock-out* Maus kann die Rolle von RIN3 in Mastzell-vermittelten Immunantworten wie Allergien, Asthma und Entzündungsreaktionen analysiert werden. Dies bietet einen interessanten Ansatz für anschließende Studien.

5.2. Lyst ist ein Regulator der Lysosomengröße in Mastzellen und zeigt eine regulatorische Funktion in der Mastzelldegranulation

Nach heutigem Forschungsstand spielt Lyst eine Rolle bei der Regulation von Membrantransportprozessen. Vorangegangene Studien zeigten, dass die Mutation des *Lyst* Gens zu Störungen im Lysosomen-Haushalt immunologischer Zellen und zu einer potentiellen defektiven Exozytose führen kann. Des Weiteren ist die Mutation des *Lyst* Gens verantwortlich für die Ausbildung des Chediak-Higashi-Syndroms im Menschen (Kaplan *et al.*; 2008). In Mastzellen blieb die Funktion des Lyst Proteins bisher jedoch weitgehend unbekannt. Die sekretorischen Granula, die während der Degranulation ihre Mediatoren exozytieren, sind in Mastzellen lysosomalen Ursprungs. Die Untersuchung der biologischen Funktion des Lyst Proteins in Mastzellen kann somit einen wichtigen Ansatz zum Verständnis der defektiven exozytotischen Prozesse, die in Chediak-Higashi-Syndrom-Patienten zur Ausbildung einer Immundefizienz führen, bieten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass Lyst eine regulatorische Funktion bei der Ausbildung der Lysosomengröße in Mastzellen zukommt und Lyst zudem ein Regulator der Mastzelldegranulation ist. Lyst-mutante (*Lyst*^{bg-J}) Mastzellen der *beige* Maus wiesen stark vergrößerte Lysosomen auf und die Granularität dieser Zellen war ebenfalls verändert. Konform dazu war die Degranulation und die Ausschüttung der Zytokine IL-6 und TNF- α defektiv. Interessanterweise scheint ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung der stark vergrößerten Lysosomen und den verringerten Degranulationsvorgängen in Mastzellen zu bestehen. Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit werden durch vorangegangene Studien unterstützt. Frühe Hinweise wiesen auf vergrößerte zytoplasmatische sekretorische Granula in Mastzellen der *beige* Maus hin (Chi und

Lagunoff; 1975). Dabei handelte es sich um Gewebemastzellen, die sich in ihrer Anzahl, Größe und Form von Wildtyp-Mastzellen unterschieden. In dieser Arbeit wurden peritoneale Mastzellen der *beige* Maus analysiert. Konform zu den zuvor analysierten Gewebemastzellen zeigten die peritonealen Mastzellen der *beige* Maus ein deutlich verändertes lysosomales Kompartiment, mit stark vergrößerten Lysosomen. Die Funktion des Lyst Proteins, die die Ausbildung dieser vergrößerten Lysosomen verhindert, ist noch nicht ausgiebig untersucht worden. Allerdings wurde vermutet, dass es in den Mastzellen der *beige* Maus zu einer veränderten Fusion der zytoplasmatischen Granula miteinander kommt (Hammel *et al.*; 1987, Hammel *et al.*; 1998, Galli *et al.*; 1993). Das Model dieser defektiven Granula-Granula-Fusion in den Mastzellen der *beige* Maus ist kürzlich erweitert worden (Hammel *et al.*; 2010). Diese Studien zeigten, dass die sekretorischen Granula der Mastzellen aus kleinen Einheiten, den sogenannten *unit* Granula gebildet werden. Diese können miteinander fusionieren und größere sekretorische Granula ausbilden. Die Granula-Granula-Fusion erfolgt dabei reguliert, indem *unit* Granula entweder miteinander oder mit größeren Granula fusionieren (*unit addition*). Die Analyse von Mastzellen und pankreatischen Zellen Lyst-mutanter Mäuse lässt vermuten, dass die sekretorischen Granula der *beige* Maus, dagegen die Fähigkeit haben wahllos mit anderen sekretorischen Granula zu fusionieren (*random addition*) und so die stark vergrößerten Lysosomen ausbilden. Somit könnte Lyst ein negativer Regulator der Granula-Granula Fusion sein (Hammel *et al.*; 2010). In Lyst-mutanten Mastzellen könnte es ebenfalls zu dieser wahllosen Fusion der Granula und somit zur Ausbildung der vergrößerten sekretorischen Lysosomen kommen. In welchen regulatorischen Zusammenhang das Lyst Protein dabei eingebunden ist und mit welchen weiteren regulatorischen Proteinen es interagiert, ist dabei noch offen. Es lässt sich vermuten, dass eventuell regulatorische Mechanismen, die eine wahllose Membranfusion von Granula verhindern, in Lyst-mutanten Zellen defektiv sind. Die Regulationsmechanismen, die die Vorgänge der Membranfusion kontrollieren, beinhalten Proteine der SNARE-Maschinerie. Spekulativ könnte Lyst als ein potentieller Interaktionspartner in dieser Maschinerie, eine regulatorische Rolle ausüben. Tchernev *et al.* lieferten erste Hinweise, dass Lyst potentiell als Adapterprotein fungieren und dabei als ein Gerüst für SNARE-Proteine dienen könnte (Tchernev *et al.*; 2002). In diesem Zusammenhang kann über die Funktion von Lyst spekuliert werden. Lyst könnte die Granula-Granula-Fusion kontrollieren,

indem es als Interaktionspartner von SNARE-Proteinen an der Regulation von Membranfusionsprozessen beteiligt ist. Fällt bei einer Lyst-Mutation diese Kontrolle aus, könnten spekulativ die Regulationsmechanismen der SNARE-Maschinerie nicht mehr greifen und es zur Ausbildung der vergrößerten Lysosomen kommen. Die Mechanismen, die hinter diesen regulatorischen Vorgängen stehen sind noch unklar. Ebenso sind potentielle Interaktionspartner des Lyst-Proteins noch relativ unbekannt und es bedarf weiterführender Studien um diese Vorgänge zu charakterisieren.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lyst-mutante Mastzellen in einem verringerten Maße degranulieren und die Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6 ebenfalls verringert ist. Lyst könnte in Mastzellen somit eine positive regulatorische Funktion während der Mastzelldegranulation zukommen. Diese Ergebnisse sind konform mit vorangegangenen Studien, die schon auf eine defektive Exozytose in verschiedenen Lyst-mutanten Zellen hinwiesen. Unter anderem zeigten Lyst-mutante T-Zellen und NK-Zellen veränderte exozytotische Prozesse. Dabei wurde vermutet, dass sich die Anfälligkeit von CHS-Patienten gegenüber bakteriellen Infektionen wahrscheinlich durch die defektive Zytotoxizität der T-Zellen, sowie die defektive Aktivität der NK-Zellen erklären lässt (Certain *et al.*; 2000). Baetz *et al.* zeigten, dass der Verlust der Zytotoxizität von Lyst-mutanten T-Zellen, die aus dem peripheren Blut von CHS-Patienten gewonnen wurden, darauf zurückzuführen ist, dass die stark vergrößerten lysosomalen Granula dieser Zellen, nicht sekretiert werden können (Baetz *et al.*; 1995). Des Weiteren zeigten Huynh *et al.*, dass die lysosomale Exozytose in Fibroblasten, die aus CHS-Patienten und aus der *beige* Maus gewonnen wurde, reduziert ist (Huynh *et al.*, 2004). Wie es zur Ausbildung dieser defektiven exozytischen Vorgänge und der verringerten Degranulation von Mastzellen kommt, bleibt dabei noch offen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Signalweiterleitung in Lyst-mutanten Mastzellen nach Fc ϵ RI-abhängiger Stimulierung nicht beeinträchtigt ist. Dies deutet darauf hin, dass die defektive Degranulation in Mastzellen eher nicht auf Prozessen der Signalweiterleitung beruht, sondern dass es sich um ein Problem der Membranfusion handeln könnte. Zudem scheint die quantitative Menge der Lysosomen nicht verändert zu sein, so dass es sich wahrscheinlich eher um strukturelle Veränderungen handelt, die zu einer Beeinträchtigung des Membrantransport und der Membranfusion führen könnten. Potentiell könnten zwei Ursachen zu einer

defektiven Membranfusion führen. Zum einen könnte es sich um ein mechanistisches Problem handeln, dass durch die Größe der Lysosomen hervorgerufen wird. Die stark vergrößerten Lysosomen könnten in diesem Fall eventuell nicht mehr korrekt mit der Plasmamembran fusionieren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Lyst als Interaktionspartner der SNARE-Maschinerie ebenfalls an den Regulationsmechanismen beteiligt sein könnte, die die Fusion der sekretorischen Lysosomen der Mastzellen mit der Plasmamembran kontrollieren.

Zusammenfassend bedarf die Analyse der physiologischen Rolle des Lyst Proteins noch weiterer Aufklärung. Insbesondere mögliche Interaktionspartner des Lyst-Proteins sind noch weitgehend unbekannt. Zudem bedürfen die regulatorischen Mechanismen, die zur Ausbildung der vergrößerten sekretorischen Lysosomen führen und die Mechanismen durch die diese eine defektive Sekretion aufweisen, weiterer Klärung. Mastzellen eignen sich durch ihre charakteristische Funktion ihre sekretorischen Lysosomen zu degranulieren besonders diese Fragestellungen zu beantworten und weiteres Verständnis zur Behandlung des Chediak-Higashi-Syndroms zu erhalten.

5.3. Ausblick

Mastzellen spielen eine entscheidende Rolle bei allergischen Prozessen, indem sie aufgrund eines Stimulus den Inhalt ihrer zytoplasmatischen Granula in das umliegende Gewebe degranulieren. Eine Vielzahl von Regulationsmechanismen kontrolliert dabei die obligatorischen Membrantransport und Membranfusionsprozesse, die zur Degranulation der Mastzellen führen. Die Erforschung neuartiger Regulatoren, wie RIN3 und Lyst wird zum Verständnis dieser Kontrollvorgänge beitragen. Dies ist von besonderem Interesse, da allergische Reaktionen, durch ein medikatives Eingreifen in diese regulativen Mechanismen im Vorfeld unterbunden werden könnten. Insbesondere die weitere Analyse potentieller Interaktionspartner von RIN3 und Lyst aus der SNARE oder Rab-Proteinfamilie bietet einen wichtigen Ansatz die Regulation der Degranulationsprozesse in Mastzellen zu verstehen. Die weitere Erforschung der Mastzellregulatoren RIN3 und Lyst könnte zukünftig einen Ansatzpunkt für therapeutische Zwecke bieten. Dabei könnte es sich um die Entwicklung anti-allergischer Medikamente handeln, die frühzeitig die

Ausschüttung der Mastzellmediatoren verhindern und die Auslösung einer allergischen Reaktion unterbinden könnten.

6. Zusammenfassung

Mastzellen spielen eine tragende Rolle bei inflammatorischen und allergischen Prozessen. Die Ausschüttung der Mastzellmediatoren, die aus einer Vielzahl von Substanzen bestehen, ist dabei von besonderer Wichtigkeit und kann innerhalb kürzester Zeit allergische Reaktionen auslösen. Insbesondere die Umorganisation der Mastzellgranula, die an Membranfusions- und Membrantransportprozessen beteiligt sind, ist dabei für die Mastzelldegranulation von essentieller Bedeutung. Diese Prozesse werden durch vielfältige Regulationsmechanismen kontrolliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der zwei unterschiedlichen Membrantransportregulatoren RIN3 und Lyst, während der Mastzelldegranulation untersucht. RIN3 agiert als potentieller Guaninnukleotid austauschfaktor (GEF) und Regulator einiger Mitglieder der Rab-Proteinfamilie, wie z.B. der kleinen GTPase Rab5 und Rab31. Diese sind involviert in die Regulation der Endozytose und dem Vesikeltransport. Lyst hingegen ist ein lysosomaler Regulator und die Mutation des Lyst-Gens führt im Menschen zur Ausbildung des Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) und zum Phänotyp der *beige* Maus, die sich durch eine starke Immundefizienz auszeichnen. Ein herausstechendes Merkmal dieser Krankheit ist die Anhäufung von stark vergrößerten lysosom-assoziierten Granula in verschiedenen Zellen.

Mittels quantitativer *real-time* PCR wurde die höchste RIN3 Expression in Mastzellen festgestellt. Lokalisationsstudien zeigten, dass RIN3 an der Plasmamembran lokalisiert war, wo es mit kortikalen filamentärem Aktin kolokalisierte. Diese Interaktion wurde anhand der Stimulation der Mastzellen reguliert. Des Weiteren führte ein durch miRNA vermittelter, spezifischer RIN3 *knock-down* zu einer erhöhten Mastzelldegranulation und einer erhöhten Zytokinausschüttung. Die biologische Rolle von Lyst wurde mithilfe der mutante Mauslinie C57BL/6J-Lyst^{bg-J}/J analysiert. Lyst-mutante Mastzellen wiesen stark vergrößerte Lysosomen auf und die Granularität der Lyst-mutanten Mastzellen war ebenfalls verändert. Des Weiteren wiesen Lyst-mutante Mastzellen eine erniedrigte Degranulation und Zytokinausschüttung auf, wobei FcεRI-abhängige Signalwege nicht beeinflusst waren.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass RIN3 und Lyst eine spezifische Assoziation mit den Mastzellfunktionen aufweisen und insbesondere an den Regulationsprozessen des Membrantransports und der Vesikelfusion beteiligt sind. Dabei üben sie ihre regulatorische Funktion an verschiedenen zellulären Kompartimenten aus. RIN3 ist mit der Plasmamembran assoziiert und kolokalisiert mit kortikalen Aktin, wohingegen Lyst mit dem lysosomalen Kompartiment assoziiert ist. RIN3 könnte dabei eine negative regulatorische Funktion bei der Mastzelldegranulation zukommen, wohingegen Lyst ein positiver Regulator der Mastzelldegranulation zu sein scheint. Trotz ihrer unterschiedlichen zellulären Lokalisation beeinflussen die Regulatoren RIN3 und Lyst die Degranulationsprozesse in Mastzellen. Das Wissen über die regulatorische Funktion von RIN3 und Lyst ist noch limitiert und ihre Beteiligung an essentiellen Transportprozessen wurde noch nicht ausreichend charakterisiert. Die weitere Aufklärung der molekularen Mechanismen und ihrer Regulatoren, wird die zellulären Vorgänge bei allergischen oder inflammatorischen Reaktionen weiter verdeutlichen und könnte zum Verständnis Mastzell-vermittelter Krankheiten beitragen.

7. Literatur

- Abbas, A.R., D. Baldwin, Y. Ma, W. Ouyang, A. Gurney, F. Martin, S. Fong, M. van Lookeren Campagne, P. Godowski, P.M. Williams, A.C. Chan, and H.F. Clark.** 2005. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes Immun.* 6:319-331.
- Abraham, S.N., and A.L. St John.** 2010. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 10:440-452.
- Abramson, J., and I. Pecht.** 2007. Regulation of the mast cell response to the type 1 Fc epsilon receptor. *Immunol Rev.* 217:231-254.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P.Walter.** 2007. Molecular biology of the cell. *Taylor & Francis.* 5th edition
- Arvan, P., and D. Castle.** 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J.* 332 (Pt 3):593-610.
- Baetz, K., S. Isaaz, and G.M. Griffiths.** 1995. Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J Immunol.* 154:6122-6131.
- Baram, D., R. Adachi, O. Medalia, M. Tuvim, B.F. Dickey, Y.A. Mekori, and R. Sagi-Eisenberg.** 1999. Synaptotagmin II negatively regulates Ca²⁺-triggered exocytosis of lysosomes in mast cells. *J Exp Med.* 189:1649-1658.
- Bischoff, S.C.** 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 7:93-104.
- Blank, U., and J. Rivera.** 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25:266-273.
- Bliss, J.M., B. Venkatesh, and J. Colicelli.** 2006. The RIN family of Ras effectors. *Methods Enzymol.* 407:335-344.
- Blott, E.J., and G.M. Griffiths.** 2002. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:122-131.
- Burd, C.G., P.A. Mustol, P.V. Schu, and S.D. Emr.** 1996. A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Mol Cell Biol.* 16:2369-2377.
- Burgoyne, R.D., and A. Morgan.** 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 83:581-632.

- Carney, D.S., B.A. Davies, and B.F. Horazdovsky.** 2006. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol.* 16:27-35.
- Certain, S., F. Barrat, E. Pastural, F. Le Deist, J. Goyo-Rivas, N. Jabado, M. Benkerrou, R. Seger, E. Vilmer, G. Beullier, K. Schwarz, A. Fischer, and G. de Saint Basile.** 2000. Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome. *Blood.* 95:979-983.
- Chi, E.Y., and D. Lagunoff.** 1975. Abnormal mast cell granules in the beige (Chediak-Higashi syndrome) mouse. *J Histochem Cytochem.* 23:117-122.
- Colicelli, J., C. Nicolette, C. Birchmeier, L. Rodgers, M. Riggs, and M. Wigler.** 1991. Expression of three mammalian cDNAs that interfere with RAS function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2913-2917.
- Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, S. Caplan, and J.S. Bonifacino.** 2000. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 14:1265-1278.
- Dhaka, A., R.M. Costa, H. Hu, D.K. Irvin, A. Patel, H.I. Kornblum, A.J. Silva, T.J. O'Dell, and J. Colicelli.** 2003. The RAS effector RIN1 modulates the formation of aversive memories. *J Neurosci.* 23:748-757.
- Dvorak, A.M.** 2005. Ultrastructure of mast cells and basophils. *Karger.* 1th edition
- Ehrlich, P.** 1878. Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung. Leipzig, Universität Leipzig, Dissertation
- Frigeri, L., and J.R. Apgar.** 1999. The role of actin microfilaments in the down-regulation of the degranulation response in RBL-2H3 mast cells. *J Immunol.* 162:2243-2250.
- Galli, S.J., A.M. Dvorak, and I. Hammel.** 1993. Mast cell abnormalities in the Chediak-Higashi syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 100:89-92.
- Galli, S.J., M. Grimaldeston, and M. Tsai.** 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol.* 8:478-486.
- Galli, S.J., J. Kalesnikoff, M.A. Grimaldeston, A.M. Piliponsky, C.M. Williams, and M. Tsai.** 2005a. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol.* 23:749-786.
- Galli, S.J., M. Maurer and C.S. Lantz.** 1999. Mast cells as sentinels of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 11:53-9.
- Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai.** 2005b. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 6:135-142.

- Grimbaldeston, M.A., C.C. Chen, A.M. Piliponsky, M. Tsai, S.Y. Tam, and S.J. Galli.** 2005. Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol.* 167:835-848.
- Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick.** 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11821-11827.
- Grützkau, A., A. Smorodchenko, U. Lippert, L. Kirchhof, M. Artuc, and B.M. Henz.** 2004. LAMP-1 and LAMP-2, but not LAMP-3, are reliable markers for activation-induced secretion of human mast cells. *Cytometry A.* 61:62-68.
- Guo, Z., C. Turner, and D. Castle.** 1998. Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. *Cell.* 94:537-548.
- Haas, A., and W. Wickner.** 1996. Homotypic vacuole fusion requires Sec17p (yeast alpha-SNAP) and Sec18p (yeast NSF). *EMBO J.* 15:3296-3305.
- Hammel, I., A.M. Dvorak, P. Fox, E. Shimoni, and S.J. Galli.** 1998. Defective cytoplasmic granule formation.II. Differences in patterns of radiolabeling of secretory granules in beige versus normal mouse pancreatic acinar cells after [3H]glycine administration in vivo. *Cell Tissue Res.* 293:445-452.
- Hammel, I., A.M. Dvorak, and S.J. Galli.** 1987. Defective cytoplasmic granule formation. I. Abnormalities affecting tissue mast cells and pancreatic acinar cells of beige mice. *Lab Invest.* 56:321-328.
- Hammel, I., D. Lagunoff, and S.J. Galli.** 2010. Regulation of secretory granule size by the precise generation and fusion of unit granules. *J Cell Mol Med.* 14:1904-1916.
- Hepp, R., N. Puri, A.C. Hohenstein, G.L. Crawford, S.W. Whiteheart, and P.A. Roche.** 2005. Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J Biol Chem.* 280:6610-6620.
- Hibi, T., N. Hirashima, and M. Nakanishi.** 2000. Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 271:36-41.
- Holt, O.J., F. Gallo, and G.M. Griffiths.** 2006. Regulating secretory lysosomes. *J Biochem.* 140:7-12.
- Hu, H., J.M. Bliss, Y. Wang, and J. Colicelli.** 2005. RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Curr Biol.* 15:815-823.
- Huynh, C., D. Roth, D.M. Ward, J. Kaplan, and N.W. Andrews.** 2004. Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16795-16800.

- Jahn, R.** 2000. Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron*. 27:201-204.
- Kajiho, H., K. Saito, K. Tsujita, K. Kontani, Y. Araki, H. Kurosu, and T. Katada.** 2003. RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci*. 116:4159-4168.
- Kajiho, H., K. Sakurai, T. Minoda, M. Yoshikawa, S. Nakagawa, S. Fukushima, K. Kontani, and T. Katada.** 2011. Characterization of RIN3 as a Guanine Nucleotide Exchange Factor for the Rab5 Subfamily GTPase Rab31. *J Biol Chem*. 286:24364-24373.
- Kalesnikoff, J., and S.J. Galli.** 2008. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 9:1215-1223.
- Kalesnikoff, J., E.J. Rios, C.-C. Chen, M. A. Barbieri, M. Tsai, S.-Y. Tam and S.J. Galli.** 2007. Roles of RabGEF1/Rabex-5 domains in regulating FcεRI surface expression and FcεRI-dependent responses in mast cells. *Blood* 109: 5308-5317.
- Kaplan, J., I. De Domenico, and D.M. Ward.** 2008. Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol*. 15:22-29.
- Kirchhausen, T.** 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:187-198.
- Kitamura, Y., S. Go, and K. Hatanaka.** 1978. Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood*. 52:447-452.
- Kitamura, Y., M. Shimada, K. Hatanaka, and Y. Miyano.** 1977. Development of mast cells from grafted bone marrow cells in irradiated mice. *Nature*. 268:442-443.
- Kitamura, Y., M. Yokoyama, H. Matsuda, T. Ohno, and K.J. Mori.** 1981. Spleen colony-forming cell as common precursor for tissue mast cells and granulocytes. *Nature*. 291:159-160.
- Malaviya, R., and A. Georges.** 2002. Regulation of mast cell-mediated innate immunity during early response to bacterial infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 22:189-204.
- Marshall, J.S.** 2004. Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 4:787-799.
- Martens, S., and H.T. McMahon.** 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:543-556.
- Martin-Verdeaux, S., I. Pombo, B. Iannascoli, M. Roa, N. Varin-Blank, J. Rivera, and U. Blank.** 2003. Evidence of a role for Munc18-2 and microtubules in mast cell granule exocytosis. *J Cell Sci*. 116:325-334.

- Mayer, A., W. Wickner, and A. Haas.** 1996. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell*. 85:83-94.
- Metcalfe, D.D.** 2008. Mast cells and mastocytosis. *Blood*. 112:946-956.
- Metcalfe, D.D., D. Baram, and Y.A. Mekori.** 1997. Mast cells. *Physiol Rev*. 77:1033-1079.
- Mizuno, K., T. Tolmachova, D.S. Ushakov, M. Romao, M. Abrink, M.A. Ferenczi, G. Raposo, and M.C. Seabra.** 2007. Rab27b regulates mast cell granule dynamics and secretion. *Traffic*. 8:883-892.
- Nakano, T., T. Sonoda, C. Hayashi, A. Yamatodani, Y. Kanayama, T. Yamamura, H. Asai, T. Yonezawa, Y. Kitamura, and S.J. Galli.** 1985. 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*. 162:1025-1043.
- Neeft, M., M. Wieffer, A.S. de Jong, G. Negroiu, C.H. Metz, A. van Loon, J. Griffith, J. Krijgsveld, N. Wulffraat, H. Koch, A.J. Heck, N. Brose, M. Kleijmeer, and P. van der Sluijs.** 2005. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell*. 16:731-741.
- Nichols, B.J., C. Ungermann, H.R. Pelham, W.T. Wickner, and A. Haas.** 1997. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature*. 387:199-202.
- Paumet, F., J. Le Mao, S. Martin, T. Galli, B. David, U. Blank, and M. Roa.** 2000. Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. *J Immunol*. 164:5850-5857.
- Perou, C.M., J.D. Leslie, W. Green, L. Li, D.M. Ward, and J. Kaplan.** 1997a. The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. *J Biol Chem*. 272:29790-29794.
- Perou, C.M., K.J. Moore, D.L. Nagle, D.J. Misumi, E.A. Woolf, S.H. McGrail, L. Holmgren, T.H. Brody, B.J. Dussault, Jr., C.A. Monroe, G.M. Duyk, R.J. Pryor, L. Li, M.J. Justice, and J. Kaplan.** 1996. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat Genet*. 13:303-308.
- Perou, C.M., R.J. Pryor, T.P. Naas and J. Kaplan.** 1997b. The bg allele mutation is due to a LINE-1 element retrotransposition. *Genomics* 42: 366-368.

- Puri, N., M.J. Kruhlak, S.W. Whiteheart, and P.A. Roche.** 2003. Mast cell degranulation requires N-ethylmaleimide-sensitive factor-mediated SNARE disassembly. *J Immunol.* 171:5345-5352.
- Puri, N., and P.A. Roche.** 2008. Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:2580-2585.
- Razin, E., J.N. Ihle, D. Seldin, J.M. Mencia-Huerta, H.R. Katz, P.A. LeBlanc, A. Hein, J.P. Caulfield, K.F. Austen, and R.L. Stevens.** 1984. Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J Immunol.* 132:1479-1486.
- Riedel, D., W. Antonin, R. Fernandez-Chacon, G. Alvarez de Toledo, T. Jo, M. Geppert, J.A. Valentijn, K. Valentijn, J.D. Jamieson, T.C. Sudhof, and R. Jahn.** 2002. Rab3D is not required for exocrine exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. *Mol Cell Biol.* 22:6487-6497.
- Roa, M., F. Paumet, J. Le Mao, B. David, and U. Blank.** 1997. Involvement of the ras-like GTPase rab3d in RBL-2H3 mast cell exocytosis following stimulation via high affinity IgE receptors (Fc epsilonRI). *J Immunol.* 159:2815-2823.
- Rottem, M., J.P. Goff, J.P. Albert, and D.D. Metcalfe.** 1993. The effects of stem cell factor on the ultrastructure of Fc epsilon RI+ cells developing in IL-3-dependent murine bone marrow-derived cell cultures. *J Immunol.* 151:4950-4963.
- Rudolph, A. M., R. K. Kamei and K. J. Overby.** 2002. Rudolphs fundamentals of pediatrics. *Mcgraw-Hill Professional.* 3rd edition
- Runkel, F., H. Bussow, K.L. Seburn, G.A. Cox, D.M. Ward, J. Kaplan, and T. Franz.** 2006. Grey, a novel mutation in the murine Lyst gene, causes the beige phenotype by skipping of exon 25. *Mamm Genome.* 17:203-210.
- Saito, K., J. Murai, H. Kajihio, K. Kontani, H. Kurosu, and T. Katada.** 2002. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem.* 277:3412-3418.
- Sander, L.E., S.P. Frank, S. Bolat, U. Blank, T. Galli, H. Bigalke, S.C. Bischoff, and A. Lorentz.** 2008. Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells. *Eur J Immunol.* 38:855-863.
- Sayed, B.A., A. Christy, M.R. Quirion, and M.A. Brown.** 2008. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol.* 26:705-739.
- Shiflett, S.L., J. Kaplan, and D.M. Ward.** 2002. Chediak-Higashi Syndrome: a rare disorder of lysosomes and lysosome related organelles. *Pigment Cell Res.* 15:251-257.

- Stelekati, E., Z. Orinska, and S. Bulfone-Paus.** 2007. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology*. 212:505-519.
- Suzuki, K., and I.M. Verma.** 2008. Phosphorylation of SNAP-23 by I κ B kinase 2 regulates mast cell degranulation. *Cell*. 134:485-495.
- Tam, S.Y., M. Tsai, J.N. Snouwaert, J. Kalesnikoff, D. Scherrer, S. Nakae, D. Chatterjea, D.M. Bouley, and S.J. Galli.** 2004. RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol*. 5:844-852.
- Tchernev, V.T., T.A. Mansfield, L. Giot, A.M. Kumar, K. Nandabalan, Y. Li, V.S. Mishra, J.C. Detter, J.M. Rothberg, M.R. Wallace, F.S. Southwick, and S.F. Kingsmore.** 2002. The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med*. 8:56-64.
- Tiwari, N., C.C. Wang, C. Brochetta, G. Ke, F. Vita, Z. Qi, J. Rivera, M.R. Soranzo, G. Zabucchi, W. Hong, and U. Blank.** 2008. VAMP-8 segregates mast cell-preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. *Blood*. 111:3665-3674.
- Trantow, C.M., M. Mao, G.E. Petersen, E.M. Alward, W.L. Alward, J.H. Fingert, and M.G. Anderson.** 2009. Lyst mutation in mice recapitulates iris defects of human exfoliation syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50:1205-1214.
- Tsai, M., T. Takeishi, H. Thompson, K.E. Langley, K.M. Zsebo, D.D. Metcalfe, E.N. Geissler, and S.J. Galli.** 1991. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:6382-6386.
- Tuvim, M.J., R. Adachi, J.F. Chocano, R.H. Moore, R.M. Lampert, E. Zera, E. Romero, B.J. Knoll, and B.F. Dickey.** 1999. Rab3D, a small GTPase, is localized on mast cell secretory granules and translocates to the plasma membrane upon exocytosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20:79-89.
- Vaidyanathan, V.V., N. Puri, and P.A. Roche.** 2001. The last exon of SNAP-23 regulates granule exocytosis from mast cells. *J Biol Chem*. 276:25101-25106.
- Yoshikawa, M., H. Kajiho, K. Sakurai, T. Minoda, S. Nakagawa, K. Kontani, and T. Katada.** 2008. Tyr-phosphorylation signals translocate RIN3, the small GTPase Rab5-GEF, to early endocytic vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 372:168-172.
- Yung, Y. P. and M. A. S. Moore.** 1984. Mast-cell growth factor: its role in mast cell differentiation, proliferation, and maturation. *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, vol. 10, p. 147-179.
- Zsebo, K.M., D.A. Williams, E.N. Geissler, V.C. Broudy, F.H. Martin, H.L. Atkins, R.Y. Hsu, N.C. Birkett, K.H. Okino, D.C. Murdock, and et al.** 1990. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell*. 63:213-224.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Mentorin Frau Dr. Kyeong-Hee Lee für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ebenfalls möchte ich mich bei ihr herzlich für die Unterstützung und Anleitung bedanken, die mich meine gesamte Doktorandenzeit begleitet haben. Mit steten Ratschlägen und Motivation stand sie mir immer zur Seite und hat mich wissenschaftliches Arbeiten gelehrt. Vielen Dank für die Hilfe und Förderung während meiner praktischen Arbeit und insbesondere für die Unterstützung, die du mir während dem Verfassen meiner Dissertation gegeben hast.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Niko Föger für die vielen hilfreichen Ratschläge und Anregungen während meiner praktischen Arbeit, sowie für die Diskussionen, die zum Fortgang und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz großer Dank gilt den Kollegen meiner Arbeitsgruppe, die gute Freunde geworden sind. Stets herrschte bei uns eine offene und kooperative Arbeitsatmosphäre. Insbesondere gilt mein Dank Patrizia Prilla für ihre technische Assistenz bei allen experimentellen Fragestellungen. Durch sie war es mir möglich die Techniken der Zellkultur und Zelltransfektion zu erlernen, sowie die Präparation von Mastzellen und die Durchführung von Western-Blot-Experimenten. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Weijia Cheng für die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine Hilfsbereitschaft und die stete Diskussionsbereitschaft. Lekha Nath gebührt mein Dank für ihre Freundschaft, Unterstützung, Motivation und ihre Hilfestellung bei mikroskopischen Fragestellungen. Xuan-Hung Nguyen, Azhar Kamal und Gulnar Fatthakova möchte für die kollegiale Zusammenarbeit danken und den Zusammenhalt der unsere Arbeitsgruppe ausmacht.

Meinen Eltern und meinen Freunden gilt mein abschließender Dank. Ohne ihre bedingungslose Hilfe, Wegweisung und Unterstützung wären mein Weg und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von Frau Dr. Kyeong-Hee Lee, am Forschungszentrum Borstel in der Laborgruppe Molekulare Immunologie angefertigt.

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Borstel, den 15.08.2011

Beate Schurek