

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und  
Allergologie der Medizinischen Fakultät Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur transkriptionellen und posttranskriptionellen  
Regulation der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit an humanen Mastzellen  
unterschiedlicher Reifegrade

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Staltmaier

aus Hamm

Gutachter/in:     1. Prof. Dr. med. T. Zuberbier  
                          2. Prof. Dr. med. E. Hamelmann  
                          3. Prof. Dr. med. R. Mösges

Datum der Promotion: 19.11.2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
1.1	Mastzellen .....	7
1.1.1	Die Entdeckung der Mastzelle .....	7
1.1.2	Die Rolle der Mastzelle in allergischen Reaktionen.....	7
1.1.3	Die Rolle der Mastzelle beim Bindegewebsumbau.....	9
1.1.4	Die Rolle der Mastzelle in der Pathogenabwehr und entzündlichen Erkrankungen.....	10
1.1.5	Die Differenzierung der Mastzelle .....	11
1.1.6	Die Heterogenität der Mastzelle.....	13
1.1.7	Die humane Mastzelllinie HMC-1.....	13
1.1.8	Die Zelllinie 5C6 - ein reiferer Phänotyp der Zelllinie HMC-1 .....	14
1.1.9	Die Mastzelllinie LAD 2 als intermediär reife Zelllinie .....	15
1.2	Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit und ihr Ligand SCF .....	16
1.2.1	Der strukturelle Aufbau von c-kit.....	16
1.2.2	SCF- "Stem Cell Factor"- der Ligand von c-kit.....	17
1.2.3	Die zelluläre Funktion von c-kit und seine Rolle in der Signaltransduktion .....	19
1.2.4	Expression von c-kit .....	22
1.2.5	Mutationen im c-kit-Gen und ihre Rolle in der Tumorgenese .....	23
1.2.6	Die Regulation von c-kit .....	24
1.2.7	Internalisierung nach Ligandenbindung .....	25
1.3	ATRA.....	27
1.3.1	Metabolismus der <i>all-trans</i> -Retinsäure .....	27
1.3.2	Signalweg der <i>all-trans</i> -Retinsäure .....	28
1.3.3	ATRA-Effekte auf die Hämatopoese .....	29
1.3.4	Der Einfluss von <i>all-trans</i> -Retinsäure auf Mastzellen .....	30
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
3.1	Materialien.....	35
3.1.1	Reagenzien .....	35
3.1.2	Enzyme .....	36
3.1.3	Antikörper .....	36
3.1.4	Laborgeräte .....	37
3.1.5	Puffer.....	39

3.1.6	Medien.....	40
3.2	Methoden .....	41
3.2.1	Die Isolierung der Mastzellen.....	41
3.2.2	Die Trennung von Epidermis und Dermis .....	41
3.2.3	Die Dispergierung der Dermis.....	41
3.2.4	Die Aufreinigung der Mastzellen .....	42
3.3	Die Zellkultur .....	43
3.3.1	Die Kultur der Zelllinie HMC-1.....	43
3.3.2	Die Kultur der Zelllinie HMC-1 5C6.....	43
3.3.3	Die Kultur der Zelllinie LAD 2.....	44
3.3.4	Die Kultur der kutanen Mastzellen .....	44
3.3.5	Die Bestimmung von Zellzahl und -durchmesser .....	44
3.4	Die Behandlung der Zellen.....	45
3.4.1	Behandlung mit Cycloheximid und Actinomycin D.....	45
3.4.2	Die Behandlung mit SCF.....	45
3.4.3	Die Behandlung mit STI571 .....	46
3.4.4	Die Behandlung mit all- <i>trans</i> -Retinsäure .....	46
3.4.5	Die Behandlung mit Cycloheximid, Actinomycin D und SCF.....	47
3.4.6	Messung der Proben mittels Durchflußzytometrie und Auswertung der ermittelten Daten .....	47
3.5	Präparation von Kernextrakten aus den drei Mastzellarten .....	49
3.6	Proteinbestimmung .....	50
3.7	Der elektrophoretische Mobilitäts <i>shift</i> -Assay als Methode zur Untersuchung der Genregulation .....	50
3.7.1	Die nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	52
3.7.2	Die Interpretation des EMSA.....	54
3.8	Statistik.....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>56</b>
4.1	Untersuchungen zum Grundumsatz von c-kit bei unterschiedlichen Mastzellsystemen .....	56
4.1.1	Die Beeinflussung der Oberflächenexpression von c-kit durch Inhibitoren der Transkription und de-novo-Proteinsynthese .....	56
4.1.2	Einfluß der Ligandenbindung auf die Zelloberflächenexpression von c-kit in drei verschiedenen Mastzellsystemen .....	59
4.1.3	Hemmung der Liganden-induzierten Internalisierung des Rezeptors durch STI571 .....	61

4.1.4	Einfluß der Inkubation der Mastzellen mit SCF auf das Verhalten bei der Behandlung der Zellen mit Inhibitoren der Transkription und de-novo-Proteinsynthese .....	65
4.2	Effekte von all- <i>trans</i> -Retinsäure auf den Grundumsatz von c-kit.....	68
4.2.1	Kurzfristeffekte von ATRA auf die Zelloberflächenexpression von c-kit bei den drei verschiedenen Mastzellsystemen .....	68
4.3	Versuch zur Hemmung der Degradierung des c-kit-Rezeptors durch die Proteasominhibitoren ALLN und Lact. ....	70
4.4	Die transkriptionelle Regulation von c-kit bei Mastzellen verschiedener Reifegrade und der Einfluß von ATRA auf diesen Prozess .....	72
4.4.1	Die Relevanz des Transkriptionsfaktors Sp1 bei c-kit in den drei Mastzellsystemen ....	72
4.4.2	Das mögliche Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors Sp1 in humanen Mastzellen, abgeleitet aus EMSA-Studien .....	73
4.4.3	Der Nachweis der Bindung von Sp1 an die Promotorregion des humanen c-kit-Gens in Kernextrakten der drei Mastzellsysteme .....	74
4.4.4	Der Nachweis der Bindung von MITF bzw. SCL an die Promotorregion des humanen c-kit-Gens in den drei Mastzellsystemen .....	78
4.4.5	Untersuchungen zum Einfluß der Behandlung mit all- <i>trans</i> -Retinsäure auf das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren .....	83
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	86
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
5.1	Die Expression von c-kit nach Hemmung der Transkription und de novo-Proteinsynthese .....	90
5.2	Die Expression von c-kit nach Ligandenbindung .....	92
5.3	Die Wirkung des selektiven Rezeptortyrosinkinaseinhibitors STI571 auf HMC-1 und LAD 2-Zellen.....	95
5.4	Die Herunterregulation des Rezeptors durch Inhibitoren der Transkription und Translation in Anwesenheit von SCF.....	97
5.5	Der Einfluss von ATRA auf die Zelloberflächenexpression von c-kit .....	99
5.6	Der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Kit- Expression .....	101
5.7	Die transkriptionelle Regulation von c-kit in Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade .....	102
5.8	Der Einfluss von all- <i>trans</i> -Retinsäure auf das Bindungsverhalten unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren .....	107
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>108</b>

<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>118</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>119</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Mastzellen

### 1.1.1 Die Entdeckung der Mastzelle

Die menschliche Mastzelle wurde erstmals 1878 von Paul Ehrlich im Rahmen seiner Dissertation als solche benannt und beschrieben [Ehrlich P 1878].

Diese war zuvor von Waldeyer in die heterogene Kategorie der von ihm entdeckten Plasmazellen gezählt worden, von denen Ehrlich die kubische bis ovale Bindegewebszelle mit zahlreichen Granula und zentralem, meist rundem Zellkern durch ihre Reaktivität in Anilinfärbungen abgrenzte [Crivellato E *et al.* 2003]. Dieser, Metachromasie genannte Effekt, stellt sich bei der Anfärbung der Mastzelle mit Toluidinblau als Farbumschlag nach violett dar und beruht, wie man heute weiß, auf dem Vorhandensein negativ geladener Glycosaminglykane, vor allem dem in zahlreichen Granula vorliegenden hochsulfatierten Heparin.

Diese Beobachtung führte zur Namensgebung der „Mast“zelle, da diese durch die gefärbten Granula wie „gemästet“ aussieht [Ehrlich P 1878]. Mastzellen haben einen Anteil von 2-8% an den dermalen Zellen. Sie sind neben Ihrem Vorkommen in der Haut vor allem im Respirationstrakt der Lunge und im Gastrointestinaltrakt lokalisiert [Bienenstock J *et al.* 1987].

In der Haut sind die 6-17 µm großen gewebsständigen Mastzellen vorwiegend in der Umgebung von Blutgefäßen, Talgdrüsen und Haarfollikeln zu finden. Eine enge Anlagerung an Nervenzellen ist ebenfalls beschrieben worden [Bienenstock J *et al.* 1991]. Mehr als 100 Jahre nach ihrer Entdeckung sind auch heute noch nicht alle Aspekte ihrer Effektorfunktion in allergischen Reaktionen, sowie physiologischen und pathophysiologischen Prozessen geklärt.

### 1.1.2 Die Rolle der Mastzelle in allergischen Reaktionen

In allergischen Reaktionen und Asthma scheint die aktivierte Mastzelle eine der wichtigsten Effektorzellen überhaupt zu sein. Sie nimmt neben ihrer Rolle in der Induktion allergischer Reaktionen, auch die Position einer multifunktionalen

Entzündungszelle in der angeborenen und erworbenen Immunität ein [Marshall JS *et al.* 2004].

Durch die Aktivierung der Mastzelle wird ihre Degranulation und die damit verbundene Freisetzung präformierter und in Granula gespeicherter Mediatoren ausgelöst.

Dieser Vorgang kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Gut bekannt ist der Weg der Aktivierung mit Hilfe des tetrameren hochaffinen IgE-Rezeptors Fc $\epsilon$ RI [Blank U *et al.* 1998]. Dieser Rezeptor ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, die sich aus einer IgE-bindenden  $\alpha$ -Kette, einer signalverstärkenden  $\beta$ -Kette und zwei homologen signalübertragenden  $\gamma$ -Ketten zusammensetzen [Lin S *et al.* 1996, Ra C *et al.* 1989].

Werden IgE-Moleküle gebunden, schließt sich die Quervernetzung durch multivalente Antigene oder Antikörper an. Darauf folgt die Aktivierung einer intrazellulären Signalübertragungskette über Tyrosinkinase, Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), Inositoltrisphosphat (IP $_3$ ), Diacylglycerin (DAG) und Proteinkinase C (PKC) an. Dadurch wird Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt und darüber hinaus der Einstrom von extrazellulärem Calcium gefördert [Rawlings DJ *et al.* 1996, Streb H *et al.* 1983, Hoth M *et al.* 1993]. Der erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel ermöglicht die Freisetzung der Mediatoren aus der Mastzelle.

Darüber hinaus ist eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Zuge der Mastzellaktivierung bekannt, die die Transkription verschiedener Zytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-5 induzieren [Csonga R *et al.* 1998]. Eine Vermittlung stimulatorischer Impulse ist neben der Aktivierung durch IgE auch durch nichtimmunologische Mechanismen möglich. Das Neuropeptid Substance P, welches aus Nervenendigungen freigesetzt wird [Schenker C *et al.* 1976], ist beispielsweise in der Lage, über G-Proteine Signalkaskaden zu aktivieren, die ihrerseits die Freisetzung diverser Mediatoren auslösen [Krumins SA *et al.* 1993, Suzuki R *et al.* 1999].

Die Zugabe von Calcium-Ionophor (Ca-Ionophor) (z.B. A23187) stellt eine unphysiologische und rezeptorunabhängige Möglichkeit der Stimulation dar. Durch seine hydrophobe Oberfläche, die es nach Bindung von extrazellulären Calciumionen erreicht, kann es die Lipiddoppelschicht der Zellmembran durchdringen. Die Abgabe der

Ionen im Inneren der Zelle führt zu erhöhter Calcium-Konzentration, die wiederum die Freisetzung präformierter Mediatoren bedingt [Szabo G *et al.* 1981]. Die Stimulation der Zellen bewirkt eine mehrere Stunden anhaltende Ausschüttung unterschiedlicher Mediatoren. Es erfolgt zuerst die Freisetzung präformierter Granula, die hauptsächlich Histamin, Serinproteasen und weitere Enzyme enthalten. Aus der in der Zellmembran gebundenen Arachidonsäure werden in der darauffolgenden halben Stunde Lipidmediatoren synthetisiert

Dazu zählen in erster Linie Prostaglandin D<sub>2</sub> und Leukotriene, die in einem zweiten Schub freigesetzt werden. Die Spätphase wird von der Synthese unterschiedlicher Zytokine mittels messenger-RNA (mRNA) geprägt. Dazu gehören - bei einigen Mastzellarten - TNF- $\alpha$ , die Interleukine 4, 5, 6, 8 und 13, der *fibroblast growth factor* (FGF) und der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), die innerhalb von Stunden in das umliegende Gewebe gelangen [Plaut M *et al.* 1989]. Das Histamin der freigesetzten Granula ist verantwortlich für den Juckreiz, den Anstieg der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur und Reflexe wie das Niesen, Husten und erhöhte gastrointestinale Motilität [Roth K *et al.* 2008].

### 1.1.3 Die Rolle der Mastzelle beim Bindegewebsumbau

Zusätzlich zu ihrer Rolle als Schlüsselzellen der allergischen Reaktion vom Soforttyp, wird Mastzellen ebenfalls eine Funktion bei der Beeinflussung des Bindegewebsumbaus und Mitwirkung bei der Wundheilung zugeschrieben [Garbuzenko E *et al.* 2002]. So ist die Beteiligung von Mastzellen in drei Phasen der Wundheilung bekannt: der entzündlichen Reaktion, der Angiogenese und der Reabsorption extrazellulärer Matrix. Dabei wird die entzündliche Reaktion durch die Freisetzung von Histamin und Arachidonsäuremetaboliten vermittelt [Kitamura Y *et al.* 1993].

Auch in der Angiogenese - unter physiologischen Bedingungen wie der Wundheilung, als auch bei pathologischen neoplastischen Stadien wie beim Tumorwachstum - scheinen Mastzellen von Bedeutung zu sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass Mastzellen mit zu den ersten Zellen gehören, die entstehende Tumore infiltrieren. Dort lagern sich Mastzellen an der Grenze zwischen gesundem und maligne verändertem

Gewebe an und finden sich oft in der Nähe von Microgefäßen der Tumorumgebung [Maltby S et al. 2009]. Die Mikrozirkulation sorgt dabei für die Ausbildung und Ernährung von Tumorzellen, wie auch die Ausbreitung über den Weg des Blutes. Andererseits ermöglicht eine gute Vaskularisierung des Tumors eine bessere Penetration mit Cytostatika, weshalb die Angiogenese einen wichtigen Platz im Geschehen neoplastischer Krankheiten einnimmt.

Es ist von vielen Autoren eine enge Verknüpfung von Mastzellen mit dem Wundheilungsprozess beschrieben worden [Nienartowicz A et al. 2006]. Nach einer Verletzung degranulieren ortsständige Mastzellen und setzen Immunmediatoren frei. Auch die Regulation der Infiltration der Wunde mit Neutrophilen durch Mastzellen wird diskutiert [Wilgus TA 2008].

Es wurde das Vorhandensein von MLMC (*mucosal like mast cells*) als auch CTMC (*connective tissue mast cells*) in Wunden durch Einwanderung in die Haut im Licht- und Elektronenmikroskop nachgewiesen, was für beide Mastzellarten eine Rolle bei der Wundheilung vermuten lässt. Zahlreiche Mastzellmediatoren wirken gefäßbildend und haben einen Einfluss auf die Proliferation und die Funktion von Endothelzellen. So induzieren SCF (*stem cell factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*) chemotaktische Migration in Gebiete der Neovaskularisierung. Der Mastzellmediator Tryptase ist in der Lage, Bindegewebe zu degradieren, um Platz für einsprossende Gefäße zu schaffen. Im Hinblick auf die Angiogenese als Ziel der Tumorbekämpfung und Behandlung der rheumatoiden Arthritis [Hiromatsu Y et al. 2003] kommt der Mastzelle auch auf diesem Gebiet große Bedeutung zu.

### **1.1.4 Die Rolle der Mastzelle in der Pathogenabwehr und entzündlichen Erkrankungen**

Die Rolle der Mastzelle in allergischen Reaktionen vom Soforttyp und verzögerten Typ ist neben der Übernahme weiterer Funktionen in Entzündungsreaktionen seit langem bekannt [Mousli M et al. 1992]. So kann die Zunahme ihrer Zahl am Ort der Entzündung in zahlreichen chronisch entzündlichen und proliferativen Reaktionen beobachtet

werden. Unter ihnen das Asthma bronchiale, die Allergische Rhinitis und die Rheumatoide Arthritis. Ähnliche Veränderungen zeigen auch Hauterkrankungen wie Mastozytose, Sklerodermie, Chronische Urtikaria, Urtikaria pigmentosa und Psoriasis [Metcalf DD 2008, Koshino T *et al.* 1996, Bentley AM *et al.* 1992, Grabbe J *et al.* 1994].

Die Ansammlung von Mastzellen am Ort der Entzündung wird auf eine gesteigerte Rekrutierung von Vorläuferzellen und ihre Differenzierung, sowie auf eine verstärkte Migration aus anderen Geweben zurückgeführt.

Die akute Aktivierung der Mastzelle ist ein typisches Kennzeichen vieler Arten von Gewebeverletzungen, sowie eine bekannte Antwort auf zahlreiche nichtpathogenassoziierte entzündliche Stimuli [Marshall JS *et al.* 2004]. Die Reaktivität von Mastzellen auf Pathogene ist seit vielen Jahren bekannt. Zunächst beschäftigte sich die Forschung mit der Degranulation von Mastzellen als Antwort auf parasitäre und bakterielle Produkte, ihre strukturellen Bestandteile, Toxine und immunglobulinbindende Proteine.

Neuerdings ließen sich ähnliche Fähigkeiten für eine Anzahl viraler Proteine und Wirtsproteine im Rahmen der antiviralen Antwort nachweisen. Der Rahmen der Reaktionsmöglichkeiten der Mastzelle erstreckt sich hier von der Degranulation mit der Freisetzung diverser präformierter Mediatoren bis hin zur Zytokin- und Chemokinproduktion [Marshall JS *et al.* 2004, 2003].

Die Gründe für die so breit gefächerte Mediatorantwort und deren Einfluß auf die Effizienz der angeborenen Immunität sind noch ungeklärt. Jedoch könnte ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention der Mastzellantwort im Zusammenhang mit der Entwicklung von Vakzinen und bei Allergien gewähren [Marshall JS *et al.* 2004].

### **1.1.5 Die Differenzierung der Mastzelle**

Sowohl Mastzellen als auch Basophile, als zweite wesentliche Effektorzellen des allergischen Geschehens, haben ihren Ursprung in der pluripotenten hämatologischen

Stammzelle, wobei während der Entwicklung bei Mastzellen und Basophilen unterschiedliche Prozesse ablaufen.

Basophile beenden ihre Differenzierung im Knochenmark, wohingegen Vorläufer der Mastzellen das Knochenmark verlassen, in das Bindegewebe oder die Mucosa einwandern, dort proliferieren und ihre Differenzierung zur Mastzelle im Gewebe abschließen. Für die Entwicklung humaner Mastzellen ist ein fibroblastenabhängiger Mechanismus notwendig. Anders bei Nager-Mastzellen, bei denen sowohl dieser als auch ein T-Zell-abhängiger Mechanismus in die Entwicklung einbezogen ist. Das Zytokin, welches im fibroblastenabhängigen Mechanismus eine wichtige Rolle übernimmt, scheint SCF der Ligand des c-kit-Rezeptors zu sein [Kitamura Y *et al.* 1993].

Der Mastzelle, die nach initialer Festlegung der Zelllinie in das Gefäßsystem einwandert, wo sie als Vorläufer eine phänotypisch unbestimmte Erscheinung von Zellen ohne Granula darstellt, fehlt der hochaffine IgE-Rezeptor, der für Gewebsmastzellen charakteristisch ist. Die vollständige Differenzierung findet in den jeweiligen Geweben statt. Bei murinen Mastzellprogenitorzellen, die in Bindegeweben lokalisiert sind, findet eine Differenzierung zu reifen Mastzellen statt, wogegen Progenitoren aus Lunge und Mucosa des kleinen Intestinums Progenitoren bleiben [Gurish MF *et al.* 2002].

Die für die Differenzierung der Gewebsmastzellen verantwortlichen Zytokine sind noch weitgehend unbekannt, wobei das stetige Vorhandensein von SCF eine notwendige, aber nicht ausreichende Bedingung darstellt. Im murinen System verläuft der Weg der Differenzierung über die Phasen eines myeloischen Progenitors, Granulozyten-Makrophagen-Vorläufer im Knochenmark zum Mastzellvorläufer [Gurish MF *et al.* 2006].

Im Humansystem entstehen Mastzellen aus CD34<sup>+</sup> und c-kit<sup>+</sup>-Progenitorzellen, aus denen ebenso ein Heranreifen zu Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Monozyten möglich wäre. Um den Kreis der möglichen Mastzellvorläufer im peripheren Blut einzugrenzen, wurde der Pool der CD34<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Zellen auch auf CD13-Expression untersucht, welches recht früh auf Nagermastzellen und humanen Mastzellen in Kultur exprimiert wird. CD13 ist als Marker myeloischer Zellen bekannt, wird jedoch nicht oder

nur in geringem Maße von Gewebemastzellen exprimiert. Die Zellkultur erfolgte mit Supplementierung von SCF, IL-3 und IL-6 [Kirshenbaum AS *et al.* 1994]. Dabei wurde festgestellt, dass die Mehrzahl der Zellen aus CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> und CD13<sup>-</sup>-Zellen reifte, Mastzellen jedoch nur aus den CD13<sup>+</sup>-Vorläuferzellen hervorgingen, die auch Monozyten hervorbringen konnten. Die Zugabe von IL-5 ließ die Zahl der Mastzellen in Kultur, nicht aber die Zahl der Monozyten ansteigen [Kirshenbaum AS *et al.* 1994].

### 1.1.6 Die Heterogenität der Mastzelle

Die neutralen Proteasen der Mastzellen sind die wohl präzisesten Marker der Heterogenität humaner Mastzellen. Es konnten zwei Klassen humaner Mastzellen identifiziert werden, wobei sogenannte MCTC sowohl Tryptase als auch Chymase, sowie Cathepsin-G ähnliche Protease und Mastzellcarboxylase enthalten, wohingegen MCT nur Tryptase, nicht aber die anderen neutralen Proteasen exprimieren. MCTC finden sich vorwiegend in Haut, Konjunktiven und intestinaler Submucosa, während MCT in den Alveolarsepten der Lunge und der intestinalen Mucosa vorliegen.

Die Entwicklung von in-vitro-Studien zur Untersuchung des Wachstums von Mastzellen hat den wichtigsten Wachstumsfaktor für Mastzellen verwendet: den Liganden von c-kit SCF. Wurden in einer Studie hämatopoetische Zellen nur in der Anwesenheit von SCF kultiviert, entstanden selektiv Mastzellen. Die Kombination von SCF mit anderen Zytokinen ermöglicht die Differenzierung zu anderen Zelllinien [Irani AM *et al.* 1994].

Zur Differenzierung von CD34<sup>+</sup>-Knochenmarkszellen zu Mastzellen spielt Thrombopoietin (TPO) in Kombination mit SCF eine große Rolle, indem es eine 3-15 Wochen anhaltende Produktion von Mastzellen induziert [Sawai N *et al.* 1999]. Abgeleitet von Effekten von Wachstumsfaktoren auf spätere Stadien der Mastzellreifung, lässt sich der Einfluß von TPO in Kombination mit SCF auf das frühe Stadium der Mastzellreifung beschränken, da im weiteren Verlauf scheinbar alleine SCF das Wachstum unterstützt.

### 1.1.7 Die humane Mastzelllinie HMC-1

In den späten 80er Jahren konnte die unreife Mastzelllinie HMC-1 aus dem peripheren Blut einer an Mastzelleukämie leidenden Patientin gewonnen werden [Butterfield JH *et*

al. 1988]. Diese Zellen haben in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeiten mit unreifen Mastzellen, wachsen in Abwesenheit menschlichen Plasmas und weisen eine einzigartige chromosomale Translokation auf. Diese besteht im Austausch eines Teils des langen "Armes" des Chromosoms Nr.16 in den langen "Arm" des Chromosoms Nr.10. Diese Zelllinie wurde als *Human Mast Cell line1* (HMC-1) bezeichnet. Aufgrund der klinischen Untersuchung der Patientin, konnte in cytochemischen Studien eine negative Reaktion mit Peroxidase und nonspezifischer Esterase, jedoch eine positive Reaktion mit Chloracetatesterase und Toluidinblau nachgewiesen werden. Diese Färbungsreaktivität lässt auf eine Verwandtschaft mit Mastzellen und nicht mit Basophilen oder unreifen Neutrophilen schließen. Die weiteren Befunde führten zur Diagnose der Mastzelleukämie. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellen ergaben ähnliche Strukturen wie die unreifer klonierter Mäusemastzellen. Die Zellen weisen runde bis ovale Kerne, unreife Granula und zytoplasmatische Fortsätze auf.

Es können zahlreiche Mitochondrien, Fettkörper und kleine Granula mit Chromatin erkannt werden. Der Histamingehalt der Zellen beträgt weniger als 1 pg/Zelle, den Zellen fehlen T- und B-Lymphozyten-Marker sowie Zellmarker myeloischer Zellen. Die Zellen exprimieren keinen IgE-Rezeptor. In Kultur formieren sich Zellklumpen und kleine Aggregate, wenn die Zellen serumfrei gehalten werden. Außerdem verhalten sich die Zellen in Kunststoff-Zellkulturflaschen kaum adhärent. Mit der Möglichkeit der erfolgreichen Langzeitkultur dieser Zelllinie ist somit ein potentes Werkzeug zur Erforschung von Mastzellen entdeckt worden, die auch in dieser Arbeit im Vergleich zu kutanen, reifen Mastzellen eingesetzt wurde [Butterfield JH *et al.* 1988].

### **1.1.8 Die Zelllinie 5C6 - ein reiferer Phänotyp der Zelllinie HMC-1**

Mit der Etablierung des Subklons HMC-1 5C6 der humanen Zelllinie HMC-1 in unserem Labor konnte der Phänotyp einer unreifen Mastzelle kultiviert werden, der fortgeschrittenere Zeichen der Differenzierung aufweist als die Original-Zelllinie [Weber S *et al.* 1996]. Der höhere Differenzierungsgrad spiegelt sich in signifikant höheren Prozentzahlen der Zellen wider, die den FcεR1α exprimieren. Der IgE-Rezeptor wurde in dieser Studie von 65% der 5C6-Zellen im Vergleich zu nur 12% der HMC-1 Zellen exprimiert. Im Vergleich war jedoch die Expression von c-kit, CD11b, CD11c und CD54

innerhalb der beiden Zelllinien ähnlich. Das Glycoprotein LFA-1 (CD11a/CD18) wurde jedoch höher von den HMC-1 5C6-Zellen als der Originalzelllinie exprimiert. Die Menge an Tryptase in 5C6-Zellen überstieg die der HMC-1-Zellen, während der Histamingehalt der beiden Zelllinien ungefähr gleich war. Unterschiede sind auch in der Anfärbbarkeit mit Toluidinblau zu sehen, die in mehr als 90% der 5C6-Zellen, jedoch nur in 20% der HMC-1-Zellen gegeben ist. Im Allgemeinen sind die Morphologie und die Färbereaktion der 5C6-Zellen homogener als die der HMC-1-Zellen. Auch auf dem ultrastrukturellen Niveau sind Unterschiede zwischen der Originalzelllinie und dem Subklon zu erkennen. So sind die 5C6-Zellen mit mehreren gefüllten Granula von den HMC-1-Zellen zu unterscheiden, die kaum dichte Granula zeigen.

Auch diese Beobachtung weist auf eine höhere Differenzierungsstufe als die der HMC-1 Zellen hin. Damit ist der Subklon HMC-1 5C6 noch geeigneter, mastzellvermittelte Prozesse zu studieren [Weber S *et al.* 1996].

### **1.1.9 Die Mastzelllinie LAD 2 als intermediär reife Zelllinie**

Aus dem Knochenmark eines Patienten mit einem Mastzellsarkom konnte im Jahre 2003 die SCF-abhängige Zelllinie LAD 2 isoliert werden [Kirshenbaum AS *et al.* 2003].

LAD 2-Zellen haben die strukturellen Merkmale humaner Mastzellen und exprimieren R $\alpha$  $\epsilon$ RI, CD4, CD9, CD13, CD14, CD22, CD31, CD32, CD45, CD64, CD71, CD103, CD117, CD132, CXCR4 (CD184), CCR5 (CD195) sowie intracytoplasmatisches Histamin, Tryptase und geringe Mengen Chymase. Im Gegensatz zu den Zelllinien HMC-1 und HMC-1 5C6 tragen LAD 2-Zellen keine aktivierende Mutation im Kodon 816 von c-kit. LAD 2-Zellen setzen nach Aggregation durch FC $\epsilon$ RI oder Fc $\gamma$ RI  $\beta$ -Hexosaminidase frei. Die ständige Verfügbarkeit dieser Zelllinie bietet optimale Möglichkeiten, das Verhalten humaner Mastzellen zu studieren, da sie in ihrem Differenzierungsstadium am meisten dem der reifen Mastzelle ähnelt.

## **1.2 Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit und ihr Ligand SCF**

### **1.2.1 Der strukturelle Aufbau von c-kit**

C-kit ist das Proteinprodukt, welches von dem proto-Onkogen c-kit kodiert wird und den transmembranen Tyrosin-Kinase-Rezeptor für den Wachstumsfaktor Stammzellfaktor (SCF) darstellt. Das c-kit-Gen befindet sich am *White spotting (W) locus* bei Mäusen, während sein Ligand SCF durch den sogenannten *Steel (Sl) locus* kodiert wird [Besmer P *et al.* 1991]. Der Name c-kit leitet sich aus seinem viralen Gegenstück v-kit ab, welches im Genom des Hardy-Zuckerman 4 *feline sarcoma virus* gefunden wurde (*kitten*) und ein oncogenetisches Virus mit akut transformierendem Potential darstellt, das aus dem Fibrosarkom einer Katze isoliert werden konnte [Besmer P *et al.* 1986]. V-kit unterscheidet sich vom humanen c-kit (*cellular*) darin, dass ihm die transmembranen und extrazellulären Domänen fehlen. Vom humanen c-kit existieren vier verschiedene Isoformen.

Die extrazelluläre Region des Moleküls besteht aus fünf immunglobulinähnlichen Domänen, von denen drei an der Bindung des Liganden SCF beteiligt sind. C-kit als Monomer existiert als inaktive Konformation wenn keine Ligandenbindung besteht. Die Quervernetzung von c-kit durch SCF induziert eine Konformationsänderung in der Kinasedomäne, die die Bindung von Adenosintriphosphat und die Phosphorylierung von Tyrosinresten ermöglicht.

SCF existiert als Homodimer, dessen Bindung an c-kit in der Dimerisierung zweier Rezeptor-Monomere resultiert. Die Dimerisierung des Rezeptors aktiviert wiederum die enzymatische Aktivität der intrazellulären Domäne und resultiert in der Autophosphorylierung des Rezeptors.

Die Tyrosin-Kinase-Domäne der intrazellulären Region von c-kit gehört zur Familie der Typ-3-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist strukturell vergleichbar mit dem *platelet-derived-growth-factor-receptor* (PDGFR) und dem *monocyte-colony-stimulating factor receptor* (M-CSFR). Alternatives mRNA-Spleißen an zwei Stellen führt zu den vier Isoformen des Rezeptors, die sich durch Vorhandensein oder Fehlen der Tetrapeptidsequenz GNNK in der extrazellulären Region oder einem einzelnen Serinrest in der Interkinaseregion der cytoplasmatischen Region unterscheiden. Die jeweils korrespondierenden Formen existieren nicht in der Maus.

Es existiert ebenfalls eine lösliche Form des Rezeptors, die durch Proteolyse entsteht und in relativ hohen Spiegeln im Serum vorkommt [Ashman LK *et al.* 1999]. Die Region zwischen der Tyrosin-Kinase-Domäne, die durch ein *Insert* aus 77 Aminosäuren in zwei Teile getrennt wird und der transmembranen Region wird als Juxtamembran-Domäne bezeichnet und reguliert die enzymatische Aktivität der Tyrosin-Kinase-Domäne.

### 1.2.2 SCF- "Stem Cell Factor"- der Ligand von c-kit

Der Ligand der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit, Stammzellfaktor (SCF), spielt eine große Rolle in der Hämatopoese und stellt einen Wachstumsfaktor auch für Mastzellen dar [McNiece IK *et al.* 1995]. SCF-Aktivität ist jedoch nicht nur beschränkt auf die Hämatopoese, sondern ist ebenfalls ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Keimzellen und Melanozyten.

SCF hat durch das Zusammenwirken mit anderen Faktoren, unter anderem G-CSF, ein großes klinisches Potential, indem es die Mobilisierung von Stammzellen in peripherem Blut verstärkt.

Im Zusammenspiel mit G-CSF, GM-CSF und IL-3 stimuliert SCF *in vitro* die Proliferation und Differenzierung von Zellen der myeloischen Reihe sowie von Megakaryozyten [McNiece IK *et al.* 1995].

SCF induziert Chemotaxis und Überleben von Mastzellen, sowie die Proliferation und Differenzierung von unreifen CD34-Vorläuferzellen, *in vitro* die Adhäsion an extrazelluläre Matrix, Degranulation mit Expression und Verstärkung der Sekretion von Histamin und proinflammatorischen Zyto- und Chemokinen. Auch bei Eosinophilen führt SCF zu Adhäsion und Aktivierung. Die Expression von SCF ist beim Menschen ebenso wie in der Maus in entzündlichen Geschehen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erhöht [Reber L *et al.* 2006]. Hemmung des SCF/c-kit- Weges führt zu verminderter Histaminausschüttung und Infiltration mit Mastzellen und Eosinophilen, IL-4-Produktion und Hyperreaktivität *in vivo*.

Desweiteren verstärkt SCF die antigeninduzierte Degranulation von Lungenmastzellen und bewirkt eine Hyperplasie von Mastzellen bei subkutaner Injektion [Da Silva CA *et al.* 2006]. Bei Asthmapatienten kann eine erhöhte Expression von SCF im

Respirationstrakt nachgewiesen werden, welche durch die Behandlung mit Glucocorticoiden rückgängig gemacht werden kann. Eine weitere Rolle für SCF wird in Krankheiten vermutet, die mit einer erhöhten lokalen Mastzellzahl und -aktivierung einhergehen, wie es in den Atemwegen beim Asthma der Fall ist. So wird SCF hier als therapeutisches Ziel erforscht, um die Zahl und Aktivierung von Mastzellen zu kontrollieren.

Die Bedeutung von SCF auch in der nicht physiologischen Hämatopoese ist am Beispiel der AML (akut myeloischen Leukämie) erforscht worden. So stimuliert SCF das Wachstum von CD34+-leukämischen Progenitorzellen in Patienten mit akut myeloischer Leukämie. Die mRNA-Expression des SCF-Rezeptors c-kit in AML-Blasten war im Vergleich mit Kontrollzellen von Normalprobanden signifikant erhöht. Da SCF die Proliferation von CD34+-AML-Zellen stark erhöht, wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die Ursache für die geringe Resonanz von Patienten mit CD34+-akuter myeloischer Leukämie auf Chemotherapeutika in der SCF-induzierten Resistenz gegen Apoptose begründet sein könnte. SCF senkte die Rate der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose um bis zu 50% in allen CD34+-leukämischen Zellen - ein Effekt, der durch Einsatz von Antikörpern gegen c-kit umgekehrt werden konnte, was die Rolle von SCF in der Resistenz gegen Chemotherapie-induzierte Apoptose in CD34+-leukämischen Zellen bestätigt [Hassan HT *et al.* 1996].

SCF wird bei Mäusen sowie beim Menschen von Stromazellen des Knochenmarks gebildet und liegt sowohl in einer membrangebundenen Form als auch in einer löslichen Form vor, die sich durch unterschiedliches Spleißen oder proteolytische Spaltung ergeben. Das Verhältnis der beiden Isoformen zueinander kann von Gewebe zu Gewebe stark schwanken. Die unterschiedlichen Effekte der beiden Formen auf Proliferation und Überleben hämatopoetischer Zellen und Vorläuferzellen sind vielfach beschrieben [Ashman LK *et al.* 1999]. Miyazawa *et al.* beschrieben anhaltendere Effekte für die membranständige Form des SCF und vermuteten im löslichen SCF die Fähigkeit c-kit herunterzuregulieren [Miyazawa K *et al.* 1995].

So weisen Mäuse, die ausschließlich die lösliche Form des SCF exprimieren (*Steel-dickie* Sl<sup>d</sup>), Abweichungen in der Blutbildung, Pigmentierung und Reproduktion auf [Geissler EN *et al.* 1988].

### 1.2.3 Die zelluläre Funktion von c-kit und seine Rolle in der Signaltransduktion

Durch Beobachtungen bei Mäusen, die c-kit mangelhaft exprimieren, konnte die Rolle dieses Rezeptors herausgearbeitet werden. Diese Mäuse weisen Krankheitsbilder wie makrozytische Anämie, fehlende Fellpigmentierung, Sterilität und eine verringerte Anzahl von Thymus- und gastrointestinalen Schrittmacherzellen auf.

Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-kit und die Interaktion mit seinem Liganden SCF spielt nicht nur eine außerordentliche Rolle in der Hämatopoese, Melanogenese und Fruchtbarkeit, wie die Regulation von Oogenese, Folliculogenese und Spermatogenese, sondern hat Einfluß auf das Überleben von Zellen, sowie deren Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und funktionelle Aktivierung [Besmer P *et al.* 1991].

Die Funktion des Rezeptors ist in der Ligandenbindung und der dadurch induzierten Autophosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne, sowie der Phosphorylierung nachgeschalteter Signalproteine begründet, die eine komplexe Signalkaskade initiieren, die in der Modulation der Genexpression gipfeln.

SCF aktiviert eine ganze Reihe von Signaltransduktoren, von denen der am besten untersuchte die Phosphatidylinositol-3-Kinase sein dürfte.

Phosphatidylinositol-3-Kinase interagiert mit der phosphorylierten Form von Y721 von c-kit. Die SCF-induzierte Rekrutierung der PI-3-Kinase führt zur Aktivierung von Akt und damit zu anschließender Phosphorylierung des proapoptotischen Faktors Bad. Diese Phosphorylierung hemmt die Aktivierung von Bad und begünstigt das Überleben der Zellen [Reber L *et al.* 2006].

Die PI-3-Kinase ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einer 85 kDa-regulatorischen Untereinheit und einer 110 kDa katalytischen Einheit, wovon die p85-Einheit, die zwei SH<sub>2</sub>-Domänen, eine SH<sub>3</sub>-Domäne und eine prolinreiche Domäne enthält, eine Rolle in Protein-Protein-Intraktionen spielt. Steigerungen in der Autophosphorylierungsaktivität der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen rekrutieren p85 durch die SH<sub>2</sub>-Domäne und lokalisieren die 110-kDa-Untereinheit in der Nähe von potentiellen Substraten wie dem Phosphatidylinositol.

Die Stimulation mit SCF induziert also die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die für die SCF-induzierte Mitogenese und das Überleben der Zelle, sowie die Aktivierung der Serin/Threonin Proteinkinase Akt benötigt wird [Geissler EN *et al.* 1988].

### **Der MAP-Kinase Signalweg**

Grb2 ist ein Adapterprotein, welches an die phosphorylierte Form von Y703 und Y936 von c-kit bindet. Grb2 ist mit dem sos-Protein (*son-of-sevenless*) eng verknüpft, interagiert mit und aktiviert als Komplex das kleine G-Protein Ras, welches zur Aktivierung von Raf-1 und letztlich der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK (c-Jun N-terminal kinase) führt. Es ist bekannt, dass die MAP-Kinasen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und damit die Genaktivität beeinflussen.

Neben der Rolle in der Signaltransduktion wurde auch ein Mitwirken an der c-kit Degradation durch Grb2 beschrieben. Dies geschieht durch die Rekrutierung von Cbl zu c-kit, was zu Ubiquitinierung und Degradation des Rezeptors führt [Sun J *et al.* 2007]

### **Der PLC- $\gamma$ Signalweg**

Die Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  konnte in einer Studie nur für die membrangebundene Form von SCF nachgewiesen werden. PLC- $\gamma$  interagiert in p815-transformierten murinen Mastzellen, die eine konstitutive Phosphorylierung aufweisen, auch in Abwesenheit des Liganden mit c-kit. In HEK-293-Zellen, die eine EGF-Rezeptor-c-kit Chimäre überexprimieren, interagiert PLC- $\gamma$  mit c-kit nach Stimulierung durch EGF (*epidermal growth factor*).

Desweiteren führt in COS-Zellen die Transfektion mit einer verkürzten Form von c-kit (tr-kit), die aus der Kinasedomäne von c-kit besteht, zur Aktivierung der PLC- $\gamma$ . Die Bindungsstelle für PLC- $\gamma$  scheint die phosphorylierte Y730 - Domäne von c-kit zu sein.

### **Die Janus-Kinase-Kaskade**

Die Familie der Janus Protein Kinasen wird durch Liganden aktiviert, die mit einer Auswahl von Rezeptoren interagieren, denen die intrinsische Kinaseaktivität fehlt.

Die Rolle der Januskinasen in Antworten, die von Rezeptortyrosinkinasen vermittelt werden, ist bisher noch nicht geklärt. Jedoch ist ein Zusammenhang zwischen JAK2 und c-kit und seine Aktivierung durch SCF bekannt. SCF stimuliert dabei die schnelle

und vorübergehende Phosphorylierung von Tyrosinresten von JAK2 [Weiler SR *et al.* 1996]. Den Januskinasen nachgeschaltet, sind die sogenannten *signal transducers and activators of transcription* (STATs). Diese Transkriptionsfaktoren sind assoziiert mit phosphorylierten Tyrosinresten von aktivierten Rezeptoren, sind sowohl tyrosin- als auch serinphosphoryliert, kommen als Homo- und/oder Heterodimere vor, translozieren zum Zellkern, binden DNA und induzieren die Transkription einer Reihe von Genen.

SCF leitet die Koppelung von STAT1 an c-kit ein, erhöht die Tyrosinphosphorylierung und die DNA-Bindungskapazität von STAT1 in hämatopoetischen Zelllinien und normalen Progenitorzellen. Desweiteren aktiviert SCF STAT5 und induziert die Serinphosphorylierung von STAT3 [Ryan JJ *et al.* 1997, Gotoh A *et al.* 1996]. Studien an Mäusen, die einen JAK2-Mangel aufweisen, haben einen Tod im Uterus auf einer ähnlichen embryonalen Entwicklungsstufe nachgewiesen wie bei Mäusen, die einen SCF- oder c-kit-Mangel aufwiesen. Diese Studien legen eine wichtige Rolle für JAK2 für optimale Antworten auf SCF in hämatologischen Progenitorzellen nahe.

### **Src im Zusammenhang mit c-kit-Signaltransduktion**

SCF induziert die Aktivierung verschiedener Mitglieder der Src-Familie, wie Src, Tec, Lyn und Fyn, die sich mit dem phosphorylierten Y568 und Y570 in der Juxtamembran Domäne von c-kit verbinden [Broudy VC *et al.* 1999, Linnekin D 1999]. Mitglieder der Src-Familie haben Bedeutung in einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie Zellmotilität, Adhäsion, Zellzyklusprogression, Überleben und Differenzierung. Sie agieren im Zusammenspiel mit einer oder mehreren Komponenten der bekanntesten Signaltransduktionswege.

Obwohl eine Aktivierung von Src im Zusammenhang mit Rezeptortyrosinkinase wie dem *platelet-derived-growth-factor* beschrieben ist, ist auch hier wenig über eine Assoziation mit c-kit bekannt. Dagegen wird Lyn, ein Mitglied der Src-Familie, in SCF-abhängigen Zelllinien und normalen Progenitorzellen stark exprimiert und erfährt durch SCF eine Aktivitätssteigerung und Verstärkung der Verbindung mit c-kit [Linnekin D *et al.* 1997]. Studien mit sogenannten *antisense*-Oligonucleotiden mit Defiziten im Lyn-Protein zeigten eine Hemmung der SCF-induzierten Proliferation. An murinen, aus dem Knochenmark generierten Mastzellen konnte 2005 durch Shivakrupa gezeigt werden,

dass Lyn zur SCF –induzierten Phosphorylierung von c-kit als auch Jnks und STAT3 beiträgt. Auf der anderen Seite wurde eine mögliche negative Regulation des PI3-Kinase/Akt Signalweges diskutiert [Shivakrupa R, Linnekin D 2005].

### 1.2.4 Expression von c-kit

C-kit wird im Gewebe von Mastzellen, Melanozyten, im Hoden und im Knochenmark, im embryonalen Hirn sowie speziell von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert [Ashman LK *et al.* 1993]. Aber auch ein breites Spektrum von Zellen außerhalb der hämatopoetischen Reihe wie Gefäßendothelzellen und die *Interstitial cells of Cajal*, die die Darmmotilität induzieren, Astrozyten, Nierentubuli, Epithelzellen der Brustdrüsen und Schweißdrüsen, exprimieren in variablem Umfang c-kit. Im menschlichen blutbildenden System exprimieren 70% der CD34<sup>+</sup>-Zellen im Knochenmark c-kit, darunter hämatopoetische Vorläuferzellen, die auf eine Zelllinie beschränkt sind, und primitive Zellen, die unter in-vitro-Bedingungen fähig sind, Langzeit-Hämatopoese aufrechtzuerhalten. Im Laufe der Differenzierung der Zellen in ihre reife Form wird die Expression von c-kit üblicherweise herunterreguliert. Eine Ausnahme machen in diesem Aspekt die Mastzellen, die c-kit auch in reifem Zustand in hohem Maße exprimieren. Der Grund dafür ist in der Bedeutung des Rezeptors für das Überleben, die Differenzierung, die Chemotaxis und funktionelle Aktivierung der Mastzelle zu sehen.

Übereinstimmend mit dem Effekt von SCF auf die in-vitro-Lymphopoese beim Menschen und die B- und T-Zellentwicklung in vitro als auch in vivo, wurde eine c-kit-Co-Expression auch in einem kleinen Teil mononukleärer Zellen mit lymphoiden Markern im Knochenmark der Maus und des Menschen nachgewiesen.

Im Laufe ihrer Differenzierung wird c-kit auf allen hämatopoetischen Zelllinien herunterreguliert, abgesehen von Mastzellen, die auch im reifen Zustand noch hohe c-kit-Level exprimieren. Im peripheren Blut exprimieren die Zellen c-kit nicht - außer wenigen zirkulierenden CD34<sup>+</sup>-Stamm- oder Progenitorzellen und einer kleinen Untergruppe natürlicher Killerzellen. Eine schwache c-kit-Expression ist auch bei aktivierten Plättchen beschrieben worden [Grabarek J *et al.* 1994]. SCF wird im ganzen

Körper von einem großen Spektrum von Stromazellen, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert und ist in geringen Mengen im Blutkreislauf nachweisbar [Ashman LK 1993].

### 1.2.5 Mutationen im c-kit-Gen und ihre Rolle in der Tumorgenese

Das Genprodukt von c-kit ist mit vielen Formen von Tumoren assoziiert. Beim Menschen sind in den letzten Jahren eine Reihe von *gain-of-function*-Mutationen in der Juxtamembranregion des c-kit-Rezeptors bekannt geworden, die eine Rolle in GIST (*gastrointestinal stromal tumors*) spielen. Unter ihnen die Mutation im Exon 11, die Auslassungen, Punktmutationen (die einige Codons betreffen) und Wiederholungen (vorwiegend in der 3`Region) beinhaltet, sowie im Exon 18, die mit einer Imatinibresistenz einhergeht; seltener sind Exon 12 und 14 betroffen [Lasota J *et al.* 2006].

Ebenso wird c-kit in ca. 70% der kleinzelligen Bronchialkarzinome, sowie bei Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs und Eierstocktumoren *de novo* exprimiert [Miettinen M, Lasota J 2005].

Die am besten untersuchte Mutation im c-kit-Gen ist die Substitution von Valin durch Aspartat, die mit einer konstitutiven Phosphorylierung an Tyrosin-Resten und einer gesteigerten katalytischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp c-kit einhergeht.

Die Abweichung zwischen den beiden Formen geht auf Unterschiede zwischen der Autophosphorylierungsregion ebenso wie auf veränderte Substratspezifität zurück [Piao X *et al.* 1996]. Im Vergleich zu anderen *gain-of-function*-Mutationen geht die D816V-Mutation (As-->Val) nicht mit einer Dimerisierung des Rezeptors einher.

Die Juxtamembranregion des c-kit-Proteins ist mit am häufigsten von Mutationen betroffen. Der Austausch von Glycin 559 an die Stelle von Valin hat dabei eine solche konstitutive Phosphorylierung und ein erhöhtes onkogenetisches Potential zur Folge [Tsujiura T *et al.* 1997]. Das Fehlen von sieben Aminosäuren in der Juxtamembranregion führt ebenso zu spontaner Dimerisierung des Rezeptors mit konstitutiver Aktivierung.

So weisen Patienten mit GIST-Tumoren häufig Mutationen in der Juxtamembranregion des c-kit-Proteins mit konstitutiver Aktivierung auf. Im Falle eines Patienten mit einem

inoperablen gastrointestinalen Stromatumor wurde eine Mutation in Exon 11 Del560-576 festgestellt, nach Lasermicrodissektion konnten zwei weitere Punktmutationen in Exon 17 C809G und N822Y in unterschiedlichen Mikrofoci des Tumors nachgewiesen werden [Haller F *et al.* 2007].

Eine konstitutive Aktivierung im c-kit-Gen (D816V) kann häufig bei Patienten mit systemischer Mastozytose und damit vergesellschafteten Blutbildveränderungen beobachtet werden [Akin C, Metcalfe DD 2004, Nagata H *et al.* 1995]. Die hämatologischen Veränderungen reichen von der Myelodysplasie bis hin zur myeloproliferativen Erkrankung.

Desweiteren ist eine hohe Inzidenz zur Ausbildung von Leukämien in diesen Patienten zu beobachten. Die hier verwendeten HMC-1-Zellen tragen eine Punktmutation in der katalytischen Domäne von c-kit, die eine Substitution von Val durch Asp im Codon 816 verursacht. Dies bringt eine konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors mit sich. LAD 2-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigen die V816-Mutation jedoch nicht.

### **1.2.6 Die Regulation von c-kit**

Die Expression von c-kit wird unter anderem über transkriptionelle Wege reguliert. Der Promotor des c-kit-Gens, welches beim Menschen und in der Maus 21 Exons umfasst, weist zahlreiche übereinstimmende Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren auf, unter ihnen Sp1, AP-2, Ets, Myb, SCL und GATA-1. Die Effekte der verschiedenen Transkriptionsfaktoren sind zum Teil noch widersprüchlich. So wurde Myb nach Transfektion nicht-hämatopoetischer Zellen eine positive Regulation von c-kit bescheinigt, wohingegen eine andere Gruppe die Wirkung von Myb als negativ auf die c-kit-Expression beschreibt [Hogg A *et al.* 1997, Vandenbark GR *et al.* 1996].

Eine entscheidende Rolle in der Regulation der c-kit-Expression in hämatopoetischen Zelllinien und Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist für Sp1 beschrieben worden [Park GH *et al.* 1998]. In hämatopotischen Zelllinien übt SCL einen positiven regulatorischen Effekt auf die c-kit-Expression aus [Krosi G *et al.* 1998].

Der Transkriptionsfaktor MITF wird von an Mikrophthalmie leidenden Mäusen nicht exprimiert, was zu einem c-kit-Mangel und fehlender Reaktion auf SCF führt. Im c-kit-Promotor konnte eine spezifische Bindungsstelle für MITF nachgewiesen werden, welches in der Mastzelle spezifisch die Expression c-kit zu regulieren scheint [Tsujiura T *et al.* 1996, Kitamura Y 2006].

Das Fehlen des Transkriptionsfaktors AP-2 und c-kit korreliert in humanen Melanomen mit metastatischem Potential. Bindungsstellen für AP-2 konnten im c-kit-Promotor nachgewiesen werden und die Re-Expression von AP-2 in Melanomzellen führte zur Wiedererlangung endogener c-kit-Expression und Unterdrückung der Kanzerogenität und metastatischen Potentials [Huang S *et al.* 1998].

Neben der zelltypspezifischen Regulation, wird die Menge der c-kit-mRNA und des Proteins von zahlreichen Zytokinen beeinflusst. So hat GM-CSF in faktorabhängigen frühen myeloischen Zellen von Mäusen einen negativen Einfluß auf die c-kit-mRNA, obwohl dieser zusammen mit SCF deren Wachstum fördert. IL-4 reguliert c-kit-Expression in Mastzellen herab [Sillaber C *et al.* 1994], während es komplexe Effekte auf deren Reifung ausübt [Nilsson G *et al.* 1994, Toru H *et al.* 1998]. TGF- $\beta$  ist ein wichtiger Faktor in der Hämatopoese, der durch Einfluss auf die mRNA-Stabilität in frühen hämatopoetischen Zellen die c-kit-Expression herunter reguliert, obwohl er in Mastzellen antagonistisch mit SCF reagiert, ohne deren Zelloberflächenexpression zu beeinflussen. TNF- $\alpha$  hemmt den überlebensfördernden Effekt von SCF auf primitive, hämatopoetische Progenitorzellen, indem er die c-kit-Expression herabreguliert. Auch  $\gamma$ -Interferon, welches negativ regulierend auf Erythrozytenvorläufer wirkt, reduziert die c-kit- und Erythropoetin-Rezeptor-mRNA und Proteine. Il-1 senkt in Endothelzellen die Menge der c-kit-mRNA, wohingegen es die SCF-Expression steigert.

### **1.2.7 Internalisierung nach Ligandenbindung**

Die Verfügbarkeit eines Proteins in einer Zelle ist unter anderem durch dessen Synthese und Degradierung bestimmt. Die Liganden-abhängige Internalisierung geht mit kinaseaktivitätsbedingter Rezeptorendozytose, Ubiquitinierung und Degradierung einher und scheint eine der Hauptursachen für die Reduktion des Rezeptors von der

Mastzelloberfläche zu sein [Shimizu Y *et al.* 1996]. Der proteolytische Prozess der Ubiquitinierung bei kurzlebigen Proteinen ist ATP-abhängig [Miyazawa K *et al.* 1994]. Im Falle von c-kit ist die Beteiligung der Ubiquitin E3 Ligase Cbl, welche durch die Src-Kinase-Familie aktiviert wird, nachgewiesen worden, die die Ubiquitinierung triggert [Masson K *et al.* 2006].

Nach Ligandenbindung kommt es zur Phosphorylierung von Cbl-Proteinen durch den aktivierten Rezeptor, und nachfolgend zur Ubiquitinierung und wechselseitigen Degradierung [Zeng S *et al.* 2005]. Eine unzureichende Rekrutierung von Cbl an c-kit hat eine unkontrollierte positive Signaltransduktion zur Folge und steht somit eventuell im Zusammenhang mit Tumorwachstum. Cbl bewirkt eine Monoubiquitinierung von c-kit und dessen anschließenden lysosomalen Abbau [Masson K *et al.* 2006]. Dabei ist eine Kinasebindung und RING-Finger-Aktivität von Cbl notwendig. Bereits 1994 konnte bei myeloischen M07e Zellen durchflußzytometrisch gezeigt werden, dass eine Stimulation mit SCF bei 37°C den c-kit-Rezeptor innerhalb von 5 Minuten fast vollständig von der Zelloberfläche verschwinden lässt. Wurden die Zellen jedoch bei 4°C oder aber bei 37°C in Anwesenheit von 0,2% Natriumazid mit SCF inkubiert war praktisch keine Ubiquitinierung nachweisbar. Dies war auch der Fall wenn die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-kit oder dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein präinkubiert wurden [Miyazawa K *et al.* 1994]. Diese Ergebnisse ließen die Ligandenabhängigkeit und die Notwendigkeit einer intrinsischen Kinaseaktivität für die Ubiquitinierung vermuten.

Für die anfänglichen Schritte der Internalisierung von c-kit, die rasch nach Bindung von SCF erfolgen, ist eine intakte Kinaseaktivität, PI3-Kinase-Aktivität und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erforderlich. So wurde anhand von DA-1-Zellen, die den Wildtyp des c-kit-Rezeptors und die YF719-Mutante des Rezeptors exprimieren, bei der die SH<sub>2</sub>-vermittelte Bindungssequenz für die p85-Untereinheit der PI-3-Kinase unterbrochen ist, gezeigt, dass beide Rezeptortypen nach Stimulation mit SCF mit annähernd gleicher Kinetik internalisiert wurden, wenn der Rezeptor auch im Falle der YF719-Mutante membrannah lokalisiert blieb [Gommerman JL *et al.* 1997].

Bei fehlendem extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  oder Anwesenheit des  $\text{Ca}^{2+}$  Influx-Blockers  $\text{Ni}^{2+}$  wurde die YF719-Mutante nicht internalisiert. Keine Internalisierung fand auch in

Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  beim Wildtyp des Rezeptors statt, wenn diese Zellen zuvor mit dem PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin vorbehandelt wurden. Bei Ligandenbindung bilden schwere Ketten von Clathrin Co-Immunopräzipitate mit c-kit. Im Falle der Blockierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx oder bei gestörter PI 3-Kinaseaktivität ist Clathrin nicht fähig, diese Co-Immunopräzipitate zu bilden. So wurde gezeigt, dass für diese Schritte der Internalisierung des Rezeptors sowohl eine intakte PI 3-Kinase-Aktivität als auch  $\text{Ca}^{2+}$  Influx essentiell sind [Gommerman JL *et al.* 1997]. Das erneute Erscheinen von c-kit auf der Zelloberfläche nach 2 Tagen SCF-Exposition ist an erneute RNA- und Proteinsynthese gebunden [Shimizu Y *et al.* 1996] und ist nach 3 Tagen abgeschlossen. Dieser Nachweis wurde durch die Inkubation der Zellen mit CHX bzw. AD erbracht, die das Wiedererscheinen von c-kit auf der Zelloberfläche verhinderten. Es konnte keine grosse Abweichung der c-kit-m-RNA-Menge während der Resynthese festgestellt werden, was einen posttranskriptionellen Regulationsweg nahe legt [Shimizu Y *et al.* 1996].

### 1.3 ATRA

#### 1.3.1 Metabolismus der all-*trans*-Retinsäure

Vitamin A ist ein essentieller, natürlich vorkommender, fettlöslicher Nahrungsbestandteil, der in vielen biologischen Prozessen wie der Immunität, Schutz gegen Gewebsverletzungen, Fortpflanzung, Wachstum und Entwicklung eine Rolle spielt. Von besonders großer Wichtigkeit in den frühen Lebensphasen ist eine adäquate Versorgung bereits während der Gestation und Lactation [Debier C *et al.* 2005].

In den Entwicklungsländern war eine Supplementierung der Nahrung Neugeborener mit Vitamin A in der Lage, die Sterblichkeit zu reduzieren. Gerade Frühgeburten neigen dazu, geringe Vitamin A Level aufzuweisen und haben ein hohes Risiko zur Ausbildung eines Vitamin A-Mangels [Mactier H *et al.* 2005]. Vitamin A, welches als Retinylester in der Leber gespeichert vorliegt, wird von da aus als Retinol in den Blutkreislauf abgegeben, wo es an das *Retinol binding protein* gebunden ist [Biesalski HK *et al.* 2004].

Dieser Prozeß wird homöostatisch reguliert und erhält somit mehr oder weniger konstante Plasmaspiegel an Retinol. Wird viel Vitamin A benötigt (wie es bei entzündlichen Reaktionen, Krankheit und vor der Geburt vorkommen kann), kann diese Versorgung unzureichend sein, indem *Retinol binding protein* verspätet gebildet wird, was zu lokalen Mangelerscheinungen und Beeinträchtigungen in Struktur und Funktion der entsprechenden Gewebe führen kann [Biesalski HK *et al.* 2004]. Dieser Mangel kann durch zelluläre Retinylesterspeicher ausgeglichen werden. Einige Zellarten sind in der Lage Retinylester aufzunehmen, so zum Beispiel buccale Mucosazellen.

So ist beispielsweise bei meta- oder dysplastischen Bronchialepithelzellen, die einen Vitamin A-Mangel aufweisen, eine Normalisierung des Epithels nach Aufnahme topisch aufgetragenen Retinylpalmitats möglich [Biesalski HK *et al.* 2004]. ATRA, der wichtigste biologisch aktive Metabolit des Vitamin A, kann am wirksamsten Vitamin A-Mangelerscheinungen vorbeugen und dadurch hervorgerufene Schäden reparieren [Kastner P *et al.* 1995].

### 1.3.2 Signalweg der all-*trans*-Retinsäure

Vitamin-A-Derivate spielen in der embryonalen Entwicklung eine kritische Rolle, wie der teratogene Effekt eines Mangels oder einer Überversorgung zeigt.

Der durch Retinoide ausgelöste Signalweg wirkt jedoch nicht nur auf die embryonale Entwicklung sondern auch auf die Homöostase im Gewebe, den Lipidmetabolismus, die zelluläre Differenzierung und die Proliferation des adulten Organismus ein. Erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden Retinoide in der Behandlung von Hauterkrankungen wie der Akne, Psoriasis und Hautalterung durch Licht, sowie in der Behandlung einiger Krebsarten, wie dem hepatozellulären Karzinom [Piao X *et al.* 2003], T-Zelllymphomen, dem invasiven Prostatakarzinom und der bereits erwähnten promyeloischen Leukämie.

Die meisten dieser Effekte sind auf die Aktivierung von Rezeptoren für Retinoide anzusehen, die zur Transkriptionsinduzierung oder der Repression Retinoid-kontrollierter Gene führen. Aus diesem Grund werden Retinoidrezeptoren als strategische therapeutische Ziele angesehen und die Eindämmung unerwünschter

Nebenwirkungen durch Retinoidbehandlung erfordern ein fundamentales Wissen um die Molekularbiologie der Retinoide und ihrer Rezeptoren [Lefebvre P *et al.* 2005].

Die Funktion der Retinoide wird über zwei Arten von nukleären Retinoidrezeptoren vermittelt. RARs und RXRs gehören zur Klasse der Steroid-/Thyroidhormon-Rezeptoren. Jede Art des Rezeptors verfügt über drei Subtypen namens  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . All-*trans*-Retinsäure (ATRA) fungiert als Ligand hoher Affinität für den RAR, wogegen 9-*cis*-RA sowohl als Ligand des letzteren fungiert sowie an die Gruppe der RXR bindet.

Diese Rezeptoren liegen als RAR/RXR- Heterodimere und RXR/RXR-Homodimere vor, und wirken als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die die retinoidinduzierten Signale zum Zellkern weiterleiten, wo sie die Aktivität unterschiedlicher Gene beeinflussen. Darunter befinden sich Gene, die sogenannte RAREs (*retinoic acid response elements*) enthalten und andere, die durch weitere Transkriptionsfaktoren oder zusätzliche Mechanismen beeinflusst werden.

### 1.3.3 ATRA-Effekte auf die Hämatopoese

Retinoide sind eine Gruppe von natürlichen und synthetischen Vitamin A Derivaten, die ausgeprägte Effekte auf das Wachstum und die Differenzierung, Apoptose und Homöostase verschiedener Zellarten - unter ihnen hämatopoetische Progenitorzellen - ausüben [Germain P *et al.* 2006]. Dabei sind grundsätzlich unreife und proliferierende Leukozyten stärker betroffen. Die Effekte von Retinoiden in der Regulierung zellulärer transkriptioneller Programme können anhand ihrer Rolle in der embryonalen und fötalen Entwicklung und ihres Beitrags zur ständigen Zellerneuerung im Erwachsenen erkannt werden. Gerade im hämatopoetischen Zellkompartiment sind Retinoide heutzutage für die Induzierung neutrophiler Differenzierung bekannt [Lawson ND *et al.* 1999].

Im Falle der akuten myeloischen Leukämie, die durch eine Chromosomentranslokation mithervorgerufen wird, die das kodierende Gen für den Rezeptor RAR $\alpha$  mit einschließt, sind therapeutische Dosen von ATRA in der Lage, die schädlichen Effekte des RAR $\alpha$ -beinhaltenden Fusionsproteins aufzuheben. Dabei wird eine Differenzierung leukämischer Blasten in reife Neutrophile induziert und eine Umkehrung des leukämischen Potentials erreicht [Chomienne C *et al.* 1996].

Die Effekte von ATRA auf hämatopoetische Stammzellen und primitive Vorläufer sind in der Vergangenheit ebenso untersucht worden. Dabei kann ATRA abhängig von der Art der Progenitorzellen und dem Vorhandensein exogener Zytokine und Wachstumsfaktoren am Ort vielfältige und sogar gegensätzliche Effekte auf diese Zellen ausüben, was ein hohes Maß an Komplexität der ATRA-vermittelten Effekte in diesen Zellen nahe legt. Dazu gehören Wachstumsunterdrückung, Induzierung neutrophiler Differenzierung, verstärkte CFU-S Formation und ein Anstieg bei der Repopularisierung von Stammzellen [Douer D *et al.* 2000]

Desweiteren wurde in Studien ein Effekt von ATRA bei der Entwicklung von Basophilen, Eosinophilen und Monozyten nachgewiesen. So beeinflusst ATRA die unreifer Vorläuferzellen eosinophiler und basophiler Granulozyten negativ, indem es deren Differenzierung hemmt [Upham JW *et al.* 2002]. Jedoch ist eine Ausbildung einer reaktiven Basophilie im Rahmen der Therapie mit ATRA bei der AML beobachtet worden, was den entgegengesetzten Einfluss von ATRA auf die Entwicklung von Basophilen unter unterschiedlichen Bedingungen zeigt [Iwakiri R *et al.* 1994]. Bei Monozyten ist der Einfluss von ATRA in reifen zirkulierenden Zellen ein dedifferenzierender, wohingegen das Retinoid auf leukämische Zelllinien differenzierend wirkt. So wurden alle untersuchten Integrinketten der aus Blut isolierten Monozyten herunterreguliert und die der leukämischen Zelllinien THP-1 und U937 als Antwort auf ATRA-Gabe erhöht [Babina M *et al.* 2003]. Diese vielfach konträren Wirkungen der ATRA-Exposition unterstreichen die weitreichenden Eingriffe in Differenzierung, Wachstum und Überleben von Leukozyten.

### **1.3.4 Der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf Mastzellen**

Über den Einfluss von ATRA auf die Proliferation und Entwicklung von Mastzellen ist in der Literatur bisher wenig bekannt, wohingegen deren regulatorische Eigenschaften auf vor allem unreife und proliferierende Zellen der Hämatopoese und unreife Mastzellen hinlänglich beschrieben sind. Im Hinblick auf die Proliferation zeigte sich ein ausgeprägter hemmender Einfluß auf die Zellzahl von aus Nabelschnurblut generierten Mastzellvorläufern in Kultur. An CD34<sup>+</sup>- Zellen, die sowohl mit SCF als auch unterschiedlichen Dosen von ATRA und 9-cis-RA behandelt wurden, konnte unter

Einfluß beider Retinoide eine dosisabhängige Zellzahlverminderung der nachfolgenden Generation festgestellt werden.

Dabei war die Zellzahl der über einen Zeitraum von 10 Wochen nur mit SCF inkubierten Zellen 9mal größer als die der Zellen, die mit SCF und ATRA bei  $10^{-7}$  mol/L behandelt wurden [Kinoshita T *et al.* 2000]. Auch bei der unreifen Mastzelllinie HMC-1 war ein die Proliferation hemmender Effekt zu beobachten [Nilsson G *et al.* 1994]. Nicht nur bei der Proliferation der Mastzelle sondern auch bei ihrer Differenzierung ist ATRA von Bedeutung, indem unter Einfluß des Retinoids eine Reduktion des Histamingehaltes der Zellen eintrat. Auch der Mastzellmarker Tryptase erfuhr einen Konzentrationsabfall unter ATRA-Einfluß [Alexandrakis MG *et al.* 2003]. Auch der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor c-kit wurde durch den Einfluss von ATRA in Zellen der unreifen Mastzelllinie HMC-1 herunterreguliert [Nilsson G *et al.* 1994, Hjertson M *et al.* 2003].

Dabei erfuhren reife Mastzellen eine geringere Herunterregulation. Der Einsatz spezifischer Agonisten, die entweder an den RAR- oder RXR-Rezeptor binden, wiesen eine Beteiligung sowohl des RAR/RXR und des RXR/RXR- Signalweges in der Hemmung der Differenzierung von Mastzellen nach [Kinoshita T *et al.* 2000].

Im Gegensatz zu den Vorläuferzellen erfuhr die Mastzellzahl in Organkultur keine Verminderung durch ATRA-Einfluss [Hjertson M *et al.* 2003]. In derselben Untersuchung konnte durch topisches Auftragen einer retinoidhaltigen Salbe auf die Haut von Probanden ein Ansteigen der Tryptase-positiven Mastzellen beobachtet werden, wobei die Zahl der in der Haut überwiegenden Tryptase-Chymase-positiven Mastzellen unbeeinflusst blieb [Hjertson M *et al.* 2003]. In Bezug auf ihre Rolle bei der Immunabwehr konnte an dem Adhäsionsmolekül ICAM-3 durch ATRA-Einfluss eine Steigerung der Expression in unreifen leukämischen Mastzellen gezeigt werden, während dieser Einfluss auf reife Mastzellen nicht festzustellen war [Babina M *et al.* 2001]. Die Hochregulierung von ICAM-3 durch Präinkubation mit ATRA war signifikant, was mit einer deutlichen Steigerung von durch ICAM-3-vermittelten Prozessen einherging. Neuere systematische Untersuchungen in diesem Labor zur Rolle von ATRA auf verschiedene Reifestadien des Mastzellsystems haben zudem deutlich dedifferenzierende Effekte von ATRA aufgezeigt; diese äußerten sich in einer klaren Reduktion praktisch aller mastzellspezifischer Marker, wie IgE Rezeptor  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , c-

kit, Chymase und Tryptase [Thienemann F, Guhl S, et al. 2004]. Die Effekte werden bei reifen Hautmastzellen gegenüber unreifen Zelllinien besonders deutlich. Hierbei fiel zudem eine Diskrepanz zwischen der c-kit-m-RNA und der Protein-Regulation auf. Dies wurde zum Anlass genommen, den Mechanismus der ATRA-vermittelten c-kit-Regulation in verschiedenen Mastzellsystemen im Rahmen dieser Arbeit näher zu betrachten.

## 2 Zielsetzung

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit spielt eine herausragende Rolle in der Differenzierung, dem Überleben und der Proliferation von Mastzellen. Jedoch sind die regulatorischen Mechanismen der c-kit-Expression noch wenig untersucht. In dieser Arbeit sollte deshalb (eine weitere Dissertation zu diesem Thema weiterführend) die Abhängigkeit des Grundumsatzes des Rezeptors vom Reifegrad der Zellen untersucht werden. Dies sollte in Versuchen mit Inhibitoren der *de novo*-Transkription und Translation als auch der Proteasomfunktion ermittelt werden.

Eine weitere Fragestellung war, ob andere Oberflächenrezeptoren sich diesbezüglich ähnlich oder anders verhalten. Für das murine System war bekannt, dass die Bindung seines Liganden SCF an den Rezeptor mit einer Herabregulation der Zelloberflächendichte aufgrund der Internalisierung des Rezeptors einhergeht. Hier sollte geprüft werden, ob das auch für humane Mastzellen gilt. Insbesondere sollten Unterschiede zwischen den einzelnen Mastzellreifestadien - falls vorhanden - aufgezeigt werden. Desweiteren war bekannt, dass die hormonell wirksame Form des Vitamin A (*all-trans*-Retinsäure, ATRA) bei menschlichen Mastzellen die Zelloberflächenexpression von c-kit senkt, dieser Hemmung aber vermutlich in verschiedenen Mastzellarten unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Es war bekannt, dass unreife, leukämische Mastzellen auf ATRA-Behandlung mit einer Herabregulation des c-kit-Rezeptors reagieren, ohne jedoch Veränderungen im mRNA-Transkriptlevel aufzuweisen. In kutanen Mastzellen ist die ATRA-vermittelte Herunterregulierung dagegen mit einer verminderten Transkriptkonzentration verbunden.

So sollte anhand des Einsatzes von ATRA und der Kombination mit Inhibitoren der Transkription und Proteinsynthese dem Mechanismus der schnellen, transkriptionsunabhängigen c-kit-Herabregulation bei unreif-leukämischen Mastzellen nachgegangen werden. Wie die Aktivität des menschlichen c-kit-Gens reguliert sein könnte war zu Beginn der Arbeit noch weitgehend unbekannt.

Es waren jedoch einige Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren im Promotor charakterisiert worden. Einigen von ihnen war eine Relevanz im murinen System,

anderen für Stammzellen zugeschrieben worden. Um die Bedeutung der einzelnen Faktoren in der lebenden Zelle zu untersuchen, sollten Transfektionsversuche hier mit Antikörpern gegen die entsprechenden Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bereits identifizierten Elemente des humanen c-kit-Promotors auf ihre Bedeutung für die Expression in der Mastzelle untersucht werden.

Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Elemente MITF, SCL und Sp1, die in der Maus relevant sind, in vitro im Gelretardierungsassay gebunden werden.

Schließlich sollte im EMSA geklärt werden, wie und ob sich die vorherige Behandlung der Zellen mit ATRA auf das Bindungsmuster auswirkt und ob es Unterschiede je nach Reifegrad der Mastzellen hierbei gibt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

Alle verwendeten Standardchemikalien wurden in analytischer Reinheit von den Firmen Merck, Sigma und Biochrom KG bezogen. Sämtliche anderen Reagenzien sind in Tabelle 1 gesondert aufgeführt.

##### 3.1.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
$\alpha$ -Monothioglycerol	Sigma
AB-Serum	Biotest
Actinomycin D	Calbiochem
Amphotericin B	Biochrom KG
All- <i>trans</i> -Retinsäure	Sigma
Basal-Iscove-Medium (1x)	Biochrom KG
Borsäure	Merck
Bovine Serum Albumine (BSA)	Fluka
Clasto-Lactacystin $\beta$ -Lactone (Lactacystin)	Calbiochem
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce Perbio
Cycloheximid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom KG
L-Glutamin	Biochrom KG
Lightshift Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce Perbio
Mithramycin A	Sigma
N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN)	Calbiochem
PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories GmbH
Stem Pro 34 Medium	Gibco
Toluidinblau (0,1% in 0,5 N HCl-Lösung)	Sigma
Tris Base	Sigma
Trypanblaulösung (0,18% in PBS w/o)	Seromed

Tabelle 1: Reagenzien

### 3.1.2 Enzyme

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Enzyme wurden für die Isolierung der Mastzellen aus der Haut eingesetzt:

Enzym	Hersteller
Collagenase Typ 1 (232 U/mg)	Worthington biochemical corporation
Dispase 1 (Neutrale Protease, Reinheitsgrad 1)	Roche Molecular Biochemicals
DNase 1 (aus bovinem Pankreas)	Roche Diagnostics GmbH
Hyaluronidase Typ 1 S (aus bovinen Testes)	Sigma

Tabelle 2: Enzyme

### 3.1.3 Antikörper

In Tabelle 3 sind die für die Aufreinigung der Mastzellen benötigten Antikörper dargestellt:

Antikörper	Hersteller
MACS Goat Anti-Mouse Ig G Micro Beads	MACS Reagents Miltenyi Biotec
YB5.B8	Freundlicherweise überlassen von L.Ashman, Adelaide, Australien

Tabelle 3: Antikörper zur MC-Isolierung

Die für die durchflußzytometrischen Analysen benötigten Antikörper sind der Tabelle 4 zu entnehmen:

Antikörper	Hersteller
CD117 (clone YB5.B8 nicht konjugiert)	eBioscience
CD117 ( clone 95c6-PE)	IO Test

CD29-FITC	Cymbus Biotechnology, LTD
CD50-FITC	Cymbus Biotechnology, LTD
CD54-FITC	Cymbus Biotechnology, LTD

Tabelle 4: Antikörper für die Durchflußzytometrie

Die für die *Supershiftassays* eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt:

Antikörper	Hersteller
Rabbit-anti-MITF	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Goat-anti-MITF	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Rabbit-anti-SCL	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Rabbit-anti-Sp-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Rabbit- anti-STAT-6	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabelle 5: Antikörper für die *Supershiftassays*

Alle Verbrauchsmaterialien wie Handschuhe, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und ähnliches wurden sämtlich von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner und Sarstedt bezogen.

### 3.1.4 Laborgeräte

Alle in den Versuchen eingesetzten Laborgeräte sind der Tabelle 6 zu entnehmen:

Gerät	Hersteller
Blot Model 1000/500 Power Supply	BIORAD
Durchflußzytometer Epics XL System 2 Version 3.0	Beckman Coulter
Gelelektrophoresegerät Power Pac 300	BIORAD
6-well bzw. 24-well-Platte "Suspension Culture"	Greiner
Elektrophorese Kammern	Laborbestand

Gewebekulturschalen	Greiner
Hypercassette	Amersham Pharmacia Biotech UK
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Magnetmix 2070	Assistent
Metallfilter (300, 70, 40 µm Porengröße)	Sigma
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories
Neubauer Zählkammer	Neolab
Nylongasefilter (30 µm Porengröße)	Miltenyi Biotec
Nylonmembran positiv geladen	Boehringer Mannheim
auto MACS	Miltenyi Biotec
5%-TBE-Gel	Bio-Rad
Zellkulturflaschen „Suspension Culture“	Greiner
Zellkulturflaschen „Tissue Culture“	Greiner
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Zentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf
Zellzählgerät Casy 1 TT	Scharfe System
Wasserbad 1086	GFL
Whatman-Papier	BioRad

Tabelle 6: Geräte

### 3.1.5 Puffer

#### EMSA-Puffer

- 5X TBE
- Tris Base (450mM)
- Borsäure (450mM)
- EDTA (10mM)

#### FACS-Puffer

- PBS w/o Ca<sup>2+</sup>
- 0,05% Na-Azid
- 2% Fetal Calf Serum (FCS)

#### MACS-Puffer

- PBS w/o Ca<sup>2+</sup>
- 0,5% Bovine Serum Albumin
- 2 mM EDTA

#### Puffer A

- Hepes 10 mM (pH 7,9 mit KOH eingestellt)
- KCl 10mM
- EDTA 0,1mM
- EGTA 0,1mM

#### Puffer B

- Hepes 20mM (pH 7,9 mit KOH eingestellt)
- NaCl 0,4M
- EDTA 1mM
- EGTA 1mM
- Glycerin 25%

### 3.1.6 Medien

#### **Mastzellmedium**

- 500 ml Basal-Iscove-Medium
- 10% Fötale Kälberserum (FCS) (50 ml\*)
- 2% L-Glutamin (10 ml\* 200 mM)
- 1% Penicillin/ Streptomycin (5 ml\* 10.000 U/ml)
- 0,05% Amphotericin B (1,25 mg\*)
- 0,002%  $\alpha$ -Monothioglycerol (10  $\mu$ l\*)

\* Menge bezogen auf 500 ml Basal Iscove Flüssigmedium, nicht komplett

#### **LAD 2-Medium**

- 100 ml Stem Pro 34
- L-Glutamin (100 mM)
- Supplement (vom Hersteller gelieferte Zusätze)
- rhSCF (100ng/ml)

#### **HMC-1/HMC-1 5C6-Medium**

- 500 ml Basal-Iscove-Medium
- 10% Fötale Kälberserum (FCS) (50 ml\*)
- 2% L-Glutamin (10 ml\* 200 mM)
- 1% Penicillin/ Streptomycin (5 ml\* 10.000 U/ml)
- 0,002%  $\alpha$ -Monothioglycerol (10  $\mu$ l\*)

\* Menge bezogen auf 500 ml Basal Iscove Flüssigmedium, nicht komplett

#### **Dispergiermedium**

- 500 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ /  $\text{Mg}^{2+}$
- 2% Fötale Kälberserum (FCS) (10 ml)
- 1% Penicillin/Streptomycin (5 ml\*10.000 U/ml)
- 0,05% Amphotericin B (1,25 mg\*)
- 5 mM  $\text{MgSO}_4$

\* Menge bezogen auf 500 ml PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Die Isolierung der Mastzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mastzellen stammen ausschließlich aus bei Mammareduktionsplastiken oder Vorhautresektionen gewonnenen Hautpräparaten gesunder Patienten. Die Verwendung direkt aus Humanhaut gewonnener Mastzellen zeichnet sich im Vergleich zu generierten MC, wie zum Beispiel aus dem Knochenmark generierter MC durch eine hohe Aussagekraft in Bezug auf das Verhalten terminal differenzierter MC aus. Zudem war es - wie oben erwähnt - Ziel der Arbeit, einen Vergleich zwischen den einzelnen Mastzellarten zu ermöglichen.

#### 3.2.2 Die Trennung von Epidermis und Dermis

Da die Isolierung der Mastzellen aus der Haut über Positivselektion mit dem Antikörper YB5.B8 gegen c-kit (CD117) erfolgte, war es notwendig, die Dermis von der Epidermis zu trennen, da sich in letzterer Melanozyten befinden, die diesen Rezeptor gleichfalls exprimieren.

Zu diesem Zweck wurden die Hautpräparate mit einem Skalpell in ca. 1-2 mm breite Streifen geschnitten und anschließend für 12 Stunden bei 4°C in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit Dispase Typ 1 (bei 0,5 mg/ml) eingelegt, um am nächsten Tag die Epidermis mechanisch von der Dermis trennen zu können.

#### 3.2.3 Die Dispergierung der Dermis

Nach gründlichster Zerkleinerung der Dermis mittels einer Schere wurde sie in Dispergiermedium (10 ml/1g Dermis), welches mit den Enzymen Collagenase (bei 7,5-15 mg/1g Dermis), Hyaluronidase (bei 5-7,5 mg/1g Dermis) und DNase (bei 100µg/1g Dermis) versetzt wurde, in eine Zellkulturflasche überführt. Darauf folgte eine Inkubation für eine bis eineinhalb Stunden in einem 37°C-warmen Schüttelwasserbad. Auf diese Weise erfolgte das Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband.

Die entstandene Suspension wurde zweifach durch ein Metallfiltersystem gefiltert und in 50 ml-Röhrchen bei 250 g für 15 min zentrifugiert. Das nach dem Filtervorgang noch

verbliebene Gewebe wurde noch einmal der oben beschriebenen Vorgehensweise unterzogen und im Anschluß wie folgt weiterbehandelt.

Die beim zentrifugieren entstandenen Zellpellets wurden zusammengeführt, nochmals durch ein Nylonsieb der Porengröße 40 µm gefiltert und in PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> gewaschen. Die Gesamtzellzahl sowie die Zahl der toten Zellen wurde durch Anfärbung mittels Trypanblau und Zählung in der Neubauerzählkammer bestimmt, die Zahl der Mastzellen durch Anfärben mit saurer Toluidinblaulösung und anschließender Zählung.

Der Anteil der Mastzellen an der Gesamtzellzahl entsprach im Durchschnitt etwa 10%. Genaue Informationen sind nachzulesen unter Babina M *et al.* 2004. Die auf diese Weise erhaltenen Zellen wurden über Nacht bei 37°C und einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Athmosphäre in Mastzellmedium inkubiert.

### 3.2.4 Die Aufreinigung der Mastzellen

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche in 50 ml-Röhrchen überführt und die verbliebenen adhärennten Zellen mit PBS/EDTA abgelöst. Anschließend wurden alle Zellen in PBS/EDTA einmal gewaschen, in MACS-Puffer zusammengeführt und zwei weitere Male gewaschen.

Daran schloß sich eine 15-minütige Inkubation mit humanem AB-Serum (1:5 eingesetzt) bei 4°C auf dem Rüttler an, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der monoklonale Antikörper YB5.B8 (bei 0,1 µg/ml) war bei Inkubation für 25 Minuten bei 4°C in der Lage, spezifisch an den Oberflächenrezeptor c-kit zu binden.

Nach zweimaligem Waschen mit kaltem MACS-Puffer erfolgte während 20-25-minütiger Inkubation die Bindung des paramagnetischen Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Maus-IgG Micro Beads) an den zuvor gebundenen Primärantikörper.

Die so markierten Zellen wurden erneut zweimal in kaltem MACS-Puffer gewaschen. Nach dem ersten Waschen wurden die Zellen nochmals filtriert. Das nach dem Dekantieren verbliebene Zellpellt wurde in 2 ml kaltem MACS-Puffer resuspendiert und es erfolgte die Isolierung der Mastzellen im autoMACS-Gerät, welches die

paramagnetisch markierten Zellen an magnetisierten Trennsäulen zurückhält und anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

Die Mastzellreinheit wurde durch Anfärben mit saurer Toluidinblaulösung und Zählung in der Neubauerzählkammer bestimmt. Auf diese Weise war im Durchschnitt eine Reinheit von 80-98% zu erreichen. Details zur Mastzellgewinnung aus Haut sind in Babina M *et al.* 2004 nachzulesen.

### **3.3 Die Zellkultur**

#### **3.3.1 Die Kultur der Zelllinie HMC-1**

Die Zelllinie HMC-1, welche eine unreife humane Mastzelllinie darstellt, wurde, wie oben beschrieben, in den späten 80-er Jahren aus dem peripheren Blut einer an Mastzelleukämie erkrankten Frau etabliert und unserem Labor von J.H. Butterfield, *Division of allergic diseases, Mayo clinic, Rochester, U.S.A* [Butterfield JH *et al.* 1988] freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Kultur der Zellen erfolgte in oben beschriebenem Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-Atmosphäre. Die Zellzahl wurde auf 1\*10<sup>Exp6</sup>/ml eingestellt und alle 4 Tage erfolgte der Austausch jeweils der Hälfte des Mediums. Der zur Verdopplung der Zellzahl benötigte Zeitraum entspricht im Durchschnitt 30-36 Stunden. Die Zellzählung wurde mit dem Zellzählgerät Casy TT durchgeführt, welches auch die Zellgröße bestimmte.

#### **3.3.2 Die Kultur der Zelllinie HMC-1 5C6**

Die Zelllinie HMC-1 5C6 wurde in unserem Hause als Subklon der Zelllinie HMC-1 etabliert [Weber S, Babina M *et al.* 1996] und entspricht, wie zuvor beschrieben, einem in ihrer Differenzierung weiter fortgeschrittenen Phänotyp der unreif-leukämischen Mastzelllinie HMC-1. Die Kultur der Zelllinie entsprach der der letzteren.

### 3.3.3 Die Kultur der Zelllinie LAD 2

Die Zelllinie LAD 2 wurde kürzlich etabliert und unserem Labor von Dr. Metcalfe und Akin, Bethesda, MD [Kirshenbaum AS *et al.* 2003] freundlichst überlassen. Sie repräsentiert eine Mastzellsarkom-Zelllinie, die sich durch hohe c-kit-Expression, sowie Tryptase, Histamin und FcεRI Level auszeichnet. Zellen dieser Linie lassen sich zu 70-80 % mit saurer Toluidinblaulösung anfärben, jedoch deutlich geringer als kutane Mastzellen. Gemäß ihrem Status in der Mastzellendifferenzierung proliferieren diese Zellen nur mäßig und benötigen für einen kompletten Zellzyklus ca. zwei Wochen.

Die Zellen wurden in Stem Pro 34-Medium kultiviert, welchem L-Glutamin (100 mM) und SCF (bei 100 ng/ml) zugegeben wurde. Die Zellzahl wurde bei  $7 \cdot 10^5$  eingestellt. Semidepletion der Zellen erfolgte am Tag 4, an dem auch neues SCF zugegeben wurde. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Atmosphäre und gesättigtem Wasserdampf.

### 3.3.4 Die Kultur der kutanen Mastzellen

Die Kultur der kutanen Mastzellen erfolgte in 24-Stunden-Medium, welches mit SCF (100 ng/ml) supplementiert wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Die Zellzahl wurde auf  $1 \cdot 10^6$  eingestellt.

Um die c-kit -Werte auf einem gut interpretierbaren Niveau zu halten, wurden die Mastzellen nach der Aufreinigung nicht gleich im Versuch angesetzt, sondern 24 Stunden vor Versuchsansatz ohne SCF inkubiert. Gleiches erfolgte bei MC die schon über 1-2 Tage mit SCF in Kultur gehalten wurden.

### 3.3.5 Die Bestimmung von Zellzahl und -durchmesser

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei den Zelllinien mit Hilfe des Gerätes Casy Model TT, welches auch die Größe der Zellen bestimmte.

Die Zahl der kutanen Mastzellen im Prozeß der Isolierung wurde per Hand in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung zweier Färbelösungen ermittelt. Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde Trypanblaulösung (0,18 % in PBS w/o) 1:1 mit der Zellsuspension versetzt. Die Methode der Trypanblaufärbung benutzt die

Membranintegrität als Parameter für die Vitalität. Somit können nur Zellen, die Defekte in der Membran haben, vom nicht membrangängigen Proteinfarbstoff Trypanblau durchdrungen werden.

Zur Bestimmung des Prozentsatzes der Mastzellen an der aufgereinigten Zellsuspension, wurden die Zellen mit saurer Toluidinblaulösung (0,1% in 0,5N HCL) 1:1 versetzt. Bei diesem Metachromasie genannten Effekt erfolgt durch negativ geladene Glycosaminglykane, vor allem das in zahlreichen Granula vorliegende Heparin, ein Farbumschlag nach violett.

### **3.4 Die Behandlung der Zellen**

#### **3.4.1 Behandlung mit Cycloheximid und Actinomycin D**

Als Inhibitor der de-novo-Proteinsynthese wurde in dieser Arbeit Cycloheximid eingesetzt, welches eine Hemmung der Transkription in im Zytosol lokalisierten Ribosomen von Eukaryonten durch Blockierung der Peptidbindung nach Ankopplung einer neuen Aminosäure an die t-RNA [Alberts *et al.* 1994] bewirkt.

Die Stocklösung liegt bei 500 mg/ml vor und wurde 1:1000 vorverdünnt und im Ansatz 1:100 eingesetzt. Actinomycin D, ein Stoff der durch Interkalation in die DNA die Replikation und Transkription hemmt, wurde von der Stock-Lösung aus, die eine Konzentration von 10 mg/ml hat 1:10 vorverdünnt und im Ansatz 1:100 eingesetzt. Bei Einsatz der Kombination beider Inhibitoren wurden die Mengen beibehalten. Die Zellen der drei Mastzellarten wurden wie oben beschrieben für 16 Stunden mit CHX (5 µg/ml), AD (10 µg/ml) und einer Kombination beider Wirkstoffe (5 µg/ml CHX & 10 µg/ml AD) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

#### **3.4.2 Die Behandlung mit SCF**

In den Versuchen zur Internalisierung des Rezeptors, wo SCF als Wirkstoff eingesetzt wurde, entsprach die Konzentration 5 ng/ml, was eine Austitration als optimale Arbeitskonzentration ergab. LAD 2 und kutane Mastzellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in Medium ohne SCF kultiviert. HMC-1-Zellen bedurften wegen ihrer

SCF-Unabhängigkeit nicht dieser Behandlung. Es wurde den Zellen für jeweils 120, 60 oder 20 Minuten SCF in einer Konzentration von 5ng/ml zugegeben.

### 3.4.3 Die Behandlung mit STI571

Imatinib Mesylat ist ein selektiver Inhibitor der Tyrosin Kinasen ABL, *ABL-related gene product*(ARG), KIT, CSF-1R und der *Platelet Derived Growth Factor Receptors* alpha und beta. Imatinib ist ein kompetitiver Antagonist der ATP Bindungsstelle. Es blockiert den Transfer von Phosphatgruppen aus ATP auf Tyrosinkinasereste der Substrate. Dies führt zu einer Unterbrechung der nachgeschalteten Signaltransduktion, die zur Zellproliferation führt. Die Wirkung von Imatinib in der Behandlung von Erkrankungen, wie der Chronisch-myeloischen Leukämie und Gastrointestinalen Stromatumoren ist als sehr effektiv beschrieben worden [Duffaud, F et al. 2009].

Um die optimale Konzentration des Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitors STI571 zu ermitteln, wurde eine Konzentrationsreihe angesetzt, die die Konzentration von 1µM als optimale Arbeitskonzentration ergab.

Die Stocklösung liegt bei einer Konzentration von 10 mM. Es wurde eine 1:100-Vorverdünnung angesetzt und diese im Ansatz 1:100 eingesetzt. Im Versuch wurden die Zellen mit STI571 über 30 min vor der jeweiligen SCF-Zugabe der verschiedenen Zeitpunkte präinkubiert.

Die in diesem Versuch eingesetzten Zellen waren Zellen der Linie HMC-1 und LAD 2. In diesem Versuch wurden die Zellen in einem Ansatz für je 20, 60 und 120 Minuten nur mit SCF (5ng/ml) inkubiert und in einem weiteren Ansatz die Zellen vor jeder SCF-Zugabe für 30 Minuten mit 1µM STI 571 präinkubiert. Desweiteren wurde eine Kontrolle ohne SCF pipettiert, sowie ein Ansatz mit Zellen und STI 571 alleine. Die beiden letzten Werte beziehen sich auf einen Zeitraum von 120 Minuten.

### 3.4.4 Die Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure

Die Konzentration des Wirkstoffs all-*trans*-Retinsäure entsprach 1µM. Die Stocklösung hatte eine Konzentration von 100 µM, die 1:1000 vorverdünnt wurde und im Ansatz 1:100 eingesetzt wurde. Die Verarbeitung dieses Wirkstoffs erfolgte ohne Licht unter

der Sterilbank, da all-*trans*-Retinsäure sehr lichtempfindlich ist. Im Kurzzeitversuch über 16 Stunden wurde diese einmalig zum Versuchsansatz gegeben, wogegen im Langzeitversuch über 7 Tage am vierten Tag (Tag 0,1,2,3...) ATRA erneut zugegeben wurde. Zudem wurde pro Zellart eine Kontrolle ohne ATRA pipettiert.

### **3.4.5 Die Behandlung mit Cycloheximid, Actinomycin D und SCF**

In diesem Versuch wurden alle drei Mastzellarten wie im Versuch mit CHX, AD und deren Kombination behandelt, mit dem Zusatz, dass eine Versuchsreihe mit Zellen durchgeführt wurde, die unmittelbar vor Zugabe mit 100ng/ml SCF versetzt worden waren. Nach dem ersten Versuchsdurchlauf war zu erkennen, daß die Messwerte auf ein kaum noch detektierbares Niveau gesunken waren, weshalb eine weitere Reihe mit Zellen, denen nur 1ng/ml SCF zugesetzt wurde angesetzt wurde.

### **3.4.6 Messung der Proben mittels Durchflußzytometrie und Auswertung der ermittelten Daten**

Die Durchflußzytometrie, ist ein fluoreszenzoptisches Verfahren zur Epitopdetektion von Rezeptormolekülen auf der Basis, daß Zellen in einem Probenführungssystem einzeln an einem Laserstrahl (hier: Argonlaser 488 nm) vorbeigeleitet werden. Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, wird er gestreut und läßt sich als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) oder im 90°-Winkel als Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC) erfassen.

Durch die Vorwärtsstreuung werden die Größe des Partikels und dessen Refraktionsindex, durch die Seitwärtsstreuung die Oberflächenbeschaffenheit und Granularität charakterisiert [Ormerod MG 1990]. Zur Detektion der gebundenen Antikörper werden diese mit Fluorochromen konjugiert.

Fluorochrome absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitation), wandeln die Energie und emittieren Licht einer anderen Wellenlänge (Emission). Diese Antikörper-Fluorochrom-Konjugate können sowohl als fertiges Produkt erworben als auch indirekt markiert werden, indem in einem weiteren Schritt der primäre Antikörper mit einem fluoreszierenden sogenannten Sekundärantikörper nachmarkiert wird. Den

verwendeten Fluorochromen FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und PE (Phycoerythrin) entsprechend werden Fluoreszenzlichtemissionen in den Wellenlängenbereichen von 515-545 nm (Grünfluoreszenz, FL1, FITC) und 564-606 nm (Orangefluoreszenz, FL2, PE) detektiert.

Die emittierten Fluoreszenzsignale werden von einem an das System angeschlossenen Rechner verarbeitet und auf dem Monitor dargestellt. Die Auswertung der so generierten Daten erfolgte über die Formel: Mittelwert der Probe/Mittelwert der Kontrolle \*100. Alle Werte sind Prozentzahlen der Mediumkontrolle sofern nicht anders angegeben.

Die Zahl der pro Ansatz eingesetzten Zellen entsprach, sofern nicht gesondert angegeben, bei der Zelllinie HMC-1 und HMC-1 5C6 je  $5 \cdot 10^5$  Exp 5, bei der Zelllinie LAD 2 je  $2,5 \cdot 10^5$  Exp 5 und bei den kutanen Mastzellen je  $2 \cdot 10^5$  Exp 5 Zellen. Die Zellen der drei Mastzellarten wurden, wie oben beschrieben, mit unterschiedlichen Wirkstoffen behandelt und für die Zeit der Behandlung im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre inkubiert.

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen geerntet, gewaschen in FACS-Puffer und anschließend mit je 400 µl AB-Serum (1:10 vorverdünnt) auf Eis im Dunkeln auf einem Rüttler für 15 Minuten inkubiert.

Nach dem Blocken unspezifischer Bindungen wurden die Zellen erneut in FACS-Puffer gewaschen, bevor der PE-konjugierte Antikörper CD117 (*clone* 95C6) mit je 20 µl pro 80 µl Probe zu den Zellen pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis auf dem Rüttler inkubiert wurde. Daran schloß sich ein weiterer Waschschrift an, nach dem die Zellen mit je 300µl 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert wurden.

Im Anschluß erfolgte sofort die durchflußzytometrische Analyse im FACS-Gerät Epics XL (BeckmannCoulter). Bei der Messung der Expression von CD29, CD50 und CD54 wurden je 10 µl des Primärantikörpers und im Falle von CD54 15µl eines Sekundärantikörpers Ziege anti-Maus-FITC eingesetzt. CD29 und CD50 lagen FITC-konjugiert vor.

CD117 (*clone* YB5.B8 e-Bioscience) wurde 1:40 vorverdünnt und 1:5 im Ansatz eingesetzt. Die Konjugation mit GAM-FITC erfolgte entsprechend der von CD54. Es

folgte ein weiterer Waschschrift mit anschließender Fixierung der Zellen und Messung im FACS.

### **3.5 Präparation von Kernextrakten aus den drei Mastzellarten**

Zur Herstellung nukleären Proteins aus Mastzellen wurden ca.  $2-3 \cdot 10^7$  Zellen der Zelllinien HMC-1 5C6 und LAD 2 nach Kultur dreimal in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Kutane Mastzellen wurden direkt nach der Aufreinigung dreimal in PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Deren Zellzahl schwankte gegebenenmaßen, unterschritt aber nicht die Zahl von  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen.

Die Reagenzien zur Herstellung der Kernextrakte sind Puffer A, Puffer B (Zusammensetzung im Kapitel 3.1.1 Puffer), DTT(4M), PMSF(1M), NP-40 (6,25-15 $\mu$ l auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen) und ein Proteaseinhibitorcocktail, der in Tablettenform bezogen wird. Zunächst wurde eine Tablette des fertigen Proteaseinhibitorcocktails mit 1 ml Puffer A gelöst und vor Gebrauch 1:5 mit der benötigten Menge Puffer A verdünnt.

Dazu wurden in oben genannten Endkonzentrationen DTT und PMSF pipettiert und alles zu dem weitgehend trocken gesaugten Zellpellet gegeben. Dieses wurde für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde NP-40, in oben angegebener Menge zu den Zellen pipettiert, für 10 Sekunden stark geschüttelt und sofort bei 14000 rpm und 4°C 30 Sekunden zentrifugiert. Das so erhaltene Lysat wurde in 1-ml-Gefäße verteilt und bei -80°C aufbewahrt, in dieser Arbeit jedoch nicht weiter verwendet. Das verbliebene Pellet wurde mit 50 $\mu$ l Puffer B, dem vorher im Verhältnis 1:5 der Proteaseinhibitorcocktail in Puffer B, DTT und PMSF in angegebener Menge zugesetzt worden war pro  $1 \cdot 10^7$  Zellen resuspendiert. Es schloß sich eine 15-minütige Inkubation auf Eis an, die durch mehrmaliges kräftiges Schütteln zu unterbrechen war. Danach folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C. Anschließend konnten die Kernextrakte in kleinen Mengen aliquotiert werden, um die recht instabilen Proteine nicht öfter auftauen und einfrieren zu müssen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.6 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der erhaltenen Kernextrakte wurden diese 1:10 mit Wasser verdünnt und zu je 10µl in Triplets in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 300µl *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden in dem Gerät Microplate-Reader der Firma Dynatech Laboratories gegenüber einem Standard aus BSA-Verdünnungen und einer Kontrolle mit *blank*-Werten (Wasser) ermittelt.

### 3.7 Der elektrophoretische Mobilitätsshift-Assay als Methode zur Untersuchung der Genregulation

Die Methode des *Gelshiftassays* auch *gel-retardation-assay* oder *electrophoretic-mobility-shift-assay* (EMSA) genannt, wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine eventuelle Bindung von Transkriptionsfaktoren aus nukleärem Protein humaner Mastzellen an definierte Abschnitte des c-kit-Promotors nachzuweisen, wie es für das murine System beschrieben ist. Dabei ist der *Gelshiftassay* eine Methode, um Genregulation zu untersuchen und DNA -Protein-Interaktionen darzustellen.

Das Prinzip des EMSA beruht darauf, daß Protein:DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel unter Elektrophorese langsamer wandern als DNA alleine. So ist es möglich, anhand der Bildung von unterschiedlich im Gel befindlichen Banden die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren zu determinieren. Als Sonde wird üblicherweise ein lineares DNA-Fragment, welches die gesuchte Bindungssequenz enthält eingesetzt. Diese DNA-Sequenz ist am 3' Ende biotinyliert und wird später durch Substratumsatz detektiert. In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden die Sonden c-kit-Sp1, c-kit-SCL-MITF, und als Kontrollen die Sonden Cyclin D1-Sp1 und IL-8-NF-κB eingesetzt.

Zu Beginn der Versuche wurde ein Volumen der Sonden von 4µl auf 25µl Gesamtvolumen eingesetzt. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass der Einsatz der halben Menge Sonde bessere Ergebnisse erzielte, was fortan berücksichtigt und entsprechend eingesetzt wurde. Die eingesetzten Kernextrakte stammten von Zellen der Linien HMC-1 5C6, LAD 2 und kutanen Mastzellen, die wie schon beschrieben

präpariert wurden. Die Menge des eingesetzten Proteins variierte von Zelllinie zu Zelllinie und nach Beschaffenheit des Proteins je nach Präparation. Die optimale Konzentration wurde in Vorversuchen bestimmt.

So kamen bei HMC-1 5C6-Zellen folgende Konzentrationen zur Anwendung, die in der Darstellung der EMSA's gesondert unter der Grafik angegeben sind:

0,05 µg; 0,1 µg; 0,25 µg; 0,5 µg; 1 µg; 2 µg; 5 µg; 10 µg; 20 µg

### **Weitere eingesetzte Mengen:**

2 µg; 4 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg; 15 µg; 20 µg; 30 µg; 50 µg

### **Eingesetzte Mengen der LAD 2-Zelllinie:**

1 µg; 2 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg; 15 µg

### **Eingesetzte Mengen der kutanen Mastzellen:**

1 µg; 2 µg; 4 µg; 5 µg; 7,5 µg

### **Zusatzstoffe zur Optimierung der Ergebnisse des EMSA:**

Folgende Reagentien sind in Verbindung mit dem Bindungspuffer zu jedem Ansatz pipettiert worden: Poly (dl\*dC), Glycerol, NP 40 und MgCl<sub>2</sub> und sind im kommerziell erworbenen EMSA-Kit, mit dem hier gearbeitet wurde, enthalten. Dieser sogenannte *Mastermix* bestand für 20 Proben aus je 44µl Binding Buffer und je 22µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, Poly (dl\*dC), Glycerol und NP 40. Zu jedem Ansatz wurden je 6µl davon pipettiert.

Die Durchführung des EMSA erfolgte nach Angaben des Herstellers des *Lightshift Chemiluminescent EMSA Kit* und ist im Folgenden kurz erläutert: Alle Ansätze der *Supershiftassays* wurden jeweils am Vorabend des Versuchs angesetzt, um der Reaktion der Komplexbildung ausreichend Zeit zu geben. Aus diesem Grund erfolgte die Inkubation jedoch bei 4°C.

Die Ansätze der EMSA's ohne Antikörper wurden am Versuchstag pipettiert, es sei denn es erfolgte ein direkter Vergleich mit *Supershift*proben. Es wurden pro EMSA 10 Proben auf ein natives 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, wobei pro Versuchstag zwei Gele parallel eingesetzt wurden.

Jede Probe hat ein Volumen von 20µl, wobei die konstanten Bestandteile die Sonde mit je 2µl und der oben beschriebene *Mastermix* mit je 6µl waren. Die Menge des Kernextrakts wurde anhand der einzusetzenden Konzentration und dem Ergebnis der Proteinbestimmung des jeweiligen Kernextrakts berechnet. Um die Spezifität der Bindung nachzuweisen, wurde ein 200-facher Überschuss der gleichen, jedoch nicht biotinylierten Sonde eingesetzt. Dies entsprach bei einer Sondenmenge von 2µl einer 1:500-Verdünnung 0,8µl der konzentrierten nicht biotinylierten Sonde. *Supershift*antikörper wurden in Konzentrationen von 2000 bzw. 200 (*rabbit*) µg/ml eingesetzt, was einer Menge von 1-3µl entsprach. Das freie Volumen wurde gegebenenfalls mit Wasser aufgefüllt. Die Ansätze wurden in folgender Reihenfolge pipettiert:

Zunächst wurde das Wasser vorgelegt, dann der Kernextrakt, der *Mastermix* und falls eingesetzt, der *Supershift*antikörper pipettiert. Diesen Ansätzen wurden anschließend erst die nicht biotinylierte Sonde und als letztes die biotinylierte Sonde zugesetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation beim *Supershift*assay dauerte 12 Stunden ohne Zugabe der Sonden und am nächsten Tag nach Zugabe entsprechend 30 Minuten.

In dieser Zeit erfolgte der Gelvorlauf zweier 5%-iger Polyacrylamidgele in einer Elektrophoresekammer mit 0,5 % TBE-Puffer bei 100 Volt. Der Gelvorlauf dient der Eliminierung von Ammoniumpersulfat aus dem Gel, welches zur Polymerisation des Gels benötigt wird, ferner der gleichmäßigen Verteilung von stabilisierenden Ionen und Gewährleistung einer konstanten Temperatur. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde den Proben je 5 µl 5X *Loading Buffer*, der ein hohes spezifisches Gewicht hat und die Probe am Boden der Kammer hält, zugesetzt und mit der Probe in der Hamiltonpipette gemischt. Nach Ziehen der Kämme und Spülung der Kammern mit der Hamiltonpipette werden die Proben mit letzterer in die Kammern pipettiert. Anschließend wird ein Strom der Stärke 100 Volt an die Kammer angelegt.

### **3.7.1 Die nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das Verfahren der Gelelektrophorese basiert auf der Möglichkeit der Trennung eines Gemisches von Proteinen oder Nukleinsäuren durch unterschiedliche Wanderung in

einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld. Dabei werden die Bestandteile anhand ihrer Masse und elektrischen Ladung getrennt.

Das Polyacrylamidgel fungiert durch seine definierte Porengröße als Sieb, welches der Größe nach Partikel passieren lässt. Nach ca. eineinhalb Stunden hat die freie Sonde zu ca. 2/3 bis 3/4 des Gels passiert und der Elektrophoreseapparat kann abgestellt werden.

Daran schließt sich das Übertragen der Reaktion vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran an, welche für 10 Minuten in TBE-Puffer getränkt wurde. Dieses geschah stets in einer dafür vorgesehenen *Wetblot*-Kammer, die mit 0,5 % TBE-Puffer gefüllt wurde. Dafür wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer mit TBE-Puffer gefüllten Wanne auf die Nylonmembran mit Hilfe zweier Pinzetten aufgebracht und mit je 3 Blättern Whatmanpapier und einem ca. 1-2 mm dicken Schwamm auf jeder Seite in zwei dafür vorgesehene Transfereinheiten überführt.

Diese wurden in eine Wetblotkammer eingesetzt, an die eine Spannung von 378 mA für 30-35 Minuten angelegt wurde. Anschließend konnten die Membranen mit einer Pinzette vom Gel abgelöst werden und mit einer UV-Lampe (254nm) mit der Bromphenolblau-Seite nach oben, die DNA an die Membran quervernetzt werden. Dies dauerte 4 min. Daran schlossen sich mehrere Schritte zur Detektion der biotinylierten DNA an:

- Zunächst mussten die im *Kit* enthaltenen *Blocking*- und Waschpuffer im Wasserbad auf 37-50°C erwärmt werden, bis alle Partikel gelöst waren. Dann wurden die Membranen in einer flachen Kunststoffschale in 20 ml *Blocking buffer* für 15 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert.
- In der Zwischenzeit wurden 66,7µl Streptavidin *Horseradish Peroxidase* zu 20 ml *Blocking Buffer* pipettiert.
- Nach 15 Minuten wurde der *Blocking Buffer* abgegossen und durch das eben hergestellte Konjugat ersetzt, welches für 15 Minuten unter leichtem Schütteln einwirkte.

- In der Zeit wurde der Waschpuffer hergestellt, indem 40 ml des im *Kit* enthaltenen 4X Waschpuffer zu 120 ml Wasser hinzugefügt wurden.
- nach 15 Minuten erfolgte ein kurzes Abspülen der Membranen mit 20 ml Waschpuffer, daran schlossen sich 4 je 5-minütige Waschschriffe mit je 20 ml des gleichen Puffers und zwischenzeitlichem Abgießen an.
- Danach wurden die Membranen in 30 ml *Equilibration Buffer* für 15 Minuten unter leichtem Schütteln inkubiert.
- In der Zeit wurde das Substrat durch Zusammenfügen von je 7 ml *Luminol Enhancer* und *Stable Peroxide Solution* hergestellt.
- Dieses wurde nach Abgießen des *Equilibration Buffers* für 5 Minuten ohne Schütteln mit den Membranen inkubiert.
- Anschließend wurden die abgetropften Membranen in eine Filmkassette überführt.
- In der Dunkelkammer wurde je ein Film für 5, 15 und 60 Minuten aufgelegt und entwickelt.

### 3.7.2 Die Interpretation des EMSA

Die vom unteren Filmrand gesehen erste Schwärzung des Films ist die freie Sonde, die kein Protein gebunden hat. Alle weiteren Banden, sind DNA-Protein-Komplexe, deren Spezifität jedoch noch gesichert werden muß.

Dies ist möglich über den Vergleich mit der Bande der entsprechenden *Lane*, die im Ansatz den 200-fachen Überschuss nicht biotinylierter Sonde vor der biotinylierten Sonde erhielt.

Dadurch, dass die nicht markierte Sonde in hohem Überschuss vorhanden ist und als erstes binden konnte, ist davon auszugehen, dass die biotinylierte Sonde nicht oder nur sehr viel geringer binden kann. Das muss sich im EMSA als stark abgeschwächte oder nicht mehr vorhandene Bande im Vergleich zur Probe darstellen. Der bindende Faktor kann durch sogenannte *Supershift assays* identifiziert werden, in denen zu den

Kernextrakten im Ansatz Antikörper gegen den entsprechenden Transkriptionsfaktor gegeben werden, die über Nacht Komplexe bilden können. Diese werden bei zusätzlichem Binden der Sonde so groß, dass ein zusätzlicher *Shift* entsteht, der eine Bande oberhalb des eigentlichen Komplexes verursacht oder die charakteristische Bande eliminiert ohne selbst sichtbar zu werden.

### 3.8 Statistik

Der T-Test nach Student ermöglicht den Vergleich zweier empirischer Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten. Mit Hilfe dieses Tests können auch Versuche mit einer geringen Anzahl statistisch gesichert werden. Dieser wurde bei Auswertung sämtlicher FACS- Analysen eingesetzt. Es wurde definiert, dass ein p-Wert von  $*p < 0,05$  als signifikant,  $**p < 0,01$  als hoch signifikant und  $***p < 0,001$  als sehr hoch signifikant bezeichnet werden kann.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungen zum Grundumsatz von c-kit bei unterschiedlichen Mastzellsystemen**

#### **4.1.1 Die Beeinflussung der Oberflächenexpression von c-kit durch Inhibitoren der Transkription und de-novo-Proteinsynthese**

Wie schon erwähnt, unterscheiden sich die drei untersuchten Mastzellsysteme unter anderem in ihrem Reifegrad, was die Fragestellung aufkommen ließ, ob auch der Grundumsatz des Wachstumsfaktorrezeptors c-kit, der eine maßgebliche Rolle für Überleben und Proliferation der Mastzelle darstellt, Reifestadium-spezifisch reguliert wird.

Die Expression des Rezeptors scheint auf verschiedenen Ebenen reguliert zu werden, jedoch sind diese Wege noch nicht erschöpfend geklärt. Einen Einblick in den Grundumsatz des Proteins könnte die Behandlung mit Inhibitoren der Transkription und de-novo-Proteinsynthese und deren Auswirkungen auf die Zelloberflächenexpression von c-kit gewähren. Zum Vergleich wurden andere Oberflächenrezeptoren wie ICAM-1 (CD50), ICAM-3 (CD54) und die  $\beta$ 1 Integrinkette CD29 auf Zellen untersucht, die die gleiche Behandlung erfahren haben. Um einen Vergleich zwischen dem c-kit-Rezeptor und den oben genannten Oberflächenrezeptoren in Bezug auf die Geschwindigkeit des Umsatzes des Rezeptors nach Behandlung mit den Inhibitoren herstellen zu können, wurden zunächst HMC-1-Zellen über die gleiche Zeit mit derselben Behandlung inkubiert und die Zellen anschließend auf die Expression von ICAM-1, ICAM-3, CD29 und CD117 (c-kit) im FACS analysiert. Es ergab sich aus der Messung, daß c-kit den Rezeptor darstellt, der dem schnellsten Umsatz unterlag.

In der Tat war nach 16-stündiger Inkubation mit CHX der Wert der Oberflächenexpression von CD29, CD50 und CD54 um maximal 10% (CD29) gesunken, wohingegen bei c-kit eine knapp 40%-ige Abnahme zu verzeichnen war. Die Behandlung mit AD über den gleichen Zeitraum hatte bei CD29 und CD54 ebenfalls eine Abnahme der Expression der Rezeptoren um ca. 10% zur Folge, wobei die Dichte des CD50 -Rezeptors nach 16-stündiger Inkubation mit AD sogar einen Anstieg auf 138% des Basalwertes erfuhr (siehe Abb. 1)

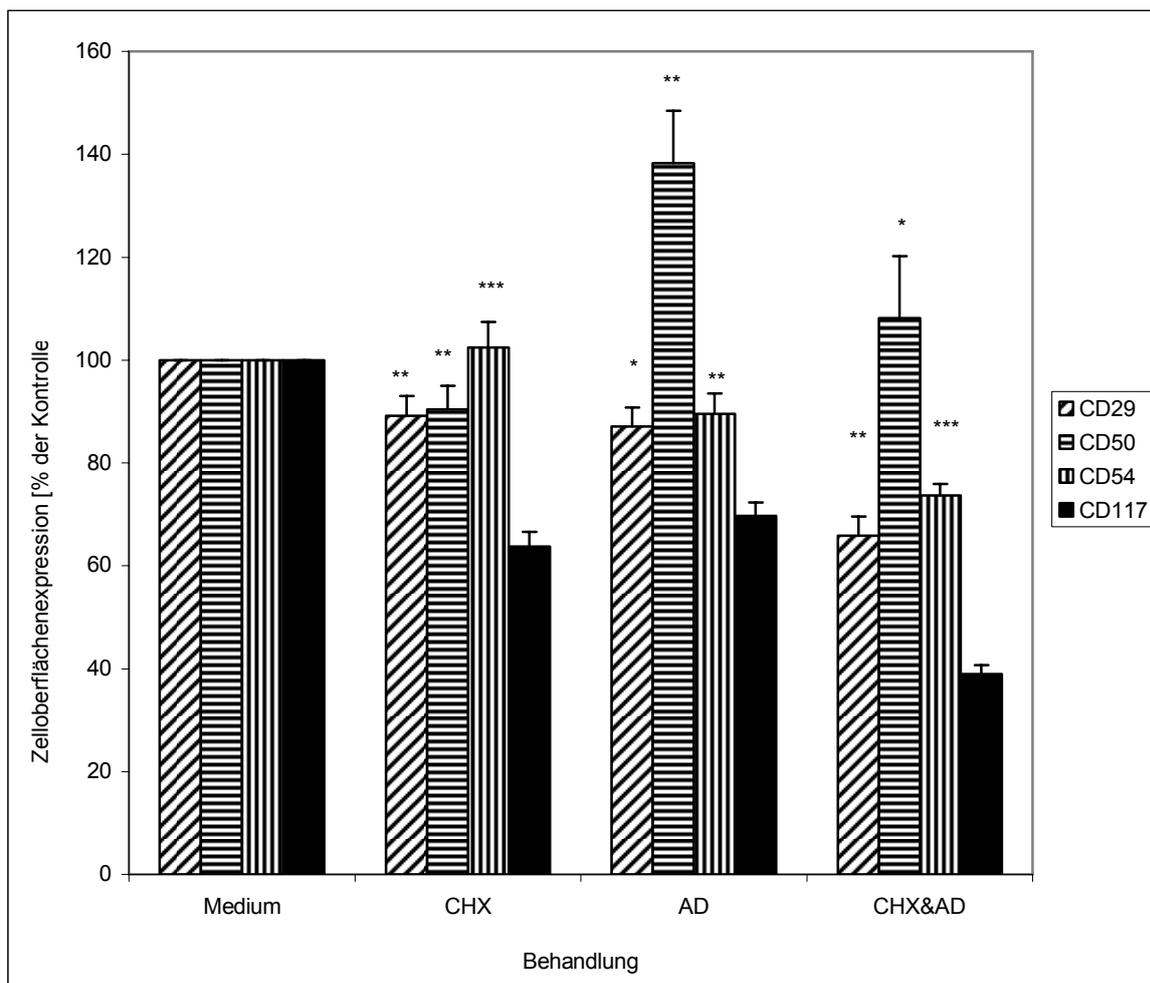


Abb. 1: Oberflächenexpression der Rezeptoren CD29, CD50, CD54 und CD117 nach 16-stündiger Inkubation mit CHX (5µg/ml), AD (10µg/ml) und der Kombination beider Inhibitoren bei HMC-1-Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt in % der erreichten gemittelten Fluoreszenzintensität unbehandelter Kontrollzellen und sind als Mittelwert  $\pm$ SEM aus 5 unabhängigen Versuchen angegeben. Die Herunterregulation des c-kit-Rezeptors war im Vergleich zu allen anderen Rezeptoren unabhängig von der Behandlung signifikant stärker (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  oder \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Anschließend wurde der c-kit-Umsatz unter der Wirkung von Cycloheximid und AD bei allen drei MC-Systemen parallel untersucht. Als Hemmstoff der Transkription wurde wie zuvor Actinomycin D (10 µg/ml) eingesetzt. Auch hierbei erfolgte die Behandlung über einen Inkubationszeitraum von 16 h, welches sich nach Vordaten der Arbeitsgruppe als der optimale Zeitrahmen erwiesen hatte. Die Blockierung der Proteinbiosynthese wurde (wie oben beschrieben) durch den Wirkstoff Cycloheximid (5 µg/ml) erreicht. Nach Behandlung der Zellen über den gleichen Zeitraum war eine

Verminderung der Oberflächenexpression auf 57,4% der Mediumkontrolle bei 5C6-Zellen erfolgt. Der Einfluß von AD hatte eine Abnahme der Oberflächenexpression auf 59,6% der Kontrolle zufolge. Um zu beobachten, ob die Wirkungen der einzelnen Inhibitoren sich gegenseitig verstärken, wurden beide Inhibitoren kombiniert eingesetzt und eine zusätzliche Abnahme der c-kit-Expression auf 29,7% des Basalwertes gemessen, was als additiver Effekt gesehen werden muß.

Die Daten der Messungen der Zelllinie LAD 2 ergaben eine Abnahme der c-kit-Expression bei Behandlung mit CHX auf 63,9%, mit AD auf 61,9% und bei Einsatz der Kombination der beiden auf 47,8% der Mediumkontrolle. Auch bei den kutanen Mastzellen war nach 16 h eine deutlich verminderte Oberflächenexpression von 59,8% bei CHX, 69,4% bei AD und 58,1% bei der Kombination im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen (siehe Abb. 2).

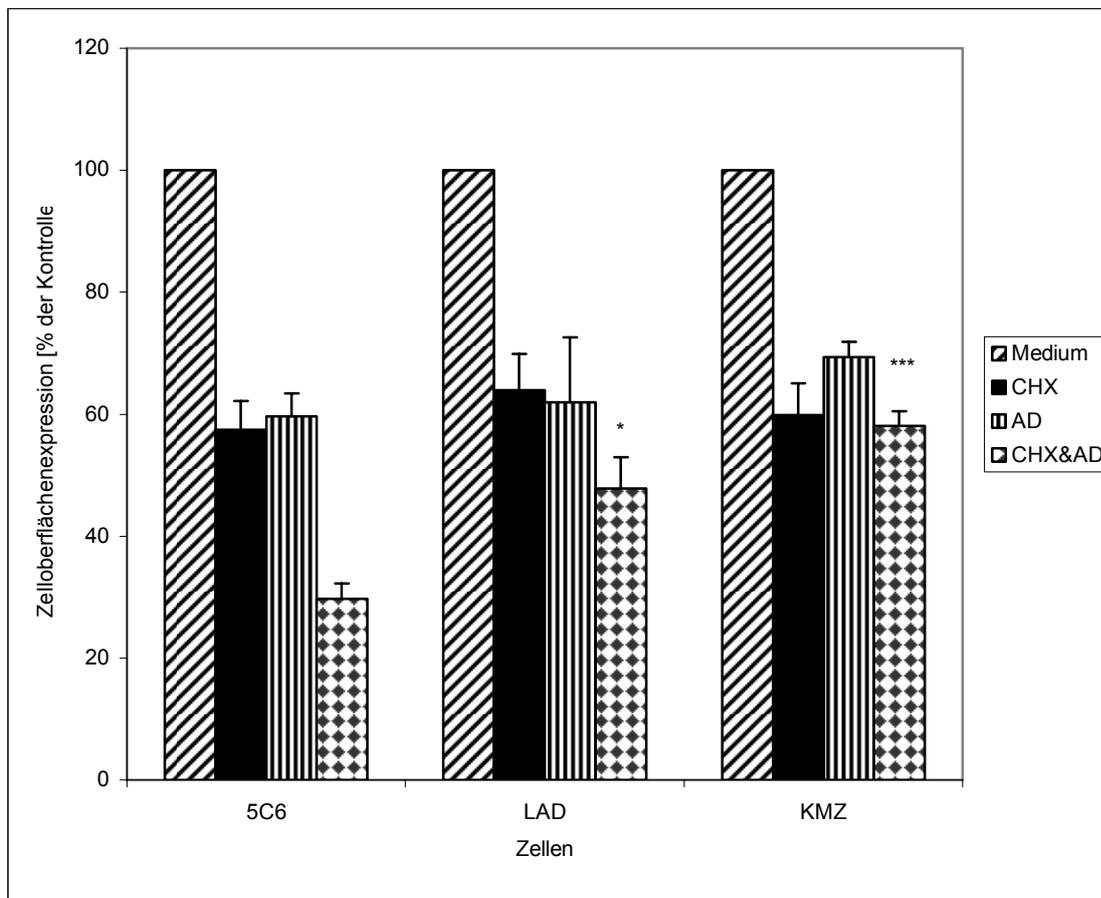


Abb. 2: Darstellung der Oberflächenexpression des c-kit-Rezeptors nach 16-stündiger Inkubation mit CHX (5 µg/ml), AD (10 µg/ml) und der Kombination beider Inhibitoren bei den drei Mastzellarten. Die Ergebnisse sind in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle angegeben und stellen den Mittelwert aus 10 (5C6-Zellen), 4 (LAD 2-Zellen) und 8 (KMZ) unabhängigen Versuchen  $\pm$  SEM dar. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellarten waren in den mit der Kombination aus CHX und AD behandelten LAD 2-Zellen im Vergleich zu HMC-1 5C6-Zellen (\* $p \leq 0,05$ ) zu sehen und für KMZ bezogen auf HMC-1 5C6-Zellen (\*\* $p \leq 0,001$ ).

#### 4.1.2 Einfluß der Ligandenbindung auf die Zelloberflächenexpression von c-kit in drei verschiedenen Mastzellsystemen

Die Zelllinien HMC-1, LAD 2 und kutane Mastzellen wurden zur Untersuchung der ligandeninduzierten Internalisierung des c-kit-Rezeptors für unterschiedliche Zeiträume (20 min, 60 min, 120 min) mit SCF (bei 5 ng/ml) bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Oberflächenexpression des Rezeptors durchflusszytometrisch analysiert.

Um aussagekräftige Daten zu erhalten, wurden die für den Versuchsansatz benötigten LAD 2-Zellen für einen Zeitraum von 24 h nach zweimaligem Waschen in PBS in Abwesenheit von dem sonst im Medium vorhandenen SCF kultiviert. Dieser Bedingung ist auch bei den kutanen Mastzellen Rechnung getragen worden, indem sie direkt nach der Aufreinigung in SCF-freiem MC-Medium kultiviert wurden und der Versuchsansatz erst 24 h danach angesetzt wurde.

Die resultierenden Daten ergaben schon nach 20 min einen rapiden Abfall der Oberflächenexpression in allen drei Mastzellarten. Gleichzeitig waren nach 20 min innerhalb der Zellarten signifikante Unterschiede ersichtlich, mit der geringsten Ausprägung bei kutanen Mastzellen. Nach 60 min war eine Abnahme der Zelloberflächenexpression auf 32,7% der Mediumkontrolle bei kutanen MC, auf 19,2% bei LAD 2-Zellen und auf 16% bei HMC-1-Zellen zu beobachten, die nach weiteren 60 min nur noch leicht verstärkt wurde (siehe Abb. 3)

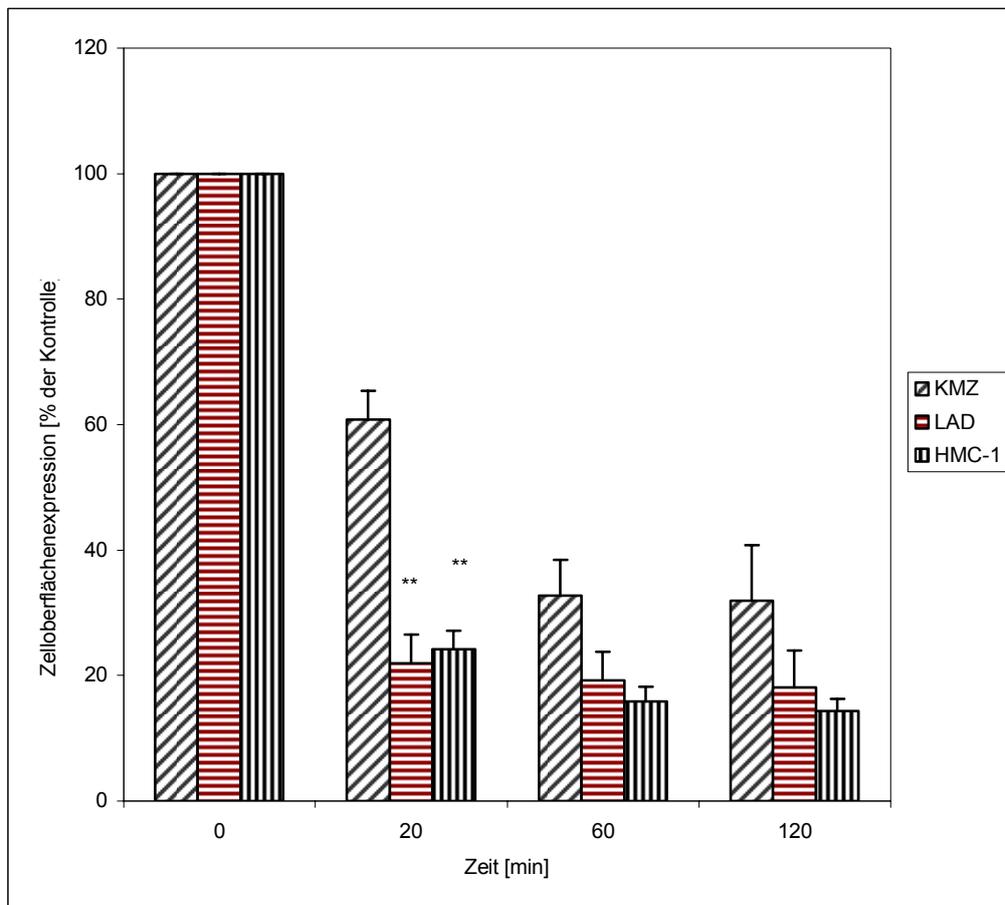


Abb. 3: Verlauf der Zelloberflächenexpression von c-kit bei den drei Mastzellsystemen nach Inkubation mit SCF für 20, 60 und 120 min. Die Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und sind der Mittelwert  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich für LAD 2-Zellen und HMC1 5C6-Zellen bezogen auf KMZ nach 20 min (\*\* $p \leq 0,01$ ).

Die vorliegenden Ergebnisse weisen eine schnelle Herabregulation des Rezeptors auf der Zelloberfläche nach Ligandenbindung nach, die auch innerhalb der verschiedenen Mastzellsysteme nur geringfügigen Veränderungen unterliegt.

#### 4.1.3 Hemmung der Liganden-induzierten Internalisierung des Rezeptors durch STI571

Der Wirkstoff STI571, ein spezifisch wirkender Inhibitor der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit, wurde eingesetzt, um den Einfluß der c-kit-Kinaseaktivität auf die ligandeninduzierte Herabregulation des Rezeptors zu bestimmen, indem Zellen der Linien HMC-1 und LAD

2 für jeweils 30 min vor SCF-Zugabe mit STI571 (1 $\mu$ M) bei 37°C präinkubiert wurden. Das weitere Vorgehen entsprach dem des vorhergehenden Versuchs, indem die Zellen für 20, 60 und 120 min mit SCF behandelt wurden.

Die Substanz STI571 war in der Lage, die schnelle Herabregulation von c-kit nach Ligandenbindung zu hemmen, ein Effekt, der nach 20 min am ausgeprägtesten schien. Dabei ergab sich für HMC-1 Zellen, wie in Abb. 4 zu sehen, eine Differenz von 28% zwischen den mit SCF und STI571 behandelten Zellen und den Zellen, die nur mit SCF behandelt wurden.

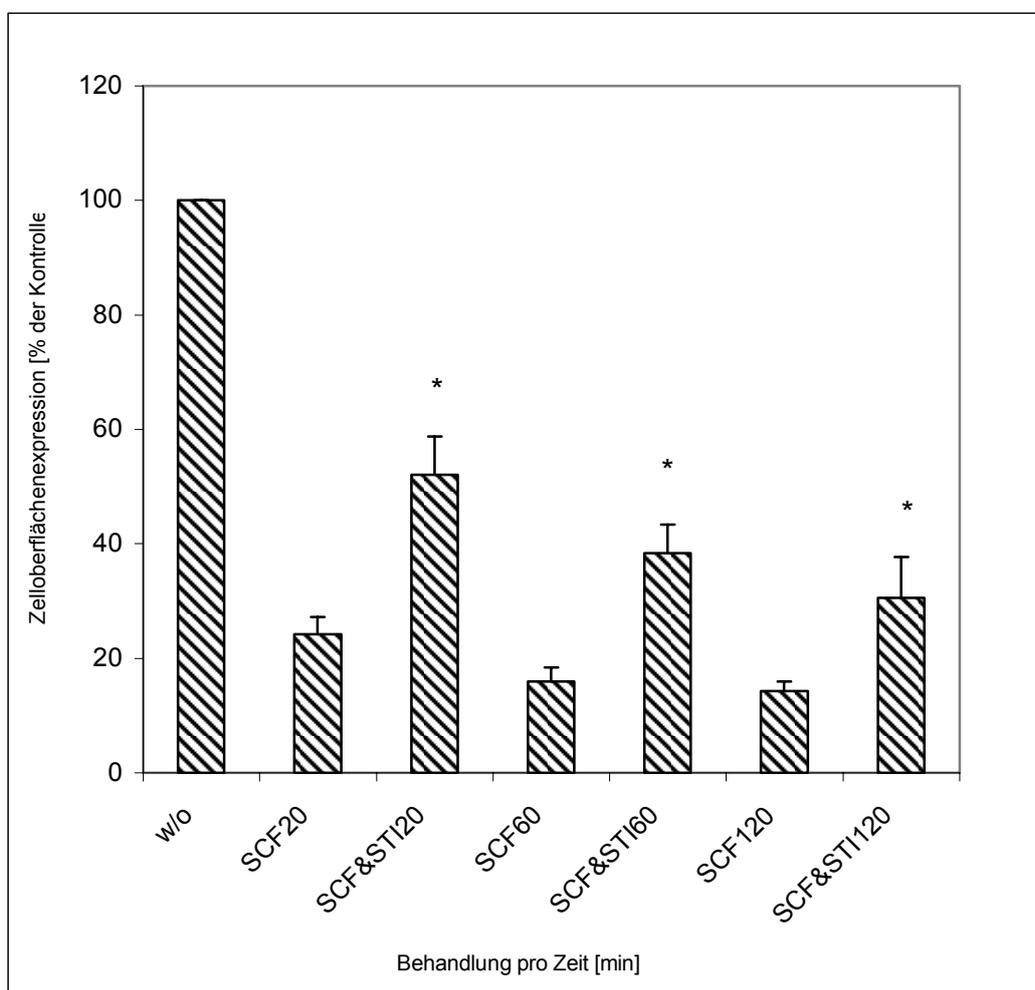


Abb. 4: Einfluß der Behandlung mit STI571 auf die Herabregulation des c-kit-Rezeptors nach SCF-Zugabe bei HMC-1-Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und der Mittelwert  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Versuchen. Die Behandlung mit STI571 ergab eine signifikante Minderung der Internalisierung des Rezeptors zu allen 3 Zeitpunkten (\* $p \leq 0,05$ ).

Auch bei der Zelllinie LAD 2 war eine deutliche Hemmung der Herabregulation bereits nach 20 min erreicht, was darauf hinweist, daß STI571 auch hier in der Lage ist, den Internalisierungsprozess des Rezeptors zu verzögern (siehe Abb. 5).

Zu dem Zeitpunkt lag der Wert für die Zelloberflächenexpression bei SCF-behandelten LAD 2-Zellen bei 22% und bei 64,2% der unbehandelten Kontrolle bei LAD 2-Zellen, die mit SCF behandelt wurden und mit STI571 präinkubiert wurden.

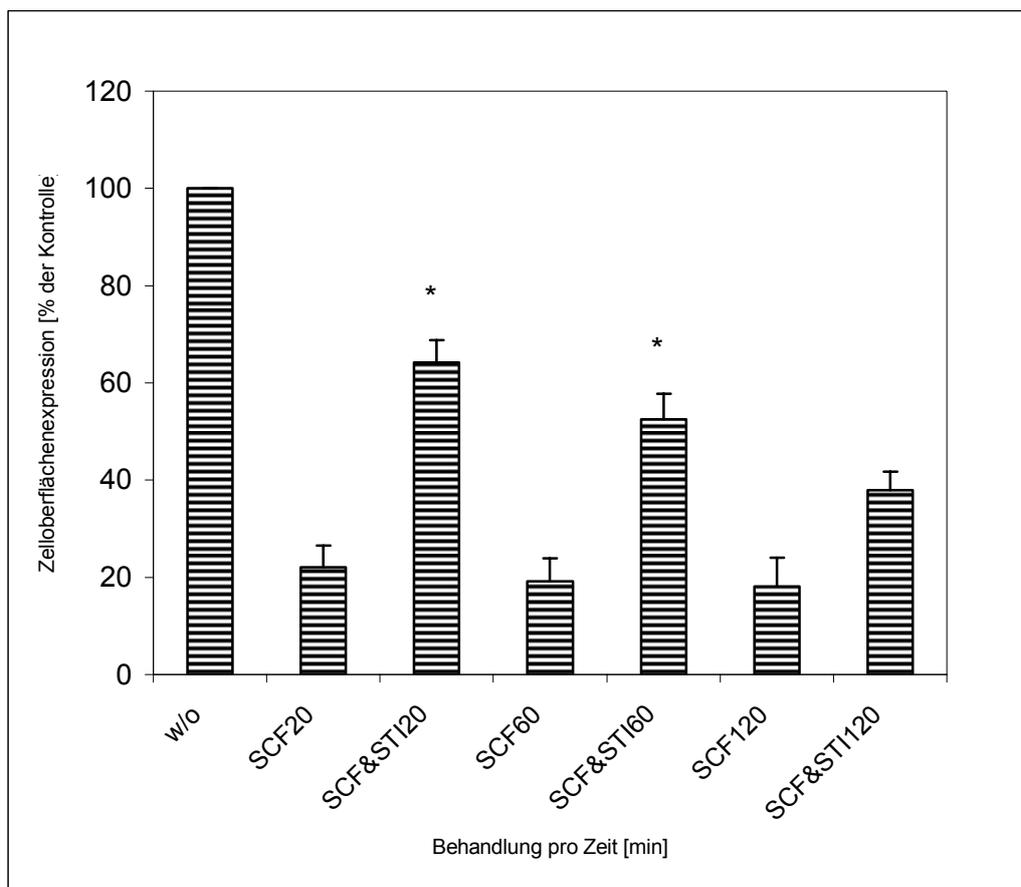


Abb. 5: Einfluß der Behandlung mit STI571 auf die Herabregulation des c-kit-Rezeptors nach SCF-Gabe bei LAD 2-Zellen. Die Ergebnisse sind in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und Mittelwert  $\pm$  SEM aus 3 unabhängigen Versuchen angegeben. Die Präinkubation der Zellen mit STI571 für 30 min vor SCF-Gabe resultierte in einer signifikanten Minderung der Internalisierung des Rezeptors bezogen auf reine SCF-Gabe ( $*p \leq 0,05$ ) zu den Zeitpunkten 20 und 60 min.

Wie aus der Literatur ersichtlich, ist als Voraussetzung der Internalisierung eine intakte Kinase-Aktivität notwendig. Deshalb ist der aus der Abbildung hervorgehende Effekt

der Behandlung mit STI571 auf HMC-1-Zellen, die die Asp816Val-Mutation im c-kit-Gen tragen ein unerwarteter. Ein weiterer Effekt war in der Herabregulation des Rezeptors durch STI571 selbst im Einsatz ohne SCF zu sehen, welcher im Vergleich zur Mediumkontrolle nur noch einen Wert von 55,5% bei HMC-1-Zellen und 79,3% bei LAD 2-Zellen erreichte (siehe Abb. 6).

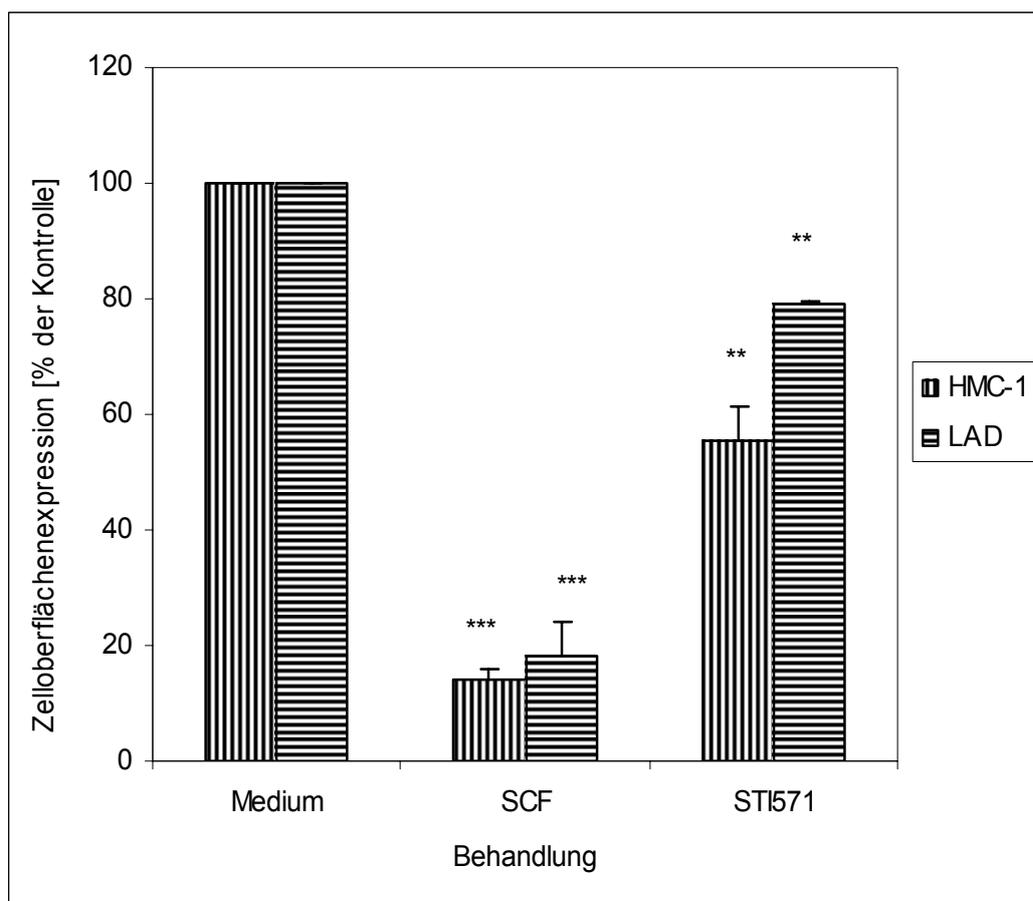


Abb. 6: Einfluß der Behandlung mit STI571 oder SCF alleine über 120 min auf c-kit bei HMC1 und LAD 2-Zellen. Die Ergebnisse sind in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle angegeben und stellen den Mittelwert  $\pm$  SEM aus 4 (LAD 2-Zellen) bzw. 6 (HMC1-Zellen) unabhängigen Versuchen dar. Sowohl die Behandlung mit SCF alleine ( $***p \leq 0,001$ ) als auch STI571 alleine ( $**p \leq 0,01$ ) hatte eine signifikante Veränderung der Rezeptorexpression auf beiden Zellarten, bezogen auf die Mediumkontrolle, zufolge.

#### **4.1.4 Einfluß der Inkubation der Mastzellen mit SCF auf das Verhalten bei der Behandlung der Zellen mit Inhibitoren der Transkription und de-novo-Proteinsynthese**

In einem weiteren Versuch wurden die beiden Mastzellarten HMC1 5C6 und kutane Mastzellen in Anwesenheit von SCF (1 bzw. 100ng/ml) mit den oben bereits erwähnten Hemmstoffen CHX (als Inhibitor der Proteinbiosynthese), AD (Inhibitor der Transkription) und deren Kombination über einen Zeitraum von 16 Stunden behandelt, um zu erfahren, ob die einzelnen Prozesse wie Transkription, Translation und Internalisierung sich gegenseitig hemmen würden oder unabhängig voneinander verlaufen. Die durchflußzytometrische Analyse ergab eine Summation der einzelnen Effekte, die sich in kaum mehr detektierbaren Meßwerten der c-kit-Expression niederschlugen. Die Zelloberflächenexpression der HMC1 5C6-Zellen entsprach nach 16-stündiger Inkubation mit SCF noch 38,9% der Mediumkontrolle, während kutane Mastzellen den Rezeptor nach dieser Zeit noch zu 10,4% exprimierten (siehe Abb. 7)

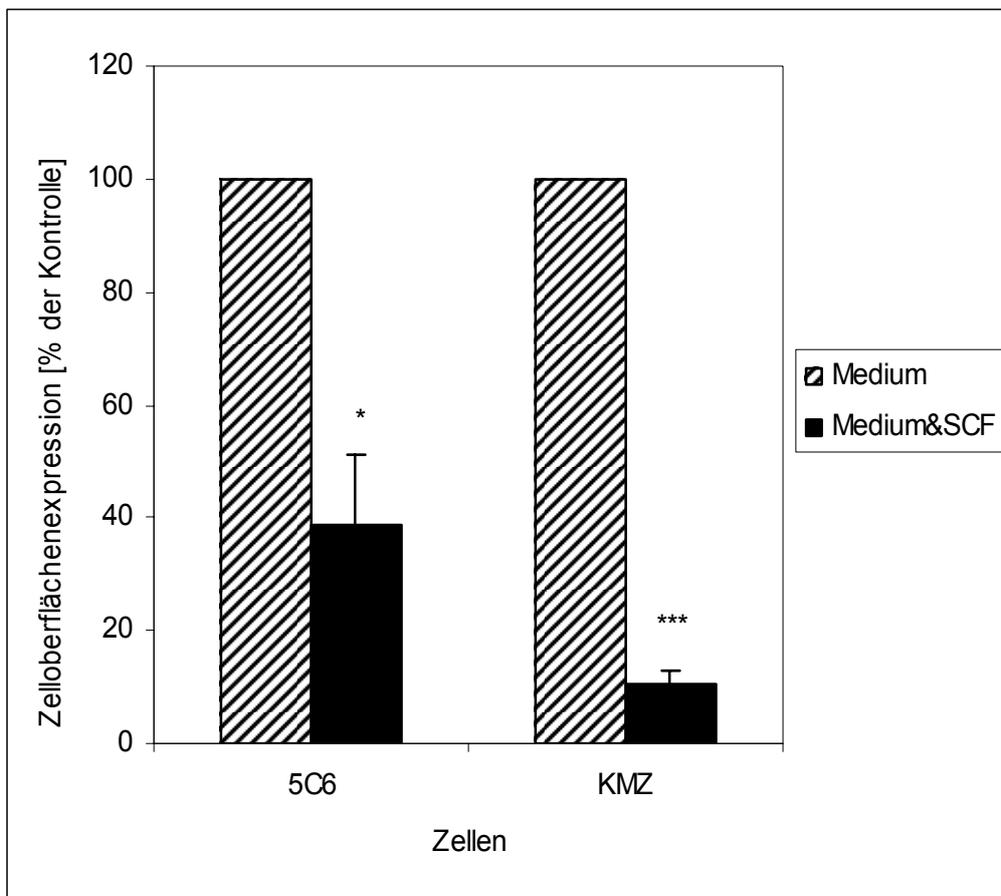


Abb. 7: Zelloberflächenexpression von c-kit auf HMC-1 5C6-Zellen und KMZ nach Inkubation mit SCF (100 ng/ml) über einen Zeitraum von 16 h. Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und Mittelwert  $\pm$  SEM aus 5 (HMC1 5C6-Zellen) bzw. 4 (KMZ) unabhängigen Versuchen. Die SCF-Gabe bewirkt bei beiden Zellarten eine signifikante Reduktion der Zelloberflächenexpression von c-kit (\* $p \leq 0,05$ ) bei HMC1 5C6-Zellen versus Mediumkontrolle bzw. (\*\* $p \leq 0,001$ ) bei KMZ versus die Mediumkontrolle.

Die Inkubation der Zellen mit SCF und der zusätzlichen Gabe von CHX, AD und deren Kombination führte, wie oben erwähnt, zu Werten, die besonders im Falle der kutanen Mastzellen bei einer Gabe von 100ng/ml zu kaum zu interpretieren waren. Deshalb erfolgte bei diesem Versuch eine Gabe von 1ng/ml SCF.

Damit war ein Absinken der Rezeptorexpression bei kutanen Mastzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wie in Abb. 8 dargestellt zu beobachten: Bei Inkubation der Zellen mit SCF und CHX erfolgte eine Herabregulierung auf 9,2%, mit CHX alleine auf 55,5%. AD und SCF regulierten die Expression auf 9% herunter, AD alleine auf 60,5%.

Die Kombination von AD und SCF ließ den Rezeptor auf 8,5% sinken, wobei die Kombination alleine einen Wert von 50,4% erreichte.

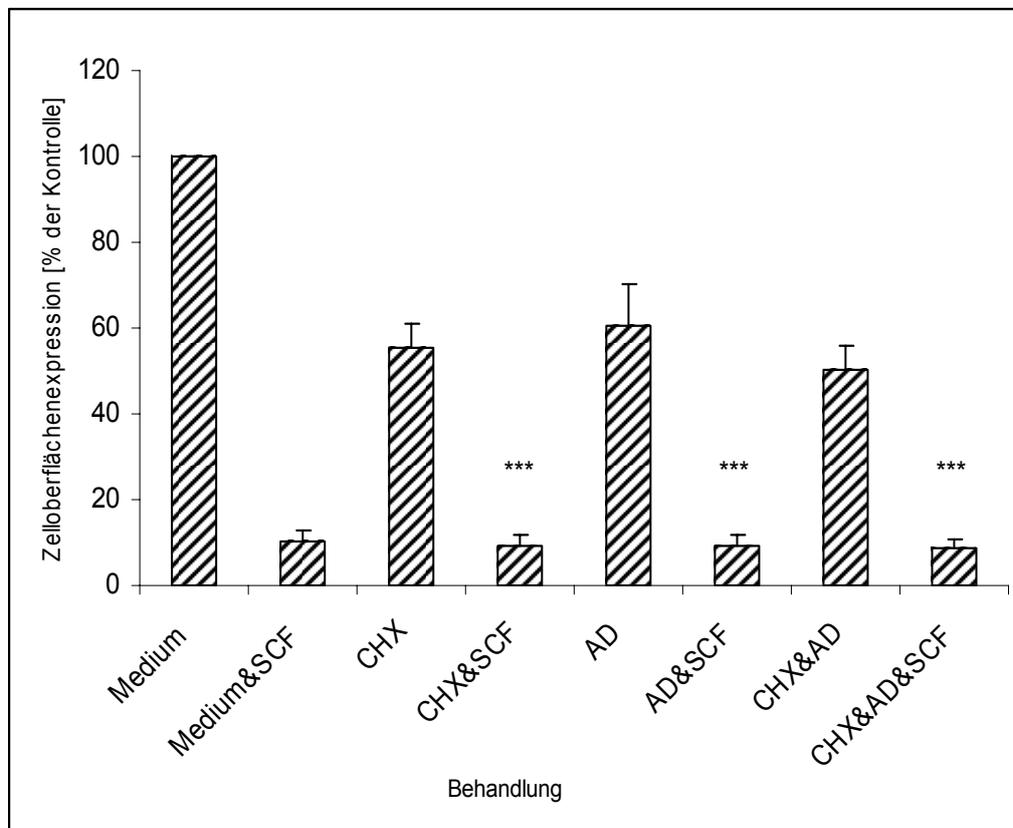


Abb. 8.: Einfluss der Behandlung von KMZ mit CHX, AD, deren Kombination alleine und in Kombination mit SCF. Die Ergebnisse sind Mittelwerte( $\pm$  SEM) aus 4 unabhängigen Versuchen und dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrollzellen. Statistisch signifikante Unterschiede waren in allen Behandlungen mit den Inhibitoren & SCF versus Inhibitoren alleine zu sehen ( $***p \leq 0,001$ ).

Bei HMC1 5C6-Zellen, die über denselben Zeitraum (16 h) mit SCF inkubiert wurden, zeigte sich eine Abnahme auf 66,6% bei CHX, 67,3% bei AD und 37% bei der Kombination. Mit SCF verstärkte sich der Effekt auf 19,35%, 18,4% und 15,6% der Mediumkontrolle (Abb. 9)

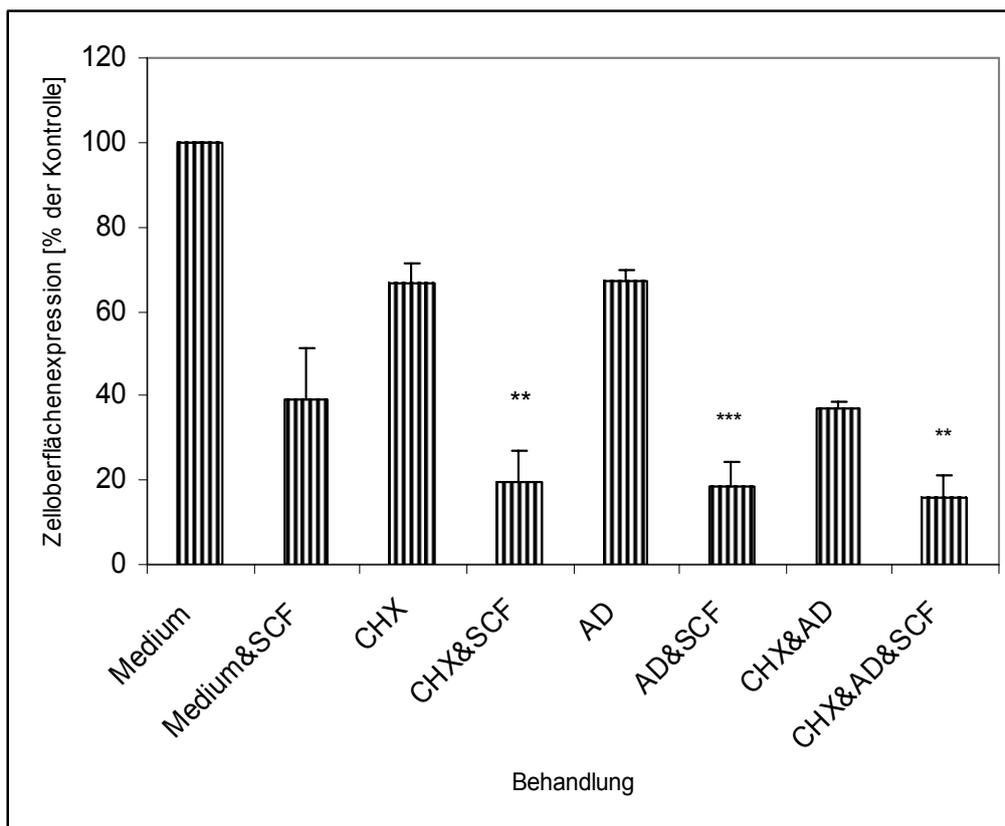


Abb. 9: Darstellung des Einflusses der Behandlung von Zellen der Linie HMC-1 5C6 mit SCF und CHX, AD und deren Kombination gemeinsam auf die Zelloberflächenexpression von c-kit. Die Ergebnisse sind in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle angegeben und sind ein Mittelwert ( $\pm$  SEM) aus 5(HMC1 5C6-Zellen) unabhängigen Versuchen. Die Unterschiede zwischen den Werten für die Behandlung mit den Inhibitoren alleine versus Inhibitoren & SCF waren alle statistisch signifikant (\*\* $p \leq 0,01$  oder \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Die im vorigen erläuterten Daten sind publiziert [Babina M, *et al.* 2006].

## 4.2 Effekte von all-*trans*-Retinsäure auf den Grundumsatz von c-kit

### 4.2.1 Kurzfristeffekte von ATRA auf die Zelloberflächenexpression von c-kit bei den drei verschiedenen Mastzellsystemen

All-*trans*-Retinsäure ist als wirksame Regulators substanz in der Hämatopoese seit langem bekannt, wo sie bevorzugt unreife und proliferierende Leukozyten beeinflusst. In dieser Arbeit wurden die schon besprochenen drei Mastzelltypen HMC-1 5C6, LAD 2 und kutane Mastzellen auf den Einfluß von ATRA auf die c-kit-Expression untersucht. Alle Zellen wurden für 16 Stunden mit ATRA (1 $\mu$ M) inkubiert und wiesen bei der durchflußzytometrischen Analyse noch eine c-kit-Expression von 59,6% der

Mediumkontrolle bei HMC-1 5C6-Zellen, 77,9% bei LAD 2-Zellen und 81,1% bei kutanen Mastzellen auf (siehe Abb. 10).

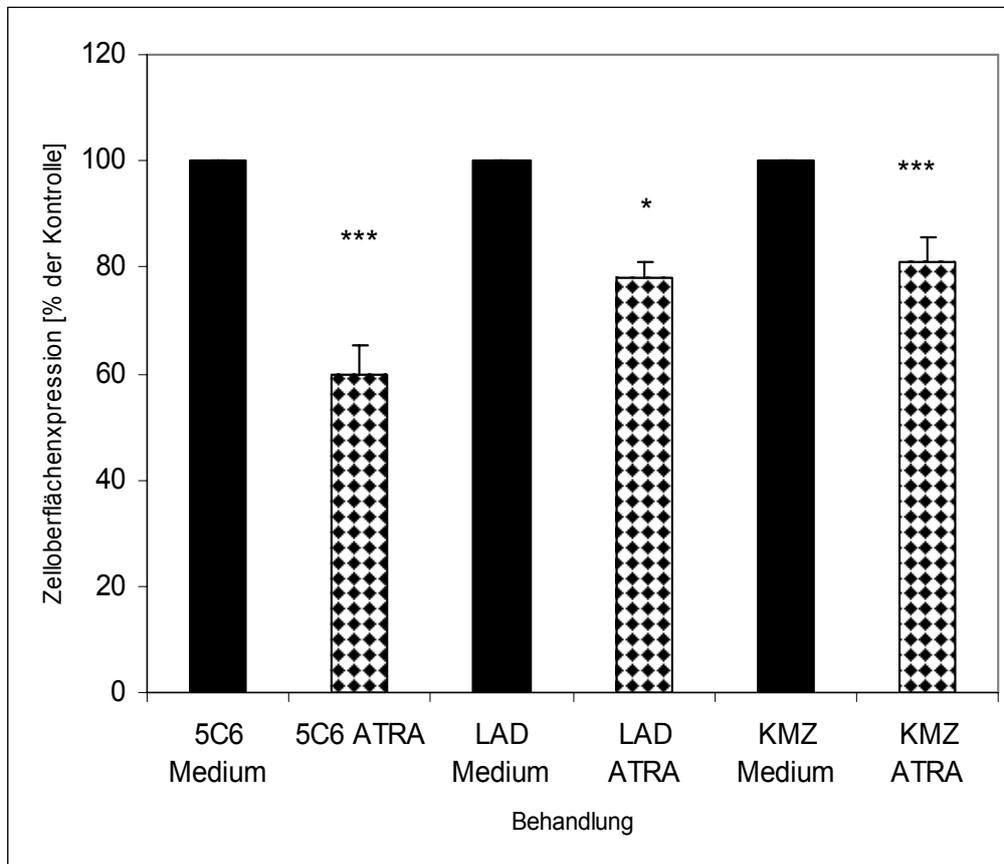


Abb. 10: Einfluss der Behandlung mit ATRA (1 $\mu$ M) über einen Zeitraum von 16 Stunden auf die c-kit-Expression der hier untersuchten Mastzellsysteme. Die Ergebnisse sind ausgedrückt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und der Mittelwert( $\pm$  SEM) aus 7 (HMC1 5C6-Zellen und KMZ) und 3 unabhängigen Versuchen (LAD 2). Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede bei allen Zellarten zwischen dem Wert der mit ATRA inkubierten Zellen und der Mediumkontrolle (KMZ und HMC1 5C6 \*\*\* $p \leq 0,001$ ; LAD 2 \* $p \leq 0,05$ ).

Die langfristigen Effekte von ATRA auf die c-kit Regulation wurden im Rahmen einer anderen Dissertation aus der Arbeitsgruppe untersucht, die die Analyse der mRNA und des Proteins von c-kit nach Inkubation der Zellen mit ATRA über einen Zeitraum von 7 Tagen als Gegenstand hatte. Die Daten aus dieser Untersuchung wiesen nach dieser Behandlung eine im Vergleich zur Proteinebene nur mäßige Herabregulation auf mRNA-Ebene bei LAD 2-Zellen und kutanen Mastzellen nach, wohingegen bei HMC-1

5C6-Zellen keine, bzw. nur eine sehr geringe Herabregulation der mRNA zu beobachten war [Thienemann F et al. 2004, ESDR-Abstract].

Im Rahmen jener Arbeit wurde desweiteren die mRNA-Ebene des c-kit-Rezeptors nach 16-stündiger Inkubation untersucht, welche bei allen drei Mastzellsystemen zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Veränderung erfahren hat. Folglich muß der raschen und deutlich signifikanten Herabregulation von c-kit auf der Proteinebene bereits nach 16 Stunden ein anderer Mechanismus als dieser transkriptionelle zu Grunde liegen.

### **4.3 Versuch zur Hemmung der Degradierung des c-kit-Rezeptors durch die Proteasominhibitoren ALLN und Lact.**

Einen bekannten Mechanismus der Reduzierung der Oberflächendichte des Rezeptors stellt die Internalisierung des Rezeptors und nachfolgende Ubiquitinierung und Degradierung im Proteasom dar.

In im Folgenden beschriebenen Versuch wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit sich durch spezifische Hemmung der Proteasomfunktion durch die potenten Inhibitoren Lact. und ALLN die Herabregulation des Rezeptors von der Zelloberfläche aufhalten läßt.

Die Versuche wurden an Zellen der Linien HMC-1 und LAD 2 durchgeführt. Um sich dem Problem zu nähern, wurden verschiedene Konzentrationen der Inhibitoren eingesetzt, sowie unterschiedliche Inkubationszeiten und Präinkubationen mit den Inhibitoren gewählt.

Die daraus resultierenden Daten zeigten, wie in Abb. 11 und 12 dargestellt, eine sehr eingeschränkte Möglichkeit, die Zelloberflächenkonzentration des Rezeptors durch die Hemmung der Proteasomfunktion zu stabilisieren.

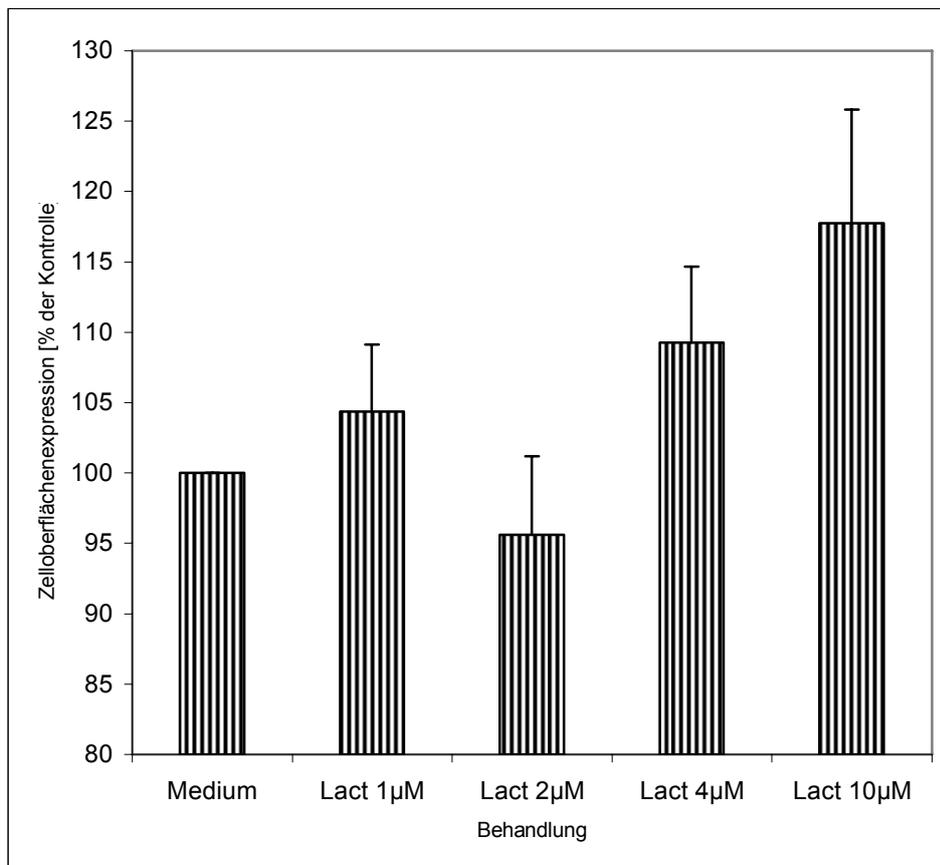


Abb.11: Einfluß des Proteasominhibitors LACT in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelloberflächenexpression von c-kit bei HMC-1-Zellen.

Inkubation der Zellen über 5 Stunden mit LACT in angegebenen Konzentrationen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und der Mittelwert(± SEM) aus 3 unabhängigen Versuchen.

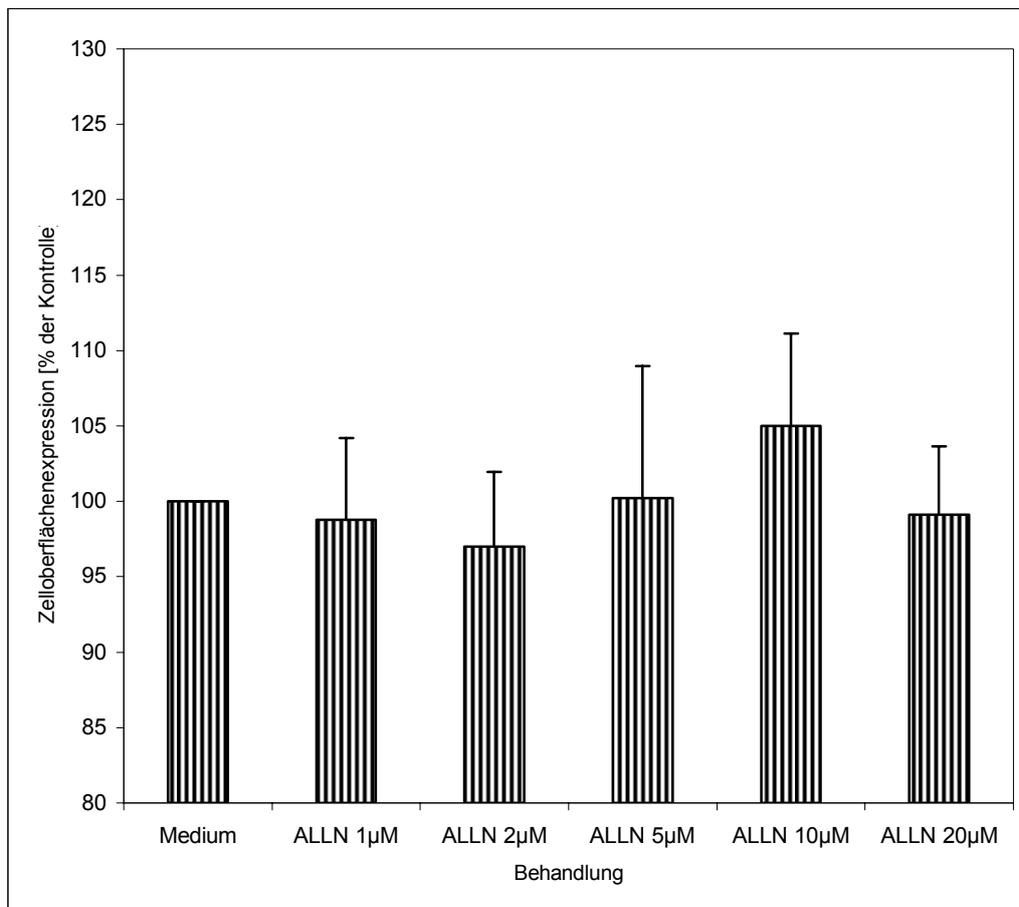


Abb.12: Einfluß des Proteasominhibitors ALLN in verschiedenen Konzentrationen auf die Zelloberflächenexpression von c-kit bei HMC-1-Zellen.

Inkubation der Zellen über 5 h mit angegebenen Konzentrationen von ALLN bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und ein Mittelwert(± SEM) aus 3 unabhängigen Versuchen.

#### 4.4 Die transkriptionelle Regulation von c-kit bei Mastzellen verschiedener Reifegrade und der Einfluß von ATRA auf diesen Prozess

##### 4.4.1 Die Relevanz des Transkriptionsfaktors Sp1 bei c-kit in den drei Mastzellsystemen

Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor Sp1 auch bei c-kit in humanen Mastzellen eine Rolle spielt, wurde das Antibiotikum Mithramycin A, welches durch Interkalation in die DNA die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie Sp1 inhibiert, bei HMC-1 und LAD 2-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messung ergaben eine Herabregulation des Wertes für c-kit nach

Mithramycinbehandlung auf 27,5% der Kontrolle bei LAD 2-Zellen und auf nur 4,7% der Kontrolle bei HMC-1-Zellen, dargestellt in Abbildung 13.

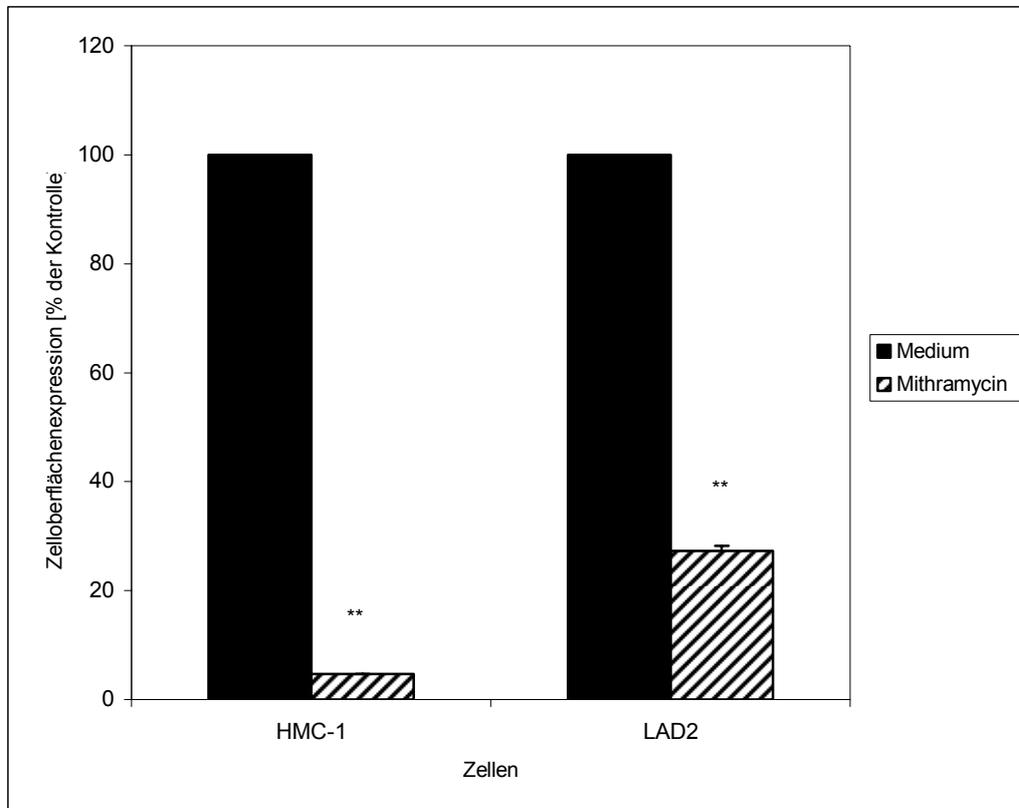


Abb. 13: Einfluß des Antibiotikums Mithramycin A auf die c-kit-Expression bei HMC-1- und LAD 2-Zellen. Es ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede der mit Mithramycin behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (\*\* $p \leq 0,01$ ).

Die Ergebnisse sind dargestellt in % der mittleren Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrolle und der Mittelwert ( $\pm$  SEM) aus 3 unabhängigen Versuchen.

#### 4.4.2 Das mögliche Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors Sp1 in humanen Mastzellen, abgeleitet aus EMSA-Studien

Zur transkriptionellen Regulation von c-kit ist beim Menschen bisher noch wenig bekannt. Zum murinen System liegen jedoch bereits Daten vor, die unter anderem den Transkriptionsfaktoren Sp1, MITF und SCL Bedeutung zumessen [Kitamura Y 2002, Lécuyer E 2002, Park GH 1998].

Da die Frage nach den relevanten Transkriptionsfaktoren in der humanen c-kit-Transkription bisher noch nicht behandelt wurde, mussten die Versuchsbedingungen

zunächst festgelegt und optimiert werden. Als Nachweismethode eines möglichen Bindungsverhaltens wurde der elektrophoretische Mobilitäts-*Shift-Assay* (EMSA) gewählt.

Dieses Verfahren beruht - wie oben beschrieben - auf der Beobachtung, dass DNA-Protein-Komplexe im Rahmen einer Polyacrylamidgelelektrophorese langsamer als reine DNA-Fragmente wandern.

Die im Lauf des Gels sichtbar werdenden Banden weisen eine eingegangene Bindung der Sonde mit der DNA nach.

Die Spezifität der Bindung bzw. Bande kann durch den Vergleich mit einer Probe, der ein 200-facher Überschuß der gleichen, jedoch nicht biotinylierten Sonde zugegeben wurde, überprüft werden. Diese darf keine oder eine um ein vielfaches schwächere Bande aufweisen.

#### **4.4.3 Der Nachweis der Bindung von Sp1 an die Promotorregion des humanen c-kit-Gens in Kernextrakten der drei Mastzellsysteme**

In dieser Arbeit wurde die Untersuchung an Kernextrakten aller drei hier untersuchten Mastzellarten durchgeführt, indem unterschiedliche Mengen Kernprotein mit definierten Mengen Sonde mit der gesuchten DNA-Sequenz für 12 Stunden bei 4°C nach Herstellerangaben inkubiert wurden.

Die Inkubationszeiten und sonstige Bedingungen wurden vorab genau optimiert.

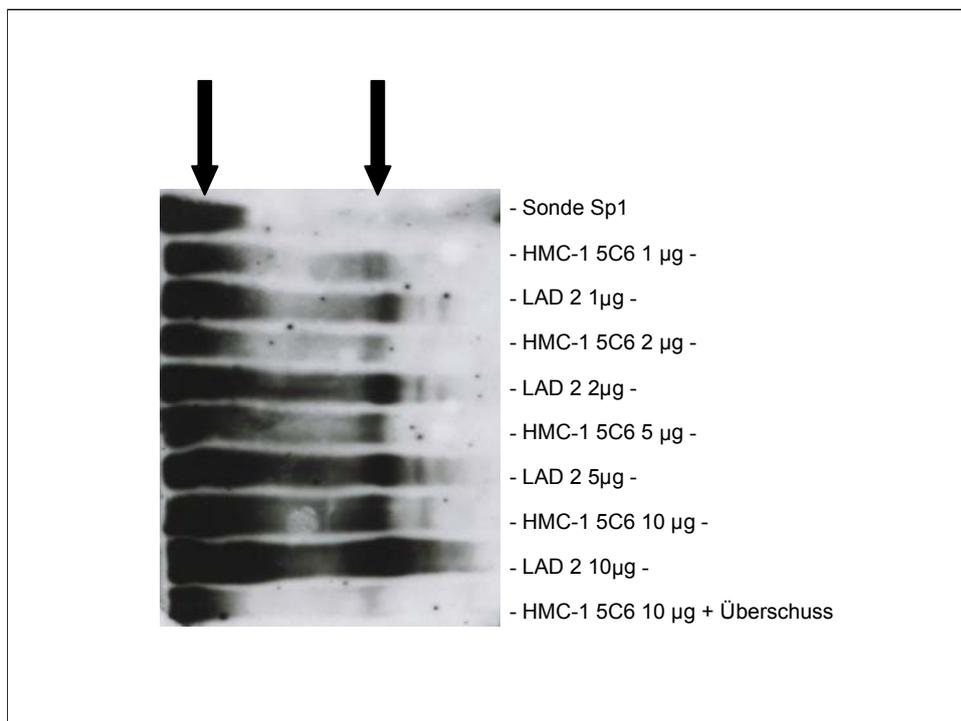


Abb. 14: Emsa 1 zeigt Kernextrakte aus HMC-1 5C6 und LAD 2 Zellen mit der Sonde Sp1. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. - und + Zeichen bedeuten Fehlen oder Vorhandensein eines Überschusses nicht biotinylierter Sonde. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Oben abgebildeter Assay zeigt die Bindungsaktivität von HMC-1 5C6 und LAD-2 Zellen an die Sonde Sp1, in Abhängigkeit von der Konzentration des Proteins. Dabei banden Kernextrakte aus LAD 2- Zellen stärker und ergaben zudem eine höher liegende, stärker retardierte Bande.

Die in mehreren *Gelshiftassays* generierten Ergebnisse weisen eine Bindungsaktivität für Sp1 hauptsächlich in noch proliferierenden Mastzellen nach.

In kutanen Mastzellen war eine Bindungsaktivität für Sp1 so gut wie nicht nachweisbar (s. Abb. 15).

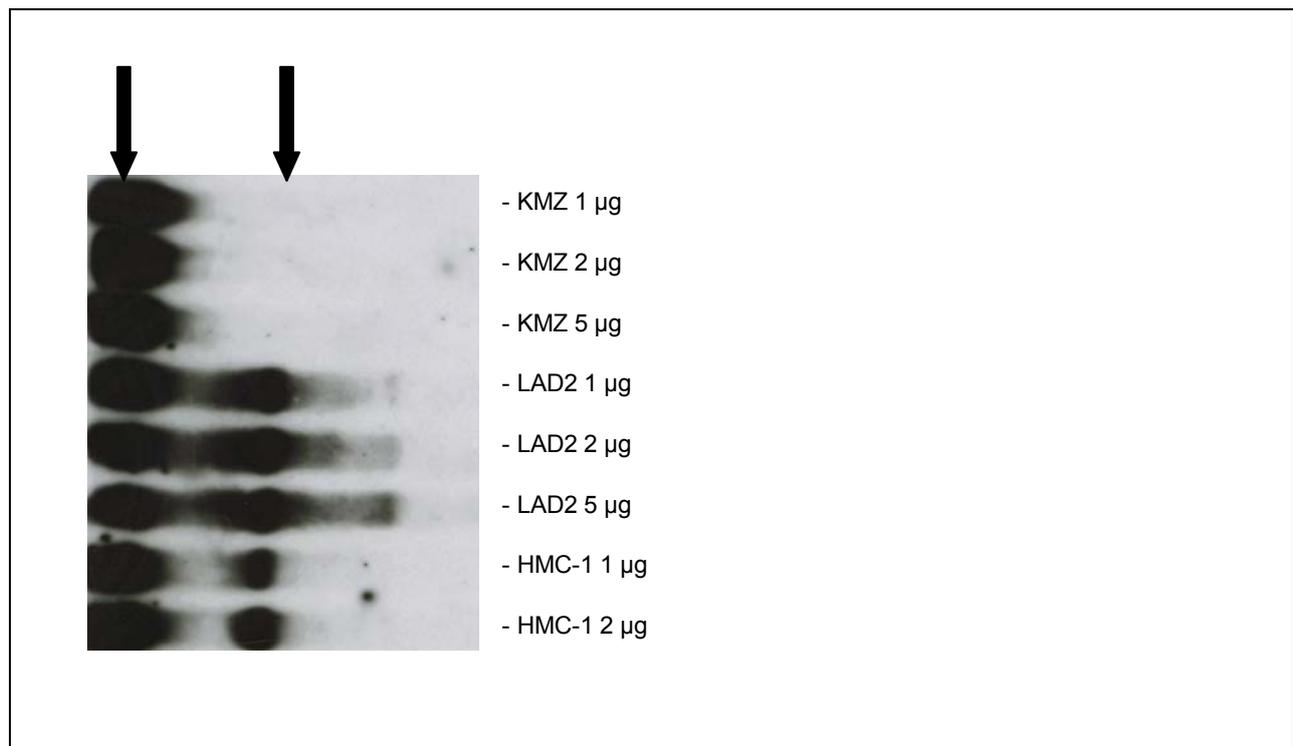


Abb. 15.: EMSA 2 zeigt Kernextrakte kutaner Mastzellen, LAD 2 und HMC-1-Zellen unterschiedlichen Volumens mit der Sonde Sp1. Die  $\mu$ g Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Die *Lanes* 1- 3 zeigen Kernextrakte mit der Sonde Sp1 ohne Bindungsaktivität bei kutanen Mastzellen. Dieser assay zeigt eine Bindungsaktivität für Sp1 bei den Zelllinien LAD-2 und 5C6, nicht jedoch für kutane Mastzellen. Die Spezifität der Bande wurde durch Zugabe der 200-fachen Menge nicht markierter Sonde erbracht (nicht dargestellt).

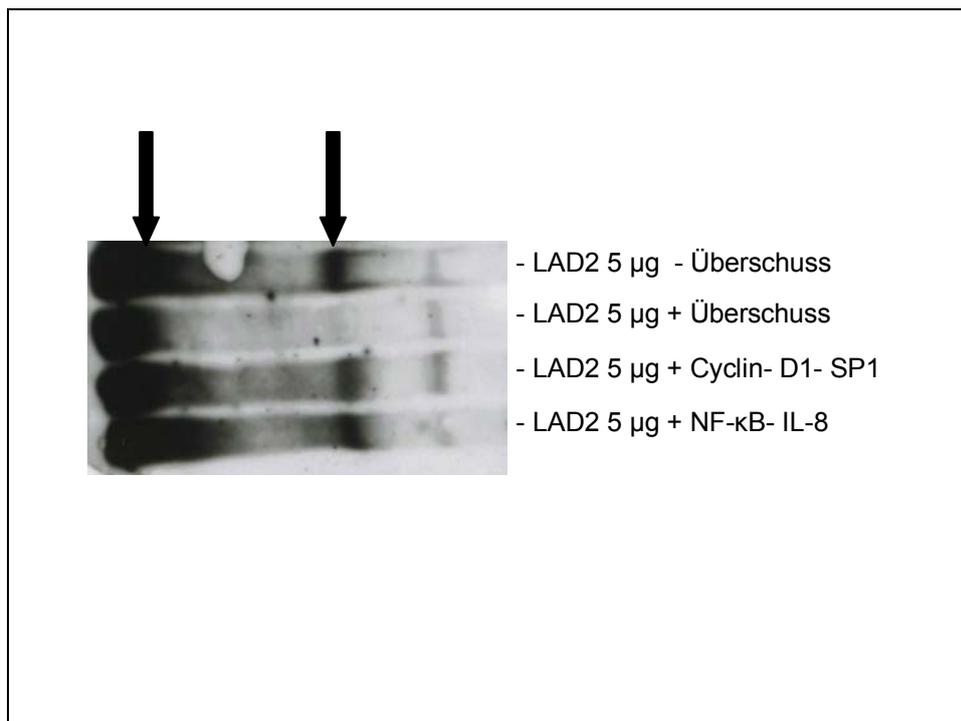


Abb. 16: EMSA 3 zeigt Kernproteine aus LAD 2-Zellen mit der Sonde Sp1. Lane 1 zeigt Kernextrakte aus Zellen, die ohne, lane 2 mit Überschuss nicht biotinylierter Sonde inkubiert wurden. Kernextrakte aus lane 3 wurden mit Überschuss der Sonde Cyclin- D1- Sp1 inkubiert, lane 4 zeigt Kernextrakte, die mit Überschuss der Sonde NF- κB- IL-8 inkubiert wurden. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Im oben dargestellten EMSA sind in den *Lanes* 1-4 LAD 2-Zellen mit Proteinvolumina von 5µg, mit Überschuss nicht markierter Sonde Sp1, mit Überschuss nicht markierter Sonde Cyclin-D1-Sp1 und Überschuss nicht markierter Sonde NF-κB-IL-8 dargestellt.. Der Assay zeigt ein fast vollständiges Verschwinden der Bande mit Überschuss nicht biotinylierter Sonde Sp1, eine Schwächung der Bande mit Überschuss Cyclin-D1-Sp1 und eine unveränderte Bande für NF-κB-IL-8. Dies weist eine Spezifität der Bande für Sp1 nach.

Den oben aufgeführten EMSAs zufolge, binden Kernextrakte aus LAD 2-Zellen und HMC-1-Zellen, nicht aber aus kutanen Mastzellen an das Sp1-Bindungsmotiv aus dem c-kit-Gen.

#### **4.4.4 Der Nachweis der Bindung von MITF bzw. SCL an die Promotorregion des humanen c-kit-Gens in den drei Mastzellsystemen**

Wie in der Einleitung dargestellt, ist der Transkriptionsfaktor MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) ein Mitglied der *basic helix-loop-helix-leucine-zipper* Transkriptionsfaktoren-Familie, der für die Entwicklung von Mastzellen von Bedeutung ist.

Zum Nachweis einer möglichen Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren MITF und SCL wurden zunächst *Gelshiftassays* mit der kombinierten Sonde SCL-MITF durchgeführt, da die Bindungsmotive der beiden Faktoren überlappen.

In den unten dargestellten EMSAs konnte für alle drei untersuchten Mastzellsysteme eine Aktivität für SCL-MITF nachgewiesen werden.

Bei den HMC-1 5C6-Zellen wird dies zunächst im unten abgebildeten EMSA deutlich:

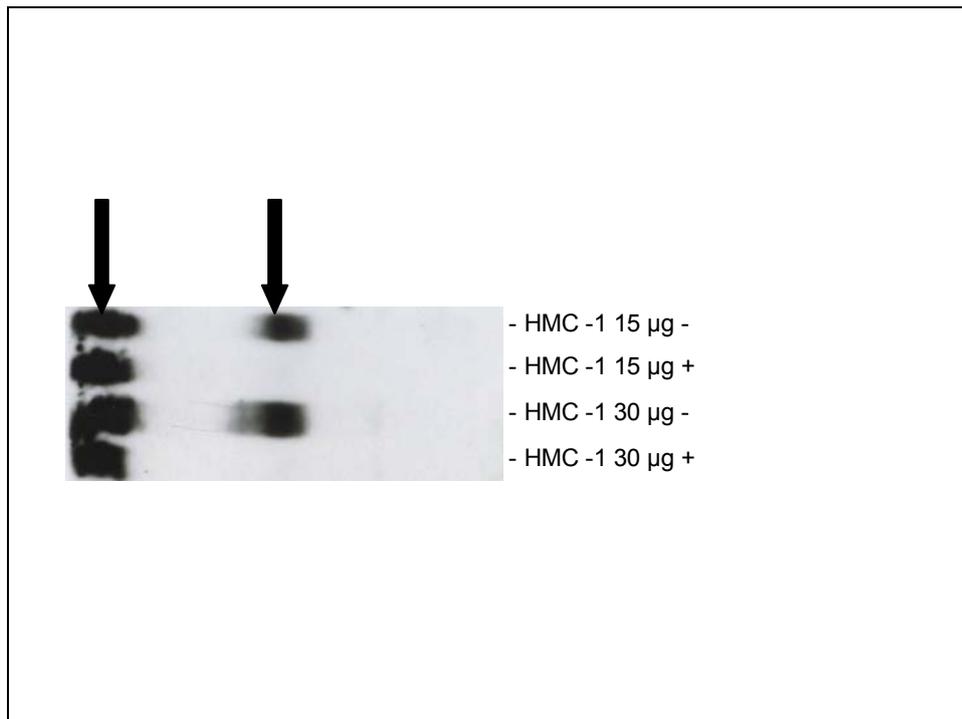


Abb. 17: Emsa 4 zeigt Kernextrakte der Zellen HMC-1 5C6 mit der Sonde SCL-MITF. + und - steht für Anwesenheit oder Fehlen eines Überschusses nicht biotinylierter Sonde. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Der oben dargestellte EMSA zeigt in *Lane* 1-4 verschiedene Mengen Protein der Zelllinie HMC-1 5C6 (15 und 30µg) und der jeweils 200-fache Überschuß nicht biotinylierter Sonde SCL-MITF. Die Bande verschwindet ganz. Der Einsatz der doppelten Menge Kernprotein führt zu einer sichtbaren Verstärkung der Bande.

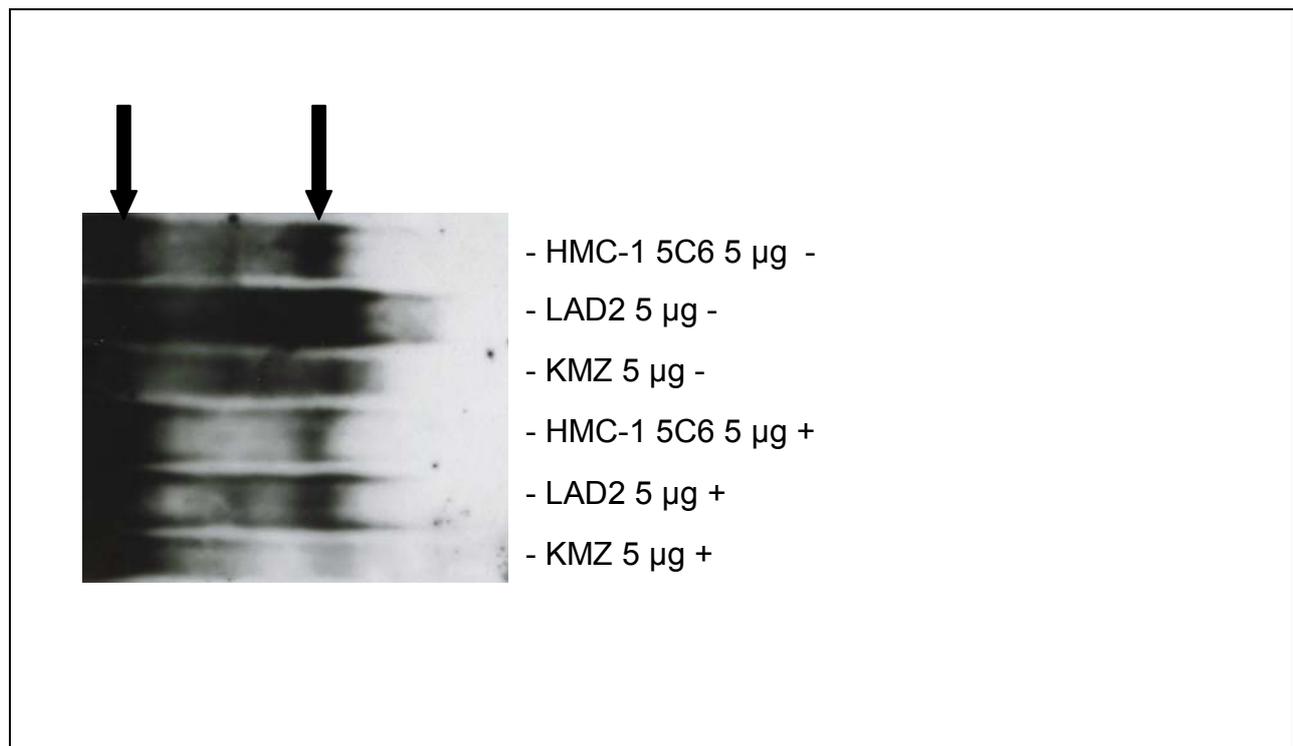


Abb. 18: EMSA 5 zeigt Kernextrakte der Zellen 5C6, LAD und kutaner MC alternierend mit der Sonde SCL-MITF. + und - stehen für Anwesenheit oder Fehlen des Überschusses nicht markierter Sonde. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Im oben gezeigten EMSA lässt sich die Bindung für die Sonde SCL-MITF demonstrieren, und zwar für alle untersuchten Mastzellkernproteine.

Eine in der Intensität stärkere und stärker retardierte Bande war auch hier bei LAD 2-Zellen im Vergleich zu HMC-1-Zellen und KMZ zu sehen.

Zwischen HMC-1 und kutanen Mastzellkernextrakten war ebenfalls ein Unterschied zu beobachten, mit HMC-1-Zellen, die die Sonde stärker als KMZ zu binden schienen.

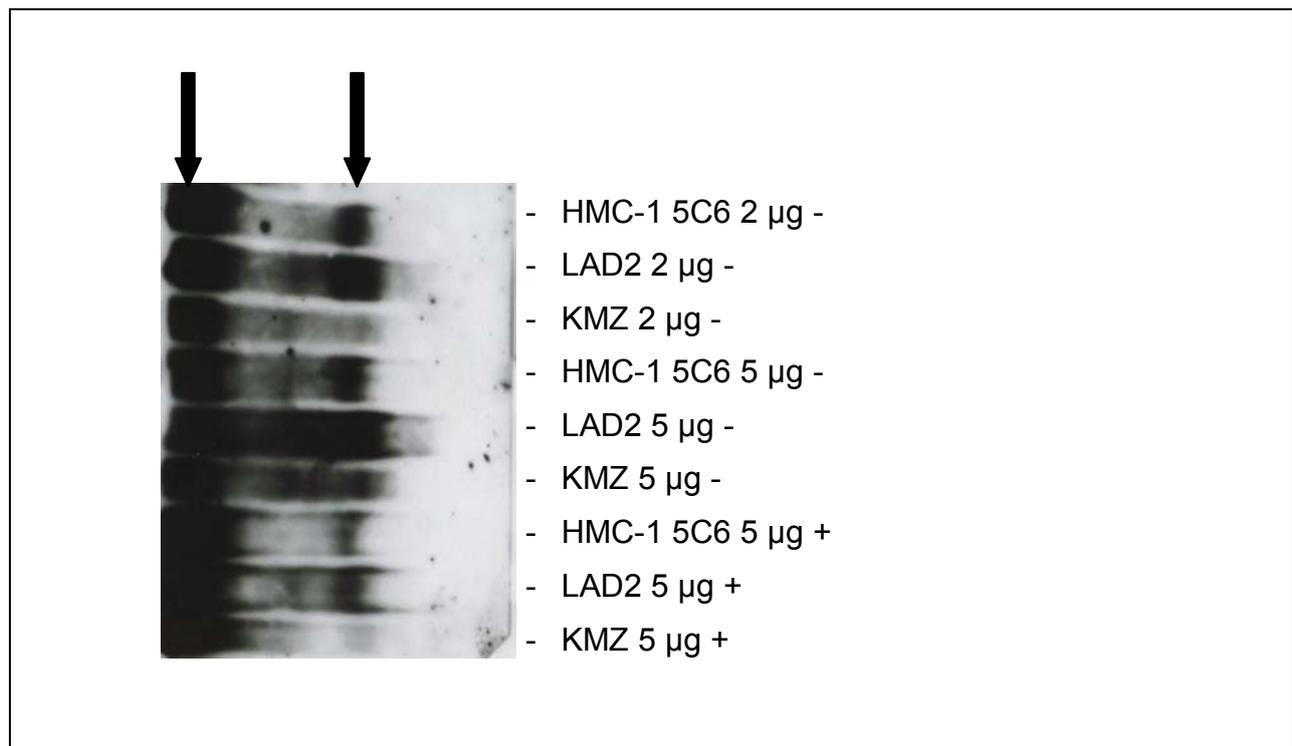


Abb.19: EMSA 6 zeigt Kernextrakte aller drei untersuchten Mastzellsysteme mit der Sonde SCL-MITF. + und - stehen für Anwesenheit oder Fehlen eines Überschusses nicht biotinylierter Sonde. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Oben dargestellt ist noch einmal die Bindungsaktivität von SCL-MITF mit den drei Kernextrakten. Dort zeigen sich abhängig von der Menge an Kernprotein (2, respektive 5µg / ml) verschiedene Komplexe der Sonden mit dem Protein verschiedener Mastzellen.

Dargestellt sind jeweils 5C6, LAD-2 und kutane MC und Überschuss nicht markierter Sonde.

Die Höhe der Banden stellt sich unterschiedlich je nach Zelllinie dar. Da bei diesem Versuch noch die doppelte Menge Sonde (4 µl) und nicht biotinylierte Sonde (1,6µl) eingesetzt wurde, ist keine vollständige Hemmung, sondern nur eine Schwächung der Bande sichtbar. Die Mengen der eingesetzten Sonde und des Überschusses nicht biotinylierter Sonde wurden später halbiert, um die Versuchsbedingungen zu optimieren.

Um zu erfassen, ob beide Transkriptionsfaktoren ein relevantes Bindungsverhalten in den untersuchten Kernextrakten aufweisen, wurden sogenannte *Supershiftassays* angefertigt, die die Identifikation des bindenden Faktors ergeben sollten.

Das Prinzip des *Supershifts* ist im Methodenteil detailliert beschrieben. Die hierzu verwendeten Antikörper sind *rabbit / goat-anti-SCL* und *anti-MITF*.

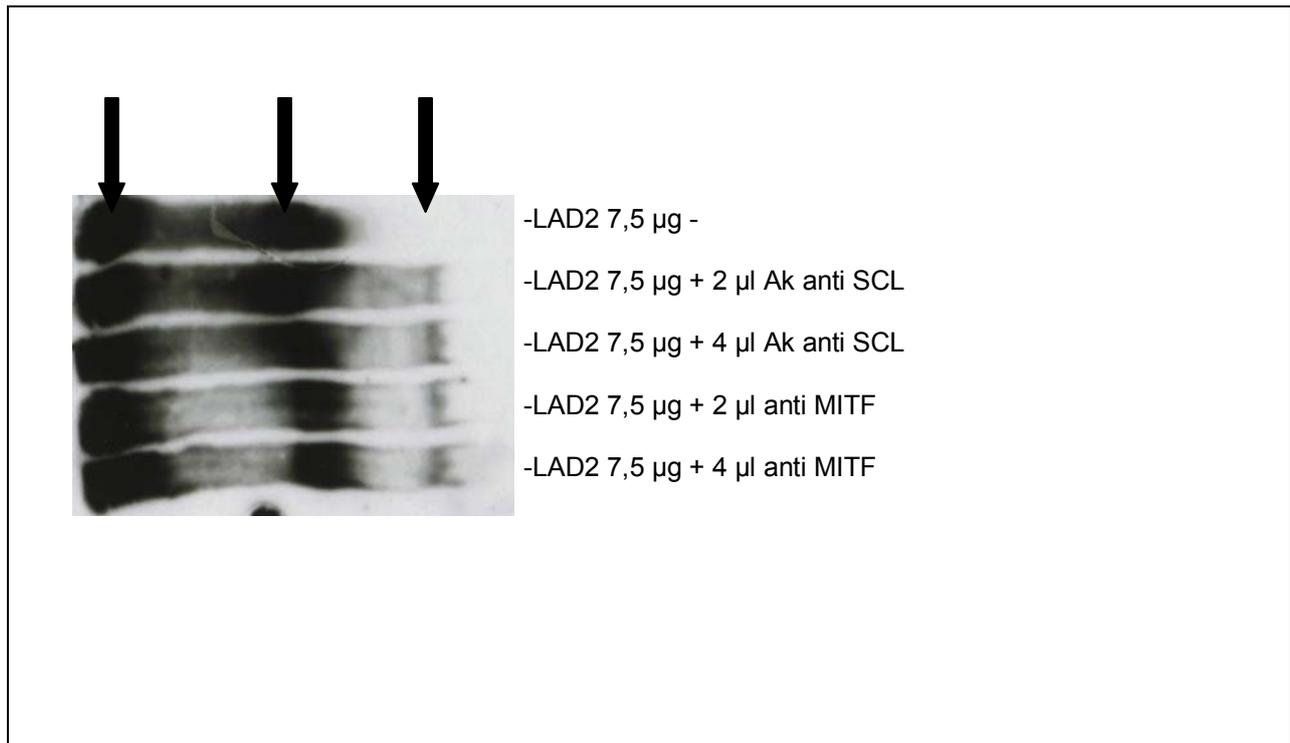


Abb. 20: Supershift-EMSA 7 zeigt Kernextrakte aus LAD 2 Zellen, lane 1 ohne Antikörper, lane 2-5 je 2 und 4µl anti-SCL und anti-MITF. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande. Der dritte Pfeil weist auf die *Supershift*-Bande.

*Lane 1* zeigt LAD 2-Zellen mit 7,5µg Protein, *Lane 2* und *3* zeigen einen *Supershift* der Bande aufgrund der Inkubation der Kernextrakte mit Antikörpern gegen SCL bzw. in den *Lanes 4* und *5* gegen MITF.

Die Bande ist nach oben verlagert, da durch Bindung des Antikörpers an den Komplex dieser schwerer geworden ist und im Gel langsamer wandert. Hier scheinen offenbar SCL und MITF ungefähr gleichermaßen zu binden.

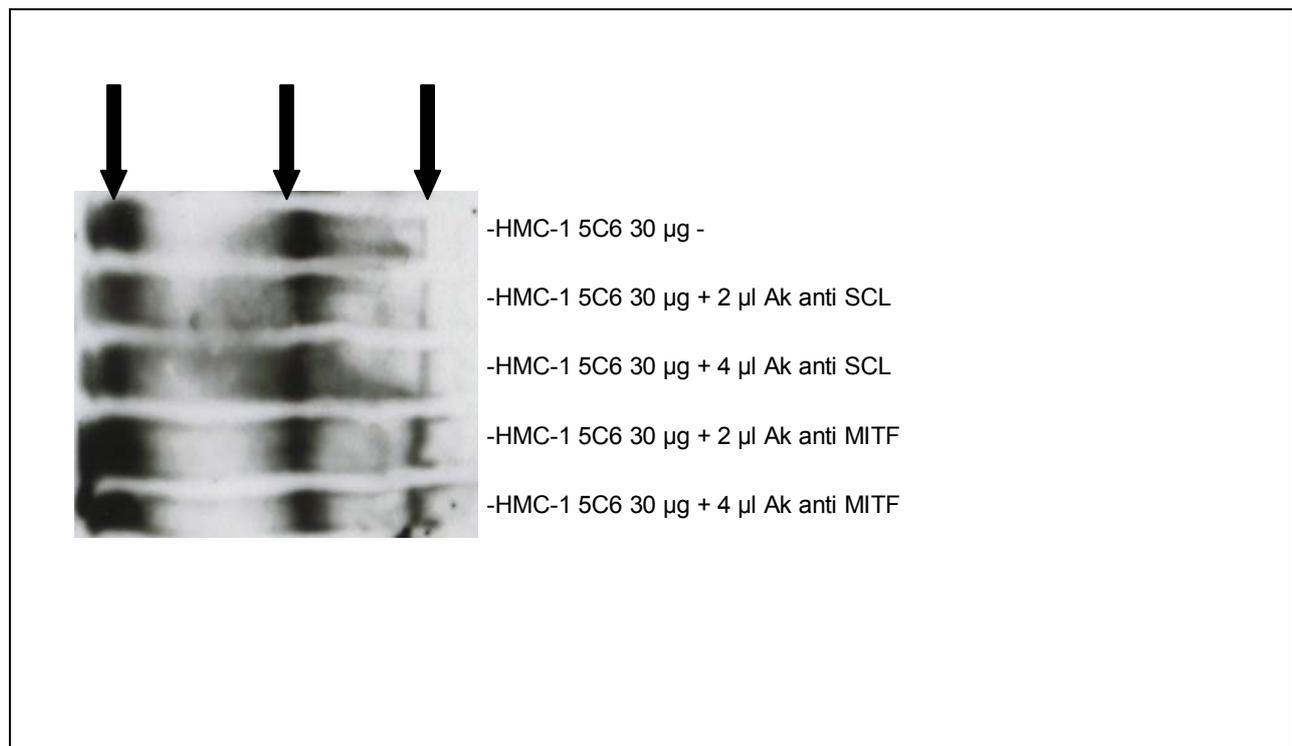


Abb. 21: EMSA 8 zeigt Kernextrakte aus HMC-1 5C6 Zellen. Der Antikörper hatte ein eingesetztes Volumen von 2 bzw. 4 µl. Lane 2 & 3 mit Antikörpern gegen SCL, lane 4 & 5 mit Antikörpern gegen MITF. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande. Der dritte Pfeil weist auf die *Supershift*-Bande.

Der oben dargestellte EMSA zeigt dieselbe Versuchsanordnung wie für die LAD 2-Zellen im zuvor gezeigten Assay für die Zelllinie HMC-1 5C6. Hier lässt sich deutlich ein *Supershift* im Falle von MITF beobachten, im Falle von SCL ist dies nicht zu sehen. Somit scheint im Falle der HMC-1 5C6 Zellen MITF der bindende Faktor zu sein.

#### 4.4.5 Untersuchungen zum Einfluß der Behandlung mit *all-trans*-Retinsäure auf das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren

Um einen möglichen Wirkmechanismus von *all-trans*-Retinsäure in der transkriptionellen Regulation von c-kit zu erfassen, wurden Zellen der intermediär reifen Zelllinie LAD 2 für 7 Tage jeweils mit ATRA beziehungsweise in Medium alleine inkubiert.

Mediumwechsel und Zugabe von SCF und ATRA erfolgte jeweils am Tag 4.

Nach siebentägiger Behandlung wurden aus den Zellen Kernextrakte präpariert, die anschließend im EMSA ebenfalls mit den Sonden Sp1 und SCL-MITF eingesetzt wurden. Aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass die c-kit m-RNA nach dieser Zeit deutlich herabreguliert ist.

In den im Folgenden dargestellten EMSAs konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaktivität der Sonden an die Promotorregion des humanen c-kit-Gens durch die Behandlung mit ATRA nicht, bzw. zumindest in diesen Versuchen nicht sichtbar beeinträchtigt wurde. Für die Sonde SCL-MITF ersichtlich in Abb. 22.

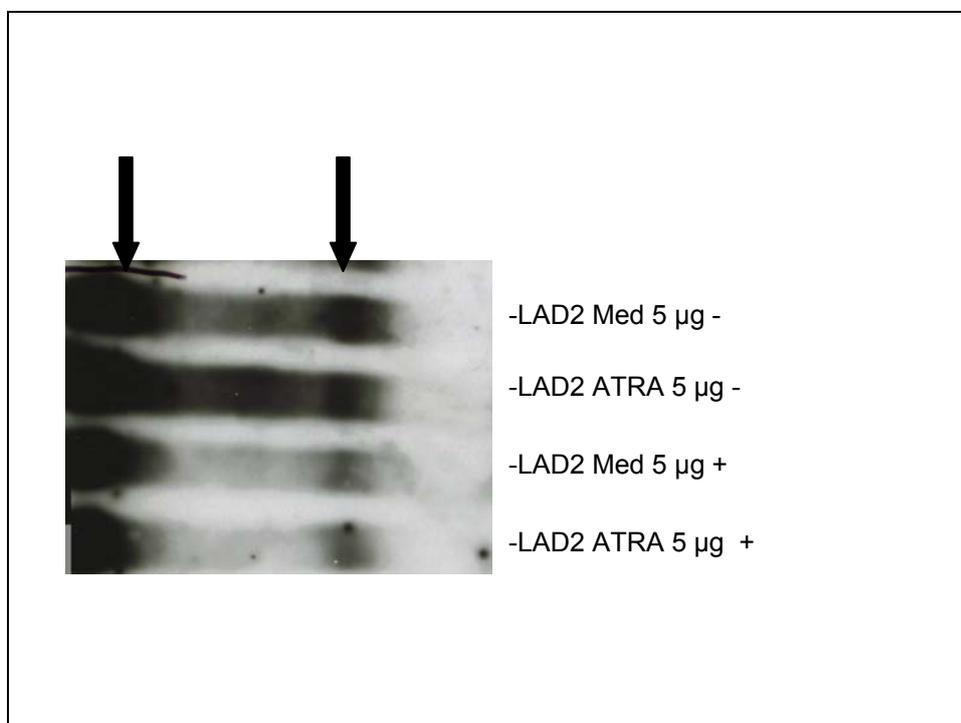


Abb. 22: EMSA 9 zeigt Kernextrakte aus LAD 2-Zellen mit der Sonde SCL-MITF, die in Medium oder mit ATRA über 7 Tage inkubiert wurden. Lane 1 Medium, lane 2 ATRA, lane 3 Medium + Überschuss nicht biotinylierter Sonde, lane 4 ATRA + Überschuss nicht biotinylierter Sonde. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Bei diesem Assay konnte bei LAD 2-Zellen mit ATRA eine weitgehend unveränderte Bindungsaktivität der Sonde SCL-MITF festgestellt werden. Die Spezifität der Bande wurde auch hier durch Überschuss nicht markierter Sonde erbracht.

*Lane 1* zeigt LAD 2 Protein und Sonde SCL-MITF, *Lane 2* LAD 2 mit ATRA und SCL-MITF mit ungeschwächter Bindungsaktivität und *Lane 3* und *4* LAD 2 in Medium und LAD 2 mit ATRA mit Überschuß nicht biotinylierter Sonde.

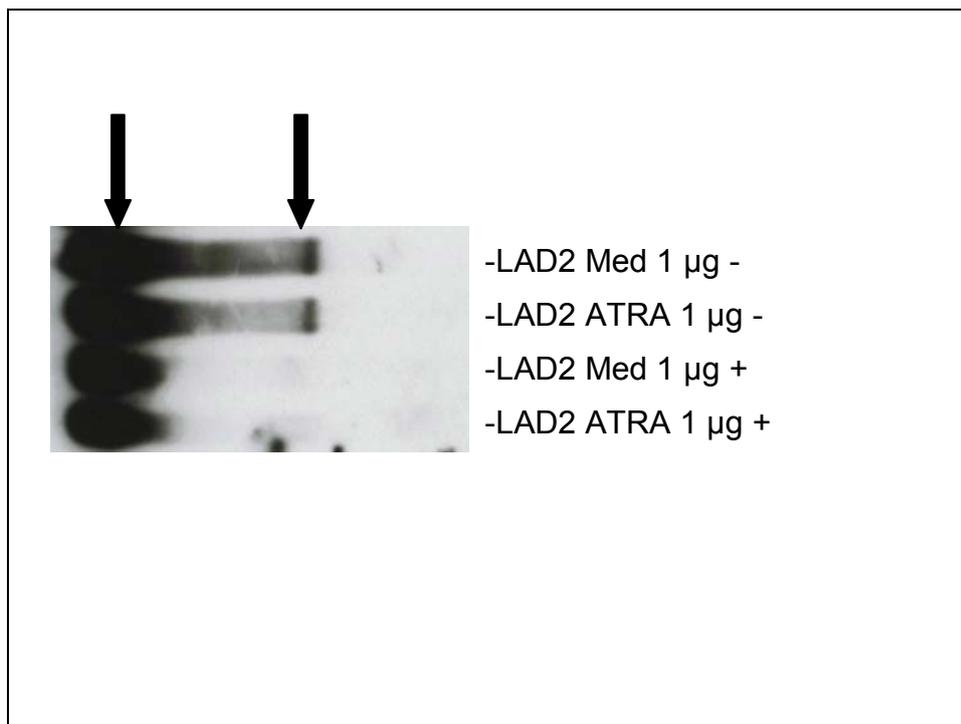


Abb.: 23: EMSA 10 zeigt Kernextrakte aus LAD 2 Zellen +/- ATRA mit der Sonde Sp1. *Lane 1* LAD 2 Medium, *lane 2* LAD 2 ATRA, *lane 3* LAD 2 Medium und Überschuss nicht biotinylierter Sonde, *lane 4* LAD 2 ATRA und Überschuss nicht biotinylierter Sonde. Die µg Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder. Der vordere Pfeil weist auf die freie Sonde, der zweite Pfeil weist auf die gesuchte Bande.

Die *Lanes 1-4* des oben dargestellten EMSA zeigen eine nicht bzw. kaum verringerte Bindung an Sp1 in Kernextrakten von LAD 2-Zellen durch die Behandlung mit ATRA. Im unten abgebildeten EMSA sind ebenfalls LAD 2-Zellen mit und ohne ATRA inkubiert worden und die daraus gewonnenen Kernextrakte unterschiedlicher Präparationen in unterschiedlichen Konzentrationen mit der Sonde Sp1 eingesetzt worden. Es konnte erneut für alle Kernextrakte eine Bindung gezeigt werden, jedoch auch für alle mit ATRA behandelten LAD 2-Zellen. Der Nachweis der Spezifität der Bande wurde durch Zugabe eines Überschusses nicht biotinylierter Sonde erbracht.

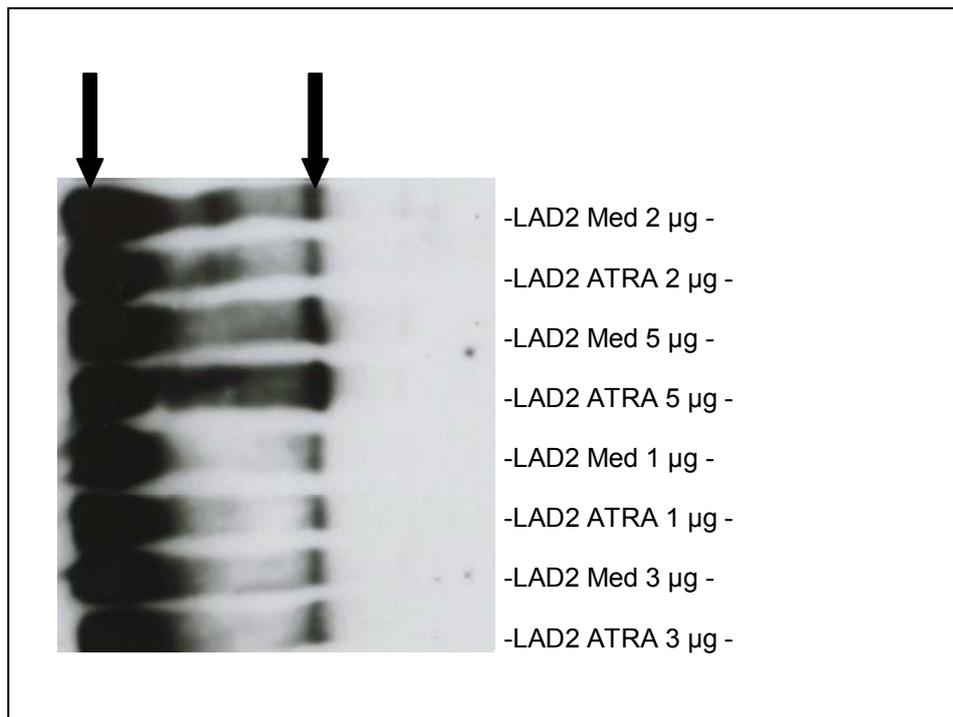


Abb. 24: EMSA 11 zeigt Kernextrakte aus LAD 2 Zellen ohne und mit ATRA mit der Sonde. Lane 1-8 alternierend LAD 2 + Medium und LAD 2 + ATRA. Die  $\mu\text{g}$  Werte geben die Menge eingesetzten Kernproteins wieder.

Der Nachweis der Spezifität der Sonde wurde durch Überschuss nicht biotinylierter Sonde erbracht, ist hier jedoch nicht dargestellt.

In den letzten EMSAs konnte wiederum eine Bindung von Sp1 an LAD 2-Zellen nachgewiesen werden, jedoch war kein (eindeutiger) Effekt von ATRA auf diesen Prozess zu ermitteln.

#### 4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit auf Mastzellen ist- weitgehend unabhängig von deren Reifegrad- sehr empfänglich für Unterbrechungen der Transkription und Translation und reagiert auf die Inhibitoren CHX und AD, einzeln oder kombiniert angewendet, mit einer starken Herabregulation der Zelloberflächenexpression.

2. Die Expression des c-kit-Rezeptors war im Vergleich zu anderen Oberflächenrezeptoren am stärksten durch die Unterdrückung der de-novo-Transkription und Proteinsynthese zu beeinflussen, was einen erhöhten Grundumsatz gegenüber dem Durchschnitt anderer Zelloberflächenmoleküle vermuten lässt.
3. Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade erfahren durch Ligandenbindung eine schnelle und deutliche Herabregulation des Rezeptors, sehr wahrscheinlich beruhend auf Internalisierung und Degradierung.  
Kutane Mastzellen reagierten etwas schwächer als HMC-1- und LAD 2-Zellen, bzw. zeigten eine etwas langsamere Reaktion.
4. Die ligandenvermittelte Internalisierung des Rezeptors ließ sich durch den spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor STI571 in allen drei Mastzellsystemen stark verzögern und hemmen.
5. Der Tyrosinkinaseinhibitor STI571 hat auf HMC-1 und LAD 2-Zellen eine Herabregulation der Zelloberflächenexpression von c-kit in Abwesenheit des Liganden zufolge.
6. Die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren der de-novo-Transkription und Proteinsynthese in Anwesenheit des Liganden SCF ergibt eine Summation der Effekte mit kaum noch detektierbaren Messwerten der Zelloberflächendichte des Rezeptors.
7. Die Zelloberflächenexpression von c-kit lässt sich durch den Einsatz von Inhibitoren der Proteasomfunktion, die in den Abbau des Proteins eingebunden ist nicht oder wenigstens nicht nennenswert stabilisieren.
8. Es kommt in Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade durch den Einsatz von ATRA zu einer verminderten Expression des c-kit-Rezeptors.  
Dieser Effekt ist nach 16h in HMC-1-Zellen am ausgeprägtesten.

9. In kutanen Mastzellen lässt sich die Herunterregulation des Rezeptors durch Cycloheximid durch die Anwesenheit von ATRA nicht weiter verstärken.
10. Durch den Einsatz des Wirkstoffs Mithramycin A welches durch Interkalation in die DNA die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 verhindert, sank die c-kit-Expression bei HMC-1 und LAD 2-Zellen drastisch.
11. Die Sonde Sp 1 zeigt im EMSA eine Bindungsaktivität nur bei proliferierenden Mastzellen, nicht bei kutanen Mastzellen.
12. Die Sonde SCL-MITF entfaltet bei allen untersuchten Mastzellsystemen eine Bindungsaktivität.

## 5 Diskussion

Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit ist in der Lage, in vielen Zellsystemen, unter ihnen Mastzellen, Keimzellen, Melanozyten und hämatopoetische Zellen, Proliferation und Überleben zu vermitteln.

Die Regulation der Expression des c-kit-Gens ist somit Gegenstand umfangreicher Forschungsarbeiten, sowohl im murinen System [Kitamura Y *et al.* 2002], als auch im humanen.

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig darüber bekannt, wie diese beim Menschen auf den verschiedenen Ebenen wie Transkription, Translation und der Proteinebene, die Internalisierung und Degradation sowie proteolytische Abspaltung beinhaltet, vonstatten geht.

Tatsächlich scheint die transkriptionelle Regulation des c-kit-Gens ungemein komplex und wird von einer langen *Promotor- / Enhancersequenz* vermittelt. Deren funktionell wichtige Elemente und Transkriptionsfaktoren bedürfen, abgesehen von einigen Ausnahmen, noch näherer Erforschung.

Es war anzunehmen, dass die verschiedenen c-kit-exprimierenden Zellsysteme sich unterschiedlicher transkriptioneller Voraussetzungen bedienen [Tsujiura T *et al.* 1996, Vandembark G *et al.* 1996, Krosi G *et al.* 1998]. Die Zellen, die in der Lage sind, das c-kit-Gen zu transkribieren, haben anschließend diverse andere Möglichkeiten, die Expression zu steuern, wie proteolytisches Shedding durch verschiedene Protease-Untergruppen nach Aktivierung, ligandeninduzierte Internalisierung mit nachfolgender Degradierung und Veränderungen in der mRNA-Stabilität [Baghestanian M *et al.* 1996, Dubois CM *et al.* 1994].

Gegenstand dieser Arbeit war es, den Einfluss von SCF auf Mastzellen, auch unreifer und intermediär differenzierter Mastzellen, darzustellen. Weiterhin war die Abhängigkeit der c-kit Expression von Unterbrechungen der *de novo*-Transkription und Proteinsynthese zu untersuchen und zu erarbeiten, ob c-kit-Regulationsmechanismen unabhängig voneinander operieren. Dies sollte für Mastzellen unterschiedlicher Reifestadien ermittelt werden.

## 5.1 Die Expression von c-kit nach Hemmung der Transkription und de novo-Proteinsynthese

Die Mastzelle ist eine der wenigen Zellen, die c-kit ihr Leben lang exprimiert. Jede Einschränkung der Funktionalität dieses Tyrosinkinase-Rezeptors hat weitreichende Folgen für die Zelle selbst und den gesamten Organismus [Miettinen M *et al.* 2005]. Die Erforschung des Grundumsatzes des c-kit-Rezeptors ist von Bedeutung, da nur der schnelle *turnover* von Proteinen in der Zelle eine rasche und optimale Anpassung an die sich permanent verändernden Aufgaben möglich macht, die ihre Funktionssysteme ihr stellen [Pirlet K 2003]. Die ständige Synthese und Degradation ermöglicht eine komplexe Regulation dieser Vorgänge.

Die Regulation dieser für Mastzellen wichtigsten Rezeptor-Tyrosin-Kinase ist bislang nur an *in vitro*-generierten Mastzellen, Zelllinien, sowie Nagermastzellen und anderen c-kit-exprimierenden Zellen untersucht worden [Yee NS *et al.* 1994]. Studien zur c-kit-Regulation in humanen Hautmastzellen waren bis zum Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Jedoch legten Studien das Vorhandensein unterschiedlicher Regulationsmechanismen gerade im Bereich der Transkription bei verschiedenen Zellarten nahe [Krosi G *et al.* 1998, Vandenbark GR *et al.* 1996, Tsujimura T *et al.* 1996].

In dieser Arbeit sollte die Messung des Umsatzes von c-kit aus diesem Grunde an Mastzellen unternommen werden, die unterschiedliche Stadien im Reifegrad darstellen, um zu einem späteren Zeitpunkt Konsequenzen für die Beurteilung der Reaktion in Abhängigkeit vom Reifestadium der Zelle ziehen zu können.

So wurde der Basalumsatz von c-kit durch Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren der *de novo*-Transkription und Proteinsynthese bei den drei Mastzellensystemen gemessen, um einen Einblick zu bekommen, in welchem Umfang die Expression des Rezeptors von Unterbrechungen der Transkription und Translation abhängig ist. Des Weiteren wurden diese Inhibitoren kombiniert angewendet, um eine Additivität der Effekte zu prüfen und zu bestimmen, ob der hemmende Einfluss überhaupt verstärkt werden kann.

Um in Bezug auf die Stärke der Effekte einen Vergleich zu haben, wurden die Zellen auch auf die Expression anderer Zelloberflächenrezeptoren (CD29, CD50, CD54) untersucht.

Es konnte eine signifikante Herunterregulation der Zelloberflächenexpression von c-kit im Vergleich zur Mediumkontrolle und allen anderen Oberflächenrezeptoren nachgewiesen werden. Eine geringfügige Herabregulation war zwar auch bei CD29, CD50 und CD54 meßbar, diese war jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie jene von c-kit. Der Tyrosinekinaserezeptor c-kit war im untersuchten Zeitfenster derjenige Rezeptor, der deutlich dem schnellsten Umsatz unterlag. Dieser schnelle Umsatz lässt vermuten, dass dem c-kit -Rezeptor eine überaus wichtige Rolle zukommt, die es notwendig macht, sehr rasch auf unterschiedliche Anforderungen reagieren zu können. Es ist anzunehmen, dass diese Bedürfnisse aus den unterschiedlichen Funktionen für Proliferation, Überleben Chemotaxis etc. - die durch c-kit-Aktivität vermittelt werden - resultieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass schon geringe Dosen beider Inhibitoren zu einem starken Verlust der Zelloberflächendichte des Rezeptors führen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit aus der Leber generierten Mastzellen. Shimizu *et al.* untersuchten in dem Zusammenhang den Einfluss von Unterbrechungen der de novo -Proteinsynthese auf c-kit, welches nach Ligandenbindung internalisiert war. Dort waren die Zellen nach Stimulation mit Cycloheximid nicht in der Lage, c-kit wieder an der Oberfläche erscheinen zu lassen [1996].

Die Empfänglichkeit von c-kit für den Hemmstoff Cycloheximid wurde für Mastzellen in dem Zusammenhang schon beschrieben [Shimizu Y, Ashman LK 1996].

Die Wirkung von CHX auf alle untersuchten Mastzellarten lässt die starke Abhängigkeit von der de novo-Synthese nicht nur, wie zu vermuten wäre, bei proliferierenden Mastzellen erkennen, sondern scheint alle Mastzellarten fast gleichermaßen zu betreffen. So konnte gezeigt werden, dass auch reife, nicht proliferierende Mastzellen einem schnellen Umsatz des c-kit-Proteins unterliegen und auch eine aktivierende Mutation keinen Einfluss auf den Umsatz des Rezeptors hat.

Anders im Falle der Inkubation der Zellen mit Actinomycin D, welches moderate, jedoch signifikante Unterschiede in der Herabregulation von c-kit in den verschiedenen Mastzellen zur Folge hatte.

Kutane Mastzellen erwiesen sich als am meisten resistent gegen eine Unterbrechung der de novo-Transkription, was eine Abhängigkeit der Einflussnahme vom Reifestadium der Zelle und/oder ihrer Proliferationstätigkeit darzustellen scheint.

Die Zellartabhängigkeit gilt umso mehr für die Kombination der beiden Inhibitoren, welche die Zelloberflächenexpression von c-kit auf HMC-1-Zellen nochmals drastisch zu senken vermochte, bei LAD 2-Zellen auch einen Einfluss hatte, jedoch bei kutanen Mastzellen keine weitere Herabregulation des Rezeptors provozieren konnte.

Somit scheint zur Aufrechterhaltung der c-kit-Expression in reifen Mastzellen die Gewährleistung einer steten de novo-Transkription nicht in dem Maße notwendig zu sein wie es in HMC-1-Zellen offensichtlich der Fall ist.

Auch hier verhalten sich LAD 2-Zellen offenbar intermediär und reagieren auf eine Unterbrechung der de novo-Transkription und Translation mit einem Abfallen der Rezeptordichte auf einen Wert, der zwischen den HMC-1 und KMZ liegt.

Somit scheinen Mastzellen jeglichen Reifegrades eine starke Anfälligkeit für Störungen der Transkription und Translation zu zeigen, die jedoch zusätzlich gewissen Unterschieden je nach Zellreifegrad unterliegt.

### **5.2 Die Expression von c-kit nach Ligandenbindung**

Um den Einfluss posttranslationeller Regulationsmechanismen auf die Oberflächenexpression von c-kit zu bestimmen, wurde zunächst die Internalisierung nach Ligandenbindung (SCF) untersucht.

Aus der Literatur war schon länger die Tatsache bekannt, dass Mastzellen, die zuvor mit SCF präinkubiert worden waren, eine geringere Fähigkeit aufwiesen, c-kit-Antikörper zu binden [Yee NS *et al.* 1993]. Die Bindung radioaktiv markierten SCFs an Mastzellen verschlechterte sich mit gleicher Kinetik. Es wurde gefolgert, dass SCF den Verlust von c-kit von der Zelloberfläche stimuliert.

Es konnte gezeigt werden, dass c-kit nach Bindung von SCF an den Rezeptor schnell internalisiert wurde und die Degradierung des Rezeptors beschleunigt war [Yee NS *et al.* 1993].

Um das Vorhandensein des Effekts der Ligandenbindung auch in humanen Mastzellen zu untersuchen, wurden diese mit SCF inkubiert.

Dieses ist in vorliegender Arbeit erstmalig in humanen Gewebe-Mastzellen untersucht worden und ist zuvor nur an aus fötalen Leberzellen generierten Mastzellen und Zelllinien in ähnlicher Weise durchgeführt worden [Shimizu Y *et al.* 1996]. Um das Verhalten des Rezeptors in humanen Hautmastzellen begreifen zu können, ist es jedoch notwendig, Zellen zu untersuchen, die funktionelle Charakteristika normaler Mastzellen aufweisen.

Studien dieser Art sind von größter Wichtigkeit, da die Spezies, die Zellart und die experimentellen Konditionen einen Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchung der Rezeptormodulation haben können.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit auch hier HMC-1-Zellen, intermediär differenzierte LAD 2-Zellen und KMZ untersucht, um zu erfahren, ob dem Reifegrad der Zellen in der Internalisierung eine Rolle zukommt.

Dabei wurden die drei Mastzellensysteme im Falle der LAD 2 und kutanen Mastzellen für 24 Stunden ohne den für sie überlebenswichtigen Wachstumsfaktor SCF kultiviert. HMC-1 Zellen bringen aufgrund ihrer Mutation eine konstitutive Aktivierung des c-kit-Rezeptors mit sich und proliferieren somit unabhängig von SCF.

Überraschend reagierten jedoch auch HMC-1-Zellen auf Zugabe des Liganden, was durch die genannten, vorliegenden 560 und 816 Mutationen nicht zu erwarten war. Nach nur 20-minütiger Inkubation mit seinem Liganden war die Rezeptorexpression von c-kit in HMC-1-Zellen drastisch um fast zwei Drittel gesunken.

Somit kann eine völlige Unabhängigkeit der Aktivität des Rezeptors von seinem Liganden SCF nicht angenommen werden. Die Vermutung einer maximalen Signalwirkung auch in Abwesenheit des Liganden konnte hier nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung der Sensitivität für SCF ist dabei das Vorliegen nur eines mutierten Allels.

Dieses Ergebnis stimmt zudem mit einigen Daten aus der Literatur durchaus überein [Baghestanian M, Agis H 1996].

Wie aus der Literatur bekannt [Shimizu 1996] und übereinstimmend mit Vorergebnissen der Arbeitsgruppe [Thienemann F 2005], war bei allen drei Mastzellsystemen bereits nach 20 Minuten ein signifikanter Abfall der Zelloberflächenexpression von c-kit zu beobachten, der am stärksten ausgeprägt in LAD 2-Zellen war. Die Rezeptorexpression dermalen Mastzellen war nach 20 min signifikant gesunken, erfuhr jedoch noch eine weitere Herabsenkung bis zum Zeitpunkt 120 min. Dies scheint auf ein verzögertes *Cycling* des Rezeptors in Abhängigkeit vom Reifegrad der Zelle zurückzuführen zu sein.

Der Abfall der Oberflächendichte des Rezeptors auf dermalen Mastzellen ließ sich im weiteren zeitlichen Verlauf bis zu 120 min jedoch steigern, wobei bei LAD 2 und HMC-1 Zellen nach 120 min nur noch eine geringfügige Herabregulation von c-kit festzustellen war. Somit lässt sich vermuten, dass die hohe Geschwindigkeit der Rezeptorinternalisierung bei unreifen Mastzellen eine weitere Reduktion der c-kit-Expression quasi nicht zulässt oder sich der Rezeptor schon im Stadium der Erholung und Reexpression an der Oberfläche befindet.

Der vorhandene Einfluss auf alle drei Mastzellsysteme lässt einen universalen Mechanismus der Regulation der Rezeptorverfügbarkeit auf der Zelloberfläche vermuten und scheint damit eine intrinsische Fähigkeit des Rezeptors selbst zu sein. Trotzdem sind zellspezifische Unterschiede in der Reaktion auf Inkubation mit dem Liganden erkennbar, was an der verzögerten Internalisierung des Rezeptors vor allem in dermalen Mastzellen ersichtlich ist.

Somit erscheint die Internalisierung nach Ligandenbindung ein Instrument zur Regulation der Rezeptorexpression zu sein, welches die Zelle selektiv benutzen kann. In diesem Zusammenhang sind von der Arbeitsgruppe weitere Ergebnisse bezüglich LAD 2-Zellen im *Western-Blot* generiert worden, die bereits nach einer Stunde eine starke Abnahme der c-kit-Level zeigten, die ihr Maximum nach 3 Stunden fand, um innerhalb von 24 Stunden wieder das Ausgangsmaß zu erreichen [persönliche Mitteilung].

### 5.3 Die Wirkung des selektiven Rezeptortyrosinkinaseinhibitors STI571 auf HMC-1 und LAD 2-Zellen

Ausgehend von der Annahme, dass Rezeptorinternalisierung eine intakte Kinaseaktivität voraussetzt, wurde der Effekt des Einsatzes des Rezeptortyrosinkinaseinhibitors STI571 (Imatinib/ Gleevec/ Glivec) im Einsatz mit den zwei Mastzellsystemen LAD 2 und HMC-1 untersucht.

STI571 steht für *Signal transduction inhibitor* und ist ein 2 Phenylaminopyrimidinderivat, welches mit Rezeptortyrosinkinasen interferiert und so die Signaltransduktion an den Zellkern verhindert.

Diesen Wirkmechanismus macht sich unter anderem die heutige Krebstherapie z.B. in der Chronisch-myeloischen Leukämie (CML) zunutze [Duffaud F et al. 2009]. Bei dieser Erkrankung wird durch fehlerhafte Teilung ein Stück des Chromosoms 9 an ein Stück des Chromosoms 22 gelegt, wodurch die beiden Onkogene BCR und ABL in direkte Nachbarschaft gelangen. Die Folge ist eine unkontrollierte Proliferation der leukämischen Zellen.

Der Einsatz von STI571, eines Medikamentes, das an der molekularen Basis der Erkrankung eingreift, hat den entscheidenden Vorteil gegenüber herkömmlichen Cytostatika in wesentlich geringeren Nebenwirkungen, da selektiv der pathologisch veränderte Mechanismus gestoppt wird und nicht alle Zellen betroffen sind.

Die hier generierten Ergebnisse zeigten in LAD 2-Zellen und erstaunlicherweise ebenfalls in HMC-1 Zellen einen deutlichen Effekt des Inhibitors bezüglich der Hemmung und Verzögerung der Internalisierung von c-kit.

Letzteres war bei LAD 2-Zellen zu erwarten. Durch die bei HMC-1-Zellen vorliegende Punktmutation, die zu konstitutiver Aktivierung des Rezeptors führt, jedoch nicht, da in der Literatur von Ma Y *et al.* 2002 beschrieben wurde, dass STI571 weder in der Lage war, die Aktivierung von mutiertem c-kit (Asp816Val) zu unterdrücken, noch Apoptose oder verringerte Proliferation in HMC-1 Zelllinien zu induzieren, welche die Asp816Val Mutation exprimieren [Ma Y *et al.* 2002].

Von Scheinfeld N wurde 2006 berichtet, dass c-kit, welches die D816V trägt, welches mit Mastozytose vergesellschaftet ist, eine Resistenz gegen Imatinib aufweist.

Dies soll in der Mutation begründet sein, die die ATP Bindungsstelle verändert, und dadurch die Bindung von Imatinib an c-kit verhindert.

Eine zweite überraschende Beobachtung war, dass HMC-1-Zellen durch die Präinkubation mit STI571 alleine für 30 min vor Versuchsansatz eine Herabregulierung der Zelloberflächendichte des Rezeptors erfuhren.

Dies verleitet zu der Vermutung, dass an der Zelloberfläche von HMC-1-Zellen die Fraktion von nicht-mutiertem c-kit, kodiert durch das Wildtyp-Gen, ausreicht, um eine Antwort auf die Hemmung der Internalisierung zu geben.

Diese Annahme wird auch schon durch das Ansprechen von HMC-1-Zellen auf den Liganden SCF bestätigt.

Die nach wie vor vorliegende Existenz der Mutation in den verwendeten HMC-1-Zellen wurde freundlicherweise im Labor von Dr. Escribano (Madrid) mittels Sequenzanalyse bestätigt.

Wie aus der Literatur bekannt, war die Reaktion von Wildtyp-c-kit mit STI571 ausdrücklich vermindert oder im Falle der konstitutiv-aktivierten Form gar nicht vorhanden. Unsere Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu den von Foster und Griffith im Jahre 2004 generierten Daten, die eine Resistenz des mutierten c-kit gegenüber STI571 feststellten [Foster R, *et al.* 2004]. Jedoch fanden deren Untersuchungen an c-kit-Modellen statt, wohingegen hier HMC-1-Zellen und LAD 2-Zellen untersucht wurden.

Die Hemmung der Internalisierung erwies sich zu früheren Zeitpunkten noch ausgeprägter als im späteren Verlauf, so ist eine Hemmung der Internalisierung von c-kit bei HMC-1-Zellen nach 20 min um mehr als die Hälfte erfolgt.

Wie zu erwarten, erfolgte bei LAD 2-Zellen eine starke Hemmung der Internalisierung, die auch ein größeres Ausmaß annahm als bei HMC-1-Zellen.

Auch hier war die Präinkubation der Zellen mit STI571 alleine in der Lage, die Zelloberflächenexpression zu senken. Mögliche Gründe für die verminderte Rezeptordichte sind eine Internalisierung, die durch STI571 ausgelöst wird, die eventuell in dessen Wirkungsweise am Rezeptor begründet sein könnte, oder in einer Abspaltung des Rezeptors von der Oberfläche durch Bindung von STI571. Eine Konformationsänderung des Rezeptors, die den Ak nicht mehr binden lassen könnte,

scheint unwahrscheinlich, da im weiteren Versuch mit SCF c-kit wieder stärker exprimiert wird. Es bleibt somit noch zu untersuchen, welcher Mechanismus der Herabregulation von c-kit durch Binden von STI571 zugrunde liegen könnte.

### **5.4 Die Herunterregulation des Rezeptors durch Inhibitoren der Transkription und Translation in Anwesenheit von SCF**

Um den möglichen Einfluss von SCF auf die Rezeptorexpression nach Inkubation mit Hemmstoffen der Transkription und Translation zu untersuchen, wurden Zellen der Linie HMC-1 5C6 und dermale Mastzellen über einen Zeitraum von 16 Stunden mit SCF und den Inhibitoren inkubiert und anschließend die Zelloberflächendichte von c-kit durchflusszytometrisch gemessen. Zunächst wurden die Daten mit denen nach Inkubation nur mit SCF verglichen.

Nach diesem Zeitraum war ein starker Abfall der Rezeptordichte zu verzeichnen, der bei HMC-1-Zellen jedoch weniger ausgeprägt schien als bei KMZ.

Dies könnte einerseits bedeuten, dass der Rezeptor auf HMC-1-Zellen einem schnelleren Umsatz unterliegt und nach 16 Stunden schon wieder vermehrt an die Oberfläche gebracht wird, oder sich in Anwesenheit von SCF auf diesem Niveau einpendelt. Im Vergleich dazu war nach zwei Stunden eine Abnahme der Zelloberflächenexpression bei HMC-1-Zellen zu messen, die in etwa der der KMZ nach 16 Stunden entsprach.

Um herauszufinden, welcher Mechanismus dieser Beobachtung zugrunde liegt, müssten weitere Kinetikstudien gemacht werden, die über den Verlauf dieser 16 Stunden die c-kit-Expression kontinuierlich messen.

Um zu erfahren, ob die Herabregulation von c-kit durch SCF und die Inhibitoren der de novo-Transkription und Proteinsynthese sich desselben Mechanismus bedienen, wurden die Zellen in Anwesenheit von SCF mit den Inhibitoren CHX, AD und deren Kombination inkubiert. Es konnte in allen Behandlungen und unabhängig von der Zellart eine Summation der hemmenden Effekte nachgewiesen werden, was bedeutet, dass diese Mechanismen unabhängig voneinander agieren. Das Zusammenspiel der Hemmung der de novo-Proteinsynthese und die Internalisierung des Rezeptors nach

SCF-Bindung ließen die Zelloberflächendichte des Rezeptors auf kaum detektierbare Werte sinken.

Da, wie oben erwähnt, die HMC-1-Zellen schon im Begriff waren, sich zu erholen und den Rezeptor wieder verstärkt zu exprimieren, war der verhältnismäßig stärkere additive Effekt der Herunterregulation in HMC-1-Zellen festzustellen.

Die Tatsache, dass nach diesem Zeitraum in kutanen Mastzellen so geringe c-kit-Werte messbar waren, lässt die Vermutung zu, dass HMC-1-Zellen tatsächlich einem schnelleren und dermale Mastzellen entsprechend einem langsameren Umsatz aufgrund ihrer höheren Differenzierung unterliegen.

Die Beobachtung, dass sich beide Effekte verstärken, macht es wahrscheinlich, dass der Rezeptor nach Internalisierung und Degradierung neuer Synthese bedarf, um wieder auf der Oberfläche erscheinen zu können. Und gilt wohl unabhängig vom Reifegrad.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Forschungsergebnissen, die anhand von humanen embryonalen, aus der Leber generierten Mastzellen gewonnen wurden [Shimizu Y, Ashman LK 1996].

Sofern einer der Inhibitoren oder auch die Kombination von CHX und AD zusammen mit SCF eingesetzt wurden, waren die resultierenden Werte untereinander nicht mehr sehr unterschiedlich und statistisch nicht signifikant. Das kann an der Tatsache liegen, dass die Werte so klein geworden waren, dass sie kaum noch messbar waren.

Diesbezüglich mag es sinnvoll erscheinen, weitere Untersuchungen mit einer geringeren Konzentration von SCF durchzuführen.

Dennoch ist es gelungen, in diesen Experimenten herauszuarbeiten, dass Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade alle sehr stark auf die Gabe von SCF ansprechen, auch reife, nicht proliferierende Mastzellen der Haut, was bisher nur für Mastzelllinien und Nagermastzellen bekannt war.

Des Weiteren war festzustellen, dass c-kit ein Rezeptor ist, der stark von der de novo-Transkription und Proteinsynthese abhängig ist, die untersuchten Regulationsmechanismen sich gegenseitig verstärken können und in unterschiedlich reifen Mastzellen auf ähnliche Weise arbeiten, mit kleinen zusätzlichen Einflüssen der einzelnen Mastzellart.

### **5.5 Der Einfluss von ATRA auf die Zelloberflächenexpression von c-kit**

Es ist bekannt, dass Retinoide starke regulatorische Effekte auf die hämatopoetische Differenzierung ausüben [Bedi A *et al.* 1995, Collins SJ *et al.* 1996]. So ist ATRA ein Hauptregulator der Hämatopoese, der vor allem auf unreife, proliferierende Leukozyten starke Effekte ausübt.

Retinoide beeinflussen die embryonale und fötale Entwicklung maßgeblich und tragen im adulten Organismus zu ständiger Zellerneuerung bei. Dies gilt im Besonderen für epitheliale und hämatopoetische Zellen.

In letzteren wurden Retinoide vielfach als Induktoren neutrophiler Differenzierung beschrieben [Lawson ND, Berliner N 1999]. Auch in Krebserkrankungen kommt Retinoiden eine bedeutende Rolle zu, indem sie neoplastische Zellen zur Induktion ihrer Differenzierung anregen, Hemmung des Zellwachstums oder Förderung ihres Überlebens induzieren [Montrone M *et al.* 2009].

Eine wichtige Rolle kann ATRA beispielsweise in der Therapie der akuten promyeloischen Leukämie einnehmen, einer Krankheit, der eine Genveränderung des RAR $\alpha$  zugrunde liegt [Hiddemann W, Griesinger F 1993].

Dort sind therapeutische Dosen von ATRA in der Lage, den pathologischen Effekt des Fusionsproteins aufzuheben und die leukämischen Blasten zur Differenzierung in reife Neutrophile anzuregen [Chomienne C 1996].

ATRA ist in der Literatur als Agens beschrieben worden, welches abhängig von verschiedenen Spezies, der Qualität der Progenitorzellen, dem Vorhandensein exogener Zytokine und Wachstumsfaktoren ganz unterschiedliche und sogar gegensätzliche Effekte vermitteln kann [Lawson ND, Berliner N 1999, Kinoshita T, Koike K 2000].

Diese umfassen Wachstumsunterdrückung, Induktion neutrophiler Differenzierung, erhöhte Repopularisierung von Stammzellen, aber auch Einflussnahme auf die Entwicklung von Basophilen, Monozyten und Eosinophilen.

Retinoide beeinflussen Wachstum und Proliferation myeloischer Zellen und sind beteiligt an der Pathogenese von Leukämien [Drumea K *et al.* 2008].

Aufgrund der komplexen und weitreichenden Effekte von ATRA auf die Hämatopoese sollte in dieser Arbeit der Effekt von ATRA auf Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade studiert werden.

Gerade weil die Unterschiedlichkeit in der Wirkung von ATRA auf dem Differenzierungsgrad von Zellen beruht, war es hier von besonderem Interesse, die Abhängigkeit der ATRA-vermittelten Effekte auf verschiedenen reife Mastzellen zu untersuchen, die - wie zuvor - durch die beiden Mastzelllinien HMC-1- und LAD 2-Zellen und dermale Mastzellen repräsentiert wurden.

In dieser Arbeit, sowie in Vorversuchen der Arbeitsgruppe, konnte klar ein dedifferenzierender Einfluss von ATRA auf Mastzellen durch negative Regulation wichtiger Marker der Zelle nachgewiesen werden [Thienemann F, Dissertation].

Weiterhin war zu beobachten, dass die ATRA-vermittelten Effekte weitgehend unabhängig vom Reifegrad der Mastzelle aufzutreten scheinen.

So war in allen drei Mastzellsystemen eine klare Herabregulierung des Zelloberflächenrezeptors c-kit zu erkennen, mit HMC-1-Zellen, die den stärksten Verlust erfuhren, LAD 2-Zellen, die sich auch hier intermediär verhielten, und KMZ, die eine moderate Senkung des Rezeptors zeigten. Diese Ergebnisse beziehen sich auf in der vorliegenden Arbeit generierte Daten mit Inkubationszeiten von 16 Stunden.

Vorergebnisse der Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass die Effekte sich von Zelllinie zu Zelllinie anders darstellen, wenn die Zellen über einen Zeitraum von 7 bzw. 3 Tagen - im Falle der HMC-1-Zellen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate - mit ATRA inkubiert waren. In dem Fall war die stärkste Abnahme bei kutanen Mastzellen zu erkennen, gefolgt von LAD 2 und HMC-1-Zellen [Thienemann F *et al.* 2005].

Ein transkriptionell regulierter Abfall der Oberflächenkonzentration konnte hier ausgeschlossen werden, da die Transkriptlevel von c-kit unter dem Einfluss von ATRA zu diesem Zeitpunkt nicht verändert waren (Vorergebnisse der Arbeitsgruppe).

Um die Möglichkeit des Basierens des Mechanismus auf translationeller Ebene zu untersuchen, wurden hier alle drei Mastzellsysteme mit ATRA und zusätzlich einem Inhibitor der de novo-Transkription und Translation bzw. deren Kombination für 16 Stunden inkubiert.

Im Falle der kutanen Mastzellen war - wie oben beschrieben - eine Herabregulation der Zelloberflächendichte von c-kit bei Hemmung der Translation zu sehen, die jedoch durch den Zusatz von ATRA nicht verstärkt werden konnte (Daten nicht dargestellt)

Cycloheximid schien den Effekt von ATRA somit zu imitieren.

Anders im Falle der HMC-1-Zellen, die eine zusätzliche Herabregulation von c-kit durch Inkubation mit Inhibitoren und ATRA erfuhren.

Dies veranlasst zur Annahme, dass der Mechanismus der Regulation von c-kit ein anderer sein muss als bei reifen Mastzellen.

Damit ist hier eine Abhängigkeit vom Reifegrad der Zellen zu vermuten.

Die Tatsache, dass ATRA, welches bisher vor allem in der Wirkung auf unreife, proliferierende Zellsysteme beschrieben wurde, auch einen starken Einfluss auf terminal differenzierte Mastzellen hat, war interessant und nach der Literatur nicht gänzlich zu erwarten.

### **5.6 Der Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Kit- Expression**

Aus der Literatur ist seit langem bekannt, dass die Regulation der Zelloberflächendichte des c-kit-Rezeptors auf unterschiedlichen Ebenen vonstatten geht. Dazu gehört, wie zuvor bereits beschrieben, der Weg der Internalisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung, der mit Ubiquitinierung und Degradierung des Proteins vergesellschaftet ist.

Die Funktion des Proteasoms, in dem Prozesse der Degradierung ablaufen, ist aus der Literatur als äußerst wichtig bekannt; Inhibitoren könnten sogar Therapieoptionen bei malignen Erkrankungen darstellen, da gezeigt werden konnte, dass maligne Zellen sogar sensibler als normale Zellen auf die Proteasomhemmung reagierten [Orlowski R1998, Masdehors P 1999].

Es sind in den letzten Jahren umfassende Untersuchungen bezüglich der Wirksamkeit von Proteasominhibitoren durchgeführt worden, die auch klinische Wirksamkeit erlangten. So wurde beispielsweise in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie berichtet, dass eine Behandlung der humanen CML Zelllinie K562 mit Proteasom-Inhibitoren zu einer signifikanten Verminderung der BCR/ABL-Expression sowie seiner Selbstaktivierung über Autophosphorylierung führt und damit den programmierten Zelltod der Leukämiezellen herbeiführte [Dou QP et al. 1999]. In diesem Zusammenhang schien es von Interesse, die Wirkung von Proteasominhibitoren, die auf die Rezeptortyrosinkinase c-kit gerichtet sind zu untersuchen.

In dieser Arbeit war im Versuch mit der Zelllinie HMC-1 jedoch nur eine geringe Modulation der c-kit-Expression erzielbar, im Sinne einer Steigerung.

Die in dieser Arbeit festgestellte eingeschränkte Wirkung auf die c-kit-Expression im Sinne einer geringen Stabilisierung kann aus unterschiedlichen Gründen resultieren: Möglicherweise ist der Zeitraum der Inkubation nicht richtig gewählt worden, wobei aus Versuchen zur Internalisierung bekannt war, dass c-kit einem schnellen Umsatz unterliegt und wenige Stunden nach Internalisierung wieder an der Zelloberfläche erscheint. Eine weitere Möglichkeit ist die Auswahl der Inhibitoren. In diesem Zusammenhang könnte die Versuchsanordnung mit dem in der Literatur jetzt gut beschriebenen Inhibitor Bortezomib, der für die Behandlung von rezidivierten, oder therapierefraktären Plasmozytomen zugelassen ist [Adams J 1999], wiederholt werden. Im Zusammenhang mit GIST wurde c-kit als Ziel des Proteasominhibitors Bortezomib auch von Wiedmann MW *et al.* 2005 beschrieben.

### **5.7 Die transkriptionelle Regulation von c-kit in Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade**

Als nächstes galt das Interesse den möglichen Mechanismen der c-kit-Regulation auf transkriptioneller Ebene.

Zur transkriptionellen Regulation der humanen c-kit -Expression war zu Beginn dieser Arbeit nicht viel bekannt.

Zwar waren für das murine System schon umfangreiche Forschungsarbeiten betrieben worden [Kitamura *et al.* 2002], der Frage nach der Regulation humaner c-kit-Expression war jedoch noch nicht, bzw. zumindest nicht in Mastzellen nachgegangen worden.

Im murinen System waren hingegen mehrere Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren charakterisiert worden, deren Vorhandensein und Aktivität nun auch für das menschliche c-kit-Gen untersucht werden sollten.

Da Nagermastzellen vielfache Abweichungen von humanen Mastzellen aufweisen, war es notwendig zu klären, ob diese Faktoren Relevanz für das humane Mastzellensystem haben und herauszufinden, ob es zusätzliche Faktoren gibt, die einen positiven oder negativen regulierenden Einfluss auf die c-kit-Transkription haben.

Die Entwicklung von Mastzellen wird von dem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren reguliert.

Auf der Ebene der Transkription konnten Studien, vor allem der murinen Mastopoese, eine Relevanz des Transkriptionsfaktors MITF für eine normale Entwicklung von Mastzellen nachweisen [Kitamura Y 2002]. Es ist bekannt, dass Gewebe von Mutanten, die mit Funktionsverlust entweder von SCF, c-kit oder MITF einhergehen, eine verminderte Mastzellzahl aufweisen [Kitamura Y *et al.* 2006].

Das SCL (*stem cell leukemia*)-Gen, auch bekannt unter dem Namen TAL1, wurde durch seine Vergesellschaftung mit chromosomalen Translokationen in kindlicher T-Zell-lymphoischer Leukämie entdeckt.

Aus der Literatur war bekannt, dass die Expression von SCL, welches der Familie der *helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren angehört, in hämatopoetischen Zellen mit der von c-kit korreliert [Krosi G *et al.* 1998]. Dort konnte anhand von CD34<sup>+</sup>-TF1-Zellen, die SCF, GM-CSF und IL3 zum Überleben benötigen, gezeigt werden, dass - wenn diese eine *antisense* SCL cDNA oder dominant negative SCL-Expression aufwiesen - die SCL DNA Bindungsaktivität am Promotor verschlechtert war. Ebenso war die SCF-vermittelte Unterdrückung der Apoptose gestört. Dies führte zu der Folgerung, dass SCL für das c-kit-abhängige Überleben der Zelle notwendig ist [Krosi G *et al.* 1998]. Die komplette Abhängigkeit vom Vorhandensein einer SCL-Expression während der frühen Embryonalentwicklung hat seine Bedeutung als maßgebliche Kontrollfunktion in der Hämatopoese begründet [Shivdasani RA 1996].

Neuere Studien zu diesem Thema haben die Notwendigkeit von SCL und Lyl1, welches in der Entwicklung von B-Zellen involviert ist, für die Aufrechterhaltung hämatopoetischer Stammzellen untersucht. Dort konnte an SCL- und Lyl1-*Knockout*-Mäusen eine starke genetische Interaktion zwischen diesen beiden demonstriert werden, die mit einer klaren Dosisabhängigkeit des Vorhandenseins von SCL oder Lyl1 Allelen für die Funktion hämatopoetischer Zellen einhergeht [Souroullas GP *et al.* 2009].

In den letzten Jahren ist an *Knockout* Mäusen (SCL(-/Delta)) die Funktion dieses Transkriptionsfaktors untersucht worden. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese über signifikant erhöhte Mastzellprogenitorzahlen in der Peritonealflüssigkeit, der Milz

und im Knochenmark verfügbaren. Nach Fraktionierung der Progenitoren aus dem Knochenmark waren diese Mastzellprogenitoren in der Megakaryozyten-Erythrozyten-Fraktion vorhanden, wohingegen sich Progenitoren der Kontrollgruppe in der Fraktion der Zellen mit Granulozyten-Makrophagen-Potential befanden. Trotz erhöhter Anzahl an Vorläufern war die Zahl reifer Gewebemastzellen nicht erhöht, es sei denn es wurde eine Behandlung mit IL3 und SCF durchgeführt. Dies wurde zumindest zum Teil auf die Notwendigkeit des Vorhandenseins von SCL für die normale Mastzellentwicklung zurückgeführt [Salmon JM et al. 2007].

Die Sp/KLF (*Krüppel-like-factor*) Familie von Transkriptionsfaktoren verfügt über eine Kombination aus drei gemeinsamen, konservierten Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup> Zink-Fingern, die die DNA-bindende Domäne dieser Transkriptionsfaktoren darstellen.

Als Folge des konservierten DNA-Bindungsmusters erkennen Sp/KLF-Mitglieder immer die gleichen GC/GT-Boxen, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität aufgrund veränderter Aminosäuren in den Zink-Fingern. GC und GT-Boxen sind unabdingbar für die Expression vieler verschiedener, ubiquitärer sowie gewebespezifischer, zellulärer Gene.

Sp1 war das erste klonierte Mitglied der Sp Faktoren, welches als Transaktivator des SV40 *early promoters* identifiziert wurde [Dyran WS, Tjian R 1983].

Sp1 ist in der Lage, Transkription von proximalen Promotoren und distalen Verstärkern zu stimulieren [Courey AJ et al. 1989]. Die Expression von Sp1 unterliegt zellspezifischen Änderungen während ihrer Entwicklung und ist in vielen voll differenzierten Zellen herunterreguliert [Saffer JD et al. 1991].

Obwohl die genauen physiologischen Funktionen von Sp Proteinen noch nicht vollständig geklärt sind, konnten in *Knockout* Studien an Sp1<sup>-/-</sup> murinen Embryos vielfältige Anomalien, verzögerte Entwicklung und erhöhte Embryonensterblichkeit am Tag 11 der Gestation gezeigt werden [Safe S et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob anhand von EMSA-Studien eine Bindungsaktivität für die drei Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden kann, und diese gegebenenfalls Unterschieden in den drei Mastzellsystemen unterliegt und

inwieweit das unterschiedliche Reifestadium einen Einfluss auf die Expression zu haben scheint.

Der elektrophoretische Mobilitäts*shift*assay stellt eine Möglichkeit dar, auf das Bindungsverhalten in der Zelle möglicherweise Rückschlüsse ziehen zu können oder ist zumindest ein erster Schritt dazu.

Hier konnte für die Sonde SCL-MITF in allen drei untersuchten Mastzellsystemen eine Bindungsaktivität nachgewiesen werden.

Dies konnte im Vergleich mit Überschuss nicht biotinylierter Sonde für HMC1 5C6-Zellen deutlich gezeigt werden.

Auch für die Zelllinie LAD 2 und kutane Mastzellen konnte für deren Kernextrakte eine Aktivität nachgewiesen werden.

Unterschiede in der Quantität der sich durch Bindung von Kernprotein und Sonde ergebenden Banden, ließen sich bei allen drei Mastzellsystemen erkennen, wobei festzustellen war, dass LAD 2-Zellen die stärkste Reaktion mit der Sonde einzugehen schienen, gefolgt von HMC-1 5C6-Zellen und mit der schwächsten Reaktivität in KMZ. Die Anfertigung von *Supershift*assays mit Antikörpern gegen SCL und MITF zeigten in HMC-1 5C6 Zellen nur mit anti-MITF einen *Supershift*, was vermuten lässt, dass in dieser Zelllinie nur MITF bindet.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Lécuyer, der zwar c-kit als direktes Ziel des SCL-Komplexes, an dem auch Sp1 und E2A beteiligt sind, beschrieb, aber auch die Tatsache, dass SCL in reifenden Zellen herunterreguliert wird, zu denen Mastzellen gehören.

Hier konnte zwar eine Bindungsaktivität auch in nicht proliferierenden, final differenzierten Mastzellen beobachtet werden, die sich jedoch wahrscheinlich auf den Einsatz einer kombinierten SCL-MITF Sonde herleiten lässt, von der jedoch MITF der bindende Faktor ist.

Die hier generierten Daten decken sich mit denen einer vergleichenden Studie der Arbeitsgruppe mit Monozyten und Granulozyten, die das Transkriptionsfaktorprofil von Mastzellen zum Gegenstand hatte. Dort konnten in kutanen Mastzellen größere mRNA-Mengen von MITF, SCL, GATA-1 und -2 ermittelt werden als in Mono- und Granulozyten, welche sich jedoch invers bezüglich der anderen untersuchten Faktoren, c-fos, PU.1, C/EBPalpha und C/EBPepsilon verhielten. Auch auf Proteinebene ließ sich

MITF bei Mastzellen eindeutig nachweisen, was bei Monozyten und Granulozyten nicht oder nur in sehr geringem Maße der Fall war.

Die Autoren beschrieben auch für SCL eine Expression in Mastzellen [Babina M 2005]. Anfänglich konnten Studien, vor allem der murinen Mastopoese, eine Relevanz des Transkriptionsfaktors MITF für eine normale Entwicklung von Mastzellen nachweisen. Dieses geschah beispielsweise durch Kitamura, der anhand von Mäusen, die eine doppelte Anzahl mutierter Allele im *mi*-locus aufwiesen, zeigen konnte, dass dies in gänzlichem Fehlen von Mastzellen resultierte [2002].

Tsujimura T *et al.* [1996] untersuchten den Einfluss von MITF auf die Transkription des murinen *c-kit*-Gens. Dabei ließ sich die Expression von *c-kit* und die verminderte Antwort auf SCF durch Überexpression nicht mutierten MITFs in in Kultur gehaltenen Mastzellen von Mäusen mit mutiertem MITF normalisieren. Damit war ein Beweis für die Beteiligung von MITF für die Transkription von *c-kit* in murinen Mastzellen erbracht. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung des Faktors MITF auch für humane Mastzellen dargestellt werden.

Im Bezug auf SCL haben Studien von Hoang zeigen können, dass SCL durchaus gegensätzliche Effekte auf die Differenzierung von Erythrozyten und Monozyten vermitteln kann [Hoang T *et al.* 1996]. So wurde dort die Notwendigkeit der Herunterregulierung von SCL für die monozytäre Differenzierung gefolgert. Hier konnte im *Supershiftassay* mit LAD 2 Zellen, einer intermediär differenzierten Zelllinie, mit der Sonde SCL-MITF nur die Bindungsaktivität von MITF nachgewiesen werden, nicht jedoch die von SCL, was Parallelen mit der oben genannten Studie aufzeigen könnte, und damit möglicherweise eine Abhängigkeit der Wirkung von SCL vom Differenzierungsgrad aufzeigt.

Für den Faktor Sp1 ergab sich jedoch nur im Falle unreifer, proliferierender Mastzellen eine Bindungsaktivität. Dabei war zu beobachten, dass LAD 2 Zellen stärker zu binden schienen und eine stärker retardierte Bande zu beobachten war.

Für kutane Mastzellen war keine Bindungsaktivität detektierbar. Somit scheint Sp1 nur bei nicht voll differenzierten Zellen eine Wirkung zu entfalten. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der Saffer JD *et al.* 1991 berichteten, dass die Sp1- Expression vom

Differenzierungsgrad der Zelle abhängig ist und mit steigender Differenzierung herunterreguliert wird.

### **5.8 Der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf das Bindungsverhalten unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren**

Die Daten aus *Gelshiftassays*, in denen LAD 2-Zellen untersucht wurden, die mit ATRA über 7 Tage inkubiert wurden - im Vergleich zu unbehandelten Zellen - zeigten keine nennenswerte Veränderung der Bindungsaktivität für die zuvor untersuchten Transkriptionsfaktoren SCL-MITF und Sp1.

Somit scheint die transkriptionelle Regulation - was die untersuchten drei Faktoren betrifft - nicht durch ATRA zu beeinflussen zu sein, bzw. sind Änderungen hierbei mittels EMSA nicht detektierbar.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, deren Daten in einer weiteren Dissertation bereits publiziert sind, konnten verringerte Transkriptlevel von c-kit nach ATRA-Behandlung vor allem in LAD 2 und KMZ nachweisen. In HMC-1-Zellen war dies nicht der Fall [Thienemann F 2005, Dissertation].

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine oder keine quantifizierbare Schwächung der Bindungsaktivität der Sonden SCL-MITF und Sp1 durch ATRA festgestellt werden. Der regulative Effekt von ATRA muss daher durch andere Mechanismen zustande kommen. Diese könnten sein: bislang nicht auf ihre Reaktion mit ATRA untersuchte Transkriptionsfaktoren, die für die verminderten mRNA-Level verantwortlich sind oder erfolgte Bindung, aber keine korrekte mRNA-Synthese infolge einer veränderten Aktivität der Transkriptionsfaktoren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Expression der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit, die hier auf unterschiedlichen Ebenen untersucht wurde, ein immens komplexer Vorgang zu sein scheint, der abhängig vom jeweiligen Reifestadium der Zelle auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden kann. So unterliegt der Rezeptor einerseits in allen Reifestadien einem extrem schnellen Umsatz im Vergleich zu anderen Markern, wird jedoch - wie oben beschrieben - andererseits durchaus auch zelltypspezifisch reguliert.

## 6 Zusammenfassung

Die Regulation der Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit in humanen dermalen Mastzellen war zu Beginn dieser Arbeit noch wenig erforscht. Zur Proteinebene lagen zwar bereits einige Studien vor, die sich mit der Internalisierung nach Ligandenbindung, Ubiquitinierung und nachfolgender Degradierung im Proteasom, sowie proteolytischem Shedding beschäftigten. Zur transkriptionellen Regulation waren jedoch nur wenige Daten publiziert, die sich zudem vor allem auf das murine System bezogen und deren Anwendbarkeit auf menschliche Mastzellen bisher ungeklärt war.

Um eine mögliche Relevanz der Transkriptionsfaktoren, die im murinen System von Bedeutung sind, für dermale Mastzellen zu untersuchen, wurden einige dieser in den drei hier eingesetzten Mastzellsystemen angewendet. Auf Proteinebene sollte in dieser Arbeit hauptsächlich dem Grundumsatz der Mastzellen in unterschiedlichen Reifestadien nachgegangen werden und untersucht werden, ob und inwieweit dieser vom Reifegrad abhängigen Unterschieden unterliegt.

Dazu wurden die Mastzelllinien HMC-1 und LAD 2 untersucht, wobei erstere eine in Kultur proliferierende leukämische Mastzelllinie darstellt, LAD 2 eine intermediär differenzierte Mastzelllinie ist, die anhand einer Patientin mit Mastzellsarkom isoliert werden konnte.

Die hier generierten Daten weisen eine weitgehend unabhängig vom Reifegrad vorliegende Anfälligkeit für Unterbrechungen der de novo- Transkription und Translation nach. Diese unterliegt nur geringfügigen Einflüssen innerhalb der Zelllinien. Im Vergleich mit anderen Zelloberflächenrezeptoren wie CD29, CD50 und CD54 war c-kit deutlich der Rezeptor, der die stärkste Abnahme der Zelloberflächenexpression infolge der Behandlung aufwies. Somit scheint c-kit in allen untersuchten Mastzellsystemen einem schnellen Umsatz zu unterliegen.

Zur Internalisierung nach Ligandenbindung war aus der Literatur bekannt, dass c-kit in Lungenmastzellen nach SCF Zugabe einer Herabregulation unterliegt. Zum Verhalten humaner, dermalen Mastzellen war auch hier wenig bekannt. Hier konnte für Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade eine rasche und starke Abnahme der Zelloberflächendichte in allen Mastzellarten nachgewiesen werden. Dabei waren kutane

Mastzellen diejenigen, die am schwächsten reagierten oder die c-kit zumindest langsamer internalisierten.

In dem Zusammenhang der Internalisierung wurde der Einfluss der Behandlung der hier untersuchten drei Mastzellsysteme mit dem Tyrosinkinaseinhibitor STI571 untersucht, was sich in einer Hemmung der c-kit Herabregulation und damit in stabilisierten c-kit Werten äußerte. Dies gilt für alle drei Mastzellarten, unabhängig auch von der in HMC-1 Zellen vorliegenden Mutation, die zu konstitutiver Aktivierung von c-kit führt.

In Abwesenheit von SCF war STI571 in HMC-1 und LAD 2 Zellen in der Lage, die Zelloberflächenexpression von c-kit zu senken. Die Behandlung der drei Mastzellsysteme mit SCF sowie fundamentalen Inhibitoren der de novo Transkription und Proteinsynthese führte zu einer gravierenden Herabregulation von c-kit, die sich in kaum noch detektierbaren c-kit Werten niederschlug. Dies stellt somit eine Summation der Effekte dar und lässt vermuten, dass die Mechanismen unabhängig voneinander agieren. Zum Grundumsatz von c-kit wurde in den drei Mastzellsystemen die Möglichkeit untersucht, durch die Hemmung der Proteasomfunktion die c-kit Oberflächenexpression zu stabilisieren. Dieses war jedoch in keinem Mastzellsystem unter den hier angewandten Bedingungen in reproduzierbarer Weise möglich.

Basierend auf dem Wissen um die Effekte von *all-trans*-Retinsäure auf hämatopoetische Zellen, sollte in dieser Arbeit einem möglichen, die Differenzierung der Zellen betreffenden Effekt von ATRA auf Mastzellen nachgegangen werden. In den hier angeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ATRA auf allen drei Mastzellsystemen eine Herabregulation der c-kit Expression bewirkt, die nach 16 Stunden bei HMC-1 Zellen im Vergleich zu LAD 2 und kutanen Mastzellen am größten ist.

Ausgehend von Daten, die in einer weiteren Dissertation in der Arbeitsgruppe zu diesem Thema generiert worden waren, konnte hier übereinstimmend festgestellt werden, dass die Herabregulierung der c-kit Expression auf kutanen Mastzellen bei gleichzeitiger Inkubation mit ATRA und Cycloheximid, durch Cycloheximid nicht weiter verstärkt werden konnte. Somit scheint ATRA den Effekt von Cycloheximid zu imitieren.

Der zweite große Teil der vorliegenden Arbeit sollte den transkriptionellen Regulationswegen von c-kit gewidmet sein. Dabei wurde die Relevanz unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren, die sich für das murine System als bedeutsam erwiesen haben, auch in den hier untersuchten Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade in *Gelshiftassays* untersucht.

Es konnte zuvor für den Transkriptionsfaktor SP1 im Versuch mit dem Wirkstoff Mithramycin A, der durch Interkalation in die DNA das Binden von SP1 verhindert, in HMC-1 und LAD 2 Zellen eine Herabregulation der c-kit Expression nachgewiesen werden. Weiterführend wurden im EMSA alle drei Mastzellensysteme mit Sonden der Transkriptionsfaktoren SCL-MITF und SP1 eingesetzt. Es ergab sich für die Sonde SP1 eine Bindungsaktivität nur in proliferierenden Mastzellen, nicht jedoch in kutanen Mastzellen. Für die Sonde SCL-MITF war eine Bindungsaktivität in allen drei Mastzellensystemen nachweisbar. Im *Supershiftassay* mit HMC-1 Zellen konnte für diese gezeigt werden, dass offenbar MITF der bindende Faktor ist.

Im Versuch mit Kernextrakten aus LAD 2-Zellen, die für 7 Tage mit ATRA behandelt wurden, ließ sich kein eindeutiger Effekt auf das Bindungsverhalten der untersuchten Sonden feststellen. Die Banden ergaben keine sichtbare Schwächung oder Verstärkung der Bindungsaktivität durch ATRA im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen.

Somit scheint dem Transkriptionsfaktor MITF auch in humanen Mastzellen eine wichtige Rolle zuzukommen, wie es für das murine System schon längere Zeit beschrieben war. Der Transkriptionsfaktor SP1 scheint mit zunehmendem Reifestadium der Zelle an Bedeutung zu verlieren. Die hier in den durchflusszytometrischen Versuchen und *Gelshiftassays* generierten Daten sollen dazu beitragen, ein weiterreichendes Verständnis der regulativen Prozesse eines der bedeutendsten Tyrosinkinaserzeptoren auf Mastzellen zu gewinnen und somit Einblicke in die komplexen Mechanismen der davon abhängigen Signaltransduktionsprozesse zu erhalten. Dieses Wissen ist notwendig, um die Mechanismen einer aberranten Reaktivierung unter anderem in der Tumorgenese zu erforschen, sowie die molekularen Vorgänge von Hämatopoese und Mastopoese besser zu verstehen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
APL	Akute Promyeloische Leukämie
ATRA	All-trans Retinsäure ( <i>All-Trans-Retinoic Acid</i> )
CCR5	CD195
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-kit	zelluläres kit (SCF Rezeptor)
COS cells	Zelllinie, die <b>CV1</b> vom Ursprung ( <i>Origin</i> ) ist, aber die genetisches Material von <b>SV40</b> trägt
CTMC	Bindegewebsmastzelle ( <i>Connective Tissue Mast Cells</i> )
CXCR4	CD184
DAG	Diaglycerin
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
EGF	Epidermiswachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
ERK	<i>Extracellularly Regulated Kinases</i>
IgE	Immunglobulin E
FcεRI	hochaffiner IgE Rezeptor
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
Fyn	Mitglied der Src-Familie von Tyrosinkinase
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony-Stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
Grb-2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
HMC-1	<i>Human Mast Cell Line-1</i>
IL5	Interleukin 5
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAK2	Janus Kinase 2
JNK	<i>C-Jun N-terminal Kinase</i>
Lyn	Mitglied der Src-Familie von Tyrosinkinase
MAP-Kinase	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
M-CSFR	<i>Monocyte-Colony-Stimulating Factor Receptor</i>
MCT	Mastzellen, die nur Tryptase exprimieren
MCTC	Mastzellen, die Tryptase und Chymase exprimieren
MLMC	Mucosale Mastzellen ( <i>Mucosal like mast cells</i> )
mRNA	<i>messengerRNA</i>
PDGF	( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC <sub>γ</sub>	Phospholipase C <sub>γ</sub>
PKC	Proteinkinase C
Ras	<i>Rat-Sarcoma</i>
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
SCF	Stammzellfaktor ( <i>Stem Cell Factor</i> )
SEM	Standardabweichung ( <i>Standard error of the mean</i> )
Sl	<i>Steel Locus</i>
Sos	<i>Son-Of-Sevenless</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
STAT	<i>Signal Transducers And Activators Of Transcription</i>
TNF <sub>α</sub>	Tumornekrosefaktor α
tr-kit	verkürzte Form von c-kit ( <i>Truncated Kit</i> )
TPO	Thrombopoetin
VEGF	Gefäßendothelwachstumsfaktor ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
v-kit	<i>Viral-Kit</i>
W Locus	<i>White Spotting Locus</i>

## 8 Literaturverzeichnis

1. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, et al.: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59 (11): 2615-22.
2. Akin C, Metcalfe DD. The biology of kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 13-19.
3. Alberts B, Bray D, et al.: *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing Inc. New York 1994.
4. Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Seretakis D, et al.: Inhibitory effect of retinoic acid on proliferation, maturation and tryptase level in human leukemic mast cells (HMC-1). *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16: 43-47.
5. Ashman LK: The biology of stem cell factor and its receptor c-kit: *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31(10): 1037-51
6. Babina M, Guhl S, Stärke A, et al.: Comparative cytokine profile of human skin mast cells from two compartments- strong resemblance with monocytes at baseline but induction of IL-5 by IL-4 priming. *J Leukoc Biol.* 2004; 75 (2): 244-52.
7. Babina M, Henz BM: All-trans retinoic acid down-regulates expression and function of  $\beta$ 2 integrins by human monocytes: opposite effects on monocytic cell lines. *Eur J Immunol* 2003; 33: 616-25. (80)
8. Babina M, Mammeri K, Henz BM: Retinoic acid up-regulates myeloid ICAM-3 expression and function in a cell-specific fashion – evidence for retinoid signaling pathways in the mast cell lineage. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 361-72.
9. Babina M, Rex C, Guhl S, et al.: Baseline and stimulated turnover of cell surface c-kit expression in different types of human mast cells. *Exp Dermatol.* 2006; 15 (7): 530-7.
10. Babina M, Schülke Y, Kirchof L, et al.: The transcription factor profile of human mast cells in comparison with monocytes and granulocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62 (2): 214-26.
11. Baghestanian M, Agis H, Bevec D, et al.: Stem cell factor-induced downregulation of c-kit in human lung mast cells and HMC-1 mast cells. *Exp Hematol* 1996; 24: 1377-86.
12. Bedi A, Sharkis SJ: Mechanisms of cell commitment in myeloid cell differentiation. *Curr Opin Hematol.* 1995; 2(1): 12-21.
13. Bentley AM, Jacobson MR, Cumberworth V, et al.: Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89 (4): 877-83.
14. Besmer P: The kit ligand encoded at the murine steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Curr Opin Cell Biol* 1991; 3 (6): 939-46.
15. Besmer P, Murphy JE, George PC, et al.: A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its ontogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 1986; 320 (6061): 415-21.
16. Bienenstock J, MacQueen G, Sestini P, et al.: Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143 (3 Pt 2): S55-8.
17. Bienenstock J, Tomioka M, Matsuda H, et al.: The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82 (3-4): 238-43.
18. Biesalski HK, Nohr D: New aspects in vitamin a metabolism: the role of retinyl esters as systemic and local sources for retinol in mucous epithelia. *J Nutr.* 2004; 134(12 Suppl): 3453S-3457S
19. Blank U, Ra C, Miller L, et al.: Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1998; 337 (6203): 187-9.
20. Broudy VC, Lin NL, Liles WC, et al.: Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-kit. *Blood* 1999; 94 (6): 1979-86.
21. Butterfield JH, Weiler D, Dewald G, et al.: Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia Research* 1988; 12 (4): 345-55.
22. Chomienne C, Fenaux P, Degos L: Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* 1996; 10 (9): 1025-30.
23. Collins SJ, Tsai S, Bernstein I, et al.: Retinoic acid receptors in hematopoiesis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 211: 7-15.
24. Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP, et al.: Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell* 1989; 59 (5): 827-36.
25. Crivellato E, Beltrami CA, et al.: Paul Ehrlich's doctoral thesis: a milestone in the study of mast cells. *Br J Haematol* 2003; 123 (1): 19-21.

26. Csonga R, Prieschl EE, Jaksche D, et al.: Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF-alpha and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells. *J Immunol* 1998; 160 (1): 273-83.
27. Da Silva CA, Reber L, Frossard N, et al.: Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006; 20(1):21-39
28. Debier C, Larondelle Y: Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr*. 2005; 93(2): 153-74
29. Dou QP, Li B: Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat* 1999; 2 (4): 215-23.
30. Douer D, Ramezani L, Parker J, et al.: All-trans-retinoic acid effects the growth, differentiation and apoptosis of normal human myeloid progenitors derived from purified CD34+ bone marrow cells. *Leukemia* 2000; 14 (5): 874-81.
31. Drumea K, Yang ZF, Rosmarin A, et al.: Retinoic acid signaling in myelopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008. 15 (1): 37-41.
32. Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J, et al.: Transforming growth factor-beta regulates c-kit message stability and cell surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* 1994; 83 (11): 3138-45.
33. Duffaud F, Le Cesne A: Imatinib in the treatment of solid tumours. *Target Oncol*. 2009;4 (1): 45-56.
34. Dynan WS, Tjian R: The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 1983; 35: 79-87.
35. Ehrlich P: Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Dissertation. Universität Leipzig, 1878.
36. Foster R, Griffith R, Ferrao P, et al.: Molecular basis of the constitutive activity and STI571 resistance of Asp816Val mutant KIT receptor tyrosine kinase. *J Mol Graph Model*. 2004; 23 (2): 139-52.
37. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, et al.: Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32 (2): 237-46
38. Geissler EN, Ryan MA, Housman DE: The dominant white-spotting(W) locus of the mouse encodes the c-kit proto-oncogene. *Cell* 1988; (55): 185-92.
39. Germain P, Chambon P, Eichele G: International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58: 712-25
40. Gommerman JL, Rottapel R, Berger SA, et al.: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Ca<sup>2+</sup> Influx Dependence for Ligand-stimulated Internalization of the c-kit Receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272(48): 30519-25
41. Gotoh A, Takahira H, Mantel C, et al.: Steel factor induces Serin phosphorylation of STAT3 in human growth factor-dependent myeloid cell lines. *Blood* 1996; (88): 138-45.
42. Grabarek J, Groopman JE, Lyles YR, et al.: Human kit ligand (stem cell factor) modulates platelet activation in vitro. *J Biol Chem* 1994; 269 (21): 718-21, 724.
43. Grabbe J, Haas N, et al.: [The mast cell]. *Hautarzt* 1994; 45 (1): 55-63.
44. Gurish MF, Boyce JA: Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002; 22(2): 107-18
45. Gurish MF, Boyce JA: Mast cells: ontogeny, homing and recruitment of a unique innate effector cell. *J allergy Clin Immunol*. 2006; 117(6):1285-91
46. Haller F, Detken S, Schulten HJ, et al.: Surgical management after neoadjuvant imatinib therapy in gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with respect to imatinib resistance caused by secondary KIT mutations. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14 (4): 1247-8.
47. Hassan HT, Zander A: Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis. *Acta haematol*. 1996; 95(3-4): 257-62
48. Hiddemann W, Griesinger F: Preclinical aspects and therapeutic perspectives of acute and chronic leukemias. *Curr Opin Oncol*. 1993; 5(1): 13-25.
49. Hiromatsu Y, Toda S: Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech*. 2003; 60(1): 64-9
50. Hjertson M, Kivinen PK, Dimberg L, et al.: Retinoic acid inhibits in vitro development of mast cells but has no marked effect on mature human skin tryptase- and chymase-positive mast cells. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 239-45.
51. Hoang T, Paradis E, Brady G, et al.: Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 1996; 87(1): 102-11.
52. Hogg A, Schirm S, Nakagoshi H, et al.: Inactivation of a c-Myb/estrogen receptor fusion protein in transformed primary cells leads to granulocyte/macrophage differentiation and down regulation of c-kit but not c-myc or cdc2. *Oncogene* 1997; 15: 2885-98.

53. Hoth M: Depletion of intracellular calcium stores activates an outward potassium current in mast and RBL-1 cells that is correlated with CRAC channel activation. *FEBS Lett* 1996; 390 (3): 285-8.
54. Hsu HL, Wadman I, Tsan JT, et al. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 5947-51.
55. Huang S, Jean D, Luca M: Loss of AP-2 results in downregulation of c-kit and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO Journal* 1998; 17: 4358-69.
56. Irani AM, Schwartz LB: Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc.* 1994; 15(6): 303-8
57. Iwakiri R, Inokuchi K, Dan K, et al.: Marked basophilia in acute promyelocytic leukaemia treated with all-trans retinoic acid: molecular analysis of the cell origin of the basophils. *Br J Haematol* 1994; 86: 870-72.
58. Kastner P, Mark M, Chambon P: Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 1995; 83 (6): 859-69.
59. Kinoshita T, Koike K, Mwanjemi HH, et al.: Retinoic acid is a negative regulator for the differentiation of cord blood-derived human mast cell progenitors. *Blood* 2000; 95(9): 2821-28
60. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y: Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or Fc gammaRI. *Leuk Res.* 2003 Aug; 27 (8): 677-82.
61. Kirshenbaum AS, Goff P, et al.: Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34+, c-kit+ and express aminopeptidase N (CD13). *Blood* 1994; 94 (7): 2333-42.
62. Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N, et al.: Development of mast cells and basophils : processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci.* 1993; 306(3): 185-91
63. Kitamura Y, Morii E, Jippo T, et al.: Effect of MITF on mast cell differentiation. *Mol Immunol.* 2002; 38 (16-18): 1173-6.
64. Kitamura Y, Oboki K, Ito A: Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; 26 (3): 387-405.
65. Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, et al.: Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Asthma* 1996; 33 (2): 89-95.
66. Kros G, He G, Lefrancois M, et al.: Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-kit function in hematopoietic cells. *J Exp Med* 1998; 188: 439-50.
67. Krumins SA, Broomfield CA: C-terminal substance P fragments elicit histamin release from a murine mast cell line. *Neuropeptides* 1993; 24 (1): 5-10.
68. Lasota J, Miettinen M: KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Semin Diagn Pathol* 2006; 23 (2): 91-102.
69. Lawson ND, Berliner N: Neutrophil maturation and the role of retinoic acid. *Exp Hematol.* 1999; 27 (9): 1355-67.
70. Lécuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, et al.: The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with SP1. *Blood* 2002; 100: 2430-40.
71. Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, et al.: Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm.* 2005 ; 70 : 199-264.
72. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, et al.: The Fc(epsilon)RI beta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RI gamma-mediated cell activation signals. *Cell* 1996; 85 (7): 985-95.
73. Linnekin D: Early signaling pathways activated by c-kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31 (10): 1053-74.
74. Linnekin D, DeBerry CS, Mou S: Lyn associates with the Juxtamembrane region of c-kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997; (272): 27,450-5.
75. Ma Y, Zeng S, Metcalfe DD, et al.: The c-kit mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory type mutations. *Blood* 2002; 99(5): 1741-4.
76. Mactier H, Weaver LT: Vitamin A and preterm infants: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005; 90(2): 103-8
77. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM: Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochem Biophys Acta* 2009; 1796 (1): 19-26.
78. Marshall JS, Jawdat DM: Mast cells in innate immunity. *Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 114 (1): 21-27
79. Marshall JS, King CA, McCurdy JD: Mast cell cytokine and chemokine responses to bacterial and viral infection. *Curr Pharm Des* 2003; (9): 11-24

80. Masdehors P, Omura S, Merle-Béral H, et al.: Increased sensitivity of CLL-derived lymphocytes to apoptotic death activation by the proteasome-specific inhibitor lactacystin. *Br J Haematol.*1999: 105 (3): 752-7.
81. Masson K, Heiss E, Band H, et al.: Direct binding of Cbl to Tyr586 and Tyr936 of the stem cell factor receptor/ c-kit is required for ligand-induced ubiquitination, internalization and degradation. *Biochem J.* 2006: 399(1): 59-67
82. McNiece IK, Briddell RA: Stem cell factor.: *J Leukoc Biol.*1995: 58(1): 14-22
83. Metcalfe DD: Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008: 112 (4): 946-56.
84. Miettinen M, Lasota J.: KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathological correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2005: 13 (3):205-20
85. Miyazawa K, Toyama K, Gotoh A, et al.: Ligand-dependent Polyubiquitination of c-kit gene-product: a possible mechanism of receptor-downmodulation in M07e cells. *Blood* 1994: 83(1): 137-45
86. Montrone M, Martorelli D, Rosato A, et al.: Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009: 9 (2): 113-31.
87. Mousli M, Hugli TE, Landry Y, et al.: A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cells. *J Immunol* 1992: 148(8): 2456-61.  
Nagata H, Worobec AS: Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogen c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995: (95): 10,560-10,564.
88. Nienartowicz A, Sobaniec-Lotowska ME, Jarocka-Cyrta E, et al.: Mast cells in neoangiogenesis. *Med Sci Monit* 2006: 12(6):LE 9-11
89. Nilsson G, Blom T, Kusche-Gullberg M, et al.: Phenotypic characterization of the human mast-cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 1994: 39: 489-98.
90. Ormerod MG: Flow cytometry: A practical approach. IRL Press Oxford England and New York 1990.
91. Orlowski RZ, Eswara JR, Lafond-Walker A, et al.: Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res.* 1998: 58 (19): 4342-8.
92. Park GH, Plummer HK 3<sup>rd</sup>, Krystal GW: Selective Sp1 binding is critical for maximal activity of the human c-kit promoter. *Blood* 1998: 92: 4138-49.
93. Piao X, Paulson R, van der Geer P, et al.: Oncogenic mutation in the Kit receptor Tyrosin kinase alters substrate specificity and induces degradation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996: (93). 14665-14669.
94. Pirllet K: Nature's healing power-natural selection in protein turnover. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2003: 10 (5): 262-8.
95. Plaut M, Pierce JH, Watson CJ, et al.: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 1989: 339 (6219): 64-7.
96. Ra C, Jouvin MH, Kinet JP: Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J Biol Chem* 1989: 264 (26): 15323-7.
97. Rawlings DJ, Scharenberg AM, Park H, et al.: Activation of BTKby a phosphorylation mechanism initiated by Src family kinases. *Science* 1996: 271(5250): 822-5.
98. Reber L, Da Silva CA, Frossard N: Stem cell factor and its receptor c-kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006: 533(1-3): 327-40
99. Roth K, Wei-Min C, et al.: Positive and negative regulatory mechanisms in high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation. *Arch Immunol Ther Exp* 2008: 56 (6): 385-96.
100. Ryan JJ, Huang H, McReynolds LJ, et al.: Stem cell factor activates STAT-5 DNA binding in IL-3-derived bone marrow mast cells. *Experimental Hematology* 1997: (25): 357-62.
101. Safe S, Maen A: Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 2005: 41 (16): 2438-48.
102. Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB: Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol.* 1991: 11 (4): 2189-99.
103. Salmon JM, Slater NJ, Hall MA, et al.: Aberrant mast cell differentiation in mice lacking the stem-cell leukemia gene. *Blood* 2007: 110 (10): 3573-81.
104. Sawai N, Koike K, Mwamtemi HH, et al.: Thrombopoietin augments stem cell factor-dependent growth of human mast cells from bone marrow multipotential hematopoietic progenitors. *Blood.* 1999: 93(11): 3703-12

105. Scheinfeld N: A comprehensive review of imatinib mesylate (Gleevec) for dermatological diseases. *J Drugs Dermatol.* 2006; 5: 117-22.
106. Schenker C, Mroz EA, Leeman SE: Release of substance P from isolated nerve endings. *Nature* 1976; 264 (5588): 790-2.
107. Shimizu Y, Ashman LK, Du Z, et al.: Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit. *J Immunol.* 1996; 156(9): 3443-9
108. Shivakrupa R, Linnekin D: Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell Signal* 2005; 17 (1): 103-9.
109. Shivdasani RA, Orkin SH: The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996; 88 (10): 4072.
110. Sillaber C, Strobl H, et al.: IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol* 1994; 147: 4223-8.
111. Souroullas GP, Salmon LM, et al.: Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either Lyl1 or Scl for survival. *Cell Stem Cell* 2009; 4 (2): 180-6.
112. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, et al.: Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* 1983; 306 (5938): 67-9.
113. Sun J, Pedersen M, Bengtsson S, et al.: Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-kit signaling by recruitment of Cbl. *Exp Cell Res* 2007; 313 (18): 3935-42.
114. Suzuki R, Furuno T, McKay DM, et al.: Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance p. *J Immunol* 1999; 163 (5): 2410-5.
115. Szabo G: Structural aspects of ionophore function. *Fed Proc* 1981; 40 (8): 2196-201.
116. Thienemann, F, Guhl S, et al.: All-trans retinoic acid is dedifferentiating to human mast cells independent of their stage of maturation. 34<sup>th</sup> ESDR Meeting Abstract Number 34, 2004.
117. Toru H, Eguchi M, Matsumoto R, et al.: Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood* 1998; 91: 187-95.
118. Tsujimura T, Kanakura Y, Kitamura Y: Mechanisms of constitutive activation of c-kit receptor tyrosin kinase. *Leukemia* 1997; (11): 496-8.
119. Tsujimura T, Morii E, Nozaki M, et al.: Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. *Blood* 1996; 88: 1225-33.
120. Upham JW, Sehmi R, Hayes LM, et al.: Retinoic acid regulates IL-5 receptor expression and selectively inhibits eosinophil-basophil differentiation of hemopoietic progenitor cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 307-13.
121. Vandembark GR, Chen Y, Friday E, et al.: Complex regulation of human c-kit transcription by promoter repressors, activators, and specific myb elements. *Cell Growth and Differentiation* 1996; 7: 1383-92.
122. Weber S, Babina M, Krüger-Krasagakes S, et al.: A subclone (5C6) of the human mast cell line HMC-1 represents a more differentiated phenotype than the original cell line. *Arch Dermatol Res* 1996; (288): 778-82.
123. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, et al.: JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogen product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* 1996; (87): 3688-93.
124. Wiedmann MW, Caca K: Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5(3): 171-93.
125. Wilgus TA: Immune cells in the healing skin wound: influential players at each stage of repair. *Pharmacol Res* 2008; 58 (2): 112-6.
126. Yee NS, Hsiau CW, Serve H, et al.: Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 1994; 269 (50): 31991-8.
127. Yee NS, Langen H, Besmer P: Mechanism of kit ligand, phorbol ester, and calcium-induced downregulation of c-kit receptors in mast cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 14189-201.
128. Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, et al.: Regulation of stem cell factor receptor signalling by cbl family proteins (cbl-b/c-cbl). *Blood* 2005; 105(1): 226-32

## **9 Erklärung an Eides Statt**

Ich, Claudia Patrizia Staltmaier, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Untersuchungen zur transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation der Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-kit an humanen Mastzellen unterschiedlicher Reifegrade" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

## **10 Danksagung**

In erster Linie gilt mein herzlichster Dank Frau Dr. Magda Babina für die kompetente und engagierte Betreuung und hervorragende Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Torsten Zuberbier danke ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas.

Für die stets hilfsbereite und nette Unterstützung im Labor und das Interesse an dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dipl.-Ing. Sven Guhl bedanken.

Für die Bereitstellung der Hautproben möchte ich mich bei den zahlreichen Patientinnen und Patienten bedanken. Ohne sie und die freundliche Unterstützung der kooperierenden Kliniken wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.