

**Generierung eines Mausmodells für Mastozytose durch kontrollierte  
Ausprägung eines mutierten, konstitutiv aktiven Kit-Rezeptors**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
**Alexander Gerbaulet**  
aus Frankfurt am Main

Köln, 2009

Berichtersteller:  
(Gutachter)

**Prof. Dr. Helmut W. Klein**  
**PD Dr. Roswitha Nischt**

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2009

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Mastzellen	5
1.1.1 Entwicklung von Mastzellen	5
1.1.2 Effektorfunktionen von Mastzellen	7
1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Kit	8
1.2.1 Struktur der Rezeptortyrosinkinase Kit	8
1.2.2 Der Kit-Ligand SCF	12
1.3 Mastozytose	12
1.3.1 WHO Klassifizierung und Diagnose der Mastozytose	13
1.3.2 Pathogenese der Mastozytose	14
1.3.3 Therapie der Mastozytose	15
1.3.4 Zellmodelle für Mastozytose	15
1.3.5 Tiermodelle für Mastozytose	16
1.4 Ziele der Arbeit	17
2 Ergebnisse	18
2.1 Generierung des <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> -BAC-Transgens	18
2.1.1 Identifikation des BAC-Klons	19
2.1.2 Einführung der Punktmutation <i>Kit</i> <sup>D814V</sup>	20
2.1.3 Punktmutation der <i>NotI</i> Site	23
2.1.4 Insertion der Stopp-Kassette	26
2.1.5 Aufreinigung des <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> -Konstrukts	29
2.1.6 Pronukleusinjektion	30
2.1.7 Genotypisierung der <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Gründertiere	30
2.1.8 Abschätzung der Kopienzahl in <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Gründerlinien	31
2.2 Phänotypische Charakterisierung von Tieren mit <i>Kit</i> <sup>D814V</sup> -Expression in unterschiedlichen Zellkompartimenten	33
2.2.1 Induzierbare Expression von <i>Kit</i> <sup>D814V</sup>	33
2.2.2 Ubiquitäre Deletion des Stopp-Elements in <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Mutanten	43
2.2.3 Mastzellspezifische Expression von <i>Kit</i> <sup>D814V</sup>	50
3 Diskussion	55
3.1 Generierung eines transgenen Mausmodells für Mastozytose	55
3.1.1 Entwurf des Mausmodells	55
3.1.2 Konstruktion des <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Transgens	56

3.1.3	Aktivierung des <i>Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Transgens durch Cre-medierte Rekombination <i>in vivo</i> .....	58
3.2	Phänotypen von Tieren mit Ausprägung von <i>Kit</i> <sup>D814V</sup> in unterschiedlichen Zellkompartimenten .....	61
3.2.1	Mastzellhyperplasie .....	61
3.2.2	Hämatologische Neoplasie in <i>Mx1-Cre/Kit</i> <sup>D814VfloX</sup> Tieren .....	63
3.2.3	Darmentzündung durch konstitutive Aktivierung von <i>Kit</i> .....	65
3.2.4	Zunahme von neutrophilen Granulozyten im Mausmodell .....	67
3.2.5	Embryonale Expression von <i>Kit</i> <sup>D814V</sup> .....	68
4	Material und Methoden .....	70
4.1	Materialien .....	70
4.1.1	Oligonukleotide .....	70
4.1.2	Enzyme .....	72
4.1.3	Plasmide .....	72
4.1.4	DNA Größenmarker .....	72
4.1.5	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) Stämme .....	73
4.1.6	BAC Klon .....	73
4.1.7	Mausstämme .....	73
4.1.8	Häufig verwendete Lösungen .....	73
4.2	Methoden .....	76
4.2.1	Molekurbioologische Methoden .....	76
4.2.2	Red/ET Recombineering .....	80
4.2.3	Biochemische Methoden .....	83
4.2.4	Durchflusszytometrie .....	84
4.2.5	Zellkultur .....	86
4.2.6	Histologie .....	87
4.2.7	Tierexperimentelle Methoden .....	88
5	Abkürzungen .....	90
6	Zusammenfassung .....	92
7	Literatur .....	94

# 1 Einleitung

## 1.1 Mastzellen

Mastzellen zählen zu den wichtigsten Effektorzellen des Immunsystems. Sie können in allen vaskularisierten Geweben auftreten, befinden sich aber hauptsächlich in den äußeren und inneren Grenzflächen des Organismus, zum Beispiel in der Haut und den Schleimhäuten der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts. Die Mastzelle wird am häufigsten als Effektorzelle der Typ-I Allergiereaktionen beschrieben. Bei diesen Reaktionen führt die Quervernetzung von Immunglobulin-E (IgE)-Rezeptoren durch antigenbindendes IgE zur Freisetzung diverser Mediatoren aus den zytoplasmatischen Mastzellgranula, unter anderem Histamin, Heparin, Lipidmediatoren und Zytokine (Metcalf et al., 1997).

Im Tierreich sind Mastzellen weit verbreitet, man findet sie in allen Klassen der Vertebraten (Chiu and Lagunoff, 1972), es sind aber auch in evolutionär sehr alten Spezies aus der Gruppe der Manteltiere (Tunicata) Heparin-freisetzende Zellen als mögliche Mastzellhomologe beschrieben worden (Cavalcante et al., 2000).

Die erste Beschreibung der Mastzelle geht auf die Dissertation von Paul Ehrlich im Jahr 1878 zurück. Die Zellgranula erschienen Ehrlich im Lichtmikroskop als „gemästet“, daher bezeichnete er sie als Mastzelle (Ehrlich, 1878).

### 1.1.1 Entwicklung von Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich aus den CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarks und differenzieren zu Mastzellvorläufern (MCP), die sich über das Blut in den Geweben verteilen (Gurish and Boyce, 2006). Rodewald et al. beschreiben das wellenförmige Auftreten von MCP in fetalem, murinem Blut 15,5 Tage *post coitum* und die anschließende Besiedlung der Zielgewebe, wo die Differenzierung zu reifen Mastzellen stattfindet (Rodewald et al., 1996). Die Trennung der MCP von anderen hämatopoetischen Vorläuferzellen wird widersprüchlich diskutiert. Zwei Arbeiten konnten exklusive MCP im adulten, murinen Knochenmark identifizieren, was für eine frühere Trennung der MCP von anderen hämatopoetischen Vorläufern spricht (Chen et al., 2005; Jamur et al., 2005), während Arinobu et al. eine Vorläuferpopulation in der murinen Milz definieren konnten, welche noch das Potential zur Ausdifferenzierung in Basophile und Mastzellen hat (Arinobu et al., 2005). Im adulten Blut von Nagern und Menschen konnten

Mastzellvorläufer bisher nicht zweifelsfrei identifiziert werden, wahrscheinlich auch auf Grund ihrer sehr niedrigen Frequenz (Hallgren and Gurish, 2007).

Essentiell für die Entwicklung von Mastzellen ist der Signalweg des Zytokins Stem cell factor (SCF) und der zugehörigen Rezeptortyrosinkinase Kit. Mastzellen sind die einzigen hämatopoetischen Zellen, die in sämtlichen Entwicklungsstadien den Kit-Rezeptor stark exprimieren. Eine Abwesenheit von SCF-Kit Interaktionen, wie in *W* (dominant white spotting locus) und *S/* (steel locus) Mausmutanten führt unter anderem zur Mastzelldefizienz dieser Stämme (Galli and Kitamura, 1987). Weitere wichtige Zytokine für die Entwicklung von Mastzellen sind vor allem Interleukin (IL)-3, IL-4, IL-9 und Nerve growth factor (NGF) als positive und Interferon (IFN)- $\gamma$ , Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  und Granulocyte/macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) als negative Regulatoren (Okayama and Kawakami, 2006). Die Rekrutierung, Differenzierung und Erscheinungsform von Mastzellen wird maßgeblich durch das im Zielgewebe vorherrschende „Mikromilieu“ mitgeprägt, durch Zelladhäsionsmoleküle wie Integrin  $\alpha 4\beta 7$ , Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) oder Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) und durch Chemokine und Chemokinrezeptoren wie CXCR2, CXCR4,  $\beta$ -Chemokinrezeptoren (CCR3 und CCR5) und deren Liganden (Gurish and Boyce, 2006).

In Nagetieren wird generell zwischen zwei reifen Mastzellsubpopulationen (Enerbäck et al., 1985) unterschieden, den Bindegewebsmastzellen („connective tissue mast cell“ (CTMC)) und mukosalen Mastzellen („mucosal mast cells“ (MMC)). CTMC finden sich hauptsächlich in den subepithelialen Strukturen der Haut, im Peritoneum und in der Submukosa der Atem- und Verdauungswege. MMC befinden sich hauptsächlich in den epithelialen Strukturen der Darm- und Atemwegsmukosa. Beide Unterklassen lassen sich auch morphologisch unterscheiden: CTMC sind stärker granuliert und speichern Heparin, Tryptasen und Chymasen - zwei Gruppen von Mastzellproteasen. MMC lassen sich durch das Vorkommen von Chondroitinsulfat und Chymasen charakterisieren (Metcalf et al., 1997). Beim Menschen wird zwischen drei Mastzelluntergruppen unterschieden: Mastzellen in der Dermis, welche nur Tryptasen speichern (MCT), Mastzellen die Tryptase und Chymase speichern (MCTC, hauptsächlich in der Mukosa), und Mastzellen, die Chymase und Cathepsin G beinhalten (MCC) (Metcalf, 2008).

### 1.1.2 Effektorfunktionen von Mastzellen

Mastzellen können durch Exozytose ein breites Spektrum an präformierten Mediatoren aus ihren Granula freisetzen: Biogene Amine (Histamin, Serotonin); Peptidoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat), Mastzellproteasen (Tryptasen, Chymasen, Carboxypeptidasen) und Zytokine (Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ , Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Fibroblast growth factor 2 (FGF2)). Zusätzlich können Arachidonsäuremetaboliten (Leukotriene, Prostaglandine), Zytokine (Interferone, Interleukine) und Chemokine von Mastzellen nach Aktivierung *de novo* synthetisiert werden (Marshall, 2004).

Als Effektorzelle der allergischen Sofortreaktion vom Typ I binden Mastzellen den Fc-Anteil von IgE mittels des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc $\epsilon$ RI). Quervernetzung des IgE durch multivalentes Antigen führt über Aggregation der Fc $\epsilon$ RI Rezeptoren, nach anschließender Weiterleitung des Signals durch intrazelluläre Signalkaskaden, letztlich zur exozytotischen Freisetzung und *De-novo*-Synthese von Mastzellmediatoren (Kawakami and Galli, 2002).

Weiterhin kann Mastzelldegranulation über Komplementrezeptoren (C3a, C5a), Fc $\gamma$  Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren (TLR) und Chemokin-Rezeptoren hervorgerufen werden. Über diese und weitere Rezeptoren, wie zum Beispiel Kit und diverse Interleukinrezeptoren, kann gleichfalls die Aktivierung von Mastzellen positiv oder negativ (Verstärkung oder Abschwächung der Mediatorfreisetzung und -produktion) oder qualitativ (Veränderung des Mediatorprofils) moduliert werden (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Funktionell konnte eine wichtige Rolle von Mastzellen und Mastzellmediatoren bei Bekämpfung und Kontrolle von Infektionen mit Bakterien und Parasiten gezeigt werden. Durch die Freisetzung von TNF $\alpha$  aus Mastzellen kann die bakterielle Infektion in einem murinen Peritonitismodell besser kontrolliert werden (Echtenacher et al., 1996; Malaviya et al., 1996). Bei einer Infektion mit Nematoden wie *Trichinella spiralis* kommt es zu einer starken Vermehrung von mukosalen Mastzellen im Darm und zur Freisetzung der murinen Mastzellprotease 1 (MMCP-1), welche für die Expulsion von *T. spiralis* von Bedeutung ist (Knight et al., 2000). Als weitere Funktion der Mastzelle wird eine Beteiligung am Abbau potentiell tödlicher Konzentrationen des endogenen Mediators Endothelin-1 (Maurer et al., 2004) oder von Bienen- und Schlangengift durch Mastzellproteasen beschrieben (Metz et al., 2006). Möglicherweise sind Mastzellen auch an der Toleranz von heterologen

Transplantaten (Lu et al., 2006) oder Tumoren (Gounaris et al., 2007) durch das Immunsystem beteiligt.

## 1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Kit

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden spontane Mausmutanten mit dominanten Allelen, die einen Fellphänotypen hervorrufen, identifiziert. Das „dominant white spotting“ (*W*) Allel (Little and Cloudman, 1937) führt heterozygot zu weißen Fellflecken und homozygot zu perinataler Lethalität durch Anämie. 1956 wurde das Steel Allel (*S*) (Sarvella and Russell, 1956) beschrieben, welches ebenfalls heterozygot einen Fellphänotypen und homozygot Anämie verursacht. 1986 wurde durch Besmer et al. ein virales Onkogen mit Tyrosinkinaseaktivität, *v-Kit*, entdeckt (Besmer et al., 1986). In der Folge konnte gezeigt werden, dass der *W* Locus für das zelluläre Protoonkogen *c-Kit* (Geissler et al., 1988) und der *Steel* Locus für den Kit-Liganden SCF codiert (Witte, 1990).

### 1.2.1 Struktur der Rezeptortyrosinkinase Kit

Kit gehört zur Klasse 3 der Rezeptortyrosinkinasen, weitere Mitglieder dieser Klasse sind Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)  $\alpha$  und  $\beta$ , Colony-stimulating factor receptor 1 (CSF1R) und Fms-like tyrosine kinase receptor 3 (FLT3). Strukturelle Merkmale dieser Klasse von Rezeptortyrosinkinasen sind fünf extrazelluläre Immunglobulin-artige Domänen, eine Transmembranhelix, und eine intrazelluläre Kinasedomäne, die durch eine eingeschobene Domäne geteilt wird (Fantl et al., 1993). Die Bindung seines ebenfalls dimeren Liganden SCF führt zur Dimerisierung von Kitmonomeren und zur gegenseitigen Autophosphorylierung von Tyrosinresten.

Abb. 1-1 zeigt eine Übersicht der Struktur des Kit-Rezeptors. Die extrazellulären Ig-artigen Domänen sind an der Bindung des Liganden SCF und der Dimerisierung von Kit-Monomeren beteiligt (Roskoski, 2005b). Die Juxtamembrandomäne (JMD) ist für Autoinhibition der Tyrosinkinaseaktivität entscheidend, sie blockiert in der inaktiven Konformation die Kinasedomäne.



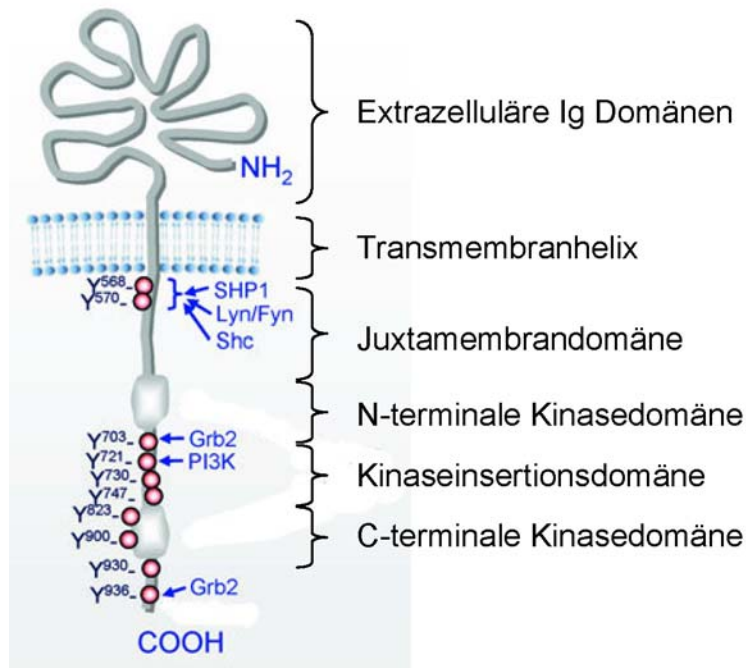


Abb. 1-1 Struktur des Kit-Rezeptors

Übersicht über den strukturellen Aufbau der Rezeptortyrosinkinase. Links sind Tyrosinreste (Y) aufgeführt, die phosphoryliert werden. Die Nummerierung der Aminosäurereste entspricht dem humanen Kit-Protein. Die Bindungsstelle für wichtige Signal- und Adaptermoleküle sind rechts eingezeichnet. (Modifiziert nach (Gilfillan and Rivera, 2009))

Die initiale Phosphorylierung der Tyrosinreste 568 und 570 (Nummerierung des humanen Rezeptors) bewirkt eine Konformationsänderung der JMD und Freigabe der Tyrosinkinaseaktivität. Die Kinaseinsertionsdomäne (KID) spaltet die Kinasedomäne des Rezeptors in einen N-terminalen und C-terminalen Kinaseteil auf. Die KID birgt mehrere Tyrosinreste, die als Bindestelle für Signaltransduktionsmoleküle fungieren. Die proximalen und distalen Kinaseteile bilden eine gemeinsame Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Eine konservierte Struktur des C-terminalen Kinaseteils ist die Aktivierungsschleife, welche im inaktiven, gefalteten Zustand als intramolekulares Pseudosubstrat fungiert, im aktiven Zustand gibt sie die Kinasedomäne durch Entfaltung frei (Mol et al., 2004; Mol et al., 2003).

Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Kit Isoformen. Eine Isoform enthält extrazellulär in der Nähe der Transmembranhelix zusätzlich die Aminosäuresequenz GNNK (GNNK+ Isoform). Beide Isoformen kommen gemeinsam vor, wobei die Isoform ohne GNNK-Sequenz (GNNK-) dominiert (Rönstrand, 2004). Weiterhin wird in postmeiotischen Keimzellen ein verkürztes Kit-Transkript (tr-Kit) von einem internen Promotor im Intron 16 exprimiert. Tr-Kit beinhaltet nur den distalen Kinaseteil und den C-Terminus, es besitzt keine eigene Kinaseaktivität, kann aber noch Signalmoleküle binden und aktivieren (Sette et al., 2000).

### 1.2.1.1 Kit-Signaltransduktion

Kit kann mit einer Vielzahl von Signalwegen durch Bindung von Signal- und Adaptermolekülen an phosphorylierten Tyrosinresten interagieren. Über die

Phosphorylierung der juxtamembranären Tyrosinreste 568 und 570 wird die Bindung verschiedener Signalmoleküle mit Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne reguliert. Beispiele hierfür sind die Kinasen Lyn, Fyn, Blk aus der Src Familie, die Phosphatase Shp1 oder Adapterproteine wie APS und Shc. In der KID befinden sich weitere Tyrosinreste, welche das Adapterprotein Grb2 und Phospholipase C $\gamma$  oder die regulatorische Untereinheit (p85) der Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) binden können. In der Nähe des C-Terminus von Kit befinden sich mehrere Tyrosinreste, die ebenfalls Adapterproteine wie Crk, Grb2, APS oder PI3K binden können (Roskoski, 2005a). Wichtige, mittelbar durch Kit aktivierte Signalwege sind Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT), Proteinkinase B (AKT) und c-Jun N-terminal kinase (JNK), die hauptsächlich Wachstums- und Überlebenssignale übermitteln (Roskoski, 2005a). Eine Abschwächung der Kit-Signale, teilweise autoinhibitorisch nach vorangegangener Aktivierung, erfolgt durch Ubiquitinylierung und nachfolgender Degradation (Yee et al., 1994) oder durch Internalisierung des Rezeptors (Broudy et al., 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass die GNNK- Isoform von Kit eine leichte konstitutive Aktivierung von PLC $\gamma$  und PI3K in Abwesenheit von SCF bedingt und schneller internalisiert wird als die GNNK+ Isoform (Roskoski, 2005a).

### 1.2.1.2 Expression von Kit

Zu den Kit exprimierenden Zellen gehören hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen, Melanozyten, interstitielle Cajal Zellen (neuronale Zellen des Darmnervensystems, ICC), Keimzellen und Mastzellen (Bernex et al., 1996; Motro et al., 1991). Verlust der Kit-Expression wie in *Kit<sup>W/W</sup>*-Mutanten führt zur Abwesenheit von Melanozyten, Mastzellen und ICC.

Während der murinen Embryonalentwicklung wird Kit hauptsächlich in Melanoblasten, in primordialen Keimzellen und in HSC exprimiert. In verschiedenen Stadien der hämatopoetischen Entwicklung des murinen Embryos bzw. Fetus konnte Kit-Expression im Dottersack, in der AGM-Region (Aorta, Gonaden, Mesonephros), in der fetalen Leber und im Knochenmark (Bernex et al., 1996) nachgewiesen werden. SCF-Kit Interaktion ist für die Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen nicht zwingend notwendig, Kit Signale scheinen viel mehr bei der Expansion von HSC und Vorläuferzellen synergistisch mit weiteren Wachstumsfaktoren zu wirken (Broudy, 1997; Wu et al., 1997). Alleinige SCF-Kit

Aktivierung verlängert das Überleben von HSC und Vorläufern, induziert selbst aber keine Proliferation (Keller et al., 1995).

### 1.2.1.3 *Kit*-Mutationen und Krankheiten

Die bereits erwähnten *W* Allele der Maus stellen funktionslose oder attenuierte *Kit*-Allele dar. Je nach Allel und Genotyp führt Verlust oder Abschwächung der *Kit*-Expression zu Pigmentierungsdefekten, Sterilität, Anämie und/oder Mastzelldefizienz. Heterozygote *Kit*<sup>W/+</sup> Tiere zeigen weiße Fellflecken, homozygote *Kit*<sup>W/W</sup> versterben in Folge völliger Funktionslosigkeit von *Kit* perinatal an einer Anämie (Waskow et al., 2002). *Kit*<sup>W/W-v</sup> oder *Kit*<sup>W-sh/W-sh</sup>-Mutanten sind lebensfähige, mastzelldefiziente Tiere (Grimbaldeston et al., 2005).

Ein entsprechende autosomal-dominante humane Erbkrankheit ist der Piebaldismus. Durch heterozygote *Kit* „loss of function“ Mutationen kommt es zu Pigmentierungsstörungen der Haut und Haare. Die inaktivierenden Mutationen finden sich meist in der JMD oder Aktivierungsschleife von *Kit* (Giebel and Spritz, 1991).

Wesentlich häufiger finden sich aktivierende *Kit*-Mutationen in humanen neoplastischen Erkrankungen wie zum Beispiel gastrointestinale-stromale Tumore (GIST), Mastozytose (siehe 1.3) und Seminome. Die meisten aktivierenden *Kit*-Mutationen befinden sich entweder in der JMD oder in der Aktivierungsschleife der distalen Tyrosinkinasedomäne (Roskoski, 2005b).

GIST entstehen aus interstitiellen Cajal-Zellen (ICC), den neuronalen Schrittmacherzellen des Darmnervengewebes und können vor allem Magen, Darm und Ösophagus befallen. In ca. 85 % der GIST-Fälle finden sich aktivierende *Kit*-Mutationen, meist in Codon 550 bis 586 der JMD, nur in wenigen Fällen ist eine Mutation der Aktivierungsschleife nachweisbar. Die meisten Fälle weisen somatische *Kit*-Mutationen auf. Es sind aber auch seltene, familiäre GIST-Erkrankungen bekannt, die sich auf Keimbahnmutationen zurückführen lassen (Corless et al., 2004; Hirota et al., 1998). Die meisten GIST-Erkrankungen können durch Gabe des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib behandelt werden. Hauptsächlich profitieren Patienten mit juxtamembranärer *Kit*-Mutation von einer Behandlung mit Imatinib, allerdings kann häufig eine sekundäre Resistenzbildung beobachtet werden (Heinrich et al., 2006). *Kit*-Mutationen in der Aktivierungsschleife sind auf Grund der Struktur des *Kit*-Imatinib-Komplexes primär resistent gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor (Mol et al., 2004).

Das Seminom, eine bösartige Keimzellneoplasie, zeigt in einem Viertel der Fälle Kit-Mutationen, hauptsächlich in der Aktivierungsschleife des distalen Tyrosinkinaseanteils (Kemmer et al., 2004).

Weiterhin konnten Kit-Expression und teilweise auch aktivierende Mutationen in einer Vielzahl von humanen Neoplasien beobachtet werden, allerdings meist mit unklarer prognostischer und pathogenetischer Relevanz (Miettinen and Lasota, 2005).

### **1.2.2 Der Kit-Ligand SCF**

Stem cell factor (SCF) bindet und aktiviert Kit als nicht-kovalentes Dimer. SCF kann durch alternatives Spleißen ebenfalls zwei Isoformen bilden, eine membrangebundene Form und eine Isoform, die durch Matrixmetalloprotease 9 gespalten werden kann und so eine lösliche Form von SCF bildet (Heissig et al., 2002). SCF wird hauptsächlich von Fibroblasten, Stroma- und Endothelzellen exprimiert.

## **1.3 Mastozytose**

Mastozytose ist eine seltene humane Erkrankung, die durch eine pathologische Mastzellvermehrung in verschiedenen Geweben gekennzeichnet ist. Bei kutaner Mastozytose ist die Mastzellinfiltration auf die Haut begrenzt. Je nach äußerem klinischen Erscheinungsbild unterscheidet man mehrere Untervarianten der kutanen Mastozytose. Bei systemischer Mastozytose infiltrieren Mastzellen zusätzlich innere Organe, vor allem das Knochenmark (Valent et al., 2001). In Folge erhöhter Mastzellmediatorfreisetzung kann es bei Mastozytose zu Symptomen wie Juckreiz, Übelkeit, Diarrhöe und Schwindel kommen. Bei systemischer Mastozytose können durch progressive Mastzellinfiltration auch schwere Symptome wie Osteoporose, Kachexie und Organversagen auftreten (Metcalfe, 2008). Ebenfalls sehr heterogen ist der Verlauf der Erkrankung. Bei Kleinkindern tritt häufig eine kutane Variante auf, welche meistens während der Adoleszenz remittiert (Hartmann and Metcalfe, 2000). Bei einem Großteil der Erkrankungen im Erwachsenenalter tritt die systemische Variante mit einem stabilen Verlauf auf, welche, trotz teilweise erheblichem Leidensdruck nicht zu einer Verkürzung der Lebenserwartung führt. Die seltenen aggressiven Varianten der Krankheit führen unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod.

Die Prävalenz der Mastozytose wird mit 5-10 neudiagnostizierten Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr angegeben (Hartmann and Henz, 2001). Die ersten

Beschreibungen der Erkrankung gehen auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurück (Metcalfe, 2008).

### 1.3.1 WHO Klassifizierung und Diagnose der Mastozytose

Die Weltgesundheitsorganisation klassifiziert Mastozytose in verschiedenen Varianten (Horny et al., 2007; Valent et al., 2001), Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht.

Variante	Beschreibung / Prognose
Kutane Mastozytose (CM)	Mastzellinfiltration auf Haut begrenzt, stabil
Indolente systemische Mastozytose (ISM), Untervariante „smoldering mastocytosis“ mit Progression der Erkrankung	Mastzellvermehrung in Haut und üblicherweise Knochenmark, stabil
Systemische Mastozytose mit assoziierter hämatologischer nicht mastozytärer Erkrankung (SM-AHNMD)	Hämatologische Begleiterkrankungen, häufig myelodysplastisches oder myeloproliferatives Syndrom, Prognose ergibt sich aus der Begleiterkrankung
Agressive systemische Mastozytose (ASM)	schnelle Progression der Erkrankung, Störung von Organfunktionen, ungünstige Prognose
Mastzelleukämie (MCL)	Unreife Mastzellen im Blut oder Organen, ungünstige Prognose

Tabelle 1-1 Klassifikation der Mastozytose nach WHO Kriterien

Auf Grund der variablen Erscheinungsform der Krankheit wurde das multifokale Auftreten von Mastzellinfiltraten als ein diagnostisches Hauptkriterium für die Diagnose der systemischen Mastozytose aufgestellt. Weiterhin gibt es vier diagnostische Nebenkriterien: 1. Abnormale spindelförmige Mastzellmorphologie, 2. Nachweis einer aktivierenden *Kit*-Mutation, 3. Mastzellen exprimieren die atypischen Mastzellmarker CD2 und/oder CD25 und 4. Erhöhung der Mastzellprotease Tryptase  $\beta$  im Serum ( $>20$  ng/ml). Bei Erfüllung des Hauptkriteriums und eines Nebenkriteriums oder bei der Erfüllung von drei Nebenkriterien wird eine systemische Mastozytose diagnostiziert.

### 1.3.2 Pathogenese der Mastozytose

Nachdem Anfang der 90er Jahre SCF als wichtiger Wachstumsfaktor für Mastzellen und Kit als dessen Rezeptor identifiziert worden war, konnte gezeigt werden, dass Mastozytosepatienten häufig die Punktmutation *Kit*<sup>D816V</sup> aufweisen (Nagata et al., 1995). Die Mutation führt zum Austausch der Aminosäure Asparaginsäure gegen Valin in der Aktivierungsschleife der C-terminalen Tyrosinkinasedomäne. Die konstitutive Aktivität des *Kit*<sup>D816V</sup>-Rezeptors konnte in Zelllinien gezeigt werden (Furitsu et al., 1993; Tsujimura et al., 1994). Mehr als 90 % der erwachsenen Patienten mit systemischer Mastozytose weisen eine somatische *Kit*<sup>D816V</sup>-Mutation in Mastzellen auf (Garcia-Montero et al., 2006). Bei kindlichen Mastozytosen konnte ursprünglich die *Kit*<sup>D816V</sup> Mutation nur bei schweren, persistierenden Fällen nachgewiesen werden (Büttner et al., 1998; Longley et al., 1999). Durch Einführung einer neuen, sensitiven PCR Methode, bei der die Amplifikation des wt *Kit* Allels unterdrückt wird, konnten *Kit*<sup>D816V</sup> und weitere Mutationen der Aktivierungsschleife jedoch in circa 50 % der kindlichen, remittierenden Fälle nachgewiesen werden (Sotlar et al., 2003). Es treten auch weitere Kit-Mutationen in der Aktivierungsschleife in sehr niedriger Frequenz auf (Longley et al., 1999). Keimbahnmutationen und Vererbung der *Kit*<sup>D816V</sup> Mutation sind nicht beschrieben worden (Metcalf, 2008), im Gegensatz zu seltenen Mutationen in der Extrazellular- oder Juxtamembrandomäne, die zu erblichen Formen von Mastozytose und GIST führen (Beghini et al., 2001; Hartmann et al., 2005; Tang et al., 2004).

In mehreren Studien (Garcia-Montero et al., 2006; Kocabas et al., 2005; Yavuz et al., 2002) konnte gezeigt werden, dass in einem Teil der Patienten die Mutation nur in Mastzellen auftritt, während in anderen Patienten weitere hämatopoetische Linien ebenfalls die Mutation aufweisen. Die Patienten in denen die Mutation in einem frühen hämatopoetischem Vorläufer mutiert war, zeigten häufig einen aggressiven Verlauf und eine hämatologische Begleiterkrankung (Garcia-Montero et al., 2006).

Bei wenigen Patienten ist keine Kit-Mutation nachweisbar, hier findet sich häufig eine chromosomale Aberration, welche ein FIP1-like 1/PDGFR $\alpha$ -Fusionsprotein mit deregulierter PDGFR $\alpha$  Aktivität hervorruft. Diese Patienten entwickeln eine chronische eosinophile Leukämie, welche mit Mastzellvermehrung einher gehen kann und daher häufig fälschlicherweise als Mastozytose diagnostiziert wird (Metcalf, 2008).

### 1.3.3 Therapie der Mastozytose

Bis heute steht kein kurativer Therapieansatz für die Behandlung der Mastozytose zur Verfügung. Die Therapie basiert auf Abmilderung der durch Mastzellmediatoren hervorgerufenen Symptome. Es werden häufig H1-Antihistaminika und Glucocorticoide gegen Juckreiz, Urticae und anaphylaktoide Reaktionen angewendet. H2-Antihistaminika und Protonenpumpeninhibitoren werden zur Linderung gastrointestinaler Symptome eingesetzt. Eine Osteoporose kann durch Gabe von Calcium, Vitamin D oder Bisphosphonaten behandelt werden.

Bei fortschreitenden Erkrankungen kommen zytoreduktive Therapieansätze zum Einsatz, wie der Antimetabolit Cladribin oder Interferon  $\alpha$  (Metcalf, 2008). Die starken Nebenwirkungen begrenzen diese Therapieansätze jedoch auf aggressive, lebensbedrohliche Verläufe.

Mastozytosepatienten, bei denen eine aktivierende Kit Mutation in der Aktivierungsschleife ausgeschlossen werden kann, profitieren teilweise von der Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Akin et al., 2004; Pardanani et al., 2003). Eine Reihe von Tyrosinkinaseinhibitoren mit antiproliferativer Wirkung auf *Kit*<sup>D816V</sup>-transformierte Mastzellen befindet sich in der Entwicklung (Gleixner et al., 2006; Pan et al., 2007; Schittenhelm et al., 2006). Ein Patient mit *Kit*<sup>D816V</sup>-positiver MCL mit hämatologischer Begleiterkrankung zeigte ein partielles Ansprechen auf den Tyrosinkinaseinhibitor Midostaurin (PKC412), verstarb dann aber an *Kit*<sup>D816V</sup>-negativer akuter myeloischer Leukämie (Gotlib et al., 2005).

### 1.3.4 Zellmodelle für Mastozytose

An der humanen Mastzelllinie HMC-1 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass eine aktivierende *Kit*-Mutation zu Mastzellproliferation führt (Furitsu et al., 1993). Die Zelllinie stammt von einem Patienten mit Mastzelleukämie (Butterfield et al., 1988). Es sind zwei Subklone bekannt: Bei HMC-1.1 läßt sich nur die juxtamembranäre Mutation *Kit*<sup>V560G</sup> nachweisen, bei HMC1.2 zusätzlich die *Kit*<sup>D816V</sup> Mutation.

An der murinen Mastzelllinie P-815 konnte gezeigt werden, dass eine *Kit*<sup>D814Y</sup> Mutation (das murine Codon 814 ist homolog zum humanen Codon 816) zur konstitutiven Phosphorylierung von Kit führt (Tsujimura et al., 1994). Durch Expression in verschiedenen Kit-negativen Zelllinien konnte die konstitutive Phosphorylierung durch Kit-Mutationen in der Aktivierungsschleife gezeigt werden

(Kitayama et al., 1995). Auch primäre Knochenmarkszellen lassen sich durch retrovirale Infektion mit *Kit*<sup>D814V</sup> transformieren (Kitayama et al., 1996).

Die Substitution von Aspartat im Codon 814 des murinen Kit-Rezeptors durch andere Aminosäuren führt in den meisten Fällen zu konstitutiver Aktivierung und verstärkter Degradation von Kit, Deletion von Asp 814 hingegen führt zum Verlust der Tyrosinkinaseaktivität, auch in Gegenwart von SCF (Moriyama et al., 1996).

### 1.3.5 Tiermodelle für Mastozytose

Kitayama et al. transplantierten Knochenmark, das retroviral mit *Kit*<sup>D814V</sup> und *Kit*<sup>V559G</sup> transduziert wurde, in syngene Mäuse. Die Tiere entwickelten B-Zellneoplasien. Weiterhin generierten sie einen transgenen Mausstamm mit *Kit*<sup>D814V</sup>-cDNA unter der Kontrolle des H2-L<sup>d</sup>-Promotors (MHC Promotor). Die Tiere entwickelten ebenfalls Leukämien und Lymphome, über eine Mastzellvermehrung machen die Autoren keine Angabe (Kitayama et al., 1996).

Dehmeri et al. injizierten die murine Mastzelllinie P-815 in syngene Tiere und erhielten einen Phänotypen der an MCL erinnert (Demehri et al., 2006).

Die konditionale Expression einer aktivierten *NRas* Mutante in hämatopoetischen Zellen verursacht Mastzellinfiltration innerer Organe und des Bluts. Das System wurde als ein Tiermodell für ASM vorgeschlagen (Wiesner et al., 2005).

Zappulla et al. generierten einen transgenen Mausstamm, welcher eine humane *Kit*<sup>D816V</sup>-cDNA unter Kontrolle eines mastzellspezifischen Promotorfragment des Pavian-Chymase-Gens trägt (Zappulla et al., 2005). Es wurde ein recht milder Phänotyp beobachtet, nur ein Viertel der älteren Tiere (> 1 Jahr) entwickelte eine leichte Mastzellvermehrung in verschiedenen Organen.



## 1.4 Ziele der Arbeit

Bei der Mehrheit der Mastozytosepatienten wird eine somatische, aktivierende Mutation der Rezeptortyrosinkinase Kit ( $Kit^{D816V}$ ) festgestellt. Allerdings ist der Nachweis der Mutation nur ein diagnostisches Nebenkriterium und hat keinerlei prognostische Relevanz. Auch in kindlichen Mastozytosen, die meist im Jugendalter eine Remission zeigen, kann die Mutation nachgewiesen werden. Der Verlauf der Erkrankung wird wahrscheinlich durch das Differenzierungsstadium der Zelle, in welcher das Mutationsereignis stattfindet, beeinflusst. Unklar ist bisher auch inwiefern weitere Mutationsereignisse oder genetische Variationen der Patienten die Vielfalt der klinischen Erscheinungsbilder bedingen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Mausmodell für Mastozytose. Prinzipiell gründet das Modell auf einem transgenen  $Kit^{D814V}$ -Allel, dessen Expression zeitlich und räumlich kontrolliert werden kann. Die Verwendung eines BAC-Transgens soll die natürliche Regulation und Expression des konstitutiv aktiven Kit-Rezeptors gewährleisten. Auf Grund der konditionalen,  $Cre/loxP$ -gesteuerten Aktivierung des Transgens können verschiedene Szenarien einer somatischen Kit-Mutation, wie ein Mutationsereignis in Vorläuferzellen oder in reifen Mastzellen, verglichen werden. Durch embryonale Aktivierung des  $Kit^{D814V/flox}$ -Transgens kann der Effekt einer  $Kit^{D814V}$ -Keimbahnmutation nachgestellt und analysiert werden. Die pathogenetische Relevanz der  $Kit^{D814V}$  Mutation kann daher im Mausmodell mit definiertem genetischen Hintergrund *in vivo* untersucht werden. Weiterhin können neue therapeutische Strategien mit Hilfe des Tiermodells entwickelt und überprüft werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Generierung des *Kit*<sup>D814Vflox</sup>-BAC-Transgens

Ziel der Arbeit ist die Erzeugung eines Tiermodells für Mastozytose durch zelltypspezifisch und zeitlich kontrollierbare Ausprägung eines mutierten, konstitutiv aktiven Kit-Rezeptors. Dazu wurde in einem Bacterial artificial chromosome (BAC), welcher das gesamte murine *Kit*-Gen (Abb. 2-1) enthält, im Exon 17, Codon 814, eine Punktmutation eingeführt, die den Aminosäureaustausch Asparaginsäure gegen Valin bedingt. Diese Mutation, welche zu einer konstitutiven Autophosphorylierung von Tyrosinresten im Kit-Protein führt, ist das murine Homolog der aktivierenden Mutation *Kit*<sup>D816V</sup>, welche häufig bei Mastozytosepatienten nachweisbar ist. Um eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Expression von *Kit*<sup>D814V</sup> zu ermöglichen, wurde im ersten Intron eine *loxP*-flankierte Stopp-Kassette eingeführt, welche durch die Rekombinase Cre ausgeschnitten werden kann. Sämtliche Modifikationen des BAC wurden mittels Red/ET Recombineering (siehe 4.2.2) durchgeführt (Zhang et al., 1998). Nach Aufreinigung wurde das *Kit*<sup>D814Vflox</sup>-Konstrukt durch Pronukleusinjektion in das murine Genom eingebracht.

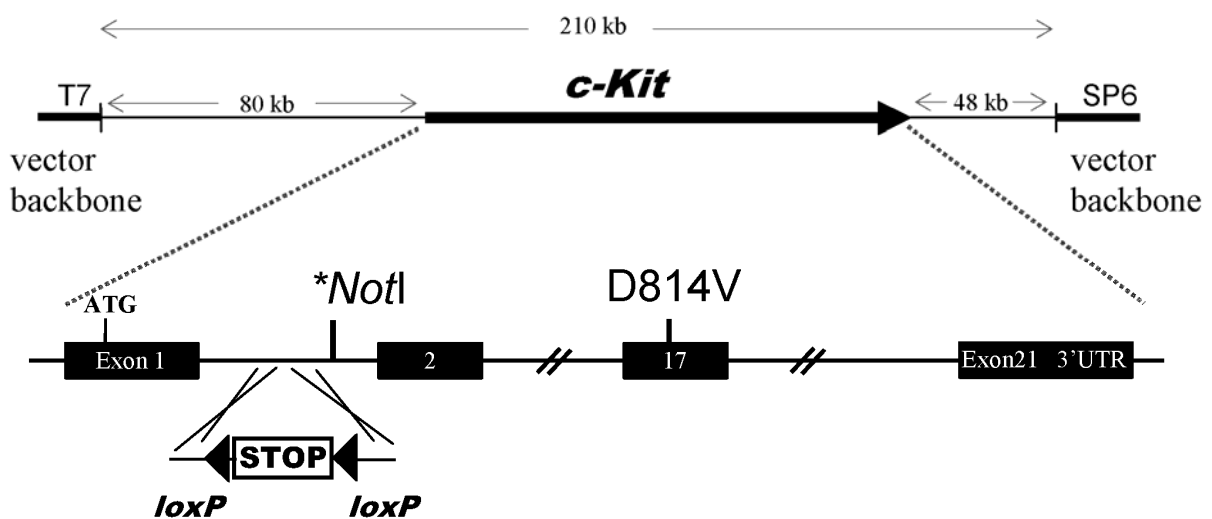


Abb. 2-1 Übersicht *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Konstrukt

Übersicht über den BAC Vektor RP23-274L11 und durchgeführte Modifikation der DNA Sequenz: 1. Punktmutation von Exon 17, Codon D814V, 2. Inaktivierung der *NotI* Schnittstelle durch Punktmutation, 3. Insertion einer *loxP*-flankierten Stopp-Kassette zur Kontrolle des Transgens. (T7, SP6, T7 bzw. SP6 Promotor des Vektors pBACe3.6, kb, Kilobasen)

### 2.1.1 Identifikation des BAC-Klons

Mit Hilfe der Webseite Clone Finder (Abb. 2-2) des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/clonefinder/CloneFinder.html>) wurden verschiedene BAC-Klone identifiziert, welche die genomische *Kit*-Sequenz enthalten.

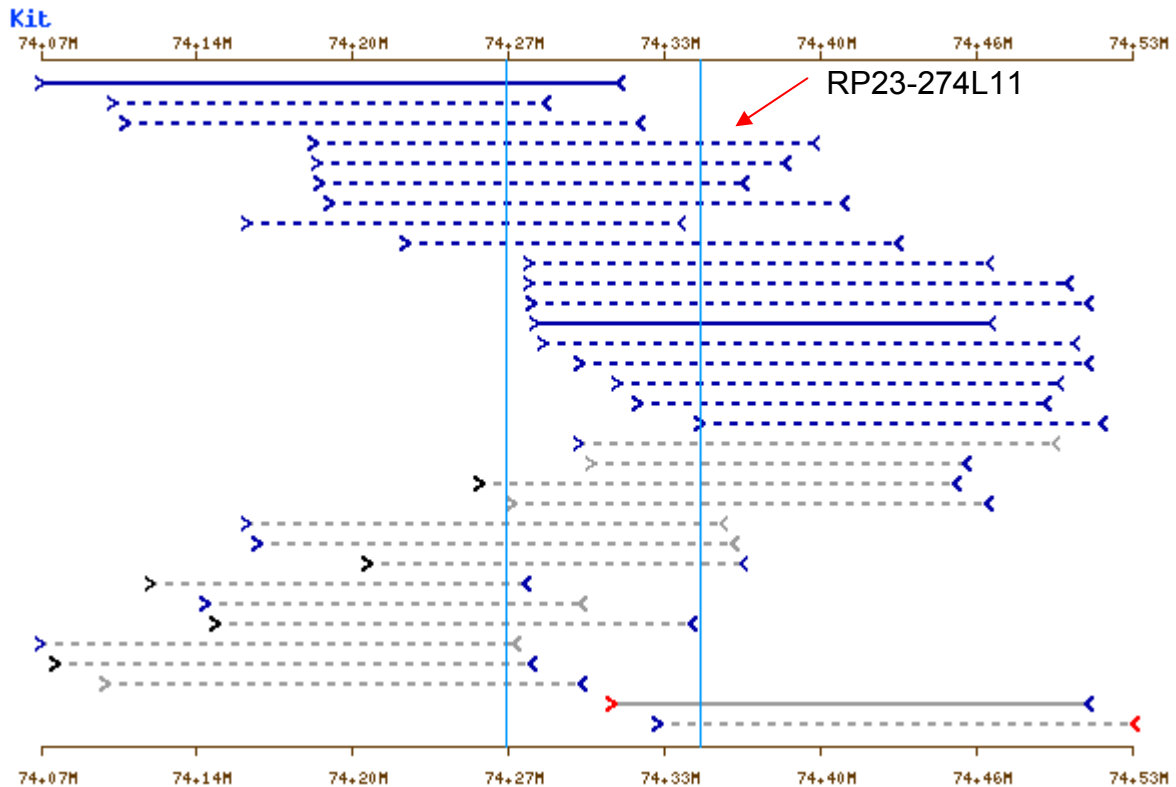


Abb. 2-2 Identifikation eines *Kit* BAC Klons mit Hilfe des NCBI Clone Finder

Mit Hilfe der Website NCBI Clone Finder lassen sich für den *Kit* Locus verfügbare BAC-Klone identifizieren. Die hellblauen vertikalen Linien zeigen die Grenzen des *Kit* Gens. Verfügbare BAC Klone sind als gestrichelte, horizontale Linien eingezeichnet. Der ausgewählte BAC Klon RP23-274L11 ist durch einen roten Pfeil markiert.

Der BAC Klon RP23-274L11 (siehe Abb. 2-1 beziehungsweise Abb. 2-2) aus der BAC-Library RPCI-23 (Osoegawa et al., 2000) beinhaltet die gesamte genomische *Kit*-Sequenz zuzüglich 79,6 kb 5' und 48,2 kb 3' flankierender Sequenz. Der Klon wurde beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) erworben. Die Identität des erhaltenen BAC-Klons wurde durch Kolonie-PCR (Abb. 2-3) von drei Bereichen überprüft (*Kit* Exon 17, (Primerpaar P1, P2), Übergang T7 Promotor zum 5' Insert, (P3, P4) und Übergang SP6 Promotor zum 3' Insert, (P5,P6)). Eine Übersicht über sämtliche verwendeten Primerpaare findet sich in Tabelle 4-1.

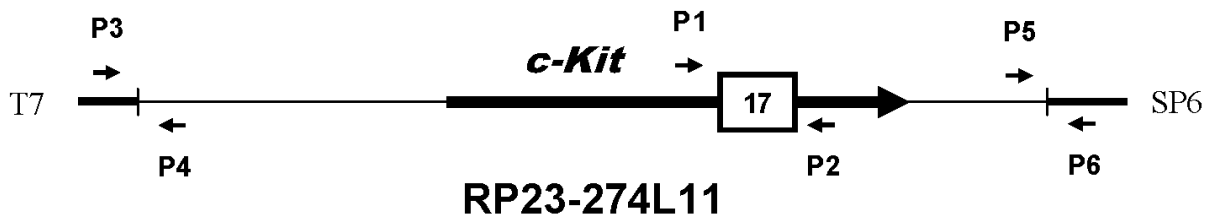


Abb. 2-3 Übersicht der Kolonie-PCR zur Überprüfung des BAC RP23-274L11

Kolonie-PCR zur Überprüfung des BAC Klon RP23-274L11. Es wurden Sequenzen am T7 und SP6 Ende und Exon 17 des Kit-Inserts mit den eingezeichneten Primerpaaren amplifiziert. (T7, SP6, T7 bzw SP6 Promotor des BAC-Vektor pBACe3.6)

### 2.1.2 Einführung der Punktmutation *Kit*<sup>D814V</sup>

Unter Verwendung der Red/ET Counterselection Methode (Gene Bridges, Dresden; (Muyrers et al., 2000)) wurde die Punktmutation *Kit*<sup>D814V</sup> eingeführt. Hierzu wurde das PCR-Produkt P1, P2 aufgereinigt und sequenziert. Dieser Schritt diente dem Abgleich der Sequenz aus der NCBI-Datenbank im Bereich Exon 17 mit der im BAC RP23-274L11 vorliegenden Sequenz. Ein möglicher Fehler in der Datenbank-Sequenz würde zu nicht völlig identischen Homologieregionen führen, was die erwünschte homologe Rekombination erschweren könnte. Ein Sequenzvergleich zwischen PCR-Produkt und NCBI-Datenbank ergab jedoch eine 100 %ige Übereinstimmung. Im ersten Schritt wurde die Counterselection-Kassette *RpsL-neo* mittels homologer Rekombination in *Kit* Codon 814 inseriert (Abb. 2-4A).

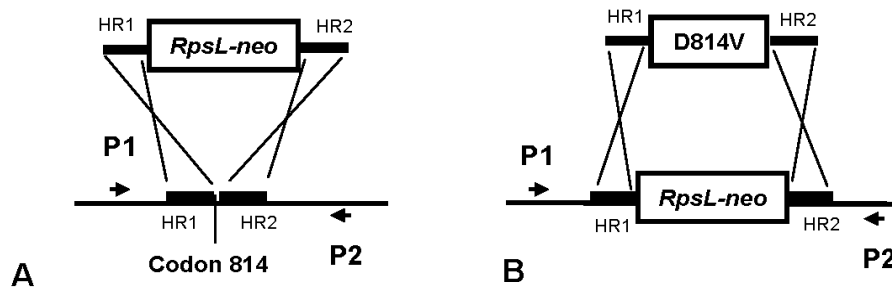


Abb. 2-4 Rekombinationsstrategie zur Einführung der Punktmutation *Kit*<sup>D814V</sup>

**(A)** Insertion der 1,3 kb langen *RpsL-neo* Counterselection-Kassette in Codon 814 durch homologe Rekombination. Erfolgreich rekombinierte Klone wurden auf Neomycin-Resistenz selektiert. **(B)** Austausch der Counterselection-Kassette gegen ein lineares DNA Fragment mit D814V Mutation führt zum Verlust der Neomycin-Resistenz und Wiederherstellung der Streptomycin-Resistenz (P1, P2, PCR Primer zur Überprüfung der Rekombinationsschritte; HR, 50 bp Homologieregion)

Die Counterselection-Kassette verleiht *E.coli* Neomycin-Resistenz (*neo*) und Streptomycin-Sensitivität (*RpsL*). Der BAC-tragende *E.coli* Stamm DH10B ist durch eine Mutation in der ribosomalen Untereinheit *RpsL* Streptomycin-resistent, kann aber durch ein extrachromosomales wt-*RpsL* Allel wieder Streptomycin-sensitiv

werden. Die Homologieregionen von 50 bp 5' bzw. 3' von Codon 814 wurden mittels PCR an die *RpsL-neo* Kasette angefügt. Tabelle 4-2 zeigt eine Übersicht der für Red/ET Recombineering verwendeten Oligonukleotide und Templates, welche mittels PCR amplifiziert wurden, um lineare DNA-Fragmente mit entsprechenden Homologieregionen zu erhalten. Klone, welche die Counterselection-Kasette durch homologe Rekombination integriert hatten, wurden durch Kanamycin-Selektion identifiziert. Zur Bestätigung wurde eine Kolonie-PCR (Primer P1,P2) durchgeführt. Die Insertion der *RpsL-neo* Kasette verlängerte das PCR-Produkt von 335 bp auf 1655 bp (siehe Negativ-Kontrolle Abb. 2-5). Im folgenden Schritt wurde die *RpsL-neo* Kasette gegen ein 262 bp PCR-Produkt ohne Selektionsmarker ausgetauscht (Abb. 2-4B). Das PCR-Produkt ist bis auf das Codon 814 homolog zur genomischen *Kit* Sequenz. Durch Austausch der *RpsL-neo* Kasette gegen das *Kit*<sup>D814V</sup> PCR Produkt wird der *E.coli* Stamm DH10B erneut Streptomycin-resistent. Zur weiteren Untersuchung der Klone wurde eine Kolonie-PCR (Abb. 2-5) mit den Primern P1, P2 durchgeführt.

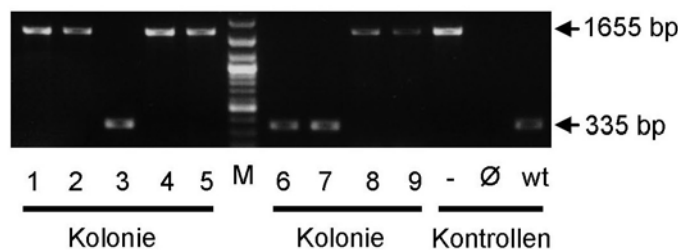


Abb. 2-5 Kolonie-PCR nach Austausch von *RpsL-neo* gegen *Kit*<sup>D814V</sup>

Kolonie-PCR P1,P2 zur Identifizierung von Klonen, welche die Counterselection-Kasette gegen das *Kit*<sup>D814V</sup> DNA Fragment ausgetauscht hatten. (M, NEB 2-log Ladder; wt, BAC RP23-274L11; Ø, ddH<sub>2</sub>O; -, Negativkontrolle *RpsL-neo* BAC vor der Rekombination)

Die Kolonien 3, 6 und 7 hatten *RpsL-neo* gegen das *Kit*<sup>D814V</sup> Fragment ausgetauscht und ergaben daher wieder ein PCR-Amplikon in der Länge des wt BAC. Zum Ausschluss einer Kontamination mit wt BAC und zur weiteren Überprüfung der Sequenz wurden mehrere Klone sequenziert (Abb. 2-6), in allen zeigte sich die erwünschte *Kit*<sup>D814V</sup> Punktmutation.

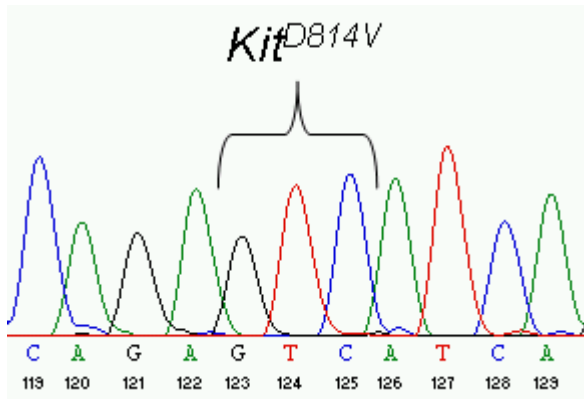


Abb. 2-6 Sequenzierung eines Klon nach erfolgreicher homologer Rekombination

DNA Sequenzierung des Produkts der Kolonie-PCR mit den Primern P1, P2. Die Klammer zeigt Codon 814 mit der gewünschten *Kit<sup>D814V</sup>* Mutation (GAC→GTC).

Zum Ausschluss unerwünschter Rekombinationsereignisse wurde ein „BAC-Fingerprinting“ durchgeführt. Eine Minipräparation des BAC-Klons wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut, welche hauptsächlich Fragmente >1 kb erzeugen. Das entstandene Muster wurde mit dem Muster des wt Klon RP23-274L11 verglichen, um unerwünschte Deletionen und Insertionen auszuschließen. Die *Kit<sup>D814V</sup>* Mutation führt nicht zu weiteren *EcoRI* und *PstI* Schnittstellen im Vergleich zu wt *Kit*.

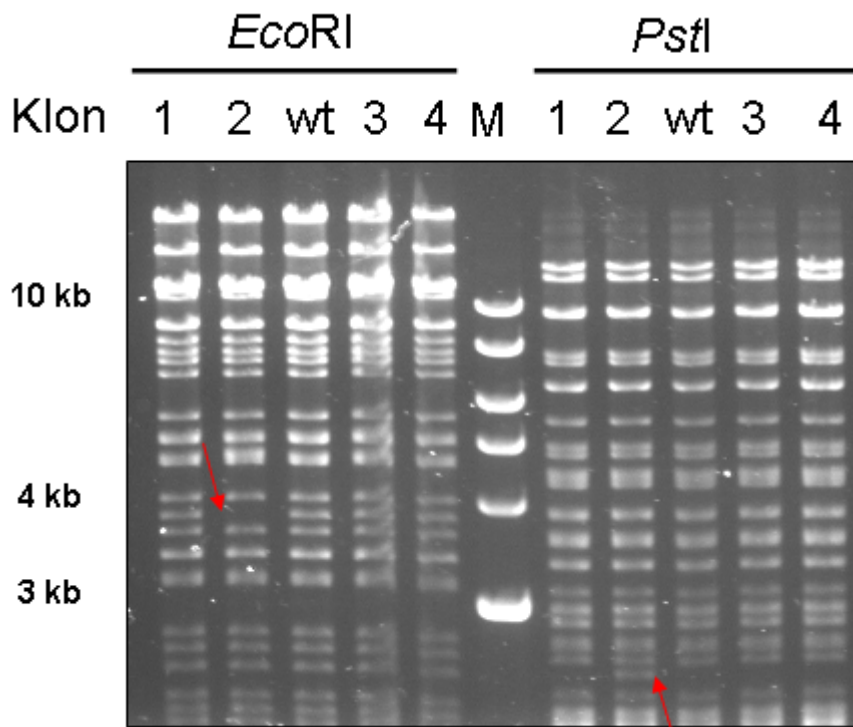


Abb. 2-7 „BAC Fingerprinting“ nach Einführung der Punktmutation *Kit<sup>D814V</sup>*

Minipräparationen der rekombinierten BAC Klone 1-4 wurden mit *EcoRI* (linker Teil) bzw. mit *PstI* (rechter Teil) verdaut und mit Wildtyp BAC RP23-274L11 (wt) verglichen. Die roten Pfeile zeigen den Verlust bzw. das Auftreten von Restriktionsfragmenten in Klon 2, welche wahrscheinlich irreguläre Rekombination entstanden sind. (kb, Kilobasen; M, NEB 2-log Ladder)

In Abb. 2-7 wurden vier sequenzierte *Kit<sup>D814V</sup>* Klone einem *EcoRI* beziehungsweise *PstI* Restriktionsverdau unterworfen und mit dem Muster des wt BAC RP-23-274L11

verglichen. Es zeigte sich, dass Klon 2 im *EcoRI* Verdau ein 4 kb Fragment fehlt (roter Pfeil) und im *PstI* Verdau eine zusätzliche Bande (roter Pfeil) bei circa 2,5 kb erscheint. Dieser Klon wurde verworfen, da offensichtlich eine unerwünschte Rekombination stattgefunden hat. Die Klone 1, 3 und 4 entsprachen dem Bandenmuster des wt-BAC.

### 2.1.3 Punktmutation der *NotI* Site

Da *Kit*<sup>D184Vlox</sup>-Insert und Vektorbackbone pBACe3.6 später durch *NotI* Verdau getrennt wurden, mussten zwei *NotI* Schnittstellen (siehe Abb. 2-8) im *Kit* Intron1-2 eliminiert werden. Die Zerstörung der ersten Schnittstellen wurde durch Insertion der Stopp-Kassette (siehe 2.1.4) erreicht. Die zweite Schnittstelle wurde gezielt punktmuiert. Die Regulation des *Kit*-Locus sollte durch die Stopp-Kassette und

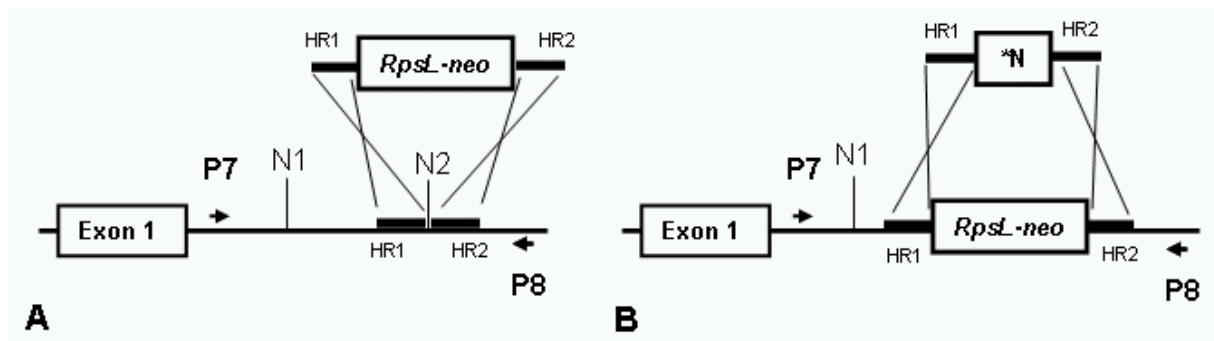


Abb. 2-8 Übersicht über die Strategie zur Punktmutation der zweiten *NotI* Schnittstelle im *Kit*-Intron1-2.

(A) Insertion der *RpsL-neo* Kassetten in die zweite *NotI* Schnittstelle durch homologe Rekombination, Identifizierung durch Neomycin-Selektion. (B) Austausch der *RpsL-neo* Kassetten gegen ein lineares DNA-Fragment mit punktmuiert, dysfunktionaler *NotI* Schnittstelle (\*N), durch Verlust der Counterselection-Kassette entsteht erneut Streptomycin-Resistenz. Überprüfung der Rekombination erfolgte durch PCR mit den Primern P7 und P8. (N, *NotI*; HR, Homologieregion)

Mutation der *NotI*-Schnittstellen möglichst nicht gestört werden Vor allem die Insertion der 3 kb langen Stopp-Kassette stellte einen erheblichen Eingriff in die Genstruktur dar. Deshalb sollte diese Veränderung an der Schnittstelle erfolgen, für die eine Sequenzanalyse die geringere Interspezieskonservierung und keine potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen feststellte. Es wurde ein Alignment von muriner und humaner *Kit*-Sequenz mit der Software Genomatix DiAlign TF (<http://www.genomatix.de>) erstellt, die gleichzeitig nach putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sucht. Es zeigte sich, dass die DNA-Sequenz im Bereich der ersten *NotI* Schnittstelle deutlich geringer konserviert ist, als in der Umgebung der zweiten *NotI* Schnittstelle. Zusätzlich ermittelte Genomatix DiAlign TF im Bereich der

zweiten *NotI* Schnittstelle putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Es wurde also die Stopp-Kassette in die erste *NotI* Schnittstelle inseriert und die zweite *NotI* Schnittstelle punktmutiert. Abb. 2-8 zeigt die Strategie zur Punktmutation der zweiten *NotI* Schnittstelle, es wurde zuerst die *RpsL-neo* Counterselection-Kassette durch Recombineering eingefügt. Zur Überprüfung der Sequenz der Homologieregionen wurde eine Kolonie-PCR des BAC RP23-274L11 mit den Primer P7, P8 durchgeführt und das PCR-Produkt (569 bp) anschließend sequenziert. Wieder ergab sich eine vollständige Übereinstimmung der experimentell festgestellten Sequenz mit der Datenbanksequenz. Die zur Rekombination genutzten Homologieregionen von je 50 bp 5' und 3' der zweiten *NotI* Schnittstelle wurden mittels PCR an die Counterselection-Kassette angefügt (Sequenz der Oligonukleotide siehe Tabelle 4-2). Kanamycin-resistente Klone wurden nach erfolgter homologer Rekombination der Kolonie-PCR P7, P8 unterzogen. Durch die Insertion der Counterselection-Kassette ergab sich eine Verlängerung der Bande auf 1889 bp. Zusätzlich wurde noch die Funktionalität der *RpsL*-Kassette (Streptomycin-Sensitivität) überprüft. Der verwendete Klon wuchs wie erwartet nicht auf Streptomycin-haltigen Agarplatten. Im folgenden Schritt wurde die Counterselection-Kassette gegen ein lineares DNA-Fragment mit mutierter, nicht-funktionaler *NotI* Schnittstelle (GCGGCCGC→GCGGCTGC) ausgetauscht. Das lineare 165 bp DNA-Fragment wurde unter Verwendung eines 78 bp Oligonukleotids, welches aus der 5' Homologieregion, der mutierten *NotI* Schnittstelle und 20 bp der Sequenz 3' der zweiten *NotI* Schnittstelle als Primer bestand, und dem Primer P8 als Gegenstück amplifiziert. Als Template diente eine Minipräparation des BAC RP23-274L11, welche *KpnI* und *Ascl* doppelverdaut wurde. (Eine Kontamination des punktmutierten PCR-Produkts mit intaktem BAC-Vektor Template, könnte bei der Elektroporation des PCR-Produkts zu einer Retransformation mit wt BAC führen. Dies würde zu Streptomycin-resistenten *E.coli* Kolonien führen, also zu falsch positiven nicht-rekombinierten Kolonien.) Korrekt rekombinierte Kolonien wurden durch Kolonie-PCR (Abb. 2-9) mit den Primern P7, P8 identifiziert. Kolonie 1, 2 und 4 schienen rekombiniert zu haben.



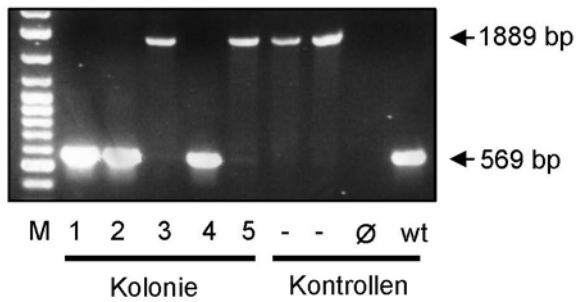


Abb. 2-9 Nachweis des Austauschs der Counterselection-Kassette gegen punktmutierte *NotI* Schnittstelle.

Kolonie 1-5: Streptomycin-resistente Kolonien; - Kontrolle: *RpsL-neo* BAC vor Rekombination; wt, RP23-274L11; Ø, ddH<sub>2</sub>O; M, NEB 2-log Ladder

In Kolonie 3 und 5 ließ sich die *RpsL-neo* Kassette noch nachweisen. Zum Nachweis der Punktmutation wurden die PCR-Produkte der Kolonie 1,2,4 und wt mit *NotI* verdaut (Abb. 2-10).

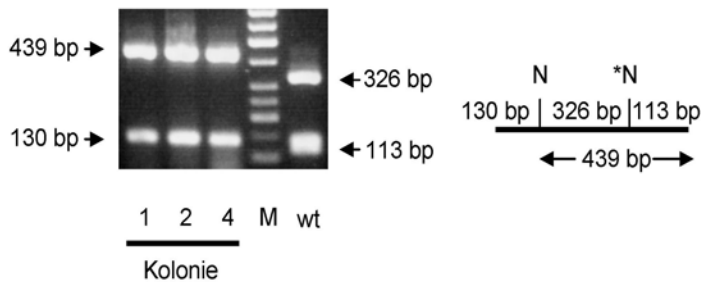


Abb. 2-10 Nachweis der punktmutierten *NotI* Schnittstelle im *Kit* *Intron1-2*

*NotI* Verdau der PCR Produkte von Kolonie 1,2,4 und wt (RP23-274L11). Rechts: Übersicht des PCR-Produkts von *Kit* Intron1-2, Fragmente des *NotI* Verdaus (bp, Basenpaare; M, Fermentas 50 bp Ladder; N, *NotI* Schnittstelle; \*N, punktmutierte *NotI* Schnittstelle)

Deutlich zeigte sich die Verlängerung der oberen Bande von 326 bp auf 439 bp, gleichzeitig entfiel die 113 bp Bande, was die erfolgreiche Rekombination bewies. Das Auftreten unerwünschter Rekombinationen wurde durch „BAC-Fingerprinting“ ausgeschlossen (Abb. 2-11). Hier zeigte sich, dass Klon 4 ausgedehnte, unerwünschte Deletionen aufwies. Im *EcoRI* Verdau fehlten zwei Banden > 10 kb und mehrere Banden bei 3 kb. Der *PstI* Verdau zeigte den Verlust von Banden im Bereich von > 10 kb bis circa 7 kb. Klone 1 und 2 erschienen identisch mit dem wt BAC RP23-274L11. Abschließend wurden die Klone 1 und 2 noch im Bereich der Modifikation sequenziert. Es zeigte sich, dass die Sequenz für beide Klone mit wt identisch war, bis auf die erwünschte Punktmutation der zweiten *NotI*-Schnittstelle (nicht gezeigt).

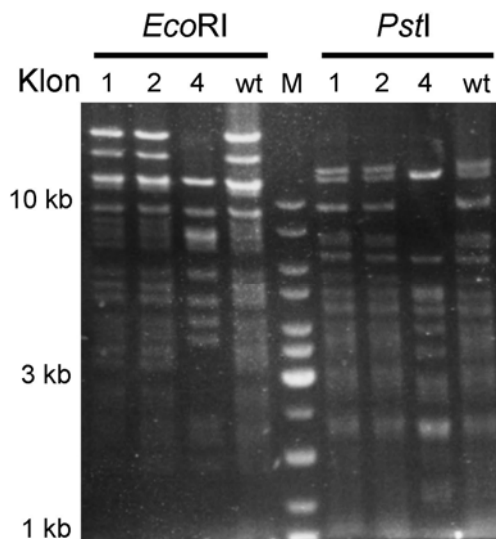


Abb. 2-11 „BAC Fingerprinting“ nach Punktmutation der zweiten *NotI* Schnittstelle im *Kit Intron1-2* durch Red/ET Counterselection.

Klon 4 scheint größere Teile seiner Sequenz deletiert zu haben, da bei beiden Verdauungen mehrere Banden nicht erscheinen. (wt, BAC RP23-274L11; M, NEB 2-log Ladder)

### 2.1.4 Insertion der Stopp-Kassette

Zur Kontrolle des *Kit<sup>D814V</sup>* Transgens wird im Intron1-2 eine *loxP*-flankierte Stopp-Kassette innerhalb der ersten *NotI* Schnittstelle platziert. Die Stopp-Kassette (Dragatsis and Zeitlin, 2001) besteht aus dem Gen Neomycinphosphotransferase (Neomycin-Resistenz) unter der Kontrolle des ubiquitär exprimierten Phosphoglycerolkinase (*Pgk*) Promotors. Zusätzlich enthält die Kassette Teile der 3' Sequenz des *His3* Gens von *S. cerevisiae*, gefolgt von einem SV 40 Polyadenylierungssignal, einem Translationsstart (ATG) und eine 5' Splice-akzeptorstelle. Die gesamte Kassette wird von zwei unidirektionalen *loxP*-Sites flankiert und kann daher mittels der Rekombinase Cre ausgeschnitten werden.

Zuerst wurde versucht die Insertion der Stopp-Kassette durch Red/ET Counterselection zu bewerkstelligen. Die Insertion der *RpsL-neo* Counterselection Kassette in die erste *NotI* Schnittstelle war problemlos möglich. Der Austausch der *RpsL-neo* Kassette gegen die lineare Stopp-Kassette mit angefügten 50 bp 5' und 3' Homologieregionen scheiterte. Es wurden zwar nach Elektroporation des linearen DNA Fragments große Zahlen an Streptomycin-resistenten Kolonien erhalten und untersucht. Es konnte jedoch keine Insertion der Stopp-Kassette in das Intron1-2 nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist die Deletion von *RpsL-neo*, welche zur Wiedererlangung der Streptomycin-Resistenz führt, ohne gleichzeitige Insertion der 3 kb großen Stopp-Kassette (siehe 3.1.2).

### 2.1.4.1 Insertion des prokaryontischen *gb2*-Promotors in die Stopp-Kassette

Die Stopp-Kassette besitzt eine eukaryontische Neomycin-Resistenz (*PgK-neo*). Auf Grund des fehlenden prokaryontischen Promotors in *E.coli* konnte nicht mit Neomycin selektiert werden. In der Arbeitsgruppe ist das Plasmid *pR6K-Pgk-gb2-neo* (Gene Bridges, Dresden) vorhanden, welches einen dualen pro- und eukaryontischen *Pgk-gb2*-Promotor enthält. *Pgk*-Promotor und *Neomycin*-Gen der Stopp-Kassette und des Plasmids *pR6K-Pgk-gb2-neo* sind identisch. Es ließ sich daher durch PCR mit den Primern P9, P10 ein lineares 252 bp DNA-Fragment amplifizieren, welches den *gb2*-Promotor, und zusätzlich Teile des *Pgk* Promotors als 5' Homologieregion und des *neo* Gens als 3' Homologieregion enthält (Abb. 2-12A). Der *gb2* Promotor wurde dann durch homologe Rekombination in die Stopp-Kassette eingebracht (Abb. 2-12B).

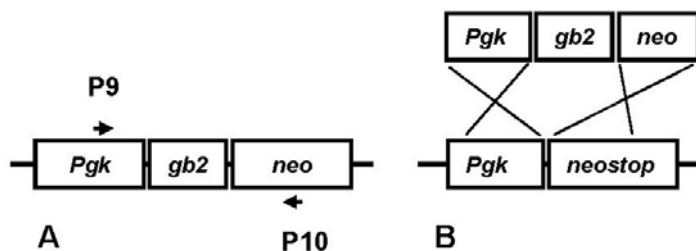


Abb. 2-12 Strategie zur Insertion des prokaryontischen *gb2*-Promotors.

(A) Amplifikation des *Pgk-gb2-neo* Fragments mit Hilfe der Primer P9 und P10 aus *pR6K-Pgk-gb2-neo*. (B) Homologe Rekombination des in (A) erstellten linearen *Pgk-gb2-neo* Fragments mit *pBSK+ Pgk-gb2-neo* unter Verwendung von Teilen der *Pgk* und *neo* Sequenz als Homologieregion

Erfolgreich rekombinierte Klone konnten durch Kanamycin-Selektion identifiziert werden, da durch den *gb2*-Promotor das Neomycin-Resistenzgen auch in *E.coli* exprimiert wird. Der Nachweis der erfolgreichen Insertion wurde durch *HincII* Verdau des entstandenen *pBSK+ Pgk-gb2-neostop* Plasmids (2 Schnittstellen, *pBSK+ Pgk-neostop* 1 Schnittstelle, nicht gezeigt) erbracht.

### 2.1.4.2 Insertion der modifizierten Stopp Kassette

Die 5' und 3' Homologieregionen wurden mittels PCR an die *loxP-Pgk-gb2-neostop-loxP*-Kassette angefügt. Um Mutationen in der 3 kb Kassette zu vermeiden wurde Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) mit Proofreading-Aktivität verwendet. Die Primer (siehe Tabelle 4-2) enthalten zusätzlich zur Homologieregion, die *loxP*-Erkennungssequenz gefolgt von 20 bp Sequenz der Stopp-Kassette. Die *loxP*-Sites befinden sich zwar bereits auf beiden Seiten im Template, allerdings ist ihre Sequenz palindromisch, was zu Primerfehlpaarungen führen könnte. Dies wurde durch

Verlängerung der Primer über die *loxP*-Sites hinweg in den 5' Anfang des *Pgk*-Promotors und in das 3' Ende der Stopp-Kassette verhindert.

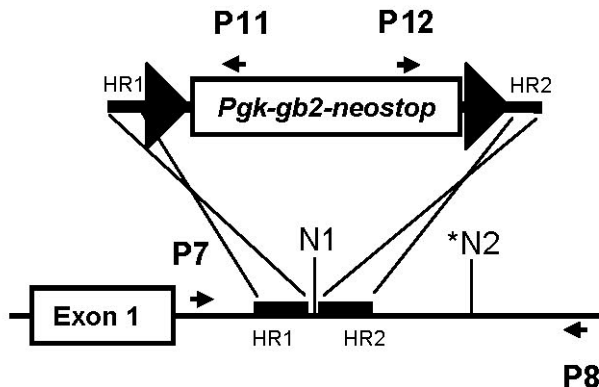


Abb. 2-13 Strategie zur Insertion der Stopp-Kassette in *Kit Intron1-2*

Die mit Homologieregionen ausgestattete *Pgk-gb2-neostop* Kassette wurde durch homologe Rekombination in die erste *NotI* Schnittstelle von *Kit Intron1-2* inseriert. Identifikation erfolgreich rekombinierter Klone durch Kanamycin-Selektion (*gb2-neo*). Nachweis durch Kolonie-PCR mit Primerpaaren P7, P11 und P12, P8 (N, *NotI* Schnittstelle; HR, Homologieregion)

Erfolgreich rekombinierte Klone wurden durch Kanamycin-Selektion identifiziert. Die Kanamycin-resistenten Klone wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primerpaaren P7, P11 und P12, P8 (Abb. 2-13, Abb. 2-14) näher untersucht.

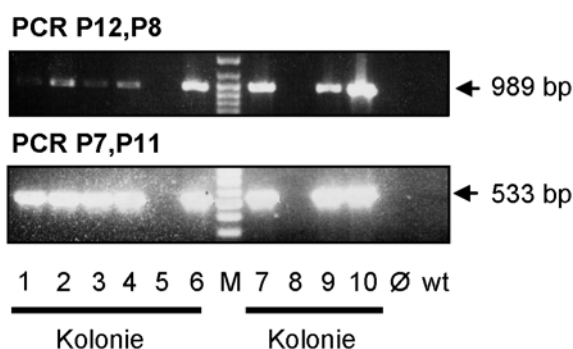


Abb. 2-14 Nachweis der Insertion der Stopp-Kassette mittels Kolonie-PCR.

Kolonie-PCR mit den Primerpaaren P12, P8 (oben, 989 bp Amplikon) und P7, P11 (unten, 533 bp Amplikon). wt BAC ergibt kein PCR-Produkt, eine Positivkontrolle war nicht verfügbar. (Übersicht der PCR-Strategie siehe Abb. 2-13; M, NEB 2-log ladder; wt, BAC RP23-274L11; Ø, ddH<sub>2</sub>O)

Die erfolgreich rekombinierten Klone 6 und 7 wurden mit weiteren Primern im Bereich der Stopp-Kassette und der *loxP*-Sites mit Übergängen in das Intron1-2 amplifiziert und sequenziert. Der Sequenzvergleich mit wt BAC und Stopp-Kassette ergab eine vollständige Übereinstimmung (nicht gezeigt).

Zum Ausschluss unerwünschter Rekombinationen wurde ein BAC-Fingerprinting durchgeführt. Die „Fingerabdrücke“ von rekombinierten Klonen und wt BAC ließen sich nicht direkt vergleichen, da durch die Stopp-Kassette weitere 3 kb DNA Sequenz mit *EcoRI* und *PstI* Schnittstellen hinzugefügt wurde. Der Verdau mit *EcoRI* führte zu einem zusätzlichen Fragment bei 3 kb im Vergleich mit wt BAC RP23-274L11, *PstI* Verdau erzeugte eine zusätzliche Bande bei 2,2 kb, allerdings finden sich in diesem Bereich schon mehrere Banden. *KpnI* Verdau bewirkte eine Bandenverschiebung von 13,7 kb auf 16,8 kb (rote Pfeile Abb. 2-15).

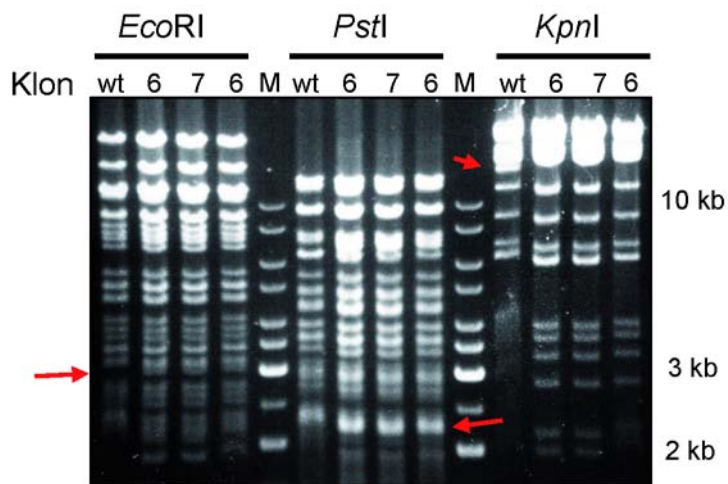


Abb. 2-15 BAC Fingerprinting nach Insertion

*EcoRI*, *PstI* und *KpnI* Verdau der Minipräparationen von Klon 6, 7 nach Insertion der Stopp-Kassette und wt BAC. Rote Pfeile markieren zusätzliche Fragmente durch die 3 kb Stopp-Kassette. (kb, Kilobasen; wt, BAC RP23-274L11; M, NEB 2-log Ladder)

Zur abschließenden Überprüfung der Integrität des Konstrukts und zum Ausschluß weiterer *NotI* Schnittstellen durch Fehler in der Datenbanksequenz wurden die zwei identifizierten Klone und wt BAC *NotI* verdaut und eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt (Abb. 2-16).

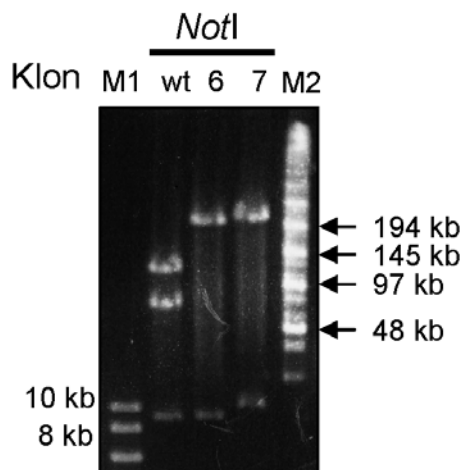


Abb. 2-16 Pulsfeldgelelektrophorese des *NotI* Verdau

Minipräparationen der Klone 6,7 und wt BAC wurden *NotI* verdaut und durch Pulsfeldgelelektrophorese untersucht. wt BAC ergab zwei Fragmente (127 und 80 kb) und Vektorbackbone durch *NotI* Verdau. Die Klone 6 und 7 ergeben intaktes Insert (210 kb) und Vektorbackbone (kb, Kilobasen; M1, NEB 2-log Ladder; M2, NEB MidRange I PFG Marker).

Beim wt BAC zeigten sich deutlich die zwei *NotI* Fragmente von 80 kb und 127 kb Länge sowie ein 8,3 kb Fragment, das dem Vektorbackbone entsprach. Die zwei rekombinierten Klone ergaben ein intaktes Insert von 210 kb Länge und das Vektorbackbone.

### 2.1.5 Aufreinigung des *Kit<sup>D814Vflox</sup>*-Konstrukts

BAC DNA aus Klon 6 wurde präpariert (siehe 4.2.1.10), *NotI* verdaut und über eine Sepharose CL4B Säule (Sigma-Aldrich) mit Injektionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 24 Fraktionen von je 300-500 µl gesammelt. Aliquots der erhaltenen Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 2-17 zeigt einen Ausschnitt der Fraktionen 8-15. Zuerst eluierte hauptsächlich Vektorbackbone (8,3 kb) und genomische *E.coli* DNA (verbleibt in den Geltaschen) und wenig BAC Insert. Ab

Fraktion 11 eluierte vor allem das Insert. Fraktion 12 wurde für die nachfolgende Pronukleusinjektion ausgewählt, hier eluierte die höchste Insertkonzentration (ca. 20 ng/ $\mu$ l), bei nur geringer Kontamination durch Vektorbackbone und genomische *E.coli* DNA.

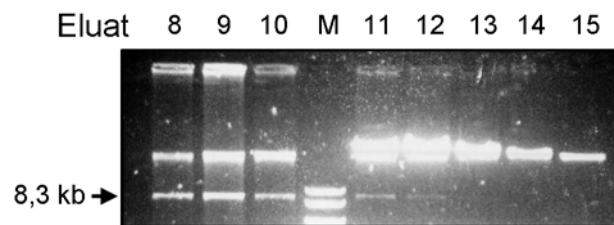


Abb. 2-17 Aufreinigung des *Kit*<sup>D814VfloX</sup>-Konstrukts durch Säulenchromatographie

Die Eluatfraktionen 8-15 der Säulenchromatographie wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Genomische *E.coli* DNA verbleibt in den Geltaschen, Insert-DNA läuft oberhalb des Größenmarkers, das Vektorbackbone bei 8,3 kb. (M, NEB 2-log Ladder)

### 2.1.6 Pronukleusinjektion

Das aufgereinigte Konstrukt wurde von Herrn Dipl. Ing. Ronald Naumann (Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) in Pronuklei von befruchteten C57BL/6 Oozyten injiziert. Die injizierten Oozyten wurden dann in scheinchwangere Ammentiere transferiert. Insgesamt wurden 59 potentielle Gründertiere geboren, welche möglicherweise transgene DNA an zufälliger Stelle in das Genom integriert hatten.

### 2.1.7 Genotypisierung der *Kit*<sup>D814VfloX</sup> Gründertiere

Im *Kit*<sup>D814VfloX</sup> Konstrukt sind drei Stellen mit artifizierender, nicht muriner DNA vorhanden, der T7 und SP6 Promotorrest am 5' bzw. 3' Ende des Konstrukts und die Stopp-Kassette (Abb. 2-18).

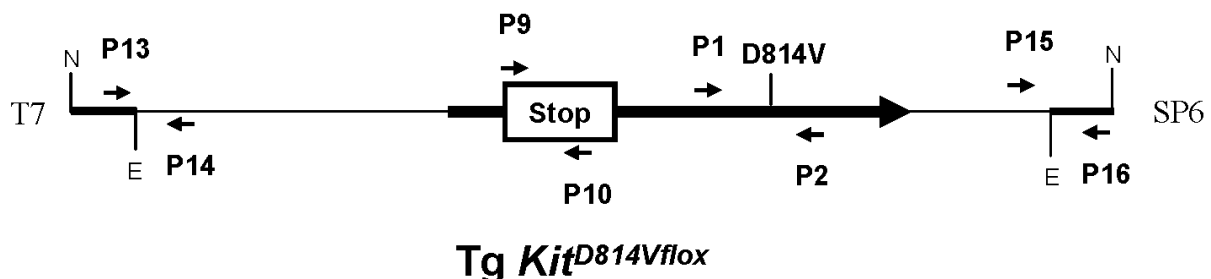


Abb. 2-18 Identifizierung von transgenen Gründertieren mittels PCR

Transgene Gründertiere wurden mittels vier verschiedener PCR identifiziert. Das Primerpaar P13, P14 amplifizierte transgene DNA am T7 Ende des Inserts. Die Primer P9, P10 binden im Bereich der Stopp-Kassette. Das Primerpaar P15, P16 amplifizierte transgene DNA im Bereich des SP6 Endes. PCR mit den Primern P1, P2 ergab sowohl mit wt *Kit* als auch mit *Kit*<sup>D814VfloX</sup> ein Produkt, DNA Sequenzierung ergab Aufschluß über das Vorhandensein der *Kit*<sup>D814V</sup> Mutation. (N, NotI; E, EcoRI)

Zuerst wurden die PCR-Reaktionen mit verschiedenen Verdünnungen von *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Konstrukt in genomischer wt C57BL/6 DNA etabliert. Hierzu wurde Fraktion 13 des Säuleneluats (2.1.5) mit wt DNA auf 2 pg/μl verdünnt, Dies entspricht ca. 9000 Kopien/μl des Transgens. Die PCR-Bedingungen (4.2.7.2) wurden so gewählt das sich bei dieser Verdünnung gut sichtbare Banden ergaben.

Die DNA aus Schwanzspitzen von 59 Gründertieren wurde präpariert (siehe 4.2.7.2). Die PCR P1, P2 diente als Template Kontrolle, da sie bei Anwesenheit von ausreichend wt C57BL/6 DNA ein Signal liefert. Die PCR-Produkte wurden sequenziert, um wt *Kit* von der *Kit*<sup>D814V</sup> Punktmutation zu unterscheiden.

Tier No.	T7	SP6	STOP	<i>Kit</i> <sup>D814V</sup>
524950	-	-	+	-
524952	-	-	+	-
524960	+	-	+	+
524964	+	+	+	+
525129	+	+	+	?
525132	-	+	+	+
525143	+	-	+	+
525163	+	+	+	+
525165	+	+	+	+

Tabelle 2-1 Übersicht über die Genotypisierung der Gründertiere

(+, PCR positiv beziehungsweise *Kit*<sup>D814V</sup> Mutation nachweisbar; - PCR negativ beziehungsweise *Kit*<sup>D814V</sup> Mutation nicht nachweisbar;?, Sequenzierung nicht erfolgreich)

Die Gründerlinien ohne *Kit*<sup>D814V</sup>-Mutation (524950, 524952) wurden nicht weiter untersucht und die Verpaarung mit Linie 525129 ergab keine *Kit*<sup>D814Vflox</sup>-transgenen Nachkommen. Da die Linien 524964 (Tg1), 525163 (Tg2) und 524960 (Tg3) bei der Verpaarung mit verschiedenen Cre-Linien (siehe 2.2) rasch einen Phänotyp zeigten, wurden aus logistischen Gründen nur diese Linien weiter untersucht.

### 2.1.8 Abschätzung der Kopienzahl in *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Gründerlinien

Für drei transgene *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Linien (Tg1, Tg2, Tg3) wurde die Anzahl der Konstruktkopien, welche in das Genom integriert hatten, abgeschätzt. Hierzu wurde aus Schwanzspitzen von Gründertiernachkommen genomische DNA isoliert, aufgereinigt und Southern Blot Analyse durchgeführt (Abb. 2-19). Die genomische

DNA wurde *NotI/BamHI* doppelverdaut. Die Southernstrategie unterscheidet zwischen *Kit*<sup>D814V/flox</sup> Transgen und dem homozygotem *Kit* Wildtypallel. Die Bandenintensität wurde mit einem Densitometer (BioRad Fluor-S Multimager) bestimmt. Das homozygote Wildtypallel wurde als interner Standard zur Abschätzung der Transgenkopienzahl verwendet. Es ergaben sich für die Linie Tg1 (524964) eine Kopienzahl von 6 (n=3), Linie Tg2 (525163) ungefähr 20 Kopien (n=5) und für Linie Tg3 (524960) 2 Kopien (n=3).

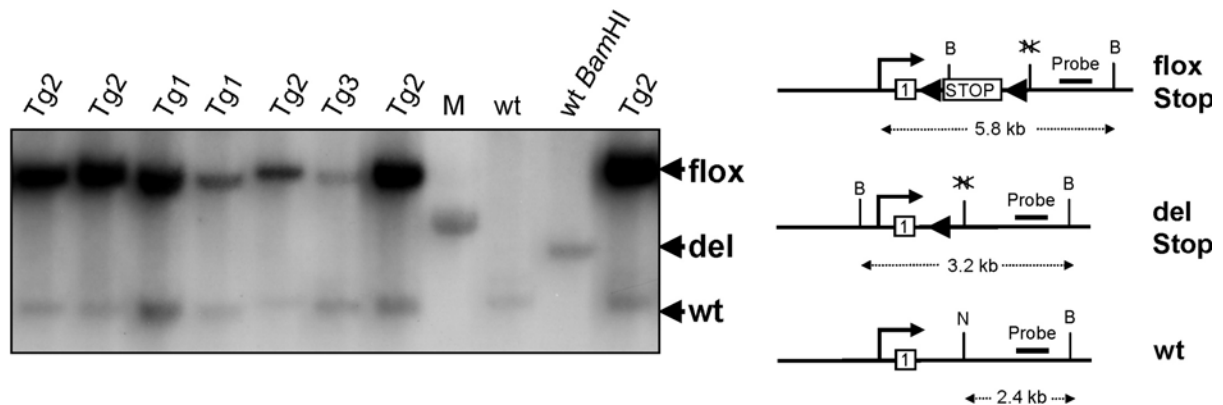


Abb. 2-19 Abschätzung der Transgen-Kopienzahl durch Southern Blot Analyse

Genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen von Nachkommen verschiedener Gründerlinien (Tg1=524964, Tg2=525163 und Tg3=524960) isoliert und mittels Southern Blot analysiert. Die Strategie ist auf der rechten Seite gezeigt: Doppelverdau mit *BamHI* (B) und *NotI* (N, mutierte Schnittstelle durchgestrichen), Intron1-2-spezifische Sonde (Probe). Die gewählte Strategie kann zwischen gefloxtem Transgen (flox stop, 5,8 kb), Transgen nach Deletion des Stopp-Elements (del Stop, 3,2 kb, hier nicht erforderlich) und den endogenen Wildtyp-Allelen (wt, 2,4 kb) unterscheiden. Die Kopienzahl wurde abgeschätzt, indem die Bandenintensität von wt und „flox Stop“ Allel ins Verhältnis gesetzt wurden. (M, Marker; wt *BamHI*, *BamHI* Einfachverdau als del Stop Kontrolle)



## 2.2 Phänotypische Charakterisierung von Tieren mit $Kit^{D814V}$ -Expression in unterschiedlichen Zellkompartimenten

### 2.2.1 Induzierbare Expression von $Kit^{D814V}$

$Kit^{D814V/flox}$  Tiere wurden mit der induzierbaren *Mx1-Cre*-transgenen Linie (Kühn et al., 1995) verpaart, welche Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des interferonsensitiven *Mx1*-Promotors ausprägt. Die Tiere wurden im Alter von 4-10 Wochen durch dreimalige Injektion von 250 µg Polyinosin-Polycytidin (pI:C) induziert. Der Toll-like Rezeptor 3-Ligand pI:C stellt ein Mimetikum für virale RNA dar und führt zu einer endogenen Interferon  $\alpha/\beta$  Antwort, welche den *Mx1*-Promotor und damit Cre-Expression aktiviert. Cre-Expression lässt sich in allen Geweben nachweisen, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Effizienz. Nahezu vollständige Deletion *loxP* flankierter DNA-Sequenzen konnte für Leber und Milz gezeigt werden. Im Gegensatz dazu deletiert *Mx1-Cre* im Skelettmuskel und Gehirn nur zu ca. 10-20 %. Durch endogene Interferon-Expression kommt es auch in Abwesenheit des Induktors pI:C zu gelegentlichen Rekombination, vor allem in Leber, Milz und Blut. In der Milz von uninduzierten Tieren wurde in circa 10 % der Zellen eine Deletion vorgefunden (Kühn et al., 1995).

#### 2.2.1.1 Effizienz der Deletion des Stopp-Elements durch *Mx1-Cre*

Um die Effizienz der Deletion des Stopp-Elements in  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814V/flox+}$  Tieren zu überprüfen wurde genomische DNA aus verschiedenen Geweben extrahiert und mittels Southern Blot analysiert.

Die Deletion des Stopp-Elementes war nach Induktion mit pI:C besonders effizient in Leber und Milz (Abb. 2-20A), die „flox Stop“ Bande war relativ zur „del Stop und wt“ Bande am schwächsten. Die Expression von Cre-Rekombinase führte zur Reduzierung der Transgen-Kopienzahl, da DNA innerhalb der äusseren, unidirektionalen *loxP*-Sites deletiert werden kann (siehe 3.1.3). Die für *Mx1-Cre* beschriebene Hintergrundrekombination wurde in uninduzierten  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814V/flox+}$  Tieren ebenfalls beobachtet (Abb. 2-20B, siehe Diskussion 3.2.1)

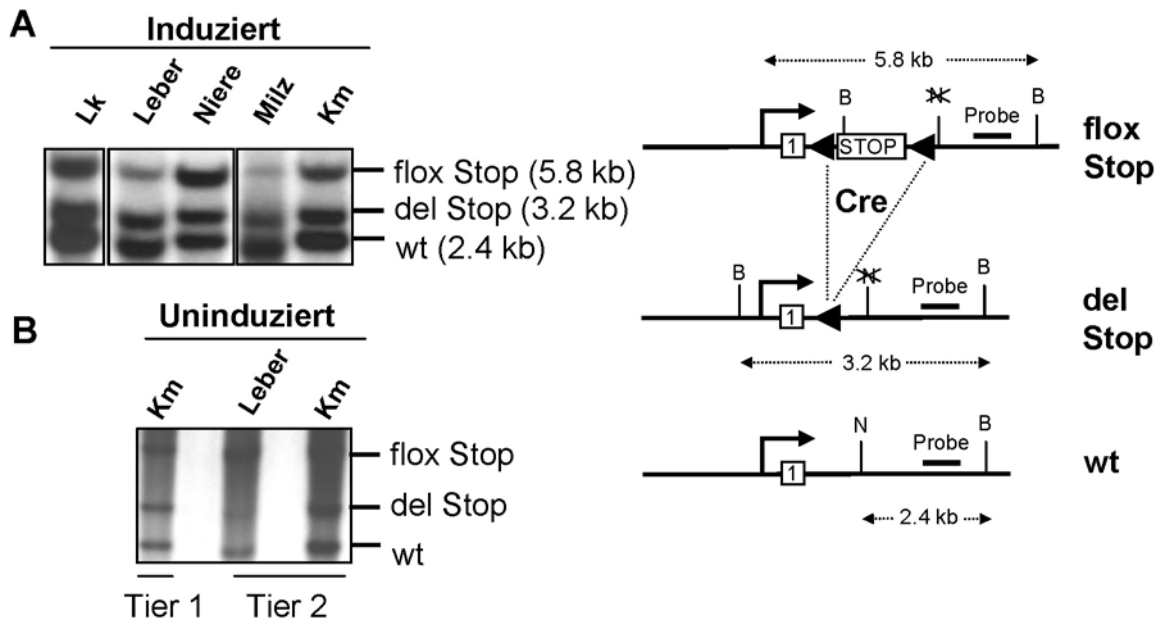


Abb. 2-20 Southern Blot Analyse von  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren

(A) Genomische DNA wurde aus verschiedenen Geweben eines  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieres (Tg1, 14 Wochen nach Induktion mit pl:C) extrahiert und mittels Southern Blot analysiert (Km, Knochenmark; Lk, Lymphknoten). (B) Southern Blot genomischer DNA aus zwei uninduzierten  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren (Tg2). Rechts: Southern Blot Strategie, vgl. Abb. 2-19.

### 2.2.1.2 Mastzellvermehrung in $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$ Tieren

Es wurden 40 bitransgene Tiere (induziert und uninduziert) im Alter von 12-48 Wochen histologisch untersucht. In allen bitransgenen Tieren (bei Analyse 12 bis 48 Wochen alt) konnte eine diffuse Vermehrung von dermalen Mastzellen beobachtet werden.  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tiere mit relativ mildem Phenotyp (Abb. 2-21A) zeigten eine Mastzellvermehrung um den Faktor 4, in schwer betroffenen Tieren stieg die Mastzellichte um den Faktor 12. Zusätzlich entwickelten die meisten Tiere (n=25) Mastzellknoten (Abb. 2-21B), die willkürlich als eine Ansammlung von dichtgepackten Mastzellen mit einem Durchmesser  $> 100 \mu\text{m}$  definiert wurden. In einigen bitransgenen Tieren waren Mastzellknoten makroskopisch sichtbar und erreichten einen Durchmesser von bis zu 5 mm. Die starke Mastzellinfiltration führte häufig zu entzündlichen Veränderungen in der Haut, meistens Akanthose, Erosionen und Krusten im Bereich des Nackens (siehe Abb. 2-34). Die Mastzellknoten zerstörten oft die gesamte Dermis (Abb. 2-21B-C), wurden aber durch den Panculus carnosus begrenzt. Zusätzlich wurde in vielen Fällen die Infiltration von Lymphknoten durch Mastzellen beobachtet (Abb. 2-21D). Eine diffuse Vermehrung einzelner Mastzellen zeigte sich häufig in Leber und Milz. In älteren Tieren ( $> 40$  Wochen) wurde auch eine dichte Mastzellinfiltration dieser Organe beobachtet (nicht gezeigt).

Mastzellvermehrung trat gelegentlich in der Submucosa des Vormagens auf (Abb. 2-21E). Mastzellinfiltrate im Knochenmark konnten histologisch und durchflusszytometrisch ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

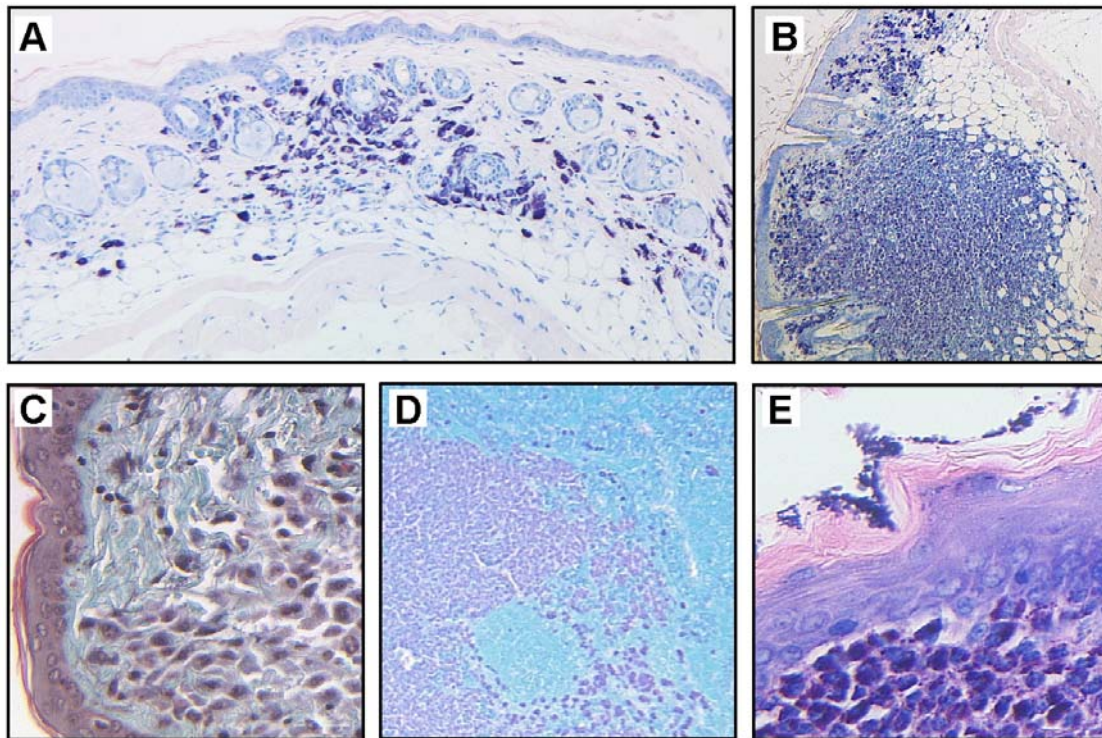


Abb. 2-21 Mastzellphänotypen in  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren

**(A)** Diffuse Infiltration der Haut mit Mastzellen (violett, Giemsa Färbung) **(B)** Mastzellknoten verdrängt die Dermis, Begrenzung des Knotens durch den Paniculus carnosus (rosa, rechts oben, Giemsa) **(C)** Zerstörung des dermalen Kollagens durch Mastzellen (Kollagen hellgrün, Mastzellen hellrosa, Trichrom-Masson Färbung) **(D)** Mastzellinfiltrat in einem Lymphknoten (Giemsa) **(E)** Submukosales Mastzelleinfiltrat im Vormagen (Giemsa)

Von zwei  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren konnten Einzelsuspensionen eines kutanen Knotens durchflusszytometrisch analysiert werden, Es zeigte sich, dass die Knoten zu mehr als 90 % aus  $Kit^+/Fc\epsilon R1\alpha^+$  Mastzellen bestanden (Abb. 2-22A). Anschließend wurde die Proliferationsrate dieser isolierten Mastzellen bestimmt, Abb. 2-22B zeigt, dass die Mastzellen *ex vivo* in Gegenwart von SCF initial geringfügig proliferierten, es aber im Zeitraum von 4 Tagen keine stabilen Zunahme der Zellzahl entstand. Ohne SCF wurde ein langsames Absterben der Mastzellen beobachtet, dass durch IL-3 verlangsamt wurde. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass isolierte Mastzellen sich zwar für 4 Wochen in Kultur (n=2) halten ließen, aber sich dabei nicht vermehrten. Um festzustellen, ob Mastzellen aus kutanen Knoten das transgene *Kit*-Allel ausprägten, wurde RNA aus Mastzellen isoliert, revers transkribiert und nach PCR Amplifikation sequenziert (Abb. 2-22C). Die isolierten Mastzellen transkribierten sowohl wt als auch  $Kit^{D814V}$  RNA.

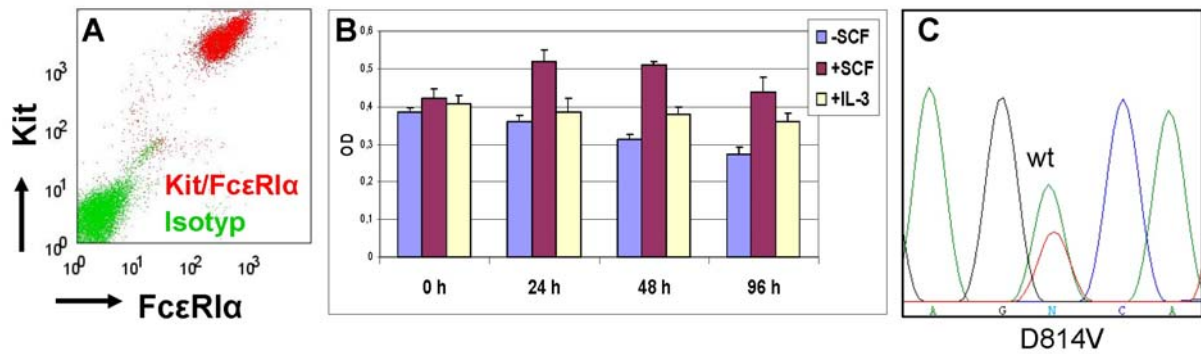


Abb. 2-22 Analyse von Mastzellen aus kutanen Knoten

(A) Durchflusszytometrische Analyse einer Zellsuspension aus einem kutanen Mastzellknoten. Mehr als 90 % der Zellen prägen die Mastzellmarker Kit und FcεR1α aus (Rot: Anti-Kit/FcεR1α Färbung Grün: Isotypen-Kontrolle). (B) Bestimmung der Proliferationsrate von isolierten Mastzellen durch den Celltiter Assay in serumhaltigem Medium (hellblau), oder Zusatz von 50 ng/ml SCF (lila) oder 50 ng/ml IL-3 zum Medium (beige). Messung der optischen Dichte (OD) nach 0 h, 24 h, 48 h und 96 h (C) Elektropherogramm nach RT-PCR von RNA, welche aus einem kutanen Mastzellknoten isoliert wurde (Grün: wt, Rot: Kit<sup>D814V</sup>).

Aus Knochenmark von *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vfllox+</sup>* Tieren und Kontrollen wurden mit Hilfe von IL-3-haltigem Medium sogenannte „bone marrow derived mast cells“ (BMMC, siehe 4.2.5.1) kultiviert. Nach vier Wochen bestand die Kultur zu mehr als 90 % aus Mastzellen (Kit<sup>hi</sup>/FcεR1α<sup>+</sup>, Abb. 2-23A). Diese Zellen zeigten keine verstärkte Proliferation im Vergleich zu BMMC aus Kontrolltieren (Abb. 2-23B). Zugabe von SCF induzierte eine starke Proliferation sowohl der bitransgenen BMMC als auch der Kontroll-BMMC.

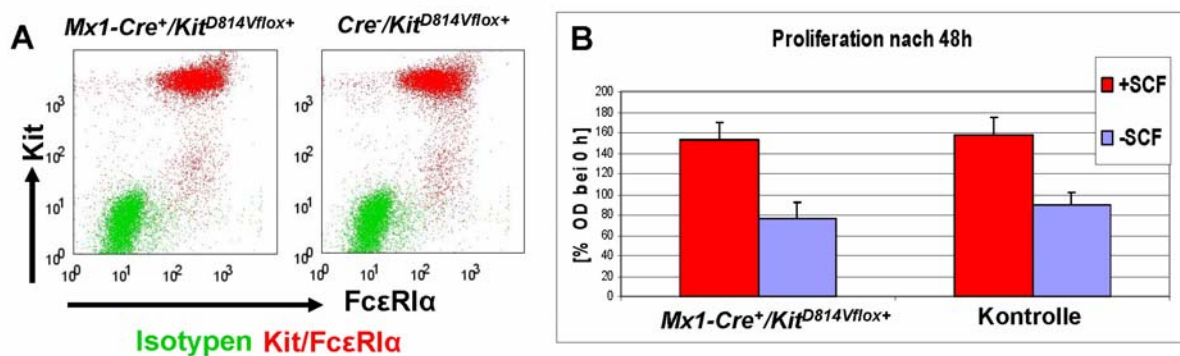


Abb. 2-23 Kultivierte Mastzellen aus *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vfllox+</sup>* Knochenmark

(A) Durchflusszytometrische Analyse von kultivierten Mastzellen (BMMC) nach 4 Wochen, mehr als 90 % der Zellen exprimieren Kit und FcεR1α (Anti-Kit/FcεR1α Färbung rot, Isotypen-Kontrolle grün). (B) Messung der relativen Proliferation (% der OD zum Zeitpunkt 0 h) durch Celltiter Assay zeigt keinen Wachstumsvorteil von *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vfllox+</sup>* BMMC (n=3) gegenüber Kontrollen (n=4, Genotypen: *Cre<sup>-</sup>/Kit<sup>D814Vfllox+</sup>*, *Mx1-Cre<sup>+</sup>* und wt). Serumhaltiges Medium (blauer Balken) oder Zusatz von 50 ng/ml SCF (roter Balken).

### 2.2.1.3 Zusätzliche hämatopoetische Neoplasie in *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

16 von 42 bitransgenen Tieren (10 induziert, 6 uninduziert) entwickelten im Alter von 12-24 Wochen (durchschnittliches Alter 17,4 Wochen) eine hämatopoetische Neoplasie, welche nicht der Mastzelllinie zuzuordnen war. Makroskopisch zeigten 15/16 Tiere eine innerhalb weniger Tage auftretende Lähmung der Hinterbeine und 5/16 Tiere entwickelten solide Tumore. Das Körpergewicht von *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren mit dieser Neoplasie war im Vergleich mit wurf- und geschlechtsgleichen Kontrollen um durchschnittlich 20 % (n=8) erniedrigt. Die meisten Tiere zeigten eine starke Vergrößerung der Milz, mit einem durchschnittlichen Milzgewicht von  $221 \pm 102$  mg (n=12) gegenüber  $80 \pm 15$  mg (n=21) in Kontrollen. Morphologisch ließ sich die Neoplasie als lymphoid-blastär (Abb. 2-24A) charakterisieren. Immunhistochemisch zeigte sich eine Reaktivität für den B-Zellmarker B220/CD45R und den Proliferationsmarker Ki67 zeigen (Abb. 2-24 B-C).

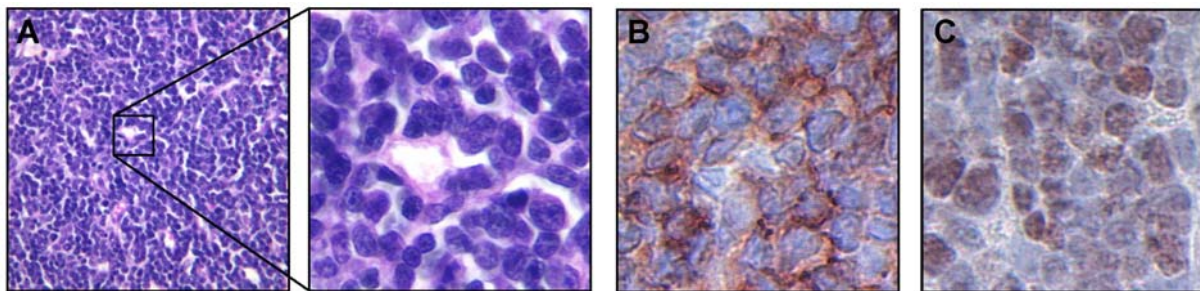


Abb. 2-24 Histologie der B-Zellneoplasie

(A) Histologie eines soliden Tumors (HE-Färbung) (B) B220/CD45R Immunfärbung (solider Tumor) (C) Ki67 Immunfärbung (solider Tumor)

Neoplastische Infiltrate konnten im Knochenmark, Milz, Leber, Lymphknoten und Blut nachgewiesen werden und wurden durchflusszytometrisch näher charakterisiert (Abb. 2-25). Es wurde eine starke Vermehrung von B220 und CD19-positiven Zellen in allen untersuchten Organen beobachtet. Solide Tumore bestanden zu mehr als 90 % aus B-Zellen. Die neoplastischen Zellen zeigten eine um circa 0,5 log niedrigere Fluoreszenzintensität für B220 ( $B220^{int}$ ) als die normalen, nicht-neoplastischen B-Zellen. In Milz und im Blut von erkrankten *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren fand sich noch eine Population, die B220 unverändert hoch exprimiert ( $B220^{hi}$ , Abb. 2-25 oben), dabei Kit negativ ist und Immunglobulin auf der Oberfläche exprimiert ( $B220^{hi}/CD19^+/Kit^-/Oberflächen-Ig^+$ ). Diese Population stellte residuale, nicht-transformierte B-Zellen dar, die sich auch bei der Cre-negativen Kontrolle fanden. Die neoplastischen  $B220^{int}$  Zellenprägten Kit aus (Abb. 2-25 links unten) ,

waren jedoch negativ für Oberflächen-Ig (IgM Abb. 2-25 rechts unten, IgA, IgD IgG nicht gezeigt).

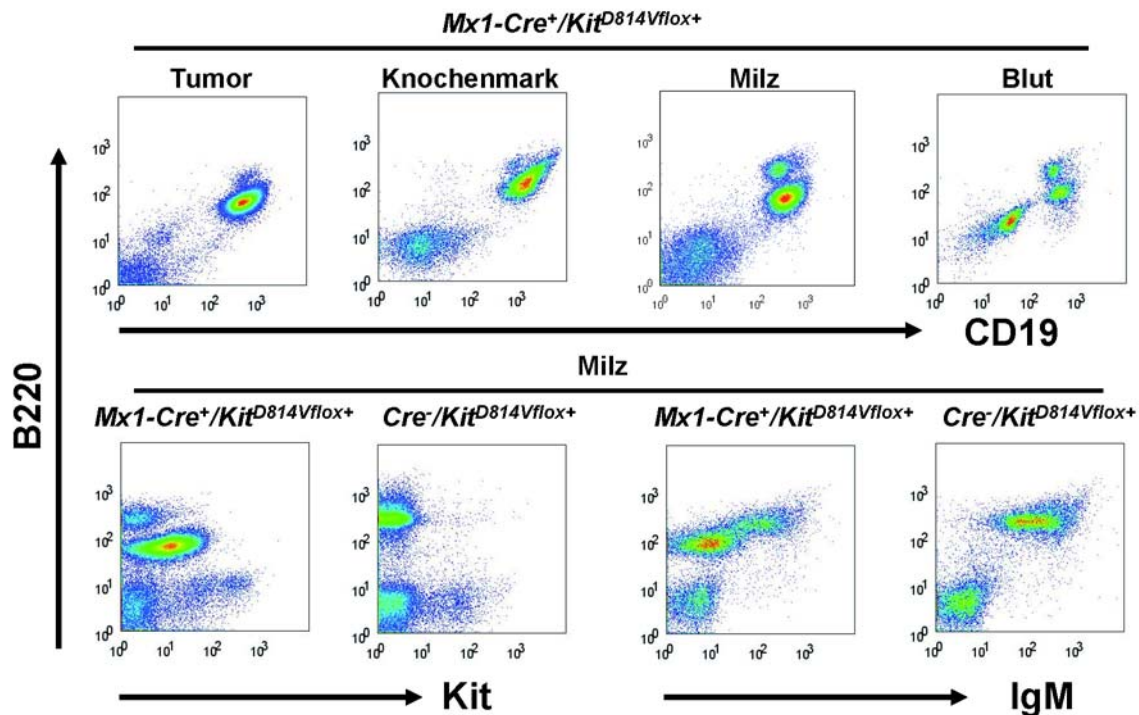


Abb. 2-25 Durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zellneoplasie

**Obere Reihe:** Einzellsuspensionen aus solidem Tumorgewebe, femoralem Knochenmark, Milz und Blut wurden für die B-Zellmarker B220 und CD19 angefärbt. In Milz und Blut ließ sich deutlich das Auftreten einer Population mit intermediärer B220 (B220<sup>int</sup>) Expression beobachten. Tumorsuspension und Knochenmark bestanden zum Großteil aus B220<sup>int</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen. Abbildung repräsentativ für folgende Anzahl an Untersuchungen: Tumor n=3, Knochenmark n=4, Milz n=6, Blut n=5. **Untere Reihe:** Kit-Expression in neoplastischen B220<sup>int</sup> B-Zellen im Vergleich zu nicht-neoplastischen B220<sup>hi</sup> B-Zellen (links). Abwesenheit von Oberflächen-IgM der B220<sup>int</sup> Population im Vergleich zur B220<sup>hi</sup> Population (rechts).

In den soliden B-Zelltumoren konnte nach RNA Isolation, RT-PCR und Sequenzierung nur das Kit<sup>D814V</sup> Transkript, jedoch nicht das wt Kit Transkript nachgewiesen werden (n=2,

Abb. 2-26).

Hauptsächlich Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup> Tiere der Transgenlinie Tg1 (n=15, insgesamt 32 Tiere analysiert) entwickeln eine B-Zellneoplasie, es wurde nur bei einem Tier der Linie Tg3 (insgesamt 4 Tiere analysiert) eine Neoplasie diagnostiziert.

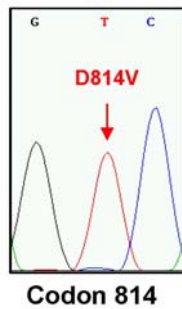


Abb. 2-26 Transkription von  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$  in neoplastischen B-Zellen

DNA-Sequenzierung des RT-PCR-Produkts von RNA aus solidem B-Zelltumor zeigt das nur  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$  und kein wt-Kit transkribiert wird. Abbildung repräsentativ für 2 Neoplasien.

#### 2.2.1.4 Entzündliche Darmerkrankung in $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$ Tieren

$\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere im Alter von 25-48 Wochen entwickelten teilweise einen Prolaps der rektalen Mucosa (5/40 Tieren), was einen Hinweis auf eine entzündliche Darmerkrankung darstellt. Häufig wurden bei bitransgenen Tieren blutige und schmierige Faeces beobachtet. Makroskopisch präsentierte sich vor allem das Caecum und das aufsteigende Colon weißlich geschwollen und vergrößert (Abb. 2-27B). Die histologische Analyse von Colon und Caecum von  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tieren ergab eine Infiltration der Mukosa durch myeloische und lymphoide Zellen. In jüngeren Tieren wurde die Mucosa von inflammatorischen Zellen fokal infiltriert und verdrängt, während ältere Tiere Erosionen der Mukosa mit fokalem Verlust aller epithelialen Strukturen zeigten (Abb. 2-27A). Die Infiltrate bestanden aus B-Lymphozyten, welche in einigen Tieren Keimzentren ausbildeten (Abb. 2-27A, F), T-Zellen (Abb. 2-27G), Makrophagen (Abb. 2-27E) und neutrophile Granulozyten, die innerhalb der Krypten sogenannte „Kryptenabszesse“ bildeten (Abb. 2-27D). Durch Chloroacetatesterasefärbung konnte die Akkumulation von mukosalen Mastzellen (Abb. 2-27C) in räumlicher Nähe zu den Läsionen nachgewiesen werden. Mit Hilfe eines Colitis-Scores (siehe 4.2.6.2) wurde die Schwere der Entzündung abgeschätzt. Der Median des Darmentzündungsscore betrug 2,5 für sämtliche  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere (n=36, Alter 12-48 Wochen) aller transgenen Gründerlinien, für wurfgleiche Kontrollen ergab sich ein Medianscore von 0 (n=23, Minimalwert 0, Maximalwert 1).  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere der Gründerlinie Tg3 zeigten einen deutlich milderen Verlauf, hier betrug der Median des Colitisscores 1 (n=4, Minimalwert 0, Maximalwert 2), im Gegensatz zu bitransgenen Tieren der Linie Tg1 (Median=3, n=26), und Tg2 (Median=3,5, n=6). Das Körpergewicht von  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tieren im Alter von 25-38 Wochen beträgt im Mittel nur 70 % der geschlechtsgleichen Kontrollgeschwister (n=6,  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere der Linie Tg3 oder Tiere mit B-Zellneoplasie wurden ausgeschlossen).

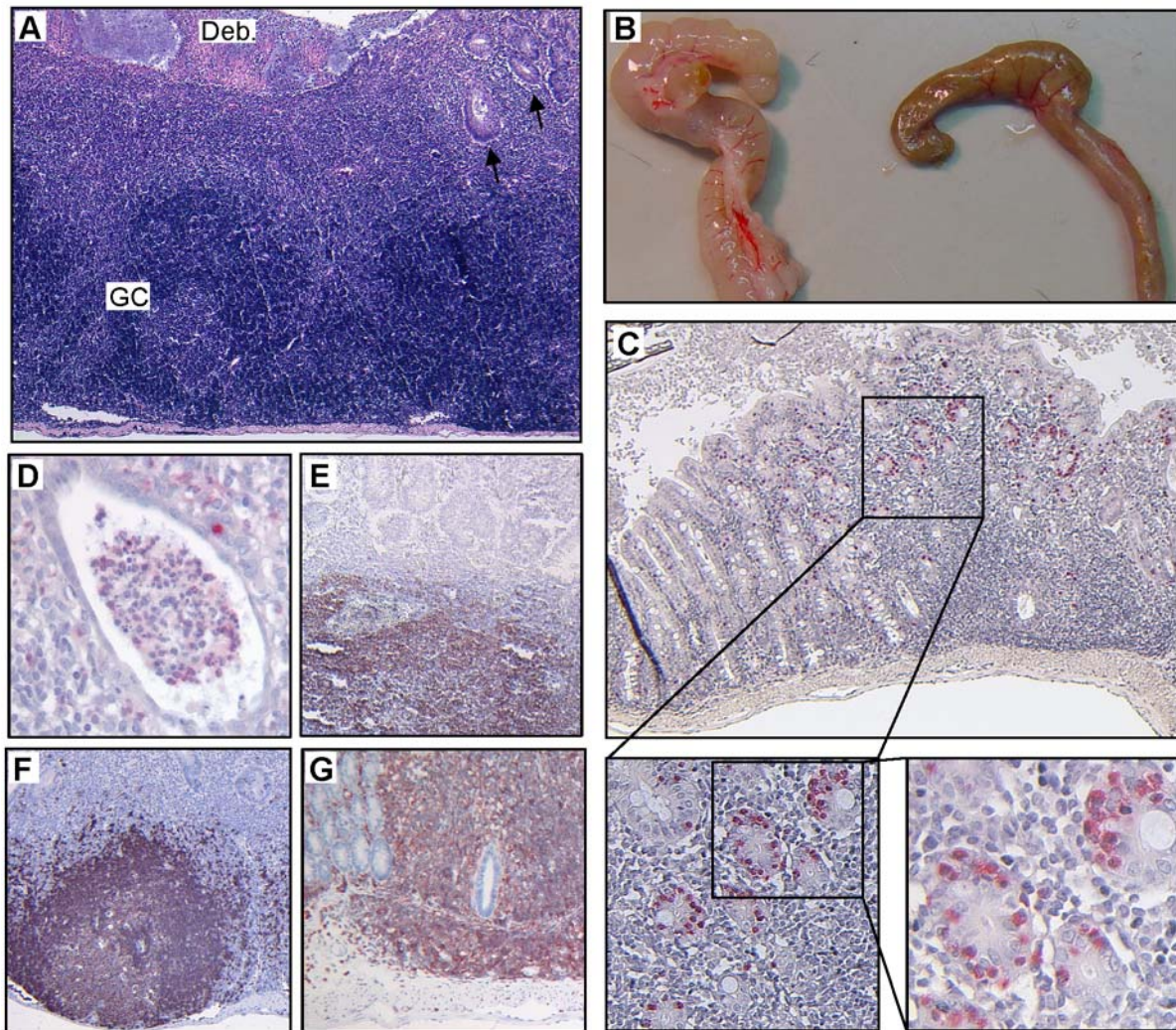


Abb. 2-27 Colitis in  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vfllox+}$  Tieren

(A) Die schwere Entzündung hat die Dickdarmmukosa fast vollständig zerstört (HE-Färbung). Das mächtige Infiltrat enthält mehrere Keimzentren (GC). Die erodierte, luminale Oberfläche wird von Zelldebris (Deb.) bedeckt. Rechts oben finden sich wenige residuale Krypten (Pfeile). (B) Entzündetes, geschwollenes Caecum und Colon (links, Kontrolle rechts). (C) Vermehrung von mukosalen Mastzellen in der Nähe einer entzündlichen Läsion. In der Vergrößerung sind intraepitheliale Mastzellen zu erkennen. (Chloroacetatesterase-Färbung). (D) Bildung eines Kryptenabszesses durch Ansammlung von neutrophilen Granulozyten (rosa) im Lumen einer Krypte (einzelne Mastzelle, leuchtend rot, Chloroacetatesterase-Färbung). (E) Das Infiltrat enthält zahlreiche Makrophagen (F4/80 Immunfärbung) (F) Bildung eines Keimzentrums (B220-Immunfärbung) (G) Starke Infiltration der Mukosa mit T-Lymphozyten (CD3ε Immunfärbung)

Mit dem Ziel einen zusätzlichen Parameter zur Abschätzung der intestinalen Mastzellhyperplasie zu erhalten, wurde die Konzentration der murinen Mastzellprotease 1 (MMCP-1), die von mukosalen Mastzellen ausgeprägt wird, im Serum bestimmt. Die durchschnittliche Konzentration von MMCP-1 im Serum betrug bei  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vfllox+}$  Tieren  $101 \pm 175$  ng/ml (n=18) gegenüber  $13,5 \pm 27,2$  ng/ml (n=30) in Kontrollen.



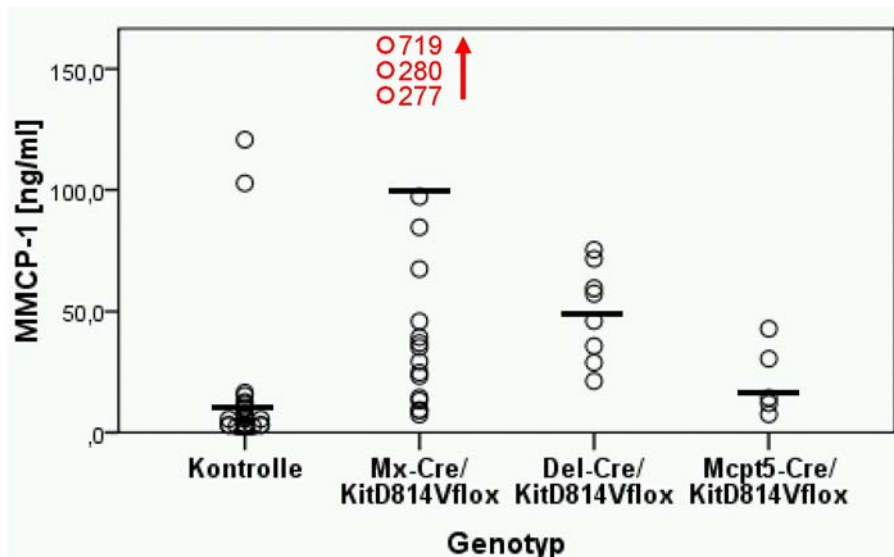


Abb. 2-28 Bestimmung der Konzentration von MMCP-1 im Serum

Mit Hilfe eines ELISA wurde die Serumkonzentration der Chymase MMCP-1, die von mukosalen Mastzellen ausgeprägt wird, gemessen. Die schwarzen Balken repräsentieren die Mittelwerte, Kreise die Messwerte einzelner Tiere. Hohe Messwerte außerhalb der Diagrammskala sind in roter Schrift eingezeichnet. Tiere mit den Genotypen  $\text{Del-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814VfloX}}$  und  $\text{A-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814VfloX}}$  sind unter 0 bzw. 0 beschrieben

Der Mittelwert der bitransgenen Tiere ist erhöht, was durch mukosale Mastzellhyperplasie erklärt werden kann. Allerdings wurde eine starke interindividuelle Schwankung beobachtet (Abb. 2-28). Bei  $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814VfloX}}$  Tieren der Gründerlinie Tg3 wurde ein Mittelwert von  $30,2 \pm 22,3$  ng/ml ( $n=2$ ) MMCP-1 im Serum bestimmt. Ob dies auf eine schwächere mukosale Mastzellvermehrung hindeutet und damit die deutlich schwächere Darmentzündung erklärt, kann auf Grund der niedrigen Tierzahl nicht eindeutig beantwortet werden (siehe Diskussion 3.2.3).

### 2.2.1.5 Verstärkte Granulopoese in $\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814VfloX}}$ Tieren

$\text{Mx1-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814VfloX}}$  Tiere im Alter von 18 bis 48 Wochen, bei denen keine B-Zellneoplasie diagnostiziert wurde, zeigten eine Vergrößerung der Milz, von durchschnittlich  $172 \pm 73$  mg ( $n=16$ ) gegenüber  $80 \pm 15$  mg in Kontrollen ( $n=21$ ). Die Verteilung von Leukozyten in der Milz wurde durchflusszytometrisch analysiert, es zeigt sich vor allem eine Zunahme von neutrophilen Granulozyten ( $\text{CD11b}^+/\text{Gr-1}^{\text{hi}}$ , siehe Abb. 2-29A). Die starke Verschiebung zugunsten von neutrophilen Granulozyten geht mit einer Abnahme von B- und T-Lymphozyten einher (Abb. 2-29B).

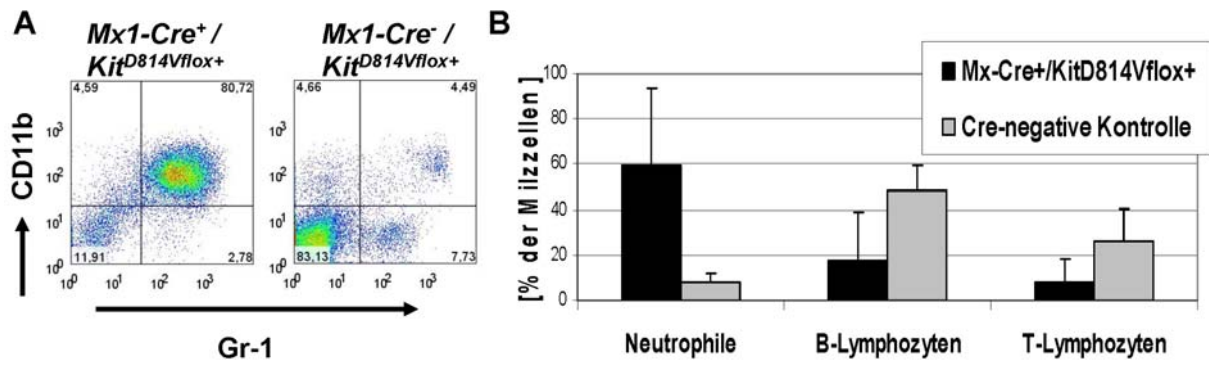


Abb. 2-29 Zunahme von Neutrophilen in der Milz von  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflo+}$  Tieren

**(A)** Durchflusszytometrische Analyse von Milzsuspension zeigte die starke Zunahme von neutrophilen Granulozyten ( $CD11b^+/Gr-1^{hi}$ ) in bitransgenen Mutanten. Abbildung repräsentativ für 3 Tiere

**(B)** Relativer Anteil von Granulozyten ( $CD11b^{hi}/Gr-1^{hi}$ ), B- ( $B220^+$ ) und T- ( $CD3\epsilon^+$ ) Lymphozyten an der Gesamtzellzahl von  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814Vflo+}$  Tieren (schwarze Balken, n=3) und Kontrollen (graue Balken, n=5).

## 2.2.2 Ubiquitäre Deletion des Stopp-Elements in *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Mutanten

Der Deleter-Cre Stamm (Schwenk et al., 1995) prägt Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Cytomegalievirus-Promotors (hCMV) aus, wodurch Cre bereits sehr früh in der Embryonalentwicklung, vor der Implantation des Embryos ubiquitär aktiv ist. Es kommt daher zu einer vollständigen Deletion *loxP*-flankierter DNA-Sequenz im gesamten Organismus.

### 2.2.2.1 Perinatale Lethalität in *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ Tieren

Ungefähr 75 % (siehe 2.2.2.2) der bitransgenen *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ Tiere versterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt. Neugeborene (getötet oder spontan verstorben) zeigten eine starke Vermehrung kernhaltiger Zellen im Blut was sich durch Blutausstriche und histologische Schnitte nachgewiesen werden konnte (Abb. 2-30A-C).

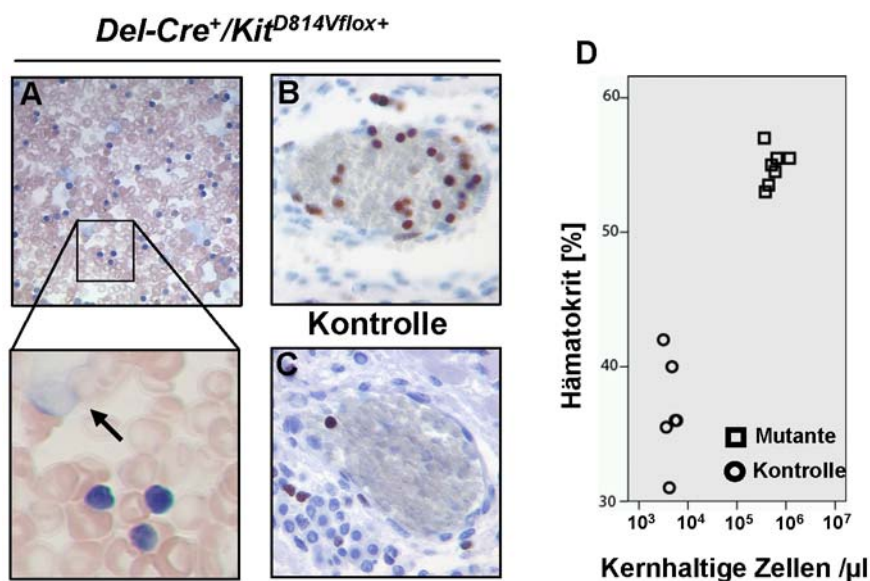


Abb. 2-30 Zunahme kernhaltiger Zellen in *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ Tieren

(A) Im Ausstrich zeigte sich die starke Zunahme tiefblauer, blastärer Zellen im Blut von *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ Neugeborenen. Weiterhin fanden sich in Blutausstrichen zahlreiche „Kernschatten“ (Pfeil), die Fragmenten untergegangener Zellen entsprachen (May-Grünwald-Giemsa Färbung). (B,C) Ki67 Immunfärbung von Blutgefäßen in der Dermis von *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ (B) und Cre-negativer Kontrolle (C). Es wurde eine Zunahme Ki67-positiver Zellen in Mutanten beobachtet. (D) Zunahme des Hämatokrits (Ordinate, [%]) und der Anzahl kernhaltiger Zellen pro  $\mu$ l (Abszisse, logarithmische Skalierung), in *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox</sup>+ (Vierecke, n=7) gegenüber nicht-bitransgenen Kontrollen (Kreise, n=6).

Im Blutastrich erkennt man kleine, blastäre Zellen mit wenig Cytoplasma, Zudem wurden zahlreiche „Kernschatten“, die zellulärem Debris entsprachen, beobachtet. Mit Hilfe eines Hämocytometers wurde die Anzahl kernhaltiger Zellen im peripheren Blut bestimmt, es ergab sich für die Mutanten gegenüber den Kontrollen, eine

Vermehrung um den Faktor 10 bis 100 (Tg1:  $3,21 \pm 2,71 \times 10^5 / \mu\text{l}$ , n=19; Tg2:  $2,13 \pm 0,29 \times 10^5 / \mu\text{l}$ , n=5; Tg3:  $0,32 \pm 0,31 \times 10^5 / \mu\text{l}$ , n=7, versus  $4,5 \pm 1,6 \times 10^3 / \mu\text{l}$  in Kontrollen, n=53). Weiterhin wurde eine Erhöhung der Erythrozytenzahl ( $7,44 \pm 1,29 \times 10^6 / \mu\text{l}$ , n=5, versus  $5,12 \pm 0,28 \times 10^6 / \mu\text{l}$  in Kontrollen, n=8) und des Hämatokrits ( $54,9 \pm 1,9\%$ , n=7, versus  $36,8 \pm 3,8\%$  in Kontrollen, n=6, Abb. 2-30D) beobachtet. Peripheres Blut wurde durchflusszytometrisch untersucht. Es konnte eine abnormale Population (R1, Abb. 2-31A) identifiziert werden, deren Streuungseigenschaften Lymphozyten ähnelte, jedoch den Erythrozytenmarker Ter119 stark ausprägte. Ein Teil der Zellpopulation färbte sich durch Propidiumiodid (PI) an, was also tot, was als Zeichen für Fragilität gewertet wurde. Färbung mit dem zellpermeablen DNA-Farbstoff Draq5 (Abb. 2-31B) zeigte deutlich die starke Zunahme (R1) von kernhaltigen Zellen, welche Ter119 und CD71 (Transferrin-Rezeptor) exprimierten und negativ für CD45 (Abb. 2-31B unten), CD3, CD11b, CD19 und B220 (nicht gezeigt) waren. Eine Vermehrung von Leukozyten ( $\text{CD45}^+ \text{Ter119}^-$ ) wurde nicht beobachtet ( $4,46 \pm 2,07 \times 10^3 \text{ CD45}^+ \text{Ter119}^-$  Zellen/ $\mu\text{l}$ , n=5 gegenüber  $4,61 \pm 1,59 \times 10^3 / \mu\text{l}$  in Kontrollen, n=8). Zusammenfassend waren diese Tiere durch eine hyperproliferative Fehlregulation der Erythropoese gekennzeichnet.

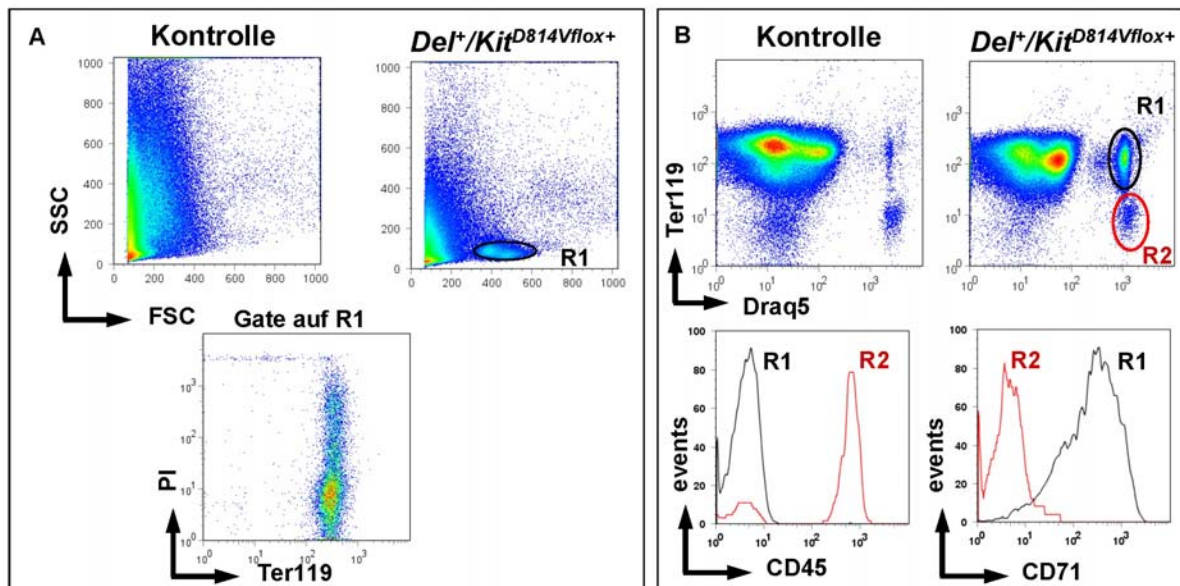


Abb. 2-31 Durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut aus *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Neugeborenen

(A) *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Neugeborene zeigten eine zusätzliche Population (R1 im Scatterplot) mit starker Expression von Ter119 und teilweiser Anfärbung durch Propidiumiodid (unteres Dotplot). (B) Anfärbung kernhaltiger Zellen mit dem zellpermeablen DNA-Farbstoff Draq5 zeigte eine starke Zunahme der Ter119<sup>+</sup>/Draq5<sup>+</sup> Population (R1) in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Neugeborenen. Die Population R1 exprimierte CD71 und ist CD45<sup>-</sup>. Die Population R2 entspricht Leukozyten.

In der Leber von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tieren wurde eine starke Infiltration mit erythropoetischen Zellen beobachtet (Abb. 2-32A). Die durchflusszytometrische Analyse von Leberzellsuspension zeigte auch hier eine starke Zunahme der Anzahl von Ter119<sup>+</sup>/Draq5<sup>+</sup> Zellen und eine relative Abnahme der Leukozytenzahl (Abb. 2-32B).

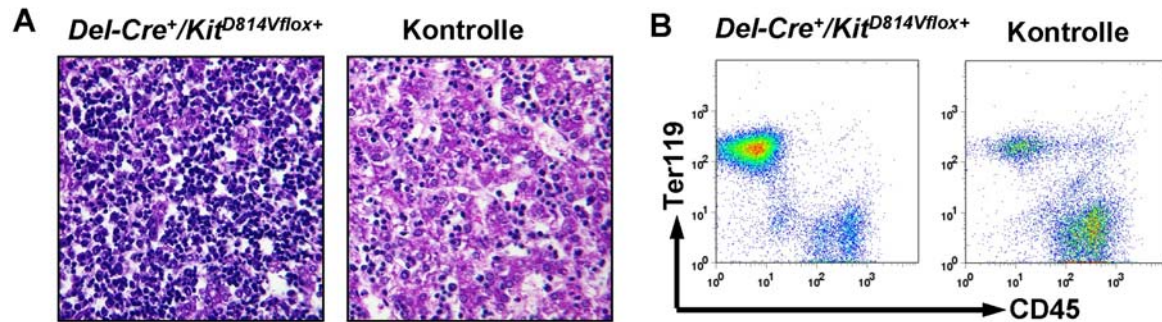


Abb. 2-32 Infiltration von fetaler Leber durch erythropoetische Zellen in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tieren

(A) Infiltration der Leber von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Neugeborenen durch erythropoetische Zellen (HE-Färbung). (B) Zunahme von Ter119<sup>+</sup> bzw. Abnahme von CD45<sup>+</sup> Zellen in fetaler Lebersuspension von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Neugeborenen (Nach Lyse und Ausschluss kernloser Erythrozyten (Draq5<sup>-</sup>)).

Eine Vermehrung von Mastzellen in der Haut neugeborener *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tiere wurde nicht festgestellt (394±108 Mastzellen/mm<sup>2</sup> (n=3) in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* gegenüber 333±79 Mastzellen/mm<sup>2</sup> (n=3) in Kontrollen, nicht gezeigt).

### 2.2.2.2 Adulte *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tiere

In niedriger Frequenz wurden *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tiere bei der Genotypisierung im Alter von 3 bis 4 Wochen beobachtet. Nicht alle bitransgenen Tiere starben zum Zeitpunkt der Geburt.

Tg Linie	Gesamtzahl Nachkommen	<i>Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup></i> erwartet	<i>Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup></i> beobachtet
Tg1	128	46,75	14
Tg2	50	12,5	0
Tg3	70	27,25	10

Tabelle 2-2 Nachkommen der Verpaarung *Del-Cre x Kit<sup>D814Vflox</sup>*

Übersicht über die Verpaarung verschiedener Gründerlinien mit der Deleter-Cre Linie, die mittlere Spalte gibt die Anzahl der bitransgenen Nachkommen, welche nach Mendelschen Regeln erwartet wurden, die linke Spalte gibt die tatsächlich beobachtete Anzahl wieder. Es wurden sowohl hetero- als auch homozygote Deleter-Cre Tiere mit heterozygoten *Kit<sup>D814Vflox</sup>* Tieren verpaart.

Tabelle 2-2 zeigt das  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tiere im Vergleich zu der nach Mendelschen Regel erwarteten Anzahl deutlich unterrepräsentiert sind, die Verpaarung mit Transgenlinie 2 ergab keine bitransgenen Mutanten. Die überlebenden Tiere zeigen im Alter von wenigen Wochen keinerlei makroskopisch erkennbaren Phänotyp, insbesondere keinen Hinweis auf eine gesteigerte Erythropoese.

### 2.2.2.3 Deletion des Stopp-Elements in $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$ Überlebenden

Um unvollständige Deletion des Stopp-Elements als mögliche Ursache des Überlebens einer geringen Anzahl von  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren auszuschließen, wurden verschiedene Organe mittels Southern Blotting untersucht. Abb. 2-33 zeigt, dass alle untersuchten Gewebe eine vollständige Deletion der Stopp-Kassette aufweisen. Bei Gründerlinie Tg1 wurde eine Reduktion der Transgenkopien auf eine Kopie beobachtet, bei Tg3 blieb die Kopienzahl unverändert bei zwei.

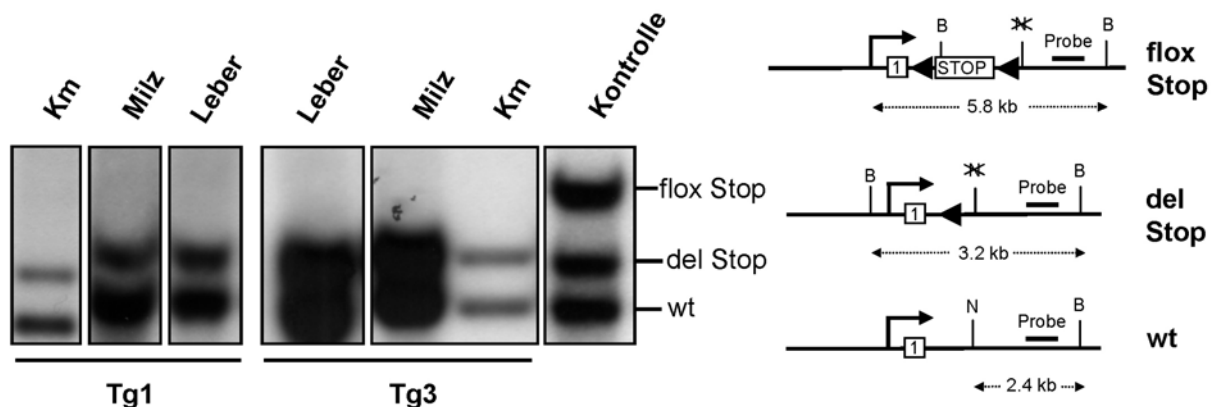


Abb. 2-33 Southern Blot Analyse von überlebenden  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$

Aus verschiedenen Organen überlebender  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Bitransgene wurde genomische DNA isoliert und nach Southern analysiert. Es wird eine vollständige Deletion der Stopp-Kassette beobachtet, bei Gründerlinie Tg1 reduziert sich die Kopienzahl von 6 auf 1 (wt-Bande entspricht 2 Kopien). Rechts: Southern Strategie, siehe Abb. 2-19.

### 2.2.2.4 Vermehrung von Mastzellen in $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$ Überlebenden

Alle histologisch untersuchten  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  überlebenden Tiere (n=19, Tg1 und Tg3) im Alter von 11 bis 61 Wochen zeigten eine diffuse Vermehrung von Mastzellen in der Haut, 13  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tiere zeigten zusätzlich Mastzellknoten (<100  $\mu\text{m}$ ) in der Haut. Mastzellknoten traten bevorzugt in älteren  $Del-Cre^+/Kit^{D814Vflox+}$  Tieren auf (Durchschnittsalter mit Mastzellknoten:  $38 \pm 12$  Wochen, gegenüber Tieren ohne Mastzellknoten:  $20 \pm 9$  Wochen). Mastzellknoten und -infiltrate zeigten sich häufig in Lymphknoten, Vormagen und Milz.

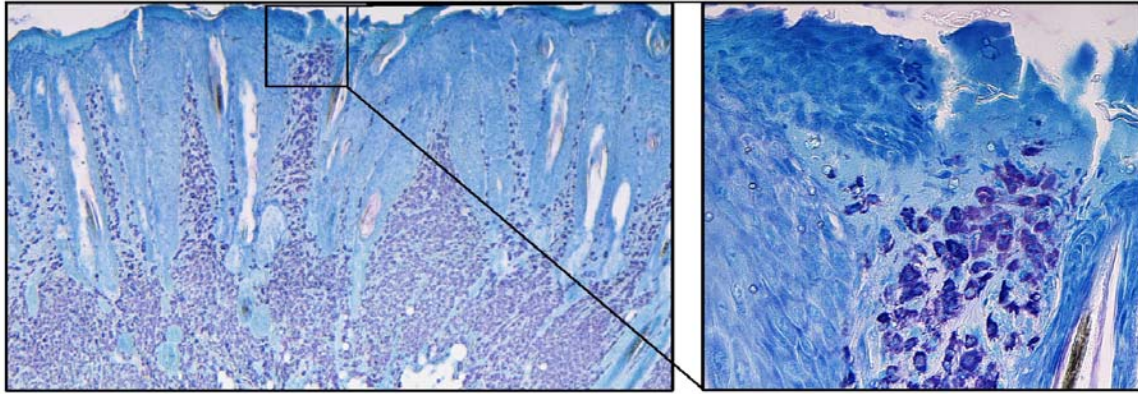


Abb. 2-34 Akanthose und Entzündung der Haut in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

Starke Infiltration der Haut mit Mastzellen führt häufig zu einer Verdickung der Epidermis (Akanthose), unkontrollierter Verhornung (Parakeratose) und Erosionen. (Giemsa Färbung).

Makroskopisch zeigten die bitransgenen Tiere (n=12/19, Alter 12-61 Wochen) häufig eine entzündliche Veränderung im Bereich des Nackens, welche mit starker Mastzellinfiltration und Akanthose (Abb. 2-34) einher ging. Bei Handhabung der Tiere wurde häufiges Kratzen beobachtet. Andere hämatopoetische Neoplasien, insbesondere B-Zellneoplasien, wurden nicht festgestellt.

#### 2.2.2.5 Entzündliche Darmerkrankung in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Überlebenden

Bitransgene Überlebende, die vom Gründertier Tg1 abstammten, entwickelten eine starke Colitis, der Median des Colitisscores betrug 3 (n=10), *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere welche vom Gründertier Tg3 abstammen, entwickelten keine Colitis, der Medianwert des Scores betrug 0 (n=6). Drei von elf untersuchten bitransgenen Tieren (Tg1) zeigten einen Prolaps der rektalen Mucosa im Alter von 33-49 Wochen. Die Bestimmung von MMCP-1 im Serum ergab einen Durchschnittswert von  $49,4 \pm 19,7$  ng/ml (n=8) gegenüber  $13,5 \pm 27,2$  ng/ml (n=30) in Kontrollen (siehe Abb. 2-28). Für *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere der Gründerlinie Tg3 wurden durchschnittlich  $48,6 \pm 23$  ng/ml MMCP-1 im Serum gemessen (n=6).

#### 2.2.2.6 Verstärkte Granulopoese in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Überlebenden

Auch bei adulten *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren wurde meistens eine Splenomegalie beobachtet. Das durchschnittliche Milzgewicht stieg von  $84 \pm 18$  mg (n=5) in Kontrollen auf  $170 \pm 124$  mg in bitransgenen Überlebenden (n=13). Wieder zeigte sich eine Vermehrung von neutrophilen Granulozyten in der Milz von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Überlebenden (Abb. 2-35).

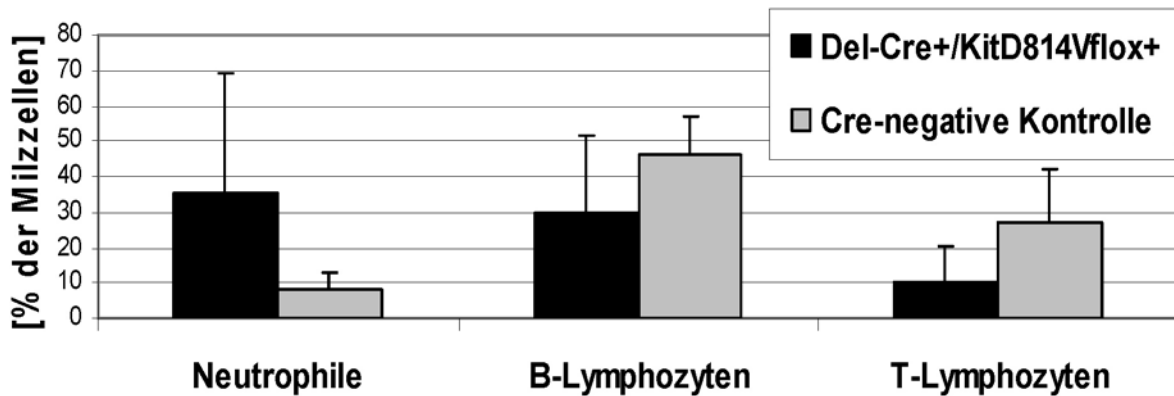


Abb. 2-35 Verteilung von Leukozyten in der Milz von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Überlebenden

Die relative Zusammensetzung der Milz wurde durchflusszytometrisch bestimmt für Neutrophile (CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>hi</sup>), B- (B220<sup>+</sup>) und T- (CD3ε<sup>+</sup>) Lymphozyten in adulten *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren (schwarze Balken, n=4) und Kontrollen (graue Balken, n=3).

### 2.2.2.7 Expression von Kit<sup>D814V</sup> in kultivierten Mastzellen

Aus Knochenmark von überlebenden *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren und Kontrollen wurden BMMC kultiviert. Die Kulturen bestanden nach 4 Wochen zu mehr als 95 % aus Kit<sup>hi</sup>/FcεR1α<sup>+</sup> Mastzellen. Die Expression beider Marker war bei Mutanten und Kontrollen gleich (nicht gezeigt). Aus den kultivierten Mastzellen wurde RNA isoliert, mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Im Elektropherogramm (Abb. 2-36A) dominierte die wt-Kit Sequenz. Das *Kit<sup>D814Vflox</sup>*-Allel wurde also in diesen Zellen nur wenig transkribiert. Hinsichtlich der Proliferationsrate unterschieden sich *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* und Kontroll BMMC nicht (Abb. 2-36B).

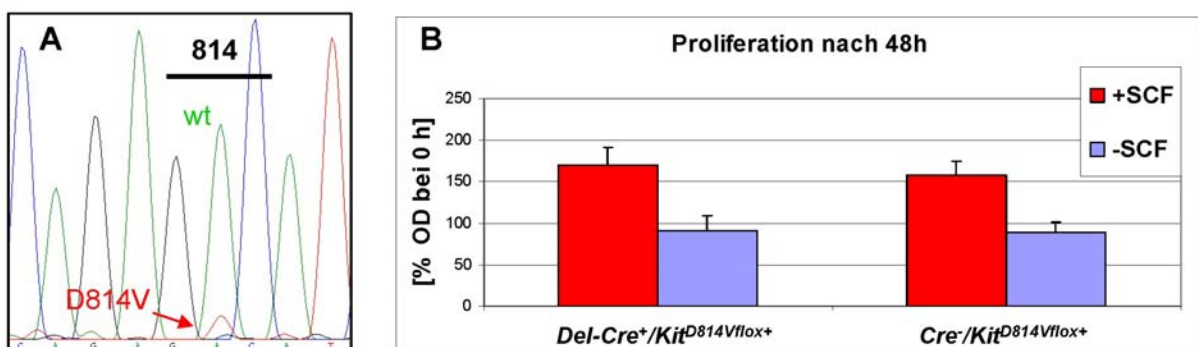


Abb. 2-36 Analyse von kultivierten Mastzellen aus adulten *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

(A) DNA Sequenzierung eines RT-PCR Produkts aus RNA von *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* BMMC (wt-Peak, grün, Kit<sup>D814V</sup>-Peak rot, Abb. repräsentativ für 2 Kulturen). (B) Die relative Proliferation (% der OD zum Zeitpunkt 0 h) von BMMC aus *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* (n=2) und Kontrollen (n=4) wurde durch den CellTiter Assay nach 48 h bestimmt. Zusatz von 50 ng/ml SCF (roter Balken) oder serumhaltiges Medium (hellblauer Balken).



Um die Aktivität des Kit-Proteins sichtbar zu machen, wurde eine Western Blot Analyse mit einem Kit-Antikörper, der spezifisch nur das am Tyrosinrest 719 phosphorylierte Protein erkannte, durchgeführt (Abb. 2-37). Weiterhin wurde die Phosphorylierung wichtiger mittelbarer Zielmoleküle des Kit-Rezeptors (ERK1/2, Akt) untersucht. Es zeigte sich, dass in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* BMMC eine deutliche Phosphorylierung des Tyrosinrests 719 vorlag, welche allerdings nicht zu einer detektierbaren Phosphorylierung von Erk1/2 und einer sehr schwachen Phosphorylierung von Akt führte. Zugabe von SCF führte zu einer deutlich stärkeren Phosphorylierung von Kit und einer starken Phosphorylierung von Erk1/2 und Akt sowohl in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* als auch in Kontroll-BMMC. Die konstitutive Kit-Phosphorylierung in bitransgenen BMMC konnte durch den Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Midostaurin (PKC412) blockiert werden, Im Gegensatz zum Inhibitor Imatinib, der nur die SCF-induzierte Kit-Phosphorylierung blockierte.

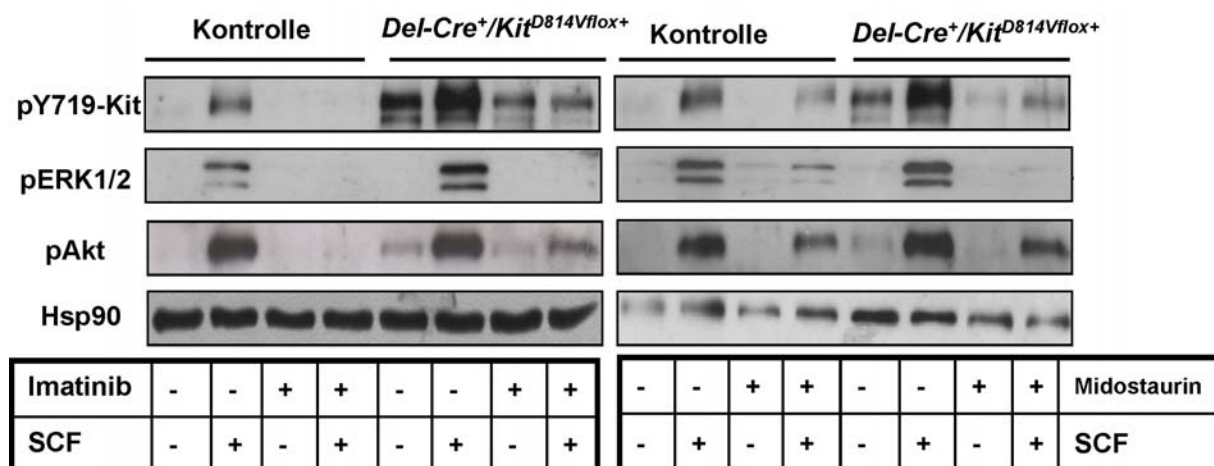


Abb. 2-37 Konstitutive Autophosphorylierung von Kit in kultivierten Mastzellen aus *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Knochenmark

Western Blot Analyse von BMMC aus *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Knochenmark mit phosphospezifischen Antikörpern gegen Kit, ERK1/2 und Akt. Entsprechende Ansätze wurden teilweise mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib (5  $\mu$ M) und Midostaurin (1  $\mu$ M) vorinkubiert. SCF wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml zugegeben, Hsp90 diente als Ladekontrolle.

### 2.2.3 Mastzellspezifische Expression von $\text{Kit}^{\text{D814V}}$

$\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$  transgene Mäuse wurden mit der mastzellspezifischen *A-Mcpt5-Cre* Linie (Scholten et al., 2007) verpaart. Die Rekombinase Cre steht in dieser Linie unter der Kontrolle des murinen Mastzellprotease-5 Promotors (*Mcpt5*). Es konnte gezeigt werden, dass gefloxt Allele mit einer Effizienz von > 90 % spezifisch in Mastzellen vom Bindegewebstyp (CTMC) deletiert werden. In mukosalen Mastzellen kommt es zu keiner nachweisbaren Expression von Cre (Scholten, 2009). Es wurden die  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ -Linien Tg1 und Tg3 mit *A-Mcpt5-Cre* verpaart, die Häufigkeit von *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Nachkommen entsprach Mendelschen Regeln (11 bitransgene Tiere erwartet, 12 beobachtet).

#### 2.2.3.1 Mastzellvermehrung in *A-Mcpt5-Cre*/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ Tieren

Ein *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Tier im Alter von 17 Wochen zeigte keine Mastzellvermehrung in der Haut, Milz und Leber. In der Haut wurde die Mastzellendichte bestimmt. Es ergab sich ein Mittelwert von  $35,9 \pm 5,9$  Mastzellen pro  $\text{mm}^2$  im bitransgenen Tier, gegenüber  $37,3 \pm 5,8$  Mastzellen/ $\text{mm}^2$  in der Kontrolle. Durchflusszytometrisch wurde der Anteil an Mastzellen in der Peritoneallavage gemessen. Es fanden sich 0,96 % Mastzellen im *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Tier, gegenüber 1,02 % in einer *Cre*<sup>-</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Kontrolle. Um die Entwicklung der Mastzellzahl genauer zu verfolgen wurden drei *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Tieren und zwei Cre-negativen Kontrollen im Alter von 18 bis 28 Wochen mehrfach Hautbiopsien entnommen.

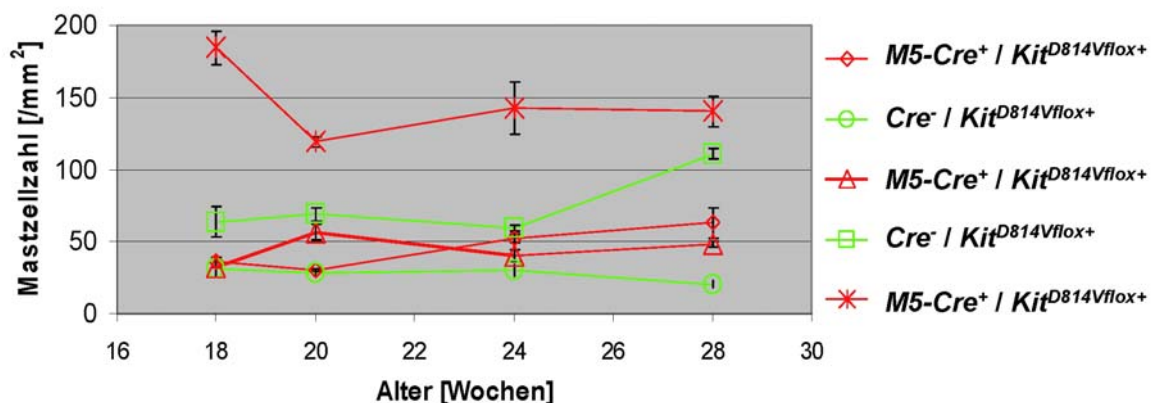


Abb. 2-38 Mastzellendichte in der Rückenhaut von *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Tieren

Im Alter von 18 bis 28 Wochen wurden *A-Mcpt5-Cre*<sup>+</sup>/ $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ <sup>+</sup> Tiere (rot) und Kontrollen (grün) wiederholt biopsiert und die Mastzellendichte wurde histologisch bestimmt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Messpunkts wieder, es wurden mehrerer Areale in derselben Biopsie gezählt. (M5-Cre, *A-Mcpt5-Cre*)

In Abb. 2-38 erkennt man die starke interindividuelle Schwankung der Mastzellzahl. Es wurde keine signifikante Zunahme der Mastzellichte in bitransgenen Tieren beobachtet, die Mittelwerte betragen  $79 \pm 53$  Mastzellen/ $\text{mm}^2$  für *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere und  $52 \pm 30$  Mastzellen/ $\text{mm}^2$  für Cre-negative Kontrollen. Nur ein Tier zeigte einen erhöhten Wert, welcher aber im Beobachtungszeitraum stabil blieb. Generell wird keine Zunahme der Mastzellichte im Zeitraum von 18-28 Wochen beobachtet. Allerdings wurden bei zwei bitransgenen Tieren multiple Foci aus circa 20-50 kompakten Mastzellen (Abb. 2-39A) beobachtet. Im Alter von 36-48 Wochen entwickelten alle *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere (n=3) aus Abb. 2-38 eine entzündliche Läsion im Nacken. Histologisch ließen sich viele Mastzellknoten von 1-3 mm Durchmesser in der Haut nachweisen. Insgesamt zeigten 4 von 8 Tieren im Alter von 36-52 Wochen Mastzellknoten in der Haut (Abb. 2-39B), alle Tiere zeigten eine diffuse Mastzellvermehrung in der Haut (Abb. 2-39D) und bei zwei Tieren zeigte sich in Leber und Milz eine schwache Infiltration durch vereinzelte Mastzellen (nicht gezeigt). In einem Tier wurden knotige Mastzellinfiltrate in einem Lymphknoten (Abb. 2-39C) beobachtet.

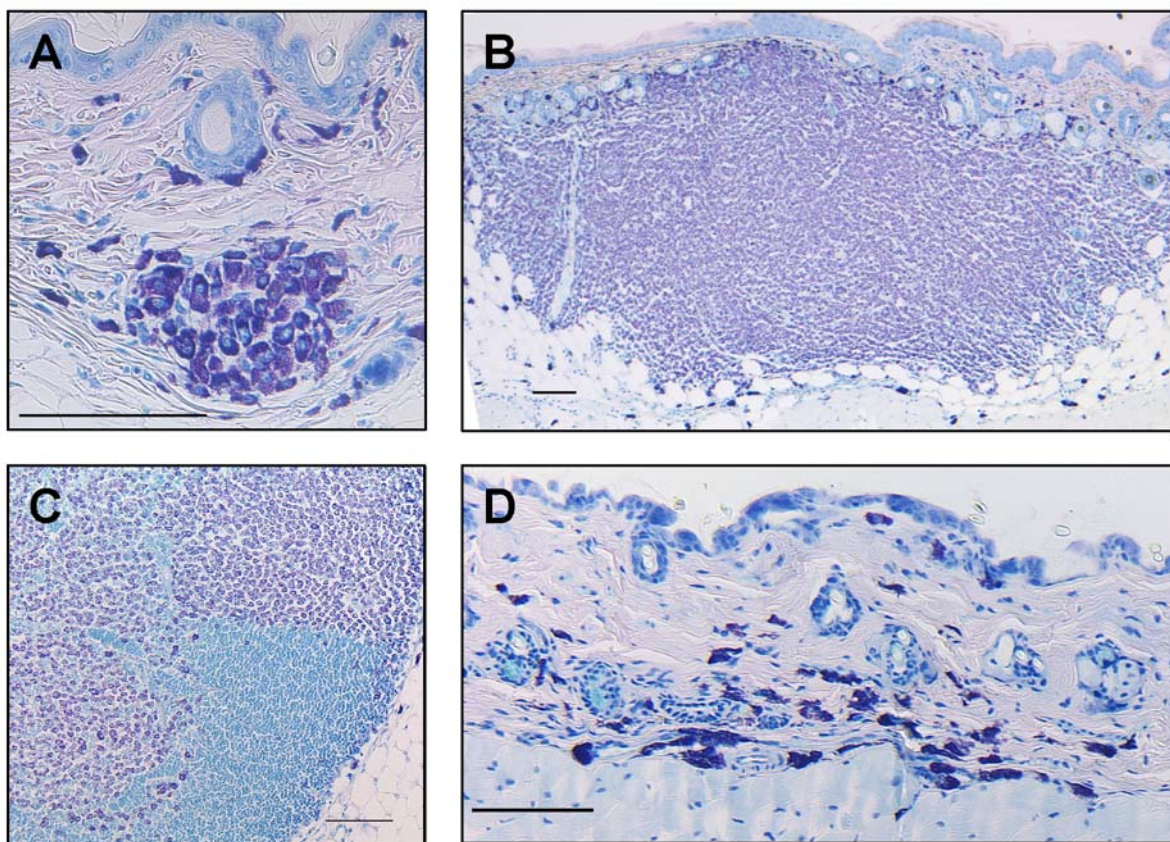


Abb. 2-39 Histologische Analyse von *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

(A) Mastzellfocus in der Rückenhaut; (B) Mastzellknoten in der Rückenhaut; (C) Mastzellinfiltration eines Lymphknotens (D) Diffuse Mastozytose, Rückenhaut. (Giemsa Färbung, Balken = 100  $\mu\text{m}$ ).

### 2.2.3.2 Entzündliche Darmerkrankung bei mastzellspezifischer Expression von $\text{Kit}^{\text{D814V}}$

Im Alter ab 30 Wochen entwickelten zwei  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere (Tg1) einen Prolaps der rektalen Mukosa. Colon und Caecum von 5 bitransgenen Tieren der Linie Tg1 im Alter von 37-42 Wochen wurden histologisch untersucht. Alle Tiere entwickelten eine starke Entzündung im Bereich des Caecums und aufsteigenden Colons (Abb. 2-40A und B). Nach Quantifizierung der Erkrankung mit Hilfe des Colitis-Scores bestimmt, ergab sich ein Medianwert von 4 (n=5) gegenüber einem Median von 0 in Kontrollen (n=4). Zwei weitere Tiere im Alter von 36 und 26 Wochen verstarben spontan. Ihr Gewicht betrug wenige Tage vor dem Todeszeitpunkt 47 % beziehungsweise 78 % des Mittelwerts der geschlechtsgleichen Geschwister. Die Kadaver konnten histologisch nicht analysiert werden.  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere aus der Gründerlinie Tg3 entwickeln im Alter von 36-52 Wochen keine entzündliche Darmerkrankung (n=3).

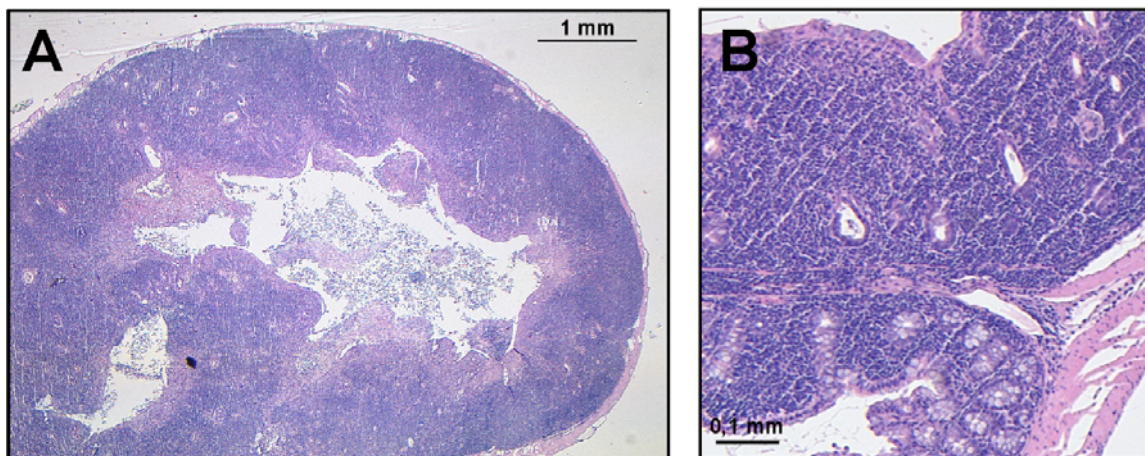


Abb. 2-40 Entzündliche Darmerkrankung in  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tieren

(A) Coecum eines  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiers im Alter von 37 Wochen. Die Mucosa ist durch starke die Entzündung weitgehend zerstört. (B) Colonmucosa bei höherer Vergrößerung, rechts unten zeigen sich noch Reste von Krypten. (HE-Färbung beider Schnitte)

Die histologische Untersuchung von Caecum und Colon auf Mastzellen ergab eine lokal unterschiedlich ausgeprägte, mukosale Mastzellvermehrung in  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tieren. Auch in Tieren der Gründerlinie Tg3 konnten fokale Vermehrungen von mukosalen Mastzellen identifiziert werden. Die Bestimmung der Chymase MMCP-1 mittels ELISA ergab eine durchschnittliche Serumkonzentration von  $21,4 \pm 14,8$  ng/ml (n=5,  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$ , Tg1) gegenüber  $13,5 \pm 27,2$  ng/ml (n=30) in Kontrollen (siehe Abb. 2-28).

### 2.2.3.3 Vermehrung von neutrophilen Granulozyten in *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

*A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere zeigen im Alter von 36-52 Wochen eine Splenomegalie, mit im Durchschnitt verdoppelten Milzgewicht ( $164 \pm 46$  mg,  $n=7$  gegenüber  $78,5 \pm 10$  mg,  $n=4$  in Cre-negativen Kontrollen). Blut und Milz wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Verteilung von neutrophilen Granulozyten ( $CD11b^+/Gr-1^+$ ), B-Zellen ( $B220^+$ ) und T-Zellen ( $CD3\epsilon^+$ ) untersucht. Es wurde eine starke Zunahme von neutrophilen Granulozyten sowohl in der Milz ( $n=5$ ) als auch im Blut ( $n=3$ ) von *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren beobachtet (Abb. 2-41A). Die durchschnittliche Verteilung von neutrophilen Granulozyten, B-Zellen und T-Zellen in der Milz wird in (Abb. 2-41B) dargestellt.

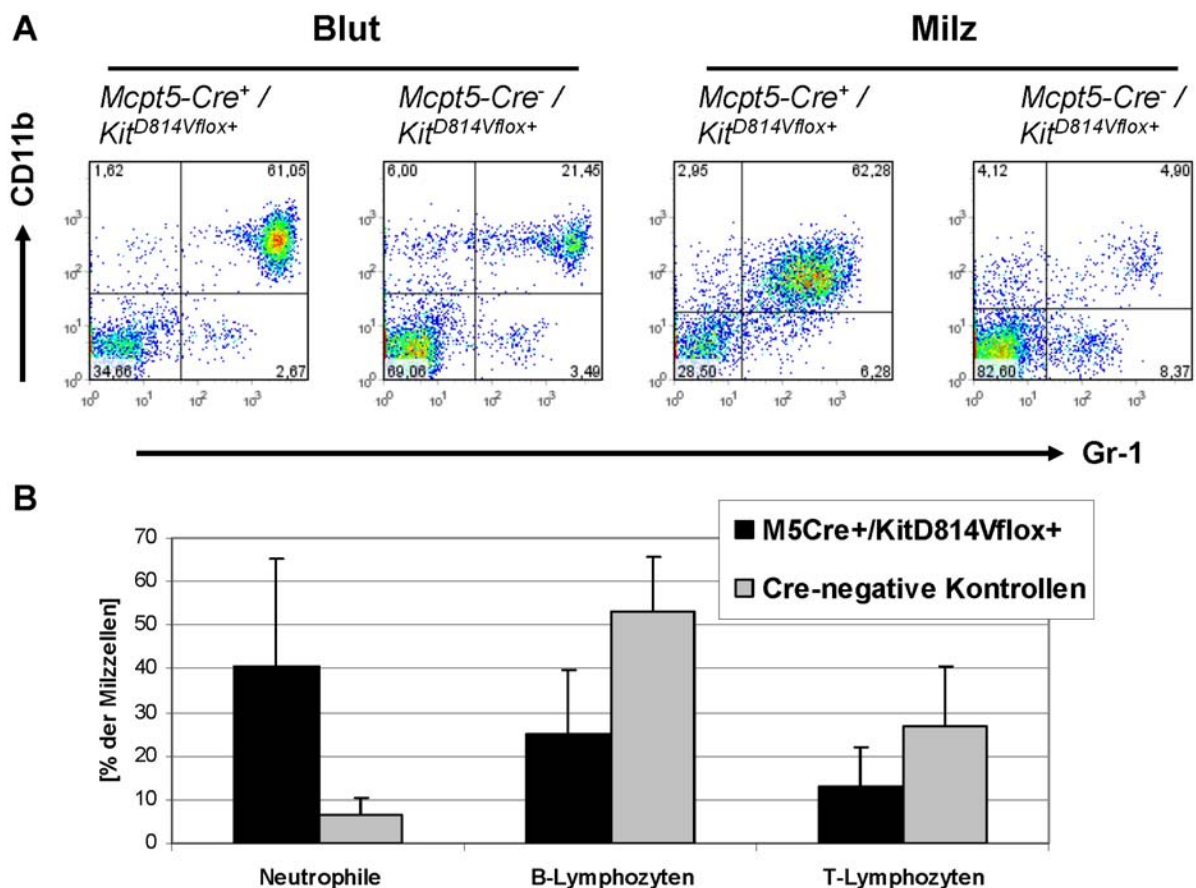


Abb. 2-41 Erhöhte Zahlen von Neutrophilen in *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren

(A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker CD11b (Mac-1) und Gr-1 (Ly6G) zeigt eine starke Zunahme von neutrophilen Granulozyten in Blut und Milz. (B) Relative Zusammensetzung der Milz für Granulozyten ( $CD11b^{hi}/Gr-1^{hi}$ ), B- ( $B220^+$ ) und T- ( $CD3\epsilon^+$ ) Lymphozyten in *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren (schwarze Balken,  $n=5$ ) und Kontrollen (graue Balken,  $n=3$ ).

Es zeigte sich eine starke Zunahme von Granulozyten, während vor allem B-Lymphozyten verringert sind. Die mittels Histologie und Durchflusszytometrie untersuchten Tieren zeigen keine kompakten Mastzellularinfiltrate in der Milz, nur einige

bitransgene Tiere zeigen verstreute, einzelne Mastzellen in der Milz. Die beobachtete Milzvergrößerung konnte daher auf die Zunahme der Granulozyten zurückgeführt werden. Im Knochenmark (n=3) von bitransgenen Tieren wurde keine Mastzellinfiltration beobachtet (Abwesenheit von Kit<sup>hi</sup>/SSC<sup>hi</sup> Zellen in der Durchflusszytometrie).

### 3 Diskussion

Ausgehend von der Erkenntnis, dass ein Großteil der Mastozytosepatienten eine somatische *Kit*<sup>D816V</sup> Mutation trägt, und dass der Differenzierungsgrad der von der Mutation ursprünglich getroffenen Zelle, die klinische Ausprägung der Erkrankung wesentlich zu determinieren scheint, war das Ziel der Arbeit die Expression eines mutierten, konstitutiv aktiven Kit-Allels in der Maus zeitlich und gewebsspezifisch zu kontrollieren.

#### 3.1 Generierung eines transgenen Mausmodells für Mastozytose

##### 3.1.1 Entwurf des Mausmodells

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten rekombinante DNA in das Genom der Maus einzubringen: zum einen, die gezielte Veränderung eines Locus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen („gene targeting“, „knock-in“ oder knock-out“), zum anderen die zufällige Integration rekombinanter DNA („Transgen“). Die Einführung der aktivierenden Mutation in den genomischen *Kit*-Locus durch gene targeting, hätte den Vorteil, dass das mutierte *Kit*-Gen unter der Kontrolle des endogenen *Kit*-Promotors stünde. Auch würde die Kopienzahl des *Kit*-Gens nicht verändert. Allerdings wäre eine derartige konstitutive *Kit*<sup>D814V</sup> Mutante wahrscheinlich nicht lebensfähig, da die entsprechende Keimbahnmutation beim Menschen bisher nie beobachtet wurde. Zudem ließe sich bei dieser Strategie die Expression des mutierten *Kit*-Allels nicht kontrollieren. Eine Kontrolle der Ausprägung von *Kit*<sup>D814V</sup> wäre grundsätzlich durch eine zusätzliche *loxP*-flankierte Stopp-Kassette im ersten *Kit*-Intron möglich. Allerdings wäre dazu eine zweite homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen erforderlich, die einen erheblichen technischen Aufwand und ein Risiko hinsichtlich der Keimbahngängigkeit der Stammzellen darstellen würde. Eine Alternative bestünde im Knock-in einer mutierten *Kit*-cDNA in den ubiquitär ausgeprägten murinen *Rosa26*-Locus. Durch ein *loxP*-flankiertes Stopp-Element und dessen kontrollierte Deletion mittels verschiedener Cre-Mausstämme, könnte die Expression des mutierten *Kit*-Rezeptors begrenzt werden. Ein Nachteil dieses Ansatzes wäre sicherlich die ektopische Expression des mutierten *Kit*-Rezeptors, da der *Rosa26*-Promotor und nicht der endogene *Kit*-Promotor genutzt würde. Diese Vorgehensweise wurde schon mehrfach für die konditionale Expression verschiedener Expressionskassetten, z.B. Reportergene, Onkogene und nicht-

codierende RNA gewählt (Hohenstein et al., 2008; Sasaki et al., 2008; Soriano, 1999).

Alternativ zum Knock-in Ansatz kann ein Mausmodell mit Expression eines konstitutiv aktiven Kit-Genes durch Integration eines transgenen *Kit*-Allels generiert werden, das dann zusätzlich zu den wt-Allelen ausgeprägt wird. Diese Strategie wurde von Zappulla et al. gewählt, die ein Modell mit Ausprägung einer humanen *Kit*<sup>D816V</sup>-cDNA unter der Kontrolle eines mastzellspezifischen Primaten-Promotors beschrieben haben. (Zappulla et al., 2005). Allerdings zeigen konventionelle Transgene häufig keine verlässliche Expression und eine Steuerung der Expression ist nicht möglich.

Transgene können alternativ auch auf der Basis von bacterial artificial chromosomes (BAC) konstruiert werden, die auf Grund ihrer Größe (bis ca. 300 kb) die gesamte genomische Sequenz und möglicherweise sämtliche Kontrollelemente eines Genlocus beinhalten. Zudem isolieren die langen 5' und 3' flankierenden Bereiche das Transgen gegen Störungen der Transgenexpression durch Effekte des Integrationsortes. Daher wird durch BAC-Transgene häufig eine verlässliche Expression, ähnlich der des ursprünglichen Genes erreicht (Giraldo and Montoliu, 2001). BAC-Konstrukte integrieren im Gegensatz zu konventionellen, kurzen Transgenen meistens in niedriger Kopienzahl (Chandler et al., 2007). Durch Cre-mediierte Deletion einer *loxP*-flankierten Stopp-Kassette, die in das erste Intron des auszuprägenden Gens, integriert wurde, kann die Genexpression gesteuert werden. Ein Vorteil gegenüber dem Knock-in ist der Verzicht auf aufwändige ES-Zellkultur und Blastozysteninjektion und die Möglichkeit, verschiedene, weit voneinander entfernte Bereiche eines Genes zu manipulieren. Auf Grund der in der Arbeitsgruppe vorhandenen technischen Möglichkeiten und des geringeren Zeitbedarfs wurde das Experiment auf der Grundlage eines Cre/*loxP*-gesteuerten BAC-Transgens geplant.

### 3.1.2 Konstruktion des *Kit*<sup>D814VfloX</sup> Transgens

Die Konstruktion des *Kit*<sup>D814VfloX</sup> Transgens erfolgte mit Hilfe der Red/ET Recombineering Technologie. Die einzelnen Rekombinationsschritte wurden durch „BAC Fingerprinting“ überprüft. Dabei wurden mehrfach unerwünschte zusätzliche Rekombinationsereignisse festgestellt. Es konnten aber für jeden Konstruktionsschritt korrekt rekombinierte Klone identifiziert werden. Nach erfolgreicher Rekombination wurden oftmals unerwünschte Punktmutationen in Sequenzbereichen gefunden, die den als Primer für die Amplifikation der linearen DNA-Fragmente verwendeten Oligonukleotiden entsprachen und welche die Homologieregionen enthielten. Bei der



Oligonukleotidsynthese wird das Oligonukleotid schrittweise um jeweils ein Nukleotid verlängert, wobei dieser Prozeß jedoch nie quantitativ abläuft, weshalb auch verkürzte, sogenannte n-1 Oligonukleotide entstehen. Die fehlerhaft synthetisierten Primer finden sich nach der Amplifikation im PCR-Produkt wieder und werden dann in den BAC-Vektor einrekombiniert. Da bei längeren Oligonukleotiden die Wahrscheinlichkeit für n-1 Fehler zunimmt, wurden Oligonukleotide ab einer Länge von 80 bp einer HPLC-Reinigung unterzogen, die eine Abreicherung von fehlerhaften n-1 Oligonukleotiden ermöglicht. Auch die Verwendung einer DNA-Polymerase mit Fehlerkorrektur erwies sich zur Vermeidung von Mutationen bei der Amplifikation von längeren Kassetten als hilfreich. Generell wurde nach der Rekombination die modifizierte Sequenz einschließlich der Homologieregionen durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Bei der Insertion der Stopp-Kassette in *Kit* Intron1-2 wurde anfangs versucht den Rekombinationsschritt mit Hilfe der Red/ET Counterselection Technik zur Einführung nicht-selektierbarer Sequenzen durchzuführen. Die Insertion der *RpsL-neo* Kassette gelang problemlos, allerdings konnten im zweiten Schritt keine Klone identifiziert werden, die *RpsL-neo* gegen die nicht-selektierbare Stopp-Kassette ausgetauscht hatten. Zwar wurden Klone gefunden, die *RpsL-neo* deletiert hatten, diese zeigten jedoch keine Insertion der Stopp-Kassette. Das Problem beim zweiten Rekombinationsschritt lag wahrscheinlich in der Selektion für den Verlust der *RpsL-neo*-Kassette. Jedes Ereignis, das zur Inaktivierung des wt-*RpsL*-Allels führte, wurde selektiert, vor allem auch große, unerwünschte Deletionen. Das Problem wurde gelöst durch Insertion eines zusätzlichen prokaryontischen Promotorelementes (*gb2*), welches eine Expression (und Selektion) der in der Stopp-Kassette enthaltenen Neomycin (bzw. Kanamycin)-Resistenz auch in *E. coli* ermöglichte. Die Integration des modifizierten Stopp-Elementes erfolgte danach problemlos durch einfache homologe Rekombination.

Nach der Pronukleusinjektion des Konstruktes wiesen 9 von 59 Nachkommen eine Integration von *Kit*<sup>D814Vlox</sup>-DNA auf. In vier Gründertieren konnte die volle Länge der transgenen DNA nachgewiesen werden. In fünf Gründertieren waren unvollständige Integrationen des BAC-Transgens erfolgt. Die Auswahl der transgenen Gründerlinien beruhte im wesentlichen auf der Verpaarung mit Deleter-Cre und der nachfolgenden Beobachtung des Phänotyps (perinatale Lethalität, Mastzellhyperplasie der überlebenden Tiere). Für die drei phänotypisierten Gründerlinien wurde die

Kopienzahl durch Southern Blot Analyse abgeschätzt. Die gefundenen Kopienzahlen und deren stabile Vererbung deckten sich mit der Beobachtung, dass pronukleusinjizierte BAC-Konstrukte häufig als Konkatemere mit einstelliger Kopienzahl an einer zufälligen Stelle in das murine Genom integrieren (Chandler et al., 2007). Im Fall der Transgenlinie Tg3 mit einer Kopienzahl von 2 konnte das SP6 Ende des Konstruktes nicht nachgewiesen werden. Allerdings muss zumindest die Kit-codierende Sequenz vollständig integriert haben, da sich in bitransgenen Mutanten durch RT-PCR von polyadenylierter RNA ein  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$  Transkript nachweisen ließ (siehe Abb. 2-36).

### 3.1.3 Aktivierung des $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ Transgens durch Cre-medierte Rekombination *in vivo*

Durch die Expression der Cre-Rekombinase kam es zur Deletion der Stopp-Kassette in allen drei Gründerlinien. Durch Cre-medierte Rekombination von zwei *loxP*-Sites benachbarter Transgen-Kopien innerhalb des Konkatemers kann es aber auch zur Reduktion der Transgen-Kopienzahl kommen. Transgene integrieren meist als sogenannte „head-to-tail“ Konkatemere (Smith, 2001), was zu einer unidirektionalen Orientierung der *loxP*-Erkennungssequenzen führt (Abb. 3-1).

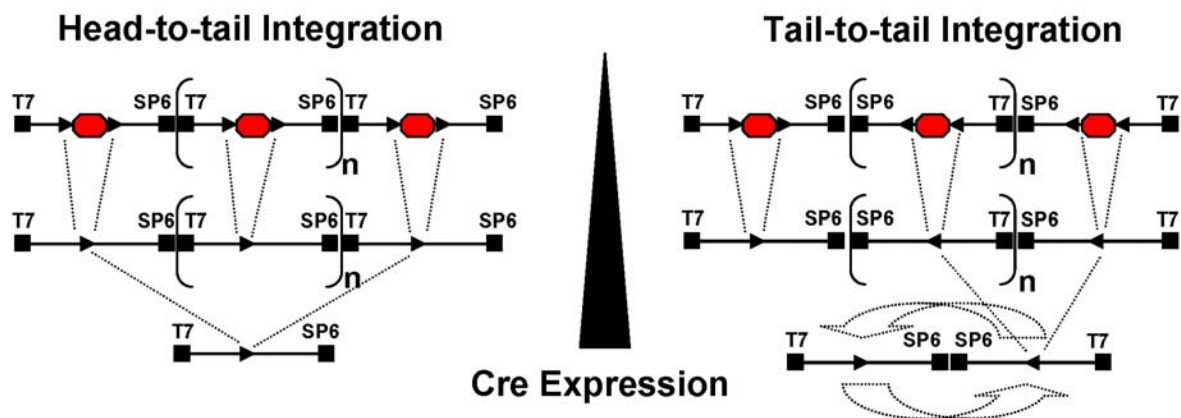


Abb. 3-1 Zwei Szenarien der Transgen-Integration und Cre/*loxP* mediierter Rekombination innerhalb eines  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$  Konkatemers

Links: Durch „Head-to-tail“ Integration des  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$  Konstrukts entstehen multiple (n) Transgenkopien mit unidirektional angeordneten *loxP*-Erkennungssequenzen (schwarze Dreiecke). Cre-Expression führt zur Deletion der Stopp-Kassette (rotes Achteck), starke Cre-Expression führt zur Verringerung der Kopienzahl, falls die äusseren *loxP*-Sequenzen unidirektional angeordnet sind. Rechts: Bei teilweiser „Tail-to-tail“ oder („Head-to head“ Integration kommt es auch zur Deletion der Stopp-Kassette und zu einer partiellen Reduktion der Kopienzahl. Sequenzbereiche, die von *loxP*-Sites in gegenläufiger Orientierung flankiert sind, werden kontinuierlich invertiert, solange eine ausreichende Cre-Expression vorliegt.

Es konnte gezeigt werden, dass Cre-Rekombinase *loxP*-Erkennungsstellen auch über lange Distanzen (Megabasen bzw. Centimorgan) deletiert. (Zheng et al., 2000). Daher kann zusätzlich zur Deletion der Stopp-Kassette auch eine Deletion multipler *Kit*<sup>D814Vflox</sup>-Kopien erfolgen, was zur Reduktion der Kopienzahl führt (Abb. 3-1). Durch Southern Blot Analyse (Abb. 2-33) von überlebenden *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox+</sup> Tieren konnte eine Reduktion der Transgen-Kopien nachgewiesen werden. Die Intensität des Signals, das die Deletion der Stopp-Kassette widerspiegelte, betrug circa 50 % der Intensität der Bande, die von derselben Sonde im Bereich der zwei wt *Kit*-Kopien markiert wurde. Im Fall der Tg1-Linie reduzierte sich die Kopienzahl von sechs auf eine Kopie. Für die entstandene, einfache *Kit*<sup>D814Vflox</sup>-Kopie mit Deletion der Stopp-Kassette konnte mittels PCR sowohl das T7 als auch das SP6 Ende nachgewiesen werden, was als starker Hinweis auf die Integrität der verbleibenden Kopie zu werten ist. Interessanterweise konnte im Fall der von Gründerlinie Tg3 abstammenden *Del-Cre*<sup>+</sup>/*Kit*<sup>D814Vflox+</sup> Tiere keine Reduktion der Kopienzahl festgestellt werden (Abb. 2-33). Möglicherweise handelt es sich hier um eine „Head-to-head“ oder „Tail-to-tail“ Integration. Nach Deletion der Stopp-Kassette wären die verbleibenden *loxP*-Erkennungssequenzen gegensätzlich orientiert, was zu einer kontinuierlichen Inversion, aber nicht zur Deletion des *loxP*-flankierten Bereichs führen sollte (Abb. 3-1).

Die *Mx1-Cre*-Linie deletiert bekanntermaßen *loxP*-flankierte DNA in verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Effizienz (Kühn et al., 1995). Da die Effizienz Cre-medierter Rekombination negativ mit der Länge der *loxP*-flankierten Sequenz korreliert (Zheng et al., 2000), führt möglicherweise eine schwache, transiente Cre-Expression zwar zur Deletion der Stopp-Kassette, nicht aber zur Reduktion der *Kit*<sup>D814Vflox</sup> Kopienzahl. Eine Southern Blot Analyse (Abb. 2-20) zeigte deutlich, dass in Leber und Milz, also Geweben in denen *Mx1-Cre* effizient rekombiniert, eine deutliche Reduktion der ursprünglichen „flox Stop“-Bande vorlag. Die Deletion der Stopp-Kassette resultierte in einer „del Stop“-Bande, deren Intensität jedoch geringer als das diploide wt *Kit*-Allel war. Folglich kam es auch in diesen Geweben bei starker Cre-Expression zur Reduktion von sechs auf weniger als zwei Transgen-Kopien. Dass sich bei BAC-Transgenen die Stärke der Genexpression oftmals zur Kopienzahl proportional verhält, ist mehrfach gezeigt worden (Chandler et al., 2007). Für *Kit* wurde diese Abhängigkeit in einem *Kit*-Reporter BAC-transgenen Mausstamm beobachtet (Berrozpe et al., 2006). Es ist daher denkbar, dass in unserem System

bei schwacher Cre-Ausprägung nur die Stoppkassette deletiert wurde, jedoch keine Reduktion der Kopienzahl erfolgte. Diese Situation würde zu einer stärkeren Ausprägung des konstitutiv aktiven Kit-Rezeptors führen, als dies bei weitestmöglicher Reduktion der Kopienzahl durch stärkere Cre-Expression der Fall wäre. Zusammenfassend kann die Behauptung aufgestellt werden, dass eine schwächere Cre-Expression möglicherweise zu einer stärkeren Kit-Aktivität führt.

Ein Schwachpunkt des vorliegenden Modells ist die Schwierigkeit die Expression des mutierten Kit-Allels zu quantifizieren und zu verfolgen. *Kit*<sup>D814VfloX</sup> und wt *Kit* mRNA und Protein unterscheiden sich nur durch die Punktmutation beziehungsweise den dadurch bedingten Austausch einer einzelnen Aminosäure, weshalb eine Unterscheidung auf der Ebene der Transkripts oder des Proteins bisher nur sehr eingeschränkt möglich war. Dass das Expressionsmuster des transgenen BAC-Konstrukts dem des wt *Kit*-Allels entspricht, erscheint wahrscheinlich, kann jedoch nicht bewiesen werden. Generell zeigen BAC Transgene häufig ein dem endogenen Locus ähnliches Expressionsverhalten, jedoch konnte kürzlich ein regulatorisches Element -154 kb oberhalb des *Kit*-Startcodons identifiziert werden (Berrozpe et al., 2006), welches für die Expression von Kit in reifen Mastzellen als zwingend nötig beschrieben wurde. Dieses Element ist nicht im hier beschriebenen *Kit*<sup>D814VfloX</sup> BAC Transgen enthalten, das 80 kb flankierende Sequenz 5' des *Kit*-Startcodons umfasst. Diese Tatsache könnte die schwache Expression von Kit<sup>D814V</sup> in isolierten und kultivierten Mastzellen aus bitransgenen Tieren erklären. Auf Grund der möglicherweise unzulänglichen Expression des Transgens in reifen Mastzellen und der genannten Probleme bei der Differenzierung von wt und transgenem Kit-Transkript beziehungsweise Protein, wurde in der Arbeitsgruppe ein neues BAC-Transgen generiert. Das neue Transgen enthält zusätzlich zu dem hier beschriebenen Konstrukt auch das -154 kb regulatorische Element und ein Proteintag in der Extrazellulärdomäne (Peschke, 2008). Die Phänotypisierung der neuen „reg*Kit*<sup>D814VfloX</sup>“-transgenen Gründerlinien steht noch aus.

## 3.2 Phänotypen von Tieren mit Ausprägung von $Kit^{D814V}$ in unterschiedlichen Zellkompartimenten

### 3.2.1 Mastzellhyperplasie

Nach Verpaarung von  $Kit^{D814V/flox}$ -transgenen Mäusen mit verschiedenen Cre-Rekombinase ausprägenden Stämmen, wurde eine starke Vermehrung von Mastzellen in allen adulten Tieren beobachtet. Die meisten Tiere entwickelten zusätzlich kompakte, knotenförmige Mastzellinfiltrate in der Haut. Dies zeigt prinzipiell den starken Effekt der aktivierenden  $Kit^{D814V}$  Mutation auf die Proliferation von Mastzellen. Im Vergleich zur humanen Erkrankung, bei der ein Großteil der Patienten einen indolenten Verlauf zeigen, entwickelten bitransgene Tiere einen progressiven Phänotyp. Dies könnte mehrere Gründe haben: 1. Bei den meisten humanen Fällen handelt es sich um eine klonale Erkrankung, das heißt eine somatische, aktivierende Mutation tritt in einer einzelnen Zelle auf, welche dann klonal expandiert (Akin, 2005). Wahrscheinlich beeinflussen Differenzierungsgrad und proliferative Kapazität der von der Mutation betroffenen, hämopoetischen Zelle den Verlauf der Krankheit. In unserem Modell wird durch Induktion der Cre-Expression in  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814V/flox+}$  Tieren gleichzeitig eine Vielzahl von Mutationsereignissen in unterschiedlich differenzierten Zellen ausgelöst. 2. Wie bereits diskutiert, ist in unserem Modell eine Verstärkung der Kit-Aktivität nicht nur durch die Mutation, sondern zusätzlich durch eine Erhöhung der Anzahl der  $Kit$ -Allele zu verzeichnen. 3. Es wird eine schwächere Onkogenität der humanen  $Kit^{D816V}$  Mutation gegenüber ihrem murinen Homolog  $Kit^{D814V}$  diskutiert (Mayerhofer et al., 2008), was auch im Einklang mit dem bereits erwähnten Mausmodell von Zappulla et al. steht. Hier verursachte die Expression von humanem  $Kit^{D816V}$  in murinen Mastzellen einen nur milden Phänotyp (Zappulla et al., 2005). Jedoch scheinen im hier beschriebenen Modell die Mastzellen ebenfalls nicht maligne transformiert zu sein, da kultivierte, transgene Mastzellen keine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu wt-Mastzellen zeigten.

Die Beobachtung, dass die bekannte sporadische Cre-Expression des  $Mx1-Cre$  Transgens ausreichend war, auch in nicht-induzierten  $Mx1-Cre^+/Kit^{D814V/flox+}$  Tieren einen ähnlich starken Phänotyp zu verursachen, wie in Tieren, die mit pl:C induziert wurden, kann folgendermaßen erklärt werden: Die vermutlich wenigen Zellklone, die  $Kit^{D814V/flox}$  durch Hintergrundrekombination aktivieren, haben gegenüber Zellen ohne

Ausprägung von  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$  einen Wachstumsvorteil und verdrängen die letzteren. In Cre-negativen Kontrolltieren wurde kein Phänotyp beobachtet, weshalb eine Hintergrundaktivität des gestoppten  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$ -Transgens ausgeschlossen werden kann.

Bei mastzellspezifischer Deletion des Stopp-Elements von  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$  zeigt sich ein langsamer Verlauf der Mastzellakkumulation. In jüngeren Tieren (<6 Monate) wurde keine Mastzellvermehrung beobachtet. Ältere  $A\text{-Mcpt5-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tiere zwischen 6 und 12 Monaten entwickelten aber eine deutliche Mastzellhyperplasie. Die im Vergleich mit  $Mx1\text{-Cre}^+$  oder  $Del\text{-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  Tieren langsamere Entwicklung der Mastzellhyperplasie kann durch das im Transgen fehlende regulatorische Element erklärt werden, welches sich 154 kb 5' der codierenden Sequenz von  $\text{Kit}$  befindet und Voraussetzung für die Expression von  $\text{Kit}$  in Mastzellen ist (Berrozpe et al., 2006). Die Bedeutung dieses regulatorischen Elements zeigt sich auch im Phänotyp der  $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$  Mausmutante, welche trotz intakter codierender Sequenz des  $\text{Kit}$ -Gens mastzelldefizient ist. In diesem Stamm führt die chromosomale Inversion eines 3 Mb Fragments ab -67,5 kb 5' von  $\text{Kit}$  zum Verlust des regulatorischen Elements und in Folge dessen zur Mastzelldefizienz (Nigrovic et al., 2008). Die Abwesenheit dieses regulatorischen Elements erklärt wahrscheinlich die schwache Expression des  $\text{Kit}^{\text{D814Vflox}}$  Transgens in isolierten und kultivierten Mastzellen (siehe Abb. 2-22, Abb. 2-23, Abb. 2-36). Es konnte in transgenen BMNC auch keine gesteigerte Proliferation gegenüber Kontrollen festgestellt werden. Jedoch ließ sich durch Western Blot Analyse in  $Del\text{-Cre}^+/\text{Kit}^{\text{D814Vflox}+}$  BMNC eine konstitutive Autophosphorylierung von  $\text{Kit}$  feststellen, welche durch die Mutation in der Aktivierungsschleife verursacht sein musste, da sie nicht durch den Inhibitor Imatinib hemmbar war. Andererseits schien die konstitutive Aktivierung des  $\text{Kit}$ -Rezeptors nur geringfügig gewesen zu sein, da nur eine schwache Phosphorylierung nachgeschalteter Signalwege beobachtet wurde. Die Annahme einer nur geringfügigen, spontanen  $\text{Kit}$ -Aktivierung in reifen Mastzellen wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass sowohl Kontroll- als auch  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$ -BMNC auf Zugabe von SCF mit deutlich gesteigerter Phosphorylierung beziehungsweise Proliferation reagierten. Im Gegensatz dazu waren  $\text{Kit}^{\text{D816V}}$ -transgene BMNC (Zappulla et al., 2005) und eine  $\text{Kit}^{\text{D814V}}$  transfizierte Zelllinie (Kitayama et al., 1995) durch den mutierten  $\text{Kit}$ -Rezeptor bereits maximal aktiviert und zeigten daher keine zusätzliche Phosphorylierung oder Proliferation durch den Liganden SCF. Die

Hemmbarkeit der konstitutiven Aktivierung in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* BMMC durch den Inhibitor Midostaurin zeigt ein mögliche Therapieoption für Mastozytose auf, welche am vorliegenden Modell in naher Zukunft *in vivo* evaluiert werden soll.

Wesentliche qualitative und quantitative Unterschiede hinsichtlich der Mastzellhyperplasie konnten zwischen den drei transgenen Gründerlinien nicht beobachtet werden. *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* bitransgene Tiere aus allen drei Linien entwickelten eine Mastzellvermehrung und häufig große Mastzellknoten in der Haut. Auch mukosale Mastzellen erschienen in allen drei Linien vermehrt. Zur besseren Quantifizierung der Mastzellinfiltration wurde die Mastzellprotease MMCP-1 im Serum bestimmt. Zur Diagnose der humanen Erkrankung Mastozytose wird die Serumkonzentration der Mastzellprotease Tryptase  $\beta$  als ein mit der Gesamt-Mastzellzahl positiv korrelierender Marker genutzt (Schwartz et al., 1987). Die Chymase MMCP-1 wird in mukosalen Mastzellen exprimiert und es wurde gezeigt dass sie mit der Zahl der mukosalen Mastzellen korreliert (Yamada et al., 2008). Die Durchschnittswerte von *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* und *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren waren gegenüber den Werten von Kontrolltieren deutlich erhöht, was auf eine mukosale Mastzellvermehrung schließen lässt. Allerdings ist bekannt das Nematodeninfektionen zu einer starken intestinalen Mastzellhyperplasie führen und damit zur Erhöhung der Serumkonzentration MMCP-1 (Wastling et al., 1997). In unserer Tierhaltung traten im Beobachtungszeitraum Infektionen mit dem Nematoden *Aspicularis tetraptera* auf. In wie weit die hier beschriebene Kolonie davon betroffen war, ist unbekannt. Möglicherweise erklärt diese Infektion aber die teilweise recht hohen Werte der Kontrolltiere.

*A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere zeigten keine eindeutige Erhöhung der MMCP-1 Konzentration und histologisch wurde eine lokal stark schwankende mukosale Mastzellzahl festgestellt, so dass eine intestinale Mastzellhyperplasie fraglich ist. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung das *A-Mcpt5-Cre* nur in CTMC und nicht in MMC rekombiniert (Scholten, 2009).

### 3.2.2 Hämatologische Neoplasie in *Mx1-Cre/Kit<sup>D814Vflox</sup>* Tieren

Ungefähr die Hälfte der *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Nachkommen der Gründerlinie Tg1 entwickelte eine B-Zellneoplasie. Die Tumorzellen zeigten eine blastär-lymphoide Morphologie, exprimierten die B-Lymphozyten Marker B220 und CD19. Die neoplastischen Zellen exprimierten kein Immunglobulin auf der Zelloberfläche, was als Hinweis auf eine unreife Vorläuferzelle gesehen werden kann. In der normalen B-

Zellentwicklung zeigen Prä B-Zellen keine und Pro B-Zellen eine schwache, durchflusszytometrisch nicht-detektierbare Expression von Oberflächen IgM (Rolink et al., 1999). Die neoplastischen B-Zellen zeigten eine mäßige Expression von Kit. Interessanterweise konnte nur Kit<sup>D814V</sup>-Transkript und kein wt-Transkript nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Überexpression des transgenen Kit Allels, möglicherweise durch Deletion der Stopp-Kassette ohne gleichzeitige Kopienreduktion (s.o.) Dafür spricht auch die Abwesenheit von hämatopoetischen Neoplasien in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814V/flox+</sup>* Überlebenden, obwohl hier alle Zellen ein potentiell aktives Kit<sup>D814V</sup> Transgen tragen, allerdings in reduzierter Kopienzahl. Eine weitere Erklärung für die beobachtete Überexpression des Kit<sup>D814V</sup> Allels könnten sekundäre Mutationsereignisse wie Genamplifikationen oder Translokationen sein.

Wahrscheinlich werden zur Entwicklung einer B-Zellneoplasie weitere onkogene Mutationen benötigt, entsprechend der Theorie von Knudson, dass es zur Transformation von Zellen in der Regel mehrere onkogene Ereignisse benötigt (Knudson, 2001). Dies könnte auch erklären, dass nur die Hälfte der Tiere trotz des identischen genetischen Hintergrundes eine Neoplasie entwickelte. Interessanterweise tritt die Neoplasie meist im Alter von 4 Monaten, in einem relativ engen Zeitfenster auf. Ältere Tiere waren dann nicht mehr betroffen, obwohl sie statistisch gesehen noch mehr „onkogene Treffer“ angesammelt haben müssten, was dann zu einer mit dem Alter kontinuierlich ansteigend Neoplasieinzidenz und nicht zur beobachteten glockenförmigen Verteilung führen sollte.

Die B-Zellneoplasie konnte in *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814V/flox+</sup>* Nachkommen aus zwei transgenen Linien (Tg1 und Tg3) beobachtet werden. Wenn die Neoplasie nur in Nachfahren einer Linie aufgetreten wäre, hätte der Phänotyp auch möglicherweise durch den unbekanntem Integrationslocus des Transgens verursacht werden können. Eine weitere mögliche Erklärung für das exklusive Auftreten der Neoplasie in *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814V/flox+</sup>* Bitransgenen, könnte im *Mx-Cre*-Allel *per se* liegen. Es ist bekannt das Cre-Expression DNA Schäden, zum Beispiel chromosomale Aberrationen durch Rekombination kryptischer, endogener *loxP*-Sites, induziert (Loonstra et al., 2001). Möglicherweise führt erst das Zusammenspiel der Genotoxizität von Cre und der Onkogenität von Kit<sup>D814V</sup> zur Zelltransformation. Allerdings erscheint dies unwahrscheinlich, da uninduziert nur wenig Cre exprimiert wird und auch kein Unterschied in der Neoplasiehäufigkeit zwischen induzierten und nicht-induzierten bitransgenen Tieren beobachtet wurde. Ebenfalls gegen eine Beteiligung der Cre-



Rekombinase an der Transformation der B-Zellen spricht die Abwesenheit der Neoplasie in *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Überlebenden, da hier die Rekombinase ubiquitär exprimiert wird.

Auch Kitayama et al. beobachteten bei retroviraler Transduktion von Knochenmarkszellen mit *Kit<sup>D814V</sup>* und nachfolgendem adoptivem Transfer, die Entwicklung B220<sup>+</sup> B-Zellneoplasien. Möglicherweise führt die Überexpression oder ektopische Expression von *Kit<sup>D814V</sup>* in hämatopoetischen Vorläufern bevorzugt zu B-Zellneoplasien. Bei humanen Patienten werden zwar begleitende hämatologische Erkrankungen (SM-AHNMD) beobachtet, allerdings handelt es sich hierbei meistens um myeloische Neoplasien (Sperr et al., 2002).

### 3.2.3 Darmentzündung durch konstitutive Aktivierung von Kit

Sämtliche adulten *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* und *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tiere der Gründerlinien Tg1 und Tg2 entwickelten eine starke Entzündung der Mucosa von Caecum und Colon. Die intestinale Entzündung verursachte Gewichtsverlust, schmierige Faeces und teilweise einen Prolaps der rektalen Mucosa. In der mittelbaren Umgebung der inflammatorischen Läsionen wurden erhöhte Zahlen von mukosalen Mastzellen gefunden und in diesen Tieren wurde eine erhöhte MMCP-1 Serumkonzentration gemessen, was ebenfalls auf eine Vermehrung mukosaler Mastzellen hinweist. In einem experimentellen Colitismodell, das auf Kontaktsensibilisierung und nachfolgender intrarektaler Provokation mit dem Kontaktallergen Dinitrofluorobenzol (DNFB) basiert, konnte eine kritische Rolle von Mastzellen bei der entzündlichen Schädigung der Mukosa gezeigt werden (Rijnierse et al., 2006a). Die Daten der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass auch im *Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>*-Modell Mastzellen wesentlich an der Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankung beteiligt sind. Der formale Beweis für die pathogenetische Relevanz der Mastzellen steht jedoch aus. Eine Beteiligung anderer Kit-ausprägender Zellen, deren Funktion durch *Kit<sup>D814V</sup>* Expression möglicherweise dereguliert war, an der intestinalen Entzündung kann nicht ausgeschlossen werden. Dass auch *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>* Tiere (außer Tg3) eine starke Darmentzündung entwickelten, spricht einerseits für eine pathogenetische Rolle der Mastzellen. Andererseits ist bekannt, dass *A-Mcpt5-Cre* nicht in mukosalen Mastzellen deletiert. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, die mastzellspezifische Aktivierung des *Kit<sup>D814Vflox<sup>+</sup></sup>*-Transgens durch *A-Mcpt5-Cre* nachzuweisen.

Unklar ist der Befund, dass bitransgene Tiere der Gründerline Tg3 keine beziehungsweise nur geringfügige intestinale Entzündung aufwiesen, obwohl diese Tiere auch eine starke Vermehrung von kutanen Mastzellen und mukosalen Mastzellen zeigten. Die Aufklärung der Ursache für die unterschiedliche Entwicklung der Darmentzündung zwischen den Gründerlinien Tg1 und Tg2 (starke Colitis) einerseits und Tg3 (fast keine Colitis) andererseits, könnte bei der Identifizierung des tatsächlichen Auslösers hilfreich sein.

Möglicherweise ist nicht nur die Vermehrung von Mastzellen für die Entwicklung der intestinalen Entzündung erforderlich, sondern auch deren abnormale Aktivierung, durch zum Beispiel deregulierte Kit-Signale oder ein bestimmtes mikrobielles Milieu. Viele Mausmodelle für entzündliche Darmerkrankungen werden wesentlich durch die intestinale Flora determiniert und die Entzündung tritt beispielsweise unter keimfreien Bedingungen oder antibiotischer Therapie nicht auf (Elson et al., 2005). Es ist bekannt, dass Mastzellen mit Pathogen-Rezeptoren wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren ausgestattet sind und an der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunität beteiligt sind (Marshall, 2004). Möglicherweise führt eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Mastzellmediatoren, wie TNF $\alpha$  oder IL-1 durch mikrobielle Stimuli zur Initiation und Aufrechterhaltung der Darmentzündung. Die Behandlung weniger, erwachsener *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere mit den Antibiotika Metronidazol und Ciprofloxacin bewirkte keine Linderung der intestinalen Entzündung (nicht gezeigt). Allerdings spricht dieser Befund nicht zwangsläufig gegen eine pathogenetische Rolle der mikrobiellen Flora, da die Keimreduktion nur einen protektiven und keinen kurativen Effekt haben könnte. Weiterhin könnte der/die verursachenden Keim(e) gegenüber den verwendeten Antibiotika resistent sein. Die Untersuchung gnotobiotischer *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere könnte zur Aufklärung dieser Frage beitragen.

In einem weiteren Experiment mit oben genannten rektalen Kontaktsensibilisierungsmodell wurde gezeigt, dass die Entwicklung der entzündlichen Darmerkrankung durch TNF $\alpha$ -Freisetzung aus Mastzellen verursacht wurde (Rijnierse et al., 2006b). Allerdings konnten in *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* und *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* keine erhöhten TNF $\alpha$ -Spiegel im Serum gemessen werden (nicht gezeigt), eine lokale Erhöhung von TNF $\alpha$  im mukosalen Gewebe kann aber nicht ausgeschlossen werden. Zur Aufklärung der Rolle von TNF $\alpha$  bei der Pathogenese der beobachteten

Darmentzündung wird momentan ein inaktiviertes TNF-Rezeptor-Allel (TNFR1 p55 -/-) (Pfeffer et al., 1993) in das *Mx1-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814VfloX</sup>* Modell eingekreuzt. Die Relevanz der im Mausmodell beobachteten Darmentzündung für Mastozytosepatienten ist unklar. Viele Patienten leiden unter wiederkehrenden gastrointestinalen Symptomen wie Übelkeit, Durchfälle und Krämpfe. Bisher wurden diese Symptome üblicherweise als anaphylaktoide Beschwerden, zum Beispiel durch Histaminfreisetzung aus Mastzellen, interpretiert (Castells and Austen, 2002). Möglicherweise leidet ein Teil der Patienten auch unter chronischen Darmentzündungen, es sind Einzelfälle beschrieben (Bedeir et al., 2006), aber eine routinemäßige Untersuchung des Gastrointestinaltrakts, etwa durch Magen- oder Darmbiopsien findet normalerweise nicht statt.

### 3.2.4 Zunahme von neutrophilen Granulozyten im Mausmodell

In bitransgenen *Kit<sup>D814VfloX</sup>* Tieren wurde eine Vermehrung neutrophiler Granulozyten im Blut und in der Milz beobachtet, einhergehend mit einer Vergrößerung der Milz. Die erhöhten Zahlen von Granulozyten und die Splenomegalie könnten eine Reaktion auf die chronische Darmentzündung und die kutanen Ulzerationen darstellen.

Es scheint jedoch auch denkbar, dass die erhöhte Zahl von Neutrophilen direkt durch deregulierte Mastzellfunktionen zu erklären ist. Es finden sich viele Berichte über die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch Mastzellen (Biedermann et al., 2000; Malaviya et al., 1996; Zhang et al., 1992). Möglicherweise führt die starke Mastzellvermehrung in bitransgenen *Kit<sup>D814VfloX</sup>* Tieren deshalb zu einer gesteigerten Granulopoese. Die Vermehrung von Neutrophilen in *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814VfloX</sup>* Tieren spricht einerseits für die Beteiligung von Mastzellen an der gesteigerten Granulopoese. Andererseits könnte der beobachtete Phänotyp in diesen Tieren durch Zellklone, die durch sporadische Cre-Expression *Kit<sup>D814VfloX</sup>* aktiviert haben und daher expandieren, verursacht worden sein. Es zeigt sich wieder die Wichtigkeit einer Verfolgung der *Kit<sup>D814V</sup>*-Expression. Ein erster Ansatz wäre der Nachweis der An- oder Abwesenheit einer Nicht-Mastzellpopulation mit deletierter Stopp-Kassette durch Southern Blot Analyse von *A-Mcpt5-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814VfloX</sup>* Tieren.

Es könnte aber auch die deregulierte Kit-Aktivität in hämatopoetischen Stammzellen und in myeloischen Vorläuferzellen zu einer Vermehrung von neutrophilen Granulozyten führen. Interessanterweise zeigen *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mutanten ebenfalls eine Splenomegalie, die einhergeht mit einer Zunahme von neutrophilen Granulozyten in

Milz, Blut und Knochenmark (Nigrovic et al., 2008). Wie bereits erwähnt, fehlt im *W-sh*-Allel ein regulatorisches Element, das für Kit-Expression in reifen Mastzellen Voraussetzung ist, daher sind *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Tiere mastzelldefizient. Die Ergebnisse von Nigrovic et al. lassen aber vermuten, dass der Verlust des regulatorischen Element zu weiteren Veränderungen der Hämatopoese, wie der gesteigerten Granulopoese führt. Die Expression des *Kit<sup>D814Vflox</sup>*-Transgens ähnelt möglicherweise der Expression des *W-sh*-Allels. *Kit<sup>D814Vflox</sup>* enthält 80 kb Sequenz 5' oberhalb des Startcodons, vergleichbar dem *W-sh* Allel, hier sind durch die 3 Mb Inversion nur 68 kb 5' Sequenz vorhanden. Möglicherweise führt die veränderte Expression in *Kit<sup>D814Vflox</sup>*, vergleichbar mit *W-sh* zu einer gesteigerten Granulopoese. Allerdings unterscheidet sich das *Kit<sup>D814Vflox</sup>* Allel durch die aktivierende Mutation und bitransgene Tiere tragen zusätzlich noch das homozygote *wt-Kit* Allel.

### 3.2.5 Embryonale Expression von *Kit<sup>D814V</sup>*

Die ubiquitäre Deletion des Stopp-Elements mit embryonaler Ausprägung von *Kit<sup>D814V</sup>* resultierte in perinataler Lethalität der meisten bitransgenen *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere. In diesen Tieren fand sich eine 10-100fach erhöhte Zahl an kernhaltigen, erythropoetischen Zellen. Die wichtige Rolle von Kit bei der Erythropoese ist bekannt: Vollständiger Funktionsverlust des Kit-Rezeptors wie in *Kit<sup>W/W</sup>* Mutanten führt zu perinataler Lethalität durch Anämie. Diese Tiere können durch Überexpression von Erythropoetin (Epo) gerettet werden (Waskow et al., 2004). Für die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen in fetaler, muriner Leber müssen sowohl der Kit- als auch der Epo-Rezeptor aktiviert werden (Wu et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass gemeinsame Kit- und Epo-Rezeptor Aktivierung in HSC zu einer starken Zunahme der Erythropoese durch überadditiven Synergismus führt (Kapur and Zhang, 2001; Wang et al., 2008). Hierbei scheint Kit-Aktivierung die Expansion von frühen Vorläufern zu fördern, während Aktivierung des Epo-Rezeptors eine Proliferation und Differenzierung von Erythrozytenvorläufern hervorruft. Möglicherweise führt die Kit Überaktivierung im *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Foetus zu einer starken Zunahme von Erythrozytenvorläufern und die teilweise Ausreifung der Vorläufer führt zu einer Erhöhung der reifen, nicht-kernhaltigen Erythrozyten und des Hämatokrits. Die beobachtete perinatale Lethalität könnte durch eine Veränderung der Fließeigenschaften des Blutes entstehen. Ein Störung der Leberfunktion durch die massiv gesteigerte Erythropoese in der Leber wäre ebenfalls denkbar. Allerdings verstarben nicht sämtliche bitransgenen

Neugeborenen, im Fall der Linien Tg1 und Tg3 überlebte circa ein Viertel der Tiere. Erstaunlicherweise zeigten alle zum Zeitpunkt der Geburt untersuchten *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tiere (tot oder lebendig) eine starke Zunahme der Erythropoese. In sämtlichen adulten, überlebenden *Del-Cre<sup>+</sup>/Kit<sup>D814Vflox+</sup>* Tieren hingegen konnte keine offensichtliche Veränderung der Erythropoese festgestellt werden. Dies ist ein indirekter Hinweis, dass es zwar in sämtlichen bitransgenen Neugeborenen zu dem beschriebenen Phänotypen kam, welcher aber nicht zwangsläufig tödlich war und sich dann im Laufe der postnatalen Entwicklung vollständig zurückbildete. Im Laufe der Entwicklung wechselt die Hämatopoese von Dottersack und AGM (Aorta, Gonaden, Mesonephros)-Region, über die fetale Leber in das Knochenmark (Mikkola and Orkin, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass frühe HSC in Dottersack und AGM-Region nicht zwangsläufig Kit-abhängig sind, im Gegensatz zu HSC aus fetaler Leber, deren Expansion stark von Kit-Aktivierung abhängt (Ogawa et al., 1993). Weiterhin besitzen HSC aus fetaler Leber ein höheres proliferatives Potential und reagieren stärker auf Kit-SCF Signale als adulte HSC aus Knochenmark (Bowie et al., 2007). Dies könnte die massive Zunahme der Erythropoese durch das konstitutiv aktive Kit-Allel innerhalb eines bestimmten Zeitfensters der Embryonalentwicklung erklären.

Denkbare Gründe für das teilweise Überleben der bitransgenen Neugeborenen wären einerseits Umgebungsfaktoren wie unterschiedliche Aufzucht durch die Elterntiere oder andererseits natürliche Variationen in der Entwicklung der Tiere oder der Effizienz der Transgenexpression. Prinzipiell könnte die perinatale Lethalität durch eine hyperproliferative Fehlregulation der Erythropoese bei embryonaler Expression von Kit<sup>D814V</sup> erklären, warum die *Kit<sup>D816V</sup>* Mutation beim Menschen nur als somatische Mutation auftritt und noch nie eine Vererbung der Mutation beobachtet wurde.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

Alle Standardreagenzien, soweit nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

#### 4.1.1 Oligonukleotide

Primer	Name	Sequenz (5'-3')	Template
P1	c-kit Fwd 814	CTTCTCTCGGAGAGCTGAAATG	5' Kit Exon 17
P2	c-kit Rev 814	TCGCACACCCCAATTATAC	3' Kit Exon 17
P3	5'T7 Seq H3	GCCAAAGCTTGCATGCCTGCAG	pBACe3.6 T7 Promotor
P4	Rev T7 RP23-274L11	GCCTGAGCATGGTAGGCAAAC	ca. 80 kb 5' Kit
P5	SP6 Fwd	AGGCTGAGCCATCTCGCCAG	35 kb 3' Kit
P6	SP6 Rev	GTCGCTCCTCCTGCCAGAAG	pBACe3.6 SP6 Promotor
P7	c-kit Intron 1-2 Fwd	GAAAGAGCGGCAGACAAGAG	Kit Intron 1-2
P8	c-kit Intron1-2 Rev	GCAAGCAAGCCCGAGATTC	Kit Intron 1-2
P9	<i>gb2</i> Fwd	TCCCGAGGCCCGGCATTCT	<i>Pgk</i> Promotor
P10	<i>gb2</i> Rev	TGTTGTGCCAGTCATAGCCGA	<i>Neo</i> Gen
P11	T3 Neo Rev	AAGGAGCAAAGCTGCTATTGGC	<i>pgk-gb2-neostop</i>
P12	NS T7 Fwd pA	AAGCTGCACTGCTATACAAG	<i>pgk-gb2-neostop</i>
P13	T7 Fwd Not	CTCACTATAGGGAGAGGATCCGC	pBACe3.6 T7 Rest
P14	T7 Insert Typ Rev	GTCAACATACGCCGCAGTTCTAG	ca. 80 kb 5' Kit
P15	SP6 Insert Typ Fwd	ACACCAACAGGAACGTTTGTGG	ca. 35 kb 3' Kit
P16	SP6 Vektor Typ Rev	GGCCGTCGACATTTAGGTGAC	pBACe3.6 SP6 Rest
P17	Exon16 Fwd	CTCGTACATAGAAAGAGACGTG	Kit cDNA
P18	Exon18 Rev	CATAGGACCAGACATCACTTTC	Kit cDNA
P19	Sonde Intron1-2 Fwd	TCTTTGTGCACAGTGCTGGGGA	Kit Intron1-2
P20	Sonde Intron1-2 Rev	CCTGCGATTACAAGTCGCATACA	Kit Intron1-2
P21	Deleter Fwd	GAAAGTCGAGTAGGCGTGTACG	<i>hCMV-Promotor</i>
P22	Deleter Rev	CGCATAACCAGTGAAACAGCAT	<i>nlsCre</i>
P23	Mcpt5-Cre Fwd	ACAGTGGTATTCCCAGGGAGTGT	<i>Mcpt5-Promotor</i>
P24	Mcpt5-Cre Rev	GTCAGTGC GTTCAAAGGCCA	<i>iCre</i>
P25	Int1-2 Typing Rev	TGAGGTCTCTCAGCTCAGGTG	Kit Intron1-2
P26	Mx Cre Fwd	CATGTGTCTTGGTGGGCTGAG	<i>Mx-Promotor</i>
P27	Vav iCre Fwd	CTCTGACAGATGCCAGGACA	<i>iCre</i>
P28	Vav iCre Rev	ACACCATTCTTTCTGACCCG	<i>iCre</i>

Tabelle 4-1 Übersicht der für PCR verwendeten Oligonukleotide

Rekombination	Oligoaufbau	Oligosequenz
Insertion von <i>RpsL-neo</i> in <i>Kit</i> Exon 17 Template: <i>pRpsL-neo</i>	<i>Kit</i> Exon17 5'HR- <i>pRpsL-neo</i> -Fwd	<u>5'TCCTCACTCACGGGCGGATCACAAAGATTTGCGA</u> <u>TTTCGGGCTAGCCAGAGGGCCTGGTGATGATGGCG</u> <u>GGATCG</u>
	<i>Kit</i> Exon17 3'HR- <i>pRpsL-neo</i> Rev	<u>5'AGAAAGGTA CT CACATTTCTTTGACCACGTAATT</u> <u>CGAATCATTCTGATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG</u> <u>GCG</u>
Ersatz <i>RpsL-neo</i> durch Exon 17 D814V Template: BAC RP23-274L11	<i>Kit</i> Exon 17 5'HR-D814V- <i>Kit</i> - HR-Fwd	<u>5'TCCTCACTCACGGGCGGATCACAAAGATTTGCGA</u> <u>TTTCGGGCTAGCCAGAGTCATCAGGAATGATTCGAA</u> <u>TTACGTGGT</u>
	<i>Kit</i> Intron17-18- Rev	<u>5'TCGCACACCCCAATTATAC</u>
Insertion <i>RpsL-neo</i> in <i>Kit</i> Intron1-2 zweite <i>NotI</i> Schnittstelle Template: <i>pRpsL-neo</i>	<i>Kit</i> Intron1-2 5'HR- <i>pRpsL-neo</i> - Fwd	<u>5'AGCCACGGGTCCCGGACACACGCCGGGCAAAG</u> <u>TTGGAGAGCCTTTTCTTGGGCCTGGTGATGATGGC</u> <u>GGGATCG</u>
	<i>Kit</i> Intron1-2 3'HR <i>pRpsL-neo</i> Rev	<u>5'CAGTTGCGTCCCCAGCACTGTGCACAAAGAGCGC</u> <u>CCGAGGTGGGGAAGCACAGAAGAACTCGTCAAGAA</u> <u>GGCG</u>
	<i>Kit</i> Intron1-2 5'HR- <i>*NotI-Kit</i> HR-Fwd	<u>5'AGCCACGGGTCCCGGACACACGCCGGGCAAAG</u> <u>TTGGAGAGCCTTTTCTTGGCGCTGTGCTTCCCCACC</u> <u>TCGGGCGC</u>
Ersatz <i>RpsL-neo</i> durch punktmutierte <i>NotI</i> Schnittstelle Template: BAC RP23-274L11	<i>Kit</i> Intron1-2 5'HR- <i>*NotI-Kit</i> HR-Fwd	<u>5'AGCCACGGGTCCCGGACACACGCCGGGCAAAG</u> <u>TTGGAGAGCCTTTTCTTGGCGCTGTGCTTCCCCACC</u> <u>TCGGGCGC</u>
Addition <i>gb2</i> Promotor zu <i>pBSK+ neo stop</i> Template: <i>p6RK-gb2-neo</i>	<i>gb2</i> -Fwd	<u>5'TCCCGAGGCCCGGCATTCT</u>
	<i>gb2</i> -Rev	<u>5'TGTTGTGCCCAGTCATAGCCGA</u>
Insertion von <i>loxP-Pgk-gb2-neostop-loxP</i> in <i>Kit</i> Intron1-2 erste <i>NotI</i> Schnittstelle Template: <i>pBSK+ gb2 neo stop</i>	<i>Kit</i> Intron1-2 5'HR- <i>loxP-pgk-</i> <i>gb2-neo stop</i> Fwd	<u>5'GAGTGGTAGCTGTTGGCTTTTCCCATGCCTACCA</u> <u>CCTCGAAGGTGGTAGGATAACTTCGTATAGCATACA</u> <u>TTATACGAAGTTATATTAAGGGTTCCGGATCCTCGA</u> <u>GGT</u>
	<i>Kit</i> Intron1-2 3'HR- <i>loxP-pgk-</i> <i>gb2-neo stop</i> Rev	<u>5'AGGTCTCTCAGCTCAGGTGAGCGAGGCGGGCCA</u> <u>CCAGAGTCCCGCGGCCGATAACTTCGTATAATGTAT</u> <u>GCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACCTGCAGCC</u> <u>CAAG</u>

Tabelle 4-2 Übersicht der Oligonukleotide und DNA-Templates für die Erstellung linearer DNA Fragmente zur homologen Rekombination.

Für die homologe Rekombination wurden lineare DNA-Fragmente mit entsprechenden Homologie-regionen durch PCR amplifiziert. Die korrespondierenden Teile von Oligoaufbau und -sequenz sind in gleicher Weise unterstrichen.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Tabelle 4-1 zeigt Oligonukleotide, die als PCR Primer genutzt wurden. Tabelle 4-2 gibt Oligonukleotide wieder, die für Red/ET Recombineering verwendet wurden. Bei einer Länge >80 bp wurden die Oligonukleotide durch den Hersteller HPLC-gereinigt.

#### 4.1.2 Enzyme

Standard Taq-Polymerase und Restriktionsenzyme wurden von Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen.

#### 4.1.3 Plasmide

Plasmid	Verwendung	Quelle
pSC101-BAD-gbaA (pRedET)	induzierbare Expression der Red/ET Rekombinasen	Gene Bridges
p <i>RpsL-neo</i>	Template für Counterselection-Kassette	Gene Bridges
pBSK+ <i>pgk-neostop</i>	Template für Stopp-Kassette	Scott Zeitlin (Dragatsis and Zeitlin, 2001)
pR6K-Pgk-gb2-neo	prokaryontische Neomycin-Resistenz	Gene Bridges

Tabelle 4-3 Übersicht der verwendeten Plasmide

#### 4.1.4 DNA Größenmarker

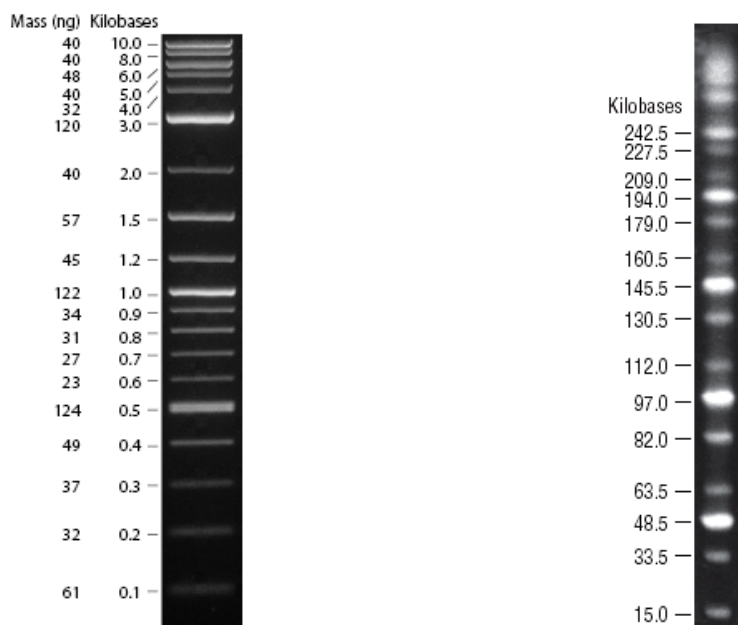


Abb. 4-1 NEB 2-log Ladder

NEB MidRange I PFG Marker



#### 4.1.5 *Escherichia coli (E.coli) Stämme*

Sämtliche BAC Rekombinationen wurden im *E.coli* Stamm DH10B (RZPD, Berlin) durchgeführt. Genotyp DH10B:

F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *endA1*  
*araD139*  $\Delta(ara, leu)7697$  *galU* *galK*  $\lambda$ -*rpsL* *nupG* / pMON14272 / pMON7124

Die homologe Rekombination des *gb2*-Promotors wurde im *E.coli* Stamm HS996 (Gene Bridges) durchgeführt. Genotyp HS996:

F- *mcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *deoR* *araD139*  
 $\Delta(ara-leu)7697$  *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG* *fhuA::IS2*

#### 4.1.6 BAC Klon

Der BAC Klon RP23-274L11 aus der Bibliothek RPCI-23 wurde beim Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin erworben. Propagation des BAC Klons (Low-copy Plasmid) erfolgte im *E.coli* Stamm DH10B in LB-Medium bei 37°C unter Chloramphenicol-Selektion (15 µg/ml). Der BAC Klon und alle davon abgeleiteten Modifikationen wurden als Glycerolstock bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.1.7 Mausstämme

Stamm	Referenz	Hintergrund	Quelle
Deleter-Cre	(Schwenk et al., 1995)	C57BL/6	Institut für Genetik, Köln
Mx1-Cre	(Kühn et al., 1995)	C57BL/6	Institut für Genetik, Köln
A-Mcpt5-Cre	(Scholten et al., 2007)	C57BL/6	Tierhaltung Institut für Pharmakologie, Köln

Tabelle 4-4 Übersicht der verwendeten Mausstämme

Alle Mausstämme wurden kontinuierlich mit Wildtyp C57BL/6 Tieren (Zentrales Tierhaltungsnetzwerk ZMMK oder Charles River Laboratories, Sulzfeld) verpaart, um die Fixierung spontaner Mutationen in der Population zu vermeiden.

#### 4.1.8 Häufig verwendete Lösungen

Alle Lösungen, soweit nicht anders vermerkt, wurden mit bidestiliertem H<sub>2</sub>O (ddH<sub>2</sub>O) erstellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf den angegebenen Wert

eingestellt. Falls nötig, wurden die Lösungen im gespannten Dampf bei 121°C für 20 min autoklaviert.

### **LB Medium**

1 % Pepton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, pH 7,5, autoklaviert

### **LB-Agar**

LB-Medium, 1,5 % Agar, autoklaviert

### **Antibiotika**

Tetrazyklin (Sigma-Aldrich): 10mg/ml Stocklösung in 75 % Ethanol, Arbeitskonzentration 3 µg/ml Low-copy Plasmid, 10 µg/ml High-copy Plasmid

Streptomycin (Sigma-Aldrich): 50 mg/ml Stocklösung, Arbeitskonzentration 50 µg/ml Low-copy Plasmid

Kanamycin (Sigma-Aldrich): 30 mg/ml Stocklösung, Arbeitskonzentration 15 µg/ml Low-copy Plasmid, 50 µg/ml High-copy Plasmid

Chloramphenicol (Sigma Aldrich): 30 mg/ml Stocklösung in 100 % Ethanol, Arbeitskonzentration 15 µg/ml Low-copy Plasmid

Ampicillin (Sigma-Aldrich): 50 mg/ml Stocklösung, Arbeitskonzentration 100 µg/ml High-copy Plasmid

### **PBS**

137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,6 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, autoklaviert

### **FACS Puffer**

PBS, 0,5 % (m/v) BSA, 0,05 % (m/v) NaN<sub>3</sub>

### **1x Erylyse Puffer**

150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA, autoklaviert

### **50x TAE**

2 M Tris Base, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,3

### **5x TBE**

445 mM Tris Base, 445 mM Borsäure, 10 mM EDTA

### **TE Puffer**

10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0

### **P1 Puffer**

50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A (Sigma)

### **P2 Puffer**

200 mM NaOH, 1 % (m/v) SDS

**P3 Puffer**

3 M K-Acetat, pH 5,5

**Injektionspuffer**

10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4, autoklaviert

**20x SSC**

3 M NaCl, 0,5 M Na-Citrat, pH 7,0

**Denaturierungspuffer**

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

**Neutralisierungspuffer**

1 M Tris-Cl, 1,5 M NaCl, pH 7,4

**Tail lysis buffer**

100 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 0,2 % (m/v) SDS, 5 mM EDTA, 1 % (v/v) Proteinase K (Fermentas), pH 8,5

**Formalin**

4 % (m/v) Formaldehyd in PBS

**Komplettiertes Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)**

DMEM-Medium (Gibco) mit zusätzlich 10 % (v/v) FCS (Biochrom), 50 µM 2-Mercaptoethanol, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

**WEHI Medium**

IL-3-haltiger Zellkulturüberstand von WEHI-3B-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig). WEHI3-Zellen wurden 3-4 Tage in Iscove's modified Dulbecco's Medium (Gibco) mit 5 % (v/v) FCS (Biochrom), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin kultiviert, das Medium wurde abgenommen und steril filtriert

**TBS-T**

25 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20

**Coating Puffer ELISA**

34 mM NaHCO<sub>3</sub>, 16 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6

**Waschpuffer ELISA**

0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS

**Verdünnungspuffer ELISA**

0,5 % (m/v) BSA, 0,05 % Tween 20 in PBS

## **Anästhesie Lösung**

1 mg/ml Xylazin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen), 10 mg/ml Ketamin (Pfizer, Karlsruhe) in isotonischer NaCl-Lösung (Berlin Chemie, Berlin)

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Molekurbioologische Methoden**

#### **4.2.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

##### *Standard-PCR*

Template DNA (ca. 10-100 ng) wurde zu 50 µl 1x Reaction Buffer (Fermentas) mit 200 nM Fwd und Rev Primer (Tabelle 4-1), 200 µM dNTP Mix, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas) und 0,025 U/µl Taq DNA Polymerase (Fermentas) gelöst. Initial wurde bei 95°C für 2 min das DNA Template denaturiert, dann folgten 30-35 Wiederholungen der folgenden Schritte: 1. Denaturierung 95°C für 30 s, 2. Primer Annealing 5°C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur (Breslauer et al., 1986) der Primer, üblicherweise 55-65°C für 45 s, 3. Neusynthese des komplementären Strangs bei 72°C für 1 min/kb. Abgeschlossen wurde die Amplifikation durch einen finalen Syntheseschritt bei 72°C für 7 min. Das entstandene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch (0,8-2 % (m/v) Agarose in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (30 ng/ml Agarosegel) visualisiert. Falls die geschilderte Vorgehensweise nicht zum Erfolg führte, wurden die Annealingtemperatur, Zyklenzahl und MgCl<sub>2</sub> Konzentration optimiert.

##### *Kolonie-PCR*

Durch Kolonie-PCR wurden rekombinierte *E.coli* Klone direkt untersucht. Dafür wurde eine Kolonie als Template direkt von der Agarplatte gepickt, in 5 µl ddH<sub>2</sub>O suspendiert und initial für 5 min bei 95°C denaturiert. Erst dann folgte der PCR Mastermix und die PCR wurde in o.g. Weise fortgeführt.

##### *High fidelity PCR*

Das lineare DNA-Fragment zur Insertion der Stopp-Kassette in Intron1-2 wurde mit Hilfe von Platinum Pfx Polymerase (Invitrogen) amplifiziert. Auf Grund der sehr langen Primerbindungsstellen (Tabelle 4-2) wurde ein zweistufiger PCR-Zyklus bestehend aus Denaturation bei 94°C für 30 s und gleichzeitiges Annealing und Synthese bei 68°C für 3 min gewählt (insgesamt 30 Zyklen).

#### **4.2.1.2 Reverse Transcription-PCR**

Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Integrität der RNA wurde durch Detektion der 18S und 28S rRNA Banden auf einem 1 % Agarosegel überprüft. Polyadenylierte RNA wurde durch Verwendung des Superscript III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) mit oligo dT-Primer nach Anweisung des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Nach RNAse H Verdau diente die synthetisierte cDNA als Template für eine PCR mit den *Kit* Exon 16-18 spezifischen Primern P17 und P18 ( $T_A$  55°C, 35 Zyklen).

#### **4.2.1.3 PCR-Produktaufreinigung**

Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel (üblicherweise 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt, visualisiert und ausgeschnitten. Das Gelstückchen mit PCR-Produkt wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (QIAGEN) nach Maßgabe des Herstellers isoliert.

#### **4.2.1.4 DNA Sequenzierung der PCR-Produkte**

Zur Abtrennung überschüssiger Primer und dNTP wurde das PCR-Produkt mit 0,5 U/ $\mu$ l Exonuklease I und 0,08 U/ $\mu$ l Shrimp Alkaline Phosphatase für 30 min bei 37°C verdaut. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend bei 85°C für 30 min. 0,5 ng/bp PCR-Produkt wurden mit 2,9  $\mu$ M Primer versehen und durch SeqLab GmbH (Göttingen) sequenziert.

#### **4.2.1.5 DNA Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde entweder photometrisch oder durch Schätzgele bestimmt. Dafür wurde auf einem Agarosegel die Bandenintensität der Probe mit einem DNA Standard in verschiedenen Konzentrationen (NEB 2-log Ladder) verglichen und abgeschätzt.

#### **4.2.1.6 Restriktionsendonukleasenverdau**

DNA wurde mit Restriktionsenzym im Überschuss (üblicherweise 10 U/ $\mu$ g DNA) im zugehörigen Puffer bei 37°C verdaut und durch Agarosegelelektrophorese visualisiert.

#### **4.2.1.7 Pulsfeldgelelektrophorese**

DNA Fragmente >20 kb lassen sich durch Pulsfeldgelelektrophorese auftrennen. Es wurde eine CHEF DR III Apparatur (Bio-Rad, München) mit folgenden Einstellungen

verwendet: Feldstärke 6 V/cm, Feldwinkel 120°, Switch time ramp 0,1-25 s, 0,5x TBE-Puffer bei 12°C, Gelstärke 1 % (m/v) PeqGold PFGE Agarose (Peqlab, Erlangen) in 0,5x TBE-Puffer. Nach 16stündigem Lauf wurde das Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung für 30 min gefärbt, gefolgt von 30 min Entfärbung mit ddH<sub>2</sub>O und abschließender Visualisierung durch UV-Licht.

#### **4.2.1.8 Southern Blotting**

##### *DNA Verdau und Transfer*

Präparation genomischer DNA aus 10-30 mg Gewebe erfolgte mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen). Die DNA wurde über Nacht mit Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch (0,8 % (m/v) Agarosegel) aufgetrennt. Die photographische Dokumentation des Gels erfolgte mit einem Lineal in der Nähe des Größenmarkers. Nach Zuschnitt wurde das Gel je 30 min in Denaturierungspuffer und anschließend in Neutralisationspuffer geschwenkt. Die verdaute DNA wurde durch Kapillarblotting auf Hybond N+ Membran (GE Amersham, Freiburg) mit 10x SSC über Nacht transferiert. Die gebundene DNA wurde durch mindestens zweistündige Inkubation bei 80°C im Trockenschrank auf der Membran immobilisiert.

##### *Hybridisierung mit radioaktiver Sonde*

Nach Befeuchtung mit 2x SSC wurde die Membran mit ULTRAhyb Hybridisierungspuffer (Ambion, Darmstadt) für 30 min bei 42°C prähybridisiert. Mit den Primern P19, P20 und RP23-274L11 BAC-DNA als Template wurde ein 462 bp PCR Produkt amplifiziert, Gel-gereinigt und unter Verwendung des DecaLabel DNA Kits (Fermentas) nach Maßgabe des Herstellers radioaktiv mit 1,85 MBq P<sup>32</sup>-dCTP markiert. Die markierte Sonde wurde mit einer ProbeQuant G-50 Micro Säule (GE Amersham) von uninkooperierten Nukleotiden gereinigt. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte bei 42°C in ULTRAhyb Lösung über Nacht. Dann wurde zweimal 5 min in 2xSSC, 0,1 % (m/v) SDS Puffer bei 42°C gewaschen, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten in 0,1x SSC, 0,1 % SDS Puffer für 15 min bei 42°C. Abschließend wurde ein Hyperfilm ECL (GE Amersham) für 48-96 h bei -80°C exponiert und entwickelt.

#### **4.2.1.9 Minipräparation von BAC-DNA durch alkalische Lyse**

1,5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika wurde mit Bakterien inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch 5 min Zentrifugation bei 11.000 g pelletiert und in 200 µl P1 Puffer resuspendiert. Durch

Zugabe von Puffer P2 erfolgte die Lyse der Bakterien. Die Inversion der Lösung und alle folgenden Schritte wurden unter Vermeidung von Scherrkräften durchgeführt. Nach 5 min Wartezeit wurden 200 µl Puffer P3 zugesetzt und das Proteinpräzipitat durch 5 min Zentrifugation bei 11.000 g abgetrennt. Die DNA im Überstand wurde durch 0,7 Volumenteile Isopropanol gefällt und bei 16.100 g für 5 min zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet (beginnende Weißfärbung des Pellets) und in TE Puffer aufgenommen.

#### **4.2.1.10      Aufreinigung der BAC DNA für die Pronukleusinjektion**

##### *Präparation und Verdau*

Während der gesamten Präparation wurde mit frischen, soweit möglich autoklavierten Lösungen gearbeitet. Scherrkräfte durch Zentrifugation und Pipettierung wurden auf ein Minimum reduziert, um Strangbrüche des BAC-Vektors zu vermeiden.

100 ml LB Medium mit 15 µg/ml Chloramphenicol und 15 µg/ml Kanamycin wurden mit einer *Kit<sup>D814Vflox</sup>* Kolonie angeimpft und über Nacht beim 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 6.000 g pelletiert und in 8 ml P1 Puffer resuspendiert. Je 4 ml Suspension wurden auf ein 50 ml PPCO Zentrifugenröhrchen (Nalgene, Rochester, USA) verteilt, und mit je 4 ml Buffer P2 versetzt und vorsichtig durch langsames Schwenken gemischt und 5 min bei Raumtemperatur gehalten. Es wurden je Zentrifugenröhrchen 4 ml Puffer P3 hinzugefügt, 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 8.000 g im Schwenkrotor bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände je Röhrchen wurden mit 7 ml Isopropanol gefällt und erneut 15 min im Schwenkrotor bei 8.000 g und 4°C zentrifugiert. Die DNA Pellets wurden zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (Zentrifugation 8.000 g), kurz angetrocknet und für 2 h in je 150 µl 10 mM Tris-Cl pH 8,5 bei 4°C gelöst. Die DNA Lösungen beider Zentrifugenröhrchen wurden vereinigt (300 µl) und mit 50 U *NotI* (NEB) und 40 µl Buffer O+ (Fermentas) versetzt und über Nacht bei 37°C verdaut.

##### *Aufreinigung durch Säulenchromatographie*

Eine sterile 5 ml Einwegpipette (Sarstedt, Nümbrecht) wurde mit autoklavierter Sepharose CL4B (Sigma-Aldrich) bis ca. 3 cm unter den Rand befüllt und mit 30 ml Injektionspuffer equilibriert. Anschließend wurde der *NotI*-Verdau des Konstrukts gemeinsam mit 5 µl 0,25 % (m/v) Bromphenolblau direkt auf die Säule pipettiert und erst nach vollständigem Einlauf in die Säule wurde mit der Elution durch Injektionspuffer begonnen. Das Eluat wurde in Fraktionen von 300-500 µl

gesammelt, bis es sich durch Bromphenolblau verfärbte. Die einzelnen Eluatfraktionen wurde mittels Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 2-17).

#### 4.2.2 Red/ET Recombineering

Sämtliche Modifikationen am BAC-Vektor wurden durch homologe Rekombination mittels Red/ET Recombineering (Gene Bridges, Dresden) durchgeführt. Die Methode basiert auf den bakteriellen Rekombinasen Red $\alpha$  und Red $\beta$ , welche homologe DNA-Sequenzen erkennen und rekombinieren. Im Plasmid pRedET stehen Red $\alpha$  und Red $\beta$  unter der Kontrolle des L-Arabinose-induzierbaren Promotors BAD. Das Arabinose-induzierbare Operon codiert zusätzlich das Red $\gamma$ -Protein, das den endogenen RecBCD-Komplex blockiert. Der RecBCD-Komplex ist Teil des endogenen Rekombinationssystems in *E.coli* und degradiert lineare DNA. pRedET basiert auf einem temperatursensitiven Replicon (oriR101) und einer Tetrazyklin-Resistenz. Das Plasmid kann bei 30°C propagiert werden, während bei 37°C und Zusatz von L-Arabinose die Rekombinasen Red $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$  exprimiert werden. Bei 37°C und ohne Tetrazyklin-Selektion sinkt die pRedET-Kopienzahl rapide.

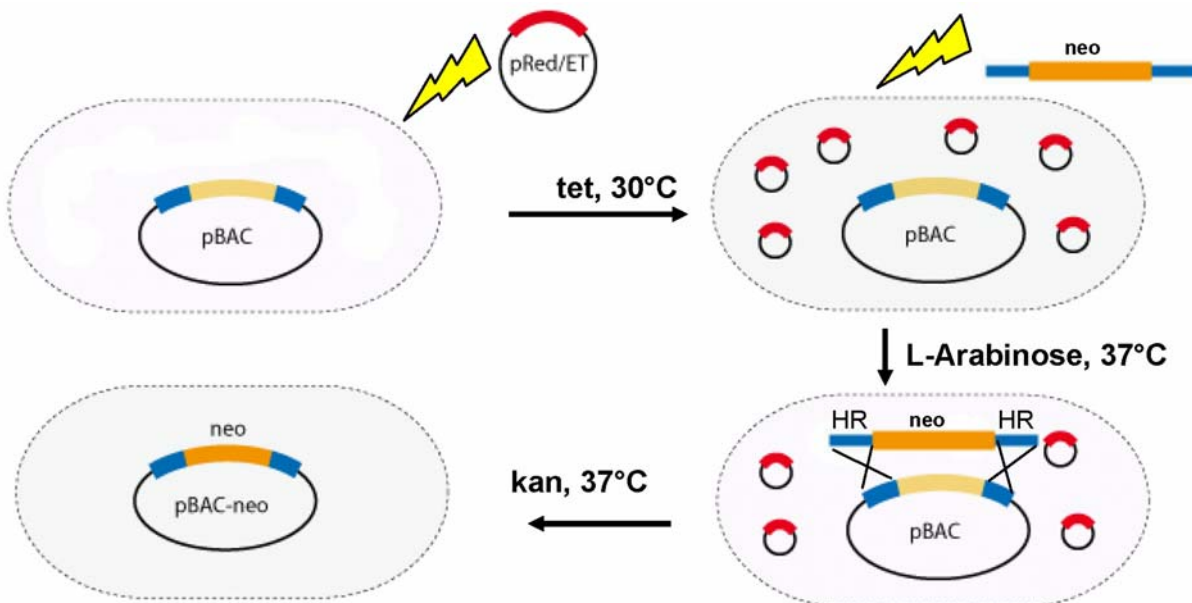


Abb. 4-2 Prinzip des Red/ET Recombineering

Das BAC-tragende *E.coli* Bakterium wird durch Elektroporation und nachfolgender Tetrazyklin-Selektion (tet) mit pRedET transformiert. Nach Propagation des Plasmids bei 30°C, werden die Rekombinasen durch Temperaturerhöhung auf 37°C und L-Arabinose induziert. Gleichzeitig wird das lineare DNA Fragment mit Homologieregionen (HR) und Selektionsmarker (neo) elektroporiert. Homologe Rekombination findet statt und erfolgreich rekombinierte Klone werden durch Kanamycin-Selektion (kan) identifiziert und pRedET wird bei 37°C entfernt. (Abbildung modifiziert nach Vorlage von Gene Bridges.)



Abb. 4-2 zeigt die Insertion eines Selektionsmarkers durch Red/ET Recombineering. Um homologe Rekombination zu erreichen, wird für einen kurzen Zeitraum die Expression der Rekombinasen des pRedET Plasmids induziert und anschließend die Bakterien mit einem linearem DNA Fragment, welches homologe Sequenzen mit dem Zielvektor teilt, transformiert. Die linearen DNA Fragmente wurden durch PCR amplifiziert, die 5' und 3' Homologieregionen von je 50 bp wurden in die verwendeten Primer integriert (siehe Tabelle 4-2). Die Punktmutationen wurden in das *Kit<sup>D814Vflox</sup>* Konstrukt durch Red/ET Recombineering Counter Selection (Gene Bridges) eingebracht. Hierbei werden zwei aufeinanderfolgende Rekombinationen durchgeführt (siehe Abb. 4-3). Im ersten Schritt wird die Counterselection-Kassette (*RpsL-neo*) inseriert und im zweiten Schritt wird die Counterselection Kasette durch ein lineares DNA Fragment ohne Selektionsmarker ausgetauscht. Die Insertion der *RpsL-neo* Kasette kann auf Grund der Neomycin-Resistenz selektiert werden. *RpsL* führt zu Streptomycin-Sensitivität des ursprünglich Streptomycin-resistenten *E.coli* Stamms DH10B. Durch homologe Rekombination der *RpsL-neo* Kasette mit nicht-selektierbarer linearer DNA wird wieder Streptomycin-Resistenz erlangt.

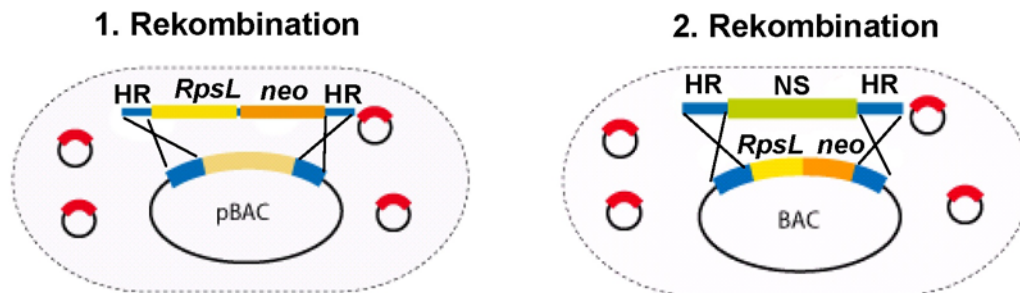


Abb. 4-3 Prinzip des Red/ET Counterselection Recombineerings

Die erste homologe Rekombination dient der Insertion der Counterselection-Kassette (*RpsL-neo*; *RpsL*, Streptomycin-Sensitivität; *neo*, Neomycin-Resistenz). Der zweite Schritt führt durch Austausch der Counterselection Kasette durch nicht-selektierbare DNA (NS) zu erneuter Streptomycin-Resistenz. (HR, Homologieregion; Abbildung modifiziert nach Vorlage von Gene Bridges.)

#### 4.2.2.1 Protokoll Red/ET Recombineering

Sämtliche Schritte während der Elektroporation wurden zügig durchgeführt, alle Reagenzien und Reaktionsgefäße waren eisgekühlt.

##### *Transformation des BAC tragenden E.coli mit pRedET*

1. Übernachtskultur des BAC Klon in LB-Medium mit entsprechendem Antitbiotikum (RPC123 Library 15 µg/ml Chloramphenicol (cm)) bei 37°C
2. Überimpfen von 30 µl Übernachtskultur in 1,4 ml frisches LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (cm), Inkubation für 2 h bei 37°C.

3. Die Bakterien pelletieren durch 30 s Zentrifugation bei 11000 g, verwerfen des Überstands, Resuspendierung des Pellet in eiskaltem ddH<sub>2</sub>O.
4. Schritt 3 wiederholen
5. Überstand verwerfen, es verbleiben ca. 30-50 µl Bakteriensuspension im Reaktionsgefäß
6. Zugabe von 0,1-0,2 µg pRedET, mischen und Überführung in eine Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad, München).
7. Elektroporation mit Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg) bei 1350 V, Zeitkonstante ca. 5-6 ms
8. Spülen der Küvette mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum
9. Inkubation des LB-Mediums bei 30°C für 70 min
10. Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Agar Platten mit 15 µg/ml cm und 3 µg/ml Tetrazyklin (tet)

#### *Induktion der homologen Rekombination*

1. Übernachtskultur eines mit pRedET transformierten BAC Klons in LB-Medium mit cm und tet
2. Überimpfen von 30 µl Übernachtskultur zu 1,4 ml LB mit cm und tet, Inkubation bei 30°C für 2 h in dreifacher Ausführung (Probe für erwünschte Rekombination, Negativkontrolle 1: ohne Arabinose, keine Induktion der Rekombinasen, Negativkontrolle 2: mit induzierten Rekombinasen, ohne lineares PCR-Produkt).
3. Zugabe von 20 µl L-Arabinose (10 % (m/v), Sigma) zur Probe und Negativkontrolle 2, Inkubation aller drei Ansätze bei 37°C für 40 min.
4. Elektroporation des PCR Produkts mit Homologieregionen (0,1-0,2 µg) bei 1350 V, Zeitkonstante 5-6 ms, zur Probe und Negativkontrolle 1, die Elektroporation der Negativkontrolle 2 erfolgt ohne lineare DNA.
5. Spülen der Küvetten mit LB-Medium ohne Antibiotikum, Inkubation der Bakteriensuspension für 70 min bei 37°C.
6. Ausplattieren der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (cm + Antibiotikum für Selektionskassette). Die Kolonienzahl auf den Agarplatten der Probe im Verhältnis zu den zwei Negativkontrollen sollte > 1:100 betragen.
7. Identifikation von korrekt rekombinierten Klone durch Kolonie-PCR.

## 4.2.3 Biochemische Methoden

### 4.2.3.1 Western Blot

300.000 BMMC (siehe 4.2.5.1) pro Versuch wurden für 2 h in Serum-freiem DMEM gehalten, anschließend wurden entsprechende Proben mit 5  $\mu$ M Imatinib oder 1  $\mu$ M Midostaurin (Novartis, Basel, Schweiz) für 20 min inkubiert. Dann wurde ein Teil der Proben mit 50 ng/ml SCF stimuliert und nach 10 min lysiert. Proteinlysate wurden durch 10 % Lämmli-Gele aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit 2 % (m/v) Milchpulver in TBS-T für 2 h geblockt und über Nacht mit den folgenden Primärantikörpern inkubiert: pS473-PKB/Akt, pY719-c-Kit, PT202/Y204-Erk1/2 (alle von Cell Signaling Technology, Frankfurt/Main) und anti-Hsp90 (Santa Cruz, Heidelberg). Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen und für 4 h mit entsprechendem Zweitantikörper: Anti-Kaninchen Ig-HRP (Santa Cruz) und Anti-Maus-Ig-HRP (Pierce, Rockford, USA) für 4 h inkubiert. Detektion erfolgte mit ECL-Reagenz und Hyperfilm ECL (GE Amersham).

### 4.2.3.2 Bestimmung von MMCP-1 im Serum mittels ELISA

Eine 96 Well-Multititerplatte (Greiner, Solingen) wurde mit 2  $\mu$ g/ml Anti-MMCP-1 Fängerantikörper (Moredun, Edinburgh, UK) in 50  $\mu$ l Coating Puffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Die beschichtete Platte wurde sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Eine Standardreihe mit rekombinatem MMCP-1 (Moredun) im Bereich 0,25-16 ng/ml wurde in Verdünnungspuffer angesetzt und gemeinsam mit 50  $\mu$ l 1:10 verdünntem Probenserum 90 min in der beschichteten Platte inkubiert. Nach sechs Waschschrritten wurde 1 h mit 1:1000 verdünntem Anti-MMCP-1-HRP Konjugat (Moredun) inkubiert. Nach weiteren sechs Waschschrritten wurde mit TMB-Substrat (Sigma-Aldrich) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 0,25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Optische Dichte wurde im Photometer (Nunc Immunoreader NJ2000) bestimmt. Standardreihe und Proben wurden in Duplikaten angesetzt und gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe wurde die MMCP-1 Konzentration errechnet, Proben mit OD-Werten < 0,1 und > 1 wurden bei niedrigerer bzw. höherer Verdünnung erneut gemessen. Zur Etablierung des ELISA wurde die MMCP-1 Serumkonzentration von Mastzell-defizienten *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* Mäusen bestimmt, hier ergab sich bei unverdünntem Serum ein unter der Nachweisgrenze liegender Messwert. Serum von Mäusen, bei denen passive systemische Anaphylaxie provoziert wurde (Scholten, 2009), ergab sehr hohe Messwerte >200 ng/ml.

#### 4.2.4 Durchflusszytometrie

Es wurde ein FACS Calibur (BectonDickinson, Heidelberg) mit 488 und 647 nm Laser verwendet. Die Daten wurden mit der Software CellQuest Pro Version 5.2.1 (BectonDickinson) aufgezeichnet und wurden mit der Software Fowjo 7.2.5 (Treestar, Ashland, USA) ausgewertet.

##### 4.2.4.1 Zellsuspensionen

Verschiedene Gewebe wurden nach Tötung der Tiere durch Isofluranüberdosis, wie im folgenden beschrieben, zu Zellsuspensionen verarbeitet. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung.

###### *Peritoneallavage*

Das intakte Peritoneum wurde von der umgebenden Haut befreit, mit einer Löthilfe („Helping Hand“) aufgespannt und mit einem kleinen Schnitt versehen. Durch das entstandene Loch wurde die Bauchhöhle mittels einer Pasteurpipette mit ca. 1 ml eiskaltem PBS befüllt und sanft massiert. Dann wurde die Suspension mit der Pasteurpipette möglichst quantitativ wieder entnommen. Der Vorgang wurde wiederholt, insgesamt wurde mit 5 ml PBS gespült.

###### *Milz, Tumor, fetale Leber*

Die Milz wurde vom umgebenden Bindegewebe befreit, gewogen und der Mittelteil (> 40 mg) verwendet. Das Gewebe wurde über einen 70 µm Zellsieb (BD Falcon) mit Hilfe eines Spritzenkolben zerdrückt und anschließend mit PBS gespült. Die Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 300 g pelletiert und mit 5 ml Erylysepuffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Erylysepuffer abgegossen. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS resuspendiert, mit einem 40 µm Zellsieb filtriert und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Zellpellet in 5-10 ml FACS Puffer resuspendiert.

###### *Mastzellknoten*

Mastzellknoten wurden aus der Haut geschnitten und über ein 70 µm Zellsieb unter leichtem Druck gerieben. Die Zellen wurde mit PBS gewaschen und anschließend in Medium oder FACS Puffer verwahrt.

###### *Knochenmarklavage*

Der Femur wurde vom Muskel freipräpariert und am Fuß- und Kniegelenk mit einer Schere durchtrennt. Mit einer 23G Kanüle wurden 2 ml PBS mit 5 mM EDTA durch die Knochenröhre gespült. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 g wurde das

Zellpellet mit 5 ml Erylyse Puffer für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und in 5 ml FACS Puffer aufgenommen.

#### *Blut*

500 µl heparinsiertes Blut wurden in 5 ml Erylyse Puffer 5 min inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen, durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und in 5 ml FACS Puffer resuspendiert.

#### 4.2.4.2 Antikörperfärbung

10<sup>6</sup> Zellen in 100 µl FACS-Puffer wurden mit Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 4-5) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 400 µl FACS Buffer suspendiert und zum Ausschluss toter Zellen mit 0,25 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt.

Antigen	Isotyp	Klon	Farbstoff	Verdünnung	Hersteller
B220	Ratte IgG2a <sub>κ</sub>	RA3-6B2	Fitc	1:100	eBioscience
CD3ε	Hamster IgG1 <sub>κ</sub>	145-2C11	Fitc / APC	1:100	eBioscience
CD11b	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	M1/70	Fitc	1:500	eBioscience
CD19	Ratte IgG2a <sub>κ</sub>	1D3	PE	1:200	eBioscience
CD45	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	30-F11	Fitc	1:500	eBioscience
CD45	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	30-F11	PE	1:500	BD Pharmingen
CD71	Ratte IgG2a <sub>κ</sub>	R17217	PE	1:200	eBioscience
CD117	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	2B8	APC	1:500	eBioscience
FcεR1α	Hamster IgG	MAR-1	PE	1:300	eBioscience
Gr-1	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	RB6-8C5	PE	1:500	eBioscience
IgA	Ratte IgG1 <sub>κ</sub>	11-44-2	PE	1:100	eBioscience
IgD	Ratte IgG2a <sub>κ</sub>	11-26c	Alexa 647	1:160	eBioscience
IgE	Ratte IgG1 <sub>κ</sub>	23G3	Fitc	1:50	eBioscience
IgE	Ratte IgG1 <sub>κ</sub>	23G3	PE	1:20	eBioscience
IgG	Esel IgG F(ab') <sub>2</sub>	pk	PE	1:200	eBioscience
IgM	Ratte IgG2a <sub>κ</sub>	II/41	PE	1:200	eBioscience
MHC class II	Ratte IgG2b	M5/114.15.2	Fitc	1:11	Miltenyi
Ter119	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	Ter119	Fitc	1:400	eBioscience
Ter119	Ratte IgG2b <sub>κ</sub>	Ter119	PE	1:500	eBioscience

Tabelle 4-5 Übersicht der für Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper (APC, Allophycocyanin; PE, R-Phycoerythrin; Fitc, Fluoresceinisothiocyanat; pk, polyklonal)

#### **4.2.4.3 Bestimmung der absoluten Leukozyten- und Erythrozytenzahl in fetalem Blut**

5 µl heparinisiertes, fetales Blut wurde mit einer bestimmten Anzahl an Calibrite PerCP Beads (BD Bioscience) versetzt und in einem Gesamtvolumen von 60 µl FACS Puffer mit Ter119-Fitc (1:400) und CD45-PE (1:500) und Draq5 (250 nM) direkt gefärbt und nach weiterer Verdünnung mit 400 µl FACS Puffer wurden  $10^6$  Ereignisse im FACS Calibur aufgezeichnet. PerCP Beads wurden als PerCP<sup>+</sup>/SSC<sup>hi</sup> Ereignisse identifiziert und dienten als interner Standard zur absoluten Quantifizierung. Leukozyten wurden als Draq<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, Erythrozyten als Draq<sup>-</sup>/Ter119<sup>+</sup> Ereignisse identifiziert. Als Kontrolle wurden Leukozyten- und Erythrozytenzahl adulter wt C57BL/6 Tiere mitbestimmt und mit Literaturwerten verglichen.

#### **4.2.5 Zellkultur**

##### **4.2.5.1 Mastzellkultur aus Knochenmark (BMNC)**

Das nachfolgende Protokoll orientiert sich grundsätzlich an der von Grimbaldston et al. im Supplement beschriebenen Methode (Grimbaldston et al., 2005)

Das Knochenmark aus Femora und Tibia wurde unter sterilen Bedingungen gewonnen, einer Erythrozyten-Lyse unterzogen und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in komplettiertem DMEM mit Zusatz von 20 % (v/v) WEHI-Medium bei 37°C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Das Medium und die Zellkulturflasche wurde anfangs 2-3mal wöchentlich gewechselt, um die adherenten Zellen abzureichern. Nach 4 Wochen wurde das Medium einmal wöchentlich zu 2/3 gewechselt. Nach 4-6 Wochen betrug der Anteil an Kit<sup>hi</sup>/FcεRIα<sup>+</sup> Zellen >95 %.

##### **4.2.5.2 Proliferationsassay**

Es wurden 10.000 Zellen pro Ansatz in 100 µl DMEM in 96 Multiwellplatten (BD Falcon) ausgesät und für 48 h oder den im Diagramm angegebenen Zeitraum bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Entsprechenden Proben wurde 50 ng/ml rekombinantes SCF oder IL-3 (Tebu-Bio, Offenbach) zugesetzt. Für die Messung wurde jeder Probe 20 µl CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent (Promega, Mannheim) zugegeben und 2 h bei 37°C inkubiert und abschließend die Optische Dichte (OD) photometrisch (Nunc Immunoreader NJ-2000) bei 490 nm bestimmt. Es wurden mindestens zwei identische 96 Wellplatten pipettiert, eine dieser Platten wurde direkt zum Zeitpunkt 0 h analysiert. Der gemessene Wert diente als Basalwert

im Vergleich mit den Meßwert nach 48 h Inkubation bei 37°C. Jeder Meßwert wurde dreifach angesetzt.

#### **4.2.6 Histologie**

Das Gewebe wurde über Nacht in Formalin fixiert, zugeschnitten und im Shandon Hypercenter XP (Thermo Scientific) in Paraffin eingebettet. 6 µm Schnitte wurden entparaffiniert, gefärbt und eingedeckt.

##### *Hämatoxylin-Eosin (HE)*

Färbung mit Hämatoxylin und Eosin Lösung (Thermo Scientific Shandon)

##### *Giemsa*

Färbung mit Giemsa Azur-Eosin Methylenblaulösung (Merck KgaA, Darmstadt)

##### *Trichrom-Masson*

Färbung mit Resorcin-Fuchsin nach Weigert, Eisenhämatoxylin nach Weigert, Ponceau-Fuchsin-Masson, Phosphormolybdänsäure Orange und Lichtgrün-Lösung (Waldeck GmbH, Münster)

##### *Chloroacetatesterasefärbung*

Färbung mit Naphthol-AS-D-Chloracetatlösung (Sigma-Aldrich) und Hexazoniumlösung in PBS. Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun.

#### **4.2.6.1 Immunhistochemie**

6 µm Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und zur Antigendemaskierung 15 min in 10 mM Na-Citrat Puffer pH 6 bei 95°C inkubiert, anschließend blockiert und mit den Erstantikörpern CD45R/B220 (Klon RA3-6B2, eBioscience), CD3ε (polyklonal Kaninchen anti-Human, Dako, Hamburg), F4/80 (Klon Cl:A3-1, AbD Serotec, Düsseldorf), Ki-67 (Klon Tec-3, Dako) inkubiert und mit entsprechendem Zweitantikörper und Vectastain Elite ABC Kit detektiert.

#### **4.2.6.2 Colitis-Score**

Die Stärke der Entzündung in Colon und Caecum wurde auf HE-Schnitten mit folgendem Punktesystem von 0-4 abgeschätzt:

0: Abwesenheit von Infiltraten mit neutrophilen Granulozyten, nur normales lymphatisches Gewebe;

1: Schwache Infiltration mit Neutrophilen ohne Zerstörung der Mucosa;

- 2: Dichte entzündliche Infiltration, die eine Trennung der Darmkrypten von der Lamina muscularis mucosae und eine beginnende Destruktion der epithelialen Krypten verursacht;
- 3: Starke Abnahme von epithelialen Krypten und Auftreten von zahlreichen „Kryptenabszessen“;
- 4: Fokal völlige Abwesenheit von epithelialen Krypten, Erosion des Oberflächenepithels.

## 4.2.7 Tierexperimentelle Methoden

### 4.2.7.1 Haltung

Die Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Pathologie, Universitätsklinik Köln im „specific pathogen free“ (SPF) Bereich gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser, ein Tag-Nacht Zyklus dauerte 12h/12h.

### 4.2.7.2 Genotypisierung

Nachwuchs wurde im Alter von 3 Wochen von den Elterntieren abgesetzt, nach Geschlecht aufgeteilt, mit einer Ohrmarke versehen und ca. 0,5 cm Schwanzspitze biopsiert. Die Schwanzspitze wurde über Nacht bei 55°C in 500 µl Tail lysis buffer im Eppendorf-Thermomixer gelöst. Ungelöste Haare und Knochen wurde bei 16.100 g für 5 min abzentrifugiert, aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 700 µl Isopropanol genomische DNA gefällt und durch Zentrifugation bei 16.100 g präzipitiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 105 µl TE Puffer gelöst. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR, eine Übersicht gibt Tabelle 4-6.

Stamm / PCR	Primer	Programm	Allel / Bande
<i>Kit<sup>DB14Vfllox</sup></i> T7	P13, P14	T <sub>a</sub> 57°C 35 Zyklen	flox: 500 bp, del: 500 bp, wt: -
<i>Kit<sup>DB14Vfllox</sup></i> gb2	P9, P10	T <sub>a</sub> 62°C 35 Zyklen	flox: 252 bp, del: -, wt: -
<i>Kit<sup>DB14Vfllox</sup></i> SP6	P15, P16	T <sub>a</sub> 57°C 35 Zyklen	flox: 400 bp del: bp, wt: -
<i>Kit<sup>DB14Vfllox</sup></i> Int1-2	P7, P25	T <sub>a</sub> 57°C 35Zyklen	flox: -, del: 215 bp wt: 181 bp
Deleter-Cre	P21, P22	T <sub>a</sub> 58°C 35 Zyklen	Cre: 600 bp
<i>Mx1-Cre</i>	P26, P22	T <sub>a</sub> 54°C 35 Zyklen	Cre: 596 bp
<i>A-Mcpt5-Cre</i>	P23, P24	T <sub>a</sub> 57°C 30 Zyklen	Cre: 554 bp

Tabelle 4-6 Genotypisierung der Mausstämme mit PCR

Das Standard-PCR Protokoll wurde mit den angegebenen Primern, Annealing Temperatur (T<sub>A</sub>) und Zyklenzahl durchgeführt. Die letzte Spalte gibt die Bandenlänge wieder, für das *Kit<sup>DB14Vfllox</sup>* Transgen ist für verschiedene *Kit*-Allele die Bandenlänge angegeben (-, kein PCR-Produkt)



#### **4.2.7.3 Injektion von pl:C**

Die Tiere erhielten insgesamt drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen an jedem zweiten Tag mit 250 µg pl:C (GE Amersham oder Invivogen, Toulouse) in 100 µl steriler, isotonischer Kochsalzlösung.

#### **4.2.7.4 Hautbiopsie**

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 10 µl Anästhesielösung pro Gramm Körpergewicht betäubt. Die Tiere wurden am Rücken rasiert. Die Rückenhaut in Höhe des Brustbeins wurde gefaltet und mit einer 5 mm Biopsiestanze (Stiefel, Offenbach) wurde an der Kante der Hautfalte ein Halbkreis ausgestochen.

#### **4.2.7.5 Blutabnahme**

Adulten Tieren wurde durch Anschnitt der Schwanzvene Blut entnommen. Teilweise wurden die Tiere mit Isofluran-Überdosis getötet und anschließend Blut durch Punktion der Vena cava entnommen. Serum wurde durch Gerinnung über Nacht bei 4°C, anschließender Zentrifugation bei 2.000 g für 10 min und vorsichtige Abnahme des Überstandes gewonnen.

Neugeborene Tiere wurden durch Dekapitation getötet, dass dabei austretende Blut wurde mit einer heparinsierten Hämatokritkapillare (Brand, Wertheim) aufgefangen. Die Zahl kernhaltiger Zellen im fetalen Blut wurde nach 1:20 oder 1:400 Verdünnung mit Türkscher Lösung (3 % (v/v) Essigsäure, 1 % (m/v) Gentianaviolett) mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

## 5 Abkürzungen

In den meisten Fällen wurden in der Literatur gebräuchliche, englischsprachige Abkürzungen verwendet.

% (m/m)	Massenprozent
% (m/v)	Prozent Masse pro Volumen
% (v/v)	Volumenprozent
AGM-Region	Aorta, Gonaden, Mesonephros-Region
ASM	Agressive systemic mastocytosis
BAC	Bacterial artificial chromosome
BMMC	Bone marrow-derived mast cell
bp	Basepair
BSA	Bovines Serum Albumin
CM	Cutaneous mastocytosis
cm	Chloramphenicol
CTMC	Connective tissue mast cell
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Epo	Erythropoetin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetal calf serum
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
G	Gauge
g	9,81 m/s <sup>2</sup>
GC	Germinal center
GIST	Gastrointestinal stromal tumor
h	Hour
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HPLC	High performance liquid chromatography
HSC	Hematopoietic stem cell
ICC	Interstitial Cajal cell
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ISM	Indolent systemic mastocytosis

JMD	Juxtamembrandomäne
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KID	Kinaseinsertionsdomäne
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCL	Mast cell leukemia
MCP	Mast cell progenitor
min	Minute
MMC	Mucosal mast cell
MMCP	Murine mast cell protease
p.c.	Post coitium
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI	Propidiumiodid
pl:C	Poly Inosin:Cytidin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PLC	Phospholipase C
RT	Reverse transcription
SCF	Stem cell factor
SDS	Sodium dodecylsulfate
SH2	Src homology 2
S/	Steel locus
SM	Systemic mastocytosis
SM-AHMND	Systemic mastocytosis with additional hematopoietic non-mast cell disease
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
tet	Tetrazyklin
Tg	Transgene Gründerlinie
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
W	Dominant white spotting locus

## 6 Zusammenfassung

Mastozytose ist eine seltene Erkrankung, die durch abnormale Zahlen von Mastzellen in Haut und inneren Organen gekennzeichnet ist. Die Erkrankung, die durch eine starke Variation bezüglich ihrer klinischen Manifestationen charakterisiert ist, konnte mit (meist) somatischen Mutationen des *Kit*-Genes assoziiert werden, die zur konstitutiven, Ligand-unabhängigen Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase Kit führen. Der Kit-Signalweg kontrolliert Differenzierung, Proliferation und Überleben von hämatopoetischen Vorläuferzellen und Mastzellen. Die klinische Ausprägung der Erkrankung scheint wesentlich durch das Differenzierungsstadium der vom ursprünglichen Mutationsereignis betroffenen Zelle abzuhängen. Ziel der Arbeit war die Generierung eines Tiermodells für Mastozytose, bei dem die Ausprägung eines mutierten Kit-Rezeptors zeitlich und räumlich kontrollierbar ist.

In ein „bacterial artificial chromosome“, das die gesamte Sequenz des *Kit*-Gens und weite flankierende Bereiche enthielt, wurde die aktivierende Punktmutation *Kit*<sup>D814V</sup>, das murine Homolog der am häufigsten in Mastozytosepatienten beobachteten Mutation *Kit*<sup>D816V</sup>, eingebracht. Eine konditionale Expression des transgenen *Kit*<sup>D814V/flox</sup>-Allels wurde durch *Cre/loxP*-medierte Exzision eines im ersten Intron platzierten Stopp-Elementes ermöglicht. Das Konstrukt wurde durch Pronukleusinjektion in das murine Genom eingeführt. Die Expression des mutierten *Kit* in adulten Tieren, unter anderem in hämatopoetischen Vorläuferzellen, führte zu rascher, progressiver Mastzellinfiltration der Haut und war häufig von einer B-Zellneoplasie und fokaler Colitis begleitet. Beschränkung der *Kit*<sup>D814V</sup> Expression auf reife Mastzellen resultierte in vergleichbarer Mastzellhyperplasie und Colitis, die sich jedoch deutlich langsamer entwickelten. Die embryonale Expression des konstitutiv aktiven *Kit*-Transgens führte zu einer massiv gesteigerten Erythropoese und perinataler Lethalität. Die wenigen überlebenden Tiere entwickelten ebenfalls eine starke Mastzellhyperplasie und Darmentzündung. Die Ergebnisse zeigen, dass *Kit*<sup>D814V</sup>-Effekte stark vom Entwicklungszeitpunkt und Differenzierungsstadium der Zelle abhängen, in welcher die Mutation auftritt.

## Summary

Mastocytosis is a rare disease characterized by abnormal mast cell numbers in skin and internal organs. The disease, which shows a broad heterogeneity of clinical manifestations, has been associated with (in most cases) somatic mutations of the *Kit* gene, resulting in constitutive, ligand-independent activation of the receptor tyrosine kinase Kit. Signaling through the Kit receptor controls differentiation, proliferation and survival of hematopoietic precursor cells and mast cells. The clinical course and severity of the disease seems to critically depend on the state of differentiation of the cell which was originally hit by the gain of function mutation. Aim of this work was to generate a mouse model for mastocytosis allowing for temporal and spatial control of the expression of the mutant kit.

A transgene was constructed on the basis of a „bacterial artificial chromosome“ containing the entire *kit* gene along with abundant flanking sequence. The activating point mutation *Kit*<sup>D814V</sup>, the murine homologue of the most common activating mutation in human patients, *Kit*<sup>D816V</sup>, was introduced into the transgenic Kit. Conditional expression of the mutant Kit was possible by Cre//loxP-mediated excision of a stop-element inserted into the first *Kit* intron. The construct was introduced into the murine genome by pronucleus injection. Expression of the transgenic *Kit*<sup>D814Vfloxed</sup> in hematopoietic precursors of adult animals caused severe mast cell infiltration of the skin with 100 % penetrance at young age and was frequently associated with additional hematopoietic B lineage-derived neoplasms and focal colitis. Restriction of transgene expression to mature mast cells resulted in a similar disease developing, however, with significantly slower kinetics. Embryonic expression led to exaggerated erythropoiesis in newborns with a high rate of perinatal lethality. The mice surviving into adulthood developed mast cell hyperplasia in skin and internal organs as well as colitis. These results demonstrate that the effects of constitutive Kit signaling critically depend on the developmental stage and the state of differentiation of the cell hit by the gain of function mutation.

## 7 Literatur

- Akin, C. (2005) Clonality and molecular pathogenesis of mastocytosis. *Acta Haematol*, **114**, 61-69.
- Akin, C., Fumo, G., Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Neckers, L. and Metcalfe, D.D. (2004) A novel form of mastocytosis associated with a transmembrane c-kit mutation and response to imatinib. *Blood*, **103**, 3222-3225.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F. and Akashi, K. (2005) Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18105-18110.
- Bedeir, A., Jukic, D.M., Wang, L., Mullady, D.K., Regueiro, M. and Krasinskas, A.M. (2006) Systemic mastocytosis mimicking inflammatory bowel disease: A case report and discussion of gastrointestinal pathology in systemic mastocytosis. *Am J Surg Pathol*, **30**, 1478-1482.
- Beghini, A., Tibiletti, M.G., Roversi, G., Chiaravalli, A.M., Serio, G., Capella, C. and Larizza, L. (2001) Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer*, **92**, 657-662.
- Bernex, F., De Sepulveda, P., Kress, C., Elbaz, C., Delouis, C. and Panthier, J.J. (1996) Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development*, **122**, 3023-3033.
- Berrozpe, G., Agosti, V., Tucker, C., Blanpain, C., Manova, K. and Besmer, P. (2006) A distant upstream locus control region is critical for expression of the Kit receptor gene in mast cells. *Mol Cell Biol*, **26**, 5850-5860.
- Besmer, P., Murphy, J.E., George, P.C., Qiu, F.H., Bergold, P.J., Lederman, L., Snyder, H.W., Brodeur, D., Zuckerman, E.E. and Hardy, W.D. (1986) A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature*, **320**, 415-421.
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C.A., Kollias, G., Kunkel, S.L., Hultner, L. and Rocken, M. (2000) Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med*, **192**, 1441-1452.
- Bowie, M.B., Kent, D.G., Copley, M.R. and Eaves, C.J. (2007) Steel factor responsiveness regulates the high self-renewal phenotype of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*, **109**, 5043-5048.
- Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H. and Marky, L.A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3746-3750.
- Broudy, V.C. (1997) Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, **90**, 1345-1364.
- Broudy, V.C., Lin, N.L., Liles, W.C., Corey, S.J., O'Laughlin, B., Mou, S. and Linnekin, D. (1999) Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood*, **94**, 1979-1986.
- Butterfield, J.H., Weiler, D., Dewald, G. and Gleich, G.J. (1988) Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leuk Res*, **12**, 345-355.
- Büttner, C., Henz, B.M., Welker, P., Sepp, N.T. and Grabbe, J. (1998) Identification of activating c-kit mutations in adult-, but not in childhood-onset indolent mastocytosis: a possible explanation for divergent clinical behavior. *J Invest Dermatol*, **111**, 1227-1231.

- Castells, M. and Austen, K.F. (2002) Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol*, **127**, 147-152.
- Cavalcante, M.C., Allodi, S., Valente, A.P., Straus, A.H., Takahashi, H.K., Mourao, P.A. and Pavao, M.S. (2000) Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. An ancient role in defense? *J Biol Chem*, **275**, 36189-36186.
- Chandler, K.J., Chandler, R.L., Broeckelmann, E.M., Hou, Y., Southard-Smith, E.M. and Mortlock, D.P. (2007) Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression. *Mamm Genome*, **18**, 693-708.
- Chen, C.C., Grimbaldston, M.A., Tsai, M., Weissman, I.L. and Galli, S.J. (2005) Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11408-11413.
- Chiu, H. and Lagunoff, D. (1972) Histochemical comparison of vertebrate mast cells. *Histochem J*, **4**, 135-144.
- Corless, C.L., Fletcher, J.A. and Heinrich, M.C. (2004) Biology of Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol*, **22**, 3813-3825.
- Demehri, S., Corbin, A., Loriaux, M., Druker, B.J. and Deininger, M.W. (2006) Establishment of a murine model of aggressive systemic mastocytosis/mast cell leukemia. *Exp Hematol*, **34**, 284-288.
- Dragatsis, I. and Zeitlin, S. (2001) A method for the generation of conditional gene repair mutations in mice. *Nucleic Acids Res*, **29**, E10.
- Echtenacher, B., Mannel, D.N. and Hultner, L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature*, **381**, 75-77.
- Ehrlich, P. (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. *Dissertation*.
- Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G. and Weaver, C.T. (2005) Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, **206**, 260-276.
- Enerbäck, L., Kolset, S.O., Kusche, M., Hjerpe, A. and Lindahl, U. (1985) Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. *Biochem J*, **227**, 661-668.
- Fantl, W.J., Johnson, D.E. and Williams, L.T. (1993) Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **62**, 453-481.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Kanayama, Y., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. and Kanakura, Y. (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*, **92**, 1736-1744.
- Galli, S.J. and Kitamura, Y. (1987) Genetically mast-cell-deficient W/W<sup>v</sup> and Sl/Sl<sup>d</sup> mice. Their value for the analysis of the roles of mast cells in biologic responses in vivo. *Am J Pathol*, **127**, 191-198.
- Garcia-Montero, A.C., Jara-Acevedo, M., Teodosio, C., Sanchez, M.L., Nunez, R., Prados, A., Aldanondo, I., Sanchez, L., Dominguez, M., Botana, L.M., Sanchez-Jimenez, F., Sotlar, K., Almeida, J., Escribano, L. and Orfao, A. (2006) KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*, **108**, 2366-2372.

- Geissler, E.N., Cheng, S.V., Gusella, J.F. and Housman, D.E. (1988) Genetic analysis of the dominant white-spotting (W) region on mouse chromosome 5: identification of cloned DNA markers near W. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9635-9639.
- Giebel, L.B. and Spritz, R.A. (1991) Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8696-8699.
- Gilfillan, A.M. and Rivera, J. (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev*, **228**, 149-169.
- Gilfillan, A.M. and Tkaczyk, C. (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol*, **6**, 218-230.
- Giraldo, P. and Montoliu, L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res*, **10**, 83-103.
- Gleixner, K.V., Mayerhofer, M., Aichberger, K.J., Derdak, S., Sonneck, K., Bohm, A., Gruze, A., Samorapoompichit, P., Manley, P.W., Fabbro, D., Pickl, W.F., Sillaber, C. and Valent, P. (2006) PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expression the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood*, **107**, 752-759.
- Gotlib, J., Berube, C., Growney, J.D., Chen, C.C., George, T.I., Williams, C., Kajiguchi, T., Ruan, J., Lilleberg, S.L., Durocher, J.A., Lichy, J.H., Wang, Y., Cohen, P.S., Arber, D.A., Heinrich, M.C., Neckers, L., Galli, S.J., Gilliland, D.G. and Coutre, S.E. (2005) Activity of the tyrosine kinase inhibitor PKC412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation. *Blood*, **106**, 2865-2870.
- Gounaris, E., Erdman, S.E., Restaino, C., Gurish, M.F., Friend, D.S., Gounari, F., Lee, D.M., Zhang, G., Glickman, J.N., Shin, K., Rao, V.P., Poutahidis, T., Weissleder, R., McNagny, K.M. and Khazaie, K. (2007) Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19977-19982.
- Grimbaldeston, M.A., Chen, C.C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.Y. and Galli, S.J. (2005) Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol*, **167**, 835-848.
- Gurish, M.F. and Boyce, J.A. (2006) Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol*, **117**, 1285-1291.
- Hallgren, J. and Gurish, M.F. (2007) Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev*, **217**, 8-18.
- Hartmann, K. and Henz, B.M. (2001) Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *Br J Dermatol*, **144**, 682-695.
- Hartmann, K. and Metcalfe, D.D. (2000) Pediatric mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*, **14**, 625-640.
- Hartmann, K., Wardelmann, E., Ma, Y., Merkelbach-Bruse, S., Preussner, L.M., Woolery, C., Baldus, S.E., Heinicke, T., Thiele, J., Büttner, R. and Longley, B.J. (2005) Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology*, **129**, 1042-1046.
- Heinrich, M.C., Corless, C.L., Blanke, C.D., Demetri, G.D., Joensuu, H., Roberts, P.J., Eisenberg, B.L., von Mehren, M., Fletcher, C.D.M., Sandau, K., McDougall, K., Ou, W.-b., Chen, C.-J. and Fletcher, J.A. (2006) Molecular



- Correlates of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol*, **24**, 4764-4774.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A., Werb, Z. and Rafii, S. (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, **109**, 625-637.
- Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y. and Kitamura, Y. (1998) Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science*, **279**, 577-580.
- Hohenstein, P., Slight, J., Ozdemir, D., Burn, S., Berry, R. and Hastie, N. (2008) High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi. *PathoGenetics*, **1**, 3.
- Horny, H.P., Sotlar, K. and Valent, P. (2007) Mastocytosis: state of the art. *Pathobiology*, **74**, 121-132.
- Jamur, M.C., Grodzki, A.C., Berenstein, E.H., Hamawy, M.M., Siraganian, R.P. and Oliver, C. (2005) Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood*, **105**, 4282-4289.
- Kapur, R. and Zhang, L. (2001) A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem*, **276**, 1099-1106.
- Kawakami, T. and Galli, S.J. (2002) Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*, **2**, 773-786.
- Keller, J.R., Ortiz, M. and Ruscetti, F.W. (1995) Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. *Blood*, **86**, 1757-1764.
- Kemmer, K., Corless, C.L., Fletcher, J.A., McGreevey, L., Haley, A., Griffith, D., Cummings, O.W., Wait, C., Town, A. and Heinrich, M.C. (2004) KIT Mutations Are Common in Testicular Seminomas. *Am J Pathol*, **164**, 305-313.
- Kitayama, H., Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Oritani, K., Ikeda, H., Sugahara, H., Mitsui, H., Kanayama, Y. and Kitamura, Y. (1995) Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, **85**, 790-798.
- Kitayama, H., Tsujimura, T., Matsumura, I., Oritani, K., Ikeda, H., Ishikawa, J., Okabe, M., Suzuki, M., Yamamura, K., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. and Kanakura, Y. (1996) Neoplastic transformation of normal hematopoietic cells by constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase. *Blood*, **88**, 995-1004.
- Knight, P.A., Wright, S.H., Lawrence, C.E., Paterson, Y.Y. and Miller, H.R. (2000) Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med*, **192**, 1849-1856.
- Knudson, A.G. (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 157-162.
- Kocabas, C.N., Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Metcalfe, D.D. and Akin, C. (2005) Analysis of the lineage relationship between mast cells and basophils using the c-kit D816V mutation as a biologic signature. *J Allergy Clin Immunol*, **115**, 1155-1161.

- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. and Rajewsky, K. (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269**, 1427-1429.
- Little, C.C. and Cloudman, A.M. (1937) The Occurrence of a Dominant Spotting Mutation in the House Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **23**, 535-537.
- Longley, B.J., Metcalfe, D.D., Tharp, M., Wang, X., Tyrrell, L., Lu, S.Z., Heitjan, D. and Ma, Y. (1999) Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 1609-1614.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. and Jonkers, J. (2001) Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9209-9214.
- Lu, L.F., Lind, E.F., Gondek, D.C., Bennett, K.A., Gleeson, M.W., Pino-Lagos, K., Scott, Z.A., Coyle, A.J., Reed, J.L., Van Snick, J., Strom, T.B., Zheng, X.X. and Noelle, R.J. (2006) Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature*, **442**, 997-1002.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. and Abraham, S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, **381**, 77-80.
- Marshall, J.S. (2004) Mast-cell responses to pathogens. *Nat Rev Immunol*, **4**, 787-799.
- Maurer, M., Wedemeyer, J., Metz, M., Piliponsky, A.M., Weller, K., Chatterjea, D., Clouthier, D.E., Yanagisawa, M.M., Tsai, M. and Galli, S.J. (2004) Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature*, **432**, 512-516.
- Mayerhofer, M., Gleixner, K.V., Hoelbl, A., Florian, S., Hoermann, G., Aichberger, K.J., Bilban, M., Esterbauer, H., Krauth, M.T., Sperr, W.R., Longley, J.B., Kralovics, R., Moriggl, R., Zappulla, J., Liblau, R.S., Schwarzinger, I., Sexl, V., Sillaber, C. and Valent, P. (2008) Unique effects of KIT D816V in BaF3 cells: induction of cluster formation, histamine synthesis, and early mast cell differentiation antigens. *J Immunol*, **180**, 5466-5476.
- Metcalfe, D.D. (2008) Mast cells and mastocytosis. *Blood*, **112**, 946-956.
- Metcalfe, D.D., Baram, D. and Mekori, Y.A. (1997) Mast cells. *Physiol Rev*, **77**, 1033-1079.
- Metz, M., Piliponsky, A.M., Chen, C.C., Lammel, V., Abrink, M., Pejler, G., Tsai, M. and Galli, S.J. (2006) Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, **313**, 526-530.
- Miettinen, M. and Lasota, J. (2005) KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **13**, 205-220.
- Mikkola, H.K. and Orkin, S.H. (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, **133**, 3733-3744.
- Mol, C.D., Dougan, D.R., Schneider, T.R., Skene, R.J., Kraus, M.L., Scheibe, D.N., Snell, G.P., Zou, H., Sang, B.-C. and Wilson, K.P. (2004) Structural Basis for the Autoinhibition and STI-571 Inhibition of c-Kit Tyrosine Kinase. *J Biol Chem*, **279**, 31655-31663.
- Mol, C.D., Lim, K.B., Sridhar, V., Zou, H., Chien, E.Y.T., Sang, B.-C., Nowakowski, J., Kassel, D.B., Cronin, C.N. and McRee, D.E. (2003) Structure of a c-Kit Product Complex Reveals the Basis for Kinase Transactivation. *J Biol Chem*, **278**, 31461-31464.

- Moriyama, Y., Tsujimura, T., Hashimoto, K., Morimoto, M., Kitayama, H., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. and Kanakura, Y. (1996) Role of Aspartic Acid 814 in the Function and Expression of c-kit Receptor Tyrosine Kinase. *J Biol Chem*, **271**, 3347-3350.
- Motro, B., van der Kooy, D., Rossant, J., Reith, A. and Bernstein, A. (1991) Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development*, **113**, 1207-1221.
- Muyrers, J.P.P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W. and Stewart, A.F. (2000) Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination. *EMBO Rep.*, **1**, 239-243.
- Nagata, H., Worobec, A.S., Oh, C.K., Chowdhury, B.A., Tannenbaum, S., Suzuki, Y. and Metcalfe, D.D. (1995) Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 10560-10564.
- Nigrovic, P.A., Gray, D.H., Jones, T., Hallgren, J., Kuo, F.C., Chaletzky, B., Gurish, M., Mathis, D., Benoist, C. and Lee, D.M. (2008) Genetic inversion in mast cell-deficient (W(sh)) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *Am J Pathol*, **173**, 1693-1701.
- Ogawa, M., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Hayashi, S., Kunisada, T., Nakao, J., Kina, T., Sudo, T., Kodama, H. and Nishikawa, S. (1993) Expression and function of c-Kit in fetal hemopoietic progenitor cells: transition from the early c-Kit-independent to the late c-Kit-dependent wave of hemopoiesis in the murine embryo. *Development*, **117**, 1089-1098.
- Okayama, Y. and Kawakami, T. (2006) Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res*, **34**, 97-115.
- Osoegawa, K., Tateno, M., Woon, P.Y., Frengen, E., Mammoser, A.G., Catanese, J.J., Hayashizaki, Y. and de Jong, P.J. (2000) Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res*, **10**, 116-128.
- Pan, J., Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H.M., Akin, C., Manshour, T., Lamb, P., Cortes, J.E., Tefferi, A., Giles, F.J. and Verstovsek, S. (2007) EXEL-0862, a novel tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis in vitro and ex vivo in human mast cells expressing the KIT D816V mutation. *Blood*, **109**, 315-322.
- Pardanani, A., Elliott, M., Reeder, T., Li, C.Y., Baxter, E.J., Cross, N.C. and Tefferi, A. (2003) Imatinib for systemic mast-cell disease. *Lancet*, **362**, 535-536.
- Peschke, K. (2008) Generation of a mouse model with expression of a mutant, constitutively active kit receptor in mast cells. *Diploma thesis, Köln*.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M. and Mak, T.W. (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell*, **73**, 457-467.
- Rijnierse, A., Koster, A.S., Nijkamp, F.P. and Kraneveld, A.D. (2006a) Critical role for mast cells in the pathogenesis of 2,4-dinitrobenzene-induced murine colonic hypersensitivity reaction. *J Immunol*, **176**, 4375-4384.
- Rijnierse, A., Koster, A.S., Nijkamp, F.P. and Kraneveld, A.D. (2006b) TNF $\alpha$  is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **291**, 969-976.
- Rodewald, H.R., Dessing, M., Dvorak, A.M. and Galli, S.J. (1996) Identification of a committed precursor for the mast cell lineage. *Science*, **271**, 818-822.

- Rolink, A.G., ten Boekel, E., Yamagami, T., Ceredig, R., Andersson, J. and Melchers, F. (1999) B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells. *Immunol Lett*, **68**, 89-93.
- Rönstrand, L. (2004) Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-kit. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2535-2548.
- Roskoski, R., Jr. (2005a) Signaling by Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 1-13.
- Roskoski, R., Jr. (2005b) Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 1307-1315.
- Sarvella, P.A. and Russell, L.B. (1956) STEEL, A NEW DOMINANT GENE IN THE HOUSE MOUSE: With Effects on Coat Pigment and Blood. *J Hered*, **47**, 123-128.
- Sasaki, Y., Calado, D.P., Derudder, E., Zhang, B., Shimizu, Y., Mackay, F., Nishikawa, S., Rajewsky, K. and Schmidt-Supprian, M. (2008) NIK overexpression amplifies, whereas ablation of its TRAF3-binding domain replaces BAFF:BAFF-R-mediated survival signals in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10883-10888.
- Schittenhelm, M.M., Shiraga, S., Schroeder, A., Corbin, A.S., Griffith, D., Lee, F.Y., Bokemeyer, C., Deininger, M.W.N., Druker, B.J. and Heinrich, M.C. (2006) Dasatinib (BMS-354825), a Dual SRC/ABL Kinase Inhibitor, Inhibits the Kinase Activity of Wild-Type, Juxtamembrane, and Activation Loop Mutant KIT Isoforms Associated with Human Malignancies. *Cancer Res*, **66**, 473-481.
- Scholten, J. (2009) Novel tools for mast cell research: Mast cell-specific Cre-mediated gene inactivation and inducible ablation of mast cells in vivo. *Dissertation, Köln*.
- Scholten, J., Hartmann, K., Gerbaulet, A., Krieg, T., Müller, W., Testa, G. and Roers, A. (2007) Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Res*, **17**, 307-315.
- Schwartz, L.B., Metcalfe, D.D., Miller, J.S., Earl, H. and Sullivan, T. (1987) Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*, **316**, 1622-1626.
- Schwenk, F., Baron, U. and Rajewsky, K. (1995) A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, **23**, 5080-5081.
- Sette, C., Dolci, S., Geremia, R. and Rossi, P. (2000) The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol*, **44**, 599-608.
- Smith, K. (2001) Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod Nutr Dev*, **41**, 465-485.
- Soriano, P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**, 70-71.
- Sotlar, K., Escribano, L., Landt, O., Mohrle, S., Herrero, S., Torrelo, A., Lass, U., Horny, H.P. and Bultmann, B. (2003) One-step detection of c-kit point mutations using peptide nucleic acid-mediated polymerase chain reaction clamping and hybridization probes. *Am J Pathol*, **162**, 737-746.
- Sperr, W.R., Horny, H.P. and Valent, P. (2002) Spectrum of associated clonal hematologic non-mast cell lineage disorders occurring in patients with systemic mastocytosis. *Int Arch Allergy Immunol*, **127**, 140-142.
- Tang, X., Boxer, M., Drummond, A., Ogston, P., Hodgins, M. and Burden, A.D. (2004) A germline mutation in KIT in familial diffuse cutaneous mastocytosis. *J Med Genet*, **41**, e88.

- Tsujimura, T., Furitsu, T., Morimoto, M., Isozaki, K., Nomura, S., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. and Kanakura, Y. (1994) Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood*, **83**, 2619-2626.
- Valent, P., Horny, H.P., Escribano, L., Longley, B.J., Li, C.Y., Schwartz, L.B., Marone, G., Nunez, R., Akin, C., Sotlar, K., Sperr, W.R., Wolff, K., Brunning, R.D., Parwaresch, R.M., Austen, K.F., Lennert, K., Metcalfe, D.D., Vardimann, J.W. and Bennett, J.M. (2001) Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*, **25**, 603-625.
- Wang, W., Horner, D.N., Chen, W.L., Zandstra, P.W. and Audet, J. (2008) Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng*, **99**, 1261-1272.
- Waskow, C., Paul, S., Haller, C., Gassmann, M. and Rodewald, H.R. (2002) Viable c-Kit(W/W) mutants reveal pivotal role for c-kit in the maintenance of lymphopoiesis. *Immunity*, **17**, 277-288.
- Waskow, C., Terszowski, G., Costa, C., Gassmann, M. and Rodewald, H.R. (2004) Rescue of lethal c-KitW/W mice by erythropoietin. *Blood*, **104**, 1688-1695.
- Wastling, J.M., Scudamore, C.L., Thornton, E.M., Newlands, G.F. and Miller, H.R. (1997) Constitutive expression of mouse mast cell protease-1 in normal BALB/c mice and its up-regulation during intestinal nematode infection. *Immunology*, **90**, 308-313.
- Wiesner, S.M., Jones, J.M., Hasz, D.E. and Largaespada, D.A. (2005) Repressible transgenic model of NRAS oncogene-driven mast cell disease in the mouse. *Blood*, **106**, 1054-1062.
- Witte, O.N. (1990) Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell*, **63**, 5-6.
- Wu, H., Klingmüller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G. and Lodish, H.F. (1997) Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1806-1810.
- Yamada, Y., Sanchez-Aguilera, A., Brandt, E.B., McBride, M., Al-Moamen, N.J., Finkelman, F.D., Williams, D.A., Cancelas, J.A. and Rothenberg, M.E. (2008) FIP1L1/PDGFRalpha synergizes with SCF to induce systemic mastocytosis in a murine model of chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome. *Blood*, **112**, 2500-2507.
- Yavuz, A.S., Lipsky, P.E., Yavuz, S., Metcalfe, D.D. and Akin, C. (2002) Evidence for the involvement of a hematopoietic progenitor cell in systemic mastocytosis from single-cell analysis of mutations in the c-kit gene. *Blood*, **100**, 661-665.
- Yee, N.S., Hsiau, C.W., Serve, H., Vosseller, K. and Besmer, P. (1994) Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem*, **269**, 31991-31998.
- Zappulla, J.P., Dubreuil, P., Desbois, S., Létard, S., Hamouda, N.B., Daëron, M., Delsol, G., Arock, M. and Liblau, R.S. (2005) Mastocytosis in mice expressing human Kit receptor with the activating Asp816Val mutation. *J Exp Med*, **202**, 1635-1641.
- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P.P. and Stewart, A.F. (1998) A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet*, **20**, 123-128.
- Zhang, Y., Ramos, B.F. and Jakschik, B.A. (1992) Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*, **258**, 1957-1959.

Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E.A., Jurecic, V. and Bradley, A. (2000) Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol Cell Biol*, **20**, 648-655.

## Danksagung

Herrn Professor Klein und Frau Privatdozentin Nischt möchte ich herzlich für die Begutachtung der Arbeit danken.

Herrn Professor Krieg danke ich für die Unterstützung und Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.

Herrn Professor Axel Roers möchte ich herzlich für die kompetente und liebenswerte Betreuung danken. Sein Enthusiasmus und Ideenreichtum haben die Arbeit ermöglicht.

Frau Doktor Julia Scholten möchte ich für unzählige kluge Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Frau Carmen Berns danke ich für die Unterstützung beim täglichen Kampf mit Genotypen, Schnitten und dem mir unverständlichen kliniksinternen Bestellwesen.

Den Mitarbeitern aus der Hautklinik möchte ich ganz herzlich für das gute Arbeitsklima danken, namentlich möchte ich die Kollegen aus dem „Innenbereich“ erwähnen: Katrin Peschke, Tobias Häring, Stefan Grotha und Sebastian Lanvermann.

Frau Privatdozentin Hartmann bin ich für die Bereitstellung einer durch die Fritz Thyssen Stiftung finanzierten Drittmittelstelle verbunden.

Meiner Familie und Freunden möchte ich für die Unterstützung danken, insbesondere meinem Vater Klaus Gerbaulet.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Helmut W. Klein betreut worden.

Köln, den 12. Mai 2009

Unterschrift:

## Teilpublikation

Gerbaulet, A., Wickenhauser, C., Scholten, J., Peschke, K., Drube, S., Horny, H.P., Kamradt, T., Naumann, R., Müller, W., Krieg, T., Hartmann, K. and Roers, A.

Mast cell hyperplasia, B cell malignancy and intestinal inflammation in mice with conditional expression of a constitutively active kit – *Manuskript in Revision*



