

Die Regulation des Interleukin-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen

Dissertation
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
Mainz

Christoph Becker
geb. in Homburg/ Saar

Mainz, 2000

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Transkription eukaryontischer Gene	1
1.2	Die Modulation der transkriptionellen Aktivität	3
1.2.1	Regulatorische Transkriptionsfaktoren	3
1.2.2	<i>Enhancer, Silencer</i> und Lokus-Kontrollregionen (LCR)	5
1.2.3	Der Einfluß des Chromatins	6
1.2.4	Der Einfluß der Methylierung regulatorischer Bereiche	7
1.3	Wichtige Transkriptionsfaktoren der Genregulation in myeloiden Zellen	8
1.3.1	PU.1: Ein Schlüsselregulator myeloider Gene	8
1.3.2	NF- κ B: Ein Schlüsselfaktor inflammatorischer Prozesse	9
1.3.3	Die C/EBP Transkriptionsfaktor-Familie	10
1.3.4	Die GATA-Proteinfamilie	11
1.3.5	Transkriptionsfaktoren und myeloide Entwicklung	12
1.4	Interleukin-12	13
1.4.1	Interleukin-12 und der Interleukin-12 Rezeptor	14
1.4.2	Die Regulation der Immunantwort durch IL-12	15
1.4.3	Die Rolle von Interleukin-12 in der Immunpathogenese von Endotoxin-vermitteltem Schock und chronischen Entzündungsreaktionen	16
1.4.4	Transkriptionelle Regulation der IL-12 p40 Untereinheit	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Verwendete Materialien und Chemikalien	21
2.2	Zellbiologische Methoden	21

2.2.1	Kultivierung und Konservierung von Zellen	21
2.2.2	Medien und Lösungen	22
2.2.3	Verwendete Zelllinien	22
2.2.4	Isolierung von CD14 positiven Monozyten aus Blut	23
2.2.5	Isolierung von Milzzellen aus der Maus	24
2.2.6	Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum der Maus	25
2.2.7	Analytische Durchflußzytometrie (FACS)	25
2.2.8	Behandlung der Zellen mit verschiedenen Faktoren	26
2.3	Gewinnung und Analyse von Proteinextrakten	26
2.3.1	Isolierung von Gesamtzellextrakten	26
2.3.2	Isolierung von nukleären Proteinen	27
2.3.3	<i>In vitro</i> Transkription/Translation von Proteinen	28
2.3.4	Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford et al., 1976)	28
2.3.5	ELISA	29
2.3.6	Western Blot Analyse	30
2.4	Molekularbiologische Standardmethoden	31
2.4.1	Häufig verwendete Puffer und Medien	31
2.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.4.3	Restriktionsverdau von Plasmiden	32
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.4.6	Hybridisierung und Aufreinigung doppelsträngiger Oligonukleotide	34
2.4.6.1	„Annealing“ komplementärer Oligonukleotide	34
2.4.6.2	Gelelektrophorese zur Aufreinigung doppelsträngiger Oligonukleotide	34
2.4.6.3	Isolierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen	34
2.4.7	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	35
2.4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.4.9	Analytische und präparative Isolierung von Plasmid-DNS	37
2.4.9.1	Präparative Isolierung mit dem <i>Qiagen Maxi-Kit</i>	38
2.4.9.2	Analytische Isolierung von Plasmid-DNS	37
2.4.10	Isolierung von RNA	38
2.4.11	Ligation von DNA-Fragmenten	39
2.4.12	Transformation	40

2.5	Die Generierung des Reporter-gen-Konstruktes p40/pXP1	41
2.5.1	Klonierung des humanen IL-12 p40 Promotors in pCRII	41
2.5.2	Subklonierung des p40 Promotors in pXP1	41
2.6	Verwendete Expressionsvektoren	42
2.7	Sequenzierung von Plasmid-DNA	43
2.7.1	Denaturierung der Plasmid-DNA	43
2.7.2	Sequenzierungsreaktion	43
2.7.3	Auftrennung der Fragmente auf einem Sequenzierungsgel	44
2.8	Nachweis von mRNA-Transkripten mittels RT-PCR	44
2.9	Gelretardationsexperimente (EMSA)	46
2.9.1	Durchführung von Gelretardationsexperimenten	46
2.9.2	Herstellung eines nativen 5%igen Polyacrylamidgels	47
2.10	Verwendete Oligonukleotide	47
2.11	<i>In vivo</i> Footprinting	49
2.11.1	Prinzip der Methode	49
2.11.2	Benötigte Puffer und Lösungen	50
2.11.2	<i>In vivo</i> DMS-Behandlung von Zellen und Isolierung der DNA	51
2.11.3	<i>In vitro</i> DMS-Behandlung isolierter DNA	52
2.11.4	Piperidinspaltung methylierter DNA	52
2.11.5	Ligationsvermittelte PCR	52
2.11.6	Auswertung von <i>in vivo</i> Footprinting Experimenten	55
2.12	Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen	55
2.12.1	DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion	55
2.12.2	Kalziumphosphat-vermittelte Transfektio	56
2.13	Reporter-genanalysen	57
2.14	Gerichtete Mutagenese der Promotorsequenz	58

2.15	Herstellung von IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgenen Mäusen	59
2.15.1	Prinzip der Methode	59
2.15.2	Herstellung des Konstrukts	60
2.15.3	<i>Screening</i> der transgenen Mäuse	60
2.16	Immunhistochemische Nachweise	61
2.16.1	Herstellung von Zytopräparaten und Gewebeschnitten	61
2.16.3	Immunfluoreszenzfärbung	61
3	Ergebnisse	63
3.1	Etablierung eines Systems zur Analyse des IL-12 p40 Promotors	63
3.1.1	Isolierung von CD14 ⁺ Monozyten aus humanem Blut	63
3.1.2	Untersuchung der Interleukin-12 Proteinsekretion in CD14 ⁺ humanen Monozyten	64
3.1.3	Die Aktivierung der IL-12 p40 mRNA Expression in CD14 ⁺ Monozyten	65
3.1.4	Untersuchung der IL-12 p40 Promotoraktivität in humanen und murinen Zelllinien	66
3.1.5	Untersuchung der induzierbaren IL-12 p40 Promotoraktivität in RAW264.7 Makrophagen	68
3.2	Analyse des humanen IL-12 p40 Promotors in primären CD14⁺ Monozyten	70
3.2.1	<i>In vivo</i> „Footprinting“ des humanen IL-12 p40 Promotors in primären Monozyten	70
3.2.2	Funktionelle Analyse der <i>in vivo</i> methylierungsgeschützten Sequenzmotive	72
3.2.3	Ein p50/RelA Heterodimer bindet LPS-induziert an das NF-κB-Motiv des p40 Promotors in primären Monozyten.	73
3.2.4	C/EBPβ bindet an das C/EBP-Motiv des p40 Promotors in primären Monozyten	76
3.2.5	Der Transkriptionsfaktor C/EBPβ ist ein starker Transaktivator des IL-12 p40 Promotors	79

3.2.6	PU.1 bindet an die ETS-Erkennungssequenz des p40 Promotors in primären Monozyten	81
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines Repressor-elements im IL-12 p40 Promotor	82
3.3.1	Die gerichtete Mutagenese des GA-12 Motivs führt zu einer Verstärkung der IL-12 p40 Promotoraktivität	82
3.3.2	GAP-12 bindet an das GA-12 Motiv in ruhenden Monozyten und RAW264.7 Makrophagen	83
3.3.3	GAP-12 ist ein GATA-ähnlicher Transkriptionsfaktor	85
3.3.4	Die Bindung von GAP-12 wird durch Interleukin-4 und Prostaglandin-E2, Repressoren der IL-12 p40 Expression, verstärkt	88
3.4	Die Generierung und Analyse IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgener Mäuse	90
3.4.1	Die Expression des Transgens erfolgt zelltyp- und stimulations-spezifisch	91
3.4.2	Die Untersuchung konstitutiver p40 Promotoraktivität in verschiedenen Organen transgener Mäuse	94
3.4.3	Untersuchung der konstitutiven Promotoraktivität im Darm transgener Mäuse	95
3.4.4	Unterschiedliche Komplexe binden in den einzelnen Darmabschnitten an das C/EBP- und NF-κB-Motiv	97
4.	Diskussion	98
4.1	Der proximale Promotor gewährleistet die stimulations- und gewebespezifische Expression des IL-12 p40 Gens	98
4.2	Der IL-12 p40 Promotor wird in humanen Monozyten durch die Interaktion von C/EBPβ, NF-κB p50/p65 und PU.1 mit ihren Zielsequenzen aktiviert	100
4.2.1	Die LPS/ Interferon-γ stimulierte Expression des IL12-p40 Gens in humanen Monozyten	101

4.2.2	Ein Heterodimer aus p50/ p65 bindet an das NF- κ B-Motiv in LPS-stimulierten Monozyten	102
4.2.3	C/EBP β bindet an den IL-12 p40 Promotor und ist ein starker Transaktivator der Promotoraktivität	104
4.2.4	Der Transkriptionsfaktor PU.1 bindet die ETS-Erkennungssequenz im humanen IL-12 p40 Promotor	106
4.3	Die Repression des IL-12 p40 Promotors durch GAP-12	107
4.4	Ein kooperativer Mechanismus der LPS-vermittelter IL-12 p40 Promotoraktivierung	109
4.5	Hohe konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität im terminalen Ileum transgener Mäuse. Implikationen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.	113
4.6	Perspektiven	115
5.	Zusammenfassung	117
6.	Literaturverzeichnis	119
7.	Abkürzungsverzeichnis	135
 Anhang		
	Danksagung	139
	Lebenslauf	140
	Publikationsliste	141
	Eidesstattliche Erklärung	143

1 Einleitung

1.1 Die Transkription eukaryontischer Gene

Die Regulation eukaryontischer Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Dazu gehören die Transkription, die Prozessierung der Ribonukleinsäure (RNA), der Transport der RNA vom Zellkern in das Zytoplasma und die Translation (Knippers, 1995). Die meisten eukaryontischen Gene werden transkriptionell reguliert, also durch Beeinflussung der Häufigkeit mit der ein Gen abgelesen wird. Im Mittelpunkt steht dabei der Promotor des Gens, den man in zwei funktionelle Bereiche unterteilen kann: (1) Am basalen Promotor setzt sich der Transkriptionsapparat zusammen. Dieser Teil beinhaltet die Transkriptionsstartstelle sowie die ca. 25-30 bp stromaufwärts gelegene TATA-Box. Die TATA-Box kann jedoch in den Promotoren ständig aktiver Haushaltsgene fehlen, wobei diese allerdings einen funktionsfähigen Initiator im Bereich des Startkodons haben (Ernst und Smale, 1995). (2) Der regulatorische Promotor umfaßt je nach Gen wenige bis einige hundert Basenpaare stromaufwärts der TATA-Box. Im Bereich des regulatorischen Promotors binden aktivierende oder inhibierende Transkriptionsfaktoren an spezifische Erkennungssequenzen (*UAS-upstream activating sequences*) und beeinflussen so den Transkriptionsapparat am basalen Promotor (Knippers, 1995). Der regulatorische Promotor ist bei den meisten Genen für eine geordnete Zelltyp- und Stimulus-spezifische Expression verantwortlich. Die Transkription eukaryontischer Gene erfolgt mit Hilfe der RNA-Polymerasen, die RNA komplementär zur DNA-Matrize synthetisieren. Man unterscheidet im Zellkern von Eukaryonten drei unterschiedliche RNA-Polymerasen. Die RNA-Polymerasen I und III transkribieren die Gene für die ribosomale RNA (rRNAs), Transfer-RNA (tRNA) und andere kleine RNAs (snRNAs). Proteinkodierende Gene werden als Boten-RNA (mRNA) von der RNA-Polymerase II transkribiert (Watson et al., 1993). Voraussetzung für die Transkription eines Gens ist die Bildung eines stabilen Initiationskomplexes zwischen der RNA-Polymerase und der Promotorregion. Das Enzym ist dabei auf Hilfsfaktoren angewiesen, mit denen sie den basalen Transkriptionsapparat (Initiationskomplex) ausbildet. Dabei findet der Aufbau des Initiationskomplexes in einer geordneten Reihenfolge statt (siehe Abbildung 1.1).

Zunächst bindet der Transkriptionsfaktor TFIID an die TATA-Box. TFIID ist ein Multiproteinkomplex, der sich aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammensetzt. Im nächsten Schritt erfolgt die Anlagerung von TFIIB. Dieser Komplex dient nun als Plattform für die Bindung von RNA-Polymerase II. Das Enzym liegt im Komplex mit einem weiteren Faktor, TFIIF vor, welcher wahrscheinlich die Polymerase zum Transkriptionskomplex leitet (Knippers 1995). Schließlich wird der Komplex durch Anlagerung von TFIIE und TFIIH fertiggestellt. TFIIH nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Eine seiner Untereinheiten enthält eine Proteinkinase, welche das carboxyterminale Ende der Polymerase phosphoryliert und damit ihre Lösung von dem Transkriptionskomplex einleitet. Außerdem beinhaltet TFIIH eine DNA-Helikase, welche die Energie aus ATP-Spaltung dazu nutzt, den DNA-Doppelstrang zu trennen (Orphanides et al., 1996). Nach der Phosphorylierung löst sich die RNA-Polymerase II vom Initiationskomplex ab und wandert entlang des Gens, wobei sie die DNA-Matrize in mRNA umschreibt (Knippers, 1995).

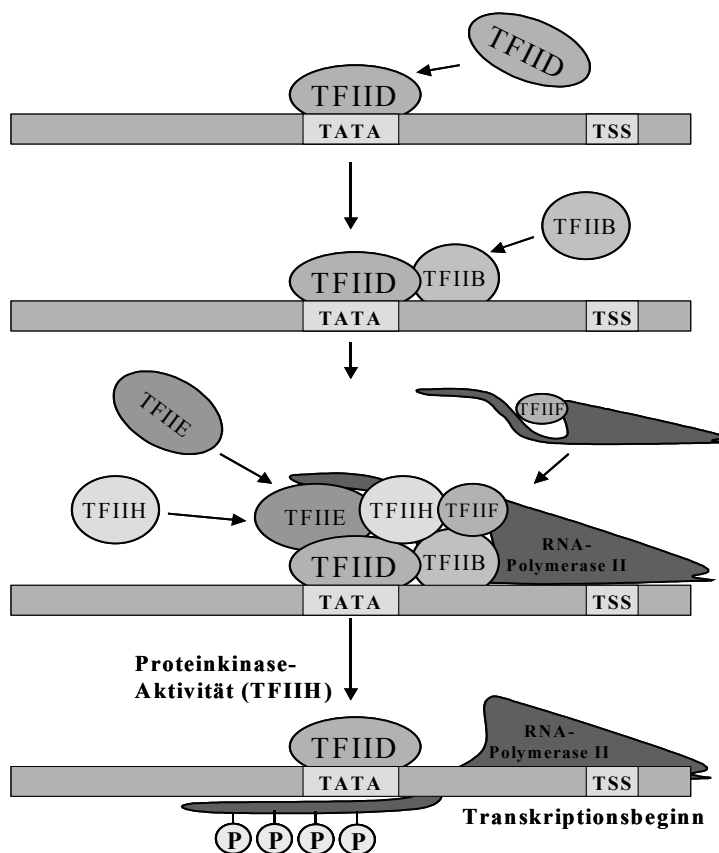


Abbildung 1.1 Modell des geordneten und schrittweisen Aufbaus des Initiationskomplexes am basalen Promotor RNA-Polymerase II transkribierter Gene. Die TATA-Box wird zunächst von TFIID erkannt, welches die sukzessive Anlagerung von basalen Transkriptionsfaktoren und schließlich der RNA-Polymerase II an den Promotor ermöglicht.

1.2 Die Modulation der transkriptionellen Aktivität

Der Transkriptionsregulation kommt hinsichtlich der Steuerung der Expression in allen Organismen eine wichtige Rolle zu. Als erster Schritt in der Entstehung von Proteinen kann hier eine unnötige Synthese von Zwischenprodukten verhindert werden.

Die transkriptionelle Aktivität von Genen kann durch vielfältige Mechanismen moduliert werden, die nachfolgend erläutert werden.

1.2.1 Regulatorische Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind durch ihre Tertiärstruktur in der Lage, die Nukleotide der DNA zu erkennen, ohne dabei den DNA-Doppelstrang öffnen zu müssen. Über Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen können sie stabil an Faktor-spezifische Erkennungssequenzen binden. Die Oberfläche des Transkriptionsfaktors ist dabei komplementär der Oberfläche der DNA in dieser Region (Alberts et al., 1994). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen basalen Transkriptionsfaktoren, die an den Promotor aller RNA-Polymerase II transkribierter Gene binden, werden die stromaufwärts gelegenen Aktivatorsequenzen des regulatorischen Promotors (UAS) von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gebunden. Vorkommen und relative Lage bestimmter Erkennungssequenzen im Promotor sind in der Regel für das betreffende Gen spezifisch und garantieren somit die individuelle Regulierbarkeit eines Gens. Es wird dabei angenommen, daß die meisten Transkriptionsfaktoren mit dem Initiationskomplex am basalen Promotor interagieren, diesen stabilisieren und so die Rekrutierung der RNA-Polymerase fördern (Alberts et al., 1994).

Transkriptionsfaktoren sind modular aufgebaut. Man kann je nach Faktor unter anderem Domänen für die Transaktivierung, Repression, Dimerisierung, DNA-Bindung und Protein-Protein-Interaktion unterscheiden. Basierend auf der Struktur ihrer DNA-bindenden Domäne werden sie in Familien gruppiert. In höheren Eukaryonten unterscheidet man die Motive Zinkfinger, Helix-Turn-Helix, Homöodomäne, Leucin-Zipper, β -Faltblatt und Helix-Loop-Helix (bHLH). Einige Transkriptionsfaktoren gehören jedoch in keine dieser vier Klassen. Die Multimerisierung, DNA-Bindung und Transaktivierung eines Transkriptionsfaktors ist selbst Ziel einer Vielzahl

regulatorischer Eingriffe der Zelle und von Protein zu Protein unterschiedlich. Am häufigsten werden diese Funktionen jedoch durch reversible Phosphorylierung von Tyrosin, Serin und Threoninresten des Faktors moduliert (Alberts et al., 1994). Über Transaktivierungsdomänen interagieren die so aktivierten Faktoren mit anderen Proteinen am Promotor, mit dem Initiationskomplex, mit Kofaktoren sowie mit Chromatinproteinen (Pabo und Sauer, 1992, Sauer und Tijan, 1997).

Aktivatoren verstärken die Genexpression. Klassische Beispiele für Aktivatoren sind AP-1 (*Activator-Protein 1*) und NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), die vor allem in Zellen des Immunsystems bei der Aktivierung einer Vielzahl von Genen beteiligt sind.

Koaktivatoren binden nicht selbst an die DNA, können aber mit Aktivatoren interagieren und so die Transkription verstärken. Beispielsweise bindet das VP16 Virusprotein an den Transkriptionsfaktor Oct-1 und an die Proteine des Initiationskomplexes TFIIB und TBP. Dadurch wird die Transkription von Virusproteinen in der Wirtszelle erhöht (Knippers, 1995).

Transkriptionsfaktoren können auch repressorisch wirken, indem sie die Transkriptionsrate inhibieren. Passive Repressorproteine hemmen die Aktivatorproteine durch Verdrängung von der DNA-Bindestelle, Ausbildung nicht-funktioneller Heterodimere, Verhinderung des Transports von Faktoren in den Nukleus oder Hemmung der Bindung des jeweiligen Koaktivators (Cowell, 1994). Ein typisches Beispiel für einen passiven Repressor, der durch Ausbildung inaktiver Heterodimere die Transkription hemmt, ist das Protein ID (*Inhibitor of Differentiation*). ID ist ein Helix-Loop-Helix Protein (HLH) und bildet Dimere mit dem myogenen Faktor MyoD oder dessen Dimerisierungspartner, dem Helix-Loop-Helix Protein E12. Durch diesen Vorgang wird die Dimerisierung von E12/MyoD verhindert und somit die Muskelzellendifferenzierung in proliferierenden Myoblasten gehemmt. Die Abtrennung der ID-Proteine stoppt die Zellproliferation und leitet die Ausdifferenzierung zur Muskelzelle ein (Norton et al., 1998). Aktive Repressoren binden selbst an für sie spezifischen DNA-Sequenzen in Promotoren von Zielgenen und inhibieren dadurch deren transkriptionelle Aktivierung. Beispiele für aktive Repressoren sind GATA-Proteine sowie YY-1 (YinYang-1). Beide Transkriptionsfaktoren üben allerdings eine duale Funktion aus. Sie können nämlich je nach Promotorkontext nach Bindung an die DNA sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken (Raich et al., 1995, Shi et al., 1991).

1.2.2 *Enhancer, Silencer* und Lokus-Kontrollregionen (LCR)

Die Regulation eukaryontischer Transkription ist sehr komplex und bei weitem nicht auf die Aktivität des Promotors beschränkt. Es konnte vielmehr gezeigt werden, daß auch DNA-Abschnitte, die viele tausend Basenpaare vom Promotor entfernt liegen, die transkriptionelle Aktivität eines Gens beeinflussen können. Zu diesen cis-regulatorischen Elementen gehören *Enhancer*, *Silencer*, Lokus-Kontrollregionen und sog. *Matrix Attachment Regions* (MAR).

Der Begriff *Enhancer* wird für einen Verstärker der Genexpression verwendet. *Enhancer* aktivieren dabei die Transkription eines entfernt liegenden Gens unabhängig von deren Abstand, Lage und Orientierung relativ zum Transkriptionsstart (Mitchell und Tijan, 1989). Negativ wirkende DNA-Abschnitte werden als *Silencer* bezeichnet. Wie *Enhancer* wirken auch *Silencer* positions- und orientierungsunabhängig. Möglicherweise sind *Silencer* wichtig bei der Aufrechterhaltung des dicht verpackten, für Transkriptionsfaktoren unzugänglichen Heterochromatins. Lokus-Kontrollregionen (LCR) beeinflussen die Chromatinstruktur über große DNA-Abschnitte hinweg und regulieren dadurch die Transkription innerhalb des Lokus. Möglicherweise öffnen diese Bereiche die Chromatinanordnung für Transkriptionsfaktoren. Dabei interagiert die LCR mit Proteinen, die in der Lage sind, Nukleosomen zu repositionieren. Ursprünglich wurden LCR im β -Globin Lokus von transgenen Mäusen identifiziert (Crossley und Orkin, 1993). Mittlerweile kennt man LCR auch in vielen anderen Genen, wie z.B. dem CD2-Gen (Greaves et al., 1989) und dem Immunglobulin H-Ketten Gen (Madisen und Groudine, 1994).

Wie regulatorische Promotoren, so führen *Enhancer*, *Silencer* und Lokus-Kontrollregionen ihre regulatorische Funktion durch die Rekrutierung aktivatorischer oder inhibitorischer Transkriptionsfaktoren aus. Man geht davon aus, daß die zum Teil sehr großen Abstände zwischen den regulatorischen Elementen und dem basalen Promotor durch eine Schlaufenbildung in der DNA überbrückt wird (siehe Abbildung 1.2). Von einigen Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1) konnte gezeigt werden, daß sie in der Lage sind, durch Bindung an die DNA diese zu verbiegen (*DNA-bending*).

Eine solche Schlaufenbildung kann auch durch *Matrix attachment regions* (MAR) erreicht werden. MARs sind A/T-reiche DNA-Abschnitte, die Chromatinschleifen in der nukleären Matrix verankern. Das häufig vorkommende Nebeneinander von MARs und transkriptionellen Regulatorelementen wie *Enhancern* ließ vermuten, daß MARs

die Transkription beeinflussen könnten. In Transfektionsstudien konnte tatsächlich gezeigt werden, daß manche MARs die Transkription stimulieren (Stief et al., 1989). In Experimenten mit IgH- transgenen Mäusen, bei denen die MARs aus dem IgH-Lokus deletiert waren, blieb der Locus transkriptionell inaktiv (Forrester et al., 1994). Inzwischen konnte eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die an MARs binden, unter anderem Lamin B1, Topoisomerase II und SAF-A, welches Schlaufenbildung induzieren kann (Hofmann et al., 1989).

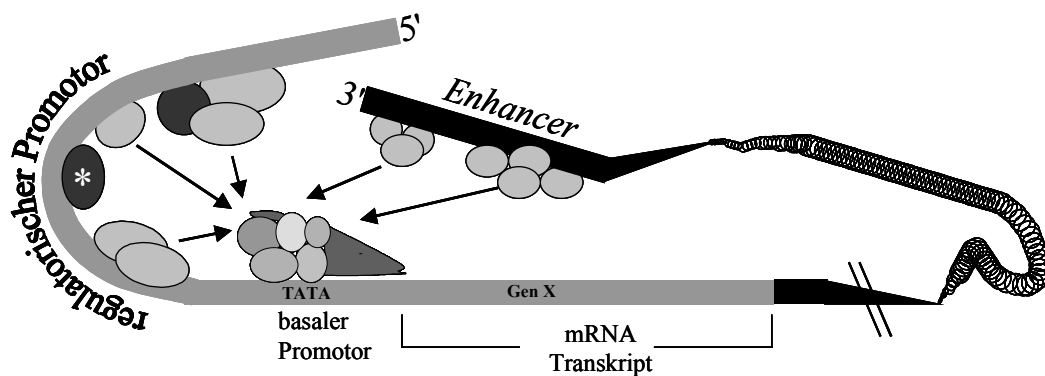


Abbildung 1.2 Modell der Einflußnahme proximaler und distaler regulatorischer Elemente auf die Transkriptionsinitiation am basalen Promotor. Durch Schlaufenbildung der DNA, induziert durch DNA-biegende Proteine wie AP-1 (*) kommen dort bindende Transkriptionsfaktoren in räumliche Nähe zum Initiationskomplex.

1.2.3 Der Einfluß des Chromatins

Das klassische Beispiel für den Effekt der Chromatinstruktur auf die Genexpression ist das X-Chromosom. In Zellen weiblicher Individuen ist das heterochromatische, dichtgepackte X-Chromosom weitgehend inaktiv, während die Gene des locker verpackten euchromatischen X-Chromosoms aktiv sind (Migeon, 1994).

Genomische DNA liegt in eukaryontischen Zellen nicht frei vor, sondern verpackt in Histonproteine zu einer Chromatin genannten Struktur. Die komplexe Verpackung der DNA in Chromatin hält diese möglicherweise in einem schwer zugänglichen transkriptionell inaktiven Zustand. Um die Transkription eines Gens zu aktivieren, müssen die Transkriptionsfaktoren in der Lage sein, ihre Erkennungssequenz im nukleosomalen Kontext zu identifizieren. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren ist

möglicherweise notwendig, um die repressive Natur des Chromatins aufzuheben. Während der Transkription geht diese höhere Ordnung verloren, und die DNA wird sensitiv gegenüber der Behandlung mit Nukleasen wie DNase I. Solche Bereiche der Chromatinöffnung werden DNase I hypersensitive Stellen (DHS) genannt. Man findet sie bei aktiven Genen im Bereich des Promotors oder der *Enhancer* (Owen-Hughes und Workman, 1994).

1.2.4 Der Einfluß der Methylierung regulatorischer Bereiche

Die Methylierung von Cytosin zu 5'-Methylcytosin in CpG Nukleotidfolgen wird als Mechanismus der transkriptionellen Regulation diskutiert (Razin und Cedar, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß 60-90% der CpG Nukleotidfolgen im Säuger genom auf diese Art methyliert vorliegen. Die Methylierung erfolgt während der Replikation der DNA durch das Enzym DNA-Methyltransferase. Das Fehlen dieses Enzyms führt zum Abbruch der Embryogenese bei Mäusen (Li et al., 1992). Gewebespezifische Gene werden nur in Geweben demethyliert, in denen sie exprimiert werden. Dies spricht für eine Korrelation zwischen der Hypomethylierung regulatorischer Elemente und der transkriptionellen Aktivität des entsprechenden Gens. Eine Reihe verschiedener Studien zeigen außerdem, daß die Beziehung zwischen Methylierung und Genexpression nicht nur korrelativ ist. So konnte gezeigt werden, daß eine *in vitro* durchgeführte Methylierung die Genexpression in transfizierten Fibroblasten verhinderte (Razin und Cedar, 1991). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin, einem demethylierenden Agens, zur Aktivierung einer Reihe endogener Gene führt (Jones, 1984).

Drei Möglichkeiten werden zur Zeit diskutiert, wie die Methylierung von CpG-Nukleotidfolgen in regulatorischen DNA-Abschnitten die Genexpression beeinflussen könnte: (1) Die Methylierung regulatorischer DNA-Abschnitte könnte die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenzen behindern. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Bindung von NF- κ B und AP-2 an ihre Erkennungssequenz methylierungssensitiv ist. (2) Repressoren könnten spezifisch methylierte CpG-Nukleotidfolgen erkennen. Zwei solcher Faktoren, MeCP1 und MeCP2, konnten identifiziert werden. Diese binden an methylierte CpG-Motive unabhängig vom Sequenzumfeld. Wie das Enzym DNA-Methyltransferase ist auch

MeCP2 essentiell für die Embryonalentwicklung in Mäusen (Tate et al., 1996). Auch konnte eine Repressordomäne in MeCP2 identifiziert werden, mittels der das Protein mit dem Initiationskomplex interagieren kann (Nan et al., 1997). (3) Die Methylierung von DNA könnte Veränderungen in der Chromatinstruktur induzieren. Unterstützung für diese Theorie kommt von Keshet et al. (1986), deren Studien belegen konnten, daß methylierte DNA die Positionierung von Nukleosomen und die Zugänglichkeit der DNA für DNase I beeinflusst.

1.3 Wichtige Transkriptionsfaktoren der Genregulation in myeloiden Zellen

1.3.1 PU.1: Ein Schlüsselregulator myeloider Gene

PU.1 nimmt bei der Entwicklung und für die Funktion von Monozyten und Makrophagen eine zentrale Rolle ein. Im hämatopoetischen System wird PU.1 vor allem in myeloiden Zellen und B-Zellen exprimiert, nicht jedoch in T-Zellen (Cheng et al., 1996; Chen et al., 1995; Klemsz et al., 1990). PU.1 Knockout-Mäuse sind nur in einer sterilen Umgebung lebensfähig, da ihnen Monozyten und reife B-Zellen zur Infektionsabwehr fehlen (Scott et al., 1994).

PU.1 gehört zur Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. Diese binden an eine purinreiche Erkennungssequenz (5'-GGAA-3') in regulatorischen DNA-Abschnitten. In Übereinstimmung mit dem dramatischen Phänotyp von PU.1^{-/-}-Mäusen konnte von einer ganzen Reihe myeloider Genen gezeigt werden, daß sie von PU.1 reguliert werden. Unter anderem bindet PU.1 an die Promotoren der Gene für CD11b (Mac-1 α), M-CSF Rezeptor, G-CSF Rezeptor, IL-1 β und MIP-1 α (Pahl et al., 1993; Zhang et al., 1994; Smith et al., 1996; Kominato et al., 1995; Grove et al., 1993).

Die Aktivität von PU.1 kann durch äußere Stimuli moduliert werden. Die Stimulation von Makrophagen-Zelllinien mit LPS (Lipopolysaccharid) führt zur Aktivierung von Caseinkinase II und zur Phosphorylierung von PU.1 (Lodie et al., 1997). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß PU.1 in vitro durch Caseinkinase II und JNK (*Jun N-terminal Kinase*) Kinase phosphoryliert werden kann (Mao et al., 1996). Die

Phosphorylierung konnte durch die Mutation von Ser148 aufgehoben werden. Dies impliziert, daß die Stimulation mit LPS zur Phosphorylierung und Aktivierung von PU.1 führt. PU.1 besitzt ferner die Fähigkeit zur Autoregulation. Für die Funktion des PU.1-Promotors ist eine PU.1-Bindungsstelle essentiell, so daß das Protein seine eigene Synthese durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus steigern kann (Chen et al., 1995).

Einige myeloid-spezifischen Gene besitzen keine TATA-Box. Interessanterweise haben viele der entsprechenden Promotoren allerdings funktionelle PU.1 Bindungsstellen oberhalb der Transkriptionsstartstelle und zwar an einer Position, an der man normalerweise die TATA-Box erwarten würde (Tenen et al., 1996). Da gezeigt werden konnte, daß PU.1 an das TATA-bindenden Protein (TBP) binden kann, wurde postuliert, daß PU.1 diese Promotoren aktiviert, indem es möglicherweise TBP, TFIID und andere Komponenten der Transkriptionsmaschinerie rekrutiert.

1.3.2 NF- κ B: Ein Schlüsselfaktor inflammatorischer Prozesse

Unter den für die immunologische Funktion von Monozyten und Makrophagen wichtigen Transkriptionsfaktoren nimmt NF- κ B ebenfalls eine herausragende Stellung ein. Unter anderem reguliert NF- κ B in myeloiden Zellen die Expression der Gene für Zytokine (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-12 p40), Wachstumsfaktoren (M-CSF, GM-CSF) und andere Transkriptionsfaktoren wie c-Rel und IRF-1 (Baeuerle und Henkel, 1994; Murphy et al., 1995)). NF- κ B steht dabei für eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die miteinander Homo- und Heterodimere bilden können und in dieser Form an das gleichnamiges Erkennungsmotiv der DNA (5'-GGG(Pu)NN(Py)(Py)CC-3') binden. In Säugetieren kennt man dabei die Untereinheiten p50 (Vorläuferprotein: p105), p52 (Vorläuferprotein: p100), p65 (RelA), c-Rel und RelB. Gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Proteine ist die N-terminale sog. Rel-Homologie-Domäne. Diese vermittelt die DNA-Bindung, die Dimerisierung und die Interaktion des Proteins mit dem NF- κ B Inhibitor I- κ B (Baeuerle und Henkel, 1994).

NF- κ B liegt im Zytoplasma der meisten Zellen als inaktiver Komplex zusammen mit unprozessierten Vorläuferproteinen (p100, p105) oder I- κ B-Proteinen vor. Nach Aktivierung der Zellen kommt es zu einer Signalkaskade, an deren Ende die Dissoziation des inaktiven zytoplasmatischen Komplexes steht. Freies NF- κ B wandert

in den Kern und kann dort an seine Erkennungssequenz in Promotoren und anderen regulatorischen Elementen binden. In Monozyten und Makrophagen wurde die Aktivierung von NF- κ B durch proinflammatorische Signale, unter anderem nach Stimulation mit LPS, TNF- α , IL-1 und IL-6 beschrieben (Neurath et al., 1998). Für die Genaktivierung haben sich hier vor allem p50/p65 und p50/c-Rel Heterodimere als wichtig gezeigt. Knockout-Studien konnten die dominante Rolle von NF- κ B für eine effektive Immunantwort eindrucksvoll belegen. p50 Knockout-Mäuse, aber auch p65 und c-Rel^{-/-}-Tiere zeigten multiple Defekte des Immunsystems (Sha et al., 1995; Beg et al., 1995; Kontgen et al., 1995). Beispielsweise waren p50^{-/-}-Mäuse sehr anfällig für bakterielle Infektionen mit Staphylococcus und Listeria. In B-Zellen dieser Mäuse war außerdem die LPS-stimulierte Proliferation und Antikörperproduktion gestört.

1.3.3 Die C/EBP Transkriptionsfaktor-Familie

Die C/EBP- (*CCAAT/ Enhancer Binding Protein*-) Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit mindestens 7 Mitgliedern (C/EBP α , - β , - δ , - γ , crp1, d/CEBP und CHOP-10), die an sog. CCAAT-Boxen von Promotoren binden (Wedel und Ziegler-Heitbrock, 1995). Die Proteine zeichnen sich durch 3 strukturelle Komponenten aus: einen C-terminalen Leuzin-Zipper, eine zentrale DNA-Bindungsdomäne und eine N-terminale Transaktivierungsdomäne. Durch eine Dimerisierung über den Leuzin-Zipper können Homo- und Heterodimere gebildet werden. Die Expression von C/EBP-Proteinen wurde insbesondere in Monozyten, Makrophagen, Adipozyten und Hepatozyten beschrieben, wobei in Monozyten/ Makrophagen insbesondere C/EBP α , - β und δ diskutiert werden (Hu et al., 1998). Dort spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation gewebespezifischer Genexpression. Im Zuge der Granulopoese steigt die Expression von C/EBP α vorübergehend an und ist dabei in reifenden myeloiden Zellen am stärksten (Scott et al., 1992; Natsuka et al., 1992). Bei der terminalen Differenzierung zu Granulozyten und Makrophagen fällt die Expression dann wieder stark ab. Im Gegensatz dazu steigt die Expression von C/EBP β und - δ bei der Reifung myeloider Zellen an und ist in differenzierten Makrophagen am höchsten.

Wie NF- κ B regulieren auch C/EBP-Proteine in Monozyten und Makrophagen die Expression von Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 und Wachstumsfaktoren

(G-CSF, M-CSF), aber auch von anderen Genen, wie z.B. Lysozym und MIP-1 α (Wedel und Ziegler-Heitbrock, 1995). Für den IL-6 und IL-8 Promotor konnte sogar die synergistische Aktivierung über direkte Protein-Protein Interaktion zwischen C/EBP β und NF- κ B gezeigt werden (Natsuka et al., 1992; Stein et al., 1993). C/EBP-Bindungsstellen zeigten sich häufig auch als LPS-responsive Elemente (Wedel und Ziegler-Heitbrock, 1995). Insbesondere C/EBP β und $-\delta$ scheinen bei der LPS-vermittelten Aktivierung eine wichtige Rolle zu spielen, da die Expression diese Proteine in verschiedenen Geweben nach LPS-Stimulation hochreguliert wird (Kinoshita et al., 1992; Ramji et al., 1993). DNA-Bindungsaktivität und Transaktivierung scheinen dabei vor allem durch Phosphorylierung von Threonin- und Serinresten reguliert zu werden (Trautwein et al., 1993; Wegner et al., 1992). C/EBP β Knockout-Mäuse zeigten Defekte der humoralen und zellvermittelten Immunantwort (Screpanti et al., 1995). Auffällig war die Anfälligkeit der Tiere gegen Infektionen mit *Candida Albicans* und die defekte Aktivierung von Makrophagen, verbunden mit einer stark verminderten Produktion von IL-12 und Stickstoffmonoxid (NO).

1.3.4 Die GATA-Proteinfamilie

Die Proteine der GATA-Familie (GATA-1 bis GATA-6) besitzen 2 Zinkfinger-Domänen, über die sie Kontakt zu ihrem Erkennungsmotiv (5'-GATA-3') in der DNA aufnehmen (Merika et al., 1993; Whyatt et al., 1993). Den Proteinen GATA-1 und GATA-2 spricht man eine wichtige Funktion in der Erythropoese zu (Pevny et al., 1991; Simon et al., 1992). Eine Expression dieser Faktoren fand man in hämatopoetischen Vorläuferzellen, erythrozytären Zellen, Megakaryozyten und Mastzellen (Martin et al., 1990; Romeo et al., 1990). Die Expression von GATA-3 und GATA-4 wurde in T-Zellen gezeigt (Joulin et al., 1991; Ko et al., 1993). Interessanterweise belegen zahlreiche Studien, daß GATA-3 ein Schlüsselfaktor der T_H1/ T_H2-Differenzierung von T-Zellen ist (Zeng et al., 1997; Ouyang et al., 1998). Dabei hemmt die Überexpression von GATA-3 in naiven T-Zellen die Differenzierung zu T_H1-Zellen und die Expression von Interferon- γ (IFN- γ), aktiviert aber die Expression T_H2-spezifischer Gene wie IL-4 und IL-5. In Übereinstimmung mit diesem Konzept fand man eine Expression von GATA-3 nur in differenzierten T_H2, nicht jedoch in T_H1-Zellen (Zhang et al., 1997). Über GATA-4, GATA-5 und GATA-6 ist

nur sehr wenig bekannt. Sie scheinen jedoch bei der Genregulation in Zellen des Herzens und des Darms eine Rolle zu spielen (Laverriere et al., 1994).

Bisher gibt es kaum Daten zur Expression von GATA-Transkriptionsfaktoren in Monozyten und Makrophagen und beide Faktoren scheinen während der myeloiden Differenzierung herunterreguliert zu werden (Tenen, 1997). Interessanterweise findet man jedoch in einigen myeloid-spezifischen Promotoren (z.B. PU.1 und CD11b) GATA-Bindungsmotive, die im Experiment auch von GATA-Proteinen gebunden wurden (Chen et al., 1995; Pahl et al., 1992). Zudem führte die Überexpression von GATA-1 oder GATA-2 zu einer Verminderung der Promotoraktivität in Transfektionsanalysen (Pahl et al., 1993). Die Mutation dieser Motive führte jedoch zu keinem signifikanten Verlust von Promotoraktivität. Es scheint, daß die bekannten GATA-Proteine keine wichtige Rolle für die terminale Differenzierung von Monozyten und Makrophagen spielen.

1.3.5 Transkriptionsfaktoren und myeloide Entwicklung

Zahlreiche Studien unter anderem in transgenen und Knockout-Mäusen konnten die essentielle Rolle bestimmter Transkriptionsfaktoren für die hämatopoetische Differenzierung von Monozyten und Makrophagen aus CD34⁺ Vorläuferzellen belegen. Der Prozess vollzieht sich dabei im wesentlichen in 3 Schritten: (1) Der Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren, (2) der dadurch induzierten Expression spezifischer CSF- (*Colony Stimulating Factor*-) Rezeptoren und (3) der Reifung der Zellen durch spezialisierte Transkriptionsfaktoren und CSF.

Während der Entwicklung des humanen hämatopoetischen Systems wird PU.1 mRNA in geringen Mengen in CD34⁺ Stammzellen gebildet (Voso et al., 1994). Während der myeloiden Entwicklung wird die Expression des Transkriptionsfaktors spezifisch hochreguliert, während bei der erythroiden Entwicklung PU.1 herunter- dafür aber GATA-1 hochreguliert wird, was notwendig für die Expression des Epo- (Erythropoetin-) Rezeptors ist (Voso et al., 1994; Sposi et al., 1992). Die PU.1-Expression dagegen fördert unter anderem die Expression des GM-CSF-Rezeptors (Hohaus et al., 1995), dessen Expression essentiell für die Entwicklung von myeloiden und monozytären Vorläuferzellen ist. PU.1 induziert weiter die Expression des M-CSF Rezeptors (Zhang et al., 1994), wodurch die Zellen in der Lage sind, auf den

Wachstumsfaktor zu reagieren und so die Entwicklung zum reifen Monozyten fortzusetzen.

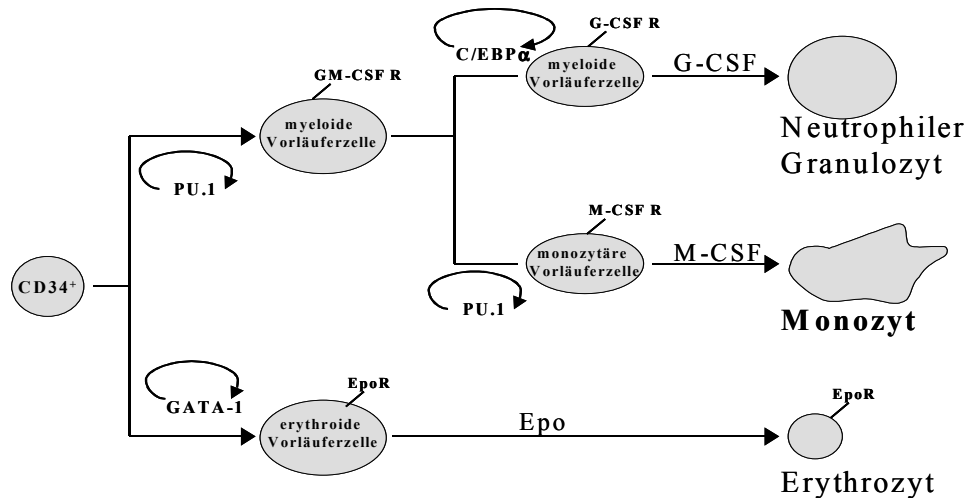


Abbildung 1.3 Modell der Rolle von PU.1 und anderen Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von Monozyten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen. Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression spezieller Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (CSF). Die fortgesetzte Expression der Rezeptoren sowie deren Liganden führt zur irreversiblen und schließlich zur terminalen Differenzierung der Zellen.

1.4 Interleukin-12

Interleukin-12 wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der die Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T Lymphozyten positiv beeinflusst. Heute geht man davon aus, daß IL-12 ein Schlüsselmolekül des funktionierenden Immunsystems ist. Im Mittelpunkt steht dabei die Fähigkeit von IL-12 naive T Lymphozyten so zu aktivieren, daß diese in Interferon- γ produzierende sog. Typ 1 T Helferzellen (T_H1 -Zellen) differenzieren. Außerdem induziert IL-12 nach Bindung an seinen Rezeptor auf T-Zellen und NK-Zellen direkt die Produktion von IFN- γ . Eine Reihe verschiedener Studien konnte zeigen, daß eine deregulierte Expression von IL-12 bei vielen Erkrankungen eine maßgebliche Rolle spielt.

1.4.1 Interleukin-12 und der Interleukin-12 Rezeptor

IL-12 ist ein heterodimeres Protein von ca. 70 kDa. Es setzt sich dabei aus zwei kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten von 35 (p35) und 40 (p40) kDa zusammen (Kobayashi et al., 1989; Stern et al., 1990; Gubler et al., 1991; Wolf et al., 1991), deren Gene sich auf verschiedenen Chromosomen befinden (Chromosom 3, bzw. 5). Für keine der Untereinheiten alleine konnte eine signifikante biologische Funktion gezeigt werden (Gubler et al., 1991; Wolf et al., 1991), obwohl p40-Homodimere möglicherweise als IL-12 Antagonist wirken können, indem sie an den IL-12 Rezeptor binden ohne biologische Funktionen auszuüben (Ling et al., 1995; Gillessen et al., 1995; Gately et al., 1996). In wie weit diese Moleküle in vivo eine Rolle spielen ist nicht geklärt. Während geringe Mengen p35 konstitutiv in vielen verschiedenen Zellen gebildet werden, ist die Expression von p40 sehr strikt reguliert und auf IL-12 produzierende Zellen beschränkt (D'Andrea et al., 1992; Wolf et al., 1992). Die Induktion des Gens für p40 ist somit entscheidend für die Produktion von biologisch aktivem Interleukin-12. p40 (und somit IL-12) wird von Antigen-präsentierenden Zellen, insbesondere Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen nach spezifischer Stimulation ausgeschüttet (D'Andrea et al., 1992; Chehimi et al., 1994). Weiterhin produzieren Epstein-Barr Virus (EBV) transformierte B-Zelllinien, nicht jedoch normale B-Lymphozyten, konstitutiv IL-12 p40 und p70 (D'Andrea et al., 1992; Kato et al., 1996; Guery et al., 1997). Als wichtigste Stimuli für die Induktion von IL-12 in Makrophagen und Monozyten konnten intrazelluläre Parasiten, Bakterien und LPS identifiziert werden (D'Andrea et al., 1992; Kubin et al., 1994). Weiterhin kann IL-12 durch die Interaktion von CD40 auf der Oberfläche dieser Zellen mit seinem Liganden auf T-Zellen induziert werden (Shu et al., 1995; Kato et al., 1996; Koch et al., 1996; Cella et al., 1996). Die IL-12 Produktion phagozytischer Zellen wird außerdem von verschiedenen Zytokinen reguliert. Dabei üben IFN- γ und GM-CSF einen stimulierenden Effekt aus, während IL-10, IL-4 sowie TGF- β inhibitorisch wirken (D'Andrea et al., 1992; D'Andrea et al., 1993).

Die biologischen Funktionen des Zytokins werden durch den Interleukin-12 Rezeptor vermittelt. Dieser ist analog der biologischen Funktion von IL-12 vor allem auf aktivierten T- und NK-Zellen exprimiert (Desai et al., 1992). Der hochaffine Rezeptor setzt sich aus zwei Untereinheiten, der β 1- und der β 2-Kette zusammen (Chua et al., 1994; Chua et al., 1995; Presky et al., 1996). Man geht davon aus, daß lediglich die β 2-

Untereinheit in der Lage ist, Signale in die Zelle weiterzuvermitteln (Presky et al., 1996; Zou et al., 1997). Im zytoplasmatischen Teil der $\beta 2$ -Kette finden sich konservierte Tyrosinreste, während solche in der $\beta 1$ -Kette nicht identifiziert werden konnten. Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, daß die Expression der $\beta 2$ -Kette bei Menschen und Mäusen auf T_H1 -Zellen beschränkt ist und mit der IL-12 Responsivität in diesen Zellen korreliert (Rogge et al., 1997; Szabo et al., 1997). Entsprechend dem für die Signaltransduktion vorgeschlagenen Modell kommt es nach Bindung von IL-12 an den Rezeptor zur Phosphorylierung von JAK2 (*Janus-family kinase 2*) und TYK2. Diese wiederum können die Transkriptionsfaktoren STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) und STAT-4 phosphorylieren (Jacobson et al., 1995; Thierfelder et al., 1996). Die so aktivierten Proteine bilden daraufhin Homo- und Heterodimere, die in den Kern wandern, an ihre Erkennungssequenz binden und regulatorisch in die Genexpression eingreifen. Eine funktionell wichtige Bindungsstelle für STAT-4 konnte im Interferon- γ Promotor identifiziert werden (Xu et al., 1996; Barbulescu et al., 1998). Die Induktion der IFN- γ Produktion durch IL-12 Rezeptorvermittelte Signalwege ist zum einen eine der wichtigsten biologischen Funktionen von IL-12, bietet zum anderen aber auch die Möglichkeit einer positiven Rückkopplung durch die Verstärkung der IL-12 Produktion in Makrophagen. Diese Rückkopplung spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle für die Initiation und Expansion einer T_H1 -Immunantwort.

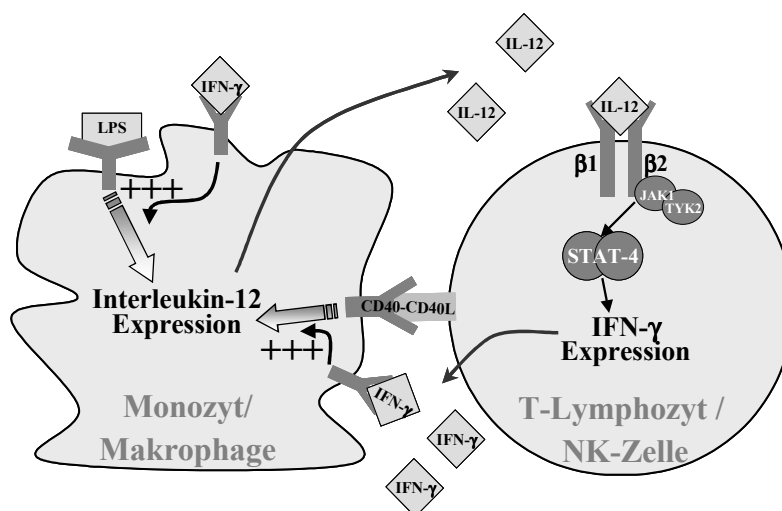


Abbildung 1.4 Ursache und Wirkung der IL-12 Expression von Makrophagen. Bakterielle Antigene wie LPS oder eine Interaktion über CD40/CD40L führen zur Expression von IL-12. Dieses induziert in T-Zellen die Bildung von IFN- γ . IFN- γ kann nun wiederum die Expression von IL-12 in Makrophagen verstärken

1.4.2 Die Regulation der Immunantwort durch IL-12

Die wahrscheinlich wichtigste Funktion von IL-12 ist seine Fähigkeit, die Natur einer Immunantwort und die Balance zwischen T_H1 und T_H2 -Zellen zu regulieren. Während T_H1 -Zellen IL-2 und Interferon- γ produzieren und damit Effektorzellen der zellvermittelten Immunität sind, produzieren T_H2 -Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und vermitteln so die humorale Immunität (Scott, 1993; Paul und Seder, 1994). Durch Studien in humanen (Manetti et al., 1993; Wu et al., 1993; Marshall et al., 1995) und murinen (Hsieh et al., 1993; Seder et al., 1993; Schmitt et al., 1994; Morris et al., 1994) Systemen konnte eindeutig gezeigt werden, daß IL-12 T_H1 -Immunantworten auf mindestens 3 Arten fördert: (1) IL-12 fördert die Differenzierung naiver T-Zellen in T_H1 -Zellen, welche in der Lage sind, große Mengen IFN- γ nach spezifischer Stimulation auszuschütten. (2) IL-12 ist ein wichtiger Kostimulus für die optimale Produktion von IFN- γ durch polarisierte T_H1 -Zellen nach Stimulation mit Antigen (Murphy et al., 1994; DeKruyff et al., 1995). (3) IL-12 stimuliert die Entwicklung IFN- γ produzierender T_H1 -Zellen aus ruhenden Gedächtnis T-Zellen (Manetti et al., 1993; Marshall et al., 1995; DeKruyff et al., 1995).

IL-12 ist ebenfalls für die physiologische Funktion von NK-Zellen essentiell. Es verstärkt dort die Produktion von IFN- γ und damit die lytische Aktivität der Zellen (Chan et al., 1991; Perussia et al., 1992).

Diese Funktionen von IL-12 konnten durch die Untersuchung von Knockout-Mäusen bestätigt werden. IL-12^{-/-}-Tiere entwickeln sich normal, zeigten aber defekte Immunantworten (Magrath et al., 1996). Die Produktion von IFN- γ nach Gabe von Endotoxin und die Fähigkeit, eine T_H1 -Immunantwort zu etablieren, waren in Knockout-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren stark eingeschränkt.

1.4.3 Die Rolle von Interleukin-12 in der Immunpathogenese von Endotoxin-vermitteltem Schock und chronischen Entzündungsreaktionen

Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Rolle von Interleukin-12 beim Endotoxin-vermittelten Schock auf (Wysocka et al., 1995; Ozmen et al., 1994). Dabei

konnten in Mäusen und Affen neben TNF- α , IL-1, IL-6 und IFN- γ auch erhöhte IL-12 Serumspiegel nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte im Mausmodell die Sterblichkeit bei Endotoxin-vermitteltem Schock durch die Gabe neutralisierender Antikörper gegen IL-12 aufgehoben werden (Ozmen et al., 1994). Die Untersuchungen zur Rolle von IL-12 beim Endotoxin-vermittelten Schock legen ein Modell nahe, bei dem das Endotoxin zu einer Produktion von IL-12 führt, welches dann die Sekretion von IFN- γ stimuliert. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Makrophagen und anderer Zellen, die schließlich für den letalen Verlauf des Endotoxin-Schocks verantwortlich sind (Gately et al., 1998).

Sehr gut untersucht ist auch die Rolle von Interleukin-12 bei chronischen Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen. Es wurde festgestellt, daß das Zytokinprofil der T-Zellen in der Lamina Propria (LP) von Patienten mit Morbus Crohn dem einer T_H-1-Immunantwort entspricht (Fuss et al., 1996). Dabei fand man im Vergleich zu Kontrollpatienten eine erhöhte IFN- γ Produktion von anti-CD2/anti-CD28 stimulierten CD4⁺ T-Zellen in der LP bei verminderter Produktion der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-5. Studien in Mausmodellen für den Morbus Crohn konnten eine essentielle Rolle für IL-12 bei der Pathogenese einer chronisch intestinalen Entzündung aufzeigen (Neurath et al., 1995; Stüber et al., 1996). Immunhistochemische Nachweise zeigten eine erhöhte Produktion von IL-12 in entzündetem Colongewebe dieser Mäuse. Dieses scheint dabei vor allem als Resultat der Interaktion von T-Zellen und Makrophagen durch CD40-CD40L-vermittelte Signalwege ausgeschüttet zu werden (Stüber et al., 1996). Es gelang weiter durch eine Behandlung dieser Mäuse mit anti-IL-12 Antikörpern eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome sowie der histologischen Befunde zu erreichen (Neurath et al., 1995). Zur Zeit laufen klinische Studien zur Erprobung von Antikörpern gegen Interleukin-12 als Therapie für Patienten mit Morbus Crohn. Ähnliche Erfolge durch Gabe von anti-Interleukin-12 Antikörpern konnte man in einem Mausmodell für Multiple Sklerose (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) erreichen (Gately et al., 1998). Erhöhte IL-12 Spiegel wurden auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie in einem Mausmodell für diese Erkrankung (Kollagen-induzierte Arthritis) gefunden (Bucht et al., 1996; McIntyre et al., 1996) und eine Rolle für IL-12 wird auch im Zusammenhang mit der Insulin-abhängigen Diabetes Mellitus und Transplantatabstoßung diskutiert (Zipris et al., 1996; Trembleau et al., 1997; Rothe et al., 1997).

Im Gegensatz zu diesen Befunden fand man bei Patienten mit Asthma bronchiale, einer wahrscheinlich T_H2 -vermittelten Entzündung, eine deutlich geringere Expression von IL-12 p40 mRNA in Bronchialbiopsien sowie signifikant geringere IL-12 Konzentrationen im Blut im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollpatienten (Naseer et al., 1997). Im Mausmodell konnte durch die systemische Gabe von rekombinantem IL-12 die für Asthma charakteristische Infiltration mit eosinophilen Zellen in die Lunge inhibiert werden (Gavett et al., 1995; Kips et al., 1996).

Die Untersuchungen verschiedener chronisch entzündlicher und autoimmuner Krankheiten sowie deren Tiermodelle weist deutlich auf eine wichtige Rolle für das Zytokin IL-12 hin. Eine überschießende Immunantwort in Richtung einer T_H2 - auf der einen oder einer T_H1 -Reaktion auf der anderen Seite scheint dabei maßgeblich von einer deregulierten IL-12 Expression beeinflusst zu sein. Klinische Studien mit rekombinantem IL-12 sowie neutralisierenden Antikörper gegen IL-12 sind bereits im Gange. Die Entwicklung neuartiger IL-12 Antagonisten oder Inhibitoren wird in Zukunft womöglich wichtige neue Therapieansätze für viele dieser Krankheiten bringen.

1.4.4 Transkriptionelle Regulation der IL-12 p40 Untereinheit

Die induzierte Expression von IL-12 p40 ist Voraussetzung für die Expression von biologisch aktivem IL-12. Studien konnten belegen, daß die Produktion von p40 überwiegend transkriptionell reguliert ist. Der humane IL-12 Promotor wurde als 3.3 kB Fragment von Ma et al. (1996) kloniert. Die Forschergruppe konnte zeigen, daß der Promotor in EBV⁺ B-Zelllinien und Makrophagen- Zelllinien aktiv war, nicht jedoch in einer T-Zelllinie. Ferner konnte gezeigt werden, daß der Promotor durch LPS und IFN- γ synergistisch induzierbar ist. Die Untersuchung der Promotorsequenz ergab eine Reihe von Übereinstimmungen zu bekannten Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren. Weiterführende Untersuchungen *in vitro* in verschiedenen Zelllinien konnten belegen, daß ETS- NF- κ B- und C/EBP-Erkennungssequenzen von funktioneller Bedeutung für die induzierbare Promotoraktivität sind (Murphy et al., 1995; Ma et al., 1996; Plevy et al., 1997) . Es gibt allerdings zur Zeit kein klares Bild über die Transkriptionsfaktorkomplexe, die für die Induktion des Promotors über diese Bindungsstellen verantwortlich sind.

Die Remodellierung der Chromatinstruktur im Bereich des p40 Promotors scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion der p40 Genexpression zu spielen. Weinmann und Kollegen konnten einen Makrophagen-spezifischen DNaseI hypersensitiven Bereich ca. 900 bp oberhalb der Transkriptionsstartstelle zeigen (Weinmann et al., 1999). Außerdem konnten sie zeigen, daß die Region dazwischen von 4 Nukleosomen gebunden wird, von denen das der TSS nächstgelegene den Bereich der bislang identifizierten regulatorischen Elemente einschließt und nach Aktivierung der Zellen selektiv remodelliert wird.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der IL-12 p40 Genregulation kommt von Untersuchungen an Knockout-Mäusen. Mäuse, die Knockout-Mutationen in den Genen für die Transkriptionsfaktoren C/EBP β , IRF-1, IRF-2 und ICSBP (*Interferon Consensus Sequence Binding Protein*) haben, zeigten eine defiziente Produktion von IL-12 auf eine Reihe verschiedener Stimuli (Screpanti et al., 1995; Salkowski et al., 1999; Scharton-Kersten et al., 1997). Interessanterweise scheint auch das Gen für das Signaltransduktionsprotein MKK3 (MAP Kinase Kinase 3) für die Expression des Zytokins essentiell zu sein (Lu et al., 1999). Dieses Protein ist Teil des p38 MAP Kinase Signaltransduktionsweges, welcher vor allem auf zellulären Stress hin und im Zuge inflammatorischer Reaktionen aktiviert wird.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die deregulierte Expression von IL-12 wird mit der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es ist daher im Sinne des Verständnisses dieser Krankheiten wünschenswert und notwendig, die Mechanismen der Regulation von IL-12 zu verstehen. Man geht davon aus, daß die Expression der p40-Untereinheit maßgeblich für das Auftreten von biologisch aktivem Interleukin-12 ist. Vorausgegangene Studien konnten zeigen, daß die Expression der p40-Untereinheit in erster Linie transkriptionell reguliert ist. Dabei konnten bei der Untersuchung des Promotors in Zelllinien erste Elemente identifiziert werden, die für die regulierte Aktivität in diesen Zellen wichtig sind. Untersuchungen in Zelllinien sind jedoch problematisch und oft widersprüchlich, da diese Zellen oft über Jahre passagiert werden und somit vielfältigen Veränderungen unterliegen. Daten zur transkriptionellen Regulation von IL-12 p40 in primären Zellen gibt es dagegen kaum.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der transkriptionellen Regulation des Gens in primären humanen Monozyten mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden. Dabei sollte unter anderem untersucht werden, welche Promotorelemente nach Stimulation der Monozyten in vivo von Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Zu diesem Zweck sollte eine spezielle Methode, das sog. in vivo Footprinting etabliert werden. Diese Methode ermöglicht es, Protein-DNA Interaktionen am Promotor von lebenden Zellen nachzuweisen. Von besonderem Interesse war auch die mögliche Identifizierung bisher nicht bekannter regulatorischer Promotorelemente und der daran bindenden Transkriptionskomplexe. Mittels transienter Transfektionen sollten auch funktionelle Aspekte der Promotorregulation, wie beispielsweise das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Bindungsmotive erörtert werden. Um tiefere Einblicke in die Regulation der Transkription des IL-12 p40 Gens zu erhalten muß man das endogene Gen in seiner nukleosomalen Umgebung untersuchen um regulatorischen Vorgängen Rechnung zu tragen, denen man mit transienten Transfektionen nicht gerecht wird. Zu diesem Zweck sollten transgene Mäuse hergestellt werden die ein Reporter gen unter der Kontrolle des proximalen IL-12 p40 Promotors exprimieren. Von besonderem Interesse war dabei in wie weit das in das Genom integrierte Transgen Zelltyp- und Stimulus-spezifisch reguliert wird. Schließlich sollte anhand der erhobenen Daten ein Modell zur Regulation des Interleukin-12 p40 Promotors entworfen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Plastikwaren wurden von den Firmen steril bezogen. Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm²), Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml) und Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml) wurden von der Firma (Fa.) Greiner (Frickenhausen), Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-well) von der Fa. Costar (Bodenheim), Pipettenspitzen und Safe-lock Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml) von der Fa. Eppendorf (Hamburg) verwendet.

Falls nicht anders aufgeführt, wurden alle Reagenzien in pro Analysis (p.A) Qualität von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Serva (Heidelberg), PAA (Linz, Österreich), USB (Cleveland, Ohio), Santa Cruz (Heidelberg), Promega (Mannheim), Clontech (Heidelberg), Pharmingen (Hamburg), Dynal (Hamburg), Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach), Biozym (Hess Oldendorf), Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), MWG (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Genzyme (Alzenau), Dianova (Hamburg), Stratagene (La Jolla, CA).

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen

Alle Arbeiten für die Zellkultur wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Glaswaren wurden vor Gebrauch für 4 h bei 180°C sterilisiert. Alle Lösungen wurden bei 120°C und einem Druck von 1,2 bar für mindestens 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in komplettem RPMI 1640 Medium, in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen ein- bis dreimal wöchentlich ausgetauscht. Für die Ablösung und Subkultivierung adhärenter Zellen wurde ein Schaber (*Cellifter*, Costar) verwendet. Empfindlichere Zellen wurden durch eine 5-minütige Inkubation mit Trypsin/ EDTA-

Lösung (Seromed) von der Oberfläche abgelöst. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden Zellen mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau (Seromed) versetzt. Die Konzentration von Zellen im Medium wurde mit einer Neubauer Zellkammer bestimmt.

Zur Kryokonservierung wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen/ ml Einfriermedium in Kryoröhrchen (Nunc) aliquotiert und bei -70°C tiefgefroren. Für die Dauerkonservierung wurden diese Aliquots in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen auf RT erwärmt, sofort in Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert, erneut in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

2.2.2 Medien und Lösungen

Kulturmedium RPMI 1640 (Seromed) mit 10% [v/v] FCS (Fötale Kälberserum, Firma PAA, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C) 50 mM HEPES (Gibco BRL) 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed)	1× PBS 0,15 M NaCl 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	Ficoll Dichte Gradienten-Lösung (Seromed) Dichte: 1,077 g/ml
Einfriermedium 90% [v/v] FCS 10% [v/v] DMSO (Roth)	MACS-Puffer 1×PBS mit 2 % [v/v] FCS 2 mM EDTA
Trypanblau-Lösung Lösung A: 0,2% [w/v] Trypanblau (Sigma) Lösung B: 4,5% [w/v] NaCl in Aqua bidest. gelöst Die Lösung wurde aus 4 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B hergestellt.	ACK-Puffer (pH 7,27) 4,15 g NH_4Cl 0,5 g KHCO_3 18,6 mg EDTA ad 500 ml Aqua dest. pH 7,27

Tabelle 2.1 Kulturmedium und Puffer für die Zellkultur

2.2.3 Verwendete Zelllinien

Für einige Experimente wurden die in der folgenden Tabelle verwendeten etablierten und käuflich erhältlichen Zelllinien verwendet. Diese wurden von der ATCC bezogen.

Zelllinie	Charakterisierung	Referenz
Jurkat	humane Thymom-Zelllinie	ATCC TIB-152
RAW264.7	murine Makrophagen-Zelllinie	ATCC TIB-71
BW5147	murine T-Zelllinie (Thymom)	ATCC TIB-234
RPMI 8866	murine B-Zelllinie (B-lymphoblastoide Zelllinie)	Ma et al. (1996)
Raji	humane B-Zelllinie (Burkitt's Lymphom)	ATCC CCL-86
COS-7	Affen Nieren-Zelllinie (Fibroblasten)	ATCC CRL-1651
THP-1	humane Monozyten-Zelllinie	ATCC TIB-202
P388	murine Makrophagen/ Monozyten-Zelllinie	ATCC TIB-63
J774	murine Makrophagen-Zelllinie	ATCC TIB-67
U937	Humane Makrophagen/ Monozyten-Zelllinie	ATCC CRL-1593.2
Daudi	Humane B-Zelllinie (Burkitt's Lymphom)	ATCC CCL-213
J558	Humane B-Zelllinie	ATCC TIB-6
K562	Humane myelogene Zelllinie	ATCC CCL-243
HeLa	Humane epitheliale Zelllinie (Zervix; Adenocarcinoma)	ATCC CCL-2
HepG2	Humane Hepotomzelllinie	ATCC HB-8065

Tabelle 2.2 Liste der verwendeten Zelllinien

2.2.4 Isolierung von CD14 positiven Monozyten aus Blut

CD14 positive humane Monozyten wurden aus sog. *buffy coats* (Blutbank Mainz) isoliert. Dabei handelt es sich um ein Zellkonzentrat aus 500 ml Vollblut eines Spenders. Die spezifische Aufreinigung der Zellpopulation wurde durch immunmagnetische *beads* erreicht, magnetische Partikel, die mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14-Oberflächenantigene konjugiert sind. Das Prinzip der Methode beruht dabei auf der Bindung dieser *beads* an CD14 Moleküle auf der Oberfläche von Monozyten und der anschließenden Positivselektion über einer magnetischen Säule (Miltenyi).

Zunächst wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation periphere mononukleäre Zellen isoliert. Zu diesem Zweck wurde das Zellkonzentrat 1:1 mit eiskaltem PBS vermischt. Jeweils 35 ml Blut wurden dann in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorsichtig mit 15 ml Ficoll-Hypaque (Seromed) unterschichtet und anschließend 25 min bei 1600 upm ohne

Bremse zentrifugiert. Die PBMCs wurden aus der Interphase isoliert. Dabei betrug die Ausbeute aus einem *buffy coat* ca. 4×10^8 Zellen. Nach Waschen in PBS, (1600 upm, 5 min) wurden die restliche Erythrozyten durch Resuspendierung und 5-minütiger Inkubation des Zellpellets in 5 ml ACK-Puffer bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit kaltem MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die PBMCs eines *buffy coats* in 800 μ l MACS-Puffer resuspendiert und mit 200 μ l immunomagnetischen beads (CD14, Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) versetzt. Das Gemisch wurde unter gelegentlichem leichtem Schütteln für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde mit MACS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml zuvor entgasten MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen anschließend durch einen sterilen 40 μ m Filter direkt auf die magnetische Säule (VS⁺-Positivselektionssäule, Miltenyi) gegeben. Die in der Säule zurückgehaltenen Zellen wurden 3 mal mit je 3 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die Zellen unter Zurhilfenahme eines Kolbens mit 5 ml MACS-Puffer aus der Säule eluiert. Um eine höhere Reinheit der Zellen zu erreichen, wurde dieses Eluat erneut auf die Säule aufgetragen, gewaschen und eluiert. Die Reinheit der so isolierten CD14⁺ Monozyten wurde mittels FACS-Analyse überprüft und lag typischerweise bei 95-99 %.

2.2.5 Isolierung von Milzzellen aus der Maus

Für die Präparation von primären Milzzellen wurden 6-12 Wochen alte Mäuse des Stammes FVB bzw. IL-12 p40 Promotor/Luziferase transgene FVB Mäuse verwendet. Nach zervikaler Dislokation wurde den Mäusen durch einen Flankenschnitt die Milz entnommen. Diese wurde in kleine Stücke zerteilt und anschließend mit dem Kolbenende einer 2 ml Spritze auf einem 100 μ m Zellsieb (Costar) zerrieben. Die dabei ausgeschwemmten Zellen wurden abzentrifugiert und durch ACK-Lyse von Erythrozyten gereinigt. Das MACS System (Miltenyi) wurde eingesetzt, um aus Milzzellsuspensionen Mac-1⁺ Makrophagen, Thy1.2⁺ T Lymphozyten oder B220⁺ B Lymphozyten mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren (siehe auch 2.2.4).

2.2.6 Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum der Maus

Zur Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum von Mäusen wurden 2,5 ml einer 2 prozentigen Lösung „Brewers Thioglycollat“ (Becton Dickinson) intraperitoneal in Mäuse injiziert. Nach 3 Tagen wurden die Mäuse getötet und das Peritoneum ohne Perforation der Peritonealhaut freigelegt. Anschließend wurden 6 ml kaltes PBS mit einer feinen Nadel in das nicht eröffnete Peritoneum injiziert. Die Peritonealzellen wurden durch leichtes Schütteln der Maus im PBS suspendiert und schließlich mit einer Kanüle aus dem Peritoneum abgesaugt. Diese sog. Peritonealexudatzellen wurden für 2 Stunden in 6-Loch Schalen in RPMI 1640 Medium im Brutschrank kultiviert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden anschließend mehrmals mit warmem Medium weggespült und die verbleibenden adhärenenten Makrophagen schließlich mit Medium versetzt und weiterkultiviert.

2.2.7 Analytische Durchflußzytometrie (FACS)

Der Reinheitsgrad der isolierten primären Monozyten wurde mittels FACS-Analyse überprüft. CD14 positive Zellen wurden mit einem Fluoreszenz-Isothiocyanat (FITC) gekoppelten monoklonalen anti-CD14 Antikörper (Miltenyi Biotec) direkt markiert. Für die Markierung wurde von den zu untersuchenden Zellen ein Aliquot von 1×10^6 Zellen entnommen und mit 1 μg Antikörper versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen in 1 ml Fixierungslösung (2% Formaldehyd in PBS) resuspendiert. Die Aufbewahrung der Ansätze bis zur Messung im FACS-Gerät (*FACScan*; Becton & Dickinson) erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Für die Auswertung der Meßdaten wurde die Software *Cellquest* von Becton & Dickinson verwendet. Die Meßergebnisse wurden als Histogramme dargestellt, wobei die Fluoreszenzintensität logarithmisch auf der x-Achse (mean-Wert) und die Anzahl fluoreszierender Zellen auf der y-Achse abgebildet wurde.

2.2.8 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Faktoren

Substanz	Hersteller	Verwendete Konzentration
Phorbolmyristatacetat (PMA)	Sigma	50 ng/ml
Ionomycin	Sigma	1 µg/ml
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma	1 µg/ml
SAC (Pansorbin cells, Formalin-fixierte Staphylococcus aureus)	Cabiochem	1: 10000
IL-4 (human)	Pharmingen	5 ng/ml
IL-4 (murin)	Pepto Tech	5 ng/ml
IL-10 (human)	Peptotech	5 ng/ml
Interferon-γ (human)	Roche	5 ng/ml
Interferon-γ (murin)	R&D	10 ng/ml
Cycloheximid	Sigma	5 µg/ml
Prostaglandin-E2	Sigma	1 ng/ml
antiCD3 (murin)	Pharmingen	1 µg/ml
antiCD28 (murin)	Pharmingen	1 µg/ml

Tabelle 2.3 Für die Zellstimulation eingesetzte Faktoren

2.3 Gewinnung und Analyse von Proteinextrakten

2.3.1 Isolierung von Gesamtzellextrakten

Zur Isolierung von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden 10^7 - 10^8 Zellen in 1 ml kaltem T₄₀E₁₀N₁₅₀ Puffer (40 mM Tris pH 7.9, 10 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl) resuspendiert. Nach Zentrifugation (13000 upm, 5 min) wurde das Pellet mit 1×PBS gewaschen, in Flüssigstickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Danach wurde das Zellpellet in 70 µl WCE-Puffer (10 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EDTA pH 8, 5% [v/v] Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 13000 upm, wurde der die Gesamtproteine enthaltende Überstand in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Isolierung von nukleären Proteinen

Die Isolierung der nukleären Proteine erfolgte nach der Methode von Schreiber et al. (1989). 5×10^6 bis 10^8 Zellen wurden in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und bei 1600 upm 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß überführt und bei 14000 upm für 25 s erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 180 µl HB Puffer aufgenommen und erneut 25 s bei 14000 upm abzentrifugiert. Danach wurden 200 µl Lysepuffer addiert und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 4°C und 14000 upm abzentrifugiert. Der zytoplasmatische Proteine enthaltende Überstand wurde bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde zur Gewinnung der nukleären Proteine in 100 µl Puffer C aufgenommen. Der Versuchsansatz wurde bei 4°C für 15 Minuten auf einem Vortexer gemixt. Diese Vorgehensweise diente der mechanischen Lyse der Kernmembranen. Danach wurden die nukleären Extrakte bei 4°C für 5 min bei 14000 upm zentrifugiert. Der nukleäre Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

HB-Puffer	Lysepuffer	Puffer C
10 mM Tris-HCl pH 7,3 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,5 mM PMSF 0,5 mM β-Mercaptoethanol	HB-Puffer + 0,4% NP40	20 mM HEPES pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT
Zu jedem der Puffer wurden folgende Protease-Inhibitoren hinzugefügt: 1 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 20 µg/ml Pepstatin		

Tabelle 2.4 Puffer für die Isolierung von nukleären Proteinen

2.3.3 *In vitro* Transkription/Translation von Proteinen

Für die *in vitro* Transkription/ Translation von Proteinen wurde das TNT[®]-System von Promega verwendet. Die Translation des Proteins vollzieht sich dabei in einem zellfreien System in Weizenkeim- oder Kaninchen-Retikulozyten Extrakt. Darin enthalten sind eine Reihe von Komponenten, welche die *in vitro* Synthese von Proteinen ermöglichen. Die Weizenkeimextrakte eignen sich hierbei besonders gut zur *in vitro* Translation von Transkriptionsfaktoren, denn diese Extrakte enthalten weitaus weniger Transkriptionsfaktoren als Retikulozytenlysate (Ibelgaufts 1993).

Reaktionsansatz:

- 25 µl Weizenkeim- oder Retikulozytenlysate
- 2 µl TNT Reaktionspuffer
- 1 µl TNT RNA-Polymerase (SP6, T7 oder T3)
- 1 µl Aminosäure-Mix [minus Methionin]
- 1 µl Aminosäure-Mix [minus Leucin]
- 1 µl 40 U/µl RNasin (RNase Inhibitor)
- 1 µl [1 µg/µl] Plasmid-DNA (zirkulärer Expressionsvektor mit Fremd-DNA)
- 18 µl ddH₂O

Die Reaktion wurde für 90 min bei 30°C inkubiert. Die erwartete Proteinausbeute (vom Hersteller angegeben) lag bei dem Retikulozytenlysate bei circa 150-300 ng Protein und bei dem Weizenkeimextrakt bei circa 100-200 ng Protein je 50 µl Reaktionsansatz. Die *in vitro* translatierten Proteine wurden in Western Blot Analysen überprüft und in Gelretardationsexperimenten eingesetzt.

2.3.4 Proteinbestimmung nach Bradford et al. (1976)

Die zu messende Probe (1-5 µl) wurde mit Aqua dest. auf 800 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad) hinzugefügt und gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Probe bei 595 nm in einem Photometer (Spectronic 601, Miltenroy) gemessen. Als Referenzwert diente ein Ansatz, der nur 800 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz enthielt. Anhand des Vergleichs mit einer BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.3.5 ELISA

Aus Zellüberständen kultivierter Monozyten und Makrophagen wurde mittels Sandwich-ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assays*) die Interleukin-12 p40 und p70 Proteinmenge quantifiziert. Der IL-12 spezifische monoklonale Antikörper (Pharmingen) wurde auf 2 µg/ml in Coating-Puffer verdünnt. 50 µl der Lösung wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween wurden pro well 200 µl Absättigungspuffer hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Platte zweimal gewaschen. 100 µl Zellkulturüberstände oder rekombinantes IL-12 p40 und p70 (R&D Biosystems) in verschiedenen Verdünnungen (Ermittlung einer Standardkurve) wurden zu jedem Loch addiert. Nach 6-14 h wurde die Platte 3mal gewaschen und 0,2 µg biotinylierter Sekundärantikörper (Fa. Pharmingen) in 100 µl PBS/ 10% FCS zu jedem Loch hinzupipettiert. Danach wurde die Platte 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und 4mal gewaschen. Es wurden 100 µl/Loch einer 1/1000 in PBS/ 10% FCS verdünnten Streptavidin-HPO (*horseredish peroxidase*, Fa. Dianova) Lösung in die Plattenlöcher addiert. Die Platte wurde 30 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und anschließend 6× gewaschen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 20 ml Substratpuffer mit 1 ml TMB-Lösung gemischt. Von dieser Lösung wurden je 200 ul in die Löcher gegeben. Die Färbungsreaktion wurde nach 5-15 min durch Zugabe von 100 µl Stoppuffer abgebrochen. Die optische Dichte wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Coating-Puffer 0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,2	PBS/Tween 0,5 ml Tween 20 in 1 l PBS	Absättigungspuffer PBS mit 3%BSA
Stoppuffer 28ml konz. H ₂ SO ₄ in 500ml H ₂ O	Substratpuffer 0,033 M Zitronensäure mit KOH auf pH 4,1 eingestellt	
TMB- Lösung 120 mg 3,5,5 Tetramethylbenzidin (Fluka,Schweiz) in 2,5 ml Aceton lösen, 22,5 ml Ethanol und 150 µl 30% Wasserstoffperoxid addieren, in dunkler Flasche bei RT lagern		

Tabelle 2.5 Puffer und Lösungen für den ELISA

2.3.6 Western Blot Analyse

Zum Nachweis *in vitro* translatierter Proteine wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zunächst mittels Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mini-Gelsystem (Mini-Protean II) von Biorad verwendet. Meistens wurden 7,5%ige Trenngele und 3,85%ige Sammelgele gegossen. Etwa 30 bis 50 µg Protein (oder 5 µl *in vitro* translatiertes Protein) wurden mit Probenpuffer auf ein Gesamtvolumen von 15 µl eingestellt, 5 min bei 95°C denaturiert und dann in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtskontrolle wurde der Kaleidoskop Standard von Biorad verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 28 V im Sammelgel und bei 60 V im Trenngel. Nach dem Gellauf wurden die Proteine mit einer *Semi-dry* Apparatur der Firma AGS auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Der Blot wurde als *Sandwich*, bestehend aus 2 Whatman 3 MM Papier (getränkt in Transfer-Puffer), dem Polyacrylamidgel, der Nitrozellulose-Membran und 2 weiteren Lagen Whatman 3 MM Papier (getränkt in Transfer-Puffer) aufgebaut. Dieser *Sandwich* wurde für ca. 1 h bei 400 mA in der AGS Aparatur geblottet. Zum Nachweis der Effizienz des Transfers wurden die auf der Membran gebundenen Proteine mit Ponceau-S angefärbt und die Membran mit Aqua. dest. wieder entfärbt. Anschließend wurde die Membran zum Abblocken unspezifischer Bindungen 1 h bei 4°C in Blockierungs-Lösung inkubiert. Nach 2× 5 min Schütteln in PBS-T wurde die Membran in einem Plastikbeutel mit 5 ml Primärantikörper-Lösung eingeschweißt (1 µg Ak in 5 ml PBS-T). Die Inkubation erfolgte auf einem Überkopftaumler entweder bei 4°C ü.N. oder für 1 h bei RT. Nach diesem Schritt wurde die Membran dreimal für 10 min in 50-100 ml PBS-T bei RT gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (1 µg Ak/ 5 ml PBS-T) wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Die Membran wurde anschließend viermal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL-System (Amersham) verwendet. Dazu wurde die ECL-Lsg. 1 mit der ECL-Lsg. 2 1:1 gemischt und für 1 min mit der Membran im Dunkeln inkubiert. Nach Abtropfen überschüssigen Substrats von der Membran wurde diese mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt. Die Exposition mit Biomax MR Filmen (Kodak) fand für 30 s bis 10 min statt.

Kathodenpuffer 0,1 M Tris 0,1 M Tricin 0,1% SDS pH 8,25	Anodenpuffer 0,2 M Tris pH 8,9	Gelpuffer 3 M Tris 0,3% SDS pH 8,45	Sammelgel-Stammlsg. (3,85%) 1 ml Gelpuffer 0,385 ml 40% PA ad 4 ml Aqua dest.
30 ml Trenngel-Stammlsg. (7,5%) 10 ml Gelpuffer 5,7 ml 40% PA 4 g Glycerin ad 30 ml Aqua dest.	Trenngel 5 ml Trenngel-Stammlsg. 50 µl 10%APS 5 µl TEMED mit 70% ETOH überschichten Polymerisation ca. 30 min	Sammelgel 2 ml Trenngel-Stammlsg. 20 µl 10% APS 2 µl TEMED + Gelkamm Polymerisation ca. 15 min	5x Probenpuffer 26,5% SDS 50% Glycerin 8,35% β-Mercaptoethanol 0,15% Bromphenolblau (gelöst in 100% ETOH) Denaturierung der Probe: 5 min 95°C
Ponceau-S Färbe-Lsg. 0,2% [w/v] Ponceau S (Sigma) 3% [v/v] Trichloressigsäure	Transfer-Puffer 2,9 g Glycin 5,8 g Tris 11% SDS 200 ml Methanol ad 1000 ml Aqua dest.	PBS-T 1× PBS 0,1% Tween-20 Waschlösung bzw. Inkubationslösung für Antikörper	Blockierungs-Lösung 3% nonfat dry milk 1× PBS-T dient zum Blockieren unspezifischer Bindungen

Tabelle 2.6 Puffer und Lösungen für Western Blot Analysen

2.4 Molekularbiologische Standardmethoden

2.4.1 Häufig verwendete Puffer und Medien

Die für molekularbiologischen Experimente häufig verwendeten Puffer sind in Tabelle 2.7 zusammengefaßt.

50× TAE 242 g Trisaminomethan 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml mit Aqua dest.	10× TBE 108 g Trisaminomethan 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit Aqua dest.	STE-Puffer 0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH (7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0)
20× SSC pH 7,0 3,0 M NaCl 0,2 M Natriumcitrat	5× Annealing-Puffer 200 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM MgCL 250 mM NaCl	DNA-Gelladepuffer 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenyanol 30% Glycerin in Aqua dest.

Tabelle 2.7 Standard-Puffer und Lösungen molekularbiologischer Methoden.

Formamidladepuffer 98% [v/v] deionisiertes Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylenxyanol	TE-Puffer pH 7,5 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8	TELT-Puffer 2,5 M LiCl 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl 4% Triton X 100 62,5 mM EDTA pH 8,0
LB – Medium 10g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.	LB – Agar 1000 ml LB–Medium 15 g Bacto Agar	S.O.C Medium 2% [w/v] Bacto Trypton 0,5% [w/v] Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
	Hochsalzpuffer-Elution von DNA 1 M NaCl 10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0	

Tabelle 2.7 Standard-Puffer und Lösungen molekularbiologischer Methoden (fortgesetzt).

2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch UV-Absorptionsspektroskopie mit Hilfe eines Photometers (Spectronic 601, Miltenroy). Die Proben werden bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen und dabei in Relation zu einer Referenzküvette gesetzt, die nur das Lösungsmittel (Aqua dest.) enthält. Die Konzentration wird nach der folgenden Formel bestimmt:

$$A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g/ml Nukleinsäure}$$

V: Verdünnungsfaktor der eingesetzten Nukleinsäure

OD: Optische Dichte (1 OD = 50 µg/ml für DNA, 40 µg/ml für RNA und 20 µg/ml für Oligonukleotide)

A₂₆₀: Absorption bei 260 nm

2.4.3 Restriktionsverdau von Plasmiden

Für den Verdau von Plasmiden mit Restriktionsenzymen wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers (Amersham) den

verschiedenen Enzymen angepasst. In der Regel wurden dabei 3 µg Vektor-DNA mit 2 µl Restriktionsenzym und Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl verdaut.

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

1-2%ige Agarose wurde in TAE-Puffer oder TBE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurden 0,5 µg/ml einer Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt und die Gelmischung in den vorbereiteten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 2-3 µl DNA-Gelladepuffer (siehe Tabelle 2.8) versetzt und anschließend in die Taschen eines erhärteten Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 1-5 V/cm Gellänge. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentlängen wurde ein Größenstandard mitgeführt (100 bp Molekulargewichtsmarker der Fa. Pharmacia, 1 kb Molekulargewichtsmarker der Fa. Invitrogen). Zur Auswertung wurde das Gel mit einer UV-Lampe bei 254 nm bestrahlt und das Ergebnis schließlich photographisch dokumentiert.

2.4.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde unter UV-Licht die gewünschte DNA Bande mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *GeneClean II kit* (Fa. Dianova) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Methode beruht auf der Immobilisierung der DNA an eine Silikatmatrix (Glasmilch) und auf dem Entfernen von Verunreinigungen durch mehrere Waschschriffe. Die DNA wird schließlich mit Wasser oder TE-Puffer von der Silikatmatrix eluiert.

2.4.6 Hybridisierung und Aufreinigung doppelsträngiger Oligonukleotide

Für Gelshiftassays wurden doppelsträngige DNA-Fragmente benötigt. Diese wurden durch Hybridisierung („*Annealing*“) zweier zueinander komplementärer Oligonukleotide hergestellt.

2.4.6.1 „*Annealing*“ komplementärer Oligonukleotide

Je 20 µg (1 µg/µl) der komplementären Oligonukleotide wurden zusammenpipettiert und mit 10 µl 5×*Annealing*puffer (siehe Tabelle 2.8) versetzt. Der Ansatz wurde in einem Wasserbad für 5 min gekocht und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese von einzelsträngigen getrennt.

2.4.6.2 Gelelektrophorese zur Aufreinigung doppelsträngiger Oligonukleotide

Zur Aufreinigung des Oligonukleotids wurde ein 20 prozentiges Polyacrylamidgel gegossen. Zur Herstellung von 40 ml Gel wurden 20 ml 40% Polyacrylamid (29:1 Acrylamid:Bisacrylamid, Roth), 4 ml 10×TBE und 16 ml Aqua dest. zusammengegeben. Zur Polymerisation der Lösung wurden 250 µl 10% APS und 35 µl TEMED hinzugefügt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 10 V/cm Gellänge und wurde nach ca. 2 Stunden abgebrochen. Die Doppelstrang-Banden wurde durch sog. „*UV-Shadowing*“ sichtbar gemacht. Dazu legt man das Gel auf die Verstärkerfolie einer Autoradiographiekassette und bestrahlt es mit einer UV-Lampe (254 nm). Die DNA-Bande absorbiert dabei das UV-Licht, was sich auf der Verstärkerfolie durch einen dunklen Schatten zeigt.

2.4.6.3 Isolierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen

Die Doppelstrangbande wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der Nukleinsäure aus dem Polyacrylamidgel-

stückchen wurde die Probe mit 500 µl Hochsalzpuffer (siehe Tabelle 2.8) ü.N. bei RT unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml 100% Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (15000 upm, 30 min) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl Aqua. dest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.4.7 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für die radioaktive Markierung wurde die doppelsträngige DNA mit dem Enzym T4 Polynukleotidkinase (PNK, New England Biolabs) markiert. Das Enzym katalysiert den Transfer der γ -Phosphat Gruppe von Nukleosidtriphosphaten (Redivue γ -³²P, Fa. Amersham) auf die 5'-Hydroxy-Enden von Nukleinsäuren.

Reaktionsansatz

1 µl (100 ng/µl) doppelsträngige DNA
1,5 µl 10×Polynukleotidkinase-Puffer
5 µl Redivue γ -³²P (Aktivität 3000 µCi/mM, Amersham)
6 µl Aqua dest.
1,5 µl T4 Polynukleotidkinase

Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermomixer für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden zum Ansatz 40 µl STE-Puffer (siehe Tabelle 2.8, Seite 35) hinzugefügt. Zur Aufreinigung der radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden sog. *Nuc Trap Push Columns* der Firma Stratagene verwendet. Das Prinzip dieser Säulen besteht darin, daß freie, nicht inkorporierte γ -ATP Moleküle in der Säule haften bleiben, während die radioaktiv markierten Oligonukleotide mit Hilfe einer speziellen Spritze durch die Säule gedrückt werden können. Nach dem Equilibrieren der Säulen mit 70 µl STE-Puffer wurden 70 µl radioaktive Probe auf die Säule appliziert. Die radioaktive Flüssigkeit wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und die Prozedur erneut mit 70 µl STE-Puffer wiederholt. Die Aktivität wurde in einem Scintillationszähler (Beckmann) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA. In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Reaktionen in einem Gerät der Firma Eppendorf (Mastercycler 5330) durchgeführt.

Bei der Konstruktion der sog. „Primer“-Oligonukleotide aus einer bekannten DNA-Sequenz wurde berücksichtigt, daß der GC-Gehalt zwischen 40%-65% betragen sollte, daß die Basenabfolge keine Sekundärstruktur durch Palindrome ausbildet und daß die Primer nicht zueinander komplementär sind.

Für die Berechnung des T_M -Wertes wurde folgende Formel verwendet:

$$T_M [^{\circ}C] = 81,5 + 16,6 \times (\log [M] + 0,41 (\%G/C) - 600/N)$$

[M]: Kationen $[M^+]$ Konzentration im Reaktionsansatz (0,05 M im verwendeten 1xPCR-Puffer)

N: Anzahl der Nukleotide des verwendeten Oligonukleotids

% G/C: Guanosin plus Cytosin-Gehalt des Oligonukleotids in Prozent

Der PCR-Reaktionsansatz wurde im Allgemeinen wie folgt angesetzt:

- x µl Matrizen-DNA (z.B. 1 µg genomische DNA oder 50 ng Plasmid-DNA)
- 5 µl Taq-Polymerase-Puffer (Roche)
- 4 µl dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP)
- 4 µl „Primer“ 1 (10 pmol/ µl)
- 4 µl „Primer“ 2 (10 pmol/ µl)
- 3 µl Taq-Polymerase (Roche, 1U/ µl)
- ad. 50 µl mit aqua dest.

Die Ansätze wurden mit je zwei Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet um die Verdunstung von Flüssigkeit zu minimieren.

Das PCR-Gerät wurde nach folgendem Schema programmiert:

95°C	5 min		Initiale Denaturierung der DNS
95°C	45 sek.		
T_M [°C]	60 sek.	18 – 35 ×	Exponentielle Amplifikation
72°C	75 sek.		
72°C	7 min.		Terminale Elongation

Die Analyse der Amplifikate erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

2.4.9 Analytische und präparative Isolierung von Plasmid-DNS

2.4.9.1 Präparative Isolierung mit dem *Qiagen Maxi-Kit*

Vorbereitung der Bakterien:

5-10 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium wurden mit einer bereits angelegten Glycerin-Konserve oder einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft und anschließend für 8 Stunden im Rotationsschüttler bei 37°C inkubiert. 5 ml dieser Vorkultur wurden am Abend in 100-200 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium überführt. Der Ansatz wird dann ü.N. weiterkultiviert.

Für die präparative Isolierung von Plasmid DNS wurde der *Qiagen Maxi Kit* (Qiagen GmbH, Düsseldorf) verwendet. Die Bakterien wurden bei 4000 upm 25 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in RNase-haltigem (400 µg/ml) Puffer (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA) resuspendiert, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit NaOH-SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1% SDS) lysiert. Nach Hinzufügen von Kaliumacetat-Puffer (2,55 M KAc) wurden die durch SDS denaturierten zellulären Proteine sowie Fette und Kohlenhydrate für 30 min auf Eis ausgefällt. Die Präzipitate und die Zelltrümmer, die unter anderem die an Zellmembranen gebundene bakterielle chromosomale DNA enthalten, wurden in zwei Zentrifugationsschritten (4000 upm, 10 min, 4°C) abgetrennt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt über Anionen-Austauschersäulen entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen). Nach Elution der DNA-Fraktion (Elutionspuffer: 1200 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol) wird die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt, mit Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen des Pellets in Aqua dest. aufgenommen. Die gewonnene DNA wurde photometrisch quantifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Typischerweise betrug die Ausbeute der Isolierung ca. 500 µg Vektor-DNS.

2.4.9.2 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung kleiner Plasmidmengen wurden sog. Mini-Präparation durchgeführt.

TELT-Protokoll:

Je Probe wurden 2 ml Bakteriensuspension 20 s bei 15000 upm zentrifugiert. Das Pellet

wurde in 100 µl TELT-Puffer resuspendiert und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1) hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz für 15 s stark gevortext und 5 min bei 13000 upm und 4°C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die Plasmid DNA mit 250 µl 100% Ethanol für 20 min bei -70°C gefällt. Nach der Abzentrifugation (20 min, 15000 upm) wurde die DNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 30 µl Aqua dest. gelöst und im Restriktionsverdau eingesetzt.

Isolierung mit dem *High pure plasmid isolation kit* (Boehringer Mannheim):

Bei dieser Präparation können bis zu 10 µg Plasmid-DNA aus 0,5 bis 5 ml Bakteriensuspension gewonnen werden. Es wurde nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren. Das Prinzip des Kits besteht zunächst auf der alkalischen Lyse der Bakterien und Abbau der bakteriellen RNA durch RNaseA. Nach Neutralisation und Ausfällung der chromosomalen DNA und bakterieller Zelltrümmer wird der plasmidhaltige Überstand mit einem *Filtertube* gereinigt, der Nukleinsäure-bindende Silika und Glasfaser-Oberflächen enthält. Nach einem Waschschrift wird die Plasmid-DNA frei von Salzen, Proteinen und zellulären Verunreinigungen mit Aqua. dest oder Niedrigsalzpuffer eluiert.

2.4.10 Isolierung von RNA

RNA-Isolierung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987)

Diese Methode wurde vor allem zur RNA Isolierung aus großen Zellvolumen ($>10^7$ Zellen/Ansatz) angewandt. Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert und dann mit PBS gewaschen. Zum Zellpellet wurde RNA-Lysepuffer gegeben (1 ml/ 10^7 Zellen). Dieser enthielt 4 M Guanidiniumisothiocyanat (GITC) als Denaturierungsreagenz, 100 mM β -Mercaptoethanol als reduzierendes Agens und 25 mM Natriumcitrat. Durch Auf- und Abpipettieren wurde der Puffer solange mit den Zellen gemischt, bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurden zum Lysat 1 Volumen saurer Phenol (Fa. Roth), 0,2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 49:1) und 0,1 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4,0 hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe für 20 s stark gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4500 upm und 4°C zentrifugiert. Die genomische DNA löst sich bei pH 4-5 in der phenolischen unteren Phase, die Proteine befinden sich

vor allem in der weißlich erscheinenden Zwischenphase und der weitaus größte Teil der RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 1 Volumen 100% Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte bei -20°C für mindestens 30 min. Nach der Zentrifugation (30 min, 5000 upm, 4°C) wurde das Pellet erneut in 700 μl RNA-Lysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 30 min Inkubation bei -20°C wurde die Probe erneut zentrifugiert (30 min, 13000 upm, 4°C). Anschließend wurde die RNA mit 200 μl 70% Ethanol gewaschen (15 min, 13000 upm, 4°C) und getrocknet. Das Pellet wurde in Aqua dest. gelöst und photometrisch quantifiziert. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C .

High pure RNA isolation kit (Boehringer Mannheim)

Dieses Verfahren wurde zur Isolierung von RNA aus geringen Zell- und Gewebemengen (1×10^4 bis 1×10^6 Zellen) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip des Kits besteht darin, daß nach Lyse der Zellen in Lysepuffer (4 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris-HCL, 30% [w/v] TritonX-100 pH 6,6) die Suspension auf Nukleinsäuren-bindenden Glasfäbersäulen aufgetragen wird. Dabei favorisiert der pH Wert des Puffers die Bindung von RNA. Im nächsten Schritt wird die restliche kontaminierende DNA in der Säule durch direkte Applikation von DNase I verdaut. Anschließend wird die Säule mehrmals gewaschen und die RNA mit Aqua dest. eluiert.

2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen erfolgten mit der T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10 μl bei 15°C über Nacht.

Reaktionsansatz:

1 μl (50 ng/ μl) Vektor-DNS

1 μl (x ng) Insert-DNS

1 μl 10 x Ligationspuffer (Stratagene)

ad 9 μl Aqua dest.

1 μl T4 DNA-Ligase (Stratagene)

Das Verhältnis Vektor zu Insert in der Ligationsreaktion kann 1:1, 1:3, 1:5 oder 1:10 betragen. Als Negativkontrolle wurde eine Ligationsreaktion mit dem linearisierten Vektor alleine oder nur mit dem Insert durchgeführt. Für die Berechnung des Vektor/ Insert-Verhältnisses von 1:1 wurde folgende Formel berücksichtigt:

$$\text{Insertmenge in ng} = \frac{(\text{Fragmentlänge Insert in bp}) \times (\text{Vektormenge in ng})}{\text{Fragmentlänge Vektor in bp}}$$

2.4.12 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien der Stämme TOP10F⁺ (Firma Invitrogen), MC1061P3 (Stratagene), INVaF⁺ (Invitrogen), SCS110 (Stratagene) für 30 min auf Eis mit 1-10 ng Plasmid-DNA oder 1-2 µl eines Ligationsansatzes inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Vektor durch Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 45 s integriert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 450 µl vorgewärmtem S.O.C.-Medium (siehe Tab. 2.8, Seite 35) versetzt und 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Suspension auf Antibiotikum-supplementierten Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin oder Tetrazyklin) ausplattiert. Wenn sich der Einbau der rekombinanten DNA in den Vektor zusätzlich über Blau-Weiß Selektion der Bakterienkolonien ermitteln ließ (z.B. pCRII Vektor), wurden 40 µl einer 20 mg/ml X-gal Lösung mit ausplattiert. Die Platten wurden für 12-20 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Langzeit-Konservierung wurden Kulturen 1:1 mit autoklaviertem 30%igem [v/v] Glycerin versetzt und nach Aliquotierung bei -80°C gelagert.

2.5 Die Generierung des Reporter-gen-Konstruktes p40/pXP1

Dieses Vektorkonstrukt wurde für alle Reporter-genanalysen sowie als Ausgangsvektor zur Herstellung der transgenen Maus benutzt.

2.5.1 Klonierung des humanen IL-12 p40 Promotors in pCRII

Der humane IL-12 p40 Promotor wurde zunächst mittels PCR als 815 bp Fragment aus genomischer DNA von Jurkat T-Zellen amplifiziert. Bei der Durchführung der PCR wurde entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 2.5.8 verfahren. Für die Amplifikation wurden die promotorspezifischen Primer p40Pp1 (5'-CTGTATGCCTCCCTGAGGG-3') und p40Pp2 (5'-AGTGCTTACCTTGCTCTGGG-3') bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C und 30 PCR-Zyklen verwendet. Das PCR-Produkt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert und anschließend mittels des *T/A cloning kit* (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in den pCRII Vektor kloniert. Die 3'-Terminale Transferase Aktivität der Taq-Polymerase addiert an 3'-Enden der Amplifikate einzelne Deoxyadenosine. Der linearisierte pCRII Vektor im Kit hingegen hat überhängende 3'-Deoxythymidine. Das so erhaltene p40/pCRII-Konstrukt wurde durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht und zur Kontrolle der Promotorsequenz sequenziert.

2.5.2 Sublonierung des p40 Promotors in pXP1

Das Promotorfragment wurde durch sog. *blunt-end* Klonierung in den pXP1-Reporter-genvektor (Nordeen et al., 1987) gebracht. Der pXP1 Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut. Anschließend wurde der linearisierte Vektor durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft, aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem GeneClean Kit aufgereinigt. Zur Dephosphorylierung des Vektors wurde dieser mit CIAP (*Calf intestinal alkaline phosphatase*, Firma Promega) behandelt. Dabei wurden 0,2 U CIAP pro µg DNA (ca. 6 kB) eingesetzt und die Reaktion bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNS durch Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt,

mit Ethanol gefällt und in Aqua dest aufgenommen.

Das IL-12 p40 Promotorfragment wurde mit EcoRI aus dem dem pCRII Vektor herausgeschnitten. Das 815 bp Fragment wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel geschnitten und mit dem GeneClean Kit aufgereinigt. Um die überhängenden Enden abzudauen, wurden 5 U/ μ g (DNA) Mung Bean Nuclease (Stratagene) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol gefällt und in Aqua dest aufgenommen. Bei der darauffolgenden Ligation von pXP1-Vektor und Promotorfragment wurde entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 2.4.11 verfahren. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 15°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in kompetente E.coli Bakterien (TOP10F') transformiert. Von den Agarplatten wurden am nächsten Tag einige Bakterienkolonien gepickt und damit 5 ml ü.N.-Kulturen angeimpft. Danach erfolgte eine Mini-Präparation der Plasmid DNA mit dem TELT-Protokoll bzw. mit dem *High pure plasmid isolation kit* Protokoll (Boehringer Mannheim). Zur Überprüfung auf positive Klone wurden die Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Weiterhin wurde der Vektor mit verschiedenen Primern (spezifisch für die klonierte IL-12 p40 Promotor-DNA) sequenziert. Die Klone, die das humane IL-12 p40 Promotorfragment in „Sense“-Orientierung (5'-3'Richtung) enthielten, wurden dann für Reporterassays verwendet.

2.6 Verwendete Expressionsvektoren

Expressionsfaktoren für Transkriptionsfaktoren wurden für *in vitro* Translationen und Kotransfektionen eingesetzt. Expressionsfaktoren für NF- κ B-Proteine (pNFkBp50, pNFkBp65, pNFkB κ rel) wurden von Dr. Sven Pettersson (CGR, Stockholm), Expressionsvektoren für C/EBP α und C/EBP δ (pC/EBP α , bzw. pC/EBP δ) von Dr. Richard Schwarz (Michigan State University, USA), für C/EBP β (pC/EBP β) von Prof. Dr. Trautwein (Universitätsklinikum Hannover), Expressionsvektoren für GATA-Transkriptionsfaktoren (pGATA-1, pGATA-2, pGATA-3, pKRR) von Dr. Winoto (UCI, Berkeley, USA) erhalten.

2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen wurden mit dem Sequenase 2.0 Kit der Firma USB durchgeführt. Das Kit verwendet dabei ^{35}S -dATP zur Markierung neu polymerisierter DNA-Fragmente und 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate zur Induktion vorzeitigen Kettenabbruchs. Die Reaktionsansätze werden schließlich auf einem Sequenzierungsgel aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

2.7.1 Denaturierung der Plasmid-DNA

5 μg Plasmid-DNA wurden in 30 μl Aqua dest. gelöst und 30 min bei 37° C in Denaturierungspuffer (3 μl 2 M NaOH und 3 μl 2 mM EDTA pH 8,0) inkubiert. Anschließend wurde der denaturierte, einzelsträngige Vektor mit 0,1 Volumen Natriumacetat pH 4,5 und 3 Volumen 100% Ethanol präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 7 μl Aqua dest. gelöst.

2.7.2 Sequenzierungsreaktion

Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Sequenzierung wurde ein sequenzspezifischer Primer an die einzelsträngige Plasmid-DNA hybridisiert. Dazu wurden 2 μl Reaktionspuffer und 1 μl (1 pmol/ μl) des Primers zu den 7 μl denaturierter Plasmid-DNA hinzugegeben. Der Reaktionsansatz (10 μl) wurde 2 min auf 65° C erhitzt und langsam (ca. 1°C/min) auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Vorbereitung der Markierungsreaktion wurden 2,5 μl ddATP, ddCTP, ddTTP und ddGTP in je einem Reaktionsgefäß auf 37°C vorgewärmt. Zum Reaktionsansatz (10 μl) wurden 1 μl 0,1 M DTT, 1 μl ^{35}S (9,25 MBq, Fa. Amersham), 2 μl Reaktionsspuffer (1:5 in Aqua dest. verdünnt) und 2 μl Sequenase (1:8 in Sequenase Puffer verdünnt) gegeben. Die Markierungsreaktion erfolgte für 4 min bei RT. Die Terminationsreaktion wurde nach Zugabe von je 3,5 μl des Reaktionsansatzes zu den Didesoxynukleotid-Ansätzen (2,5 μl) für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 4 μl Formamidgelladepuffer gestoppt. Vor dem Auftragen auf ein Sequenzierungsgel wurden die Proben

4 min bei 75°C denaturiert und 2 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Auftrag auf das Sequenzierungsgel.

2.7.3 Auftrennung der Fragmente auf einem Sequenzierungsgel

Die Elektrophorese von Sequenzierungsreaktionen wurden in 5%igen PAA-Gelen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Zur Herstellung von 100 ml Gel wurden 42 g Harnstoff, 10 ml 10×TBE und 12,5 ml 40% Polyacrylamid (19:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Fa. Roth) zusammengegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde unter Einsatz von Vakuum durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und anschließend 10 min entgast. Zur Polymerisation und Quervernetzung wurden unmittelbar vor dem Gießen des Gels 250 µl 10% APS und 50 µl TEMED zur Lösung hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte in der Sequi-Gen II Gelkammer (Fa. Biorad). Der Gellauf fand in 1x TBE bei 100 Watt und 50°C statt. Nach dem Lauf wurde das Gel auf 3 MM Whatman Papier transferiert und unter Vakuum (Geldryer Model 583, Biorad) getrocknet. Für die Autoradiographie wurden die Gele in Kassetten mit Verstärkerfolien geklebt und mit Biomax MR Filmen (Kodak) bedeckt. Die Kassetten wurden bis zur Entwicklung bei -70° C aufbewahrt.

2.8 Nachweis von mRNA-Transkripten mittels RT-PCR

Die Expression von mRNA-Transkripten wurden mittels RT-PCR untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Ein Aliquot der cDNA diente dann als Matrizen-DNA in einer PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern. Als interne Kontrolle wurde die Expression von β-Aktin mRNA analysiert, ein konstitutiv exprimiertes Gen dessen Signal in allen Ansätzen gleich stark sein sollte.

5 µg RNA wurde in einem Volumen von 10 µl Aqua dest. 5 min bei 65° C denaturiert und anschließend sofort auf Eis transferiert. Dieser Schritt diente der Aufhebung von Sekundärstrukturen, welche die Funktion der Reversen Transkriptase behindern. Nach Zugabe von 20 µl RT-Mix wurde die Probe 1 h bei 39°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz schließlich 2 min bei 95°C inkubiert. Die cDNA-

Proben wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

RT-Mix (20 μl /Ansatz)

0,6 μl 0,1 M DTT

1,5 μl 5mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

6 μl 5 x First Strand buffer (Gibco BRL)

1 μl (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Oligo dT (Boehringer Mannheim)

0,5 μl RNase Inhibitor-RNasin (Boehringer Mannheim)

0,4 μl 1 mg/ml BSA

1,5 μl MMLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL)

8,5 μl Aqua dest.

Die exponentielle Amplifikation der cDNA erfolgt mittels PCR. Bei der Durchführung wurde entsprechend der Ausführungen in Abschnitt 2.4.8 verfahren. Die für die PCR verwendeten Primer, Zyklenzahl und „*Annealing*“-Temperaturen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Primer-bezeichnung	Sequenz	T_M	Zyklus-zahl	Fragment
5'-hsp40CDS	5'-TTTTCTGGCATCTCCCCTCGTG-3'	58°C	18	645 bp
3'-hsp40CDS	5'-TGGGTGGGTCAGGTTTGATGATG-3'			
5'-hmAktinCDS	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	63°C	20	620 bp
3'-hmAktinCDS	5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'			
5'-mmp40CDS	5'-GGAGACCCTGCCATTGAACT-3'	51°C	25	456 bp
3'-mmp40CDS	5'-CAACGTTGCATCCTAGGATCG-3'			

Tabelle 2.8 Primer und Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von cDNA

2.9 Gelretardationsexperimente (EMSA)

Gelretardationsexperimente (Bandshiftassay oder *electrophoretic mobility shift assay* abgekürzt EMSA) dienen der Untersuchung sequenzspezifischer Protein-DNA Interaktionen. Diese Methode wird angewandt, um zu untersuchen, ob sich in nukleären Proteinextrakten unterschiedlicher Zellen oder unterschiedlich stimulierter Zellen spezifische Transkriptionsfaktoren befinden, die an regulatorische DNA-Sequenzen des Promotors oder *Enhancer* eines Gens binden. Dazu werden Kernproteine mit dem radioaktiv markierten, doppelsträngigen DNA-Fragment inkubiert und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Methode macht sich dabei die Tatsache zunutze, daß die ungebundene doppelsträngige Oligonukleotide in der Gelelektrophorese schneller wandern als die gleichen DNA-Fragmente im Komplex mit Protein (Neurath 1997).

Zur Charakterisierung einer Protein-DNA Wechselwirkung werden sowohl Konkurrenzexperimente als auch „Supershift“-Experimente durchgeführt. Bei den Konkurrenzversuchen wird der Reaktion ein Überschuß eines unmarkierten (kalte) Oligonukleotids hinzugefügt. Kommt es zu einer Abschwächung des Signals, spricht man von Konkurrenz, da die beteiligten Proteine vom Konkurrenten-Oligonukleotid eingefangen werden. Als Positivkontrolle für die Abschwächung der Bande wird die Autokonkurrenz verwendet. Dazu setzt man ein unmarkiertes Fragment mit der gleichen Sequenz wie das markierte Fragment in die Reaktion ein. Die sogenannte Kreuzkonkurrenz mit einem unspezifischen Oligonukleotid sollte dabei zu keiner Abschwächung des Signals führen, weil diese mit einer nicht verwandten DNA-Sequenz durchgeführt wird. Bei dem „Supershiftassay“ wird ein spezifischer Antikörper zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Bindet der Antikörper an den Transkriptionsfaktor im Protein-DNA Komplex, dann erhält man entweder einen „Supershift“, also eine oberhalb des ursprünglichen Komplexes liegende Bande, oder nur eine Auslöschung des Signals (wenn der Antikörper die DNA-Bindung inhibiert).

2.9.1 Durchführung von Gelretardationsexperimenten

Bei der Durchführung von Gelshiftassays wurden Kernproteine oder *in vitro* translatierte Proteine verwendet. Um unspezifische DNA/ Protein-Interaktionen abzusättigen, wurden

zum Reaktionsansatz synthetische repetitive DNA-Stränge (Poly-dIdC, Pharmacia) hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach sofort auf nativen 5%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle von „Supershift“-Experimenten wurde der Antikörper mit dem Proteinextrakt für 30 min auf Eis vorinkubiert. Als Negativkontrolle (ohne Proteinextrakt) wurden einem Ansatz anstelle von Protein 2 µl DNA-Ladepuffer hinzugefügt, um die Lauffront im Gel zu markieren.

Reaktionsansatz:

3 µl 5×HO-Puffer (125 mM Hepes, 25 mM DTT, 750 mM KCl, 50 % Glycerin)

1-15 µg nukleäre Proteine (oder 5 µl *in vitro* translatiertes Protein)

1 µl 1 µg/ µl Poly-dIdC (Pharmacia)

1 µl (25000 cpm) γ -³²P markierter doppelsträngiges Oligonukleotid

Optional: 1-100 ng Kompetitor-Oligonukleotid) oder 1-2 µg Supershift-Antikörper)

Ad 15 µl Aqua dest.

2.9.2 Herstellung eines nativen 5%igen Polyacrylamidgels

Zur Herstellung von 40 ml Gel wurden 5 ml 40% Polyacrylamid (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Fa. Roth), 4 ml 10×TBE und 31 ml Aqua dest. gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 250 µl 10% APS und 35 µl TEMED induziert. Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer des Gels auf 3 MM Whatmann Papier und dessen Trocknung unter Vakuum (Geldryer Model 583, Biorad). Für die Autoradiographie wurden Kassetten mit Verstärkerfolien und hochsensitive Biomax MS Filme (Kodak) verwendet.

2.10 Verwendete Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit für Gelretardationsexperimente und zielgerichtete Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Name	Oligonukleotidsequenz	Lage rel. zur TSS
GA-12	5'-CCTCGTTATTGATACACACACAGAGA -3'	-169 bis -144
GA-12m1	5'-CCTCGTTATTTCTACACACACAGAGA-3'	-169 bis -144
GA-12m2	5'-CCTCGTTATTTCTACACACACAGAGA-3'	-169 bis -144
GA-12m3	5'-CCTCGTTATTTCTACACACACAGAGA-3'	-169 bis -144
GA-12m4	5'-CCTCGTTATTTCTACACACACAGAGA-3'	-169 bis -144
GATA	5'-GACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT -3'	Consensus
OCT	5'-GATCGAATGCAAATCACTAGCT-3'	Consensus
p40NFkB	5'-GAACTTCTTGAAATCCCCCAGAAGG-3'	-127 bis -102
p40NFkBm1	5'-GAACTTCTTGAAATTAGCCCAGAAGG-3'	-127 bis -102
NF-kB1	5'-GATCGAGGGGACTTTCCTAGC-3'	Consensus
NF-kB2	5'-AGTTGAGGGGACTTTCAGGC-3'	Consensus
AP-1	5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGATC-3'	Consensus
p40C/EBP	5'-TGTTTTCAATGTTGCAACAAGTCAGT-3'	-91 bis -66
p40C/EBPm1	5'-TGTTTTCAATGTTCTAACAAGTCAGT-3'	-91 bis -66
C/EBP	5'-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'	Consensus
p40ETS	5'-CCCAAAGTCATTCCTCTTAGTTC-3'	-225 bis -201
p40ETS m1	5'-CCCAAAGTCATTA ACTCTTAGTTC-3'	-225 bis -201
p40ETS-L	5'-GATGTAACCCAGAGAAATTAGCATCTCCATCTCCTTC - CTTATTC CCAAGTCATTCCTCTTAGTTCATTA-3'	-275 bis -197
ETS	5'-GGGCTGCTTGAGGAAGTATAAGAAT-3'	Consensus
CREB	5'-GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT-3'	Consensus
IRF-1	5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3'	Consensus
STAT-1	5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG-3'	Consensus
STAT-3	5'-GATCCTTCTGGGAATCCTAGATC-3'	Consensus
STAT-5/6	5'-AGATTCTAGGAATTCAATCC-3'	Consensus
E-Box	5'-AGCTTGAACCTGCAGCTGCAGGTGGGGGAGTA -3'	Meyer et al., 1995

Tabelle 2.9 Bei Gelshift-Assays verwendete Oligonukleotide (oberer Strang).

2.11 *In vivo* Footprinting

Die Methode *in vivo*-Footprinting (*genomisches Footprinting*) wurde 1989 von Mueller und Wold vorgestellt. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum *in vitro* Footprinting liegt darin, mögliche Protein/DNA Wechselwirkungen in Bereichen regulatorischer DNA-Elemente in intakten, lebenden Zellen unter realen Bedingungen zu untersuchen.

2.11.1 Prinzip der Methode

Lebende Zellen in Kulturmedium werden für kurze Zeit mit Dimethylsulfat (DMS) behandelt. DMS diffundiert als kleines Molekül in den Zellkern und überträgt als stark alkylierendes Agens eine seiner Methylgruppen auf Guanosine in der DNA. Diese Methylierung ist im Bereich gebundener Transkriptionsfaktoren gegenüber freier DNA unterrepräsentiert. Nach der Isolierung der DNA wird diese mit Piperidin bei 90°C verdaut. Piperidin schneidet DNA an methylierten Guanosinen, nicht jedoch an unmethylierten. Die verdaute DNA wird dann mehreren enzymatischen Reaktionen unterworfen. Im Zuge der sogenannten Erststrangsynthese werden durch die Verwendung spezifischer Primer bestimmte Fragmente aus dem zu untersuchenden Bereich durch *Annealing* eines spezifischen Primers (Primer 1) markiert und mit Sequenase 1.0, einem Enzym mit geringer terminaler Transferaseaktivität abgelesen. Die Amplifikation der Fragmente erfolgt durch sog. ligationsvermittelte PCR (*ligation mediated PCR*, LM-PCR). Bei dieser Methode erfolgt zunächst die Ligation eines synthetischen, unidirektionalen Linkers an die glatten Enden der DNA-Fragmente. Bei der sogenannten Zweitstrangsynthese werden die unterschiedlich langen Fragmente mit der Taq-Polymerase amplifiziert. Hierbei wird ein genspezifischer Primer (Primer 2) und ein linkerspezifischer Primer verwendet. Anschließend wird die amplifizierte DNA mit einem dritten genspezifischen Primer (Primer 3) radioaktiv markiert und in denaturiertem Zustand auf einem Sequenzierungsgel aufgetrennt. Dabei wird als Referenzkontrolle ein Ansatz *in vitro* methylierter, also proteinfrei methylierter DNA mitgeführt. Durch Vergleich der Bandenmuster der verschiedenen Ansätze mit der *in vitro* Kontrolle können *in vivo* protektierte Guanosine identifiziert werden, die auf Protein/DNA Wechselwirkungen hinweisen. Die Bindung von Proteinen an die DNA kann aber auch benachbarte Adenosine chemisch aktivieren, so daß auch hier eine Methylierung ermöglicht wird.

Solche Hyperreaktivitäten können als Banden identifiziert werden, die in der Spur mit der *in vitro* methylierten DNA nicht vorhanden sind.

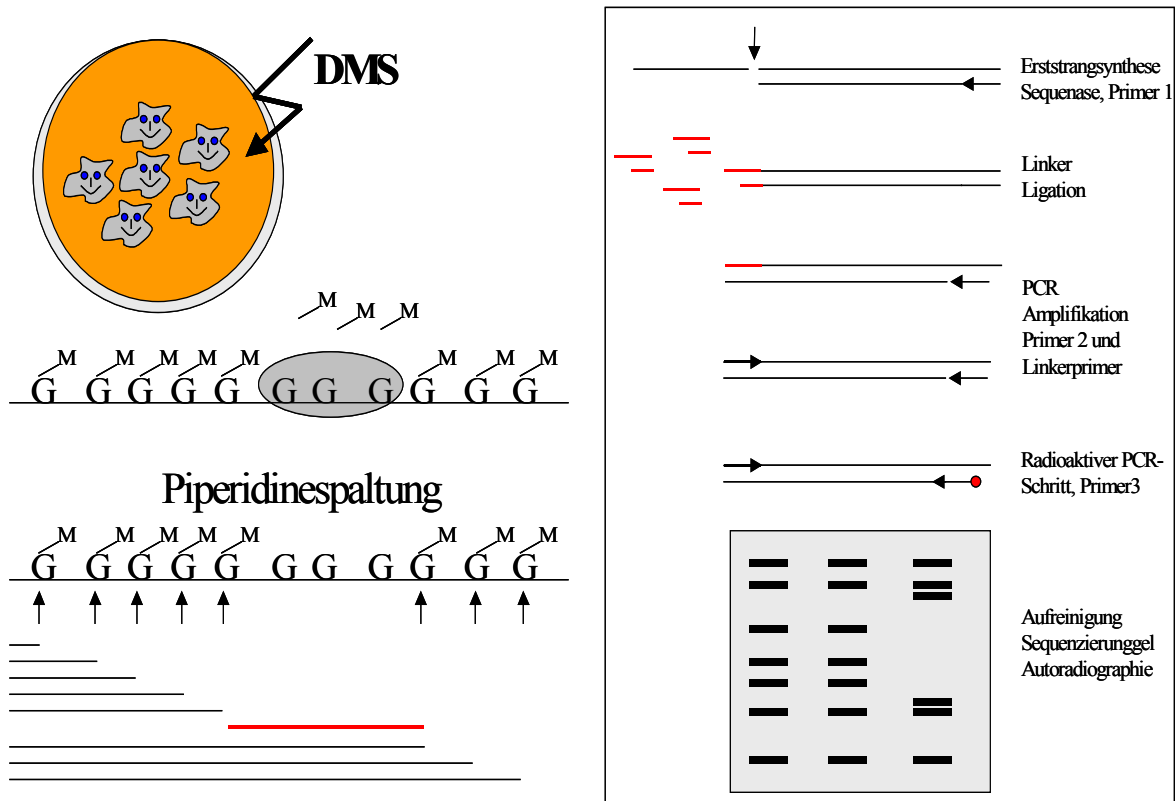


Abbildung 2.1 Prinzip des *in vivo* Footprinting mittels LM-PCR.

2.11.2 Benötigte Puffer und Lösungen

Für die Durchführung der Methode wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen und Puffer benötigt.

Zellyse-Puffer 1 mM Tris-HCl (pH 7,5) 400 mM NaCl 2 mM EDTA (pH 8,0) 0,2 % SDS 0,2 mg/ ml Proteinase K	DMS-Stoppuffer 1,5 M NaAc (pH 7,0) 1 M β -Mercaptoethanol 100 μ g/ml tRNA	LM-Mix 1 40 mM Tris (pH 7,7) 50 mM NaCl
LM-Mix 2 20 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 20 μ M je dNTP	LM-Mix 3 20 mM MgCl ₂ 125 μ g/ml BSA	LM-Mix 4 260 mM Na-Acetat 10 mM Tris-HCl 4 mM EDTA (pH 8.0)
Ligationspuffer 0,002 M MgCl ₂ 1,9 mM rATP 50 mM BSA 70 mM Tris-HCl pH 7,5 1 μ l T4 DNA Ligase (10 U/ μ l)	Sequenase-Verdünnungspuffer 10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0	

Tabelle 2.10 Puffer und Lösungen für *in vivo* Footprinting Experimente

2.11.2 *In vivo* DMS-Behandlung von Zellen und Isolierung der DNA

Die Zellen (1×10^7 - 1×10^8) wurden in 6-Loch Zellkulturplatten kultiviert und mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Für die *in vivo* DMS-Behandlung wurden zum Kulturmedium 0,1% DMS (Sigma) hinzugefügt und genau 2 min bei RT (möglichst dunkel) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden dann sofort 10 ml eiskaltes PBS pro Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Zellsuspensionen von jedem Ansatz wurden dann in 15 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 1600 upm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 15 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurde jedes Zellpellet in 3 ml Zellysepuffer aufgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Lyse der Zellen und die Denaturierung der Proteine erfolgte für 5 h oder ü.N. bei 37°C. Nach Zugabe von 3 ml Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) wurden die Ansätze für 30 min bei 4°C auf einem Überkopftaumler inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 20 min bei 4000 upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 6 ml eiskaltem 100%igen Ethanol und 300 μ l 3 M Natriumacetat (pH 4,5) gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 4500 upm und 4°C abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Aufnahme des Pellets in ca. 200 μ l TE-Puffer (pH 7,5) wurde der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

2.11.3 *In vitro* DMS-Behandlung isolierter DNA

Für Kontrollreaktionen war es notwendig, *in vitro* methylierte DNA zur Verfügung zu haben. Zu diesem Zweck wurde DNA nicht *in vivo* methylierter Zellen wie oben beschrieben isoliert. Zu 200 µg DNA (in 200 µl TE Puffer pH 7,5) wurde 1 µl DMS hinzupipettiert. Nach genau 30 s wurde 50 µl eiskalter DMS-Stoppuffer hinzugegeben. Die DNA wurde mit 500 µl Ethanol 20 min auf Trockeneis gefällt und anschließend 30 min bei 13000 upm und 4° C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 40 µl TE Puffer gelöst.

2.11.4 Piperidinspaltung methylierter DNA

200 µg methylierte DNA in TE-Puffer wurden mit 200 µl 1 M Piperidinlösung versetzt und 30 min bei 90°C erhitzt. Dadurch wurde die DNA an methylierten Guanosinen gespalten. Anschließend wurden 40 µl 3 M Natriumacetat und 1 ml Ethanol hinzugegeben und die DNA gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 13000 upm) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Zur Entfernung von eventuell vorhandenen Piperidinresten wurde das Ansatz vakuumgetrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer (pH 7.5) gelöst und photometrisch quantifiziert. Anschließend wurde der Piperidinverdaulichkeit der DNA-Proben auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft. Die verdaute DNA hatte eine durchschnittliche Fragmentlänge von 300 bis 500 bp.

2.11.5 Ligationsvermittelte PCR

Verwendete Primer und Oligonukleotide

Die Auswahl geeigneter Primer spielt eine wichtige Rolle für die Spezifität der enzymatischen Reaktionen der ligationsvermittelten PCR. Die Konstruktionsprinzipien von Oligonukleotiden wurden bereits erläutert. Bei den hier verwendeten IL-12 p40 Promotor spezifischen Primern wurde zusätzlich folgendes beachtet: Primer 3 wurde so gewählt, daß er weiter in 3`-Richtung liegt als Primer 2 und Primer 2 weiter in 3`-Richtung als Primer 1.

Dabei dürfen sich die einzelnen Primer überlappen. Desweiteren wurden die Primer so konstruiert, daß die „Annealing“-Temperaturen von Primer 3 höher als die von Primer 2 ist und diese wiederum höher als die von Primer 1 ist. Dies wurde erreicht, indem Länge und Basenzusammensetzung der Primer unterschiedlich gewählt wurden.

Bezeichnung	Sequenz	Lage rel. zur TSS	TM
p40primer 1	5'-GGCTGGGAAGTGCTTACC-3'	+77 bis +58	60 °C
p40primer 2	5'-CTCTGGGCAGGACGGAGAGTCC-3'	+54 bis +33	63 °C
p40primer 3	5'-GGGCAGGACGGAGAGTCCAATGGC-3'	+50 bis +27	66°C
Linkerprimer	5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'		
Linker-as	5'-GAATTCAGATC-3'		

Tabelle 2.11 Oligonukleotide die bei der Durchführung der LM-PCR Verwendung fanden

Der Linker wurde aus den Oligonukleotiden Linkerprimer und Linker-as hergestellt. Dazu wurden beide wie in Abschnitt 2.5.6 beschrieben hybridisiert und auf eine Konzentration von 50 pmol/ µl eingestellt.

Erststrangsynthese

Zur Erststrangsynthese wurden 3 µg Piperidin verdaute DNA (in 5 µl TE-Puffer pH 7.5) mit 15 µl LM-Mix 1 und 1 µl (1 pmol/ µl) Primer 1 gemischt. Das Programm 1 (siehe Seite 54) wurde im Thermocycler gestartet und bei 90°C wurde der Reaktionsansatz in das Gerät gestellt. Nach Programmende wurde die Probe sofort auf Eis überführt. Zum Reaktionsansatz wurden 7,5 µl LM-Mix 2 und 1,5 µl Sequenase 1.0 (1:4 verdünnt in Sequenase-Verdünnungspuffer) hinzugefügt. Das Programm 2 wurde gestartet. Nach dem zweiten Programmschritt (5 min, 60°C) wurde das Programm angehalten, aber die Proben weiter bei 60°C inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 6 µl 310 mM Tris (pH 7,7) hinzugefügt und das Programm anschließend wieder gestartet. Die Proben wurden danach sofort auf Eis gestellt.

Linkerligation

Zu jedem Erststrangansatz wurden 20 µl LM-Mix 3, 20 µl Ligationspuffer und 5 µl Linker (50 pmol/µl) hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 15° C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 V Ethanol (160 µl), 0,1 V 3 M Natriumacetat (8 µl) und 10 µg Hefe tRNA (1 µl) zu jedem Ansatz hinzugefügt. Danach wurde die DNA 30 min auf Trockeneis gefällt und 20 min bei 13000 upm und 4° C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet. Das Pellet wurde in 38 µl Aqua dest. gelöst.

Zweitstrangsynthese

Zu jedem Ansatz (38 µl) wurden auf Eis 5 µl Taq-Polymerasepuffer (Boehringer Mannheim), 2 µl dNTP-Mix (je 5mM), 1 µl (10 pmol/ µl) Primer 2, 1 µl (10 pmol/ µl) Linkerprimer hinzugefügt und mit Mineralöl überschichtet. Das Programm 3 (siehe Tabelle 2.18, Seite 63) wurde gestartet und das Reaktionsgefäß wurde in den Thermocycler gestellt. Kurz vor Ablauf des ersten Schrittes (5 min, 94°C) wurde das Programm angehalten und zu jedem Ansatz 3 µl (1 U/ µl) Taq Polymerase (Boehringer Mannheim) hinzugefügt. Nach diesem sogenannten *Hotstart* der Taq Polymerase wurde Programm 3 fortgeführt. Nach Programmende wurden die Proben sofort auf Eis transferiert.

Radioaktive Markierung

Zu jedem Ansatz wurden 2 µl dNTP-Mix (5mM) und 1 µl (1 x 10⁶ counts) γ-³²P markierter Primer 3 und 1 µl (1U/ µl) Taq-Polymerase addiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in den Thermocycler gestellt und das Programm 4 wurde ausgeführt.

Programm 1	Programm 2	Programm 3	Programm 4
5 min 95°C 30 min 60°C	5 min 47 °C 5 min 60°C STOPP! (60°C) + 6 µl 310 mM Tris (pH 7,7) Programm wird fortgesetzt 10 min 67°C	95 °C 5 min <u>20 Zyklen</u> 95°C 45 s 63°C 1 min 45 s <u>76°C 2 min 45 s</u> 76°C 10 min	95 °C 4 min 66°C 1 min 45 s 76°C 9 min 30 s 95°C 4 min 66°C 1 min 45 s 76°C 9 min 30 s°C

Die Reaktionsansätze wurden anschließend (ohne Öl) in vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 295 µl LM-Mix 4 transferiert. 500 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol wurden hinzugefügt und 30 s stark gevortext. Nach 3 min Zentrifugation bei 13000 upm

und 4° C wurden je ca. 200 µl der oberen Phase in vorbereitete 1,5 ml Eppendorfgefäße mit je 500 µl 100% Ethanol überführt. Die Fällung erfolgte entweder über Nacht bei -20° C oder 15 min auf Trockeneis. Die radioaktiv markierte DNA wurde 20 min bei 13000 upm abzentrifugiert, mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 6 µl Formamidladepuffer gelöst und 4 min bei 90° C denaturiert. 3 µl davon wurden auf ein Sequenzierungsgel aufgetragen (siehe Abschnitt 2.7.3). Die Filme wurden getrocknet und mit Kodak MS Filmen exponiert.

2.11.6 Auswertung von *in vivo* Footprinting Experimenten

Die Bandenmuster unterschiedlich stimulierter Zellen wurden miteinander und auch mit der Kontrolle (*in vitro* methylierte DNA) verglichen. Die Zuordnung protektierter und hyperreaktiver Basen zu der Promotorsequenz wurde durch den Vergleich der Banden mit einer auf demselben Gel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion unter Verwendung des spezifischen p40Primer 3 bewerkstelligt.

2.12 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die transiente Transfektion verwendet, um die Aktivität des IL-12 p40 Promotors in verschiedenen Zellen und unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde für Reporteranalysen die DEAE-Dextran Methode verwendet, weil sich diese in den hier durchgeführten transienten Transfektionen als effizient und reproduzierbar erwies. Die Überexpression von Proteinen in COS-7 Zellen wurde durch Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion erreicht.

2.12.1 DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit frischem Kulturmedium gefüttert. Bei adhärennten Zellen wurde darauf geachtet, daß diese bei der Transfektion einen semikonfluenten Rasen bilden. Pro Transfektionsansatz wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt.

Bei Stimulationsexperimenten unter Verwendung des gleichen Vektors für mehrere Ansätze wurde die Transfektion in einem Ansatz mit dem entsprechenden, proportional größeren Volumen und DNA-Konzentration durchgeführt, um Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu vermeiden.

Am Tag der Transfektion wurden die Zellen abzentrifugiert (1600 upm, 5 min), aufgeteilt, zuerst mit 5 ml PBS und anschließend mit 5 ml TS Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde danach in 1 ml Transfektionspuffer aufgenommen und 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz mehrmals leicht geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium/ 0,1 mM Chloroquin hinzugefügt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Chloroquin ist ein zytotoxisches Agens, das die Transfektionseffizienz erhöht. Man nimmt an, daß es den Abbau der DNA durch lysosomale Hydrolasen verhindert. Nachdem der Ansatz abzentrifugiert (5 min, 1600 upm) und mit 5 ml serumfreiem Kulturmedium gewaschen worden war, wurden die Zellen in 10-20 ml Kulturmedium aufgenommen und in Kulturschalen ausgesät. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 10 Stunden die Luziferaseaktivität in den lysierten Zellen bestimmt.

TD-Puffer pH 7,4 8 g NaCl 0,38 g KCl 0,13 g Na ₂ HPO ₄ 3 g Tris-HCl ad 1000 ml Aqua dest.	Transfektionslösung 950 µl 1×TS-Puffer 10 µg Plasmid-DNS 50 µl DEAE Dextran (10 mg/ml)
100 ml 1×TS-Puffer (frisch ansetzen) 99 ml TD-Puffer 1 ml Mg/Ca-Lösung	Mg/Ca-Lösung 10 mg/ ml MgCl ₂ 10 mg/ ml CaCl ₂

Tabelle 2.12 Bei der DEAE-Transfektion verwendete Puffer. Alle Lösungen wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert.

2.12.2 Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion

Die Zellen wurden 24 Std. vor der Transfektion 1:5 in 10 cm Gewebekulturschalen aufgeteilt und mit 10 ml frischem Kulturmedium (DMEM-*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) gefüttert. Zur Vorbereitung der Transfektionslösung wurden pro Ansatz in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen 562,5 µl 0,1×TE-Puffer, 62,5 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung sowie

20 µg Vektor-DNS pipettiert. Der Ansatz wurde auf einem Vortexer gemischt und dabei tropfenweise mit 625 µl 2×HBS versetzt. Das Gemisch wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise in die Gewebekulturschalen pipettiert. Die Zellen wurden für 15 Stunden weiterkultiviert und anschließend mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 15 ml vorgewärmtem Kulturmedium wurden die Zellen dann für weitere 48 Stunden kultiviert. Zur Gewinnung der Proteine wurden Gesamtzellextrakte isoliert.

2.13 Reportergenanalysen

Um die Aktivität des IL-12 p40 Promotors zu untersuchen, wurde das zuvor hergestellte p40/ pXP1 Konstrukt verwendet. Reportergen ist dabei das Enzym Luziferase. Dieses katalysiert die Oxidation von Luziferin unter Freisetzung eines Photons. Die Luziferase-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem *luciferase assay system* von Promega bestimmt. Zur Kontrolle gleicher Transfektionseffizienz in verschiedenen Ansätzen wurde ein β-Gal-CMV Vektor (Invitrogen) kotransfiziert. Die β-Galaktosidase-Konzentration wurde stets in demselben Zellextrakt gemessen wie die Luziferaseaktivität des zu untersuchenden IL-12 p40 Promotorkonstrukts. Im Falle unterschiedlicher Transfektionseffizienz in verschiedenen Ansätzen wurden die Luziferasewerte, gemessen als RLU (*Relative Light Units*), gegen die β-Galaktosidasewerte normalisiert. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde durch Chemilumineszenzmessung mit dem *Luminescent β-gal detection kit II* von Clontech ausgewertet. Zur Analyse wurde ein Luminometer (Sirius, Berthold Detection Systems) verwendet.

Zur gleichzeitigen Untersuchung von Luziferase und der β-Galaktosidase wurden die Zellen nach der Transfektion mit 1x PBS gewaschen (1600 upm, 5 min) und anschließend in 1×RLB-Puffer (Promega) lysiert. Die Proben wurden 15 min bei RT inkubiert und anschließend bei 13000 upm 1 min zentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden mit 200 µl β-Gal Substratpuffer (Clontech) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die β-Galaktosidase Aktivität der Proben für 15 s im Luminometer bestimmt. Als Referenzwert für die Messung wurde ein Röhrchen nur mit Substrat verwendet. Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden 100 µl Luziferase-Substratpuffer (Promega) in ein durchsichtiges 5 ml Röhrchen vorgelegt und 20-35 µl Überstand der lysierten Zellen hinzupipettiert. Das Röhrchen wurde sofort in das Luminometer gestellt, und die Messung

erfolgte über 10 s. Als Referenzwert wurde vor jeder Messung der RLU-Wert des Substrats bestimmt. Als Negativkontrolle diente die Transfektion der Zellen mit dem leeren, promotorlosen pXP1.

Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität der IL-12 p40 Promotorkonstrukte mit der β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Weiterhin wurde zur Normalisierung der IL-12 p40 Promotoraktivität der Proteingehalt der Zellysat-Überstände photometrisch bestimmt.

Zur Untersuchung der Luziferase-Aktivität in Organen transgener Tiere wurden diese getötet und verschiedene Organe wie Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge, Gehirn, Schilddrüse, Darm und Geschlechtsorgane entnommen. Diese wurden in einem Homogenisator homogenisiert. Die Luziferaseaktivität wurde nach Zugabe des Substratpuffers im Lumino-meter bestimmt.

2.14 Gerichtete Mutagenese der Promotorsequenz

Um die Bereiche im IL-12 p40 Promotors zu untersuchen, die an der Transkriptionsregulation maßgeblich beteiligt sind, wurden Mutationen in diese Abschnitte eingeführt. Hierbei wurde das *QuickchangeTM site-directed mutagenesis kit* von Stratagene verwendet.

Dazu wurde der p40/pXP1 Vektor und 2 Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation enthielten und komplementär zu den beiden gegensätzlichen Strängen des Vektors waren, verwendet. Es wurden dabei die mutierten Oligonukleotide eingesetzt, die bereits in Gelretardationsexperimenten auf Protein-DNA Komplexbildung untersucht worden sind (siehe Tabelle 2.10). Die an den Vektor hybridisierten Oligonukleotide dienten der Pfu DNA Polymerase als Startpunkt für die Synthese des komplementären DNA-Stranges in der PCR. Hierbei war die Zyklenzahl (12-18 Zyklen) von der Anzahl auszutauschender Basen (1 bis 3) und die Extensionszeit (2 min/kb) von der Länge des Vektors abhängig. Anschließend wurde das Produkt mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Dieses Enzym schneidet nur die parentale methylierte DNA mit der Zielsequenz 5'-G^{m6}ATC-3' aber nicht die neu synthetisierte, mutagenisierte Vektor-DNA. Es ist bekannt, daß DNA, die aus E. coli Stämmen wie XL1 blue, TOP10F', INV α F isoliert wird, *dam* methyliert ist und daher von DpnI verdaut wird. Die neu synthetisierte DNA wurde in kompetente Bakterien transformiert und durch Sequenzierung überprüft.

Reaktionsansatz:

50 ng p40/pXP1-Vektor (7 kb)
 125 ng Primer 1 (siehe mutierte Primer für Gelshift)
 125 ng Primer 2 (siehe mutierte Primer für Gelshift)
 5 µl 10x Reaktionspuffer
 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
 1 µl (2,5 U/µl) *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene)
 ad 50 µl Aqua dest., mit Öl überschichten

PCR-Programm

Denaturierung	95°C 30 s	
Denaturierung	95°C 30 s	
Annealing	x°C (=T _M) 60 s	16 Zyklen
Extension	68°C 2 min/kb (hier 14 min)	

2.15 Herstellung von IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgenen Mäusen

Die Mikroinjektion zur Herstellung der IL-12 p40 Promotor/Luziferase transgenen Mäuse wurde von Dr. Manfred Blessing (Uniklinik Mainz) durchgeführt.

2.15.1 Prinzip der Methode

Die Methode kann in mehreren Schritten unterteilt werden. Zunächst wird das zu injizierende DNA-Konstrukt hergestellt. Im nächsten Schritt werden Oozyten aus dem FVB/NHSD Mäusestamm entnommen. Dabei wird bei den weiblichen Spendermäusen eine Superovulation durch Serum trächtiger Stuten und menschlichem Choriongonadotropin (hCG) ausgelöst, so daß von einer 3-4 Wochen alten Maus 30-40 Eier gewonnen werden können. 48 Stunden nach der Gabe von hCG wird jedes Weibchen mit einem fruchtbaren Männchen verpaart. Weibliche FVB/NHSD Mäuse, die am nächsten Tag Vaginalpfropfen aufweisen, werden getötet und die Eier aus der Ampulla des geschwollenen Eileiters präpariert. Die befruchteten FVB/NHSD Eizellen werden vor

der ersten Teilung gesammelt. Das optimale Stadium für die Mikroinjektion ist das Stadium, wo der männliche und weibliche Vorkern (Pronukleus) sichtbar ist. Die fremde DNA wird in den größeren männlichen Vorkern mikroinjiziert. Dabei wird die Injektion mit Hilfe eines speziellen Mikroskops und 2 Mikromanipulatoren durchgeführt. Ein Mikromanipulator dient dazu, die Eier mit der Pipette zu fixieren, der andere dient zur Halterung der Injektionsnadel. Dann werden die Eier in den Eileiter einer schein-schwangeren Maus transplantiert. Dabei werden die schein-schwangeren Mäuse durch Verpaarung von 6-7 Wochen alten Weibchen mit sterilen Männchen gewonnen. Die geborenen Mäuse verbleiben bis zu 3 Wochen bei den Ziehmüttern. Anschließend werden diese am Ohr markiert und ein Stück vom Schwanz der Tiere wird abgeschnitten, um daraus DNA zu isolieren. Die transgenen Gründertiere werden zur Weiterkreuzung verwendet.

Für experimentelle Analysen wurden transgene Tiere verwendet, die für mindestens 2 Generationen mit FVB/NHSD Mäusen rückgekreuzt wurden.

2.15.2 Herstellung des Konstrukts

Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde dasselbe p40/pXP1 Luziferase-Konstrukt eingesetzt, dessen Klonierung in Abschnitt 2.5 dargestellt ist. Dieses Konstrukt enthält 815 bp des humanen IL-12 p40 Promotors (Position -748 bis +67 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle) 5' vom Luziferase-Reportergen. Die funktionelle Regulation dieses Konstrukts wurde vor der Herstellung des Transgens in vielen verschiedenen Zelllinien getestet. Um prokaryontische Sequenzen (2,3 kb) aus dem pXP1 Vektorrückgrat zu entfernen, wurden mit dem *QuickchangeTM site-directed mutagenesis kit* Restriktionsschnittstellen für das Enzym StuI in den pXP1 Vektor integriert. Nach dem Restriktionsverdau mit Stu I, wurde das linearisierte 4,2 kb Fragment aus dem Agarosegel aufgereinigt und in die befruchteten FVB/NHSD Mäuseeier mikroinjiziert.

2.15.3 Screening der transgenen Mäuse

Zum *Screening* der transgenen Mäuse wurde aus den Mäuseschwänzen zunächst DNA isoliert. Dazu wurde der *QIAamp tissue kit* der Firma Qiagen verwendet. Die DNA-

Isolierung wurde nach den genauen Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das Gewebe bei 56°C mit einem Proteinase K-haltigem Puffer zersetzt, die DNA gefällt und auf Nukleinsäure-bindenden Säulen aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten konnte die Nukleinsäuren mit Elutionspuffer aus den Säulen eluiert werden. Die DNA wurde anschließend photometrisch quantifiziert.

100 ng DNA wurden in einer PCR Reaktion (30 Zyklen) mit konstruktsspezifischen Primern eingesetzt. Der 5'-Primer (5'-GGCATAACAGTTGTTCCATCCCGACATG-3') lag dabei im Promotorbereich, der 3'-Primer (5'-TTGTCACGATCAAAGGACTCTGG-3') im Luziferasegen. Als Positivkontrolle wurden in einem Ansatz 50 ng p40/ pXP1-Vektor als Matrize eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen dabei den Ausführungen in Abschnitt 2.4.8. In transgenen Tieren war eine spezifisches Amplifikat von 1049 bp nachweisbar.

2.16 Immunhistochemische Nachweise

2.16.1 Herstellung von Zytopräparaten und Gewebeschnitten

Zur Herstellung von Zytopräparaten wurden 10^5 Zellen in einem Volumen von 100 μ l PBS mit einer Zytocentrifuge (Shandon) auf Objektträger zentrifugiert (400 upm, 4 min). Die Präparate wurden ca 30 min bei RT getrocknet und anschließend luftdicht bei -80°C eingefroren.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurde Organteile in verschiedener Schnittebene in einem Kryostat (Zeiss) geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnittdicke betrug ca. 5 μ m. Die Gewebepräparate wurden bei RT getrocknet und schließlich luftdicht bei -80°C eingefroren.

2.16.2 Immunfluoreszenzfärbung

Präparate wurden aufgetaut, für 30 min bei RT getrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Zur Fixierung wurden diese dann 5 min in frisch angesetztem 4 %igem

Paraformaldehyd (frisch angesetzt) gebadet und anschließend in TBST-Puffer (50 mM Tris-HCL pH 7.6, 300 mM NaCl, 0.1% Tween20) gewaschen. Je ca. 100 µl des verdünnten (TBST/ 2% BSA) Primärantikörpers wurde auf die Präparate pipettiert und für 1 Std. bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit TBST-Puffer gewaschen. Je ca. 100 µl des verdünnten (TBST) Sekundärantikörpers wurden auf die Präparate gegeben und für 1 Std. bei RT inkubiert. Es wurde erneut mit TBST-Puffer gewaschen und die Präparate anschließend 30 min (RT) bei Dunkelheit mit je ca. 100 µl verdünnter (TBST) Chromophorlösung inkubiert. Im Falle von Doppelfärbungen wurde erneut mit TBST-Puffer gewaschen und die beschriebenen Inkubationen mit einer weiteren Kombination von Primär-, Sekundärantikörper und Chromophor durchgeführt. Schließlich wurden die Präparate eingedeckelt (Vectashield Mounting Medium, Vector) und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus) analysiert.

Anfärbung von	Reagenz	TYP	eingesetzte Verdünnung
Mac-1	Primärantikörper	Ratte anti-Maus Mac-1 (Pharmingen)	1 : 1000
	Sekundärantikörper	Maus anti-Ratte IgG biotinyliert (Dianova)	1 : 500
	Chromophor	Cy2 Streptavidin-gekoppelt (Dianova)	1 : 1000

Tabelle 2.13 Bei der Immunfluoreszenzfärbung eingesetzte Reagenzien

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Systems zur Analyse des IL-12 p40 Promotors

Die Untersuchung des IL-12 p40 Promotors erforderte eine Reihe von Voruntersuchungen zur Etablierung der experimentellen Systeme. Entscheidend war vor allem die Überprüfung der Expression von IL-12 p40 in primären Monozyten sowie die Entwicklung eines Reportersystems zur Untersuchung funktioneller Mechanismen.

3.1.1 Isolierung von CD14⁺ Monozyten aus humanem Blut

Die molekularbiologische Untersuchung des IL-12 p40 Promotors in primären Monozyten erforderte die Isolierung hochgereinigter CD14⁺ Zellen aus peripherem menschlichen Blut. Diese Aufreinigung wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durch die Verwendung CD14-spezifischer immunmagnetischer „Beads“ erreicht. Die Reinheit der so gewonnenen primären Monozyten betrug reproduzierbar zwischen 95 und 99 % und wurde durch FACS-Analyse mit FITC-markierten CD14-spezifischen Antikörpern gegenüber einer Isotypkontrolle überprüft (Abbildung 3.1).

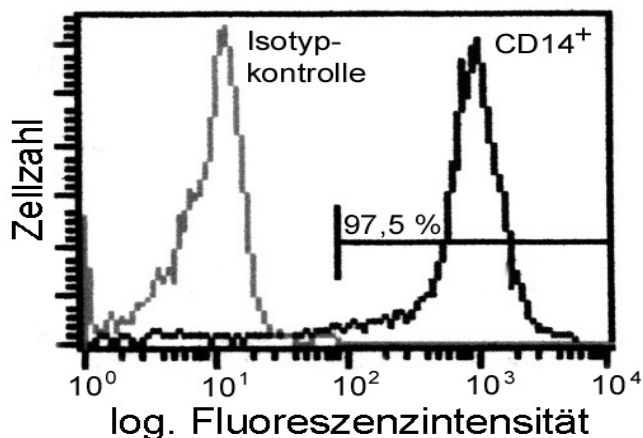


Abbildung 3.1 Representative FACS-Analyse zur Bestimmung des Reinheitsgrades der aus peripherem Blut isolierten Monozyten. Frisch isolierte CD14⁺ Monozyten wurden mit einem FITC-markierten α CD14 Antikörper angefärbt und anschließend im FACS untersucht. Als Isotypkontrolle wurden parallel Zellen mit einem FITC-markierten Maus IgG Antikörper inkubiert und ebenfalls im FACS untersucht. Das Ergebnis ist als Histogramm dargestellt.

3.1.2 Untersuchung der Interleukin-12 Proteinsekretion in CD14⁺ humanen Monozyten

Um zu überprüfen, ob sich die mittels immunmagnetischer „Beads“ aufgereinigten Monozyten zur molekularbiologischen Analyse des IL-12 p40 Promotors eignen, wurden ELISA Experimente für IL-12 p40 und p70 durchgeführt. Die kritischen Parameter waren zum einen eine möglichst geringe IL-12 Proteinsekretion ruhender Monozyten und zum anderen eine starke Induzierbarkeit der IL-12 Sekretion nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen. Wie in Abbildung 3.2 gezeigt, führte die Stimulation primärer Monozyten mit LPS (Lipopolysaccharid), LPS/ IFN- γ (Interferon- γ), sowie SAC (Staphylococcus Aureus Zellen) und SAC/ IFN- γ zu einem starken Anstieg der IL-12 p40 (3-4 ng/ ml Medium) und p70 (4-5 ng/ ml Medium) Proteinsekretion. Dagegen produzierten unstimulierte oder nur IFN- γ -stimulierte Zellen kaum nachweisbar IL-12. Zudem reagierten die Monozyten auf Interleukin-10, einen Inhibitor der Expression proinflammatorischer Zytokine, mit einer erwartungsgemäß deutlich supprimierten IL-12 Produktion.

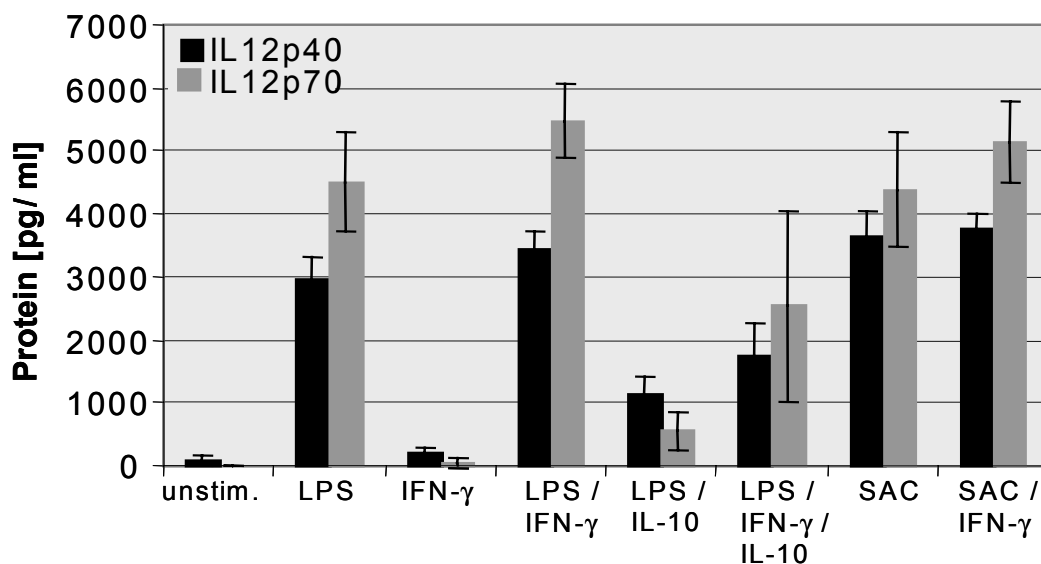


Abbildung 3.2 ELISA-Untersuchungen von Zellüberständen unstimulierter und stimulierter primärer Monozyten.

Jeweils 1 Mio. CD14⁺ Monozyten wurden für 48 Stunden wie angegeben stimuliert (1 μ g/ml LPS, 100 U/ml Interferon- γ , 0,01 % Staphylococcus Aureus Suspension (Calbiochem), 5 ng/ml Interleukin-10). Mittels spezifischem ELISA wurde anschließend die Menge von IL-12 p40 und p70 in den Kulturüberständen bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Die Aktivierung der IL-12 p40 mRNA Expression in CD14⁺ Monozyten

Zur Überprüfung, ob die Induktion der IL-12 p40 Proteinsekretion nach Stimulation CD14-positiver Monozyten mit LPS und SAC zumindest teilweise auf eine vermehrte mRNA Synthese zurückzuführen ist, wurden semiquantitative mRNA-Analysen mittels RT-PCR durchgeführt. Die Expression der mRNA des Haushaltsgens β -Aktin wurde dabei als interner Standard zur Kontrolle der Vergleichbarkeit der Versuchsansätze mitgeführt. Die Abbildung 3.3 zeigt in Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Proteindaten eine starke Induzierbarkeit des IL-12 p40 mRNA Signals nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS (Abb.3.3 A). Die zusätzliche Stimulation mit IFN- γ bewirkte eine maximale p40 mRNA Signalstärke. Die Anwesenheit von Interleukin-10 im Kulturmedium führte entsprechend den ELISA-Ergebnissen zu einer starken Abschwächung des Signals im Vergleich zu den Ansätzen ohne IL-10. Eine Zeitkinetik zeigte, daß das IL-12 p40 mRNA Signal nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS/ IFN- γ bereits nach einer Stunde detektierbar war und nach 8 bis 12 Stunden Stimulationsdauer ein Maximum erreichte (Abb.3.3 B).

Das Auftreten von mRNA ist die Folge der transkriptionellen Aktivierung eines entsprechenden Gens. Diese Aktivierung setzt bei manchen Promotoren die Neusynthese essentieller Transkriptionsfaktoren voraus. Die Nachweisbarkeit des mRNA Signals bereits nach einer Stunde Stimulation legt den Schluß nahe, daß die Initiation der IL-12 p40 Transkription möglicherweise unabhängig von *de novo* Proteinsynthese stattfinden kann. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde die p40 mRNA in Zellen untersucht, die mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteintranslation, vorbehandelt waren (Abb.3.3 C). Es konnte gezeigt werden, daß die p40 Signalstärke in Cycloheximid-behandelten Zellen in vergleichbarem Maße nach Stimulation mit LPS/ IFN- γ zunahm wie in Zellen, die nur mit DMSO (Lösungsmittel) versetzt wurden. Demzufolge kann in primären Monozyten die Transkription des IL-12 p40 Gens auch ohne Neusynthese von Transkriptionsfaktoren oder anderen Proteinen geschehen. Zusammengenommen zeigen diese Expressionsdaten die Eignung der in der vorliegenden Arbeit isolierten primären Monozyten für weiterführende Untersuchungen der IL-12 p40 Genexpression.

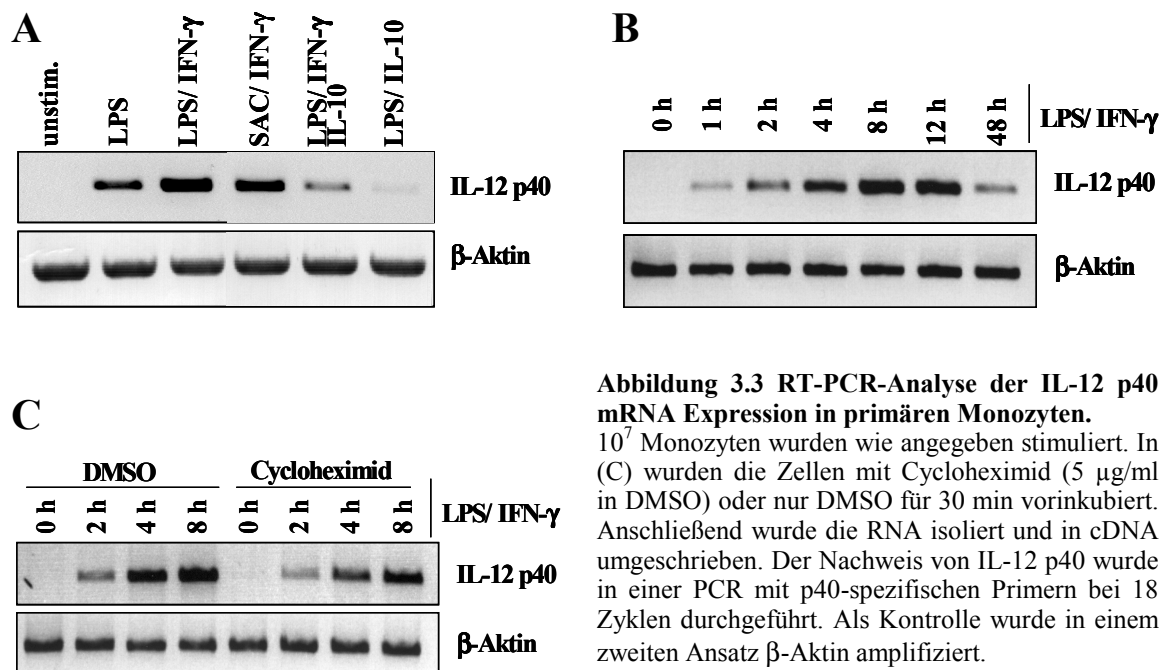


Abbildung 3.3 RT-PCR-Analyse der IL-12 p40 mRNA Expression in primären Monozyten.

10^7 Monozyten wurden wie angegeben stimuliert. In (C) wurden die Zellen mit Cycloheximid (5 μ g/ml in DMSO) oder nur DMSO für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von IL-12 p40 wurde in einer PCR mit p40-spezifischen Primern bei 18 Zyklen durchgeführt. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Ansatz β -Aktin amplifiziert.

3.1.4 Untersuchung der IL-12 p40 Promotoraktivität in humanen und murinen Zelllinien

Um den Interleukin-12 p40 Promotor funktionell zu untersuchen, waren Reporter-genanalysen notwendig. Dazu wurde der humane IL-12 p40 Promotor als 815 bp Fragment in einen Luziferase-Reportergenvektor (pXP1) kloniert und das daraus resultierende Konstrukt p40/pXP1 mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Zur Überprüfung des Konstruktes wurden eine Reihe von Zelllinien verschiedenen Ursprungs transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden entweder unstimuliert belassen oder wurden mit LPS/ IFN- γ oder PMA/ Ionomycin stimuliert. Es zeigte sich dabei, daß die Luziferaseexpression des p40/pXP1 Vektors in Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien um ein Vielfaches höher war als die des „leeren“ pXP1 Vektors (Abbildung 3.4). In diesen Zellen (mit Ausnahme der murinen J774-Zelllinie) konnte durch Stimulation mit PMA/ Ionomycin oder LPS/ IFN- γ zusätzlich eine starke Induktion der Luziferaseaktivität erreicht werden. Insbesondere in der RAW264.7 Makrophagen-Zelllinie erwies sich die Luziferaseaktivität als stark induzierbar. Durch die Stimulation mit LPS/ IFN- γ konnte in diesen Zellen die Aktivität

des Reportergens auf das 140-fache der Aktivität des „leeren“ Konstrukts gesteigert werden. Dagegen war das Konstrukt in B-Zelllinien (Daudi, J558) und T-Zelllinien (Jurkat und BW5147) sowie in sonstigen nicht-lymphoiden Zelllinien (K562 und cos-7) kaum aktiv und konnte auch durch Stimulation nicht signifikant induziert werden. Eine wichtige Ausnahme stellt die humane Epstein-Barr Virus (EBV) transformierte B-Zelllinie Raji da. Hier war die IL-12 p40 Promotoraktivität nach Stimulation mit PMA/ Ionomycin um den Faktor 40 induzierbar. Dieses Resultat entspricht Studien anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, daß B-Zelllinien und primäre B-Lymphozyten nach Transformation mit EBV große Mengen Interleukin-12 synthetisieren (Kobayashi et al., 1989, Benjamin et al., 1996, Yoshimoto et al., 1998). Die Daten implizieren, daß das verwendete 815 bp Fragment des IL-12 p40 Promotors entsprechend dem endogenen Promotor die gewebe-spezifische und induzierbare Expression des Reportergens steuert.

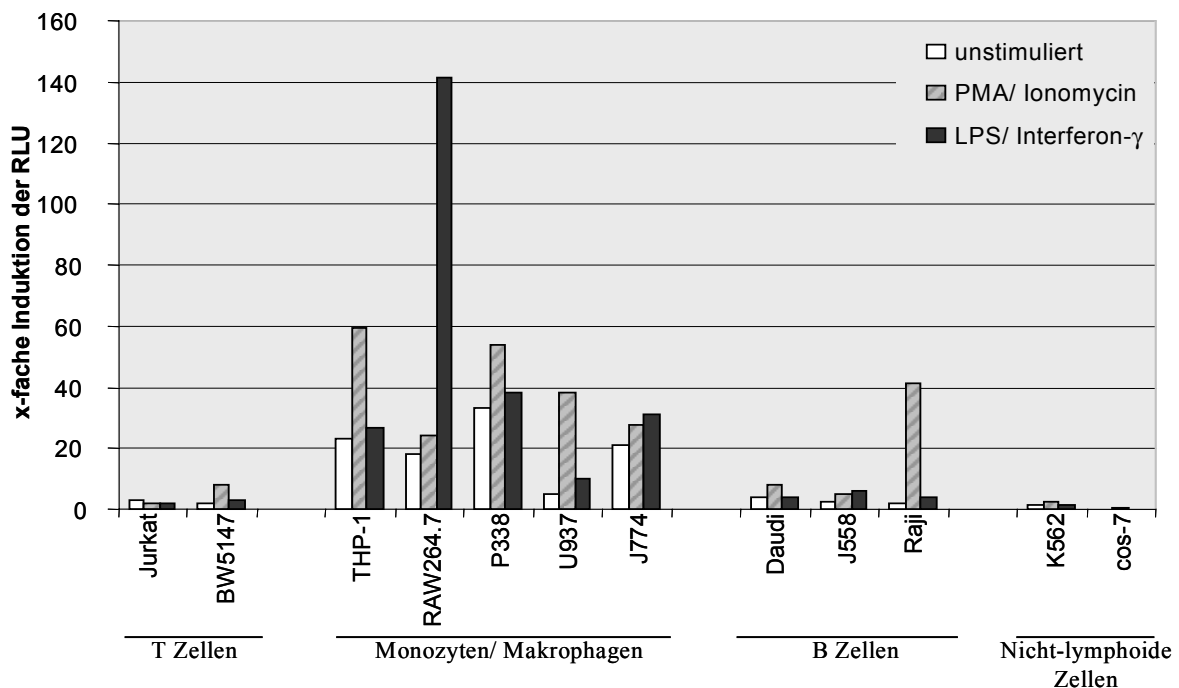


Abbildung 3.4 Transiente Transfektion des p40/pXP1 Reportergenkonstruktes in verschiedene Zelllinien.

Jeweils 8 μg des p40/pXP1 Reportergenvektors wurden zusammen mit 2 μg eines β -Galaktosidase Kontrollvektors mittels DEAE-Dextran transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen für weitere 12 Stunden mit PMA/ Ionomycin (50 ng/ml PMA, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ionomycin) oder LPS/ Interferon- γ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS, 1000 U/ml IFN- γ) stimuliert. Die Luziferaseexpression wurde schließlich im Luminometer als RLU („Relative Light Units“) gemessen. Die Messwerte wurden im Vergleich zur Expression von β -Galaktosidase normalisiert und als x-fache Induktion im Vergleich zur Luziferaseexpression des „leeren“ pXP1-Reportergenvektor aufgetragen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Untersuchung der induzierbaren IL-12 p40 Promotoraktivität in RAW264.7 Makrophagen

Primäre Monozyten und Makrophagen gelten als nahezu untransfizierbar. Zur Analyse funktioneller Fragestellungen ist demzufolge die Verwendung einer Zelllinie unvermeidbar. Unter den untersuchten Zelllinien war lediglich die murine Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 durch LPS/ IFN- γ signifikant stimulierbar. Eine weiterführende Untersuchung der IL-12 p40 Promotoraktivität in dieser Makrophagen-Zelllinie zeigte eine starke synergistische Aktivierung der Luziferaseexpression nach Stimulation der Zellen mit LPS/ IFN- γ (ca. 10-fach) sowie SAC/ IFN- γ (ca. 7-fach). Die Stimulation mit LPS, SAC oder IFN- γ alleine dagegen führte lediglich zu einer marginalen Induktion der Promotoraktivität (siehe Abb. 3.5 A). Die stimulierende Wirkung von IFN- γ auf die Aktivierung des IL-12 p40 Promotors war stark konzentrationsabhängig. Ein maximaler Effekt konnte bei Verwendung von 100 bis 1000 U (*Units*) IFN- γ / ml Medium erreicht werden (siehe Abbildung 3.5 B). Für weiterführende Reporterexperimente in RAW264.7 Makrophagen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Konzentration von 100 U/ ml IFN- γ verwendet.

Die Abbildung 3.5 (C) zeigt eine Zeitkinetik der LPS/ IFN- γ -stimulierten Luziferaseexpression in RAW264.7 Makrophagen. Die Daten zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Luziferaseaktivität mit einem Maximum nach 8 bis 10 Stunden Stimulationsdauer. In weiterführenden Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend diesen Ergebnissen eine Stimulationsdauer von 9 Stunden gewählt. Um zu überprüfen, ob die beschriebene IL-12 p40 Promotoraktivierung mit einer Induktion der endogenen IL-12 p40 mRNA Synthese in RAW264.7 Makrophagen einhergeht, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt mit RNA von unstimulierten und stimulierten Zellen. Es zeigte sich wie zuvor bei der Analyse primärer CD14⁺ Monozyten und entsprechend den Reporterexperimenten eine synergistische Verstärkung des IL-12 p40 mRNA Signals nach simultaner Stimulation mit LPS/ IFN- γ (Abbildung 3.5 D). Die Makrophagenzelllinie RAW264.7 wird von vielen Arbeitsgruppen als „Modell-Zelllinie“ zur Untersuchung von LPS- und IFN- γ -abhängigen Signalwegen eingesetzt (Ma et al., 1996, Deng et al., 1996, Baldassare et al., 1999). Entsprechend implizieren die hier gezeigten Daten die LPS/ IFN- γ -abhängige Induktion der IL-12 p40 Promotoraktivität und mRNA Synthese in RAW-Makrophagen. Die Zelllinie wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit als geeignet erachtet, funktionelle Elemente im IL-12 p40 Promotor zu untersuchen.

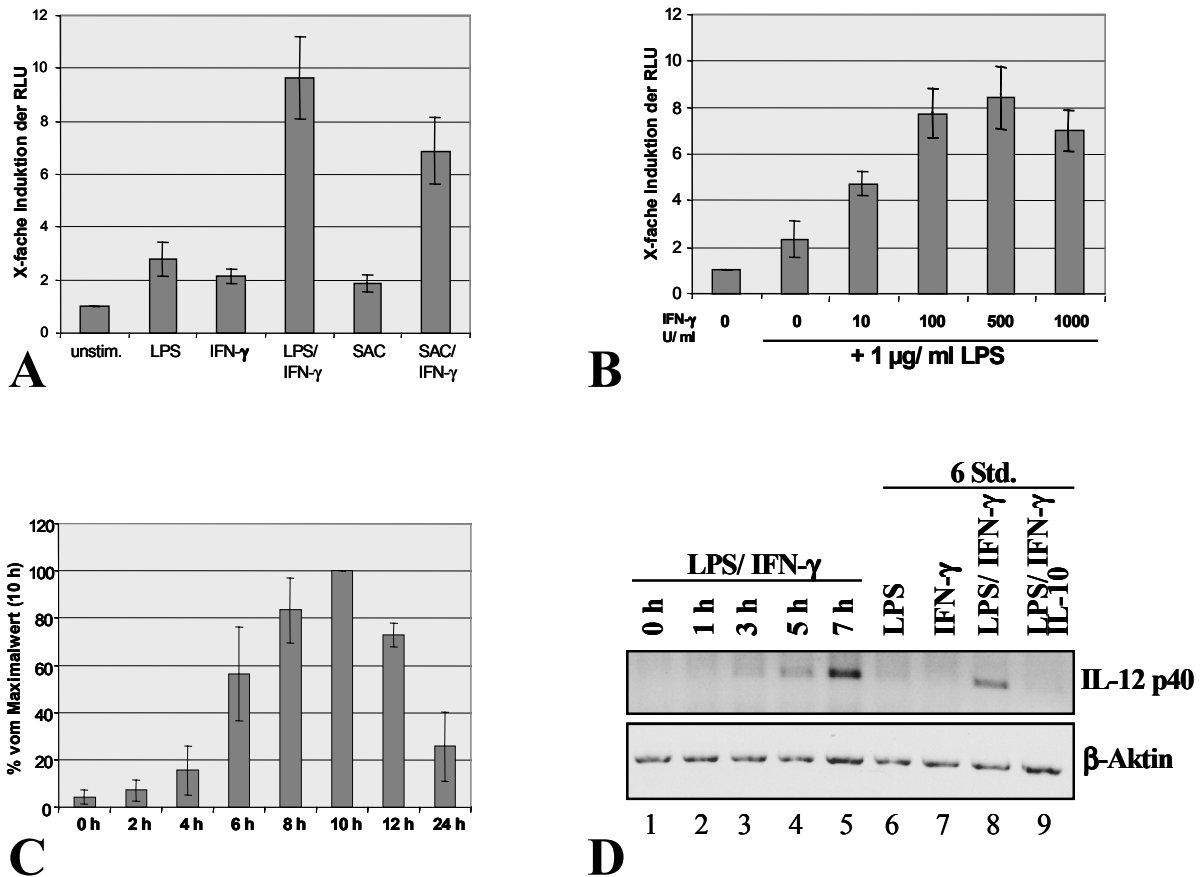


Abbildung 3.5 Untersuchung der induzierbaren IL-12 p40 Promotoraktivität in RAW264.7 Makrophagen. (A-C) Jeweils 8 μ g des p40/pXP1 Reportergenvektors wurden mittels DEAE-Dextran in RAW264.7 Makrophagen transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen für weitere 10 Stunden mit LPS (1 μ g/ml), Interferon- γ (100 U/ml), Staphylococcus Aureus (0,001%) oder wie angegeben (B) stimuliert. In C wurden die Zellen mit LPS+IFN- γ stimuliert. Die Luciferaseexpression wurde schließlich im Luminometer gemessen. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. (D) RT-PCR-Analyse der IL-12 p40 mRNA Expression in RAW264.7 Makrophagen. Jeweils 10^7 RAW264.7 Zellen wurden wie angegeben stimuliert. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von IL-12 p40 wurde in einer PCR mit p40-spezifischen Primern bei 25 Zyklen durchgeführt. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Ansatz aus der selben cDNA β -Aktin amplifiziert.

3.2 Analyse des humanen IL-12 p40 Promotors in primären CD14⁺ Monozyten

3.2.1 *In vivo* „Footprinting“ des humanen IL-12 p40 Promotors in primären Monozyten

Die Vorversuche der vorliegenden Arbeit hatten gezeigt, daß in primären CD14⁺ Monozyten nach Stimulation mit LPS und Interferon- γ die Expression des Interleukin-12 p40 Gens angeschaltet wird. Zur Überprüfung, ob die transkriptionelle Aktivierung des humanen IL-12 p40 Gens *in vivo* mit Veränderungen im Promotorbereich des Gens einhergeht, wurden *in vivo* „Footprinting“ Experimente in primären Monozyten durchgeführt. Die Methode ermöglicht es in lebenden Zellen, die Kontaktstellen zwischen Proteinen und DNA genau zu identifizieren und trägt somit im Gegensatz zu vergleichbaren *in vitro* Methoden auch den komplexen Vorgängen im Nukleus der Zelle Rechnung.

Zur Durchführung der Methode wurden unstimulierte und stimulierte CD14⁺ Monozyten mit Dimethylsulfat behandelt und anschließend die DNA isoliert. Entsprechend den Ausführungen in Material und Methoden wurde dann eine LM-PCR-Reaktion (*ligation-mediated PCR*) durchgeführt, um geschützte und hyperreaktive Bereiche im IL-12 p40 Promotor zu identifizieren. Als Kontrolle wurde die LM-PCR Reaktion einer *in vitro* (nach DNA-Extraktion) methylierten DNA aufgetragen. Um protektierte und hyperreaktive Nukleotide der genomischen Sequenz zuordnen zu können, wurde das Bandenmuster der LM-PCR-Amplifikate mit dem einer Sequenzierung des IL-12 p40 Promotor verglichen. Wie in Abbildung 3.6 A gezeigt, konnten nach Stimulation der Monozyten mit LPS/ IFN- γ veränderte DMS-Reaktivitäten im Bereich des IL-12 p40 Promotors nachgewiesen werden. Die Stimulation mit LPS alleine ergab jedoch kein signifikant verändertes Bandenmuster. Die Abbildung 3.6 B zeigt die Sequenz des humanen IL-12 p40 Promotors mit einer Übersicht lokalisierter Protektionen und Hyperreaktivitäten. Es zeigte sich, daß die nach Stimulation veränderten DMS-Reaktivitäten im Bereich der bereits beschriebenen NF- κ B-, C/EBP- und ETS-Erkennungsmotive auftraten. Im Gegensatz dazu konnten in unstimulierten, nicht jedoch in stimulierten Monozyten Protektionen mehrerer benachbarter Guanosinreste im Bereich -184 bis -143 oberhalb der Transkriptionsstartstelle identifiziert

werden. Eine Analyse der entsprechenden Promotorsequenz zeigte, daß die stärkste Protektion (-159) im Bereich einer GATA-Erkennungssequenz lokalisiert ist. Dieses Promotorelement wurde GA-12 genannt.

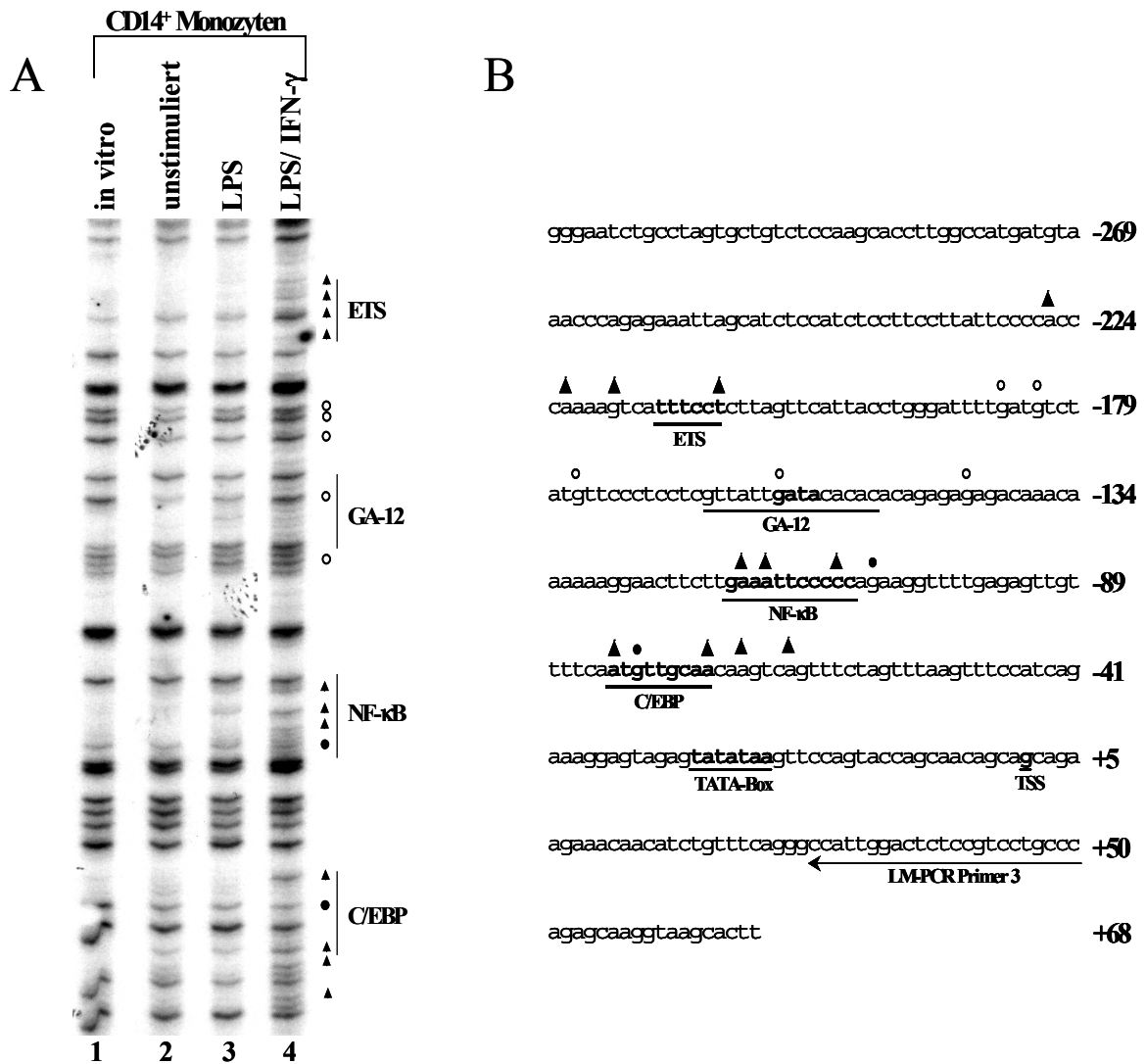


Abbildung 3.6 *In vivo* „Footprinting“ des humanen IL-12 p40 Promotors in primären CD14⁺ Monozyten.

(A) Frisch isolierte CD14⁺ Monozyten wurden für 4 Stunden wie angegeben mit LPS (1 μ g/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimuliert. *In vivo* Footprinting wurde entsprechend den Angaben in Material und Methoden durchgeführt. Veränderte DMS-Reaktivitäten wurden anhand einer parallel durchgeführten Sequenzierung des p40/pXP1-Plasmids der Promotorsequenz zugeordnet. Die Position in unstimulierten Monozyten protektierter (offener Kreis) sowie nach Stimulation protektierter (schwarzer Kreis) und hyperreaktiver (Dreieck) Nukleotide ist gezeigt. (B) Übersicht protektierter und hyperreaktiver Nukleotide im Bereich des IL-12 p40 Promotors relativ zur Transkriptionsstartstelle (TSS) des Gens.

3.2.2 Funktionelle Analyse der *in vivo* methylierungsgeschützten Sequenzmotive

In LPS/ IFN- γ stimulierten CD14⁺ Monozyten konnten Protektionen und Hyperreaktivitäten im Bereich von Erkennungssequenzen für NF- κ B-, C/EBP- und ETS-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Um die funktionelle Bedeutung dieser Elemente zu analysieren, wurden durch gerichtete Mutagenese des Reportergenvektor p40/pXP1 jeweils zwei Nukleotide in den Erkennungssequenzen ausgetauscht und die Aktivität des mutanten mit der des Wildtyp Promotors verglichen. Die Abbildung 3.7 zeigt, daß die stimulierte Aktivität des IL-12 p40 Promotors in RAW264.7 Makrophagen nach Mutation von 2 Nukleotiden im Bereich des C/EBP-Elementes (p40mC) auf ca. 25 %, im Bereich des NF- κ B-Elementes (p40mN) auf ca. 50 % und im Bereich des ETS-Elementes (p40mE) auf ca. 30 % der Aktivität des Wildtyp-Promotors zurückging.

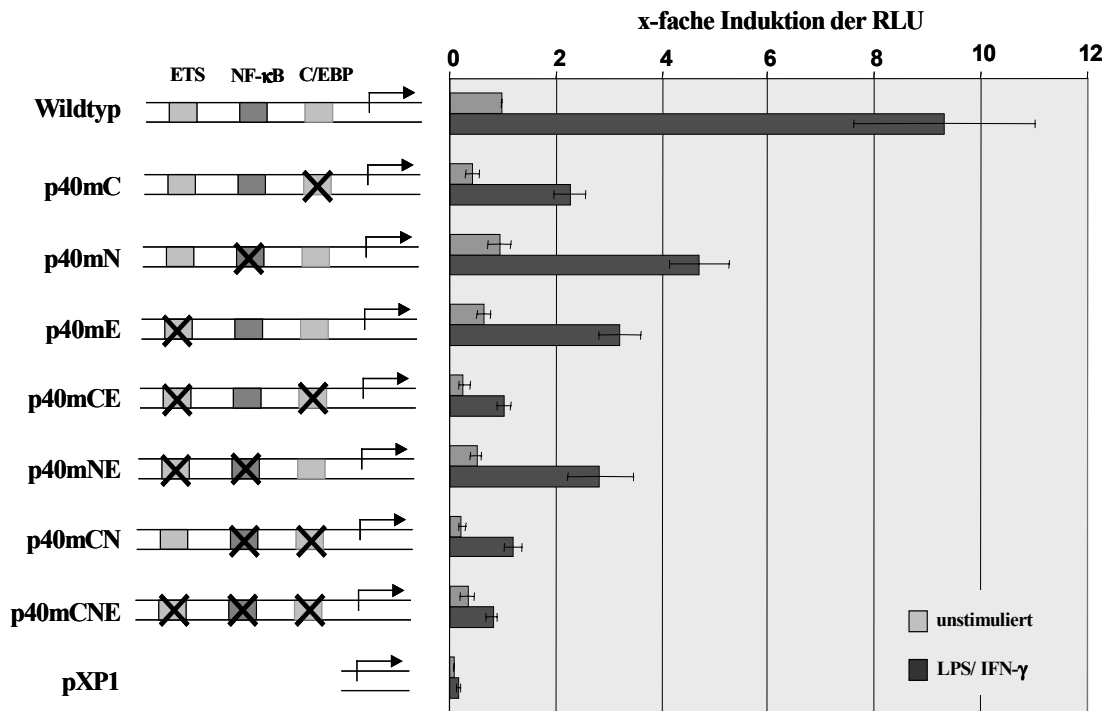


Abbildung 3.7 Funktionelle Relevanz der *in vivo* protektierten Promotorelemente. Durch gerichtete Mutagenese wurden in den Erkennungssequenzen des C/EBP-, NF- κ B und ETS-Motivs im p40/pXP1 Reportergenvektor je 2 Nukleotide ausgetauscht. Jeweils 8 μ g des mutanten oder des Wildtyp Konstrukts wurden dann mit je 2 μ g des β -Gal Kontrollvektors DEAE-vermittelt in RAW264.7 Makrophagen transfiziert. Nach 18 Stunden wurde ein Teil der Ansätze mit LPS (1 μ g/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimuliert. Nach 10 Stunden Stimulationsdauer wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität in einem Luminometer gemessen. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten nach Abgleich der Transfektionseffizienz.

Zur weiteren Analyse wurden Doppelmutationen in jeweils zwei der untersuchten Elemente eingeführt. Die Verwendung der C/EBP/ NF- κ B- (p40mCN) sowie der C/EBP/ ETS (p40mCE) Doppelmutanten, nicht jedoch der NF- κ B/ ETS (p40mNE) Doppelmutante, führte dabei gegenüber den Einzelmутanten zu einer weiter verringerten Promotoraktivität (Abbildung 3.7). Ein Konstrukt mit Mutationen in allen drei Elementen war durch LPS/ IFN- γ nicht mehr signifikant stimulierbar. Die Daten sprechen demzufolge für eine wichtige Funktion dieser Elemente für die LPS/ IFN- γ -abhängige Aktivierung des IL-12 p40 Promotors.

3.2.3 Ein p50/RelA Heterodimer bindet LPS-induziert an das NF- κ B-Motiv des p40 Promotors in primären Monozyten.

Die Mutation des in stimulierten CD14⁺ Monozyten protektierten NF- κ B-Motivs führte in Reporteranalysen zu einer stark eingeschränkten Aktivierbarkeit des IL-12 p40 Promotors und zeigt so die Relevanz dieses Elements für die Funktion des Promotors. Um zu klären, welche Transkriptionsfaktoren in stimulierten Monozyten spezifisch an dieses Motiv binden, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden nukleäre Proteine von unstimulierten und stimulierten Monozyten isoliert und mit einer radioaktiv markierten p40 Promotor NF- κ B-Sonde (p40NF- κ B) inkubiert. Die Abbildung 3.8 A zeigt die Induktion eines Komplexes nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS oder LPS/ IFN- γ . Die Stimulation mit IFN- γ alleine ergab gegenüber unstimulierten Monozyten keine Verstärkung eines Komplexes. IFN- γ führte auch zu keiner Verstärkung des Komplexes gegenüber nur mit LPS stimulierten Monozyten. Wie humane Monozyten, so zeigten isolierte Makrophagen aus dem Peritoneum einer Maus nach Stimulation mit LPS/ IFN- γ ebenso die Induzierbarkeit eines Komplexes am NF- κ B-Motiv.

Ein direkter Nachweis der Bindung von NF- κ B Homo- und Heterodimeren an das NF- κ B-Motiv des IL-12 p40 Promotors ist in Abbildung 3.8 B gezeigt. COS-7 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für NF- κ B Proteine oder GATA-1 (Kontrolle) transfiziert und die Extrakte der Zellen im Gelretardationsexperiment eingesetzt. Eine deutliche Intensivierung der Signale gegenüber der Kontrolle war in p50/ p65, p50/ c-Rel, aber auch in nur p50 überexprimierenden Zellen zu beobachten.

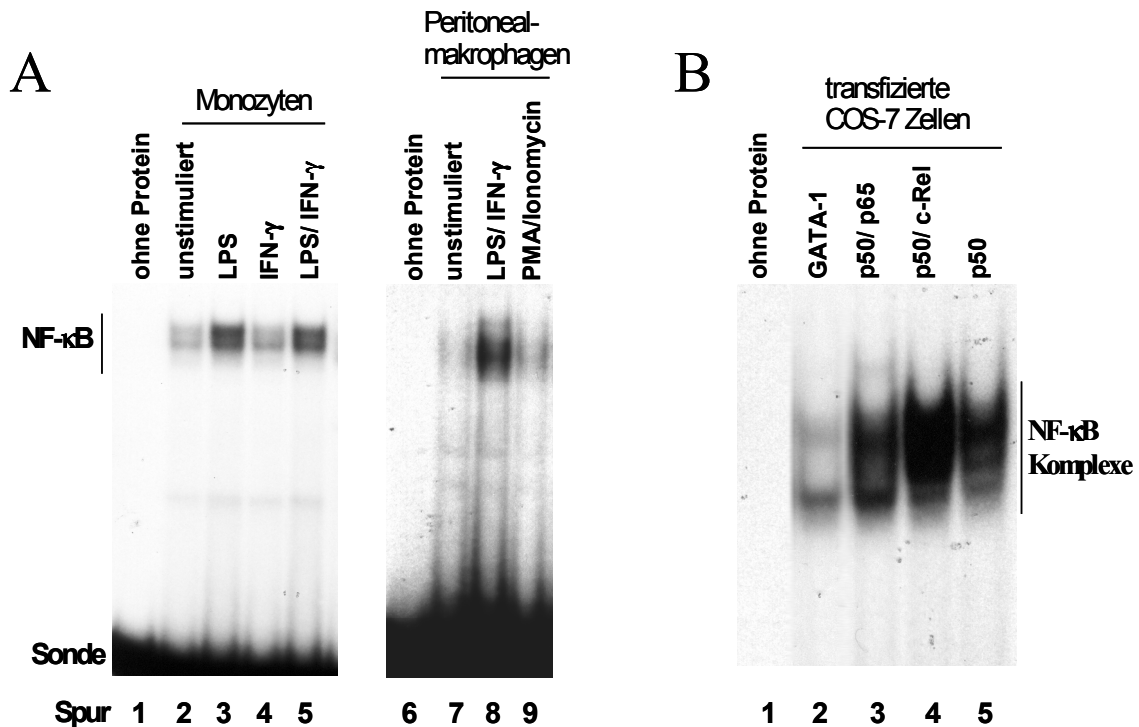


Abbildung 3.8 In primären Monozyten bindet ein LPS-induzierbarer Komplex an das NF- κ B-Motiv. (A) Gelretardationsexperiment mit jeweils 5 μ g nukleärem Protein unstimulierter und stimulierter (4 Std.) primärer Monozyten (Spur 1-5) oder Peritonealmakrophagen (Spur 6-9) und einer radioaktiv markierten p40NF- κ B-Sonde. (B) Gelretardationsexperiment mit Gesamtzellextrakt Expressionsplasmid-transfizierter cos-7 Zellen und der p40NF- κ B-Sonde. Jeweils 10 μ g/Ansatz Expressionsvektoren für die angegebenen Transkriptionsfaktoren wurden mittels Kalziumphosphat in cos-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 12 Stunden später mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) stimuliert und nach weiteren 10 Std. lysiert. 10 μ g Proteinoxtrakt je Ansatz wurden eingesetzt.

Zur weiteren Charakterisierung des LPS-induzierten Komplexes wurden Supershift- und Konkurrenzexperimente durchgeführt (Abbildung 3.9). Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung des Komplexes bei Zugabe eines Überschusses nicht radioaktiv-markierter p40NF- κ B-Sonde (Autokonkpetition), oder zwei bona fide NF- κ B Sonden (NF- κ B1, NF- κ B2) aufgehoben werden konnte, während bei der Konkurrenz mit einer Kontrollsonde (GATA) oder einer mutierten p40 NF- κ B Sonde (p40NF- κ Bm1) kein Effekt auftrat. Durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern gegen die NF- κ B Familienmitglieder p50 sowie p65 zum Reaktionsansatz konnte eine weitere Retardierung des Komplexes erreicht werden („Supershift“), wodurch die Anwesenheit dieser Proteine im Komplex gezeigt wurde. Kein Supershift trat dagegen bei Verwendung eines Kontrollantikörpers (OCT-1)

oder eines Antikörpers gegen das NF- κ B Protein c-Rel (nicht gezeigt) auf. Die Daten zeigen demzufolge, daß nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS ein Komplex aus p50 und p65 an das NF- κ B-Motiv des IL-12 p40 Promotors binden kann.

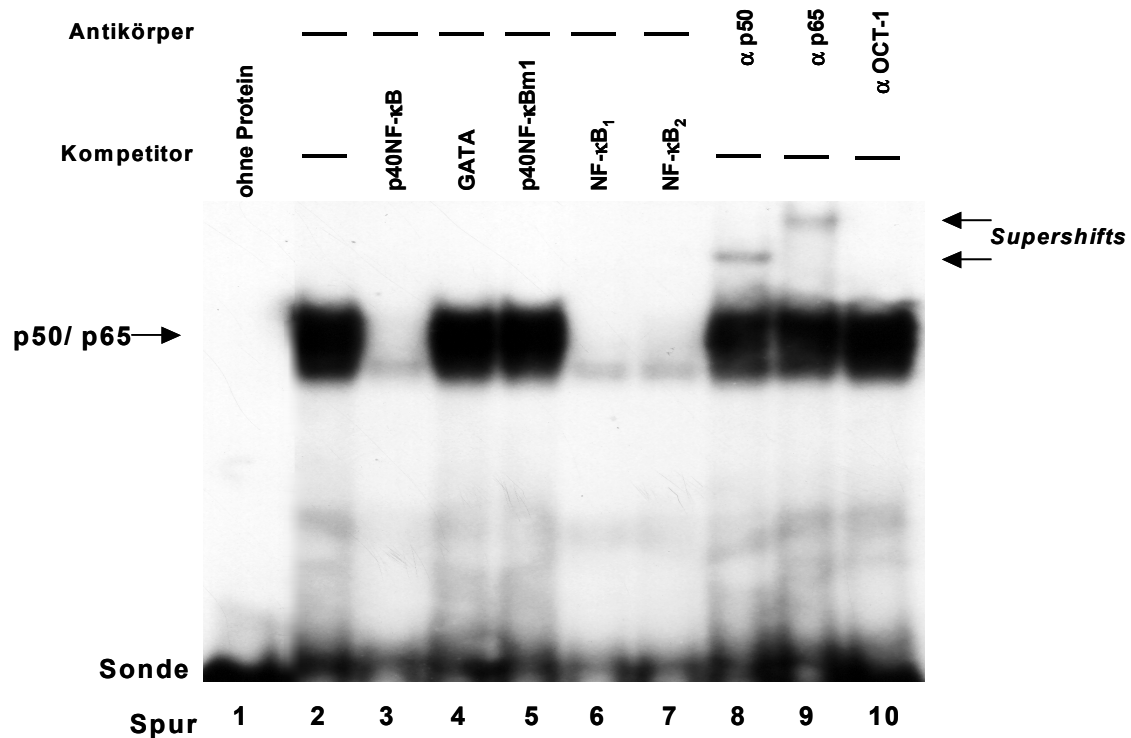


Abbildung 3.9 Ein Komplex aus p50/ p65 bindet an das NF- κ B-Motiv in stimulierten Monozyten. Gelretardationsexperiment mit je 5 μ g nukleärem Extrakt LPS/ IFN- γ stimulierter primärer Monozyten und der p40NF- κ B-Sonde. Für Kompetitionen wurden dem Ansatz zusätzlich 50 ng eines nicht radioaktiv markierten Oligonukleotids hinzugefügt (Spur 3-7). Für Supershift-Ansätze wurde das nukleäre Extrakt für 30 min mit dem angegebenen Antikörper vorinkubiert.

Um zu überprüfen, ob der IL-12 p40 Promotor durch Überexpression von NF- κ B-Proteinen in RAW264.7 Makrophagen transaktiviert werden kann, wurden transiente Reporteranalysen durchgeführt. Dazu wurden RAW264.7 Makrophagen mit dem Wildtyp p40/pXP1 Reportergenkonstrukt und Expressionsvektoren für die NF- κ B-Proteine p50, p65 und c-Rel kotransfiziert. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt, führte die Überexpression von p50 und p65 zu einer dosisabhängigen Steigerung der stimulierten Promotoraktivität (3,5-fach gegenüber der Kontrolle), nicht jedoch der unstimulierten Promotoraktivität. Die Überexpression von p50 und c-Rel führte dagegen lediglich zu

einer moderaten Steigerung der Promotoraktivität (2-fach). Die Kotransfektion mit Expressionsvektoren für p50, p65 und c-Rel alleine führte zu keiner Induktion der Promotoraktivität (nicht gezeigt). Die Daten sprechen somit für eine Transaktivierung des Promotors nach Bindung von NF- κ B p50/ p65 an die Erkennungssequenz.

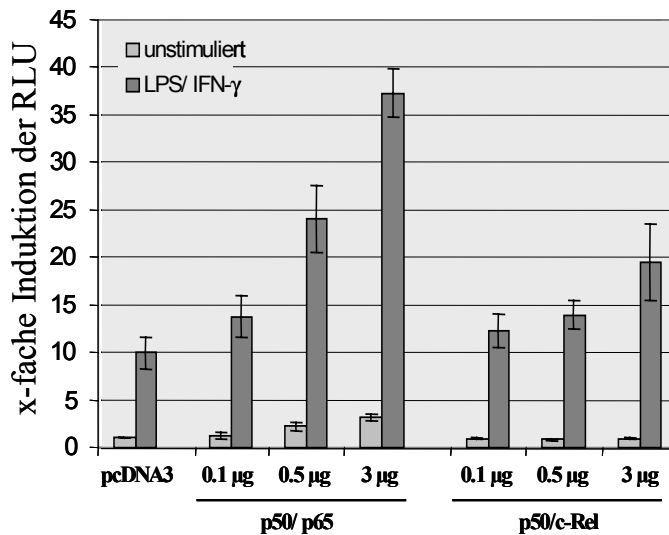


Abbildung 3.10 Der IL-12 p40 Promotor wird durch p50/ p65 transaktiviert.

RAW264.7 Makrophagen wurden mit jeweils 8 μ g p40/pXP1 Reporter-genvektor, 2 μ g β -Gal Kontrollvektor, sowie insgesamt 3 μ g der angegebenen Expressionsvektoren (oder pcDNA3) transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 18 Std. mit LPS/ IFN- γ stimuliert. Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die Werte entsprechen der normalisierten x-fachen Induktion der Luziferaseexpression (RLU) +/- Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten im Vergleich zur unstimulierten kontroll-transfizierten Zellen (pcDNA3).

3.2.4 C/EBP β bindet an das C/EBP-Motiv des p40 Promotors in primären Monozyten

Die Mutation des in stimulierten primären Monozyten protektierten C/EBP-Motivs führte in Reporter-genanalysen zu einer drastisch verminderten Aktivierbarkeit des IL-12 p40 Promotors und zeigt somit die Relevanz dieses Elements für die Funktion des Promotors *in vivo*. Um aufzuklären, welche Transkriptionsfaktoren in primären Monozyten an das C/EBP-Motiv binden, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte Monozyten für 4 Stunden mit LPS/ IFN- γ stimuliert und Extrakte dieser Zellen mit einem radioaktiv markierten p40C/EBP Oligonukleotid inkubiert. Es konnte gezeigt werden, daß es bereits bei Verwendung von Extrakt unstimulierter Monozyten zur Komplexbildung an diesem Motiv kam (Abbildung 3.11 A). Die Stimulation der Monozyten mit LPS oder LPS/ IFN- γ führte im Gegensatz zur Bindung am

NF- κ B-Motiv zu keiner Verstärkung des Signals an der p40C/EBP-Sonde. Das C/EBP-Motiv wird von Mitgliedern der gleichnamigen Familie von Transkriptionsfaktoren gebunden. C/EBP α , - β und - δ kommen in Monozyten und Makrophagen vor (siehe Einleitung). Um zu überprüfen, welche dieser Faktoren an das C/EBP-Motiv des p40 Promotors binden können, wurden Expressionsvektoren für diese Proteine in COS-7 Zellen transfiziert und die Extrakte dieser Zellen im Gelretardationsexperiment eingesetzt (Abbildung 3.11 B, Spur 1-4). Lediglich die Verwendung von Extrakten C/EBP β -überexprimierender COS-7 Zellen führte zu einer starken Signalintensivierung. Die Überexpression von C/EBP α oder C/EBP δ ergab einen im Vergleich zur Kontrolle (GATA-1) leicht verstärkten Komplex. Die Bindung von C/EBP β konnte außerdem durch die Verwendung *in vitro* translatierten Proteins gezeigt werden (Abbildung 3.11 B Spur 5+6). Dazu wurde C/EBP β oder GATA-1 (Kontrolle) in einem zellfreien System (Retikulozytenlysate) *in vitro* translatiert und die Lysate im Gelretardationsexperiment mit einer p40C/EBP-Sonde inkubiert. Unter Verwendung C/EBP β programmierten Lysats, nicht jedoch mit GATA-1 programmiertem Lysat (Kontrolle) kam es zur Ausbildung eines starken Komplexes am C/EBP-Motiv.

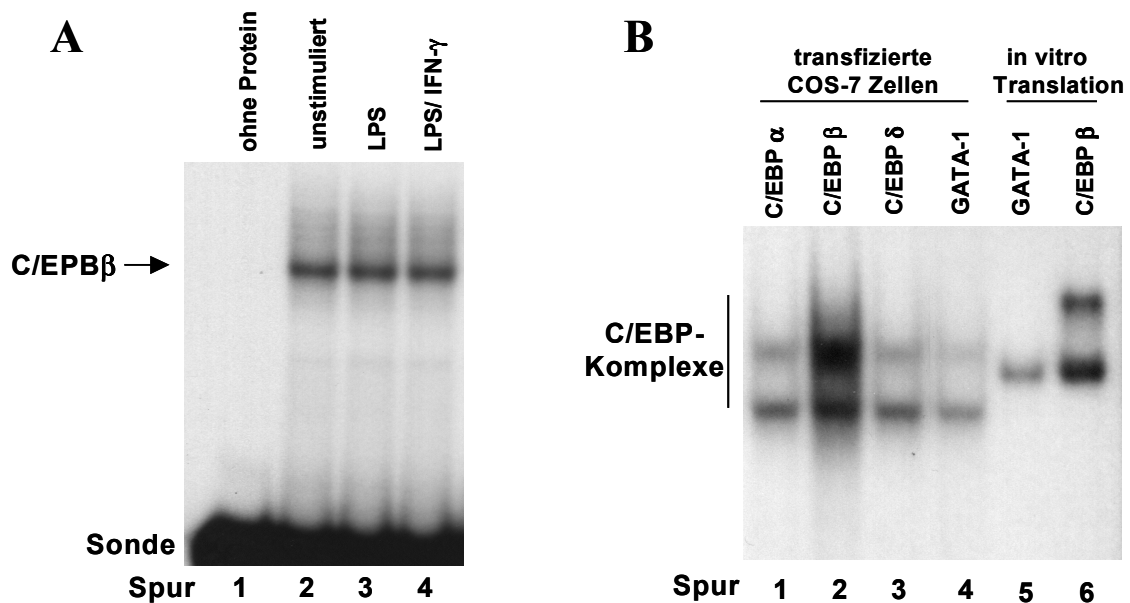


Abbildung 3.11 Ein konstitutiver Komplex bindet an das C/EBP-Motiv des p40 Promotors in primären Monozyten. (A) Gelretardationsexperiment mit jeweils 5 μ g nukleärem Protein unstimulierter und stimulierter (4 Std.) primärer Monozyten und einer radioaktiv markierten p40C/EBP-Sonde. (B) Gelretardationsexperiment mit Gesamtzellextrakt Expressionsplasmid-transfizierter COS-7 Zellen und der p40C/EBP-Sonde. Jeweils 10 μ g/Ansatz Expressionsvektoren für die angegebenen Transkriptionsfaktoren wurden mittels Kalziumphosphat in COS-7 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 12 Stunden später mit PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) stimuliert und nach weiteren 10 Std. lysiert. 10 μ g Proteinextrakt je Ansatz wurden eingesetzt.

Zur Charakterisierung des konstitutiven C/EBP-Komplexes in primären Monozyten wurden *Supershift*- und Kompetitionsanalysen durchgeführt (Abbildung 3.12). Es zeigte sich, daß der Komplex durch eine nicht radioaktiv-markierte IL-12 p40 Promotor C/EBP-Sonde (Autokompetition, Spur 2) sowie eine bona fide C/EBP-Sonde (C/EBP, Spur 6) kompetetiert werden konnte, nicht jedoch durch eine mutierte p40 C/EBP-Sonde (p40C/EBPm1, Spur 5) oder Kontrollsonden (OCT-1, AP-1). Die Komplexbildung konnte ebenfalls durch Zugabe eines C/EBP β -spezifischen Antikörpers aufgehoben werden, nicht jedoch durch Antikörper gegen p65, GATA-2 oder C/EBP α (nicht gezeigt). Die Daten implizieren folglich die konstitutive Bindung von C/EBP β an das C/EBP-Motiv im IL-12 p40 Promotor *in vitro*.

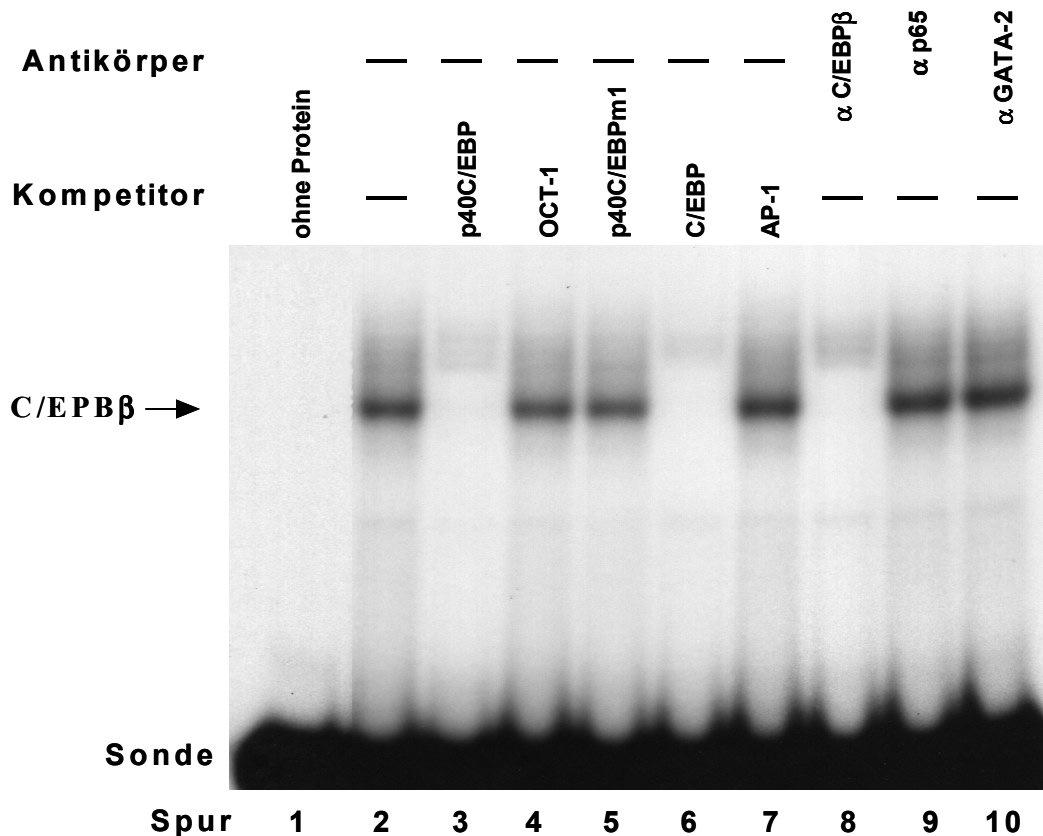


Abbildung 3.12 C/EBP β bindet an das C/EBP-Motiv in primären Monozyten.

Gelretardationsexperiment mit je 5 μ g nukleärem Extrakt LPS/ IFN- γ stimulierter primärer Monozyten und der p40C/EBP-Sonde. Für Kompetitionen wurden dem Ansatz zusätzlich 50 ng eines nicht radioaktiv-markierten Oligonukleotids hinzugefügt (Spur 3-7). Für *Supershift*-Ansätze (Spur 8-10) wurde das nukleäre Extrakt für 30 min mit dem angegebenen Antikörper vorinkubiert.

3.2.5 Der Transkriptionsfaktor C/EBP β ist ein starker Aktivator des IL-12 p40 Promotors

In vivo „Footprinting“ Experimente und Reporteranalysen zeigten die wichtige Funktion des C/EBP-Motivs für die induzierbare Aktivität des IL-12 p40 Promotors. Um die Rolle dieses Motivs weiter zu untersuchen, wurde die IL-12 p40 Promotoraktivität unter dem Einfluß überexprimierter C/EBP-Transkriptionsfaktoren untersucht. Zu diesem Zweck wurden Expressionsvektoren zusammen mit dem Wildtyp p40/pXP1 Reporter-Genvektor in RAW264.7 Zellen transfiziert.

Die Abbildung 3.13 A zeigt die IL-12 p40 Promotoraktivität in C/EBP α , - β , und - δ überexprimierenden RAW264.7 Makrophagen. Die Kotransfektion eines C/EBP β -Expressionsvektors führte zu einer drastischen Verstärkung der Promotoraktivität (24-fach und 5-fach gegenüber unstimulierten, bzw. stimulierten kontrolltransfizierten Zellen). Interessanterweise inhibierte die Überexpression von C/EBP α die stimulierte Promotoraktivität in RAW264.7 Makrophagen (60 % Inhibition). Die Überexpression von C/EBP δ dagegen hatte keine Auswirkung auf die IL-12 p40 Promotoraktivität. Die Abbildung 3.13 B zeigt die dosisabhängige Transaktivierung des Promotors in unstimulierten Makrophagen durch C/EBP β . Die Promotoraktivität stieg kontinuierlich mit der Menge kotransfizierten C/EBP β -Expressionsvektors. Dies demonstriert, daß die Überexpression von C/EBP β im Gegensatz zu NF- κ B p50/p65 zu einer starken Transaktivierung des IL12 p40 Promotors in unstimulierten Zellen führt. Bei Kotransfektion von 3 μ g des Expressionsvektors konnte in unstimulierten Zellen eine Luziferaseaktivität gemessen werden, die durchschnittlich doppelt so hoch war wie die LPS/IFN- γ stimulierte Aktivität in kontrolltransfizierten Zellen.

C/EBP-Proteine binden an ein Erkennungsmotiv, das Homologien zu mehreren Sequenzenabschnitten im IL-12 p40 Promotor hat. Um auszuschließen, daß der starke transaktivatorische Effekt von C/EBP β auch über andere CCAAT-ähnliche Motive im IL-12 p40 Promotor wirkt, wurden mutante Reporterkonstrukte untersucht. Es zeigte sich, daß die Mutation des C/EBP-Motivs (p40mC) zu einer Aufhebung des transaktivierenden Effektes von C/EBP β auf die Aktivität des p40 Promotors in RAW264.7 Zellen führt (Abbildung 3.13 C). Demzufolge wirkt C/EBP β wahrscheinlich vollständig über das Erkennungsmotiv im Bereich – 80 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle. In LPS/IFN- γ

stimulierten Zellen kompensiert die Überexpression von C/EBP β die Inaktivierung des NF- κ B- (mut NF- κ B), nicht jedoch des ETS- (mut ETS) Motivs (ca. 50% Inhibition gegenüber dem Wildtyp-Promotor (Abbildung 3.13 C). Dies läßt auf eine Kooperation zwischen dem C/EBP- und dem ETS-Motiv bei der Aktivierung des IL-12 p40 Promotors schließen.

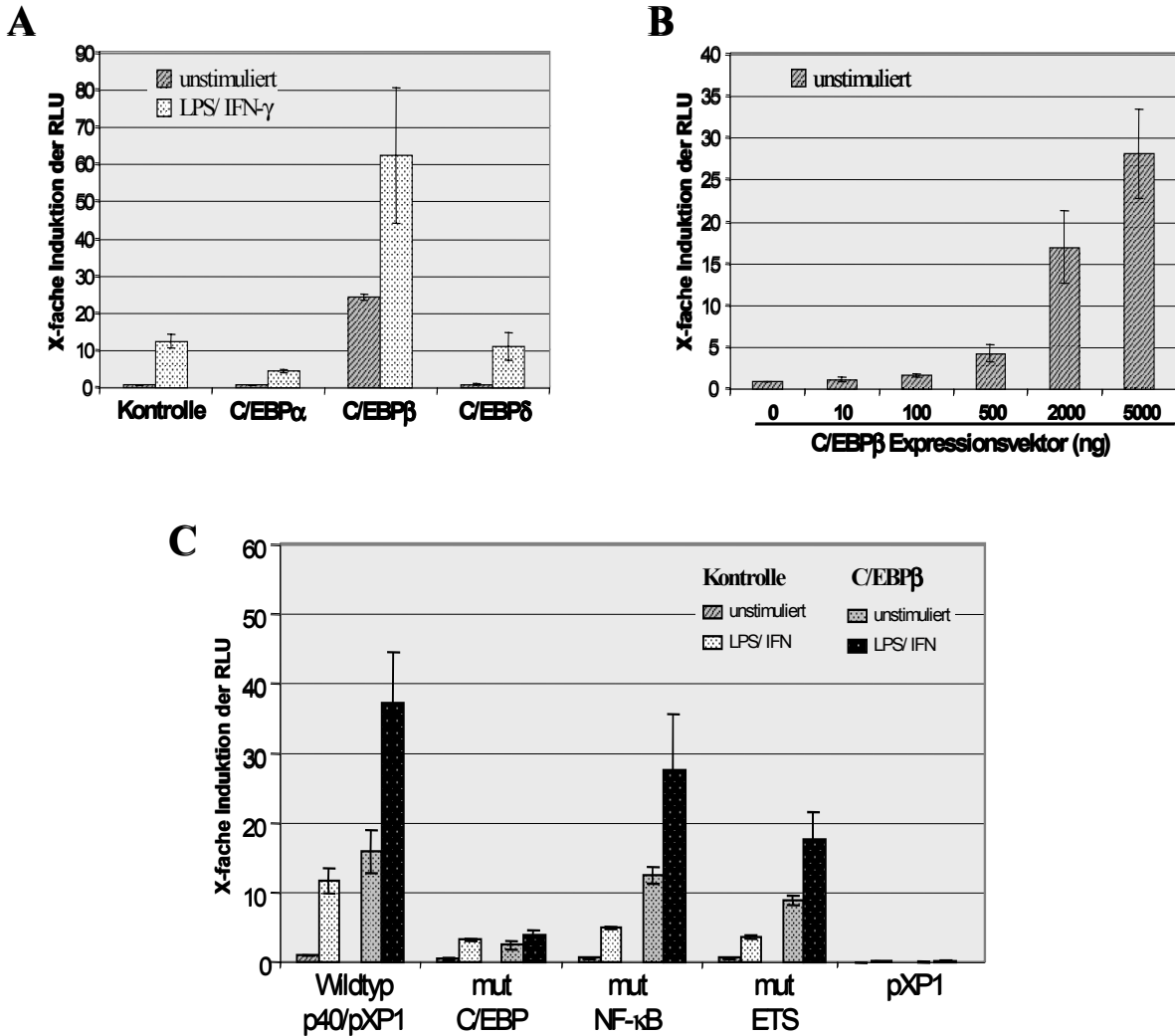


Abbildung 3.13 C/EBP β ist ein starker Transaktivator des IL-12 p40 Promotors.

RAW264.7 Makrophagen wurden mit jeweils 8 μ g p40/pXP1 Reportergenvektor oder mutiertem Reportergenvektor (C), 2 μ g β -Gal Kontrollvektor sowie insgesamt 3 μ g der angegebenen Expressionsvektoren (oder pcDNA3) transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 18 Std. mit LPS/ IFN- γ stimuliert. Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die Werte entsprechen der normalisierten x-fachen Induktion der Luziferaseexpression (RLU) +/- Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten im Vergleich zur unstimulierten kontrolltransfizierten Zellen (pcDNA3).

3.2.6 PU.1 bindet an die ETS-Erkennungssequenz des p40 Promotors in primären Monozyten

Schließlich wurde untersucht, welche Faktoren in primären Monozyten an das in stimulierten Monozyten *in vivo* geschützte ETS-Motiv binden. Dazu wurden Gelretardationsexperimente mit nukleären Extrakten unstimulierter und stimulierter Monozyten und RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Es zeigte sich die Ausbildung von konstitutiven Komplexen, deren Signale gleichermaßen bei unstimulierten sowie LPS/IFN- γ stimulierten Monozyten und RAW264.7 Zellen nachweisbar waren (Abbildung 3.14 A). Kompetitionsanalysen zeigten die spezifische Aufhebung der Komplexe bei Anwesenheit eines Überschusses der p40ETS-L- (Autokompetition) sowie einer bona fide ETS-Sonde (Abbildung 3.14 B, Spur 3 und 8). *Supershift*-Experimente zeigten die spezifische Aufhebung eines Komplexes durch Zugabe von Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor PU.1 (Abbildung 3.14 C Spur 5), nicht jedoch bei Zugabe von Antikörpern gegen andere ETS-Proteine oder andere Transkriptionsfaktoren.

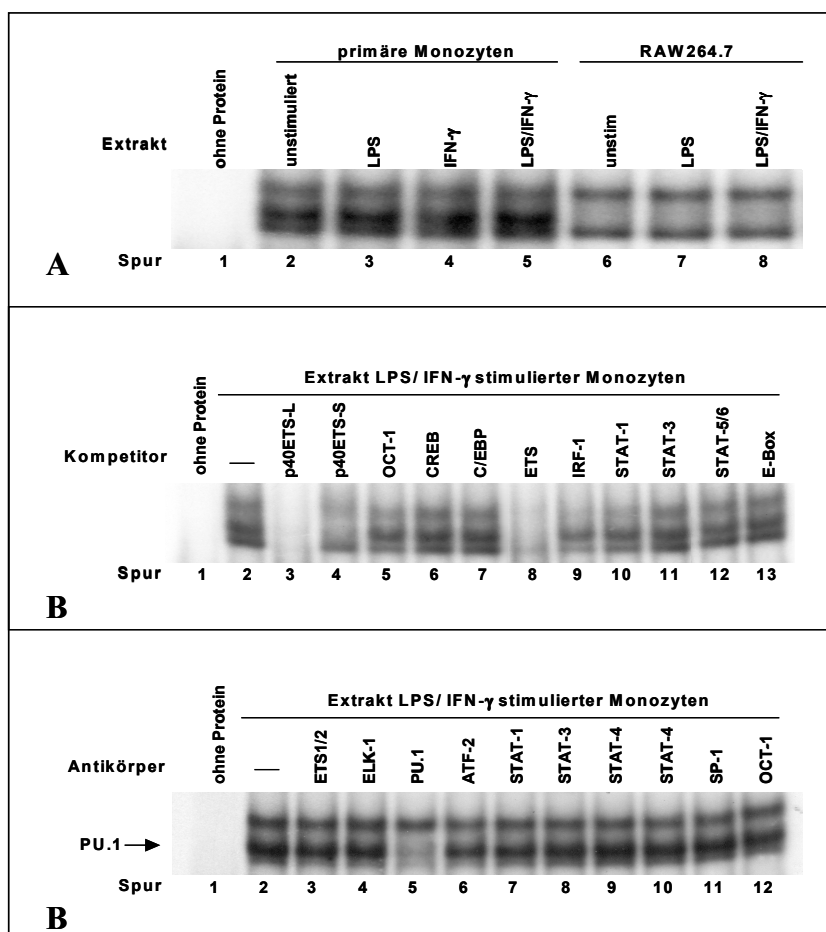


Abbildung 3.14 Der Transkriptionsfaktor PU.1 bindet an das ETS-Motiv im IL-12 p40 Promotor. (A) Gelretardationsexperiment mit jeweils 5 μ g nukleärem Protein unstimulierter und stimulierter (4 Std.) primärer Monozyten und einer radioaktiv markierten p40ETS-L-Sonde. (B) Kompetitionsanalyse der ETS-bindenden Komplexe. Je Ansatz wurden zusätzlich 50 ng eines nicht radioaktiv markierten Oligonukleotids hinzugefügt. (C) Für Supershift-Analyse der ETS-bindenden Komplexe. Nukleärer Extrakt wurde für 30 min mit den angegebenen Antikörpern vorinkubiert.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung eines Repressor- elements im IL-12 p40 Promotor.

Die bisher gezeigten Daten zum IL-12 p40 Promotor implizieren die konzertierte Bindung von NF- κ B p50/p65, C/EBP β und PU.1 an ihre Erkennungssequenzen nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS/IFN- γ . Im Gegensatz zu diesen stimulationsabhängigen Protein/ DNA-Interaktionen konnte im *in vivo* „Footprinting“ die Protektion mehrerer Guanosine um den Bereich -155 in unstimulierten, nicht jedoch in stimulierten Monozyten gezeigt werden (siehe Abbildung 3.6). Die Analyse der Sequenz zeigte die Anwesenheit einer Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren der GATA-Proteinfamilie in diesem Bereich. Dieses neue Promotorelement wurde GA-12 genannt.

3.3.1 Die gerichtete Mutagenese des GA-12 Motivs führt zu einer Verstärkung der IL-12 p40 Promotoraktivität

Um zu überprüfen, ob das GA-12 Motiv eine regulatorische Funktion für den IL-12 p40 Promotor hat, wurden Reporterexperimente durchgeführt. Mittels gerichteter Mutagenese des Reporter-genvektor p40/pXP1 wurden zu diesem Zweck im Bereich der GATA-Sequenz des GA-12 Elementes Nukleotide ausgetauscht und die Aktivität der Mutanten mit der des Wildtyp Promotors verglichen. Interessanterweise führte die Mutation im Bereich der GATA-Kernsequenz des GA-12 Motivs (GA-12m1 und GA-12m2) zu einer Verdoppelung der IL-12 p40 Promotoraktivität nach Stimulation von RAW264.7 Zellen mit LPS/IFN- γ (Abbildung 3.15). Der Austausch von 2 Nukleotiden direkt 3' der GATA-Sequenz führte ebenso zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität (GA-12m3), während ein Austausch von Nukleotiden direkt 5' der GATA-Sequenz (GA-12m4) einen geringeren Effekt hatte. Kontrollmutationen in anderen Promotorbereichen führten dagegen zu keinem Effekt (p40m17 bis p40m19). Diese Daten implizieren die potentielle Bindung eines repressorisch wirkenden Faktors an das GA-12 Motiv im IL-12 p40 Promotor. Das Bindungsmotiv beschränkt sich dabei nicht nur auf die eigentliche GATA-Sequenz, sondern umfasst möglicherweise auch Nukleotide insbesondere stromabwärts der klassischen GATA-Erkennungssequenz.

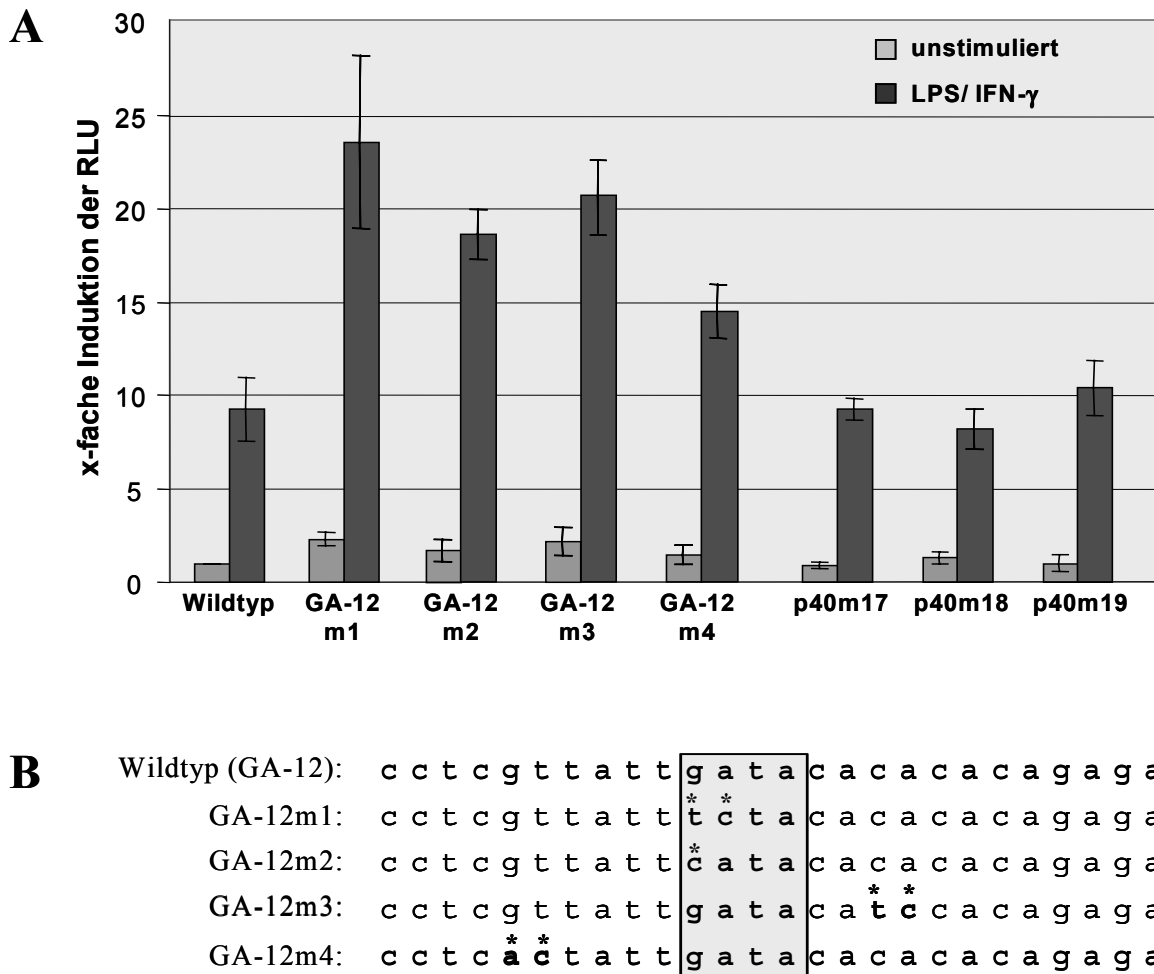


Abbildung 3.15 Mutationen im Bereich der GATA-Sequenz von GA-12 führen zu einer Verstärkung der IL-12 p40 Promotoraktivität. Durch gerichtete Mutagenese wurden im Bereich des GA-12 Motivs des p40/pXP1 Reportergenvektors Nukleotide ausgetauscht. **(A)** Jeweils 8 μ g des mutanten oder des Wildtyp Konstrukts wurden dann mit je 2 μ g des β -Gal Kontrollvektors mittels DEAE-Dextran in RAW264.7 Makrophagen transfiziert. Nach 18 Stunden wurde ein Teil der Ansätze mit LPS (1 μ g/ml) und IFN- γ (100 U/ml) stimuliert. Nach 10 Stunden Stimulationsdauer wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität in einem Luminometer gemessen. Die Werte entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten nach Abgleich der Transfektionseffizienz. **(B)** Darstellung der durch gerichtete Mutagenese erzeugten Promotorvarianten. Ausgetauschte Nukleotide sind gekennzeichnet (*).

3.3.2 GAP-12 bindet an das GA-12 Motiv in ruhenden Monozyten und RAW264.7 Makrophagen.

Um zu überprüfen, ob das GA-12 Motiv sequenzspezifisch mit einem Proteinkomplex interagiert, wurden Gelretardationsexperimente mit Extrakten unstimulierter und LPS/IFN- γ stimulierter primärer Monozyten, bzw. RAW264.7 Makrophagen und einer

radioaktiv markierten GA-12 Sonde durchgeführt. Wie in Abbildung 3.16 ersichtlich, konnten retardierte Komplexe nachgewiesen werden. Ein spezifischer Komplex trat dabei interessanterweise nur mit Extrakten unstimulierter, nicht jedoch LPS- oder LPS/ IFN- γ stimulierter Monozyten (Abbildung 3.16 A Spur 1-3) und RAW264.7 Makrophagen (Abbildung 3.16 B) auf. Dieser Komplex wurde GAP-12 genannt. Da das GA-12 Motiv eine potentielle Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren der GATA-Proteinfamilie enthält, wurde die Möglichkeit erwogen, daß GAP-12 ein GATA-ähnlicher Proteinkomplex sein könnte. In einem ersten Experiment zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die zuvor an der GA-12 Sonde getesteten nukleären Proteine mit einer bona fide GATA-Sonde inkubiert. Interessanterweise konnte dabei ein Komplex identifiziert werden, der im Gel auf derselben Höhe wandert wie der GAP-12 Komplex und der ebenso nur im Extrakt unstimulierter Monozyten nachweisbar war (Abbildung 3.16 A Spur 4-6). GAP-12 bindet demzufolge sowohl an das GA-12 Motiv des IL-12 p40 Promotors, als auch an ein *consensus* GATA-Motiv.

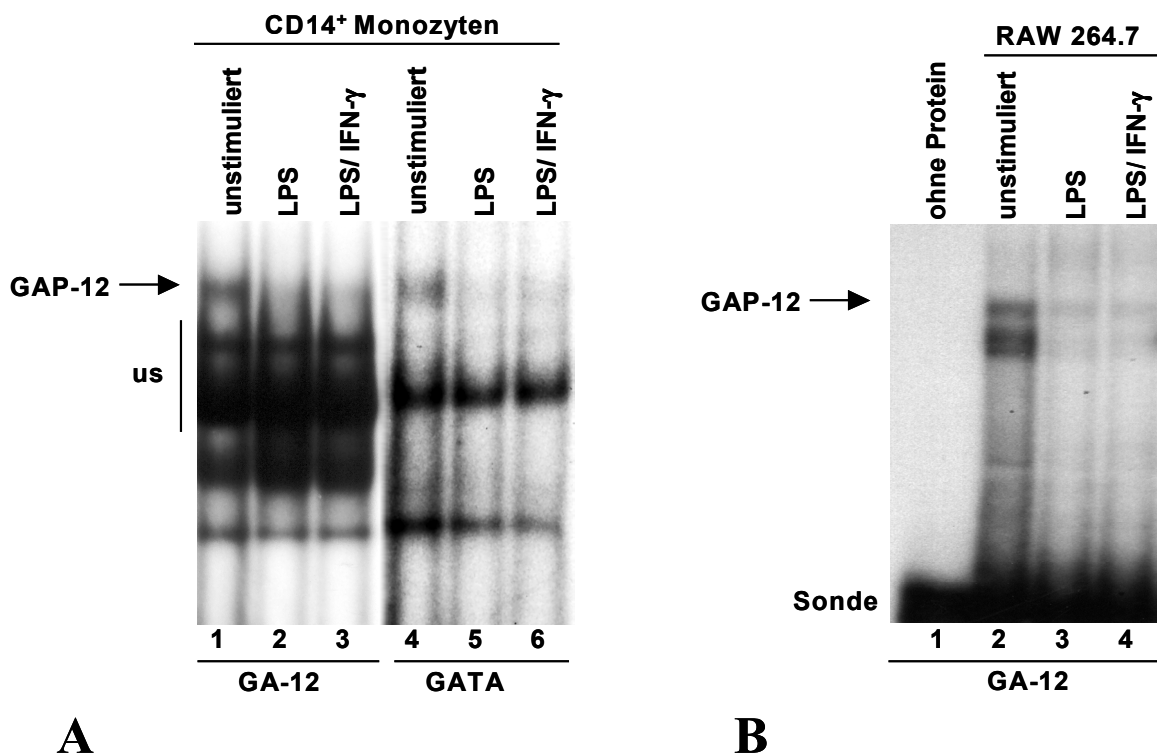


Abbildung 3.16 GAP-12 bindet an das GA-12 Motiv in unstimulierten primärer Monozyten und RAW264.7 Makrophagen. Gelretardationsexperiment mit jeweils 5 μ g nukleärem Protein unstimulierter und für 4 Std. stimulierter primärer Monozyten (A Spur 1-3) oder RAW264.7 Makrophagen (B) und einer radioaktiv markierten p40GA-12 Sonde (A Spur 1-3, B) oder einer *bona fide* GATA-Sonde (A Spur 4-6). Die Position des spezifischen GAP-12 Komplexes sowie unspezifischer Komplexe (us) ist angezeigt.

3.3.3 GAP-12 ist ein GATA-ähnlicher Transkriptionsfaktor

Zur weiteren Charakterisierung des GAP-12 Komplexes wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Wie in Abbildung 3.17 A gezeigt, konnte die Bindung von GAP-12 an das GA-12 Motiv durch Zugabe eines Überschusses nicht radioaktiv markierter GA-12 Sonde (Autokonkpetition) sowie einer bona fide GATA-Sonde spezifisch aufgehoben werden. Die Konkurrenz mit einer mutierten GA-12 Sonde (GA-12m1) oder einer Sonde für OCT-Transkriptionsfaktoren (Kontrolle) hatte dagegen keinen Effekt auf die Bindung von GAP-12. Wurden mutante GA-12 Oligonukleotide direkt als Sonden im Gelretardationsexperiment eingesetzt (siehe Abbildung 3.17 B für die Sequenzen), war der GAP-12 Komplex nicht mehr (GA-12m1, GA-12m2) oder kaum noch (GA-12m3) nachweisbar (Abbildung 3.17 B). Entsprechend den Transfektionsexperimenten in Abbildung 3.15 war auch hier der Effekt von GA-12m4 am geringsten ausgeprägt. Die Daten zeigen demzufolge, daß die Bindung von GAP-12 im Gelretardationsexperiment sowie der funktionelle Effekt bei den Reporteranalysen (Abbildung 3.15) eine intakte GATA-Kernmotiv, sowie einige Basen insbesondere 3' der GATA-Sequenz benötigt.

Um zu analysieren, ob die Bindung von Proteinen am GA-12 Motiv auf Zellen myeloiden Ursprungs begrenzt ist, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt, bei denen die GA-12 Sonde mit nukleären Extrakten unstimulierter Zelllinien inkubiert wurden (Abbildung 3.17 C). Es konnte festgestellt werden, dass GA-12 bindende Komplexe in Extrakten von Zelllinien verschiedener Herkunft zu finden sind. Ähnlich wie GAP-12 migrierende Komplexe wurden in der humanen Makrophagen/Monozyten-Zelllinie U937, der myelogenen Zelllinie K562, aber auch der Epithel-Zelllinie HeLa, der Hepatom-Zelllinie HepG2 und der Fibroblasten-Zelllinie COS-7 gefunden.

Um zu prüfen, ob möglicherweise ein bekannter GATA-Transkriptionsfaktor Teil des GAP-12 Komplexes ist, wurden „Supershift“-Experimente mit Extrakten unstimulierter Monozyten und Antikörpern gegen die GATA-Proteine GATA-1, GATA-2 und GATA-3 durchgeführt. Wie in Abbildung 3.17 D gezeigt, führte keiner der getesteten GATA-Antikörper zu einem spezifischen „Supershift“ oder zu einer spezifischen Auslöschung von Komplexen.

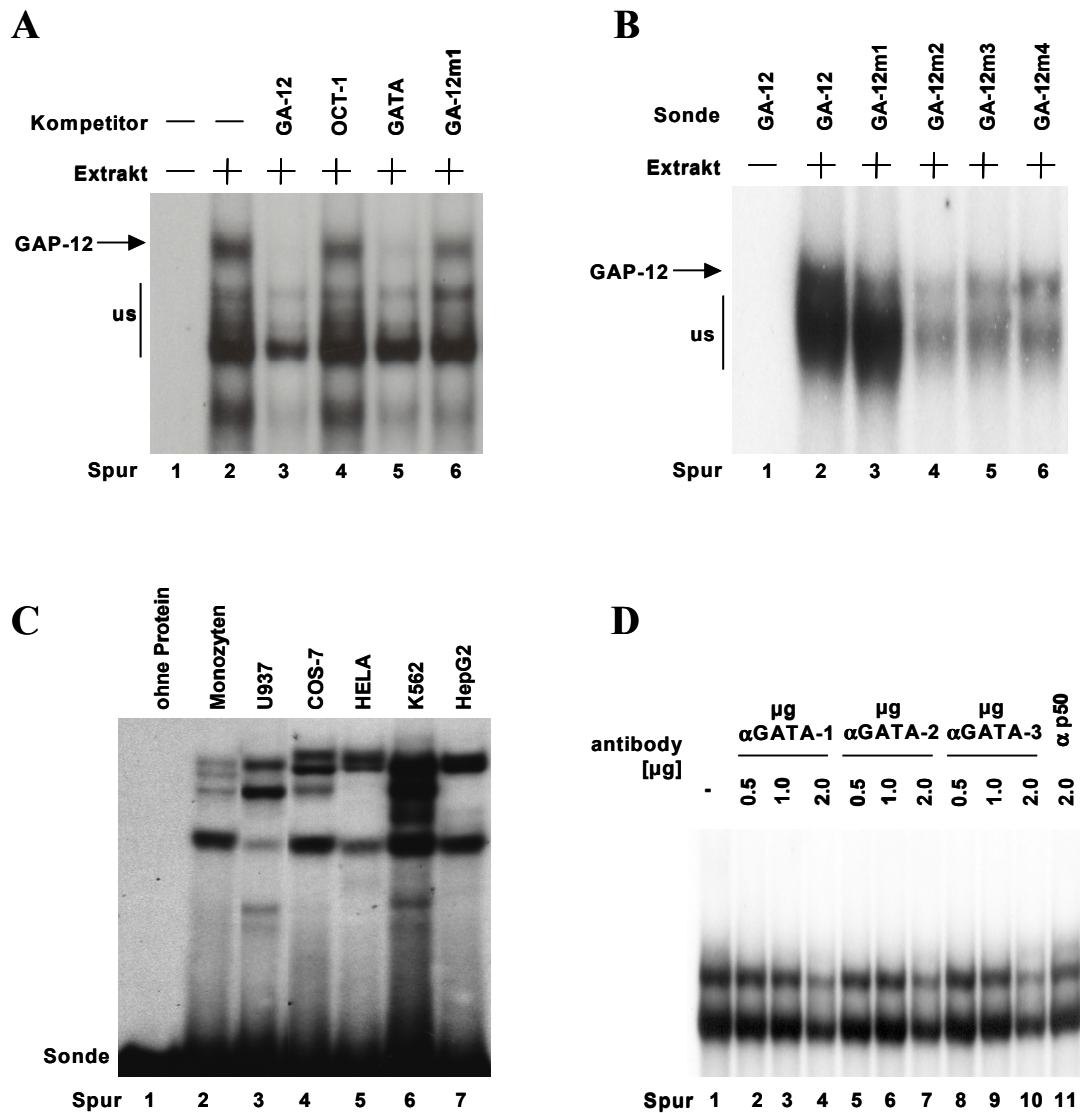


Abbildung 3.17 GAP-12 bindet im Bereich der GATA-Sequenz von GA-12. Gelretardationsexperimente mit der p40GA-12 Sonde und je 5 µg nukleärem Extrakt unstimulierter humaner Monozyten (A, B, D) oder Zelllinien (C). (A) Kompetitionsanalysen des GAP-12 Komplexes. Jeweils 50 ng der angegebenen Kompetitor-Sonden wurden den Ansätzen hinzugefügt. (B) Mutante GA-12 Oligonukleotide (siehe Abbildung 3.16) wurden direkt als Sonden eingesetzt. (C) Vergleich der sich an der GA-12 Sonde bildenden Komplexe in Zellen verschiedenen Ursprungs. Jeweils 10 µg nukleärer Extrakte der angegebenen Zelllinien wurden eingesetzt. (D) Supershiftanalyse des GAP-12 Komplexes. Das nukleäre Extrakt wurde zu diesem Zweck mit GATA-spezifischen Antikörpern oder einem Kontrollantikörper für 30 min auf Eis präinkubiert.

Die Daten sprechen dafür, daß GAP-12 ein GATA-ähnliches Repressorprotein darstellt. Um zu überprüfen, ob die Überexpression von GATA-Transkriptionsfaktoren zu einer Repression des IL-12 p40 Promotors in RAW264.7 Makrophagen führen könnte, wurden Kotransfektions-Reportergenanalysen durchgeführt. Wie in Abbildung 3.18 gezeigt konnte

durch Überexpression von GATA-1 und GATA-3 eine deutliche Inhibition der induzierbaren IL-12 p40 Promotoraktivität erreicht werden. Bei Kotransfektion von 3 μg Expressionsvektor für GATA-1 und GATA-3 konnte gegenüber der Kontrolle eine ca. 45 %, bzw. eine ca. 60 % geringere Promotoraktivität in LPS/ IFN- γ stimulierten RAW264.7 Makrophagen gemessen werden. Im Gegensatz dazu führte die Kotransfektion eines dominant-negativen GATA-3 Expressionsvektors (pcKRR) zu einer verstärkten Promotoraktivität. Dieser Expressionsvektor kodiert für ein mutantes GATA-3 Protein, welches zwar noch an seine Erkennungssequenz binden kann, jedoch eine funktionsunfähige Transaktivierungsdomäne hat und somit als dominant-negativ wirkendes pan-GATA Protein beschrieben wurde (Smith et al., 1995). Interessanterweise ist der transaktivatorische Effekt vor allem in unstimulierten RAW264.7-Zellen am ausgeprägtesten. Bei Kotransfektion von 3 μg des pcKRR-Vektors war die unstimulierte IL-12 p40 Promotoraktivität im Vergleich zur Kontrolltransfektion 6-fach höher.

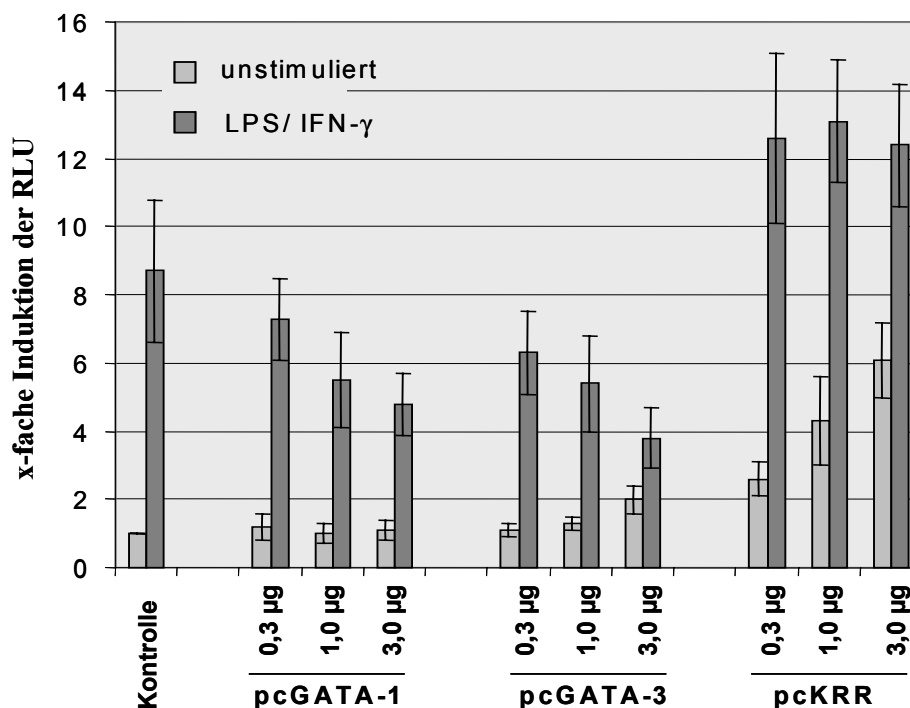


Abbildung 3.18 Die Überexpression von GATA-Transkriptionsfaktoren inhibiert den IL-12 p40 Promotor in RAW264.7 Makrophagen. RAW264.7 Makrophagen wurden mit jeweils 8 μg p40/pXP1 Reporter-genvektor, 2 μg β -Gal Kontrollvektor sowie insgesamt 3 μg der angegebenen Expressionsvektoren (oder pcDNA1 als Kontrollvektor) transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 18 Std. mit LPS/ IFN- γ stimuliert. Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die Werte entsprechen der normalisierten x-fachen Induktion der Luziferaseexpression (RLU) \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten im Vergleich zur unstimulierten kontrolltransfizierten Zellen (pcDNA3).

3.3.4 Die Bindung von GAP-12 wird durch Interleukin-4 und Prostaglandin-E2, Repressoren der IL-12 p40 Expression, verstärkt.

Interleukin-4 ist Mediator einer Immunantwort vom T_H2-Typ und Inhibitor der IL-12 Produktion von Monozyten und Makrophagen (D'Andrea et al., 1995, Koch et al., 1996, Levings et al., 1999). Um dies in der vorliegenden Arbeit anhand CD14⁺ humaner Monozyten nachzuvollziehen, wurden ELISA- und RT-PCR Experimente durchgeführt (Abbildung 3.19 A+B). Entsprechend den Daten der Literatur war in Monozyten die LPS/IFN- γ stimulierte Expression von IL-12 p40 Protein und mRNA nahezu vollständig unterdrückt. Die molekularen Mechanismen dieser Inhibition sind nicht geklärt. Um zu testen, ob IL-4 einen direkten Einfluß auf die IL-12 p40 Promotoraktivität ausübt, wurden Transfektionsexperimente mit dem p40/pXP1 Konstrukt in RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Die Anwesenheit von IL-4 im Kulturmedium LPS/IFN- γ stimulierter Zellen führte gegenüber den Ansätzen ohne IL-4 zu einer durchschnittlich um 50 % geringen Luziferaseexpression (Abbildung 3.19 C).

Da IL-4 die Induktion der IL-12 p40 Promotoraktivität inhibiert, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das Zytokin direkt über eine Beeinflussung der Bindung eines Transkriptionsfaktors an seine Zielsequenz im IL-12 p40 Promotor wirken könnte. Gelretardationsexperimente mit Extrakten IL-4 behandelter Monozyten ergaben im Vergleich zu unbehandelten Monozyten keine veränderten Bindungssignale an den Aktivatoromotiven NF- κ B, C/EBP und ETS (nicht gezeigt). Um zu prüfen, ob IL-4 möglicherweise die Bindung von GAP-12 an den IL-12 p40 Promotor moduliert, wurden Gelretardationsexperimente mit der p40GA-12 Sonde durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß in LPS/IFN- γ stimulierten Monozyten eine Verstärkung der GAP-12-Bande durch IL-4 im Kulturmedium auftrat. Während dieser Effekt nach einer Stunde Inkubationsdauer noch nicht nachweisbar war, war in IL-4 behandelten Zellen nach 3 Stunden und insbesondere nach 5 Stunden Inkubationsdauer die Bindung von GAP-12 gegenüber nicht mit IL-4 behandelten Zellen deutlich verstärkt. Neben IL-4 ist auch Prostaglandin-E2 ein Effektormolekül T_H2-vermittelter Immunantworten und ein Repressor der Expression von IL-12 (Van-der Pouw et al., 1995, Monteleone et al., 1999). Um zu überprüfen, ob auch PGE2 die Bindung von GAP-12 induzieren kann, wurden unstimulierte primäre Monozyten für 6 Stunden mit Prostaglandin-E2 versetzt und

Extrakte dieser Zellen im Gelretardationsexperiment mit der GA-12 Sonde inkubiert. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die GAP-12 Bande gegenüber nicht mit PGE₂ behandelten Zellen deutlich verstärkt war (Abbildung 3.19 E).

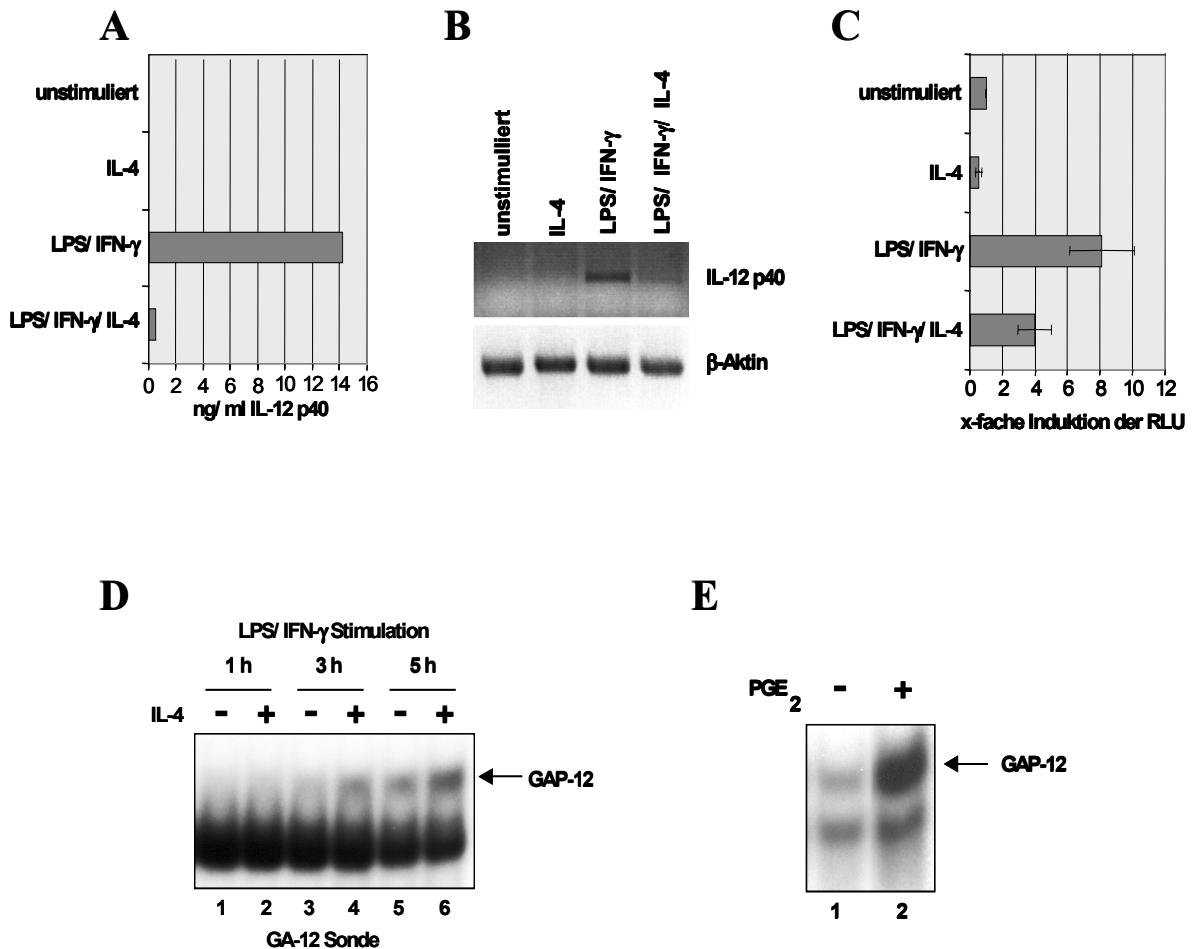


Abbildung 3.19 Interleukin-4 und Prostaglandin-E2 verstärken die Bindung von GAP-12. (A) ELISA-Untersuchungen von Zellüberständen unstimulierter und stimulierter primärer Monozyten. Jeweils 2 Mio. Monozyten wurden für 48 Stunden wie angegeben stimuliert. Mittels ELISA wurde anschließend die Menge von IL-12 p40 in den Zellüberständen bestimmt. Die Daten zeigen Ergebnisse eines Experimentes. (B) RT-PCR-Analyse der IL-12 p40 mRNA Expression in IL-4 behandelten primären Monozyten. 10^7 Monozyten wurden wie angegeben stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von IL-12 p40 wurde in einer PCR mit p40-spezifischen Primern bei 16 Zyklen durchgeführt. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Ansatz aus der selben cDNA-Probe β -Aktin amplifiziert. (C) RAW264.7 Makrophagen wurden mit jeweils $10 \mu\text{g}$ p40/pXP1 Reporter-genvektor transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde nach 18 Std. mit IL-4, LPS/ IFN- γ oder LPS/ IFN- γ / IL-4 stimuliert. Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die Werte entsprechen der normalisierten x-fachen Induktion der Luziferaseexpression (RLU) \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten im Vergleich zur unstimulierten Zellen. (D) Gelretardationsexperiment mit jeweils $5 \mu\text{g}$ nukleärem Protein IL-4 behandelter und unbehaltener LPS/IFN- γ stimulierter primärer Monozyten und einer radioaktiven markierten p40GA-12 Sonde. (E) Gelretardationsexperiment mit jeweils $5 \mu\text{g}$ nukleärem Protein Prostaglandin-E2 (PGE₂) behandelter (4 Std.) und unbehaltener primärer Monozyten und einer radioaktiven markierten p40GA-12 Sonde.

3.4 Die Generierung und Analyse IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgener Mäuse

Die transiente Transfektion ist eine wichtige Methode der Untersuchung funktioneller Aspekte eines Promotors. Allerdings bleibt das transfizierte Konstrukt episomal und die so erhaltenen Daten spiegeln nicht notwendigerweise die komplexen biochemischen Prozesse der Expression endogener Gene wieder. Um zu überprüfen, ob das von uns verwendete 815 bp Konstrukt genügt, um im nukleosomalen Kontext Aktivierungs- und Gewebespezifität zu garantieren, wurden transgene Mäuse generiert. Die verwendete Expressionskassette enthielt das Luziferasegen unter der Kontrolle des 815 bp Fragmentes des humanen IL-12 p40 Promotor (Abbildung 3.20 A). Um den Einfluß des Integrationsortes zu minimieren, wurde diese Expressionskassette 5' und 3' von SV40 polyA-Elementen flankiert. Das Konstrukt wurde entsprechend den Ausführungen in Material und Methoden durch Modifikation des p40/pXP1 Reportergenvektors gewonnen und in die Pronuklei befruchteter Eier injiziert. Die so erhaltenen Mäuse wurden mittels PCR unter Verwendung Konstrukt-spezifischer Primer auf das Vorhandensein des Transgens überprüft (Abbildung 3.20 B). Zwei sog. „*Founder*“-Mäuse erwiesen sich dabei als positiv. Nachkommen dieser Tiere wurden getrennt weitergezüchtet und in den folgenden Experimenten verwendet.

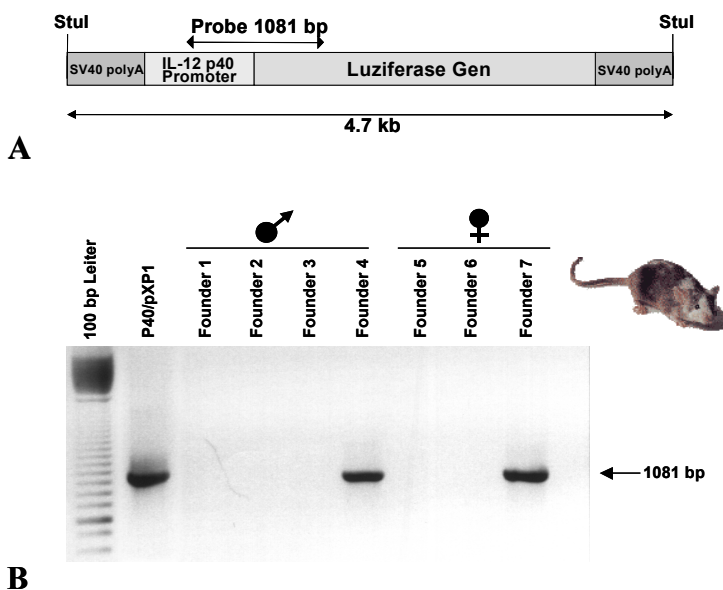


Abbildung 3.20 Die Generierung IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgener Mäuse. (A) Schematische Darstellung der für die Mikroinjektion verwendeten Expressionskassette. Das 4.7 kb Konstrukt entstammt dabei einem modifizierten p40/pXP1 Vektor. Die Position des bei der transgen-spezifischen PCR amplifizierten Fragments ist angezeigt. (B) Transgen-spezifische PCR aus DNA von Schwanzbiopsien potentiell transgener „*Founder*“-Tiere. Als Positivkontrolle für die Amplifikation des erwarteten 1081 bp Fragments bei der PCR wurde der p40/pXP1 Vektor verwendet.

Alle untersuchten Mäuse waren phänotypisch normal und zeigten keine sichtbaren pathologischen Organveränderungen. Die im folgenden gezeigten Daten stammen von 6-8 Wochen alten Nachkommen der „Founder“-Maus 1, da diese eine höhere Expression des Transgens zeigte. Bei allen Experimenten wurden jedoch auch Nachkommen der „Founder“-Maus 2 als Kontrolle mitgeführt. Diese zeigten stets die selbe Tendenz bei durchschnittlich niedrigeren RLU („*Relative Light Units*“).

3.4.1 Die Expression des Transgens erfolgt zelltyp- und stimulations-spezifisch

Die Ergebnisse transienter Transfektionsexperimente zeigten, daß das 815 bp IL-12 p40 Promotorfragment in Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien, nicht jedoch in T- und B-Zelllinien aktiv und induzierbar war. Zur Kontrolle, ob in transgenen Mäusen die Luziferaseexpression entsprechend dem endogenen IL-12 p40 Gen ebenfalls Zelltyp-spezifisch reguliert wird, wurde die Luziferaseexpression isolierter Makrophagen, T und B Lymphozyten untersucht. Dazu wurde zuvor getöteten 6-8 Wochen alten transgenen Mäusen die Milz entnommen und mittels immunmagnetischer „Beads“ daraus Makrophagen, T Lymphozyten und B Lymphozyten isoliert. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit LPS/ IFN- γ (Makrophagen), LPS/ SAC (B Lymphozyten) oder Antikörpern gegen CD3/ CD28 (T Lymphozyten) stimuliert und anschließend lysiert. Im Lysat wurde schließlich die Luziferaseexpression bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß die Expressionskassette lediglich in stimulierten Makrophagen eine hohe Aktivität aufweist, während in T Lymphozyten oder B Lymphozyten kaum oder gar keine signifikante Aktivität meßbar war (Abbildung 3.21). Die in primären Makrophagen gemessene Luziferaseaktivität lag dabei um den Faktor 100 höher als in B Lymphozyten und um den Faktor 15 höher als in T Lymphozyten. Das Transgen wird dementsprechend Zelltyp-spezifisch reguliert.

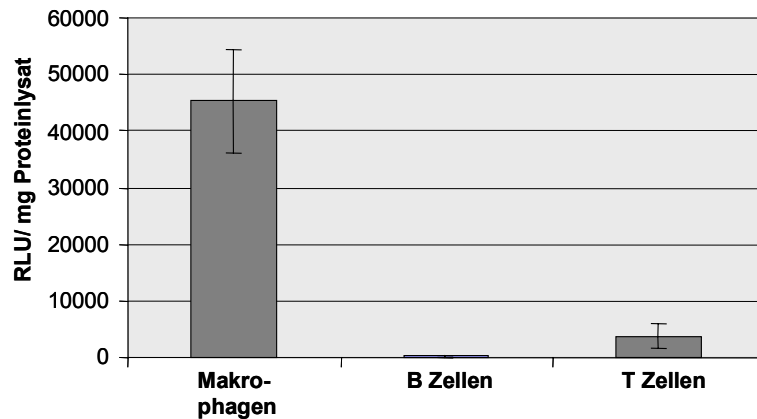


Abbildung 3.21 Die Expression des Transgens erfolgt Zelltyp-spezifisch.

Mittels immunmagnetischer „Beads“ wurden Mac-1 positive Makrophagen, B220 positive B Zellen und CD3 positive T Zellen aus Milzzellen transgener Mäuse isoliert. Die Zellen wurden in Kultur genommen und für 24 Stunden mit LPS/ IFN- γ , LPS/ SAC, bzw. anti-CD3/ anti-CD28 stimuliert. Schließlich wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseexpression wurde im Zel lysat bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte +/- Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

Um die Stimulierbarkeit des IL-12 p40 Promotors in p40 Promotor/Luziferase transgenen Mäusen zu untersuchen, wurden Makrophagen aus dem Peritoneum transgener Mäuse isoliert und mit LPS und IFN- γ stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Wie in Abbildung 3.22 (A) gezeigt, konnte durch Stimulation mit LPS eine ca. 9-fache Induktion der Luziferaseaktivität erreicht werden. Die zusätzliche Stimulation mit IFN- γ führte lediglich zu einer geringfügigen Steigerung der Aktivität gegenüber der Stimulation mit LPS alleine. Die Stimulation mit IFN- γ alleine stimulierte die Expression ca. 4-fach. Analog den Ergebnissen transienter Transfektions-experimente verminderte die zusätzliche Gabe von IL-4 die LPS/IFN- γ stimulierte Luziferaseexpression um ca. 50 %. ELISA-Experimente zeigten analog eine starke Induktion der IL-12 p40 Proteinmenge in Kulturüberständen LPS/ IFN- γ stimulierter Peritonealmakrophagen und eine Suppression dergleichen durch IL-4 (Abbildung 3.22 B). Die konstitutive Luziferaseexpression in Milzen transgener Mäuse war lediglich moderat (siehe weiter unten). Zur Überprüfung der Stimulierbarkeit der IL-12 p40 Promotor-aktivität in Makrophagen der Milz wurde transgenen Tieren intraperitoneal eine sublethale Dosis LPS (200 μ g in PBS gelöst) injiziert. Nach 4 Stunden wurden die Tiere getötet und die Luziferaseaktivität im Milzhomogenisat bestimmt. Wie in Abbildung 3.22 gezeigt, war die gemessene Luziferaseaktivität in den LPS-injizierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) deutlich erhöht. Zu Kontrollzwecken wurde im Milz-Homogenisat

mittels ELISA zusätzlich die Konzentration von IL-12 p40 Protein bestimmt. Es zeigte sich dabei, daß diese, entsprechend der Expression des Transgens, in LPS-behandelten Tieren ca. 10-fach höher lag als in Milzen von Kontrolltieren (PBS-behandelt).

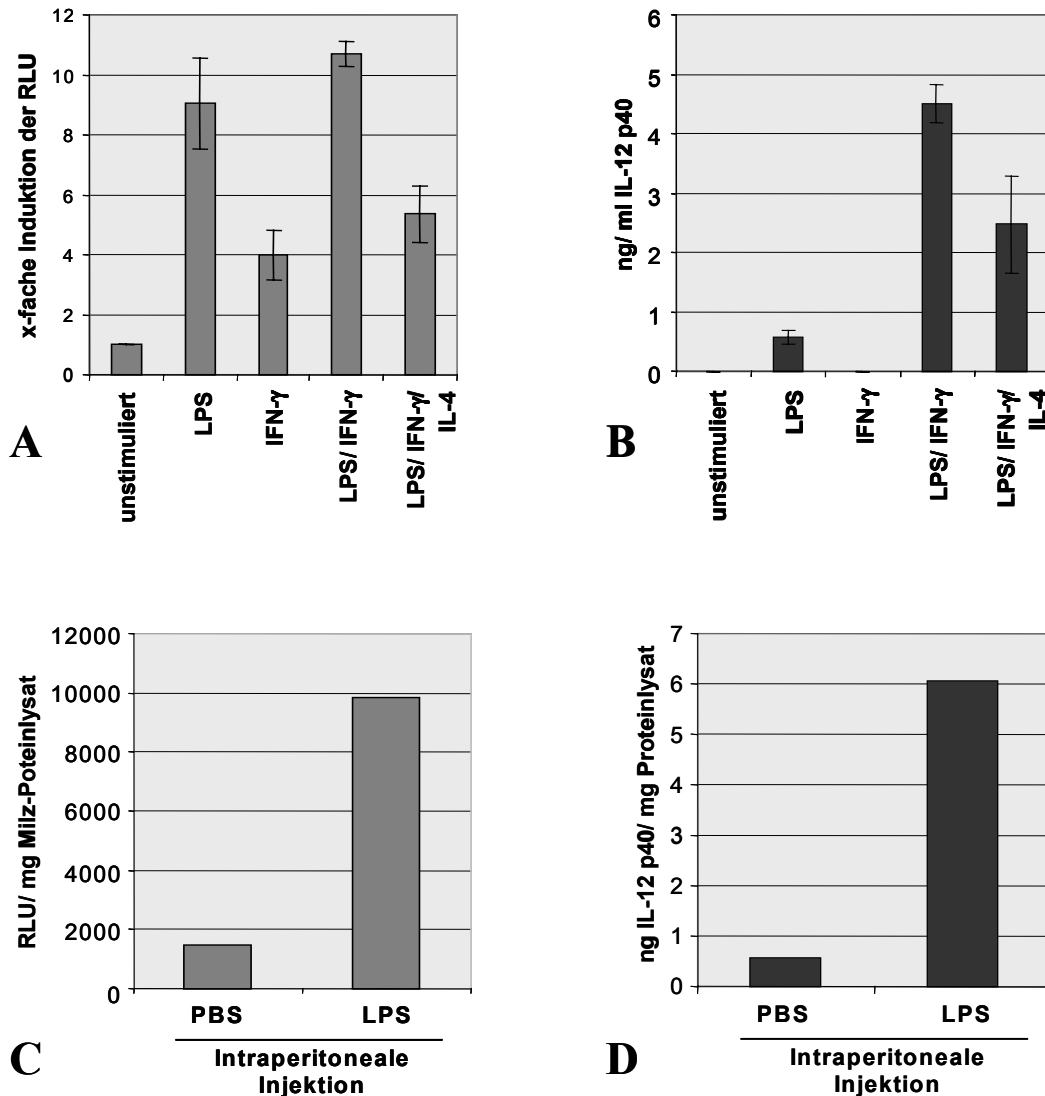


Abbildung 3.22 Die Expression des Transgens wird durch Stimulation mit LPS induziert.

(A+B) Die stimulationsabhängige Expression des Transgens in Peritonealmakrophagen. Peritonealmakrophagen wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, durch intraperitoneale Injektion von Brewer's Thioglykollat isoliert. Nach 3 Tagen wurden sog. Peritonealexudatzellen gewonnen, aus denen die Makrophagen schließlich durch Adhärenz angereichert wurden. Die Zellen wurden in Kultur genommen und für 24 Stunden (A) oder 48 Stunden (B) mit LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), IFN- γ (100 U/ml) und Interleukin-4 (5 ng/ml) stimuliert. Schließlich wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseexpression wurde im Zellysat bestimmt (A). (B) Kulturüberstände stimulierter Makrophagen wurden entnommen und mittels ELISA auf Interleukin-12 p40 untersucht. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. (C+D) Die LPS-abhängige Expression des Transgens in gesamten Milzen. Transgenen Mäusen wurde intraperitoneal 200 μl LPS (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS) oder PBS (Kontrolle) injiziert. Nach 4 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Milzen der Tiere entnommen. Die Milz wurde sofort homogenisiert und die Luziferaseexpression im Lysat bestimmt (A). (B) Mittels ELISA wurde im Lysat IL-12 p40 nachgewiesen. Gezeigt sind Daten eines repräsentativen Experimentes von insgesamt 4 Experimenten.

3.4.2 Die Untersuchung konstitutiver p40 Promotoraktivität in verschiedenen Organen transgener Mäuse

Um zu analysieren, ob in einem oder mehreren Organen transgener Mäuse der IL-12 p40 Promotor konstitutiv aktiv ist, wurden mehrere 6-8 Wochen alte Mäuse der F2-Generation getötet und deren Organe entsprechend den Angaben in Material und Methoden nach Homogenisation auf Luziferaseaktivität untersucht. Wie in Abbildung 3.23 gezeigt, konnte in den meisten Geweben nur wenig (bis ca. 1000 „Relative Light Units“ je mg Proteinlysate) Luziferaseaktivität nachgewiesen werden (Blut, Colon, Hirn, Leber, Niere und Herz). Eine moderate Expression (bis ca. 2000 „Relative Light Units“ je mg Proteinlysate) konnte in Milz und Lunge gemessen werden. Eine hohe bis sehr hohe konstitutive Luziferaseexpression wurde überraschenderweise im Testis (ca. 4000 RLU/ mg Protein im Gewebelysate) und insbesondere im Dünndarm (ca. 11000 RLU/ mg Protein im Gewebelysate) transgener Mäuse gefunden. Die Daten sprechen demzufolge für eine konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität im Testis und im Dünndarm.

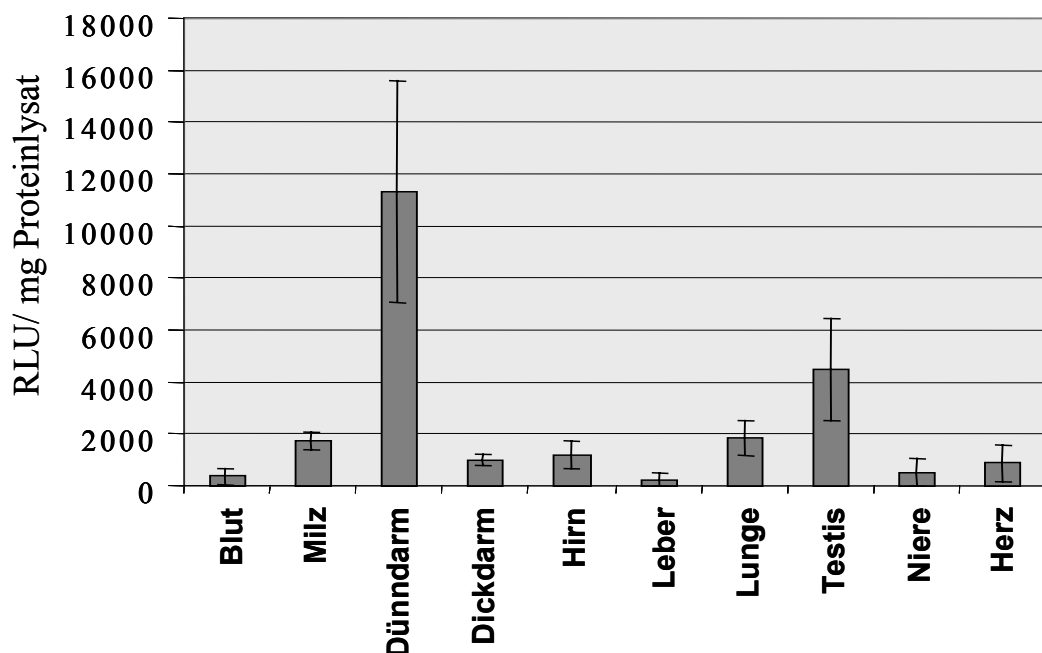


Abbildung 3.23 Konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität in verschiedenen Organen transgener Mäuse. 6-8 Wochen alte Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Organe der Tiere entnommen. Ein Teil jedes Organs wurde homogenisiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die gemessenen Werte wurden anhand der Proteinkonzentration normalisiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 unterschiedlichen Mäusen der „*Founder*“-Linie 1.

3.4.3 Untersuchung der konstitutiven Promotoraktivität im Darm transgener Mäuse

Die überraschend hohe konstitutive Luziferaseexpression im Dünndarm wurde weiterführend untersucht. Um zu prüfen, ob die konstitutive Luziferaseexpression im gesamten Dünndarm auftritt oder auf bestimmte Regionen beschränkt ist, wurde dieser in der ganzen Länge entnommen und in vier gleich lange Stücke geteilt (D1 bis D4). Dabei entsprach D1 dem proximalen Abschnitt und D4 dem am weitesten distal gelegenen Darmabschnitt. Die sog. Peyer'schen Plaques, Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe, wurde vom Darm abgelöst und zu Kontrollzwecken getrennt untersucht. Die Gewebeproben wurden dann homogenisiert und die Luziferase im Lysat bestimmt. Es zeigte sich, daß nahezu die gesamte Luziferaseaktivität in den distalen Dünndarmabschnitten (D3 und D4) vorhanden war, während man in proximalen Abschnitten (D1 und D2) nur eine basale Expression beobachten konnte (Abbildung 3.24). Im Bereich des terminalen Ileums (D4) war die durchschnittlich gemessene Luziferaseaktivität um den Faktor 10 bis 25 höher als im am weitesten proximal gelegenen Abschnitt D1. Die Daten sprechen somit für einen steilen Anstieg der konstitutiven IL-12 p40 Promotoraktivität vom proximalen zum distalen Dünndarmbereich hin. Im Gegensatz zum Dünndarm war im Kolon und im Caecum lediglich eine basale Aktivität nachweisbar. Im Lysat homogenisierter Peyer'scher Plaques fand sich dagegen eine erhöhte Luziferaseaktivität.

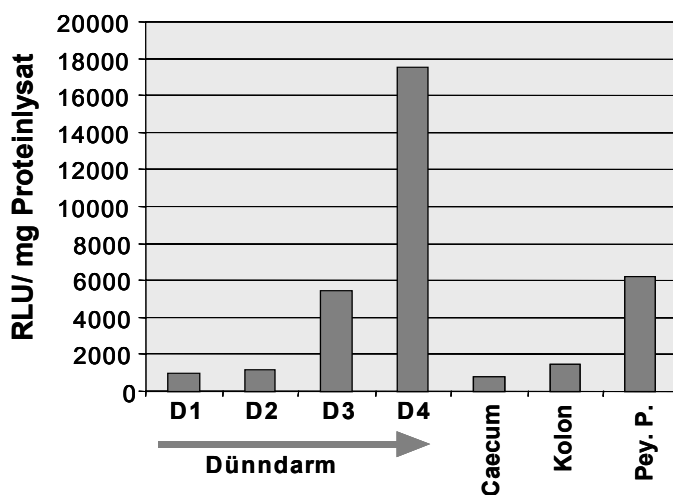


Abbildung 3.24 Hohe konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität im terminalen Ileum transgener Mäuse. 6-8 Wochen alte Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Darm der gesamten Länge nach entnommen. Der Dünndarm wurde in 4 Abschnitte geteilt, vom proximalen (D1) bis zum distalen (D4) Bereich. Die Gewebestücke wurden homogenisiert und die Luziferaseaktivität im Lysat bestimmt. Die gemessenen Werte wurden anhand der Proteinkonzentration normalisiert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob sich diese unterschiedliche konstitutive Aktivität des IL-12 p40 Promotors im proximalen und terminalen Dünndarmbereich auf die Expression von Interleukin-12 Protein auswirkt, wurden ELISA-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Darmabschnitte isoliert und homogenisiert und die Menge im Homogenisat enthaltenen IL-12 bestimmt. Es konnte festgestellt werden, daß die Konzentration von IL-12 im Abschnitten D4 durchschnittlich ca. doppelt so hoch war wie im Abschnitt D1 (Abbildung 3.25 A). Diese Steigerung war allerdings nicht signifikant und nicht bei allen Tieren zu beobachten.

Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß die erhöhte Luziferaseexpression im terminalen Ileum das Resultat einer dort möglicherweise erhöhten Anzahl von Makrophagen sein könnte. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden in einem Kryostat Gewebeschnitte der einzelnen Dünndarmabschnitte hergestellt und anschließend mit einem Chromogen markierten Antikörper für den Makrophagen-Oberflächenmarker Mac-1 gefärbt. Mac-1 positive Zellen im Darmquerschnitt wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Es konnte festgestellt werden, daß im Gegensatz zu der zuvor gestellten Vermutung die Zahl Mac-1 positiver Zellen im Bereich des terminalen Ileums in deutlich geringerer Zahl vorhanden sind als in den weiter proximal gelegenen Darmabschnitten (Abbildung 3.25 B). Da die starke Luziferaseexpression im terminalen Ileum nicht mit einer erhöhten Anzahl von Makrophagen korreliert wurde vermutet, daß der IL-12 p40 Promotor in Makrophagen des terminalen Ileums einen höheren Aktivitätsstatus haben könnte als in Makrophagen proximaler Darmabschnitte.

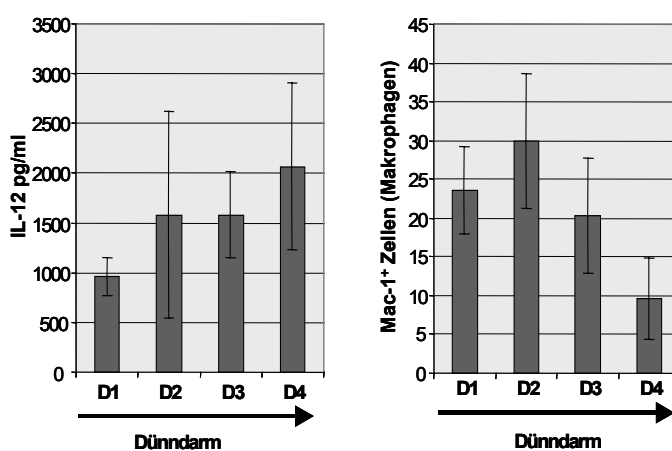


Abbildung 3.25 Analyse der IL-12 Proteinkonzentration und der Anzahl Makrophagen in einzelnen Abschnitten. (A) Gewebe der Darmabschnitte D1 bis D4 wurde homogenisiert und die Konzentration von IL-12 im Lysat durch spezifischen ELISA bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 5 Tieren. (B) Gewebe der Darmabschnitte D1 bis D4 wurde im Kryostat geschnitten. MAC-1+ Zellen wurden durch Immunfluoreszenz angefärbt und in jeweils 20 Gesichtsfeldern ausgezählt.

3.4.4 Unterschiedliche Komplexe binden in den einzelnen Darmabschnitten an das C/EBP- und NF- κ B-Motiv

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Gelretardationsexperimente mit den für den Promotor funktionell wichtigen C/EBP- und NF- κ B Motiven durchgeführt. Bei Verwendung des p40C/EBP-Oligonukleotids als Sonde zeigte sich eine gegenüber proximalen Darmabschnitten verstärkte Komplexbildung in Gewebeextrakten aus dem terminalen Ileum (Abbildung 3.26 A). Die Verwendung der p40NF- κ B Sonde ergab dagegen ein umgekehrtes Bild, mit einer sehr starken Komplexbildung, vor allem in proximalen Darmabschnitten (D1 und D2, Abbildung 3.26 B Spur 1-8). Zur Charakterisierung dieses Komplexes wurden Supershift-Analysen durchgeführt. Lediglich bei Verwendung eines Antikörpers gegen das NF- κ B Protein p50, nicht jedoch mit Antikörpern gegen p65 und c-Rel konnte ein *Supershift* beobachtet werden (Abbildung 3.26 B Spur 9-13).

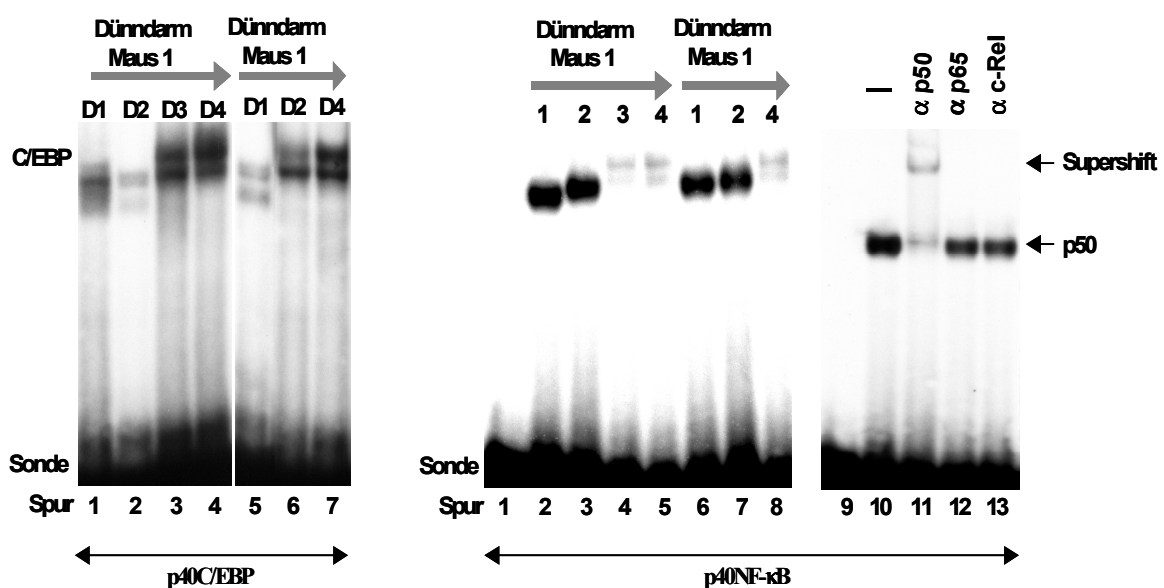


Abbildung 3.26 Gelretardationsexperimente mit Extrakten der Dünndarmabschnitte D1 bis D4 und der Aktivator motive des IL-12 p40 Promotors. Gewebe der Darmabschnitte D1 bis D4 wurde homogenisiert und die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt. 20 μ g Protein je Ansatz wurden mit einer p40C/EBP-Sonde (A) oder einer p40NF- κ B (B) inkubiert. In B (Spur 9-13) wurden Supershiftanalysen durchgeführt. Dazu wurde Extrakt des Darmabschnittes D1 mit jeweils 2 μ g eines spezifischen Antikörpers für 30 min. präinkubiert. Die Position des „Supershifts“ ist gekennzeichnet.

4. Diskussion

Die Produktion von Interleukin-12 ist eine der wichtigsten Eigenschaften von Monozyten und Makrophagen. IL-12 fördert einerseits die Entwicklung von Interferon- γ produzierenden T_H1-Zellen (Manetti et al., 1993; Marshall et al., 1995; DeKruyff et al., 1995), ist andererseits aber auch ein wichtiger Kostimulator der Expression von IFN- γ in T-Zellen und NK-Zellen (Murphy et al., 1994; DeKruyff et al., 1995). Somit kommt dem Zytokin eine entscheidende Rolle bei der Regulation zellvermittelter Immunität zu. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der humane Interleukin-12 p40 Promotor *in vivo* in Monozyten und Makrophagen strikt reguliert wird und daß diese Regulation auf einer Modulation der Bindung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B p50/ p65, C/EBP β und PU-1 am p40 Promotor beruht. Außerdem konnte ein bisher nicht bekanntes Repressorelement im IL-12 p40 Promotor identifiziert werden, welches in unstimulierten, nicht jedoch in stimulierten Monozyten und Makrophagen spezifisch von einem nukleären Faktor (GAP-12) gebunden wird. Die Suppression der Bindung von GAP-12 an seine Erkennungssequenz im p40 Promotor könnte demzufolge eine Voraussetzung für die Expression von IL-12 p40 als Antwort auf bakterielle Antigene sein.

4.1 Der proximale Promotor gewährleistet die stimulations- und gewebespezifische Expression des IL-12 p40 Gens

Der humane Interleukin-12 p40 Promotor wurde 1996 kloniert (Ma et al., 1996). Ein Vergleich zwischen der humanen und der murinen Promotorsequenz zeigt starke Homologien, insbesondere innerhalb ca 300 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (siehe Abbildung 4.1). Diese Tatsache legt nahe, daß der proximale Promotorbereich wichtige Kontrollelemente der zelltyp- und stimulusspezifischen Genexpression beinhaltet und wahrscheinlich auch die Mechanismen der transkriptionellen Regulation bei beiden Spezies im Verlauf der Evolution konserviert wurden. Eine Analyse dieses konservierten Promotorbereichs zeigt Sequenzhomologien

zu Erkennungsmotiven für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, unter anderem AP1, ETS, Ikaros, C/EBP, NF- κ B, NF1, YY1 und OCT-1 (siehe Abbildung 4.1).

```

-685 tgagcaca-g-gatgtgcacata---tttgagtccttattagtggtacacgcagttttatcatctccccaggtctgtgtctgtatgaa
-602 taagcataagagacgcctcaaaacactagactttttattagttattcac-----ctccccagagctgtccctggatgaca

                                     NF1/YY1
-603 atgtgcatgggtgtgtgtgtgcacgcgtgtgttccactcggggaatgtggggagaggtgcatggagccaaagatgggtggtaaatagt
-527 gacaacatagg-----tattgaggtaggggtacgtggagccaaacagga-ggtaa-----

-515 atgtttctgaaattaaaggactaatgtggaggaaggcggccagatgtactaaacctttgccttcatctcatcctctctgac-ttgg
-477 taccttctg-aattagatg-ctaac-----aag-----aaa-----acatggg

-428 gaa---gaaccag---gattttgttttaagcccttgggcat---ac---agtgttccatcccagacatgaactca-g-cctcccg
-441 gaaaggtggcccagatcactaggccctttattcttgggctgtaacacactacttatttgatgtggcatgaac-catgaact-cgg

                                     C/EBP/ETS
-356 tctgaccgcccttggccttccttcttctcgtatctgtggaacccagggga-atctgcctagtctgtctccaagcaccttggccatga
-355 tttg---g-ggcaagtcttcttcttctcagctctgtggaatcgggagaggttagcc-attgccctctatccaccttaggcatga

    C/EBP          OCT          Ikaros          API ETS-Motiv          Ikaros
-269 tghtaaaccagagaaaattagcatctccatctccttcttattccccacccaaaagtcatttccctcttagttcattacctgggattttg
-272 tghtaaac---agaaattagtatctctgcctccttcttccccaccccgaaagtcatttccctctta-----acctgggattttg

          Ikaros          GATA-Motiv          ETS          NF- $\kappa$ B-Motiv
-181 atgtctatgttccctcctcgttatgtgatacacacagagagagacaacaaaaa---aggaacttcttgaattccccagaaggt
-195 acgtctatattccct-ct-g-ta-tgatagatgcactcagggaggcaagggggaggagggaacttcttgaattccccagaatgt

          C/EBP-Motiv          API          ETS          TATA-
-97 tttgagagttgttttcaatgtttgca-----caagtcagtttctagtttaagtttccatcagaa-----aggagtagagtatat
-111 tttgacactagttttcaatgtttgcaatgtgagactagtcagtttctactttgggtttccatcagaaagttctgtaggagtagagtatat

    Box          TSS
-23 aagttccagtagcagcaacagcagcagcagaagaaa Humane Sequenz
-23 aagcaccaggagcagccaaggcagcagaaggaa Murine Sequenz

```

Abbildung 4.1 Vergleich des humanen und murinen IL-12 p40 Promotors. Die Sequenzen zeigen den „kodierenden“-Strang des humanen (oben) und murinen (unten) Promotors. Größere Bereiche mit hoher Sequenzhomologie sind durch graue Unterlegung gekennzeichnet. Die Kästchen zeigen die Position der in der vorliegenden Arbeit näher charakterisierten Transkriptionsfaktor-Motive. Außerdem sind weitere Homologien zu Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der humane Promotor als 815 bp Fragment (-748 bis +67 relativ zur Transkriptionssatrtstelle) kloniert und funktionell charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß der proximale Promotor ausreichend Sequenzinformation enthält, um in transienten Transfektionen, aber auch im chromosomalen Kontext transgener Mäuse eine gewebe- und stimulusspezifische Expression in Monozyten und Makrophagen zu gewährleisten. Dafür sprechen folgende Ergebnisse: (1) In transienten Transfektionen war das p40 Promotor/ Reporter-genkonstrukt nur in Monozyten- und Makrophagen-Zelllinien aktiv, nicht jedoch in T-Zelllinien, B-Zelllinien oder nicht-lymphoiden Zelllinien. Eine wichtige Ausnahme bildete dabei die Ebstein-Barr Virus

(EBV) transformierte B-Zelllinie Raji, in der das transfizierte p40 Promotorkonstrukt durch PMA/ Ionomycin induzierbar war. Von EBV⁺ B-Zelllinien ist bekannt, daß sie große Mengen Interleukin-12 produzieren (Kobayashi et al., 1989; Benjamin et al., 1998). Die Transformation primärer B-Zellen mit EBV *in vitro* führt zu einer hohen Produktion von IL-12 (Yoshimoto et al., 1998). Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe belegen die wichtige Funktion des LMP1-Proteins von EBV. Zellen, die lediglich mit einem Expressionsvektor für dieses Protein transfiziert wurden, produzierten daraufhin IL-12. Man vermutet, daß LMP1 in diesem Zusammenhang über die Aktivierung von NF-κB wirkt. (2) Die Analyse der Luziferaseaktivität in isolierten Milzzellen IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgener Mäuse zeigte eine hohe Reporterogenaktivität in Makrophagen, nicht jedoch in T-Zellen oder B-Zellen. (3) Der IL-12 p40 Promotor war entsprechend den Daten der p40-spezifischen RT-PCR Ergebnisse in RAW264.7 Makrophagen und in primärer Monozyten durch LPS und Interferon-γ synergistisch aktivierbar. (4) Durch LPS-Stimulation von Peritonealmakrophagen transgener Mäuse sowie in Milzen transgener Mäuse, denen eine subletale Dosis LPS injiziert wurde, war die IL-12 p40 Promotoraktivität gemessen als Luziferaseaktivität gegenüber den Kontrollen stark induziert.

Transkriptionsfaktoren, die an den proximale Promotor binden, sind demzufolge wichtige Regulatoren der geordneten Expression von Interleukin-12 in Monozyten und Makrophagen. Allerdings kann aufgrund der hier erhobenen Daten die Beteiligung distaler cis-regulatorischer DNA-Elemente wie *Enhancer* oder *Silencer* an der Feinregulation des Promotors nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.2 Der IL-12 p40 Promotor wird in humanen Monozyten durch die Interaktion von C/EBPβ, NF-κB p50/p65 und PU.1 mit ihren Zielsequenzen aktiviert

Die Ergebnisse erster funktioneller Untersuchungen zur Regulation des IL-12 p40 Promotors in Zelllinien implizierten die Bindung regulatorischer Proteine an ein C/EBP, NF-κB und ETS-Bindungsmotiv (Murphy et al., 1995; Ma et al., 1996; Plevy et al., 1997). Studien zeigten jedoch, daß sich die Mechanismen transkriptioneller Regulation in Zelllinien *in vitro* deutlich von den Mechanismen in primären Zellen *in vivo*

unterscheiden können. Außerdem unterscheiden sich die Ergebnisse solcher Studien häufig in Abhängigkeit von den verwendeten Zelllinien. So wurde beispielsweise bei der Regulation des TNF- α Promotor in einer T-Zelllinie, basierend auf *in vitro* Bindungsstudien, eine wichtige Funktion für Transkriptionsfaktoren der NFAT-Proteinfamilie postuliert (Tsai et al., 1996). NFAT-Proteine binden der Studie zufolge an mehreren Stellen des Promotors. *In vivo* footprinting Studien des TNF- α Promotors in primären T-Zellen zeigten jedoch, daß lediglich eines dieser Promotorelemente *in vivo* eine Protein/ DNA-Interaktion eingeht (Becker et al., 1999). Die Charakterisierung dieses Promotorelements in primären T-Zellen ergab die Bindung von NF- κ B. Eine Rolle für NFAT konnte dagegen nicht gefunden werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen deutlich die Notwendigkeit der Untersuchung von Protein/ DNA-Interaktionen *in vivo* in primären Zellen.

Um Einblicke in die molekularen Mechanismen der Regulation der Interleukin-12 Expression *in vivo* zu erlangen, wurde in wesentlichen Teilen der vorliegenden Arbeit mit primären Monozyten gearbeitet.

4.2.1 Die LPS/ Interferon- γ stimulierte Expression des IL12-p40 Gens in humanen Monozyten

Mit Hilfe von ELISA-Experimenten konnte in humanen Monozyten die Induktion der IL-12 p40 und p70 Proteinsekretion nach spezifischer Stimulation mit bakteriellen Antigenen wie LPS und SAC gezeigt werden. Durch Verwendung p40 spezifischer RT-PCR konnte weiter gezeigt werden, daß dies mit einem transienten Anstieg nachweisbarer p40 mRNA Transkripte in primären Monozyten einhergeht und daß diese Induktion nicht von einer Neusynthese von Proteinen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, abhängig ist. Dies impliziert, daß die transkriptionelle Regulation ein wichtiger Kontrollmechanismus der Expression von Interleukin-12 p40 in humanen Monozyten ist. Wie bereits von anderen Autoren beschrieben (D'Andrea et al., 1993; Cassatella et al., 1995), führte die zusätzliche Stimulation mit Interferon- γ zu einer deutlichen Verstärkung der LPS-abhängigen Synthese von p40 mRNA in Monozyten. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten implizieren eine schnelle Induktion der IL-12 p40 Genexpression nach dem Kontakt humaner Monozyten mit bakteriellen Antigenen wie Lipopolysaccharid oder Staphylococcus Aureus Zellen.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte ferner demonstriert werden, daß Interleukin-10 und Interleukin-4 in CD14⁺ Monozyten Inhibitoren der Expression von IL-12 p40 Protein und mRNA sind (D'Andrea et al., 1993; D'Andrea et al., 1995; Koch et al., 1996; Levings et al., 1999). Interleukin-10 ist als potenter Inhibitor der Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine in Monozyten und Makrophagen bekannt (Bogdan et al., 1991; Fiorentino et al., 1991). Ihm kommt somit eine wichtige Funktion bei der Begrenzung T_H1-vermittelter Immunantworten zu. Über den Mechanismus der Inhibition der IL-12 Expression durch Zytokine wie IL-10 und IL-4 ist bisher nur wenig bekannt. Allerdings konnten Aste-Amezaga et al. (1998) zeigen, daß die Inhibition durch IL-10 abhängig von *de novo* Proteinsynthese ist und sich auf die transkriptionelle Aktivierung des IL-12 p40 Gens auswirkt.

Da die in der vorliegenden Arbeit isolierten humanen Monozyten offensichtlich alle für eine regulierte Expression notwendigen Faktoren wie Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle besitzen, wurden sie zur Untersuchung der IL-12 p40 Promotorregulation *in vivo* verwendet. Um Protein/DNA-Interaktionen im Bereich des IL-12 p40 Promotors im chromosomalen Umfeld zu untersuchen, wurde *in vivo* footprinting in lebenden humanen Monozyten durchgeführt. Dabei konnte nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS und Interferon- γ die Protektion oder Hyperreaktivität mehrerer Nukleotide im Bereich einer degenerierten NF- κ B Erkennungssequenz (-115 bis -105), einer stromabwärts gelegenen C/EBP-Erkennungssequenz (-80 bis -72) sowie einer ETS-Erkennungssequenz (-210 bis -205) festgestellt werden. In unstimulierten Zellen war dagegen keine veränderte DMS-Reaktivität im Bereich dieser Motive nachweisbar. Dies impliziert die Bindung von regulatorischen Proteinen an die entsprechenden Motive *in vivo* in humanen Monozyten nach Stimulation mit LPS und Interferon- γ und spricht für eine wichtige Rolle dieser Promotorelemente bei der Regulation des IL-12 p40 Promotors.

4.2.2 Ein Heterodimer aus p50/ p65 bindet an das NF- κ B-Motiv in LPS-stimulierten Monozyten

Das im IL-12 p40 Promotor *in vivo* protektierte NF- κ B Motiv (5'-GAAATTCCCC-3') weicht deutlich von einer *Consensus* NF- κ B-Erkennungssequenz (5'-GGGRHTYYCC-3') ab. Dennoch konnten verschiedene Arbeitsgruppen in Abhängigkeit der

verwendeten Zelllinie *in vitro* die Bindung von p50, p65 und c-Rel an diese Sequenz zeigen (Murphy et al., 1995; Yamada et al., 1997). NF- κ B wird in Makrophagen durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli, wie beispielsweise zellulärer Stress oder Zytokine, aktiviert. Dennoch wird der IL-12 p40 Promotor sehr spezifisch induziert. Möglicherweise ist die Abweichung der NF- κ B-Erkennungssequenz im p40 Promotor von der idealisierten Erkennungssequenz ein Mechanismus der Affinitätsregulation und somit im Sinne einer stringenten Promotorregulation. Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen von Muroi et al. (1993), die zeigen konnten, daß Abweichungen von der idealisierten NF- κ B-Erkennungssequenz einen starken Einfluß auf die stringente Regulation LPS-aktivierter Gene haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Kompetitions- und Supershiftexperimenten gezeigt werden, daß in LPS-stimulierten primären Monozyten NF- κ B Komplexe aus p50/ p65 an dieses Element binden. Die Bindung von p50/cRel dagegen konnte in stimulierten humanen Monozyten nicht gezeigt werden. NF- κ B Transkriptionsfaktoren werden im Zytoplasma ruhender Zellen durch I- κ B Proteine zurückgehalten. Nach Stimulation der Zellen mit LPS dissoziiert der Komplex und NF- κ B transloziert in den Nukleus, wo es an seine Erkennungssequenz an Promotoren binden kann. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist die Translokation in den Zellkern der wichtigste regulatorische Schritt der NF- κ B vermittelten Genregulation (Neurath et al., 1998). Durch die Verwendung nukleärer Zellextrakte für Bindungsstudien wurde in der vorliegenden Arbeit aktiviertes NF- κ B Protein nachgewiesen. Die zusätzliche Stimulation mit IFN- γ führte weder selbst zu einer Translokation von NF- κ B Protein in den Zellkern, noch verstärkte es die LPS-vermittelte Translokation von NF- κ B Proteinen in primären Monozyten. Somit scheint die koaktivierende Funktion von IFN- γ in diesen Zellen nicht durch das NF- κ B-Motiv vermittelt zu sein.

In Übereinstimmung mit diesen Bindungsstudien führte die Überexpression von p50/p65 in RAW264.7 Makrophagen zu einer deutlichen, die Überexpression von p50/ c-Rel zu einer moderaten Transaktivierung des humanen IL-12 p40 Promotors. Dies steht im Widerspruch zu einer Publikation von Murphy und Kollegen, die postulierten, daß p50/ c-Rel der transaktivierende Komplex sei, da nur dieses Heterodimer, nicht jedoch p50/ p65 in der L929 Fibroblastenzelllinie zu einer Transaktivierung des murinen IL-12 p40 Promotors führte (Murphy et al., 1995). Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf die von den Autoren verwendete Zelllinie zurückzuführen.

Die funktionelle Bedeutung des NF- κ B-Elements für die induzierbare Aktivität des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen wurde durch die stark verminderte Promotoraktivität nach gerichteter Mutagenese des Motivs unterstrichen. Der Promotor mit mutiertem NF- κ B-Motiv war um 50 % weniger induzierbar als der Wildtyp-Promotor. Die Charakterisierung des NF- κ B-Motivs impliziert somit eine wichtige Rolle für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B p50 und p65 bei der LPS-abhängigen Induktion des Interleukin-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen.

4.2.3 C/EBP β bindet an den IL-12 p40 Promotor und ist ein starker Transaktivator der Promotoraktivität

Das C/EBP-Motiv des IL-12 p40 Promotors rekrutiert in humanen Monozyten, wie bereits für RAW264.7 Makrophagen beschrieben (Plevy et al., 1997), den Transkriptionsfaktor C/EBP β . Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Supershift- und Kompetitions-Experimente sowie durch Bindungsstudien mit rekombinantem C/EBP β -Protein gezeigt. Verschiedene Studien konnten belegen, daß C/EBP β in Monozyten und Makrophagen durch LPS-Stimulation aktiviert werden kann (Scott et al., 1992; Wedel et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor wurde im Zusammenhang mit der Aktivierung verschiedener Zytokingene (z.B. IL-6, IL-8, TNF α und MIP-1 α) diskutiert (Cao et al., 1991; Godambe et al., 1994; Grove et al., 1993; Matsusaka et al., 1993; Pope et al., 1994; Stein et al., 1993).

Während in Gelshift-Experimenten die Bindung von p50/p65 an die NF- κ B-Bindungsstelle in primären Monozyten und peritonealen Makrophagen durch LPS stark induzierbar war, bildete C/EBP β *in vitro* einen stimulationsunabhängigen, konstitutiven Komplex. Dies zeigt, daß C/EBP β in primären Monozyten konstitutiv im Zellkern vorhanden ist und im Gegensatz zu NF- κ B nicht hauptsächlich durch Translokation reguliert wird. Die *in vivo* footprinting Ergebnisse sprechen jedoch für eine stimulationsabhängige Protein/ DNA-Interaktion an der C/EBP-Bindungsstelle. Möglicherweise muß C/EBP β *in vivo* nach Stimulation posttranslationell modifiziert werden, um an seine Erkennungssequenz im p40 Promotor binden zu können. Für diese These spricht, daß die Aktivität von C/EBP β von einer Reihe von Signaltransduktionswegen beeinflusst wird und nicht von einer Neusynthese von Protein (Clarkson et al.,

1995; Metz et al., 1991; Ramji et al., 1993; Trautwein et al., 1993; Yin et al., 1996). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von Threonin-235 durch eine ras-abhängige MAP-Kinase wichtig für die Transaktivierung durch C/EBP β ist (Nakajima et al., 1993). Andere Autoren beschrieben die funktionell wichtige Phosphorylierung von Serinresten durch die Enzyme Proteinkinase C, bzw. CaMKII (Wegner et al., 1992; Mahoney et al., 1992). Williams et al. (1995) beschrieben eine regulatorische Domäne im C/EBP β -Protein, über die die Affinität zu seiner Erkennungssequenz reguliert wird.

Die funktionelle Bedeutung des C/EBP-Elements für die induzierbare Aktivität des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen wurde durch die stark verminderte Promotoraktivität nach gerichteter Mutagenese dieser Motive unterstrichen. Der Promotor mit mutiertem C/EBP-Motiv war dabei um ca. 75 % weniger aktiv als der Wildtyp-Promotor. Die Überexpression von C/EBP β in RAW264.7 Makrophagen führte zu einer starken Transaktivierung des humanen IL-12 p40 Promotors. C/EBP β agiert dabei wahrscheinlich ausschließlich über das Erkennungsmotiv 80 bp stromaufwärts der TSS, denn die Mutation dieses Motivs führte zu einer vollständigen Aufhebung des transaktivatorischen Effekts. Interessanterweise inhibierte im Gegensatz zu C/EBP β die Überexpression von C/EBP α die IL-12 p40 Promotoraktivität. C/EBP α wird im hämatopoetischen System vor allem in proliferierenden myelomonozytischen Zellen stark exprimiert, in ausgereiften Zellen jedoch kaum noch (Scott et al., 1992; Natsuka et al., 1992). C/EBP β dagegen wird insbesondere in reifen Monozyten und Makrophagen stark exprimiert (Hu et al., 1998). Möglicherweise ist C/EBP α in undifferenzierten Zellen an der Repression des Promotors beteiligt, während es nach Reifung der Zellen von C/EBP β verdrängt wird. Weitere Unterstützung für eine wichtige Rolle von C/EBP β für die Expression von Interleukin-12 kommt von Studien in C/EBP β Knockout-Mäusen (Screpanti et al., 1995). Die Mäuse waren dieser Studie zufolge sehr anfällig gegenüber einer Infektion mit intrazellulären Pathogenen. In Makrophagen dieser Tiere konnte eine unzureichende Aktivierbarkeit, verbunden mit einer defizienten IL-12 Produktion, beobachtet werden. Außerdem konnten Plevy und Kollegen zeigen, daß in Makrophagen, in denen die dominant-negative C/EBP β -Isoform LIP überexprimiert wurde, der IL-12 p40 Promotor durch LPS nicht mehr induzierbar war (Plevy et al., 1997; Descombes et al., 1991).

4.2.4 Der Transkriptionsfaktor PU.1 bindet die ETS-Erkennungssequenz im humanen IL-12 p40 Promotor

Ein verändertes Methylierungsmuster nach Stimulation primärer Monozyten mit LPS und IFN- γ wurde auch an einem mutmaßlichen ETS-Motiv gefunden, was die Bindung eines Proteins an dieses Motiv in stimulierten Monozyten vermuten ließ. In einer früheren Veröffentlichung konnten Ma und Kollegen zeigen, daß der Transkriptionsfaktor PU.1 in unstimulierten RAW264.7 Makrophagen an dieses Motiv bindet (Ma et al., 1997). Nach Stimulation der Zellen mit LPS und IFN- γ dagegen war die PU.1 Bindung nicht mehr nachweisbar. Stattdessen konnte die Bindung eines Multiproteinkomplexes, bestehend aus den Transkriptionsfaktoren ETS-2, IRF-1, c-Rel und GLp109, beobachtet werden. Der Komplex war abhängig von einer intakten ETS-Sequenz und trat nur auf, wenn ein Oligonukleotid von 90 Basenpaaren verwendet wurde. Die Bedeutung dieses Komplexes für die Promotorregulation in primären Zellen ist allerdings unklar, da ein entsprechender Komplex in primären Mausmakrophagen von den Autoren nicht bestätigt werden konnte (X. Ma, persönliche Kommunikation). In der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung von PU.1 an dieses ETS-Motiv in unstimulierten humanen Monozyten bestätigt werden. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Daten war die Bindung von PU.1 allerdings auch nach Stimulation der Zellen mit LPS/IFN- γ nachweisbar, nicht jedoch der von den Autoren beschriebene Multiproteinkomplex. PU.1 scheint demzufolge *in vivo* in Monozyten an der transkriptionellen Regulation der IL-12 p40 Expression beteiligt zu sein. PU.1 ist ein Schlüsselregulator myeloider Gene. Es wird in Monozyten sehr stark exprimiert und in Übereinstimmung damit besitzen viele Promotoren myeloidspezifischer Gene regulatorische PU.1 Bindungsstellen (Pahl et al., 1993; Zhang et al., 1994; Smith et al., 1996; Kominato et al., 1995; Grove et al., 1993). Von PU.1 konnte gezeigt werden, daß seine Aktivität durch die Phosphorylierung von Serin 148 reguliert werden kann und daß dies essentiell für die LPS-abhängige Transaktivierung durch PU.1 ist (Mao et al., 1996; Lodie et al., 1997). Eine solche posttranslationelle Modifikation von PU.1 ist möglicherweise auch für die Transaktivierung des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen essentiell, denn *in vivo*, nicht jedoch *in vitro*, war die Bindung von PU.1 an sein Erkennungsmotiv in primären Monozyten stimulationsabhängig.

Die Mutation der für die Bindung des Transkriptionsfaktors wichtigen ETS-Erkennungssequenz führte zu einer ca. 60 % Inhibition der induzierbaren Promotor-

aktivität in RAW264.7 Makrophagen. Dies belegt die funktionelle Relevanz der Bindung von PU.1 für die LPS/ IFN- γ stimulierte Expression von Interleukin-12.

4.3 Die Repression des IL-12 p40 Promotors durch GAP-12

Die deregulierte Expression von Interleukin-12 hat einen starken Einfluß auf zellvermittelte Immunantworten. Dies legt die Vermutung nahe, daß negativ regulatorische Elemente im p40 Promotor die Expression des Gens kontrollieren. In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in vivo* footprinting in primären Monozyten ein bisher unbekanntes Element im IL-12 p40 Promotor identifiziert werden. Dieses Element wurde GA-12 genannt. Es konnte gezeigt werden, daß GA-12 *in vivo* in unstimulierten Monozyten vor Methylierung durch Dimethylsulfat geschützt war, nicht jedoch nach Stimulation von Monozyten mit LPS/ Interferon- γ . Diese Beobachtung läßt auf Protein/DNA-Interaktionen in unstimulierten, nicht jedoch in stimulierten Monozyten schließen. Die Analyse der Promotorsequenz in diesem Bereich ergab, daß die am stärksten protektierte Base Teil eines GATA-Erkennungsmotivs 155 Basen stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle ist. Dieser Bereich ist zwischen dem murinen und humanen Interleukin-12 p40 Promotor sehr gut konserviert (siehe Abbildung 4.1). Gelretardationsexperimente demonstrierten die sequenzspezifische Bindung eines GAP-12 genannten Komplexes an dieses Motiv in Monozyten und Makrophagen. Interessanterweise führte die Stimulation von primären Monozyten und RAW264.7 Makrophagen zu einer drastischen Reduktion der Bindung von GAP-12, verbunden mit einer Aufhebung der Protein/DNA-Interaktion an dem GA-12 Element *in vivo*.

Mehrere Gründe sprechen dafür, daß GAP-12 ein GATA-ähnlicher Proteinkomplex ist: (1) GAP-12 bindet im Bereich der GATA-Sequenz des GA-12 Motivs. (2) Der GAP-12 Komplex konnte in unstimulierten, humanen Monozyten durch einen Überschuß einer bona-fide GATA-Sonde verdrängt werden. (3) Bei Benutzung einer bona-fide GATA-Erkennungssequenz als Sonde mit Extrakt humaner Monozyten kam es zur Ausbildung eines Komplexes der im Gel auf gleicher Höhe mit dem GAP-12 Komplex migrierte. (4) Dieser GATA-Komplex wurde entsprechend dem GAP-12 Komplex durch Stimulation primärer Monozyten mit LPS oder LPS/ IFN- γ drastisch herunterreguliert.

In der Literatur ist nur wenig über GATA-Transkriptionsfaktoren in Monozyten und Makrophagen bekannt. Außerdem wurde postuliert, daß die Herunterregulation von GATA-1 und GATA-2 wichtig für die myeloide Differenzierung sei (Tenen et al., 1997). Interessanterweise wurden aber in einer Reihe myeloidspezifischer Promotoren GATA-Bindungsstellen gefunden, die zumindest *in vitro* auch GATA-Proteine binden können. Dies konnte beispielsweise auch für den PU.1 Promotor gezeigt werden (Chen et al., 1995; Pahl et al., 1992). Die ektopische Überexpression von GATA-1 oder GATA-2 verminderte die PU.1 Promotoraktivität in diesen Studien um den Faktor zwei (Pahl et al., 1993). Die Überexpression von GATA-1 und GATA-3 führte in Experimenten der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer dosisabhängigen Repression des IL-12 p40 Promotors in RAW264.7 Makrophagen. Die Überexpression einer dominant negativen GATA-3 Mutante führte dagegen insbesondere in unstimulierten Makrophagen zu einer dosisabhängigen Hyperaktivierung des Promotors. Die verwendete Mutante, so wurde von Smith et al. (1995) gezeigt, bindet zwar noch an ihr Erkennungsmotiv, ist aber nicht mehr in der Lage, eine transkriptionelle Funktion zu erfüllen. Diese Resultate weisen auf die Repression des IL-12 p40 Promotors durch DNA-bindende GATA-Proteine in unstimulierten RAW264.7 Makrophagen hin.

Die repressorische Wirkung von GAP-12 auf die IL-12 p40 Promotoraktivität in Monozyten konnte durch mehrere Experimente gezeigt werden: (1) Eine gerichtete Mutagenese innerhalb des GA-12 Motivs führte einerseits zur Aufhebung der GAP-12 Bindung in Gelretardationsexperimenten und gleichzeitig auch zu einer Verstärkung der IL-12 p40 Promotoraktivität in Reporteranalysen. (2) Eine Protein/ DNA Interaktion am GA-12 Motiv wurde nur in unstimulierten Monozyten beobachtet, nicht jedoch in stimulierten, IL-12 produzierenden Monozyten. (3) Die GAP-12 Komplexbindung in primären Monozyten, die mit IL-4 oder Prostaglandin-E2 stimuliert wurden, war deutlich verstärkt. Beides sind Mediatoren einer T_H2-Immunantwort und Inhibitoren der IL-12 Synthese in Monozyten und Makrophagen (D'Andrea et al., 1995; Van-der-Pouw et al., 1995; Koch et al., 1996; Levings et al., 1999; Monteleone et al., 1999).

Interessanterweise wurde gezeigt, daß GATA-Proteine in der Lage sind, durch direkte Protein/ Protein Interaktion die transaktivatorische Funktion von PU.1 zu reprimieren (Zhang et al., 1999). GATA-1 und GATA-2 waren diesen Studien zufolge in der Lage, über eine unter GATA-Proteinen konservierte Zink-Finger-Domäne mit der Helix-Turn-Helix-Domäne von PU-1 zu interagieren und dabei myeloidspezifische Gene zu inhibieren. Möglicherweise funktioniert auch GAP-12 als Repressor der PU.1 ver-

mittelten Promotoraktivierung. Die Bindung von GAP-12 am Promotor könnte dabei die Interaktion durch räumliche Nähe erleichtern.

Die strikte Korrelation der GAP-12 Bindung auf der einen und der Repressorfunktion auf der anderen Seite impliziert eine wichtige Rolle von GAP-12 bei der Kontrolle der IL-12 p40 Promotoraktivität.

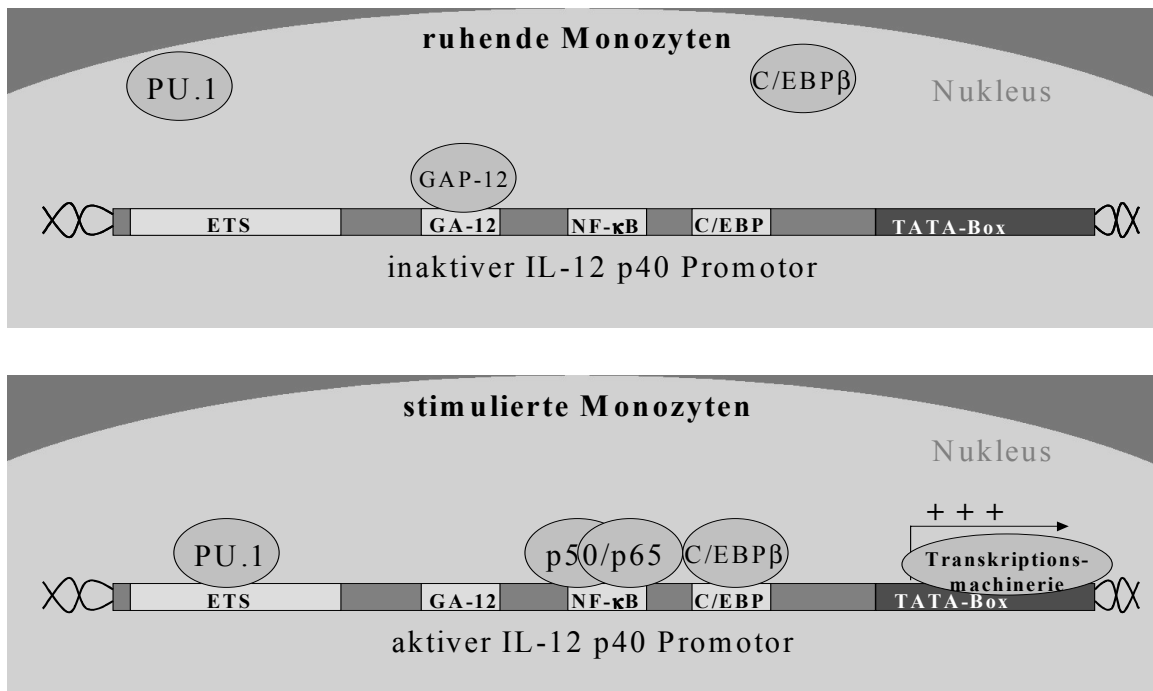


Abbildung 4.2 Modell der Regulation des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen

4.4 Ein kooperativer Mechanismus der LPS-vermittelten IL-12 p40 Promotoraktivierung

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen für eine komplexe Regulation des IL-12 p40 Promotors und implizieren ein Modell, bei dem die Stimulation humaner Monozyten mit LPS und Interferon- γ zu einer koordinierten Bindung von NF- κ B p50/p65, C/EBP β und PU.1 an ihre Erkennungssequenzen, verbunden mit einer schnellen Aktivierung des Interleukin-12 p40 Promotors führt. Interessanterweise scheinen diese Transkriptionsfaktoren bei der Regulation verschiedener Promotoren physikalisch und funktionell miteinander zu interagieren. Eine solche Synergie wurde im Zusammenhang

mit der Regulation der IL-6 und IL-8 Promotoren zwischen C/EBP und NF- κ B in der Literatur beschrieben (Natsuka et al., 1992; Stein et al., 1993). Bei diesen Genen konnten im Promotorbereich benachbarte, funktionell relevante NF- κ B und C/EBP-Motive identifiziert werden, über die die daran bindenden Faktoren physikalisch miteinander in Kontakt treten. Bei der LPS-abhängigen Aktivierung des Serum Amyloid A Gens wurde außerdem ein ternärer Komplex aus C/EBP und NF- κ B beschrieben (Ray et al., 1995). Die Daten von Stein et al. (1993) legen nahe, daß es sich bei diesem Kontakt um eine Wechselwirkung der Rel-Domäne von NF- κ B mit der bZIP-Domäne von C/EBP handelt. Möglicherweise ist eine solche Interaktion auch bei der synergistischen Aktivierung des IL-12 p40 Promotors wichtig. Beide Bindungsmotive befinden sich in räumlicher Nähe zueinander, was eine solche Interaktion fördern könnte. Die Kooperation von Faktoren, die an das ETS- und an das NF- κ B Motiv binden, wurden schon von Gri et al. (1998) bei der Aktivierung des IL-12 p40 Promotors in EBV-transformierten B-Zelllinien postuliert. Die Kooperation von C/EBP, NF- κ B und ETS Transkriptionsfaktoren bei der Regulation makrophagenspezifischer Genexpression konnte bereits bei der Regulation des MIP-1 α -Gens in Monozyten und Makrophagen gezeigt werden (Grove et al., 1993).

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen ebenfalls für die Kooperation von p50/p65, C/EBP β und PU.1 bei der regulierten Expression des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen: (1) *In vivo* Footprinting Experimente zeigten immer die simultane Besetzung der Erkennungsmotive nach Stimulation mit LPS und Interferon- γ . (2) Die Mutation des NF- κ B und C/EBP-Motivs sowie des NF- κ B und ETS-Motivs, nicht jedoch des C/EBP und ETS-Motivs, führte gegenüber den Einzelmutanten zu einer weiter verringerten Promotoraktivität, was auf eine funktionelle Synergie der jeweiligen Elemente für die induzierbare Promotoraktivität schließen läßt.

Die Schlüsselrolle von NF- κ B p50/p65, C/EBP β und PU.1 liefert auch eine mögliche Erklärung für die Induktion des humanen IL-12 p40 Promotors nach LPS-Stimulation in Abwesenheit von Protein-Neusynthese, wie mit der Induktion der p40 mRNA in humanen Monozyten in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid gezeigt wurde. Jeder der Faktoren ist bereits als transkriptionell inaktiver Komplex in Monozyten und Makrophagen vorhanden und kann nach Kontakt der Zellen mit bakteriellen Antigenen wie LPS durch posttranslationelle Modifikation schnell mobilisiert oder aktiviert werden. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung wird LPS als Bestandteil der Zellwände gram-negativer Bakterien von dem sog. *Toll-like*

Receptor 2 (TLR2) auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen erkannt (Yang et al., 1998). Der Rezeptor bindet dabei LPS im Komplex mit CD14 und LBP (*LPS-binding protein*). Durch die Bindung des Liganden werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, an deren Ende unter anderem die Aktivierung von NF- κ B-, C/EBP- und ETS-Proteinen steht (siehe Abbildung 4.2). Am besten charakterisiert ist dabei der Weg der Aktivierung von NF- κ B (Zhang et al., 1999b). Nach Bindung von LPS an TLR2 kommt es zur Aktivierung der Signalproteine IRAK (*IL-1 receptor associated kinase*), IRAK2 und MyD88. Diese Proteine führen zu einer Aktivierung von TRAF6 (*TNF receptor associated factor*), welches seinerseits NIK (*NF- κ B inducing kinase*) aktiviert. Schließlich wird das Enzym IKK (*I- κ B kinase*) aktiviert, welches durch Phosphorylierung von I- κ B die Translokation von NF- κ B in den Kern ermöglicht. Die experimentelle Inaktivierung einzelner dieser Faktoren führt in Studien von Yang und Kollegen zu einem Verlust der LPS-vermittelten NF- κ B Mobilisierung in diesen Zellen (Yang et al., 1999).

C/EBP β dagegen wird wahrscheinlich LPS-abhängig über den p38 MAP-Kinase Signalweg aktiviert. Dafür sprechen Beobachtungen, bei denen chemische Inhibitoren der p38 MAP Kinase zur Aufhebung der LPS-vermittelten Aktivierung eines C/EBP-abhängigen Reportergenkonstruktes führten (Baldassare et al., 1999). Für eine wichtige Rolle dieses Signalweges spricht auch, daß die Aktivierung der p38 zu einer Induktion der IL-12 p40 mRNA führt (Hacker et al., 1998; Feng et al., 1999). p38 wird als MAP-Kinase selbst wiederum von der MAP Kinase Kinase MKK3 aktiviert. Interessanterweise zeigten MKK3 Knockout-Mäuse ähnlich wie C/EBP β Knockout Mäuse eine defiziente Produktion von Interleukin-12 (Lu et al., 1999), was einen weiteren Hinweis auf die Verwendung dieses Signalweges bei der LPS-abhängigen Aktivierung von C/EBP β liefert.

PU.1 kann, wie bereits in Abschnitt 4.2.4 diskutiert, in Makrophagen LPS-abhängig über die Phosphorylierung eines Serinrestes durch Caseinkinase II aktiviert werden.

Im Gegensatz zu der Wirkung von LPS auf die Aktivierung des IL-12 p40 Gens bleiben die molekularen Ziele der IFN- γ abhängigen Signalwege weitgehend unklar. IFN- γ ist ein wichtiger Kostimulator der LPS-vermittelten Interleukin-12 p40 Genexpression. Dies belegen Studien verschiedener Arbeitsgruppen (D'Andrea et al., 1993; Cassatella et al., 1995) und die Daten der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchungen von Ma und Kollegen belegen, daß der Effekt der IFN- γ Stimulation sich direkt auf die Transkriptionsrate des p40 Gens auswirkt (Ma et al., 1996). Interessanterweise zeigten

Knockout-Mäuse für die Interferon- γ regulierten Transkriptionsfaktoren ICSPB (*interferon consensus sequence binding protein*), IRF-1 (*interferon- γ regulated faktor-1*) und IRF-2 zudem eine deutlich verminderte Produktion von IL-12 (Scharton-Kersten et al., 1997; Salkowski et al., 1999). Die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren bei der Regulation des IL-12 p40 Promotors ist zur Zeit nicht geklärt, da bisher keine funktionell relevanten Erkennungsmotive für diese Transkriptionsfaktoren im IL-12 p40 Promotor identifiziert werden konnten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten weder durch *in vivo* Footprinting noch durch *in vitro* Bindungsstudien Hinweise auf die Relevanz dieser Transkriptionsfaktoren für eine direkte Beteiligung an der IL-12 p40 Genexpression gewonnen werden.

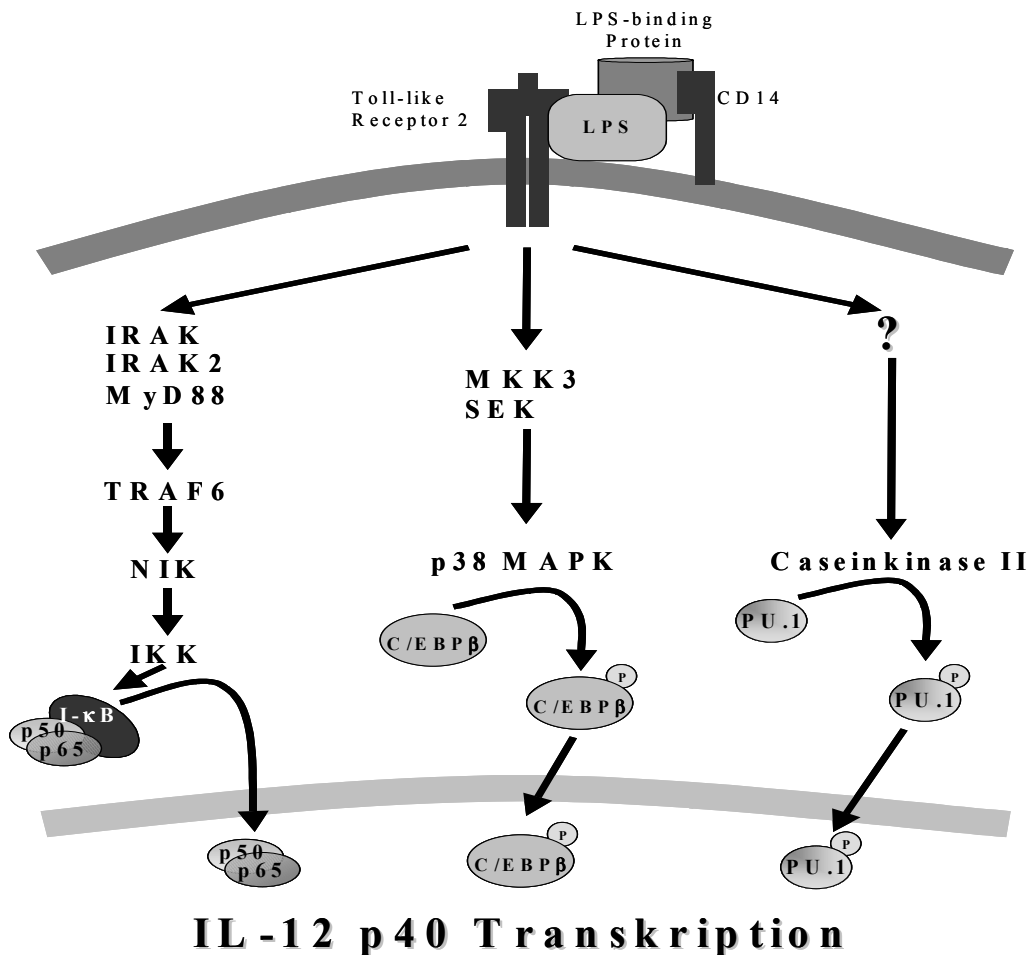


Abbildung 4.3 Hypothetisches Modell der LPS-vermittelten Signalwege bei der Genexpression von Interleukin-12 p40 in humanen Monozyten.

4.5 Hohe konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität im terminalen Ileum transgener Mäuse. Implikationen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen

In den meisten Organen IL-12 p40 Promotor/ Reporter gen transgener Mäuse war die konstitutive Luziferaseexpression gering. Eine moderate Reporter genaktivität wurde in Milz- und Lungengewebe, eine hohe konstitutive Luziferaseexpression überraschenderweise im Hoden und im Dünndarm gefunden. Da das verwendete Konstrukt wie bereits beschrieben die Aktivität des endogenen IL-12 p40 Gens widerspiegelt, implizieren diese Daten eine konstitutive IL-12 p40 Promotoraktivität in diesen Organen. Interessanterweise konnten frühere Studien anderer Arbeitsgruppen die Expression von IL-12 in der Samenflüssigkeit (Naz et al., 1998a) sowie die starke Expression von STAT-4, welches in T-Zellen nach Stimulation über den IL-12 Rezeptor aktiviert wird, im Hoden zeigen (Yamamoto et al., 1994; Zhong et al., 1994). Der IL-12/ STAT-4 Signalweg wurde sogar im Zusammenhang mit männlicher Fruchtbarkeit diskutiert, da es Hinweise gibt, daß unfruchtbare Männer deutlich weniger IL-12 in der Samenflüssigkeit enthalten als fruchtbare (Naz et al., 1998b).

Die IL-12 p40 Promotoraktivität im Dünndarm wurde näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die gemessenen hohen Luziferasewerte insbesondere auf eine konstitutiv hohe IL-12 p40 Promotoraktivität im terminalen Dünndarmbereich zurückzuführen sind. Interessanterweise manifestiert sich gerade in diesem Darmbereich die Erkrankung Morbus Crohn. Morbus Crohn ist eine chronische Entzündung der Darmschleimhaut und der Darmwand von der in Deutschland schätzungsweise 300000 Menschen betroffen sind. In Intervallen leiden die Patienten an Durchfällen, Bauchschmerzen und Gewichtsverlust. Eine Heilung der Krankheit ist zur Zeit nicht möglich. Therapieansätze reichen von der Gabe immunsuppressiver Stoffe wie Kortison bis zur chirurgischen Entfernung betroffener Darmbereiche. Die pathophysiologische Untersuchung dieser Erkrankung ist Ziel vieler Forschungsgruppen weltweit. Bisher sind die Mechanismen der Krankheitsentstehung unklar, man geht jedoch von einem Zusammenbruch der intestinalen Toleranz gegenüber Bakterien der Darmflora aus.

Zahlreiche Studien belegen die essentielle Rolle von Interleukin-12 für die Pathophysiologie des Morbus Crohn. Es konnte gezeigt werden, daß Lamina Propria Zellen von Patienten mit Morbus Crohn große Mengen IL-12 sezernieren (Monteleone et al.,

1997). Antikörper gegen IL-12 zeigten einen positiven Effekt auf klinische Symptome in einem Tiermodell für Morbus Crohn (Neurath et al., 1995).

Weitere Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, daß die erhöhte IL-12 p40 Promotoraktivität im terminalen Dünndarmbereich nicht das Resultat einer vermehrten Anzahl Makrophagen in diesem Bereich ist und lediglich mit einer marginal erhöhten IL-12 Proteinkonzentration einhergeht. Möglicherweise wird das Zytokin intrazellulär gespeichert. Ein solcher Mechanismus wurde von Quinones et al. (2000) vorgeschlagen. Die Autoren konnten zeigen, daß IL-12 als unreifes Heterodimer im Zytoplasma vorliegt und daß die Glykosylierung des Proteins der wichtigste regulatorische Schritt ist, der die Sekretion einleitet.

In Gelretardationsexperimenten mit Extrakten der einzelnen Dünndarmabschnitte wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Komplexe an den C/EBP und NF- κ B-Motiven gefunden. In Gewebelysaten aus dem terminalen Ileum waren die Komplexe am C/EBP-Motiv des IL-12 p40 Promotors gegenüber proximalen Darmabschnitten verstärkt. Zudem migrierten die Komplexe unterschiedlich schnell im Gel. Ein Vergleich der NF- κ B bindenden Komplexe zeigte ebenfalls unterschiedliche Bindungsstärken und unterschiedliches Migrationsverhalten. Es kann deshalb vermutet werden, daß im proximalen und terminalen Ileum unterschiedliche Proteinkomplexe an die Aktivatorelemente des IL-12 p40 Promotors binden. Bei Verwendung der p40 NF- κ B-Sonde konnte im proximalen, nicht jedoch im distalen Dünndarm ein starker Komplex nachgewiesen werden, der lediglich NF- κ B p50, nicht jedoch p65 oder c-Rel enthielt. Von p50 ist bekannt, daß es an NF- κ B-Motive binden kann, selbst jedoch keine Transaktivierungsdomäne besitzt. Konsequenterweise konnte gezeigt werden, daß p50 Homodimere NF- κ B regulierte Promotoren reprimieren (Franzoso et al., 1992; Kang et al., 1992). Möglicherweise tragen p50 Homodimere im proximalen Dünndarmbereich zur Repression des IL-12 p40 Promotors bei, während im distalen Dünndarm wenig p50 Homodimere vorhanden sind und der Promotor somit offen für die Bindung aktivierender Transkriptionfaktorkomplexe ist. Die latente Aktivierung des IL-12 p40 Promotors im Bereich des terminalen Dünndarms könnte möglicherweise das Resultat einer dort stark vermehrten Bakterienkonzentration sein. Die Untersuchungen der Reporterexpression im Dünndarm transgener Mäuse implizieren eine Prädisposition des terminalen Ileums zur Produktion großer Mengen IL-12. Weiterführende Untersuchungen zur Regulation des IL-12 p40 Promotors im Darm werden jedoch

klären müssen, in wie weit diese Versuchsergebnisse ein pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen haben.

4.6 Perspektiven

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die transkriptionelle Regulation des Interleukin-12 p40 Gens untersucht. Anhand der hier durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, daß der proximale Promotor ausreichend Sequenzinformation bereitstellt um die Stimulus- und Gewebe-spezifische Expression von Interleukin-12 zu gewährleisten. Für die LPS-abhängige Transaktivierung des Promotors in Monozyten scheinen vor allem die Transkriptionsfaktoren NF- κ B p50/p65, C/EBP β und PU.1 eine wichtige Rolle zu spielen. Im Bereich des zwischen Maus und Mensch stark konservierten Promotors finden sich jedoch weitere, bisher nicht charakterisierte Elemente, wie beispielsweise hypothetische Ikaros-, AP-1- oder OCT-Bindungsmotive. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis auf eine Funktion dieser Elemente gefunden werden konnte, kann eine solche nicht ausgeschlossen werden. Weiterführende Gelretardations-, *in vivo footprinting*- und Reporterexperimente werden somit klären müssen ob diese Elemente unter anderen Versuchsbedingungen für die induzierbare IL-12 p40 Promotoraktivität eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein bisher nicht beschriebenes Repressorelement identifiziert, an das in unstimulierten Monozyten und Makrophagen ein GATA-ähnlicher Transkriptionsfaktor (GAP-12) bindet. Kein bisher bekanntes GATA-Protein konnte im GAP-12 Komplex identifiziert werden. Es wäre daher interessant zu untersuchen ob möglicherweise ein bisher nicht bekanntes GATA-Protein in Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Eine mögliche Strategie solche Faktoren zu finden besteht in einer RT-PCR mit degenerierten Primern aus dem unter allen GATA-Proteinen hochkonservierten GATA-Zinkfingermotiv und einer Klonierung möglicher Amplifikate.

Die Charakterisierung der IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgenen Maus lieferte wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Promotorregulation *in vivo*. Um die funktionelle Bedeutung der einzelnen Promotorelemente *in vivo* aufzuklären, könnten IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgene Mäuse untersucht werden, die Mutationen in den hier beschriebenen Promotorelementen tragen. Interessant wäre auch die Kreuzung der IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgenen Maus mit transgenen Mäusen oder

Knockout-Mäusen für Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, C/EBP β und PU.1 bzw. regulatorische Zytokine wie IL-10, IL-4 und Interferon- γ .

Interleukin-12 scheint bei vielen Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Prozessen eine pathogenetische Funktion auszuüben. Für viele dieser Krankheiten konnten Tiermodelle etabliert werden. Die Verknüpfung der transgenen Maus mit verschiedenen Tiermodellen könnte wichtige Hinweise auf eine pathogenetische Funktion des Zytokins bei diesen Erkrankungen liefern. Beispielsweise könnten IL-12 p40 Promotor transgene Mäuse Hinweise zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten liefern. Dazu wäre es interessant die Mäuse mit IL-10 *Knockout*-Mäusen zu kreuzen. Mäuse, denen dieses Zytokin fehlt, entwickeln 6-8 Wochen nach der Geburt eine spontane Kolitis (Rennick et al., 1997). Denkbar wäre die Messung der Reporterogenaktivität in entzündetem gegenüber gesundem Darmgewebe sowie die Untersuchung der Reporterogenaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt solcher Mäuse. Die Kenntnis der regulatorischen Mechanismen bei der Expression von Interleukin-12 im Darm könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankung führen.

Zusammenfassung

Interleukin-12 ist ein Schlüsselregulator zellvermittelter Immunantworten. Eine strikte Regulation der Expression des Zytokins ist daher für ein funktionierendes Immunsystem von essentieller Bedeutung. Die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität des Gens ist der entscheidende Schritt bei der Regulation der Expression von IL-12.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Regulation des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen *in vivo* und *in vitro* untersucht. Mit Hilfe von „*in vivo footprinting*“-Experimenten in primären humanen Monozyten konnten nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon- γ an Erkennungssequenzen für C/EBP-, NF- κ B- sowie ETS-Transkriptionsfaktoren Protein/ DNA-Interaktionen nachgewiesen werden. Reporteranalysen, bei denen mutierte Promotorkonstrukte mit dem Wildtyp-Promotor verglichen wurden, demonstrierten die funktionelle Bedeutung der protektierten Motive und lieferten Hinweise auf kooperative Mechanismen der Regulation. Die Mutation aller drei Motive ergab einen fast vollständig inaktiven Promotor. Mittels Gelretardationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Erkennungssequenzen in primären Monozyten von den Transkriptionsfaktoren C/EBP β , p50/p65 beziehungsweise PU.1 erkannt werden. C/EBP β zeigte sich dabei in Kotransfektionsstudien als besonders starker Transaktivator des IL-12 p40 Promotors. Die Daten implizieren eine wichtige Rolle der Bindung dieser Transkriptionsfaktoren für die Endotoxin-induzierte Expression des IL-12 p40 Gens.

„*In vivo footprinting*“-Experimente führten auch zur Identifikation eines bisher nicht beschriebenen regulatorischen Elementes im IL-12 p40 Promotor. Dieses GA-12 genannte Motiv war in unstimulierten primären Monozyten protektiert, nicht jedoch in Zellen, die mit LPS oder LPS/ Interferon- γ stimuliert wurden. Eine genauere Charakterisierung ergab, daß dieses Motiv eine repressorische Funktion auf den Promotor ausübt und in unstimulierten, nicht jedoch in stimulierten Monozyten und Makrophagen von einem spezifischen GATA-ähnlichen Komplex (GAP-12) erkannt wird. Zudem führte die Behandlung von Monozyten mit Interleukin-4 und Prostaglandin-E2, Inhibitoren der IL-12 Produktion, zu einer Verstärkung der Komplexbildung am GA-12 Motiv.

Zur Analyse der Promotorregulation im nukleosomalen Umfeld wurden außerdem IL-12 p40 Promotor/ Luziferase transgene Mäuse hergestellt. Die Analyse dieser Mäuse

zeigte, daß der proximale Promotor ausreichend Sequenzinformation beinhaltet, um *in vivo* die stimulations- und gewebespezifische Regulation des Gens zu gewährleisten. Anhand der erhobenen Daten konnte ein Modell der Regulation des IL-12 p40 Promotors in Monozyten und Makrophagen entworfen werden.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, daß der IL-12 p40 Promotor im distalen Dünndarmbereich unbehandelter Mäuse eine hohe konstitutive Aktivität aufweist. Weiterführende Untersuchungen ergaben, daß diese nicht das Resultat einer vermehrten Anzahl von Gewebemakrophagen in diesem Darmbereich zu sein scheint, sondern vielmehr ein Unterschied der Bindung von Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen Elemente des IL-12 p40 Promotors. Diese Daten liefern möglicherweise wichtige Erkenntnisse zur Pathophysiologie des Morbus Crohn, einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die sich besonders häufig im distalen Dünndarm manifestiert.

Literaturverzeichnis

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, third edition, Garland Publishing, New York.

Aste-Amazaga, M., X. Ma, A. Sartori, and G. Trinchieri. 1998. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J.Immunol.* **160**:5936-5944.

Baeuerle, P.A. and T. Henkel. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu.Rev.Immunol.* **12**:141-179.

Baldassare, J.J., Y. Bi, and C.J. Bellone. 1999. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J.Immunol.* **162**:5367-5373.

Barbulescu, K., C. Becker, J.F. Schlaak, E. Schmitt, B.K. Meyer-zum, and M.F. Neurath. 1998. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* **160**:3642-3647.

Becker, C., K. Barbulescu, S. Wirtz, B.K. Meyer-zum, S. Pettersson, and M.F. Neurath. 1999. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr.* **8**:115-127.

Beg, A.A., W.C. Sha, R.T. Bronson, S. Ghosh, and D. Baltimore. 1995. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**:167-170.

Benjamin, D., V. Sharma, M. Kubin, J.L. Klein, A. Sartori, J. Holliday, and G. Trinchieri. 1996. IL-12 expression in AIDS-related lymphoma B cell lines. *J.Immunol.* **156**:1626-1637.

Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J.Exp.Med.* **174**:1549-1555.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.

Bucht, A., P. Larsson, L. Weisbrot, C. Thorne, P. Pisa, G. Smedegard, E.C. Keystone, and A. Gronberg. 1996. Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.* **103**:357-367.

- Cao, Z., R.M. Umek, and S.L. McKnight.** 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* **5**:1538-1552.
- Cassatella, M.A., L. Meda, S. Gasperini, A. D'Andrea, X. Ma, and G. Trinchieri.** 1995. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur.J.Immunol.* **25**:1-5.
- Cella, M., D. Scheidegger, L.K. Palmer, P. Lane, A. Lanzavecchia, and G. Alber.** 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* **184**:747-752.
- Chan, S.H., B. Perussia, J.W. Gupta, M. Kobayashi, M. Pospisil, H.A. Young, S.F. Wolf, D. Young, S.C. Clark, and G. Trinchieri.** 1991. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J.Exp.Med.* **173**:869-879.
- Chehimi, J., S.E. Starr, I. Frank, A. D'Andrea, X. Ma, R.R. MacGregor, J. Sennelier, and G. Trinchieri.** 1994. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J.Exp.Med.* **179**:1361-1366.
- Chen, H., G.D. Ray, P. Zhang, C.J. Hetherington, D.A. Gonzalez, D.E. Zhang, G.F. Moreau, and D.G. Tenen.** 1995. PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* **11**:1549-1560.
- Chen, H.M., P. Zhang, M.T. Voso, S. Hohaus, D.A. Gonzalez, C.K. Glass, D.E. Zhang, and D.G. Tenen.** 1995. Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* **85**:2918-2928.
- Cheng, T., H. Shen, D. Giokas, J. Gere, D.G. Tenen, and D.T. Scadden.** 1996. Temporal mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:13158-13163.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
- Chua, A.O., R. Chizzonite, B.B. Desai, T.P. Truitt, P. Nunes, L.J. Minetti, R.R. Warriar, D.H. Presky, J.F. Levine, M.K. Gately, and a. et.** 1994. Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J.Immunol.* **153**:128-136.
- Chua, A.O., V.L. Wilkinson, D.H. Presky, and U. Gubler.** 1995. Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component. *J.Immunol.* **155**:4286-4294.

- Clarkson, R.W., C.M. Chen, S. Harrison, C. Wells, G.E. Muscat, and M.J. Waters.** 1995. Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol.Endocrinol.* **9**:108-120.
- Cowell, I.G.** 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends.Biochem.Sci.* **19**:38-42.
- Crossley, M. and S.H. Orkin.** 1993. Regulation of the beta-globin locus. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **3**:232-237.
- D'Andrea, A., M. Rengaraju, N.M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Aste, S.H. Chan, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbarg, and a. et.** 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J.Exp.Med.* **176**:1387-1398.
- D'Andrea, A., A.M. Aste, N.M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri.** 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J.Exp.Med.* **178**:1041-1048.
- D'Andrea, A., X. Ma, A.M. Aste, C. Paganin, and G. Trinchieri.** 1995. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* **181**:537-546.
- Descombes, P. and U. Schibler.** 1991. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**:569-579.
- DeKruyff, R.H., Y. Fang, S.F. Wolf, and D.T. Umetsu.** 1995. IL-12 inhibits IL-4 synthesis in keyhole limpet hemocyanin-primed CD4+ T cells through an effect on antigen-presenting cells. *J.Immunol.* **154**:2578-2587.
- Deng, W., Y. Ohmori, and T.A. Hamilton.** 1996. LPS does not directly induce STAT activity in mouse macrophages. *Cell Immunol.* **170**:20-24.
- Desai, B.B., P.M. Quinn, A.G. Wolitzky, P.K. Mongini, R. Chizzonite, and M.K. Gately.** 1992. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J.Immunol.* **148**:3125-3132.
- Ernst, P. and S.T. Smale.** 1995. Combinatorial regulation of transcription. I: General aspects of transcriptional control. *Immunity.* **2**:311-319.
- Fackelmayer, F.O., K. Dahm, A. Renz, U. Ramsperger, and A. Richter.** 1994. Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur.J.Biochem.* **221**:749-757.

- Feng, G.J., H.S. Goodridge, M.M. Harnett, X.Q. Wei, A.V. Nikolaev, A.P. Higson, and F.Y. Liew.** 1999. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J.Immunol.* **163**:6403-6412.
- Fiorentino, D.F., A. Zlotnik, T.R. Mosmann, M. Howard, and A. O'Garra.** 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J.Immunol.* **147**:3815-3822.
- Forrester, W.C., G.C. van, T. Jenuwein, and R. Grosschedl.** 1994. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* **265**:1221-1225.
- Franzoso, G., V. Bours, S. Park, Y.M. Tomita, K. Kelly, and U. Siebenlist.** 1992. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition. *Nature* **359**:339-342.
- Fuss, I.J., M. Neurath, M. Boirivant, J.S. Klein, M.C. de-la, S.A. Strong, C. Fiocchi, and W. Strober.** 1996. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J.Immunol.* **157**:1261-1270.
- Gately, M.K., D.M. Carvajal, S.E. Connaughton, S. Gillessen, R.R. Warriar, K.D. Kolinsky, V.L. Wilkinson, C.M. Dwyer, J. Higgins-GF, F.J. Podlaski, D.A. Faherty, P.C. Familletti, A.S. Stern, and D.H. Presky.** 1996. Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **795**:1-12.
- Gavett, S.H., D.J. O'Hearn, X. Li, S.K. Huang, F.D. Finkelman, and K.M. Wills.** 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J.Exp.Med.* **182**:1527-1536.
- Gillessen, S., D. Carvajal, P. Ling, F.J. Podlaski, D.L. Stremlo, P.C. Familletti, U. Gubler, D.H. Presky, A.S. Stern, and M.K. Gately.** 1995. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur.J.Immunol.* **25**:200-206.
- Godambe, S.A., D.D. Chaplin, T. Takova, and C.J. Bellone.** 1994. Upstream NFIL-6-like site located within a DNase I hypersensitivity region mediates LPS-induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. *J.Immunol.* **153**:143-152.
- Greaves, D.R., F.D. Wilson, G. Lang, and D. Kioussis.** 1989. Human CD2 3'-flanking sequences confer high-level, T cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* **56**:979-986.

- Gri, G., D. Savio, G. Trinchieri, and X. Ma.** 1998. Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NF-kappaB and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages. *J.Biol.Chem.* **273**:6431-6438.
- Grove, M. and M. Plumb.** 1993. C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol.Cell Biol.* **13**:5276-5289.
- Gubler, U., A.O. Chua, D.S. Schoenhaut, C.M. Dwyer, W. McComas, R. Motyka, N. Nabavi, A.G. Wolitzky, P.M. Quinn, P.C. Familletti, and a. et.** 1991. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:4143-4147.
- Guery, J.C., F. Ria, F. Galbiati, and L. Adorini.** 1997. Normal B cells fail to secrete interleukin-12. *Eur.J.Immunol.* **27**:1632-1639.
- Hacker, H., H. Mischak, T. Miethke, S. Liptay, R. Schmid, T. Sparwasser, K. Heeg, G.B. Lipford, and H. Wagner.** 1998. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* **17**:6230-6240.
- Hohaus, S., M.S. Petrovick, M.T. Voso, Z. Sun, D.E. Zhang, and D.G. Tenen.** 1995. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol.Cell Biol.* **15**:5830-5845.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy.** 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages [see comments]. *Science* **260**:547-549.
- Hu, H.M., M. Baer, S.C. Williams, P.F. Johnson, and R.C. Schwartz.** 1998. Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J.Immunol.* **160**:2334-2342.
- Ibelgauf, H.** 1993. Gentechnologie von A bis Z. VCH, Weinheim
- Jacobson, N.G., S.J. Szabo, N.R. Weber, Z. Zhong, R.D. Schreiber, J. Darnell-JE, and K.M. Murphy.** 1995. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J.Exp.Med.* **181**:1755-1762.
- Jones, P.** 1984. Gene activation by 5-azacytidine. Erschienen in DNA methylation: Biochemistry and Biological Significance. S. 165-187 Springer Verlag, New York.
- Joulin, V., D. Bories, J.F. Eleouet, M.C. Labastie, S. Chretien, M.G. Mattei, and P.H. Romeo.** 1991. A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* **10**:1809-1816.

- Kang, S.M., A.C. Tran, M. Grilli, and M.J. Lenardo.** 1992. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science* **256**:1452-1456.
- Kato, T., R. Hakamada, H. Yamane, and H. Nariuchi.** 1996. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J.Immunol.* **156** :3932-3938.
- Keshet, I., H.J. Lieman, and H. Cedar.** 1986. DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* **44**:535-543.
- Kinoshita, S., S. Akira, and T. Kishimoto.** 1992. A member of the C/EBP family, NF-IL6 beta, forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:1473-1476.
- Kips, J.C., G.J. Brusselle, G.F. Joos, R.A. Peleman, J.H. Tavernier, R.R. Devos, and R.A. Pauwels.** 1996. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **153**:535-539.
- Klemsz, M.J., S.R. McKercher, A. Celada, B.C. Van, and R.A. Maki.** 1990. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene [see comments]. *Cell* **61**:113-124.
- Knippers, R.** 1995. *Molekulare Genetik*. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ko, L.J., M. Yamamoto, M.W. Leonard, K.M. George, P. Ting, and J.D. Engel.** 1991. Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. *Mol.Cell Biol.* **11**:2778-2784.
- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri.** 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J.Exp.Med.* **170**:827-845.
- Koch, F., U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heufler, E. Kampgen, N. Romani, and G. Schuler.** 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J.Exp.Med.* **184**:741-746.
- Kominato, Y., D. Galson, W.R. Waterman, A.C. Webb, and P.E. Auron.** 1995. Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol.Cell Biol.* **15**:59-68.

- Kontgen, F., R.J. Grumont, A. Strasser, D. Metcalf, R. Li, D. Tarlinton, and S. Gerondakis.** 1995. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* **9**:1965-1977.
- Kubin, M., J.M. Chow, and G. Trinchieri.** 1994. Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood* **83**:1847-1855.
- Laverriere, A.C., C. MacNeill, C. Mueller, R.E. Poelmann, J.B. Burch, and T. Evans.** 1994. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J.Biol.Chem.* **269**:23177-23184.
- Levings, M.K. and J.W. Schrader.** 1999. IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms. *J.Immunol.* **162**:5224-5229.
- Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**:915-926.
- Ling, P., M.K. Gately, U. Gubler, A.S. Stern, P. Lin, K. Hollfelder, C. Su, Y.C. Pan, and J. Hakimi.** 1995. Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J.Immunol.* **154**:116-127.
- Lodie, T.A., R. Savedra, D.T. Golenbock, B.C. Van, R.A. Maki, and M.J. Fenton.** 1997. Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II. *J.Immunol.* **158**:1848-1856.
- Lu, H.T., D.D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R.J. Davis, and R.A. Flavell.** 1999. Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* **18**:1845-1857.
- Ma, X., J.M. Chow, G. Gri, G. Carra, F. Gerosa, S.F. Wolf, R. Dzialo, and G. Trinchieri.** 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J.Exp.Med.* **183**:147-157.
- Ma, X., M. Neurath, G. Gri, and G. Trinchieri.** 1997. Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter. *J.Biol.Chem.* **272**:10389-10395.
- Madisen, L. and M. Groudine.** 1994. Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* **8**:2212-2226.

- Magram, J., S.E. Connaughton, R.R. Warriar, D.M. Carvajal, C.Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D.A. Faherty, and M.K. Gately** . 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity*. **4**:471-481.
- Mahoney, C.W., J. Shuman, S.L. McKnight, H.C. Chen, and K.P. Huang**. 1992. Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding. *J.Biol.Chem.* **267**:19396-19403.
- Manetti, R., P. Parronchi, M.G. Giudizi, M.P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani**. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J.Exp.Med.* **177**:1199-1204.
- Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira**. 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**:10193-10197.
- Mao, C., G.D. Ray, A. Tavitian, and G.F. Moreau**. 1996. Differential phosphorylations of Spi-B and Spi-1 transcription factors. *Oncogene* **12**:863-873.
- Marshall, J.D., H. Secrist, R.H. DeKruyff, S.F. Wolf, and D.T. Umetsu**. 1995. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* **155**:111-117.
- Martin, D.I., L.I. Zon, G. Mutter, and S.H. Orkin**. 1990. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* **344**:444-447.
- McIntyre, K.W., D.J. Shuster, K.M. Gillooly, R.R. Warriar, S.E. Connaughton, L.B. Hall, L.H. Arp, M.K. Gately, and J. Magram**. 1996. Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* **26**:2933-2938.
- Merika, M. and S.H. Orkin**. 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol.Cell Biol.* **13**:3999-4010.
- Metz, R. and E. Ziff**. 1991. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev.* **5**:1754-1766.
- Migeon, B.R.** 1994. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends.Genet.* **10** :230-235.
- Mitchell, P.J. and R. Tjian**. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**:371-378.

Monteleone, G., L. Biancone, R. Marasco, G. Morrone, O. Marasco, F. Lizza, and F. Pallone. 1997. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* **112**:1169-1178.

Monteleone, G., T. Parrello, I. Monteleone, S. Tammaro, F. Lizza, and F. Pallone. 1999. Interferon-gamma (IFN-gamma) and prostaglandin E2 (PGE2) regulate differently IL-12 production in human intestinal lamina propria mononuclear cells (LPMC). *Clin.Exp.Immunol.* **117**:469-475.

Morris, S.C., K.B. Madden, J.J. Adamovicz, W.C. Gause, B.R. Hubbard, M.K. Gately, and F.D. Finkelman. 1994. Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J.Immunol.* **152**:1047-1056.

Mueller, P.R. and B. Wold. 1989. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**:780-786.

Mullis, K.B. and F.A. Faloon. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.

Muroi, M., Y. Muroi, K. Yamamoto, and T. Suzuki. 1993. Influence of 3' half-site sequence of NF-kappa B motifs on the binding of lipopolysaccharide-activatable macrophage NF-kappa B proteins. *J.Biol.Chem.* **268**:19534-19539.

Murphy, E.E., G. Terres, S.E. Macatonia, C.S. Hsieh, J. Mattson, L. Lanier, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. Murphy, and A. O'Garra. 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J.Exp.Med.* **180**:223-231.

Murphy, T.L., M.G. Cleveland, P. Kulesza, J. Magram, and K.M. Murphy. 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol.Cell Biol.* **15**:5258-5267.

Nan, X., F.J. Campoy, and A. Bird. 1997. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**:471-481.

Naseer, T., E.M. Minshall, D.Y. Leung, S. Laberge, P. Ernst, R.J. Martin, and Q. Hamid. 1997. Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* **155**:845-851.

Natsuka, S., S. Akira, Y. Nishio, S. Hashimoto, T. Sugita, H. Isshiki, and T. Kishimoto. 1992. Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6. *Blood* **79**:460-466.

Naz, R.K., L. Evans, J.S. Armstrong, and S.C. Sikka. 1998a. Decreased levels of interleukin-12 are not correlated with leukocyte concentration and superoxide dismutase activity in semen of infertile men. *Arch.Androl.* **41**:91-96.

- Naz, R.K. and L. Evans.** 1998b. Presence and modulation of interleukin-12 in seminal plasma of fertile and infertile men. *J.Androl.* **19**:302-307.
- Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, E. Stuber, and W. Strober.** 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J.Exp.Med.* **182**:1281-1290.
- Neurath, M.F., C. Becker, and K. Barbulescu.** 1998. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* **43**:856-860.
- Nordeen, S.K.** 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* **6** :454-458.
- Norton, J.D., R.W. Deed, G. Craggs, and F. Sablitzky.** 1998. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends.Cell Biol.* **8**:58-65.
- Orphanides, G., T. Lagrange, and D. Reinberg.** 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**:2657-2683.
- Ouyang, W., S.H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W.C. Sha, and K.M. Murphy.** 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* **9**:745-755.
- Owen, H.T. and J.L. Workman.** 1994. Experimental analysis of chromatin function in transcription control. *Crit.Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **4**:403-441.
- Ozmen, L., M. Pericin, J. Hakimi, R.A. Chizzonite, M. Wysocka, G. Trinchieri, M. Gately, and G. Garotta.** 1994. Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J.Exp.Med.* **180**:907-915.
- Pabo, C.O. and R.T. Sauer.** 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu.Rev.Biochem.* **61**:1053-1095.
- Pahl, H.L., A.G. Rosmarin, and D.G. Tenen.** 1992. Characterization of the myeloid-specific CD11b promoter. *Blood* **79**:865-870.
- Pahl, H.L., R.J. Scheibe, D.E. Zhang, H.M. Chen, D.L. Galson, R.A. Maki, and D.G. Tenen.** 1993. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J.Biol.Chem.* **268**:5014-5020.
- Paul, W.E. and R.A. Seder.** 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**:241-251.

- Perussia, B., S.H. Chan, A. D'Andrea, K. Tsuji, D. Santoli, M. Pospisil, D. Young, S.F. Wolf, and G. Trinchieri.** 1992. Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J.Immunol.* **149**:3495-3502.
- Pevny, L., M.C. Simon, E. Robertson, W.H. Klein, S.F. Tsai, V. D'Agati, S.H. Orkin, and F. Costantini.** 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**:257-260.
- Plevy, S.E., J.H. Gemberling, S. Hsu, A.J. Dorner, and S.T. Smale.** 1997. Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol.Cell Biol.* **17**:4572-4588.
- Pope, R.M., A. Leutz, and S.A. Ness.** 1994. C/EBP beta regulation of the tumor necrosis factor alpha gene. *J.Clin.Invest.* **94**:1449-1455.
- Presky, D.H., H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C.Y. Wu, M.K. Gately, and U. Gubler.** 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:14002-14007.
- Quinones, M., S.A. Ahuja, P.C. Melby, L. Pate, R.L. Reddick, S.S. Ahuja.** 2000. Preformed membrane-associated stores of interleukin (IL)-12 are a previously unrecognized source of bioreactive IL-12 that is mobilized within minutes of contact with an intracellular parasite. *J.Exp.Med.* **192**:507-515
- Raich, N., C.H. Clegg, J. Grofti, P.H. Romeo, and G. Stamatoyannopoulos.** 1995. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. *EMBO J.* **14**:801-809.
- Ramji, D.P., A. Vitelli, F. Tronche, R. Cortese, and G. Ciliberto.** 1993. The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP delta/NF-IL6 beta, are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucleic.Acids.Res.* **21**:289-294.
- Ray, A., M. Hannink, and B.K. Ray.** 1995. Concerted participation of NF-kappa B and C/EBP heteromer in lipopolysaccharide induction of serum amyloid A gene expression in liver. *J.Biol.Chem.* **270**:7365-7374.
- Razin, A. and H. Cedar.** 1991. DNA methylation and gene expression. *Microbiol.Rev.* **55**:451-458.
- Rennick, D.M., M.M. Fort, and N.J. Davidson.** 1997. Studies with IL-10-/- mice: an overview. *J.Leukoc.Biol.* **61**:389-396.

- Rogge, L., M.L. Barberis, M. Biffi, N. Passini, D.H. Presky, U. Gubler, and F. Sinigaglia.** 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J.Exp.Med.* **185**:825-831.
- Romeo, P.H., M.H. Prandini, V. Joulin, V. Mignotte, M. Prenant, W. Vainchenker, G. Marguerie, and G. Uzan.** 1990. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* **344**:447-449.
- Romig, H., F.O. Fackelmayer, A. Renz, U. Ramsperger, and A. Richter.** 1992. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J.* **11**:3431-3440.
- Rothe, H., J. O'Hara-RM, S. Martin, and H. Kolb.** 1997. Suppression of cyclophosphamide induced diabetes development and pancreatic Th1 reactivity in NOD mice treated with the interleukin (IL)-12 antagonist IL-12(p40)2. *Diabetologia* **40**:641-646.
- Salkowski, C.A., K. Kopydlowski, J. Blanco, M.J. Cody, R. McNally, and S.N. Vogel.** 1999. IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice. *J.Immunol.* **163**:1529-1536.
- Sauer, F. and R. Tjian.** 1997. Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **7**:176-181.
- Scharton, K.T., C. Contursi, A. Masumi, A. Sher, and K. Ozato.** 1997. Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J.Exp.Med.* **186**:1523-1534.
- Schmitt, E., P. Hoehn, C. Huels, S. Goedert, N. Palm, E. Rude, and T. Germann.** 1994. T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur.J.Immunol.* **24**:793-798.
- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner.** 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic.Acids.Res.* **17**:6419
- Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh.** 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**:1573-1577.
- Scott, L.M., C.I. Civin, P. Rorth, and A.D. Friedman.** 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* **80**:1725-1735.

- Scott, P.** 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity [comment]. *Science* **260**:496-497.
- Screpanti, I., L. Romani, P. Musiani, A. Modesti, E. Fattori, D. Lazzaro, C. Sellitto, S. Scarpa, D. Bellavia, G. Lattanzio, and a. et.** 1995. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J.* **14**:1932-1941.
- Seder, R.A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W.E. Paul.** 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**:10188-10192.
- Sha, W.C., H.C. Liou, E.I. Tuomanen, and D. Baltimore.** 1995. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* **80**:321-330.
- Shi, Y., E. Seto, L.S. Chang, and T. Shenk.** 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**:377-388.
- Shu, U., M. Kiniwa, C.Y. Wu, C. Maliszewski, N. Vezzio, J. Hakimi, M. Gately, and G. Delespesse.** 1995. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur.J.Immunol.* **25**:1125-1128.
- Simon, M.C., L. Pevny, M.V. Wiles, G. Keller, F. Costantini, and S.H. Orkin.** 1992. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat.Genet.* **1**:92-98.
- Smith, L.T., S. Hohaus, D.A. Gonzalez, S.E. Dziennis, and D.G. Tenen.** 1996. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* **88**:1234-1247.
- Smith, V.M., P.P. Lee, S. Szychowski, and A. Winoto.** 1995. GATA-3 dominant negative mutant. Functional redundancy of the T cell receptor alpha and beta enhancers. *J.Biol.Chem.* **270**:1515-1520.
- Sposi, N.M., L.I. Zon, A. Care, M. Valtieri, U. Testa, M. Gabbianelli, G. Mariani, L. Bottero, C. Mather, S.H. Orkin, and a. et.** 1992. Cell cycle-dependent initiation and lineage-dependent abrogation of GATA-1 expression in pure differentiating hematopoietic progenitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:6353-6357.
- Stein, B. and J. Baldwin-AS.** 1993. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol.Cell Biol.* **13**:7191-7198.

- Stern, A.S., F.J. Podlaski, J.D. Hulmes, Y.C. Pan, P.M. Quinn, A.G. Wolitzky, P.C. Familletti, D.L. Stremlo, T. Truitt, R. Chizzonite, and a. et.** 1990. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**:6808-6812.
- Stein, B., P.C. Cogswell, and J. Baldwin-AS.** 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol.Cell Biol.* **13**:3964-3974.
- Stief, A., D.M. Winter, W.H. Stratling, and A.E. Sippel.** 1989. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* **341**:343-345.
- Stuber, E., W. Strober, and M. Neurath.** 1996. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J.Exp.Med.* **183**:693-698.
- Szabo, S.J., A.S. Dighe, U. Gubler, and K.M. Murphy.** 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J.Exp.Med.* **185**:817-824.
- Tate, P., W. Skarnes, and A. Bird.** 1996. The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat.Genet.* **12**:205-208.
- Tenen, D.G., R. Hromas, J.D. Licht, and D.E. Zhang.** 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**:489-519.
- Thierfelder, W.E., D.J. van, K. Yamamoto, R.A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld, and J.N. Ihle.** 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* **382**:171-174.
- Trautwein, C., C. Caelles, G.P. van-der, T. Hunter, M. Karin, and M. Chojkier.** 1993. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature* **364**:544-547.
- Trembleau, S., G. Penna, S. Gregori, M.K. Gately, and L. Adorini.** 1997. Deviation of pancreas-infiltrating cells to Th2 by interleukin-12 antagonist administration inhibits autoimmune diabetes. *Eur.J.Immunol.* **27**:2330-2339.
- Tsai, E.Y., J. Yie, D. Thanos, and A.E. Goldfeld.** 1996. Cell-type-specific regulation of the human tumor necrosis factor alpha gene in B cells and T cells by NFATp and ATF-2/JUN. *Mol.Cell Biol.* **16**:5232-5244.
- Van-der-Pouw, K.T., L.C. Boeije, R.J. Smeenk, J. Wijdenes, and L.A. Aarden.** 1995. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J.Exp.Med.* **181**:775-779.

- Voso, M.T., T.C. Burn, G. Wulf, B. Lim, G. Leone, and D.G. Tenen.** 1994. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:7932-7936.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller.** 1993. *Rekombinierte DNA*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Wedel, A. and H.H. Ziegler.** 1995. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology* **193**:171-185.
- Wegner, M., Z. Cao, and M.G. Rosenfeld.** 1992. Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta. *Science* **256**:370-373.
- Whyatt, D.J., E. deBoer, and F. Grosveld.** 1993. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J.* **12**:4993-5005.
- Wolf, S.F., P.A. Temple, M. Kobayashi, D. Young, M. Dicig, L. Lowe, R. Dzialo, L. Fitz, C. Ferenz, R.M. Hewick, and a. et.** 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J.Immunol.* **146**:3074-3081.
- Wolf, S., D. Seiburth, B. Perussia, J. Yetz-Adalpe, A. D'Andrea, G. Trinchieri.** 1993. Cell sources of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) transcripts and subunit expression. *FASEB J.* **6**:A 1335.
- Wu, C.Y., C. Demeure, M. Kiniwa, M. Gately, and G. Delespesse.** 1993. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J.Immunol.* **151**:1938-1949.
- Wysocka, M., M. Kubin, L.Q. Vieira, L. Ozmen, G. Garotta, P. Scott, and G. Trinchieri.** 1995. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur.J.Immunol.* **25**:672-676.
- Xu, X., Y.L. Sun, and T. Hoey.** 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain [see comments]. *Science* **273**:794-797.
- Yamamoto, K., H. Kobayashi, A. Arai, O. Miura, S. Hirosawa, and N. Miyasaka.** 1997. cDNA cloning, expression and chromosome mapping of the human STAT4 gene: both STAT4 and STAT1 genes are mapped to 2q32.2-->q32.3. *Cytogenet.Cell Genet.* **77**:207-210.
- Yang, R.B., M.R. Mark, A. Gray, A. Huang, M.H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W.I. Wood, A.L. Gurney, and P.J. Godowski.** 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**:284-288.
- Yang, R.B., M.R. Mark, A.L. Gurney, and P.J. Godowski.** 1999. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated toll-like receptor 2. *J.Immunol.* **163**:639-643.

- Yin, M., S.Q. Yang, H.Z. Lin, M.D. Lane, S. Chatterjee, and A.M. Diehl.** 1996. Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes. *J.Biol.Chem.* **271**:17974-17978.
- Yoshimoto, T., H. Nagase, T. Yoneto, J. Inoue, and H. Nariuchi.** 1998. Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **252**:556-560.
- Zhang, D.E., C.J. Hetherington, H.M. Chen, and D.G. Tenen.** 1994. The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol.Cell Biol.* **14**:373-381.
- Zhang, D.H., L. Cohn, P. Ray, K. Bottomly, and A. Ray.** 1997. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J.Biol.Chem.* **272**:21597-21603.
- Zhang, P., G. Behre, J. Pan, A. Iwama, A.N. Wara, H.S. Radomska, P.E. Auron, D.G. Tenen, and Z. Sun.** 1999. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**:8705-8710.
- Zhang, F.X., C.J. Kirschning, R. Mancinelli, X.P. Xu, Y. Jin, E. Faure, A. Mantovani, M. Rothe, M. Muzio, and M. Arditi.** 1999b. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J.Biol.Chem.* **274**:7611-7614.
- Zheng, W. and R.A. Flavell.** 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**:587-596.
- Zipris, D., D.L. Greiner, S. Malkani, B. Whalen, J.P. Mordes, and A.A. Rossini.** 1996. Cytokine gene expression in islets and thyroids of BB rats. IFN-gamma and IL-12p40 mRNA increase with age in both diabetic and insulin-treated nondiabetic BB rats. *J.Immunol.* **156**:1315-1321.
- Zhong, Z., Z. Wen, and J. Darnell-JE.** 1994. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:4806-4810.
- Zou, J., D.H. Presky, C.Y. Wu, and U. Gubler.** 1997. Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases. *J.Biol.Chem.* **272**:6073-6077.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATCC	<i>America Tissue Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Proteine
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA
CHOP-10	<i>C/EBP-Homologous Protein-10</i>
BSA	bovines Serum Albumin
C	Cystein
°C	Grad Celsius
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	Zytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
DEAE	Diethylaminoethyl
DHS	DNase I hypersensitive Stellen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>

EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ETS	<i>E26 Transformation Specific</i>
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflußcytometer)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
G-CSF	Granulocyten Kolonie stimulierender Faktor
GITC	Guanidiniumisothiozyanat
GM-CSF	Granulocyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-I-piperazinethansulfonsäure
HLH	<i>Helix-Loop-Helix</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
HPO	<i>horseshoe peroxidase</i>
ICSBP	<i>Interferon Consensus Sequence Binding Protein</i>
ID	Inhibitor der Differenzierung
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
I- κ B	Inhibitor von κ B
IKK	I- κ B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	<i>IL-1 Receptor Associated Kinase</i>
IRF-1	<i>Interferon-γRegulated Faktor-1</i>
JAK2	<i>Janus-family Kinase 2</i>
JNK	c-Jun aminoterminal Kinase
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LBP	Lipopolysaccharid Bindendes Protein
LCR	Lokus-Kontroll-Region(en)
LM-PCR	<i>Ligation Mediated PCR</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M	Mol
mA	Milliampere
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

MAR	<i>Matrix attachment regions</i>
MBq	Megabequerel
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
MeCP1	Methyl-CpG-bindendes Protein 1
mg, ml	Milligramm, Milliliter
µg, µl	Mikrogramm, Mikroliter
min	Minute
MIP-1α	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i>
MKK3	MAP Kinase Kinase 3
mM	Millimol
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NF-1	nukleärer Faktor-1
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NIK	<i>NF-κB Inducing Kinase</i>
NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
Oct-1	Octamermotiv-bindendes Protein 1
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligonucleotid Desoxy-Thymidin
p.A	pro Analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PGE2	Prostaglandin-E2
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rATP	ribosomales ATP
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

s	Sekunde
SAC	Staphylococcus Aureus Zellen
SAF-A	<i>Scaffold Attachment Factor-A</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
snRNAs	<i>small nuclear RNAs</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i> (Natriumchlorid/Natriumcitrat)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Std.	Stunde(n)
SV-40	<i>simian virus protein 40</i>
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAF	TATA-bindendes Protein (TBP)-assoziiierter Faktor
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBP	TATA-bindendes Protein
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
T _H	T-Helferzelle
TLR2	<i>Toll-Like Receptor 2</i>
T _M	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TRAF	<i>TNF-Receptor Associated Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSS	Transkriptionsstartstelle
TYK-2	Tyrosinkinase-2
U	Unit
UAS	<i>Upstream Activating Sequences</i>
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
VP16	Virusprotein 16
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-gal	5-Bromo-4-chloro-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YY-1	YinYang-1

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn _____ für die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor _____ danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für klinische Immunologie der I. Med. Klinik und die gute finanzielle Ausstattung des Labors.

Herrn Professor _____ danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Professor _____ gilt mein Dank für seine Kooperationsbereitschaft bei der Herstellung der transgenen Maus.

Herrn Professor _____ möchte ich für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg „molekulare und zelluläre Mechanismen der Pathogenese“ danken.

Insbesondere danke ich den früheren und aktuellen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe _____ für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich auch sonst ständig unterstützt und motiviert haben.

Schließlich möchte ich mich bei Kerstin und Annika bedanken, für ihre Liebe, Geduld und Verständnis.

LEBENS LAUF

NAME:

ANSCHRIFT:

PERSÖNLICHE

DATEN:

SCHULBILDUNG:

WEHR-/ERSATZDIENST:

HOCHSCHULBILDUNG:

Publikationsliste

An folgenden Publikationen konnte ich während meiner Promotionsarbeit mitwirken:

1. **Becker, C., S. Wirtz, X. Ma, M. Blessing, P.Galle, M.Neurath.** 2000. Regulation of interleukin-12 p40 promotor activity in primary human monocytes: Roles of NF- κ B, C/EBP β , PU.1 and identification of a novel repressor element that responds to IL-4 and prostaglandin-E2. Zur Veröffentlichung eingereicht.
2. **Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, J.S. Rose, and M.F. Neurath.** 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat.Med.* **6**:583-588.
3. **Becker, C., K. Barbulescu, S. Wirtz, B.K. Meyer-zum, S. Pettersson, and M.F. Neurath.** 1999. Constitutive and inducible in vivo protein-DNA interactions at the tumor necrosis factor-alpha promoter in primary human T lymphocytes. *Gene Expr.* **8**:115-127.
4. **Hildner, K., S. Finotto, C. Becker, J. Schlaak, P. Schirmacher, P.R. Galle, H.E. Marker, and M.F. Neurath.** 1999. Tumour necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* **118**:137-146.
5. **Neurath, M.F., K. Hildner, C. Becker, J.F. Schlaak, K. Barbulescu, T. Germann, E. Schmitt, P. Schirmacher, S. Haralambous, M. Pasparakis, B.K. Meyer-zum, G. Kollias, and H.E. Marker.** 1999. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin.Exp.Immunol.* **115**:42-55.

6. **Becker, C., K. Barbulescu, K. Hildner, B.K. Meyer-zum, and M.F. Neurath.** 1998. Activation and methotrexate-mediated suppression of the TNF alpha promoter in T cells and macrophages. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **859**:311-314.
7. **Barbulescu, K., C. Becker, J.F. Schlaak, E. Schmitt, B.K. Meyer-zum, and M.F. Neurath.** 1998. IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* **160**:3642-3647.
8. **Neurath, M.F., C. Becker, and K. Barbulescu.** 1998. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* **43**:856-860.
9. **Barbulescu, K., C. Becker, B.K. Meyer-zum, and M.F. Neurath.** 1998. Regulation of protein-DNA interactions at the interferon-gamma gene promoter by corticosteroids. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **859**:319-322.
10. **Hildner, K., H.E. Marker, J.F. Schlaak, C. Becker, T. Germann, E. Schmitt, B.K. Meyer-zum, and M.F. Neurath.** 1998. Azathioprine, mycophenolate mofetil, and methotrexate specifically modulate cytokine production by T cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **859**:204-207.
11. **Neurath M.F, X. Ma, S. Petterson (mit Beiträgen von V. Arulampalam, K. Barbulescu, C.Becker, S. Wirtz):** DNA/Protein Interaktionen. Labor im Fokus, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1997.
12. **Neurath M.F., C. Becker, K. Barbulescu, S. Wirtz, K.-H. Meyer zum Büschenfelde.** 1996 Characterization of different DNA polymerases and ligases in ligation-mediated PCR for optimized in vivo footprinting. PCR Bibliographie anlässlich des PCR Award for young scientists. Biochemica Information Sonderheft, Boehringer Mannheim GmbH.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christoph Becker, geboren am 06.09.1969, an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mainz, im November 2000

.....
Christoph Becker