

# **Transkriptionelle Regulation des humanen Interferon- $\gamma$ Promotors in T-Lymphocyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor

der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Karina Barbulescu  
geb. in Konstanz

Mainz, 1999

Tag der mündlichen Prüfung:

4.04.2000

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Expression und transkriptionelle Regulation eukaryontischer Gene</b> .....	1
1.1.1 RNA-Polymerasen und Initiationskomplex.....	1
1.1.2 Modulation der transkriptionellen Regulation.....	2
<b>1.2 T-Zellen, Cytokine und Cytokinrezeptoren</b> .....	6
1.2.1 Transkriptionelle Regulation von Genen in T-Zellen.....	8
1.2.1.1 Wichtige Transkriptionsfaktoren von T-Lymphocyten.....	9
1.2.1.2 Transkriptionelle Regulation der Differenzierung und Cytokinproduktion von CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen.....	15
<b>1.3 IFN-<math>\gamma</math></b> .....	17
1.3.1 Expression und Funktion von IFN- $\gamma$ .....	17
1.3.2 Struktur und transkriptionelle Regulation des IFN- $\gamma$ Gens.....	19
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	20
<b>2 Material und Methoden</b> .....	22
<b>2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien</b> .....	22
<b>2.2 Zellbiologische Methoden</b> .....	22
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Zellen.....	22
2.2.2 Medien und Lösungen.....	23
2.2.3 Isolierung von humanen CD4 <sup>+</sup> , CD45RO <sup>+</sup> und CD45 RA <sup>+</sup> T-Zellen.....	23
2.2.4 Verwendete Zelllinien.....	25
2.2.5 Isolierung von murinen Einzelzellsuspensionen aus der Milz sowie von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz.....	26
2.2.6 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Faktoren.....	27

<b>2.3</b>	<b>Methoden zur Untersuchung der Proteinexpression</b>	28
2.3.1	Analytische Durchflußcytometrie (FACS)	28
2.3.2	ELISA	29
2.3.3	Isolierung und Quantifizierung von Proteinen	30
2.3.4	Immunpräzipitation	31
2.3.5	In vitro Transkription/Translation von Proteinen	32
2.3.6	Western Blot Analyse	33
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	35
2.4.1	Standard-Puffer und Medien	35
2.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	35
2.4.3	Oligonucleotidkonstruktion	36
2.4.4	Gel-Elektrophorese	36
2.4.4.1	Agarosegele	36
2.4.4.2	Polyacrylamidgele	37
2.4.4.3	Sequenzierungsgele	38
2.4.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Polyacrylamidgelen	38
2.4.6	<i>Annealing</i> von Oligonucleotiden und radioaktive Markierung	39
2.4.7	Restriktionsverdau von Plasmiden	39
2.4.8	Herstellung, Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA	40
2.4.8.1	Transformation	40
2.4.8.2	Analytische Präparation der Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präparation)	41
2.4.8.3	Klonierung des IFN- $\gamma$ Promotors in den pXP1-Luc Vektor	43
2.4.8.4	Verwendete Vektoren	45
2.4.9	Sequenzierung von Plasmid DNA mit Sequenase 2.0	47
2.4.10	Nachweis von mRNA-Transkripten mit der RT-PCR	48
2.4.10.1	Isolierung von RNA	48
2.4.10.2	Reverse Transkription	49
2.4.10.4	PCR	50
2.4.10.4	Nachweis der Spezifität der Amplifikate (Southern Blot)	51

<b>2.5</b>	<b>Methoden zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen</b>	54
2.5.1	Gelshiftassays (EMSA)	54
2.5.1.1	Prinzip der Methode	54
2.5.1.2	Durchführung von Gelshiftassays	55
2.5.2	<i>In vivo</i> -Footprinting	57
2.5.2.1	Prinzip der Methode	58
2.5.2.2	<i>In vivo</i> DMS-Behandlung	61
2.5.2.3	<i>In vitro</i> DMS-Behandlung	61
2.5.2.4	Piperidinspaltung methylierter DNA	61
2.5.2.5	Ligationsvermittelte PCR (LM-PCR)	62
<b>2.6</b>	<b>Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen</b>	63
2.6.1	Transfektionstechniken	63
2.6.1.1	DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion	64
2.6.1.2	Elektroporation	65
2.6.1.2	Lipofektion	65
2.6.2	Reportergenassays	66
2.6.2.1	Gerichtete Mutagenese der Promotorsequenz	68
<b>2.7</b>	<b>Herstellung von IFN-<math>\gamma</math> Promotor/Luciferase transgenen Mäusen</b>	69
2.7.1	Prinzip der Methode	69
2.7.2	Klonierung des Konstrukts	70
2.7.3	<i>Screening</i> der transgenen Mäuse	71
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	73
<b>3.1</b>	<b>Voruntersuchungen</b>	73
3.1.1	FACS-Analyse zur Reinheitsbestimmung der in weiteren Experimenten verwendeten CD4 <sup>+</sup> , CD45RO <sup>+</sup> und CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen	73
3.1.2	IFN- $\gamma$ Proteinproduktion von CD4 <sup>+</sup> , CD45RO <sup>+</sup> und CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen	74
3.1.3	Zeitkinetik der IFN- $\gamma$ mRNA Expression in primären CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und Jurkat T-Zellen	75
3.1.4	Funktionelle Analyse der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität in CD4 <sup>+</sup> , CD45RO <sup>+</sup> und CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen	75

3.1.5	Funktionelle Analyse der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien.....	77
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung eines AP-1 Aktivatorelements im IFN-<math>\gamma</math> Promotor</b> .....	<b>79</b>
3.2.1	<i>In vivo footprinting</i> Daten demonstrieren die PMA/PHA induzierte Besetzung einer neuen Bindungsseite in Jurkat T-Zellen und primären CD45RO <sup>+</sup> und CD45 RA <sup>+</sup> T-Lymphocyten.....	79
3.2.1.1	<i>In vivo</i> -Footprinting des IFN- $\gamma$ Promotors in Jurkat T-Zellen.....	79
3.2.1.2	<i>In vivo</i> -Footprinting des IFN- $\gamma$ Promotors in CD45RO <sup>+</sup> T-Zellen.....	81
3.2.2	AP-1 bindet an die neu identifizierte Seite C im IFN- $\gamma$ Promotor.....	82
3.2.2.1	Induktion eines spezifischen, Corticosteroid-sensitiven Protein/DNA Komplexes an der C-Seite des IFN- $\gamma$ Promotor in PMA/PHA stimulierten Jurkat T-Zellen und CD45RO T-Zellen.....	82
3.2.2.2	Seiten-gerichtete Mutagenese und Supershift Experimente demonstrieren AP-1 Bindung an die C-Seite des IFN- $\gamma$ Promotors.....	84
3.2.3	Seiten-gerichtete Mutagenese der AP-1 Bindungsseite reprimiert signifikant die IFN- $\gamma$ Reportergenaktivität in CD45RA <sup>+</sup> , CD45RO <sup>+</sup> T-Zellen und Jurkat T-Zellen.....	85
<b>3.3</b>	<b>IL-12 und IL-18 regulieren unterschiedlich die IFN-<math>\gamma</math> Promotoraktivität in CD4<sup>+</sup> T-Zellen via AP-1 und STAT-4</b> .....	<b>87</b>
3.3.1	IL-18 aber nicht IL-12 induziert direkt eine hohe IFN- $\gamma$ Promotoraktivität und eine hohe IFN- $\gamma$ Proteinproduktion in primären CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	87
3.3.2	<i>In vivo</i> -Footprinting Experimente demonstrieren unterschiedliche molekulare Ziel-Elemente für IL-12 und IL-18 innerhalb des IFN- $\gamma$ Promotors.....	89
3.3.3	IL-18 induziert die Ausbildung eines c-Jun/AP-1 Komplexes, das an seine molekulare Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor bindet.....	90
3.3.4	IL-12 induziert STAT-4 DNA-Bindungsaktivität.....	90

3.3.5	Seiten-gerichtete Mutagenese demonstriert Bedeutung der STAT-4 und AP-1 Bindemotive für die induzierbare IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung.....	92
<b>3.4</b>	<b>IL-4 reprimiert die induzierbare IFN-<math>\gamma</math> Promotoraktivierung in CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten via GATA-3</b> .....	<b>93</b>
3.4.1	IL-4 reprimiert die IFN- $\gamma$ mRNA Expression, Proteinproduktion und Promotoraktivierung in CD4 <sup>+</sup> T-Lymphocyten.....	94
3.4.2	Gelshiftassays zeigen einen IL-4 induzierbaren Komplex an einer spezifischen Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor.....	97
3.4.3	<i>In vivo</i> -Footprinting Experimente demonstrieren IL-4 induzierbare Protein/DNA Interaktionen im Bereich der GATA-Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor.....	99
3.4.4	GATA-3 bildet den IL-4 induzierbaren Protein/DNA Komplex.....	101
3.4.5	IL-4 induziert spezifisch die GATA-3 Proteinexpression in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aber nicht in den restlichen Lymphocyten.....	103
3.4.6	Das GATA-3 Element des IFN- $\gamma$ Promotors erfüllt eine repressorische Funktion bei der konstitutiven und induzierbaren IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	104
<b>3.5</b>	<b>Herstellung und Analyse der IFN-<math>\gamma</math> Promotor/Luciferase transgenen Maus</b> .....	<b>107</b>
3.5.1	Identifizierung und Charakterisierung der positiven transgenen Mäuse.....	107
3.5.2	Überprüfung der Reporterogenaktivität in verschiedenen Organen.....	108
3.5.3	IFN- $\gamma$ Promotorregulation in Einzelzellsuspensionen aus Milzen transgener Mäuse.....	109
3.5.4	Induzierbare und reprimierbare Reporterogenaktivität von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphocyten.....	111
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>113</b>
<b>4.1</b>	<b>Kritische Betrachtung der durchgeführten Methoden: Grenzen und Möglichkeiten der experimentellen Systeme</b> .....	<b>113</b>
4.1.1	Gelshiftassays.....	113
4.1.2	<i>In vivo</i> -Footprinting.....	114

4.1.3	Transiente Reportergergenstudien und die transgene Reportergergen Maus .....	116
<b>4.2</b>	<b>Die Regulation des IFN-<math>\gamma</math> Promotors in humanen T-Zellen</b> .....	<b>117</b>
4.2.1	Signifikanz des AP-1 Aktivatorelements im IFN- $\gamma$ Promotor .....	119
4.2.2	Molekulare Regulation der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität durch die Cytokine IL-12 und IL-18 .....	125
4.2.3	IL-4 vermittelte GATA-3 Repression der induzierbaren IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung in T-Zellen .....	128
<b>4.3</b>	<b>Die Regulation des humanen IFN-<math>\gamma</math> Promotors in der transgenen Reportergergen Maus</b> .....	<b>135</b>
<b>4.4</b>	<b>Perspektiven</b> .....	<b>138</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>157</b>
 <b>Anhang</b>		
	Danksagung .....	162
	Publikationsliste .....	163
	Eidesstattliche Erklärung .....	165



# 1 Einleitung

## 1.1 Expression und transkriptionelle Regulation eukaryontischer Gene

Die Regulation eukaryontischer Gene kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Dazu gehören die Transkription, die Prozessierung der Ribonucleinsäure (RNA), der RNA-Transport vom Zellkern in das Cytoplasma und die Translation. Die meisten eukaryontischen Gene werden auf transkriptioneller Ebene reguliert. Hauptsächlich basiert die Genregulation auf einer spezifischen Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren mit Elementen der Desoxyribonucleinsäure (DNA) in Promotor-/Enhancerbereichen. Promotoren liegen im 5'-flankierenden Bereich eines Gens. Enhancerbereiche hingegen liegen weit entfernt, vor oder hinter dem Gen. Sie kommen jedoch auch auf Introns innerhalb des Gens vor. Ihre Funktion ist die Erhöhung der Aktivität eines Promotors (Mitchell und Tijan 1989). Als Folge der Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren mit ihren Zielsequenzen innerhalb der Promotor-/Enhancerbereiche, wird der Aufbau des Initiationskomplexes an der TATA-Box oder am Initiator-Element (Inr) beeinflusst. Die TATA-Box ist eine Adenin/Thymin (A/T)-reiche Sequenz, die in den Promotoren von regulierten Genen, etwa 30 Basenpaare (bp) stromaufwärts vom Transkriptionsstart (TS) positioniert ist. Sie fehlt jedoch in den Promotoren von ständig aktiven Haushaltsgenen, die Enzyme des Stoffwechsels und Proteine des Cytoskeletts codieren. Die Haushaltsgene haben jedoch einen funktionsfähigen Initiator im Bereich des Adenin/Thymin/Guanin (ATG) Startnucleotids (Ernst und Smale 1995).

### 1.1.1 RNA-Polymerasen und Initiationskomplex

Die Transkription eukaryontischer Gene erfolgt mit Hilfe der RNA-Polymerasen. Dabei handelt es sich um Enzyme, die komplementär zur DNA-Matrize RNA synthetisieren. Man unterscheidet im Zellkern von Eukaryonten drei unterschiedliche Polymerasen. Die RNA-Polymerase I (RNAPI) transkribiert die Gene für drei ribosomale RNAs (rRNAs), die 28S, 18S und 5,8S rRNA. Die RNA-Polymerase II (RNAPII) ist vor allem an der Synthese von *Messenger-RNA* (mRNA) beteiligt. Die RNA-Polymerase III (RNAPIII) transkribiert vor allem Transfer-RNA (tRNA) und Gene für 5S rRNA und andere kleine RNAs (snRNAs) (Watson et al. 1993). Die Voraussetzung für die Transkription ist ein stabiler Initiationskomplex, der sich zwischen der RNAP und der Promotorregion bildet. Das geschieht mit Hilfe von bestimmten Faktoren, die für jedes Transkriptionssystem unterschiedlich sind. Alle Promotoren beinhalten DNA-Kernmotive, die als Bindemotive für spezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktoren dienen. Diese *cis*-wirkenden DNA-Motive und die Transkriptionsfaktoren (*trans*-wirkende Ele-

mente), die sie erkennen, kommen ubiquitär oder genspezifisch vor. Transkriptionsfaktoren von gewebspezifischen und induzierbaren Genen sind sowohl für die Kontrolle des zeitlichen als auch räumlichen Transkriptionsmusters verantwortlich (Johnson und McKnight 1989).

Proteincodierende Gene werden von der RNA-Polymerase II (RNAPII) transkribiert. Die RNAPII ist auf Hilfsfaktoren angewiesen, mit denen sie den basalen Transkriptionsapparat (Initiationskomplex) ausbildet. Dabei findet der Aufbau des Initiationskomplexes in einer bestimmten Reihenfolge statt. Zunächst bindet Transkriptionsfaktor (TF)II-D an die TATA-Box. TFII-D setzt sich zusammen aus dem TATA-bindenden Protein (TBP) und TBP-assoziierten Faktoren (TAFs). Im nächsten Schritt erfolgt die Anlagerung von TFII-B und TFII-A. Dieser Komplex dient nun als Plattform für die RNAPII. Allerdings braucht das Enzym noch die Hilfe von TFII-F. Wahrscheinlich führt TFII-F die RNAPII zum Transkriptionskomplex. Dieser Faktor besteht aus zwei Untereinheiten. Die größere Untereinheit (RPA74) besitzt eine ATP-abhängige DNA-Helikase-Aktivität, die an der Strangtrennung beteiligt sein könnte. Die kleinere Untereinheit (RPA3S) weist einige Homologien zu der Region des bakteriellen *Sigma-Faktors* auf, die an RNA-Polymerasen binden kann. Schließlich wird der Komplex durch Anlagerung weiterer Faktoren fertiggestellt. Dazu gehören TFII-E und TFII-H. TFII-H nimmt dabei eine Sonderstellung ein. Eine seiner Untereinheiten enthält eine Proteinkinase, welche das carboxyterminale Ende der RNAPII phosphoryliert und damit ihre Lösung von dem Transkriptionskomplex einleitet. Außerdem beinhaltet TFII-H eine DNA-Helikase, welche die Energie aus der ATP-Spaltung dazu nutzt, den DNA-Doppelstrang zu trennen (Orphanides et al. 1996).

Mit dem Beginn der Transkription wird das carboxyterminalen Ende der RNAPII phosphoryliert. Dafür ist die Proteinkinase des Faktors TFII-H verantwortlich. Nach der Phosphorylierung löst sich die RNAPII vom Initiationskomplex ab und wandert entlang des Gens, wobei sie die DNA-Matrize in RNA umschreibt. TFII-D, TFII-B und TFII-A bleiben an der Startbasis des Promotors zurück und verhelfen wahrscheinlich nachfolgenden RNA-Polymerasen zum Start (Knippers 1995).

### **1.1.2 Modulation der transkriptionellen Regulation**

Die Modulation der transkriptionellen Regulation von Genen kann durch vielfältige Mechanismen erfolgen, die nachfolgend erläutert werden.

#### Enhancer, Aktivatoren/Coaktivatoren

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff Enhancer für einen Verstärker der Genexpression verwendet. Dabei ist ein Enhancer ein DNA-Abschnitt, der unabhängig

von dem Abstand, der Lage und Orientierung relativ zum Transkriptionsstart auf die Transkription aktivierend wirkt (Mitchell und Tijan 1989).

Bei den Aktivatoren handelt es sich um DNA-bindende Proteine, die distinkte Domänen für die DNA-Bindung und Transaktivierung enthalten. Diese Transkriptionsfaktoren verstärken die Genexpression. Einige Beispiele für Aktivatoren sind AP-1 (*activator-protein 1*) und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), die vor allem in Zellen des Immunsystems bei der Aktivierung einer Vielzahl von Genen beteiligt sind. Zu den Aktivatoren zählen auch die Homöobox (HOX)-Proteine, die für die Embryonalentwicklung bei *Drosophila* essentiell sind. Die Effizienz und die Spezifität, mit der ein Promotor von Aktivatoren erkannt wird, ist abhängig von bestimmten DNA-Motiven stromaufwärts der TATA-Box (Johnson und McKnight 1989, Li und McGinnis 1999).

Die Transkriptionsfaktoren werden in Familien gruppiert, basierend auf die Struktur ihrer DNA-bindenden Domäne. In höheren Eukaryonten unterscheidet man Zinkfinger, Helix-Turn-Helix (Homäodomäne), Leucin-Zipper und basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine. Viele Transkriptionsfaktoren gehören jedoch in keine dieser vier Klassen. Die Transaktivierungsdomäne erlaubt den Faktoren mit anderen Proteinen innerhalb des Promotors, mit dem Initiationskomplex, mit Coaktivatoren sowie Chromatinproteinen zu interagieren (Pabo und Sauer 1992, Sauer und Tijan 1997).

Coaktivatoren können mit DNA-bindenden Proteinen Kontakt aufnehmen und die Transkription verstärken. Klassische Beispiele dafür sind das VP16 Virusprotein und das PC4 (*positive cofactor 4*) Protein. VP16 bindet an den Transkriptionsfaktor Oct-1 (Octamer-Bindeprotein 1) und an Proteinen des Initiationskomplexes TFII-B und TBP. Dadurch wird Transkription von Virusproteinen in der Wirtszelle erhöht. PC4 vermittelt Wechselwirkungen zwischen stromaufwärts gebundenen Faktoren und dem Protein TFII-D innerhalb des Initiationskomplexes. Die Aktivität von PC4 wird hierbei durch Phosphorylierung reguliert. Weitere typische Beispiele für Coaktivatoren sind auch die TAFs innerhalb des TFIID Komplexes (Tijan und Maniatis 1994, Cleary et al. 1993, Knippers 1995).

### Silencer, Repressoren und Corepressoren

Negativ wirkende DNA-Abschnitte werden als Silencer bezeichnet. Wie Enhancer wirken Silencer auch unabhängig von dem Abstand, der Lage und der Orientierung zum Transkriptionsstart. Möglicherweise sind Silencer wichtig bei der Aufrechterhaltung des dicht verpackten, für Transkriptionsfaktoren unzugänglichen Heterochromatins. Abhängig von dem Mechanismus der transkriptionellen Regulation, werden passive und aktive Repressoren unterschieden. Passive Repressorproteine hemmen die Aktivatorproteine durch Verdrängung der DNA von den DNA-Bindestellen, Ausbildung nicht-funktioneller Heterodimere, Verhinderung des Transports von Faktoren in den Nucleus oder Hemmung der Bindung des jeweiligen Coaktivators (Cowell

1994).

Ein typisches Beispiel für einen passiven Repressor, der durch Ausbildung inaktiver Heterodimere die Transkription hemmt, ist das Protein ID (Inhibitor der Differenzierung). Das Protein ID ist ein Helix-Loop-Helix Protein (HLH). Er bildet Dimere mit dem myogenen Faktor Myo D oder mit dem Dimerisierungspartner von Myo D, dem basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Protein E12. Durch diesen Vorgang wird die DNA-Bindung von E12/MyoD verhindert und somit die Muskeldifferenzierung 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 an spezifischen DNA-Sequenzen in Promotoren von Zielgenen und inhibieren dadurch deren transkriptionelle Aktivierung. Typische Beispiele dafür sind GATA sowie YY-1 (YinYang-1) Proteine. Beide Transkriptionsfaktoren üben je nach Promotorkontext eine duale Funktion aus. Sie können nämlich nach Bindung an die DNA sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken (Raich et al. 1995, Shi et al. 1991).

Corepressoren wirken ähnlich wie Coaktivatoren. Sie vermitteln ihre Aktivität durch Protein/Protein Interaktionen mit den Repressoren. Die Groucho Familie von Corepressoren wird in Fliegen, Würmer, Mäusen und Menschen exprimiert. Diese Faktoren wirken über eine konservierte intrinsische Repressionsdomäne (Fisher und Caudy 1998).

### Chromatin

Das Genom liegt nicht als freie DNA vor sondern ist ein Komplex aus Chromatin, DNA und Proteinen. Das Chromatin ist hierbei eine Folge von Nucleosomen, die aus je zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 bestehen. Um die Nucleosomen ist die DNA in circa zwei Windungen geschlungen. Die Faser hat hierbei ein Durchmesser von 10 nm. Mehrere Nucleosomen formieren zusammen mit Histon 1 (H1) das sogenannte Solenoidmodell mit circa 6-8 Nucleosomen pro Windung. Sie bilden dabei eine Faser mit einem Durchmesser von 30 nm. Die Chromatinschleifen bestehen aus 30 nm Fasern mit DNA-Abschnitten von 50-150 bp Länge. Die Verpackung der DNA in Chromatin hält diese möglicherweise in einem schwer zugänglichen, transkriptionell inaktiven Zustand. Während der Transkription wird diese höhere Ordnung aufgehoben, und die DNA wird sensitiv auf Behandlung mit Nucleasen 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 1998).

Das transkriptionell aktive Chromatin unterscheidet sich vom inaktiven Chromatin durch Veränderungen der Acetylierungsmuster, Phosphorylierung der Histone oder Bindung von HMG (*high mobility group*) Faktoren an das Nucleosom. Die posttransla-

tionale Acetylierung von Lysinresten in den Kernhistonen beeinflusst hierbei die Chromatinstruktur, verbessert den Zugang von Transkriptionsfaktoren an die nucleosomale DNA, und verstärkt dadurch die transkriptionelle Aktivierung (Turner und Neill 1995). 1995 wurde von Brownell und seinen Mitarbeitern ein Polypeptid mit Histon-Acetyltransferase (HAT) Aktivität entdeckt. Seitdem wurden mehrere transkriptionell regulatorische Proteine mit HAT Aktivität beschrieben, wie beispielsweise der humane Coaktivator TAFII250. Außerdem wurden in Hefen Histon-Deacetylasen (HD) identifiziert (Workman und Kingston 1998).

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

#### Locus-Control-Regionen (LCR), Isolatoren und *Matrix attachment regions* (MAR)

Locus-Control-Regionen (LCR) kennzeichnen chromosomale Regionen. Sie beeinflussen die Chromatinstruktur und aktivieren dadurch die Transkription. Ursprünglich hat man diese im  $\beta$ -Globin Locus von transgenen Mäusen identifiziert. Mittlerweile kennt man LCR auch in T-Zell-spezifischen Genen beispielsweise von CD2 (*cluster of differentiation 2*), CD4 und T-Zell-Rezeptor (TCR)  $\alpha/\beta$ . Die LCR definiert den Beginn und das Ende eines Genlocus, indem es dieses von den Effekten des angrenzenden Chromatins abgrenzt. Diese Region kann in aktiven Genen mehrere DNase I hypersensitive Stellen enthalten, die auf Chromatinöffnung in diesen Regionen hinweisen. Möglicherweise öffnen diese Bereiche die Chromatinanordnung für Transkriptionsfaktoren. Dabei interagiert die LCR mit Proteinen, die in der Lage sind, Nucleosomen zu repositionieren. Im  $\beta$ -Globin Locus vermitteln diese Elemente die gewebsspezifische, Positions- und Kopienanzahl-unabhängige Expression des  $\beta$ -Globin Gens (Kioussis und Festenstein 1997).

Isolatoren beinhalten zugängliche und geschlossene Chromatinstrukturen. Sie vermitteln ähnlich wie LCR Positions-unabhängige Genexpression, sind aber im Gegensatz zu den LCR nicht in der Lage, die Transkription zu verstärken. Isolatoren wurden als flankierende Elemente eines Hitze-Schock Locus in *Drosophila* und im  $\beta$ -Globin Locus bei Hühnern gefunden (Kellum und Schedl 1992).

*Matrix attachment regions* (MAR) sind DNA-Fragmente, die mit der Kern-Matrix assoziiert sind. Diese Regionen dienen potentiell dazu, die Chromosomen in Schleifen einzuteilen, welche unterschiedliche Gene exprimieren. Die MARs beinhalten A/T-reiche Sequenzen. Sie verstärken die Aktivität von benachbarten Enhancer und schützen Gene vor Positionierungseffekten. Damit haben diese Elemente ähnliche Effekte wie LCR und Isolatoren (Gasser und Laemmli 1987, Aronow et al. 1995, Forrester et al. 1994, McKnight et al. 1992, Stief et al. 1989, Jenuwein et al. 1997) .

### DNA-Methylierung

Die 5`-Methylierung von Cytosinen in CpG Nucleotidfolgen wurde postuliert als essentieller Mechanismus der transkriptionellen Regulation. Möglicherweise besteht bei Säugetieren eine Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression. Häufig sind gewebsspezifische Gene in Geweben, in denen sie nicht exprimiert werden, methyliert, während sie in Geweben, in denen sie aktiv sind, nicht-methyliert vorliegen. Folglich inaktiviert die DNA-Methylierung die Genexpression. Eine Anhäufung von CpG-Inseln findet man insbesondere vor Genen von Haushaltsproteinen (Ibelgaufts 1993).

CpG Nucleotidfolgen kommen statistisch fünfmal weniger vor als erwartet. Dieser Zustand hat sich während der Evolution entwickelt. Die eventuelle Desaminierung von Methylcytosin führt zu Thymin, das von Reparatursystemen nicht erkannt wird und daher eine Ursache spontaner Mutationen ist. Die Methylierung erfolgt während der Replikation durch das Enzym DNA-Methyltransferase. Das Fehlen dieses Enzyms führt zum Abbruch der Embryogenese bei Mäusen. Allerdings kommen andere Organismen wie *Drosophila* und Nematoden ganz ohne Methylcytosin aus. Auch bei Hefen hat man bislang kein Methylcytosin gefunden (Knippers 1995).

Methylierte, inaktive Gene sind mit nicht-acetylierten Histonen assoziiert. Acetylierte Histone werden hierbei mit der transkriptionellen Aktivierung korreliert. Außerdem sind Methyl-CpG-bindende Proteine bekannt, die mit HATs (Histon-Acetyl-Transferasen) und Corepressoren interagieren. Demnach wäre ein Mechanismus denkbar, bei dem die Methylierung die Histon-Acetylierung beeinflusst und dadurch die Genaktivierung in bestimmten Chromatinregionen reprimiert (Jones et al. 1998, Nan et al. 1998).

In Säugetieren wurde 1999 ein Protein mit Demethylaseaktivität für Methyl-CpG Oligonucleotide entdeckt. Dieses physiologische Enzym baut 5-Methylcytosin zu Cytosin und Methanol ab (Wolffe et al. 1999).

## **1.2 T-Zellen, Cytokine und Cytokinrezeptoren**

Im Thymus findet sowohl die programmierte Differenzierung als auch die Selektion von T-Zellen statt. T-Vorläuferzellen stammen aus dem Knochenmark und entwickeln sich im Thymus zu funktionellen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen. Die vorläufig naiven Zellen können dann in die Peripherie gelangen und Effektorzellen bilden, die aktiv zur adaptiven Immunität beitragen (Res und Spits 1999).

Das früheste Stadium der Thymocytenentwicklung ist der sogenannte doppelt negative Zustand. In diesem Stadium exprimieren die Zellen kein CD3 (*cluster of differentiation 3*) / T-Zell-Rezeptor (TCR $\alpha/\beta$ ) und auch keine CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Corezeptoren. Dann werden die rekombinationsaktivierenden Gene RAG-1 und -2 exprimiert. Diese Gene codieren die RAG-1 und -2 Proteine, die bei der Umordnung von Immunrezeptoren

wichtig sind. Anschließend wird das TCR $\beta$  Gen rearrangiert, und die Zellen exprimieren sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Marker auf ihrer Oberfläche. Dieses Stadium kennzeichnet doppelt positive T-Zellen. Die doppelt positiven T-Zellen rearrangieren nun TCR $\alpha$  und interagieren mit MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-II Molekülen auf der Oberfläche von Thymusepithelzellen und dendritischen Zellen. Diese Interaktion führt zur Positiv- bzw. Negativselektion der T-Zellen und zur Entwicklung von einfach positiven CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten. Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und die CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen wandern anschließend in die Peripherie aus (Haks et al. 1999).

Wenn eine naive T-Zelle ein spezifisches Antigen auf der Oberfläche einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC, z.B. Makrophage) antrifft, und diese Zelle zusätzlich costimulatorische Moleküle exprimiert, beispielsweise B7, dann wird eine Immunantwort ausgelöst. Die aktivierte Zelle produziert Interleukin (IL)-2, das nun ihre Proliferation und Differenzierung zur T-Effektorzelle steuert (Janeway und Travers 1995). Während CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen direkt Zielzellen bekämpfen können, die mit Krankheitserreger infiziert sind, regulieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Differenzierung, Proliferation und Funktion von anderen Zellen des Immunsystems (Kupfer und Singer 1993). Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen antworten über die Bindung ihres TCR an MHC-Klasse-II gebundenes Antigen auf Zielzellen, durch Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 Zellen. Diese Einteilung der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) wurde anhand des Cytokin-Expressionsmodells beider Subpopulationen definiert. T<sub>H</sub>1 Zellen beeinflussen die zellvermittelte Immunität gegen bakterielle und virale Krankheitserreger und produzieren hauptsächlich IL-2 und Interferon- $\gamma$ . Trotz ihrer protektiven Funktionen sind T<sub>H</sub>1 T-Zellen an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt. Dagegen produzieren T<sub>H</sub>2 T-Zellen vor allem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Diese Cytokine aktivieren B-Lymphocyten und induzieren die Antikörper-vermittelte, humorale Immunität (Abbas et al. 1996, Romagnani 1994).

Die molekularen Mechanismen, die zur Ausprägung der unterschiedlichen Cytokinproduktion in T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2-Zellen beitragen, sind weitgehend unklar. In den letzten Jahren stand diese Fragestellung im Mittelpunkt intensiver Forschungsarbeiten. Einerseits ist die TCR/Antigen Interaktion für die Aktivierung der naiven T-Zelle essentiell. Andererseits sind costimulatorische Signale wichtig, welche durch Interaktion von B7 auf der T-Zelle und CD28 auf der antigenpräsentierenden Zelle stattfinden. Außerdem ist die Anwesenheit bestimmter Cytokine während der Aktivierung der T-Zellen, das sogenannte *priming*, entscheidend für die Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2. Hierbei findet die T<sub>H</sub>1 Entwicklung nur in Gegenwart von IL-12 statt, während die T<sub>H</sub>2 Entwicklung IL-4 bedarf. Die Expression der verschiedenen Cytokine wird auf der transkriptionellen Ebene reguliert (Swain 1999).

Cytokine können vielfältige Aktivitäten innerhalb des Immunsystems vermitteln und

koordinieren. Diese vielfältigen Effekte werden nach Bindung dieser löslichen Mediatoren an spezifische, hochaffine Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen vermittelt. Die Rezeptoren der Cytokinrezeptor-Superfamilie sind Glykoproteine mit einer einzigen Transmembran Domäne und bestehen aus mindestens zwei identischen oder unterschiedlichen Rezeptor-Untereinheiten. Sie haben keine Proteinkinase Domänen und nur beschränkte Sequenzhomologie in ihren cytoplasmatischen Domänen. Ihre cytoplasmatischen Domänen sind mit der Src (*signaling receptor of cytokines*) Familie von Proteintyrosinkinasen (PTK) und mit einer anderen Familie von PTK, den Janus Kinasen (JAKs) assoziiert. Die Rolle von Proteintyrosinkinasen bei der Cytokinsignaltransduktion wurde zunächst für die Src-Familie, genauer für PTK p56<sup>lck</sup> (Lck), Fyn und Lyn bei der IL-2 Rezeptor  $\beta$  Kette-vermittelten Signaltransduktion, demonstriert. Die Rolle der Src Familie bei der Signalweiterleitung ist noch weitgehend unklar. Jedoch hat man herausgefunden, daß IL-2 die Tyrosinphosphorylierung und Assoziation des Adaptor-Proteins Shc (*Src homology cofactor*) induziert, die den Ras (*receptor associated signaling*)-Signaltransduktionsweg aktiviert. Der Ras Weg führt letztendlich zur Aktivierung der MAPK (*mitogen activated protein kinase*), die zur Nucleustranslokation des Transkriptionsfaktors AP-1 (activator-protein 1) führt (Taniguchi 1995).

Im Brennpunkt intensiver Forschung stehen momentan die Janus Kinasen (JAK). Alle Cytokinrezeptoren scheinen eine oder mehrere Mitglieder dieser PTK Familie aktivieren zu können. Zu der JAK Familie gehören die Tyrosinkinase TYK2 und JAK1 bis 3. Die Ligandenbindung an den Rezeptor führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der assoziierten JAKs. Die Phosphorylierungs-Substrate der JAKs sind Transkriptionsfaktoren der STAT Familie (*signal transducer and activator of transcription*). Diese Proteine translozieren nach Phosphorylierung und Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren in den Kern der Zelle. Dort regulieren sie dann die Expression cytokingesteuerter Gene, durch Wechselwirkung mit spezifischen DNA-Bindemotiven und dem Transkriptionsinitiationskomplex (Ihle et al. 1995, 1996).

### 1.2.1 Transkriptionelle Regulation von Genen in T-Zellen

Die transkriptionelle Regulation von Genen in T-Zellen ist sehr komplex. Bereits zu Beginn wurde auf die vielfältigen Regulationsmechanismen hingewiesen, die bei der Regulation der Genexpression in eukaryontischen Genen eine Rolle spielen. Dabei besteht der Schwerpunkt laufender Forschungsarbeiten in der Ermittlung von DNA/Protein Interaktionen an Promotoren/Enhancer und in der Entschlüsselung der Rolle des Chromatins und der DNA-Methylierung bei der aktiven Transkription.

### 1.2.1.1 Wichtige Transkriptionsfaktoren von T-Lymphocyten

Die Entwicklung von T-Lymphocyten sowie deren Proliferation und Differenzierung wird durch ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Im folgenden Abschnitt werden einige wichtige Familien von Transkriptionsfaktoren in T-Vorläuferzellen und T-Zellen vorgestellt. Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren sind jedoch nicht auf T-Zellen restringiert, sondern im hämatopoetischen und lymphoiden Zellsystem weit verbreitet. Manche dieser Transkriptionsfaktoren werden konstitutiv im Nucleus exprimiert, während andere erst nach Aktivierung der Zellen in den Nucleus translozieren und dort an DNA binden.

#### Basische Leucin-Zipper-Proteine (bZIP)

Zu den in T-Zellen relevanten Proteinen mit einem basischen Leucin-Zipper (bZIP) DNA-bindenden Motiv gehören die AP-1 (*activator-protein-1*), CREB (*cAMP response element binding protein*)/ATF (*associated transcription factor*) und c-Maf (*mitogen activated factor*) Familien.

Der AP-1-Komplex besteht aus Dimeren von sogenannten Fos-Transkriptionsfaktoren (cFos, FosB, Fra-1 und Fra-2), die Homo- und Heterodimere bilden können, und Jun-Faktoren (cJun, JunB und JunD), die Heterodimere mit Fos-Proteinen bilden können. Aufgrund seines DNA-Bindungsmotivs gehört AP-1 zur Leucin-Zipper-Gruppe. Es bindet an eine charakteristische palindromische DNA-Sequenz 5'-TGAG/CTCA-3'. Die Expression des AP-1-Komplexes ist wichtig für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphocyten und spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation von Cytokingenen, wie beispielsweise von IL-2. AP-1 wird jedoch ubiquitär exprimiert und reguliert unterschiedliche, induzierbare Gene. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren wird vor allem durch einen von der c-Jun aminoterminalen Kinase (JNK) abhängigen Mechanismus phosphoryliert. Danach translozieren aktivierte AP-1 Dimere in den Kern. AP-1 kann hierbei die Chromosomenstruktur aufheben. Folglich kann dieses Protein durch Veränderung der Chromatinstruktur die Transkription beeinflussen (Angel und Karin 1991, Wooi-ng et al. 1997).

Die CREB/ATF Familie beinhaltet 6 Mitglieder ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, CREB1 und CREB2. Es handelt sich hierbei um Leucin-Zipper-Proteine, die an das spezifische CRE (*CREB response element*) Element mit der Sequenz 5'-TGANNTCA-3' binden. CREs gibt es in einer Vielzahl von T-Zell-Genen. Die transkriptionelle Aktivierung dieses Faktors erfolgt nach Phosphorylierung eines spezifischen Serins (Ser 119) (Montminy et al. 1990). Barton et al. zeigten 1996, daß Thymocyten von transgenen Mäusen, die eine dominant negative Form von CREB exprimieren, proliferative Defekte haben. Die Thymocyten weisen eine drastisch reduzierte IL-2 Expression auf, sind in der G1 Zellzyklus-Phase arretiert und zeigen typische Merkmale von Apoptose. Dieser

proliferative Defekt in den transgenen Mäusen ist assoziiert mit einer signifikant reduzierten Induktion von AP-1. Folglich ist die Aktivierung von CREB die Voraussetzung für die normale Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 und der daraus resultierenden IL-2 Produktion und Proliferation von Thymocyten.

c-Maf (*mitogen activated factor*) gehört wie AP-1 und CREB zur Gruppe der basischen Leucin-Zipper-Proteine. c-Maf ist ein T<sub>H</sub>2 spezifischer Transkriptionsfaktor, der den IL-4 Promotor *in vitro* kontrolliert. c-Maf überexprimierende, transgene Mäuse weisen eine verstärkte Produktion von T<sub>H</sub>2 Cytokinen, vor allem von IL-4 auf (Ho et al. 1996, 1998).

### Basische Helix-Loop-Helix Proteine (E-Box bindende Proteine)

Aufgrund ihrer DNA-Bindedomäne wurde diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren als basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine klassifiziert. Diese Faktoren binden an charakteristische Consensus DNA-Sequenzen, den sogenannten E-boxen 5'-CANNTG-5'. Sie wurden ursprünglich im Immunglobulin-Intron-Enhancer als B-Zell-spezifisch charakterisiert (Murre et al. 1987).

Das E2A Gen ist ein wichtiges Mitglied dieser Familie von bHLH-Proteinen. Es gibt zwei alternativ prozessierte Mitglieder von E2A nämlich E12 und E47. Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist Tal1, das auch an E-Boxen binden kann. Tal1 ist ein Onkogen, das vor allem durch chromosomale Translokation in der T-Zell-akuten lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) überexprimiert wird. Tal1 wird in T-Zellen normalerweise nicht exprimiert, sondern nur in hämatopoetischen Stammzellen. Tal1 überexprimierende, transgene Mäuse entwickeln spontan T-Zell-Lymphome. Aber auch E2A defiziente Mäuse weisen T-Zell-Leukämien auf. Es wird angenommen, daß E2A Genprodukte die Proliferation und das Überleben von T-Zellen kontrollieren. Der Verlust dieser Aktivität führt zu unkontrolliertem Wachstum und Tumorbildung (Park et al. 1999).

### Zinkfinger-Proteine

Zu den zwei wichtigen Zinkfinger-Proteinen, die bei der T-Zell-Entwicklung und Differenzierung eine Rolle spielen, gehören GATA und Ikaros Proteine. Zinkfinger-Proteine werden so genannt, weil sie wiederholte Motive aus Cystein (C) und Histidin (H) enthalten, die mit einem Zinkion eine dreidimensionale Struktur, den sogenannten C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger entfalten (Watson et al. 1993).

Die Proteine der GATA Familie (GATA-1 bis GATA-6) enthalten eine Doppel-Zinkfinger-Struktur (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>) mit der sie an das GATA DNA-Sequenzmotiv in Zielgenen binden können. Die GATA Familie wurde ursprünglich als essentiell für die Erythropoese identifiziert. Mittlerweile konnten zahlreiche Studien belegen, daß GATA-3 bei der Regulation des T-Zell-Rezeptors, der Differenzierung von T-Zellen und der Produktion von T<sub>H</sub>2-Cytokinen eine große Rolle spielt (Zheng und Flavell 1997).

Die Ikaros Familie besteht aus 6 Mitgliedern Ikaros (Ik) 1 bis 6. Die meisten Mitglieder der Ikaros Familie binden mit ihren N-terminalen sowie C-terminalen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Proteinen an eine G-reiche Sequenz (5'-TGGGGGT-3'). Die Ikaros Expression ist restringiert auf das fötale und adulte hämo- und lymphopoetische System. Ikaros *knock-out* Mäuse haben keine T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung reguliert Ikaros die frühe Entwicklung von Lymphocyten aus pluripotenten Stammzellen (Cortes et al. 1999).

### Ets-Familie

Die Ets (*E26 transformation specific*)-Familie von Transkriptionsfaktoren umfaßt zahlreiche Proteine, die mit einer charakteristischen DNA-Sequenz GGA bzw. GGAA interagieren. Von den zahlreichen Familienmitgliedern (z.B. Ets-1, Elf-1, PU.1) werden einige ubiquitär, andere jedoch nur in bestimmten Zellarten exprimiert. Diese Transkriptionsfaktoren sind in vielfältigen biologischen Prozessen involviert, wie Wachstumskontrolle, Transformation und Zellentwicklung. Sie sind nicht nur essentiell bei der Lymphocytendifferenzierung, sondern auch bei der Drosophila Entwicklung und bei der Xenopus Eizell-Differenzierung. Meistens kooperieren Ets-Proteine mit anderen Faktoren, um die Genexpression zu induzieren. Elf-1 kann unter anderem mit AP-1 und NF-κB-Proteinen interagieren (Wasylyk et al. 1990,1993).

Ets-1 scheint ein wichtiger Regulator der T-Zell-Entwicklung zu sein. Die Inaktivierung des Ets-1 Gens in *knockout* Mäusen führt zur verstärkten T-Zell-Apoptose und zu einer verminderten Anzahl reifer T-Zellen (Muthusamy et al. 1995).

PU.1 ist ein multifunktionseller Faktor, der unter anderem essentiell ist für die Generierung lymphoider und myeloider Vorläuferzellen. Die Inaktivierung dieses Gens in *knockout* Mäusen führt zu einem kompletten Verlust von B- und T-Vorläuferzellen (McKercher et al. 1996).

Elf-1 wird spezifisch in T- und B-Zellen exprimiert. Dieser Faktor bindet an regulatorische Elemente im CD4-Enhancer und IL-2-Enhancer und kann mit AP-1 Proteinen Komplexe bilden (Thompson et al. 1992).

### OCT-Proteine

Zu der Octamer (Oct)-Familie gehören verschiedene Proteine mit unterschiedlichem Transaktivierungspotential, die spezifisch mit dem Octamermotiv 5'-TACGTTTA-3' interagieren können. Dazu gehört das ubiquitär exprimierte Oct-1-Protein sowie das B-Zell-spezifische Oct-2-Protein. Alle Octamerproteine besitzen eine konservierte, zweigeteilte DNA-Bindedomäne, die als POU-Domäne bezeichnet wird. POU steht hierbei für die Transkriptionsfaktoren **P**it 1 (*pituitary factor 1*), **O**ct (Octamer Protein) und **U**nc86. Diese Proteine werden als POU Proteine zusammengefaßt. Die POU-Domäne besteht aus einer POU-spezifischen Teil in der aminoterminalen Region und aus der POU-

Homöobox. Die Homöobox kennzeichnet hierbei ein typisches Helix-Turn-Helix Motiv. Beide Teile der POU-Domäne können sich unabhängig voneinander zum Helix-Turn-Helix Motiv entfalten (Dekker et al. 1993).

In T-Zellen reguliert Oct-1 die Aktivität des Interleukin-2 Promotors. Oct-2 spielt hingegen eine wichtige Rolle bei der Transkription der Immunglobulingene in B-Zellen (Corcoran und Kavelas 1994, Garrity et al. 1994).

### HMG-Box Proteine

Zu dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren gehören Tcf-1 (*T-cell factor 1*), Lef-1 (*lymphoid enhancer factor 1*) und Sox-4. Sie enthalten eine DNA-Bindedomäne, die homolog ist zur DNA-Bindedomäne der *high mobility group 1* (HMG1) Proteine. Diese Transkriptionsfaktoren binden mit ihrem HMG-Box Motiv bevorzugt an die 5`-CAAAG-3` DNA-Sequenz. Sie bevorzugen hierbei ungewöhnliche DNA-Strukturen wie etwa kreuzförmige DNA oder Formen wo B-Form und Z-Form der DNA aufeinandertreffen. HMG-Box-Proteinen haben eine wichtige regulatorische Funktion bei der T-Zell-Differenzierung (Okamura et al. 1998).

### NFAT-Familie

NFAT (nucleärer Faktor von aktivierten T-Zellen) beinhaltet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, zu der NFAT1 (NFATp), NFAT2 (NFATc), NFAT3 und NFAT4 gehören. Bei NFATp und NFATc gibt es zusätzliche Spleißvarianten, die potentiell unterschiedliche Funktionen vermitteln (Rao et al. 1997).

NFAT wird in T-Zellen nach Stimulation über den TCR/CD3-Komplex aktiviert. Dabei wird die phosphorylierte, cytoplasmatische Form von NFAT durch das Ca<sup>2+</sup>-abhängige und Cyclosporin-sensitive Protein Calcineurin, dephosphoryliert. Anschließend transloziert das dephosphorylierte NFAT-Protein, das meist als Dimer vorliegt, in den Nucleus und bindet an GA-reiche DNA-Sequenzen in Zielgenen. Im IL-2 Promotor interagieren NFAT p/c Heterodimere mit AP-1 Familienmitglieder. Weiterhin gibt es auch das NFAT interagierende Protein NIP-45, das bei der IL-4 Promotorregulation eine Rolle spielt (Ranger et al. 1998a, 1998b).

NFAT bindet an die Promotoren zahlreicher Cytokingene in T-Zellen, z.B. IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Dieser Transkriptionsfaktor ist ein wichtiges Ziel für die Immunsuppression durch Cyclosporin und Glucocorticoide. In T-Zellen von NFATp *knockout* Mäusen wurde eine signifikant erhöhte IL-4 Produktion registriert, während T-Zellen von NFATc defizienten Mäusen kein IL-4 mehr produzieren konnten (Oukka et al. 1998).

### NF- $\kappa$ B Familie

In Säugetieren umfaßt NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Dazu gehören p50 und sein Vorläuferprotein p105, p52 und sein Vorläuferprotein p100, p 65 (Rel A), c-Rel und Rel B. Diese Proteine sind dadurch charakterisiert, daß sie über eine 300 Aminosäuren lange, sogenannte Rel-Homologie-Domäne verfügen. Diese vermittelt die DNA-Bindung, Dimerisierung und Bindung an den NF- $\kappa$ B Inhibitor I $\kappa$ B. Auch I $\kappa$ B-Proteine bilden eine Familie von Faktoren, zu der I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$  (p105), Bcl-3, I $\kappa$ B $\delta$  (p 100), I $\kappa$ B $\epsilon$  und Bcl-3 gehören. In Drosophila kennt man die Rel Proteine Dorsal, Dif, Relish und die I $\kappa$ B Proteine Relish und Cactus. Als NF- $\kappa$ B Prototyp wird das Heterodimer aus dem p50- und dem p65-Protein bezeichnet. Die Familienmitglieder können jedoch in beliebigen Kombinationen Heterodimere bilden, wobei einzelne Familienmitglieder auch als Homodimere an DNA binden können (z.B. p50). Die NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktorfamilie bindet an die spezifische DNA-Sequenz 5`-GGGACTTTC-3`. Diese Sequenz hat man in einer ganzen Reihe von Genen gefunden, die bei Akutphasereaktionen, Regulation der Immunantwort und viralen Replikationsvorgängen (z.B. von HIV) von essentieller Bedeutung sind (Neurath et al. 1998). Wenn T-Zellen durch Phorbolmyristataacetat (PMA), Phytohämagglutinin (PHA), IL-2, IL-18 oder Kreuzvernetzung ihrer Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 aktiviert werden, dann wird NF- $\kappa$ B induziert. Inaktives NF- $\kappa$ B wird im Cytoplasma durch inhibitorisches I $\kappa$ B Protein sequestriert. Nach Aktivierung der T-Zelle wird aus diesem inaktiven NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B-Komplex NF- $\kappa$ B freigesetzt. Die Dissoziation von NF- $\kappa$ B bewirkt die Ubiquitinierung und den Abbau von I $\kappa$ B. Aktives NF- $\kappa$ B transloziert anschließend in den Nucleus der Zelle, wo es an regulatorische DNA Sequenzen, beispielsweise im Cytokingenpromotor von IL-2 binden kann (Chen et al. 1996).

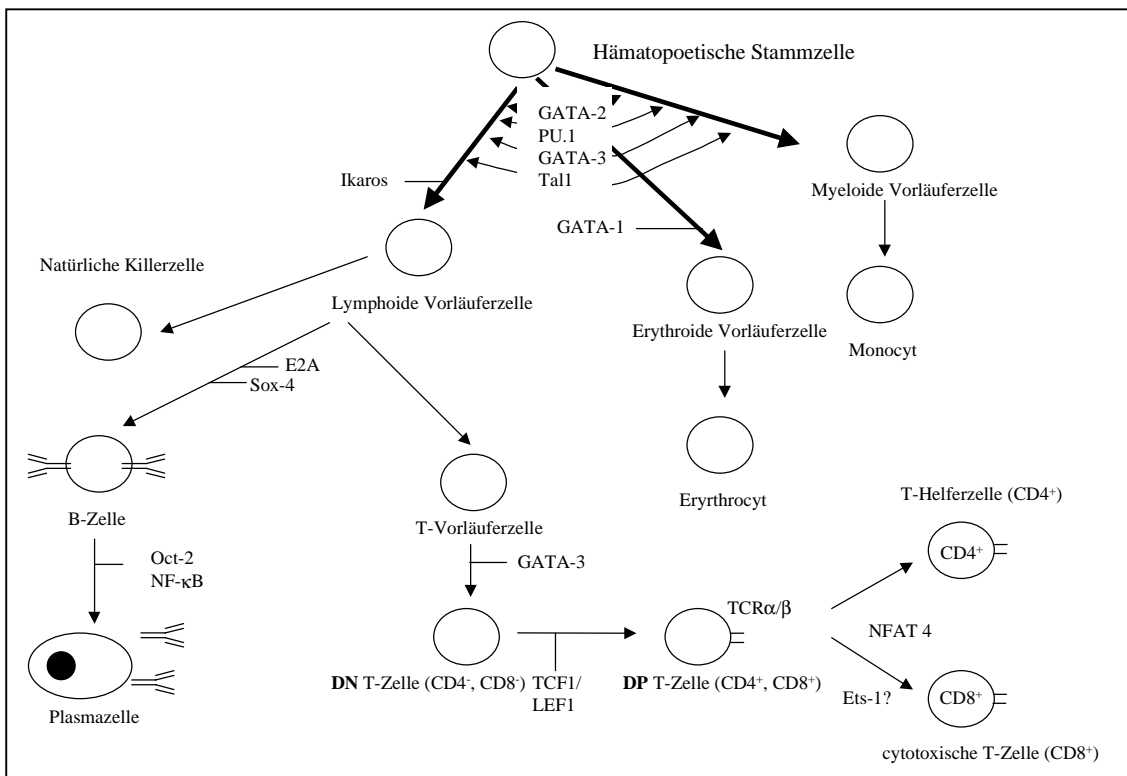
### STAT (*signal transducer and activators of transcription*) Familie

Die STAT Familie stellt eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die an der Cytokinrezeptor-vermittelten Signaltransduktion in den Nucleus beteiligt ist. Ihre Aktivierung erfolgt sehr schnell, teilweise innerhalb von fünfzehn Minuten nach Ligandenbindung an den Cytokinrezeptor. Diese schnelle Aktivierung wird dadurch ermöglicht, daß inaktive STAT Proteine im Cytoplasma bereits vorhanden sind. Die ersten Vertreter der STAT Familie wurden als DNA-bindende Proteine identifiziert, welche die von Interferonen regulierte Genexpression kontrollieren. Bislang sind sechs Mitglieder der STAT Familie (STAT1-6) sowie negative Spleißvarianten, wie z.B. STAT1 $\beta$ , bekannt (Ihle 1996).

Sobald Cytokine an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden, erfolgt die Assoziation der Rezeptorkomponenten, die dazu führt, daß assoziierte Janus-Kinasen (JAKs) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Hierauf phosphorylieren diese Kinasen sich gegenseitig und auch ein spezifisches Tyrosin (Tyr<sup>440</sup>) in der cytoplasmatischen Cyto-

kinrezeptor Domäne. Der phosphorylierte Rezeptor kann nun spezifische STAT Proteine über ihre sogenannte Src Homologie 2 (SH2) Domäne rekrutieren. Die STATs werden anschließend von den JAKs an einem spezifischen Tyrosin (Tyr<sup>701</sup>) phosphoryliert und somit aktiviert. Nach Aktivierung bilden die STAT Proteine stabile Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Nucleus, wo sie an spezielle Bindestellen, den sogenannten  $\gamma$ -activation-sites (GAS) binden (Karnitz und Abraham 1995).

Die Spezifität von Cytokinrezeptor-vermittelten Reaktionen wird dadurch gewährleistet, daß nur bestimmte JAK/STAT Familienmitglieder durch einzelne Cytokine aktiviert werden. So aktiviert Interferon- $\alpha/\beta$  über JAK1 und TYK2 STAT-1, STAT-2 und STAT-3, während Interferon- $\gamma$  über JAK1 und JAK2 zur Aktivierung von STAT-1 führt. Diese Spezifität des JAK/STAT Signalweges konnte in STAT-1 *knockout* Mäusen gezeigt werden. Diese Mäuse hatten Defizienzen in den Interferon-vermittelten Immunantworten und waren daher anfällig für virale Infekte (Darnell 1997).



**Abbildung 1.1** Modell der Hierarchie von Transkriptionsfaktoren während der Entwicklung des hämatopoetischen Systems. PU.1, GATA, und Tal1 Transkriptionsfaktoren regulieren vor allem die Entwicklung pluripotenter Stammzellen, welche die lymphoiden, myeloiden und erythroiden Vorläuferzellen generieren. Ikaros ist zuständig für die Entwicklung der lymphoiden Vorläuferzellen, die zur B- und T-Zell-Entwicklung führen. GATA-3 ist hingegen auch bei der Differenzierung der doppelt negativen (DN) T-Zellen notwendig. Weil diese Transkriptionsfaktoren allgemeine lymphoide und myeloide Stammzellen generieren, führt ihr Ausschalten notwendigerweise zum Ausfall der normalen T-Zell-Entwicklung (DN-doppelt negativ, DP-doppelt positiv).

### 1.2.1.2 Transkriptionelle Regulation der Differenzierung und Cytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen

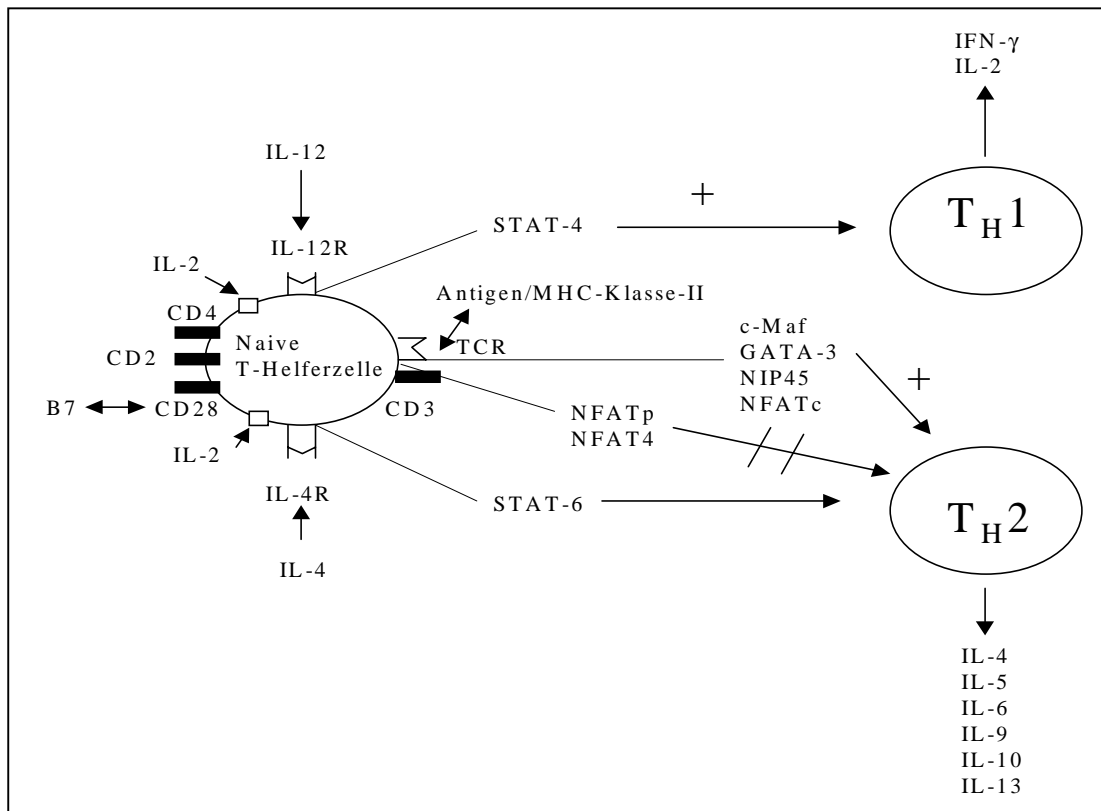
Naive CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen antworten auf die antigenspezifische Aktivierung durch Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) oder T<sub>H</sub>2 (IL-4,-5,-6,-9,-10,-13). Wie dieser Differenzierungsprozeß abläuft ist jedoch bislang ungeklärt. Man nimmt jedoch an, daß die Präsenz bestimmter Cytokine und spezifischer, von Cytokinen aktivierten Transkriptionsfaktoren, notwendig ist. Aus diesem Kontext ergeben sich mehrere Fragestellungen. Erstens ist noch nicht genau geklärt wie die transkriptionelle Regulation von Cytokingenen funktioniert, und zweitens ist noch unklar wie diese Prozesse zur Differenzierung von T-Helferzellen beitragen. Die Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 und die Cytokinproduktion stellen zwei ineinander verflochtene, grenzüberschreitende Prozesse dar, die in diesem Abschnitt gemeinsam erläutert werden.

Mit Hilfe von *in vivo* DNase I Hypersensitivitätsassays wurde in murinen T<sub>H</sub>2-Zellen gezeigt, daß nach der Antigenstimulation die koordinierte Umstrukturierung von Chromatin (*remodeling*) und die CpG Demethylierung der Cytokingene IL-4/IL-13/IL-5 erfolgt. Derselbe *remodeling* Prozeß, aber diesmal nur am IFN- $\gamma$  Locus, findet in differenzierenden T<sub>H</sub>1 Zellen statt. In der Studie von Agarwal und Rao 1998 wurde ein Modell aufgestellt, bei dem die Antigen-induzierte Umstrukturierung von Chromatin die Besetzung regulatorischer DNA Sequenzen durch spezifische Transkriptionsfaktoren bewirkt.

Die T<sub>H</sub>2 Differenzierung wird durch IL-4 initiiert und benötigt den IL-4 responsiven Transkriptionsfaktor STAT-6. Andererseits setzt die T<sub>H</sub>1 Differenzierung das Vorhandensein von IL-12 und STAT-4 voraus. Die Cytokinproduktion in den T-Zellen wird hierbei auf der Ebene der Gentranskription und durch bestimmte Transkriptionsfaktoren reguliert (siehe Abbildung 1.2).

Insbesondere wurde die transkriptionelle Regulation des IL-4 Promotors intensiv erforscht. Die detaillierten molekularen Analysen ergaben wichtige *cis*-regulatorische Elemente. Die Besetzung dieser Elemente im IL-4 Promotor durch NFAT und AP-1 Transkriptionsfaktoren ist essentiell für die IL-4 Genaktivierung. Weiterhin wurde gezeigt, daß T<sub>H</sub>2 spezifische Faktoren wie GATA-3 und c-Maf die IL-4 Genexpression verstärken. Hierbei aktiviert c-Maf direkt den IL-4 Promotor, während GATA-3 eher ein Chromatin *remodeling* Prozess initiiert, um den IL-4 Genlocus für Transkriptionsfaktoren zugänglich zu machen. GATA-3 besitzt jedoch auch eine direkte transaktivierende Eigenschaft, die bei der Aktivierung des Promotors für das T<sub>H</sub>2 Cytokin IL-5 demonstriert wurde. Die kritische Rolle von c-Maf wurde auch anhand von c-Maf defizienten und c-Maf überexprimierenden Mäusen demonstriert, deren T-Zellen nach entsprechender Stimulation kein bzw. sehr viel IL-4 produzierten (Glimcher und Singh 1999).

Über die  $T_H1$  Differenzierung ist weitaus weniger bekannt. Man geht jedoch davon aus, daß IL-12 und STAT-4 für die Polarisierung der T-Zelle in diese Richtung benötigt werden.  $T_H1$  T-Zellen produzieren hauptsächlich IFN- $\gamma$  und IL-2. IL-2 ist ein potenter autokriner Wachstumsfaktor für T-Zellen. Für die Induktion der IL-2 mRNA Transkripte ist die Aktivierung der T-Zelle durch TCR/Antigen Interaktion und durch costimulatorische Signale (B7/CD28) notwendig. Bereits nach 45 Minuten wird das IL-2 mRNA Transkript exprimiert. Alle essentiellen regulatorischen Bindemotive des IL-2 Promotors befinden sich innerhalb von 300 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart. Diese *cis*-wirkenden Elemente interagieren mit NFAT, AP-1 (c-Jun/c-Fos), NF- $\kappa$ B und Oct-1 Proteinen, um die Genaktivität zu initiieren. Bis auf Oct-1 ist die Bindung aller dieser Transkriptionsfaktoren induzierbar. Hierbei erfolgt die Besetzung der Bindestellen am IL-2 Promotor kooperativ. Demzufolge führt die Cyclosporin A (CsA) Behandlung der T-Zellen nicht nur zur Aufhebung der NFAT-Bindung sondern auch zur Beseitigung aller anderer Protein/DNA Interaktionen am IL-2 Promotor (Jain et al. 1995).



**Abbildung 1.2** Schema der Transkriptionsfaktoren, welche die Differenzierung der T-Helferzellen in Richtung  $T_H1$  und  $T_H2$  kontrollieren. In Gegenwart von IL-2, IL-4, TCR Aktivierung (Antigen-spezifisch oder CD3 vermittelt) und costimulatorischer Signale (B7-CD28) findet die  $T_H2$  Differenzierung statt. Dabei fördern die Transkriptionsfaktoren STAT-6, c-Maf, GATA-3, NIP45 und NFATc diesen Differenzierungsprozeß. NFATp und NFAT4 hingegen hemmen diesen Prozeß. Durch TCR Aktivierung, costimulatorische Signale und IL-12 erfolgt die  $T_H1$  Entwicklung. Dabei übt der IL-12 induzierte Transkriptionsfaktor STAT-4 eine positive regulatorische Funktion aus.

## 1.3 IFN- $\gamma$

Die Interferone wurden 1956 von Isaacs und Lindenmann als antivirale Substanzen entdeckt. Das Wort Interferon entstand im Labor-Slang und ist darauf zurückzuführen, daß diese Stoffe mit Viren interferieren. Definitionsgemäß sind Interferone Proteine, die antiviral, antiproliferativ und immunmodulierend wirken.

Mittlerweile werden die Interferone (IFN) als Cytokine klassifiziert. Man unterscheidet drei Hauptklassen von Interferonen, die als IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  bezeichnet werden. Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten werden IFN- $\alpha$  und - $\beta$  als Typ 1-IFN und IFN- $\gamma$  als Typ 2 IFN bezeichnet. IFN- $\alpha$  und - $\beta$  weisen Sequenzhomologien auf, binden an gemeinsame Zielrezeptoren und üben vor allem antivirale Aktivität aus. IFN- $\gamma$  hat keine Sequenzhomologie zu den anderen Interferonen, wirkt hauptsächlich immunmodulatorisch und bindet an spezifische Rezeptoren. IFN- $\gamma$  und - $\beta$  werden beim Menschen von einem Gen codiert, während IFN- $\alpha$  von einer Familie von mindestens 23 verschiedenen Genen codiert wird (Ibelgaufts 1992).

### 1.3.1 Expression und Funktion von IFN- $\gamma$

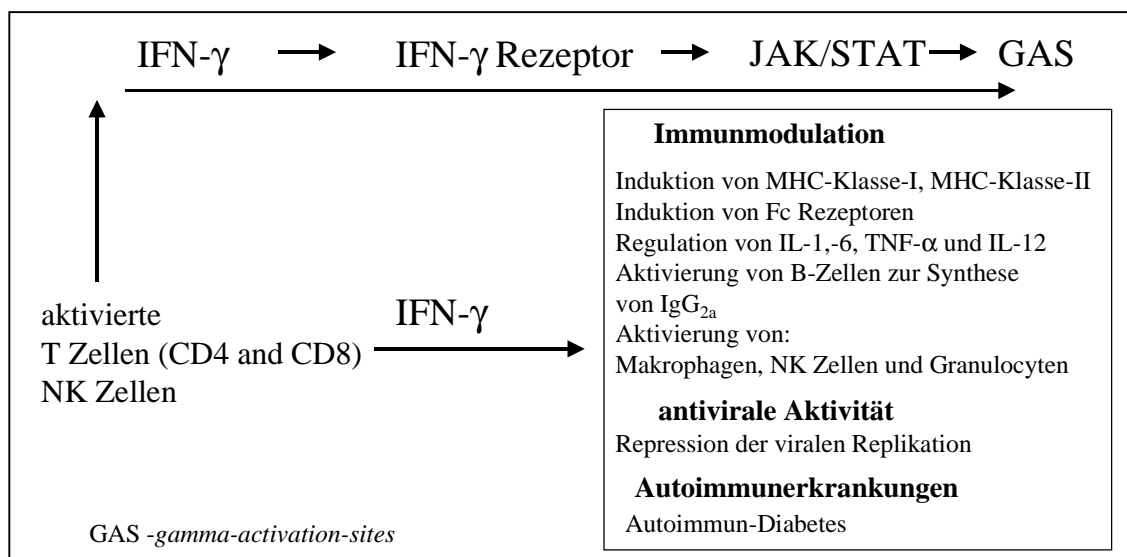
IFN- $\gamma$  wird hauptsächlich von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen vom T<sub>H</sub>1 Subtyp, cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und natürlichen Killerzellen synthetisiert. IFN- $\gamma$  wurde jedoch auch in murinen peritonealen Makrophagen festgestellt (Di Marzio et al. 1994). Das Protein liegt als Dimer vor, ist an zwei Stellen glykosyliert und besteht aus 146 Aminosäuren. Die Glykosylierung ist hierbei für die biologische Aktivität nicht notwendig (Young et al. 1989a).

Die IFN- $\gamma$  Rezeptoren wurden bislang auf allen getesteten humanen Zelltypen gefunden, mit Ausnahme von reifen Erythrocyten. Der auf Monocyten und anderen hämatopoetischen Zellen vorkommende Rezeptor hat eine Molmasse von circa 140 kd, während auf anderen Zelltypen ein 54 kd großes Protein festgestellt wurde. Ähnlich wie bei IL-2, IL-6, IL-4 und IL-7 wurden auch lösliche IFN- $\gamma$  Rezeptoren identifiziert (Aguet 1990).

Die Funktionen von IFN- $\gamma$  im Immunsystem sind sehr vielfältig und daher wird das Cytokin als pleiotrop bezeichnet. Es induziert die Cytotoxizität von natürlichen Killerzellen (NK) und Makrophagen, verstärkt das T<sub>H</sub>1 Zellwachstum, erhöht die Expression von MHC-Klasse-II und MHC-Klasse-I und stimuliert die Synthese von IgG<sub>2a</sub> durch aktivierte B-Zellen (Young und Hardy 1989b). Die wichtigsten Effekte von IFN- $\gamma$  sind in Abbildung 1.3 zusammengefaßt. Die Makrophagen von IFN- $\gamma$  defizienten Mäusen haben eine verringerte Produktion von antimikrobiellen Produkten und eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-II Molekülen auf ihrer Oberfläche. Weiterhin weisen die IFN- $\gamma$  *knockout* Mäuse eine reduzierte NK Cytotoxizität auf. Diese Defizienzen führen

zu einem Versagen der Abwehr gegen bakterielle Infektionen. Folglich sterben die Mäuse bereits an einer sublethalen Dosis des intrazellulären Pathogens *Mycobacterium bovis* (Dalton et al. 1993).

Wie bereits beschrieben, übt IFN- $\gamma$  seine Wirkung auf Zielzellen nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor. Der IFN- $\gamma$  Rezeptor ist mit Janus-Kinase 1 und 2 assoziiert. Nach der Aktivierung, phosphorylieren diese Kinasen STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-1 Transkriptionsfaktoren, die als Dimere in den Nucleus translozieren. Diese Transkriptionsfaktoren binden an bestimmte Zielsequenzen, den sogenannten GAS (*gamma activated sequence*), mit der Consensus Sequenz 5`-(G/A)GGAAAN(N)GAAACT-3`. Diese GAS sind in einer Vielzahl von Genen vorhanden. Das IFN- $\gamma$  Gen selbst beinhaltet sowohl im Bereich seines Promotors als auch in den Introns solche GAS Sequenzen, an denen unterschiedliche STAT Faktoren binden können. IFN- $\gamma$  Rezeptor *knockout* Mäuse haben eine defiziente antibakterielle und antivirale Immunabwehr. Sie sind daher anfällig für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *Vaccinia* Viren (Huang et al. 1993). Außer seinen protektiven antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften bei der Immunabwehr ist IFN- $\gamma$  bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Erkrankungen, wie der chronischen Polyarthritis und Colitis beteiligt (Manoury-Schwarz et al. 1997, Neurath et al. 1995, Murphy et al. 1994). Außerdem ist dieses Cytokin in Autoimmunerkrankungen, wie der Autoimmun-Diabetes, involviert (Sarvetnik et al. 1988).



**Abbildung 1.3** Biologische Funktionen von IFN- $\gamma$ . Aktivierete T-Zellen und NK-Zellen produzieren IFN- $\gamma$ , das nach Bindungen an seinen spezifischen Rezeptor zur Aktivierung des JAK/STAT Signaltransduktionswegs in T-Zellen führt. STAT Transkriptionsfaktoren binden hierbei an spezifische GAS (*gamma-activation sites*) DNA-Bindemotive in Zielgenen. IFN- $\gamma$  übt immunmodulatorische und antivirale Aktivität aus. Dieses Cytokin ist jedoch auch in Autoimmunerkrankungen involviert.

### 1.3.2 Struktur und transkriptionelle Regulation des IFN- $\gamma$ Gens

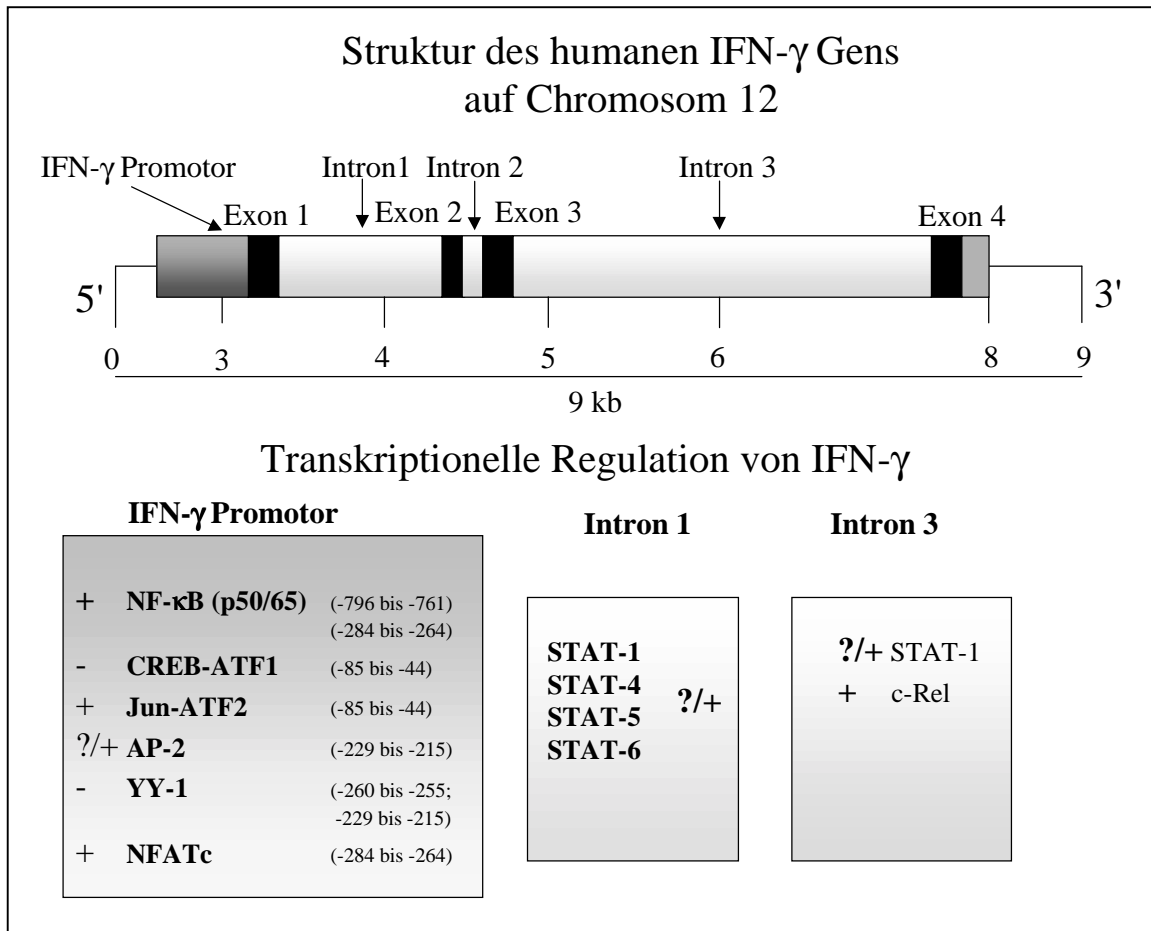
Das humane IFN- $\gamma$  Gen wurde auf Chromosom 12 lokalisiert. Es hat eine Länge von circa 9 kb und setzt sich zusammen aus vier Exons und drei Introns (siehe Abbildung 1.4). Das IFN- $\gamma$  Gen ist zwischen verschiedenen Spezies größtenteils konserviert, weist aber keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Genen auf (Gray und Goeddel 1982).

IFN- $\gamma$  wird auf transkriptioneller Ebene reguliert. Dabei spielt die Chromatinstruktur eine wichtige Rolle. Fünf DNase I hypersensitive Stellen (DHS) wurden in aktivierten, IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen festgestellt. Zwei DHS befinden sich circa 200 bp und 3 kb stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt, zwei befinden sich im ersten Intron und eine liegt im dritten Intron. Diese DHS weisen auf Chromatinöffnung hin und ihr Auftreten korreliert mit der Genaktivität. Möglicherweise ist in diesen Regionen der Zugang von Transkriptionsfaktoren an die DNA gewährleistet (Agarwal S. und A. Rao 1998, Hardy et al. 1985, Hardy et al. 1987).

Ein weiterer Mechanismus der transkriptionellen Regulation ist die Methylierung von CpG Inseln. Die Hypomethylierung des IFN- $\gamma$  Gens erfolgt an CpG Sequenzen innerhalb des IFN- $\gamma$  Promotors und im ersten Intron. Die Hypomethylierung korreliert hierbei mit der Genaktivierung (Young et al. 1994, Melvin et al. 1995).

Der IFN- $\gamma$  Promotor enthält eine TATA-Box und *cis*-regulatorische Sequenzen. Alle notwendigen Protein/DNA Interaktionen, welche die T-Zell-Spezifität und Genaktivierung *in vivo* widerspiegeln, finden innerhalb von 300 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle (TSS) statt. Die Aktivität dieser 300 bp wird zudem durch immunsuppressive Substanzen wie Cyclosporin A und Glucocorticoide reprimiert. Außerhalb dieser 300 bp Sequenz gibt es noch eine NF- $\kappa$ B (p50/p65) DNA-Bindestelle, die 760 bp stromaufwärts der TSS liegt und als Aktivatorelement charakterisiert wurde. Auch im ersten sowie im dritten Intron wurden *cis*-regulatorische Elemente festgestellt (Sica et al. 1997, Campbell et al. 1996, Cippitelli et al. 1995).

In Abbildung 1.4 sind relevante Transkriptionsfaktoren, die zur IFN- $\gamma$  Genaktivierung beitragen, zusammengefaßt. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung, stellen NF- $\kappa$ B (p50/65), NFATc und Jun-ATF2 Aktivatoren des IFN- $\gamma$  Promotors dar. Die Transkriptionsfaktoren YY-1 und CREB/ATF1 hingegen, wurden als Repressoren der transkriptionellen Aktivierung charakterisiert. Die Funktion der STAT Faktoren im ersten und dritten Intron ist noch nicht geklärt. Möglicherweise handelt es sich um Aktivatoren. Weiterhin wurde eine *cis*-regulatorische Sequenz im dritten Intron festgestellt, an die der NF- $\kappa$ B Faktor c-Rel bindet und die zu einer verstärkten Aktivierung *in vitro* führt (Sica et al. 1992, Xu et al. 1996, Penix et al. 1996, Ye et al. 1996a, Murphy 1998, Young 1996).



**Abb. 1.4** Struktur und transkriptionelle Regulation des IFN- $\gamma$  Gens.

Das humane IFN- $\gamma$  Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert, hat eine Länge von circa 9 kb und umfasst 4 Exons und drei Introns. Sowohl im Bereich des Promotors als auch im Intron 1 und 3 wurden regulatorische Sequenzen festgestellt, die mit den angegebenen Transkriptionsfaktoren interagieren. Einige Transkriptionsfaktoren wirken als Aktivatoren (+) und andere als Repressoren (-). Die Funktion einiger DNA-bindenden Faktoren (z.B. STATs im Intron 1) ist nicht bekannt, aber es könnte sich um potentielle Aktivatoren (?/+) handeln.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

IFN- $\gamma$  ist essentiell für die protektive Immunität gegen Salmonellen, Mycobakterien und viralen Infektionen wie HBV (Hepatitis B Virus) und HIV (*human immunodeficiency virus*). Auf der anderen Seite ist dieses Cytokin in Autoimmunerkrankungen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen involviert. Die genauen molekularen Mechanismen der Regulation von IFN- $\gamma$  in T-Zellen sind bisher jedoch noch nicht aufgeklärt. Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, die Expression von IFN- $\gamma$  im humanen System auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen. Dadurch sollten neue Gesichtspunkte der Regulation des IFN- $\gamma$  Promotors aufgeklärt werden.

Die Untersuchungen setzten die Identifikation geeigneter Zellen voraus. Daher sollten zunächst in Stimulations- und Zeitkinetikexperimenten T-Zelllinien mit einer induzierbaren Aktivität des IFN- $\gamma$  Promotors gefunden werden. Anschließend sollten sowohl in pri-

mären T-Zellen aus Blutkonserven sowie in Zelllinien molekulare Vorgänge am IFN- $\gamma$  Promotor mit Hilfe verschiedener Techniken analysiert werden. Hierbei sollten *in vivo*-Footprinting Experimente durchgeführt werden, um Erkenntnisse über Protein/DNA Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor in der intakten, lebenden Zelle zu erhalten. In Gel-shiftassays sollten dann die Zellkernextrakte auf sequenzspezifische Bindung hin untersucht werden. Transiente Transfektionen von IFN- $\gamma$  Reportergenkonstrukten sollten dann die Funktion der identifizierten regulatorischen Elemente aufklären. Das Ziel bestand vor allem darin, neue potentielle Bindemotive für Transkriptionsfaktoren zu finden, die an der Regulation der IFN- $\gamma$  Expression beteiligt sind. Dabei sollte auch die Induzierbarkeit dieser Protein/DNA Interaktionen durch Cytokine wie IL-12 und IL-18, die bei der Induktion der IFN- $\gamma$  Produktion essentiell sind, analysiert werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Untersuchungen war die Fragestellung, ob die in den Zelllinien und primären T-Zellen gewonnenen Erkenntnisse mit den tatsächlichen Verhältnissen im intakten Organismus vergleichbar sind. Daher sollten transgene Mäuse hergestellt werden, die den humanen IFN- $\gamma$  Promotor unter der Kontrolle eines Reportergens exprimieren. Die Analyse der Reportergenaktivität in den Mäusen sollte hierbei die Überprüfung der transienten Transfektionen *in vivo* ermöglichen. Weiterhin sollte die Aktivierung und *in vivo* Regulation des humanen IFN- $\gamma$  Promotors im transgenen Mausmodell analysiert werden.

Alle geplanten Untersuchungen sollten mit Hilfe neuer experimenteller Ansätze einen Einblick in die komplexe *in vivo* Regulation des humanen IFN- $\gamma$  Promotors geben und somit zum Verständnis der molekularen Genregulation von IFN- $\gamma$  beitragen.

## 2 Material und Methoden

Alle aufgeführten Methoden wurden, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, selbstständig von mir durchgeführt.

### 2.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Plastikwaren wurden von den Firmen steril bezogen. Zellkulturflaschen (25, 80, 175 cm<sup>2</sup>) wurden von der Firma (Fa.) Greiner, Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-well) von der Fa. Costar (Bodenheim), Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml) und Plastikpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml) von der Fa. Greiner (Frickenhausen), Pipettenspitzen (0,5-10; 10-100; 100-1000 µl) und Safe-lock Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2 ml) von der Fa. Eppendorf (Hamburg) verwendet.

Chemikalien und Lösungen wurden in pro Analysis (p.A) Qualität verwendet. Falls nicht anders aufgeführt wurden alle Reagenzien 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), Promocell (Heidelberg), 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. Alle Glas- und Metallgeräte wurden vor Gebrauch für 4 h bei 180°C sterilisiert. Alle Lösungen wurden bei 120°C bei einem Druck von 1,2 bar für mindestens 20 min autoklaviert oder sterilfiltriert.

Die Kultivierung von frisch isolierten Zellen und Zelllinien erfolgte in supplementiertem RPMI 1640 (Seromed). Die Kultivierung der Zelllinien und Primärzellkulturen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Das Kulturmedium wurde je nach Dichte der Zellen alle 2-5 Tage ausgetauscht. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden Zellen mit Trypanblau-Lösung angefärbt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, das die Bestimmung der Lebendzellzahl ermöglicht. Die Zellmembranen lebender Zellen sind für 5-10 min impermeabel für den Farbstoff, während sich das Cytoplasma toter Zellen augen-

blicklich blau anfärbt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zellkammer verwendet. Nach Auszählung von einem Großquadrat (=16 Einzelquadrate) errechnet sich diese nach folgender Formel:  $N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$

$N$  = Zahl der Zellen/Großquadrat,  $V$  = Verdünnungsfaktor mit Trypanblau (meistens beträgt der Verdünnungsfaktor 2 bis 10),  $10^4$  = Kammerkonstante

Zur Kryokonservierung wurden  $1-5 \times 10^6$  Zellen/ml Einfriermedium in Kryoröhrchen aliquotiert und bei  $-70^\circ\text{C}$  in einem Styroporbehälter für 24 h tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen auf RT erwärmt und sofort in Medium resuspendiert, abzentrifugiert, in Kulturmedium aufgenommen und ausgesät.

## 2.2.2 Medien und Lösungen

Tabelle 2.1 Kulturmedium und Puffer für die Zellkultur

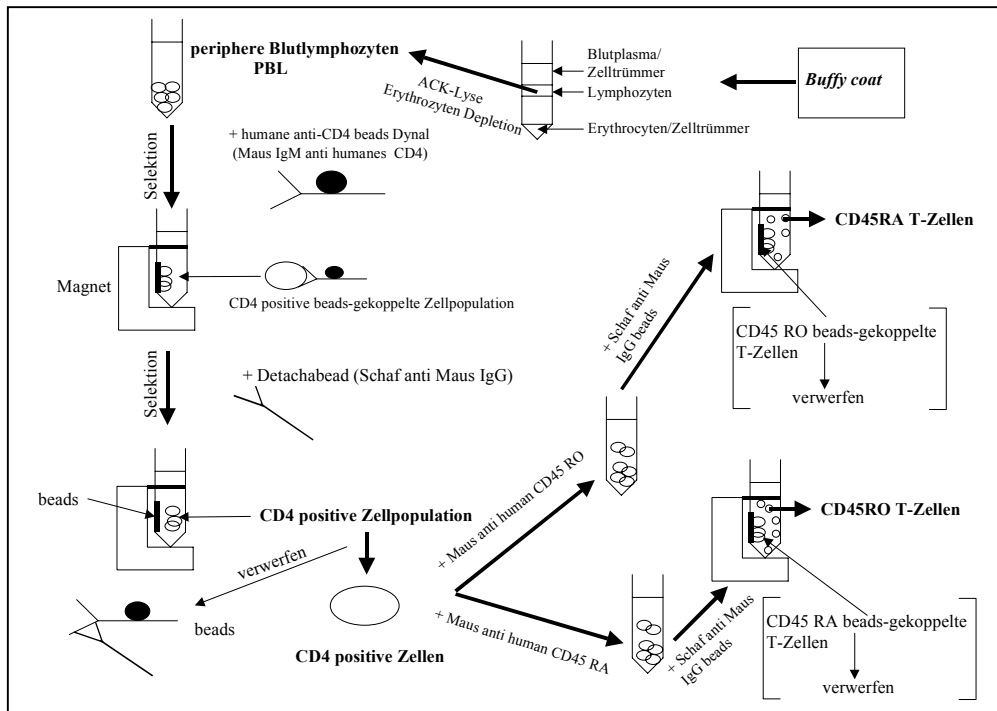
<b>Kulturmedium</b> RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Seromed) 10% [v/v] FCS (Fötales Kälberserum, Firma PAA, hitzeinaktiviert für 45 Minuten bei $56^\circ\text{C}$ ) 50 mM HEPES (Gibco BRL) 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed)	<b>1x HBSS pH 7,4</b> (Hanks Balanced Salt solution) 5,4 mM KCl 0,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,4 mM $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ 4,2 mM $\text{NaHCO}_3$ 1,3 mM $\text{CaCl}_2$ 0,5 mM $\text{MgCl}_2$ 0,6 mM $\text{MgSO}_4$ 1,37 mM NaCl 5,6 mM D-Glucose ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,4	<b>Coating-Medium</b> 1x HBSS pH 7,4 10% [v/v] FCS 20 mM HEPES 5 mM EDTA pH 8,0
		<b>Ficoll Dichte Gradienten-Lösung</b> (Seromed) Dichte: 1,077 g/ml
<b>Trypanblau-Lösung</b> 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.	<b>ACK-Puffer (pH 7,27)</b> $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 154 g $\text{KHCO}_3$ 0,5 g EDTA 18,6 mg ad 500 ml Aqua dest. pH 7,27	<b>1x PBS</b> 0,15 M NaCl 0,01 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
		<b>Einfriermedium</b> 90% [v/v] FCS 10% [v/v] DMSO (Roth)

## 2.2.3 Isolierung von humanen $\text{CD4}^+$ , $\text{CD45RO}^+$ und $\text{CD45RA}^+$ T-Zellen

Zunächst wurden mittels Ficoll-Hypaque Gradienten (Seromed) aus *buffy coats* (Blutbank Mainz) periphere Blutlymphocyten (PBL) isoliert. Dabei betrug die Ausbeute an PBL aus einem *buffy coat* ca.  $1 \times 10^8$  Zellen. Nach dem Waschen in 1x PBS, (1600 rpm, 5 min) wurden die Erythrocyten durch Zugabe von ACK-Puffer depletiert. Erythrocyten- und ACK-Pufferreste wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS+2% FCS entfernt. Anschließend wurden mit immunomagnetischen beads ( $1,4 \times 10^8$  beads/ml, Fa. Dynal) durch Positivselektion  $\text{CD4}^+$  T-Helferzellen nach den Angaben

des Herstellers isoliert. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Markierung der humanen Zellen mit Maus IgM monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker (z.B. CD4), die mit magnetischen Partikeln (beads) konjugiert sind. Hierbei ist bekannt, daß die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellpopulation 42,8% der gesamten Lymphocytenpopulation im Blut eines Erwachsenen ausmacht (Wiener et al. 1990). Dabei wurden 2 beads pro geschätzte Zielzelle aus der Gesamtzellpopulation eingesetzt, d.h. ca. 500 µl beads (1,4x10<sup>8</sup> beads/ml Stammlösung) bei 1x10<sup>8</sup> PBL. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C (unter Schütteln) wurde das Röhrchen, welches die Suspension von markierten und unmarkierten Zellen enthielt, in einem speziellen Magneten hereingestellt. Während markierte Zellen am Röhrchenrand durch die magnetische Anziehungskraft hafteten, wurden die negativen Zellen gewaschen. Die selektionierten Zellen wurden anschließend mit dem *Detachabead*-Reagenz inkubiert, das einen polyklonalen Antikörper gegen das FAB Fragment des magnetisierten Maus IgM Primärantikörpers enthält. Dabei wurden 10 µl (1 Unit) des Reagenzes bei 1x10<sup>6</sup> beads-markierten Zielzellen eingesetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 25 min bei RT (unter Schütteln) wurde der Magnet-gekoppelte Primärantikörper von der positiv selektionierten Zelle abgelöst. Mit diesem von Dynal speziell entwickeltem System der Positivselektion betrug die Ausbeute an isolierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen ca. 20% der Gesamtpopulation von PBL. Die Reinheit der isolierten Zellen betrug ca 95%. Der Reinheitsgrad der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durch FACS (*fluorescent activated cell sorter*)-Analysen bestimmt (siehe 2.3.1, Seite 28).

In einem zweiten Verfahren wurden aus den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch Negativselektion CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen isoliert. Um beide T-Zell-Subpopulationen zu isolieren, wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 1x PBS gewaschen, und nach Aufnahme in 10 ml Coating-Medium auf zwei 50 ml Röhrchen verteilt. Zu jedem 5 ml Ansatz wurden jeweils anti-CD45RA bzw. anti-CD45RO Antikörper (Stammlsg. 0,5 µg/ml, Fa. Pharmingen) in einer Konzentration von 6 µg (30 µl Stammlsg.) pro 1x10<sup>8</sup> CD4<sup>+</sup> Zielzellen hinzugefügt. Hierbei wurde angenommen, daß sich in jedem Ansatz ca. 50% CD45RA<sup>+</sup> und 50% CD45RO<sup>+</sup> Zielzellen befinden. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden zu jedem Ansatz 100 µl Schaf anti Maus IgG Dynabeads (4x10<sup>8</sup> beads/ml, Fa. Dynal) hinzugefügt und bei 4°C für weitere 30 min (unter Schütteln) inkubiert. Die Beads-markierten Zellen wurden dann mit Hilfe des Dynal-Magneten selektioniert und verworfen. Die Restpopulation wurde anschließend gewaschen und der Reinheitsgrad der isolierten CD45RO<sup>+</sup> bzw. CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen durch FACS-Analyse bestimmt (siehe 2.3.1, Seite 28). Eine schematische Darstellung der hier beschriebenen Methode zur Isolierung von CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45 RA<sup>+</sup> T-Zellen ist in Abbildung 2.1, Seite 25, gezeigt.



**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der Dynabead/Detachabead Methode zur Isolierung von CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45 RA<sup>+</sup> T-Zellen.

## 2.2.4 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2.2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung
Jurkat	humane Thymom-Zelllinie
EL-4	murine Thymom-Zelllinie
BW5147	murine Thymom-Zelllinie
K 46	murine B-Zelllinie
Mopc315	murine Plasmazelllinie
RPMI 8866	murine B-Zelllinie (B-lymphoblastoide Zelllinie)
Raji	humane B-Zelllinie (Burkitt's Lymphom)
HeLa	humane epitheliale Zelllinie (Adenocarcinoma)
HepG2	humane Hepatomzelllinie
COS-7	Affen Nieren-Zelllinie (Fibroblasten)
NIH3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie
THP-1	humane Monocyten-Zelllinie
MPC-11	murine Plasmazelllinie
P388	murine Makrophagen-Zelllinie
KG-1	murine Myeloblasten Zelllinie (Makrophagen ähnlich)
J774	murine Makrophagen-Zelllinie

### 2.2.5 Isolierung von murinen Einzelzellsuspensionen aus der Milz sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz

Für die Präparation von primären Milzzellen wurden 6-12 Wochen alte Mäuse des Stammes FVB/NHSD bzw. IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgene FVB/NHSD Mäuse verwendet, die im Tierstall des Instituts für Pathologie der Universität gezüchtet wurden. Nach cervikaler Dislokation wurde den Mäusen durch einen Flankenschnitt die Milz entnommen und in sterilem PBS zwischengelagert. Mit dem Kolbenende einer 5 ml Spritze wurden die Milzen durch ein 100  $\mu$ m Zellsieb (Costar) gepreßt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Erythrocyten durch Zugabe von 5 ml ACK-Puffer depletiert. Erythrocyten- und ACK-Pufferreste wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS+2% FCS entfernt. In der vorliegenden Arbeit wurden Studien mit primären CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt, deren Anteil an der Milzzellpopulation ungefähr 20% beträgt (Janeway und Travers 1995). Das MACS System (Fa. Miltenyi, Bergisch Gladbach) wurde eingesetzt, um aus Milzzellsuspensionen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren.

Das Prinzip der Methode beruht auf einer Markierung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker, die mit ferromagnetischen Mikropartikeln (Microbeads) konjugiert sind. Die Suspension von markierten und unmarkierten Zellen wird über eine Säule mit einem starken Permanentmagneten gegeben. Während magnetisch markierte Zellen gebunden werden, können negative Zellen gewaschen werden.

Für die Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden Positivselektionssäulen (VS<sup>+</sup>) und CD4/CD8 Microbeads (Miltenyi) eingesetzt. Als Puffer für alle Reaktionsschritte wurde MACS-Puffer (PBS + 2 mM EDTA+ 2% [v/v] FCS) verwendet. Zuerst wurden die primären Milzzellen in MACS-Puffer resuspendiert und mit der Microbeadsuspension versetzt (200  $\mu$ l beads pro  $1 \times 10^8$  Zielzellen). Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 4° C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Microbeads wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4° C) und in neuem Puffer resuspendiert. Zur Vorbereitung der Zellseparation wurde die VS<sup>+</sup> Positivselektionssäule zusammen mit dem Adapter im Magneten positioniert und mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert. Danach wurden die markierten Zellen (maximal  $4 \times 10^8$ ) auf die Säule gegeben. Es wurde 4mal mit je 3 ml Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde als negative Fraktion gesammelt. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt und mit 5 ml MACS-Puffer gefüllt. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einem Kolben durch die Säule gepreßt und in ein 15 ml Röhrchen aufgefangen (positive Fraktion). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert. Der Reinheitsgrad der isolierten Zellen wurde durch FACS-Analyse bestimmt und betrug 95%.

## 2.2.6 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Faktoren

Tabelle 2.3 Eingesetzte Faktoren für Stimulationsexperimente

Substanz	Hersteller	Effekte auf T-Zellen	Verwendete Konzentration
Phytohämagglutinin (PHA)	Pharmacia	Mitogen, polyklonale Aktivierung	50 µg/ml
Concanavallin A (Con A)	Pharmacia	Mitogen, polyklonale Aktivierung	2 µg/ml
A23187	Sigma	Calciumionophor, u.a Aktivierung Calcium-abhängiger Signaltransduktion	1 µg/ml
Ionomycin	Sigma	Calciumionophor, u.a Aktivierung Calcium-abhängiger Signaltransduktion	1 µg/ml
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma	Phorbolster, Aktivierung von Proteinkinase C	50 ng/ml
Prednisolon	Merck	Corticosteroid	8 µM
Dexamethason	Merck	Corticosteroid	5 µM
Cyclosporin A (CsA)	Sigma	Hemmung Calcineurin-abhängiger Wege	1 µg/ml
IL-2 (human)	PBH	Cytokin, multiple Wirkungen	40 u/ml
IL-4 (human)	Pharmingen	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-7 (human)	Pepto Tech	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-10 (human)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-12 (human)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-16 (human)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	10 ng/ml
IL-18 (IGIF, human)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	10 ng/ml
TGF-β1 (human)	R&D	Cytokin, multiple Wirkungen	1 ng/ml
antiCD3 (human)*	Pharmingen	Kreuzvernetzung des TCR, Aktivierungssignal	1 µg/ml
antiCD28 (human)*	Pharmingen	Bindung an CD28, costimulatorisches Signal	1 µg/ml
antiCD3 (murin)*	Pharmingen	Kreuzvernetzung des TCR, Aktivierungssignal	1 µg/ml
antiCD28 (murin)*	Pharmingen	Bindung an CD28, costimulatorisches Signal	1 µg/ml
Interleukin 2 (murin)	Peptotech	Cytokin, u.a. Proliferation	10 ng/ml
Interleukin 4 (murin)	Promocell	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-12 (murin)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	5 ng/ml
IL-18 (IGIF, murin)	Peptotech	Cytokin, multiple Wirkungen	25 ng/ml
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma	kein Effekt auf T-Zellen, Aktivierung von B-Zellen, Makrophagen	1 µg/ml
SAC (Pansorbin cells, Formalin-fixierte Staphylococcus aureus)	Cabiochem	kein Effekt auf T-Zellen, Aktivierung von B-Zellen, Makrophagen	1: 10000

\* Die Ak anti-CD3 und CD28 wurden entweder direkt zur Zellkultur hinzugefügt (1 µg/ml) oder die Zellkulturplatte wurde mit den Ak *gecoatet*. Dazu wurden die Ak in 1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,2 gelöst (5 µg Ak/1 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub>). 200 µl dieser Lösung wurden pro well einer 24-well Platte eingesetzt. Danach wurde die Platte 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal mit 1x PBS (500 µl/well) gewaschen. Anschließend wurde die jeweilige Zellsuspension (1 ml/well) hinzugefügt.

## 2.3 Methoden zur Untersuchung der Proteinexpression

### 2.3.1 Analytische Durchflußcytometrie (FACS)

Der Reinheitsgrad der isolierten primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Zur quantitativen Messung der Proteinexpression wurde ein Durchflußcytometer (*FACScan*; Becton & Dickinson) verwendet. Bei dieser Methode erfolgt der Nachweis der Proteinantigene über indirekte oder direkte Immunfluoreszenz-Markierung. Bei der indirekten Markierung bindet ein spezifischer, monoklonaler Primärantikörper an das Antigen und wird dann über einen Fluorochrom-markierten Anti-Immunglobulin (Ig) Sekundärantikörper detektiert. Beim direkten Nachweis ist der Primärantikörper mit dem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert, so daß die Verwendung eines Sekundärantikörpers entfällt. Ein hierfür geeignetes Fluorochrom ist z.B. das grün (520 nm) emittierende Fluoreszein-Derivat FITC (Fluorescein-Isothiocyant). Sein Absorptionsmaximum liegt in einem Wellenlängenbereich von 492 nm.

#### Funktionsprinzip eines Durchflußcytometers

Durch hydrodynamische Fokussierung werden einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das von dem Argonionen-Laser emittierte monochromatische Licht (488 nm) regt die Fluoreszenz der Fluorochrome an. Dabei erfaßt ein Detektor die erzeugte Lichtstreuung und die Fluoreszenzintensität. Die Streuung des Laserlichts wird in Richtung des einfallenden Strahls (FSC=Vorwärtstreulicht) und quer zur Strahlrichtung (SSC=Rechtwinkelstreulicht) gemessen. Das FSC ist hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße, während das SSC von der Zelldichte und der Zellgranularität abhängig ist. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Antikörper (Ak)-Bindungsstellen und somit ein Maß für die Dichte des untersuchten Antigens der jeweiligen Zelle.

#### Durchführung

CD4 positive Zellen wurden mit einem Fluoreszenz-Isothiocyant (FITC) gekoppelten monoklonalen anti CD4 Ak (Pharmingen) direkt markiert. CD45RO<sup>+</sup> bzw. antiCD45RA<sup>+</sup> Zellen wurden indirekt markiert mit einem Maus IgG Ak (anti CD45RO bzw. anti CD45RA, Pharmingen) und einem anti Maus IgG-FITC (Pharmingen) Sekundärantikörper. Für die Markierung wurde aus den zu untersuchenden Zellen ein Aliquot von  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen entnommen und mit 1 µg Ak versetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen mit 1 ml PBS+1% Formaldehyd fixiert. Die Aufbewahrung der Ansätze bis zur Messung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

### Auswertung der Meßdaten

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. Für die Berechnung der absoluten Fluoreszenzintensität (=Δmean-Wert) wurde der Wert der Negativkontrolle (Isotypkontrolle) abgezogen.

## **2.3.2 ELISA**

Die ELISA Versuche (Enzyme linked immunosorbent assays) wurden von Frau Ulrike Süßdorf (I. Med. Klinik Mainz, AG. Dr Schlaak) durchgeführt.

### Prinzip der Methode

Aus Zellkulturüberständen wurde mittels Sandwich-ELISA die IFN- $\gamma$  Proteinmenge quantifiziert. Dabei wurde ein IFN- $\gamma$  spezifischer monoklonaler Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Absättigung unspezifischer Proteinbindungen durch Zugabe von BSA (Bovines Serum Albumin), wurden die zu testenden Proben und rekombinantes IFN- $\gamma$  zur Ermittlung der Standardkurve dazupipettiert. Wenn IFN- $\gamma$  vorhanden war, wurde es von dem monoklonalen Antikörper gebunden. Alle anderen Proteine wurden im nächsten Waschschrift beseitigt. Anschließend wurde ein zweiter IFN- $\gamma$  spezifischer, Biotin markierter monoklonaler Ak hinzugefügt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde streptavidingekoppelte Peroxidase hinzugefügt. Dabei bindet Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Substrat für die Peroxidase ist Wasserstoffperoxid, das zum Radikal gespalten, im Chromogen TMB (Trimethybenzidin) eine Farbveränderung von hellgrün nach dunkelgrün bewirkt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 N Schwefelsäure verwendet. Die anschließende Messung erfolgte spektralphotometrisch bei einer Testwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde eine Standardkurve erstellt, bei der die photometrisch ermittelte optische Dichte gegen die IFN- $\gamma$  Konzentration in den Standardansätzen aufgetragen wurde. Durch Vergleich der optischen Dichte (OD) der gemessenen Proben mit der Standardkurve wurde die Cytokinkonzentration bestimmt.

### Versuchsdurchführung

Der IFN- $\gamma$  spezifische monoklonale Antikörper (Pharmingen) wurde auf 2  $\mu\text{g/ml}$  in Coating-Puffer (siehe Tab. 2.1, Seite 23) verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden in die wells einer 96-well Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde pro well 200  $\mu\text{l}$  Absättigungspuffer hinzuge-

geben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde die Platte dann 2mal gewaschen. 100 µl Zellkulturüberstände und rekombinantes IFN- $\gamma$  (R&D Biosystems) in verschiedenen Verdünnungen wurden zu jedem well 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 well hinzupipettiert. Danach wurde die Platte 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und 4mal gewaschen. Es wurden 100 µl/well 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 6mal gewaschen. Unmittelbar vor Gebrauch wurden 20 ml Substratpuffer mit 1 ml TMB-Lösung gemischt. Von dieser Lösung wurden je 200 µl in die wells 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.

Tabelle 2.4 Puffer und Lösungen für den ELISA

<b>Coating-Puffer</b> 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8,2	<b>PBS/Tween</b> 0,5 ml Tween 20 in 1 l PBS	<b>Absättigungspuffer</b> PBS mit 3%BSA
<b>Stoppuffer</b> 28ml konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in 500ml H <sub>2</sub> O	<b>Substratpuffer</b> 0,033 M Zitronensäure mit KOH auf pH 4,1 eingestellt	
<b>TMB- Lösung</b> 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		

### 2.3.3 Isolierung und Quantifizierung von Proteinen

#### Isolierung von Gesamtzell-Proteinextrakten

Zur Isolierung von Gesamtzell-Proteinextrakten wurden die Zellen ( $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$ ) in 1 ml T<sub>40</sub>E<sub>10</sub>N<sub>150</sub> Puffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) wurde das Pellet mit 1x PBS gewaschen und in Flüssigstickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Danach wurde das Zellpellet in 70 µl WCE (*whole cell extract*)-Puffer resuspendiert. Nach der Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm, wurde der Gesamtproteine enthaltende Überstand in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 2.5 Puffer zur Isolierung von Gesamt-Zellextrakten

<b>T<sub>40</sub>E<sub>10</sub>N<sub>150</sub> Puffer</b>	<b>WCE (whole cell extract)-Puffer</b>
40 mM Tris pH 7,9	10 mM HEPES pH 7,9
10 mM EDTA pH 8,0	400 mM NaCl
150 mM NaCl	0,1 mM EDTA pH 8,0
	5% (v/v) Glycerin
	1 mM DTT
	1 mM PMSF

### Isolierung von nucleären Proteinen

Die Isolierung der nucleären Proteine erfolgte nach der Methode von Schreiber et al. 1989.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 10 ml eiskaltem PBS resuspendiert und bei 1500 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ) 5 min abzentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden diese bei 15000 rpm für 25 s abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 400  $\mu\text{l}$  eiskaltem PBS wiederholt. Das Pellet wurde dann in 180  $\mu\text{l}$  HB Puffer aufgenommen und für 25 s bei 15000 rpm abzentrifugiert. Danach wurden 240  $\mu\text{l}$  Lysepuffer addiert und der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 15000 rpm abzentrifugiert. Der cytoplasmatische Proteine enthaltende Überstand wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Das Pellet wurde zur Gewinnung der nucleären Proteine in 100  $\mu\text{l}$  Puffer C aufgenommen. Zum Versuchsansatz wurde ein Mini-Rührstab (5 mm) hinzugegeben und bei  $4^\circ\text{C}$  für 15 Minuten auf einem Magnetrührer bei hoher Drehzahl gemixt. Diese Reaktion diente zur mechanischen Lyse der Kernmembranen. Danach wurden die nucleären Extrakte bei  $4^\circ\text{C}$  für 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der nucleäre Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Tabelle 2.6 Puffer für die Isolierung von nucleären Proteinen

<b>HB-Puffer</b>	<b>Lysepuffer</b>	<b>Puffer C</b>
10 mM Tris-HCl pH 7,3 10 mM KCl 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ 0,5 mM PMSF	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 bzw. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF		
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin		
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin		
20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin		

### Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurden 2-10  $\mu\text{l}$  Proteinextrakt auf 800  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit Aqua dest. verdünnt. Dazu wurden 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (Biorad) hinzugefügt. Nach 5 min Inkubation mit diesem Reagenz wurde die Messung bei 595 nm in einem Photometer (Spectronic 601, Miltenroy) durchgeführt. Anhand des Vergleichs mit dem BSA-Standard bzw. anhand der BSA Eichkurve wurde die Proteinkonzentration berechnet.

## 2.3.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde speziell zur Anreicherung des Transkriptionsfaktors GATA-3 aus cytoplasmatischen und nucleären Extrakten verwendet. Für die Immun-

präzipitation wurden gleiche Konzentrationen von nucleären bzw. cytoplasmatischen Proteinextrakten verwendet. Je 40 µg Protein pro Ansatz wurden in 1 ml kaltem RIPA-Puffer (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% Natrium-Desoxycholat, 0,1% SDS, 100 µg/ml PMSF, 10 µg/ml Aprotinin) resuspendiert. Dann wurden 5 µl anti-GATA-3 Agarose-konjugierte beads (Santa Cruz) hinzupipettiert und bei 4°C für 1 h geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren (6000 rpm, 5 min) wurde das Immunpräzipitat zweimal mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und dann in 20 µl Western Blot 1x Probenpuffer (siehe Tabelle 2.7, Seite 34) aufgenommen. Die Proben wurden für 3 min bei 90°C gekocht und die Agarose-beads wurden anschließend abzentrifugiert (25 s bei 15000 rpm).

### 2.3.5 In vitro Transkription/Translation von Proteinen

#### Prinzip der Methode

Für die *in vitro* Transkription/Translation von Proteinen wurde das TNT System von Promega verwendet. Für die Herstellung von RNA-Transkripten mit diesem Kit verwendet man spezifische Expressionsvektoren (z.B. pcDNA2.1, pcDNA 3.1), die sich dadurch auszeichnen, daß sie in der Nähe der Klonierungsstelle den Promotor des Gens für eine RNA-Polymerase tragen, nämlich T7, T3 oder SP6. Die hinter diesem Promotor einklonierte Fremd-DNA (cDNA) wird spezifisch unter der Kontrolle dieses Promotors abgelesen und liefert bei der Transkription genspezifische RNA. Liegt der Promotor jedoch hinter der Klonierungsstelle so entsteht antisense RNA, die als Negativkontrolle verwendet werden kann. Für die biochemische *in vitro* Translation der mRNA gibt man zu dem Reaktionsansatz bestimmte Zellextrakte. Bei dem TNT-System handelt es sich um Weizenkeim- bzw. Kaninchen-Retikulocyten Extrakte. Darin enthalten sind eine Reihe von Komponenten, welche die *in vitro* Synthese von Proteinen ermöglichen, wie Ribosomen, transferRNAs (tRNAs), Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, energieliefernde Systeme, K<sup>+</sup>- und Mg<sup>+</sup>-Ionen sowie Enzyme und Proteinfaktoren für die Initiation, Elongation und Termination der Proteinbiosynthese. Die Weizenkeimextrakte eignen sich hierbei besonders gut zur *in vitro* Translation von Transkriptionsfaktoren, denn diese enthalten weitaus weniger Transkriptionsfaktoren als die Retikulocytenlysate (Ibelgaufts 1993).

#### **Reaktionsansatz**

- 25 µl Weizenkeimextrakt (25 µl Retikulocytenlysate)
- 2 µl 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 µg Plasmid-DNA (Expressionsvektor mit Fremd-DNA, *circular DNA*)

ad 50 µl Aqua. dest

Die Reaktion wurde für 90 min bei 30°C inkubiert. Im Falle der SP6 Polymerase betrug die Inkubationszeit 120 min. Die erwartete Proteinausbeute (vom Hersteller angegeben) lag bei dem Retikulocytenlysat bei circa 150-300 ng Protein und bei dem Weizenkeimextrakt bei circa 100-200 ng Protein pro 50 µl Reaktionsansatz. Die *in vitro* translatierten Proteine wurden in Western Blot Analysen und Gelshiftassays eingesetzt.

### 2.3.6 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse werden Proteine zunächst mittels Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine werden hierbei durch Aufnahme in SDS-Probenpuffer denaturiert und durch das SDS in Polyanionen überführt. Die Trennung der Proteine bei der Elektrophorese erfolgt daher nur nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht. Danach werden die Proteine auf eine Membran transferiert. Die Detektion erfolgt über einen spezifischen Primärantikörper und einen Sekundärantikörper, der mit einem Enzymkonjugat gekoppelt ist. Die Visualisierung erfolgt bei der hier durchgeführten Methode mit dem ECL-System der Firma Amersham. Dabei wird Chemilumineszenz nach Filmexposition detektiert.

#### Durchführung

In dieser Arbeit wurde ein Mini-Gelsystem (Mini-Protean II) von Biorad verwendet. Meistens wurden 7,5%ige Trenngele und 3,85%ige Sammelgele gegossen. Etwa 5 bis 50 µg 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 (Blau 202 kD; Magenta 133 kd; Violett 41,8 kd; Orange 30,6 kd, Rot 17,8 kd, Blau 6,9 kd). 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 Nitrocellulose bzw. PVDF Membran geblottet. Der Blot wurde als *Sandwich*, bestehend aus 2 Whatman 3 MM Papier (getränkt in Transfer-Puffer), dem Polyacrylamidgel, der Nitrocellulose-Membran (PVDF-Membran) und 2 weiteren Lagen Whatman 3 MM Papier (getränkt in Transfer-Puffer) aufgebaut. Dabei wurde die Membran auf der Pluspol Seite platziert. 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 2mal 5

min Schütteln in PBS-T wurde die Membran in einem Plastikbeutel mit 5 ml Primärantikörper-Lösung eingeschweißt (1 µg Ak in 2 ml PBS-T). Die Inkubation erfolgte auf einem Überkopftaunler entweder bei 4°C ü.N. oder für 1 h bei RT. Nach diesem Schritt wurde die Membran zweimal 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 in 5 ml PBS-T (im Plastikbeutel) durchgeführt. Die Membran wurde anschließend viermal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde die ECL-Lsg. 1 mit der ECL-Lsg. 2 (Amersham) 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.

Tabelle 2.7 Western Blot Analyse

<b>Kathodenpuffer</b> 0,1 M Tris 0,1 M Tricin 0,1% SDS pH 8,25	<b>Anodenpuffer</b> 0,2 M Tris pH 8,9	<b>Gelpuffer</b> 3 M Tris 0,3% SDS pH 8,45	<b>30 ml Trenngel-Stammlsg. (7,5%)</b> 10 ml Gelpuffer 5,7 ml 40% PA 4 g Glycerin ad 30 ml Aqua dest.
<b>Sammelgel-Stammlsg. (3,85%)</b> 1 ml Gelpuffer 0,385 ml 40% PA ad 4 ml Aqua dest.	<b>Trenngel</b> 5 ml Trenngel-Stammlsg. 50 µl 10%APS 5 µl TEMED mit 70% ETOH überschichten Polymerisation ca. 30 min	<b>Sammelgel</b> 2 ml Trenngel-Stammlsg. 20 µl 10% APS 2 µl TEMED + Gelkamm Polymerisation ca. 15 min	<b>5x Probenpuffer</b> 26,5% SDS 50% Glycerin 8,35% β-Mercapto-ethanol 0,15% Bromphenolblau (gelöst in 100% ETOH) Denaturierung der Probe: 5 min 95°C
<b>Gellauf</b> Minigel-Apparatur Biorad Sammelgel: 28 V, ca. 30-45 min Trenngel: 60 V ca 2,5-3,5 h	<b>Molekulargewichtsstandard</b> Kaleidoskop-Standard, Firma Biorad	<b>Ponceau-S Färbe-Lsg.</b> 0,2% [w/v] Ponceau S (Sigma) 3% [v/v] Trichlor-essigsäure	<b>Blotting Apparatur</b> Semi-dry Blotter, Firma AGS 400 mA, ca. 1 h
<b>Transfer-Puffer</b> 2,9 g Glycin 5,8 g Tris 11% SDS 200 ml Methanol ad 1000 ml Aqua dest.	<b>Transfer-Membran</b> PVDF (Boehringer Mannheim) Nitrocellulose (Schleicher und Schüll)	<b>PBS-T</b> 1x PBS 0,1% Tween-20 Waschlösung bzw. Inkubationslösung für Antikörper	<b>Blockierungs-Lösung</b> 3% nonfat dry milk 1x PBS-T dient zum Blockieren unspezifischer Bindungen, Background-Reduktion Inkubation 1 h bei RT
<b>Primärantikörper</b> 1 µg/2 ml PBS-T  Inkubation 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C	<b>Sekundärantikörper /HRP - (horse-redish-peroxidase) Konjugat</b>  1 µg/5 ml PBS-T Inkubation (Verdünnung 1:5000)	<b>Detektionslsg ECL</b> (Amersham)  Lsg 1, Lsg. 2 Beide Lsg. vor Gebrauch 1: 1 mischen 0,125 ml Substrat/cm <sup>2</sup> Membran, 1 min im Dunkeln mit Substrat inkubieren, mit Folie abdecken und Film 30 s-10 min exponieren	

## 2.4 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.4.1 Standard-Puffer und Medien

Die molekularbiologischen Standard-Puffer sind in Tabelle 2.8 zusammengefaßt.

Tabelle 2.8: Standardpuffer Molekularbiologie

<b>50x TAE</b> 242 g Trisaminomethan 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1000 ml mit Aqua dest.	<b>5x TBE</b> 54 g Trisaminomethan 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1000 ml mit Aqua dest.	<b>STE-Puffer</b> 0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH (7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0)
<b>20x SSC pH 7,0</b> 3,0 M NaCl 0,2 M Natriumcitrat	<b>5x Annealing-Puffer</b> 200 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM MgCL 250 mM NaCl	<b>10x DNA-Gelladepuffer</b> 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenxyanol 30% Glycerin in Aqua dest.
<b>Formamidladepuffer</b> 98% [v/v] deionisiertes Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylenxyanol	<b>TE-Puffer pH 7,5</b> 10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8	<b>TELT-Puffer</b> 2,5 M LiCl 100 mM MgCl <sub>2</sub> 250 mM NaCl 4% Triton X 100 62,5 mM EDTA pH 8,0
<b>LB – Medium</b> 10g Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl ad 1000 ml Aqua dest.	<b>LB – Agar</b> 1000 ml LB-Medium 15 g Bacto Agar	<b>S.O.C Medium</b> 2% [w/v] Bacto Trypton 0,5% [w/v] Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
	<b>Hochsalzpuffer-Elution von DNA</b> 1 M NaCl 10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0	

### 2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren erfolgt durch UV-Absorptionsspektroskopie mit Hilfe eines Photometers (Spectronic 601, Miltenroy). Die Proben werden hierbei bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen und dabei in Relation gesetzt zu einer Referenzküvette, die nur das Lösungsmittel (Aqua dest.) enthält. Das Absorptionsmaximum für Nucleinsäuren liegt bei 260 nm. Bei 280 nm absorbieren die in Proteinen vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan aufgrund ihrer Mesomerie-Eigenschaften. Somit läßt sich aus dem Quotienten 260 nm/280 nm eine Aussage über die Reinheit der isolierten Nucleinsäure treffen. Optimale Werte liegen zw. 1,8 und 2,0. Bei Werten unter 1,6 wird eine zusätzliche Aufreinigung der Nucleinsäuren notwendig.

Die Konzentration wird nach der folgenden Formel bestimmt (Maniatis et al. 1989):

$$A_{260} \times V \times OD = \mu\text{g/ml (ng/}\mu\text{l) Nucleinsäure}$$

$A_{260}$ : Absorption bei 260 nm

V: Verdünnungsfaktor der eingesetzten Nucleinsäure

OD: Optische Dichte (50 für DNA, 40 für RNA, 20 für Oligonucleotide)

Die optische Dichte wird folgendermaßen definiert:

1 OD= 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngige DNA

1 OD= 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngige DNA bzw. RNA

1 OD= 20  $\mu\text{g/ml}$  Oligonucleotid

### 2.4.3 Oligonucleotidkonstruktion

Bei der Konstruktion der Oligonucleotide aus einer bekannten DNA-Sequenz wird 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. Außerdem gilt die Faustregel, daß am 3'-Ende ein Cytosin oder Guanin vorhanden sein sollte. Bei der Auswahl eines Primers ist die vorherige Berechnung der *Annealing*-Temperatur unerlässlich, wobei als *Annealing* das Anlagern der Primer an die spezifische DNA-Sequenz bezeichnet wird. Die optimale *Annealing*-Temperatur ( $T_a$ ) ist gleichzusetzen mit der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der verwendeten Primern. Zur Berechnung der *Annealing*temperatur in der PCR bzw. LM-PCR wurde der Mittelwert aus den  $T_M$  beider Primer gebildet.

Für die Berechnung des  $T_M$ -Wertes gilt im Allgemeinen folgende Formel:

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

[M]: Kationen [ $M^+$ ] Konzentration im Reaktionsansatz  
(0,05 M im 1x Taq-Puffer von Boehringer Mannheim)

N: Anzahl der Nucleotide des verwendeten Oligonucleotids

% G+C: Guanosin plus Cytosin-Gehalt des Oligonucleotids in Prozent

### 2.4.4 Gel-Elektrophorese

#### 2.4.4.1 Agarosegele

Die Agarosegel-Elektrophorese wird zur Auftrennung linearer DNA-Moleküle (z.B. PCR-Amplifikate) als auch superhelikaler Fragmente (Plasmide) verwendet. Außerdem eignet sich diese Methode auch zur Isolierung von DNA bestimmter Größe. Die Nucleinsäure wird dabei in einem 0,5-2%igem Agarosegel in TAE-Puffer oder TBE-Puffer (pH 8,0) aufgetrennt. Die DNA-Proben werden vor dem Gellauf mit Auftragspuffer (DNA-Gelladepuffer siehe Tabelle 2.8, Seite 35) versetzt. Der Puffer enthält Gly-cerin um die Probe zu beschweren und die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-cyanol um die Lauffront zu markieren. Aufgrund der negativen Ladungen der im

Rückgrat der DNA vorhandenen Phosphatgruppen, wandert diese im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt sowohl von ihrer Größe [bp] als auch von ihrer Konformation ab (linear oder superhelikal). Kleine Moleküle wandern schneller als größere. Zur Bestimmung der Fragmentlänge wird ein Größenstandard mitgeführt (100 bp Molekulargewichtsmarker Pharmacia, 1 kb Molekulargewichtsmarker Invitrogen). Der Nachweis erfolgt mit Ethidiumbromid, das in die DNA-Doppelhelix interkaliert und nach UV-Bestrahlung bei 254 nm fluoresziert.

#### Durchführung

1-2%ige Agarose wurde in TAE-Puffer oder TBE-Puffer aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 60°C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt und die Gelmischung in den Gelträger gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1-5 V/cm Gellänge. Zur Auswertung wurde das Gel mit einer UV-Lampe bei 254 nm bestrahlt. Das Ergebnis wurde fotodokumentiert mit einer Apparatur der Firma Cybertech CS1.

### **2.4.4.2 Polyacrylamidgele**

Für Gelshifftassays wurden hauptsächlich 5%ige Polyacrylamidgele (PAA)-Gele verwendet. Zur Aufreinigung von doppelsträngigen Oligonucleotiden wurden 20%ige PAA-Gele hergestellt. Für die Elektrophorese wurde die Hoefer Apparatur (Modell SE 600) benutzt. Der Gellauf wurde in 1x TBE durchgeführt, bei einer Spannung von 10 V/cm. Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit Ladepuffer versetzt. Die DNA wandert im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode.

#### 5%iges PAA-Gel für Gelshifftassay

Zur Herstellung von 40 ml Gel wurden 8 ml 40% Polyacrylamid (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Roth), 8 ml 5x TBE und 24 ml Aqua dest. gemischt. Vor dem Gießen in den Gelträger wurden 250 µl 10% APS und 35 µl TEMED hinzugefügt. Nach dem Lauf erfolgte der Transfer des Gels auf 3 mM Whatmann Papier und die Trocknung im Vakuumtrockner (Geldryer Model 583, Biorad). Für die Autoradiographie wurden Kassetten mit Verstärkerfolien und hochsensitive Biomax MS Filme (Kodak) verwendet.

#### 20%iges PAA-Gel zur Aufreinigung doppelsträngiger Oligonucleotide

40 ml Gel wurden aus 20 ml 40% Polyacrylamid (29:1 Acrylamid:Bisacrylamid, Roth), 8 ml 5x TBE und 4 ml Aqua dest. hergestellt. Vor dem Gießen wurden 250 µl 10% APS und 35 µl TEMED hinzugefügt. Das Gel wurde nach dem Elektrophoreselauf mit einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml 1x TBE Puffer) für 10 min bei RT

inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit einer UV-Lampe bei 254 nm detektiert.

#### 2.4.4.3 Sequenzierungsgele

Sequenzierungsreaktionen wurden in 5%igen PAA-Gelen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Zur Herstellung von 100 ml Gel wurden 42 g Harnstoff, 20 ml 5x TBE und 16,7 ml 30% 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 Gelgießen 250 µl 10% APS und 50 µl TEMED zur Lösung hinzugefügt. Hierbei wurde die Sequi-Gen II Gelkammer und das Spannungsgerät Power Pack 3000 der Fa. Biorad verwendet. Das Gießen des Gels wurde mit einer 50 ml Spritze durchgeführt. 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 auf einem Vakuumtrockner (Geldryer Model 583, Biorad) getrocknet. Für die Autoradiographie wurden die Gele in Kassetten mit Verstärkerfolien geklebt und mit Biomax MR bzw. Biomax MS Filmen (Kodak) bedeckt und bei -70° C bis zur Entwicklung aufbewahrt.

#### 2.4.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und Polyacrylamidgelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde unter UV-Licht die entsprechende DNA Bande aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *GeneClean II kit* der Fa. Dianova nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Methode beruht auf der Immobilisierung der DNA an eine Silikatmatrix (Glasmilch) und auf dem Entfernen von Verunreinigungen durch mehrere Waschschritte. Die DNA wird anschließend im gewünschten Flüssigkeitsvolumen eluiert. Dieses Verfahren wurde nach der Methode von Vogelstein und Gillespie (1979) entwickelt.

Zur Isolierung von DNA aus Polyacrylamidgelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht (254 nm) mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der Nucleinsäure aus dem Polyacrylamidgelstückchen wurde die Probe mit 500 µl Hochsalzpuffer (siehe Tabelle 2.8, Seite 35) ü.N. bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1 ml 100% Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (15000 rpm, 30 min) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde anschließend in 100 µl Aqua. dest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

## 2.4.6 **Annealing von Oligonucleotiden und radioaktive Markierung**

Für Gelshiftassays wurden doppelsträngige DNA-Fragmente benötigt. Diese wurden durch Anlagerung (*Annealing*) zweier zueinander komplementärer Oligonucleotide hergestellt. Je 20 µg der Oligonucleotide wurden zusammenpipettiert, mit 20 µl 5x Annealingpuffer (siehe Tabelle 2.8, Seite 35) versetzt und mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 5 min auf 95° C erhitzt und im Thermocycler langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (1°C/min). Anschließend wurden die doppelsträngigen Oligonucleotide mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt. Für die radioaktive Markierung wurde die doppelsträngige (ds) DNA mit dem Enzym T4 Polynucleotidkinase (PNK, New England Biolabs) markiert. Das Enzym katalysiert den Transfer der  $\gamma$ -Phosphat Gruppe von Nucleosidtriphosphaten (Redivue  $\gamma$ -<sup>32</sup>P, Fa. Amersham) auf die 5'-Hydroxy-Enden von Nucleinsäuren.

### Reaktionsansatz (30 µl)

1 µl (100 ng/µl) ds DNA

3 µl 10x PNK-Puffer

5 µl Redivue  $\gamma$ -<sup>32</sup>P (Aktivität 3000 µCi/mM, Amersham)

19 µl Aqua dest.

2 µl T4 PNK

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 Oligonucleotide wurden *Nuc Trap Push Columns* der Firma Stratagene verwendet. Das Prinzip dieser Säulen besteht darin, daß freie nicht inkorporierte  $\gamma$ -ATP Moleküle in der Säule haften bleiben, während die radioaktiv markierten Oligonucleotide 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. Mit diesem Verfahren wurden ca. 100 µl aufgereinigte radioaktiv-markierte doppelsträngige Oligonucleotid-Lösung hergestellt. Die Aktivität wurde in einem Scintillationscounter (Beckmann) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.4.7 **Restriktionsverdau von Plasmiden**

Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix und schneiden beide Stränge der Helix an spezifische Stellen. Die erkann-

ten Sequenzen sind Palindrome von 4 bis 8 Basenpaaren. Die Restriktionsenzyme hydrolysieren die Phosphodiesterbindungen innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz oder dahinter. Dabei können 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*) entstehen (Maniatis et al. 1989). Die Restriktionsenzyme *Sma*I und *EcoRV* spalten DNA innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz. Dabei entstehen vollständig basengepaarte Restriktionsschnittstellen mit stumpfen Enden. Andere Enzyme wie beispielsweise *Bam*HI, *Hind*III, *Stu*I, *Kpn*I, *Eco*RI produzieren überhängende Enden. Die Reaktionsbedingungen für den Restriktionsverdau wurden nach den Angaben des Herstellers eingestellt. Dabei gilt die Faustregel: 1 Unit Enzym spaltet 1 µg DNA in einer Stunde. Sind mehrere Restriktionen mit unterschiedlichen Enzymen in einem Ansatz notwendig, so kann man diese gleichzeitig in einem Puffer ansetzen, der optimal ist für alle verwendeten Enzyme. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, mehrere Restriktionsschritte hintereinander durchzuführen, wobei die Nucleinsäuren nach jedem spezifischen Verdau mit einer Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt werden.

## 2.4.8 Herstellung, Vermehrung und Isolierung rekombinanter DNA

Die cDNA- oder die genomische Sequenz klonierter Gene (z. B. Promotorregion) wird zur Vermehrung in Plasmid-Klonierungsvektoren eingebunden. Hierbei werden Antibiotika-Resistenzgene für Tetrazyklin ( $tet^r$ ) oder Ampicillin ( $amp^r$ ) benutzt, um den Transfer des Plasmids in Bakterien zu überprüfen. Die eingeschleusten verwendeten Vektoren tragen solche Antibiotika-Resistenzgene als Markergene und erleichtern dadurch die Selektion der positiven, rekombinanten Bakterienklone. Nach der Transformation in kompetente Bakterien mit durchlässiger Zellmembran und anschließender Vermehrung der rekombinanten Bakterien im Antibiotikum-haltigem Selektionsmedium, wird der Vektor präparativ isoliert (Mini-Präparation bzw. Maxi-Präparation).

### 2.4.8.1 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Bakterien (*TOP10F'* Firma Invitrogen, *MC1061P3* Stratagene, *INVaF'* Invitrogen, *SCS110* Stratagene) für 30 min auf Eis mit 1-10 ng Plasmid-DNA oder 1-5 µl Ligationsansatz inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Vektor durch Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 45 s integriert. Anschließend wurde die Bakterienzellwand mit 450 µl S.O.C.-Medium (siehe Tab. 2.8, Seite 35) rekonstituiert. Danach wurde der Ansatz 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation im Rotationsschüttler für 1 h bei 37°C, wurde der Probe auf Antibiotikum-supplementierten Agarplatten (50 µg Ampicillin/ml LB-Agar) 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 hinzugegeben. Das Prinzip der Blau/Weiß Selektion besteht darin, daß der Einbau der rekombinanten DNA innerhalb des LacZ Gens stattfindet, welches für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Daher wird in der Regel kein funktionsfähiges Enzym gebildet und X-gal kann nicht zu blauem Indigofarbstoff umgesetzt werden. Folglich bleiben die rekombinanten Bakterienkolonien weiß. Die Platten wurden für 12-20 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Blau/Weiß Selektion wurden diese zur Farbentwicklung 1 h bei 4°C gelagert. Durch Auspicken mit einer Pipettenspitze wurden Einzelkolonien rekombinanter Bakterien gepickt, mit denen 5-10 ml ü.N.-Kulturen in Antibiotikum-haltigem LB-Medium angeimpft wurden. Zur Langzeit-Konservierung werden ü.N.-Kulturen 1:1 mit autoklaviertem 30%igem [v/v] Glycerin versetzt und nach Aliquotierung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.9 Antibiotika und Lösungen für die Transformation von Bakterien

<b>Ampicillin-Lösung</b> in H <sub>2</sub> O Stammlösung 50 mg/ml Verwendete Konzentration: 50 µg/ml	<b>Tetrazyklin-Lösung</b> in Ethanol Stammlösung 25 mg/ml Verwendete Konzentration: 50 µg/ml
<b>Chloramphenicol-Lösung</b> in Ethanol Stammlösung 34 mg/ml Verwendete Konzentration: 170µg/ml	<b>X-gal Lösung</b> in Dimethylformamid Stammlösung 20 mg/ml Verwendete Konzentration pro Agarplatte: 40 µl einer 20 mg/ml Xgal Lösung

### 2.4.8.2 Analytische Präparation von Plasmid-DNA (Maxi- und Mini-Präparation)

#### Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparation eignet sich zur quantitativen Gewinnung von Plasmid-DNA. Für die präparative Isolierung wurde der Qiagen Kit (Qiagen GmbH, Düsseldorf) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

- Vorbereitung der Bakterien

Vorkultur: Mit einer bereits angelegten Glycerin-Konserve oder einer Bakterienkolonie von der Agarplatte wird eine frische 5-10 ml über Nacht (ü.N.)-Kultur, bestehend aus Ampicillin-haltigem LB-Medium, angeimpft.

- Hauptkultur: 5 ml der Vorkultur werden in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin-Zusatz überführt. Bei *low-copy* Plasmiden (z.B. pBR 322) werden nach 8-10stündiger Kulturdauer (im Rotationsschüttler bei 37°C) 170 µg/ml Chloramphenicol hinzugefügt, um die Kopienzahl des Plasmids pro Zelle zu erhöhen. Der Ansatz wird dann ü.N. weiterkultiviert. Bei *high-copy* Plasmiden (z. B pXP1, pCRII) entfällt die Chloramphenicol Behandlung, weil diese Plasmide per se zu sehr hohen Kopienzahlen replizieren.

- Präparative Plasmid-DNA Isolierung mit dem *Qiagen Maxi-kit*

Die Durchführung richtet sich an die Anweisung des Herstellers. Alle Reagenzien

werden vom Hersteller im Kit mitgeliefert. Das Prinzip wird in der folgenden Zusammenfassung erläutert:

Die Bakterien werden nach Abzentrifugation in RNase-haltigem (400 µg/ml) EDTA-Puffer (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA) resuspendiert und mit NaOH-SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1% SDS) lysiert. Nach Hinzufügen von Kaliumacetat (2,55 M KAc), werden die durch SDS denaturierten zellulären Proteine sowie Fette und Kohlenhydrate auf Eis ausgefällt. Die Präzipitate und die Zelltrümmen, die unter anderem die an Zellmembranen gebundene bakterielle chromosomale DNA enthalten, werden in einem darauffolgenden Zentrifugationsschritt abgetrennt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt über Anionen-Austauschersäulen. 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 wird photometrisch quantifiziert und zur Überprüfung mit Restriktionsendonucleasen geschnitten.

#### Mini-Präparation

Mit der Mini-Präparation kann man aus 2-10 ml Bakterienkulturen bis zu 20 µg Plasmid-DNA herstellen. Diese Methode eignet sich zur effizienten Bestimmung positiver rekombinanter Bakterienklone. Man kann damit bis zu 50 Klone gleichzeitig überprüfen und so die Vorauswahl der Klone treffen, die man anschließend in der Maxi-Präparation aufbereitet.

##### - TELT-Protokoll

Pro Probe wurden 2 ml Bakteriensuspension 20 s bei 15000 rpm 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 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die Plasmid-DNA wurde mit 250 µl 100% Ethanol für 20 min bei -70°C gefällt. Nach der Abzentrifugation (20 min, 15000 rpm) wurde die DNA mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 30 µl Aqua dest. gelöst und im Restriktionsverdau eingesetzt.

##### - *High pure plasmid isolation kit* (Boehringer Mannheim)

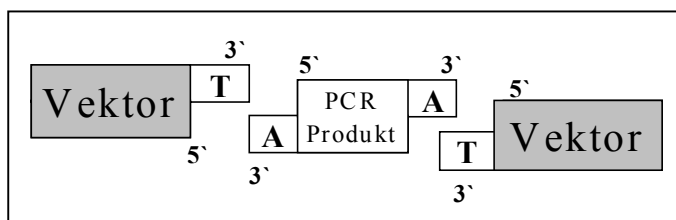
Bei dieser Präparation können bis zu 10 µg Plasmid-DNA aus 0,5 bis 5 ml Bakteriensuspension gewonnen werden. Das Prinzip des Kits besteht zunächst auf der alkalischen Lyse der Bakterien und Abbau der bakteriellen RNA durch RNaseA. Nach Neutralisation und Ausfällung der chromosomalen DNA und bakterieller Zelltrümmen, wird der plasmidhaltige Überstand mit einem *Filtertube* gereinigt, der Nucleinsäurebindende 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. Die Durchführung erfolgte hierbei nach den Angaben des Herstellers.

### 2.4.8.3 Die Klonierung des IFN- $\gamma$ Promotors in den pXP1 Luciferase-Vektor

Die Klonierung des IFN- $\gamma$  Promotors in den pXP1 Vektor wird als einzige der durchgeführten Klonierungen dargestellt, weil dieses Vektorkonstrukt vergleichsweise am häufigsten für Transfektionen verwendet wurde. Weiterhin wurde dieses Konstrukt zur Herstellung der transgenen Maus benutzt.

Die Klonierung des IFN- $\gamma$  Promotors erfolgte zunächst in den pCRII Vektor mit dem *T/A cloning kit* der Firma Invitrogen. Dazu wurde der Promotor aus genomischer DNA von Jurkat T-Zellen mittels PCR amplifiziert und anschließend in den pCRII Vektor ligiert. Anschließend wurde die Promotorsequenz aus dem Vektor mit dem Enzym EcoRI herausgeschnitten und die überhängenden Enden mit Mung bean Nuclease abgedaut, so daß glatte Enden (*blunt ends*) entstanden sind. Das Fragment wurde dann in die die SmaI Schnittstelle des promotorlosen pXP1 Vektor ligiert. Anschließend wurde die Orientierung der positiven Klone durch Sequenzierung untersucht (siehe 2.4.9, Seite 47). Die Klone, die das humane IFN- $\gamma$  Promotorfragment in Sense-Orientierung (5'-3'Richtung) enthielten, wurden dann für Reporterassays verwendet (siehe 2.5.1, Seite 54). Das Prinzip der Methode besteht darin, daß man zunächst die gewünschte Sequenz mit Hilfe spezifischer Primer durch PCR amplifiziert. Dabei wird das Enzym Taq-Polymerase verwendet. Dieses Enzym verfügt über eine 3'-Terminale Transferase Aktivität. Es addiert an 3'-Enden der Amplifikate einzelne Deoxyadenosine. Der linearisierte pCRII Vektor in dem T/A Kit hingegen hat einzelne 3'-Deoxythymidine. Damit kann das PCR Produkt in sense Orientierung in den linearisierten Vektor ligiert werden (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2** Das Diagramm zeigt das Prinzip der T/A Cloning Methode

#### Amplifikation des Promotors aus genomischer DNA mit PCR

5  $\mu$ l 10x Puffer (Boehringer Mannheim)

5  $\mu$ l 5 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

2,5  $\mu$ l 20 pmol  $\mu$ l Primer 1 (5'-cccttgtaaagggttgagaggcc-3')

2,5  $\mu$ l 20 pmol/ $\mu$ l Primer 2 (5'-atgtgctgcacctcctctggctgct-3')

1  $\mu$ l (1  $\mu$ g) genomische DNA (aus Jurkat T-Zellen)

32,5  $\mu$ l Aqua. dest.

2,5 µl 1 U/µl Taq Polymerase (Boehringer Mannheim)

Überschichten des Ansatzes mit 100 µl Mineralöl

Denaturierung	5 min 95°C	
Denaturierung	30 s 95°C	
<i>Annealing</i>	60 s 58°C	35 Zyklen
Extension	2 min 72°C	
finale Extension	10 min 72°C	

PCR-Programm

Damit wurde ein 410 bp Fragment (Position -403 bis +7 des IFN- $\gamma$  Promotors) amplifiziert.

#### Ligation in den pCRII Vektor mit Hilfe des *T/A cloning kit* (Invitrogen)

3 µl PCR Produkt

1 µl 10 x Ligationspuffer

2 µl 25 ng/µl pCRII Vektor

3 µl Aqua dest.

1 µl T4 DNA-Ligase

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 14°C inkubiert und am nächsten Tag in kompetente E.coli Bakterien (INVaF<sup>'</sup>) transformiert. Die Transformation erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.4.8.1 beschrieben. Nach der Blau/Weiß Selektion wurden weiße 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). Der pCRII Vektor enthält im Polylinker beiderseits der Einklonierungsstelle Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym EcoRI. Um die isolierten Plasmide zu identifizieren, die rekombinante DNA enthielten, wurde die Plasmid-DNA mit EcoRI verdaut und zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Überprüfung des Erfolgs der Klonierung und zur Verwendung bei der Auswertung der *in vivo*-Footprinting Experimente wurde die klonierte DNA mit verschiedenen Primern sequenziert. Aus den ü.N.-Kulturen positiver Ansätze wurden Glycerinstocks hergestellt.

#### Klonierung des Interferon-gamma Promotors in den pXP1 Vektor

Hierbei wurde im Prinzip eine *blunt-end* Klonierung durchgeführt, so daß die Interferon- $\gamma$  Promotorsequenz in beiden Orientierungen in den Zielvektor pXP1 kloniert wurde. Der pXP1 Vektor wurde mit SmaI verdaut. Dieses Restriktionsenzym erzeugt glatte Enden. Anschließend wurde der linearisierte Vektor durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft und die entsprechende Bande aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem GeneClean Kit aufgereinigt. Anschließend wurde der Vektor 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. Dieses Enzym dephosphoryliert die Enden des linearisierten Vektors und verhindert dadurch die Religation des Vektors durch Ligase. Anschließend wurde die DNA durch Phenol-

Chloroform Extraktion aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und in Aqua dest aufgenommen. Der IFN- $\gamma$  Promotor (410 bp) wurde mit EcoRI aus dem dem pCRII Vektor herausgeschnitten. Das 410 bp Fragment wurde durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel geschnitten und mit dem GeneClean Kit aufgereinigt. Das isolierte Fragment enthielt überhängende Enden. Um diese abzudauen wurden 5 U/ $\mu$ g DNA Mung Bean Nuclease (Stratagene) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die DNA von der Enzym Verunreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion befreit, die DNA wurde durch Ethanol gefällt und in Aqua dest. aufgenommen.

Für die Ligationsreaktion wurde folgende Formel berücksichtigt:

$$X \text{ ng insert} = \frac{Y \text{ bp Fragmentlänge des inserts (hier 410 bp)}(50 \text{ ng pXP1 Vektor})}{\text{Größe des pXP-Vektors 6163 bp}}$$

$$X = 3,3 \text{ ng insert}$$

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.

#### Ligation in den pXP1 Vektor

1  $\mu$ l (50 ng/ $\mu$ l) pXP1 Vektor

1  $\mu$ l (X ng) insert

1  $\mu$ l 10 x Ligationspuffer

ad 9  $\mu$ l Aqua dest.

1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 14°C inkubiert und anschließend in kompetente E.coli Bakterien (TOP10F') transformiert. Anschließend wurden 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 des positiven Klone wurden die klonierten Plasmide mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Weiterhin wurde der Vektor mit verschiedenen Primern (spezifisch für die klonierte Interferon- $\gamma$  Promotor-DNA) sequenziert.

#### **2.4.8.4 Verwendete Vektoren**

Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2. 10 dargestellt.

Tabelle 2.10 Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Vektor	Antibiotikaresistenz Bakterienstamm	Insert	Verwendungszweck	Herkunft
pCRII-IFN- $\gamma$ cDNA(428)	pCRII	amp <sup>r</sup> /INV $\alpha$ F <sup>r</sup> Invitrogen	428 bp der humanen IFN- $\gamma$ cDNA Sequenz in T/A Klonierungsstelle	cDNA-Sonde für Northern-Hybridisierung	Invitrogen
pCRII-IFN- $\gamma$ Pr (1365)	pCRII	amp <sup>r</sup> /INV $\alpha$ F <sup>r</sup> Invitrogen	1365 bp des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-1355 bis +10) in T/A Klonierungsstelle	Ausgangsvektor für Umklonierung in den Reporter-genvektor, Sequenzüberprüfung	Invitrogen
pCRII-IFN- $\gamma$ Pr (410)	pCRII	amp <sup>r</sup> /INV $\alpha$ F <sup>r</sup> Invitrogen	410 bp der humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-403 bis +7) in T/A Klonierungsstelle	Ausgangsvektor für Umklonierung in den Reporter-genvektor, Sequenzüberprüfung	Invitrogen
pXP1	pXP1	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	Luciferase-Reporter-genvektor, Negativkontrolle für Reporter-genassays	ATCC
pXP1-RSV	pXP1	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	Luciferase-Reporter-genvektor Positivkontrolle mit RSV-Promotor für Reporter-genassays	ATCC
pXP1-IFN- $\gamma$ Pr (410)	pXP1	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	410 bp des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-403 bis +7) in Sma I Schnittstelle	Funktionelle Analyse des IFN- $\gamma$ Promotors in Luciferase-Reporter-genassays	ATCC
p $\beta$ Gal-Basic	p $\beta$ Gal	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	$\beta$ -Galaktosidase-Reporter-genvektor, Negativkontrolle für Reporter-genassays	Clontech
p $\beta$ Gal-IFN- $\gamma$ Pr (1365)	p $\beta$ Gal	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	1365 bp des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-1355 bis +10) in KPN I/Xho I Schnittstelle	Funktionelle Analyse des IFN- $\gamma$ Promotors in $\beta$ -Galaktosidase-Reporter-genassays	Clontech
p $\beta$ Gal-IFN- $\gamma$ Pr (410)	p $\beta$ Gal	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	410 bp des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-403 bis +7) in KPN I/Xho I Schnittstelle	Funktionelle Analyse des IFN- $\gamma$ Promotors in $\beta$ -Galaktosidase-Reporter-genassays	Clontech
p $\beta$ Gal-Co (SV40)	p $\beta$ Gal	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	Promotor für Reporter-genassays	Clontech
pGL2-Co (CMV)	pGL2	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	$\beta$ -Galaktosidase Vektor, Positivkontrolle mit CMV-Promotor für Reporter-genassays	Invitrogen
pGL2-Basic	pGL2	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	Luciferase-Reporter-genvektor, Negativkontrolle für Reporter-genassays	Promega
pGL2-IFN- $\gamma$ Pr (1365)	pGL2	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	1365 bp des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (-1355 bis +10) in SacI/Xho I Schnittstelle	-	Promega
pGL2-Control (SV40)	pGL2	amp <sup>r</sup> TOP10F <sup>r</sup> Invitrogen	-	Luciferase-Reporter-genvektor Positivkontrolle mit SV-40 Promotor für Reporter-genassays	Promega
GATA-3,-2,-1, KRR	pc DNA2.1	amp <sup>r</sup> , tet <sup>r</sup> / MC1061P3 Invitrogen	GATA-3,-2,-1 cDNA, KRR dominant negative GATA-3 cDNA	eukaryontische Expressionsvektoren für Transkriptionsvektoren GATA-1,-2,-3	Dr. Winoto, Berkeley, CA

## 2.4.9 Sequenzierung von Plasmid DNA mit Sequenase 2.0

Die Sequenzierungen wurden mit dem Sequenase 2.0 Kit der Firma USB durchgeführt. Das Kit verwendet hierbei die DNA-Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Dazu werden spezifische Terminatoren der DNA-Kettenverlängerung, nämlich 2',3'-Dideoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet. Der Sequenzierungsansatz besteht aus dem zu analysierenden DNA-Strang, einem markierten spezifischen Primer, der dem einen Ende des DNA-Strangs komplementär ist, einem bestimmten ddNTP sowie den 4 normalen dNTPs. Nach Zugabe der Sequenase 2.0, beginnt diese vom DNA-Primer an, den komplementären Strang zu synthetisieren. Sobald die Sequenase 2.0 jedoch ein ddNTP einbaut, wird das Kettenwachstum gestoppt, weil die ddNTPs keine Phosphodiesterbrücken zu den anzuhängenden Desoxynucleosidtriphosphaten bilden können. Es entsteht eine Reihe markierter Fragmente deren Länge von der Position des ddNTPs zum markierten Ende abhängt. Die Prozedur wird mit 4 verschiedenen Reaktionsansätzen durchgeführt, wobei jeder Ansatz eines der 4 ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) enthält. Die Fragmente werden dann auf Polyacrylamidgele aufgetrennt und autoradiographisch detektiert.

### Denaturierung der Plasmid-DNA

Dazu wurden 5 µg Plasmid-DNA in 30 µl Aqua dest. gelöst und 30 min bei 37° C mit 0,1 Volumen 2 M NaOH und 0,1 Volumen 2 mM EDTA pH 8,0 denaturiert. Anschließend wurde der denaturierte, einzelsträngige Vektor mit 0,1 Volumen Natriumacetat pH 4,5 und 3 Volumen 100% Ethanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in einem Vakuumbehälter getrocknet und in 7 µl Aqua dest. gelöst.

### Sequenzierungsreaktion

Bei diesem Verfahren 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) 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 Redivue <sup>35</sup>S (9,25 MBq, Fa. Amersham), 2 µl Markierungspuffer (1:5 in Aqua dest. verdünnt) und 2 µl Sequenase (1:8 in Sequenase Puffer verdünnt) gegeben. Die Markierungsreaktion erfolgte für 2-5 min bei RT. Die Terminationsreaktion wurde nach Zugabe von je 3,5 µl des Reaktionsansatzes zu den Dideoxynucleotid-Ansätzen (2,5 µl) für 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 (5% Urea-Polyacrylamidgel) und die anschließende Autoradiographie.

## 2.4.10 Nachweis von mRNA-Transkripten mit der RT-PCR

Zum Nachweis der IFN- $\gamma$  mRNA-Transkripte wurde die RT-PCR Reaktion angewandt. Zunächst wurde die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und diese für die IFN- $\gamma$  spezifische PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet, ein konstitutiv exprimiertes Gen, das in allen Versuchsansätzen gleich stark exprimiert werden sollte. Weiterhin wurde die PCR angewandt, um den IFN- $\gamma$  Promotor aus genomischer DNA von Jurkat T-Zellen zu amplifizieren. Zum Nachweis der Spezifität der RT-PCR Amplifikate wurde die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet (Southern Blot) und mit einem spezifischen Digoxigenin (DIG)-markierten Primer (Sonde) hybridisiert. Die verwendete DIG-Sonde war spezifisch für die humane IFN- $\gamma$  cDNA. Die Detektion der hybridisierten Probe erfolgte mit einem Anti-DIG AP-gekoppeltem Antikörper. Die Visualisierung der spezifischen Signale fand durch Chemilumineszenz und Exposition auf Biomax MS Filmen statt.

### 2.4.10.1 Isolierung von RNA

Die Extraktion der gesamten zellulären RNA erfolgte entweder in Anlehnung an die Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) oder mit dem *High pure RNA isolation kit* (Boehringer Mannheim).

#### RNA-Isolierung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi

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  $\beta$ -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 rpm 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  $-20^{\circ}\text{C}$  für mindestens 30 min. Nach der Zentrifugation (30 min, 5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde das Pellet erneut in 700  $\mu\text{l}$  RNA-Lysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und 30 min Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , wurde die Probe erneut zentrifugiert (30 min, 13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurde die RNA mit 200  $\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen (15 min, 13000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und getrocknet. Das Pellet wurde in Aqua dest. gelöst und photometrisch quantifiziert. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### High pure RNA isolation kit (Boehringer Mannheim)

Dieses Verfahren eignet sich vor allem zur Isolierung von RNA aus geringen Zellzahlen ( $1 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen). 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 Nucleinsäuren-bindenden Glasfibersäulen aufgetragen wird. Dabei favorisiert der pH Wert des Puffers die Bindungsbedingungen für 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.

### **2.4.10.2 Reverse Transkription**

Bei der reversen Transkription wird die zelluläre RNA mit einem genspezifischen 3'-Primer oder einem Oligo dT-Primer, der an den polyAdenosin-Schwanz der mRNA bindet, durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der Vorteil der Benutzung eines Oligo-dT Primers in der RT-Reaktion liegt darin, daß man einen pool aller zellulären cDNAs herstellt, den man für verschiedene PCR-Reaktionen verwenden kann. Das Enzym Reverse Transkriptase wurde von Temin und Baltimore zuerst in RNA-Tumoviren (Retroviren) entdeckt. Es führt nacheinander drei Reaktionen durch, eine RNA-abhängige DNA Synthese, eine RNA-Hydrolyse und eine DNA-abhängige DNA-Synthese (Stryer 1991). Der an die komplementäre RNA-Sequenz angelagerte Primer dient als Startsignal für die enzymatische Reaktion.

#### Durchführung

5  $\mu\text{g}$  RNA wurde in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  Aqua dest. 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  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 Reaktionsmischung, wurde die Probe 1 h auf 39°C erwärmt. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz 2 min bei 95°C inkubiert. Die Probe wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Reaktionsmischung (für 1 Ansatz):

20 µl RT-Mix  
10 µl RNA-Lsg. (5 µg RNA)

Reverse Transkriptase-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 µg/µl) 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.

### 2.4.10.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine effiziente Methode zur exponentiellen Amplifikation von bestimmten cDNA-Sequenzen oder von genomischer DNA (Mullis, K.B. und F.A Faloon 1987). Dabei werden Nucleotidsequenzen *in vitro* durch Einsatz des thermostabilen Enzyms Taq-Polymerase vervielfältigt. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, daß sehr geringe Mengen DNA nachgewiesen werden können. Die Nucleotidsequenzen werden durch 20-35 PCR-Zyklen mit spezifischen Primern amplifiziert. Jeder der sich periodisch wiederholenden Zyklen ist in drei Schritten untergliedert. Der erste Schritt, die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize in eine einzelsträngige DNA-Sequenz erfolgt bei 94°C für 1 min. Die zweite Reaktion, das *Annealing*, bezeichnet die Anlagerung der Oligonucleotide an die komplementäre einzelsträngigen DNA-Sequenz bei spezifischer Temperatur (meist zwischen 45°C und 60°C) für 1 min. Der dritte Schritt kennzeichnet die Extension. Dabei dienen die doppelsträngigen Primersequenzen der Taq-Polymerase als Startpunkt für die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Diese Reaktion erfolgt bei 72°C für 2 Minuten. Das Enzym stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Mullis, 1987). Sein Temperaturoptimum liegt bei etwa 75°C und es toleriert Temperaturen bis 95°C, so daß es nur einmal in die PCR-Reaktion hinzugefügt werden

muß. Zwischen 70°C und 80° C leistet die Taq-Polymerase eine Extensionsrate von 2000-4000 Basen pro Minute.

Tabelle 2.11 Verwendete Oligonucleotide für PCR

Primerbezeichnung humane Sequenz	Sequenz	T <sub>M</sub>	erwartete Frag- mentgröße [bp]
5'-IFN-γ cDNA	5'-agttatatcttgcttttcagc-3' 5'-ggttctcttggtgttactgcc-3'	53°C	428 bp 392 bp
3'-IFN-γ cDNA	5'-ctggcgacagttcagccatcac-3'		
5'-β-Aktin cDNA	5'-tgacggggtcaccacactgtgcc-3'	59°C	620 bp
3'-β-Aktin cDNA	5'-ctagaagcatttgcggtggacgatg-3'		
5'-IFN-γ Promotor lang	5'-gtgccatcccaaagtgttga-3'	51°C	(-1355 bis +10 bp IFN-γ Promotor) 1360 bp
3'-IFN-γ Promotor lang	5'-acaatgtgctgcacctcctct-3'		
5'-IFN-γ Promotor kurz	5'-ccctttaaagggttgagaggccc-3'	57°C	( -403 bis +7 bp IFN-γ Promotor) 410 bp
3'-IFN-γ Promotor kurz	5'-atgtgctgcacctcctctggtgct-3'		

#### Durchführung der PCR

5 µl 10 x Puffer (Boehringer Mannheim)

3 µl 5 mM dNTP-Mix

2,5 µl (20 pmol/µl) Primer 5' (sense)            siehe Tabelle 2.11

2,5 µl (20 pmol/µl) Primer 3' (antisense)        siehe Tabelle 2.11

5 µl cDNA bzw. 1 µg genomische DNA mit EcoRI verdaut

5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>

23,5 µl Aqua dest., 100 µl Mineralöl

2,5 µl (1 U/µl) Taq Polymerase

PCR-Programm

Denaturierung	95°C 5 min	
Denaturierung	95°C 30 s	
Annealing	x°C (=T <sub>M</sub> ) 60 s	25-30 Zyklen
Extension	72°C 90 s	
finale Extension	72°C 10 min	

#### **2.4.10.4 Nachweis der Spezifität der Amplifikate**

Zum Nachweis der Spezifität der Amplifikate wurde die DNA zunächst aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran geblottet (Southern Blot). Anschließend wurde die Membran mit einer spezifischen Digoxigenin (DIG)-markierter Sonde (5'-ggcatttgaagaattggaagag-3'), die spezifisch für die amplifizierte humane IFN-γ cDNA

ist, hybridisiert. Die Detektion der hybridisierten Probe erfolgte mit einem Anti-DIG Alkalischer Phosphatase (AP)-gekoppeltem Antikörper. Die AP-katalysierte Chemilumineszenzreaktion wurde durch anschließende Filmexposition detektiert.

### Southern Blot

Mit dem Begriff Southern Blot bezeichnet man den Kapillar-Transfer von Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Molekülen auf einen Membranfilter. Diese Methode wurde erstmals von Southern (1975) beschrieben.

Die Durchführung erfolgt hierbei nach einem alternativen Protokoll, welches von Boehringer Mannheim für die Hybridisierung von auf Membranfiltern immobilisierten DNA-Fragmenten mit Digoxigenin markierten Oligonucleotidsonden empfohlen wird (Boehringer, 1993)

### Reagenzien und Lösungen für Southern Blot

Depurinierungs-Lsg.	250 mM HCl
Denaturierungs-Lsg.	0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungs-Lsg.	0,5 M Tris-HCl, pH7,5 ; 3 M NaCl
Transfermembran	Nylonmembran (positiv geladen), Boehringer Mannheim
Transferpuffer	20 x SSC

### Durchführung des Southern Blots

Das Agarosegel wurde in 250 mM HCl für etwa 10 min bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit Aqua. dest gespült und dann in Denaturierungs-Lsg. zweimal für 15 Minuten bei RT auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua. dest wurde das Gel zweimal für 15 Minuten bei RT in Neutralisierungs-Lsg. geschüttelt. Der Kapillar-Transfer erfolgte über Nacht mit 20x SSC (siehe Tabelle 2.8, Seite 35). Dabei wurde die Nucleinsäure durch neutralen Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran gebloftet. Zum Aufbau des Southern Blots wurde das Gel mit seiner Oberseite auf 3 Lagen Whatman Papier, dessen Enden in eine mit 20 x SSC gefüllten Kammer eintauchten, gelegt. Die passend zurecht geschnittene Nylonmembran wurde trocken auf das Gel gelegt. Die Gelränder wurden mit Frischhaltefolie abgedichtet. Danach wurden 8 Lagen Whatman Papier in der entsprechenden Gelgröße auf die Membran plaziert und mit mehreren Lagen trockenes, saugfähiges Papier belegt. Der Blot wurde mit einem oben aufgelegten Gewicht von ca. 400 g beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Nucleinsäure bei 80°C für 2 h bzw. bei 120°C für 30 min auf der Nylonmembran fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Membranfilter bei RT gelagert.

### Markierung der Sonde mit Digoxigenin

Bei dieser Methode wurde die humane IFN- $\gamma$  cDNA spezifische Sonde (5'-ggcattttgaagaattggaagag-3') mit Digoxigenin markiert. Die Durchführung erfolgte mit dem 3'-tailing kit nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim). Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Oligonucleotid-Sonden mittels Terminaler Transferase an ihrem 3'-Ende markiert werden. Dazu verwendet man eine Mischung aus Desoxyadenosin-triphosphat (dATP) und Digoxigenin-markiertem Desoxyuridin-triphosphat (DIG-dUTP). In einer Matrizen-unabhängigen Synthese werden die mit dem Steroidhaptan DIG markierten Nucleotide enzymatisch mit dem 3'-Ende des Oligonucleotids verknüpft.

### Hybridisierung

Zuerst wurde die Membran mit der fixierten Nucleinsäure in eine Hybridisierungsröhre hineingelegt, wobei die Nucleinsäureseite ins Lumen zeigte. Dann wurde die Prähybridisierungs-Lösung hinzugefügt. Die Röhre wurde unter ständiger Rotation für mindestens 4 Stunden bei 68°C in einem Hybridisierungsofen (Stratagene) inkubiert. Dieser Schritt diente zur Absättigung unspezifischer Bindungen. Anschließend wurde die Lösung gegen den Hybridisierungspuffer mit der DIG-markierten IFN- $\gamma$  cDNA Sonde ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 48°C. Die Reaktion wurde durch 2 stringente Waschschrte beendet. Dazu wurde die Membran zweimal für 5 min in Wasch-Lsg. 1 und zweimal für 5 min in Wasch-Lsg. 2 gewaschen. Das Waschen erfolgte bei der spezifischen Hybridisierungstemperatur in der Hybridisierungsröhre.

Tabelle 2.12 Verwendete Lösungen und Reagenzien für DIG-Hybridisierung

<p><b>Hybridisierungs-Lösung</b>            5 x SSC            1% [w/v] Blockierungsreagenz            0,1% [w/v] N-Lauroylsarkosin            0,02% [w/v] SDS            0,1 mg/ml poly (A)            0,5 µg/ml poly(dA)            0,1pmol/ml DIG-markierte IFN-<math>\gamma</math> cDNA spezifische Sonde            (5'-ggcattttgaagaattggaagag-3')</p>	<p><b>Wasch-Lösung 1:</b>            2 x SSC            0,1% [w/v] SDS</p>
<p><b>Prähybridisierungslösung</b>            Hybridisierungslösung ohne Oligosonde, poly(dA) und polyA</p>	<p><b>Wasch-Lösung 2:</b>            0,1 x SSC            0,1% [w/v] SDS</p>

### Detektion der Hybridisierungsprodukte

Die hybridisierten Proben wurden mittels Anti-Digoxigenin Fab-Fragmenten, die mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert sind, immundetektiert. Die Visualisierung erfolgte dann mit dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD, welches nach enzymatischer

Dephosphorylierung zu einer Lichtemission von 477 nm führt. Die spezifischen Signale wurden durch die Exposition des Filters mit Biomax MR Film (Kodak) registriert. Zunächst wurde die Membran für 1-5 Minuten in Wasch-Puffer gespült. Anschließend wurde diese in einem Polypropylenbeutel mit ca 10-20 ml Blockierungs-Lösung (Puffer 2) eingeschweißt und 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde der Beutel aufgeschnitten, die Flüssigkeit verworfen und durch Anti-DIG-AP-haltige Blockierungs-Lösung (anti DIG-AP-Konjugat 1:10000 in Puffer 2) ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Membran zweimal für 15 min mit dem Tween-haltigen Wasch-Puffer gespült. Die nachfolgende Inkubationszeit mit dem in Puffer 3 verdünntem CSPD-Substrat (1:100) betrug 5 min und fand lichtgeschützt bei 4°C statt. Nach Abtropfen des Filters auf Whatman-Papier wurde dieser erneut in einem Polypropylenbeutel eingeschweißt und in eine Autoradiographie-Kassette gelegt. Die Kassette wurde zur schnelleren Entwicklung der AP-Chemilumineszenz-Reaktion 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein Biomax MR Film aufgelegt. Die Expositionszeit betrug 5 min bis 90 min.

Tabelle 2.13 Verwendete Puffer für die DIG-Detektion

<b>Maleinsäure-Puffer (Puffer 1)</b> 0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen	<b>Blockierungs-Lösung (Puffer 2)</b> 1% [w/v] Blockierungs-Reagenz in Puffer 1
<b>Detektions-Puffer (Puffer 3)</b> 0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub>	<b>Wasch-Puffer</b> 0,3% [v/v] Tween 20 in Puffer 1

## 2.5 Methoden zur Untersuchung von Protein-DNA Interaktionen

### 2.5.1 Gelshiftassays (EMSA)

#### 2.5.1.1 Prinzip der Methode

Der Gelshiftassay (Gelretardationsexperiment, Bandshiftassay oder *electrophoretic mobility shift assay* abgekürzt EMSA) dient zur Erforschung sequenzspezifischer Protein-DNA Interaktionen. Diese Methode wird vor allem angewandt um zu untersuchen, ob sich in nucleären Proteinextrakten unterschiedlicher Zellen oder unterschiedlich stimulierter Zellen spezifische Transkriptionsfaktoren befinden, die an regulatorische DNA-Sequenzen aus dem Promotor- bzw. Enhancerbereich eines Gens binden. Dazu werden Kernproteine mit dem radioaktiv markierten, doppel-

strängigen DNA-Fragment inkubiert und auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Methode macht sich dabei die Tatsache zunutze, daß die radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonucleotide in der Gelelektrophorese schneller wandern als das gleiche DNA-Fragment im Komplex mit Protein (Neurath 1997).

Um die Spezifität identifizierter Protein-DNA Wechselwirkungen nachzuweisen, werden sowohl Konkurrenzexperimente als auch Supershiftassays durchgeführt. Bei den Konkurrenzversuchen wird unmarkierte (kalte) DNA hinzugefügt. Kommt es zu einer Abschwächung des Signals mit einem bestimmten Überschuß an kalter DNA (meist 100fach) dann kann man von Spezifität ausgehen. Als Positivkontrolle für die Abschwächung der Bande wird die Autokompetition verwendet. Dazu setzt man ein unmarkiertes Fragment mit der gleichen Sequenz wie das markierte Fragment in die Reaktion ein. Die sogenannte Kreuzkompetition sollte zu keiner Abschwächung des spezifischen Signals führen, weil diese mit einer nicht verwandter DNA-Sequenz durchgeführt wird. Bei dem Supershiftassay wird ein spezifischer Antikörper zum Ansatz 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. Der Supershift setzt voraus, daß der Transkriptionsfaktor nach Anheftung des Antikörpers noch an die DNA binden kann. Eine Auslöschung des Protein-DNA Komplexes ohne Supershift kommt dann zustande, wenn der Antikörper gegen die DNA-Bindedomäne gerichtet ist. Allerdings sollte die Spezifität des Antikörpers durch Kontrollreaktionen mit anderen Antikörpern getestet werden. Eine schematische Darstellung der Methode wird in Abbildung 2.3, Seite 56, gezeigt.

### 2.5.1.2 Durchführung von Gelshiftassays

Zur Durchführung von Gelshiftassays wurden Kernproteine oder in vitro translatierte Proteine mit der radioaktiv-markierten doppelsträngigen DNA-Sequenz inkubiert. Zusätzlich wurden in die Reaktion synthetische repetitive DNA-Stränge (Poly(dIdC), Pharmacia) hinzugegeben, um unspezifische Reaktionen abzufangen. Für Konkurrenzexperimente wurden unmarkierte doppelsträngige Oligonucleotide hinzupipettiert, während für Supershiftversuche Antikörper zum Reaktionsansatz hinzugefügt wurden. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne Protein mitgeführt.

Reaktionsansatz (ad 20 µl Aqua. dest)

4 µl 5x HO-Puffer (1) oder 10 µl 2 x Puffer (2), siehe Tabelle 2.14, Seite 56

3 µg nucleäre Proteine oder 2 µl in vitro translatiertes Protein

1 µl 1 µg/µl Poly(dIdC) (Pharmacia)

1 µl (25000 counts/µl)  $\gamma$ -<sup>32</sup>P markierter doppelsträngiges Oligonucleotid

(Kompetitor: 10-100 ng unmarkierter ds Oligonucleotid)

(Supershift: 1 µg Antikörper)

Zur Negativkontrolle ohne Proteinextrakt wurden 2 µl 10x DNA-Ladepuffer addiert, um die Lauffront im Gel zu markieren. Die Proben wurden gelelektrophoretisch mit 1x TBE-Puffer in 5%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Detektion erfolgte nach Trocknung der Gele und Filmexposition mit Kodak MS Filmen.

Tabelle 2.14 Reaktionspuffer für EMSA

5 x HO-Puffer	5 x EMSA-Puffer
125 mM HEPES	50 mM HEPES
50% Glycerin	500 mM NaCl
25 mM DTT	50% (v/v) Glycerin
750 mM KCl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
	5 mM DTT

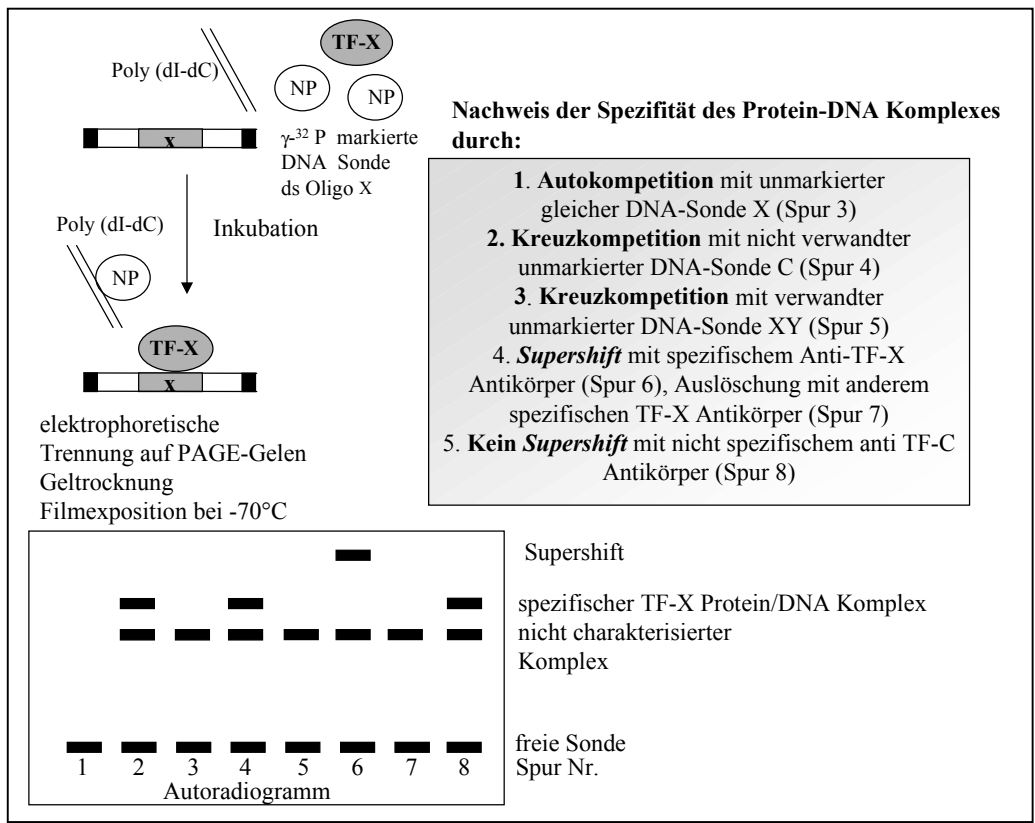


Abbildung 2.3 Prinzip des EMSA.

Beim EMSA wird eine radioaktiv markierte DNA-Sonde (hier X) mit nucleären Proteinen (NP) und dem Transkriptionsfaktor X (TF-X) in Gegenwart von Poly(dI-dC) inkubiert. Nachfolgend werden die Protein/DNA-Komplexe elektrophoretisch auf PAA-Gelen aufgetrennt. Die Spezifität TF-X-DNA Komplexes kann durch Autokompetition, Kreuzkompetitionen und Supershiftversuchen nachgewiesen werden.

Tabelle 2.15 In Gelshiftassays verwendete Oligonucleotide

Name	Oligonucleotidsequenz	Lokalisierung innerhalb des humanen IFN- $\gamma$ Promotors (bp relativ zur TSS) bzw. Consensus-Sequenz
WT-B	5'- AGG ACC CAA GGA GTC TAA AGA AAA -3' 3'- TCC TGG GTT CCT CAG ATT CTT TTG -5'	-147 bis - 171 bp
WT-C (AP-1)	5'- ATG GGT CTG TCT CAT CGT CAA AGG A -3' 3'- TAC CCA GAC AGA GTA GCA GTT TCC T -5'	-177 bis -201 bp
WT-D	5'- AGA ATC CCA CCA GAA TGG CAC AGG T -3' 3'-TCT TAG GGT GGT CTT ACC GTG TCC A -5'	-209 bis -233 bp
AP-1 Consensus	5'- CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3' 3'- GCG AAC TAC TCA GTC GGC CTT -5'	Consensus-Sequenz für AP-1
SP1 Consensus	5'- ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C -3' 3'- TAA GCT AGC CCC GCC CCG CTC G -5'	Consensus-Sequenz für SP-1
NF1/ CTC	5'- CCT TTG GCA TGC CAA TAT C-3' 3'- GGA AAC CGT ACG GTT ATA C-5'	Consensus-Sequenz für NF1/CTC
WT-C M1	5'- ATG GGT <u>CCA</u> GCT CAT CGT CAA AGG A -3' 3'- TAC CCA GGT CA GTA GCA GTT TCC T -5'	-177 bis -201 bp mutiert
WT-C M2	5'- ATG GGT CTG TCT CAT CGT CAA <u>ATT</u> A -3' 3'- TAC CCA GAC AGA GTA GCA GTT TAA T -5'	-177 bis -201 bp mutiert
WT-C M3	5'- ATG GGT CTG <u>TAT</u> CAT CGT CAA AGG A -3' 3'- TAC CCA GAC ACA GTA GCA GTT TCC T -5'	-177 bis -201 bp mutiert
WT-C M4	5'- ATG GGT CTG TCT CAT CGT <u>AAA</u> AGG A -3' 3'- TAC CCA GAC AGA GTA GCA TTT TCC T -5'	-177 bis -201 bp mutiert
wt STAT	5'-AGTCCTTGAATGGTGTGAAGTAAAAGTGCCCTCAAAGAATCCCC-3' 3'-TCAGGAACCTACCACACTTCATTTTCACGGAAGTTTCTTAGGGG-5'	-268 bis -225 bp
STAT mut	5'-AGTCCTTGAATGGTGTGAAGTAAAAGTGCC* <u>TCAAACA</u> AATCCCC-3' 3'-TCAGGAACCTACCACACTTCATTTTCACGG*AGTTT <u>G</u> TTAGGGG-5'	-268 bis -201 mutiert
wt GATA	5'-CAA ACT ATC ATC CCT GCC TAT CTG T -3' 5'-GTT TGA TAG TAG GGA CGG ATA GAC A -3'	-111 bis -87 bp
mut GATA	5'-CAA ACT <u>AAA</u> ATC CCT GCC TAA ATG T -3' 5'-GTT TGA TTT TAG GGA CGG ATT TAC A -3'	-111 bis -87 mutiert
GATA Consensus	5'-GAC TTG ATA ACA GAA AGT GAT AAC TCT -3' 5'-CTG AAC TAT TGT CTT TCA CTA TTG ACA -3'	Consensus-Sequenz

## 2.5.2 *In vivo*-Footprinting

Die Methode *in vivo*-Footprinting (*ligation-mediated PCR*, kurz LM-PCR oder DNA-Schutzexperiment) wurde 1989 von Mueller und Wold entwickelt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß mögliche Protein/DNA Wechselwirkungen in Bereichen regulatorischer DNA-Elemente in der intakten, lebenden Zelle untersucht werden können. Dabei werden DNA-Sequenzen, die mit Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung treten, vor chemischer Modifizierung durch Dimethylsulfat (DMS) bewahrt. DMS überträgt als stark alkylierendes Agens eine seiner Methylgruppen auf Guanosine in der DNA. Durch Zugabe von Piperidin kann die DNA spezifisch an methylierten Guanosinen geschnitten werden. Nach einer bestimmten Reihenfolge enzymatischer Reaktionen, erhält man auf dem Sequenzierungsgel eine Guanosin-Leiter, in der die

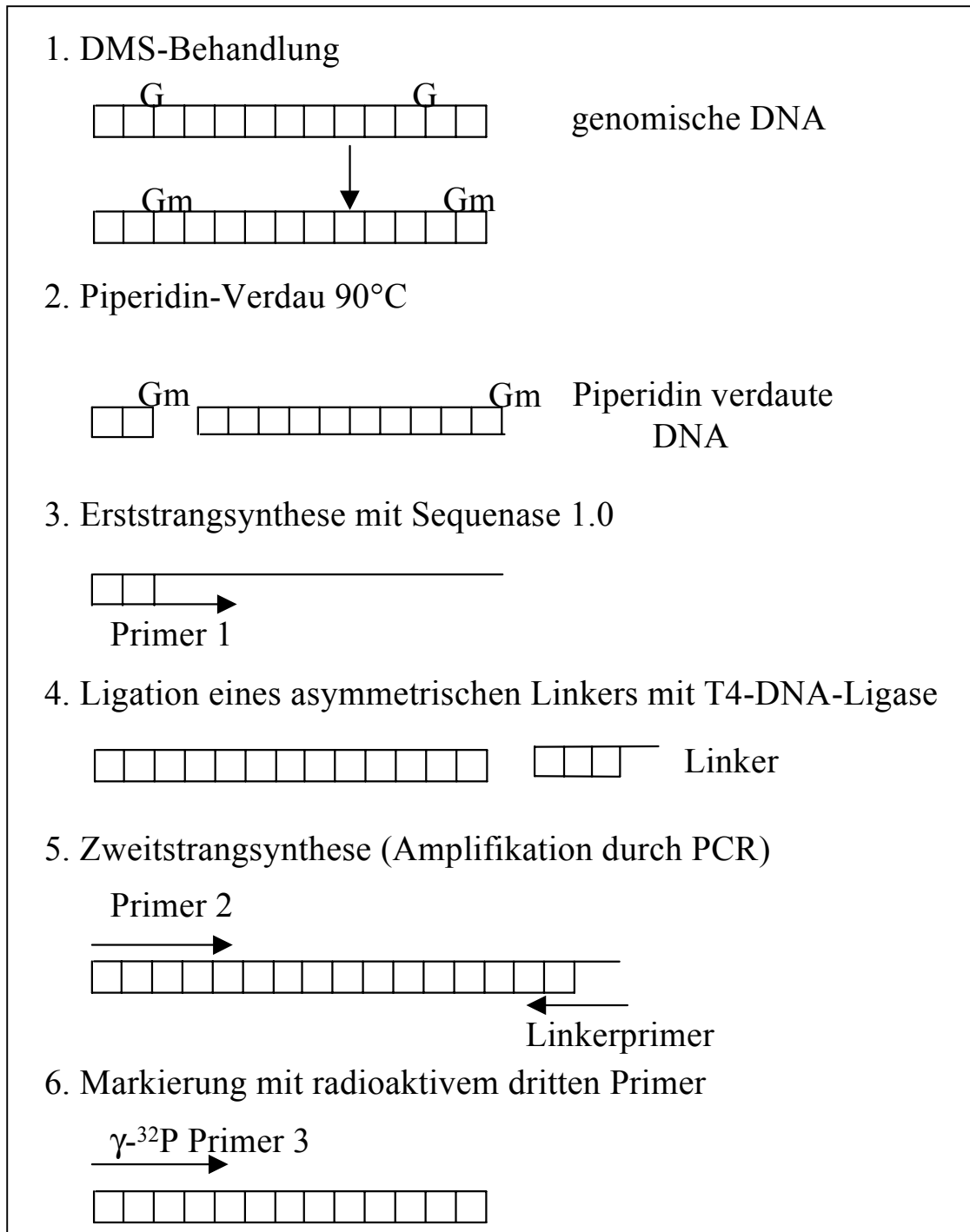
durch Proteine protektierte Areale als Lücke erscheinen und daher als footprint des Proteins bezeichnet werden.

### 2.5.2.1 Prinzip der Methode

Die Zellen werden für kurze Zeit mit DMS behandelt. Hierbei gelangt DMS in den Zellkern und methyliert Guanosine in der DNA-Leiter. Danach wird die DNA mit Piperidin bei 90°C verdaut. Dieses chemische Agens schneidet methylierte Guanosine. Die verdaute DNA wird dann mehreren enzymatischen Reaktionen unterworfen. Bei der ersten Reaktionsfolge, der sogenannten Erststrangsynthese, werden 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, das einen hohen Anteil an glatten DNA Enden ('blunt ends') erzeugt, abgelesen. Danach erfolgt die Ligation eines synthetischen, unidirektionalen Linkers an die glatten Enden der DNA-Fragmente. Bei der sogenannten Zweitstrangsynthese werden die Zielsequenzen 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.

Die Auswahl geeigneter Primer spielt eine wichtige Rolle für die Spezifität der enzymatischen Reaktionen der ligationsvermittelten PCR. Die Konstruktionsprinzipien von Oligonucleotiden wurden bereits erläutert. Bei den hier verwendeten Primern wurde folgendes beachtet:

1. Primer 3 liegt weiter in 3'-Richtung als Primer 2 und Primer 2 liegt weiter in 3'-Richtung als Primer. Dabei können sich die Primer überlappen. Primer 3 hat den höchsten  $T_M$ -Wert, meistens 66°C. Die Primer sollten so konstruiert werden, daß die Reihenfolge folgendermaßen gegeben ist:  $T_M$  Primer 1 <  $T_M$  Primer 2 <  $T_M$  Primer 3 (60°C < 63°C < 66°C)
2. Meistens wurde Primer 1 mit einer Basenpaarlänge von 20 bp konstruiert und Primer 2 bzw. Primer 3 mit einer Basenpaarlänge von 25 bp.



**Abbildung 2.4** Prinzip der LM-PCR.

Nach DMS-Behandlung *in vivo* wird die genomische DNA mit Piperidin an methylierten Guanosinen geschnitten (1+2). Danach erfolgt die Erststrangsynthese mit dem ersten genspezifischen Primer und der Sequenase 1.0 (3). Nach Ligation eines unidirektionalen Linkers (4) folgt eine PCR-Amplifikation mit dem zweiten genspezifischen Primer und dem Linkerprimer (4). Die radioaktive Markierung erfolgt mit dem dritten spezifischen Primer (6). Schließlich werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

Tabelle 2.16 In der LM-PCR verwendete Oligonucleotide

Name	Sequenz
Set A	1.5'-GCT GAT CTT CAG ATG ATC AG-3'
	2.5'-AGA ACA ATG TGC TGC ACC TCC TCT G-3'
	3.5'-ATG TGC TGC ACC TCC TCT GGC TGC T -3'
Set B	1.5'-AAG GCT GCC CCT TTG TAA AG -3'
	2.5'-GGC TGC CCC TTT GTA AAG GTT TGA -3'
	3.5'-CCC TTT GTA AAG GTT TGA GAG GCC C -3'
Set C	1.5'-AGT GCC TCA AAG AAT CCC AC -3'
	2.5'-AAG AAT CCC ACC AGA ATG GCA CAG G -3'
	3.5'-GGC ACA GGT GGG CAT AAT GGG TCT G -3'
Set D	1.5'-ACA GGT GGG CAT AAT GGG T -3'
	2.5'-GGG CAT AAT GGG TCT GTC TCA TCG T -3'
	3.5'-GGT CTG TCT CAT CGT CAA AGG ACC C -3'
Set E	1.5'-TTA CAT ATG GGT CCT GGC AG -3'
	2.5'-TAT GGG TCC TGG CAG TAA CAG CCA A -3'
	3.5'-CCT GGC AGT AAC AGC CAA GAG AAC C -3'
Set F	1.5'-GCT GAT CTT CAG ATG ATC AG -3'
	2.5'-AGA ACA ATG TGC TGC ACC TCC TCT G -3'
	3.5'-ATG TGC TGC ACC TCC TCT GGC TGC T -3'

Tabelle 2.17 Puffer für die LM-PCR

<b>Zellyse Puffer</b> 0,001 M Tris-HCl (pH 7,5) 0,4 M NaCl 0,002 M EDTA (pH 8,0) 0,2 % SDS 0,2 mg Proteinase K	<b>Stoppuffer</b> 1,5 M NaAc (pH 7,0) 1 M ME 100 µg/ml tRNA	<b>LM-Mix 1</b> 0,04 M Tris 0,05 M NaCl	<b>LM-Mix 2</b> 0,02 M MgCL <sub>2</sub> 0,02 M DTT 0,02 M dNTPMix
<b>LM-Mix 3</b> 0,017 M MgCL <sub>2</sub> 0,125 µg/ml BSA	<b>LM-Mix 4</b> 0,26 M Na-Acetat 0,001 M Tris-HCl 0,004 M EDTA (pH 8.0)	<b>Linkerprimer</b> 5'-gcg gtg acc cgg gag atc t ga att c-3'	
<b>genspezifische Primer</b> genspezifischer Primer 1 (1 pmol pro Ansatz) genspezifischer Primer 2 (10 pmol pro Ansatz) genspezifischer Primer 3 (1x10 <sup>6</sup> cpm γ- <sup>32</sup> P pro Ansatz)	<b>ds Linker-Primer (Linkermix)</b> 5'-gcg gtg acc cgg gag atc tga att c-3' 3'-c tag act taa g-5' 50 pmol/µl linker 1 (lang) 50 pmol/µl linker 2 (kurz)  annealing 95°C-20°C in Annealingpuffer siehe Tab. 2.8; Seite 35		<b>Ligationspuffer</b> 0,002 M MgCL <sub>2</sub> 1,9 mM rATP 0,05 M BSA 0,07 M Tris-HCl pH 7,5 1 µl T4 Ligase (10 U/µl, Fa. Stratagene)

### 2.5.2.2 *In vivo* DMS-Behandlung und Isolierung der DNA

Die Zellen ( $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^8$ ) wurden in 6-well Zellkulturplatten kultiviert und mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Zusätzlich wurden jedoch auch Zeitkinetikexperimente durchgeführt. 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 10 ml eiskaltes PBS pro Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Zellsuspensionen von jedem Ansatz wurden dann in 15 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 1600 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 15 ml 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 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 6 ml eiskaltem 100%igen Ethanol und 300 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,5) gefällt. Die DNA wurde für 30 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Aufnahme des Pellets in ca. 100 µl TE-Puffer (pH 7,5) wurde der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

### 2.5.2.3 *In vitro* DMS-Behandlung

Zu 200 µg DNA (in 200 µl TE Puffer pH 7,5) wurden 0,9 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 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 40 µl TE Puffer gelöst.

### 2.5.2.4 Piperidinspaltung methylierter DNA

200 µg methylierte DNA in TE-Puffer wurden mit 200 µl 1 M Piperidinlösung versetzt und 30 min auf 90°C erhitzt. Dadurch wurde die DNA spezifisch an methylierten Guanosinen gespalten. Zur Entfernung der Piperidinreste wurde der Ansatz vakuumgetrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 350 µl TE-Puffer gelöst und mit 1 ml Ethanol und 35 µl 3 M Natriumacetat 15 min auf Trockeneis gefällt. Nach der Zentrifugation (30 min, 13000 rpm) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in TE-Puffer (pH 7,5) gelöst und photometrisch quantifiziert. Anschließend wurde der Piperidinverdau der DNA-Proben auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft. Die verdaute DNA hatte eine durchschnittliche

Fragmentlänge von 500 bp.

### 2.5.2.5 Ligationsvermittelte PCR

#### Erststrangsynthese

Zur Erststrangsynthese wurden 3 µg methylierte, Piperidin verdaute DNA (in 5 µl TE-Puffer pH 7.5) mit 15 µl LM-Mix 1 und 1 µl (1µg) Primer 1 gemischt. Das Programm 1 (siehe Tabelle 2.18, Seite 63) 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 10 mM Tris pH 7,5 + 1 mM EDTA pH 8,0) hinzugefügt. Das Programm 2 wurde gestartet. Nach dem zweiten Schritt (5 min, 60°C) wurde das Programm gestoppt, aber die Proben weiter bei 60°C inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 6 µl 310 mM Tris (pH 7,7) hinzugefügt. Die Proben wurden auf Eis gestellt.

#### Linkerligation

Zu jedem Erststrangansatz wurden 20 µl LM-Mix 3, 20 µl Ligationspuffer und 5 µl Linkermix (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 rpm und 4° C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Aqua dest. gelöst.

#### Zweitstrangsynthese

Zu jedem Ansatz (20 µl) wurden auf Eis 47 µl Amplifikationspuffer hinzugefügt und mit Mineralöl überschichtet. Das Programm 3 (siehe Tabelle 2.18, Seite 63) wurde gestartet und das Reaktionsgefäß wurde bei 90° C in den Thermocycler gestellt. Kurz vor Ablauf des ersten Schrittes (5 min, 94°C) wurde das Programm angehalten und zu jedem Ansatz 2,5 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 auf Eis transferiert.

#### Radioaktive Markierung

Zu jedem Ansatz wurden 2 µl dNTP-Mix (5mM) und 1 µl ( $1 \times 10^6$  counts)  $\gamma$ -<sup>32</sup>P markierter Primer 3 addiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze in den Thermocycler gestellt und das Programm 4 wurde ausgeführt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend (ohne Öl) in 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 rpm und 4° C wurden je ca. 200 µl der oberen Phase in 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 rpm abzentrifugiert, mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Vor dem Auftragen auf ein Sequenzierungsgel wurde die DNA in 6 µl Formamidladepuffer gelöst und 4 min bei 90° C denaturiert.

Tabelle 2.18 Thermocyclerprogramme für die LM-PCR mit Sequenase 1.0

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

## 2.6 Transiente Transfektion von eukaryontischen Zellen

Als Transfektion bezeichnet man den den DNA-medierten Transfer von klonierten Genen in Form rekombinanter Vektoren in Säugerzellen. Man unterscheidet dabei zwischen dem stabilen Gentransfer und der transienten Expression der Fremd-DNA. Beim transienten Gentransfer nehmen je nach Zelltyp etwa 10-50% der transfizierten Zellen vorübergehend die Fremd-DNA auf, ohne diese aber stabil ins Genom zu integrieren. Diesen Zeitraum kann man zur Untersuchung von Regulationsmechanismen der Expression der eingeschleusten Gene nutzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die transiente Transfektion verwendet, um die Aktivität des IFN- $\gamma$  Promotors sowohl in verschiedenen Zelllinien als auch in primären Lymphocyten zu analysieren. Dazu wurden Luciferase-Reportergenkonstrukte verwendet (siehe Tabelle 2.10, Seite 46). Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Reportergenkonstrukt (z.B.  $\beta$ -Gal CMV, Fa. Invitrogen) verwendet. Die Meßwerte wurden mit dem Kontrollvektor normalisiert und mit dem Proteingehalt der Probe. Die hierbei verwendeten Transfektionstechniken werden im folgenden Abschnitten erläutert.

### 2.6.1 Transfektionstechniken

Die vier gängigsten Transfektionstechniken sind die Calciumphosphat-, die DEAE-Dextran-Transfektion, die Elektroporation und die Lipofektion. Je nach Zelltyp bzw. Zelllinie wurde eine der hier aufgeführten Techniken angewandt.

### 2.6.1.1 DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion

Die Calciumphosphat- und die DEAE-Dextran vermittelten Transfektionen gehören aufgrund ihrer hohen Effizienz (10-50%) zu den am häufigsten angewandten Methoden. Man nimmt an, daß bei diesen Transfektionstechniken die DNA über Endocytose in den Zellkern gelangt und von dort in den Zellkern eingeschleust wird. Die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion wird vor allem bei adhärennten Zellen verwendet. Sie wird außerdem eingesetzt, wenn die Fremd-DNA in das Genom der Zellen stabil integriert werden soll. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch in den meisten Fällen die DEAE-Dextran Methode verwendet, weil sich diese in den hier durchgeführten transienten Transfektionen von Suspensionszellen als sehr effizient und reproduzierbar erwies.

#### Durchführung der DEAE-Dextran Transfektion

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit frischem Kulturmedium (RPMI + 10% FCS) gefüttert. Pro Transfektionsansatz wurden  $1 \times 10^7$  Zellen eingesetzt. Bei 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. Im nachfolgenden Abschnitt wird die DEAE-Transfektion für ein Transfektionsansatz ( $1 \times 10^7$  Zellen) beschrieben.

Am Tag der Transfektion wurden die Zellen abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min), mit 5 ml 1x PBS und anschließend mit 5 ml kaltem 1x TS Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DNA/DEAE/TS aufgenommen und 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde der Ansatz mehrmals leicht geschüttelt. Anschließend wurden 10 ml Kulturmedium (+ 10% FCS) und 0,1 mM Chloroquin hinzugefügt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Chloroquin ist ein cytotoxisches Agens, das die Transfektionseffizienz erhöht. Man nimmt an, daß es den Abbau der DNA durch lysosomale Hydrolasen verhindert. Danach wurde der Ansatz abzentrifugiert (5 min, 1600 rpm) und mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen je nach Zellgröße und Dichte in 5-30 ml Komplettmedium (RPMI + 10%FCS) aufgenommen und in Kulturschalen ausgesät. Das Kulturmedium für primäre T-Zellen wurde zusätzlich mit 40 U/ml IL-2 supplementiert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 10 Stunden wurde die Luciferase Aktivität in den lysierten Zellen bestimmt.

Tabelle 2.19 Puffer für die DEAE-Dextran Transfektion

<b>1000 ml 1 x TD pH 7,4</b> 8 g NaCl 0,38 g KCl 0,13 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 g Tris-HCl ad 1000 ml Aqua dest. steril filtrieren durch 0,45 µM Filter	<b>100 ml 1x TS</b> 99 ml 1 x TD 1 ml (10 mg/ml MgCl <sub>2</sub> , 10 mg/ml CaCl <sub>2</sub> )  steril filtrieren durch 0,45 µM Filter
<b>1 ml DNA/DEAE/TS (1 Transfektionsansatz)</b> 943 µl 1 x TS 5 µl (5 µg) DNA Reporterplasmid (Luciferase-Vektor) 2 µl (2 µg) Kontrollplasmid (β-Galaktosidase CMV Plasmid) 50 µl einer 10 mg/ml DEAE-Dextran Lösung steril filtrieren durch 0,45 µM Filter	<b>100 x Chloroquin (10 mM)</b>  51,6 mg Chloroquin ad 10 ml Aqua dest.  steril filtrieren durch 0,45 µM Filter lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren

### 2.6.1.2 Elektroporation

Die Elektroporation kann angewendet werden, um DNA für transiente oder stabile Transfektionen in eukaryontischen und prokaryontischen Zellen einzuschleusen. Dabei werden die Zellen einem elektrischen Hochspannungsimpuls ausgesetzt. Dadurch kommt es zur Bildung von Poren in der Plasmamembran, durch welche die DNA ins Cytoplasma und dann in den Zellkern gelangen kann. Durch eine anschließende Inkubation auf Eis kann das Schließen der Poren verzögert werden und damit die Effizienz der DNA-Aufnahme erhöht werden.

#### Durchführung der Elektroporation

2x10<sup>7</sup> Zellen wurden in 500 µl serumfreien Medium aufgenommen und mit 40 µg (1 µg/µl) Reporterplasmid (Luciferase-Vektor) und 10 µg (1 µg/µl) Kontrollplasmid (β-GalCMV, β-GalSV40) gemischt. Anschließend wurde die Mischung in eine sterile Biorad Elektroporationsküvette überführt und die Küvette 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Küvette in die Kammer des Elektroporationsapparats (*Biorad Gene Pulser TM*) eingeführt und einem Impuls mit entsprechender Kapazität (250 V, 950 µF) ausgesetzt. Danach wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis inkubiert, in 5 ml Komplettmedium (RPMI + 10% FCS) resuspendiert und in 6-well Platten ausgesät. Nach 14 h wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 10 h lysiert. Dann wurde aus den Lysaten die Luciferase und die β-Galaktosidase Aktivität bestimmt.

### 2.6.1.3 Lipofektion

Bei dieser Methode wird eine Mischung von kationischen und neutralen Lipiden verwendet, die sich mit anionischen Molekülen (DNA) zu Komplexen verbinden. Damit

wird die DNA in Lipidvesikel verpackt, die Liposomen verschmelzen mit der Zellmembran, und die DNA kann ins Cytoplasma und dann in den Zellkern gelangen. Abgesehen von Plasmiden lassen sich durch Liposomen-vermittelten Transfer auch Oligonucleotide, RNA- und Proteinmoleküle in eukaryontische Zellen einführen. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Lipofektion das Reagenz Dosper (Boehringer Mannheim) und das Reagenz Fugene (Boehringer Mannheim) verwendet.

Dosper ist eine Liposomen Präparation des polykationischen Lipids 1,3-Di-Oleoyloxy-2(6-Carboxy-spermyl)propylamid, das aus einer positiv geladenen Spermin Kopfgruppe und endständigen Fettsäureresten besteht. Es bindet negativ geladene DNA-Gruppen und bildet polykationische Komplexe aus, die von den negativen Zellmembranen der zu transfizierenden Zellen adsorbiert werden und anschließend von den Zellen aufgenommen werden. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die Transfektion der Zellen mit dem DNA-Lipidkomplex in serumfreien Medium erfolgte. Dabei wurden für ein Transfektionsansatz  $3 \times 10^5$  Zellen in 1 ml serumfreien Medium mit 5 µg Dosper, 1,5 µg Reporterplasmid und 0,5 µg Kontrollplasmid für 6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das serumfreie Medium entfernt, die Zellen in Kompletmedium (RPMI + 10% FCS) resuspendiert und nach 12 h Kultur mit verschiedenen Agenzien stimuliert. Die Stimulation dauerte in der Regel 12 h. Danach wurde aus den Zellysaten die Luciferase- bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität bestimmt.

Fugene ist ein nicht-liposomales Reagenz. Es besteht jedoch aus Lipiden und anderen, nur dem Hersteller Boehringer Mannheim bekannten Komponenten in 80% Ethanol. Der Vorteil dieses Reagenzes liegt darin, daß man es direkt auf die Zellkultur in Kompletmedium applizieren kann. Nach der Verdünnung von 3 µl Fugene in 97 µl serumfreien Medium wurde 1 µg DNA hinzugefügt, der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die Zellkultur ( $3 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Kompletmedium) appliziert. Nach 12 h wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 12 h wurde der Versuch ausgewertet.

## 2.6.2 Reporterassays

Um die Aktivität bestimmter Promotoren nach Transfektion in Säugerzellen zu untersuchen, setzt man in einem geeigneten Vektor ein heterologes Gen (Reporter-gen) unter die Kontrolle des betreffenden Promotors. Als Reportergene verwendet man meistens Gene, die leicht nachweisbare Enzyme kodieren wie bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase, Luciferase (*firefly luciferase*) oder bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die Menge des gebildeten Enzyms bzw. der Enzymaktivität gilt dann als Maß für die Fähigkeit des Promotors bzw. des *cis*-regulatorischen Elements die Transkription zu regulieren.

Die Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung von einem

Photon. Die Luciferase-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem *luciferase assay system* von Promega bestimmt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität hingegen wurde durch Chemilumineszenzmessung mit dem *Luminescent  $\beta$ -gal detection kit II* von Clontech ausgewertet. Zur Analyse wurde ein Luminometer (Lumat 9600) der Firma Berthold verwendet.

Bei den Reportergenvektoren unterscheidet man 4 Typen: Basisvektor, Kontrollvektor, Enhancervektor und Promotorvektor. Alle 4 Typen enthalten einen bakteriellen Replikationsstartpunkt (*f1 ori*), ein Antibiotikaresistenzgen für die Selektion des rekombinierten Plasmids in Bakterien (z.B. Ampicillin) sowie Restriktionsschnittstellen für die Integration der fremden DNA-Sequenz (*polylinker*). Zudem enthalten diese Vektoren die cDNA für das Reportergen (z.B. Luciferase), sowie Polyadenylierungssignale, welche die RNA-Prozessierung effizienter machen und die Stabilität der Transkripte innerhalb der transfizierten Zellen erhöhen. Der Basisvektor enthält keine eukaryontischen Promotor- und Enhancerelemente, und eignet sich daher zur funktionellen Analyse von Promotoren, die stromaufwärts der Reportergen cDNA kloniert werden. Der Kontrollvektor hingegen enthält einen Promotor, z.B. CMV (Cytomegalus Virus), RSV (Rous Sarkoma Virus) oder SV40 (*simian virus 40*) Promotor sowie Enhancerelemente. Dieser Vektor sollte bei transienten Transfektionen immer eine starke Reportergenaktivität aufweisen. Der Promotorvektor eignet sich zur Integration von Enhancerelementen, die zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Konstrukts führen sollten. Der Enhancer-Vektor eignet sich zur Überprüfung schwacher Promotoren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klonierung des IFN- $\gamma$  Promotors die Luciferase-Basisvektoren pXP1 und pGL2 verwendet. Als Kontrollvektor wurde der p $\beta$ -Gal-ControlSV40 Vektor (Clontech) und der  $\beta$ -GalCMV Vektor (Invitrogen) verwendet. Dabei wurden die Zellen stets mit 2 Plasmiden cotransfiziert, mit dem Luciferase/IFN- $\gamma$  Reportergenkonstrukt und mit dem  $\beta$ -Galaktosidase Kontrollplasmid. Die konstitutive Aktivität des Kontrollenzym  $\beta$ -Galaktosidase wurde in demselben Zellextrakt gemessen wie die Luciferase-Aktivität des zu untersuchenden IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukts. Somit wurde die Transfektionseffizienz bei der Auswertung der Meßergebnisse immer berücksichtigt.

#### Auswertung der Reportergenaktivität

Zur gleichzeitigen Untersuchung der Luciferase und der  $\beta$ -Galaktosidase wurden die Zellen nach der Transfektion mit 1x PBS gewaschen (1600 rpm, 5 min) und anschließend in 1x *reaction lysis buffer* von Promega lysiert. Dabei wurden  $10^7$  Zellen in 100  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden 15 min bei RT stark gevortext und anschließend bei 13000 rpm 1 min abzentrifugiert. 20  $\mu$ l Überstand wurden mit 200  $\mu$ l  $\beta$ -Gal Substratpuffer (Clontech) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die  $\beta$ -

Galaktosidase Aktivität der Proben für 15 s in einem Luminometer (Lumat 9600, Berthold) bestimmt. Als Referenzwert für die Messung wurde ein Röhrchen mit Substrat verwendet.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 100 µl Luciferase-Substratpuffer (Promega) in ein durchsichtiges 5 ml Röhrchen vorgelegt und 20 µl Überstand der lysierten Zellen hinzupipettiert. Das Röhrchen wurde sofort in das Luminometer gestellt, und die Messung erfolgte für 15 s bei RT. Als Referenzwert wurde hier vor jeder Messung die Lichtcountzahl vom Substrat bestimmt. Als Negativkontrolle diente die Transfektion der Zellen mit dem leeren, promotorlosen Vektor (z.B. pXP1, pGL2). Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität der IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukte mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Weiterhin wurde zur Normalisierung der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität der Proteingehalt der Zellysat-Überstände photometrisch bestimmt .

### 2.6.2.1 Gerichtete Mutagenese der Promotorsequenz

Um die DNA-Regionen im IFN- $\gamma$  Promotor zu untersuchen, die an der Transkriptionsregulation maßgeblich beteiligt sind, wurden Mutationen in diese Abschnitte eingeführt. Hierbei wurde das *Quickchange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit* von Stratagene verwendet.

#### *Quickchange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit*

Für diese Methode wurde der Vektor, der die zu untersuchende DNA enthielt (pXP1-IFN- $\gamma$  Luc) und 2 Oligonucleotide, welche die gewünschte Mutation enthielten und komplementär zu den beiden gegensätzlichen Strängen des Vektors waren, verwendet. Dabei wurden die mutierten Oligonucleotide eingesetzt, die bereits in Gelshiftassays auf Protein-DNA Komplexbildung untersucht wurden (siehe Tabelle 2.15, Seite 57). Die an den Vektor angelagerten Oligonucleotide dienen 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 der Mutationen 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<sup>m6</sup>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 $\alpha$ 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.

PCR für *Quickchange*<sup>TM</sup> *site-directed mutagenesis kit*

- Reaktionsansatz

50 ng pXP1-IFN- $\gamma$  Promotor (6,5 kb Vektor insgesamt)

125 ng Primer 1 (siehe mutierte Primer für Gelshift, Tabelle 2.15, Seite 57)

125 ng Primer 2

5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer

1  $\mu$ l dNTP-Mis (10 mM)

1  $\mu$ l (2,5 U/ $\mu$ l) *PfuTurbo* DNA Polymerase (Stratagene)

ad 50  $\mu$ l Aqua dest., mit Öl überschichten

- PCR-Programm

Denaturierung	95°C 30 s	
Denaturierung	95°C 30 s	
<i>Annealing</i>	x°C (=T <sub>M</sub> ) 60 s	16 Zyklen
Extension	68°C 2 min/kb (hier 14 min)	

## 2.7 Herstellung von IFN- $\gamma$ Promotor/Luciferase transgenen Mäusen

Die Mikroinjektion zur Herstellung der IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgenen Mäuse wurde von Privatdozent Dr. Manfred Blessing durchgeführt.

### 2.7.1 Prinzip der Methode

Die erste erfolgreiche Erzeugung einer transgenen Maus wurde von Gordon et al. 1980 etabliert. Diese Technik wird seither vor allem zur Aufklärung der gewebsspezifischen und entwicklungsspezifischen Genregulation und Genfunktion verwendet (Neurath 1997).

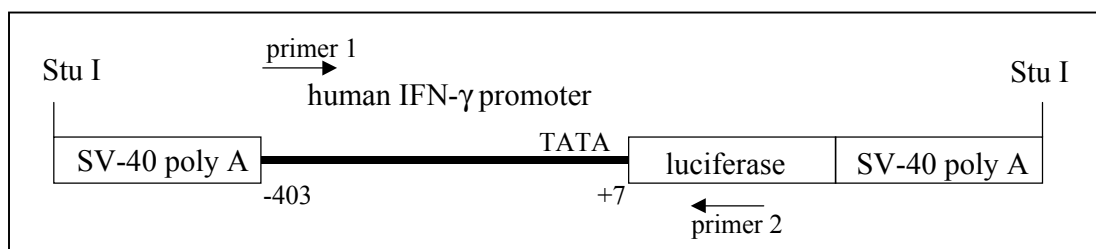
Die Methode kann in mehreren Schritten unterteilt werden. Zunächst wird das DNA-Konstrukt hergestellt. Im nächsten Schritt werden Oocyten aus dem NVB/NHSD Mäusestamm entnommen. Dabei wird bei den weiblichen Spendermäusen eine Superovulation durch Serum trächtiger Stuten und menschlichem Choriongonadotropin (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 NVB/NHSD Mäuse, die am nächsten Tag Vaginalpfropfen aufweisen, werden getötet und die Eier aus der Ampulla des geschwollenen Eileiters präpariert. Die befruchteten NVB/NHSD Eizellen werden vor der ersten Teilung gesammelt. Das optimale Stadium für die Mikroinjektion ist das Stadium, wo der männliche und weibliche Vorkern (Pronucleus) sichtbar ist. Die

fremde DNA wird in den größeren männlichen Vorkern mikroinjiziert. Dabei wird die Injektion mit Hilfe eines speziellen Mikroskops und von 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 scheinchwangeren Maus transplantiert. Dabei werden die scheinchwangeren Mäuse durch Verpaarung von 6-7 Wochen alten Weibchen mit sterilen Männchen gewonnen. Die geborenen Mäusen verbleiben bis zu 3 Wochen bei den Ziehmüttern. Anschließend werden diese am Ohr markiert und ein Stück DNA-Schwanz wird abgeschnitten, um die DNA zu analysieren. 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.

## 2.7.2 Klonierung des Konstrukts

Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde dasselbe pXP1-IFN- $\gamma$  Luciferase-Konstrukt eingesetzt, dessen Klonierung in Abschnitt 2.4.8.3 dargestellt ist. Dieses Konstrukt enthält 410 bp vom humanen IFN- $\gamma$  Promotor (Position -403 bis +7 bp relativ zur Transkriptionsstartseite) stromaufwärts des Luciferase-Reportergens. Die funktionelle Regulation dieses Konstrukts wurde vor der Herstellung des Transgens in vielen verschiedenen Zelllinien getestet. Um die prokaryontischen bakteriellen Sequenzen (2,3 kb) aus dem pXP1 Vektor zu entfernen, wurden mit dem *Quickchange<sup>TM</sup> site-directed mutagenesis kit* StuI Restriktionsschnittstellen 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 NVB/NHSD Mäuseeier mikroinjiziert. Dieses 4,2 kb Fragment enthielt die humane IFN- $\gamma$  Promotorsequenz (-403 bis +7), die Luciferase-cDNA und 2 SV-40 poly A Seiten.



**Abbildung 2.5** Das Schema zeigt das Konstrukt aus dem pXP1 Vektor, das für die Herstellung der transgenen Mäuse verwendet wurde. Die Position der Primer, die für die Identifizierung der positiven Mäuse verwendet wurde, ist angezeigt.

### 2.7.3 Screening der transgenen Mäuse

Zum *Screening* der transgenen Mäuse wurde aus den Mäusschwänzen 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 wurde gefällt und auf Nucleinsäure-bindenden Säulen aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten wurden die Nucleinsäuren mit Elutionspuffer aus den Säulen eluiert. Die DNA wurde anschließend photometrisch quantifiziert. 100 ng DNA wurden in eine PCR Reaktion mit einem sense Primer (5'-cccttgtaaagggttgagaggccc-3') und einem antisense Primer (5'-ttttgtcacgatcaaaggactctgg-3') eingesetzt. Mit dieser PCR-Reaktion wurde ein 1049 bp IFN- $\gamma$  Promotor Luciferase-Fragment amplifiziert. Als Kontrolle wurden murine  $\beta$ -Aktin Primer (5'-cgcagctcagtaacagtc-3' und 5'-tctctggcatccatgaa-3') verwendet. Damit wurde ein 850 bp  $\beta$ -Aktin PCR-Amplifikat aus der genomischen murinen DNA hergestellt.

#### PCR zur Überprüfung der transgenen Mäuse

5  $\mu$ l 10 x Puffer (Boehringer Mannheim)  
 3  $\mu$ l 5 mM dNTP-Mix  
 2,5  $\mu$ l (20 pmol/ $\mu$ l) Primer 5' (5'-cccttgtaaagggttgagaggccc-3')  
 2,5  $\mu$ l (20 pmol/ $\mu$ l) Primer 3' (5'-ttttgtcacgatcaaaggactctgg-3')  
 5  $\mu$ l cDNA bzw. 1  $\mu$ g genomische DNA mit EcoRI verdaut  
 5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
 ad 47,5  $\mu$ l Aqua. dest., überschichten mit 100  $\mu$ l Mineralöl  
 + 2,5  $\mu$ l (1 U/ $\mu$ l) Taq polymerase

#### PCR-Programm

Denaturierung	95°C 5 min	
Denaturierung	95°C 45 s	
<i>Annealing</i>	47°C 90 s	30 Zyklen
Extension	72°C 120 s	
finale Extension	72°C 10 min	

Danach wurden die PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt, der zum Nachweis der Spezifität der Amplifikate mit einer DIG-markierten Sonde aus dem IFN- $\gamma$  Promotor hybridisiert wurde.

DIG-Sonde für Southern Blot Hybridisierung:

5'-agtccttgaatgggtggaagtaaaagtcctcaagaatcccc-3'

Die Hybridisierung erfolgte hierbei bei 55°C.

Die Auswertung erfolgte nach Inkubation mit Chemilumineszenzsubstrat und der Filmexposition.

### Reportergenassays

Mehrere transgene Tiere wurden auf Luciferase-Aktivität ihrer Organe überprüft. Dazu wurden die Tiere getötet und verschiedene Organe wie Milz, Leber, Niere, Herz, Lunge, Gehirn, Schilddrüse, Thymus, Darm, Magen und Geschlechtsorgane entnommen. Danach wurden die Organe in Flüssigstickstoff eingefroren und mit einem Mörser zerkleinert. Nach Aufnahme in Lysepuffer (Promega), wurde die Luciferase-Aktivität nach Zugabe des Substratpuffers im Luminometer bestimmt. Weiterhin wurden aus den Milzen der transgenen Mäuse Einzelzellsuspensionen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellpopulationen isoliert (siehe 2.2.5, Seite 26). Es wurden Zellkulturen angesetzt unter verschiedenen Stimulationsbedingungen und mit unterschiedlichen Reagenzien (siehe Tabelle 2.3, Seite 27). Hierbei wurden die Zellen nach 48 h lysiert und die Luciferase-Aktivität wurde im Luminometer bestimmt.

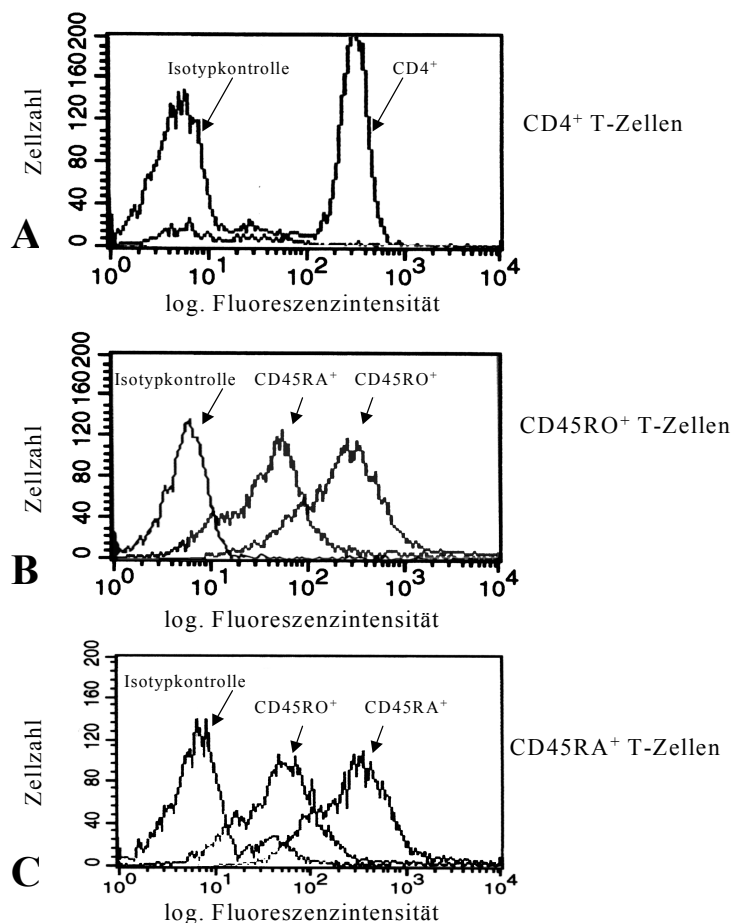
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen dienen vor allem der Etablierung und Überprüfung der durchgeführten Methoden. Einige dieser Experimente sind aufgrund ihrer Relevanz für weiterführende Studien in diesem Abschnitt zusammengestellt.

#### 3.1.1 FACS-Analyse zur Reinheitsbestimmung der in weiteren Experimenten verwendeten $CD4^+$ , $CD45RO^+$ und $CD45RA^+$ T-Zellen

Zur Untersuchung der IFN- $\gamma$  Promotorregulation in primären T-Zellen wurde zunächst die Reinheit der isolierten primären T-Zellen, die als Ausgangsmaterial für alle weiteren Experimente dienen, analysiert.



**Abbildung 3.1** FACS-Analyse zur Reinheitsbestimmung der in weiteren Studien verwendeten  $CD4^+$ ,  $CD45RO^+$  und  $CD45RA^+$  Zellpopulationen.

**A** Frisch isolierte  $CD4^+$  T-Zellen wurden mit einem direkt  $\alpha CD4$  FITC-markierten Antikörper angefärbt ( $1 \mu g$  Ak/ $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz) und im FACS analysiert. Als Isotypkontrolle wurde ein Maus IgG-FITC Antikörper verwendet.

**B+C**  $CD45RO^+$  (**B**) und  $CD45RA^+$  (**C**) Subpopulationen von  $CD4^+$  T-Helferzellen wurden indirekt markiert mit einem  $\alpha CD45RO$  bzw.  $\alpha CD45RA$  Antikörper ( $1 \mu g/10^6$  Zellen) und einem  $\alpha$ Maus IgG-FITC Sekundärantikörper ( $1 \mu g/10^6$  Zellen). Als Negativkontrolle wurde ein unmarkierter Maus IgG Antikörper und ein  $\alpha$ Maus IgG-FITC Sekundärantikörper verwendet.

In Abbildung 3.1 sind repräsentative FACS-Analysen der mit immunomagnetischen beads (Firma Dynal) isolierten Zellpopulationen dargestellt. Die Ergebnisse sind in Histogrammen dargestellt, wobei die Zellzahl gegen den Logarithmus der Fluoreszenz-

intensität aufgetragen ist. Die Rechtsverschiebung des Histogramms kennzeichnet somit das Maß der Expressionsstärke des nachgewiesenen Antigens im Vergleich zur Isotypkontrolle. Der Reinheitsgrad der isolierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen betrug circa 95% (Abbildung 3.1 A).

Durch negative Selektion wurden aus CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen (T-Gedächtniszellen) und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (naive T-Zellen) isoliert. Aus Abbildung 3.1 B+C wird ersichtlich, daß sowohl die CD45RO<sup>+</sup> als auch die CD45RA<sup>+</sup> T-Lymphocyten beide Antigene auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei der einen Zellpopulation ist das Antigen CD45RO überexprimiert, während bei der anderen Zellpopulation CD45RA stärker exprimiert wird (3.1B+C).

### 3.1.2 IFN- $\gamma$ Proteinproduktion von CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen

In Tab. 3.1 ist die IFN- $\gamma$  Proteinkonzentration aus Zellkulturüberständen unstimulierter, PMA/ConA und PMA/PHA stimulierter CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt. Die Proteinkonzentration wurde durch ELISA Experimente ermittelt. Dabei wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Tabelle zeigt, daß die IFN- $\gamma$  Proteinproduktion durch die angegebenen Stimulantien induzierbar ist. Hierbei induziert PMA/PHA stärker die IFN- $\gamma$  Proteinproduktion (bis zu 3766 pg/ml) als PMA/ConA (bis zu 1608 pg/ml). Weiterhin wird ersichtlich, daß die Meßdaten der 3 unabhängig durchgeführten Experimente sich unterscheiden. Dennoch ist die Tendenz klar erkennbar. Im Durchschnitt produzieren CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen mehr IFN- $\gamma$  (bis zu 3766 pg/ml) als CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (Höchstwert 2860 pg/ml).

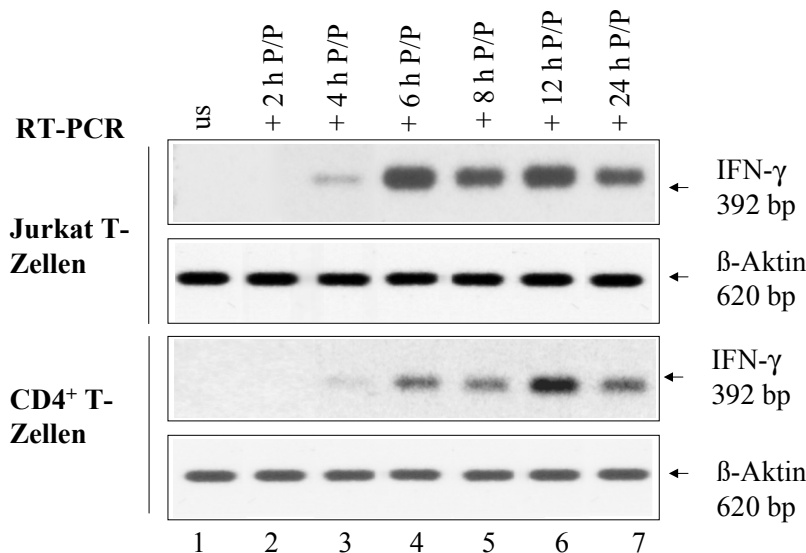
primäre T-Zellen	Experiment Nr.	IFN- $\gamma$ (pg/ml)		
		Medium	PMA+ConA	PMA+PHA
CD45RO <sup>+</sup> T-Zellen	1	211	1608	3766
	2	160	820	1220
	3	80	546	720
CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen	1	304	1010	2860
	2	265	840	1677
	3	102	633	838
CD4 <sup>+</sup>	1	370	1357	3275
	2	182	957	1587
	3	105	654	1321

**Tab. 3.1** ELISA-Meßwerte aus Zellkulturüberständen unstimulierter, PMA/PHA und PMA/ConA stimulierter primärer T-Lymphocyten. Jeweils 3 unterschiedliche Experimente sind gezeigt. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet, die für 48 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert wurden.

### 3.1.3 Zeitkinetik der IFN- $\gamma$ mRNA Expression in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Jurkat T-Zellen

In Abbildung 3.2 ist die Zeitkinetik der IFN- $\gamma$  mRNA Expression nach Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Jurkat T-Zellen mit PMA/PHA dargestellt. Bei der hier durchgeführten Methode handelt es sich um eine semiquantitative RT-PCR mit  $\beta$ -Aktin als interner Standard.

Die Abbildung 3.2 zeigt, daß IFN- $\gamma$  mRNA Transkripte bereits nach vierstündiger Stimulationsdauer mit PMA/PHA in Jurkat T-Zellen produziert wurden (Spur 3). Das Signal ist allerdings zu diesem Zeitpunkt noch sehr schwach. Nach 6 Stunden ist die RT-PCR Bande sowohl in Jurkat T-Zellen als auch in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich erkennbar und bleibt 24 Stunden bestehen. Hierbei zeigen die primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine maximale IFN- $\gamma$  mRNA Expressionsrate nach Behandlung mit PMA/PHA für 12 Stunden (Spur 6). Die Signalstärke der  $\beta$ -Aktin Kontrolle ist bei allen Ansätzen weitgehend konstant und demonstriert somit die Vergleichbarkeit der Versuchsansätze. Für Studien zur Analyse der Promotorregulation ist der Zeitpunkt der Neusynthese des mRNA-Transkripts wichtig. In weiterführenden Gelshift und *in vivo*-Footprinting Experimenten zur Untersuchung der Protein/DNA Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor, wurden daher Stimulationszeitpunkte von 2-4 Stunden gewählt.



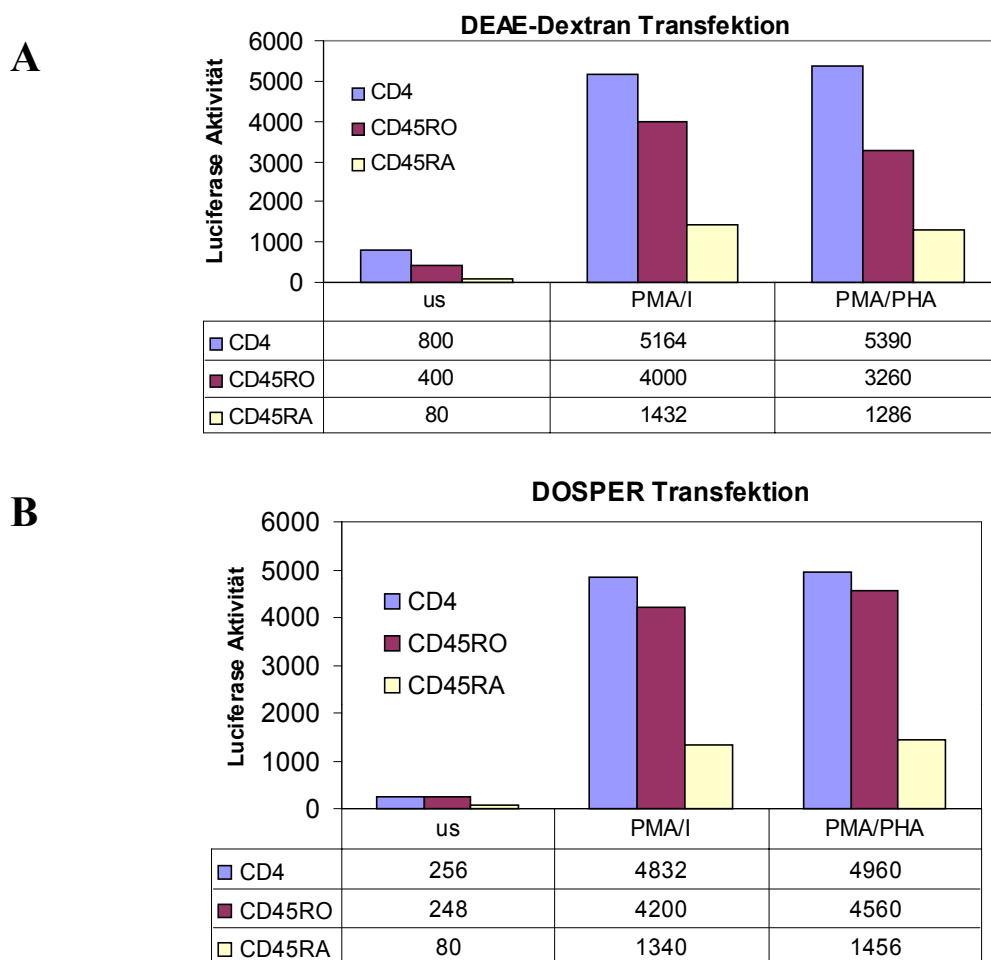
**Abbildung 3.2** RT-PCR Analyse von IFN- $\gamma$  mRNA Transkripten aus Jurkat T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zellen wurden für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h und 24 h mit 50 ng/ml PMA und 50  $\mu$ g/ml PHA stimuliert. Als interner Standard wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. Die Proben wurden zusammen mit einem Längenstandard in einem 1,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.1.4 Funktionelle Analyse der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität in CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen

Die funktionelle Untersuchung der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in primären T-Helferzellen ist in Abbildung 3.3 gezeigt. Zum Vergleich wurden die Zellen mit DEAE-Dextran und dem liposomalen Agens Dosper (Boehringer Mannheim) transfiziert.

Die Abbildung 3.3 zeigt, daß der IFN- $\gamma$  Promotor sowohl durch PMA/PHA als auch durch PMA/Ionomycin in den untersuchten primären T-Zellen induzierbar ist. Sowohl bei der liposomalen als auch bei der DEAE-vermittelten Transfektionstechnik ist die Luciferase-Aktivität in den transfizierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen höher als in den naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Helferzellen. Das ist vergleichbar mit der erhöhten IFN- $\gamma$  Proteinproduktion der CD4<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Tabelle 3.1).

In weiterführenden Studien wurde die DEAE-vermittelte Transfektion gegenüber der Dospers Transfektion bevorzugt eingesetzt. Bei der kostengünstigeren DEAE Transfektion wurden durchschnittlich höhere Reproduktionsraten der Meßergebnisse und bessere Transfektionseffizienzen festgestellt.



**Abbildung 3.3** Transiente Transfektion des pXP IFN- $\gamma$  Reporter-genkonstrukts in primäre CD4<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Lymphocyten.

**A** 5  $\mu$ g pXP-IFN- $\gamma$  Reporter-genkonstrukt und 2  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor wurden in  $5 \times 10^6$  Zellen mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen für weitere 10 h mit 50 ng/ml PMA, 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (I) und 50  $\mu$ g/ml PHA stimuliert. Die Zellysate wurden im Luminometer ausgewertet. Der Meßwert wurde mit der  $\beta$ -Gal Kontrolle und mit dem Proteingehalt normalisiert.

**B** 3  $\mu$ g pXP-IFN- $\gamma$  Reporter-genkonstrukt und 1  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor wurden in  $2 \times 10^6$  Zellen mit Dospers (Boehringer Mannheim) transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für weitere 12 h mit 50 ng/ml PMA, 1  $\mu$ g/ml Ionomycin und 50  $\mu$ g/ml PHA behandelt. Die Zellysate wurden im Luminometer ausgewertet und mit der  $\beta$ -Gal Kontrolle sowie dem Proteingehalt normalisiert. Auf der y-Achse ist die gemessene Luciferase-Aktivität dargestellt.

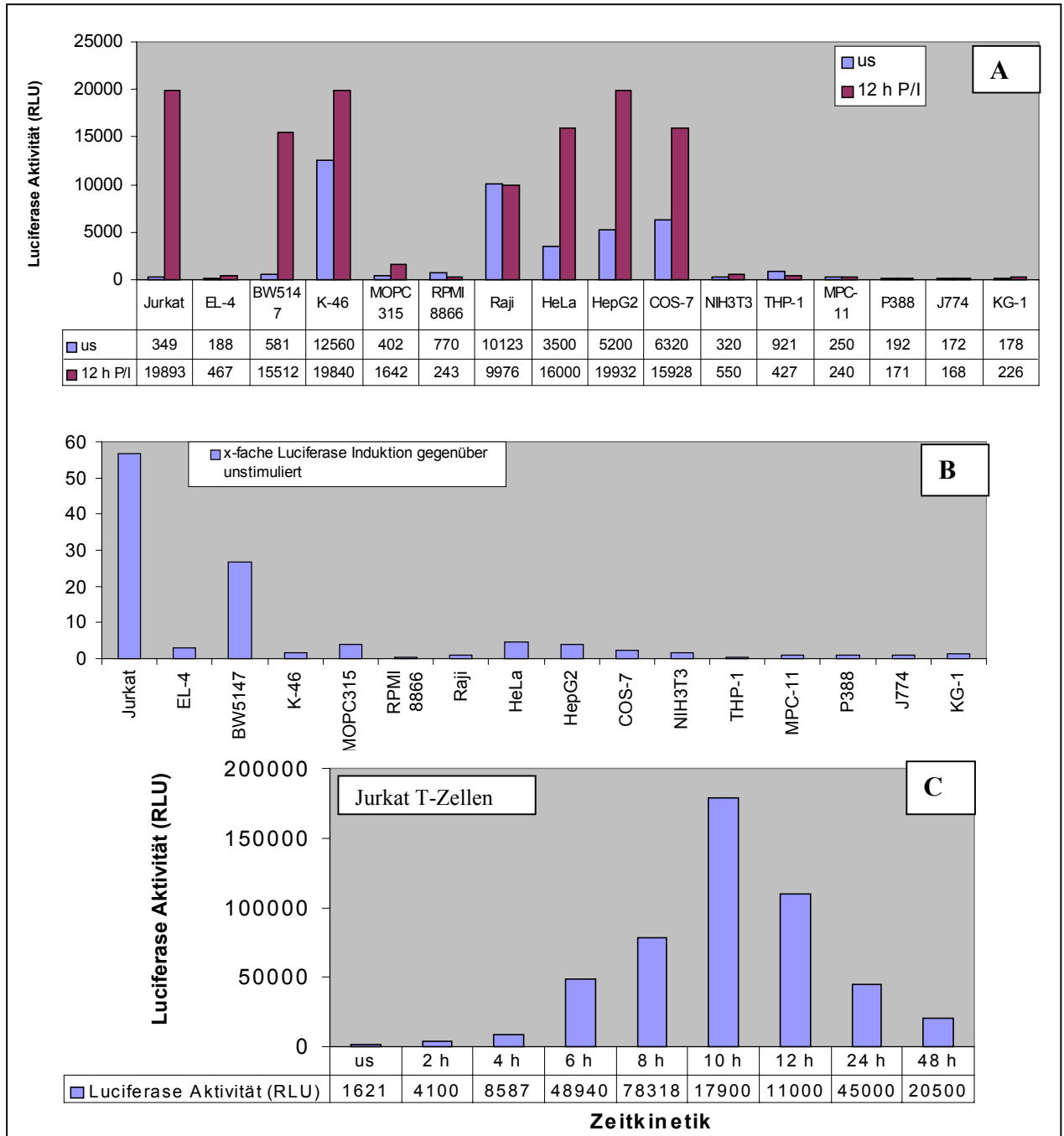
### 3.1.5 Funktionelle Analyse der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität in verschiedenen Zelllinien

Zur Charakterisierung und funktionellen Untersuchung des IFN- $\gamma$  Reportergenkonstrukts (pXP IFN- $\gamma$  Luc.) wurden DEAE-Dextran transiente Transfektionen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dieses Fragment aus dem IFN- $\gamma$  Promotor hat eine Länge von 410 Basenpaare und enthält die TATA-Box sowie alle notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente, um die Genaktivierung zu induzieren.

Die in Abbildung 3.4 dargestellten Zelllinien sind in Tabelle 2.2 (siehe Seite 25) zusammengefaßt. Die Abbildung 3.4 A zeigt, daß der IFN- $\gamma$  Promotor in humanen und murinen T-Zelllinien (Jurkat T-Zellen, BW5147), in B-Zelllinien (K-46, Raji) aber auch in epithelialen (HeLa), Hepatom- (HepG2) und Fibroblasten-Zelllinien (COS-7) aktiv ist. In einigen murinen B-Zelllinien (MOPC315, RPMI8866) und in der Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 konnte keine Luciferase-Aktivität gemessen werden. Weiterhin konnte in den untersuchten Makrophagen-Zelllinien (THP-1, MPC-11, P388, KG-1, J774) keine Reportergenaktivität nachgewiesen werden.

Wenn man jedoch in Abbildung 3.4 B die x-fache Induktion der in 3.4 A gemessenen Luciferase-Werte gegenüber dem unstimulierten Ansatz betrachtet, wird ersichtlich, daß eine signifikante Induktion der Promotoraktivität nur in der humanen T-Zelllinie Jurkat und in der murinen T-Zelllinie BW5147 erfolgt. Für weitere Studien, vor allem aber wegen ihrer induzierbaren IFN- $\gamma$  Promotoraktivität und der Vergleichbarkeit zu primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, wurde in weiteren Experimenten vor allem die Jurkat T-Zelllinie verwendet.

In Abbildung 3.3 C ist die Zeitkinetik der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in transienten Reportergenstudien von Jurkat T-Zellen dargestellt. Nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin für 10 Stunden ist die maximale Aktivierung des Promotors erreicht, die im weiteren Verlauf der Zeitkinetik abnimmt. In weiterführenden Experimenten wurde diese Stimulationsdauer gewählt, um eine maximale Luciferase-Aktivität in T-Zellen zu induzieren.



**Abbildung 3.4** DEAE-Dextran transiente Transfektionen des pXP IFN- $\gamma$  Luciferase-Reportergenkonstrukts in verschiedene Zelllinien.

**A+B** 5  $\mu$ g pXP-IFN- $\gamma$  Reportergenkonstrukt und 2  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor wurden in  $5 \times 10^6$  Zellen mit DEAE-Dextran transient transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen für weitere 12 h mit 50 ng/ml PMA + 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (P/I) stimuliert. Die Zellysate wurden mit Luciferin-Substratpuffer im Luminometer gemessen. Der Meßwert wurde mit der  $\beta$ -Gal Kontrolle und mit dem Proteingehalt normalisiert. Das Ergebnis zeigt repräsentative Meßwerte aus mehreren durchgeführten Experimenten. In A ist auf der y-Achse die absolute Luciferase-Aktivität (RLU) dargestellt, während in B die x-fache Induktion gegenüber dem jeweiligen unstimulierten Ansatz dargestellt ist.

**C** 10  $\mu$ g pXP IFN- $\gamma$  Luciferase-Konstrukt (+ 4  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor) wurden in  $2 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen transfiziert und nach 14 h wurden die Zellen für die angegebene Zeitdauer mit PMA/I stimuliert. Danach wurden die Zellysate im Luminometer gemessen und mit dem Kontrollvektor sowie dem Proteingehalt normalisiert. Auf der y-Achse ist die gemessene Luciferase-Aktivität dargestellt.

## 3.2 Identifizierung eines AP-1 Aktivatorelements im IFN- $\gamma$ Promotor

Um die transkriptionelle Aktivität des IFN- $\gamma$  Promotors in primären CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen und der humanen T-Zelllinie Jurkat zu untersuchen, wurden sowohl *in vivo*-Footprinting Experimente als auch *in vitro* Gelshift-Studien und funktionelle Reporterassays durchgeführt. Diese Techniken ermöglichten die Identifizierung und Charakterisierung eines AP-1 Aktivatorelements, das mit seiner *cis*-regulatorischen Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor interagiert. Die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an die DNA führte zur Erhöhung der Transkriptionsaktivität und wurde somit als essentielles Enhancerelement des IFN- $\gamma$  Promotors in T-Zellen charakterisiert.

### 3.2.1 *In vivo*-Footprinting Daten demonstrieren die PMA/PHA induzierte Besetzung einer neuen Bindungsseite in Jurkat T-Zellen und primären CD45RO<sup>+</sup> und CD45 RA<sup>+</sup> T-Lymphocyten

Zur Lokalisierung möglicher DNA/Protein Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor wurden zunächst *in vivo*-Footprinting Experimente durchgeführt. Die Voraussetzung für die Durchführung der Footprinting Experimente war eine vollständige Aktivierung aller Zellen im Versuchsansatz, denn nur partiell protektierte oder partiell hyperreaktive Regionen waren nach der LM-PCR (*ligation-mediated PCR*) und elektrophoretischer Auftrennung kaum identifizierbar.

Um das Bandenmuster der LM-PCR Amplifikationsprodukte der genomischen Sequenzierung des IFN- $\gamma$  Promotors zuordnen zu können, wurden 410 Basenpaare des Promotors in den pCRII Vektor kloniert und mit einem genspezifischen Primer, der auch für die LM-PCR verwendet wurde, sequenziert. Dieser Sequenzierungsansatz wurde neben den LM-PCR Proben auf dem Sequenzierungsgel aufgetragen.

#### 3.2.1.1 *In vivo*-Footprinting des IFN- $\gamma$ Promotors in Jurkat T-Zellen

In den bereits dargestellten Voruntersuchungen erwiesen sich insbesondere die Jurkat T-Zellen als geeignet, um molekulare Vorgänge am IFN- $\gamma$  Promotor *in vivo* zu untersuchen. Diese T-Zelllinie produzierte konstitutiv kein IFN- $\gamma$ , zeigte jedoch nach Stimulation mit PMA/PHA eine hohe induzierbare IFN- $\gamma$  Produktion.

In Abbildung 3.4 A ist das *in vivo*-Footprinting Ergebnis aus der IFN- $\gamma$  Promotorregion -282 bp bis -143 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartseite gezeigt. Dazu wurde die DMS-methylierte DNA aus stimulierten und unstimulierten Jurkat T-Zellen isoliert, mit





### 3.2.2 AP-1 bindet an die neu identifizierte Seite C im IFN- $\gamma$ Promotor

Das *in vivo* protektierte Areal des C-Motivs enthält die Sequenz 5`-TGTCTCCA-3`, die ein Rest der palindromischen TRE (*TPA responsive element*) Sequenz (5`-TGAG/CTCA-3`) darstellt. Dieses TRE DNA-Bindemotiv ist charakteristisch für Mitglieder der AP-1 (*activator protein 1*) Familie. Die AP-1 Familie beinhaltet Fos-Transkriptionsfaktoren (c-Fos, Fos-B, Fra-1, FRA-2), die Homo- und Heterodimere bilden können, und Jun-Faktoren (cJun, JunB, JunD), die Heterodimere mit Fos-Proteinen bilden können. Dabei gehören alle AP-1 Mitglieder zur Leucin-Zipper-Familie und sind beispielsweise bei der durch Phorbol ester induzierten Aktivierung und Proliferation von T-Lymphocyten beteiligt.

In weiterführenden Experimenten wurde die Möglichkeit erwogen, daß der nucleäre Faktor C (NF-C), der an die C-Seite im IFN- $\gamma$  Promotor bindet, ein AP-1 Protein darstellt. In Gelshiftassays wurde die Induzierbarkeit und Repression dieses Elements in primären T-Zellen und Jurkat T-Zellen analysiert und das DNA-bindende Protein als c-Fos und c-Jun Heterodimer identifiziert.

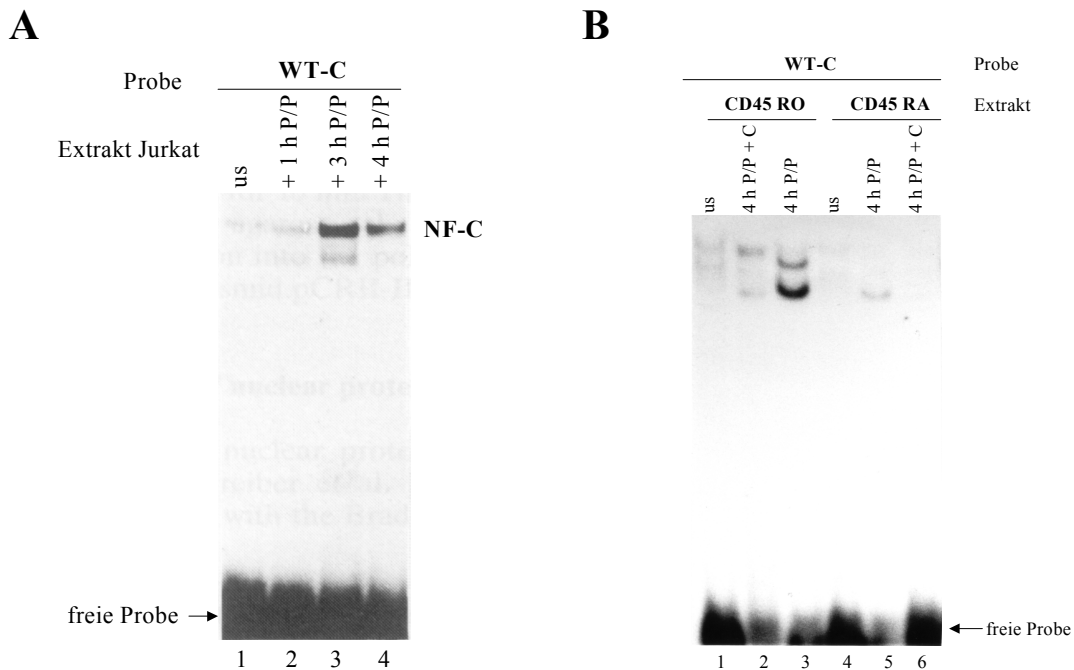
#### 3.2.2.1 Induktion eines spezifischen, Corticosteroid-sensitiven Protein/DNA Komplexes an der C-Seite des IFN- $\gamma$ Promotors in PMA/PHA stimulierten Jurkat T-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen

In Gelshiftassays wurde die Expressionsstärke und Induzierbarkeit des nucleären Faktors C (NF-C) in primären T-Zell-Populationen und Jurkat T-Zellen analysiert. Die Abbildung 3.5 A zeigt, daß der NF-C Komplex in Jurkat T-Zellen bereits 1 Stunde nach Stimulation mit PMA/PHA induziert wurde und nach circa 3 Stunden die maximale Expressionsstärke erreichte. Dabei demonstrierten die primären CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen, nach der Behandlung mit PMA/PHA für 4 Stunden, eine höhere NF-C DNA-Bindungsaktivität als naive CD45RA T-Zellen (Abbildung 3.5 B). Die gleichzeitige Behandlung der CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen mit dem immunsuppressiven Corticosteroid Solu-decortin H, bewirkte eine drastische Reduktion der NF-C Expressionsstärke. Damit wurde ein molekulares Ziel für die Aktion von Corticosteroiden identifiziert.

Um die funktionelle Relevanz von Corticosteroiden zu ermitteln, wurden transiente Reporteranalysen durchgeführt. Die Abbildung 3.6 zeigt, daß die PMA/PHA induzierte IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung, sowohl in CD45RO<sup>+</sup> als auch in CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen, durch das Corticosteroid Dexamethason inhibiert wurde.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Gelshift Experimente, daß an der neu identifizierten Seite C im IFN- $\gamma$  Promotor *in vitro* ein nucleärer Faktor bindet (NF-C),

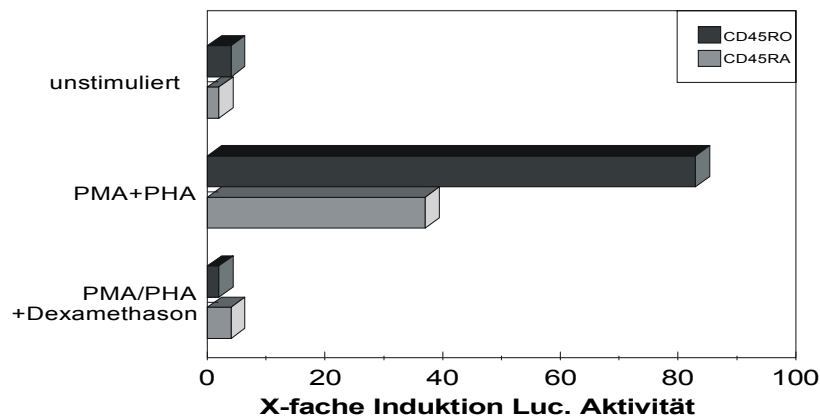
dessen Expression bereits 1 Stunde nach Stimulation der Zellen mit PMA/PHA induziert wird, und dessen DNA-Bindungsaktivität durch Applikation von immunsuppressiven Corticosteroiden drastisch herunterreguliert wird.



**Abbildung 3.5** Induzierbarkeit des NF-C Komplexes in Jurkat T-Zellen und primären T-Zellen durch PMA /PHA und Repression durch Corticosteroide.

**A** 10 µg nucleäre Extrakte von unstimulierten (Spur 1) und mit 50 ng/ml PMA + 50 µg/ml PHA für 1 h, 3 h und 4 h stimulierten Jurkat T-Zellen (Spur 2-4) wurden mit dem  $^{32}$ P-markiertem Wildtyp C-Oligonucleotid inkubiert und auf 4%igen PAGE Gelen aufgetrennt.

**B** CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden wie angegeben stimuliert und die daraus gewonnenen nucleären Extrakte mit dem radioaktiv markiertem Oligonucleotid WT-C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf 4%igen PAGE-Gelen.



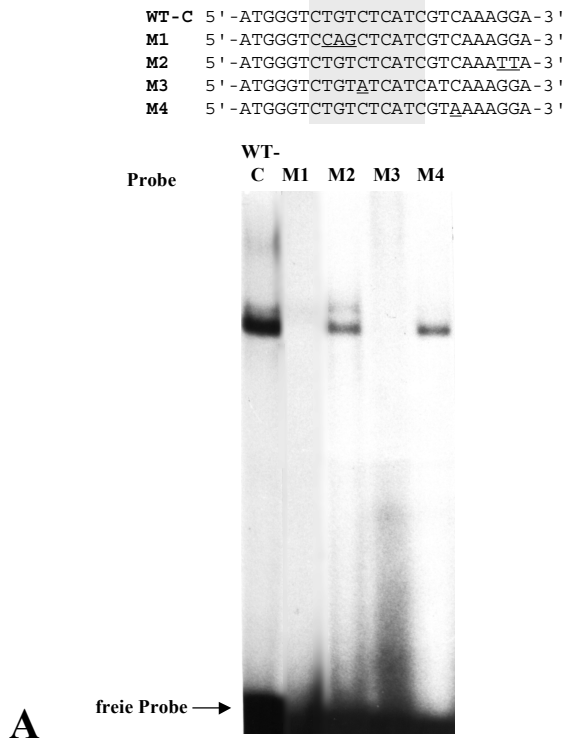
**Abbildung 3.6** Dexamethason inhibiert IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in primären T-Zellen.

5 µg pXP-IFN- $\gamma$  Vektor wurden zusammen mit 2 µg  $\beta$ Gal Kontrollvektor in  $5 \times 10^6$  CD45RO<sup>+</sup> bzw. CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen transient transfiziert und für 10 h mit PMA, PHA und Dexamethason (5 µM) stimuliert. Die Luciferase-Aktivität in den Zellysaten wurde im Luminometer bestimmt und mit dem  $\beta$ -Gal Kontrollvektor normalisiert. Ein repräsentatives Experiment von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten ist gezeigt Die Luciferase-Aktivität ist als x-fache Induktion gegenüber dem promotorlosen pXP Vektor angegeben.

### 3.2.2.2 Seiten-gerichtete Mutagenese und Supershift Experimente demonstrieren AP-1 Bindung an die C-Seite des IFN- $\gamma$ Promotors

Wie schon bereits am Anfang des Abschnitts 3.2.2 beschrieben, enthält das C-Motiv ein TRE ähnliches Motiv, das charakteristisch ist für das DNA-Bindemotiv von AP-1 Transkriptionsfaktoren. Um zu analysieren, ob es sich beim NF-C Komplex um AP-1 handelt, wurden zahlreiche Gelshiftexperimente durchgeführt. Wie in Abbildung 3.7 A gezeigt, führten die Mutationen M1 und M3 innerhalb der Sequenz (5'-TGTCTCA-3') zu einer Aufhebung des NF-C Protein-DNA Komplexes. Die Spezifität des NF-C Komplexes wurde außerdem durch Comigration und Kreuzkompetition mit einer Standard AP-1 Bindungsseite demonstriert (Barbulescu et al. 1997).

In Abbildung 3.7 B ist das Ergebnis des Supershiftexperiments mit Antikörper gegen Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie gezeigt. Das Gelshiftexperiment zeigt eine Auslöschung des NF-C Protein/DNA Komplexes durch Hinzufügen des  $\alpha$ -jun Antikörpers zum Reaktionsansatz und einen im Gel retardierten Komplex nach Addition des  $\alpha$ -Fos Antikörpers. Demnach ist der  $\alpha$ -Jun Antikörper gegen die Protein/DNA Bindedomäne gerichtet, was zu einer Auslöschung des Signals führt. Als Negativkontrolle wurde ein Antikörper gegen AP-2 verwendet. Die Ergebnisse der Gelshiftexperimente zeigen eindeutig, daß der NF-C Komplex, der an die C-Seite (-196 bis -183) im IFN- $\gamma$  Promotor bindet, ein AP-1 Heterodimer ist, der in Jurkat T-Zellen aus c-Fos und c-Jun Transkriptionsfaktoren besteht.



**Abbildung 3.7** AP-1 bindet an die C-Seite im IFN- $\gamma$  Promotor.

**A** EMSA Analyse mit nucleären Extrakten aus primären PMA/PHA stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und dem <sup>32</sup>P- markierten Wildtyp-C (WT-C) Oligonucleotid sowie mutierten C-Seiten (M1, M2, M3, M4). Die mutierte Sequenz ist unterstrichen. Mutationen innerhalb des TRE-ähnlichem Motivs zeigen eine Aufhebung des Protein/DNA Komplexes.

**B** EMSA Supershift Experiment mit nucleären Proteinen (je 10  $\mu$ g) aus PMA/PHA stimulierten Jurkat T-Zellen und dem radioaktiv markierten C-Oligonucleotid in Gegenwart oder Abwesenheit der angegebenen Antikörper (je 200 ng/Ansatz, Firma Santa Cruz). Die Addition des c-Fos Antikörpers erzeugte einen Supershift von NF-C, während die Zugabe des Antikörper gegen c-Jun die NF-C Bindung aufhob.

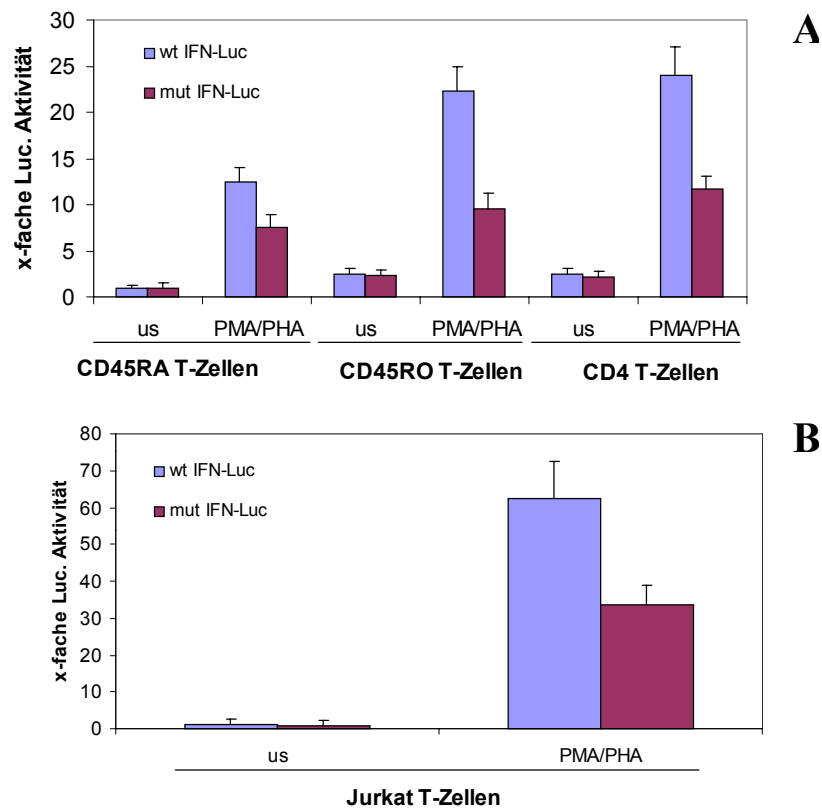
### 3.2.3 Seiten-gerichtete Mutagenese der AP-1 Bindesequenz reprimiert signifikant die IFN- $\gamma$ Reporter-genaktivität in CD45RA<sup>+</sup>, CD45 RO<sup>+</sup> T-Zellen und Jurkat T-Zellen

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion des Transkriptionsfaktors AP-1 mit seiner Zielsequenz (-196 bis -183) im IFN- $\gamma$  Promotor zu analysieren, wurden 410 Basenpaare des Wildtyp IFN- $\gamma$  Promotors oberhalb des Luciferase-Gens in den pGL2 Vektor kloniert (wtIFN-Luc). Desweiteren wurde ein ähnliches Reporter-genkonstrukt hergestellt, das jedoch eine veränderte C-Sequenz aufweist (mutIFN-Luc). Dieses Plasmid enthält die M1 Mutation im TRE-ähnlichem Motiv der C-Seite. Bereits in Abbildung 3.7 A wurde gezeigt, daß die M1 Mutation im C-Motiv des IFN- $\gamma$  Promotors die AP-1 Bindung aufhebt.

Die Abbildungen 3.8 A und B zeigen, daß die Mutation der C-Seite in unstimulierten primären T-Zellen und Jurkat T-Zellen, in Einklang mit mangelnder AP-1 Aktivität in unstimulierten Nuclei (siehe Gelshiftassays Abbildung 3.6), zu keiner signifikanten Veränderung der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität führte. Weiterhin demonstriert die Abbildung

3.8 A, daß in PMA/PHA stimulierten CD45RA T-Zellen, bei Verwendung des mutierten Konstrukts (mutIFN-Luc), eine etwa 35%ige Reduktion der Reporterogenaktivität im Vergleich zum Wildtypkonstrukt stattfand. Die Transfektion dieser Konstrukte in CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen hingegen, zeigten eine deutlichere Repression der PMA/PHA induzierten IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung von bis zu circa 60%. In Abbildung 3.8 B sind die Ergebnisse der transienten Transfektion beider Reportergenkonstrukte wtIFN-Luc und mutIFN-Luc in Jurkat T-Zellen dargestellt. Die Mutation des AP-1 Bindemotivs führte hier zu einer 50%igen Verringerung der Reporterogenaktivität.

Die dargestellten Ergebnisse veranschaulichen, daß die DNA-Bindung von AP-1 kritisch ist für die induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in primären humanen T-Helferzellen und der T-Zelllinie Jurkat. Damit wurde die regulatorische Aktivatorfunktion des AP-1 Transkriptionsfaktors auf die induzierbare IFN- $\gamma$  Promotorfunktion in T-Zellen demonstriert.



**Abbildung 3.8** Funktionelle Relevanz der AP-1 Bindungsseite (-196 bp bis -183 bp) im IFN- $\gamma$  Promotor.

**A** 35  $\mu$ g wtIFN-Luc (pGL2-Vektor mit 410 bp des IFN- $\gamma$  Promotors) bzw. mutIFN-Luc (pGL2-Vektor mit 410 bp IFN- $\gamma$  Promotor und M1 Mutation innerhalb der C-Seite, siehe auch Abbildung 3.7 A, Seite 85) wurden zusammen mit 10  $\mu$ g  $\beta$ -Gal SV40 Kontrollvektor (Clontech) in  $2 \times 10^7$  CD45RO<sup>+</sup> bzw. CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit PMA/PHA stimuliert und die Zellysate im Luminometer ausgewertet. Die Luciferase-Aktivität wurde mit der  $\beta$ -Gal Aktivität normalisiert. Die Meßergebnisse und die Standardabweichung wurden aus 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Daten sind als x-fache Luciferase-Aktivität gegenüber dem promotorlosen Referenzvektor pGL2 dargestellt.

**B**  $2 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen wurden genauso wie in A für primäre T-Zellen dargestellt, transient transfiziert. Die Auswertung erfolgte genauso wie in A schon beschrieben.

### **3.3 IL-12 und IL-18 regulieren unterschiedlich die IFN- $\gamma$ Promotoraktivität in CD4<sup>+</sup> T-Zellen via AP-1 und STAT-4**

IL-12 induziert die Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen und NK-Zellen, nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor. IL-12 bewirkt die spezifische Aktivierung von STAT-3 und STAT-4 Transkriptionsfaktoren (*Signal transducer and activator of transcription*), die nach Phosphorylierung in den Nucleus translozieren und an ihre Zielsequenzen in den Promotoren bestimmter Gene binden (Jacobson et al. 1995). IL-18, das auch als IGIF bekannt ist (*IFN- $\gamma$  inducing factor*), wird von Makrophagen bzw. Monocyten produziert und induziert die IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen, die Cytotoxizität von natürlichen Killerzellen und die T-Zell-Proliferation (Okamura et al. 1995).

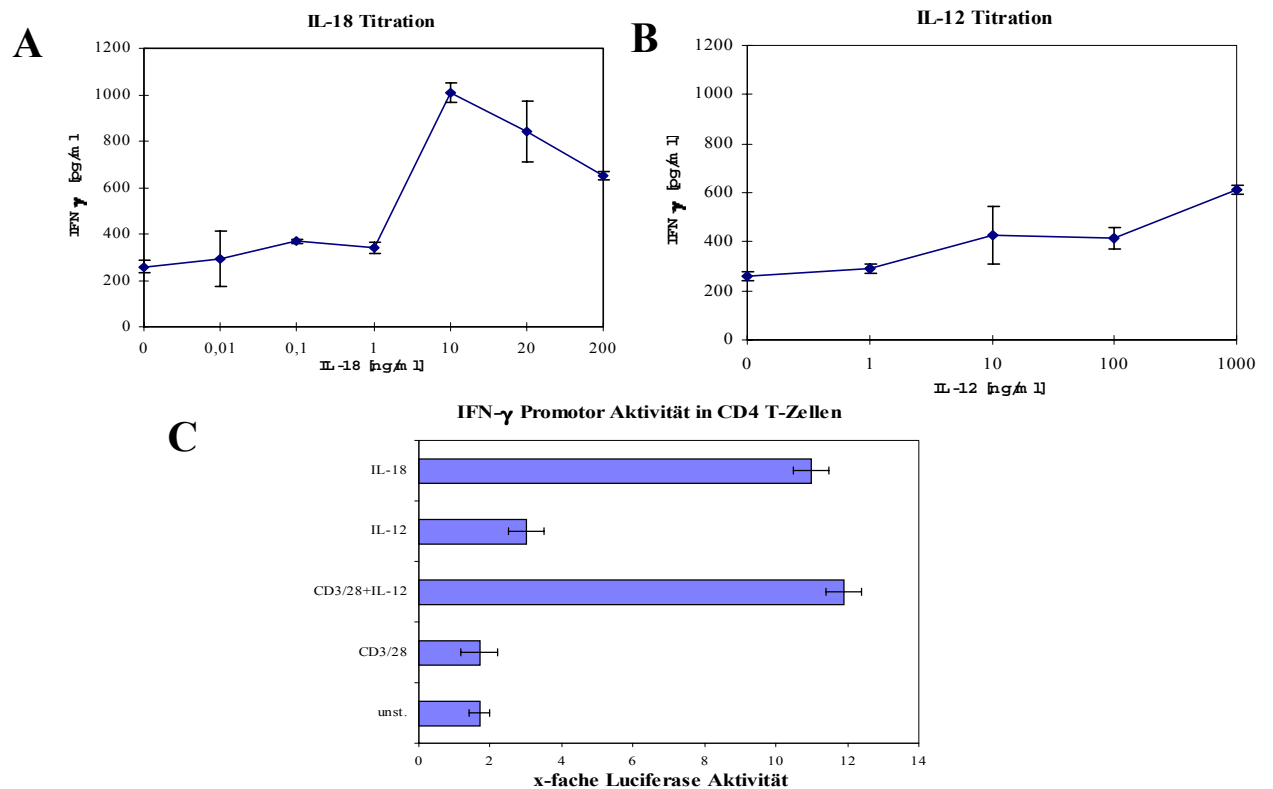
In dieser Studie wurden die molekularen Mechanismen untersucht, durch welche die Cytokine IL-12 und IL-18 die transkriptionelle Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren. Die Ergebnisse zeigten, daß IL-18 ein direkter Aktivator der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität via AP-1 ist. IL-12 hingegen übt seine aktivierende Funktion erst in Gegenwart von costimulatorischen Signalen aus, die durch Addition von  $\alpha$ CD3/CD28 Antikörper bereitgestellt wurden. Die ermittelten Ergebnisse demonstrieren, daß der IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 vermittelte Signaltransduktionsweg zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT-4 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt, die folglich an ihre Zielsequenzen im IFN- $\gamma$  Promotor binden und somit das Gen aktivieren.

#### **3.3.1 IL-18 aber nicht IL-12 induziert direkt eine hohe IFN- $\gamma$ Promotoraktivität und eine hohe IFN- $\gamma$ Proteinproduktion in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß IL-18 (IGIF) signifikant die IFN- $\gamma$  Synthese in humanen peripheren Blutlymphocyten induziert (Ushio et al. 1996). IL-12 hingegen begünstigt die T<sub>H</sub>1 Differenzierung, die einhergeht mit einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Trinchieri et al. 1995).

Um die Wirkungen beider Cytokine auf die IFN- $\gamma$  Expression in humanen CD4<sup>+</sup> T Zellen zu untersuchen, wurden zunächst ELISA-Experimente mit Überständen von IL-12 und IL-18 stimulierten CD4<sup>+</sup> T Zellen durchgeführt. Die Abbildung 3.9 A zeigt, daß rekombinantes IL-18 die IFN- $\gamma$  Proteinproduktion von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert. Die maximale IFN- $\gamma$  Proteinmenge wurde mit einer Konzentration von 10 ng/ml IL-18 erreicht. Im Gegensatz dazu wurde die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Behandlung mit IL-12 nicht signifikant erhöht (Abbildung 3.9 B).

Um den molekularen Mechanismus der differentiellen Regulation von IFN- $\gamma$  durch IL-12 und IL-18 in humanen T-Lymphocyten zu detektieren, wurde ein Reporter-genkonstrukt hergestellt, das 410 bp des Wildtyp IFN- $\gamma$  Promotors (Position -403 bis +7) oberhalb des Luciferase-Gens enthält. Mittels transienter Transfektionen wurde mit diesem pXP-IFN- $\gamma$  Konstrukt die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Die Abbildung 3.9 C zeigt, daß in diesem experimentellen System IL-18 alleine ein starker Aktivator der Promotoraktivität war, während IL-12 erst nach Coapplikation von löslichen Antikörper gegen CD3 und CD28 zu einer signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität führte. Um die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung zu analysieren, wurde eine suboptimale Stimulation der T-Zellen mit löslichen  $\alpha$ CD3/CD28 Antikörper verwendet. Die Stimulation mit den an Zellkulturplatten gebundenen, kreuzvernetzten  $\alpha$ CD3/28 Antikörpern induzierte die IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in diesen Experimenten und war daher nicht geeignet, um die IL-12 Funktion in Reporter-genassays zu analysieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.9** IL-18 aber nicht IL-12 induziert direkt eine hohe IFN- $\gamma$  Promotoraktivität und eine hohe IFN- $\gamma$  Proteinproduktion in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

**A** Humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz/ml) wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen IL-18 stimuliert und die IFN- $\gamma$  Proteinmenge im Zellkulturüberstand mit ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 3 Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

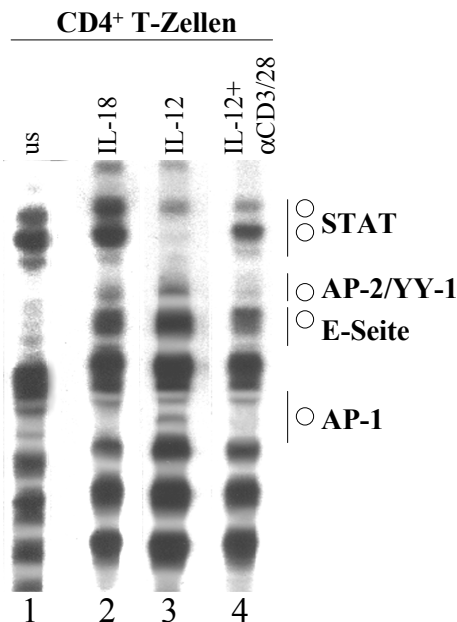
**B** CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz/ml) wurden mit 1 bis 1000 ng/ml IL-12 p70 stimuliert. Der Zellkulturüberstand wurde nach 48 h abgenommen und im ELISA analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von 3 durchgeführten Experimenten  $\pm$  Standardabweichung ist gezeigt.

**C** 25  $\mu$ g pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Reporter-genkonstrukt wurden mit 10  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor in  $1 \times 10^8$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen gesplittet und mit 10 ng/ml IL-18, 10 ng/ml IL-12 und 1  $\mu$ g/ml löslichen  $\alpha$ CD3/28 Ak für weitere 10 h stimuliert. Die Ergebnisse sind als x-fache Induktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum promotorlosen pXP1 Kontrollvektor angegeben.

### 3.3.2 *In vivo*-Footprinting Experimente demonstrieren für IL-12 und IL-18 unterschiedliche molekulare Zielelemente innerhalb des IFN- $\gamma$ Promotors

In weiterführenden Experimenten wurden die potentiellen molekularen Zielsequenzen für die Aktion der Cytokine IL-12 und IL-18 am IFN- $\gamma$  Promotor, mit Hilfe von *in vivo*-Footprinting Experimenten, ermittelt (Abbildung 3.10).

Dazu wurde methylierte DNA aus stimulierten und unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert, mit Piperidin verdaut und dann in die LM-PCR Reaktion eingesetzt. Eine veränderte DMS-Reaktivität in IL-18 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde an dem AP-1 Bindemotiv (-196 bis -183) beobachtet, das bereits in Abschnitt 3.2 als kritisches Element der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in Jurkat T-Zellen und primären CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen charakterisiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit IL-12 keine veränderte DMS-Reaktivität im Bereich dieses AP-1 Motivs sondern in der Region einer bereits publizierten STAT Bindestelle aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (Hoey et al. 1997). Der IL-12 induzierte footprint an der STAT Bindungsseite weist auf *in vivo* Protein/DNA Interaktionen im Bereich dieser Sequenz (-230 bis -260) hin. Die gleichzeitige Aktivierung der T-Zellen mit IL-12 und mit löslichen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3/CD28 verursachten sowohl *footprints* im Bereich der AP-1 als auch der STAT Bindungsseite des IFN- $\gamma$  Promotors.



**Abbildung 3.10** *In vivo*-Footprinting des IFN- $\gamma$  Promotors von Position -170 bis -260 auf dem codierenden Strang in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Frisch isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 4 h mit 10 ng/ml IL-18 (Spur 2), 10 ng/ml IL-12 (Spur 3) und 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 + 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 + 10 ng/ml IL-12 stimuliert. Die methylierte, mit Piperidin verdaute DNA wurde dann in die LM-PCR Reaktion mit spezifischen Primer (Set A, siehe Tab. 2.16, S.60) amplifiziert. Die Lokalisierung der AP-1 und STAT-4 Bindestellen ist angezeigt. Die E-Seite ist ein E-Box Element des IFN- $\gamma$  Promotors, das mittels *in vivo*-Footprinting identifiziert wurde (siehe auch Abbildung 3.4). Die offenen Kreise kennzeichnen protektierte Guanine.

### 3.3.3 IL-18 induziert die Ausbildung eines c-Jun/AP-1 Komplexes, der an seine molekulare Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor bindet

Mit Hilfe von Gelshift Experimenten wurde die Induzierbarkeit des AP-1 Komplexes in nucleären Extrakten aus humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die mit IL-12 sowie IL-18 stimuliert wurden, analysiert.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse dieser Studien dargestellt. Als Positivkontrolle für die AP-1 Komplexbildung wurden die Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert (Abbildung 3.11 A, Spur 1). IL-12 alleine zeigte keinen Effekt auf die AP-1 Expression (Spur 4). Erst nach Costimulation mit löslichen  $\alpha$ CD3/CD28 Antikörpern wurde eine Komplexbildung erzeugt (Spur 9). Der an den IFN- $\gamma$  Promotor bindende AP-1 Komplex wurde durch IL-18 stark induziert (Spur 7 und Spur 8). Dabei reichte eine Dosis von 10 ng/ml IL-18 aus, um die maximale Expressionsstärke zu induzieren. Die höhere IL-18 Konzentration von 100 ng/ml hatte keine weitere verstärkende Aktivität. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der durch IL-18 induzierbaren IFN- $\gamma$  Proteinproduktion, die mit ELISA Experimenten quantifiziert wurde (siehe Abbildung 3.9). Die Spezifität des Komplexes wurde durch Gelretardation (Supershift) mit einem  $\alpha$ c-jun/AP-1 Antikörper (Firma Santa Cruz) nachgewiesen (Spur 9).

In Abbildung 3.11 B wurden die in A ermittelten Ergebnisse überprüft. Dabei sollte festgestellt werden, ob es sich bei dem in Abbildung 3.11 A, mit nucleären Extrakten aus unstimulierten und IL-12 stimulierten T-Zellen nur schwach detektierten Signal in Höhe der AP-1 Bande, um einen spezifischen AP-1 Komplex handelt. Zur besseren Auflösung der Protein/DNA Komplexe wurde hier ein 4%iges PAGE-Gel verwendet. Die Abbildung 3.11 B zeigt, daß nur der IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 induzierte Komplex mit dem spezifischen  $\alpha$ c-jun/AP-1 Antikörper einen Supershift ergab.

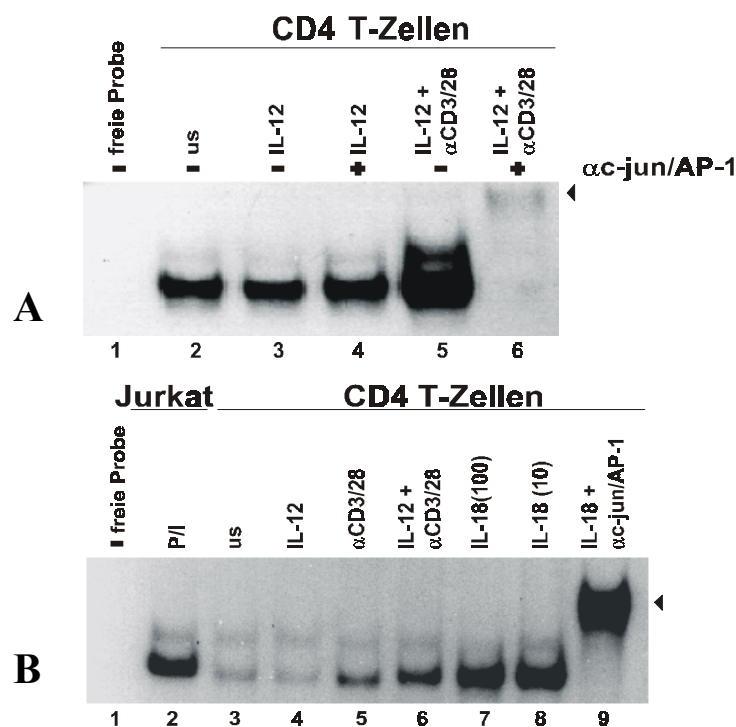
Zusammenfassend demonstrieren die Experimente die IL-18 bzw. IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 vermittelte Induzierbarkeit der AP-1 DNA-Bindungsaktivität in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.3.4 IL-12 induziert STAT-4 DNA-Bindungsaktivität

In weiterführenden EMSA-Experimenten, deren Durchführung auf den *in vivo*-Footprinting Ergebnissen basierte, wurde untersucht, ob IL-12 die Aktivierung von STAT Transkriptionsfaktoren verursacht. Mit Hilfe der LM-PCR wurde bereits in Abbildung 3.10 gezeigt, daß nach IL-12 Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen eine veränderte DMS-Reaktivität im Bereich einer STAT Bindestelle im IFN- $\gamma$  Promotor auftrat. Dieses STAT Bindemotiv (siehe auch Tab. 2.15) wurde demzufolge radioaktiv markiert und zusammen mit nucleären Extrakten von stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im EMSA Experiment untersucht.

In Abbildung 3.12 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Die Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-12 oder IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 induzierte die Bindung des STAT-4 nucleären Komplexes an das STAT Bindemotiv des IFN- $\gamma$  Promotors, während dies bei IL-18 nicht der Fall war. Die Spezifität des STAT-4 Komplexes wurde sowohl durch Supershiftexperimente mit einem spezifischen humanen  $\alpha$ STAT-4 Antikörper (Firma Santa Cruz) als auch mit Wettbewerbsversuchen mit einer STAT-4 Consensus Bindesequenz nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

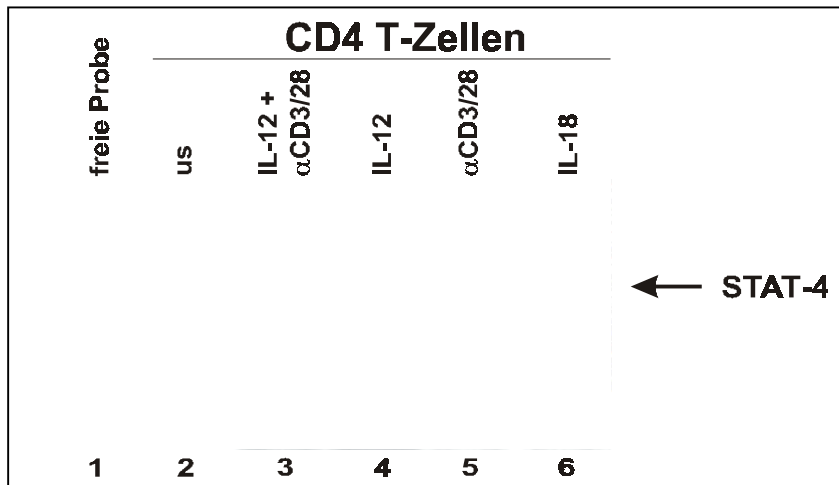
Die Daten sprechen dafür, daß IL-12 aber nicht IL-18 die STAT-4 Aktivierung in primären CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten induziert.



**Abbildung 3.11** IL-18 aber nicht IL-12 induziert die AP-1 DNA-Bindung an seine Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor.

**A** Das Gelshift-Experiment wurde mit 3  $\mu$ g nucleären Extrakten aus humanen CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten und der radioaktiv markierten AP-1 Bindungsseite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (WT-C) durchgeführt. Die Zellen wurden vor der Extraktion der Proteine für 2 h mit 10 ng/ml IL-12 (Spur 4, 6), 10 ng/ml IL-18 (Spur 8) bzw. 100 ng/ml IL-18 (Spur 7) und 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD3 + 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 (Spur 5, 6) stimuliert. Der Supershift (Spur 9) wurde mit 1  $\mu$ g  $\alpha$ c-jun/AP-1 Antikörper (Santa Cruz) durchgeführt. Der Supershift ist mit einem Dreieck markiert.

**B** 5  $\mu$ g nucleäre Extrakte aus IL-12 bzw. IL-12 +  $\alpha$ CD3/28 humanen CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten wurden mit der <sup>32</sup>P markierten AP-1 Bindesequenz aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (WT-C) inkubiert und im EMSA analysiert. In Spur 4 und Spur 6 wurden 1  $\mu$ g des  $\alpha$ c-jun AP-1 Antikörpers (Santa Cruz) hinzugefügt. Der Supershift ist mit einem schwarzen Dreieck markiert.



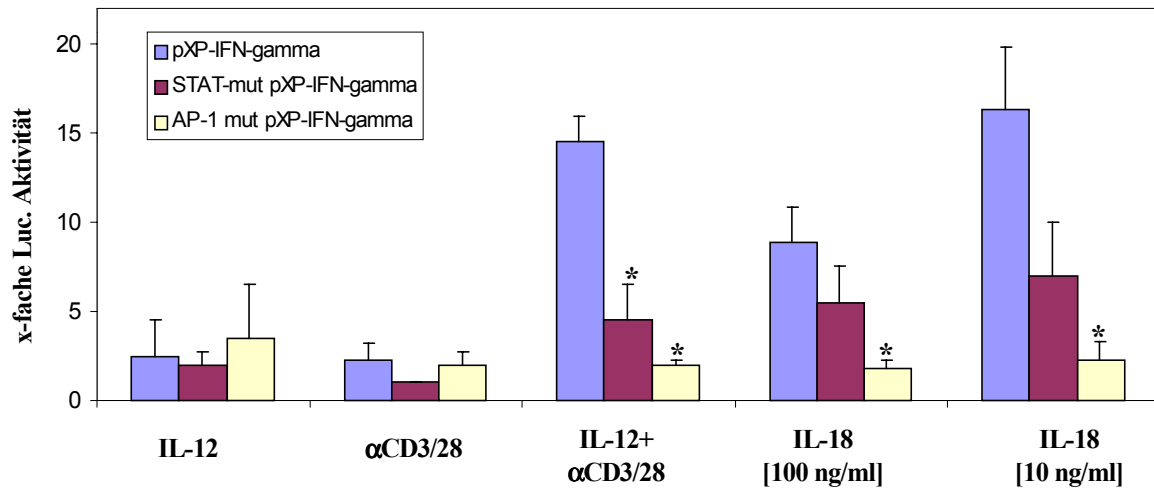
**Abbildung 3.12** IL-12 aber nicht IL-18 induziert die Bindung von STAT-4 an seine Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor.

EMSA wurde durchgeführt mit nucleären Extrakten (3  $\mu$ g/Ansatz) und dem radioaktiv markierten STAT Oligonucleotids aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (25000 cpm). Die Konzentration der verwendeten Stimulantien, die zur Aktivierung der T-Zellen verwendet wurden ist in Abbildung 3.10 angegeben. Die Zellen wurden für 0,5 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert.

### 3.3.5 Seiten-gerichtete Mutagenese demonstriert die Bedeutung der STAT-4 und AP-1 Bindemotive für die induzierbare IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung

Um die funktionelle Bedeutung der AP-1 und STAT-4 Bindesequenzen für die IL-12 und IL-18 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivität zu ermitteln, wurden transiente Transfektionen des Reportergenkonstrukts in CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dementsprechend wurden mit Hilfe Seiten-gerichteter Mutagenese Plasmide hergestellt, die Mutationen bzw. Deletionen im Bereich der AP-1 oder STAT-4 Seite des IFN- $\gamma$  Promotors enthalten, welche die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren effizient verhindern (Tabelle 2.15, Seite 57).

Die Einführung der Mutation in das AP-1 Bindemotiv bewirkte, daß keine IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung mehr durch die Cytokine IL-12 bzw. IL-18 erfolgte (siehe Abb. 3.13). Die Mutation der STAT Bindesequenz hingegen verursachte eine schwache Inhibition der IL-18 induzierten Promotoraktivität, aber eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Reduktion der IL-12 abhängigen IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung.



**Abbildung 3.13** Transiente Transfektionen der AP-1 und STAT mutierten IFN- $\gamma$  Reporter-genkonstrukte in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

5  $\mu$ g Wildtyp IFN- $\gamma$  Promotor (pXP-IFN $\gamma$ ) bzw. Promotor-mutagenisierte Luciferase-Reporter-genkonstrukte (STAT-mut pXP-IFN $\gamma$ , AP1-mut pXP-IFN $\gamma$ ) wurden mit 2  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor in  $5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels DEAE-Dextran transfiziert. 14 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 10 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert. Danach wurde die Luciferase-Aktivität der Zellsate im Luminometer ermittelt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung nach der Normalisierung der Transfektionseffizienz mit dem  $\beta$ -Gal Kontrollvektor und dem Proteingehalt. Die Luciferase Aktivität ist als x-fache Induktion gegenüber den unstimulierten transfizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen angegeben. Die Signifikanz der Reduktion der Luciferase-Aktivität bei Transfektion der mutagenisierten Konstrukte wurde mit dem Wilcoxon Test mit dem Programm Statworks für Macintosh ermittelt. Die Signifikanz ( $p < 0,01$ ) der Repression ist mit einem Kreuz markiert.

### 3.4 IL-4 reprimiert die induzierbare IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung in CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten via GATA-3

In dieser Studie wurden die molekularen Effekte des T<sub>H</sub>2 Cytokins IL-4 auf die transkriptionelle Aktivierung des humanen IFN- $\gamma$  Promotors in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht.

In Transfektionsexperimenten wurde eine signifikante Repression der IL-12 abhängigen IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch IL-4 festgestellt. Zusätzlich demonstrierten LM-PCR Experimente, daß IL-4 eine *in vivo* Protektion von 2 GATA Elementen verursacht, die -91 bis -107 Basenpaare stromaufwärts der transkriptionellen Startseite im IFN- $\gamma$  Promotor lokalisiert sind. Mit Hilfe von Supershiftexperimenten und Kompetitionsstudien konnte gezeigt werden, daß diese Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor GATA-3 darstellt. Der GATA-3 Komplex war in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden, wurde aber durch die IL-12 abhängige Promotoraktivierung herunterreguliert. IL-4 hingegen verhinderte die Reduktion der GATA-3 Proteinexpression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Funktionelle

Reporterstudien zeigten, daß die Mutation der GATA Zielsequenz sowohl die basale als auch die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung verstärkt. Damit konnte eindeutig bewiesen werden, daß GATA-3 eine Repressorfunktion innerhalb des IFN- $\gamma$  Promotors erfüllt.

### **3.4.1 IL-4 reprimiert die IFN- $\gamma$ mRNA Expression, Proteinproduktion und Promotoraktivierung in CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten**

Bereits frühere Studien demonstrierten, daß die IFN- $\gamma$  Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch T-Zell-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion, durch costimulatorische Moleküle wie CD28, Phorbol ester, Ca<sup>2+</sup>-Ionomycine sowie durch Cytokine moduliert wird. Die Cytokine führen durch Kreuzvernetzung der Cytokinrezeptoren zur Phosphorylierung der cytoplasmatischen Rezeptordomänen und zur Signalweiterleitung durch Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege. In dieser Studie wurden die Effekte verschiedener Cytokine auf die IFN- $\gamma$  Synthese analysiert.

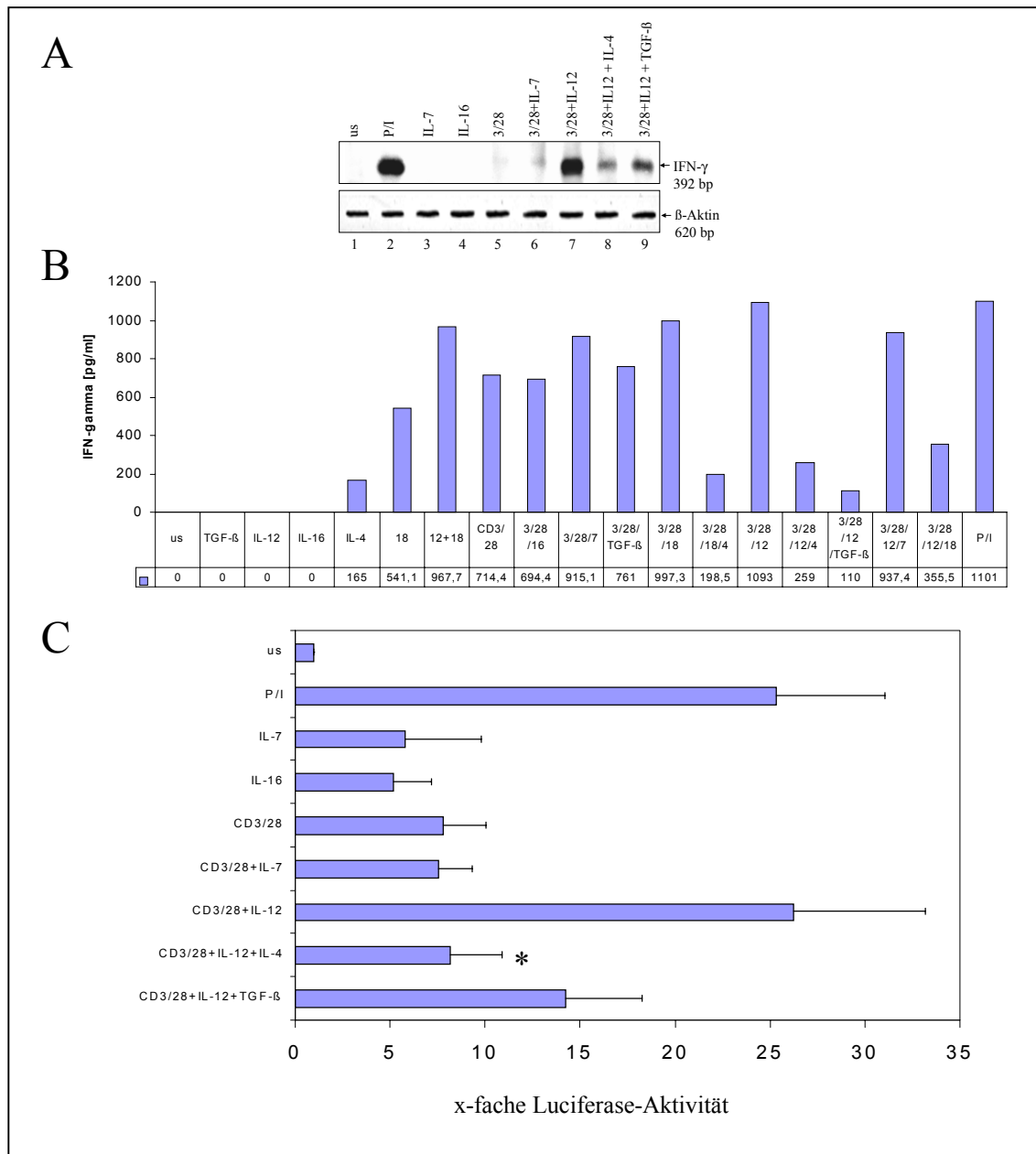
Wie in Abbildung 3.14 A gezeigt, wurden frisch isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus humanem Blut mit löslichen Stimulantien behandelt und nach 6 Stunden die IFN- $\gamma$  und  $\beta$ -Aktin mRNA durch RT-PCR analysiert.  $\beta$ -Aktin wurde als interner Standard verwendet. Die gleichbleibende Signalstärke der  $\beta$ -Aktin Kontrolle demonstrierte die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze. Die IFN- $\gamma$  mRNA wurde durch PMA/Ionomycin und durch  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert (Spur 1 und 7). Andere Cytokine wie IL-7 oder IL-16 sowie lösliche  $\alpha$ CD3/28 Antikörper hatten keinen Effekt auf die Bildung des IFN- $\gamma$  mRNA Transkripts. Die durch  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 induzierte IFN- $\gamma$  mRNA Synthese wurde signifikant durch Coapplikation von IL-4 reprimiert. Die Addition von TGF- $\beta$  zum Versuchsansatz führte auch zu einer Abschwächung der IFN- $\gamma$  mRNA Signalstärke.

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlich regulierte IFN- $\gamma$  mRNA Expression auf differentielle IFN- $\gamma$  Promotorregulation zurückzuführen ist, wurden transiente Transfektionen mit primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dabei wurde ein pXP1 IFN- $\gamma$  Promotor Luciferase-Konstrukt (wtIFN- $\gamma$  Luc, IFN- $\gamma$  Promotor Position -403 bis +7 relativ zur Transkriptionsstartseite) in primären CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch DEAE-Dextran transient transfiziert. Die Abbildung 3.14 B zeigt die Daten aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In diesem experimentellen System führte die Stimulation der T-Zellen mit IL-7 oder IL-16 zu einer schwachen IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Eine deutliche Induktion der Luciferase-Aktivität (bis zu 25 fach) gegenüber unstimuliert, wurde in den Zellysaten der mit PMA/Ionomycin und  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 behandelten Zellen gemessen. Die Ergebnisse zeigen außerdem, daß IL-4 die  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 induzierte IFN- $\gamma$  Promotor-

aktivierung signifikant reprimierte ( $p < 0,05$ ). Das Cytokin TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) hingegen, führte zu einer schwachen Repression der Promotoraktivität.

In weiteren Studien wurde analysiert, welchen Effekt die in der RT-PCR und Promotorstudien getesteten Cytokine auf die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese haben. Dazu wurden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen für 48 h mit den angegebenen Faktoren stimuliert und aus den Zellkulturüberständen die IFN- $\gamma$  Proteinproduktion bestimmt (Abbildung 3.14 C). Die alleinige Applikation der Cytokine IL-7 und IL-16 hatte keinen Effekt auf die IFN- $\gamma$  Proteinexpression. Außerdem zeigten die durchgeführten Experimente, daß durch  $\alpha$ CD3/28 und PMA/Ionomycin die IFN- $\gamma$  Synthese in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert wurde. Durch Coapplikation von IL-7 und IL-12 zu  $\alpha$ CD3/28 wurde eine Steigerung der IFN- $\gamma$  Proteinmenge bewirkt. Weiterhin bestätigte sich in diesem experimentellen System die effiziente Repression der  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 induzierten IFN- $\gamma$  Expression durch das T<sub>H</sub>2 Cytokin IL-4 sowie durch das Cytokin TGF- $\beta$ .

Die in der Abbildung 3.14 dargestellten Ergebnisse stellen 3 verschiedene experimentelle Systeme dar. Die Abbildung 3.14 A zeigt die IFN- $\gamma$  mRNA Expression, die Abbildung 3.14 B die Promotorregulation und die Abbildung 3.14 C stellt die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese dar. Die Ergebnisse dieser verschiedenen Systeme müssen nicht miteinander korrelieren, denn die Proteinsynthese setzt die Translation der mRNA und die mRNA Transkription die Promotoraktivierung voraus. Jedoch im Falle der  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 vermittelten IFN- $\gamma$  Aktivierung sowie Repression dieser Aktivierung durch IL-4, zeigten alle 3 experimentellen Systeme die gleiche Tendenz, so daß man von einer Korrelation ausgehen kann.



**Abbildung 3.14** IL-4 reprimiert die  $\alpha$ CD3/28+IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  mRNA Expression (A), Promotoraktivierung (B) und Proteinproduktion (C) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

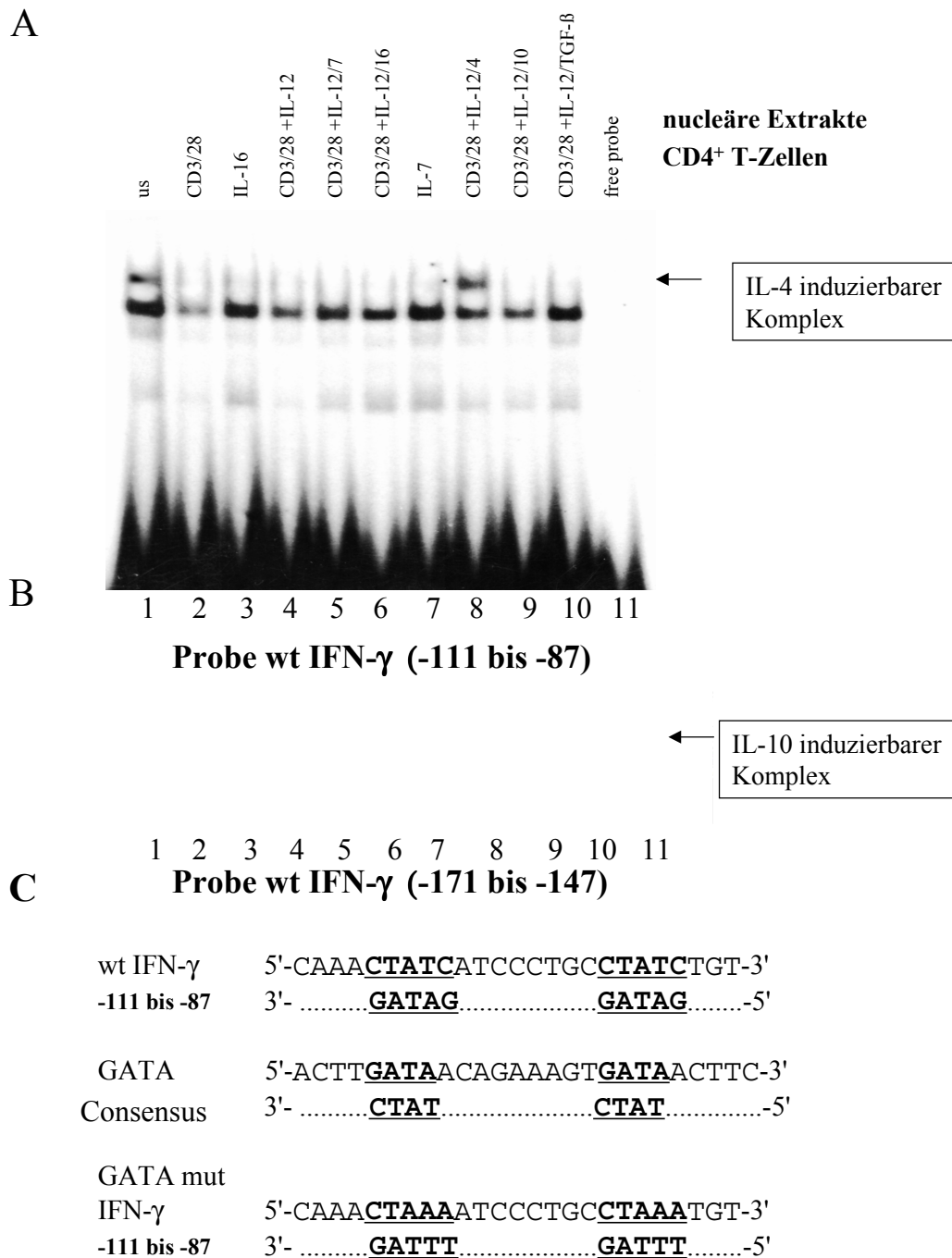
**A** Humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^7$ /Ansatz) wurden für 6 h mit 50 ng/ml PMA (P), 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (I), 1  $\mu$ g/ml lösliche  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Antikörper, 5 ng/ml rekombinantes IL-12, 10 ng/ml IL-16, 5 ng/ml IL-7, 5 ng/ml IL-4 oder 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 wie angezeigt. Die RT-PCR erfolgte mit spezifischen IFN- $\gamma$  und  $\beta$ -Aktin Primer. Der Southern Blot wurde mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten IFN- $\gamma$  Sonde markiert und mit einem anti-DIG-Peroxidase Ak detektiert.

**B** 45  $\mu$ g pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Reportergenkonstrukt wurden mit 18  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor in  $1,8 \times 10^8$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels DEAE-Dextran transient transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen für weitere 10 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert. Die Ergebnisse sind als x-fache Induktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum unstimulierten Ansatz (=1) angegeben. Die Transfektionseffizienz wurde hierbei mit dem  $\beta$ -Gal Kontrollvektor und dem Proteingehalt normalisiert. Die Signifikanz der Repression ist mit einem Kreuz markiert.

**C** Humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz/ml) wurden für 48 h mit den angegebenen Stimulantien behandelt und die IFN- $\gamma$  Proteinmenge im Zellkulturüberstand mit ELISA gemessen.

### 3.4.2 Gelshiftassays zeigen einen IL-4 induzierbaren Komplex an einer spezifischen Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor

Um potentielle molekulare Zielsequenzen für den Effekt von IL-4 auf den IFN- $\gamma$  Promotor zu untersuchen, wurde der Promotor mit Hilfe von Gelshiftassays (EMSA) analysiert. Dabei wurden verschiedene doppelsträngige DNA-Sequenzen mit Erkennungsmotiven für Transkriptionsfaktoren aus dem IFN- $\gamma$  Promotor untersucht. Während die meisten Protein/DNA Komplexe nach Behandlung mit IL-4 unverändert blieben (z.B. wt IFN- $\gamma$  -171 bis -147, siehe Abbildung 3.15 B), wurde an Position -111 bis -87 des IFN- $\gamma$  Promotors ein spezifischer, durch IL-4 induzierbarer Protein/DNA Komplex identifiziert (Abbildung 3.15 A). Der Protein/DNA Komplex trat in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf und wurde reprimiert in den Extrakten der IL-7, IL-16 oder  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 stimulierten T-Zellen. Die Behandlung mit IL-4 verhinderte die Abschwächung des Komplexes und führte stattdessen zu einer Intensivierung des Signals. Im Gegensatz dazu konnte der Protein/DNA Komplex durch TGF- $\beta$  oder IL-10 nicht induziert werden, was darauf hindeutet, daß die Wirkung dieser Cytokine über andere molekulare Zielseiten erfolgt. Diese Annahme wird durch den in Abbildung 3.15 B gezeigten Gelshift bestätigt. Die Abbildung demonstriert, daß IL-10 einen Komplex an einer anderen Bindesequenz (Position -171 bis -147) des IFN- $\gamma$  Promotors induziert. In Abbildung 3.15 C ist die molekulare Zielsequenz des IL-4 induzierten Komplexes gezeigt. Diese Sequenz (wtIFN- $\gamma$  -111 bis -87) wurde in den EMSA Analysen verwendet. Sie enthält 2 GATA Motive auf dem nicht codierenden Strang, die 8 Basenpaare voneinander entfernt sind. Außerdem ist im Vergleich dazu eine Consensus-Bindesequenz für GATA Transkriptionsfaktoren gezeigt. Diese enthält auch, allerdings auf dem codierenden Strang, zwei GATA Bindemotive, die in einem Abstand von 9 Basenpaaren auftreten. Für weiterführende Gelshiftuntersuchungen und funktionelle Reporterassays wurden Mutationen im Bereich der GATA Motive des IFN- $\gamma$  Promotors eingefügt. Die Sequenz der mutierten GATA Motive ist in Abb 3.15 C dargestellt.



**Abbildung 3.15** IL-4 induziert einen spezifischen Komplex in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

**A** EMSA wurde durchgeführt mit 3  $\mu$ g nucleären Extrakten von primären CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten und mit dem <sup>32</sup>P markierten doppelsträngigen Oligonucleotid der den Bereich -111 bis -87 des IFN- $\gamma$  Promotors umspannt (25000 cpm). Die Zellen wurden hierbei für 3 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert.

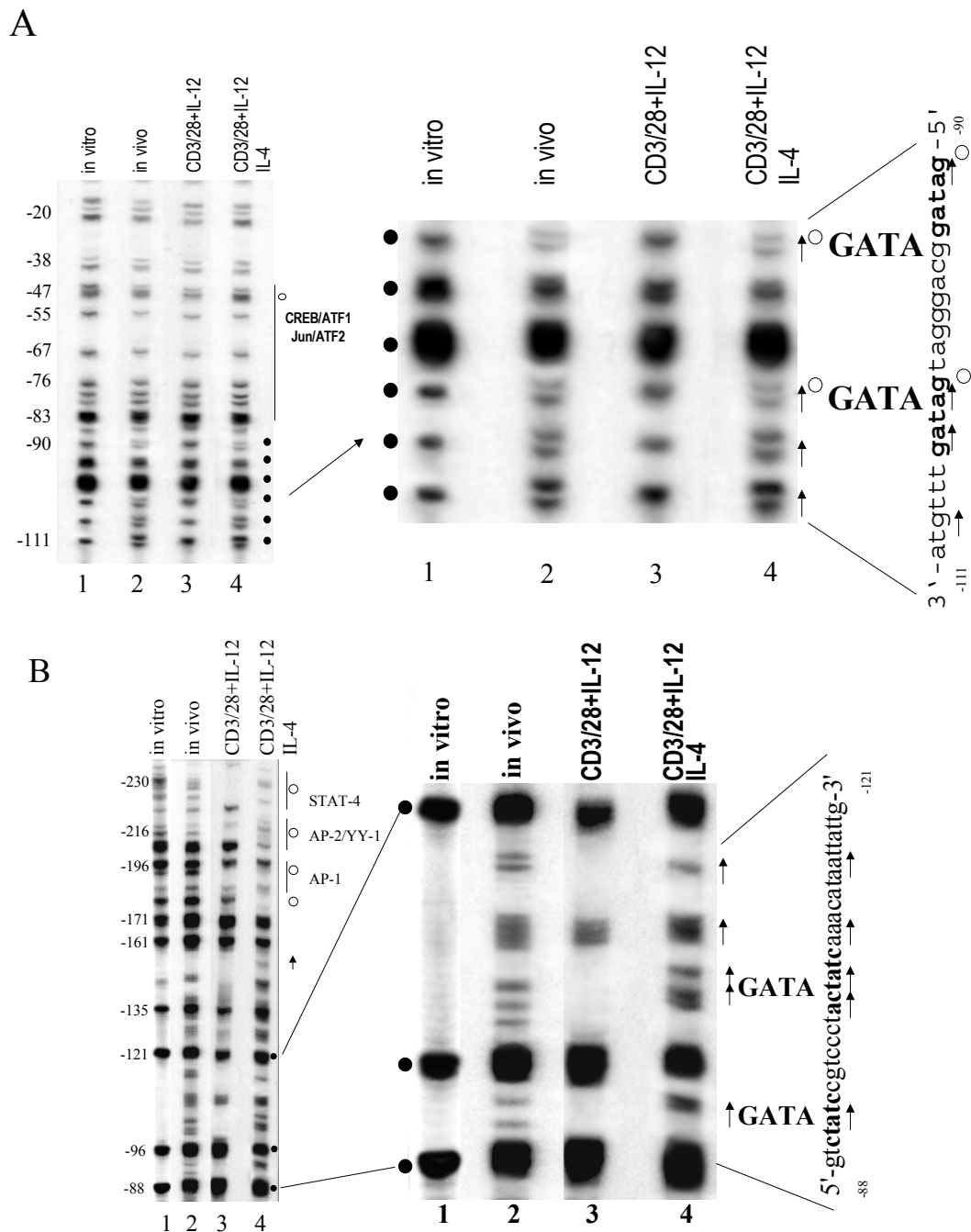
**B** EMSA mit 3  $\mu$ g nucleären Extrakten und dem <sup>32</sup>P markierten doppelsträngigen Oligonucleotid (25000 cpm) der den Bereich -171 bis -147 des IFN- $\gamma$  Promotors umspannt. Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen wurden hierbei für 3 h mit den angegebenen Reagenzien stimuliert. Die Reihenfolge der Proben ist die gleiche wie in A.

**C** Sequenz des Wildtyp IFN- $\gamma$  (-111 bis -87) Oligonucleotids und Lokalisierung der GATA Kernmotive. Spezifische Mutationen der GATA Motive sind angezeigt (GATA-mut IFN- $\gamma$ ). Weiterhin ist die Standard Erkennungssequenz für GATA Transkriptionsfaktoren abgebildet.

### 3.4.3 *In vivo*-Footprinting Daten demonstrieren IL-4 induzierbare Protein/DNA Interaktionen im Bereich der GATA-Zielsequenz im IFN- $\gamma$ Promotor

Um zu analysieren, ob die GATA Zielsequenz durch regulatorische Proteine *in vivo* besetzt ist, wurde *in vivo* genomisches Footprinting von primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels LM-PCR durchgeführt. Dazu wurde methylierte genomische DNA aus unstimulierten und stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und mit IFN- $\gamma$  spezifischen Primern (Set D und Set F, siehe Tab. 2.16, S.60) amplifiziert. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse dieser Analysen gezeigt. Die Guanosinleiter des nicht codierenden Stranges von Position -111 bis Position -90 relativ zur transkriptionellen Startseite von IFN- $\gamma$ , zeigte in unstimulierten und mit IL-4 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen Protektionen und Hyperreaktionen im Bereich beider potentiellen GATA Bindestellen (Spur 2 und 4, Abbildung 3.16 A). Die korrespondierenden Veränderungen in der Region beider GATA Motive traten auch auf dem codierenden Strang auf (Spur 2 und 4 Abbildung 3.16 B). Die Ergebnisse deuten auf eine potentielle *in vivo*-Bindung nucleärer Proteine an diese GATA Elemente in unstimulierten und mit IL-4 behandelten T-Helferzellen. Im Gegensatz dazu war die DMS Reaktivität im Bereich der GATA Elemente in den  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 stimulierten T-Zellen identisch zu der nackter DNA (Spur 1 und 3, Abb 3.16 A und B). Dieses Ergebnis weist auf eine Aufhebung der Protein/DNA Interaktionen nach Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 hin. Dennoch wurden nach der Stimulation mit IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 zahlreiche DMS-Reaktivitäten in Regionen bereits charakterisierter regulatorischer Elemente festgestellt, einschließlich AP-1, AP-2/YY-1, STAT-4 und CREB/ATF/Jun DNA-Bindestellen (Spur 3, Abbildung 3.16 A und B). Diese Protein/DNA Interaktionen wurden nach Coapplikation von IL-4 reduziert bzw. aufgehoben.

Zusammenfassend zeigen die *in vivo*-Footprinting Experimente die potentielle *in vivo* Relevanz beider GATA Motive (Position -111 bis -187 des IFN- $\gamma$  Promotors) für die IL-4 vermittelte Repression der Transaktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen.



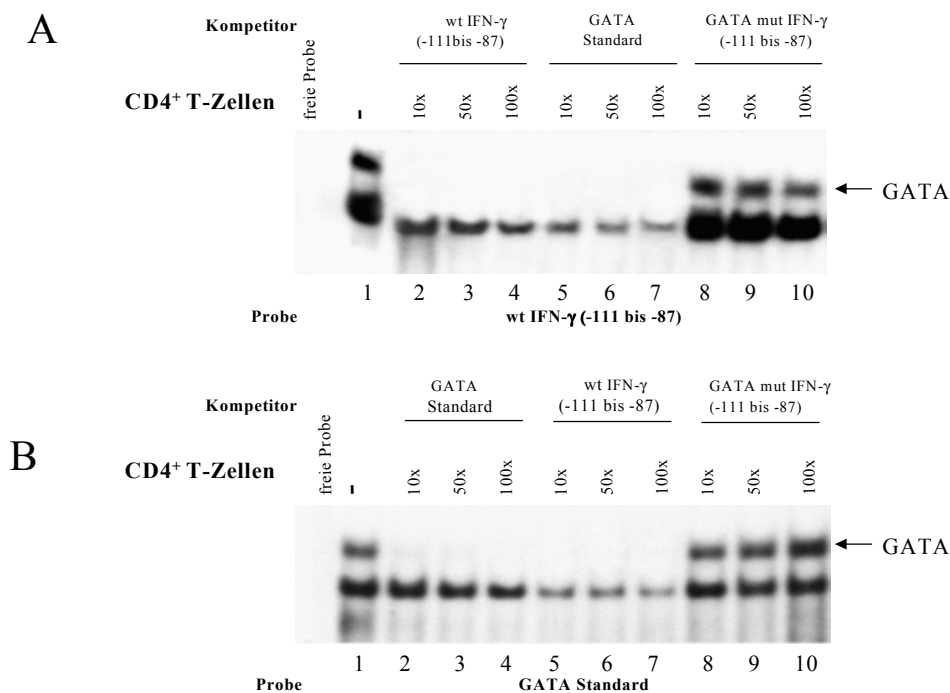
**Abbildung 3.16** LM-PCR zeigt Veränderungen der *in vivo* DMS-Reaktivität im Bereich der GATA-Motive in unstimulierten und  $\alpha$ CD3/28/IL-12 plus IL-4 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

**A** *In vivo*-Footprinting des IFN- $\gamma$  Promotors von -111 bis -20 auf dem nicht codierenden Strang in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Primer Set D, siehe Tab. 2.16, S.60). Spur 1 enthält *in vitro* DMS-methylierte DNA aus primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Spur 2-4 enthalten *in vivo* DMS-methylierte DNA von unstimulierten (Spur 1),  $\alpha$ CD3/28/IL-12 und  $\alpha$ CD3/28/IL-12 + IL-4 behandelten T-Zellen. Die Position der GATA Motive und der CREB/ATF/Jun Bindungsseiten ist angezeigt. Die schwarzen Kreise markieren die Guanosine der angezeigten Sequenz, die vertikalen Pfeile Hyperreaktivitäten und die offenen Kreise markieren DMS-protektierte Guanosine.

**B** *In vivo*-Footprinting des IFN- $\gamma$  Promotors von -230 bis -88 auf dem codierenden Strang in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Primer Set F, siehe Tab. 2.16, S.60). Die methylierte, mit Piperidin verdaute DNA, die für A verwendet wurde, wurde auch hier in die LM-PCR eingesetzt. Die Position der GATA, STAT-4, AP-1 und AP-2/YY-1 Bindungsseiten ist angezeigt. Die schwarzen Kreise markieren die Guanosine der angezeigten Sequenz, die vertikalen Pfeile Hyperreaktivitäten und die offenen Kreise markieren DMS protektierte Guanosine.

### 3.4.4 GATA-3 bildet den IL-4 induzierbaren Protein/DNA Komplex

Um die Bedeutung der GATA Motive im IFN- $\gamma$  Promotor für die Bindung des durch IL-4 induzierbaren Komplexes zu klären, wurden doppelsträngige Oligonucleotide hergestellt, die Mutationen im Bereich beider GATA Bindestellen enthalten (siehe Abbildung 3.15 C). In Gelshiftexperimenten wurde dann die Kreuzkompetition der potentiellen GATA Komplexformation durch diese mutierten Oligonucleotide getestet. Abbildung 3.17 A zeigt, daß keine Kreuzkompetition der Wildtypseite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (wtIFN- $\gamma$  -111 bis -87) mit der GATA-mutierten Bindungsseite stattfand (Spur 8-10), während sowohl die Autokompetition (Spur 2-4) als auch die Kompetition mit der GATA Standard-Bindesequenz (Spur 5-7) stattfand. Das gleiche Ergebnis ergab sich auch bei Verwendung der radioaktiv markierten GATA Standardseite (Abbildung 3.17 B). Der DNA-bindende Proteinkomplex konnte hier mit der Wildtyp IFN- $\gamma$  Sequenz (Spur 5-7), aber nicht mit der mutierten GATA DNA-Sequenz verdrängt werden (Spur 8-10).



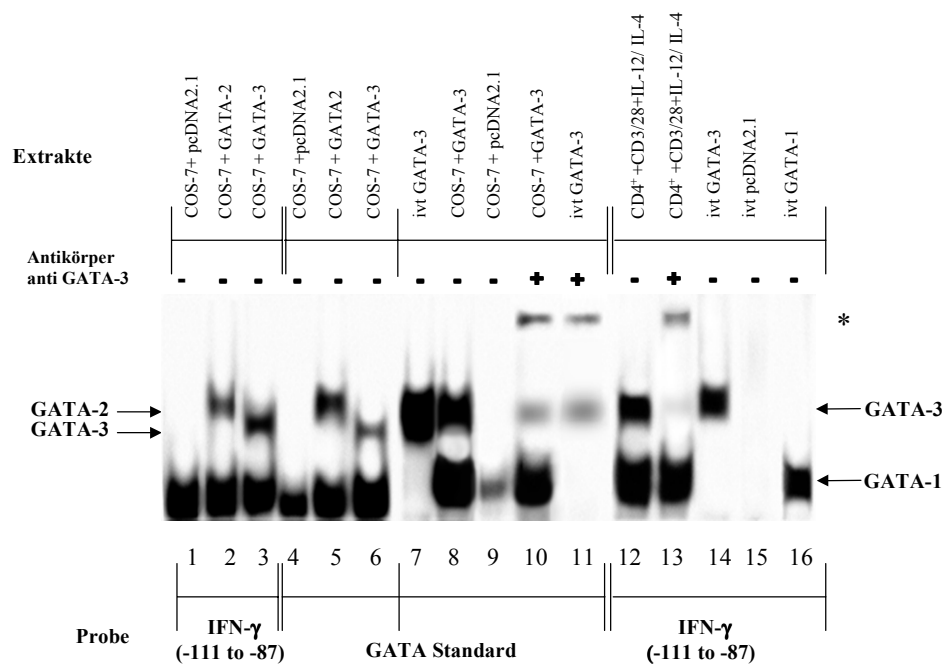
**Abbildung 3.17** Konkurrenzexperimente

**A** EMSA Analyse mit 3  $\mu$ g nucleären Proteinen von unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 25000 cpm der <sup>32</sup>P-markierten Wildtyp IFN- $\gamma$  Seite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (wt IFN- $\gamma$  -111 bis -87). Der GATA Komplex (mit Pfeil markiert) konnte spezifisch durch Autokompetition (Spur 2-4) und Kreuzkompetition mit einer GATA Standardseite (Spur 5-7) aber nicht durch Kreuzkompetition mit dem kalten GATA-mutierten Oligonucleotid (Spur 8-10) verdrängt werden.

**B** Gelshiftanalyse mit nucleären Proteinen von unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der <sup>32</sup>P markierten GATA Standardsequenz. Der GATA Komplex wurde durch Autokompetition (Spur 2-4) und Kreuzkompetition mit wt IFN- $\gamma$  (-111 bis -87) aufgehoben (Spur 5-7), aber nicht durch die Kompetition mit GATA mut IFN- $\gamma$  -111 bis -87 (Spur 8-10).

In weiteren Studien wurde analysiert, welche Mitglieder der GATA Transkriptionsfaktorfamilie an die GATA Sequenz im IFN- $\gamma$  Promotor binden. Dafür wurde ein *in vitro* Transkriptions-/Translationssystem eingesetzt. Bei dieser Reaktion wurden GATA-3 und GATA-1 Expressionsvektoren in Protein translatiert. Weiterhin wurden COS-7 Zellen mit Expressionsvektoren für GATA-2 und GATA-3 transient transfiziert und daraus Gesamtzellextrakte isoliert.

Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, comigrierten die spezifischen GATA-2 und GATA-3 gebildeten Protein/DNA Komplexen an der Wildtypseite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (Spur 2,3) mit den Komplexen an der GATA Standardseite (Spur 5,6). Als Negativkontrolle wurde die Transfektion mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA2.1 aufgetragen (Spur 1, 4). *In vitro* translatierte GATA-1 und GATA-3 Proteine zeigten spezifische Protein/DNA Interaktionen mit der Wildtypseite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (Spur 14, 16), jedoch comigrierte nur der *in vitro* translatierte GATA-3 Protein/DNA Komplex (Spur 14) mit dem durch IL-4 induzierten nucleären Komplex aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Spur 12). Die Präsenz von GATA-3 in den nucleären Extrakten IL-4 behandelter T-Zellen wurde durch Supershift mit einem  $\alpha$ GATA-3 Antikörper nachgewiesen (Spur 13).



**Abbildung 3.18** GATA-3 bildet den IL-4 spezifischen Komplex an der Wildtypseite (-111 bis -87) des IFN- $\gamma$  Promotors.

Doppelsträngige Oligonucleotide aus dem IFN- $\gamma$  Promotor Position -111 bis -87 (Spur 1-3 sowie Spur 12-16) und GATA Standardseite (Spur 4-11) wurden radioaktiv markiert und mit Gesamtzellextrakten von COS-7 Zellen (1-11) inkubiert. Zur Gewinnung der Gesamtzellextrakte wurden die COS-7 Zellen für 48 h mittels dem Transfektionsreagenz Fugene mit 2  $\mu$ g GATA-2 und GATA-3 Expressionsvektoren oder dem leeren Expressionsvektor pcDNA2.1 transient transfiziert. Weiterhin wurden beide radioaktiv markierten Bindungsseiten mit dem *in vitro* translatiertem (ivt) GATA-3 Protein inkubiert (Spur 7, 11, 14). Die Spuren 12-16 zeigen die Protein/DNA Komplexe, die mit  $\alpha$ CD3/28/IL-12 plus IL-4 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und mit ivt GATA-3 und GATA-1 Protein an der Wildtyp IFN- $\gamma$  Seite (-111 bis -87) gebildet wurden. In Spuren 10, 11 und 13 wurde 1  $\mu$ g spezifischer  $\alpha$ GATA-3 Antikörper (Fa. Santa Cruz) hinzugefügt. Der GATA-3 Supershift ist mit einem Asterisk markiert.

Der Supershift wurde auch an der GATA Standardseite mit GATA-3 transfizierten COS-Extrakten (Spur 10) und *in vitro* translatiertem GATA-3 Protein (Spur 11) erzielt. Die an der GATA Standardseite gezeigten Experimente wurden als Kontrolle durchgeführt, um die Spezifität der GATA-3 transfizierten COS-7 Extrakte sowie der *in vitro* translatierten GATA-3 Proteine auszutesten (Spur 4-11).

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß die Wildtypseite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor *in vitro* GATA-3, -2 und -1 Proteine binden kann. Weiterhin demonstrieren die EMSA-Experimente (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18), daß GATA-3 den spezifischen, durch IL-4 induzierbaren Komplex in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausbildet.

### **3.4.5 IL-4 induziert spezifisch die GATA-3 Proteinexpression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen aber nicht in den restlichen Lymphocyten**

Um zu untersuchen, ob die GATA-3 Proteinexpression in CD4<sup>+</sup> T-Lymphocyten direkt von IL-4 reguliert wird, wurden sowohl cytoplasmatische als auch nucleäre Proteine aus unstimulierten und stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie aus CD4<sup>+</sup> depletierten peripheren Blutlymphocyten extrahiert. Diese wurden in Western Blot Experimenten analysiert. Die Abbildung 3.19 zeigt, daß GATA-3 konstitutiv in nucleären und cytoplasmatischen Extrakten aus primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> depletierten PBL vorhanden war (Abbildung 3.19 A+B, Spur 1 und 2). Nach der Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA/Ionomycin wurde die GATA-3 Proteinexpression reduziert bzw. in den nucleären Extrakten aufgehoben (Abbildung 3.19 A Spur 3, 4). Diese Reduktion der Signalstärke trat in den nucleären Extrakten der CD4<sup>+</sup> T-Zell-depletierten restlichen Blutlymphocyten nicht auf (Abbildung 3.19 B, Spur 4). Das Ergebnis weist darauf hin, daß die Herunterregulation der nucleären GATA-3 Expression charakteristisch ist für CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz dazu verursachte IL-4 alleine keine signifikanten Veränderungen der GATA-3 konstitutiven Proteinsynthese in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 3.19 A, Spur 7,8). Jedoch bewahrte die Coapplikation von IL-4 während der T-Zell-Aktivierung mit PMA/Ionomycin vor der Repression des Transkriptionsfaktors GATA-3 (Abbildung 3.19 A, Spur 5,6). In den CD4<sup>+</sup> T-Zell-depletierten peripheren Blutlymphocyten führte die Applikation von IL-4 zum unstimulierten oder zum PMA/Ionomycin stimulierten Ansatz zu einer deutlichen Reduktion der GATA-3 Proteinexpression in den nucleären Extrakten (Abbildung 3.19 B, Spur 6,8).

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß GATA-3 konstitutiv in CD4<sup>+</sup> T-Zellen expriert wird und während der T-Zell-Aktivierung herunterreguliert wird. Dieser Prozeß wird von dem T<sub>H</sub>2 Cytokin IL-4 verhindert.



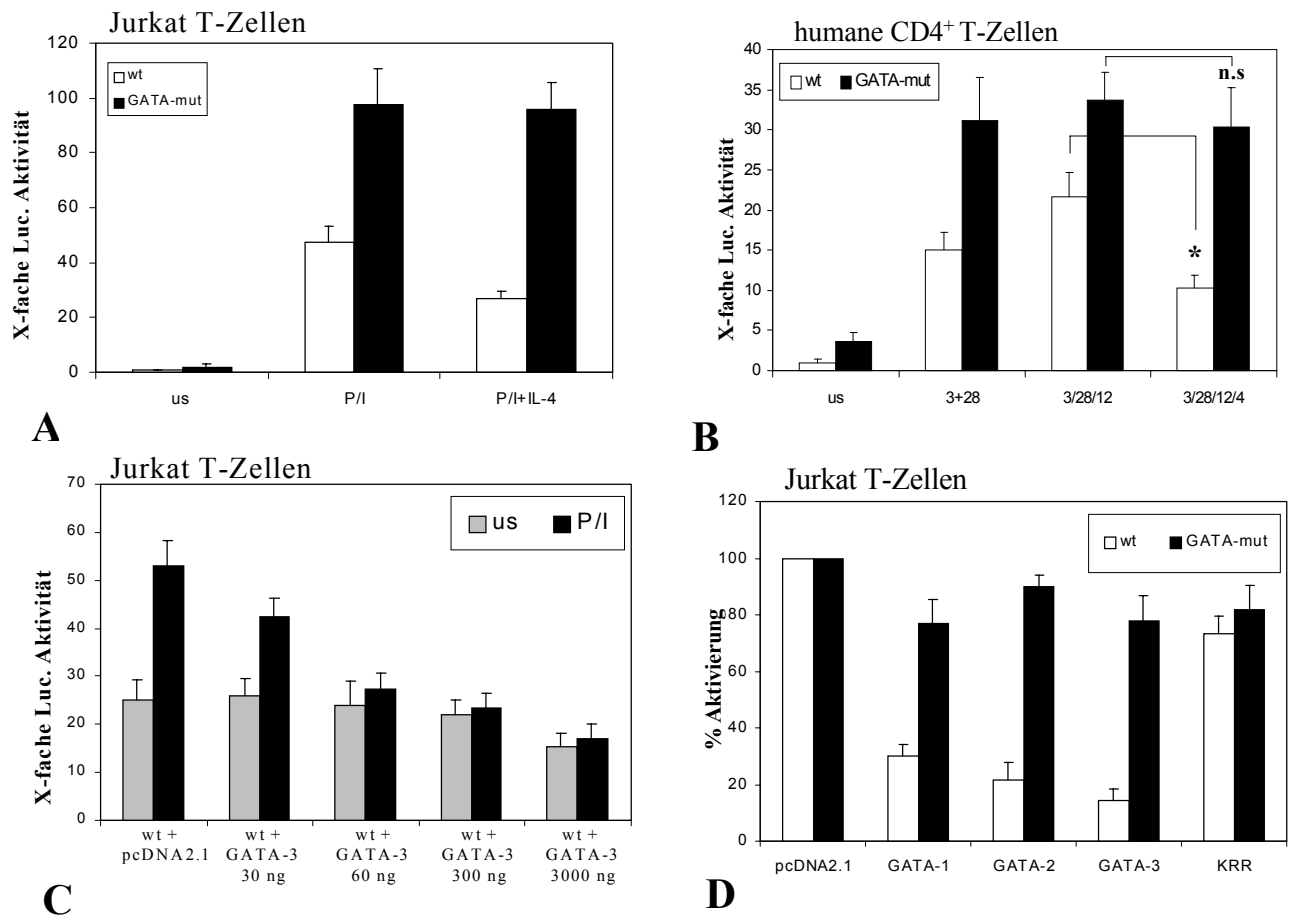
Wie in Abbildung 3.20 A gezeigt, verursachte die Mutation der GATA Bindemotive eine signifikante Hochregulation der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität (bis zu 60%) in unstimulierten und PMA/Ionomycin stimulierten Jurkat T-Zellen. Interessanterweise wurde eine durch IL-4 vermittelte Herunterregulation der Promotoraktivität mit dem Wildtyp Konstrukt, aber nicht mit dem GATA-mutierten Konstrukt in PMA/Ionomycin aktivierten Jurkat T-Zellen festgestellt. Das Ergebnis weist darauf hin, daß GATA-3 bei der durch IL-4 vermittelten Repression des IFN- $\gamma$  Promotors involviert ist.

In Übereinstimmung mit den Transfektionsergebnissen in Jurkat T-Zellen, zeigten auch primäre mit  $\alpha$ CD3/28 bzw. mit  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Zunahme der Luciferase Aktivität (bis zu 40 %) nach Einführung der Mutation in das GATA-bindende DNA-Motiv (Abbildung 3.20 B). Zudem war auch hier die signifikant repressorische Funktion von IL-4 durch Mutation der GATA-3 Bindestelle aufgehoben. Weiterhin demonstrieren die Ergebnisse, daß IL-4 über die Induktion von GATA-3 und Interaktion dieses Transkriptionsfaktors mit seiner molekularen Zielsequenz, die IFN- $\gamma$  Expression in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen reprimiert.

Um direkt den repressorischen Effekt von GATA-3 auf die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität zu analysieren, wurde der GATA-3 Expressionsvektor mit dem Wildtyp pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor in Jurkat T-Zellen cotransfiziert. Wie in Abbildung 3.20 C gezeigt, führte die Cotransfektion mit dem GATA-3 Expressionsvektor zu einer Dosis-abhängigen Repression der PMA/Ionomycin induzierten IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung bis auf das Aktivitätsniveau von unstimulierten Zellen.

Dennoch war die gezeigte Repressorfunktion nicht spezifisch für GATA-3, denn die Cotransfektion des Wildtypkonstrukts mit GATA-1 und GATA-2 Expressionsvektoren führte auch zur Herunterregulation der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität (siehe Abbildung 3.20 D). Jedoch hatten bereits die Gelshiftexperimente demonstriert, daß GATA-1 und GATA-2 Proteine in der Lage sind an das GATA Motiv im IFN- $\gamma$  Promotor zu binden (Abbildung 3.18). Dennoch, die Cotransfektion eines dominant negativen GATA Expressionsvektors (KRR), das ein GATA-3 Protein exprimiert, welches zwar an DNA bindet aber über keine Transaktivierungsdomäne verfügt, besaß keine repressorische Funktion mehr. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die alleinige Bindung der GATA Proteine an die DNA nicht ausreichend ist, um die Repression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in T-Zellen zu verursachen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Reporterstudien die repressorische, funktionelle Relevanz des GATA-bindenden DNA-Motivs im IFN- $\gamma$  Promotor. IL-4 bewirkte über die Induktion der GATA-3 Protein/DNA Interaktion eine Inhibition der IL-12 vermittelten Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen.



**Abbildung 3.20** Die Mutationen der GATA-3 Motive im IFN- $\gamma$  Promotor erhöhen die induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung und verhindern die IL-4 vermittelte Repression der Promotoraktivität in T-Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten, nach der Normalisierung der Transfektionseffizienz mit dem  $\beta$ -Gal Kontrollvektor.

**A**  $1 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen wurden mittels DEAE-Dextran transient transfiziert mit 5  $\mu$ g Wildtyp und GATA-mutierten pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor, sowie je 2  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 10 h mit 50 ng/ml PMA, 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (P/I), sowie P/I plus 5 ng/ml IL-4 stimuliert.

**B** Primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit dem Wildtyp und dem GATA-mutierten Vektor transfiziert. Die Stimulation erfolgte auch hier für 10 h mit 1  $\mu$ g/ml löslichem  $\alpha$ CD3 Antikörper, 1  $\mu$ g/ml  $\alpha$ CD28 Antikörper, 5 ng/ml IL-12 und 5 ng/ml IL-4. Die Signifikanz der IL-4 vermittelten Repression ( $p < 0,05$ ) wurde mit einem studentischen T-Test (Excel) ermittelt und ist mit einem Kreuz markiert. n.s. steht für eine nicht signifikante Korrelation.

**C**  $1 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen wurden mittels DEAE-Dextran transient transfiziert mit 5  $\mu$ g Wildtyp pXP-IFN- $\gamma$  Luc Vektor und verschiedenen Konzentrationen GATA-3 Expressionsvektor bzw. leerer Expressionsvektor pcDNA2.1, sowie je 2  $\mu$ g  $\beta$ -Galaktosidase Kontrollvektor. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 10 h mit 50 ng/ml PMA und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (P/I) stimuliert.

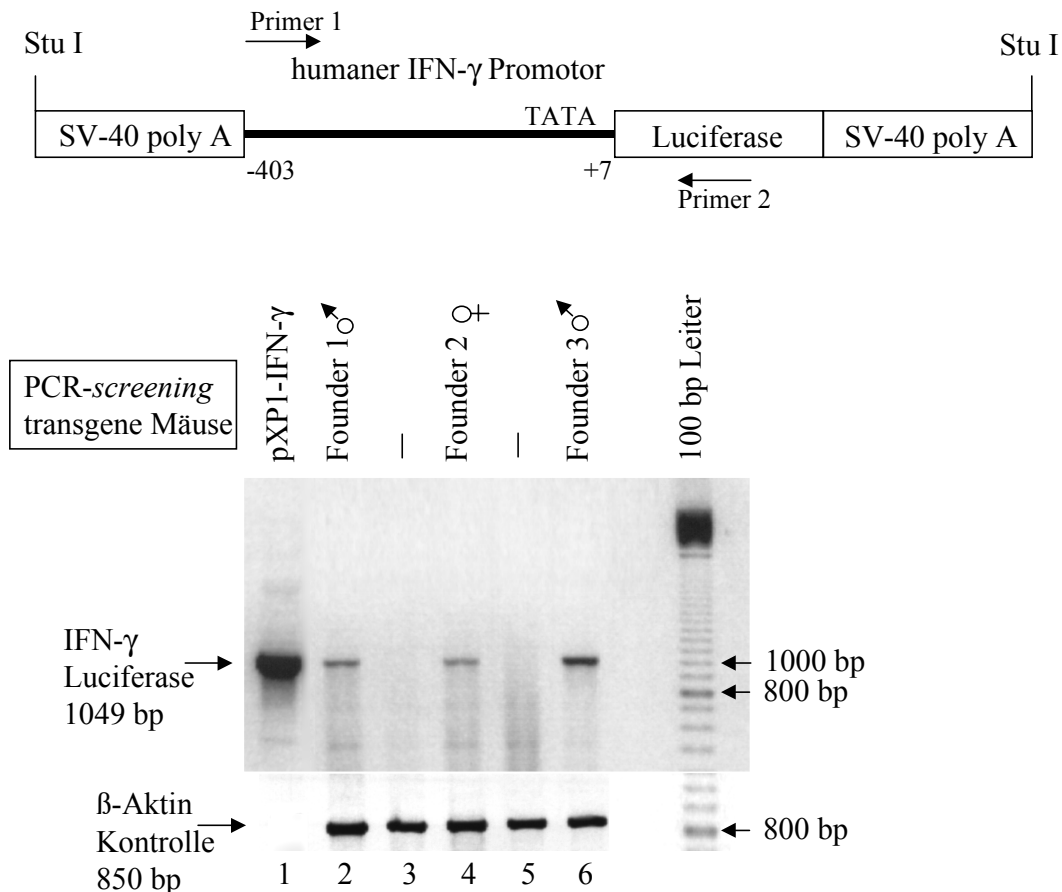
**D**  $2 \times 10^7$  Jurkat T-Zellen wurden mittels DEAE-Dextran transient transfiziert mit 10  $\mu$ g Wildtyp bzw. GATA-mutierten pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor und 4  $\mu$ g pcDNA2.1, GATA-1, GATA-2, GATA-3 oder KRR (dominant negativer GATA Vektor) sowie je 2  $\mu$ g  $\beta$ -Gal Kontrollvektor. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 10 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Ergebnisse sind als %ige Aktivierung im Vergleich zur Luciferase-Aktivität des Wildtyp bzw. GATA-mutierten Reportergenvektors dargestellt, das gleich 100% gesetzt wurde.

### **3.5 Herstellung und Analyse der IFN- $\gamma$ Promotor/Luciferase transgenen Maus**

Dieser Abschnitt stellt die Ergebnisse einer Reihe von Experimenten, die zur Charakterisierung der IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgenen Maus durchgeführt wurden. Die transgene Maus wurde in erster Linie hergestellt, um funktionelle Studien am IFN- $\gamma$  Promotor in einem *in vivo* relevanten System zu untersuchen. Dabei sollten vor allem die Ergebnisse der transienten IFN- $\gamma$  Reporterstudien in primären humanen T-Zellen überprüft werden. Dabei wurden NVB/NHSD Luciferase transgene Mäuse hergestellt, in denen die Reporterogenaktivität von einem humanen IFN- $\gamma$  Promotorfragment reguliert ist. Dieses Konstrukt stammt aus dem pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor und wurde in zahlreichen Reporterstudien *in vitro* analysiert.

#### **3.5.1 Identifizierung und Charakterisierung der positiven transgenen Mäuse**

In Abbildung 3.21 A ist das Konstrukt dargestellt, das zur Herstellung der transgenen Maus verwendet wurde. Es enthält 410 Basenpaare des humanen IFN- $\gamma$  Promotors (Position -403 bis +7 relativ zur transkriptionellen Startseite) sowie das Luciferase-Reportergen und ist flankiert von zwei SV-40 Poly A Seiten. Dieses Konstrukt stammt aus dem pXP1-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor. Alle prokaryontischen Sequenzen des Vektors wurden, nach Integration zweier Stu I Schnittstellen, durch Restriktionsverdau entfernt. Zur Identifizierung der positiven Founder und positiven Nachfolgegenerationen wurde aus den Mäuseschwänzen genomische DNA isoliert und in der PCR mit zwei spezifischen Primern aus dem Luciferase-Gen und aus dem IFN- $\gamma$  Promotor amplifiziert. Die Position der Primer ist in Abbildung 3.21 A eingezeichnet. In Abbildung 3.21 B ist die Identifizierung der positiven Founder dargestellt. Die Ergebnisse demonstrieren die chromosomale Integration des Konstrukts in 3 Founder. Hierbei wurde mit Hilfe der genomischen PCR ein spezifisches Fragment, mit einer Größe von 1049 Basenpaaren, amplifiziert.



**Abbildung 3.21** Herstellung und Analyse der IFN- $\gamma$  Promotor transgenen Mäuse.

**A** Mappe der Vektorkassette des linearisierten IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukts, das aus dem pXP-IFN- $\gamma$ -Luc Vektor stammt, das für die Mikroinjektion verwendet wurde. Die Stu I Restriktionsschnittstellen, sowie die Position der TATA-Box, poly A Regionen, sowie der in der PCR verwendeten Primern ist eingezeichnet.

**B** Transgen-spezifische PCR aus der Mausschwanz DNA von verschiedenen Founder. Als Positivkontrolle für die Amplifikation des erwarteten 1049 bp Fragments in der PCR, wurde der pXP-IFN- $\gamma$  Luc. Vektor verwendet. Als interne Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin amplifiziert.

### 3.5.2 Überprüfung der Reporterogenaktivität in verschiedenen Organen

Die transgenen Mäuse bzw. die Nachfolgegenerationen der Founderlinien waren phänotypisch normal und zeigten keine histologischen Veränderungen der untersuchten Organe, z.B. Leber, Lunge, Milz, Niere, Herz, Darm und Magen.

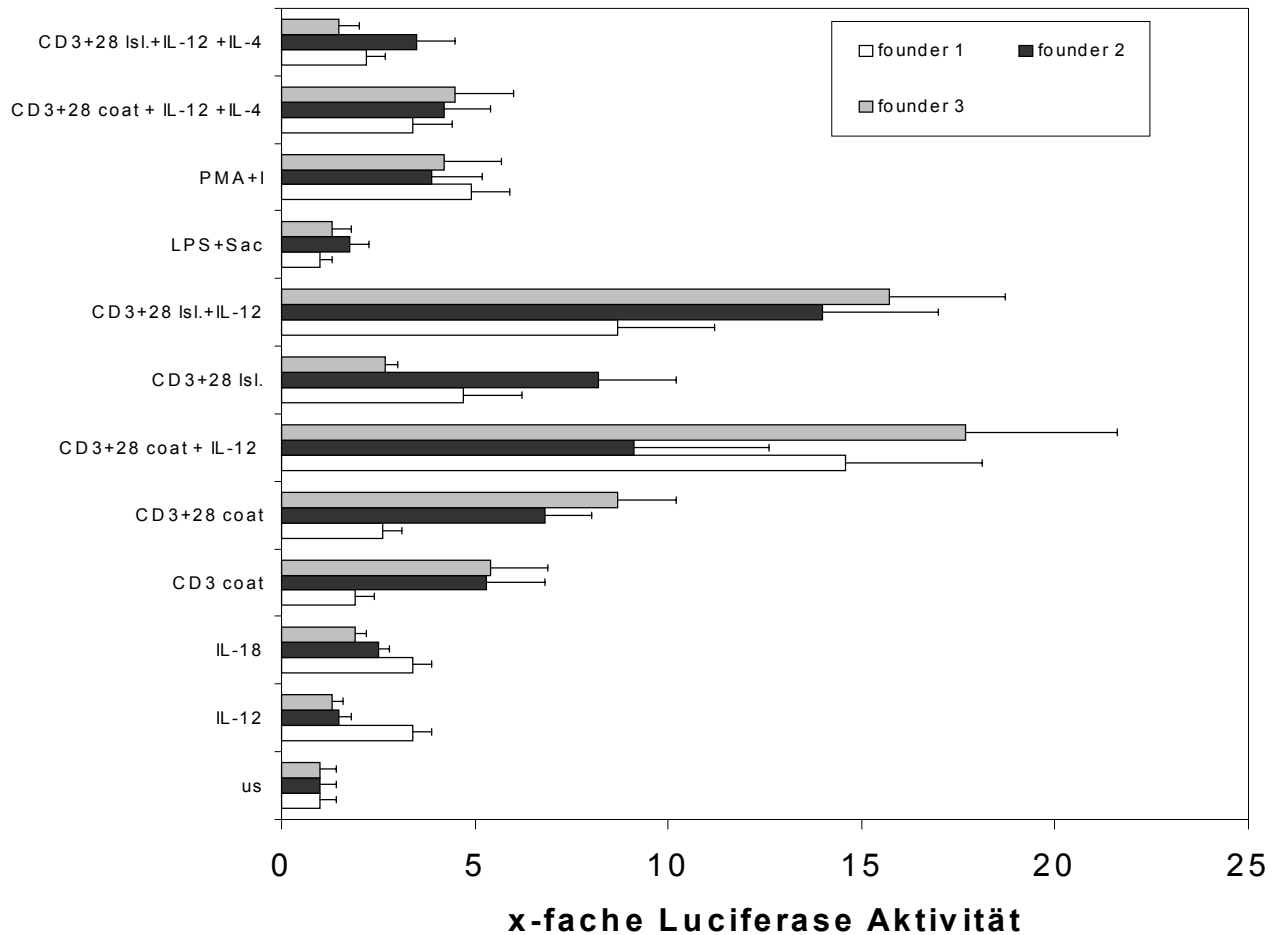
Zur Überprüfung der konstitutiven Luciferase-Aktivität in verschiedenen Organen wurden mehrere 6-8 Wochen alte Mäuse aus der F2 Generation getötet und die Organe entnommen. Diese wurden in Flüssigstickstoff eingefroren, mit einem Mörser zerrieben und anschließend in Zellysepuffer aufgenommen. Anschließend wurden 20  $\mu$ l Zellysat mit 100  $\mu$ l Luciferin-haltigem Substratpuffer im Luminometer ausgewertet. Dabei wurde keine konstitutive Luciferase-Aktivität gemessen.

### 3.5.3 IFN- $\gamma$ Promotorregulation in Einzelzellsuspensionen aus Milzen transgener Mäuse

In weiteren Studien wurden Gesamt-Milzzellen aus 6-8 Wochen alten FVB/NHSD transgenen Mäusen der F2 Generation isoliert und für 48 h in Zellkultur mit verschiedenen Faktoren stimuliert. Aus den Zellysaten erfolgte anschließend die Messung der Luciferase-Aktivität im Luminometer. Die Ergebnisse zeigten keine Korrelation zwischen der Kopienzahl des Transgens und der Luciferase-Aktivität, so daß ein starkes positives Signal in der PCR kein Hinweis auf eine erhöhte Luciferase-Aktivität darstellte (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 3.22 zeigt repräsentative Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die Daten zeigen die induzierbare Reporterogenaktivität nach der T-Zell-abhängigen Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28. Im Gegensatz dazu hatte die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) plus *Staphylococcus Aureus* (SAC) keinen Effekt. Dieses Resultat deutet auf eine transgene Expression des Reportergenkonstrukts in T-Zellen hin. Dieses Ergebnis steht auch in Einklang mit der induzierbaren Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukts vor allem in T-Zelllinien, aber nicht in B-, Makrophagen-, und Fibroblasten-Zelllinien (siehe Abbildung 3.4 B). Weiterhin erfolgte eine auffallend starke Reportergenaktivierung mit  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12. Dieser Befund bestätigt somit die vorherigen Beobachtungen hinsichtlich der Bedeutung des IL-12/STAT-4 Signaltransduktionswegs für die Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors in transienten Transfektionen (siehe 3.3). In diesem experimentellen System konnte jedoch, die mit Hilfe von transienten Reportergenstudien gezeigte, direkte Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors mit IL-18 nicht festgestellt werden (siehe 3.3).

Interessanterweise zeigt die Abbildung 3.21, daß murines IL-4 die IL-12 abhängige Luciferase-Aktivität in den Milzzellen transgener Mäuse signifikant reprimiert. Somit bestätigte sich die Repression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung durch IL-4 (siehe 3.4).



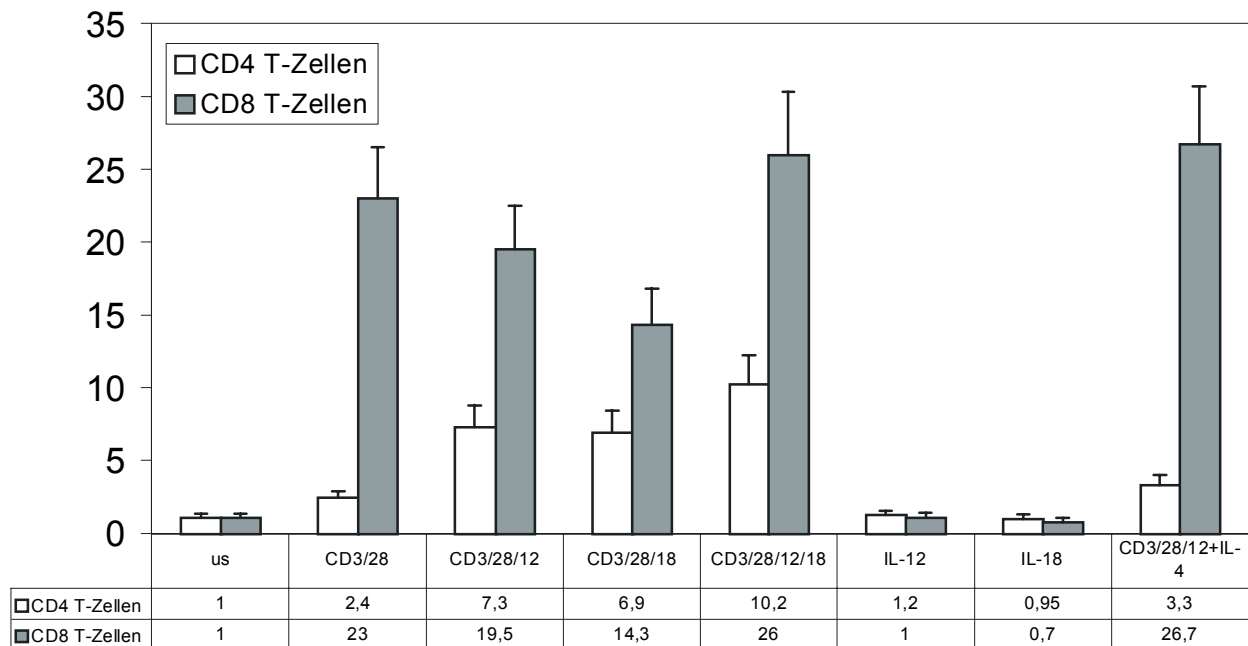
**Abbildung 3.22** Analyse der IFN- $\gamma$  Reporterogenaktivität in Milzzellen aus FVB/NHSD transgenen Mäusen.

Die Reporterogenaktivität der F2 Generationen aus 3 verschiedenen Founderlinien wurde überprüft. Dabei betrug das Alter der Mäuse ca. 6-8 Wochen. Frisch isolierte Milzzellen aus transgenen Mäusen (3 Mäuse pro Experiment) wurden von Erythrocyten depletiert und für 48 h stimuliert. Dabei wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI+10% FCS in 24-well Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h mit folgenden Reagenzien stimuliert: 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}$  löslich (Isl.) oder auf Platte gebunden (*coat*), 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD28}$  (Isl. oder *coat*), 5 ng/ml murines IL-12, 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 1:10000 Verdünnung SAC, 25 ng/ml murines IL-18 und 5 ng/ml murines IL-4. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten und sind als x-fache Induktion im Vergleich zum unstimulierten Ansatz (=1) angegeben.

### 3.5.4 Induzierbare und reprimierbare Reporterogenaktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten

Die T-Zell-abhängige Aktivierung des transgen gebildeten Konstruktes in den Milzzellen der untersuchten Mäuse, wies auf eine T-Zell-spezifische Expression hin (Abbildung 3.22). Daher wurden in weiterführenden Experimenten T-Zell-Subpopulationen analysiert. Dazu wurden aus den Milzzellen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und mit verschiedenen Faktoren für 48 h stimuliert. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die restlichen Milzlymphocyten wurden mit LPS/SAC sowie PMA/Ionomycin behandelt. Hierbei konnte jedoch keine Reporterogenaktivität in den Zellysaten gemessen werden.

Die Abbildung 3.23 zeigt die experimentellen Ergebnisse bei Verwendung von aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente, wobei pro Experiment drei 6-8 Wochen alte, positive Mäuse, aus der F2 Generation der Founderlinie 3 analysiert wurden. Die Meßergebnisse zeigen, daß die IFN- $\gamma$  Luciferase-Aktivität in den cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten um ein Vielfaches höher war als in den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Die Luciferase-Aktivität wurde in beiden T-Zell-Subpopulationen durch  $\alpha$ CD3/28 induziert. Die Coapplikation von IL-12 bzw. IL-18 sowie von beiden Cytokinen zu dieser Stimulation verursachte eine Hochregulation der Reporterogenaktivität in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die Costimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-12 oder IL-18 eher zu einer Suppression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung. Die alleinige Behandlung der CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-12 bzw. IL-18 hatte jedoch keinen Effekt auf die IFN- $\gamma$  Reporterogenaktivität. Interessanterweise reprimierte IL-4 die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivität nur in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, aber nicht in CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Befund bestätigt nicht nur die Ergebnisse der transienten Reportergenstudien in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (siehe 3.4), sondern spricht auch dafür, daß die IL-4 vermittelte Repression des IFN- $\gamma$  Promotors spezifisch ist für CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen.



**Abbildung 3.23** Reportergenaktivität in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen der transgenen Mäuse.

Murine T-Zellen wurden aus Milzen von ca. 6-8 Wochen alten Mäusen aus der F2 Generation der Founderlinie 3 isoliert. Dabei wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI+10% FCS in 24-well Kulturschalen ausgesät und die Zellen wurden für 48 h mit folgenden Reagenzien stimuliert: 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD3}$  löslich (Isl.), 1  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{CD28}$  (Isl.), 5 ng/ml murines IL-12, 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 1:10000 Verdünnung SAC, 25 ng/ml murines IL-18 und 5 ng/ml murines IL-4. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten und werden als x-fache Induktion im Vergleich zum unstimulierten Ansatz (=1) exprimiert.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kritische Betrachtung der durchgeführten Methoden: Grenzen und Möglichkeiten der experimentellen Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurden Protein/DNA Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor in T-Zellen analysiert. Hauptsächlich wurden *in vivo*-Footprinting Experimente, Gelshiftassays und Reporterstudien durchgeführt. Mit Hilfe dieser Techniken wurden cis-regulatorische Elemente identifiziert, die beteiligten Transkriptionsfaktoren bestimmt und deren funktionelle Bedeutung ermittelt. Erst der Vergleich aller Befunde ergab ein Gesamtbild, aus dem Modelle für die molekularen Mechanismen der IFN- $\gamma$  Genaktivierung in T-Zellen entwickelt wurden. Jede der experimentellen Systeme weist kritische Parameter auf, die nachfolgend diskutiert werden. Dennoch erzielte die experimentelle Ausführung verschiedener Techniken aussagekräftige Resultate.

#### 4.1.1 Gelshiftassays

Der Gelshiftassay (Gel-Retentionsanalyse, Bandshiftassay, *electrophoretic mobility shift assay*, Abkürzung EMSA) ist ein schnelles und empfindliches Testsystem. Diese experimentelle Technik ermöglicht die Untersuchung der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA. Die Methode beruht im Prinzip darauf, daß Protein/DNA Komplexe in der Gelelektrophorese langsamer wandern als freie DNA (Neurath 1997).

Bei dieser Methode gibt es einige kritische Parameter, welche die Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse erheblich beeinflussen. Zunächst ist die Qualität der Kernproteine wichtig. Um Degradationsprozesse durch Proteasen zu vermeiden, wurde die Proteinextraktion auf Eis und in Gegenwart von Proteaseinhibitoren durchgeführt. Ein anderer kritischer Parameter beim Gelshiftassay ist die DNA-Sonde, welche in die Reaktion eingesetzt wird. Die doppelsträngige Sonde wurde daher durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) aufgereinigt. Einzelsträngige DNA-Sequenzen werden nämlich auch durch die Polynucleotidkinase radioaktiv markiert und erzeugen unspezifische Banden im Gelshift. Zur Zeit wird für fast jeden Transkriptionsfaktor ein bestimmter Bindungspuffer empfohlen. Bei der Analyse neuer Zielsequenzen ist jedoch nicht bekannt, welcher Puffer geeignet ist. Ein einfaches Experiment besteht zunächst darin, eine Salzreihe durchzuführen, bei der steigende Konzentrationen KCl eingesetzt werden. Somit wird ermittelt, bei welcher Salzkonzentration die Komplexbildung nachweisbar ist. Für einige Transkriptionsfaktoren wird die Zugabe von Calcium-Chelatbildner wie EDTA, reduzierenden Agenzien wie Dithiothreitol, sowie bovines Serumalbumin zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen, empfohlen. Auch die

Polyacrylamidgel-Elektrophorese kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Die Auftrennung der Komplexe ist besser, je weniger prozentig der Polyacrylamid/Bisacrylamidgehalt ist. Optimale Werte liegen bei 4% bis 5% Polyacrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 29 zu 1. Zusätzlich kann eine zu hoch angelegte Stromstärke zum Überhitzen des Laufpuffers führen und die Degradierung der Protein/DNA Komplexe im Gel verursachen.

Aufgrund der genannten Parameter können Schwankungen der Reproduzierbarkeit auftreten. Daher sollten verschiedene Befunde miteinander verglichen werden, um eine Aussage über die Identität des betreffenden Transkriptionsfaktors zu treffen. Zur Überprüfung der Spezifität wird unter anderem die Comigration durchgeführt. Dabei wandert der beobachtete Komplex auf gleicher Höhe, wie der an eine Referenzsonde bindende, bekannte Transkriptionsfaktor. Nach Mutation des Kernmotivs sollte jedoch die Proteinbindung nicht mehr stattfinden. Außerdem kann ein Bandshiftassay mit *in vitro* translatierten Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden. Als Negativkontrolle dient hierbei das untranslatierte Lysat. Die Spezifität eines Protein/DNA Komplexes kann weiterhin mit Hilfe der Kompetitions- und Supershiftanalysen ermittelt werden. Bei der Kompetitionsanalyse werden vor allem bekannte Consensus-Sequenzen verwendet. Um unspezifische Kompetitionen zu vermeiden, sollten jedoch Titrationen durchgeführt werden. Die hierbei verwendete DNA-Konzentration ist wichtig. Jede unmarkierte DNA, die in zu hohem Überschuß in die Reaktion eingesetzt wird, kann die Komplexbildung unspezifisch aufheben. Der Supershift hingegen, hängt vor allem von der Bindungsqualität des verwendeten Antikörpers ab. Ein spezifischer Antikörper kann zur Retardation oder Auslöschung des DNA-Protein Komplexes führen. Viele der käuflich erwerblichen Antikörper (z.B. Firma Santa Cruz) wurden jedoch nicht für Gelshiftassays, sondern vor allem für Immunhistochemie und Western Blot Analysen getestet.

Der Gelshiftassay stellt die am häufigsten angewandte Methode dar, um Interaktionen von Transkriptionsfaktoren mit ihren Bindemotiven zu untersuchen und die DNA-bindenden Proteine zu bestimmen. Auch wenn die Methode einige kritische Parameter aufweist, ist diese jedoch unerlässlich für Genregulationsstudien. Allerdings beschränkt sich diese Analyse auf *in vitro* Protein/DNA Interaktionen.

#### **4.1.2 *In vivo*-Footprinting**

Das *in vivo*-Footprinting stellt eine Methode dar, welche die Analyse von Protein/DNA Interaktionen an genomischer DNA ermöglicht. Die sogenannte Ligationsvermittelte Polymerase-Kettenreaktion (LM-PCR) ist hierbei die gebräuchlichste experimentelle Analyse. Sie beruht auf der Vorstellung, daß Transkriptionsfaktoren, die in der intakten

Zelle an DNA binden, diese vor chemischen Modifikationen schützen können (Mueller und Wold 1989, Pfeifer et al. 1989).

Bei der LM-PCR gibt es einige kritische Schritte, welche die Sensitivität und Spezifität der Methode beeinträchtigen können. Eine nahezu vollständige Aktivierung des Promotors aller Zellen im Versuchsansatz ist wichtig, denn nur partiell protektierte oder partiell hyperreaktive Bereiche können kaum identifiziert werden. Daher ist die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Agenzien und die Durchführung von Zeitkinetikexperimenten unerlässlich. Beim IFN- $\gamma$  Promotor liegen die optimalen Stimulationszeitpunkte, um eindeutige footprints in den untersuchten Promotorbereichen (bis ca. 500 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startseite) festzustellen, bei zwei bis vier Stunden. Bei der experimentellen Durchführung ist die Enzymauswahl sehr wichtig. Empfehlenswert für die LM-PCR sind vor allem DNA-Polymerasen, die eine geringe terminale Transferaseaktivität haben. Dadurch werden möglichst viele glattendige DNA-Moleküle erzeugt, die für die Ligation des doppelsträngigen Linkers und der nachfolgenden PCR benötigt werden. Sehr gut bewährt hat sich in diesem Fall die Sequenase 1.0 von der Firma Amersham. Ein weiterer kritischer Parameter ist die Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen, um *in vivo* Protein/DNA-Interaktionen nachweisen zu können. Eine zu hohe Zyklenzahl kann den Nachweis der footprints beeinträchtigen. Daher sollten 20 Amplifikationszyklen nicht überschritten werden. Weiterhin ist die Auswahl der Primer sehr wichtig. Manche Primersets zeigen eine schmierige Auflösung im Sequenzierungsgel, während bei anderen die Auftrennung sehr sauber ist. Andere Sets hingegen, ergeben überhaupt keine Amplifikationsprodukte. Das Austesten der jeweiligen Primer ist daher unerlässlich. Die Optimierung der Temperatur bei der Zweitstrangsynthese ist jedoch nur in einigen Fällen sinnvoll. Wenn das Primerset nicht geeignet ist, dann können Veränderungen der Reaktionsbedingungen wie Erhöhung der Zyklenzahl und Herabsetzung der *Annealing* Temperatur in der PCR nichts bewirken. Ein weiterer kritischer Punkt bei der LM-PCR sind auch die verwendeten Puffer. Die Konzentration der Puffer und der pH-Wert sollten immer eingehalten werden. Bei der LM-PCR können unspezifische Signale hochamplifiziert werden, welche die Beurteilung der Sequenz erschweren. Daher ist das Mitführen von *in vitro*-methylierter DNA als Referenz unerlässlich. Diese dient als Negativkontrolle für footprints und Hyperreaktivitäten.

Insgesamt betrachtet weist das *in vivo*-Footprinting einige kritische Parameter auf. Wenn die Methode jedoch etabliert ist, dann kann diese ein sehr effektvolles experimentelles System darstellen, um Protein/DNA Interaktionen *in vivo* nachzuweisen.

### 4.1.3 Transiente Reporterstudien und die transgene Reporter-Maus

Bei den transienten Transfektionen wurde hauptsächlich ein pXP1 Luciferase-Reporterkonstrukt verwendet, das 410 Basenpaare (bp) vom IFN- $\gamma$  Promotor (Position -403 bis +7 stromaufwärts der transkriptionellen Startseite) enthält. Hauptsächlich wurde hierbei die DEAE-Dextran Transfektionsmethode eingesetzt. Dabei wurde sowohl ein Wildtyp IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukt transient transfiziert, als auch Konstrukte, die Mutationen in relevanten *cis*-regulatorischen Sequenzen enthalten. Ein weiterer wichtiger Punkt war auch die Analyse der Konstrukte unter bestimmten Stimulationsbedingungen der Zelle, beispielsweise nach Behandlung mit IL-12 oder IL-18. Zur Analyse der funktionellen Bedeutung von Transkriptionsfaktoren wie GATA-3, wurde die cDNA für den Faktor mit Hilfe eines Expressionsvektors (GATA-3 pcDNA2.1) in die Zellen eingeschleust. Bei der Untersuchung der Promotoraktivität wurde immer ein interner Standard verwendet. Mit dessen Hilfe wurde bestimmt, ob die Ergebnisse tatsächlich auf Unterschiede in der Transkriptionsstärke zurückzuführen sind. Der interne Standard dient hierbei zur Überprüfung der Transfektionseffizienz und der Extraktpräparation. Als interner Standard wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Kontrollvektor verwendet (z.B.  $\beta$ -Gal SV40, Firma Clontech). Die Normalisierung der gemessenen Luciferase-Aktivität erfolgte außerdem mit dem Proteingehalt der Probe.

Bei der transienten Transfektion gelangt die Plasmid DNA, beispielsweise durch DEAE-Dextran, in den Zellkern, wo diese transkribiert wird. Von dort aus gelangt die RNA ins Cytoplasma, wo das Reporter-gen (z.B. Luciferase) translatiert wird. Eine transiente Transfektion dauert in der Regel 24 bis 48 Stunden. Hierbei wird die transfizierte DNA nicht in das Genom integriert. Daher ist bei der transienten Transfektion nur ein artifizielles System vorhanden, bei dem keine übergeordneten Chromatinstrukturen entstehen. Diese sind jedoch *in vivo* für die Zelltyp-spezifische Regulation eines Gens von Bedeutung. Daher können bei der transienten Transfektion wichtige genetische Kontrollelemente übersehen werden, die nur im Zusammenhang des intakten Genoms im Zellkern wirksam sind. In der vorliegenden Arbeit haben die transienten Transfektionen gezeigt, daß der IFN- $\gamma$  Promotor vor allem in T-Zelllinien und primären T-Zellen, aber nicht in Makrophagen-, B- und Fibroblasten Zelllinien induzierbar ist. In einigen dieser Zelllinien war jedoch eine hohe basale Aktivität vorhanden. Die Frage nach den Mechanismen, welche die Induzierbarkeit des Promotors in transienten Transfektionen in T-Zellen ausmacht, ist schwierig zu beantworten. Die Spezifität der Chromatinstruktur sowie der Methylierungsmuster, kann in dem Zusammenhang der transienten Transfektion keine bedeutende Rolle spielen, da hierbei keine stabile Integration ins Genom erfolgt. Möglicherweise ist die spezifische Ausstattung der T-Zelle mit bestimmten Transkriptionsfaktoren verantwortlich für die Zelltyp-spezifische

Induktion der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität. Weiterhin könnten in T-Zellen bestimmte Signaltransduktionsmechanismen aktiviert werden, die in anderen Zellen nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde eine Luciferase transgene Maus hergestellt, die das humane IFN- $\gamma$  Promotorkonstrukt trägt. Die transgene Maus stellt eine wesentlich bessere Alternative zur stabilen Transfektion dar. Hierbei kann die Promotorregulation in verschiedenen Organen und zudem Zelltyp-spezifisch untersucht werden. Die transgene Maus weist jedoch auch einige Nachteile auf. Sowohl die Integrationsstelle des Transgens als auch die Art der Integration ist unbekannt. Außerdem ist die Anzahl der integrierten Kopien nicht bekannt.

Insgesamt betrachtet sind Reporterstudien unerlässlich, um die Funktionalität des Promotors bzw. einzelner Bindestellen am Promotor festzustellen. Die transgene Maus erweitert die Möglichkeiten der funktionellen Reporterstudien. Sie erlaubt die Untersuchung der Genaktivierung und Genregulation in einem Organismus unter *in vivo* Bedingungen.

## 4.2 Die Regulation des IFN- $\gamma$ Promotors in humanen T-Zellen

IFN- $\gamma$  ist ein pluripotentes Cytokin, das für seine antiviralen und immunmodulatorischen Eigenschaften bekannt wurde. *In vivo* sind die Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  vor allem CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> cytotoxische T-Zellen (Trinchieri und Perussia 1985).

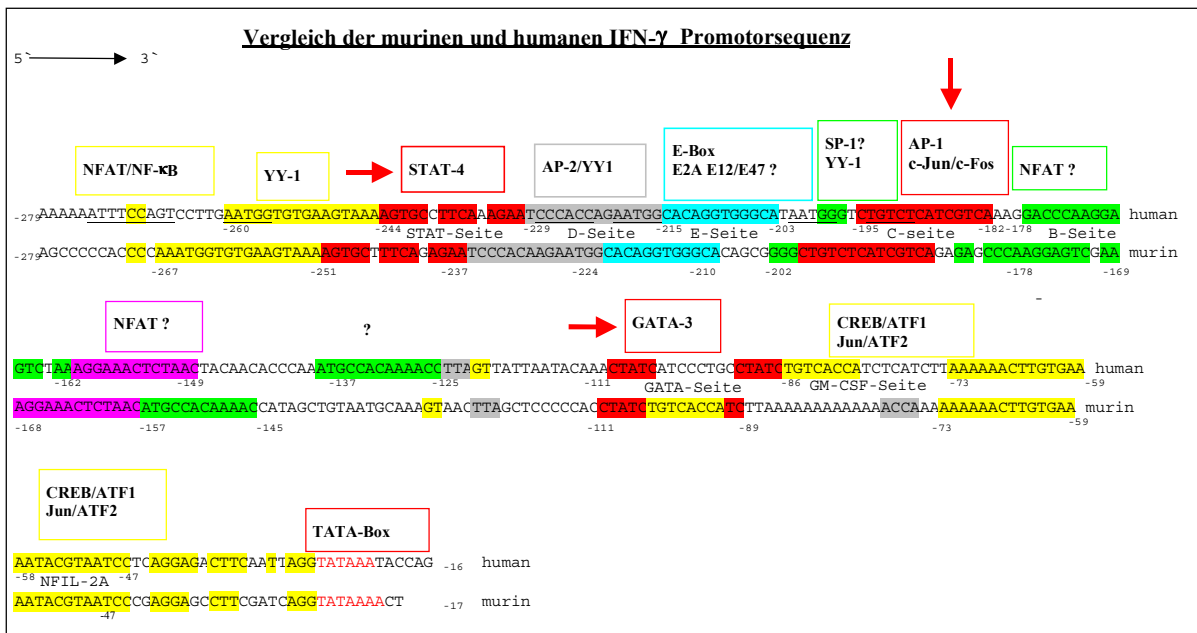
Die Untersuchungen zur Analyse der molekularen Prozesse, die an der komplexen transkriptionellen Regulation des humanen IFN- $\gamma$  Gens beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit in T-Lymphocyten durchgeführt. Hauptsächlich wurden hierbei CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzell-Subpopulationen analysiert. Durch den Einsatz IFN- $\gamma$  spezifischer RT-PCR wurde die Produktion von IFN- $\gamma$  mRNA Transkripten in primären CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und in der humanen Jurkat T-Zelllinie etwa 6 Stunden nach Induktion mit Phorbol ester (PMA) und Phytohämagglutinin (PHA) nachgewiesen. Auch mit Hilfe von ELISA Experimenten wurde parallel zur RT-PCR die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese nach 48 Stunden bestimmt. Dabei wurde festgestellt, daß naive CD45RA<sup>+</sup> T-Helferzellen weniger IFN- $\gamma$  produzieren als *memory* CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen (T-Gedächtniszellen). Dieser Befund stimmt mit den Literaturangaben überein (Conlon et al. 1995).

Die humane Jurkat T-Zelllinie erwies sich für weitere Studien als geeignet. Sie zeigte genauso wie primäre CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen keine konstitutive IFN- $\gamma$  Produktion. Erst nach Stimulation der Zellen mit PMA/PHA und PMA/Ionomycin erfolgte die transkriptionelle IFN- $\gamma$  Aktivierung. Diese Stimulantien führen zur Aktivierung des Proteinkinase C-Wegs und zur Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels. Für die Reporterstudien wurde hauptsächlich ein 410 bp Fragment aus dem IFN- $\gamma$  Promotor (-403 bis +7)

ausgewählt, das eine TATA-Box und außerdem alle *cis*-regulatorischen Elemente enthält, die notwendig sind für die IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung *in vivo*. Interessanterweise wurde festgestellt, daß die Reporter-genaktivität dieses Fragments nur in der humanen T-Zelllinie Jurkat und in der murinen T-Zelllinie BW5147, aber nicht in Fibroblasten-, Makrophagen-, und B-Zelllinien induzierbar ist. Dennoch war eine basale konstitutive Reporter-genaktivität auch in den nicht T-Zelllinien nachweisbar. Möglicherweise ist diese Ergebnis darauf zurückzuführen, daß diese Zellen auch über die notwendige Ausstattung basaler *trans*-regulatorischer Elemente verfügen. Dieses Reporter-genkonstrukt war in der transgenen Maus in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber nicht in anderen Zelltypen induzierbar.

Die Abbildung 4.1 zeigt eine Zusammenfassung der aus Veröffentlichungen bekannten sowie in der vorliegenden Arbeit identifizierten Bindemotive am IFN- $\gamma$  Promotor. Im Vergleich zur humanen Sequenz ist die murine Sequenz dargestellt. Der murine IFN- $\gamma$  Promotor weist starke Sequenzhomologien zum humanen IFN- $\gamma$  Promotor auf. Daher sind wahrscheinlich auch die Mechanismen der transkriptionellen Regulation im Verlauf der Evolution konserviert worden. Das CREB/ATF1 Element wurde als T-Zell-spezifisches Aktivatorelement identifiziert, während Jun/ATF2 und YY-1 Proteine als Repressorelemente erkannt wurden (Penix et al. 1996). Im Bereich des YY-1 Motivs bei Position -229 befindet sich eine AP-2 (Aktivator Protein 2) homologe Sequenz, die potentiell eine aktivierende Funktion besitzt (Ye et al. 1994). Weiterhin enthält die Sequenz eine NF- $\kappa$ B (p50/p65)/NFATc Bindestelle (-284 bis -264), die als Aktivatorelement charakterisiert wurde (Ye et al. 1996, Sica et al. 1997). Die Sequenz zeigt auch hypothetische NFAT-Bindestellen und ein E-Box Element. Die Sequenzhomologie zu den Standardmotiven dieser Transkriptionsfaktoren ist zwar vorhanden, aber es gibt bislang keine eindeutigen Daten zur Funktion und Interaktion dieser *trans*-regulatorischen Elemente mit den jeweiligen Bindemotiven am IFN- $\gamma$  Promotor (Campbell et al. 1996). Weiterhin gibt es konservierte Elemente, die in dieser Abbildung nur mit einem Fragezeichen markiert sind. Im Bereich dieser Sequenzen wurden keine footprints durch LM-PCR festgestellt, und die Sequenzanalyse ergab auch keinen konkreten Hinweis auf DNA-bindende Proteine. Viele Transkriptionsfaktoren binden an degenerierte Motive, so daß ein direkter Rückschluß aus der Sequenzvorgabe nicht möglich ist. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 3 essentielle Bindemotive aus dem IFN- $\gamma$  Promotor identifiziert und funktionell charakterisiert. Das AP-1 Element (Position -196 bis -183) wurde als Aktivator der PMA/PHA, IL-18 und IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 induzierbaren IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in primären CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen identifiziert. Das STAT-4 Element an Position -240 bis -230 des IFN- $\gamma$  Promotors wurde als IL-12 induzierbares Element in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen charakterisiert. Die Protein/DNA Interaktion an dieser Zielsequenz war jedoch nicht ausreichend, um die IFN- $\gamma$  Transkription anzuschalten. Erst nach

Costimulation mit  $\alpha$ CD3/28, führte sowohl die Besetzung der AP-1 Bindestelle (-196 bis -183) als auch des STAT-4 Motivs (-240 bis -230) zur Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 wurde als Silencer- bzw. Repressorelement der induzierbaren Promotoraktivierung identifiziert. Die Bindesequenz dieses nucleären Faktors wurde an Position -111 bis -87 stromaufwärts der transkriptionellen Startseite des IFN- $\gamma$  Promotors lokalisiert. GATA-3 wurde hierbei als IL-4 induzierbares Element, charakterisiert.



**Abbildung 4.1** Vergleich der humanen 5'-flankierenden IFN- $\gamma$  Sequenz mit der murinen Sequenz. Die *trans*-regulatorischen Elemente und ihre Bindestellen sind angezeigt. Die in der vorliegenden Arbeit analysierten Elemente sind mit einem roten Pfeil markiert. Die Konservierung der *cis*-regulatorischen Elemente zwischen der murinen und humanen Sequenz ist durch die Verwendung der gleichen Farben angegeben.

#### 4.2.1 Signifikanz des AP-1 Aktivatorelements im IFN- $\gamma$ Promotor

In dieser Studie wurde ein induzierbarer footprint an Position -196 bis -183 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startseite des IFN- $\gamma$  Promotors festgestellt. Eine veränderte DMS-Reaktivität im Bereich dieses Bindemotivs, hier als C bezeichnet, wurde in Jurkat T-Zellen, naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie *memory* CD45RO<sup>+</sup> T-Helferzellen, nach Stimulation der Zellen mit PMA/PHA, festgestellt. Weiterhin wurde gezeigt, daß die Bindungsaktivität des Proteins an die Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor Corticosteroid-sensitiv ist. Supershift Experimente und Kreuzkompetitionen demonstrierten, daß der Transkriptionsfaktor AP-1 an die C-Seite bindet. Die Mutation der AP-1 Sequenz, die *in vitro* die AP-1 Bindung aufhebt, war ausreichend, um die

PMA/PHA induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in Jurkat T-Zellen sowie primären CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen zu verhindern (Barbulescu et al. 1997).

AP-1 (*activator protein-1*) stellt eine Familie von Transkriptionsfaktoren dar, die aus der Fos- (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2) und Jun (c-Jun, JunB, JunD) Multigenfamilie besteht. Jun Proteine formieren hierbei Homodimere oder Heterodimere mit Fos-Proteinen. Diese Transkriptionsfaktoren sind charakterisiert durch eine Leuzin-Zipper-Domäne, die es ihnen erlaubt Homo- und Heterodimere zu bilden. Weiterhin verfügen sie über eine konservierte DNA-Bindedomäne, die für die Interaktion mit dem TRE (*TPA responsive element* TGA G/C TCA) DNA-Motiv verantwortlich ist (Neuberg et al. 1989). Interessanterweise binden AP-1 Faktoren sowohl an nackte DNA als auch an Nucleosomen. AP-1 kann nach der DNA-Bindung die Formation des Nucleosoms zerstören, so daß schließlich eine Umstrukturierung des Chromatins erfolgt. Dieser Vorgang ermöglicht die Anlagerung weiterer Transkriptionsfaktoren. Eine weitere Fähigkeit der c-Jun/c-Fos Heterodimere besteht darin, nach Bindung der DNA-Sequenz, eine Veränderung der dreidimensionalen DNA-Struktur zu induzieren. Hierbei spricht man von DNA/Biegung bzw. *bending*. Dadurch kann AP-1 mit entfernten Transkriptionsfaktoren oder mit der basalen Transkriptionsmaschinerie an der TATA-Box interagieren (Wooi Ng et al. 1997, Rajaram und Kerppola 1997).

Die Aktivierung von AP-1 in T-Zellen erfolgt über den durch Proteinkinase C vermittelten, Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signaltransduktionsmechanismus. Die Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bewirkt hierbei die Aktivierung der Proteinkinase C. AP-1 wird durch *de novo* Synthese von Jun und Fos und durch posttranslationale Mechanismen wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Nach der Phosphorylierung durch die Jun Kinase (JNK) erfolgt die Dimerisierung der AP-1 Faktoren und die Nucleustranslokation. Dieser Prozeß findet entweder nach Stimulation der Zellen mit Phorbol-13-acetat-8-acetat (PMA) und Calcium-Ionophore (Ionomycin) statt, oder wird über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) angeschaltet. Die TCR-Ligandenbindung ist jedoch nicht ausreichend, sondern setzt die gleichzeitige Aktivierung costimulatorischer Signale voraus. Diese werden durch Interaktion von B7.1 oder B7.2 auf der antigenpräsentierenden Zelle mit CD28 oder CTLA-4 auf der T-Zelle gewährleistet (Rincón und Flavell 1994)

Die AP-1 Familie ist bei der Kontrolle zahlreicher Gene involviert, die für die Zelldifferenzierung, Proliferation und Tumorgenese maßgeblich sind. Die c-Jun *knockout* Maus ist nicht lebensfähig. Die c-Fos defiziente Maus hingegen ist überlebensfähig, weist aber zahlreiche Abnormalitäten, wie eine verzögerte Knochenbildung und späte Gametogenese, auf. Die c-Fos überexprimierende, transgene Maus entwickelt Osteo- und Chondrosarkome. c-Fos ist außerdem bei der Entstehung maligner Tumoren in der Haut beteiligt. In T-Zellen spielt AP-1 als Verstärker der IL-2 Transkription eine wichtige Rolle. AP-1 ist weiterhin essentiell während der Thymocytenentwicklung. In CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>

doppelt positiven Vorläuferthymocyten wird AP-1 inaktiviert. Als Konsequenz können die Thymocyten keine Cytokine produzieren. Dadurch wird gewährleistet, daß keine Aktivierung der Thymocyten erfolgt, bevor die Selektion in Richtung CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bzw. CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Lymphocyten stattfindet (Rincón und Flavell 1996, Saez et al. 1995, Schuh et al. 1990).

In einer 1996, gleichzeitig zu den hier ermittelten Ergebnissen publizierten Studie, haben Ye und seine Mitarbeiter anhand von Gelshiftexperimenten, die Bindesequenz C im IFN- $\gamma$  Promotor (-196 bis -183) analysiert. Der Autor stellte fest, daß sowohl AP-1, als auch SP-1 und YY-1 an diese Sequenz binden. SP-1 (*Simian Virus 40 protein 1*) ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der in den Nuclei der meisten Zellen konstitutiv vorkommt. Ursprünglich wurde dieser Faktor im SV-40 (*simian virus 40*) Promotor identifiziert. SP-1 enthält drei Zinkfinger-Motive und bindet an GC oder GT reichen Sequenzen. Möglicherweise dient dieser Faktor zur Aufrechterhaltung von methylierungsfreien CpG Inseln, zum Zellzyklus und zur Formation der Chromatinstruktur. SP-1 *knockout* Mäuseembryos sterben am Tag 11 der Embryogenese, zeigen ein verzögertes Wachstum und eine eindeutige Repression des Methyl-CpG-bindenden Proteins MeCP2, das für die Zelldifferenzierung notwendig ist (Marin et al. 1997).

YY-1 wurde von Ye et al. als Silencerelement an der C-Seite postuliert. Der Autor stellte die Hypothese auf, daß YY-1 die AP-1 Aktivatorfunktion reprimiert, indem es die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 inhibiert. Weiterhin wurde postuliert, daß YY-1 eher ein Suppressor der IFN- $\gamma$  basalen Aktivität ist, denn die nucleäre Expressionsstärke von YY-1 ändert sich nicht nach der Zellaktivierung. YY-1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der sowohl zur Repression als auch zur Aktivierung der Transkription beitragen kann. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung, kann dieser Faktor selbst an den c-Fos Promotor binden und dadurch die Genaktivierung von c-Fos inhibieren (Natesan und Gilman 1993).

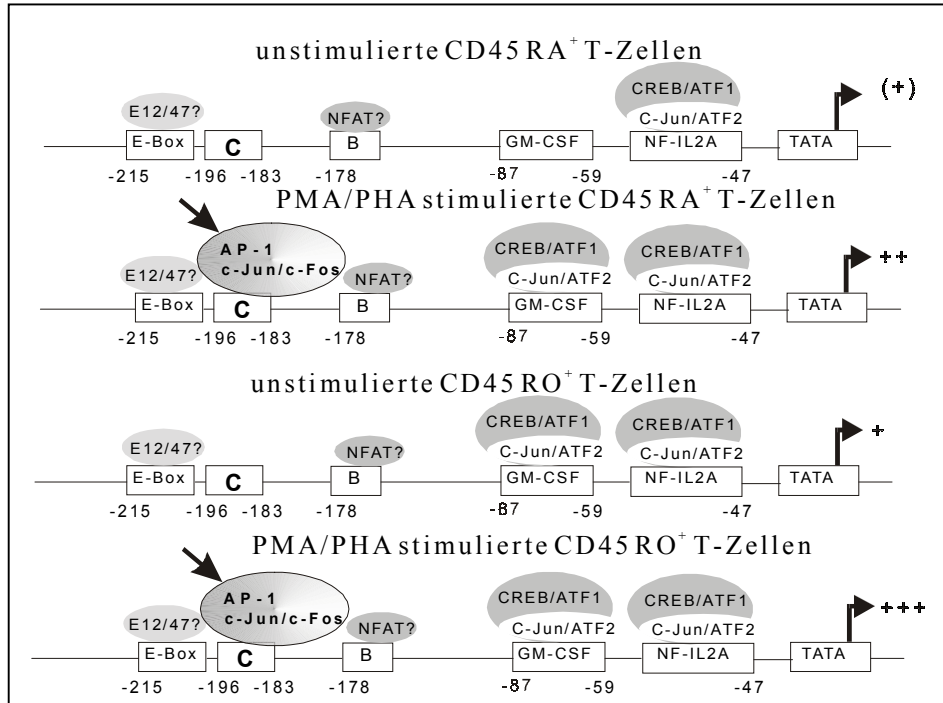
Mehrere Ergebnisse sprechen jedoch für die Bindung von AP-1 und nicht von YY-1 bzw. SP-1 an die C-Seite im IFN- $\gamma$  Promotor. Erstens ist AP-1 ein Glucocorticoid-sensitiver Transkriptionsfaktor, der in Lymphocyten exprimiert wird, in denen der IFN- $\gamma$  Promotor aktiv ist. Zweitens wurde ein eindeutiger footprint über dem TRE-ähnlichem Motiv der C-Seite (5'-TGTCTCAT-3'), aber nicht über dem weiter stromaufwärts lokalisierten SP-1 Bindemotiv (5'-GGGTC-3') bzw. YY-1 Motiv (5'-AATGGT-3') festgestellt. Drittens bestätigte sowohl die Induzierbarkeit des Komplexes durch PMA/PHA in primären T-Helferzellen als auch der Supershift mit  $\alpha$ c-jun und  $\alpha$ c-fos Antikörper, daß AP-1 an die C-Seite im IFN- $\gamma$  Promotor bindet. Die Applikation der spezifischen SP-1 und YY-1 Antikörper zum Reaktionsansatz zeigte im Gelshiftexperiment keinen Supershift (Daten nicht gezeigt). Die doppelsträngige, radioaktiv markierte C-Sequenz enthielt jedoch nicht die gesamte Sequenz, die für die YY-1 Bindung möglicherweise nötig ist. Das Oligonucleotid umspannt die 5'-ATGGT-3' Sequenz und nicht die 5'-

AATGGT-3' DNA-Sequenz. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit im EMSA Experiment andere Puffer verwendet. Ye et al. bemerkte, daß der YY-1 bindende Komplex eines spezifischen Puffers bedarf, um nachgewiesen zu werden. Daher könnten erst weitere Experimente, unter Verwendung derselben Reaktionsbedingungen, die Relevanz der YY-1 DNA-Bindung aufklären.

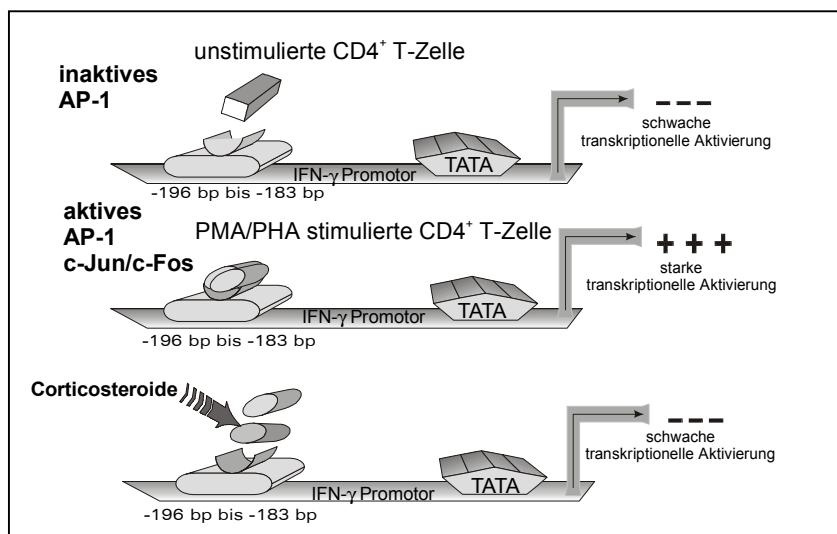
Die Bedeutung der AP-1 Bindung an den IFN- $\gamma$  Promotor wurde durch funktionelle Studien mit dem mutierten Reportergenkonstrukt in primären T-Zellen gezeigt. Interessanterweise scheint AP-1 vor allem bei der Regulation der induzierbaren IFN- $\gamma$  Promotoraktivität wichtig zu sein. Weiterhin zeigten die Ergebnisse der Gelshift Experimente und der transienten Reporterstudien, daß die AP-1 Aktivität kritischer ist für die hohe IFN- $\gamma$  Produktion in CD45RO<sup>+</sup> *memory* T-Zellen als in CD45RA<sup>+</sup> naiven T-Zellen. Die Mutation des AP-1 Bindemotivs im IFN- $\gamma$  Promotor erzielte in CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen einen 50%igen Aktivitätsverlust der Luciferase-Reporteraktivität, während dieser Aktivitätsverlust in den CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen lediglich 35 % betrug.

Anhand der in dieser Studie durchgeführten *in vivo*-Footprinting Untersuchungen mit verschiedenen Primersets, wurde ein Modell entwickelt, in welchem AP-1 die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren verstärkt (Abbildung 4.2). In Abschnitt 3.2 der Dissertation wurden aus Platzgründen nur die Resultate eines LM-PCR Primersets, das den nicht codierenden Strang des IFN- $\gamma$  Promotors amplifiziert, gezeigt. Das hier dargestellte Modell faßt die festgestellten Veränderungen der DMS-Reaktivitäten im Bereich der IFN- $\gamma$  Promotorsequenz von Position -16 (TATA-Box) bis Position -215 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startseite zusammen. Unstimulierte CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen zeigten Protein/DNA Interaktionen im Bereich der AP-1/CREB-ATF bindenden NF-IL2A Seite, im Bereich der potentiellen NFAT bindenden B-Seite und im Bereich der E-Box. Die B-Seite und auch die E-Box stellen noch nicht charakterisierte Elemente dar (siehe auch Abbildung 4.1). Anhand der Sequenzhomologien wurden diese Bindemotive NFAT bzw. E12/E47 Transkriptionsfaktoren zugeordnet (Campbell et al. 1996, Murre et al. 1994). Nach Stimulation der CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA/PHA wurden 2 zusätzliche Protein/DNA Interaktionen identifiziert. Die eine fand an der C-Seite statt, die in dieser Studie als c-Jun/c-Fos Bindemotiv charakterisiert wurde. Die andere fand im Bereich einer von Penix et al. 1996 identifizierten GM-CSF homologen Sequenz statt, die als CREB/ATF1 und Jun/ATF2 Bindungselement charakterisiert wurde (Penix et al. 1996). In unstimulierten CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen wurden footprints im Bereich der E-Box, B-Seite und dem proximalen (GM-CSF) bzw. des distalen CREB/ATF/AP-1 Bindemotivs (NF-IL2A Motiv) festgestellt. Nach Stimulation der CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen mit PMA/PHA wurde eine zusätzliche Protein/DNA Interaktion im Bereich der AP-1 Zielsequenz registriert. Das Modell in Abbildung 4.2 zeigt, daß am IFN- $\gamma$  Promotor konstitutive und induzierbare Protein/DNA Interaktionen stattfinden. Hierbei ist jedoch die induzierbare IFN- $\gamma$

Promotoraktivität in naiven CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen sowie in *memory* CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen mit der Bindung von AP-1 an die C-Seite (-196 bis -183) assoziiert.



**Abbildung 4.2** Modell der *in vivo* Besetzung des IFN-γ Promotors in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen CD45RA<sup>+</sup> und CD45RO<sup>+</sup>. Das Modell wurde anhand der Resultate der *in vivo*-Footprinting Experimente (LM-PCR) entwickelt. Die induzierbare Besetzung der C-Seite (-196 bis -183) durch AP-1 (c-Jun/c-Fos) ist mit einem Pfeil markiert.



**Abbildung 4.3** Modell zur Corticosteroid Inhibition der AP-1 Bindung (-196 bis -183) im IFN-γ Promotor.

In Abbildung 4.3 ist ein Modell für die Repression der AP-1 Bindungsaktivität (-196 bis -183) im IFN- $\gamma$  Promotor durch Corticosteroide dargestellt. Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß Glucocorticoide die Bindung des AP-1 Komplexes an die C-Seite in CD45RO<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren und die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in transienten Reporterstudien drastisch reduzieren. Damit wurde eine potentielle molekulare Zielscheibe für die Aktion von Corticosteroiden im IFN- $\gamma$  Promotor identifiziert. Corticosteroide sind potente Inhibitoren zahlreicher Cytokine wie IL-2, IL-5 und TNF- $\alpha$ . Sie binden beispielsweise an NF- $\kappa$ B p65 und verhindern dadurch die NF- $\kappa$ B vermittelte Aktivierung von IL-2. Außerdem können Corticosteroide über eine Stimulation der I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor of  $\kappa$ B  $\alpha$ ) mRNA Synthese die Wirkung von NF- $\kappa$ B aufheben (Scheinmann et al. 1995, Almawi et al. 1996).

Corticosteroide sind bekannt für die Inhibition der Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierten Aktivierung von AP-1 (Adcock et al. 1994, Paliogianni et al. 1993). Cippitelli et al. zeigte 1995, daß Dexamethason die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität reprimiert. Der Autor konnte eine Dexamethason-vermittelte Inhibition der CREB/ATF/AP-1 Bindung an den IFN- $\gamma$  Promotor aufzeigen (Position -66 bis -47 und -96 bis -75). Dabei war der IFN- $\gamma$  Aktivitätsverlust, nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason, ähnlich stark ausgeprägt, wie bei der Cotransfektion eines dominant-negativen c-Jun/AP-1 Expressionsvektors. Andere Studien konnten belegen, daß der Corticosteroidrezeptor mit dem Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) interagiert. Dabei wird die Expression von CREB durch Dexamethason hochreguliert (Jungmann et al. 1992).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine komplexe und koordinierte Regulation der IFN- $\gamma$  Promotors in primären T-Zellen. Die hier ermittelten Daten zeigen, daß die Aktivierung der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität entlang der AP-1/C-Motiv Achse verläuft. Der Glucocorticoid-sensitive Transkriptionsfaktor AP-1, scheint für eine hohe IFN- $\gamma$  Promotoraktivität notwendig zu sein. Die Regulation von AP-1 *in vivo*, könnte somit ein wichtiger Kontrollmechanismus der aktivierten *memory* T-Helferzelle darstellen, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Interessanterweise wurde bereits demonstriert, daß etwa 200 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startseite, also im Bereich der hier identifizierten AP-1 Bindestelle (C-Seite), eine DNase I hypersensitive Seite (DHS) in IFN- $\gamma$  produzierenden Jurkat T-Zellen vorhanden ist (Hardy et al. 1986). Diese DHS spricht für eine Chromatinauflockerung in diesem Bereich und für den aktiven Zustand der dort gebundenen Transkriptionsfaktoren. Eine wahrscheinliche Ursache für die DHS ist das Ablösen oder Verdrängen des Nucleosoms durch Transkriptionsfaktoren, wobei AP-1 der ideale Kandidat wäre. Dieser Transkriptionsfaktor kann sowohl Nucleosomenstrukturen auflösen, als auch die DNA-Biegung induzieren, die ihm die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder dem Initiationskomplex an der TATA-Box ermöglicht.

## 4.2.2 Molekulare Regulation der IFN- $\gamma$ Promotoraktivität durch die Cytokine IL-12 und IL-18

$T_H1$  T-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und sind vor allem an der Entstehung von Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen beteiligt. IL-18 und IL-12 verstärken die IFN- $\gamma$  Produktion von  $CD4^+$  T-Zellen und agieren zudem synergistisch. Die Daten, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, demonstrieren die unterschiedliche Wirkungsweise beider Cytokine. Die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung setzt die DNA-Bindung von AP-1 und STAT-4 an den Promotor voraus. IL-18 hingegen aktiviert direkt den IFN- $\gamma$  Promotor via AP-1. Dieser differentielle molekulare Mechanismus gibt neue Einblicke in die  $T_H1$  Entwicklung und Differenzierung.

IL-12 ist ein wichtiges immunmodulatorisches Cytokin, das eine funktionelle Brücke zwischen der angeborenen, unspezifischen Immunität und der antigenspezifischen, adaptiven Immunität herstellt. Vor allem wird es von phagozytischen Zellen (Monocyten, Makrophagen, Neutrophilen) sowie von B-Zellen und dendritischen Zellen produziert. Ursprünglich hat man es konstitutiv in EBV (Epstein-Barr-Virus) transformierten B-Zelllinien gefunden. Die phagozytierenden Zellen produzieren dieses Cytokin als Immunantwort auf Bakterien, bakteriellen Produkten und intrazellulären Parasiten (Trinchieri 1995). Das biologisch aktive IL-12 Protein ist ein Heterodimer von 70 kd (p70), das von zwei glykosylierten Ketten von 40 kd (p 40) und 35 kd (p35) gebildet wird. Die genetische Kontrolle von IL-12 ist komplex, weil zwei unterschiedliche Gene verwendet werden, um das biologisch aktive Heterodimer zu produzieren. p35 Transkripte werden ubiquitär produziert von fast allen Zelltypen. Die Expression der p40 mRNA Transkripte korreliert jedoch mit der Synthese des biologisch aktiven p70 Heterodimers (Kobayashi et al. 1989, D'Andrea et al. 1992). IL-12 induziert die Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen und natürlichen Killerzellen nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor auf der jeweiligen Zielzelle. Die  $\beta 2$ -Kette des IL-12 Rezeptors wird nur auf  $T_H1$  Zellen exprimiert, während die  $\beta 1$ -Kette auf beiden,  $T_H1$  und  $T_H2$   $CD4^+$  Subpopulationen exprimiert wird. Beide Ketten des Rezeptors tragen somit zur Spezifität des IL-12 Signalmechanismus bei (Wu et al. 1997, Rogge et al. 1997, Szabo et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß IL-12 weder die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese noch die IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in T-Helferzellen per se induzieren kann. Erst nachdem costimulatorische Signale in Form löslicher  $\alpha CD3/\alpha CD28$  Antikörper hinzugefügt wurden, erfolgte die IL-12 induzierte IFN- $\gamma$  Aktivierung. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Jacobson et al. gezeigten Untersuchungen überein. Der Autor konnte in der murinen T-Zelllinie EL-4 keine Induktion der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität durch IL-12 nachweisen (Jacobson et al. 1995).

In weiteren experimentellen Untersuchungen wurden IL-12 abhängige, *cis*-regulatorische Elemente im IFN- $\gamma$  Promotor identifiziert. Mit Hilfe von *in vivo*-Footprinting Experimenten wurde nach IL-12 Stimulation eine veränderte DMS-Reaktivität in der Region einer STAT Bindestelle (-230) im IFN- $\gamma$  Promotor lokalisiert. Durch IL-12 wurde die STAT-4 DNA-Bindung induziert, während durch IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 sowohl die Besetzung des STAT-4 als auch des AP-1 Motivs erfolgte. Die Mutation dieser Bindemotive führte zur Aufhebung der IL-12 induzierten IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in transienten Reporterstudien. Die STAT Seite aus dem IFN- $\gamma$  Promotor wurde bereits früher, anhand von *in vitro* DNase I Footprinting Assays charakterisiert. Die Autoren hatten jedoch die funktionelle Bedeutung dieser Bindestelle nicht untersucht. Sie hatten jedoch nachgewiesen, daß rekombinante STAT-1 bzw. STAT-4 Proteine *in vitro* an diese Zielsequenz im IFN- $\gamma$  Promotor binden können (Xu et al. 1998). Zum ersten Mal konnten wir, anhand der genomischen *in vivo*-Footprinting Experimente und Transfektionsstudien, die IL-12 abhängige funktionelle Relevanz dieser STAT Bindestelle in CD4<sup>+</sup> T-Zellen demonstrieren (Barbulescu et al. 1998).

IL-12 aktiviert nach Bindung an seinen Rezeptor die Janus Tyrosinkinasen JAK2 und TYK2. Die aktivierten, phosphorylierten Tyrosinkinasen wiederum phosphorylieren STAT-3 und STAT-4 (*signal transducer and activator of transcription*) Transkriptionsfaktoren. Diese bilden Homo- bzw. Heterodimere und translozieren in den Nucleus, wo sie an spezifische Zielsequenzen, den sogenannten GAS ( *$\gamma$ -activation-sites*), binden (Jacobson et al. 1994, Thierfelder et al. 1996). Interessanterweise zeigt sich die kritische Rolle des IL-12/STAT-4 Signaltransduktionswegs auch durch den Befund, daß IL-12 (p40) und STAT-4 *knockout* Mäuse keine T<sub>H</sub>1 Antworten bzw. keine IFN- $\gamma$  Immunantwort mehr generieren können (Kaplan et al. 1996, Magram et al. 1996). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß die STAT-4 transgene Maus ein ausgeprägtes T<sub>H</sub>1 Profil und eine signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion aufweist (Wirtz et al. 1999).

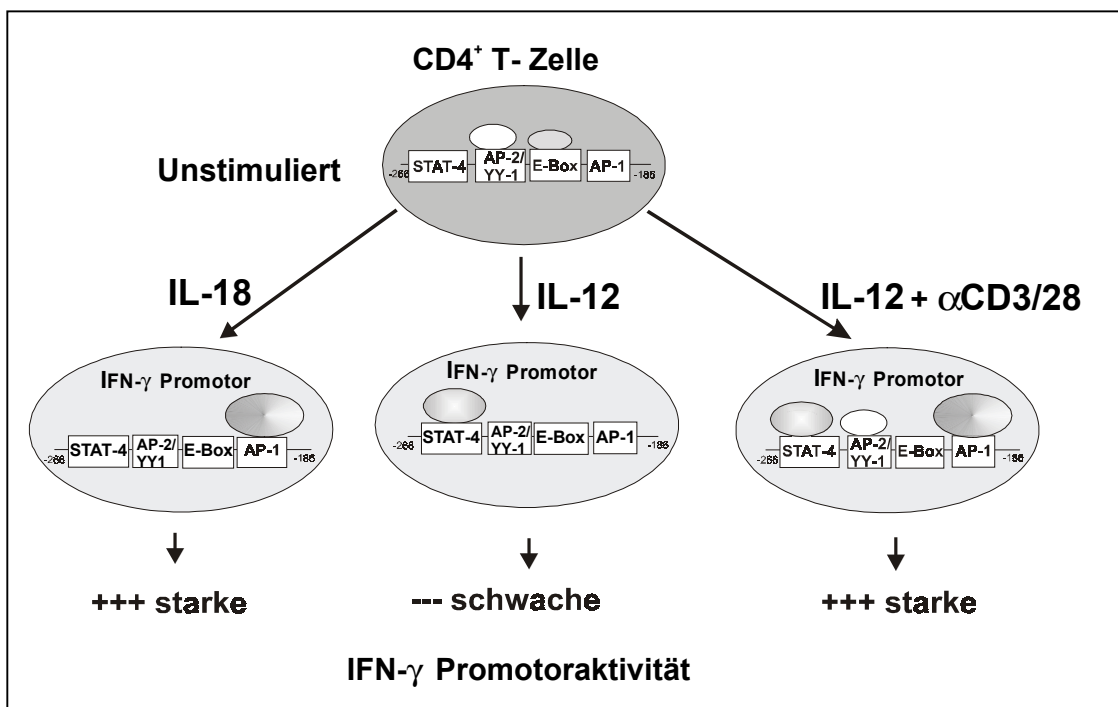
Die Ergebnisse der hier gezeigten Studien demonstrieren auch, daß die STAT-4 Bindung an den IFN- $\gamma$  Promotor zwar die Voraussetzung für die IL-12 abhängige Aktivierung darstellt, aber nicht ausreicht, um eine hohe IFN- $\gamma$  Genaktivität zu induzieren. Nach IL-12 plus  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Behandlung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wurden sowohl footprints im Bereich der STAT Bindungsseite (Position -236 stromaufwärts der transkriptionellen Startseite) als auch im Bereich eines AP-1 Bindemotivs des IFN- $\gamma$  Promotors (Position -190) festgestellt. Bereits im vorherigen Abschnitt wurde die Entdeckung und die funktionelle Relevanz dieses AP-1 Aktivatorelements im IFN- $\gamma$  Promotor diskutiert. Das Auftreten des AP-1 Komplexes nach IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 Behandlung der T-Zellen korrelierte mit der starken IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung und der erhöhten IFN- $\gamma$  Proteinproduktion. Interessanterweise führte sowohl die Mutation der STAT als auch der AP-1 Bindestelle zur Aufhebung der IL-12 plus  $\alpha$ CD3/28 vermittelten IFN- $\gamma$

Promotoraktivierung. Dieses Ergebnis kann nur darauf zurückgeführt werden, daß beide intakten Bindemotive für diesen Signaltransduktionsweg benötigt werden.

IL-18 (*IFN- $\gamma$  inducing factor*) wurde 1995 in der Leber von Mäusen, die mit *Propionibacterium acnes* und Lipopolysaccharid behandelt wurden, entdeckt. Dieses Cytokin wird vor allem von aktivierten Makrophagen sezerniert (Ushio et al. 1996, Okamura et al. 1995). Möglicherweise können IL-18 mRNA Transkripte auch von der T-Zelllinie EL-4, aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert werden (Tone et al. 1997). Andere Autoren fanden IL-18 Protein in Osteoblasten und im adrenalen Cortex (Conti et al. 1997; Udagawa et al. 1997). IL-18 wird hierbei als *precursor* Molekül synthetisiert, welches erst durch das Enzym ICE (*IL-1 $\beta$  converting enzyme* oder Caspase-1) in die aktive, reife Form prozessiert wird (Gu et al. 1997). IL-18 induziert die Produktion von IFN- $\gamma$  durch T<sub>H</sub>1 T-Zellen, erhöht die NK Cytotoxizität und entfaltet seine biologischen Aktivitäten in Synergie mit IL-12 (Robinson et al. 1997). Bislang wurde ein *low-affinity* IL-18 Rezeptor kloniert. Dieser Rezeptor ist identisch mit IL1Rrp (*IL-1 receptor-related protein*). Möglicherweise existiert noch ein *high-affinity* IL-18 Rezeptor (Torigoe et al. 1997). Die kritische Rolle von IL-18 wurde an IL-18 und IL-18 Rezeptor (IL1rRp) *knockout* Mäusen demonstriert. Diese Mäuse hatten Defekte in der NK Cytotoxizität und in der Generierung von T<sub>H</sub>1 Immunantworten, einschließlich IFN- $\gamma$  Produktion (Takeda et al. 1998, Hoshino et al. 1999).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, daß IL-18 sowohl die IFN- $\gamma$  Genexpression als auch die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese direkt induziert. Nach Stimulation mit IL-18 wurde ein footprint über ein AP-1 Bindemotiv im IFN- $\gamma$  Promotor (Position -190) festgestellt. *In vitro* Bindungsstudien mit nucleären Extrakten aus CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen demonstrierten, daß c-Jun/AP-1 Komplexe nach 3stündiger Behandlung der Zellen mit rekombinantem IL-18 induziert werden. Die Mutation der AP-1 *cis*-regulatorischen Sequenz bewirkte die Aufhebung der IL-18 induzierten IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung. Bereits 1998 wurden die Daten dieser Arbeit publiziert (Barbulescu et al. 1998). Interessanterweise wurden mittlerweile weitere Studien veröffentlicht, die einen über IL-18 und c-Jun Kinase (JNK) aktivierten Mechanismus, der zur AP-1 Phosphorylierung und Nucleustranslokation führt, zeigen. IL-18 und IL-18 Rezeptor *knockout* Mäuse demonstrierten sowohl eine reduzierte IFN- $\gamma$  Produktion als auch eine defiziente JNK Funktion (Hoshino et al. 1999, Takeda et al. 1998). Kanakaray et al. zeigte 1999, daß die IRAK (IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase) eine IL-18 Rezeptor assoziierte Kinase ist. In IRAK defizienten Mäusen fand keine JNK Aktivierung mehr statt, die IFN- $\gamma$  Produktion war drastisch reduziert und die NK Cytotoxizität war stark vermindert. Damit hatte diese IRAK *knockout* Maus einen ähnlichen Phänotyp wie die IL-18 bzw. IL-18 Rezeptor defiziente Maus. Außerdem wurde durch Kojima et al. die kritische Rolle von NF- $\kappa$ B und AP-1 bei der IL-18 induzierten IFN- $\gamma$  Genaktivierung demonstriert (Kojima et al. 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten zeigen, daß die IFN- $\gamma$  Gentranskription in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen differentiell durch IL-18 und IL-12 moduliert wird (siehe Modell 4.4). Während IL-18 direkt den IFN- $\gamma$  Promotor via AP-1 induziert, führt die Stimulation mit IL-12 zur Induktion der DNA-Bindungsaktivität von STAT-4. Erst die Costimulation von IL-12 mit löslichen  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 Antikörpern führt letztendlich zur STAT-4/AP-1 Induktion und somit zur IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung. Demzufolge sind die Aktivierung, Nucleustranslokation und Zielsequenzbindung der STAT-4 und AP-1 Transkriptionsfaktoren Hauptereignisse der transkriptionellen Aktivierung des humanen IFN- $\gamma$  Promotors in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Signalmechanismen könnten sowohl zur Kontrolle als auch zur Regulation der T<sub>H</sub>1 Differenzierung beitragen.



**Abbildung 4.4** Hypothetisches Modell zum molekularen Aktivierungsmechanismus des IFN- $\gamma$  Promotors in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-18, IL-12 und IL-12 plus  $\alpha$ CD3/CD28.

#### 4.2.3 IL-4 vermittelte GATA-3 Repression der induzierbaren IFN- $\gamma$ Promotoraktivierung in T-Zellen

Die in dieser Studie durchgeführten experimentellen Untersuchungen ergaben, daß IL-4 signifikant die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen reprimiert. Durch Einsatz von genomischem *in vivo*-Footprinting, EMSA und transienten Reporterassays wurde ein GATA-3 Bindemotiv im IFN- $\gamma$  Promotor identifiziert. Diese Sequenz dient als molekulare Zielscheibe für die Promotorrepression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Sowohl die basale als auch die IL-12 induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung wird *in vivo* durch einen IL-4/GATA-3 abhängigen Mechanismus kontrolliert. Die

Modulation dieses IL-4/GATA-3 Signaltransduktionswegs könnte somit eine Schlüsselrolle bei der Überwachung der humanen T-Zell-Aktivierung und Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 spielen.

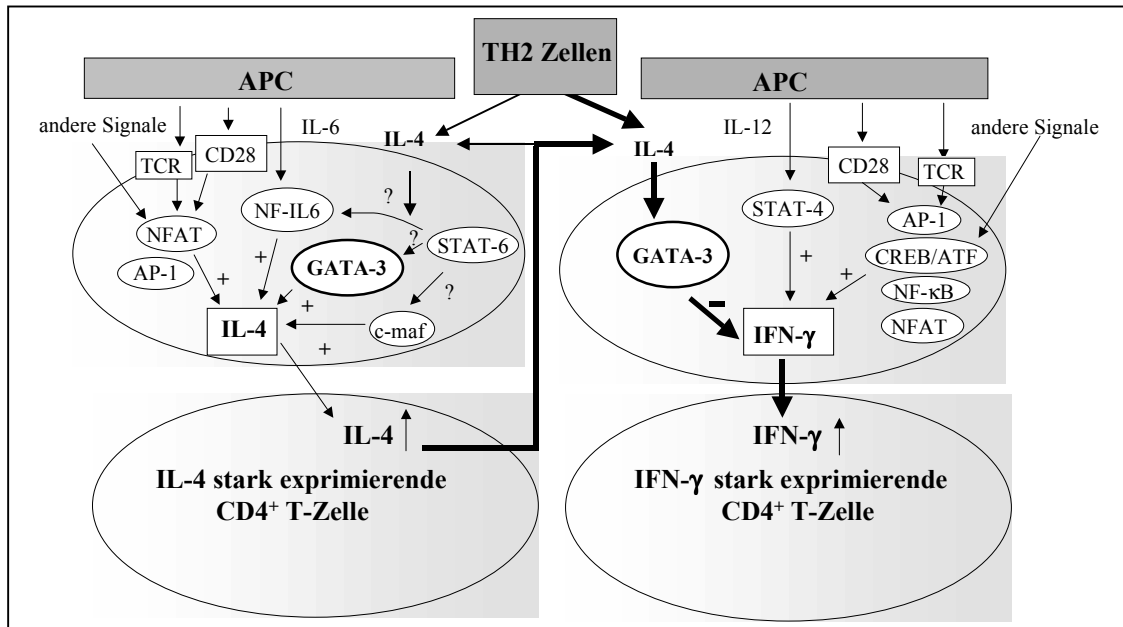
Die Produktion von IL-4 ist eine Eigenschaft von aktivierten T<sub>H</sub>2 Zellen, die eine Hauptfunktion bei der humoralen, Antikörper-vermittelten Immunität und bei allergischen Erkrankungen spielen. Das Cytokin IL-4 ist bekannt dafür, ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten, einschließlich Differenzierung von T- und B-Lymphocyten, Makrophagen und Zellen der hämatopoetischen Linie, zu regulieren. Zudem bildet IL-4 ein wichtiges Schutzschild gegen T<sub>H</sub>1-vermittelte Erkrankungen.

Auf der anderen Seite ist die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  ein charakteristisches Merkmal von T<sub>H</sub>1 T-Zellen. Diese Zellen aktivieren die zelluläre Immunität gegen Viren und intrazellulären Parasiten und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Seder und Paul 1994, Romagnani 1994).

Der molekulare Mechanismus der T-Zell-Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 ist weitgehend unbekannt. Die Antigenstimulation via TCR und costimulatorische Signale (B7/CD28) führen zu einer Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und zur Aktivierung von Proteinkinase C. Dieser Prozeß initiiert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP-1 und NFAT, die zur Induktion der Cytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-4 führen. Dabei ist der Differenzierungsweg determiniert durch die Umgebung, in welcher die naive T-Zelle auf die Antigenstimulation reagiert. Die Gegenwart von Cytokinen wie IL-12 und IL-4 spielt hierbei eine wichtige Rolle (Manetti et al. 1994, Seder et al. 1993, Le Gros et al. 1990, Swain et al. 1990, Murphy et al. 1994, Schmitt et al. 1994). IL-12 induziert die Phosphorylierung und Nucleustranslokation von STAT-4 in T<sub>H</sub>1 Zellen (Bacon et al. 1995). Im Kontrast dazu führt IL-4 zur Aktivierung von STAT-6 in T<sub>H</sub>2 Zellen. Diese Ergebnisse wurden durch die Untersuchungen von STAT-4 bzw. STAT-6 defizienten Mäuse bestätigt. Die *knockout* Mäuse waren nicht in der Lage T<sub>H</sub>1 bzw. T<sub>H</sub>2 Antworten zu generieren. Weitere Transkriptionsfaktoren haben bei der Entwicklung von IL-4 produzierenden T<sub>H</sub>2-Zellen eine bedeutende, regulatorische Funktion. Dazu gehören c-Maf, NFATp, NIP-45, NF-IL6 und GATA-3 (siehe Modell 4.5) (Davydov et al. 1995; Ho et al. 1996, Hodge et al. 1995, 1996a, 1996b; Ranganath et al. 1998).

In der vorliegenden Studie wurde demonstriert, daß in humanen T-Zellen IL-4 selbst ein transkriptioneller Repressor des T<sub>H</sub>1 Cytokins IFN- $\gamma$  darstellt. Die RT-PCR Analysen zeigten, daß IL-4 und TGF- $\beta$  die IFN- $\gamma$  mRNA Expression reprimieren. Andere Cytokine wie IL-7 und IL-16 hatten jedoch keinen Effekt auf die IFN- $\gamma$  mRNA Produktion. Allerdings ist die Rolle dieser Cytokine bezüglich der IFN- $\gamma$  Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen noch nicht geklärt. Rezente Untersuchungen demonstrierten, daß IL-16 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen die IL-2 Rezeptor  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette induziert (Parada et al. 1998). IL-7 hingegen schützt natürliche Killerzellen vor Apoptose und erhöht die allogenen stimulierte IFN- $\gamma$  Produktion in peripheren Blutlymphocyten (Armant et al. 1995, Bruserud et al.

1996). Mit IL-7 retroviral transfizierte T-Zellen zeigen jedoch keine direkte Veränderung der IFN- $\gamma$  Synthese (Kim et al. 1994). Folglich kann IL-7 die IFN- $\gamma$  Produktion nur indirekt verstärken. Warum die Cytokine IL-7 und IL-16 in den hier durchgeführten IFN- $\gamma$  Reporterstudien eine schwache Promotoraktivierung bewirkten, ist nicht verständlich. Möglicherweise handelt es sich um einen unspezifischen Effekt.



**Abbildung 4.5** Hypothetisches Modell zu den molekularen Mechanismen, die zur Differenzierung in Richtung IL-4 produzierender T-Zellen bzw. IFN- $\gamma$  produzierender T-Zellen führen. Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren, die bei der Genregulation aktivierend (+) oder hemmend (-) wirken können. Unbekannte Effekte sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Der Signaltransduktionsmechanismus der in dieser Studie ermittelt wurde, ist mit schwarzen Pfeilen hervorgehoben.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß IL-4 an Position -111 bis -87 des IFN- $\gamma$  Promotors einen spezifischen GATA-3 Proteinkomplex induziert. Nach Behandlung der T-Zellen mit IL-4, erfolgte die in vivo Besetzung der GATA DNA-Zielmotive. Funktionelle Untersuchungen demonstrierten, daß IL-4 über GATA-3 zu einer Repression der IL-12 induzierbaren Promotoraktivität führt. Dieser Kontrollmechanismus scheint charakteristisch zu sein für CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. CD4<sup>+</sup> depletierte Blutlymphocyten zeigten keine IL-4 vermittelte Induktion von GATA-3. Außerdem wurde die IFN- $\gamma$  Aktivität in den IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgenen Mäusen nur in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen aber nicht in CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch IL-4 reprimiert. Interessanterweise ist nur ein GATA Kernmotiv im IFN- $\gamma$  Promotor zwischen Maus und Mensch vollständig konserviert. Allerdings können GATA Faktoren auch an degenerierte DNA-Motive binden, so daß ein direkter Rückschluß aus der Sequenzvorgabe nicht möglich ist. Ob im murinen System die durch IL-12 induzierte Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors auch über die IL-4/GATA-3 Achse verläuft, kann erst durch weiterführende Studien ermittelt werden.

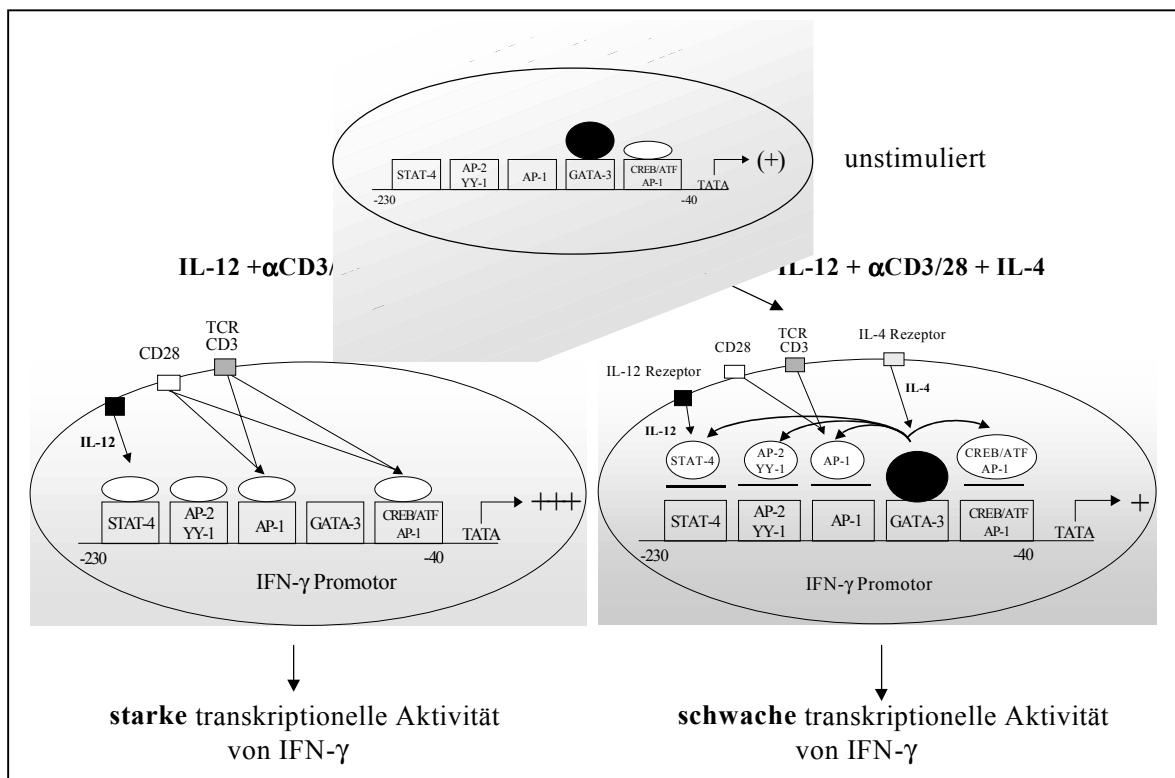
GATA-3 ist ein Mitglied der Transkriptionsfaktorfamilie GATA, die in Vertebraten 6 Mitglieder (GATA-1 bis-6) beinhaltet. Alle Familienmitglieder haben eine gemeinsame, konservierte Doppel-Zinkfinger-Struktur, die mit hoher Affinität an das DNA-Motiv (T/A)GATA (A/G) bindet. Die GATA-1 Expression beschränkt sich auf Erythrocyten, Mastzellen, Megakaryocyten und Sertolizellen in der Testis. Zusammen mit GATA-2 sind diese beiden Transkriptionsfaktoren vor allem für die Erythropoese essentiell (Pevny et al. 1991, Dorfman et al. 1992). GATA-4 bis -6 konstituieren eine distinkte Subfamilie, die vor allem im Herzen und im Darm während der Embryonalentwicklung exprimiert wird (Arceci et al. 1993). GATA-3 regulierte Gene wurden bislang erst in T-Lymphocyten gefunden. Dennoch haben detaillierte Studien ergeben, daß GATA-3 auch in der embryonalen Leber, in der Plazenta, in der Niere und dem embryonalen zentralen und peripheren Nervensystem produziert wird. GATA-3 homozygot defiziente Mäuse sterben nach 11-12 Tagen der Embryonalentwicklung. Die Embryonen zeigen hierbei massive innere Blutungen, Kleinwuchs, Deformationen des Gehirns und des Rückenmarks sowie Aberrationen der fötalen Leber-Hämatopoese (Pandolfi et al. 1995). Wie bereits beschrieben, wird GATA-3 in T-Lymphocyten stark exprimiert. Untersuchungen ergaben, daß es die T-Zell-Rezeptor Genexpression sowie die Thymocytenentwicklung reguliert (Hattori et al. 1996, Ko et al. 1991). Möglicherweise muß GATA-3 im frühesten Stadium der T-Zell-Entwicklung vorhanden sein, denn embryonale Stammzellen aus GATA-3 *knockout* Mäusen entwickeln keine doppelt negativen Vorläuferzellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Diese sind die Vorläuferzellen von doppelt positiven (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) Thymocyten, die letztendlich zu einfach positiven CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten ausdifferenzieren (Ting et al. 1996). In reifen T-Zellen wird GATA-3 selektiv in naiven T-Zellen und T<sub>H</sub>2 Zellen exprimiert. Es reguliert hierbei sowohl die T<sub>H</sub>2 Entwicklung als auch die Promotoraktivität der T<sub>H</sub>2 Cytokine IL-4 und IL-5 (Zhang et al. 1998a, Siegel et al. 1995). Im Gegensatz dazu ist die GATA-3 Expression in T-Zellen, die eine hohe Expression von IFN- $\gamma$  aufweisen, stark reduziert bzw. aufgehoben (Zheng und Flavell 1997).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde demonstriert, daß der IFN- $\gamma$  Promotor selbst über potentielle GATA Zielsequenzen verfügt. Die GATA Bindestelle wurde anhand von *in vivo* genomischem Footprinting lokalisiert. Die Sequenz enthält zwei GATA Bindemotive, die zwischen -111 und -87 stromaufwärts der transkriptionellen Startseite des IFN- $\gamma$  Promotors positioniert sind. Dieses DNA-Motiv bindet *in vitro* einen IL-4 induzierbaren GATA-3 Komplex. Um die funktionelle Relevanz des IL-4 induzierbaren Komplexes an der GATA Seite im IFN- $\gamma$  Promotor zu analysieren, wurden beide GATA Motive mutiert und somit die Bindung von GATA-3 aufgehoben. Das hatte eine starke Zunahme der Promotoraktivität zur Folge, was auf eine Repressorfunktion von GATA-3 im IFN- $\gamma$  Promotor zurückschließen läßt. Eine repressorische Funktion von GATA Proteinen konnte erstmals im  $\epsilon$ -Globin Gen

nachgewiesen werden. Dort ist GATA-1 an der Formation eines Repressorkomplexes beteiligt, das die Interaktion zwischen Locus Kontroll Region (LCR) und  $\epsilon$ -Globin Promotor verhindert. Folglich wird die  $\epsilon$ -Globin Genexpression reprimiert (Raich et al. 1995).

Bereits andere Arbeitsgruppen haben versucht, die Funktion der GATA Motive im IFN- $\gamma$  Promotor zu analysieren. Sie fanden nach Einführung von 10 bp Deletionen innerhalb der proximalen oder distalen GATA Bindestelle keine signifikante Veränderung der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in transienten Reporterstudien (Penix et al. 1993). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durch mehrere Schlußfolgerungen begründet werden. Erstens wurden in der vorliegenden Arbeit andere experimentelle Systeme einschließlich Reportervektoren, Transfektionstechniken und Stimulationszeitpunkte gewählt. Zweitens wurden mit *in vivo*-Footprinting Experimenten eindeutige Veränderungen der DMS-Reaktivitäten in beiden GATA Kernmotiven festgestellt. Demzufolge wurden auch beide Bindestellen mutiert. Bei der von Penix et al. publizierten Untersuchung wurden keine GATA Mutanten hergestellt, die Mutationen in beiden GATA Zielsequenzen enthalten. Bekanntlich haben GATA Proteine eine höhere Affinität zu doppelten bzw. multiplen GATA Bindesequenzen als zu einfachen GATA Motiven (Ko und Engel 1993). TCR $\delta$ ,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin sowie IL-5 haben zwei benachbarte GATA Bindestellen innerhalb ihrer Promotorsequenz. Diese GATA Motive treten entweder überlappend auf, wie im Falle des IL-5 Promotors oder sind meistens 8-9 Basenpaare voneinander entfernt, wie beispielsweise im  $\alpha$ Globin bzw. IFN- $\gamma$  Promotor (Jarman et al. 1991). Eine Veröffentlichung von Siegel et al. zeigte 1995, daß im IL-5 Promotor die Mutation beider GATA Motive die Bindung von GATA-3 *in vitro* stärker abschwächt als die Mutation des proximalen bzw. distalen GATA Bindungselements. Die Schlüsselrolle des GATA Motivs für die IL-4 vermittelte Repression des IFN- $\gamma$  Promotors wurde in der vorliegenden Arbeit bewiesen, indem gezeigt wurde, daß die Aktivität des GATA-mutierten Konstrukts nicht mehr durch IL-4 reprimiert wird. Weiterhin führte die Cotransfektion mit dem GATA-3 Expressionsvektor zu einer dosisabhängigen Abschwächung der IFN- $\gamma$  Reporteraktivität. Diese Daten demonstrieren zum ersten Mal einen direkten Nachweis der GATA-3 vermittelten Suppression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in primären T-Zellen. Die Repression der induzierbaren Promotoraktivität scheint jedoch nicht spezifisch für das Protein GATA-3 zu sein. Die Cotransfektion mit GATA-1 und GATA-2 reprimierte auch die Aktivität des IFN- $\gamma$  Promotors. GATA Faktoren verfügen über homologe DNA-Bindemotive, so daß unterschiedliche GATA Faktoren ähnliche DNA Sequenzen erkennen. Möglicherweise ist die Spezifität der GATA Transkriptionsfaktoren auch durch bestimmte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellsubpopulationen vorgegeben (Yamamoto et al. 1990, Merika und Orkin 1993). Die Cotransfektion eines dominant negativen GATA-3 (KRR) Expressionsvektors, welcher ein DNA-bindendes GATA Protein ohne Transaktivie-

lungspotential exprimiert, zeigte keinen reprimierenden Effekt mehr auf die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität. Möglicherweise ist die DNA-Bindung der GATA Proteine nicht ausreichend, um ihre spezifischen Funktionen zu vermitteln. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vivo*-Footprinting Experimente zeigen, daß Protein/DNA Interaktionen im Bereich verschiedener regulatorischer Elemente, wie beispielsweise AP-1, STAT-4 und CREB/ATF, nach Behandlung der Zellen mit IL-4, nicht mehr stattfanden. *In vitro* Protein/DNA Interaktionen an diesen Bindestellen blieben jedoch, nach Stimulation der primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit IL-4, unverändert. Die letztgenannten Befunde wurden durch Gelshiftassays analysiert. Anhand der Ergebnisse kann ein hypothetisches Modell aufgestellt werden, in welchem die IL-4 induzierte Bindung von GATA-3 zu Protein/Protein Interaktionen oder konformationellen Veränderungen am IFN- $\gamma$  Promotor führt, welche die DNA-Bindung von anderen *trans*-aktivierenden Faktoren verhindern (siehe Abbildung 4.6).



**Abbildung 4.6** Hypothetisches Modell zur IL-4/GATA-3 vermittelten Suppression der IL-12 induzierten IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung.

Für das in Abbildung 4.6 entwickelte Modell sprechen auch Untersuchungen an der humanen  $\beta$ -Globin Locus Kontrollregion (HS4). Im HS4 interagieren GATA-1 Proteine mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1. Diese Prozesse führen zur Ausbildung der erythroid-spezifischen Chromatinstruktur, welche sowohl das Ergebnis der Repositionierung von Nucleosomen als auch der spezifischen, tertiären DNA-Struktur ist (Raich et al. 1995).

Die Ergebnisse, die in dieser Studie erarbeitet wurden, sind durch rezente Untersuchungen bestätigt worden. Die Autoren konnten in Mäusen eine GATA-3 vermittelte Repression der IL-12 induzierten IFN- $\gamma$  Synthese während der initialen T-Zell-Entwicklung demonstrieren (Ouyang et al. 1998). Diese Studie beschränkte jedoch den Mechanismus der Repression auf die IL-12R $\beta$ 2 Kette. Die Autoren führten den supprimierenden Mechanismus darauf zurück, daß T-Zellen ohne den spezifischen Rezeptor für IL-12 kein IFN- $\gamma$  mehr produzieren können. Sie postulierten somit einen indirekten oder posttranskriptionellen Mechanismus, bei dem der IFN- $\gamma$  Promotor durch GATA-3 nicht beeinflusst wird. Bei Cotransfektionen eines Reporter-genkonstrukts, das 200 bp vom murinen IFN- $\gamma$  Promotor enthält, mit dem GATA-3 Expressionsvektor, wurde keine Abschwächung der Reporter-genaktivität in der murinen T-Zelllinie EL-4 festgestellt. Es gibt zahlreiche, potentielle Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen der hier durchgeführten Studie und der von Ouyang et al. publizierten Untersuchung. Zunächst könnte es Zelllinien oder Spezies spezifische Unterschiede geben. In der vorliegenden Arbeit wurden humane Jurkat T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen verwendet, während der Autor murine EL-4 T-Zellen für die Reporter-genstudien eingesetzt hat. Das GATA-3 Element des humanen IFN- $\gamma$  Promotors ist nämlich im murinen Promotor nicht vollständig konserviert. Zweitens wurde hier beobachtet, daß die signifikante Repression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität durch GATA-3 erst nach 10stündiger Stimulation der T-Zellen erfolgt, während in der von Ouyang et al. publizierten Untersuchung Stimulationszeitpunkte von 4 Stunden verwendet wurden. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit ein längeres IFN- $\gamma$  Promotorfragment (410 bp) in den transienten Transfektionen verwendet. Dieses Fragment enthält eine IL-12 induzierbare STAT-4 Bindestelle, die eine potentielle molekulare Zielscheibe für die GATA-3 vermittelte Repression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung darstellt.

Die in diesem Abschnitt diskutierten Untersuchungen demonstrieren, daß die basale und die IL-12 induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* von dem T<sub>H</sub>2 Cytokin IL-4, via einem GATA-3 abhängigen Mechanismus, kontrolliert wird (Modell 4.5 und Modell 4.6). Somit wurden neue molekulare Aspekte beleuchtet, die für die T-Zell-Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 substantiell sein könnten.

### 4.3 Die Regulation des humanen IFN- $\gamma$ Promotors in der transgenen Reportergergen Maus

Zur Überprüfung der funktionellen transienten IFN- $\gamma$  Reportergergenstudien in primären humanen T-Zellen und zur Analyse der IFN- $\gamma$  Genregulation *in vivo* wurden IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgene Mäuse hergestellt. In den FVB/NHSD transgenen Mäusen ist die Luciferase-Reportergergenaktivität von einem humanen, 410 bp IFN- $\gamma$  Promotorfragment reguliert. Dieses Konstrukt stammt aus dem pXP-IFN- $\gamma$  Luciferase-Vektor und wurde in zahlreichen Reportergergenstudien *in vitro* analysiert. Dieses Fragment wurde ausgewählt, weil diese Sequenz alle notwendigen *cis*-regulatorischen Elemente enthält, welche die T-Zell-spezifische IFN- $\gamma$  Genaktivierung ausmachen. Die Reportergergenaktivität der 400 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartseite des IFN- $\gamma$  Promotors ist hierbei genauso hoch wie die Aktivität der gesamten 5' flankierenden IFN- $\gamma$  Promotorsequenz (circa 2,3 kb). Im Gegensatz dazu weisen die Enhancerelemente aus dem ersten Intron des IFN- $\gamma$  Gens keine T-Zell-Spezifität auf, da ihre transkriptionelle Aktivierung durch Phorbolester auch in Fibroblasten induzierbar ist (Ciccarone et al. 1990). Außerdem zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten LM-PCR Analysen, daß innerhalb der 400 bp stromaufwärts der transkriptionellen Startseite die hauptsächlichen Protein/DNA Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor stattfinden.

Die Mikroinjektion zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde hierbei von PD Dr. rer. nat. Manfred Blessing und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Dabei wurden drei positive Founder hergestellt, die weitergekreuzt wurden. Die mittels PCR ermittelten, positiven, transgenen Mäuse aus der F2 Generation wurden analysiert. Die Mäuse waren phänotypisch normal, und sie zeigten keine histologischen Veränderungen der untersuchten Organe. Somit wurde durch die Integration des Transgens kein anderes Gen ausgeschaltet bzw. beschädigt. Interessanterweise wurde keine Korrelation zwischen Kopienanzahl des Transgens und der Reportergergenaktivität festgestellt. Ähnliche Befunde zur fehlenden Korrelation wurden auch von anderen Autoren bei der Analyse von Reportergergen Mäusen erstellt (Aune et al. 1997).

In weiterführenden Untersuchungen wurden Milzzellen aus 6-8 Wochen alten FVB/NHSD transgenen Mäusen isoliert und für 48 Stunden in Zellkultur mit verschiedenen Faktoren stimuliert. Die Daten zeigten eine induzierbare Luciferase-Aktivität nach Stimulation mit  $\alpha$ CD3/28 aber nicht mit LPS/SAC, was für eine transgene Expression des Reportergergenkonstrukts in T-Zellen spricht. Bereits 1989 wurden von Young et al. IFN- $\gamma$  transgene Mäuse hergestellt (Young et al. 1989b). In diese Mäuse wurde ein 8,6 kb Fragment der humanen genomischen DNA integriert, welches das komplette IFN- $\gamma$  Gen enthält. Der Autor stellte fest, daß humanes IFN- $\gamma$  in keines der untersuchten Gewebe konstitutiv exprimiert wird. Weiterhin wurde beobachtet, daß die Synthese des

humanen, biologisch aktiven IFN- $\gamma$  Proteins nur im Thymus und in Milzzellen durch T-Zell Mitogene wie PMA und Ionomycin induziert wird. Das Cytokin wird hierbei nicht von LPS stimulierten B-Lymphocyten produziert. Die Schlußfolgerung aus diesen Studien war, daß es *in vivo* entwicklungspezifische Faktoren geben muß, welche die Expression von IFN- $\gamma$  auf T-Zellen beschränken.

Mittlerweile gibt es Veröffentlichungen welche postulieren, die *cis*-regulatorischen Elemente des humanen IFN- $\gamma$  Promotors gefunden zu haben, welche die T-Zell-Spezifität von IFN- $\gamma$  ausmachen. Hierbei handelt es sich um eine distale CREB/ATF1 sowie Jun/ATF2 bindende Sequenz (-98 bis -78) und eine proximale CREB/ATF1 sowie Jun/ATF2 (-70 bis -44) Bindesequenz (Aune et al. 1997). Die Autoren haben hierbei zwei Sets transgene Mäuse hergestellt, die entweder 2 Kopien des proximalen Elements oder 4 Kopien des distalen Elements oberhalb eines Luciferase-Gens enthielten. Zunächst stellten die Autoren fest, daß keine Korrelation zwischen Kopienanzahl des Transgens und der Luciferase-Aktivität vorhanden ist. Diese Feststellung steht in Einklang mit den hier erzielten Resultaten. Zweitens stellten sie fest, daß die transkriptionelle Aktivierung beider Elemente in CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt, während in CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur die Aktivierung des distalen Elements stattfindet. Interessanterweise konnten die Autoren nur eine hohe transkriptionelle Aktivierung dieser Elemente in CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen und cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aber nicht in B-Zellen, Hepatocyten, Thymocyten und Fibroblasten feststellen (Aune et al. 1997). Weiterführende Veröffentlichungen über diese transgenen Mäuse demonstrierten, daß CREB/ATF1 Proteine in CD4<sup>+</sup> T-Vorläuferzellen eher eine IFN- $\gamma$  repressorische Funktion haben. Weiterhin wurde beobachtet, daß IFN- $\gamma$  produzierende Effektor T-Zellen transkriptionell aktivierende Jun/ATF2 Komplexe überexprimieren, welche die repressorischen CREB/ATF1 Proteine von ihren Bindungsstellen am IFN- $\gamma$  Promotor verdrängen. Dieses Modell wurde vor allem anhand von Gelshift Experimenten aufgestellt (Zhang et al. 1998b).

Die transgenen Mäuse, die in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, weisen auch eine induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung in T-Zellen auf. Es ist jedoch unklar, ob die Spezifität auf CREB/ATF1 bzw. Jun/ATF2 bindende *cis*-regulatorische Elemente zurückzuführen ist. Im Rahmen der Dissertation wurde die funktionelle Relevanz der AP-1, STAT-4 und GATA-3 Bindestelle für die Promotoraktivierung erarbeitet. Höchstwahrscheinlich gibt es aber noch weitere Elemente innerhalb dieser 410 Basenpaar-Sequenz, die für die transkriptionelle Aktivierung von Bedeutung sind, aber bislang nur unzureichend charakterisiert wurden.

Eine maximale IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung erfolgte nach Stimulation der murinen transgenen Milzzellen sowie der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen für 48 Stunden mit  $\alpha$ CD3/28 bzw.  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten der transienten Transfektionen. Somit wird die essentielle Rolle des IL-12/STAT-4 Signalmecha-

nismus und der  $\alpha$ CD3/28 vermittelten AP-1 Aktivierung bestätigt. Weiterhin wurde festgestellt, daß die Reporter-genaktivität in den murinen CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Lymphocyten um ein Vielfaches höher war als in den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Interessanterweise zeigten bereits frühere Publikationen, daß cytotoxische T-Lymphocyten bis zu zehnmal mehr IFN- $\gamma$  Protein sezernieren als CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Conlon et al. 1995). Somit bestätigt die transgene Maus die T-Zell-Spezifität des aktivierbaren IFN- $\gamma$  Genkonstrukts. Die  $\alpha$ CD3/28 induzierte IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung konnte in den untersuchten cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten nicht durch die Coapplikation der Cytokine IL-12 oder IL-18 hochreguliert werden, was dafür spricht, daß die IFN- $\gamma$  Regulation durch diese Cytokine keine bedeutende Rolle in CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten spielt.

Eine Diskrepanz zwischen den transienten Transfektionen des IFN- $\gamma$  Reportergens und der transgenen Maus wurde hinsichtlich der Rolle des IL-18 Cytokins und der PMA/Ionomycin Stimulation beobachtet. Wie bereits diskutiert, führte IL-18 via einem AP-1 vermittelten Mechanismus zur Induktion der IFN- $\gamma$  Promotoraktivität. In den transgenen Tieren wurde eine durch IL-18 vermittelte direkte Aktivierung der Luciferase-Aktivität nicht beobachtet. Statt dessen erfolgte in diesem System eine Hochregulation der  $\alpha$ CD3/28 induzierten Luciferase-Aktivität durch Coapplikation von IL-18. Diese unterschiedlichen Resultate können darauf zurückzuführen sein, daß der durch IL-18 vermittelte Signaltransduktionsweg in humanen und murinen T-Zellen unterschiedlich ist. Frühere Veröffentlichungen demonstrierten, daß in murinen T-Zellen IL-18 in Synergie mit IL-12 die IFN- $\gamma$  Proteinsynthese induziert (Robinson et al. 1997). Außerdem führt IL-18 sowohl zur Aktivierung von AP-1 als auch NF- $\kappa$ B (Hoshino et al. 1999). Es gibt zwei NF- $\kappa$ B Bindestellen im IFN- $\gamma$  Promotor, die bei -796 und -284 stromaufwärts der transkriptionellen Startseite lokalisiert sind (Sica et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch sowohl für die transiente Transfektion als auch zur Herstellung der transgenen Mäuse eine 410 bp Sequenz aus dem IFN- $\gamma$  Promotor verwendet, welche nur eine dieser NF- $\kappa$ B Bindestellen (Position -284) umfaßt. PMA/Ionomycin war in den transienten Transfektionen eines der stärksten Stimuli zur Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors. Phorbol-ester führen hierbei zur Aktivierung der Proteinkinase C und zur Erhöhung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Spiegel. In den untersuchten Milzzellen der transgenen Maus, fand die Aktivierung des Promotors T-Zell-spezifisch durch  $\alpha$ CD3/28 statt. Dieses Resultat weist darauf hin, daß die Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor und costimulatorische Signale erfolgt.

Interessanterweise reprimierte IL-4 die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in den murinen, transgenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen aber nicht in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der transienten Reporter-genstudien und weist auf eine IL-4 vermittelte Repression des humanen IFN- $\gamma$  Promotors hin. Diese Repression scheint spezifisch für CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu sein. Sie wurde in den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der transgenen Mäuse nicht festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, daß IL-4 via

GATA-3 den humanen IFN- $\gamma$  Promotor reprimiert. Es wurde auch gezeigt, daß IL-4 die  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12 vermittelte GATA-3 Suppression hemmt. Dieser Mechanismus führt zur GATA-3 Bindung an dessen Zielsequenz (-111 bis -87) und verhindert dadurch die transkriptionelle Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors.

Insgesamt betrachtet weisen die Resultate der Analysen von IFN- $\gamma$  Promotor transgenen Mäusen auf eine T-Zell-spezifische Expression hin. Hierbei ist keine konstitutive IFN- $\gamma$  Promotoraktivität vorhanden. Die transkriptionelle Aktivierung des humanen IFN- $\gamma$  Promotors in den transgenen Tieren findet sowohl in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch in CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen statt. Hierbei wird die Promotoraktivität sowohl durch T-Zell-spezifische Agenzien wie  $\alpha$ CD3/CD28 und Cytokine wie IL-12 induziert als auch durch IL-4 reprimiert.

#### 4.4 Perspektiven

Im Rahmen der Dissertation wurde die Genregulation von IFN- $\gamma$  in T-Zellen analysiert. IFN- $\gamma$  ist für seine immunmodulatorischen und antiviralen Eigenschaften bekannt. Einerseits ist IFN- $\gamma$  für die protektive Immunität gegen bakterielle und virale Infektionen wichtig (Bellamy et al. 1998, Louis et al. 1998, Shen et al. 1998, Ibelgaufts et al. 1992). Andererseits ist dieses Cytokin auch an der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Transgene Mäuse, die IFN- $\gamma$  in der Leber überexprimieren, entwickeln eine chronisch aktive Hepatitis. Die Schlüsselrolle von IFN- $\gamma$  in Autoimmunerkrankungen wurde mit Hilfe transgener Mäuse demonstriert, die in pankreatischen  $\beta$ -Zellen IFN- $\gamma$  unter der Kontrolle des humanen Insulinpromotors exprimieren. Diese Mäuse entwickeln eine Diabetes Mellitus, bei der inflammatorische Prozesse zur Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen führen (Sarvetnik et al. 1988, Toyonaga et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Mechanismen identifiziert, die zur Aktivierung des Promotors via AP-1 und STAT-4 sowie Repression via GATA-3 in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen beitragen. Die 5'-flankierende IFN- $\gamma$  Promotorsequenz zeigt aber auch noch nicht charakterisierte Elemente, wie beispielsweise hypothetische NFAT-Bindestellen und ein E-Box Element. Weiterhin gibt es auch noch andere, zwischen Maus und Mensch konservierte Elemente, deren Bedeutung man bislang nicht kennt. Weiterführende Gelshiftassays, *in vivo*-Footprinting Experimente und Reportergenstudien könnten hierbei zur Aufklärung der DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren in diesen Bereichen und zur funktionellen Relevanz dieser Sequenzen beitragen. Außerdem könnten daraus wichtige Erkenntnisse zu parallelen Mechanismen der Promotorregulation von Cytokingenen ermittelt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit hergestellte IFN- $\gamma$  Promotor/Luciferase transgene Maus ist wichtig für das Verständnis der IFN- $\gamma$  Genregulation *in vivo*. Der Vorteil der transge-

nen Maus besteht auch darin, daß man verschiedene Agenzien auf ihre *in vivo* Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Promotorregulation austesten kann. Weiterhin könnte anhand des Luciferase-Reportergens die Differenzierung von T-Zellen in Richtung IFN- $\gamma$  produzierender T<sub>H</sub>1 Zellen, sowie IL-4 produzierender T<sub>H</sub>2 T-Zellen analysiert werden. Weiterführende Experimente könnten demonstrieren, durch welche Mechanismen der IFN- $\gamma$  Promotor bei zahlreichen Erkrankungen aktiviert wird, und wie die Blockade der Aktivierung *in vivo* funktionieren kann. Das Reporter-gen Luciferase könnte hierbei als Marker von aktivierten CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 T-Zellen und cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphocyten dienen und deren Involvierung in chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen demonstrieren. Die daraus erworbenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen.

Die Dissertation wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Markus F. Neurath erstellt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe besteht vor allem in der Analyse von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CEDE). Die transgene Maus könnte zur Analyse der Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors bei CEDE verwendet werden. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden bereits STAT-4 transgene Mäuse hergestellt. Dabei wurde festgestellt, daß STAT-4 transgene Mäuse chronische Darmentzündungen (Colitis) entwickeln und IFN- $\gamma$  im Darm überexprimieren. Durch Kreuzung der transgenen Tiere könnte direkt die Rolle von STAT-4 bei der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung ermittelt werden. Auch die daran beteiligten T-Zellen könnten somit charakterisiert werden. Andere Kreuzungen mit transgenen Mäusen, die bestimmte Transkriptionsfaktoren überexprimieren (z. B. GATA-3, c-Jun, c-Fos) wären auch denkbar. Eine weitere Perspektive wäre die Herstellung von IFN- $\gamma$  Reporter-gen transgenen Mäusen, die Punktmutationen innerhalb der relevanten *cis*-regulatorischen Elementen aufweisen. Dabei könnte analysiert werden, wie die Aktivierung des Reportergens in bestimmten Krankheitsmodellen abläuft. Damit könnte die direkte Beteiligung eines bestimmten Transkriptionsfaktors bei einer bestimmten Erkrankung, und gleichzeitig seine Funktion bei der Regulation des IFN- $\gamma$  Promotors ermittelt werden.

## 5 Zusammenfassung

Interferon- $\gamma$  ist ein Cytokin, das von aktivierten T-Helferzellen, natürlichen Killerzellen (NK) und cytotoxischen T-Lymphocyten produziert wird. Es induziert die zelluläre Immunabwehr gegen virale und bakterielle Infektionen. Damit dient es der protektiven Funktion des Immunsystems gegenüber Infektionen. Andererseits ist dieses Cytokin in Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen involviert. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Protein/DNA Interaktionen am Interferon- $\gamma$  Promotor in T-Lymphocyten analysiert. Die Resultate sollen zum Verständnis der molekularen Mechanismen der IFN- $\gamma$  Genregulation beitragen.

Zunächst wurde der IFN- $\gamma$  Promotor mit Hilfe von *in vivo*-Footprinting Experimenten in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und Jurkat T-Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigten konstitutive und induzierbare Protein/DNA Interaktionen am IFN- $\gamma$  Promotor. Hierbei wurde ein neues DNA-Bindemotiv identifiziert (Position -196 bis -183 bp), das für die induzierbare IFN- $\gamma$  Promotoraktivität in T-Zellen essentiell ist. Gelshiftassays demonstrierten, daß der Transkriptionsfaktor AP-1 (c-Jun/c-Fos) an dieses DNA-Motiv bindet. Mutationen im Bereich des Kernmotivs der AP-1 Bindestelle führten zu einer drastischen Reduktion der induzierbaren Promotoraktivität. Damit wurde AP-1 als wichtiges Aktivatorelement des IFN- $\gamma$  Promotors in T-Zellen charakterisiert.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, daß IL-12 und IL-18 unterschiedlich die transkriptionelle Aktivität des IFN- $\gamma$  Promotors regulieren. Die Ergebnisse demonstrierten, daß die  $\alpha$ CD3/28 plus IL-12-abhängige Aktivierung des Promotors über AP-1 und STAT-4 Bindung an ihre entsprechende Zielsequenzen (-196 bis -183 und -224 bis -215) erfolgt. Dagegen aktiviert IL-18 den IFN- $\gamma$  Promotor direkt über AP-1.

Weiterhin wurde die Wirkung verschiedener Cytokine auf den IFN- $\gamma$  Promotor getestet. Dabei sollten die molekularen Mechanismen zur Entwicklung und Differenzierung von T<sub>H</sub>1 T-Zellen determiniert werden. Bei diesen Untersuchungen wurde die Funktion des T<sub>H</sub>2 Cytokins IL-4 analysiert. In funktionellen Reportergergenstudien wurde in CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine signifikante Repression der IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung durch IL-4 festgestellt. *In vivo*-Footprinting Experimente demonstrierten, daß IL-4 die Protektion zweier GATA Motive verursacht, die sich an Position -111 bis -87 des IFN- $\gamma$  Promotors befinden. Gelshiftassays zeigten, daß diese Zielsequenz ein Bindemotiv für GATA-3 darstellt. GATA-3 war in unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen vorhanden, wurde jedoch durch IL-12 herunterreguliert. IL-4 verhinderte die Suppression des Transkriptionsfaktors GATA-3. Transiente Reportergergenstudien demonstrierten, daß die Mutation der GATA-3 Zielsequenz sowohl die basale als auch die IL-12 abhängige IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung verstärkt. Außerdem wurde durch die Mutation der GATA Motive die repressorische Wirkung von IL-4 aufgehoben. Somit könnte der IL-4/GATA-3

Signaltransduktionsmechanismus die T-Zell-Differenzierung in Richtung IFN- $\gamma$  produzierender T<sub>H</sub>1 Zellen oder in Richtung IL-4 exprimierender T<sub>H</sub>2 Zellen kontrollieren. Für transiente Transfektionen wurde ein Vektorkonstrukt hergestellt, bei dem ein humanes IFN- $\gamma$  Promotorfragment von 410 bp oberhalb eines Luciferase-Reportergens kloniert wurde. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Manfred Blessing wurden transgene Mäuse hergestellt, bei denen dieses Fragment ins Genom integriert ist. Die Analyse der transgenen Mäuse zeigte eine T-Zell-spezifisch induzierbare Reportergenaktivität. Hierbei wurde keine konstitutive Aktivität in T-Zellen, B-Zellen, Fibroblasten oder Makrophagen festgestellt. Die transkriptionelle Aktivierung des IFN- $\gamma$  Promotors fand sowohl in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch in CD8<sup>+</sup> cytotoxischen T-Zellen statt. Hierbei demonstrierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere Luciferase-Aktivität. Die IFN- $\gamma$  Promotoraktivität wurde durch gleichzeitige Behandlung der T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor spezifischen Stimulantien wie  $\alpha$ CD3 und costimulatorischen Agenzien wie  $\alpha$ CD28 induziert. Cytokine wie IL-12 und IL-18 verstärkten die  $\alpha$ CD3/28 induzierte IFN- $\gamma$  Promotoraktivierung. Das T<sub>H</sub>2 Cytokin IL-4 reprimierte hingegen die IL-12 abhängige Promotoraktivierung in den murinen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., K.M. Murphy, A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 387: 787-793.
- Adcock, I.M., C.R. Brown, H. Shirasaki, P.J. Barnes. 1994. Effects of dexamethasone on cytokine and phorbol ester stimulated c-Fos and c-Jun DNA binding and gene expression in human lung. *Eur. Respir. J.* 7: 2117-2123.
- Agarwal, S., A. Rao. 1998. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity* 9: 765-775.
- Aguet, M. 1990. The interferon- $\gamma$  receptor: a comparison with other cytokine receptors. *J. Interferon Res.* 10: 551-558.
- Almawi, W.Y., H.N. Beyhum, A.A. Rahme, M.J. Rieder. 1996. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J. Leukoc. Biol.* 60: 563-572.
- Angel, P., M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1072:129-157.
- Arceci, R.J., A.A.J. King, M.C. Simon, S.H. Orkin, D.B. Wilson. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2235-2246.
- Armant, M., G. Delespesse, M. Sarfati. 1995. IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression. *Immunology.* 85: 331-337.
- Aronow, B. J., C.A. Ebert, M.T Valerius, S.S Potter, D.A Wiginton, D.W. Witte, J.J. Hutton. 1995. Dissecting a locus control region: Facilitation of enhancer function by extended enhancer-flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1123-1135.
- Aune, T.M., L.A. Penix, M.R. Rincon, R.A. Flavell. 1997. Differential transcription directed by discrete gamma interferon promoter elements in naive and memory (effector) CD4 T cells and CD8 T cells. *Mol. Cell. Biol.* 17: 199-208.
- Barbulescu K., K.-M. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. Constitutive and inducible protein/DNA interactions of the interferon- $\gamma$  promoter in in vivo CD45RA and CD45RO T helper subsets. *Eur. J. Immunol.* 27: 1098-1107.
- Barbulescu, K., C. Becker, J.F. Schlaak, E. Schmitt, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1998. Cutting edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- $\gamma$  promoter in primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 160: 3642-3647.

- Barton, K., N. Muthusamy, M. Chanyangam, C. Fischer, C. Clendenin, J.M. Leiden. 1996. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB.
- Bellamy, R., A.V.S. Hill. 1998. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 483-487.
- Bertram, S., H.G. Gassen. 1991. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bruserud, O., L. Mentzoni, B. Foss, J. Bergheim, S. Berentsen, I. Nesthus. 1996. Human T-lymphocyte activation in the presence of acute myelogenous leukaemia blasts: studies of allostimulated interferon-gamma secretion. *Cancer. Immunol. Immunother.* 43: 275-282.
- Campbell, P.M., J. Pimm, V. Ramassar, P.F. Halloran. 1996. Identification of a calcium-inducible, cyclosporine-sensitive element in the IFN- $\gamma$  promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation.* 61: 933-939.
- Chen, Z., L. Parent, T. Maniatis. 1996. Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  by a novel ubiquitin-dependent kinase activity. *Cell* 84: 853-862.
- Chomczynski, P., N. Sacchi. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Ciccarone, V.C., J. Chrivia, K.J. Hardy, H.A. Young. 1990. Identification of enhancer-like elements in human IFN- $\gamma$  genomic DNA. *J. Immunol.* 144: 725-730.
- Cippitelli, M., A. Sica, V. Viggiano, J. Ye, P. Ghosh, M.J. Birrer, H.A. Young. 1995. Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun.
- Cleary, M.A., S. Stern, M. Tanaka, W. Herr. 1993. Differential positive control by Oct-1 and Oct-2: activation of a transcriptionally silent motif through Oct-1 and VP16 corecruitment. *Genes Dev.* 2:1570-1581.
- Conlon, K., J. Osborne, C. Morimoto, J.R. Ortaldo, H.A. Young. 1995. Comparison of lymphokine secretion and mRNA expression in the CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> subsets of human peripheral blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 644-648.
- Conti, B. J.W. Jahng, C. Tinti, J.H. Son, T.H. Joh. 1997. Induction of interferon- $\gamma$  inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272: 2035-2037.

- Corcoran, L.M., M. Karvelas. 1994. Oct-2 is required in T-cell independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity* 1: 635-645.
- Cortes, M., E. Wong, J. Koipally, K. Georgopoulos. 1999. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 167-171.
- Cowell, I.G. 1994. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem. Sci.* 19: 38-42.
- D'Andrea, A., M. Rengaraju, N.M. Valiante, J. Chehimi, M. Kubin, M. Kobayashi, D. Young, E. Nickbark, et al. 1992. Production of natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176: 1387-1398.
- Dalton, D.K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I.S. Figari, A. Bradley, T.A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes.
- Darnell, J.E. Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
- Davydov, I.V., P. H. Kramer, M. Li-Weber. 1995. Nuclear factor-IL-6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J. Immunol.* 155: 5273-5279.
- Dekker, N., M. Cox, R. Boelens, C.P. Verrijzer, P.C. van der Vliet, R. Kaptein. 1993. Solution structure of the POU-specific DNA-binding domain of Oct-1. *Nature* 362: 852-855.
- Di Marzio, P., P. Puddu, L. Conti, F. Bellardelli, S. Gessani. 1994. Interferon  $\gamma$  upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 179: 1731-1736.
- Dorfman, D.M., D.B. Wilson, G.A.P. Bruns, S.H. Orkin. 1992. Human transcription factor GATA-2. *J. Biol. Chem.* 267: 1279-1285.
- Ernst P., S.T. Smale. 1995. Combinatorial regulation of transcription. I: General aspects of transcriptional control. *Immunity* 2: 311-319.
- Fisher, A.L., M. Caudy. 1998. Groucho: Transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev.* 12: 1931-1940.
- Forrester, W.C., C. van Genderen, T. Jenuwein, R. Grosschedl. 1994. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin  $\mu$  gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* 265: 1221-1225.
- Garrity, P.A., D. Chen, E.V. Rothenberg, B.J. Wold. 1994. Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2159-2169.

- Gasser, S.M., U.K. Laemmli. 1987. A glimpse at chromosomal order. *Trends. Genet.* 3: 16-22.
- Glimcher, L.H., H. Singh. 1999. Transcription factors in lymphocyte development-T and B cells get together. *Cell* 96: 13-23.
- Gray, P.W., D.V. Goeddel. 1982. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 298: 859-863.
- Gu, Y., K. Kuida, H. Tsutsui, G. Ku, K. Hsiao, M.A. Fleming, N. Hayashi, K. Higashino, H. Okamura, K. Nakanishi, et al. 1997. Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* 275: 206-209.
- Haks, M.C., M.A. Oosterwegel, B. Blom, H. Spits, A.M. Kruisbeck. 1999. Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Sem. Immunol.* 11: 23-37.
- Hardy, K.H., B. Manger, M. Newton, J. Stobo. 1987. Molecular events involved in regulating human interferon- $\gamma$  gene expression during T cell activation. *J. Immunol.* 138: 2353-2358.
- Hardy, K.J., B.M. Peterlin, R.E. Atchison, J.D. Stobo. 1985. Regulation of expression of the human interferon  $\gamma$  gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8173-8177.
- Hattori, N., H. Kawamoto, S. Fujimoto, K. Kuno, Y. Katsura. 1996. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *J. Exp. Med.* 184: 1137-1147.
- Ho, I.-C., D. Lo, L.H. Glimcher. 1998. C-maf promotes Th2 and attenuates Th1 differentiation by both IL-4 dependent and independent mechanisms. *J. Exp. Med.* 188: 1859-1866.
- Ho, I.-C., M.R. Hodge, J.W. Rooney, L.H. Glimcher. 1996. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85: 973-983.
- Hodge, M.R., A.M. Ranger, C.F. de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, L.H. Glimcher. 1996a. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4:397-405.
- Hodge, M.R., H.J. Chun, J. Rengarajan, A. Alt, R. Lieberson, L.H. Glimcher. 1996b. NF-AT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 274:1903-1906.
- Hodge, M.R., J.W. Rooney, L.H. Glimcher. 1995. The proximal promoter of the IL-4 gene is composed of multiple essential regulatory sites that bind at least two distinct factors. *J. Immunol.* 154:6397-6405.

- Hoshino, K., H. Tsitsui, T. Kawai, K. Takeda, K. Nakanishi, Y. Takeda, S. Akira. 1999. Cutting edge: Generation of IL-18 receptor-deficient mice: Evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol.* 162: 5041-5044.
- Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R.M. Zinkernagel, M. Aguet. 1993. Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science* 259: 1742-1745.
- Ibelgaufts, H. 1992. *Lexikon Zytokine*. Medikon Verlag, München.
- Ibelgaufts, H. 1993. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH, Weinheim.
- Ihle, J.N. 1995. Cytokine receptor signaling. *Nature* 377: 591-594.
- Ihle, J.N. 1996. STATs: Signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331-334.
- Isaacs, A., J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. the interferon. *Proc. Roy. Soc. B.* 147: 258-267.
- Jacobson, N.G., S.J. Szabo, R.M. Weber-Nordt, Z. Zhong, R.D. Schreiber, J.E. Darnell, Jr., 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 (stat)4. *J. Exp. Med.* 181:1755-1762.
- Jain, J., C. Loh, A. Rao. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 333-342.
- Janeway, C.A., P.Travers. 1995. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jarman, A.P., W.G. Wood, J.A. Sharpe, G. Gourdon, H. Ayyub, D.R. Higgs. 1991. Characterization of the major regulatory element upstream of the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4679-4689.
- Jenuwein, T., W.C Forrester, L.A. Fernandez-Herrero, G. Laible, M. Dull, R. Grosschedl. 1997. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 385: 269-272.
- Johnson, P.F., S.L. McKnight. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 7999-839.
- Jones, P.L., G.J. Veenstra, P.A. Wade, D. Vermaak, S.U. Kass, N. Landsberger, J. Strouboulis, A.P. Wolffe. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet.* 19: 187-191.
- Jungmann, R.A., X.S. Wang, D.M. Milkowski, M.L. Short. 1992. Glucocorticoid induction of CRE-binding protein isoform mRNAs in rat C6 glioma cells. *Nucleic Acids Res.* 20: 825-839.

- Kaplan, M.H., Y.L. Sun, T. Hoey, M.J. Grusby. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in STAT4 deficient mice. *Nature* 382: 174-177.
- Karnitz, L.M, R.T. Abraham. 1995. Cytokine receptor signaling mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 7:320-326.
- Kellum, R., P. Schedl. 1992. A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer blocking assay. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2424-2431.
- Kim, J.H., S. Ratto, K.V. Sitz, J.D. Mosca, R.J. McLinden, K.L. Tencer, M.T. Vahey, D. St. Louis, D.L. Birx, R.R. Redfield. 1994. Consequences of stable transduction and antigen-inducible expression of the human interleukin-7 gene on tetanus-toxoid-specific T cells. *Hum. Gene. Ther.* 5: 1457-1466.
- Kioussis, D., R. Festenstein. 1997. Locus-control regions: Overcoming heterochromatin-induced gene activation in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 614-619.
- Knippers, R. 1995. *Molekulare Genetik*. 6. neubearbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ko, L.J, J.D. Engel. 1993. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4011-4022.
- Ko., L.J., M. Yamamoto, M.W. Leonard, K.M. George, P. Ting, J.D. Engel. 1991. Murine and human T-lymphocytes GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor  $\delta$  gene enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2778-2783.
- Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, 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: 827-846.
- Kojima, H., Y. Aizawa, Y. Yanai, K. Nakaoke, M. Takeuchi, T. Ohta, H. Ikegama, M. Ikeda, M. Kurimoto. 1999. An essential role for NF- $\kappa$ B in IL-18-induced IFN- $\gamma$  expression in KG-1 cells. *J. Immunol.* 162: 5063-5069.
- Kupfer, A., S.J. Singer. 1993. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 309-337.
- Le Gros, G., S.Z. Ben-Sasson, R.A. Seder, F.D. Finkelman, W.E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172:921-929.
- Li, X., W. McGinnis. 1999. Activity regulation of Hox proteins, a mechanism for altering functional specificity in development and evolution. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 96: 6802-6807.

- Louis, J., H. Himmelrich, C. Parra-Lopez, F. Tacchini-Cotier, P. Launois. 1998. Regulation of protective immunity against *Leishmania major* in mice. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 459-464.
- Manetti, R., F. Gerosa, M.G. Giudizi, R. Biagotati, P. Parronchi, M.-P. Piccini, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, G. Trinchieri. 1994. Interleukin 12 induces stable priming for interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN- $\gamma$  production in established Th2 cell clones. *J. Exp. Med.* 179:1273-1283.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory manual.* Chris Nolan, ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Manoury-Schwarz, B., G. Chiocchia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M.-C. Boissier, C. Fournier. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- $\gamma$  receptors. *J. Immunol.* 158: 5501-5506.
- Marin, M., A. Karis, P. Visser, F. Grosveld, S. Philipsen. 1997. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89: 619-628.
- Masgram, J., S.E. Connaughton, R.R. Warriar, D. Carvajal, C. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D.A. Faherty, M.K. Gately. 2006. IL-12-deficient mice are defective in IFN-gamma production and type I cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481.
- McKercher, S.R., B.E. Torbett, K.L. Anderson, G.W. Henkel, D.J. Vestal, H. Baibault, M. Klemsz, A.J. Feeney, G.E. Wu, C.J. Paige, R.A. Maki. 1996. Targeted disruption of the Pu.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15: 5647-5658.
- McKnight, R.A., A. Shamay, L. Sankaran, R.J. Wall, I. Henninghausen. 1992. Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6943-6947.
- Melvin, A.J., M.E. McGurn, S.J. Bort, C. Gibson, D.B. Lewis. 1995. Hypomethylation of the interferon- $\gamma$  gene correlates with its expression in primary T-lineage cells. *Eur. J. Immunol.* 25: 426-430.
- Merika M., S.H. Orkin. 1993. DNA-binding specificity of GATA transcription factors. 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3999-4010.
- Migeon, B.R. 1994. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends Genet.* 10: 2049-2054.
- Mitchell, P.J., R. Tijan. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378.

- Montminy, M.R., G.A. Gonzales, K.K. Yamamoto. 1990. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* 13: 184-188.
- Mueller, P.R., B. Wold. 1989. In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246: 780-786.
- Mullis, K.B., F.A. Faloon 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol* 155: 335-350.
- Murphy, E.E., G. Terres, S.E. Macatonia, C.-S. Hsieh, J. Mattson, L. Lanier, M. Wysocka, G. Trinchieri, K.M. Murphy, 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.* 180:223-232.
- Murphy, K.M. 1998. T lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 226-232.
- Murre, C., G. Bain, M.A. van Dijk, I. Engel, B. Furnari, M.E. Massari, J.R. Mathews, M.W. Quong, R.R. Rivera, M.H. Stuver. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1218, 129-135.
- Muthusamy, N., K. Barton, J.M. Leiden. 1995. Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor.
- Nan, X., H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenmann, A. Bird. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-393.
- Natesan, S., M.Z. Gilman. 1993. DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev.* 7: 2497-2509.
- Neuberg, M., M. Scheuermann, J.B. Hunter, R. Muller. 1989. Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature* 338: 589-590.
- Neurath, M.F., I. Fuss, B.L. Kelsall, E. Stuber, W. Strober. 1995. Antibodies to IL-12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182: 1280-1289.
- Neurath, M., X. Ma, S. Petterson. 1997. DNA/Protein Interaktionen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Neurath, M.F., C. Becker, K. Barbulescu. 1998. Review: role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43: 856-860.
- Norton, J.D., R.W. Deed, G. Craggs, F. Sablitzki. 1998. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol.* 8, 58-65.
- Okamura, H., T. Tsutsui, T. Komatsu, M. Yutsudo, A. Hakura, T. Tanimoto, K. Torigoe, T. Okura, Y. Nukada, K. Harttori, K. Akita, M. Namba, F. Tanabe, K. Konishi, S.

- Fukuda, M. Kurimoto. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* 378: 88.
- Okamura, R.M., M. Sigvardsson, J. Galceran, S. Verbeek, H. Clevers, R. Grosschedl. 1998. Redundant regulation of T cell differentiation and TCR $\alpha$  gene expression by the transcription factors LEF-1 und TCF-1. *Immunity* 8:11-20.
- Orphanides, G., T. Lagrane, D. Reinberg. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10: 2657-2683.
- Oukka, M., F.C. de la Brousse, T. Hoey, M. Grusby, L.H. Glimcher. 1998. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cell. *Immunity* 9: 295-304.
- Ouyang, W., S.H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T.L. Murphy, W.C. Sha, K.M. Murphy. 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9: 745-755.
- Owen-Hughes, T., J.L. Workman 1994. Experimental analysis of chromatin function in transcription control. *Crit. Rev. Euk. Gene Express.* 4: 403-441.
- Pabo, C.O., R.T Sauer. 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA-recognition. *Annu. Rev. Euk. Gene Express.* 4: 403-441.
- Paliogianni, F.A. Raptis, S.S. Ahujy, S.M. Najjar, D.T. Boumpas.1993. Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NFAT. *J. Clin. Invest.* 91: 1481-1489.
- Pandolfi, P.P., M.E. Roth, A. Karis, M.W. Leonard, E. Dzierzak, F.G. Grosveld, J.D. Engel, M. H. Lindenbaum. 1995. Targeted disruption of the GATA-3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* 11: 40-44.
- Parada, N.A., D.M. Center, H. Kornfeld, W.L. Rodriguez, J. Cook, M. Vallen W.W. Cruikshank. 1998. *J. Immunol.* 160: 2115-2120.
- Penix, L., W.M. Weaver, Y. Pang, H.A. Young, C.B. Wilson. 1993. Two essential regulatory elements in the human interferon  $\gamma$  promoter confer activation specific expression in T cells. *J. Exp. Med.* 178:1483-1496.
- Penix, L.A., M.T. Sweetser, W.M. Weaver, J.P. Hoeffler, T.K. Kerppola, C.B. Wilson. 1996. The proximal regulatory element of the interferon- $\gamma$  promoter mediates selective expression in T cells. *J. Biol. Chem.* 271:31964-31972.
- Pevny, L., M.C. Simon, E. Robertson, W.H. Klein, S.F. Tsai, V. D'Agati, S.H. Orkin, F. Constantini. 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349: 257-260.

- Pfeifer, G.P., S.D. Steigerwald, P.R. Mueller, B. Wold, A.D. Riggs. 1989. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* 246: 810-813.
- Raich, N., C.H. Clegg, J. Grofti, P.-H. Roméo, G. Stamatoyannopoulos. 1995. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human  $\epsilon$ -globin gene. *EMBO J.* 14: 801-809.
- Rajaram, N., T.K. Kerppola. 1997. DNA bending by Fos-Jun and the orientation of heterodimer binding depend on the sequence of the AP-1 site. *EMBO J.* 16: 2917-2925.
- Ranganath, S., W. Ouyang, D. Bhattacharya, W.C. Sha, A. Grupe, G. Peltz, K.M. Murphy. 1998. Cutting edge: GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. *J. Immunol.* 161: 3822-3826.
- Ranger, A.M., M. Oukka, J. Rengarajan, L.H. Glimcher. 1998b. Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9: 627-635.
- Ranger, A.M., M.R. Hodge, E.M. Gravallesse, M. Oukka, L. Davidson, F.W. Alt, F.C. de la Brousse, T. Hoey, M. Grusby, L.H. Glimcher. 1998a. Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4 driven responses produced by inactivation of NFATc. *Immunity* 8: 125-134.
- Rao, A., C. Luo, P.G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Ann. Rev. Immunol.* 15: 707-747.
- Res, P., H. Spits. 1999. Developmental stages in the thymus. *Sem. Immunol.* 11: 39-46.
- Rincón, M., R.A. Flavell. 1994. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J.* 13: 4370-4381.
- Rincón, M., R.A. Flavell. 1996. Regulation of AP-1 and NFAT transcription factors during thymic selection of T cells. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1074-1084.
- Robinson, D., K. Shibuya, A. Mui, F. Zonin, E. Murphy, T. Sana, S.B. Hartley, S. Menon, R. Kastelein, F. Bazan, A. Ogarra. 1997. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- $\gamma$  production and activates IRAK and NF $\kappa$ B. *Immunity* 7:571-581.
- Rogge, N., L. Barberis-Maino, M. Biffi, N. Passini, D. H. Presky, U. Gubler, F. Singaglia. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 185: 825-831.
- Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 227-257.

- Ruther, U., D. Komitowski, F.R. Schubert, E.F. Wagner. 1989. c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene* 4: 861-865.
- Saez, E., S.E. Rutberg, E. Mueller, H. Oppenheim, J. Smoluk, S.H. Yuspa, B.M. Spiegelman. 1995. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82: 721-732.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sarvetnik, N., D. Liggitt, S.L. Pitts, S.E. Hansen, T.A. Stewart. 1988. Insulin-dependent Diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma.
- Sauer, R:T., R. Tijan. 1997. Mechanisms of transcriptional activation: Differences and similarities between yeast, *Drosophila* and man. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 7: 176-181.
- Scheinmann, R.I., P.C. Cogswell, A.K. Lofquist, Jr. A.S. Baldwin. 1995. Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B $\alpha$  in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270: 283-286.
- Schmitt, E., P. Hoehn, C. Huels, S. Goedert, N. Palm, E. Rude, T. Germann. 1994. T helper 1 development of naive CD4<sup>+</sup> 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, W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 6419.
- Schuh, A.C., S.J. Keating, F.S. Monteclaro, P.K. Vogt, M.L. Breitmann. 1990. Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. *Nature* 346: 756-760.
- Seder, R.A., R. Gazzinelli, A. Sher, W.E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4<sup>+</sup> T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:10188-10192.
- Seder, R.A., W.E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635-673.
- Shen, H., C.M. Tato, X. Fan. 1998. *Listeria monocytogenes* as a probe to study cell-mediated immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10: 450-458.
- Shi, Y., E. Seto, L.S. Chang, T. Shenk. 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67: 377-388.

- Sica, A., L. Dorman, V. Viggiano, M. Cippitelli, P. Ghosh, N. Rice, H. A. Young. 1997. Interaction of NF- $\kappa$ B and NFAT with the interferon- $\gamma$  promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 30412-30420.
- Sica, A., T.-H. Tan, N. Rice, M. Kretzschmar, P. Ghosh, H. Young. 1992. The c-rel protooncogene product c-rel but not NF- $\kappa$ B binds to the intronic region of the human interferon- $\gamma$  gene at a site related to an interferon-stimulable response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1740-1744.
- Siegel, M.D., D.-H. Zhang, P. Ray, A. Ray. 1995. Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements. *J. Biol. Chem.* 270:24548-24555.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stief, A., D.M. Winter, W.H. Strätling, a.E. Sippel. 1989. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature* 341: 343-345.
- Stryer, L.. 1991. *Biochemie. - Korr. Nachdruck 1991 der völlig neubearbeiteten Aufl. 1990.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Swain, S.L. 1999. Helper T cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* 11:180-185.
- Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796-3806.
- Szabo, S., A.S. Dighe, U. Gubler, K.M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R  $\beta$ 2 subunit expression. *J. Exp. Med.* 185: 817-824.
- Takeda, K., H. Tsutsui, T. Yoshimoto, O. Adachi, N. Yoshida, T. Kishimoto, H. Okamura, K. Nakanishi, S. Akira. 1998. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18 deficient mice. *Immunity* 8: 383-390.
- Taniguchi, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268: 251-255.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, K. Yamamoto, R. A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld, J.N. Ihle. 1996. Requirement for STAT4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382: 171-174.
- Thompson, C.B., C.Y. Wang, I.C. Ho, P.R. Bohjanen, B. Petryniak, C.H. June, S. Miesfeldt, L. Zhang, G.J. Nabel, B. Karpinski, J.M. Leiden. 1992. Cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell. Biol.* 12: 1043-1053.
- Tijan, R., T. Maniatis. 1994. Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77: 5-8.

- Ting, C.N., M. C. Olson, K. P. Barton, J. M. Leiden. 1996. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384: 474-478.
- Tone, M., S.A.J. Thompson, Y. Tone, P.J. Fairchild, H. Waldmann. 1997. Regulation of IL-18 (IFN- $\gamma$ -inducing factor) gene expression. *J. Immunol.* 159: 6156-6163.
- Torigoe, K., S. Ushio, T. Okura, S. Kobayashi, M. Tanai, T. Kunikata, T. Murikami, O. Sanou, H. Kojima, M. Fujii, et al. 1997. Purification and characterization of the human IL-18 receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 25737-25742.
- Toyonaga, T., O. Hino, S. Sugai, S. Wakasugi, K. Abe, M. Shichiri, K.-I. Yamamura. 1994. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon- $\gamma$  in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 614-618.
- Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276.
- Trinchieri, G., B. Perussia. 1985. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today* 6: 131-136.
- Turner, B.M.O., L.P. Neill. 1995. Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Sem. Cell. Biol.* 6: 229-236.
- Udagawa, N., N.J. Horwood, J. Elliot, A. Mackay, J. Owens, H. Okamura, M. Kurimoto, T.J. Chambers, T.J. Martin, M.T. Gillespie. 1997. Interleukin-18 (interferon- $\gamma$  inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony stimulating factor and not via interferon- $\gamma$  to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.* 185: 1005-1012.
- Ushio, S., M. Namba, O. Takanori, K. Hattori, Y. Nukada, K. Akita, F. Tanabe, K. Konishi, M. Micallef, M. Fujii, K. Torigoe, T. Tanimoto, S. Fukuda, M. Ikeda, H. Okamura, M. Kurimoto. 1996. Cloning of the cDNA for human IFN- $\gamma$ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J. Immunol.* 156: 4274-4279.
- Vogelstein, A., D. Gillespie. 1976. Elution of DNA from agarose gels by the glass beads/NaJ method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 615-619.
- Wasylyk, B., C. Wasylyk, P. Flores, A. Begue, D. Leprince, D. Stehelin. 1990. The c-ets protooncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346: 191-193.
- Wasylyk, B., S. Hahn, A. Giovane. 1993. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211: 7-18.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller. 1993. *Rekombinierte DNA*. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Wiener et al. 1990. *J. Clin. Lab. Anal.* 4: 175-179.

- Wirtz, S., S. Finotto, S. Kanzler, A.W. Lohse, M. Blessing, H.A. Lehr, P.R. Galle, M.F. Neurath. 1999. Cutting edge: Chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: Characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T cells that respond to bacterial antigens. *J. Immunol.* 162: 1884-1888.
- Wolffe, A.P., P.L. Jones, P.A. Wade. 1999. Commentary. DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5894-5896.
- Wooi-ng, K., P. Ridgway, D.R. Cohen, D.J. Tremethick. 1997. The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J.* 16: 2072-2085.
- Workman, J.L., R.E. Kingston. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 545-579.
- Wu, C., R.R. Warriar, X. Wang, D.H. Presky, M.K. Gately. 1997. Regulation of interleukin-12 receptor beta 1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol.* 27: 147-154.
- Xu, X., Y.-L. Sun, T. Hoey. 1996. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the stat amino-terminal domain. *Science* 273:794-797.
- Yamamoto, M., L.J. Ko, M.W. Leonard, H. Beug, S.H. Orkin, J.D. Engel. 1990. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* 4:1650-1662.
- Ye, J., M. Cipitelli, L. Dorman, J.R. Ortaldo, H.A. Young. 1996a. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP-1 binding and activation of a silencer element. *Mol. Cell. Biol.* 58: 225-233.
- Ye, J., P. Ghosh, M. Cippitelli, J. Subleski, K.J. Hardy, J.R. Ortaldo, H.A. Young. 1996b. Characterization of a silencer regulatory element in the human interferon- $\gamma$  promoter. *J. Biol. Chem.* 41: 25728-25734.
- Young, H.A. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *Interferon Cytokine Res.* 16: 563-568.
- Young, H.A., K.J. Hardy. 1989a. Interferon- $\gamma$ : producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmacol. Ther.* 45: 137-151.
- Young, H.A., K.L. Komschlies, V. Ciccarone, M. Beckwith, M. Rosenberg, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, S.K. Durum. 1989b. Expression of human IFN- $\gamma$  genomic DNA in transgenic mice. 143: 2389-2394.
- Young, H.A., P. Ghosh, J. Ye, J. Lederer, A. Lichtman, J.R. Gerard, L. Penix, C.B. Wilson, A. J. Melvin, M. E. McGurn, D. B. Lewis, D.D. Daub. 1994. Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN- $\gamma$  gene. *J. Immunol.* 153: 3603-3610.

- Zhang, D.-H., L. Yang, A. Ray. 1998a. Cutting edge: Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J. Immunol.* 161:3817-3821.
- Zhang, F., D.Z. Wang, M. Boothby, L. Penix, R. A. Flavell, T.M. Aune. 1998b. Regulation of the activity of IFN- $\gamma$  promoter elements during Th cell differentiation. *J. Immunol.* 161:6105-6112.
- Zheng, W.-P., 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.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATF	<i>associated transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
bHLH	basische Helix-Loop-Helix Proteine
<i>buffy coat</i>	humane Blutkonserve (enthält überwiegend zelluläre Bestandteile des Bluts)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
BSA	bovines Serum Albumin
bZIP	basische Leucin-Zipper-Proteine
C	Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
c-Maf	<i>mitogen activated factor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Con A	Concanavallin A
CpG	Desoxycytidin-Phosphodiester-Bindung-Desoxyguanosin
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
CTL	cytotoxischer T-Lymphocyt
DHS	DNase I hypersensitive Stellen
DIG	Digoxygenin
DMS	Dimethylsulfat

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negative Thymocyten
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2`-Desoxy-Nucleosid-5`-Triphosphat
DP	doppelt positive Thymocyten
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Ets	<i>E26 transformation specific</i>
	FACS Fluorescence Activated Cell Sorter (Analytisches Durchflußzytometer)
Fa.	Firma
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflußzytometer)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
G	Guanin
GAS	<i>gamma-activation-sites</i>
GITC	Guanidiniumisothiozyanat
GM-CSF	Granulocyten/Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
H	Histidin
H(2A, 2B, 3, 4)	Histone
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HBSS	Hanks Balanced Salt solution
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HD	Histon-Deacetylasen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency syndrome</i>
HLH	Helix-loop-Helix Protein
HMG	<i>high mobility group</i>
HOX	Homäobox Proteine
HPO	<i>horseredish peroxidase</i>
hsp	Hitzeschock-Protein
ICE	<i>IL-1<math>\beta</math> converting enzyme</i> oder Caspase-1

---

ID	Inhibitor der Differenzierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
IL	Interleukin
IL1Rrp	<i>IL-1 receptor related protein</i> (IL-18 Rezeptor)
IRAK	IL-1 receptor related protein associated kinase
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun aminoterminal Kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kd	Kilodalton
<i>knockout</i>	Gendefekt
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria Bertani
LCR	Locus-Control-Regionen
Lck	Proteintyrosinkinase p56 <sup>lck</sup>
Lef-1	lymphoid enhancer factor 1
LiCl <sub>2</sub>	Lithiumchlorid
LM-PCR	<i>ligation mediated PCR</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
Luc.	Luciferase
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAR	<i>Matrix attachment regions</i>
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
mg, ml	Milligramm, Milliliter
$\mu$ g, $\mu$ l	Mikrogramm, Mikroliter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NaOH	Natriumhydroxid
min	Minute
mM	Millimol
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid

---

NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NF	nucleärer Faktor
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
NK	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
Oct	Octamermotiv-bindendes Protein
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligonucleotid Desoxy-Thymidin
p.A	pro Analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Tween-20
PC4	<i>positive cofactor 4</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POU	<b>Pit 1</b> (pituary factor 1), <b>Oct</b> (Octamer Protein) und <b>Unc86</b> (DNA-bindende Domäne POU-Domäne)
PTK	Proteintyrosinkinasen
PVDF	Polyvinylidenefluorid
RAG (-1, 2)	rekombinationsaktivierende Gene
rATP	ribosomales ATP
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RNAPI, II, III	RNA-Polymerase I, II, III
RNAse	Ribonuclease
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
S.	Seite
s	Sekunde
SAC	Formalin-fixierte Staphylococcus aureus Zellen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shc	<i>Src homology cofactor</i>

---

snRNAs	<i>small nuclear RNAs</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i> (Natriumchlorid/Natriumcitrat)
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV-40	<i>simian virus protein 40</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAF	TATA-bindendes Protein (TBP)-assoziiertes Faktor
T-ALL	T-Zell-akute lymphoblastische Leukämie
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBP	TATA-bindendes Protein
Tcf-1	<i>T-cell factor 1</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris/EDTA
Temed	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TMB	Trimethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
TS	Transkriptionsstart
TSS	transkriptionelle Startseite, Transkriptionsstartstelle
TYK	Tyrosinkinase
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volumen
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- $\beta$ -D-galactopyranosid
YY-1	YinYang-1

## Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Markus F. Neurath danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung und die intensive Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. Peter Galle danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die gute finanzielle Ausstattung des Labors.

Herrn Professor Dr. Gerhard Wegener danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Manfred Blessing danke ich für seine Kooperationsbereitschaft und die Herstellung der transgenen Maus.

Insbesondere danke ich den Mitglieder der Arbeitsgruppe Christoph Becker, Stefan Wirtz, Brigitte Bartsch sowie allen anderen für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich allen Menschen danken, die mich während der Promotion unterstützt und motiviert haben.

Bei Michel möchte ich mich für sein geduldiges Verständnis und die persönliche, immerwährende Unterstützung ganz herzlich bedanken.

## Publikationsliste

1. Becker, C., K. Barbulescu, S. Wirtz, S. Pettersson, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1999. Constitutive and inducible protein/DNA interactions at the tumor necrosis factor- $\alpha$  in primary human T-lymphocytes. Gene expression. in press.
2. Neurath M.F., K.Hildner, C. Becker, J.F Schlaak., K. Barbulescu, T. Germann, E. Schmitt, P. Schirmacher, S. Haralambous, S. Pasparakis, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, G. Kollias, E. Marker-Hermann: 1999. Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagene-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immuno-suppression. Clin. Exp. Immunol. 115: 42-55.
3. Barbulescu K., C. Becker, J.F. Schlaak, E. Schmitt, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1998. Cutting Edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- $\gamma$  promoter in primary CD4<sup>+</sup> T cells. J. Immunol. 160: 3642-3647.
4. Barbulescu K., C. Becker, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, 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.
5. Barbulescu K., C. Becker, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1998. Regulation of protein-DNA interactions at the interferon-gamma gene promoter by corticosteroids. Implications for inflammatory bowel disease. Ann. N. Y. Acad. Sci. 859:194-207.
6. Neurath M.F., C. Becker, K. Barbulescu. 1998. Role of NF- $\kappa$ B in immune and inflammatory responses in the gut. Gut. 43: 856-860.
7. Becker C., K. Barbulescu, K. Hildner, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1998. Activation and methotrexate-mediated suppression of the TNF alpha promoter in T cells and macrophages. Gene Expr. 859: 219-222.

8. Barbulescu K., K.-H. Meyer zum Büschenfelde, M.F. Neurath. 1997. Constitutive and inducible protein/DNA interactions of the IFN- $\gamma$  promoter in vivo in CD45RA and CD45RO T helper subsets. *Europ. J. Immunol.* 27: 1098-1107.
9. 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.
10. Neurath M.F., C. Becker, K. Barbulescu, S. Wirtz, K.-H. Meyer zum Büschenfelde: 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.

#### **Vorträge und Posterpräsentationen:**

1. 13. Frühjahrstagung der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR IMMUNOLOGIE in Binz (6.-8.3.1997):
2. Kongreß *Intestinal Plasticity in Health and Disease* (16-18.10.1997) in Berlin:
3. 12. Jahrestagung der GASTROENTEROLOGISCHEN ARBEITSGEMEINSCHAFT RHEINLAND-PFALZ (24.10.-25.10.1997) in Bad Kreuznach.
4. FALK-SYMPOSIUM *Induction and modulation of gastrointestinal inflammation* vom 5.03-7.03.1998 in Saarbrücken.
5. FALK-SYMPOSIUM *Innovative concepts in inflammatory bowel diseases* vom 30.04-2.05.1998 in Rostock.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Karina Barbulescu, geboren am 4.03.1970, 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 (Rheinland-Pfalz), August 1999

.....