

**Aus dem Pathologischen Institut  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

# **Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren NF-ATc und GATA-3 in T-Helfer Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von  
Arthur Schmidt  
aus Möckmühl**

**Würzburg, August 2004**

**Referent:**

**Prof. Dr. Edgar Serfling**

**Koreferent:**

**Prof. Dr. Holger Reichhardt**

**Dekan:**

**Prof. Dr. Stefan Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 27.1.2005**

**Der Promovend ist Arzt**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 T-Helfer Zellen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Rolle der T-Helfer Zellen bei der Immunantwort	1
1.1.2 T-Helfer-Effektorfunktionen und Cytokine	2
1.1.3 Fehlregulierte Immunreaktionen	3
1.1.4 Faktoren, die die Th1/Th2-Entwicklung beeinflussen	4
<b>1.2 Die Entwicklung der Th1-Zellen</b>	<b>7</b>
1.2.1 Signalwege bei der Th1-Differenzierung	7
1.2.2 Transkriptionsfaktoren bei der Th1-Entwicklung	8
<b>1.3 Die Entwicklung der Th2-Zellen</b>	<b>9</b>
1.3.1 Signalwege bei der Th2-Differenzierung	9
1.3.2 Transkriptionsfaktoren bei der Th2-Entwicklung	10
<b>1.4 Die NF-AT-Transkriptionsfaktoren</b>	<b>13</b>
1.4.1 Die Familie der NF-AT-Faktoren	13
1.4.2 NF-AT-Zielgene	15
1.4.3 Aktivierung der NF-AT-Faktoren	15
<b>1.5 Die transkriptionelle Regulation der Th1/Th2-Cytokingene</b>	<b>18</b>
1.5.1 Regulation auf Chromatinebene	18
1.5.2 Struktur und Regulation des IL-5-Promoters	20
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>24</b>
2.1.1 Zellen	24
2.1.2 Nährmedien	24
2.1.3 Chemikalien und Reaktionssysteme	24
2.1.4 Geräte und Verbrauchsmittel	25
2.1.5 Lösungen und Puffer	26
2.1.6 Enzyme	29
2.1.7 Größenmarker	30
2.1.8 Oligonukleotide	30
2.1.9 Antikörper	30
<b>2.2 Methoden</b>	<b>31</b>
2.2.1 Klonierungen	31
2.2.2 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen	37
2.2.3 GST-Pulldown	38
2.2.4 Transfektion von 293T Zellen	39
2.2.5 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus 293T Zellen	40
2.2.6 Western Blot Analyse	40
2.2.7 Das Cytotrap-System	42

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>3.1 NF-ATc und GATA-3 interagieren in vivo</b>	<b>44</b>
<b>3.2 Bestimmung der für die Interaktion wichtigen Proteindomänen</b>	<b>47</b>
3.2.1 Klonierungen	47
3.2.2 Bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine	51
3.2.3 GST-„pulldown“	52
3.2.4 Untersuchungen der NFATc/GATA-3 Interaktion mit dem Cytotrap-System	59
<b>4. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>69</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. T-Helfer-Zellen

### 1.1.1 Die Rolle der T-Helfer Zellen bei der Immunantwort

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes System aus vielen verschiedenen Zellarten, die sich darauf spezialisiert haben, den Körper vor einer Vielfalt unterschiedlicher Mikroorganismen und pathologischer Veränderungen zu schützen. Ihre Aufgabe ist es, nicht nur eindringende Erreger sondern auch entartete körpereigene Zellen als fremd zu erkennen und zu eliminieren. Für die Effektivität und den Erfolg dieses Prozesses ist es wichtig, daß die Immunantwort abhängig von der Art des Erregers genau reguliert und gesteuert wird.

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in diesem Prozeß. Sie entwickeln sich im Thymus und wandern dann in die peripheren lymphatischen Organe (wie Lymphknoten oder Milz) aus. Dort werden sie von Antigenen, die an membranständige MHC (Major Histocompatibility Complex) - Moleküle auf antigenpräsentierenden und anderen Zellen gebunden sind, stimuliert. MHC Klasse I-Moleküle werden dabei von  $CD8^+$  T-Zellen (=zytotoxische T-Zellen) und MHC Klasse II-Moleküle von  $CD4^+$  T-Zellen erkannt. Man nennt dieses Phänomen MHC-Restriktion.

Naive, undifferenzierte  **$CD4^+$ -T-Helfer-Zellen** differenzieren sich nach Kontakt mit einem an ein MHC Klasse II-Molekül gebundenen Antigen entweder in **T-Helfer 1 (Th1)** oder **T-Helfer 2 (Th2)** Zellen, die sich phänotypisch durch ihre Cytokine, die sie produzieren, unterscheiden (Mosmann et al. 1986; Mosmann und Coffman 1989; Paul und Seder 1994; O'Garra 1998; Rengarajan und Glimcher 2000).

Diese **unterschiedlichen Cytokinmuster** wiederum vermitteln verschiedene Effektorfunktionen und steuern die Immunantwort in eine entweder **zelluläre** oder **humorale** Richtung. Intrazelluläre Erreger, wie Viren und verschiedene Bakterien, induzieren eine Th1-vermittelte, sogenannte zelluläre Reaktion, die vor allem in der Aktivierung von Makrophagen und cytotoxischen  $CD8^+$  T-Lymphozyten resultiert. Extrazelluläre Erreger, wie Helminthen, lösen dagegen eine Th2-vermittelte, sog.

humorale Immunantwort, aus, die vor allem durch von Plasmazellen produzierten Antikörper getragen wird (Mosmann et al. 1986, Sher and Coffman 1992, Abbas et al. 1996, O'Garra et al. 1998).

### **1.1.2 T-Helfer-Effektorfunktionen und Cytokine**

Das charakteristische Cytokin der **Th1-Zellen** ist Interferon- $\gamma$  (**IFN- $\gamma$** ). Th1-Zellen sezernieren aber auch Interleukin-2 (**IL-2**), Tumor Nekrose Faktor (**TNF**)  $\alpha$  und  $\beta$  und Lymphotoxin (**LT**). Interferon- $\gamma$  hat zwei Hauptfunktionen: Erstens aktiviert es Makrophagen und verstärkt deren bakterizide Aktivität. Zweitens stimuliert es die Produktion von IgG-Antikörpern, die an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen binden und so an der Opsonierung und anschließenden Phagozytose von Fremdpartikeln beteiligt sind. Th1-dominierte Immunantworten sind oft mit Entzündung und Gewebeschäden assoziiert, weil die Cytokine TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  entzündungsvermittelnde Leukozyten aktivieren. Th1-Zellen können auch mittels IL-2 und TNF- $\alpha$  die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Natürlicher Killer Zellen (NK-Zellen) bewirken und so zur Eliminierung von Bakterien und virusinfizierten körpereigenen Zellen beitragen.

**Th2-Zellen** produzieren **IL-4** und **IL-5**, aber auch **IL-6**, **IL-9**, **IL-10** und **IL-13**. IL-4 ist für den Immunglobulin-Klassenwechsel („class switching“) der B-Zellen in Richtung IgE notwendig. IgE bindet an Fc-Rezeptoren auf Mastzellen und löst dort nach Kontakt mit einem Antigen ihre Degranulation und nachfolgende Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamin aus (Galli et al. 1993). IL-5 ist wichtig für die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten (Wardlaw et al. 1993). So zeigen IL-5- oder IL-5-Rezeptor-defiziente Mäuse im Experiment eine reduzierte Eosinophilenantwort auf Infektionen mit Helminthen (Kopf et al. 1996, Yoshida et al. 1996). In Th2-dominierten Immunantworten, wie in Allergien oder bei der Abwehr von Helminthen findet man deshalb sowohl eine erhöhte IgE-Ausschüttung als auch eine verstärkte Gewebsinfiltration mit eosinophilen Granulozyten. Die Rekrutierung von Eosinophilen zu den Orten der Immunreaktion (z.B. Lunge bei Asthma) wird über

Chemokine (z.B. Eotaxin) vermittelt, die sowohl von Th1- als auch von Th2-Zellen produziert werden, und die Aktivität beider wird durch lokale IL-4 und IL-5 Produktion gesteigert (Gonzalo et al. 1996, Rothenberg et al. 1995).

Weiterhin sind Th2-Zellen ausgezeichnete Helfer von B-Lymphozyten. Sie stimulieren die Produktion von IgM und nicht komplementbindenden IgG-Isotypen, wie IgG1 in der Maus oder IgG4 im Menschen (Coffman et al. 1993).

Einige Th2-Cytokine haben auch antiinflammatorische Wirkung. IL-4 und IL-13 wirken antagonistisch zur makrophagenaktivierenden Funktion von IFN- $\gamma$ . Auch IL-10 unterdrückt Makrophagen-Antworten; TGF- $\beta$  wirkt antiproliferativ und hemmt die Leukozytenaktivierung. Th2-Zellen haben bei der Immunantwort also nicht nur Effektor- sondern auch regulatorische Funktionen und können den Organismus vor zu starken und gewebeschädigenden Th1-vermittelten Reaktionen schützen. Passend zu dieser Hypothese ist die Tatsache, daß während einer T-Zell Aktivierung in vitro zuerst Th1-Antworten auftreten und dann erst im Laufe der Immunreaktion Th2-Antworten folgen (Croft und Swain 1995).

### **1.1.3 Fehlregulierte Immunreaktionen**

Es wurde gezeigt, daß der Verlauf und der Ausgang einer Vielzahl pathologischer Prozesse, wie Infektionen, Allergien und Autoimmunkrankheiten, eng mit den in der jeweiligen Immunantwort dominierenden T-Helfer-Subtypen (Th1 oder Th2) und ihren sezernierten Cytokinmustern verknüpft sind (Abbas et al. 1996). Dies unterstreicht die duale Natur T-Zell-vermittelter Immunantworten und die Bedeutung der Cytokine bei der Kontrolle pathologischer Reaktionen.

**Autoimmunkrankheiten**, wie Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis, sind mit verstärkten Th1-Antworten assoziiert (Powrie and Coffmann 1993, Liblau et al. 1995, O'Garra et al. 1997), die mit Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigung einhergehen.

Dysregulierte **Th2**-Antworten können **Allergien** und **atopische Reaktionen** hervorrufen (Sher and Coffmann 1992, Urban et al. 1992, Romagnani et al. 1994). Patienten mit schweren Atopien haben hohe Spiegel an IgE Antikörpern, die eng mit dem Auftreten allergen-spezifischer Th2-Zellen und Th2-Cytokinen korreliert sind

(Romagnani et al. 1994). In bronchoalveolären Lavagen und Biopsien der Luftwege von **Asthma**-Patienten wurden beispielsweise gehäuft Th2-Zellen und ihre sezernierten Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 gefunden, wobei die Anzahl dieser Zellen nach aerogener Stimulation mit Allergenen anstieg (Walker et al. 1992, Robinson et al. 1992). Th2-Cytokine sind für eine Gewebeeinfiltration mit eosinophilen Granulozyten, für die Produktion von IgE durch Plasmazellen und die daraus resultierende Entzündung der Luftwege notwendig, so daß eine Verstärkte Th2-Antwort als Ursache von Asthma angenommen werden kann (Anuradha and Cohn 1999).

Ein besseres Verständnis der Entwicklung und Differenzierung der Th1- und Th2-Zellen und der Regulation der Balance zwischen den von ihnen vermittelten Immunreaktionen ist für mögliche zukünftige Therapeutika deshalb wichtig.

#### **1.1.4 Faktoren, die die Th1/Th2-Entwicklung beeinflussen**

Nach Reifung im und Auswanderung vom Thymus in die peripheren lymphatischen Organe sind die CD4<sup>+</sup>-T-Helfer Zellen funktionell noch unreif, sie produzieren hauptsächlich IL-2 und werden in diesem Stadium als Th0- oder Thp (p für „precursor“) - Zellen bezeichnet (Glimcher and Murphy 2000). Th1 und Th2 Zellen scheinen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abzustammen, die auch IL-4 exprimiert (Kamagowa et al. 1993). Auf dem Weg zur Effektorzelle wird die Entwicklung der naiven Zelle von einer Reihe von Faktoren beeinflusst:

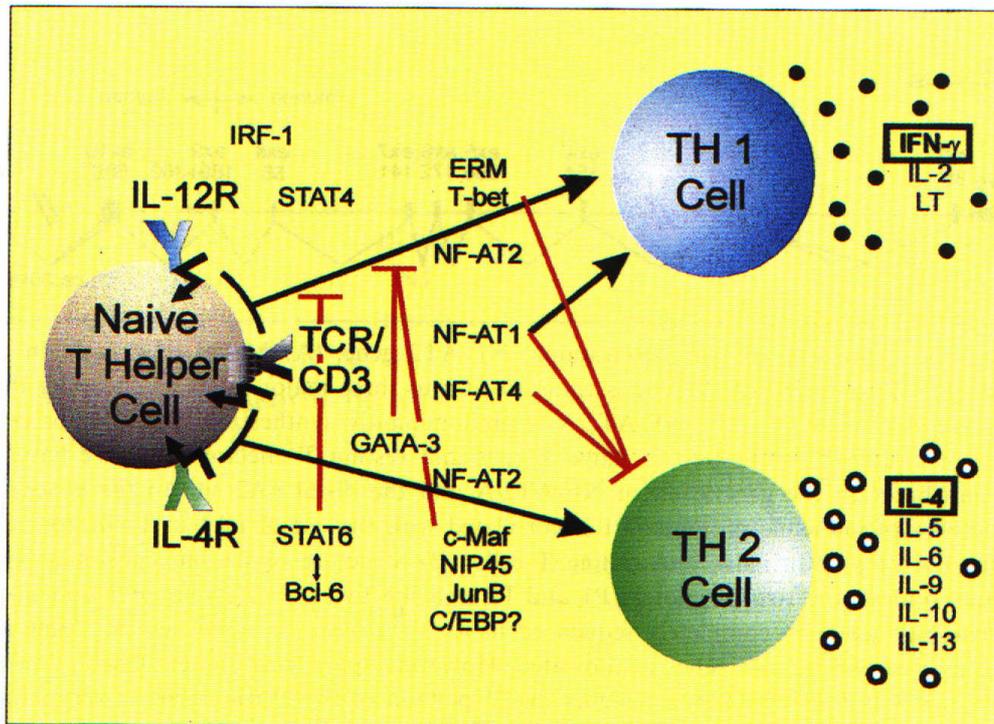
*Costimulation:* Zur Aktivierung und Differenzierung benötigen die Th0-Zellen in der Peripherie mindestens zwei verschiedene Signale. Signal eins wird durch die Interaktion des T-Zell Rezeptors (TCR) mit dem Antigen-MHC-II-Komplex auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APC, z.B. dendritische Zellen) geliefert. Das zweite Signal kommt durch die Interaktion von costimulatorischen Oberflächenmolekülen auf antigenpräsentierenden Zellen einerseits und auf T-Zellen andererseits zustande. Das am besten charakterisierte costimulatorische Paar ist **CD28** (auf T-Zellen) **und B7** (auf antigenpräsentierenden Zellen). CD28- und B7-Knockout Mäuse zeigen signifikant abgeschwächte Immunantworten mit reduzierter Anzahl an Th2-Zellen (Freeman et al. 1993, Green et al. 1994, Schweitzer et al. 1997). Ob B7-1 und B7-2 die Th-Entwicklung

unterschiedlich beeinflussen können, wird noch kontrovers diskutiert (Kuchroo et al. 1995, Brown et al. 1996, Ranger et al. 1996, Nakajima et al. 1997, Subramanian et al. 1997). **ICOS**, ein weiterer costimulatorischer Rezeptor und sein Ligand **B7-H1** (Dong et al. 1999, Hutloff et al. 1999, Yoshinaga et al. 1999) stimulieren spezifisch die Th2-Entwicklung. Auch die Interaktion zwischen **OX40 und CD28** scheint die Entwicklung der T-Helfer-Zellen in Richtung Th2 zu leiten (Akiba et al. 2000, Lane 2000). Eine entgegengesetzte Rolle spielt das Paar **LFA-1/ICAM-1,2**, denn die Blockierung ihrer Interaktion resultiert in einer Überproduktion an Th2-Cytokinen (Salomon and Bluestone 1998).

Erst kürzlich wurde gezeigt, daß es mindestens zwei Untergruppen von **Dendritischen Zellen** gibt, die wiederum einzigartige Funktionen in der Entwicklung der Th1/Th2 Effektorzellen besitzen (Maldonado-Lopez et al. 1999, Pulendran et al. 1999, Risoan et al. 1999). Humane **DC1** bzw. murine  $CD8\alpha^+$  lymphoide dendritische Zellen produzieren IL-12 und stimulieren so vorzugsweise die Th1-Differenzierung. Die Th2-Entwicklung dagegen wird von humanen **DC2** bzw. murinen  $CD8\alpha^-$  myeloiden dendritischen Zellen angeregt, möglicherweise durch die Produktion von IL-6 (Rincon et al. 1997).

*Antigendosis und Antigen-TCR-Interaktion.* **Niedrige Antigenkonzentrationen** und Infektionsdosen induzieren typischerweise **Th1**-Antworten, wogegen **hohe Dosen** an Antigenen **Th2**-dominierte Reaktionen auslösen (Bretscher et al. 1992, Hosken 1995). Auch die Struktur der Antigene und die Stärke des über den TCR übermittelten Signals scheint eine wichtige Rolle in der T-Helfer Polarisierung zu spielen (Constant and Bottomly 1997, Tao et al. 1997, O'Garra 1998, Glimcher and Murphy 2000), möglicherweise durch die Regulierung der Dauer und Stärke von  $Ca^{2+}$ -Strömen (Sloan-Lancaster et al. 1997, Grakoui et al. 1999)

*Cytokine.* Die wichtigste Rolle bei der Th1/Th2 Differenzierung kommt jedoch den Cytokinen selbst zu (Abbas et al. 1996, O'Garra 1998, Paul and Seder 1994). Die wichtigsten sind dabei IL-12 und IL-4. **IL-12** stimuliert die Entwicklung von Th1-Zellen, während **IL-4** die Th2-Differenzierung fördert. Gleichzeitig inhibiert jedes der beiden Cytokine die Entwicklung des „entgegengesetzten“ Zelltyps, d.h. IL-12 hemmt



**Abb.1: Signalwege und Transkriptionsfaktoren bei der Th1/Th2-Differenzierung.** Die Stimulation von naiven T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor und entweder über den IL-12- oder den IL-4-Rezeptor leitet die Differenzierung zu Th1- oder Th2-Effektorzellen ein. Das charakteristische Cytokin der Th1-Zellen ist IFN- $\gamma$ , das der Th2-Zellen IL-4. Signale über den IL-12R bzw. IL-4R lösen die Aktivierung und nukleäre Translokation von STAT4 bzw. STAT6 aus. BCL-6 wirkt der Th2-Entwicklung entgegen, indem es STAT-6 hemmt. T-bet ist ein Th1-spezifischer Transkriptionsfaktor, der die IFN- $\gamma$ -Expression stimuliert und gleichzeitig der Th2-Entwicklung entgegenwirkt. Th2-spezifische Transkriptionsfaktoren sind c-Maf und GATA-3. GATA-3 stimuliert die Transkription von Th2-Cytokingenen und hemmt die von Th1-Cytokingenen. NF-AT2 (=NF-ATc) hat in der Differenzierung von sowohl Th1- als auch Th2-Zellen einen positiven Effekt. NF-AT1 (=NF-ATp) und NF-AT4 stimulieren die Aktivität aller Lymphokinpromotoren. Allerdings führte die Inaktivierung der NF-AT1- und/oder NF-AT4-Gene in Mäusen zu gesteigerten Th2-Antworten, was darauf hindeutet, daß die beiden Faktoren einen Repressor der Th2-Entwicklung kontrollieren. (Abb. aus Serfling et al. 2000)

die Th2-Entwicklung und IL-4 die Th1-Entwicklung (Scott 1991, Maggi et al. 1992, Paronchi et al.1992, Hsieh et al. 1993, Macatonia et al. 1993, Manetti et al. 1993, Powrie and Coffmann 1993, Seder et al. 1993, Trinchieri 1993, Wu et al. 1993).

## 1.2. Die Entwicklung der Th1-Zellen

### 1.2.1 Signalwege in der Th1-Differenzierung

*IL-12 und STAT4.* IL-12 ist der dominierende Faktor, der die Entwicklung der Th1-Zellen aus naiven CD4<sup>+</sup>-Vorläuferzellen induziert. IFN- $\gamma$ , welches die Expression des IL-12-Rezeptors hochreguliert, verstärkt diesen Effekt und hemmt gleichzeitig das Wachstum von Th2-Zellen (O'Garra et al. 1998, Murphy et al. 1999, Trinchieri et al. 1995). IL-12 wird von Makrophagen und dendritischen Zellen (Trinchieri et al. 1995, Macatonia et al. 1995) nach Stimulation mit mikrobiellen Produkten oder CD40-Ligation produziert (Scheicher et al. 1995, Cella et al. 1996, Reis et al. 1997). Nach Bindung von IL-12 an den IL-12-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von rezeptorassoziierten Januskinasen (JAKs). Diese Tyrosinkinase phosphorylieren den Transkriptionsfaktor STAT4, der dimerisiert, in den Zellkern wandert und dort die Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens aktiviert. IL-12- und STAT4-defiziente Mäuse zeigen reduzierte, aber vorhandene Th1-Antworten (Murphy et al. 1999, Magram et al. 1996, Kaplan et al. 1996, Thierfelder et al. 1996). Obwohl STAT4 an non-consensus STAT-Sites des IFN- $\gamma$  Gens binden kann (Xu et al. 1996), sind differenzierte T-Zellen doch in der Lage, IFN- $\gamma$  auch ohne STAT4 zu produzieren (Ouyang et al. 1999). Die Rolle von STAT4 bei der direkten Kontrolle der IFN- $\gamma$ -Transkription ist zu Zeit noch unklar. IL-12 aktiviert auch STAT1 und STAT3, aber nur STAT4 wird für die Th1-Differenzierung benötigt. STAT4 kann in menschlichen, nicht aber in Maus-T-Zellen auch von IFN- $\alpha$  aktiviert werden (Glimcher and Murphy 2000).

*IL-1 und IL-18.* IL-12 ist - wie eben geschildert - das wichtigste Cytokin für die Differenzierung der Th1-Zellen. Aber auch andere Cytokine, vor allem IL-18, spielen dabei eine Rolle. Schon früh wurde eine unterschiedliche Wirkung von IL-1 auf Th1- und Th2-Zellen beobachtet (Lichtmann et al. 1988, Taylor-Robinson and Phillips 1994). Verstärkte Th2-Antworten in IL-1-defizienten Mäusen belegen die hemmende Wirkung dieses Cytokins auf Th2-Zellen (Satoskar et al. 1998). Vor wenigen Jahren wurde gezeigt, daß IL-18, ein IL-1-verwandter Faktor, selektiv IFN- $\gamma$  in Th1-, nicht aber in Th2-Zellen aktivieren kann. Die Signalwege beider Cytokine teilen einige ähnliche

Komponenten. Sowohl IL-1 als auch IL-18 aktivieren IRAK (Robinson et al. 1997), NF- $\kappa$ B in Th1-Zellen (Matsumoto et al. 1997) und TRAF6 (Kojima et al. 1998). Außerdem wurde von einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges berichtet (Tsuji-Takayama et al. 1997).

IL-18-defiziente Mäuse (Takeda et al. 1998) zeigen nach Infektion mit *Propionibacterium acnes* eine reduzierte Sekretion von IFN- $\gamma$ , und IL-12/IL18-doppeldefiziente Mäuse produzieren sogar noch weniger IFN- $\gamma$  als die einfach defizienten Tiere. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß beide Cytokine synergistisch auf die IFN- $\gamma$  Produktion wirken (Micallef et al. 1996). Auch wird die Expression des IL-18-Rezeptors in Th2-Zellen herunterreguliert, während dies in Th1-Zellen nicht geschieht (Xu et al. 1998).

*MAP-Kinasen, JNK und p38.* Die MAP (mitogen activated protein) -Kinasen JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) und p38 werden aktiviert, wenn die Zellen Umweltstressoren und Cytokinen ausgesetzt werden (O'Garra and Arai 2000). Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Cytokingenen bei angeborenen und erworbenen Immunantworten spielen, sind Ziele dieser Signalwege (Rincon and Flavell 1997). In JNK1-defizienten Mäusen wurden verstärkte Th2-Antworten und eine Akkumulation von NF-AT (s.u.) im Zellkern beobachtet (Dong et al. 1998). JNK2<sup>-/-</sup>-T-Zellen zeigten eine reduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  (Yang et al. 1998).

### 1.2.2 Transkriptionsfaktoren bei der Th1-Entwicklung

*T-bet.* Von Szabo, Glimcher und Kollegen wurde eine cDNA isoliert, die für ein Protein namens T-bet codiert. T-bet steht für „T-box expressed in T-cells“, und wird selektiv in NK (Natürliche Killer) - und Th1-Zellen exprimiert. Seine Expression korreliert dabei mit der IFN- $\gamma$  Produktion. T-bet gehört zu der Familie der **T-box-Transkriptionsfaktoren**, die in verschiedenen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle spielen (Szabo et al. 2000). T-Bet wird schnell und **selektiv in Th1-, nicht aber in Th2-Zellen** induziert. In Cotransfektionen von Maus El-4 Thymom-Zellen mit einem T-bet-Expressionsvektor und einem IFN- $\gamma$ -Luciferase-Reporterkonstrukt zeigte sich, daß T-bet sowohl in stimulierten, als auch in unstimulierten Zellen das **IFN- $\gamma$ -Gen**

transaktiviert (Szabo et al. 2000). Im Gegensatz dazu unterdrückt T-bet die Aktivität des IL-2-Promotors. Dies könnte die Tatsache erklären, daß Th1-Zellen im Laufe ihrer Differenzierung die IL-2-Expression reduzieren. Durch retrovirale Infektion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedlicher Reifegrade (wie von naiven T-Zellen, sich entwickelnden und voll polarisierten Th2-Zellen) und konsekutiver Überexpression von T-bet konnten große Mengen IFN- $\gamma$ -produzierender Th1-Zellen generiert werden. Interessanterweise hatte T-bet dabei einen dualen Effekt: Es stimulierte nicht nur die IFN- $\gamma$  Produktion, sondern schaltete auch die Expression von Th2-Cytokinen, wie IL-4 und IL-5, komplett ab. T-bet steuert die Th1-Entwicklung in der Weise, daß es Th1-spezifische genetische Programme aktiviert und gleichzeitig das entgegengesetzte Programm hemmt. In der Literatur wird T-bet deshalb auch als „**Master Regulator**“ der Th1-Entwicklung bezeichnet (Glimcher and Murphy 2000).

*NF-AT*. Nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors wandern die NF-AT (Nuclear factor of activated T-cells) -Transkriptionsfaktoren (zur genaueren Darstellung siehe Kap. 4) in den Zellkern und stimulieren dort zusammen mit AP-1 (activator protein-1) unter anderem die Transkription des **IL-2**-Gens (Durand et al. 1988; Shaw et al. 1988, Marx et al. 1993, Northrop et al. 1994). IL-2 ist das Cytokin, das am frühesten in der Th-Entwicklung produziert wird und zwar sowohl von naiven Th0- als auch von Th1-Zellen (Glimcher and Murphy et al. 2000). Da NF-AT-Proteine aber in Th1- und Th2-Zellen exprimiert werden, spielen möglicherweise noch andere, unentdeckte Transkriptionsfaktoren bei der Th1-spezifischen Expression von IL-2 eine Rolle (Glimcher and Murphy et al. 2000).

## **1.3 Die Entwicklung der Th2-Zellen**

### **1.3.1 Signalwege bei der Th2-Differenzierung**

*IL-4 und STAT6*. Die Ausschüttung von IL-4 während der frühen Immunantwort stimuliert die Entwicklung von Th2-Zellen, die mit der Produktion der Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13, der Sekretion von IgE aus Plasmazellen und der Aktivierung von

Mastzellen und Eosinophilen einhergeht (Sher et al. 1992, Romagnani et al. 1994, Paul and Seder et al. 1994, Swain et al. 1990). Aktiviert IL-4 den IL-4 Rezeptor auf naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen, so bindet STAT6 an den cytoplasmatischen Teil des Rezeptors und wird dann von den rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen JAK1 und JAK3 phosphoryliert. Phosphoryliertes STAT6 dimerisiert und wandert in den Zellkern, um an seine Zielgene zu binden (Hoey and Grusby 1999). Obwohl es unwahrscheinlich ist, daß STAT6 die Transkription des IL-4 Genes in einem signifikanten Ausmaß direkt kontrolliert (Lederer et al. 1996), aktiviert es eine Reihe von IL-4-Targetgenen wie IgE (Linehahn et al. 1998), MHC Klasse II, IL-4R, CD23 (Kaplan et al. 1996b, Shimoda et al. 1996, Takeda et al. 1996) und GATA-3 (Ouyang et al. 1998). Die ektope Expression von induzierbarem, aktiviertem STAT6 in sich entwickelnden Th1-Zellen induziert c-Maf und GATA-3 mit nachfolgender Expression von IL-4 (Kurata et al. 1999).

*BCL-6*. Dieser transkriptioneller Repressor hemmt die Aktivität von STAT6, indem es um STAT6-Bindestellen konkurriert. Trotzdem zeigen BCL-6-defiziente Mäuse einen normalen Th2-Phänotyp (Dent et al. 1997).

### **1.3.2 Transkriptionsfaktoren bei der Th2-Entwicklung**

*NF-AT*. Obwohl die NF-AT-Transkriptionsfaktoren sowohl in Th1- als auch in Th2-Zellen exprimiert werden (Ranger et al. 1998b), läßt der Phänotyp NF-ATp- oder NF-ATc-defizienter Mäuse (zur Nomenklatur der NF-AT-Familienmitglieder siehe Kap.4) auf eine wichtige Rolle dieser Faktoren in der Th1/Th2 Balance schließen. T-Zellen NF-ATc-defizienter Mäuse (die Tiere sterben am Tag 13,5 in Utero an schweren Herzklappenfehlern) zeigen eine reduzierte IL-4-Produktion (Ranger et al. 1998a, Yoshida et al. 1998), denn NF-ATc ist in der Lage, den IL-4-Promotor direkt zu transaktivieren. NF-ATp und NF-AT4 haben einen negativen Effekt auf die Th2-Differenzierung, Proliferation und die Aktivierung von Lymphozyten, wie durch den Phänotyp der NFAT-defizienten Mäuse demonstriert wird (Hodge et al. 1996b, Xanthoudakis et al. 1996, Kiani et al. 1997, Oukka et al. 1998). Die Th2-Cytokinproduktion NF-ATp-defizienter Mäuse ist mäßig erhöht (Hodge et al. 1996b, Xanthoudakis et al. 1996) und die von NF-AT4-Knockout-Mäusen ist normal (Oukka et

al. 1998). Doch weisen NF-ATp/NF-AT4-doppeldefiziente Mäuse (Ranger et al. 1998b) eine massive Überproduktion an Th2-Cytokinen mit stark erhöhten IgG1- und IgE-Spiegeln (die Produktion dieser Immunglobuline ist IL-4 abhängig) auf. Klinisch zeigen diese Mäuse schwere allergische Reaktionen und interstitielle Pneumonien, die mit Eosinophilen- und Mastzell-Infiltration einhergehen.

*c-Maf.* *c-Maf* ist ein **Th2-Zell-spezifischer Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor**, der an den IL-4 Promotor bindet. Seine Expression wird durch Signale via T-Zell-Rezeptoraktivierung induziert (Ho et al. 1996). *C-Maf* spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der IL-4 Produktion, wie in vivo durch *c-Maf*-transgene und –defiziente Mäuse demonstriert wurde. Mäuse, die *c-Maf* überexprimieren, zeigen verstärkte Th2-Antworten (Ho et al. 1998), und in *c-Maf*-defizienten Mäusen wurde eine verminderte IL-4-Produktion beobachtet (Kim et al. 1999). Dennoch sind reife Effektor-Th1-Zellen nach retroviraler Infektion mit *c-Maf* nicht in der Lage, IL-4 zu exprimieren. Das deutet darauf hin, daß noch andere Faktoren wie STAT6 und GATA-3 benötigt werden.

*GATA-3.* GATA-3 wurde ursprünglich als T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, der an das TCR $\alpha$ -Gen bindet, kloniert (Ho et al.1991) und gehört zu einer Superfamilie von **Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren**, die sechs Mitglieder umfaßt (**GATA-1 bis GATA-6**). GATA-Proteine erkennen durch ihre beiden Zinkfinger-DNA-Bindedomänen ein gemeinsames **WGATAR-Motiv** und sind innerhalb ihrer Familie strukturell hochkonserviert (Orkin et al. 1992). GATA-1, GATA-2 und GATA-3 werden vor allem in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Orkin 1995) . GATA 4, GATA-5 und GATA-6 dagegen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Darm und Herz und werden in Geweben endodermaler Abstammung exprimiert (Laverriere et al. 1994). GATA-Faktoren spielen somit in der Entwicklung vieler verschiedener Zell- und Gewebetypen eine wichtige Rolle.

Die gezielte Deletion des GATA-3-Gens in Mäusen resultierte in letalen embryonalen Fehlbildungen des Zentralnervensystems und des hämatopoetischen Systems (Pandolfi et al. 1995), während die Thymozyten von Mäusen, denen GATA-3 nur im lymphoiden System fehlt, in einem frühen Stadium der Entwicklung arretiert wurden (Ting et al. 1996, Hendriks et al. 1999). 1997 zeigten zwei Forschergruppen, daß GATA-3 **selektiv**

in **Th2**-, nicht aber in Th1-Zellen exprimiert wird (Zhang et al. 1997, Zheng and Flavell 1997). Ektoper transgene Expression von GATA-3 führte zu einem Anstieg von Th2-Cytokinen, wogegen Expression einer dominant-negativen Version von GATA-3 in einer Th2-Zelllinie zu einer Hemmung der Th2-Differenzierung führte (Zheng and Flavell 1997).

GATA-3 fördert nicht nur die Entwicklung von Th2-Zellen sondern hemmt auch die Th1-Entwicklung, und zwar unabhängig von IL-4. Dies geschieht zumindest zum Teil durch Hemmung der Expression der  $\beta$ 2-Kette des IL-12-Rezeptors, so daß der IL-12-Signalweg unterbunden wird (Ouyang et al. 1998). Durch ektoper Expression von GATA-3 konnten sogar reife Th1-Effektor-Zellen und Th1-Zelllinien so „umprogrammiert“ werden, daß sie Th2-Cytokine exprimierten (Lee et al. 2000).

Das GATA-3-Gen ist durch STAT6 aktivierbar. GATA-3 kann seine Aufgabe in der Th2-Entwicklung und –Funktion aber auch unabhängig von STAT6 ausführen. Nach retroviraler Expression von GATA-3 in STAT6-defizienten T-Zellen konnten alle Komponenten der normalen Th2-Entwicklung beobachtet werden, einschließlich der Induktion von c-Maf und der Bildung von DNaseI-hypersensitiven Bindeorten im IL-4-Locus. Trotz Zugabe von IL-12 zur Kultur (die normalerweise die GATA-3-Expression hemmt) wurde auch endogenes GATA-3 in diesen Zellen induziert (Ouyang et al. 1998). Eine **autoregulatorische Funktion** von GATA-3 ist somit sehr wahrscheinlich.

GATA-3 kontrolliert direkt die Expression des **IL-5**-Gens, indem es die Promotorelemente der Region von Position –70 bis –59 bindet (Siegel et al. 1995, Zhang et al. 1997, Zhang et al. 1998a), während der **IL-4**-Promotor durch GATA-3 aber nicht direkt gebunden und transaktiviert wird (Zhang et al. 1997, Zhang et al. 1998a). Wahrscheinlich ist, daß GATA-3 die Expression des IL-4/IL-13-Locus durch Interaktion mit Enhancersequenzen außerhalb des Promotors verstärkt (Ouyang et al. 1998). Durch strukturelle Analyse des GATA-3-Proteins konnte die Hypothese unterstützt werden, daß GATA-3 das IL-4-Gen durch andere Mechanismen kontrolliert als das IL-5-Gen. Lee und Kollegen zeigten mit Hilfe ektoper Expression verschiedener GATA-3-Mutanten in Th1-Zellen, daß die Transaktivierungs- und die C-terminale Zinkfinger-DNA-Bindedomäne sowohl für die IL-4- als auch für die IL-5-Induktion wichtig sind. Eine GATA-3-Mutante, der ein Teil des N-terminalen Zinkfingers fehlte, konnte IL-4 immer noch induzieren, während die Induktion von IL-5 signifikant

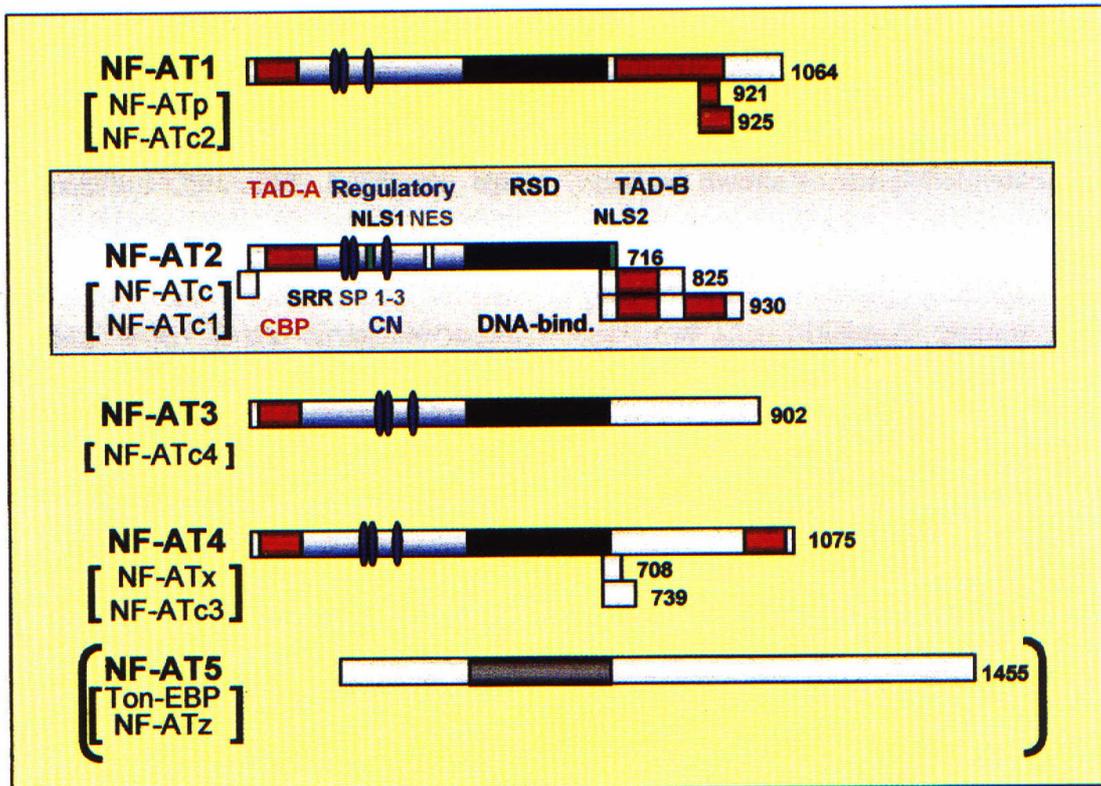
reduziert war. Analog zu T-bet in Th1-Zellen wird GATA-3 auch als „Master Regulator“ der Th2-Entwicklung bezeichnet.

## 1.4 Die NF-AT Transkriptionsfaktoren

### 1.4.1 Die Familie der NF-AT Faktoren

*NF-AT* (nuclear factor of activated T-cells) wurde ursprünglich als ein Transkriptionsfaktor in Kernextrakten aktivierter Jurkat T-Zellen beschrieben, der an den humanen IL-2 Promotor bindet (Shaw et al. 1988). Später wurde gezeigt, daß NF-AT-Signalweg der Angriffspunkt der beiden klinisch eingesetzten Immunsuppressiva **Cyclosporin A** und **FK506** ist (Emmel et al. 1989, Randak et al. 1990, Mattila et al. 1990, Brabletz et al. 1991). Heute sind vier NF-AT Familienmitglieder (NF-ATp, NF-ATc, NF-AT3, NF-AT4, s. Abb.) bekannt und genauestens charakterisiert.

*Struktur.* Gemeinsam ist den NF-AT Faktoren eine 300 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne mit 68-73% Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Mitgliedern. Diese wird wegen ihrer Ähnlichkeit mit der DNA-bindenden (Rel-) Domäne der Rel/NF- $\kappa$ B Faktoren als Rel similarity domain (**RSD**) bezeichnet. Weitere strukturelle Gemeinsamkeiten der NF-AT-Familienmitglieder sind ihre starke N-terminale transaktivierende Domäne (**TAD-A**, s. Abb. 2) (Luo et al. 1996, Avots et al. 1999) und ihre regulatorische Domäne zwischen der TAD und der RSD (siehe Abb. 2). Kürzlich wurde ein potentiell weiteres Familienmitglied, NF-AT5 oder Ton-EBP genannt, kloniert (Miyakawa et al. 1996). Allerdings ist NF-AT 5 nur entfernt mit den anderen NF-AT-Proteinen verwandt, da ihm wichtige Strukturmerkmale, wie die calcineurinbindende regulatorische Domäne fehlen (siehe Abb. 2; als Übersicht siehe Serfling et al. 2000).



**Abb. 2: Struktur der NF-AT Faktoren.** Die DNA-bindenden Domänen (RSD) der NF-ATs sind als schwarze Balken dargestellt. Die roten Bereiche bezeichnen die N- und C-terminalen transaktivierenden Domänen TAD-A und TAD-B. Weitere Domänen sind nur für NF-AT2 dargestellt. TAD-B besteht dabei aus zwei Peptiden, die durch eine inhibitorische Domäne getrennt sind. Außerdem ist die Regulatorische Domäne zwischen TAD-A und RSD eingezeichnet, die SRR-(=serine-rich region) und SP-Motive enthält. Weiterhin sind sowohl Bindestellen des Cofaktors CBP und der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phosphatase Calcineurin als auch Signale für den nukleären Im- und Export (NLS=nuclear localisation signal, NES=nuclear export signal) zu sehen.  
(aus Serfling et al. 2000)

*Isoformen.* Alle NF-AT Faktoren werden in mehreren Isoformen synthetisiert, die sich sowohl in ihren N-terminalen als auch in ihren C-terminalen Teilen unterscheiden können (Luo et al. 1996, Park et al. 1996, Lyakh et al. 1997, Imamura et al. 1998, Chuvpilo et al. 1999). NF-ATc zum Beispiel wird in 3 Isoformen (**NF-ATc/A**, **NF-ATc/B**, **NF-ATc/C**) synthetisiert, die sich in der Länge ihre C-terminalen Abschnitte unterscheiden. Interessanterweise enthalten die zusätzlichen Peptide der längsten Isoform NF-ATc/C eine zusätzliche, wenn auch schwache transaktivierende Domäne (TAD-B). Obwohl diese zusätzliche TAD im Vergleich zur kürzesten Isoform NF-ATc/A auf eine spezielle Funktion von NF-ATc/C hindeutet, konnte dies in transienten

Transfektionen mit verschiedenen Lymphokinpromotoren noch nicht eindeutig gezeigt werden (Chuvpilo et al. 1999b).

### 1.4.2 NF-AT-Zielgene

Viele Lymphokinpromotoren, die nach T-Zell-Aktivierung aktiviert werden, enthalten NF-AT-Bindestellen. Der **IL-2 Promotor** enthält zwei NF-AT-Motive, die NF-AT-Proteine mit hoher Affinität binden (Randak et al. 1990). Dennoch führte überraschenderweise weder die Deletion von NF-ATc noch von NF-ATp zu einer verminderten IL-2-Produktion in T-Zellen (Hodge et al. 1996, Xanthoudakis et al. 1996, Ranger et al. 1998, Yoshida et al. 1998). NF-ATp/NF-AT4-doppeldefiziente Splenozyten aber haben eine im Vergleich zum Wildtyp um 30% reduzierte IL-2 Sekretion (Ranger et al. 1998), was auf eine überlappende Funktion dieser drei NF-AT Faktoren bei der Kontrolle des IL-2 Promotors hindeutet.

Auch der **IL-4 Promotor** steht unter der Kontrolle von NF-AT und enthält vier bis fünf NF-AT-Bindestellen (Chuvpilo et al. 1993, Szabo et al. 1993, Rooney et al. 1995). NF-ATc-defiziente T-Zellen zeigten eine deutlich verringerte IL-4-Produktion (Ranger et al. 1998, Yoshida et al. 1998), während diese in NF-ATp-defizienten Zellen mäßig erhöht (Hodge et al. 1996, Xanthoudakis et al. 1996, Kiani et al. 1997) und in NF-ATp/NF-AT4 doppeldefizienten Zellen extrem gesteigert war (Ranger et al. 1998).

Eine Bindestelle für NF-AT wurde im **IL-5 Promotor** an Position -115 beschrieben (De Boer et al. 1999, Prieschl et al. 1995), deren Induktion durch hohe Konzentrationen von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) verstärkt wird (Lee et al. 1995, Siegel et al. 1995).

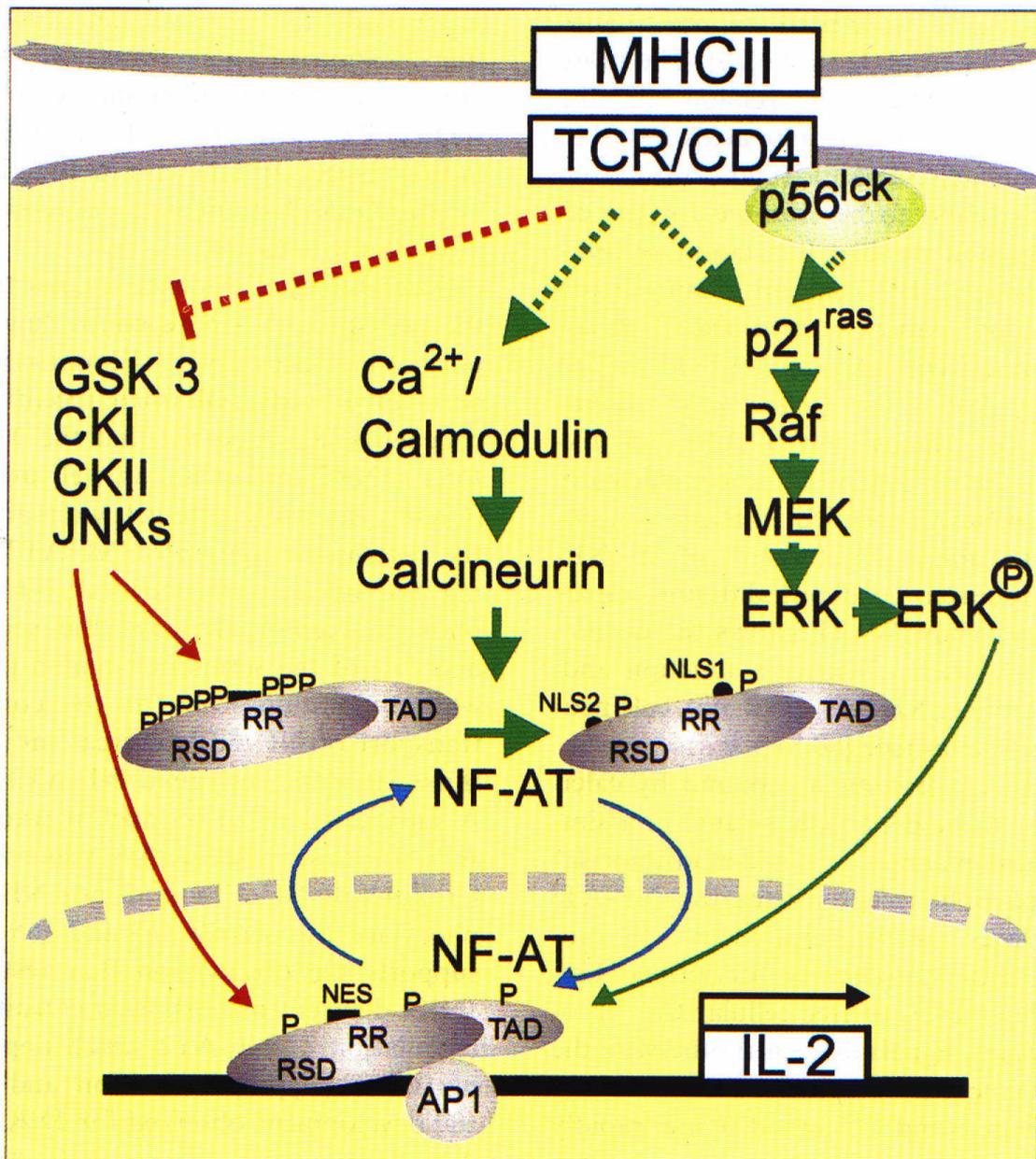
Weiterhin sind NF-AT-Bindestellen im **TNF $\alpha$ -Promotor**, **IL-3-Enhancer** und **GM-CSF Promotor** sowie in Rezeptor- und Liganden-Promotoren, wie in den Promotoren von FasL und von CD40L bekannt.

### 1.4.2 Aktivierung der NF-AT Faktoren

Zur effizienten Aktivierung der NF-AT Faktoren sind mindestens zwei Signale nötig, die beide durch die Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR) ausgelöst werden (als

Übersicht siehe Serfling et al. 2000). Diese TCR-vermittelten Signale führen a) zu einem Anstieg des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$  und zur Aktivierung von **Calcineurin** und b) zur Stimulierung verschiedener **Tyrosinkinasen**, wie  $\text{p56}^{\text{lck}}$ , und kleinen GTP-bindenden Proteine wie  $\text{p21}^{\text{ras}}$ , die wiederum Serin/Threonin-Kinasen-Kaskaden aktivieren (s. Abb.). Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NF-AT und ermöglicht so seine Translokation in den Zellkern (Liu et al. 1993, Crabtree et al. 1999, Rao et al. 1997), während klassische Ras/Raf/Erk- und andere MAP-Kinasen-Kaskaden die transkriptionelle Aktivierung von NF-AT (Avots et al. 1999) und die Induktion von AP-1 vermitteln (Treisman et al. 1996).

Die beiden Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 hemmen die T-Zell Aktivierung durch Blockierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalwege (Lin et al. 1991). Sie binden an kleine intrazelluläre Rezeptorproteine, sogenannte Immunophiline. Solche Komplexe aus Immunophilinen und Cyclosporin A bzw. FK506 binden an Calcineurin und hemmen dessen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Phosphatase-Aktivität (Liu et al. 1991). Mehrere Ser/Thr-Proteinkinasen wurden beschrieben, die durch Phosphorylierung von NF-AT der Calcineurinaktivität entgegenwirken. Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) und Proteinkinase A (PKA) phosphorylieren NF-ATc an den Serine-rich regions (SSR) der regulatorischen Domäne und kontrollieren so den nukleären Im- und Export (Beals et al. 1997). Auch die Kinasen Erk1, JNK,  $\text{p38}\alpha$  und Casein Kinase II (CKII) vermitteln die NF-AT-Phosphorylierung (Porter et al. 2000).



**Abb. 3: Aktivierung der NF-AT Faktoren.** Die Stimulierung des T-Zell Rezeptors (TCR) führt zu einer schnellen Aktivierung von Tyrosinkinase, insbesondere von p56<sup>lck</sup>, und einem Anstieg von freiem intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Tyrosinkinase aktivieren direkt Proteinkinasekaskaden, wie die Raf-MEK-Erk-Kaskade. Der Anstieg des freien Ca<sup>2+</sup> und die Bildung von Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplexen führt zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin. Calcineurin bindet an und dephosphoryliert NF-AT, welches daraufhin in den Zellkern gelangt und in Assoziation mit AP-1 Zielgene, wie IL-2, aktiviert. Die Serin/Threoninkinase GSK 3, CK I + II und JNK (Jun N-terminal kinase) können NF-AT phosphorylieren, der Calcineurinaktivität so entgegenwirken und den nukleären Export von NF-AT vermitteln. (aus Serfling et al. 2000)

## 1.5 Die transkriptionelle Regulation der Th1/Th2-Cytokingene

### 1.5.1 Regulation auf Chromatinebene

*Allgemeines.* Transkriptionsfaktoren steuern normalerweise die Genexpression durch direkte Bindung an regulatorische DNA-Sequenzen und nachfolgende Transaktivierung. GATA-3 und NF-ATc beispielsweise binden beide an den Interleukin-5-Promotor und steuern so die Expression des IL-5-Gens. Daneben gibt es aber auch noch weitere Mechanismen der Genregulation.

Die DNA transkriptionell inaktiver Gene ist durch kondensiertes Chromatin mit deacetylierten Histonen gekennzeichnet und oft stark methyliert (für eine Übersicht siehe Aragwai and Rao 1998b). Um regulatorischen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, den Zugang zur DNA und damit die Aktivierung der Transkription zu ermöglichen, muß sich die Struktur des Chromatins ändern. Transkriptionell aktive Gene weisen deshalb dekontensiertes, „offenes“ Chromatin mit acetylierten Histonen auf und sind demethyliert. Stellen der DNA mit offener, dekontensierter Chromatinstruktur besitzen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNaseI und werden deshalb als „DNaseI- Hypersensitive-Sites“ bezeichnet.

*Regulation des IL-4 Gens auf Chromatinebene.* Die Gene für die Th2-Cytokine **IL-4**, **IL-13** und **IL-5** sind in einem **Gencluster** organisiert, der sich auf dem kurzen Arm (**q23-31**) des menschlichen **Chromosom 5** befindet (Le Beau et al. 1989, Frazer et al. 1997). Bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom kann gehäuft eine Deletion (del5q) dieser Region nachgewiesen werden (Le Beau et al. 1989). Mehrere Arbeiten deuten darauf hin, daß die Th2-Differenzierung mit einer Änderung der Chromatinstruktur des IL-4-Genlokus einhergeht (Aragwai and Rao 1998a, Aragwai and Rao 1998b, Takemoto et al. 1998). Fünf **DNaseI hypersensitive sites** (HSS I-V) und CpG Demethylierung wurden in einem 19kb-BamHI-Fragment des IL-4-Lokus in einer Th2-Zelllinie (D10) und differenzierten primären Th2-Zellen gefunden. Im Gegensatz dazu wies das entsprechende Fragment aus naiven Th0-Zellen und einem Th1-Klon nur eine solche Stelle (HSS IV) auf, was auf eine relativ „geschlossene“ Chromatinstruktur in diesem Bereich hindeutet. In naiven Th0-Zellen traten die Th2-

typischen HSS schon 48 h nach Antigenstimulation auf (Aragwai and Rao 1998b). Retrovirale Expression von GATA-3 in Th1-Zellen und STAT6<sup>-/-</sup>-Zellen führte ebenfalls zum Auftreten dieser Th2-spezifischen HSS (Ouyang et al. 1998). GATA-3 kontrolliert die Expression von Th2-Cytokingenen also nicht nur durch Transaktivierung, sondern auch auf Chromatinebene und könnte so TCR-induzierten Faktoren, wie c-Maf und NF-AT, die Bindung an ihre spezifischen Bindeorte in diesen Genen erlauben (Aragwai and Rao 1998b).

Erst kürzlich wurde gezeigt, daß bestimmte regulatorische Regionen des IL-4 Gens (unter anderem der IL-4 Promoter) in naiven Th-Zellen hypoacetyliert sind, während differenzierte Th2-Zellen eine **Hyperacetylierung** dieser Regionen aufweisen. Stimuliert man naive Th-Zellen initial über den T-Zell-Rezeptor so werden zunächst regulatorische Regionen sowohl des IL-4- wie auch des IFN- $\gamma$  Gens acetyliert. Um diese Acetylierung nicht wieder zu verlieren, benötigen die Zellen aber eine kontinuierliche Stimulation durch Cytokine. Kultiviert man die Zellen unter Th2-Bedingungen (mit IL-4) so zeigt sich eine weitere Hyperacetylierung am IL-4-Gen. In STAT-6-defizienten Zellen konnte eine solche Hyperacetylierung unter IL-4-Stimulation nicht detektiert werden, was darauf hindeutet, daß STAT-6 für den Erhalt der Acetylierung notwendig ist. Werden die aktivierten Zellen unter Th1-Bedingungen (also mit IL-12) kultiviert, zeigen die regulatorischen Regionen des IFN- $\gamma$  Gens Hyperacetylierung, die in T-Bet-defizienten Zellen fehlt (Avni et al. 2003).

Ein möglicher Mechanismus ist, daß das Chromatin nach der initialen TCR-Stimulation durch Acetylierung für TCR-induzierte Faktoren wie STAT6 zugänglich gemacht wird und diese Faktoren wiederum andere Proteine, wie Histonacetylasen und Transkriptionsfaktoren (wie NF-AT und GATA-3), rekrutieren, um so den jeweiligen Th2-Phänotyp aufrechtzuerhalten. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß sowohl STAT6 als auch NF-AT1 an den IL-4 Promoter binden, wobei STAT6 für die Interaktion von NF-AT1 mit dem Promoter notwendig ist (Avni et al. 2002).

Untersuchungen zur **Methylierung** des IL-4 Locus zeigten, daß dieser in Th0-Zellen stärker methyliert ist als in Th2-Zellen. Passend dazu konnte durch Behandlung von naiven Th0-Zellen mit Trichostatin A und 5-Azacytidin (Histondeacetylase- und Methylase-Inhibitoren) die Kinetik der IL-4 Produktion beschleunigt werden (Bird et al. 1998).

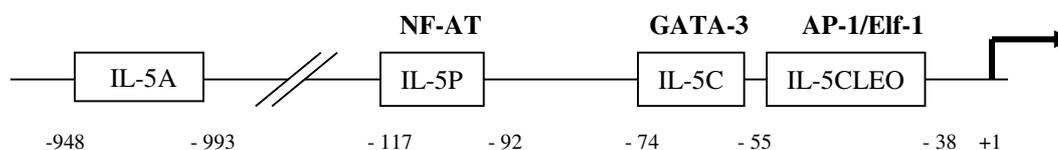
Durch Sequenzvergleiche des IL-4/IL-5/IL-13-Genclusters verschiedener Spezies (wie von Mensch, Maus und Hund) wurde nach regulatorischen Sequenzen gesucht. Dabei wurden auf dem humanen Chromosom 5 in einem eine Megabase großen Abschnitt 90 konservierte nichtkodierende Sequenzen (conserved noncoding sequences, CNSs) detektiert (Loots et al. 2000). Die größte konservierte Sequenz, CNS-1, befindet sich zwischen dem IL-4- und dem IL-13-Gen und enthält zwei vor kurzem entdeckte stimulationsunabhängige hypersensitive Orte, HSS1 und HSS2 (Takemoto et al. 1998). Die Eigenschaften dieser CNS-1 wurden durch transgene Mäusen untersucht. Die Mäuse trugen dabei ein Yeast Artificial Chromosome (YAC), das den humanen IL-4/IL-13/IL-5-Gencluster enthielt. Die Deletion von CNS-1 in diesen Mäusen führte im Vergleich zum transgenen „Wildtyp“ zu einer reduzierten Expression von humanem IL-4, IL-5 und IL-13 in den murinen Th2-Zellen (Loots et al. 2000). Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz einer wichtigen Sequenz in der CNS-1-Region hin, die alle drei Cytokingene des IL-4-Clusters reguliert.

*IFN- $\gamma$ -Gen.* Über die Regulation der Th1-Cytokingene ist weit weniger bekannt. Im ersten und dritten Intron des IFN- $\gamma$ -Gens wurden Th1-spezifische „DNaseI hypersensitive sites“ beschrieben (Young et al. 1994, Aragwai and Rao 1998b). Auch wurde gezeigt, daß der IFN- $\gamma$ -Lokus in Th1-Zellen hypo- und in Th2-Zellen hypermethyliert ist (Young et al. 1994, Fritzpatrick et al. 1999). Ob der Th1-spezifische Transkriptionsfaktor T-bet die Chromatinstruktur verändern kann, ist allerdings unklar.

### **1.5.2 Struktur und Regulation des IL-5-Promoters**

*Struktur des Maus-IL-5 Promoters.* Lee et al. analysierten die Regionen des murinen IL-5 Promoters, die für die PMA/cAMP vermittelte Aktivierung notwendig sind und detektierten in einem 1.2 kb großen Fragment vier cis-regulatorische Elemente, die sie als **IL-5A** (Position -948 bis -933), **IL-5P** (Pos. -117 bis -92), **IL-5C** (-74 bis -56) und **IL-5CLE0** (Pos. -55 bis -38) bezeichneten (Lee et al. 1995) (s. Abbildung 4). CLE0 steht für conserved lymphokine element 0 und ist innerhalb der IL-3-, IL-4-, IL-5- und GM-CSF-Gene hoch konserviert.

Eine Sequenzanalyse zeigte, daß IL-5P eine **NF-AT**-Site enthält. In EMSAs konnte ein an IL-5P bindender, durch PMA und/oder cAMP induzierbarer Proteinkomplex (Bezeichnet als NF-ILP) nachgewiesen werden, dessen Auftreten durch Zugabe von CyclosporinA gehemmt wurde. In Supershift-Analysen stellte sich heraus, daß der NF-IL5P Komplex durch NF-ATp- und Jun/Fos-Antikörper gebunden werden konnte. Auch waren rekombinante NF-ATc- und NF-ATx-Proteine in der Lage, an die NF-AT Site zu binden, so daß geschlossen werden konnte, daß NF-IL5P zumindest ein NF-AT-verwandtes Protein und den AP-1-Komplex (Lee et al. 1995) enthält.



**Abb.4: Struktur des IL-5 Promotors der Maus.** Die für die Aktivierung durch PMA/cAMP wichtigen Promoterelemente IL-5A, IL-5P, IL-5C und IL-5CLE0 sind in den Rechtecken angedeutet. Die in ihnen enthaltenen Bindeorte für Transkriptionsfaktoren sind darüber fett gedruckt. Die Zahlen unten bezeichnen die Positionen in Basenpaaren, bezogen auf den Transkriptionsstart (Pfeil).

In Position  $-70$  bis  $-60$  (also in IL-5C) wurde eine überlappende **GATA**-Bindestelle gefunden, die zusammen mit dem CLE0-Element, welches **AP-1**- und **Elf-1** Bindeorte enthält, essentiell für die PMA/cAMP-vermittelte Aktivierung des murinen IL-5-Promotors ist (Siegel et al. 1995). Lee und Kollegen konnten später zeigen, daß GATA-3 in Th2-, nicht aber in Th1- Zelllinien an diesen doppelte GATA-Bindeort bindet und so den IL-5 Promoter direkt aktiviert und kontrolliert (Lee et al. 1998). Weiterhin stellte sich in transienten Transfektionen mit Luciferasereporterkonstrukten heraus, daß der 1,2 kb messende IL-5-Promoter nur in Th2-, nicht aber in Th1-Zellklonen durch PMA aktivierbar ist (Lee et al. 1998). Die Autoren spekulierten, daß GATA-3 zumindest zum Teil für diese Th2-spezifische Aktivität des IL-5 Promotors verantwortlich ist, da GATA-3 in Th2-, aber nicht in Th1-Zellen exprimiert wird.

*Die Rolle von cAMP und PKA.* Das Th2-Cytokin Interleukin-5 ist durch Substanzen, die die intrazelluläre Konzentration von **cAMP** (cyclisches Adenosinmonophosphat) erhöhen, wie z.B. von IL-1 $\alpha$ , Prostaglandin E2 und Forskolin, stark induzierbar, während die Expression von Th1-Cytokinen wie IL-2 und IFN- $\gamma$  durch solche Substanzen gehemmt wird (Munoz et al. 1990, Snijdewint et al. 1993, Betz et al. 1991, Naora et al. 1994, van der Pouw Kraan et al. 1995). Außerdem wurde berichtet, daß die intrazelluläre cAMP-Konzentration von Th2-Zellen höher ist als die von Th1-Zellen (Novak et al. 1990).

1993 konnten Lee und Kollegen zeigen, daß murine EL-4 Zellen nach Stimulation mit PMA allein nur wenig IL-5 produzieren, aber daß durch Zugabe von dibutyryl-cAMP (bt2cAMP) die IL-5-Synthese auf mRNA- und Proteinebene um mehr als das zehnfache gesteigert werden kann. Passend dazu verstärkt bt2cAMP die Aktivität des IL-5-Promoters in transienten Transfektionen mit Luciferasegen-Reporterkonstrukten ebenfalls um ein Vielfaches (Lee et al. 1993). Der gleiche Effekt zeigte sich in Experimenten, in denen EL-4 Zellen mit T/I oder mit T/I und Forskolin stimuliert wurden; auch hier wurde die maximale IL-5-Promoteraktivität erst durch die Forskolinstimulation erreicht (Klein-Hessling et al. 2003). Für die optimale Aktivierung des IL-5-Promoters sind also mindestens zwei Signale nötig: ein Signal über den Ca<sup>2+</sup>-Weg (experimentell mit T/I oder PMA) und eines über cAMP (experimentell über bt2cAMP oder Forskolin).

Der Effekt von cAMP auf die IL-5-Promoteraktivität konnte durch Cotransfektion mit der katalytischen Untereinheit der **Proteinkinase A (PKA)** in EL-4 Zellen imitiert werden, was auf eine Verbindung von PKA zum cAMP-Signalweg hindeutet (Lee et al. 1993). Hemmt man die PKA selektiv durch den chemischen Inhibitor H89 oder durch Überexpression einer mutierten Version der regulatorischen Untereinheit der PKA (diese kann cAMP nicht mehr binden), wird die IL-5 Produktion in Th2-Zellen drastisch reduziert (Klein-Hessling et al. 2003). Überexpression der PKA in Th0-Zellen bewirkte dagegen eine signifikante Steigerung der IL-5 Expression.

Für den stimulatorischen Effekt von PKA auf den IL-5-Promoter ist GATA-3 erforderlich. Durch Cotransfektion der katalytischen Untereinheit von PKA und GATA-3 konnte die Aktivität des IL-5-Promoters (gemessen anhand der Luciferaseaktivität) in 293T-Zellen im Vergleich zu Einzeltransfektionen signifikant gesteigert werden. Th1-

Zellen exprimieren im Gegensatz zu Th2-Zellen kein GATA-3 und können durch Forskolin- oder cAMP-Stimulation nicht zur IL-5 Produktion angeregt werden. Ektopische Expression von GATA-3 in diesen Zellen vermag die cAMP-vermittelte Expression von IL-5 aber deutlich zu steigern. Dabei kann der Effekt von cAMP durch Coexpression von GATA-3 und PKA in Th1-Zellen ersetzt werden (Klein-Hessling et al. 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß PKA in Synergie mit GATA-3 die IL-5-Transkription und -Expression aktivieren kann.

*Der humane IL-5 Promoter.* Der IL-5-Promoter des Menschen zeigt starke Homologien zu dem der Maus. Kimberley et al. beschrieben 1997 drei Protein bindende Regionen, die als **Response Element I** (-79 bis -45), **RE II** (-123 bis -92) und **RE III** (-170 bis -130) bezeichnet wurden. RE I enthält das **CLE0** Element; RE II ist wichtig für die induzierbare Aktivität des Promoters und bindet mindestens zwei Mitglieder der **NF-AT** Familie. RE III scheint einen negativen Effekt auf die Aktivität des Promoter zu besitzen (Kimberley et al. 1997). Später wurde gezeigt, daß die Transkriptionsfaktoren **Oct-1**, **Oct-2** und **AP-1** an CLE0 (RE I) binden und so den IL-5 Promoter aktivieren (Thomas et al. 1999). Auch **Ets1** und **Ets2** aus der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren binden an CLE0 und aktivieren in Kooperation mit **GATA-3** den humanen IL-5 Promoter (Blumenthal et al. 1999).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterien und Zellen

- TopF E.coli                      E.coli Bakterien
- Saccharomyces cerevisiae      Hefezellen
- EL-4                                Thymomzelllinie der Maus
- 293T                                Embryonale Nierenepithelzelllinie des Menschen

#### 2.1.2 Nährmedien

- DMEM
- LB-Broth
- 2x YT

#### 2.1.3 Chemikalien und Reaktionssysteme

- Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), Roth
- Agarose, Roth
- Ammoniumperoxydisulfat (APS), Roth
- Ampicillin, Sigma
- Ethidiumbromid: 10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, Sigma
- $\beta$ -Mercaptoethanol, Roth
- Bradford-Reagenz (5x), BioRad
- Bromphenolblau, Merck
- BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin), Boehringer
- Chloramphenicol, Sigma
- Dithiothreitol (DTT), Sigma
- Essigsäure, Roth
- Ethanol, Roth
- Ionomycin: 5mM, Sigma
- Isopropanol, Roth

- MOPS, Sigma
- Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF), Serva
- [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, Amersham
- TEMED, Roth
- Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid (IPTG), Sigma
- Leupeptin, Sigma
- Trypanblau, 0,1%, Sigma
- Tween 20, Roth
- Lumi Light Peroxidase Substrat, Roche
- Glutathion-Agarose Beads, Sigma
- Protein A/G Beads, Sigma

#### **2.1.4 Geräte und Verbrauchsmittel**

- Autoklaven, Stiefenhofer
- Blotgerät TransphorLid, Hoefer
- Brutschrank, Heraeus
- Einmalküvetten, Hartenstein
- Eismaschine, Sunbeam
- Filme, Kodak
- Gelkammern, Hoefer/Stratagene
- Glaspipetten, Brandt
- Glaswaren, Schott
- Inkubatoren für Eppendorf-Reaktionsgefäße, Liebisch
- Magnetrührer, Ika Combimag
- Nitrocellulose-Membran, Schleicher&Schüll
- Nylonmembran, Schleicher&Schüll
- Parafilm, Nesco
- pH-Meter, Ingold K455
- Pipetten und -spitzen, Eppendorf
- Plastikmaterial, Falcon/Nunc/Greiner/Hartenstein
- Rotoren: Beckmann

- JA-10, Beckmann
- JA-14, Beckmann
- JA-20, Beckmann
- VTi-65, Beckmann
- Schüttler für Eppendorf-Reaktionsgefäße, Labinco, Hartenstein
- Spannungsgeräte, Desaga/Biorad
- Spektralphotometer, Pharmacia
- Sterilbank, Flow Laboratories
- Sterilfilter, Satorius
- UV-Leuchtschirm
- Verstärkerfolien, DuPont
- Vortexer, Hartenstein
- Waage, Precisa 300 MC
- Wasserbäder, Hartenstein
- Zählkammer, Marienfeld
- Zentrifugen, Eppendorf/Heraeus/Beckmann
- PCR-Maschinen, Perkin Elmer
- Sonikator, Biorad
- Roller, Hartenstein

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

#### Ladepuffer für SDS-Gele (2x) nach Laemmli

100mM	Tris pH 6,8
4%	SDS
0,2%	Bromphenolblau
20%	Glycerin
0,5%	DTT

#### 10x Laufpuffer für SDS-Gele (nach Laemli)

30,3 g/l	Tris
144,2 g/l	Glycin

10 g/l        SDS

Lösung zur Entfernung von Antikörpern von Western Blot Membranen

100 mM         $\beta$ -Mercaptoethanol  
62,5 mM        Tris pH 6,7  
2%                SDS

Transferpuffer für Western Blot Analyse

0,48 M        Tris  
0,39 M        Glycin  
20 %            Methanol

Waschpuffer für Western Blot Analyse

0,05 %        Tween 20 in 1x TBS

1x TAE

48,4 g        Tris  
11,4 ml        Essigsäure  
3,72 g        EDTA auf 1l ddH<sub>2</sub>O

1x TBE

89 mM        Tris  
89 mM        Borsäure  
2mM            EDTA

KLBM (Lyse Puffer)

20 mM        HEPES pH 7,5  
2 mM        EGTA pH 8,0  
2mM        EDTA pH 8,0  
50 mM         $\beta$ -Glycerophosphat  
1 %        Triton X100  
10 %        Glycerol  
20 mM        NaF

### RF 1

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
15 %	Glycerol

pH eingestellt auf 5,8, steril filtriert

### RF 2

10 mM	RbCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
15 %	Glycerol

pH eingestellt auf 6,8, steril filtriert

### Lösungen für Kolonie-Hybridisierung:

- CoHy I  
0,5 M        NaOH
  
- CoHy II  
0,2 M        Tris pH 7,5  
1 M         NaCl
  
- CoHyIII  
0,3 M        NaCl  
0,05 M      EDTA  
0,025 M     Natriumphosphat pH 6,8
  
- Praehybridisierungslösung  
6 ml         2xSSC  
1,2 ml      0,2 % SDS

1,2 ml          1x Denhardt  
1,2 ml          Heringsspermien DNA (100 µg/ml)  
Auffüllen auf 60 ml mit dd Wasser

- Hybridisierungslösung

11,3 ml        5x SSC  
0,9 ml        0,2 % SDS  
1,8 ml        2x Denhardt  
Auffüllen auf 45 ml

- Waschlösung

1-2x SSC  
0,2 % SDS

### **2.1.6 Enzyme (von MBI Fermentas)**

- EcoRI
- BamHI
- SmaI
- SalI
- XhoI
- HindIII
- BglII
- HpaI
- T4-DNA-Ligase
- Shrimp Alkaline Phosphatase
- Calf Intestine Phosphatase
- Polynukleotidkinase
- Taq-DNA-Polymerase
- Pwo-DNA-Polymerase, Peqlab

### 2.1.6 Größenmarker

- Proteingrößenmarker: Benchmark (Gibco)
- DNA-Größenmarker: 100bp u. 1000bp (MBI Fermentas)

### 2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

- Sequenzierungsprimer für pGex-Vektoren, 5' und 3'
- 5' Sequenzierungsprimer für pSOS-Vektoren  
5' CCAAGACCAGGTACCATG 3'
- 3' Sequenzierungsprimer für pSOS-Vektoren  
5' CGCAGGGTTTTCCCAGT 3'
- 5' Sequenzierungsprimer für pMyr-Vektoren  
5' ACTACTAGCAGCTGTAATAC 3'
- 3' Sequenzierungsprimer für pMyr-Vektoren  
5' CGTGAATGTAAGCGTGACAT 3'
- Primer NF-ATc NT BamHI/SalI, 5' und 3'
- Primer NF-ATc CT BamHI/SalI, 5' und 3'
- Primer GATA-3 NT 5' und 3'
- Primer GATA-3 CT 5' und 3'

### 2.1.8 Antikörper

- Anti-NF-ATc Monoklonaler Maus-Antikörper (Alexis)
- Anti-HA Monoklonaler Maus-Antikörper (Babco)
- Anti-FLAG Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Sigma)
- Anti-GST Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz)
- Anti-ER Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz)
- Anti-SOS Monoklonaler Maus-Antikörper
- Anti-Maus SC-2005 (Santa Cruz) Peroxidase gekoppeltes anti-Maus Serum
- Anti-Kaninchen NAG34 (Amersham) Peroxidase gekoppeltes anti-Kaninchen IgG

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Klonierungen

Das Prinzip der (Sub)Klonierung ist folgendes: Das gewünschte cDNA-Fragment wird entweder aus einem bestehenden Plasmid mit geeigneten Restriktionsenzymen herausgeschnitten oder mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem Plasmid als Template amplifiziert. Die Probe wird auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die interessierende Bande wird unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Fragment aus dem Gel extrahiert. Das Fragment wird mit dem gewünschten Vektor ligiert und anschließend wird der Ligationsansatz in E.coli Zellen transformiert. Transformierte E.coli-Zellen werden durch Ampicillin- oder Chloramphenicolhaltige Agarplatten selektioniert. Aus den einzelnen Klonen kann dann mittels DNA-Mini-Präparation Plasmid-DNA isoliert werden, die mit passenden Restriktionsenzymen behandelt und so auf das Vorhandensein und der richtigen Orientierung des klonierten cDNA-Fragmentes untersucht werden kann. Die endgültige Kontrolle erfolgt durch DNA-Sequenzierung mit Hilfe geeigneter Primer.

#### 2.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme „schneiden“ doppelsträngige DNA an genau definierten (oft palindromischen) Sequenzen und sind deshalb wichtige Hilfsmittel in der Molekularbiologie..

Ein Restriktionsverdau eines Plasmides wird folgendermaßen angesetzt:

DNA/Plasmid:	Je nach Bedarf, z.B. 20 µg
Restriktionsenzym:	1 Unit pro 1µg eingesetzte DNA
10x Reaktionspuffer:	10% des Volumens des Gesamtansatzes
Aqua dest.	Auffüllen auf ein geeignetes Endvolumen. Das Endvolumen muß dabei mindestens um den Faktor 10 größer sein als das eingesetzte Enzymvolumen.

Der Reaktionspuffer muß passend zum Enzym/zu den Enzymen ausgewählt werden, um eine optimale Aktivität des Enzyms zu erzielen.

Der Ansatz wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei einer geeigneten Temperatur (meist 37°C je nach Enzym) 1-2 h inkubiert.

### 2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Zu Klonierungszwecken wurde zusätzlich zur Taq-Polymerase auch die Pwo-Polymerase benutzt, da diese aufgrund ihrer 3'-5' Exonukleaseaktivität eine wesentlich geringere Fehlerrate aufweist.

Ein typisches Protokoll sieht so aus:

Master-Mix (Volumina pro 50 µl Ansatz):

10x Puffer Pwo (-Mg <sup>2+</sup> )	5,0 µl
25 mM Mg <sup>2+</sup>	8,0 µl
Pwo-Polymerase	2,0 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
Aqua dest.	9,5 µl

DNA-Mix (Volumina pro 50 µl Ansatz):

200 ng Plasmid	1,0 µl
100 pmol 5' Primer	1,0 µl
100 pmol 3' Primer	1,0 µl
10 mM dNTP's	1,0 µl
Aqua dest.	21,0 µl

Master- und DNA-Mix werden in PCR-Gefäßen gemischt und die PCR-Maschine wird mit einem geeigneten Programm gestartet.

### 2.2.1.3 Auftrennen von DNA auf Agarosegel

Um den Erfolg eines Restriktionsverdau oder einer PCR zu kontrollieren, werden die Proben (je 3µl) mit je 2µl Ladepuffer gemischt und auf ein Ethidiumbromid-enthaltendes Agraosegel aufgetragen. Ein 1,5 % Gel wird folgendermaßen hergestellt: 3

g Agarose werden mit 200ml TAE und 6µl Ethidiumbromid gemischt und aufgekocht, danach werden 22ml in eine Form gegossen. Die Elektrophorese erfolgt bei 100V für etwa 1,5 h. Die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente können aufgrund des eingelagerten EtBr durch Beleuchtung mit UV-Licht dargestellt und fotografiert werden. Die Bestimmung der Größe der Fragmente (Basenpaare) erfolgt durch Vergleich mit parallel aufgetragenen Standard-Größenmarkern.

#### 2.2.1.4 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt mit Hilfe des JetSorb (Genomed) Gelextraktionskits.

#### 2.2.1.5 Ligation

Die Ligation von Fragment und Vektor wird nach folgendem Schema in 1,5 ml Eppendorf Gefäße angesetzt:

	Leerkontrolle	Ansatz
Vektor	1,0 µl	1,0 µl
Insert (Fragment)	-	10,0 µl
T-4 Ligase	1,0 µl	1,0 µl
10x Puffer für Ligase	2,0 µl	2,0 µl
Aqua dest.	6,0 µl	6,0 µl
10mM Tris	10,0 µl	-

Die Reaktionsansätze werden über Nacht in einem Wasserbad bei 16 °C inkubiert und am nächsten Tag in kompetente E.coli Zellen transformiert.

#### 2.2.1.6 Herstellung kompetenter E.coli Zellen

TopF E.coli Bakterien werden auf eine LB-Agarplatte (ohne Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird abends eine Kolonie mit einer Eppendorf-Spitze gepickt und in 3ml flüssigem SOB-Medium (ohne Antibiotika) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wird die Kultur auf 500ml SOB-Medium verdünnt und in einem 2l-Erlenmeyerkolben bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die O.D.<sub>550</sub> 0,500 bis 0,550 beträgt (ca. 2 bis 3 h). Die Kultur wird in sterile 250 ml Zentrifugengefäße überführt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wird bei 2500 Upm für 12 bis 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttelt. Die Zellen werden in 20 ml RF1 vorsichtig resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wird für 9 Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert und der

Überstand wieder abgeschüttet. Das Pellet wird vorsichtig in 3,5 ml eiskalter RF2-Lösung aufgenommen. Abschließend werden 200 µl-Aliquots hergestellt. Die Eppendorf-Gefäße stehen dabei in einer Mischung aus Trockeneis und Ethanol, so daß die Suspension beim Einfüllen sofort gefriert. Die Zellen werden dann bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.1.7 Transformation**

Das Ziel der Transformation ist Einbringen von Plasmiden in kompetente *E. coli* Bakterien. Die kompetenten Zellen werden ca. 30 min auf Eis aufgetaut. In ein 14 ml Reaktionsgefäß werden je 10µl DNA (Ligationsansatz) in 90 µl kompetente Zellen pipettiert. Handelt es sich um eine Retransformation werden nur 1-2 µl Plasmid und 10-50 µl kompetente Zellen benötigt. Der Ansatz wird mit der Pipette gemischt und 30 min auf Eis stehen gelassen. Der Hitzeschock, der die Aufnahme der DNA in die Bakterien bewirkt, erfolgt in einem Wasserbad bei  $42^{\circ}\text{C}$  für genau eine Minute. Danach wird je 1ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugegeben und der Ansatz für 1h bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Zur Selektion der transformierten Zellen werden 10 bis 200 µl der Kultur auf Antibiotikum (z.B. Ampicillin)-enthaltende Platten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht (ca. 16 h) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nur die Zellen, die ein Plasmid mit Antibiotikumresistenz aufgenommen haben können auf der Platte Kolonien bilden.

#### **2.2.1.8 Kolonie-Hybridisierung**

Nach Transformation der Ligationen müssen die *E.coli*-Kolonien auf den Agarplatten daraufhin untersucht werden, ob ihre Plasmide die klonierten cDNA-Fragmente auch tatsächlich enthalten oder nicht. Klassischerweise geschieht dies durch Isolation der Plasmide (Minipräp.) und nachfolgenden Restriktionsverdau. Müssen sehr viele Kolonien untersucht werden bietet sich die Kolonie-Hybridisierung an, bei der die „positiven“ Kolonien mittels einer radioaktiven DNA-Sonde markiert werden.

Man legt runde Nylonmembranen auf die Agar-Platten und wartet 2 bis 3 Minuten. Die Orientierung der Membranen wird durch mehrere kleine Einstiche durch die Membran in den Agar markiert. Nach ruckartigem Abziehen befinden sich die Kolonien auf der Oberfläche der Membranen. Die Membranen legt man nun auf ein Whatman-Papier, das

vorher mit dem CoHy I Puffer (0,5 M NaOH) getränkt wurde, und inkubiert für 5 bis 10 Minuten. Dieser Schritt dient dazu, die Zellen zu lysieren, die Plasmid-DNA freizulegen und zu denaturieren. Dann werden die Membranen in gleicher Weise zwei mal 10 Minuten mit dem CoHy II Puffer (zur Neutralisation von CoHy I) getränkt. Man läßt die Membranen an der Luft trocknen, trinkt sie dann mit CoHy III für 10 Minuten und trocknet sie wieder. Zur Fixierung der DNA auf der Oberfläche der Membranen werden sie für 30 min bei 80°C gebacken.

Die Membranen werden jetzt in einer Prähybridisierungslösung für 30 Minuten bei 60°C (Wasserbad) unter langsamem Schütteln inkubiert.

Die eigentliche Hybridisierung mit 20 µl radioaktiv markierter Probe erfolgt in einer Hybridisierungslösung für eine Stunde bei 60°C. In diesem Schritt erfolgt die Hybridisierung von Probe mit komplementärer cDNA, so daß nur die Kolonien markiert werden, die das cDNA-Fragment erhalten. Die Probe muß dabei so gewählt werden, daß sie spezifisch an das klonierte cDNA-Fragment binden, nicht aber an den Vektor.

Die radioaktive Markierung der Probe erfolgt durch Kinasierung von freien 5'Enden:

Primer 5' (100 pmol)	1,0 µl
Primer 3' (100 pmol)	1,0 µl
10 U Polynukleotidkinase	1,0 µl
10 x Reakt. Puffer PNK	2,0 µl
[ <sup>32</sup> P] γ-ATP	3,0 µl
Aqua dest.	12,0 µl

Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert, die Primer sind dann mit radioaktivem <sup>32</sup>P markiert.

Nach der Hybridisierung werden die Membranen drei mal 15 Minuten mit 1x SSC gewaschen und anschließen luftgetrocknet. Dann werden sie auf ein Filterpapier geklebt. In der Dunkelkammer wird ein Film aufgelegt, die Exposition erfolgt über Nacht bei -70°C. Der Film sollte nach dem Entwickeln dann an den Stellen geschwärzt sein, an denen sich positive (also auch radioaktiv markierte) Kolonien befanden. Durch richtiges Auflegen des Filmes auf die Agarplatten können dann die positive Kolonien

identifiziert werden. Die weitere Analyse der Kolonien erfolgt durch Minipröp., anschließendem Restriktionsverdau und Sequenzierung der Plasmide.

#### **2.2.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Der sogenannte Minipröp. dient zur Isolation von Plasmiden aus 3-ml- E.coli-Kulturen. Abends werden mit Pipettenspitzen einzelne Kolonien von den Nährplatten gepickt und über Nacht in je 3ml LB-Medium (mit Antibiotikum) bei 37°C in einem Schüttler vermehrt. Die Isolation der Plasmide erfolgt mit Hilfe des Mini-Pröp.-Kits von Genomed.

#### **2.2.1.10 DNA-Sequenzierung**

Der PCR-Ansatz zur Sequenzierung eines Plasmides (meist aus Minipröp.) wird wie folgt pipettiert:

DNA (0,8 µg)	5,0 µl
Primer 3´oder 5´ (20 pmol)	2,0 µl
Sequencing Mix	7,0 µl (enthält Polymerase und mit Flourochrom markierte Dedeoxynukleotide)

Zentrifugensäulchen werden mit Sephadex G50 beladen, 3 min bei 3000 Upm zentrifugiert und dann auf 1,5 ml Gefäße, die 1,5 µl 3 M Natriumacetat enthalten, aufgeschraubt. Nach der PCR werden die Proben auf die Säulchen geladen. Durch Zentrifugation für 3 min bei 3000 Upm durchlaufen die Proben die Säulchen, werden in den Gefäße aufgefangen und dabei gereinigt. Durch Zugabe von 70 µl 100 % Ethanol und anschließendes vortexen fällt man die DNA. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 Upm wird der Überstand vorsichtig abgesaugt und das DNA-Pellet unter UV-Licht kontrolliert.

#### **2.2.1.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Amplifikation von Plasmiden werden diese in E.coli Bakterien transformiert. Je eine Kolonie wird morgens gepickt und bis abends (ca. 8h) bei 37 °C unter Schütteln in

3 ml 2xYT-Medium (+Antibiotikum) inkubiert. Abends wird 1 ml der Kultur auf 100 ml verdünnt und bis zum nächsten Morgen (ca 16 h) wieder bei 37°C inkubiert. Die Isolation der Plasmide aus den Bakterien erfolgt mit dem Nukleobond AX-Kit von Machery & Nagel.

## 2.2.2 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen

Zur Untersuchung von Proteinen, z.B. für Interaktionsstudien ist es oft hilfreich, das gewünschte Protein in größerer Menge zu synthetisieren und zu isolieren. Eine relativ einfache Methode hierfür ist die bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen. Man kloniert man die cDNA des gewünschten Proteins in ein sog. Gex Plasmid (siehe Klonkarten im Ergebnisteil), welches die cDNA für GST enthält. GST steht für Glutathion-S-Transferase und ist ein Enzym aus dem Helminthen *Schistosoma mansoni*, welches Glutathion spezifisch bindet. Das Fusionsprotein „GST-Zielprotein“ kann in *E.coli* Bakterien exprimiert werden und mit Hilfe von mit Glutathion beladenen Beads (siehe Skizze GST-Pulldown) aus dem Bakterienextrakt isoliert werden.

Kompetente *E.coli* TopF Zellen werden mit den Gex-Plasmiden transformiert, auf Ampicillin-enthaltende Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je eine Kolonie wird mit einer Eppendorf-Spitze gepickt und über Nacht in 3ml YT-Medium (+Ampicillin) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Kultur 1:100 (2ml auf 200 ml) verdünnt und ca. 3h bei 37°C in einem 2l-Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Induktion der Expression erfolgt durch Zugabe von 20 µl IPTG (=Isopropyl-β-Thiogalactosid), anschließend wird für 1,5 h bei 30°C inkubiert. Die Bakterien werden dann durch Zentrifugation (10 min bei 5000 Upm) geerntet, in 5 ml eiskaltem PBS mit 1% Triton (plus PMSF und Leupeptin) aufgenommen und in 14 ml-Reaktionsgefäße überführt. Mittels Sonikation (Ultraschallbehandlung, für 30 s bei maximaler Energie und in 1s-Pulsen) werden die Zellen aufgebrochen. Die Zelltrümmer werden nun abzentrifugiert (20 min bei 10000 Upm) und die Überstände, die die Fusionsproteine enthalten, in neue 14 ml Reaktionsgefäße überführt. Um die GST-Proteine aus dem Extrakt zu isolieren, werden 200 µl 50%ige Glutathion-Agarose-Beads-Suspension hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird eine Stunde bei 4°C unter Rollen inkubiert, die Beads werden

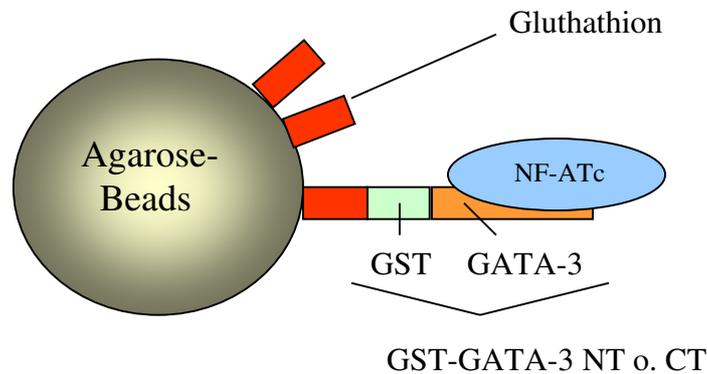
dann durch Zentrifugation (5 min bei 10000 Upm) abgetrennt, der Überstand wird abgesaugt. Die Beads werden dann in 1ml-Eppendorf-Caps überführt und 3 mal mit je 1ml eiskaltem PBS mit 1% Triton gewaschen. Um die Fusionsproteine wieder von den Beads abzulösen, wird zu den Beads (Überstand vorher absaugen) 100µl Glutathion-Elutionspuffer hinzugegeben und für 15 min bei 4°C unter Rollen inkubiert. Der Überstand wird durch Zentrifugation (1 min bei 1400 Upm) gewonnen und in ein neues Gefäß überführt. Der Vorgang wird dann noch einmal wiederholt. Die Proteinkonzentration wird photometrisch mit dem Bradford-Reagenz von BioRad bestimmt. Die Proteine werden bei -70° C gelagert.

### **2.2.3 GST-Pulldown**

GST-Pulldown-Versuche dienen dazu, die physikalische Interaktion zweier Proteine in Lösung nachzuweisen. Der Versuch wird im folgenden am Beispiel der Interaktion von NF-ATc und GATA-3 NT bzw. CT erklärt.

293T Zellen werden mit Expressionsvektoren für NF-ATc/A transfiziert und 24 h später geerntet. In drei 1,5 ml Eppendorf Gefäße werden je 200µg Gesamtprotein des Extraktes und je 30 (bis 70) µg GST und 50 µl Glutathion-Agarose Beads (50%ige Suspension) pipettiert und die Reaktionsansätze auf je 400µl aufgefüllt. Die Ansätze werden bei 4° C eine Stunde auf einem Roller inkubiert. Nach einer Stunde wird abzentrifugiert und die Überstände in neue Caps überführt. Diese Vorinkubation dient dazu, alle Proteine, die unspezifisch an GST binden, aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

Jetzt werden zu den gesammelten Überständen je 30 µg bakteriell exprimiertes GST, GST-GATA-3 NT oder GST-GATA-3 CT plus je 50 µl 50 %ige Glutathion-Agarose-Beads Suspension hinzugegeben. Die Ansätze werden für zwei bis drei Stunden bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Während dieser Zeit soll die Bindung von NF-ATc an GATA-3 NT oder CT erfolgen:



Die Glutathion-Agarose-Beads dienen dazu, den Komplex aus GST-Fusionsproteinen und daran gebundenem NF-ATc aus dem Reaktionsansatz zu präzipitieren, bzw. „herauszuziehen“ („Pull-down“). Die Ansätze werden kurz zentrifugiert, die Überstände abgesaugt und die Beads jetzt 5 mal mit 1ml eiskaltem KLBm gewaschen. Zu den gewaschenen Beads wird je 30 µl Laemmli-Puffer hinzugegeben und die Gefäße werden für ca. 3min bei 100°C in einem Heizblock aufgekocht, um die Proteine von den Beads abzulösen. Nach kurzer Zentrifugation werden die Überstände abgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis von an GATA-3 gebundenem NF-ATc erfolgt mittels anti-NF-ATc Antikörpern im Western Blot.

#### 2.2.4 Transfektion von 293T-Zellen

Die Transfektion dient dem Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen (hier 293T-Zellen).

Pro Reaktionsansatz werden in Eppendorfgefäße die entsprechende Menge DNA (5 bis 10 µg) pipettiert und der Ansatz mit DMEM- auf 600 µl aufgefüllt. Dann wird je 30 µl Polyfect (Quiagen) Reagenz hinzugegeben, kurz gevortext und der Ansatz für 10 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Medium der über Nacht in Gewebekulturschalen kultivierten Zellen abgesaugt und durch 3,6 ml frisches DMEM ersetzt. Die Eppendorf-Gefäße werden nach 10 Minuten nochmals gevortext und deren Inhalt wird dann in die Kulturschalen gegeben. Die Zellen werden dann noch etwa 24 Stunden bei 37 °C kultiviert.

## 2.2.5 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus eukaryontischen Zellen

293T Zellen wachsen adhären auf der Plastikoberfläche von Gewebekulturschalen. Zum Ernten der Zellen wird das Flüssigmedium abgesaugt und die Zellen mit 6ml eiskaltem PBS von der Platte abgespült und so in Suspension gebracht. Die Suspension wird zentrifugiert (5 min bei 1500 Upm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird dann mit 1ml eiskaltem PBS aufgenommen, in ein 1ml Eppendorf-Gefäß überführt und wieder durch Zentrifugation abgetrennt (2min bei 10000 Upm). Zur Herstellung von Extrakten werden die Zellen in 400 µl eiskaltem KLBm-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen zu lysieren, wird die Suspension ca. 7 mal mit einer 1ml-Spritze durch eine dünne Kanüle gezogen. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation (2min bei 12000 Upm) abgetrennt. Der klare Überstand enthält die extrahierten Proteine und wird nach photometrischer Messung (BioRad) der Proteinkonzentration bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.6 Western Blot (Immunoblot) Analyse

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von Proteinen. Das Verfahren läuft in folgenden Schritten ab:

### 2.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das denaturierende Polyacrylamidgel besteht aus einem oberen Trenn- und einem unteren Sammelgel. Die Ansätze für das Gel werden nach folgendem Schema zusammenpipettiert (Bsp. für ein 12 prozentiges Gel):

	Trenngel:	Sammelgel:
H <sub>2</sub> O:	4,1 ml	6,8 ml
Acrylamid 30%:	5 ml	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8:	3,125 ml	-
1,5 M Tris pH 6,8:	-	1,25 ml
10 % SDS:	0,125 ml	0,1 ml
APS (1mg/ml):	0,125 ml	0,1 ml
TEMED:	0,005 ml	0,01 ml

Zuerst wird das Trenn-, dann das Sammelgel gegossen. Nach Polymerisation wird das Gel in eine Laufkammer eingespannt und die Proben geladen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgt elektrophoretisch bei 25 mA für ca. 2h.

#### *2.2.6.2 Transfer auf Nitrocellulosemembran („Blot“)*

Das Gel wird luftblasenfrei auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt, darüber die Nitrocellulosemembran und wieder 3 Lagen Whatman-Papier. Der Aufbau erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Wanne, dann wird das Ganze in eine Transferkassette gelegt, die in richtiger Orientierung (Membran in Richtung Anode) in eine Transferkammer gestellt wird. Die Transferkammer wird mit Transferpuffer gefüllt und der Spannungsgenerator angeschaltet (50 V). Der elektrophoretische Transfer („Blot“) der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgt über Nacht bei 4°C.

#### *2.2.6.3 Immun-Detektion*

Das Prinzip der Immun-Detektion ist folgendes: Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten und auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine werden durch sogenannte Primärantikörper gebunden. Diese Primärantikörper (z.B. anti-NF-ATc) binden spezifisch ein bestimmtes Protein, bzw. einen Teil davon. Der Sekundärantikörper bindet im zweiten Schritt an den Primärantikörper. Der Fc-Anteil des Sekundärantikörpers ist mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe des Substrates der Peroxidase wird Licht emittiert, welches einen aufgelegten Film an der Stelle schwärzt, an der sich das gesuchte Protein auf der Membran befindet.

Zunächst wird zur Blockierung unspezifischer Bindungen die Membran für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in 50 ml 5%iger Milchpulverlösung inkubiert. Dann inkubiert man die Membran für 3h mit dem Primärantikörper (1:250 bis 1:4000 in 12ml 5%iger Milchlösung). Anschließend wird die Membran einmal 15 min und 3 mal 5 min in TBS-Tween-Lösung gewaschen. Jetzt erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:2000 anti-Maus o. anti-Kaninchen in 12 ml 5%iger Milchpulverlösung) für 2h. Es wird wie oben angegeben zum zweiten mal gewaschen und die Membran dann in 2ml Peroxidasesubstrat (Roche, 1ml Lsg. A + 1ml Lsg. B) gegeben und für 1 min per Hand geschüttelt. Man verpackt die Membran dann in eine

Klarsichtfolie, die mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist, und legt in der Dunkelkammer einen Fotofilm auf. Die Expositionszeit richtet sich nach der Stärke des Signals und beträgt 10 Sekunden bis 16 Stunden. Der Film wird dann entwickelt und beschriftet. Die Bestimmung des Molekulargewichts der detektierten Proteine erfolgt durch Vergleich mit dem Größenmarker auf der Membran.

#### **2.2.6.4 Ablösung („Stripping“) der Antikörper von der Nitrocellulosemembran**

Will man die Nitrozellulosemembranen erneut verwenden (z.B. zur Detektion mit anderen Antikörpern), können diese vorher von den gebundenen Antikörpern befreit werden. Die Membran wird dazu 30 Minuten in Stripping-Puffer in einem Schüttelwasserbad bei 55-70°C inkubiert. Dann wird die Membran wie bei der Immundetektion (s.o.) gewaschen.

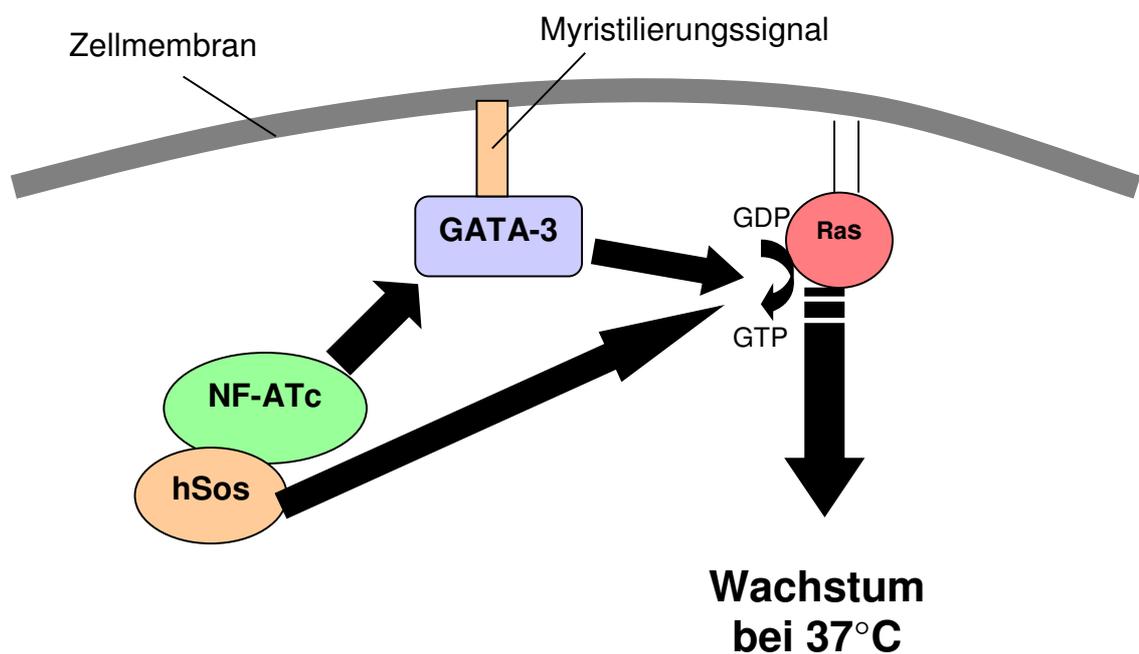
#### **2.2.7 Das Cytotrap-System**

Dieses neuartige two-hybrid System basiert auf dem Prinzip der Interaktion zweier in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierter Fusionsproteine, die den Ras-Signalweg aktivieren und so das Wachstum der Hefezellen induzieren können. Im Gegensatz zum klassischen Yeast-two-hybrid-System können mit dem Cytotrap System auch Proteine untersucht werden, die eine DNA-bindende und/oder eine transaktivierende Domäne (wie die meisten Transkriptionsfaktoren) enthalten.

Das Cytotrap System benutzt den temperatursensitiven *S. cerevisiae* Stamm *cdc25H*, der eine Punktmutation im *CDC25* Gen enthält. *CDC25* ist das Hefezell-Homolog des menschlichen *Sos* (*hSos*) Gens, welches für einen „Nukleotidexchangefaktor“ codiert, der Ras bindet und aktiviert und so den Ras Signalweg anschaltet. Die *cdc25* Mutation verhindert das Wachstum der Hefezellen bei 37°C, nicht aber bei der sogenannten permissiven Temperatur von 25°C. Das Cytotrap System basiert auf der Fähigkeit des humanen *Sos* proteins (*hSos*), den *cdc25* Defekt zu kompensieren, d.h den Ras Signalweg anzuschalten. Wird *hSos* in der Hefezelle exprimiert und wandert anschließend an die Zellmembran, so kann die Zelle bei 37°C wachsen (s. Abb.8).

Die cDNA der zu untersuchenden Proteine (in diesem Fall NF-ATc NT, -CT, GATA-3 NT und -CT) wurde im Rahmen dieser Arbeit in die Vektoren *pSos* (NF-ATc) und

pMyr (GATA-3) Vektoren kloniert (s. Abb.7). Die Plasmide werden in die Hefezellen kotransformiert und die Fusionsproteine exprimiert. Durch das Myristilierungssignal wird GATA-3 an der Zellmembran verankert. Bindet NF-AT an GATA-3 so wird auch hSos an die Membran verlagert und kann dort den Ras-Signalweg aktivieren, so daß die Hefezellen bei 37 °C wachsen.



**Abb. 8: Das Cytotrap System**

Die cDNA der zu untersuchenden Proteine (in diesem Fall NF-ATc und GATA-3) wird in pSos (NF-ATc) und pMyr (GATA-3) Vektoren kloniert. Die Plasmide werden in die Hefezellen kotransformiert und die Fusionsproteine exprimiert. Durch das Myristilierungssignal wird GATA-3 an der Zellmembran verankert. Bindet NF-AT an GATA-3 so wird auch hSos an die Membran verlagert und der Ras-Signalweg wird angeschaltet. Die Hefezellen können dann bei 37 Grad Celsius wachsen.

### 3. Ergebnisse

*Zielstellung.* Für Herzmuskelzellen konnte gezeigt werden, daß NF-AT3 an GATA-4 bindet (Molkentin 1998). Dabei interagieren die RSD von NF-AT3 mit dem C-terminalen Zinkfinger von GATA-4. Diese Interaktion besitzt offensichtlich auch funktionelle Bedeutung, denn sie steigert die Aktivität des BNP-Promoters und trägt letztendlich zur Hypertrophie des Herzens bei (Molkentin et al. 1998).

Einen ähnliches Zusammenspiel scheint es in Th2-Zellen zwischen NF-ATc (=NF-AT2) und GATA-3 zu geben. In Luciferasereporteressays, die in unserem Labor durchgeführt wurden, zeigte sich bei Cotransfektion von NF-ATc und GATA-3 im Vergleich zu Einzeltransfektionen eine drastische Aktivitätssteigerung des IL-5-Promoters. Diese Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Kooperation der beiden Transkriptionsfaktoren bei der Steuerung des IL-5 Promoters hin (Stefan Klein-Heßling et al., in Vorbereitung). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob NF-ATc und GATA-3 auch physikalisch interagieren. Im Falle einer Bindung sollten dann die Interaktionsdomänen bestimmt werden.

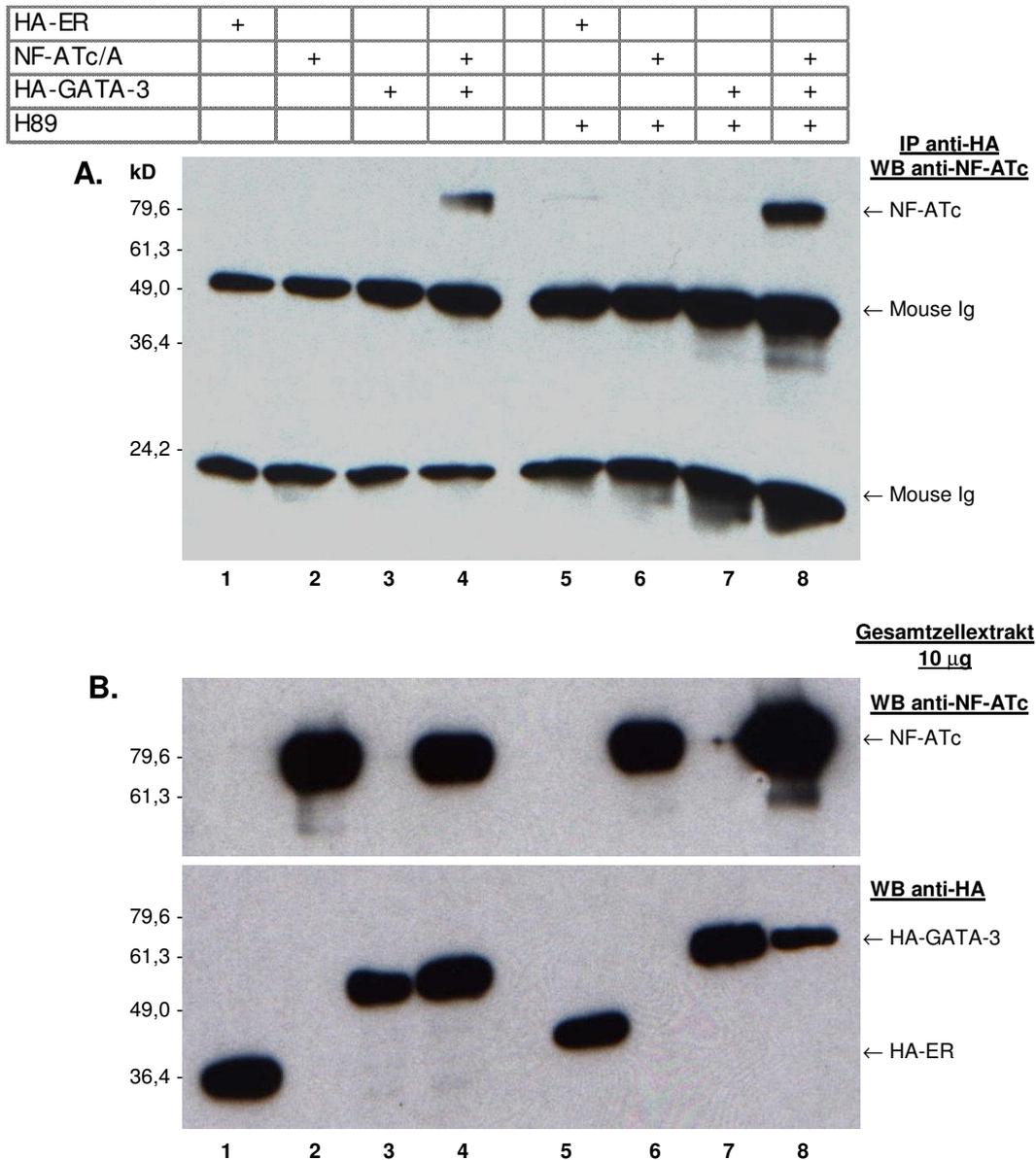
#### 3.1. NF-ATc und GATA-3 interagieren *in vivo*

Um zu untersuchen, ob NF-ATc und GATA-3 physikalisch interagieren, wurden Coimmunopräzipitationen durchgeführt. Expressionsvektoren für NF-ATc/A und HA-GATA-3 wurden in 293T Zellen cotransfiziert. Als Negativkontrollen dienten Transfektionen mit Vektoren, die für HA-ER (HA-Epitop fusioniert mit dem Östrogenrezeptor), HA-GATA-3 oder NF-ATc/A allein kodieren. Die Zellen wurden unstimuliert belassen oder mit dem PKA-Inhibitor H89 behandelt.

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. 200 µg Extrakt wurden zunächst mit unspezifischen Maus-Antikörpern und Protein A/G Kügelchen („beads“) 1h vorinkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet (enthält die Kügelchen, daran gebundene Maus-Antikörper und Proteine, die unspezifisch mit den Antikörpern reagieren) verworfen. Zum Überstand wurden nun je 2 µl anti-HA Antikörper und 50 µl 50 prozentige Protein A/G

„beads“ Suspension zugegeben und für weitere 3 h unter Rollen bei 4 °C inkubiert. Die anti-HA-Antikörper binden nun spezifisch HA-GATA-3 („Immunopräzipitation“) und werden ihrerseits mit ihrem Fc-Teil an die „beads“ gebunden. So war es möglich, HA-GATA-3 und daran gebundene Proteine aus den Extrakten zu präzipitieren. Die Kügelchen wurden nach 3 h 5 mal mit eiskaltem KLBm gewaschen und dann in 30 µl Lämmli-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Nach SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet. Die Detektion von an GATA-3 gebundenem NF-ATc erfolgte mit anti-NF-ATc Antikörpern im Western Blot.

In Abbildung 1A erkennt man, daß NF-ATc nur in den Proben detektiert werden konnte, in denen sowohl GATA-3 als auch NF-ATc enthalten war (80 kD Banden in Spalten 4 und 8). Der Proteinkinase A-Inhibitor H89 zeigte keinen Einfluß auf die Interaktion. Zur Kontrolle der Expression von HA-ER, NF-ATc und GATA-3 diente ein Western-Blot mit je 10 µg Zellextrakt (Abb.1B). NF-ATc wurde mit anti-NF-ATc und HA-ER bzw. HA-GATA-3 mit anti-HA detektiert. In der Abbildung erkennt man, daß alle Proteine relativ gleichmäßig exprimiert wurden.



**Abb 1: NF-ATc/A und GATA-3 interagieren in vivo.**

**A. Coimmunopräzipitation von NF-ATc/A mit HA-GATA-3 aus 293T Gesamtzellextrakten.**

293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-ER, NF-ATc/A, HA-GATA-3 oder NF-ATc/A +GATA-3 transfiziert und entweder unstimuliert belassen (Spalten 1-4) oder mit dem PKA-Inhibitor H89 behandelt (Spalten 5-8). Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. 200 µg Gesamtzellextrakt wurde 1h mit Maus IgG und Protein A/G „beads“ vorinkubiert. Der Überstand davon wurde dann 3 h mit 2 µg Anti-HA Antikörper und Protein A/G Agarose „beads“ bei 4° C inkubiert. Die „beads“ wurden 5 mal mit KLBm Puffer gewaschen, in Lämmli-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion von NF-ATc im Western Blot. NF-ATc konnte nur in den Spalten 4 u. 8. nachgewiesen werden (Bande 80 kD). Die Banden darunter entsprechen den schweren und leichten Ketten der eingesetzten Immunglobuline.

**B. Expression von NF-ATc/A, HA-GATA-3 und HA-ER.** Western Blot von 10 µg der 293T-Gesamtzellextrakte mit anti-NF-ATc (oben) oder anti-HA-antikörpern (unten).

## 3.2. Bestimmung der für die Interaktion wichtigen Proteindomänen

Um die Proteindomänen, die für die NF-ATc/GATA-3 Interaktion von Bedeutung sind, zu bestimmen, wurden sogenannte GST-„pulldown“ Versuchen durchgeführt.

Das Prinzip des GST-„pulldowns“ ist folgendes: Es wurden verschiedene cDNA-Fragmente der zu untersuchenden Proteine in einem Leseraster mit der GST(=Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma mansoni*)-cDNA kloniert. GST bindet spezifisch an Glutathion, so daß die in *E.coli* exprimierten Fusionsproteine mit Hilfe von Glutathion-beladenen Agarose-„beads“ leicht aus einem bakteriellen Extrakt aufgereinigt werden können. Mit diesen gereinigten GST-fusionierten Proteinanteilen (z.B. GST-GATA-3 CT) kann dann im Pulldown mit verschiedenen Zellextrakten (z.B. 293 Zellen, die NF-ATc überexprimieren) die Interaktion getestet werden.

Die Arbeitsschritte waren also

- a) Klonierung der cDNAs in Gex-Vektoren,
- b) bakterielle Expression der Fusionsproteine und
- c) GST-„pulldown“

### 3.2.1 Klonierungen

Um bakteriell exprimierte GST-fusionierte Proteine herzustellen, war es notwendig, die jeweilige cDNA in Gex-Vektoren zu klonieren. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen beispielhaft Klonkarten der so konstruierten Plasmide. Folgende Konstrukte wurden hergestellt:

**GATA-3 NT (AS 2-300, 894 bp) Gex1**

**GATA-3 CT (AS 301-443, 426 bp) Gex1**

**GATA-3 FL (AS 2-443, 1323 bp) Gex1**

**NF-ATc NT (AS 2-417, 1245 bp) Gex2**

**NF-ATc CT (AS 418-716, 894 bp) Gex2**

NT steht dabei für den aminoterminalen Anteil der Proteine, CT für den carboxyterminalen Anteil, FL für „full length“ und die Zahlen in Klammern bezeichnen die Aminosäuren der codierten Proteine.

Bestehende Plasmide, die die entsprechenden cDNAs enthielten, wurden zur Gewinnung der cDNA-Fragmente mit passenden Restriktionsenzymen behandelt. Für die GATA-3-Fragmente NT, CT und FL wurde EcoRI, für die NF-ATc-Fragmente BamHI und BglIII verwendet. Die Proben wurden dann auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die der errechneten Größe entsprechenden Banden (siehe Basenpaargröße oben) wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten, und das Fragment wurde aus dem Gel mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits isoliert. Die Fragmente wurden dann in die „Multiple Cloning Site“ des gewünschten Vektors (GATA-3-Fragmente in Gex-1 und NF-ATc Fragmente in Gex-2) mit Hilfe der T4-Ligase eingefügt. Nach Ligation über Nacht bei 16° C wurden die Ansätze in kompetente TopF E.coli Zellen transformiert. Transformierte E.coli-Kolonien wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektioniert. Aus den einzelnen Klonen konnte dann mittels der Mini-Präp.-Technologie Plasmid-DNA isoliert werden. Zur Kontrolle wurden die Plasmide mittels ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt, um das Vorhandensein und die richtige Orientierung der „Inserts“ zu prüfen:

GATA-3 NT Gex1 mit Sma und HpaI

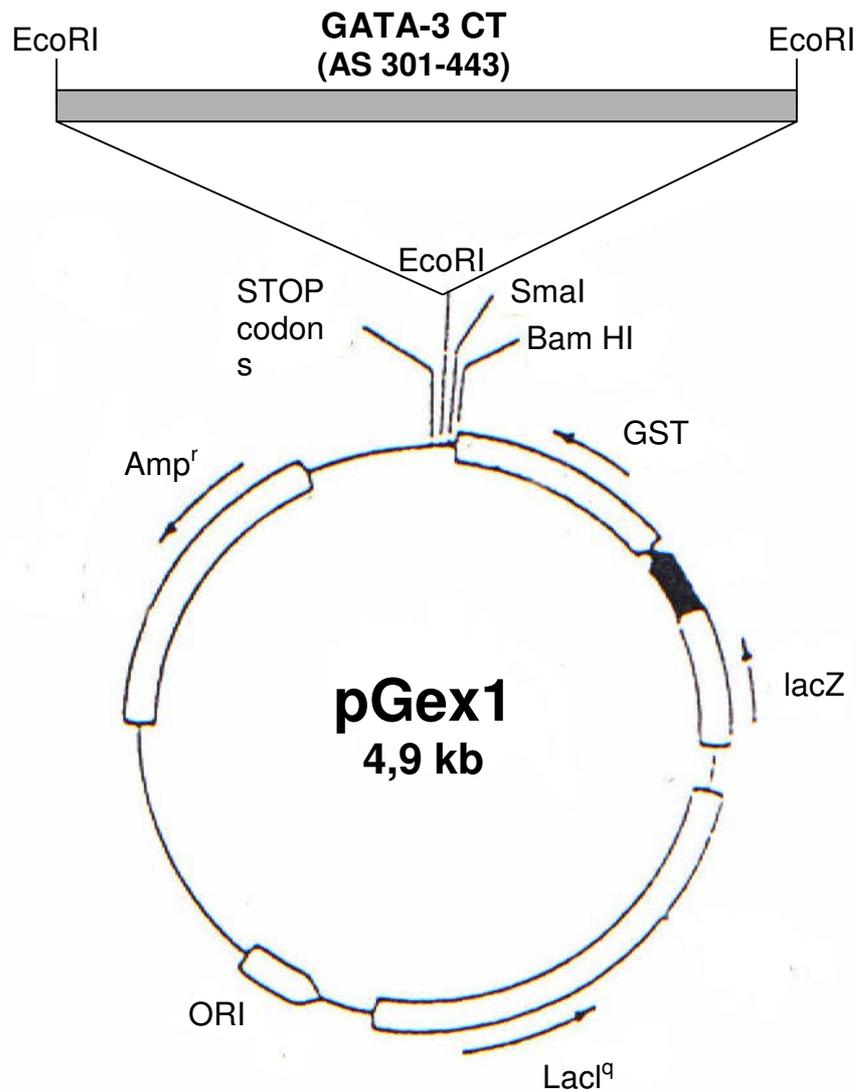
GATA-3 CT Gex1 mit Sma und HpaI

GATA-3 FL Gex1 mit Sma und HpaI

NF-ATc NT Gex2 mit BamHI und EcoRI

NF-ATc CT Gex2 mit BamHI und EcoRI

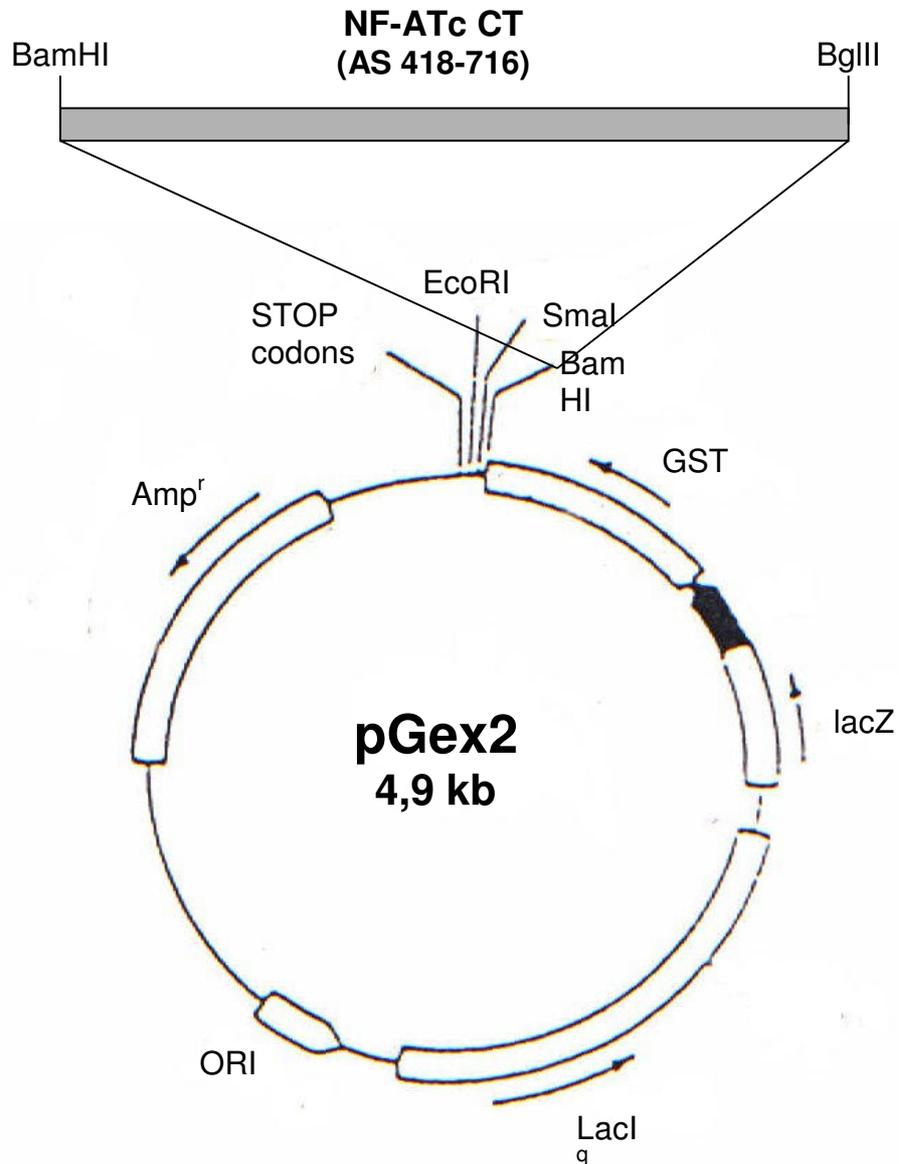
Mittels DNA-Sequenzierung wurden die Konstrukte dann endgültig auf Orientierung der Inserts und eventuell vorhandene Mutationen kontrolliert.



**Abb.2: Klonkarte GATA-3-CT-pGex1.** Der Vektor pGex enthält die cDNA für das Protein Glutathion-S-Transferase, dessen Expression unter der Kontrolle eines LacZ-Promoters steht. Der Promotor kann durch IPTG aktiviert werden. In die MCS („multiple cloning site“) wurde in frame ein 426 bp großes EcoRI-Fragment kloniert, das für für einen C-terminalen Teil (Aminosäuren 301-443) des Maus GATA-3 Proteins (kurz: GATA-3 CT) kodiert. Das Plasmid dient zur bakteriellen (E.coli) Expression eines Fusionsproteins aus GST und dem C-Terminus von GATA-3.

ORI: „Origin of replication“

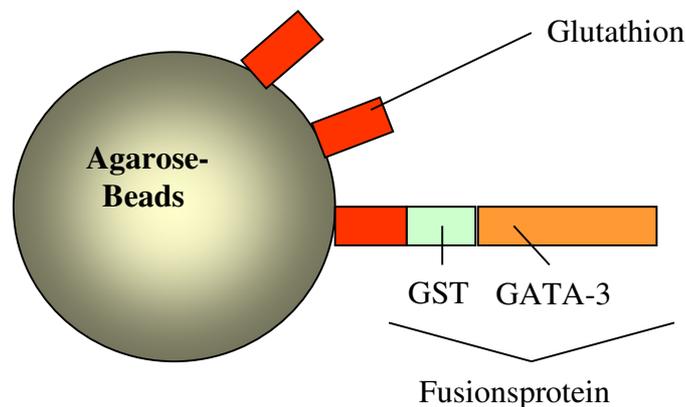
Amp<sup>r</sup>: Gen für Ampicillin-Resistenz zur Selektion der transformierten Bakterien



**Abb.3: Klonkarte NF-ATc CT pGex1.** In die MCS (multiple cloning site) von pGex1 wurde „in frame“ ein 894 bp großes BamHI/Bgl II-Fragment kloniert, das für einen C-terminalen Teil (Aminosäuren 418-716) des humanen NF-ATc-Proteins (kurz: NF-ATc CT) kodiert. Das Plasmid dient zur bakteriellen (E.coli) Expression eines Fusionsproteins aus GST und dem C-terminalen NF-ATc.  
Zur genaueren Beschreibung siehe auch Abb. 2

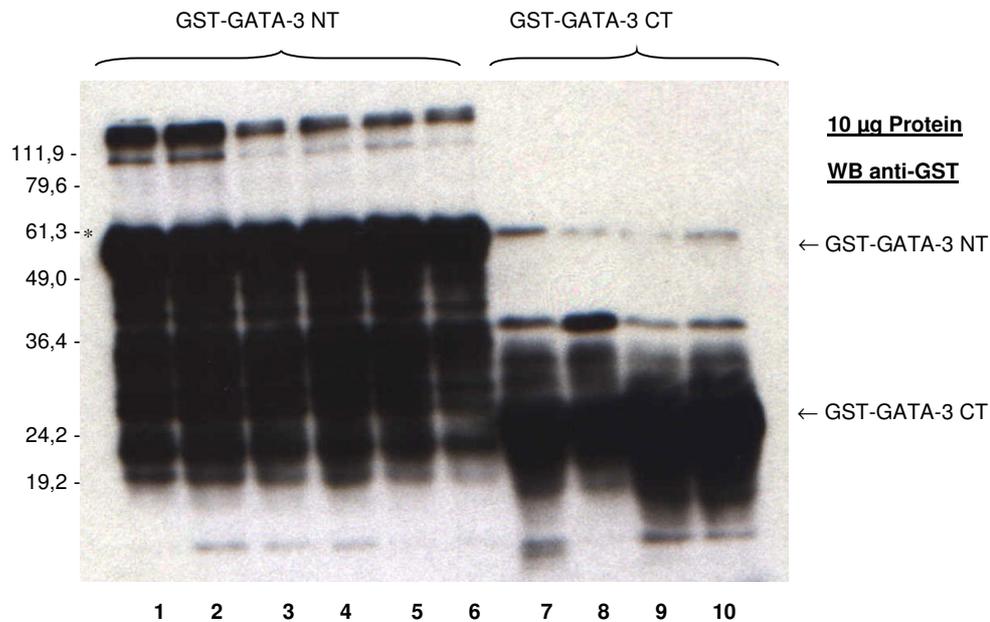
### 3.2.2 Bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine

Kompetente E.coli-TopF-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transformiert und auf Ampicillin-enthaltenden Nährplatten selektioniert. Je eine Kolonie wurde über Nacht in 3ml YT-Medium (+Amp.) bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:100 (2ml auf 200 ml) verdünnt und ca. 3 h bei 37°C geschüttelt. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (=Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactosid), anschließend wurde bei 30°C 1,5 h inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation gesammelt und in eiskaltem PBS-Triton aufgenommen. Mittels Ultraschallbehandlung wurden die Zellen aufgebrochen, die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Überstände, die die Fusionsproteine enthalten, gesammelt. Um die GST-Proteine aus dem Extrakt zu isolieren, wurden Glutathion-Agarose-„beads“ hinzugegeben, da GST spezifisch an Glutathion bindet:



Die Fusionsproteine konnten dann nach Bedarf mit Glutathion-Elutionspuffer wieder von den „beads“ abgelöst werden.

Abb. 4 zeigt exemplarisch einen Western Blot von je 10  $\mu$ g gereinigten GST-GATA-3 NT oder CT Proteinen. Die verschiedenen Spalten bezeichnen Präparationen von verschiedenen Tagen. Die Detektion erfolgte mit anti-GST Antikörpern.



**Abb. 4: Bakterielle Expression der GST-Fusionsproteine.** Western Blot von je 10µg GST-GATA-3 NT (Spalten 1-6, Höhe der Banden mit \* gekennzeichnet) oder CT (Spalten 7-10). Die verschiedenen Spalten entsprechen unterschiedliche Präparationen von verschiedenen Tagen. Zusätzlich zu den Fusionsproteinen sind auch deutlich Degradationsprodukte angefärbt.

### 3.2.3 GST-„pulldown“

Mittels GST-„pulldown“ sollten die Interaktionsdomänen von GATA-3 und NF-AT bestimmt werden.

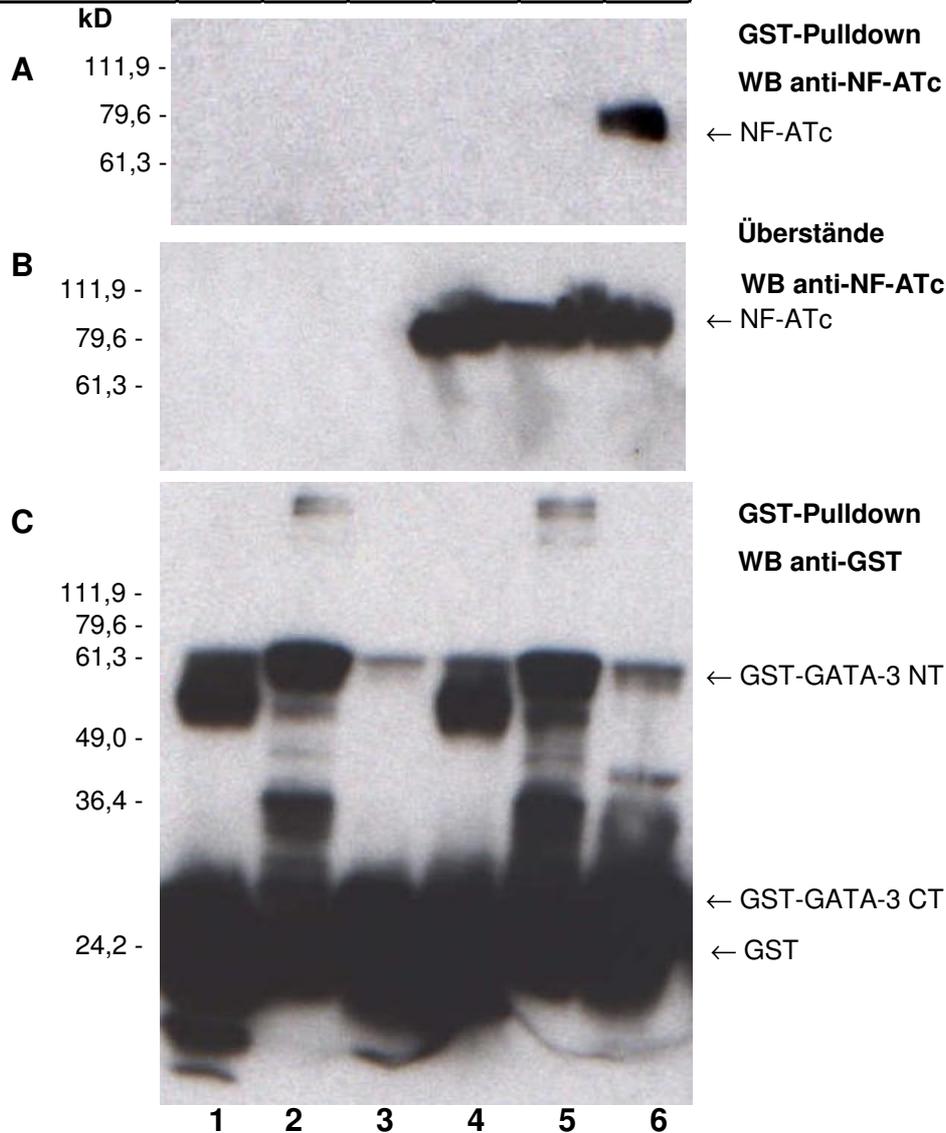
#### 3.2.3.1 Bestimmung der GATA-3-Interaktionsdomänen

293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für NF-ATc/A transfiziert und 24 h später geerntet. 200 µg Gesamtzelleextrakt wurden zunächst mit 70 µg GST, GST-GATA-3 NT und GST-GATA-3 CT unter ständigem Rollen zwei Stunden inkubiert. Dann wurden je 50 µl Glutathion-Agarose-„beads“ hinzugegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert. Die „beads“ wurden 5 mal mit 1 ml eiskaltem KLBm-Puffer gewaschen. In den Eppendorf-Gefäßen sollten in diesem Stadium also nur „beads“, daran gebundene GST-Proteine und an GST-GATA-3 NT oder CT gebundene Interaktionspartner (NF-ATc) enthalten sein.

Die „beads“ wurden in 30 µl Lämmli Puffer resuspendiert und kurz aufgeköcht (zur Denaturierung und Ablösung der Proteine von den „beads“). Im anschließenden Western-Blot wurde dann gebundenes NF-ATc mit anti-NF-ATc-Antikörpern detektiert.

Abbildung 5 zeigt einen solchen Versuch. Als Negativkontrolle wurden Extrakte von HA-ER (Hämagglutinin-Epitop fusioniert mit dem Östrogenrezeptor)-transfizierten 293T Zellen verwendet. Man sieht in Abb. 5A, daß NF-ATc nur beim „pulldown“ mit GST-GATA-3 CT, nicht aber mit GST-GATA-3 NT oder GST alleine detektiert wurde (Spalte 6, 80 kD Bande). NF-ATc scheint also an den C-terminalen Teil von GATA-3 zu binden. Abb. 5B zeigt einen Western-Blot der Überstände des „pulldown“-Ansatzes, der vor dem ersten Waschen abgenommen wurde. NF-ATc ist in jeder Spur gleichmäßig vorhanden und wird von den 293T-Zellen gut exprimiert. Zur Kontrolle der eingesetzten GST-Proteine wurde die gleiche Nitrocellulose-Membran wie in Abb. 5A mit anti-GST-Antikörpern gefärbt. Neben den Fusionsproteinen sind auch Degradationsprodukte nachweisbar..

293T HA-ER	+	+	+			
293T NF-ATc				+	+	+
GST	+			+		
GST-GATA-3 NT		+			+	
GST-GATA-3 CT			+			+



**Abb.5: NF-ATc interagiert mit dem C-terminalen Zn<sup>++</sup>-Finger von GATA-3**

**A. GST-Pulldown.** 293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-ER oder NF-ATc/A transfiziert und nach 24 h geerntet. 200 µg Ganzzelextrakt wurde mit je 70 µg GST-Fusionsproteinen bei 4°C inkubiert. Nach 2 h wurde je 50 µl Glutathion-Agarose-„beads“ zugegeben und für weitere 2h inkubiert. Die „beads“ wurden 5 mal mit 1 ml KLBm gewaschen, in Lämmli-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion des gebundenen NF-ATc im Western-Blot mit anti-NF-ATc-Antikörpern. NF-ATc war nur beim „pulldown“ mit GST-GATA-3 CT detektierbar (Bande ganz links).

**B. Kontrolle der NF-AT-Expression.** Die Überstände des „pulldowns“ wurden mittels Westernblot (anti-NF-ATc-Antikörper) auf NF-ATc untersucht. Man erkennt, daß die mit einem NF-ATc-Vektor transfizierten Zellen das Protein tatsächlich exprimieren (Spalten 4-6).

**C. Kontrolle der GST-Proteine.** Die gleiche Nitrocellulose-Membran wie in A. wurde mit anti-GST-Antikörpern gefärbt. Die GST- und GST-Fusionsproteine sind nachweisbar, wenn auch stark degradiert.

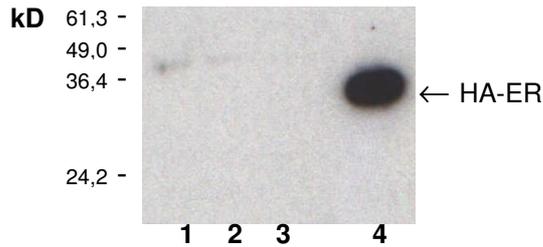
### 3.2.3.2 Bestimmung der NF-ATc-Interaktionsdomänen

Die „pulldown“-Versuche zur Identifizierung der NF-ATc Interaktionsdomänen wurden nach einem ähnlichen Prinzip wie in 3.2.3.1 durchgeführt. 293T Zellen wurden diesmal mit HA-ER als Negativkontrolle und verschiedenen Teilen von HA-NF-ATc (HA-NF-ATc NT (AS 2-417) und HA-NF-ATc CT (AS 418-716)) transfiziert. Um unspezifischen Bindungen an GST und/oder Beads vorzubeugen, wurden die Extrakte mit 30 µg GST und 50µl „beads“ eine Stunde vorinkubiert. Die Überstände wurden durch Zentrifugation abgetrennt und mit 50 µl „beads“ und 30 µg GST, GST-GATA-3 NT oder GST-GATA-3 CT drei Stunden inkubiert. Nach 5 maligem Waschen mit 1ml KLBm erfolgte die Detektion der gebundenen NF-AT-Anteile im Western-Blot mit anti-HA-Antikörpern. Der anti-NF-ATc-Antikörper konnte in diesem Versuch für den Western-Blot nicht verwendet werden, da er nur den N-terminalen, nicht aber den C-terminalen Anteil von NF-ATc erkennt.

Abbildung 6 zeigt einen solchen Versuch. Zur Expressionskontrolle der transfizierten Zellen wurde neben den „pulldown“-Ansätzen jeweils in einer Spur 10 µg Geamtzelleextrakt aufgetragen (Abb. 6A Spalten mit „Extr.“ Beschriftet). Alle Proteine wurden gleichmäßig exprimiert. Beim „pulldown“ mit den GST-Proteinen konnte weder HA-ER noch HA-NF-ATc detektiert werden (Abb. 6A Spalten 1-3 , 6B Spalten 1-3). HA-NF-ATc CT konnte beim „pulldown“ mit GST, GST-GATA-3 NT und auch GST-GATA-3 CT nachgewiesen werden (Abb. 6B, Spalten 5-7, 30 kD Bande). NF-ATc CT scheint also unspezifisch an GST zu binden, deshalb kann in diesem Experiment keine Aussage über die spezifische Interaktion mit GST-GATA-3 NT oder CT gemacht werden. Es wurden mehrere Experimente dieser Art durchgeführt, zum Teil auch mit unterschiedlichen Protokollen, die alle zu ähnlichen Ergebnissen führten. Abb. 6C und 6D zeigen Western-Blots derselben Nitrocellulose-Membranen wie in A u. B., die zur Kontrolle der GST-Proteine mit anti-GST-Antikörpern defärbt wurden. Die GST-Proteine sind detektierbar, aber stark degradiert.

**A.**

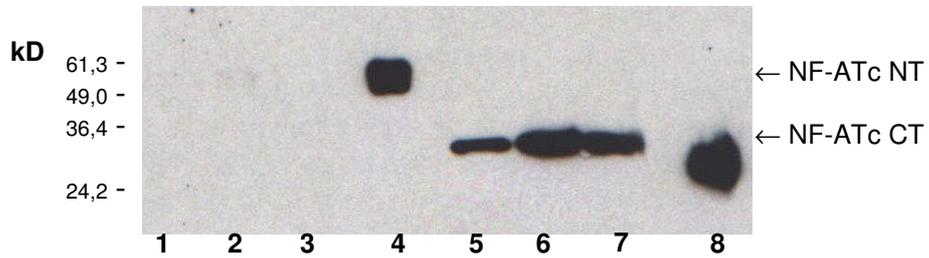
293T HA-ER	+	+	+	Extr.
GST	+			
GST-GATA-3 NT		+		
GST-GATA-3 CT			+	



**GST-Pulldown  
WB anti-HA**

**B.**

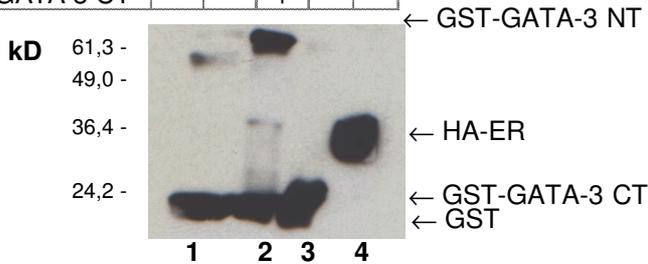
293T NF-ATc NT	+	+	+	Extr.				
293T NF-ATc CT					+	+	+	Extr.
GST	+				+			
GST-GATA-3 NT		+				+		
GST-GATA-3 CT			+				+	



**GST-Pulldown  
WB anti-HA**

**C.**

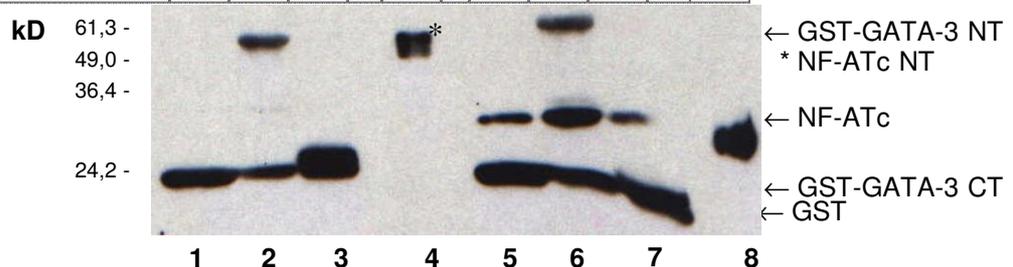
293T HA-ER	+	+	+	Extr.
GST	+			
GST-GATA-3 NT		+		
GST-GATA-3 CT			+	



**GST-Pulldown  
WB anti-GST**

**D.**

293T NF-ATc NT	+	+	+	Extr.				
293T NF-ATc CT					+	+	+	Extr.
GST	+				+			
GST-GATA-3 NT		+				+		
GST-GATA-3 CT			+				+	



**GST-Pulldown  
WB anti-GST**

**Abb.6**

### Zu Abb. 6

**A. NF-ATc-CT-Protein interagiert unspezifisch mit GST-Proteinen.** 293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-ER, HA-NF-ATc NT oder HA-NF-ATc CT transfiziert und nach 24 h geerntet. 200 µg Ganzzellextrakt wurden mit je 30 µg GST und 50 µl bei 4 °C vorinkubiert. Nach 1h wird der Überstand abgenommen und mit 30 µg GST-Fusionsproteinen und 50 µl „beads“ 3h inkubiert. Dann wurden die „beads“ 5 mal mit 1 ml KLBm-Puffer gewaschen, in Lämmli-Puffer aufgenommen und aufgekocht. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion des gebundenen NF-ATc im Western-Blot mit anti-HA. Die mit „Extr.“ beschrifteten Spalten enthalten nur Zellextrakt und dienen zu Kontrolle der Proteinexpression der transfizierten Zellen. Leider konnte HA-NF-ATc CT beim „pulldown“ mit GST alleine, GST-GATA-3 NT und GST-GATA-3 CT detektiert werden, so daß eine unspezifische Bindung von NF-ATc CT an GST anzunehmen ist.

**B. Kontrolle der GST-Proteine.** Die gleichen Nitrocellulose-Membran wie in a. wurden mit anti-GST gefärbt. Die GST- und GST-Fusionsproteine sind nachweisbar, wenn auch degradiert. Außerdem ist immer noch das Signal des HA-Antikörpers sichtbar.

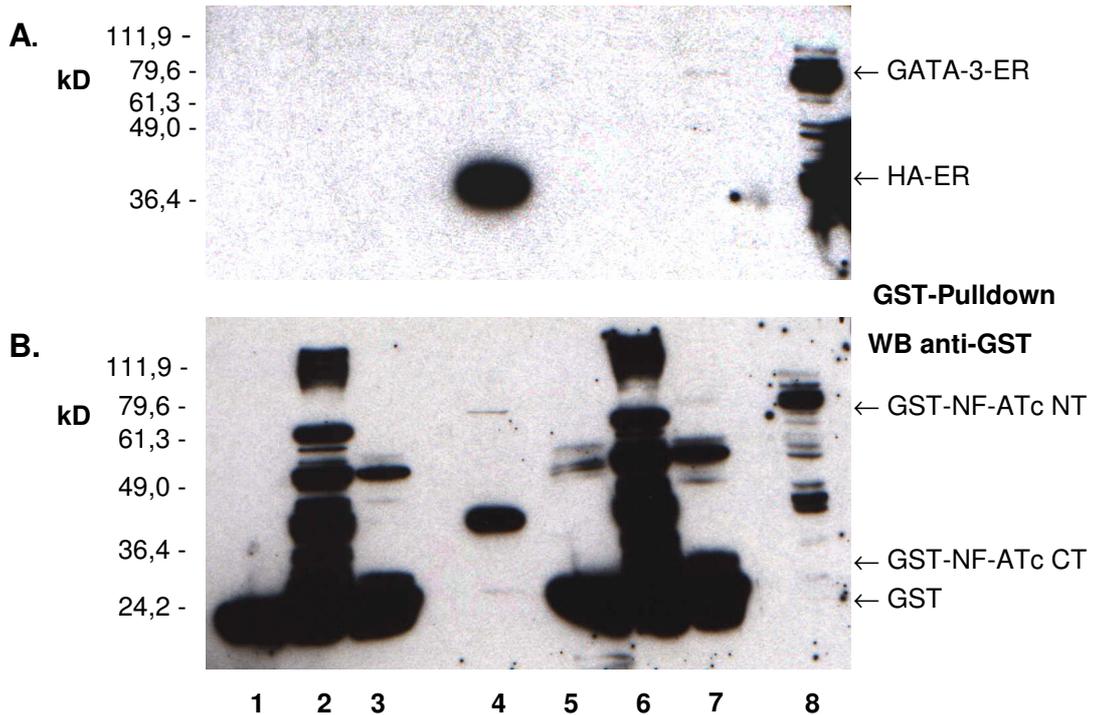
**C. und D. Kontrolle der GST-Protein-Expression.** Die gleichen Nitrocellulose-Membranen wie in A. und B. wurde mit anti-GST-Antikörpern gefärbt. Die GST- und GST-Fusionsproteine sind nachweisbar, wenn auch stark degradiert.

Um die NF-ATc-Interaktionsdomänen dennoch zu bestimmen, wurde das folgende GST-„pulldown“ Experiment durchgeführt: Das Versuchsprotokoll ist prinzipiell identisch mit dem des zuletzt beschriebenen Experimentes. 293T Zellen wurden diesmal mit GATA-3-ER (GATA-3 fusioniert mit dem Östrogenrezeptor) und HA-ER als Kontrolle transfiziert, und der Pulldown wurde mit GST-NF-ATc NT und GST-NF-ATc-CT durchgeführt. An GST-NF-ATc NT oder CT gebundenes GATA-3-ER wurde im Western-Blot mit anti-ER-Antikörpern detektiert.

Abb. 7 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Die mit „Extr.“ beschrifteten Spalten enthalten nur den jeweiligen 293T Extrakt (10µg Protein). Sowohl HA-ER als auch GATA-3-ER werden exprimiert. GATA-3-ER ist nur beim „pulldown“ mit mit GST-NF-ATc CT, nicht aber mit GST oder GST-NF-ATc NT detektierbar (schwache Bande in Höhe von etwa 90 kD in Spalte 7, Abb. 7A). Das Signal erscheint sehr schwach, ist aber vorhanden, d.h. GATA-3 scheint mit einem C-terminalen Anteil von NF-ATc zu interagieren.

Dieselbe Nitrocellulose-Membran wie in A. wurde zur Kontrolle der GST-Proteine mit anti-GST Antikörpern gefärbt (Abb. 7b). GST, GST-NF-ATc NT und CT sind nachweisbar, aber relativ stark degradiert.

293T HA-ER	+	+	+		Extr.					
293T GATA-3-ER						+	+	+		Extr.
GST	+					+				
GST-NF-ATc NT		+					+			
GST-NF-ATc CT			+					+		



**Abb.7**

**Zu Abb.7**

**A. GST-Pulldown.** 293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-ER oder HA-GATA-3-ER transfiziert und nach 24 h geerntet. 200 µg Ganzzelextrakt wurde mit je 30 µg GST und 50 µl bei 4°C vorinkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand abgenommen und mit 30 µg GST-NF-ATc CT oder NT Fusionsproteinen und 50 µl „beads“ 3h inkubiert. Dann wurden die Beads 5 mal mit 1 ml KLBm gewaschen, in Lämmli-Puffer aufgenommen und aufgeköcht. Nach SDS-PAGE erfolgte die Detektion des gebundenen GATA-3-ER im Western-Blot mit anti-ER. Die mit „Extr.“ beschrifteten Spalten enthalten nur Zellextrakt und dienen zu Kontrolle der Proteinexpression der transfizierten Zellen. HA-GATA-3 konnte nur, wenn auch schwach, beim „pulldown“ mit GST-NF-ATc CT detektiert werden.

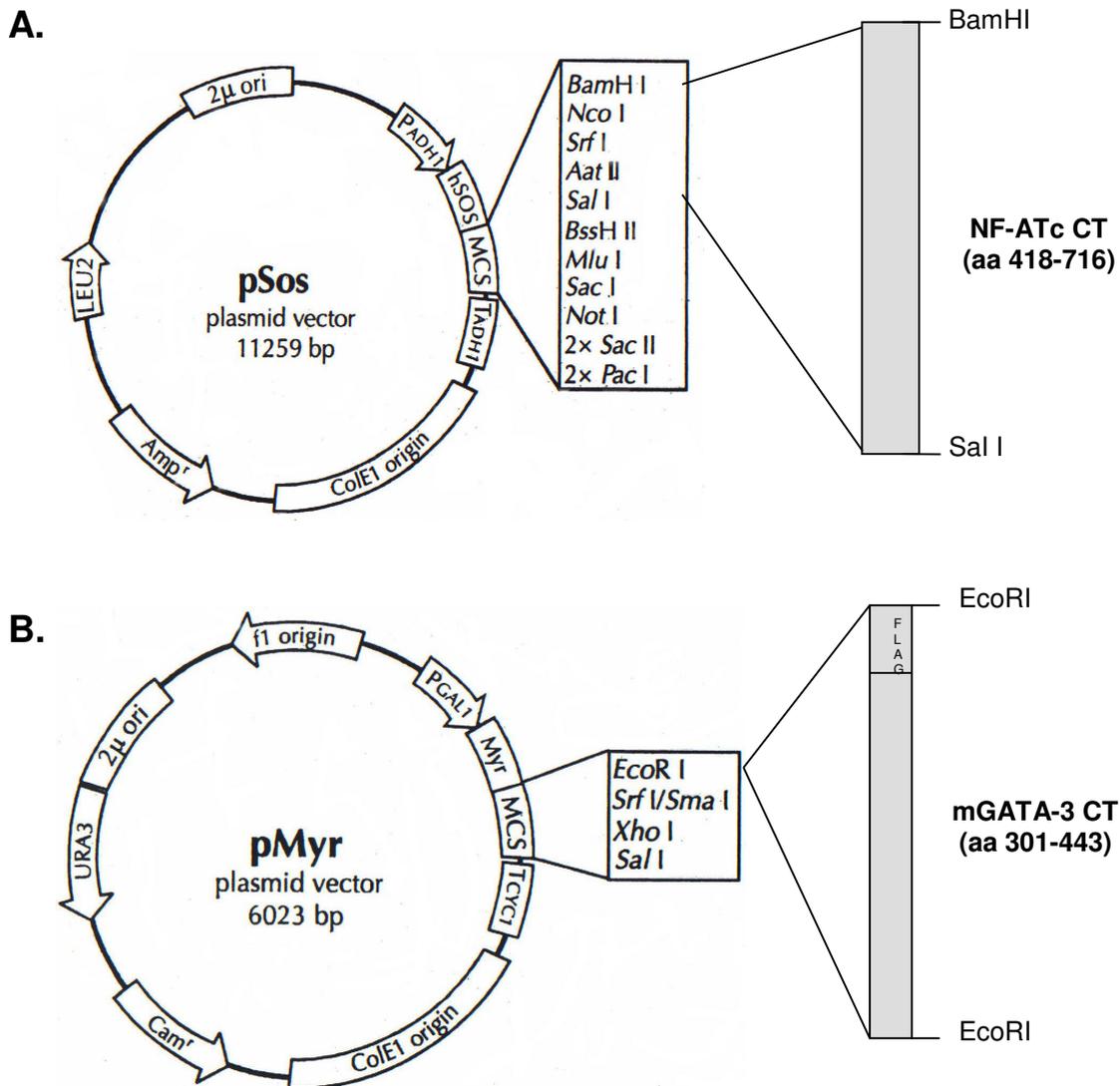
**B. Kontrolle der GST-Protein-Expression.** Die gleiche Nitrocellulose-Membran wie in A. wurde mit anti-GST gefärbt. Die GST- und GST-Fusionsproteine sind nachweisbar, wenn auch degradiert. Außerdem ist immer noch das Signal des ER-Antikörpers sichtbar.

### 3.2.4 Untersuchungen der NF-ATc/GATA-3 Interaktion mit dem Cytotrap System

Um die Ergebnisse der GST-„pull-downs“ zu bestätigen, wurde das Cytotrap System von Stratagene angewandt. Dieses neuartige „two-hybrid“-System basiert darauf, daß die Interaktion zweier in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierter Fusionsproteine den Ras-Signalweg aktiviert und so das Wachstum der Hefezellen induziert (s. Material und Methoden). Im Gegensatz zum klassischen „Yeast-two-hybrid“-System können mit dem Cytotrap-System auch Proteine untersucht werden, die, wie die meisten Transkriptionsfaktoren, eine DNA-bindende und/oder eine transaktivierende Domäne enthalten.

Das Cytotrap-System benutzt den Temperatur-sensitiven *S. cerevisiae* Stamm *cdc25H*, der eine Punktmutation im *CDC25*-Gen enthält. *CDC25* ist das Hefezell-Homolog des menschlichen *Sos* (*hSos*) Gens, welches für einen Nukleotidexchangefaktor codiert, der Ras bindet und aktiviert und so den Ras-Signalweg anschaltet. Die *cdc25*-Mutation verhindert das Wachstum der Hefezellen bei 37°C, nicht aber bei der sog. permissiven Temperatur von 25°C. Das Cytotrap System basiert auf der Fähigkeit des humanen *Sos* proteins (*hSos*), den *cdc25*-Defekt zu kompensieren, d.h den Ras-Signalweg anzuschalten. Wird *hSos* in der Hefezelle exprimiert und wandert anschließend an die Zellmembran, so kann die Zelle bei 37° C wachsen (s. Abb.8).

Die cDNA der zu untersuchenden Proteine (in diesem Fall von NF-ATc NT, -CT, GATA-3-NT und -CT) wurde im Rahmen dieser Arbeit in die Vektoren *pSos* (NF-ATc) und *pMyr* (GATA-3) Vektoren kloniert (s. Abb. 7). Die Plasmide werden in die Hefezellen kotransformiert und die Fusionsproteine exprimiert. Durch das Myristilierungssignal wird GATA-3 an der Zellmembran verankert. Bindet NF-AT an GATA-3, so wird auch *hSos* an die Membran verlagert und kann dort den Ras-Signalweg aktivieren, so daß die Hefezellen bei 37 °C wachsen. Die Ergebnisse dieser Experimente stehen noch aus.



**Abb.7**

**A. Klonkarte NF-ATc CT pSos.** Der Vektor pSos enthält die cDNA für das Protein „Sos“, dessen Expression unter der Kontrolle eines ADH1 Promoters steht. In die MCS („multiple cloning site“) wurde „in frame“ ein 426 bp großes BamHI/SalI-PCR-Fragment kloniert, das für einen C-terminalen Teil (Aminosäuren 418-716) des humanen NF-ATc kodiert. Nach Transformation der Hefezellen exprimieren diese ein Hybridprotein, das aus Sos und dem C-terminalen NF-ATc-Protein besteht.

TADH1: Terminationssequenz

2 $\mu$  ori: „Origin of replication“ in Hefezellen

Amp<sup>r</sup>: Gen für Ampicillin-Resistenz zur Selektion in E. coli

LEU2: Leucin-Selektionsmarker für eukaryontische Selektion.

**B. Klonkarte GATA-3 CT pMyr.** Der Vektor pMyr enthält die cDNA für das Protein „Myr“, dessen Expression unter der Kontrolle eines GAL1-Promoters steht. In die MCS (multiple cloning site) wurde „in frame“ ein 426 bp großes EcoRI-Fragment kloniert, das für einen C-terminalen Teil (Aminosäuren 301-443) des Maus-GATA-3-Proteins (kurz: mGATA-3 CT) kodiert. Nach Transformation der Hefezellen exprimieren diese ein Hybridprotein, das aus einem Myristilierungssignal und dem C-terminalen GATA-3-Protein besteht.

TCYC1: Terminationssequenz

Cam<sup>r</sup>: Gen für Chloramphenicol Resistenz zur Selektion in E.coli

URA3: Uracil-Selektionsmarker für eukaryontische Selektion

## 4. Diskussion

*GATA-3 und NF-ATc interagieren in vivo.* Mittels Coimmunopräzipitationen konnte eine *in vivo* Interaktion zwischen GATA-3 und NF-ATc/A nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden mit transfizierten 293T Zellen durchgeführt, die beide Transkriptionsfaktoren überexprimierten. Der Vorteil dieses Systems ist, daß die Proteine nach Expression noch in der lebenden Zelle während einer Inkubationszeit von 24 h interagieren können. Erst danach werden Zellextrakte hergestellt, und nach Präzipitation von HA-GATA-3 aus den Extrakten konnte NF-ATc im Westernblot spezifisch nur in den Proben detektiert werden, in denen beide Faktoren exprimiert wurden. Aus diesen Experimenten kann man also schließen, daß NF-ATc und GATA-3 *in vivo* interagieren.

*Der C-terminale Anteil von GATA-3 interagiert mit NF-ATc.* In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Proteindomänen der beiden Transkriptionsfaktoren für die Interaktion von Bedeutung sind. Für diese Fragestellung konnte die Coimmunopräzipitation nicht verwendet werden, da der benutzte anti-NF-ATc Antikörper nur die N-terminale Regulatorische Domäne, nicht aber den C-terminalen DANN-bindenden Anteil von NF-ATc erkennt und außerdem ein anti-GATA-3 Antikörper nicht zur Verfügung stand. Wir haben uns deshalb für die GST-„pulldown-Methode“ entschieden.

Nach erfolgreicher Herstellung der benötigten Plasmide, bakterieller Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine sollten zunächst die GATA-3-Interaktionsdomänen bestimmt werden. Es wurden zwei verschiedene GST-GATA-3-Fusionsproteine benutzt: GST-GATA-3 NT enthielt den N-terminalen Teil von GATA-3 (AS 1-301) inklusive dem ersten Zinkfinger, GST-GATA-3 CT den zweiten Zinkfinger bis Aminosäure 443. Die Experimente wurden mit NF-ATc-transfizierten Zellen durchgeführt, deren Extrakte mit den GST-Proteinen inkubiert wurden. Nach Präzipitation der Fusionsproteine mit Glutathion-„beads“ und ausgiebigem Waschen konnte im Western-Blot NF-ATc nur in der Probe detektiert werden, die auch GST-GATA-3 CT enthielt. Für die Interaktion scheint also eine Region zwischen AS 301-443, die den C-terminalen Zinkfinger von GATA-3 enthält, wichtig zu sein.

*Schwache Interaktion des C-terminalen Anteils von NF-ATc mit GATA-3.* Nun stellte sich die Frage, welche NF-ATc-Domänen für die Interaktion von Bedeutung sind. Wiederum wurden GST-„pull-down“-Versuche durchgeführt: 293T Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-NF-ATc NT (AS 2-417) und HA-NF-ATc CT (AS 418-716, enthält die Rel-Similarity-Domäne RSD) transfiziert, nach Expression wurden Zellextrakte hergestellt und mit GST, GST-GATA-3 NT bzw GST-GATA-3 CT inkubiert. Nach der Präzipitation der GST-Proteine sollte an GATA-3 gebundenes HA-NF-ATc im Western-Blot mit anti-HA-Antikörpern nachgewiesen werden. Dabei stellte sich heraus, daß NF-ATc CT mit GST, GST GATA-3 NT und GST-GATA-3 CT interagiert. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, daß NF-ATc CT unspezifisch an den GST-Teil der Fusionsproteine bindet. In diesem Versuch konnte also nicht geklärt werden, inwiefern der C-terminale Teil von NF-ATc mit GATA-3 interagiert. Der N-terminale Anteil von NF-ATc zeigte keinerlei Interaktionen.

Um dennoch die Frage nach den NF-ATc Interaktionsdomänen klären zu können, wurden weitere GST-„pull-down“-Experimente durchgeführt: 293T Zellen wurden mit HA-ER oder GATA-3-ER transfiziert, und der „pull-down“ erfolgte dann mit GST-NF-ATc NT und GST-NF-ATc CT. Im Western-Blot mit anti-ER Antikörpern konnte eine schwache Interaktion von GATA-3-ER mit GST-NF-ATc CT detektiert werden, die in den Kontrollen nicht nachweisbar war. Diese Experimente deuten auf eine Interaktion des C-terminalen Anteils von NF-ATc, der die Rel-Similarity-Domain enthält, mit GATA-3 hin.

*Nachteile des GST-„pull-downs“.* Die Ergebnisse der GST-„pull-down“-Experimente deuteten darauf hin, daß NF-ATc mit seiner Rel-Domäne an den zweiten Zinkfinger von GATA-3 bindet. Leider konnten diese Resultate bei mehrfach wiederholten Experimenten nicht immer bestätigt werden. Dies mag an verschiedenen Faktoren liegen:

- a) Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine erwiesen sich als sehr empfindlich und erschienen im Westernblot zum Teil sehr stark degradiert, so daß möglicherweise nicht immer genügend intaktes Protein zur Interaktion zur Verfügung stand.
- b) Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli*-Bakterien, also in *prokaryontischen* Organismen. NF-AT und GATA-3 werden aber physiologischerweise

in eukaryontischen Organismen exprimiert und dort posttranslational möglicherweise stark modifiziert. In Skelettmuskelzellen beispielsweise interagiert GATA-2 nur mit einer stark dephosphorylierten Isoform von NF-ATc (Musaro et al. 1999). Weiterhin ist bekannt, daß GATA-3 von p38 (Chen et al. 2000) und möglicherweise PKA (Klein-Hessling, unveröffentlichte Beobachtung) phosphoryliert wird. Ob solche Modifikationen bei der Protein-Protein-Interaktion von GATA-3 und NF-ATc eine Rolle spielen, muß noch geklärt werden.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der GST-„pull-downs“ werden zur Zeit noch Experimente mit dem Cytotrap-System (siehe Kapitel 1) durchgeführt. Die hierfür benötigten Plasmide wurden noch im Rahmen dieser Arbeit konstruiert (siehe Kapitel 3).

*Funktionelle Interaktion von GATA-3 mit NF-ATc.* Wenn GATA-3 und NF-ATc physikalisch interagieren, so ist es natürlich interessant zu wissen, ob dies auch eine funktionelle Bedeutung hat. Der **IL-5 Promoter** weist Bindestellen für NF-ATc und GATA-3 auf. Um zu untersuchen, ob die beiden Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung dieses Promoters kooperieren, wurden in unserem Labor transiente Transfektionen mit nachfolgenden Luciferasegen-Reporterassays durchgeführt. Dabei wurden NF-ATc, GATA-3 und ein IL-5-Promoter-Luciferasereporter-Plasmid in 293 T Zellen transfiziert, und die Luciferaseaktivität wurde nach verschiedenartiger Stimulation der Zellen gemessen. Bei gemeinsamer Transfektion vom NF-ATc und GATA-3 mit nachfolgender TPA/Ionomycin/Forskolin-Stimulation konnte die Luciferaseaktivität im Vergleich zu den Einzeltransfektionen drastisch gesteigert werden. Neben der rein physikalischen Interaktion der Proteine zeigte sich also zumindest im Bezug auf den IL-5 Promoter auch eine funktionelle Kooperation zwischen NF-ATc und GATA-3 (Klein-Hessling, unveröffentlichte Beobachtung).

Ob die physikalische Interaktion von NF-ATc und GATA-3 für die funktionelle Kooperation der beiden Faktoren verantwortlich ist, muß noch untersucht werden. Vorstellbar wären etwa IL-5-Luciferase-Reporterassays mit Kotransfektion von NF-ATc- bzw. GATA-3-Konstrukten, die in ihren Interaktionsdomänen mutiert wurden. Die Fähigkeit zur DNA-Bindung der exprimierten veränderten Proteine müßte dabei aber erhalten bleiben. Wenn man bedenkt, daß ausgerechnet die Rel-Domäne von NF-

ATc und der zweite Zinkfinger von GATA-3 betroffen sein müßte, dürfte sich ein solcher Versuch allerdings technisch sehr schwierig gestalten.

*Mögliche Mechanismen der NF-AT/GATA-Kooperation.* Der IL-5 Promoter besitzt Bindestellen sowohl für GATA-3 als auch für NF-ATc. Obwohl diese nicht unmittelbar benachbart liegen, könnten beide Proteine durch eine Schleifenbildung des DNA-Strangs gemeinsam im Komplex an die DNA binden. Ein Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren wäre über verschiedene Mechanismen denkbar: NF-ATc könnte als Coaktivator von GATA-3 fungieren und eine Transaktivierungsdomäne zur Verfügung stellen, die mit Komponenten des basalen Transkriptionsapparates und/oder anderen Faktoren interagiert.

Alternativ könnte NF-ATc als Kofaktor von GATA-3 noch andere Proteine rekrutieren (wie z.B. AP-1), die für die optimale Aktivierung des Promoters notwendig sind. Umgekehrt könnte an DNA gebundenes NF-ATc freies GATA-3 an den Promoter „bringen“ und so nach T-Zell-Aktivierung die Synthese von IL-5 mRNA anschalten.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus wäre, daß NF-ATc die DNA-Bindung von GATA-3 oder umgekehrt beeinflusst, wie dies schon für AP-1 und NF-AT beschrieben wurde: Dabei erleichtert die physikalische Interaktion der beiden Proteine ihre gemeinsame Bindung an NF-AT/AP-1-DNA-Motive. NF-AT stabilisiert beispielsweise die Bindung von AP-1 an die distale NF-AT-„Site“ des IL-2 Promoters (Peterson et al. 1996). Dabei ist der NF-AT/AP-1 Komplex an Pu-b<sub>d</sub> zehnmal stabiler als die alleinige Bindung von NF-AT an die DNA (Jain et al. 1996).

*Die NF-AT/GATA-Interaktion im Herzen.* 1998 wurde von Molzentin und Kollegen eine Interaktion zwischen **NF-AT3** und **GATA-4** in Herzmuskelzellen beschrieben. Mit Hilfe eines „Yeast-Two-Hybrid-Screens“ gelang es damals, NF-AT3 als spezifischen Interaktionspartner von GATA-4 zu identifizieren. Dabei wurde ein GATA-4 Konstrukt verwendet, das die beiden Zinkfinger und den größten Teil des C-terminalen Teils enthielt, dem aber die N-terminale Transaktivierungsdomäne fehlte (Molzentin et al. 1998).

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Molzentin et al. in Coimmunopräzipitationen mit *in vitro* translatierten Proteinen, daß der zweite

Zinkfinger von GATA-4 essentiell für die Interaktion mit der RSD von NF-AT3 in Herzmuskelzellen ist (Molkentin et al. 1998).

Die beiden Faktoren interagieren dabei aber nicht nur physikalisch, sondern aktivieren auch synergistisch den BNP-Promoter (analog zur Aktivitätssteigerung des IL-5 Promoters in T-Zellen). Gemeinsame Transfektion von Calcineurin, NF-AT3 und GATA-4 in primäre Rattenkardiozyten bewirkte im Vergleich zu Einzeltransfektionen eine Aktivitätssteigerung des Promoters um den Faktor 10 (Molkentin et al. 1998).

*Andere NF-AT-Interaktionen und ihre Funktion.* Ähnlich wie im Herzmuskel (wo NF-AT3 und GATA-4 interagieren) gibt es in Skelettmuskelzellen eine Interaktion von Proteinen der NF-AT- und GATA-Familien: Die physikalische Bindung und funktionelle Kooperation von **NF-AT3 und GATA-4** bei der Aktivierung von entsprechenden Promotoren induziert analog zum Herzen eine Hypertrophie der Muskelzellen.

Erst kürzlich wurde auch eine Kooperation von **GATA-3 mit NF-ATp** in T-Zellen bei der Aktivierung eines IL-4 Enhancers ( $V_A$ ) beschrieben. Bei gemeinsamer Transfektion von GATA-3 und NF-ATp in Jurkat Zellen und nachfolgender Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigte sich dabei eine starke Aktivitätssteigerung des Enhancers (Avni et al. 2002).

Im Zellkern binden NF-AT-Faktoren mittels ihrer Rel-Domäne an **AP-1** (activator protein-1)-Komplexe (Sun et al. 1997), d.h. Heterodimeren bestehend aus den Proteinen Jun- und Fos-Proteinen (s. Abb.), und aktivieren gemeinsam Zielgene. 1996 wurde ein weiterer Interaktionspartner von NF-ATp gefunden: **NIP45** (NF-AT interacting protein) bindet an die „Rel Similarity Domain“ (RSD) und steigert gemeinsam mit NF-ATp und c-Maf die Aktivität des IL-4-Promoters. Weiterhin wurde eine Interaktion von NF-ATc mit dem transkriptionellen Koaktivator **CBP/p300** beschrieben. CBP/p300 bindet nicht nur an die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD-A) von NF-AT, sondern steuert auch deren Aktivität (Avots et al. 1999).

*Interaktionspartner von GATA.* GATA-1, das in der Entwicklung und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle spielt, bindet mit seinem N-terminalen Zinkfinger an **FOG** (Friend of GATA-1). Die beiden Faktoren wirken dabei

synergistisch auf die Transkription von Genen, die in der Differenzierung von Erythrozyten und Megakaryozyten von Bedeutung sind (Tsang et al. 1997). 1999 wurde **FOG-2** entdeckt, das in Herzmuskelzellen spezifisch an den N-terminalen Zinkfinger von GATA-4 bindet und so die transkriptionelle Aktivität von GATA-4 erhöht (Tevosian et al. 1999, Svensson et al. 1999).

GATA-Faktoren können durch Interaktion mit anderen Proteinen aber auch in ihrer Funktion gehemmt werden: **ROG** (**R**epressor **o**f **G**A**T**A) bindet an den C-terminalen Zinkfinger von GATA-3 und inhibiert die GATA-3-vermittelte Aktivierung von Th2-Cytokingenen, wie IL-4 und IL-5. Diese Hemmung beruht zumindest teilweise darauf, daß ROG die Bindung von GATA-3 an die entsprechenden Promotoren verhindert (Miaw et al. 2000).

*Ausblick.* Die Steuerung des Interleukin-5-Promoters (und anderer Cytokin-Promotoren) ist komplex. Beteiligt sind viele Proteine, die als Transkriptionsfaktoren und/oder Cofaktoren wirken können. Die Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen in diesem „Netzwerk“ scheint dabei von großer Bedeutung zu sein. Neben den Transkriptionsfaktoren NF-ATc und GATA-3 gibt es viele weitere, z. T. noch unbekannt Proteine, die zusammen die „Transkriptionsmaschinerie“ bilden und die Aktivität des Promoters bedarfsabhängig regulieren. Im Gegensatz zum Genom ist das Proteom der Zelle noch relativ unerforscht. Zum genaueren Verständnis werden in Zukunft eine Vielzahl von Experimenten, vor allem Protein-Screening-Programme (wie z.B. „Yeast-Two-Hybrid-Screens“) nötig sein. Ähnlich der NF-AT/GATA-Interaktionen könnte sich dabei herausstellen, daß sich völlig unterschiedliche Zellen (wie z.B. T-Zellen und Muskelzellen) oft analogen Mechanismen zu Steuerung ihrer Gene bedienen.

## 5. Zusammenfassung

Interleukin-5 ist ein Th2-Cytokin, das eosinophile Granulozyten aktiviert und B-Zellen zur Produktion von IgE stimuliert. Bei der Entstehung von allergischen (wie z.B. Asthma) und atopischen Reaktionen spielt die erhöhte Ausschüttung von IL-5 eine wichtige Rolle. Der Interleukin-5-Promoter weist unter anderem Bindestellen für NF-AT-Faktoren und GATA-3 auf. NF-ATc ist ein Mitglied der NF-AT („Nuclear Factor of Activated T-cells“)-Transkriptionsfaktoren, die an den verschiedensten immunologischen Funktionen beteiligt sind, vor allem aber an der Steuerung der Cytokingene. GATA-3 ist ein wichtiger Th2-spezifischer Zinkfinger-Transkriptionsfaktor aus der Familie der GATA-Faktoren, die an eine gemeinsame WGATAR-Sequenz der DNA binden.

Molkentin et al. zeigten 1998, daß NF-AT3 und GATA-4 in Herzmuskelzellen physikalisch interagieren und daß ihre funktionelle Kooperation bei der Aktivierung verschiedener Promotoren letztendlich zur Entwicklung einer Herzhypertrophie beiträgt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine ähnliche physikalische Interaktion zwischen NF-ATc und GATA-3 in T-Zellen stattfindet. Zu diesem Zweck wurden im ersten Teil der Arbeit Coimmunopräzipitationen durchgeführt. Dabei konnte in mit NF-ATc und GATA-3 cotransfizierten 293T Zellen eine spezifische *in vivo* Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mittels GST-„pull-down“-Experimenten die für die Interaktion wichtigen Proteindomänen von NF-ATc und GATA-3 bestimmt werden. Im ersten Schritt wurden die dafür benötigten Plasmide konstruiert. Im zweiten Schritt erfolgte die bakterielle Expression und nachfolgende Aufreinigung der GST-Fusionsproteine. Mit GST wurde jeweils eine N- und C-terminale Hälfte von NF-ATc und GATA-3 fusioniert. Mit diesen rekombinanten Proteinen wurden die „pull-down“-Experimente durchgeführt. Dabei konnte eine Interaktion des C-terminalen Anteils (enthält den zweiten Zinkfinger) von GATA-3 mit NF-ATc detektiert werden. Nachfolgende Ergebnisse deuteten auf eine Interaktion des C-terminalen Anteils

(enthält die „Rel-Similarity-Domain“) von NF-ATc mit GATA-3 hin. Analog zeigten Molkenkin et al., daß die RSD von NF-AT3 mit dem C-terminalen Zinkfinger von GATA-4 in Herzmuskelzellen interagiert.

Die Interaktion von NF-ATc und GATA-3 scheint nicht nur physikalisch zu existieren, sondern auch funktionell von Bedeutung zu sein. In Luciferase-Reporterassays, die in unserem Labor durchgeführt wurden, zeigte sich bei Cotransfektion von NF-ATc und GATA-3 im Vergleich zu Einzeltransfektionen eine drastische Aktivitätssteigerung des IL-5 Promoters. Diese Ergebnisse weisen – wiederum analog zu den Vorgängen im Herzen - auf eine funktionelle Kooperation der beiden Transkriptionsfaktoren bei der Steuerung des IL-5 Promoters hin.

## 6. Literatur

Abbas, A.K., Murphy, K.M. and Sher, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Akiba, H., Miyahira, Y., Atsuta, M., Takeda, K., Nohara, C., Futagawa, T., Matsuda, H., Aoki, T., Yagita, H., Okumura, K. (2000). Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental Leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191, 375-380.

Ansel, K.M., Lee, D.u. and Rao, A. (2003). An epigenetic view of T cell differentiation. *Nature Immunol.* 4, 616-623.

Aragwai, S. and Rao, A. (1998a). Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 345-352.

Aragwai, S. and Rao, A. (1998b). Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T-cell differentiation. *Immunity* 9, 765-775.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H. and Rao, A. (2002). T<sub>H</sub> cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature Immunol.* 3(7), 643- 651.

Avots, A., Buttman, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Smola, U., Bannister, A.J., Rapp, U.R., Kouzarides, T., Serfling, E.. (1999). CBP/p300 integrates Raf/Rac-signaling pathways in the transcriptional induction of NF-ATc during T cell activation. *Immunity* 10, 515-524.

Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., Crabtree, G.R. (1997). Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.

Betz M, Fox BS. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 14, 108-113.

Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL. (1998). Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 9, 229-237.

Blumenthal SG, Aichele G, Wirth T, Czernilofsky AP, Nordheim A, Dittmer J. (1999). Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J. Biol. Chem.* 274, 12910-12916.

Brabletz T, Pietrowski I, Serfling E. (1991). The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* 19, 61-67.

Bretscher, P.A., Wie, G., Menon, J.N., Bielefeldt-Ohmann, H. (1992). Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257, 539-542.

Brown, D.R., Green, J.M., Moskowitz, N.H., Davis, M., Thompson, C.B. and Reiner, S.L. (1996). Limited role of CD28-mediated signals in T-helper subset differentiation. *J. Exp. Med.* 184, 803-810.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of IL-12 and enhances T-cell stimulatory capacity: T-T help via APC interaction. *J. Exp. Med.* 184, 747-752.

Chen, C.-H., Zhang, D.-H., LaPorte, J.M., and Ray, A. (2000). Cyclic AMP activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Th2-Cells: Phosphorylation of GATA-3 and Stimulation of Th2 Cytokine Gene Expression. *J. Immunol.* 165, 5597-5605.

Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glockner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T., Serfling, E. (1999b). Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* 162, 7294-7301.

Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F., Serfling, E. (1993). Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.* 21, 5694-5704.

Chuvpilo, S., Zimmer, M., Kerstan, A., Glockner, J., Avots, A., Escher, C., Fischer, C., Inashkina, I., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., Schmitt, E., Serfling E. (1999). Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10, 261-269.

Coffman, R.L., Leberman, D.A., Rothman, P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.* 54, 229-270.

Constant, S. and Bottomly, K. (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: The alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 297-322.

Crabtree, G.R. et al. (1999). *Cell* 96, 611-614.

Croft, M. and Swain, S. L. (1995) Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *J. Immunol.* 154, 4269-4281.

De Boer, M.L., Mordvinov, V.A., Thomas, M.A., Sanderson, C.J. (1999). Role of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in the expression of interleukin-5 and other cytokines involved in the regulation of hemopoietic cells. *J. Biochem Cell Biol.* 31, 1221-1236.

- Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D., Staudt, L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression and germinal centre formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 12, 1365-1369.
- Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacy, E., Crabtree, G.R. (1989). Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* 241, 202-205.
- Fitzpatrick, D.R., Shirley, K.M., Kelso, A. (1999). Stable epigenetic inheritance of regional IFN-gamma promoter demethylation in CD44<sup>high</sup> CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 162, 5053-5057.
- Frazer, K.A., Ueda, Y., Zhu, Y., Gifford, V.R., Garofalo, M.R., Mohandas, N., Martin, C.H., Palazzolo, M.J., Cheng, J.F., Rubin, E.M. (1997). Computational and biological analysis of 680 kb of a DNA sequence from the human 5q31 cytokine gene cluster region. *Genome Res.* 7, 495-512.
- Freeman, G.J., Borriello, F., Hodes, R.J., Reiser, H., Hathcock, K.S., Laszlo, G., McKnight, A.J., Kim, J, Du, L., Lombard, D.B., et al. (1993) Uncovering of functional alternative CTLA-4 counter-receptor in B7-deficient mice *Science* 262, 907-909.
- Galli, S. J. (1993). New concepts about the mast cell. *N. Engl J. Med.* 328, 257-265.
- Glimcher, L.H. and Murphy K.M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & Dev.* 14, 1693-1711.
- Gonzalo, J.A., Lloyd, C.M., Kremer, L., Finger, E., Martinez-A, C., Siegelman, M.H., Cybulsky, M., Gutierrez-Ramos, J.C. (1996). Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation. The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors. *Immunity* 4,1-14.
- Grakoui, A., Donermeyer, D.L., Kanagawa, O., Murphy, K.M., Allen, P.M.. (1999). TCR-independent pathways mediate the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J. Immunol.* 162, 1923-1930.
- Green, J.M., Noel, P.J., Sperling, A.I., Walunas, T.L., Gray, G.S., Bluestone, J.A., Thompson, C.B. (1994). Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1,501-508.
- Grewal, I.S. and Flavell, R.A. (1998). CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 111-135.
- Hendriks, R.W., Nawijn, M.C., Engel, J.D., van Doorninck, H., Grosveld, F., Karis, A. (1999). Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of

the earliest T-cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur. J. Immunol.* 29, 1912-1918.

Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W., Glimcher, L.H. (1996). The protooncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin 4. *Cell* 85, 973-983.

Ho, I.C., Lo, D., Glimcher, L.H. (1998). C-maf promotes Th2 and attenuates Th1 differentiation by both IL-4 dependent and independent mechanisms. *J. Exp. Med* 188(10), 1859-1866.

Ho, I.C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B.K., Tsai, S.F., Orkin, S.H., Leiden, J.M. (1991). Human GATA-3: A lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T-cell receptor alpha gene. *EMBO J.* 10, 1187-1192.

Hodge, M.R., Chun, H.J., Rengaraja, J., Alt, A., Lieberson, R., Glimcher, L.H. (1996). NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science* 274(5294); 1903-1905.

Hodge, M.R., Chun, H.J., Rengaraja, J., Alt, A., Lieberson, R., Glimcher, L.H. (1996). NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45 *Science* 274(5294); 1903-1905.

Hodge, M.R., Ranger, A.M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1996b). Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* 4, 1-20.

Hoey, T. and Grusby, M.J. (1999). STATs as mediators of cytokine-reduced responses. *Adv. Immunol.* 71, 145-162.

Horsley, V. and Pavlath, G.K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J. Cell Biology*, 156, 771-774.

Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995) The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 182, 1579-1584.

Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.

Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczeck, R.A. (1999) ICOS is an inducible costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.

I-Cheng, H. and Glimcher, L.H. (2002). Transcription: Tantalizing Times for T Cells. *Cell* 109, 109-120.

- Jain, J., Miner, Z., Rao, A. (1993). Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activated T cells. *J. Immunol.* 151, 837-848.
- Kamogawa, Y., Minasi, L.A., Carding, S.R., Bottomly, K. and Flavell, R.A. (1993). The relationship of IL-4 and IFN- $\gamma$ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell* 75, 985-995.
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J. (1996b). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity* 4, 313-319.
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2-cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174-177.
- Kiani, A., Viola, J.P., Lichtman, A.H., Rao, A. (1997). Down-regulation of IL-4 gene transcription and Th2 cell differentiation by a mechanism involving NF-AT1. *Immunity* 7, 849-860.
- Kim, J.I., Ho, I.C., Grusby, M.J., Glimcher L.H. (1999). The transcription factor c-Maf controls the production of IL-4 but not other cytokines. *Immunity* 10, 745-751.
- Kojima, H., Takeuchi, M., Ohta, T., Nishida, Y., Arai, N., Ikeda, M., Ikegami, H., Kurimoto, M. (1998). Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 183-186
- Klein-Hessling, S., Jha, M.K., Santner-Nanan, B., Berberich-Siebelt, F., Baumruker, T., Schimpl, A. and Serfling, E. (2003). Protein kinase A regulates GATA-3-dependent activation of IL-5 gene expression in Th2 cells. *J. Immunol.* 170, 2956-2961.
- Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P.D., Ramsay, A.J., Milbourne, E.A., Dai, W.J., Ovington, K.S., Behm, C.A., Kohler, G., Young, I.G., Matthaei, K.I. (1996). IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5<sup>+</sup> B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4, 15-24 .
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718.
- Kurata, H., Lee HJ, O'Garra A, Arai N. (1999). Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11, 677-688.
- Lane, P. (2000). Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th) 1 and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 191, 201-205.

- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B., Evans, T. (1994). GATA 4/5/6, a subfamily of transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* 269, 23177-23184.
- Le Beau MM, Lemons RS, Espinosa R 3rd, Larson RA, Arai N, Rowley JD. (1989). Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del(5q). *Blood* 73, 647-650.
- Lederer, J.A., Perez, V.L., DesRoches, L., Kim, S.M., Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (1996). Cytokine transcriptional events during helper T-cell subset differentiation. *J. Exp. Med.* 184, 397-406.
- Lee, H.J., Koyano-Nakagawa, N., Naito, Y., Nishida, J., Arai, N., Arai, K., Yokota, T. (1993). cAMP activates the IL-5 promoter synergistically with phorbol ester through a signalling pathway involving protein kinase A in mouse thymoma line EL-4. *J. Immunol.* 158, 765.
- Lee, H.J., Masuda, E.S., Arai, N., Arai, K., Yokota, T. (1995) Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J. Biol. Chem.* 270, 17541-17550.
- Lee HJ, O'Garra A, Arai K, Arai N. (1998). Characterization of cis-regulatory elements and nuclear factors conferring Th2-specific expression of the IL-5 gene: role for a GATA-binding protein. *J. Immunol.* 160, 2343.
- Lee, H.J., Takemoto, N., Kurata, H., Kamogawa, Y., Miyatake, S., O'Garra A, Arai N. (2000). GATA-3 induces Th2 cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J. Exp. Med.* 192, 105-115.
- Liblau, R.S., Singer, S.M., McDevitt, H.O. (1995) Th1 and Th2 CD4+ cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 16, 34-38.
- Lichtman, A.H., Chin, J., Schmidt, J.A., Abbas, A.K. (1988). Role of interleukin-1 in the activation of T-lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 9699-9703.
- Lin, C.S., Boltz, R.C., Siewierka, J.J., Sigal, N.H. (1991). FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* 133, 269-284.
- Linehan, L.A., Warren, W.D., Thompson, P.A., Grusby, M.J., Berton, M.T. (1998). STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig-gene transcription and switch recombination. *J. Immunol.* 161, 302-310.
- Liu, J. (1993). FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol. Today* 14, 290-295.

- Liu, J., Farmer, J.D. Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Loots, G.G., Locksley, R.M., Blankespoor, C.M., Wang, Z.E., Miller, W., Rubin, E.M., Frazer, K.A. (2000). Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288, 136-140.
- Luksch, C.R., Winqvist, O., Ozaki, M.E., Karlsson, L., Jackson, M.R., Peterson, P.A. and Webb, S.R. (1999). Intercellular adhesion molecule-1 inhibits interleukin 4 production by naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3023-3028.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T-cells. *J. Immunol.* 154, 5071-5079.
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M.P., Ruggiu, F.S., De Carli, M., Ricci, M., Romagnani, S. (1992). Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* 148, 2142.
- Magram, J., Sfarra, J., Connaughton, S., Faherty, D., Warrier, R., Carvajal, D., Wu, C.Y., Stewart, C., Sarmiento, U., Gately, M.K. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN- $\gamma$  production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C.R., Moser, M. (1999). CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587-592.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S. (1993) Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* 177, 1199.
- Matsumoto, S., Tsuji-Takayama, K., Aizawa, Y., Koide, K., Takeuchi, M., Ohta, T., Kurimoto, M. (1997). Interleukin-18 activates NF- $\kappa$ B in murine T helper type 1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 454-457.
- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, Herzenberg LA. (1990). The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* 9, 4425-4433.
- Miaw, S.-C., Choi, A., Yu, E., Kishikawa, H., and Ho, I-C. (2000). ROG, Repressor of GATA, Regulates the Expression of Cytokine Genes. *Immunity* 12, 323-333.

- Micallef, M.J., Ohtsuki, T., Kohno, K., Tanabe, F., Ushio, S., Namba, M., Tanimoto, T., Torigoe, K., Fujii, M., Ikeda, M., Fukuda, S., Kurimoto, M. (1996). Interferon-gamma inducing factor enhances T helper type 1 cytokine production by stimulated human T-cells: Synergism with interleukin-2 for IFN- $\gamma$  production. *Eur. J. Immunol.* 26, 1647-1651.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding Universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17, 138-146.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T-cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2384-2357.
- Munoz, E., Zubiaga, A.M., Merrow, M., Sauter, N.P., Huber, B.T. (1990). Cholera toxin discriminates between T helper 1 and 2 cells in T cell receptor-mediated activation: role of cAMP in T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 172, 95-103.
- Murphy, K.M., Ouyang, W., Szabo, S.J., Jacobson, N.G., Guler, M.L., Gorham, J.D., Gubler, U., Murphy, T.L. (1999). T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent, and Stat4-independent phases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 238, 13-26.
- Musaro, A., Mc Cullagh, K. J. A., Naya, F. J., Olson, E. N., and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581-585.
- Nakajima, A., Watanabe, N., Yoshino, S., Yagita, H., Okumura, K., Azuma, M. (1997). Requirement of CD28-CD86 costimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells. *Int. Immunol.* 9, 637-644.
- Naora, H. and Young, I.G. (1994). Mechanisms regulating the mRNA levels of interleukin-5 and two other coordinately expressed lymphokines in the murine T lymphoma EL4.23. *Blood* 83, 3620-3628.
- Novak, T.J., Rothenberg, E.V. (1990). cAMP inhibits induction of interleukin 2 but not of interleukin 4 in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9353.
- O'Garra, A and Arai, N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in CELL BIOLOGY* 10, 542-550.

- O'Garra, A. (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8, 275-283.
- O'Garra, A. et al. (1997) CD4+ T-cell subsets in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 872-883.
- Orkin, S.H (1992). GATA-binding transcription factors in haematopoietic cells. *Blood* 80, 575-581.
- Orkin, S.H. (1995). Hematopoiesis: How does it happen? *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7, 870-877.
- Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1998). The transcription factor NF-AT4 is involved in the generation and survival of T-cells. *Immunity* 9, 295-304.
- Ouyang, W., Jacobson, N.G., Bhattacharya, D., Gorham, J.D., Fenoglio, D., Sha, W.C., Murphy, T.L., Murphy, K.M. (1999). The Ets transcription factor ERM is Th1-specific and induced by IL-12 through a Stat4-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3888-3893.
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., Murphy, K.M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.
- Pandolfi, P.P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., Luzzatto, L. (1995). Targeted disruption of the GATA-3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver hematopoiesis. *Nat. Genet.* 11, 40-44.
- Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampognaro, S., Piccinni, M.P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., Romagnani, S. (1992). IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J. Immunol.* 149, 2977.
- Paul, W.E. and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Peterson, B.R., Sun, L.J., Verdine, G.L. (1996). A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13671-13676.
- Porter, C.M., Havens, M.A., Clipstone, N.A. (2000). Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 3543-3551.
- Powrie, F. and Coffmann, R.L. (1993) Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol. Today* 14, 270-274.

- Prieschl, E. E., Gouilleux-Gruart, V., Walker, C., Harrer, N.E., Baumruker, T. (1995). A nuclear factor of activated T cell-like transcription factor in mast cells is involved in IL-5 gene regulation after IgE plus antigen stimulation. *J. Immunol* 154, 6112-6119.
- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 1036.
- Randak, C., Brabletz, T., Hergenrother, M., Sobotta, I., Serfling, E. (1990). Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J.* 2529-2536.
- Ranger, A.M, Hodge, M.R., Gravallesse, E.M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F.W., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M., Glimcher, L.H. (1998a). Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4 driven responses produced by inactivation of NF-ATc. *Immunity* 8, 125-134.
- Ranger, A.M., Das, M.P., Kuchroo, V.K., Glimcher, L.H. (1996). B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4 producing T-cells. *Int. Immunol.* 8, 125-134.
- Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., Glimcher, L.H. (1998b). Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9, 627-635.
- Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747.
- Reis e Sousa, C., Germain, R.N. (1997) *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40-independent production of IL-12 by dendritic cells and their redistribution to T-cell areas. *J. Exp. Med.* 186, 1819-1829.
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., Flavell, R.A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 185, 461-469.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., Liu, Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 238, 1183-1186.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., O'Garra, A. (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.
- Rooney, J.W., Hoey, T., Glimcher, L.H. (1995). Coordinate and cooperative roles for NF-AT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity* 2, 473-483.
- Rothenberg, M.E., Luster, A.D. and Leder P. (1995). Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 8960-8964.

- Rulifson, I.C., Sperling, A.I., Fields, P.E., Fitch, F.W. and Bluestone, J.A. (1997). CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol.* 158, 658-665.
- Salomon, B. and Bluestone, J.A. (1998). LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J. Immunol.* 161, 5139-5142.
- Satoskar, A.R., Okano, M., Connaughton, S., Raisanen-Sokolowski, A., David, J.R., Labow, M. (1998). Enhanced Th2-like responses in IL-1 type1 receptor-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 28, 2066-2074
- Scheicher, C., Mehlig, M., Dienes, H.P., Reske, K. (1995). Uptake of microparticle absorbed protein antigen by bone marrow dendritic cells results in upregulation of IL-1 $\alpha$  and IL-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 25, 1566-1572.
- Schweitzer, A.N., Borriello, F., Wong, R.C., Abbas, A.K., Sharpe, A.H. (1997). Role of costimulators in T cell differentiation. *J. Immunol.* 158, 2713-2722.
- Scott, P. (1991) IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 response in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. *J. Immunol.* 147, 3149.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993). IL-12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for IFN- $\gamma$  production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci* 90, 10188-10192.
- Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik T, Avots A. (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1498, 1-18.
- Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J. J., Emmel, E. A., Crabtree, G.R. (1988). Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241, 202-205.
- Sher, A. and Coffman, R. L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T-cells and T-cell derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 385-409.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., Ihle, J.N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380, 630-633.
- Siegel, M.D., Zhang, D.H., Ray, P., Ray, A. (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine E1-4 cells requires the GATA-3 and C/EBP elements. *J. Biol. Chem.* 270, 24548-24555.

- Siegel, M.D., Zhang, D.H., Ray, P., Ray, A. (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.
- Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T.H., Allen, P.M. (1997). Selective loss of the calcium ion signaling pathway in T cells maturing toward a T helper 2 phenotype. *J. Immunol.* 159, 1160-1168.
- Snijdwint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E.A., Bos, J.D., Kapsenberg, M.L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J. Immunol.* 150, 5321-5329.
- Stranick, K.S., Zambas, D.N., Uss, A.S., Egan, R.W., Billah, M.M., Umland, S.P. (1997). Identification of transcription factor binding sites important in the regulation of the human interleukin-5 gene. *J. Biol. Chem.* 272, 16453-16465.
- Subramanian, G., Kazura, J.W., Pearlman, E., Jia, X., Malhotra, I., King, C.L. (1997). B7-2 requirement for helminth-induced granuloma formation and CD4 type 2 T helper cell cytokine expression. *J. Immunol.* 158, 5914-5920.
- Sun, L.J., Peterson, B.R., Verdine, G.L. (1997). Dual role of the nuclear factor of activated T cells insert region in DNA recognition and cooperative contacts to activator protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4919-4924.
- Svensson, E.C., Tufts, R.L., Polk, C.E., and Leiden, J.M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: A modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 956-961.
- Szabo, S.J., Gold, J.S., Murphy, T.L., Murphy, K.M. (1993). Identification of cis-regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T-cells: Roles for NF- $\kappa$ B. Identification of cis-regulatory elements controlling interleukin-4 gene expression in T-cells: Roles for NF- $\kappa$ B and NF-ATc. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4793-4805.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1-lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. (1996). Essential Role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380, 627-630.
- Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Akira, S. and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8, 383-390.
- Takemoto, N., Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S., Arai, K. (1998). Th2-specific DNaseI-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. *Int. immunol.* 10, 383-390.

Tao, X., Constant, S., Jorritsma, P., Bottomly, K. (1997) Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Immunol.* 159, 5956-5963.

Taylor-Robinson, A.W. and Phillips, R.S. (1994) Expression of the IL-1 receptor discriminates Th2 from Th1 cloned CD4<sup>+</sup> T-cells specific for Plasmodium chabaudi. *Immunology* 81, 216-221.

Tevosian, S.G., Deconninck, A.E., Cantor, A.B., Rieff, H., Fujiwara, Y., Corfas, G., and Orkin, S.H. (1999). FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 950-955.

Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171-174.

Thomas, M.A., Mordvinov, V.A., Sanderson, C.J. (1999). The activity of the human interleukin-5 conserved lymphokine element 0 is regulated by octamer factors in human cells. *Eur. J. Biochem.* 265, 300-307.

Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., Leiden, J.M. (1996). Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384, 474-478.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.

Trinchieri, G. (1993) Interleukin-12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunol. Today* 14, 335-338.

Trinchieri, G. and Scott, P. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory function that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 251-276.

Tsuji-Takayama, K., Matsumoto, S., Koide, K., Takeuchi, M., Ikeda, M., Ohta, T., Kurimoto, M. (1997). Interleukin-18 induces activation and association of p56(lck) and MAPK in a murine Th1 clone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 126-130

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Channing, Y., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megacaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Channing, Y., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megacaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

- van der Pouw Kraan, T.C., Boeije, L.C., Smeenk, R.J., Wijdenes, J., Aarden, L.A. (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* 181, 775-779.
- Wardlaw, A. J., Moqbel R. and Kay, A. B. (1993) Eosinophils: biology and role in disease. *Adv. Immunol.* 54, 229-270.
- Wu, C.Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M., Delespesse, G. (1993) IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J. Immunol.* 151, 1938.
- Xanthoudakis, S., Viola, J.P., Shaw, K.T., Luo, C., Wallace, J.D., Bozza PT, Luk DC, Curran T, Rao A. (1996). An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NF-AT1. *Science* 272, 892-895.
- Xu, D., Chan, W.L., Leung, B.P., Hunter, D., Schulz, K., Carter, R.W., McInnes, I.B., Robinson, J.H., Liew, F.Y. (1998). Selective expression and functions of interleukin-18 on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J. Exp. Med.* 188, 1485-1492.
- Xu, X., Sun, Y.L., Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794-797.
- Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y.Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., Ohashi, P.S., Penninger, J.M., Crabtree, G.R., Mak, T.W. (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* 8, 115-124
- Yoshida, T., Ikuta, K., Sugaya, H., Maki, K., Takagi, M., Kanazawa, H., Sunaga, S., Kinashi, T., Yoshimura, K., Miyazaki, J., Takaki, S., Takatsu, K. (1996). Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5R alpha-deficient mice. *Immunity* 4, 483-494.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G.S., Hui, A., McCabe, S.M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C.L., Van, G., Mak, T.W., et al. (1999) T-cell costimulation by B7-RP1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.
- Young, H.A., Ghosh, P., Ye, J., Lederer, J., Lichtman, A., Gerard, J.R., Penix, L., Wilson, C.B., Melvin, A.J., McGurn, M.E. et al. (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., Yang, L., Ray, A. (1998a). Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J. Immunol.* 161, 3817-3821.

Zhang, D.H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J. Biol. Chem.* 272, 21597-21603.

Zheng, W.-P. and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596

## **Danksagung**

Für die hervorragende Betreuung und Korrektur meiner Arbeit danke ich Dr. Stefan Klein-Heßling und Prof. Edgar Serfling. Ein großes Dankeschön für die Hilfe und die tolle Atmosphäre auch an alle Mitarbeiter des Labors, vor allem aber an Dr. Mithilesh K. Jha.

Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre, gilt mein ganz besonderer Dank.

Ein Dankeschön auch an meine Freundin und alle meine Freunde, die mich während der frustrierten Phasen der Arbeit immer wieder motivieren konnten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Arthur Robert Schmidt  
Adresse: Erlachhofstraße 1.2, App. 107  
71640 Ludwigsburg  
Tel. Nr.: 07141/2983254 oder 0177 / 242 55 64  
Email: [arthur.schmidt@gmx.de](mailto:arthur.schmidt@gmx.de)  
Geboren am: 15.09.1976  
Geburtsort: Arad, Rumänien  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

## Ausbildung:

1983 – 1984: Grundschule Möckmühl (Baden-Württemberg)  
1987 – 1996: Gymnasium Möckmühl, Abitur 1996  
07/1996 – 08/1997: Zivildienst im Kreiskrankenhaus Möckmühl,  
10/1997 – 05/2004: **Studium der Humanmedizin**, Bayerische Julius-  
Maximilians-**Universität Würzburg**  
09/1999: Ärztliche Vorprüfung  
08/2000: Erstes Staatsexamen  
03/2003: Zweites Staatsexamen  
05/2004: Drittes Staatsexamen

## Praktische Erfahrungen:

### **Famulaturen:**

03/2000 – 04/2000: **Innere Medizin**  
Kreiskrankenhaus Möckmühl  
09/2001 – 10/2001: **Allgemeinmedizin**  
Praxis Dr. Walter Heppner, Lengfeld/Würzburg  
02/2002 – 03/2002: **Chirurgie**  
Chris Hani Baragwanath Hospital, University of the  
Witwatersrand, Johannesburg, *Südafrika*  
03/2002 – 04/2002: **Anästhesie**  
Chris Hani Baragwanath Hospital, University of the  
Witwatersrand, Johannesburg, *Südafrika*  
08/2002 – 09/2002: **Urologie**  
Universitätsspital Zürich, *Schweiz*

### **Praktisches Jahr:**

**Innere Medizin**  
04/2003 - 08/2003: *Kardiologie, Gastroenterologie, allgemeine Innere Medizin*  
Medizinische Universitätsklinik Würzburg

**Chirurgie**  
08/2003 – 10/2003: *Allgemein- / Visceralchirurgie*  
Klinikum Coburg  
10/2003 – 12/2003: *Allgemeinchirurgie und Urologie*  
Mount Sinai Hospital, Finch University of Health Sciences /  
The Chicago Medical School, Chicago, Illinois, USA

**Pädiatrie**  
12/2003 – 02/2004: *Pädiatrische Gastroenterologie und Allgemeine Pädiatrie*  
Children's Hospital, University of Chicago / Pritzker School  
of Medicine, Chicago, Illinois, USA  
02/2004 – 03/2004: *Pädiatrische Urologie / Nephrologie*  
Universitätskinderklinik Würzburg

**Sonstiges:**

08/1999 – 08/2000: Praktikumsassistent im **Physiologischen Institut** der  
Universität Würzburg  
09/2000 – 04/2003: Nachtwachentätigkeit an der **HNO-Universitätsklinik**  
Würzburg

**AiP/Facharztausbildung:**

Seit 07/2004: Medizinische Klinik I, Klinikum Ludwigsburg

**Promotion:**

09/2000 – 01/2005: „Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren NF-ATc und  
GATA-3 in T-Helfer-Zellen.“  
Institut für Pathologie, **Abteilung für Molekulare**  
**Pathologie** (Prof. Dr. E. Serfling), Universität Würzburg

**Fremdsprachen:**

Englisch: Fließend  
Französisch: Fortgeschritten

**Persönliche Interessen:**

Soz. Engagement: Aktives Mitglied der Deutschen Lebensrettungsgesellschaft  
(DLRG)  
EDV-Kenntnisse: Sehr gute Kenntnisse in MS Windows, MS Office und HTML  
Sport: Radfahren, Inline-Skaten, Schwimmen, Windsurfen

Ludwigsburg, den 30. Januar 2005



Arthur Schmidt