

Aus dem Pathologischen Institut

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Regulation des Blimp1-Promotors durch die Transkriptionsfaktoren  
C/EBP $\beta$  und NFATc1 in T-Lymphozyten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Fabian Hauck

aus Amorbach im Odenwald

Würzburg, Mai 2005

Referent:

Prof. Dr. rer. nat. E. Serfling

Korreferent:

Priv.-Doz. Dr. med. A. Greiner

Dekan:

Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2005

Der Promovend ist Arzt.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Angeborene und erworbene Immunität.....	1
1.1.1	Die angeborene Immunität.....	1
1.1.2	Die erworbene Immunität.....	2
1.1.2.1	Die B-Zell-vermittelte Immunität.....	3
1.1.2.2	Die T-Zell-vermittelte Immunität.....	4
1.2	Die Genexpression.....	8
1.2.1	Epigenetische Phänomene.....	9
1.2.2	Der allgemeine Transkriptionsapparat.....	10
1.2.3	Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren.....	11
1.3	Die T-Helfer-Zelldifferenzierung.....	12
1.3.1	Naive T-Helferzellen.....	12
1.3.2	T-Helfer-1-Zellen.....	13
1.3.3	T-Helfer-2-Zellen.....	14
1.4	Blimp1.....	17
1.5	C/EBP $\beta$ .....	20
1.6	NFATc1.....	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1	Material.....	26

2.1.1	Chemikalien und Reaktionssysteme.....	26
2.1.2	Lösungen und Puffer.....	29
2.1.3	Enzyme.....	34
2.1.4	Primer und Oligonukleotide.....	35
2.1.5	Verwendete Plasmide und konstruierte Vektoren.....	36
2.1.6	Antikörper.....	39
2.1.7	Bakterien und Gewebekulturzellen.....	40
2.1.8	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	40
2.2	Zellkultur und zellbiologische Methoden.....	42
2.2.1	Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien.....	42
2.2.2	Induktion der EL-4 Zellen.....	43
2.2.3	Transiente Transfektion.....	43
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	43
2.3.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	44
2.3.3	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> durch alkalische Lyse.....	44
2.3.3.1	Plasmidisolierung in analytischen Mengen.....	44
2.3.3.2	Plasmidisolierung in präparativen Mengen.....	45
2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.3.5	Reinigung von DNA aus Agarose.....	46

2.3.6	Enzymatische Manipulation an DNA.....	46
2.3.6.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen....	46
2.3.6.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	47
2.3.6.3	Erzeugung glatter DNA-Enden durch die Klenow-Polymerase.....	48
2.3.6.4	Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle.....	48
2.3.7	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten- Reaktion (PCR).....	49
2.3.8	DNA-Sequenzierung.....	51
2.3.9	DNA/Protein-Bindungsstudien mittels EMSA.....	52
2.3.9.1	Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide.....	52
2.3.9.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP	52
2.3.9.3	Aufreinigung von $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Sonden.....	53
2.3.9.4	Der EMSA ( <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> ).....	53
2.3.10	RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen.....	55
2.3.11	Die Ribonuklease-Protektions-Analyse.....	55
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	56
2.4.1	Konfokale Mikroskopie.....	56
2.4.2	Isolierung von Kernproteinen und Zytoplasmaextrakten eukaryontischer Zellen.....	57

2.4.3	Luziferase-Reportergen-Assay.....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
3.1	Folikuläre T-Lymphozyten exprimieren PRDI-BF1.....	59
3.2	C/EBP $\beta$ induziert in EL-4 Zellen die Expression von Blimp1-mRNA.....	61
3.3	C/EBP $\beta$ aktiviert in transienter Transfektion den Blimp1-Promotor.....	64
3.4	Der Blimp1-Promotor beinhaltet C/EBP-Bindungs- sequenzen und ein P1/Pu-b <sub>B</sub> -ähnliches NFAT-C/EBP- Bindungsmotiv.....	67
3.5	C/EBP $\beta$ und NFATc1 binden <i>in vitro</i> an den Blimp1- Promotor.....	69
3.6	NFATc1/A und -/C reduzieren in transienter Kotransfektion die Aktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$ .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signalübertragungskaskade in TCs.....	5
1.2	Modell zur T-Helfer-Zelldifferenzierung und -Funktion.....	7
1.3	Dynamisches Modell zur T <sub>H</sub> -Differenzierung.....	16
1.4	Schematische Struktur des Blimp1-Gens, der Blimp1-cDNA und des Blimp1-Proteins.....	19
1.5	Schematische Darstellung der C/EBP $\beta$ -Isoformen LAP*, LAP und LIP.....	22
1.6	Schematische Struktur der NFATc1-Isoformen A/B/C....	24
3.1	Konfokale Mikroskopie eines Lymphfollikels einer humanen Tonsille.....	60
3.2	RNase-Protektionsversuch zur Induzierbarkeit der Blimp1-mRNA durch C/EBP $\beta$ in EL-4 Zellen.....	62
3.3	Transiente Transfektion von EL-4 Zellen mit C/EBP $\beta$ und verschiedenen <i>pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1-</i> Reporterplasmiden.....	66
3.4	Schematische Darstellung des Blimp1-Promotors, der 5'UTR und des Exon 1 mit putativen NFAT-C/EBP-	

	Bindungsmotiven.....	69
3.5	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) zur Testung der C/EBP $\beta$ -Bindung an das NFAT-C/EBP- und die C/EBP-Motive des Blimp1-Promotors.....	70
3.6	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> zur Testung der Bindung von C/EBP $\beta$ und NFATc1 an das Blimp1 NFAT-C/EBP-Motiv.....	74
3.7	Transiente Kotransfektion von EL-4 Zellen mit C/EBP $\beta$ und/oder NFATc1/A bzw. -/C und dem Reporterplasmid <i>pTATALuc+/Blimp1 1.2 kb SBB</i> .....	77



## **Tabellenverzeichnis**

1.1	Angeborenes und Adaptives Immunsystem.....	8
1.2	Unterschiede zwischen Euchromatin und Heterochromatin.....	9
3.1	C/EBP-Konsensussequenz im Vergleich mit putativen C/EBP-Bindungssequenzen in der Blimp1-Promotorregion.....	68
3.2	P1/Pu-b <sub>B</sub> - NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv im Vergleich mit putativem Blimp1- NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv....	68



# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborene und erworbene Immunität

### 1.1.1 Die angeborene Immunität

Vertebraten, einschließlich des menschlichen Organismus, sehen sich zeitlebens physikalischen, chemischen und biologischen Noxen, wie mikrobiologischen Pathogenen, d.h. Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Helminthen, ausgesetzt. Anhand ihrer bevorzugten Lokalisation trennt man diese gruppenübergreifend in intrazelluläre und extrazelluläre Erreger<sup>1</sup>. Um ihre strukturelle und somit funktionelle Integrität gegen Bedrohungen von außen und innen zu wahren, haben die Wirbeltiere im Laufe ihrer Phylogenese ein auf die Abwehr dieser Agenzien spezialisiertes System entwickelt, das Immunsystem. Die lymphatischen Organe stellen dessen anatomisches Korrelat dar. Man unterscheidet die primären oder zentralen lymphatischen Organe von den sekundären oder peripheren. Die zentralen lymphatischen Organe sind das Knochenmark und der Thymus, in denen aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen die naiven Zellen des Immunsystems, die Lymphozyten, entstehen. Die peripheren lymphatischen Organe sind die Milz, die Lymphknoten und das mucosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT), in denen bestimmte Zellpopulationen des Immunsystems stabilisiert und adaptive Immunantworten durch die Antigenpräsentation eingeleitet werden<sup>2</sup>. Jede mikrobiologische Infektion verläuft in mehreren Phasen, die jeweils durch bestimmte Abwehrmechanismen unterbunden werden können.

Grundsätzlich dienen die Epithelien der inneren und äußeren Körperoberflächen als physische Barriere, die je nach Lokalisation durch spezielle Eigenschaften, wie den Säureschutzmantel der Epidermis<sup>3</sup>, durch verschiedene antimikrobielle Peptide<sup>4</sup> und insbesondere durch die bakterielle Standortflora unterstützt wird. Krankheitserreger, denen es gelungen ist, das Epithel zu überwinden, sehen sich mit den opsonisierenden oder sogar lytischen Plasmaproteinen des Komplementsystems (alternativer Weg), der angeborenen humoralen Immunität<sup>5</sup>, konfrontiert.

Träger der angeborenen zellulären Immunantwort hingegen sind phagozytierende und zytotoxische Zellen, wie Monozyten/Makrophagen (MCs/MPs) und Neutrophile Granulozyten (NGCs) einerseits und Natürliche Killerzellen (NKs) andererseits. Über eine eingeschränkte Anzahl von evolutionär stark konservierten Oberflächenrezeptoren, den zehn *toll-like*-Rezeptoren (TLRs), können MPs extrazellulär vorhandene molekulare Strukturen erkennen. Die Rezeptorbindung dieser pathogenassoziierten molekularen Muster (PAMPs)<sup>6</sup> führt zur endozytotischen Aufnahme der Pathogene und anschließend zu deren Abbau in Lysosomen<sup>7</sup>. NKs hingegen sind in der Lage, viral oder bakteriell infizierte körpereigene Zellen mittels ihrer NK-Rezeptoren zu erkennen und über eingebrachte Effektorproteine deren programmierten Zelltod, die Apoptose, zu induzieren<sup>8</sup>.

Diesen unmittelbar einsetzenden und auf den Ort der Infektion beschränkt bleibenden Reaktionen folgt die Phase der frühen induzierten, nicht adaptiven, Immunantwort. Die Aktivierung der oben genannten Rezeptoren führt über die entsprechenden Signaltransduktionskaskaden, wie über den NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*)-*pathway*<sup>9</sup>, zu einer veränderten Genexpression und zur konsekutiven Sekretion wichtiger lokal und systemisch wirkender Signalmoleküle, den Zytokinen. Bei diesen handelt es sich um eine Gruppe strukturell sehr heterogener Moleküle, wie den Interleukinen (ILs), den Tumornekrosefaktoren (TNFs) und den Interferonen (IFNs)<sup>10</sup>, deren gemeinsame Wirkung letztendlich das Generieren einer Entzündungsreaktion und das Einleiten einer adaptiven Immunantwort ist.

### 1.1.2 Die erworbene Immunität

Viele Infektionen werden durch die unspezifischen Mechanismen der angeborenen Immunität kontrolliert und verlaufen deshalb subklinisch. Gelingt es den Pathogenen jedoch, dieses System zu überwinden, etablieren sie einen Infektionsherd (primärer Fokus) und induzieren damit meistens eine adaptive Immunantwort, die in der Lage ist, die eingedrungenen Erreger wesentlich spezifischer zu bekämpfen. Die zellulären Träger dieser Immunreaktion sind die B-

und T-Lymphozyten (BCs und TCs) sowie antigenpräsentierende Zellen (APCs), wie dendritische Zellen (DCs), MPs, und wiederum BCs<sup>2</sup>.

#### 1.1.2.1 Die B-Zell-vermittelte Immunität

Man unterscheidet zwei phänotypisch und funktionell verschiedene Arten von BCs, die B-1<sup>11</sup> und B-2 Zellen. Alle folgenden Ausführungen beziehen sich lediglich auf die B-2 Zellen. Ausgehend von hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich die B-Lymphozyten über verschiedene Stadien bis hin zu naiven BCs<sup>12</sup>. Im Zuge dieser Differenzierungsprozesse werden die V(D)J-Gensegmente der Immunglobulinloci durch somatische Rekombination umgelagert, so dass die entstehenden naiven BCs am Ende ihrer intramedullären Reifung neben anderen Oberflächenmolekülen, wie dem MHC-II (*major histocompatibility complex II*), und den kostimulatorischen CD (*cluster of differentiation*) 40 und CD 45R (B220), den B-Zell-Rezeptor (BCR) exprimieren<sup>13</sup>.

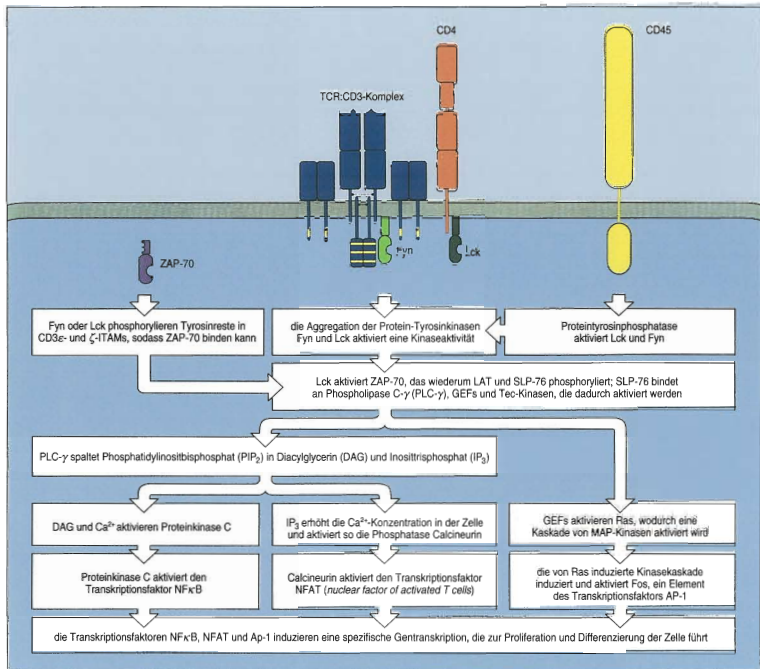
Die naiven BCs verlassen in diesem Entwicklungsstadium das Knochenmark und beginnen durch die Gefäße des Blut- und Lymphkreislaufs zu zirkulieren. Kommt es im Laufe dieser Zirkulation zum Kontakt mit einem spezifischen Antigen, dann leiten Interaktionen mit APCs und TCs die Differenzierung zur reifen B-Effektorzelle ein (*priming*)<sup>14</sup>.

Die antigenspezifische naive BC beginnt dann in einem Prozess, der als klonale Expansion bezeichnet wird, massiv zu proliferieren<sup>15</sup>. Dabei findet auch die Affinitätsreifung des BCR statt, indem die neu entstehenden BCs durch somatische Hypermutation Punktmutationen in die V-Regionen ihrer Immunglobulingene einführen, um die Bindungseigenschaften der BCRs an das entsprechende Antigen zu verbessern<sup>16</sup>. Durch den B-Zell-Korezeptor, bestehend aus CD19:CD21:CD81, kann die Antwort der BCs auf Antigene weiterhin erheblich verstärkt werden. Letztendlich differenzieren sie zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (PCs), den Trägern der humoralen Immunantwort, die in der Lage sind, hochspezifische Immunglobuline zu sezernieren (sIg). Angeleitet durch TCs vollziehen sie den sogenannten Klassenwechsel und exprimieren somit verschiedene Immunglobulinklassen oder Isotypen, nämlich sIgG, sIgA und sIgE<sup>17</sup>.

Diese Antikörper können lösliche bakterielle Toxine oder Viren durch ihre Bindung neutralisieren, das Komplementsystem über den klassischen Weg aktivieren und Pathogene opsonisieren. Phagozyten binden dann mit ihren Fc-Rezeptoren<sup>18</sup> an die konstanten Domänen der Igs und es kommt zur rezeptorvermittelten Endozytose bzw. durch NKs zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC). Sind die Pathogene eliminiert, gehen die meisten B-Effektorzellen in die Apoptose und beenden die Immunantwort dadurch. Einige BCs hingegen differenzieren zu B-Gedächtniszellen (B<sub>Mem</sub>), die im Falle einer Reinfektion mit einem schon bekannten Pathogen schnell aktiviert werden und erneut eine spezifische Immunantwort auslösen<sup>2</sup>.

#### 1.1.2.2 Die T-Zell-vermittelte Immunität

Auch die T-Lymphozyten differenzieren aus hämatopoietischen Stammzellen. Allerdings verlassen sie in einem frühen Entwicklungsstadium das Knochenmark, um in den Thymus einzuwandern. Nachdem die Subpopulation der  $\gamma\delta$ -TCs<sup>19</sup> einen separaten Differenzierungsweg eingeschlagen hat, lagert die Mehrheit der TCs durch somatische Rekombination die Gensegmente für die  $\beta$ - und die  $\alpha$ -Kette ihres Antigenrezeptors, den  $\alpha\beta$ -TCR, um. Zusätzlich zu den hochvariablen Domänen der TCR $\alpha$ - und TCR $\beta$ -Ketten, die Heterodimere mit einer einzigen Antigenbildungsstelle bilden, enthält der  $\alpha\beta$ -TCR-Komplex invariante Ketten, nämlich CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  und CD3 $\epsilon$ , die zusammen den CD3-Komplex bilden, sowie die als Homodimer vorliegende  $\zeta$ -Kette<sup>20</sup>. Die Bindung des spezifischen Antigens führt über rezeptorassoziierte Proteintyrosinkinasen der Src-Familie zur Tyrosinphosphorylierung sogenannter ITAMs (*immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*), dem ersten Schritt einer komplexen intrazellulären Signalgebung<sup>21</sup> (s. Abbildung 1.1). Zur Änderung der Genexpression kommt es letztendlich über mehrere verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Der MAPK- (mitogenaktivierte Proteinkinase) *pathway* rekrutiert den Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein-1*) (Fos/Jun), die Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) stellt Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) bereit, welche ihrerseits zum einen über eine Proteinkinase C (PKC) den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und zum anderen über die



**Abbildung 1.1** Vereinfachtes Schema der intrazellulären Signalübertragungskaskade in TCS<sup>2</sup>.

Durch die Bindung eines Peptid:MHC-II-Liganden werden der TCR:CD3-Komplex sowie CD4- und CD45-Moleküle in einer immunologischen Synapse organisiert. Dies aktiviert die CD45-Tyrosinphosphatase und führt zur Entfernung inhibitorischer Phosphatgruppen an den Rezeptor-assoziierten Proteinkinase Lck und Fyn (Proteine der Src-Familie). Die phosphorylierten ζ-Ketten des TCR:CD3-Komplexes binden die cytosolische Tyrosinkinase ZAP-70 (*ζ-chain-associated protein*). Wird das gebundene ZAP-70 via Lck durch Phosphorylierung aktiviert, stehen drei wichtige Signalübertragungswege offen. Denn ZAP-70 phosphoryliert die Adaptorproteine LAT (*linker of activation in T-cells*) und SLP-76 (*Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kD*), was in der Aktivierung von PLC-γ durch PH-Domänen- (*pleckstrin-homology domain*) enthaltende Tec-Kinasen, sowie in der Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras durch GEFs (*guaninucleotide-exchange factors*) resultiert. PLC-γ und Ras initiieren drei Signalübertragungswege, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB, NFAT und AP-1 resultieren.

Phosphatase Calcineurin den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktivieren<sup>22</sup>.

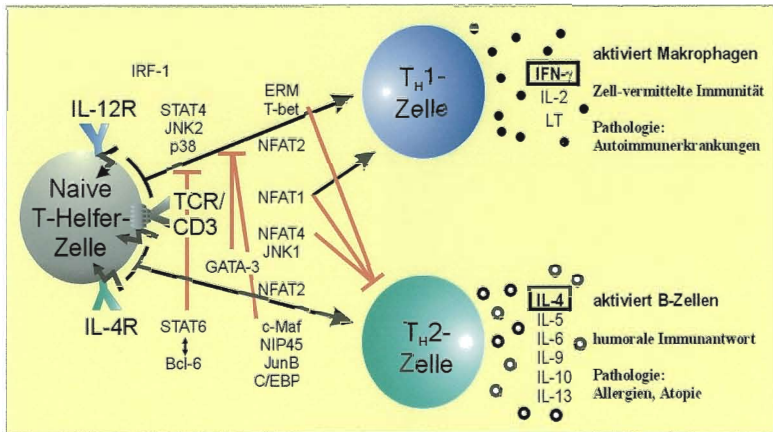
Im Gegensatz zum BCR ist der TCR nicht in der Lage, lösliche Proteinantigene zu erkennen, sondern bindet nur kleinere Peptidfragmente, die ihm von eigens darauf spezialisierten Molekülen, den integralen Membranproteinen des MHC, präsentiert werden. Der MHC ist polygen, und die einzelnen Gene sind stark polymorph, so dass sich die nebeneinander exprimierten MHC-I- und MHC-II-Moleküle interindividuell stark unterscheiden können<sup>23,24</sup>. Um einen MHC-I:Peptid-Komplex zu erkennen, benötigt eine TC neben dem TCR das sogenannte CD8-Korezeptormolekül, welches einen membran nahen konstanten Bereich des MHC-I erkennt<sup>25</sup>. Über die MHC-I-Moleküle werden den CD8<sup>+</sup> TCs, die als ausdifferenzierte Effektoren zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) genannt werden, Antigene von zytosolischen Viren oder Bakterien präsentiert, und da fast alle kernhaltigen Zellen MHC-I exprimieren, sind diese TCs dadurch in der Lage, infizierte Zellen zu erkennen und abzutöten<sup>2</sup>.

MHC-II-Moleküle präsentieren entweder Peptidfragmente von intravesikulären Pathogenen, wie denen aus den Lysosomen der MPs, oder von extrazellulären Erregern und deren Toxinen, die von BCs nach Bindung an den BCR internalisiert wurden<sup>26,27</sup>. Ähnlich wie CTLs den MHC-I:Peptid-Komplex mit Hilfe ihres CD8-Korezeptors erkennen, geht die Antigenerkennung bei der zweiten T-Zellpopulation, den CD4<sup>+</sup>- oder T-Helferzellen (T<sub>H</sub>s), vonstatten<sup>28</sup>. Diese lassen sich nach dem klassischen Modell in zwei Untergruppen teilen, nämlich in T-Helfer-1-Zellen (T<sub>H</sub>1s) und T-Helfer-2-Zellen (T<sub>H</sub>2s). T<sub>H</sub>1s sezernieren als wichtigstes Effektorzytokin IFN- $\gamma$ , aktivieren MPs, interagieren mit diesen und generieren eine adaptive zelluläre Immunantwort; T<sub>H</sub>2s sezernieren die Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13, regulieren die BCs und propagieren dadurch eine adaptive humorale Immunantwort<sup>29</sup> (s. Abbildung 1.2).

Bevor die naiven CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-TCs den Thymus verlassen, durchlaufen sie eine positive und negative Selektion. Erstere sorgt über ein Signal durch den TCR für das Überleben derjenigen TCs, die einen antagonistischen Peptid:selbst-MHC-



Komplex erkennen<sup>30</sup>. Letztere induziert bei denjenigen TCs, die auf agonistisches Peptid:selbst-MHC-Komplexe reagieren, Apoptose<sup>31</sup>. Somit verlassen im Idealfall nur naive TCs den Thymus, die nicht auf Autoantigenen reagieren, und Fremdartige nur dann erkennen, wenn sie von selbst-MHC-Molekülen präsentiert werden, also MHC-restringiert sind<sup>2</sup>.



**Abbildung 1.2** Modell zur T-Helfer-Zelldifferenzierung und -Funktion<sup>32</sup>.

Die Stimulation einer naiven TC durch den TCR:CD3-Komplex und entweder den IL-12R oder den IL-4R veranlasst die Zelle sich entweder in eine TH1 oder TH2 zu differenzieren, welche IFN- $\gamma$ , IL-12 und Lymphotoxin bzw. IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 synthetisieren. Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie STAT4 und T-bet (TH1), STAT6 und GATA3 (TH2) und NFATs sowie C/EBPs spielen hierbei eine Rolle. TH1s tragen zur Zell-vermittelten Immunität und zu Autoimmunkrankheiten bei, TH2 zur humoralen Immunität und zur Atopie bzw. zu Allergien.

Die naiven TCs zirkulieren durch das Blut- und Lymphgefäßsystem und – vermittelt durch Chemokine, vaskuläre Adressine, Selektine und Integrine – gelangen sie in die T-Zellregionen der peripheren lymphatischen Gewebe, wo sie über den TCR Überlebenssignale erhalten (*homing*)<sup>33</sup>. Treffen sie auf ihr Antigen, das ihnen von professionellen APCs über den MHC-I oder MHC-II präsentiert werden muss, leiten die Bindung des TCR und andere kostimulatorische Signale an einer sogenannten immunologischen Synapse ihre klonale Expansion und

Differenzierung zu reifen T-Effektorzelle oder T-Gedächtniszellen ( $T_{Mem}$ ) ein (*priming*)<sup>34</sup>.

	Angeborenes Immunsystem	Adaptives Immunsystem
<b>Rezeptoren</b>	Im Genom fixiert, Umordnung nicht notwendig	In Gensegmenten kodiert, Umordnung notwendig
<b>Ausbreitung</b>	Nicht-klonal, alle Zellen einer Klasse identisch	Klonal, alle Zellen einer Klasse verschieden
<b>Erkennung</b>	Konservierte molekulare Muster (LPS, LTA, Mannane, Glykane)	Details molekularer Strukturen (Proteine, Peptide, Kohlenhydrate)
<b>Selbst-/Nichtselbst-Erkennung</b>	Perfekt: über evolutionären Zeitraum selektioniert	Imperfekt: in individuellen somatischen Zellen selektioniert
<b>Reaktionszeit</b>	Unverzögliche Aktivierung von Effektoren	Verzögerte Aktivierung von Effektoren
<b>Antwort</b>	Kostimulierende Moleküle, Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6), Chemokine (IL-8)	Klonale Expansion oder Anergie, IL-2, Effektorzytokine (IFN- $\gamma$ , IL-4)

**Tabelle 1.1** Angeborenes und Adaptives Immunsystem<sup>7</sup>.

## 1.2 Die Genexpression

Die meisten Zellen des Immunsystems entstehen aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks. Damit aus diesen einheitlichen Vorläuferzellen so verschiedene Populationen wie die NGCs und die BCs/TCs hervorgehen können, bedarf es komplexer Wachstums- und Differenzierungsmechanismen. Eine zentrale Rolle kommt dabei der DNA-Regulation zu, denn die DNA-Replikation, die somatische Rekombination und die differentielle Transkription sind wesentliche Voraussetzungen für die verschiedenen Genexpressionsmuster, in denen die Vielfalt der Leukozyten begründet liegt<sup>35</sup>.

### 1.2.1 Epigenetische Phänomene

Das menschliche Genom besteht aus 3,2 Gigabasen ( $3,2 \times 10^9$  Nukleotide), enthält nach neuesten Schätzungen 30.500–35.500 Gene<sup>36</sup> und ist in den 23 Chromosomenpaaren der Zellkerne lokalisiert. Die DNA-Moleküle können dort aus räumlichen und funktionellen Gründen nicht in beliebiger Konformation vorliegen, sondern bedürfen einer hochorganisierten Struktur, die als Chromatin bezeichnet wird. Man unterscheidet zwei Zustandsformen, nämlich das hochkondensierte Heterochromatin und das weniger dicht gepackte Euchromatin, welche sich in vielen molekularen Details und der Dichte der kodierenden Sequenzen unterscheiden<sup>37</sup> (s. Tabelle 1.2). Kovalente Modifikationen der DNA, wie die Cytosin-Methylierung in CpG-reichen Regionen, und kovalente Modifikationen der Histone, wie Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, tragen zur genregulatorischen Funktion des Chromatins bei.

	<b>Euchromatin</b>	<b>konstitutives Heterochromatin</b>
<b>Färbeverhalten</b>	dispers	heteropyknotisch
<b>DNA-Sequenz</b>	überwiegend unikal	überwiegend repetitiv (Satelliten, Transposons)
<b>Gendichte</b>	hoch	gering oder ohne Gene
<b>Chromatinstruktur</b>	unregelmäßige Nukleosomen, zugänglich für Nukleasen	regelmäßige Nukleosomenreihen, weniger zugänglich für Nukleasen
<b>Aktivitätsstadium</b>	Gene induzierbar	Gene stumm
<b>Charakteristische Modifikationen</b>	Histone hyperacetyliert, Cytosine hypomethyliert, Histon H3-mLys4 vorhanden	Histone hypoacetyliert, Cytosine hypermethyliert, Histon H3-mLys9 vorhanden

**Tabelle 1.2** Unterschiede zwischen Euchromatin und Heterochromatin<sup>37</sup>.

Der *histone code*<sup>38</sup>, also die Summe verschiedener Modifikationen der Histone, entscheidet, ob es sich um stilles Heterochromatin oder um transkribierbares

Euchromatin handelt. Da die dem Differenzierungsgrad der verschiedenen Zelllinien entsprechenden Modifikationen der Chromatinstruktur und somit das Aktivierungsmuster der für diese Diversität verantwortlichen Genloci von den Mutterzellen an ihre Tochterzellen weitergegeben werden, nennt man diese Art von biologischer Informationsspeicherung epigenetische Information<sup>37</sup>.

Man unterscheidet zwei Hauptklassen Chromatin-remodellierender Komplexe, nämlich die ATP-abhängigen und die kovalent-modifizierenden Komplexe. Die ATP-abhängigen Komplexe, wie SWI/SNF (*switching-defective/sucrose non-fermenting*), können die Konfiguration der Nukleosomen selbst oder deren Position auf der DNA durch *sliding* verändern und dadurch die Zugänglichkeit bestimmter Sequenzen für DNA-bindende Faktoren regulieren. Welche Bedeutung diesem Mechanismus *in vivo* zukommt und wie die unterschiedlichen Positionierungen der Nukleosomen stabilisiert und an die Tochterzellen weitergegeben werden, ist noch weitgehend unklar<sup>39</sup>. Die kovalent-modifizierenden Komplexe versehen die N-terminalen Histonpeptide mit verschiedenen chemischen Gruppen – Acetyl-, Methyl- und Phosphatidylgruppen – oder entfernen diese wieder. Stellvertretend für eine Vielzahl verschiedener Enzyme sind hier die Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) genannt. Die Hyperacetylierung an bestimmten Lysinresten der Histone begünstigt den euchromatischen Zustand und man findet sie in transkriptionell aktiven Loci, wohingegen die Hypoacetylierung charakteristisch für transkriptionell stummes Heterochromatin ist<sup>40</sup>.

### 1.2.2 Der allgemeine Transkriptionsapparat

Neben den oben genannten epigenetischen Mechanismen ist der allgemeine Transkriptionsapparat, bestehend aus der RNA-Polymerase II (RNAP II), den allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs) und dem Mediator Komplex, für die eukaryontische Genexpression von herausragender Bedeutung<sup>41</sup>. Die RNAP II ist ein Multienzymkomplex und katalysiert die DNA-abhängige mRNA-Synthese. Ihre größte Untereinheit zeichnet sich durch eine carboxyterminale Domäne (CTD)<sup>42</sup> aus, die den mit ihr vergesellschafteten Faktoren als Plattform dient und die deshalb eine Schlüsselrolle in der Transkriptionsinitiation und der Koordination der ko-

transkriptionellen mRNA-Prozessierungen, wie dem *5'-capping*, der 3'-Polyadenylierung und dem Spleißen, innehat<sup>43</sup>.

RNAP II und GTFs alleine sind nicht in der Lage, komplexe transkriptionelle Signalgebungen zu integrieren. Um sowohl positive als auch negative regulatorische Informationen von genspezifischen Aktivatoren oder Suppressoren zu transduzieren, hat sich gleichsam als molekulare Schnittstelle in Hefen der Mediator Komplex entwickelt. Beim Menschen hat man bis jetzt über 25 verschiedene orthologe TRAPs (*transcription activator proteins*) identifiziert, die physisch mit der RNAP II und dem TFIID wechselwirken und modular miteinander kommunizieren. Es scheint sich beim Mediator Komplex also um ein hochkomplexes, dynamisch integrierendes Netzwerk zu handeln<sup>42</sup>.

### 1.2.3 Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren

Neben den Chromatin-remodellierenden Komplexen und dem allgemeinen Transkriptionsapparat gibt es eine dritte Gruppe genregulatorischer Proteine, die sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren (spTFs). In Eukaryonten besteht ihre Hauptaufgabe darin, ein der Transkription generell zugängliches Gen im entscheidenden Moment an einer spezifischen Sequenz im Promotorbereich, in einem sogenannten *silencer* oder *enhancer* – die 5' des Promotors, in einem Intron oder auch 3' der kodierenden Region liegen können – zu binden und durch Interaktion mit dem Mediator Komplex die Transkription zu hemmen oder zu fördern<sup>44</sup>. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, sind die spTFs aus funktionell verschiedenen Domänen aufgebaut. Neben der DNA-bindenden Domäne findet man transkriptionell aktivierende oder inhibierende Domänen, Protein/Protein-Interaktionsdomänen und Import/Export-Signale, die der Lokalisation der spTFs im zytosolischen oder nukleären Kompartiment dienen<sup>45</sup>. Die wichtigsten Struktur motive spezieller DNA-Bindungsdomänen werden im folgenden beschrieben.

Das *Zinkfinger*-Motiv entsteht durch eine spezifische Positionierung von Cysteiny- oder Histidylresten in einer Peptidkette, die es einem Zinkatom ermöglicht, erstere zu chelatieren, wodurch eine schleifenförmige Struktur, der sogenannte Zinkfinger,

entsteht. Diese Schleifen bilden  $\alpha$ -helikale oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die imstande sind, in der großen Furche der DNA zu binden und basenspezifische Kontakte zu knüpfen<sup>46</sup>.

Das *basische Leuzin-Zipper-Motiv* (bZIP) enthält als Monomer zwei Domänen, von denen die erste eine  $\alpha$ -Helix, deren 5-7 Leuzine auf einer Seite lokalisiert sind, bildet und die zweite etliche, meist basische, Aminosäuren enthält. Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Leuzinresten können die Monomere reißverschlussartig (engl. *zipper*) dimerisieren und mit ihren basischen Domänen sequenzspezifisch an die DNA binden<sup>47</sup>.

Das *basische Helix-Loop-Helix-Motiv* (bHLH) ist gewissermaßen mit dem bZIP verwandt, denn seine monomere Struktur besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices, die über eine relativ flexible Schleife miteinander verbunden sind. Die nicht an der DNA-Bindung beteiligte  $\alpha$ -Helix liefert ein starkes Dimerisierungssignal und spTFs mit diesem Motiv binden bevorzugt als Homo- oder Heterodimere an die DNA<sup>48</sup>.

### 1.3 Die T-Helfer-Zelldifferenzierung

#### 1.3.1 Naive T-Helferzellen

Treffen naive  $CD4^+$   $T_H0$ s in den sekundären lymphatischen Organen auf APCs, die ihnen gebunden an MHC-II-Moleküle ihr jeweils spezifisches Antigen präsentieren, bedarf es neben der Interaktion mit dem TCR<sup>27</sup> sogenannter kostimulierender Signale, die von der gleichen APC geliefert werden müssen. Die Bindung eines Liganden an den TCR und die konsekutive Signalgebung alleine können weder eine Proliferation noch eine Differenzierung der  $T_H0$ s auslösen. Um eine Autoreaktivität zu verhindern, führt dieses Ereignis vielmehr zur Anergie oder zur Apoptose des entsprechenden T-Zellklons<sup>2</sup>. Die am besten untersuchten kostimulatorischen Moleküle sind die homodimeren Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, die man ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen findet, welche die Proliferation der TCs anregen. Der Rezeptor der TCs für die B7-Moleküle ist das CD28-Oberflächenmolekül, ebenfalls ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, und simultane Signalgebung über den

TCR und CD28 kann die klonale Expansion der T<sub>H</sub>0s unter Beteiligung des autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 auslösen<sup>49</sup>.

Neben diesen initialen Aktivierungsvorgängen spielen eine Reihe anderer Prozesse, wie die Antigenpräsentation, das Zytokinmilieu, Nicht-Zytokinfaktoren und vor allem genetische Modifikatoren, eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung der naiven T<sub>H</sub>0s hinzu T<sub>H</sub>1s und T<sub>H</sub>2s<sup>50</sup>.

### 1.3.2 T-Helfer-1-Zellen

Reife T<sub>H</sub>1s sind für die zellvermittelte Immunität bei viralen oder intrazellulären bakteriellen Infektionen verantwortlich, bieten Schutz gegen parasitären Befall durch *Leishmania spp.* und *Toxoplasma gondii* und vermitteln gewebespezifische Autoimmunkrankheiten sowie die Transplantatabstoßung<sup>50</sup>. Die wichtigsten, von T<sub>H</sub>1s exprimierten, Effektorzytokine sind IFN- $\gamma$ , IL-2 und das Lymphotoxin (LT- $\alpha$ /TNF- $\beta$ ), ein Mitglied der TNF-Familie<sup>51</sup>.

Die Differenzierung zu reifen T<sub>H</sub>1s ist hoch plastisch, denn verschiedene Zellen des Immunsystems sind mit differentieller Signalgebung daran beteiligt. Neben den Ereignissen an der immunologischen Synapse<sup>52</sup> spielen die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12, sezerniert von NKs bzw. MPs und DCs, eine Schlüsselrolle<sup>53,54</sup>. Viele Zytokine verändern die Genexpression über die Bindung an Zytokinrezeptoren, deren zytoplasmatische Domänen mit Tyrosinkinasen der Janus-Kinase-Familie (JAKs) assoziiert sind. Nach der Bindung des Zytokins dimerisieren die Rezeptormoleküle, so dass die JAKs sich gegenseitig aktivieren und den Rezeptor selbst phosphorylieren. STAT-Transkriptionsfaktoren, Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription, werden daraufhin durch die JAKs phosphoryliert und bilden, vermittelt durch Wechselwirkungen ihrer SH2-Domänen (Src-Homologie 2-Domäne), Homo- oder Heterodimere. Die STAT-Dimere translozieren letztlich in den Zellkern und können dort als spTFs verschiedene Gene aktivieren<sup>55</sup>.

Zur Aktivierung naiver T<sub>H</sub>0s bindet IFN- $\gamma$  an den Interferon- $\gamma$ -Rezeptor (IFN- $\gamma$ R) und induziert über STAT1 ein für T<sub>H</sub>1s spezifisches Mitglied der T-box-Familie, den Transkriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T cells*)<sup>56</sup>. Dieser remodeliert

den bis dahin transkriptionell stummen IFN- $\gamma$  Genlocus, induziert anschließend in nicht näher geklärter Synergie mit HLX (*H2.0-like homeobox 1*) die Expression von IFN- $\gamma$  und stabilisiert seine eigene Expression entweder über einen intrinsischen *feedback*-Mechanismus oder über autokrine IFN- $\gamma$  Signalgebung<sup>57</sup>. Des weiteren induziert T-bet die Expression der  $\beta$ 2-Untereinheit des IL-12 Rezeptors (IL-12R $\beta$ 2), so dass die heranreifende T<sub>H</sub>1-Zelle den heterodimeren IL-12R (IL-12R $\beta$ 1/IL-12R $\beta$ 2) in ihre Zellmembran integriert<sup>58</sup>. In terminal differenzierten T<sub>H</sub>1s kann die akute Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens dann über zwei experimentell unterscheidbare Signalwege initiiert werden, nämlich über den TCR oder über die Zytokine IL-12 und IL-18<sup>59</sup>. Die Signalgebung über den TCR lässt sich pharmakologisch mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor der NFAT-Transkriptionsfaktoren, hemmen und könnte somit über den Ca<sup>2+</sup>-Weg und die Phosphatase Calcineurin vonstatten gehen<sup>60</sup>. Die akute IFN- $\gamma$ -Induktion über IL-12 und IL-18 hingegen hängt stark von STAT4 und NF- $\kappa$ B ab<sup>59</sup>.

Ein weiteres Zytokin, das heterodimere IL-27, wird von APCs sezerniert, bindet an TCCR (*T-cell cytokine receptor*) und induziert selektiv die Proliferation naiver T<sub>H</sub>0s. Der genaue Mechanismus, über den IL-27 und TCCR in die frühe T<sub>H</sub>1-Entwicklung eingreifen, ist noch ungeklärt, scheint jedoch über ein Zusammenspiel mit IL-12 zu geschehen<sup>61</sup>.

Das erst kürzlich beschriebene IL-23 setzt sich aus der p40-Untereinheit von IL-12 und einer eigenen IL-23 $\alpha$ -Kette zusammen. Über den IL-23-Rezeptor (IL-23R) aktiviert es den Transkriptionsfaktor STAT4. Deshalb vermutet man, dass dieses Zytokin während der primären Induktion und der akuten Transkription des IFN- $\gamma$ -Gens zusammen mit IL-18 fungiert<sup>62</sup> (s. Abbildung 1.3).

### 1.3.3 T-Helfer-2-Zellen

Terminal differenzierte T<sub>H</sub>2s regulieren die humorale Immunität und schützen den Organismus somit gegen extrazelluläre Bakterien und deren Toxine sowie gegen etliche parasitäre Infestationen wie z.B. intestinale Helminthen. Die pathologische T<sub>H</sub>2-Antwort hingegen führt zur Allergie und zu atopischen Erkrankungen<sup>50</sup>. Beim

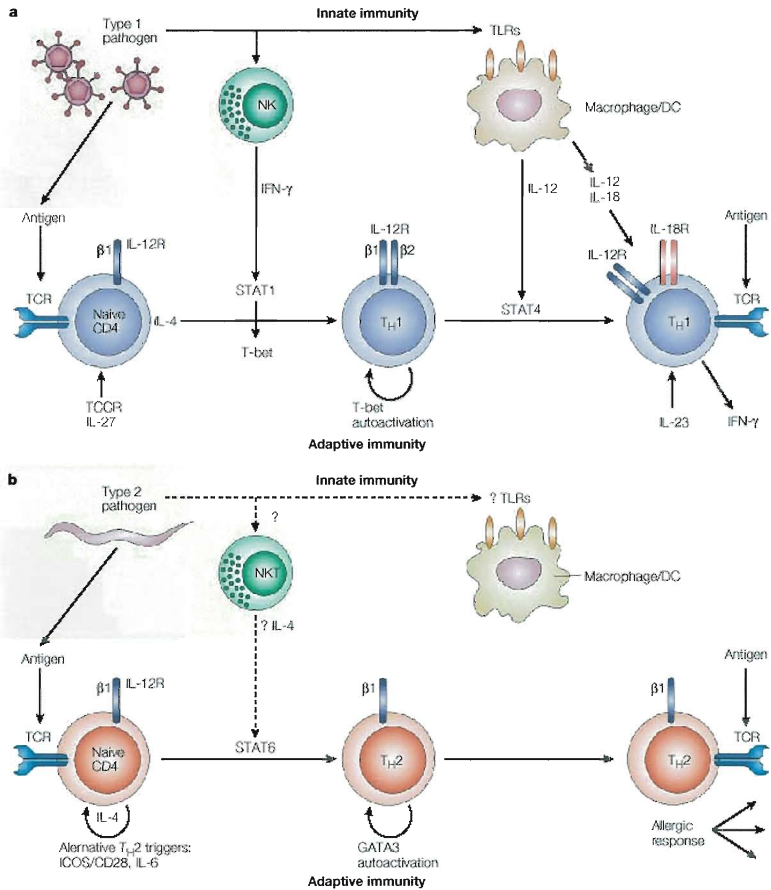


Menschen liegen die wichtigsten T<sub>H</sub>2-Effektorzytokine, d.h. die Lymphokin-Gene IL-4, IL-13 und IL-5, gekoppelt in einem Genlocus auf Chromosom 5 (5q31)<sup>35</sup>.

Wie bei der Differenzierung der T<sub>H</sub>1s sind die Vorgänge an der immunologischen Synapse<sup>52</sup>, welche die Reifung zu T<sub>H</sub>2-Effektorzellen einleiten, richtungsweisend. Auf das Erkennen eines löslichen Typ-2 Antigens hin, verbunden mit einem T<sub>H</sub>2-spezifischen kostimulatorischen Signal durch die APCs, führt das hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> TCs sezernierte IL-4<sup>63</sup> zur Induktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors GATA3<sup>64</sup>. Die Induktion von GATA3 über den IL-4R geht in Synergie mit Mel-18 (*RING finger protein 110*), einem Protein der Polycomb-Gruppe<sup>65</sup> vorstatten. Eine andere Theorie besagt, dass bei Ausbleiben der angeborenen Immunantwort die T<sub>H</sub>2-Differenzierung über eine intrinsische IL-4/GATA3-Schleife gestartet wird, die ansonsten durch die von NKs und MPs sezernierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-12 unterdrückt wird<sup>50</sup>. In naiven T<sub>H</sub>0s ist der T<sub>H</sub>2-Zytokin-Genlocus transkriptionell stumm. Methylierte CpGs sind mit MBD2 (*methyl-CpG-binding domain protein 2*) assoziiert, welches wiederum einen Chromatin-remodellierenden Komplex namens NuRD (*nucleosome remodelling and histone deacetylase*) bindet. Beide zusammen bilden den sogenannten MeCP1-Komplex<sup>66</sup>. Die DNA-Bindungsregionen dieser Repressorkomplexe sind wahrscheinlich identisch mit den für die Expression von IL-4, IL-13 und IL-5 entscheidenden *cis*-aktiven Elementen, die in den CNS1- (*conserved non-coding sequence*) und CNS2-Regionen liegen<sup>67</sup>. Der GATA3-Transkriptionsfaktor aktiviert den T<sub>H</sub>2-Zytokin-Genlocus, indem er MBD2 verdrängt, und induziert daraufhin epigenetische Veränderungen, wie Histonacetylierung und DNA-Demethylierung<sup>68</sup>. Nachdem der T<sub>H</sub>2-Zytokin-Genlocus remodelliert wurde, spielen verschiedene Faktoren in der akuten Expression der nun direkt induzierbaren Gene eine Rolle. T<sub>H</sub>2-spezifische Proteine wie GATA3 und der bZIP-Transkriptionsfaktor c-Maf<sup>69</sup> transaktivieren den IL-5-beziehungsweise die IL-4-Promotoren/*enhancer*. Linienunspezifische Faktoren, wie die NFATs und AP-1, die man auch in T<sub>H</sub>1s findet, üben sowohl positive als auch negative Effekte auf die Zytokinexpression reifer T<sub>H</sub>2s aus<sup>70</sup> (s. Abbildung 1.3).

Als weitere, die T<sub>H</sub>2-Differenzierung unterstützende Signale werden CD28 und ICOS (*inducible co-stimulator*), die STAT6-unabhängig über den

Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B operieren<sup>71</sup>, und IL-6 (IFN- $\beta_2$ ) diskutiert<sup>72</sup>. IL-6 wird durch verschiedene externe Stimuli, beispielsweise durch IL-1 oder TNFs, in einer Vielzahl an Leukozyten induziert, und im Kontext der T-Helfer-Zelldifferenzierung anschließend von MCs, DCs und BCs, also professionellen APCs, exprimiert<sup>73</sup>.



**Abbildung 1.3** Dynamisches Modell zur T<sub>H</sub>-Differenzierung<sup>50</sup>.

**a.** Die Entwicklung von T<sub>H</sub>1s wird neben dem entsprechend präsentierten Typ-1-Antigen durch Signale des angeborenen Immunsystems unterstützt. Der erste Differenzierungsschritt wird über den

TCR und über den IFN- $\gamma$ R vermittelt, was u.a. den Transkriptionsfaktor STAT1 aktiviert und in gesteigerter Expression des Transkriptionsfaktors T-bet resultiert. Dies führt zur Aktivierung des IFN- $\gamma$ -Gens durch Remodellierung des Locus und zur Expression der IL-12R $\beta$ 2-Untereinheit des IL-12R. Die IL-12-Signalgebung kann nun die T<sub>H</sub>1-Antwort auf zwei Wegen verstärken. Einmal wird die Produktion von IFN- $\gamma$  durch IL-12 direkt erhöht, des weiteren wird die Expression des IL-18R initiieren, durch den ein neuer *pathway* für die IFN- $\gamma$ -Produktion eröffnet wird. Zu verschiedenen Zeitpunkten spielen auch das IL-27 über den TCCR und das IL-23 über den IL-23R eine Rolle.

b. Die T<sub>H</sub>2-Entwicklung könnte entweder als Antwort auf eine extrinsische IL-4-Quelle oder durch die Aktivierung eines *default pathway* in der Abwesenheit inhibierender Signale des angeborenen Immunsystems resultieren. In naiven T<sub>H</sub>0s ist die basale Expression von GATA3 gering, könnte aber, wenn hemmende Signale ausbleiben, eine IL-4-Produktion initiieren, die dann die T<sub>H</sub>2-Differenzierung startete. Des weiteren könnte die GATA3-Expression positiv durch CD28, ICOS und IL-6 oder negativ durch LFA1 (*leukocyte-associated antigen 1*) reguliert werden.

Das sezernierte IL-6 bindet an die  $\alpha$ -Kette des IL-6 Rezeptors (IL-6R $\alpha$ ), führt zur Dimerisierung der  $\beta$ -Ketten (IL-6R $\beta$ /gp130)<sup>74</sup> und aktiviert über diese zwei verschiedene Signaltransduktionskaskaden, nämlich einen JAK/STAT-*pathway* und den C/EBP-*pathway* (*CCAAT/enhancer-binding protein*). Die Aktivierung der Ras/Raf/Mak/Erk- (*extracellular signal-regulated kinase*) Kaskade durch IL-6 führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$ , synonym NF-IL6 (*nuclear factor of IL-6*)<sup>75</sup>. Gleichzeitig wird durch IL-6 die Isoform C/EBP $\delta$  (NF-IL6 $\beta$ ) induziert<sup>76</sup>. Diese beiden Transkriptionsfaktoren regulieren zusammen die sogenannten IL-6-responsiven Gene vom Typ-1<sup>77</sup>. Die Typ-2 Gene werden von IL-6 über die Aktivierung von Jak1, Jak2 und Tyk2 und die konsekutive Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3, in wesentlich geringerem Ausmaß auch STAT1, induziert<sup>78</sup>.

#### 1.4 Blimp1

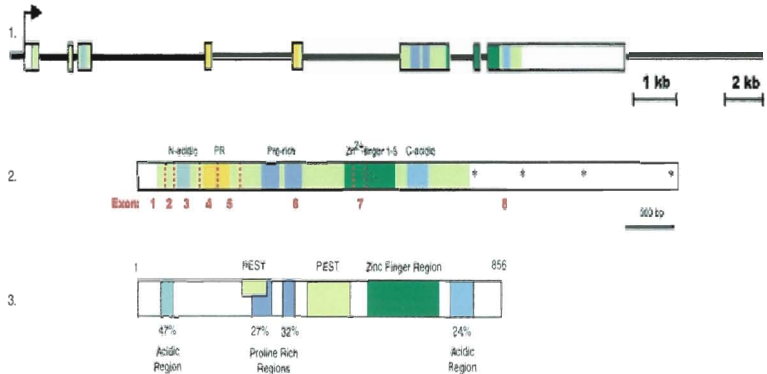
Die Familie der PRDM-Gene (*positive regulatory domain*) besteht aus drei Mitgliedern, nämlich PRDM1, -2 und -3, und man findet ihre Homologe in Vielzellern von *D. melanogaster* bis *H. sapiens*, nicht jedoch in Einzellern wie *S. cerevisiae*, so dass sie wahrscheinlich während der Evolution der multizellulären Organismen entstanden sind<sup>79</sup>. Bei ihren Genprodukten handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, und PRDM1 (6q21-q22.1)<sup>80</sup> kodiert für das humane PRDI-

BF1 (*positive regulatory domain I binding factor I*) bzw. das murine Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein*)<sup>81</sup>. Die entsprechenden Proteinprodukte zeichnen sich durch fünf DNA-bindende Zinkfinger vom *Krüppel-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>*-Typ<sup>82</sup> und durch die namensgebende, etwa 100 Aminosäuren (aa) lange PR-Domäne aus, die eine Untergruppe der SET-Domänen darstellt. Bei diesen handelt es sich um evolutionär stark konservierte Domänen, die erstmalig in den *D. melanogaster*-Proteinen SU(VAR)3-9, E(Z)30 und TRX31 beschrieben wurden und die einen Teil der katalytischen Region von Histon-Methyltransferasen bilden<sup>83</sup>. Die genaue Funktion der PR-Domäne hingegen ist zur Zeit noch unbekannt.

Die Expression von Blimp1 wurde in MCs/MPs<sup>84</sup> und PCs, die in thymusabhängigen und thymusunabhängigen Immunantworten entstanden sind, in langlebigen PCs des Knochenmarks und in 5-15% der folliculären BCs gezeigt<sup>85</sup>. Das Blimp1-Gen enthält acht Exons, deren Information sich über einen ~23 kb langen, genomischen DNA-Bereich erstreckt, und alle Exon-Intron-Verbindungen gehen mit der *gt/ag*-Regel konform. Die bekannten funktionellen Domänen, mit Ausnahme der PR-Domäne (Exon 4+5) und der fünf Zinkfinger (Exon 6+7+8), werden jeweils von einem Exon kodiert<sup>79</sup>. Die Transkription wird, wie es bei Promotoren ohne TATA-Box üblich ist, von verschiedenen Initiatorelementen (INRs) aus geregelt<sup>86</sup>, die sich 244-251bp stromaufwärts vom ATG-Startkodon befinden<sup>79</sup>. Daraus, und aus der Benutzung verschiedener PolyA-Signale, resultieren drei Blimp1-mRNA-Isoformen (5.7 kb, 4.3 kb, 3.6 kb), die allerdings für das gleiche Protein kodieren. Eine vierte mRNA-Isoform wird ohne Exon 7 ( $\Delta$ exon7) synthetisiert, so dass dem entsprechenden murinen Protein die für die DNA-Bindung kritischen Zinkfinger 1 und 2 fehlen. Es ist anzunehmen, dass dieses Protein ohne DNA-Bindungsaktivität ist<sup>79</sup>.

Das Blimp1-Protein (96 kDa) besteht aus 856 aa und enthält die obligatorischen fünf Zinkfinger vom *Krüppel*-Typ (aa 608-740), wobei dem am meisten C-terminal gelegenen das letzte Histidin der PROSITE Konsensussequenz (CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>OX<sub>5</sub>LX<sub>2</sub>HX<sub>3</sub>H)<sup>87</sup> fehlt. Interessanterweise scheinen für die sequenzspezifische Bindung von PRDI-BF1, dem humanen Homolog, an PRDI, einen 12 bp langen Abschnitt im Promotor des IFN- $\beta$  Gens, die Zinkfinger 1 (Exon

6+7) und 2 (Exon 8) auszureichen<sup>88</sup>. Des weiteren enthält das Protein zwei Aktivierungsdomänen vom sauren Typ (*acidic type activation domain*), die durch eine negative Nettoladung charakterisiert sind, wobei die N-terminale Domäne (Exon 3, aa 71-87) eine Nettoladung von  $-8$  und die C-terminale (Exon 8; aa 752-800) eine Nettoladung von  $-11$  aufweisen<sup>82,89</sup>.



**Abbildung 1.4** Schematische Struktur des Blimp1-Gens, der Blimp1-cDNA und des Blimp1-Proteins<sup>79,82</sup>.

1. Dargestellt ist das murine Blimp1-Gen, das aus acht Exons und mindestens sieben Introns besteht und sich über ca. 33 kb genomische DNA erstreckt. Die kodierenden Sequenzen sind farblich hinterlegt (hellblau/N-terminale saure Region, blau/C-terminale saure Region, gelb/*positive regulatory domain*, dunkelblau/prolinreiche Region, hellgrün/PEST-Sequenz, dunkelgrün/Zinkfinger).

2. Das Schema der Blimp1-cDNA folgt der oben beschriebenen Farbgebung. Zusätzlich sind die Spleißverbindungen der einzelnen Exons durch vertikale, gepunktete rote Linien angezeigt und die *poly(A)-sites* in der 3'-UTR (3'-*untranslated region*) mit Sternchen markiert.

3. Die Anordnung der verschiedenen funktionelle Domänen des Blimp1-Proteins (aa 1-856) wird aus diesem Schema ersichtlich. Die Prozentzahlen geben den relativen Anteil der jeweiligen aa an (z.B. 47% saure aa oder 27% Prolin).

Darüber hinaus finden sich mehrere prolinreiche Regionen (Exon 6), wie die Bereiche aa 360-400 (27% P) und aa 422-439 (32% P), bei denen es sich um weitere Aktivierungsdomänen handelt<sup>82</sup>. Die Region aa 351-394 zeichnet sich durch einen hohen Anteil der aa Prolin, Glutamat, Serin oder Threonin (*PEST-sequence*)

aus, die das Protein nach kovalenter Modifizierung der proteosomalen Degradation zuführen<sup>90</sup>. Für das humane PRDI-BF1 konnten zwei verschiedene Isoformen gezeigt werden, nämlich PRDI-BF1 $\alpha$ , welches Blimp1 entspricht, und eine kurze Variante, PRDI-BF1 $\beta$ , welche ohne die N-terminale saure Aktivierungsdomäne und mit einer unvollständigen PR-Domäne exprimiert wird. Diese kurze Form wird von einer zweiten Promotorregion zwischen Exon 3 und dem neu beschriebenen Exon 1 $\beta$  aus transaktiviert und weist einen signifikanten Verlust seiner transkriptionellen Repressionsfunktion auf<sup>91</sup>.

In Übereinstimmung mit seinem Expressionsmuster in PCs hat sich gezeigt, dass Blimp1 sowohl in der Tumorzelllinie BCL<sub>1</sub> (*B-cell lymphoma 1*)<sup>82</sup> als auch in primären BCs der Milz<sup>92</sup> in der Lage ist, deren terminale Differenzierung zu antikörpersezernierenden PCs einzuleiten. In kürzlich durchgeführten *microarray*-Studien konnte gezeigt werden, dass Blimp1 mehr als 225 Gene reprimiert und ca. 30 Gene induziert<sup>93</sup>. Bei den z. Z. bekannten 5 Zielgenen, die von Blimp1 direkt unterdrückt werden, d.h. c-Myc<sup>94</sup>, CIITA<sup>95</sup> (*class II transactivator*), Pax5<sup>96</sup> (*paired-box gene 5*), SpiB und Id3<sup>93</sup> (*inhibitor of DANN-binding*), handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die alle während der BC-Entwicklung eine Hauptrolle spielen. Es ist erwiesen, dass Blimp1 seine Zielgene auf mindestens zwei Arten unterdrückt. Über die Bindung an seine 12bp lange Konsensussequenz (GTAGTGAAAGTG)<sup>97</sup> verdrängt es transkriptionelle Aktivatoren, wie IRF4 (*IFN regulatory factor-4*), aus der Promotorregion oder rekrutiert transkriptionelle Korepressoren der Groucho-Familie<sup>98</sup> und verschiedene HDACs, die mittels epigenetischer Modifikationen transkriptionell stumme Genloci schaffen<sup>99</sup>.

## 1.5 C/EBP $\beta$

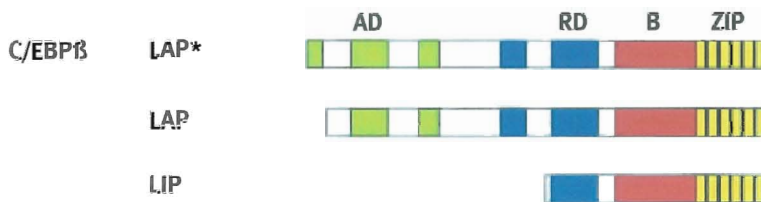
Die C/EBP-Familie (*CCAAT/enhancer-binding protein*) beinhaltet sechs Transkriptionsfaktoren (C/EBP $\alpha$ - $\zeta$ ), die teilweise in verschiedenen Isoformen vorliegen, und die in unterschiedliche zelluläre Vorgänge, wie in die gewebespezifische Transkription metabolischer Gene, in die durch Zytokine ausgelöste Signaltransduktion und in die Proliferation bzw. Differenzierung, involviert sind. Die Gene für C/EBP $\alpha$ - $\delta$  entbehren intronischer Sequenzen,

wohingegen C/EBP $\epsilon$  und - $\zeta$  mit zwei bzw. vier Introns vorliegen<sup>100</sup>. Alle C/EBPs besitzen eine C-terminal gelegene bZIP-Domäne, so dass sie über ihre Leuzin-Zipper homo- oder heterodimerisieren und, mit Ausnahme von C/EBP $\zeta$ , mittels der basischen Regionen an ihre *cis*-regulatorische Konsensussequenz (PuTTGCGPyAAPy) binden<sup>101</sup>. C/EBP $\alpha$ , - $\beta$  und - $\delta$  sind für eine Reihe verschiedener Zelllinien, einschließlich der Adipozyten, MCs/MPs und Neurone, als terminale Differenzierungsfaktoren beschrieben worden<sup>102,103,104</sup>. *Knockout*-Mäuse für die entsprechenden Gene zeigen aufgrund der resultierenden variablen Phänotypen eine funktionelle Redundanz an. Da die DBDs sich in ihren primären aa-Sequenzen durch Homologien von über 90% sehr ähneln, sind die funktionellen Unterschiede wohl in den transaktivierenden bzw. transreprimierenden oder mit anderen Proteinen interagierenden Domänen zu finden<sup>100</sup>.

Über die Mechanismen der Transaktivierung ist nur wenig bekannt. So weiß man, dass C/EBP $\alpha$  mit TBP (*TATA-box-binding protein*) und TFIIB (*transcription factor IIB*), zwei Hauptkomponenten des allgemeinen Transkriptionsapparates, interagiert<sup>105</sup>, und dass C/EBP $\alpha$  und - $\beta$  den ATP-abhängigen Chromatinremodellierenden Komplexe SWI/SNF rekrutieren<sup>106</sup>. Des Weiteren wurde der Einfluss kovalent modifizierender Proteine, namentlich der mit den GTFs kommunizierenden HATs CBP [*CREB (cAMP response element-binding protein) binding protein*] und p300, auf die durch C/EBP $\alpha$ , - $\beta$  und - $\delta$  vermittelte Genexpression gezeigt. Nach einer direkten Bindung von C/EBP $\beta$  an die E1A-Bindungsdomäne von p300 bzw. von C/EBP $\delta$  an CPB werden diese Kofaktoren durch noch nicht näher spezifizierte Proteinkinasen phosphoryliert und dadurch in ihren koaktivierenden Eigenschaften moduliert<sup>107</sup>.

Die Expression der C/EBPs unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, wie während der Adipozytendifferenzierung und der Akute-Phase-Reaktion (APR), wird auf den Ebenen der Transkription, der Translation, der Protein-Protein-Interaktionen, der durch Phosphorylierung modulierten DNA-Bindungsaffinität und der Kernlokalisation durch eine Reihe von Faktoren gesteuert. Diese können Zytokine, Mitogene und Hormone sein<sup>100</sup>. Für den Promotor des murinen C/EBP $\beta$ -Gens konnte eine die Expression fördernde

*binding protein*) greift regulierend in die C/EBP $\beta$ -Expression ein, indem er an zwei nahe der TATA-Box gelegene Sequenzmotive bindet<sup>109</sup>. Im Zuge der APR werden diese CRE-Sequenzen (*cAMP-response element*) auch für die IL-6 vermittelte Induktion von C/EBP $\beta$  über den oben beschriebenen STAT 3-*pathway* benötigt<sup>110</sup>. Aufgrund verschiedener translationeller Startkodons<sup>111</sup> und regulierter Proteolyse<sup>112</sup> kodiert die C/EBP $\beta$ -mRNA für drei Isoformen, nämlich für LAP\*, LAP und LIP (*liver-enriched transcriptional activator/inhibitor protein*). LAP\* und LAP enthalten die C-terminale bZIP, zwei zentral gelegene Repressionsdomänen sowie zwei N-terminale Aktivierungsdomänen. Darüber hinaus besitzt LAP\* eine dritte C-terminal lokalisierte Aktivierungsdomäne, über die das Protein den SWI/SNF-Koaktivator rekrutiert. LIP dahingegen weist nur die bZIP- und eine der beiden Repressionsdomänen auf und fungiert deshalb als dominant negativer Inhibitor, indem es funktionslose Heterodimere mit den anderen Familienmitgliedern bildet<sup>111</sup>.



**Abbildung 1.5** Schematische Darstellung der C/EBP $\beta$ -Isoformen LAP\*, LAP und LIP<sup>100</sup>.

Alle drei C/EBP $\beta$ -Isoformen sind *basische Leuzin-Zipper*-Transkriptionsfaktoren (bZIP). Das Leuzin-Zipper-Motiv ist gelb hinterlegt, die vertikalen schwarzen Linien zeigen die Positionen der einzelnen Leuzine an; die basische Region ist rot. LAP\* (*liver-enriched transcriptional activator protein*) enthält drei, LAP zwei und der dominant negative Inhibitor LIP (*liver-enriched transcriptional inhibitor protein*) keine Aktivierungsdomänen (AD, grüne Markierung). Des Weiteren zeichnen sich alle Proteine durch Repressionsdomänen (RD, blaue Markierung) aus, wobei LAP\* und LAP zwei, LIP eine RD aufweist.

C/EBP $\beta$  (NF-IL6) wurde ursprünglich als Mediator der IL-6-Signalgebung und Transkription beschrieben<sup>75</sup>, doch inzwischen weiß man, dass verschiedene andere Induktoren, wie LPS, IL-1, Glukagon und Insulin, die Transkription, den Kerntransport und die Transaktivierung von C/EBP $\beta$  stimulieren<sup>77</sup> und nicht nur IL-



Induktoren, wie LPS, IL-1, Glukagon und Insulin, die Transkription, den Kerntransport und die Transaktivierung von C/EBP $\beta$  stimulieren<sup>77</sup> und nicht nur IL-6-Zielgene reguliert werden. Li-Weber *et al.* zeigten die Expression von C/EBP $\beta$  in TCs<sup>113</sup> und anschließend, dass das Protein über seine spezifische Bindung an das P4/Pu-b<sub>D</sub>/PRE-I Element in der Promotorregion des IL-4 Gens zu dessen Expression in T<sub>H</sub>2-artigen D10 Zellen beiträgt<sup>114</sup>. Berberich-Siebelt *et al.* gelangten zu der Schlussfolgerung, C/EBP $\beta$  spiele eine Rolle in der Differenzierung der naiven T<sub>H</sub>0s hinzu reifen T<sub>H</sub>2s, da sie die C/EBP $\beta$  vermittelte Expression des IL-4 Gens und gleichzeitig die Suppression von IL-2 und IFN- $\gamma$  in TCs zeigen konnten<sup>115</sup>.

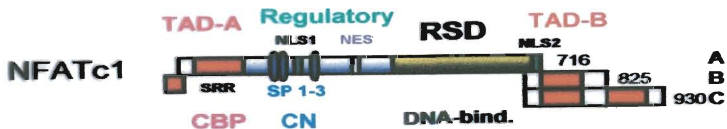
## 1.6 NFATc1

Die NFAT-Transkriptionsfaktoren werden zu einer Familie zusammengefasst, da sie eine gemeinsame, ca. 300 aa lange, DBD aufweisen, welche wegen ihrer strukturellen Übereinstimmungen mit der DBD der Rel/NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren RSD (*Rel similarity domain*) genannt wird<sup>32</sup>. Unter den vier eigentlichen NFAT-Faktoren NFATc1, NFATc2, NFATc3 und NFATc4 besteht hinsichtlich der RSD eine Sequenzhomologie von ca. 70%, wohingegen ein fünftes Protein, NFAT5, lediglich eine RSD-Homologie von ca. 40% zu diesen zeigt. Im Gegensatz zu den erstgenannten ist NFAT5 nicht in der Lage, über seine RSD mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Jun/Fos) zu kooperieren und entbehrt der gängigen TADs (*transactivation domains*) und RR (*regulatory region*)<sup>116</sup>.

TADs und RR sind wichtige Merkmale von NFATc1-4, denn an die N-terminale TAD-A binden die transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP<sup>117</sup>. Die RR weist mehrere Phosphorylierungsstellen auf, welche in zwei konservierte SRRs (*serine rich regions*) und drei SP-Motive organisiert sind. Die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin (CN) bindet an mehrere Stellen innerhalb dieser RR. Durch die CN-Aktivität werden NLSs (*nuclear localisation signals*) exponiert, an die Transportproteine binden und den Kerntransport der NFATs regulieren<sup>118,119</sup>. Eines dieser Motive, nämlich NLS1, sowie ein NES (*nuclear export signal*) liegen in der RR, ein zweites NLS2 nahe des C-terminalen Endes der RSD<sup>120,121</sup>.

Alle NFATs werden in verschiedenen Isoformen exprimiert, die sich sowohl in ihren N-terminalen als auch C-terminalen Peptiden unterscheiden. Ähnlich NFATc2 und NFATc3 wird NFATc1 in drei Isoformen (NFATc1/A,-/B,-/C) synthetisiert. Interessanterweise beinhaltet der C-Terminus der längsten Isoform, NFATc1/C, eine weitere, wenn auch schwache TAD, die als TAD-B bezeichnet wird. Selbst wenn sich hinsichtlich der Transaktivierung kein substantieller Unterschied zu NFATc1/A, der die TAD-B fehlt, feststellen lässt, kann man *in vivo* wohl mit unterschiedlichen Funktionen rechnen<sup>122</sup>.

Zahlreiche Zytokine, die im Zuge der T-Zellaktivierung und -differenzierung exprimiert werden, enthalten in ihren Promotoren mehrere NFAT-Konsensussequenzen (T/AGGAAA) und kombinierte NFAT+AP-1-Bindungsmotive (caxwGGAAAwxxxg/aTGAC/GTCag/tc)<sup>123</sup>. Im murinen IL-2-Promotor finden sich ein proximales und ein distales, jeweils hochaffines NFAT-Motiv, Pu-b<sub>p</sub> (*purine-rich box<sub>proximal</sub>*) und Pu-b<sub>d</sub>, (*purine-rich box<sub>distal</sub>*) deren Mutation einen stark negativen Effekt auf die IL-2-Promotorinduktion ausübt. Pu-b<sub>d</sub> gilt als der Prototyp der NFAT-Konsensussequenz, an dem die Mehrzahl aller Experimente durchgeführt wurde<sup>124</sup>.



**Abbildung 1.6** Schematische Struktur der NFATc1-Isoformen A/B/C<sup>32</sup>.

Die *DNA-binding region* (DBD), die *Rel similarity domain* (RSD), ist als gelbe Box dargestellt, die N-terminale und die C-terminale *transactivation domain* (TAD-A bzw. TAD-B) als rote Boxen, wobei die TAD-B bei NFATc1/C aus zwei Peptiden besteht, die durch eine inhibitorische Domäne getrennt sind. Für die *regulatory domain*, die sich zwischen der TAD-A und der RSD befindet, sind die Positionen der *serine rich region* (SRR) und der drei SP-Motive SP1-3 angegeben. Zusätzlich sind die Bindungsstellen für den transkriptionellen Kofaktor CBP (*CREB-binding protein*) und die Phosphatase Calcineurin (CN), sowie zwei *nuclear localisation signals* (NLS1-2) und ein *nuclear export signal* (NES) eingezeichnet.

Der murine und der humane IL-4-Promotor enthalten jeweils vier NFAT-Motive, und vor allem die Mutationen von P1/Pu-b<sub>B</sub> (atcTGGTGTAAATaaaATTTTCCAA) und P4/Pu-b<sub>D</sub>/PRE-I führten zu einem starken Rückgang der IL-4-Expression. Für P1/Pu-b<sub>B</sub> konnte die Bindung von NFAT+AP-1, von HMG I(Y) (*high-mobility group I*) und der Oktamer-Faktoren gezeigt werden, so dass man von einer komplexen transkriptionellen Informationsintegration ausgehen muss<sup>125</sup>. Ähnlich stellen sich die Verhältnisse an der P4/Pu-b<sub>D</sub>/PRE-I dar, denn es ist bekannt, dass die C/EBPs stromaufwärts der NFAT-Konsensussequenz binden, deshalb mit den NFATs um den Promotor konkurrieren und über alternative Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung der IL-4 Genexpression in TCs beitragen<sup>114</sup>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reaktionssysteme

– 4-Hydroxytamoxifen ( $C_{26}H_{29}NO_2$ )	Sigma-Aldrich
– $\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth
– Acrylamidlösung	Carl Roth
– AEBSF (Pefabloc SC)	Roche
– Agar-Agar	Carl Roth
– Agarose	Sigma-Aldrich
– Ampicillin	Hoechst
– APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck Eurolab
– BioRad Protein Assay (5 x Bradford Reagenz)	BioRad
– Borsäure	Merck Eurolab
– Bromphenol Blau	Merck Eurolab
– BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Carl Roth
– Chloroform ( $CHCl_3$ )	Carl Roth
– DEPC (Diethylpyrokarbonat)	Carl Roth
– Dinatriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )	Merck Eurolab
– D-Luziferin ( $C_{11}H_8N_2O_3S_2$ )	AppliChem
– DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth

– dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI-Fermentas
– DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth
– EDTA ( $\text{Na}_2$ EDTA • $2\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth
– EGTA ( $\text{Na}_4$ EGTA)	Sigma-Aldrich
– Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )	Carl Roth
– Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	Carl Roth
– Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich
– FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco BRL
– Ficoll	Amersham Pharmacia
– Gelextraktionskit <i>jetsorb</i>	Genomed
– Glycerin (87%)	Carl Roth
– Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'- (3-Propansulfonsäure))	Carl Roth
– Ionomycin	Sigma-Aldrich
– Isoamylalkohol	Carl Roth
– Isopropanol (2-Propanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ )	Carl Roth
– Kaliumazetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$ )	Carl Roth
– Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
– Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich
– Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KHPO}_4$ )	Sigma-Aldrich

– Kaliumhydroxid (KOH)	Carl Roth
– Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth
– L-Glutamin	Gibco BRL
– Leupeptin Hydrochlorid	Roche Applied Science
– Magnesiumazetat (Mg(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich
– Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth
– Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O)	Carl Roth
– Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Fluka
– MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure, C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S)	Sigma-Aldrich
– MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure, C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S)	Carl Roth
– Natriumazetat (CH <sub>3</sub> COONa • 3H <sub>2</sub> O)	Merck Eurolab
– Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth
– Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O)	Merck Eurolab
– Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth
– PEG (Polyethylenglykol) 4000	NEB
– Phenol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O, mit TE äquilibriert)	Carl Roth
– Plasmid-DNA Isolationskit (Maxi)	Quiagen
– Plasmid-DNA Isolationskit (Mini)	Genomed
– PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva
– poly dI/dC	Boehringer-Ingelheim

– Protease-Inhibitor-Tabletten (complete Mini)	Roche Applied Science
– radioaktive Nukleotide ( $\gamma^{32}$ -P-ATP, $\alpha^{32}$ -P-dCTP, $\alpha^{32}$ -P-UTP)	Amersham Pharmacia
– RNase-Protektions-Analyse-Kit (RiboQuant)	BD Pharmingen
– RPMI 1640	Gibco BRL
– Rubidiumchlorid (RbCl)	Carl Roth
– Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab
– Sephadex G50	Amersham Pharmacia
– TaqDyePrimer Sequenzierungskit	Perkin Elmer
– TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth
– TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma-Aldrich
– Transfektionsreagentien (SuperFect™)	Quiagen
– Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)-1,3-Propanediol)	Carl Roth
– Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
– Trizol-Reagenz	Gibco BRL
– Trypanblau 0,1 %	Gibco BRL
– Xylencyanol	Serva
– Zeocin	InvitroGen

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Chemikalien wurden in jeweils höchstmöglichem Reinheitsgrad von den angegebenen Herstellern bezogen. Alle Lösungen wurden mit durch

Millipore-Filter gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

DNA-Extraktionslösung

Phenol	25 Teile
Chloroform	24 Teile
Isoamylalkohol	1 Teil

TAE-Puffer (Tris/Azetat/EDTA; 50 x)

Tris	242 g/l
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O (pH 8,0)	100 ml/l
konzentrierte Essigsäure	57,1 ml/l

TAE-Agarosegele (DNA-Elektrophorese)

TAE (50 x)	20 ml/l
------------	---------

Gel[%] Agarose [g/l] Auftrennung [bp]

0,5	5	1000-30000
1,0	10	500-10 000
1,4	14	200-4000

Zugabe von 0,25 ml EtBr-Stammlösung pro Liter Gellösung, zum Lösen der Agarose aufkochen (Vorsicht, Siedeverzug!)

DEPC-behandeltes ddH<sub>2</sub>O (RNase-frei, Handschuhe tragen!)

DEPC	2 ml/l
------	--------

gut vermischen und über Nacht (~16 h) unter Abzug inkubieren, autoklavieren und bei RT lagern; alle Lösungen und Puffer beim Arbeiten mit RNA in DEPC-ddH<sub>2</sub>O ansetzen



Denaturierendes PAA-Gel für RNase-Protektions-Analyse (5%-ige Gellösung)

Harnstoff	35,82 g
30%-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	12,42 ml
10 x TBE-Puffer	7,45 ml

mit ddH<sub>2</sub>O auf 74,5 ml auffüllen;

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 0,5-1 h) Zugabe von:

10% APS	450 µl
TEMED	60 µl

Protease-Inhibitoren (Stammlösungen, eingesetzte Endkonzentrationen)

Aprotinin	(Stammlösung (0,3 M): 2 mg/ml ddH <sub>2</sub> O)	0,3 µM
Leupeptin	(Stammlösung (2 mM): 1 mg/ml ddH <sub>2</sub> O)	2 µM
AEBSF	(Stammlösung (0,2 M): 50 mg/ml ddH <sub>2</sub> O)	1 mM

Extraktions-Puffer A (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, hypotonisch)

1 M HEPES/KOH (pH 7,9)	10 ml/l
1 M KCl	10 ml/l
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O (pH 8,0)	200 µl/l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	400 µl/l

Lagerung bei 4°C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer A von:  
10 µl DTT-Stammlösung (1 M), 50 µl AEBSF (0,2 M)

Extraktions-Puffer C (Kernprotein- und Zytoplasmaextrakte, Hochsalz-Extraktionspuffer)

1 M HEPES/KOH (pH 7,9)	20 ml/l
1 M KCl	400 ml/l
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O (pH 8,0)	2 ml/l
0,25 M EGTA (pH 8,0)	4 ml/l

Lagerung bei 4°C, vor Verwendung Zugabe pro 10 ml Extraktions-Puffer C von:  
10 µl DTT-Stammlösung (1 M) und 1 Tablette der *complete mini* von Roche  
oder 100 µl AEBF (0,2 M), 10 µl Leupeptin (2 mM), 10 µl Aprotinin (0,3 M)

Bindungspuffer für EMSA (3 x)

1 M HEPES/KOH (pH 7,9)	3 ml/50 ml
1 M KCl	7,5 ml/50 ml
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O (pH 8,0)	300 µl/50 ml
1 M DTT	150 µl/50 ml
Ficoll	6 g/50 ml

Aliquote bei -20°C lagern, vor Verwendung auf Eis auftauen

PAA-Gel für Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden (12%-ige Gellösung)

ddH <sub>2</sub> O	30 ml
30%-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	18 ml
10 x TBE-Puffer	2 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1 h) Zugabe von:

10% APS	300 µl
TEMED	60 µl

PAA-Gel für EMSA (6%-ige Gellösung)

ddH <sub>2</sub> O	72 ml
30%-ige Acryl-Bisacrylamidlösung	20 ml
10 x TBE-Puffer	8 ml

zum Starten der Polymerisierung (Polymerisationszeit 1-3 h) Zugabe von:

10% APS	500 µl
TEMED	50 µl

Hochsalz-Elutionspuffer (PAA-Gel)

1,5 M Tris/HCl (pH 7,5)	6,7 ml/l
5 M NaCl	200 ml/l
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O (pH 8,0)	2 ml/l

Lagerung bei 4°C

RF1-Puffer (Herstellung kompetenter Bakterien)

Kaliumazetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> )	2,9 g/l
RbCl	12,1 g/l
MnCl <sub>2</sub>	6,3 g/l
1 M CaCl <sub>2</sub>	10 ml/l
Glyzerin (87%)	150 ml/l

pH-Wert mit 0,2 N Essigsäure auf 5,8 einstellen, steril filtrieren

RF2-Puffer (Herstellung kompetenter Bakterien)

RbCl	1,2 g/l
MOPS	2,1 g/l
1 M CaCl <sub>2</sub>	75 ml/l
Glyzerin (87%)	150 ml/l

pH-Wert mit 0,2 M NaOH auf 6,8 einstellen, steril filtrieren

Harvesting-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	1,7 ml/50 ml
1 M MES	2,5 ml/50 ml
Triton X-100	50 µl/50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von 50 µl DTT-Stammlösung (1 M)

Assay-Puffer für Luziferase-Assay

1,5 M Tris/HCl (pH 7,8)	4,17 ml/50 ml
1 M MES	6,25 ml/50 ml
1 M Mg(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	1,25 ml/50 ml

frisch herstellen und vor Verwendung Zugabe von ATP (Spatelspitze)

Luziferin-Lösung für Luziferase-Assay

Luziferin	28 ml/100 ml
1 M KHPO <sub>4</sub> (pH 7,8)	0,5 ml/100 ml

Aliquots bei -20°C lagern

2.1.3 Enzyme

Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden, meist 10fach konzentrierten Reaktionspuffern bei den angegebenen Herstellern bezogen und, wenn nicht anders angegeben, nach den Hersteller-Protokollen verwendet.

- Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas, NEB
- Klenow-Fragment	MBI-Fermentas
- T4 DNA-Ligase	MBI-Fermentas
- T4 Polynukleotid-Kinase (PNK)	MBI-Fermentas
- CIAP ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )	MBI-Fermentas
- SAWADY Pwo-DNA-Polymerase	Peqlab
- Proteinase K	Sigma-Aldrich
- RNase (Ribonuklease) Typ I-A	Sigma-Aldrich

#### 2.1.4 Primer und Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide und Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und lyophilisiert zugesandt. Die Aufnahme erfolgte in ddH<sub>2</sub>O, in der Regel in einer Stock-Konzentration von 100 pmol/μl. Für die Sequenzierung wurde eine Lösung mit 10 pmol/μl eingesetzt.

Für die PCR zur Amplifizierung der jeweiligen Blimp1-Promotorfragmente wurden folgende Primer eingesetzt:

Name	Sequenz
5s-Sal(1)	5'-GATCGTCGACGATCCCTGCTGAAGGCAAAAAG-3'
5s-Bam(587)	5'-ACGTCGGATCCTGTAATTGAG-3'
3a-Bam(1168)	5'-GATCGGATCCGTCACCCAGTCCACATCCT-3'
sBL:Sal/Ksp <sub>outer</sub>	5'-TCGAGTCGACGGGTCGCAGTCGGTGG-3'
aBL:Bam/Ksp <sub>outer</sub>	3'-CCTCGCTCGGGCCGGCCTAGGAGCT-5'
sBL:Sal/Ksp <sub>inner</sub>	5'-TCGAGTCGACGGGAGGGGAAGAGTAG-3'
aBL:Bam/Ksp <sub>inner</sub>	3'-CAGACGGCCGTCCCGTCCTAGGAGCT-5'

Zur Sequenzierung der einzelnen *pTATA<sub>luc</sub>*<sup>+</sup>-Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

Name	Sequenz
Luzi-5' revers	5'-GCTCTCCAGCGGTTCCAT-3'

Für die EMSAs fanden folgende Oligonukleotide Verwendung:

Name	Sequenz
sC/EBP $\beta$ cons	5'-ATTGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'
sPu-b <sub>a</sub>	5'-TCGACAAAAGAGGAAAAATTTGTTTCATACAGAAG-3'
sPu-b <sub>B</sub>	5'-TCGACAATCTGGTGTAATAAAATTTTCCAATGTAAA-3'
BL:sNF-CE	5'-TCGACTGTTTCCCTATTTCCAAATGGTCGAAAGG-3'
BL:sNFmut	5'-TCGACTGTTTCCCTATTAGCTAATGGTCGAAAGG-3'
BL:sCEmut	5'-TCGACTGTTTCCCTATTTCCAAATCCTCGAAAGG-3'
BL:sCE1	5'-TCGAGTGTGGGTAAACATGGA-3'
BL:sCE2	5'-TCGAGGTGGGGGGAAGCCCTG-3'
BL:sCE3	5'-TCGAGGTAGGAGTGAATCAGA-3'
BL:sCE4	5'-TCGAATTGGTAAAGAAGTCTG-3'
BL:sCE5	5'-TCGA CGGAGACGCAAGAGCAG-3'

### 2.1.5 Verwendete Plasmide und konstruierte Vektoren

#### pTATA<sub>luc</sub><sup>+</sup>

Dieser eukaryontische Luziferaseexpressionsvektor<sup>126</sup> mit einer Gesamtlänge von 4643 bp bringt das luc<sup>+</sup>-Gen (170 bp-1822 bp) des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* unter die Kontrolle des tk-Promoters (3 bp-7131 bp) und enthält neben einem Splice- und Polyadenylierungssignal (1854 bp-2075 bp) zwei Polylinker (1 bp-36 bp: HindIII, SalI, BamHI, AccI, XhoI; 2078 bp-2094 bp: ClaI, XmaI, SmaI, EcoRI). Des weiteren birgt der Vektor ein  $\beta$ -Laktamasegen (3277 bp-4137 bp) zur

antimikrobiellen Selektion und ein weiteres Polyadenylierungssignal (4269 bp-4640 bp).

*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 1.2 kb SBB*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATA<sub>luc</sub>+* zwischen den Restriktionsschnittstellen SalI/BamHI das PCR-Produkt Blimp1-Promotor 1188 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren 5s-Sal(1) und 3a-Bam(1168).

*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.6 kb SB*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATA<sub>luc</sub>+* zwischen den Restriktionsschnittstelle SalI/BamHI die DNA-Sequenz Blimp1-Promotor 599 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren 5s-Sal(1) und 3a-Bam(1168), wobei das gewonnene PCR-Produkt vor der Ligation mit BamHI geschnitten wurde und nur der distale Teil zur Klonierung verwendet wurde.

*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.6 kb BB*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATA<sub>luc</sub>+* zwischen der Restriktionsschnittstelle BamHI das PCR-Produkt Blimp1-Promotor 582 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren 5s-Bam(587) und 3a-Bam(1168).

*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.3 kb KK*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATA<sub>luc</sub>+* zwischen den Restriktionsschnittstellen SalI/BamHI das PCR-Produkt Blimp1-Promotor Ksp-Fragment 294 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren sBL:Sal/Ksp<sub>outer</sub> und aBL:Bam/Ksp<sub>outer</sub>.

*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.15 kb K5'*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATA<sub>luc</sub>+* zwischen den Restriktionsschnittstellen SalI/BamHI das PCR-Produkt Blimp1-Promotor distales Ksp-Fragment 148 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren sBL:Sal/Ksp<sub>outer</sub> und aBL:Bam/Ksp<sub>inner</sub>.

### *pTATALuc+/Blimp1 0.15 kb K3'*

In diesem Konstrukt enthält der Expressionsvektor *pTATALuc+* zwischen den Restriktionsschnittstellen SalI/BamHI das PCR-Produkt Blimp1-Promotor proximales Ksp-Fragment 145 bp. Die hierbei eingesetzten Primer waren sBL:Sal/Ksp<sub>inner</sub> und. aBL:Bam/Ksp<sub>outer</sub>.

### *pTATALuc+/Blimp1 ΔKsp*

Diesem Konstrukt diente der Expressionsvektor *pTATALuc+/Blimp1 1.2 kb SBB* zur Vorlage. Mittels der Restriktionseendonuklease KspI wurde ein 277 bp Fragment aus dem proximalen Anteil des PCR-Produktes Blimp1-Promotor 1188 bp herausgeschnitten und der Vektor nach Aufreinigung über ein Agarosegel wieder ligiert.

### *pEGZ/MCS und pEGZ/MCS-HA*

Dieses von Dr. Lindemann (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) konstruierte retrovirale Expressionsplasmid erlaubt über eine interne ribosomale Bindestelle (IRES) die koordinierte Expression einer gewünschten cDNA mit einem Grünfluoreszenzprotein (EGFP). Die multiple Klonierungsstelle (MCS) setzt sich aus den EcoRI, SmaI und BamHI Restriktionsschnittstellen zusammen. Der Vektor enthält ein Zeocin-Resistenzgen sowie die retrovirale Verpackungssequenz  $\psi^{+127}$ . *pEGZ/MCS-HA* enthält zusätzlich einen Abschnitt der Information für das Protein HA (Hämagglutinin), welcher von Dr. Schulze-Lührmann (dieses Labor) in die EcoRI 2260 Schnittstelle kloniert wurde.

### *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>*

Der retrovirale Verpackungs- und Genexpressions-Vektoren *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* wurden freundlicherweise von Dr. Ingolf Berberich (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Er wurde als Derivat des Murinen Leukämie Virus (MLV) konstruiert<sup>128</sup>. Neben dem Promotor



des CMV enthält das Plasmid einen SV40-*origin of replication*, eine PolyA-Anfügestelle und ein Ampicillin-Resistenzgen.

*pHA-hNFATc1/A*

Dieses von Dr. Chuvpilo (dieses Labor) konstruierte retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die humane NFATc1-Isoform A (aa 1-716). In der PCR diente der Vektor *pRSV-NFATc1/A*<sup>122</sup> als DNA-Matrize. Die eingesetzten Primer waren hNFATc1/A ClaI U sowie hNFATc1/A SmaI L. Das ClaI/SmaI-PCR-Produkt wurde dabei zwischen die ClaI/HpaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors eingefügt.

*pHA-hNFATc1/C*

Dieses retrovirale Expressionsplasmid kodiert für die humane Isoform C des NFATc1 (aa 2-942). In der PCR diente der Vektor *pRSV-NFATc1/C*<sup>122</sup> als DNA-Matrize. Die eingesetzten Primer waren hNFATc1/C ClaI U sowie hNFATc1/C BamHI L. Das ClaI/BamHI-PCR-Produkt wurde zwischen die ClaI/BamHI-Restriktionsschnittstelle des Vektors eingefügt.

2.1.6 Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller	Klonalität
Blimp1	Kaninchen	Novocastra	polyklonal
CD3	Maus	Novocastra	monoklonal
αKaninchenCy3	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal
αMausCy5	Esel	Jackson Immunoresearch	polyklonal
C/EBPβ	Maus	Santa Cruz (sc-7962)	monoklonal
NFATc1	Maus	Alexis Biochemicals	monoklonal

### 2.1.7 Bakterien und Gewebekulturzellen

Die Bakterien wurden von Stratogene bezogen und wie unter 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben weiterbehandelt. In dem hier verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm *DH5α* wird die genetische Rekombination aufgrund einer Mutation im *recA*-Gen unterdrückt.

EL-4 T-Zellen wurden aus einem murinen, mittels 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthrazen induzierten T-Zell-Lymphom etabliert. Nach einer Phorbolster-Stimulation sezerniert diese Zelllinie, Zytokine wie IL-2, IL-3, IL-4 und IL-10, sowie den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (ATCC Nr. TIB-39).

### 2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterial

– Autoklav	Stiefenhofer
– Brutschränke	Nunc, Heraeus
– DNA-Sequenzierer 373A	Perkin Elmer
– Eismaschine	Genheimer
– Gefrierschränke (-20°C; -70°C)	Privileg, Bosch
– Gelkammern	Stratogene, Hoefer
– Geltrockner	BioRad, Hartenstein
– Heizblöcke	Hartenstein
– Kühlzentrifugen	Heraeus
– Lichtmikroskope	Olympus, Leica
– Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Brand

– Mikrozentrifugen	Eppendorf
– PCR-Maschinen	Perkin Elmer
– pH-Meter	Hartenstein
– Phospho-Imager	Molecular Dynamics
– Rotoren (JA-10, JA-14)	Beckman
– Schüttelinkubator	Hartenstein
– Scintillations-Meßgerät	Canberra Packard
– Spannungsquelle	Amersham Pharmacia Biotech
– Spektralphotometer	Amersham Pharmacia Biotech
– Sterilbank	Heraeus, Gelaire
– Stickstoff-Tanks	tec-lab
– Ultrazentrifuge	Beckman
– UV-Stimulationsgerät UVT-20M	Herolab
– Vortexer	Hartenstein
– Waage Precisa 300 MC	Sartorius, Hartenstein
– Wasserbäder	Hartenstein
– Wasser-Entsalzungsanlage (MilliQ-Plus)	Millipore
– Zählkammer (Neubauer improved)	Brand

– Reagiergefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
– Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Nunc
– 2 ml Kryotubes	Greiner bio-one
– Einmalkanülen (26G <sub>3/8</sub> ; 0,45 x 10 mm)	Hartenstein
– Einmalküvetten	Hartenstein
– Einmalspritzen (1 ml, 10 ml, 20 ml)	Hartenstein
– Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one
– Gewebekulturschalen (60 mm, 90 mm)	Falcon, Greiner bio-one
– Glaswaren	Schott
– Parafilm	Hartenstein
– Pipettenspitzen	Eppendorf
– Röntgenfilme (13 x 18 cm)	Kodak
– Sterilfilter (0,2 µM, 0,45 µM)	Schleicher & Schuell
– Whatman Papier	Hartenstein

## 2.2 Zellkultur und zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Lagerung und Kultivierung verwendeter Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Die in 2 ml-Kryotubes in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen ( $6,0 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  Einfriermedium) wurden in 37°C warmem Wasser aufgetaut, und die Zellsuspension wurde in ein mit 10 ml Kompletmedium gefülltes 15 ml Polypropylenröhrchen pipettiert. Nach der Zentrifugation (200g/8min, RT;  $g = 11,17 \text{ r x (rpm/1000)}$ ) wurden die Zellen in Kompletmedium resuspendiert, gezählt (Neubauer-Zählkammer, Trypanblau-Ausschlussmethode) und in

Gewebekulturgefäße überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank. Das komplette Zellkulturmedium wurde wachstumsabhängig alle 2 bis 4 Tage erneuert.

### 2.2.2 Induktion der EL-4 Zellen

TPA 20 ng/ml

Ionomycin 1 mM/ml

Tamoxifen 200 ng/ml

### 2.2.3 Transiente Transfektion

Zur transienten Transfektion eukaryontischer Zellen wurde das Transfektionsreagenz SuperFect™ der Firma Quiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Zwei Stunden vor der Transfektion wurden in eine 6-well Gewebekulturplatte pro Kavität 2,5 ml in Suspension wachsender Zellen ( $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ) pipettiert. Der Transfektionsansatz setzte sich aus bis zu 4 µg Plasmid-DNA in 75 µl FKS-freiem Zellkulturmedium und 6 µl Transfektionsreagenz zusammen. Nach kurzem Vortexen des Ansatzes und 5-10 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz zu den Zellen (Suspensionskultur) hinzugegeben. Nach 24-48 h Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen nach Bedarf stimuliert werden.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Auf einer SOB-Agarplatte (ohne Antibiotika) wurden Bakterien (*E.coli DH5α*) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Impföse wurde eine Kolonie der gewachsenen Bakterien in 500 ml SOB-Medium überführt. Diese Flüssigkultur wurde bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5-0,55 bei 37°C in einem Schüttler inkubiert und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden sedimentiert (250g/10 min, 4°C), vorsichtig in 40 ml RF1-Puffer resuspendiert, 15

min auf Eis inkubiert und erneut sedimentiert (250g/10 min, 4°C). Die Zellen wurden danach vorsichtig in 7 ml RF2-Puffer resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 220 µl Aliquote in 1,5 ml Eppendorf-*tubes* in einem Trockeneis/Ethanol-Bad eingefroren. Die Kompetenz der Bakterien wurde durch einen 100 µl Transformationsansatz mit 5 ng des Kontrollplasmids *pTATALuc+*, der anschließend auf eine Agarplatte (mit Ampicillin) ausgestrichen wurde, getestet. Die Transformationseffizienz ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{CFU}/\mu\text{g} = (\text{CFU Kontrollplatte}/\text{pg Plasmid}) \times (10^6 \text{ pg} / \mu\text{g}) \times \text{Verdünnungsfaktoren}$$

Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -70°C.

### 2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Zur DNA-Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien mit Vektoren transformiert. Dazu wurden 100 µl kompetente Bakterien in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis mit der einzubringenden DNA (Ligationsansatz oder vorhandenes Plasmid) vermischt und 30-45 min inkubiert. Durch Hitzeschock (90 s bei 42°C im Wasserbad) und nachfolgender Inkubation auf Eis (2 min) wurden die kompetenten Zellen gezwungen, DNA-Moleküle aufzunehmen. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB-Medium auf einem Schüttler 45-60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte entweder ein Ausplattieren dieser Bakterienkultur auf Agarplatten oder das Animpfen einer weiteren Flüssigkultur. In beiden Fällen wurde ein geeignetes Antibiotikum (z.B. Ampicillin) zur Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien verwendet.

### 2.3.3 Plasmidisolierung aus *E.coli* durch alkalische Lyse

#### 2.3.3.1 Plasmidisolierung in analytischen Mengen

Die Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA ( $\leq 12 \mu\text{g}$ ) vieler verschiedener bakterieller Klone diente meist zur Analyse neuer Plasmid-Konstrukte. Dazu wurde die Plasmid-DNA aus 1-3 ml Übernachtskultur unter Verwendung des

Minipräparations-Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien sowie anschließender Reinigung und Fällung der Plasmid-DNA. Diese kann in EB- oder TE-Puffer gelöst und weiter analysiert werden (z.B. mittels Restriktionshydrolyse, Sequenzierung).

#### 2.3.3.2 Plasmidisolierung in präparativen Mengen

Auch bei der Maxipräparation von bekannter Plasmid-DNA (100 µg bis 1 mg) wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Dazu wurden 500 µl Übernacht- oder Erhaltungskultur in 100-500 ml Antibiotika enthaltendem Medium 12-16 h bei 37°C und 220 U/min in einem Schüttler inkubiert. Zur Isolation der Plasmid-DNA wurden Protokolle und Reaktionssysteme der Firmen Qiagen verwendet. Die Bakterien wurden sedimentiert (250g/10 min, 4°C) und in 11 ml einer RNase-haltigen Lösung (S1) resuspendiert. Die Lyse der Bakterien (Denaturierung der DNA-Moleküle) erfolgte durch Zugabe von 11 ml einer stark alkalischen Lösung (S2), vorsichtigem Mischen und 5-minütiger Inkubation bei RT. Anschließend erfolgte die Neutralisation (Renaturierung der DNA) durch Zugabe von 11 ml saurer Lösung (S3). Die bakterielle DNA fiel dabei aus und wurde von der in Lösung befindlichen Plasmid-DNA durch Zentrifugation (1200g/45 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben (DEAE-Kügelchen), an welche die Plasmid-DNA unter Hochsalz-Bedingungen bindet. Verunreinigungen wurden mit 2 x 16 ml Waschpuffer entfernt, und die DNA wurde unter Niedrigsalz-Bedingungen (16 ml M2) von der Säule eluiert. Durch Zugabe von 11 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt (1200g/45 min, 18°C), das *pellet* mit 20 ml 70%-igem Ethanol gewaschen (1200g/20 min, 18°C) und anschließend 10 min bei 37°C getrocknet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 200 µl bis 1 ml EB- oder TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können je nach ihrer Größe optimal in 0,7-2,5%-igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu wurde die Agarose in Laufpuffer (1 x TAE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid) durch kurzes Aufkochen gelöst, wobei 0,75%-

ige Gele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 0,5 bis 12 kB und 2%-ige Agarose-Gele zur Auftrennung von kleineren Fragmenten (50 bp bis 2 kB) verwendet wurden. Nach dem Erhärten in einer entsprechenden Form wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in einer Elektrophorese-Kammer mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA wurde mit 1/6 Vol. *gel loading* Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei 50-100 V (20-80 mA) parallel zu DNA-Markern bekannter Größe. Präparative Gele wurden wegen der besseren Separation der einzelnen DNA-Fragmente bei 20 mA aufgetrennt. Unter UV-Bestrahlung konnte die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA anschließend dargestellt und fotografiert werden.

### 2.3.5 Reinigung von DNA aus Agarose

In einem Agarose-Gel getrennte, mit Ethidiumbromid gefärbte und unter langwelligem UV-Licht mittels einer Handlampe dargestellte DNA Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Isolation aus der Agarose erfolgte mit dem Gelextraktionskit *jetsorb* der Firma Genomed nach dem Protokoll des Herstellers. Das Schmelzen der Agarose und die Bindung der DNA an DEAE-Kügelchen erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durch 30-minütige Inkubation bei 60°C im Puffer A1 (alle 4 min gemischt). Das durch Zentrifugation entstehende *pellet* wurde vorsichtig gelöst. Die DEAE-Kügelchen wurden durch 5-minütige Inkubation bei 50°C getrocknet, und die DNA wurde anschließend in 30 µl EB-Puffer je 100 ng Gel durch 20-minütige Inkubation bei 60°C eluiert (alle 3 min gemischt). Nach Sedimentation der DEAE-Kügelchen wurde die DNA-Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Konzentration konnte im Photometer gemessen oder über eine Agarose-Gelelektrophorese im Vergleich mit einer Kontroll-DNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

### 2.3.6 Enzymatische Manipulation an DNA

#### 2.3.6.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen wurde bei der Charakterisierung von Plasmid-DNA sowie bei der Konstruktion neuer



Plasmide angewandt. Die Reaktionsbedingungen, wie Temperatur und Art des Restriktionspuffers (Salzkonzentration) sowie Zeitdauer der Reaktion, variierten dabei für das jeweilige Restriktionsenzym und bezüglich dessen, ob das Plasmid teilweise oder vollständig mit diesem Enzym geschnitten werden sollte. Die Reaktionsbedingungen wurden den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer angepasst, wobei ein typischer Reaktionsansatz mit kleinem Volumen (15 µl) folgendermaßen aussah:

10 x Reaktionspuffer	1,5 µl
in EB gelöste Plasmid-DNA (300 ng bis 1,5 µg)	1-7 µl
Restriktionsenzym (5-10 U/µl)	1 µl
mit ddH <sub>2</sub> O auf 15 µl aufgefüllt	

Dieser Ansatz wurde 1-2 h bei 37°C bzw. bei der vom Hersteller empfohlenen Reaktionstemperatur inkubiert. Für eine präparative Spaltung von über 10 µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz proportional erhöht, wobei 2 U der Restriktionsendonuklease pro 1 µg der DNA eingesetzt wurden und die Reaktionszeit auf 3-12 h verlängert wurde. Für einen partiellen Verdau wurde zum einen weniger Enzym zugegeben und zum anderen die Reaktionszeit verkürzt sowie eine niedrigere Temperatur (z.B. RT statt 37°C) gewählt. Nach der Spaltung wurde dem Ansatz 6fach *gel loading* Probenpuffer zugegeben, und die DNA-Fragmente wurden mittels eines Agarosegels getrennt.

#### 2.3.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation eines gespaltenen Vektors zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen der freien 5'-Enden mit Hilfe einer Phosphatase entfernt. Dies geschah durch eine einstündige Inkubation der gespaltenen Plasmid-DNA mit einer intestinalen alkalischen Phosphatase aus dem Kalb (CIAP, eingesetzte

Konzentration: 2 U pro 5 µg DNA) im Restriktions-Reaktionspuffer bei 37°C. Durch anschließende Inkubation (15 min bei 85°C) wurde die Phosphatase inaktiviert, und die Vektor-DNA konnte nach der Aufreinigung aus einem Agarose-Gel mit einem DNA- *insert* ligiert werden.

### 2.3.6.3 Erzeugung glatter DNA-Enden durch die Klenow-Polymerase

Nicht-kompatible, überhängende DNA-Enden, die miteinander ligiert werden sollen, können durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt werden. Die Klenow-Untereinheit der bakteriellen DNA-Polymerase I besitzt eine 3'-Exonuklease- und eine Polymeraseaktivität. Ein typischer 25 µl Reaktionsansatz zur Auffüllung überhängender DNA-Enden sah folgendermaßen aus:

gespaltene DNA	1-5 µg
10 x Klenow-Puffer	2,5 µl
Klenow-Polymerase (2 U/µl)	0,5-1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,5 µl
mit ddH <sub>2</sub> O auf 25 µl aufgefüllt	

Dieser Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach zur Inaktivierung der Polymerase 10 min auf 70°C erhitzt. Es ist in den meisten Fällen auch möglich, vorher gespaltene, überhängende DNA-Fragmente im Restriktionspuffer selbst aufzufüllen. Die Reinigung der DNA kann optional auch durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Isolation aus dem Gel erfolgen.

### 2.3.6.4 Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle

In einer Ligation wird in der Regel ein gewünschtes DNA-Fragment (*insert*) mit einem gespaltenen DNA-Trägerplasmid (Vektor) verbunden, das Vermehrung,

stabiles Aufbewahren, Expression oder auch eine Reporter-gen-Analyse ermöglicht. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 aus *E.coli* verbindet nicht nur DNA-Fragmente mit überhängenden (kohäsiven) Enden, sondern auch solche mit glatten Enden (*blunt ends*) miteinander. Um eine intermolekulare Reaktion bei größeren *inserts* (1-4 kB) zu begünstigen, sollte das molare Verhältnis zwischen dem *insert* und dem Vektor zwischen 2:1 bis 6:1 liegen. Ein typischer 30 µl Reaktionsansatz zur Ligation war:

Vektor-DNA	100 ng
<i>insert</i> -DNA (entsprechend der <i>insert</i> -Größe)	10-300 ng
10 x Ligase-Puffer	3 µl
10 mM ATP	1 µl
(bei glatten Enden) 50 % PEG 4000	3 µl
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	2 µl
mit ddH <sub>2</sub> O auf 30 µl aufgefüllt	

Nach einer 12-16 h Inkubation bei 18°C (kohäsive Enden) oder RT (glatte Enden) wurde die Ligase durch eine 10-minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert, bevor der Reaktionsansatz zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet wurde.

### 2.3.7 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine häufig eingesetzte Standardmethode, die zur Sequenzierung oder zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei der Konstruktion neuer Plasmide eingesetzt wurde. Sie basiert auf einer hitzestabilen, bakteriellen DNA-Polymerase, wobei durch eine geregelte Abfolge von Schmelz-, Hybridisierungs- und Amplifizierungs-Reaktionen

ausgehend von kurzen DNA-Oligonukleotiden, den Primern, die dazwischenliegenden DNA-Sequenzen eines *template* amplifiziert werden. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Konstruktion neuer Plasmide wurde die Pwo-Polymerase eingesetzt, die neben der 5'→3'-Polymerase- eine zusätzliche 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading activity*) aufweist. Dabei wurde die DNA-Matrize (200 ng/μl) unmittelbar vorher 5 min bei 100°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Ein typischer 50 μl Reaktionsansatz auf Eis war:

DNA- <i>template</i> (Plasmid von ~ 9 Kb)	120 ng
Primer für <i>upper</i> und <i>lower</i> DNA-Strang (100 pmol/μl)	jeweils 0,7 μl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM, Endkonz. 3-3,5 mM)	6-7 μl
10 x Puffer ohne Magnesiumsulfat	5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	4,5 μl
Pwo-Polymerase (1 U/μl)	4 μl
mit ddH <sub>2</sub> O auf 50 μl aufgefüllt	

Die DNA wurde in einem PCR-Gerät mit folgendem Programm amplifiziert, wobei die Reaktionszeiten und -temperaturen je nach Länge und GC-Gehalt der verwendeten Primer und der DNA-Matrize variierten. Die Pwo-Polymerase amplifizierte dabei bei 72°C pro Minute 500 bp DNA:

1 Zyklus	2 min	95°C
7 Zyklen	15 s	94°C (Schmelzen)
	30 s	55°C (Hybridisieren)

6 min 72°C (Amplifizieren)

28 Zyklen 20 s 94°C

40 s 65°C

6 min 72°C

1 Zyklus 7 min 72°C

∞ 4°C

### 2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen erfolgte nach der Methode von Sanger. Die verwendeten dNTPs sind je nach Nukleotid mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Mit einem spezifischen PCR-Protokoll erfolgte die Sequenzierungsreaktion, die auf einer unvollständigen Reaktion mit nur einem Primer basiert. Die Bedingungen für die auf Eis angesetzte Sequenzierungsreaktion waren:

Plasmid-DNA 5 µl

Primer (Stock: 10 mM) 2 µl

Sequenzierungs-Mix. 7 µl

PCR-Programm: 30 Zyklen mit 96°C/15 s; 52°C (oder 55°C)/15 s; 60°C/4 min

Die Sequenzierungsreaktion wurde danach auf eine G50-Sepharosesäule geladen und durch Zentrifugation (1.200g/4 min, RT) von freien Nukleotiden gereinigt. Die DNA wurde durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert und 5 min bei 50°C getrocknet.

Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden in einem PAA-Gel (6% PAA mit 8 M Harnstoff) aufgetrennt. Dabei wurden die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe eines Argonlasers angeregt und durch die Detektionseinheit des 373 DNA-Sequenzers in einen Rechner eingelesen. Mit Hilfe spezifischer Software (Sequence Navigator, DNAsis) konnten die erhaltenen Daten analysiert werden.

### 2.3.9 DNA/Protein-Bindungsstudien mittels EMSA

#### 2.3.9.1 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden einzelsträngig synthetisiert, so dass Sinn- und Gegensinn-Strang vor der radioaktiven Markierung hybridisiert werden mussten. Im Hybridisierungsansatz wurden dazu im 1,5 ml Reaktionsgefäß jeweils 80 µl der DNA-Oligonukleotide (100 pmol/µl) mit 20µl ddH<sub>2</sub>O und 20 µl 10 x O<sup>+</sup>-Puffer 5 min auf 95°C erhitzt und danach langsam wieder auf RT abgekühlt (≤1°C pro Minute). Die so entstandenen doppelsträngigen DNA-Sonden konnten anschließend radioaktiv markiert werden.

#### 2.3.9.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit <sup>32</sup>P-γ-ATP

Zur Markierung der doppelsträngigen DNA-Sonden wurde die Polynukleotidkinase (PNK) des Bakteriophagen T4 verwendet. Dieses Enzym markiert Einzel- oder Doppelstrang-DNA an endständigen 5'-Hydroxy-Gruppen, wobei überhängende 5'-Enden leichter phosphoryliert werden als zurückgesetzte oder glatte Enden. Zur radioaktiven Markierung wurde <sup>32</sup>P-γ-ATP verwendet, so dass am Ende des Protokolls eine an beiden Enden markierte, doppelsträngige DNA-Sonde vorlag. Für die Kinase-Reaktion (30-60 min, 37°C) wurde folgendes Reaktionsgemisch in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

dsDNA-Sonde (100 ng/µl) 1 µl

10 x PNK-Puffer 5 µl

$^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )	8 $\mu\text{l}$
T4-PNK (10 U/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	34 $\mu\text{l}$

### 2.3.9.3 Aufreinigung von $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Sonden

Zur Abtrennung der freien Radionukleotide und der markierten Einzelstränge wurden die PNK-Ansätze nach der Markierung mit 6 x *gel loading* Probenpuffer versetzt und auf ein 12%-iges natives PAA-Gel geladen, welches mit 0,4 x TBE-Puffer eine Stunde bei 220 V vorgelaufen war. Die Auftrennung erfolgte elektrophoretisch (3 h bei 220 V), wobei die Bromphenolblau-Bande nicht über das erste Drittel der Gellänge hinaus laufen sollte. Daraufhin wurde die obere Glasplatte vom Gel entfernt und dieses – mit einer Lage Haushaltsfolie bedeckt – auf einem Röntgenfilm exponiert. Anschließend konnte die mittels Autoradiographie identifizierte Bande mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel isoliert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden. Zur Elution der markierten, doppelsträngigen DNA-Sonde wurden die mechanisch zerteilten Gelstücke mit 200  $\mu\text{l}$  Hochsalz-Elutionspuffer über Nacht (12-16 h) auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der markierten Probe im Szintillationszähler gemessen. Die radioaktive Sonde wurde in einem Bleigefäß bei -20°C aufbewahrt und innerhalb von 3-4 Wochen im EMSA verwendet.

### 2.3.9.4 Der EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*)

Für EMSA-Studien werden üblicherweise Kernproteine aus unterschiedlich behandelten Zellen verwendet. Dazu wurden auf Eis folgende Komponenten gemischt und 15-30 min inkubiert:

Kernproteine in Puffer C	2-5 µg
3 x Bindungspuffer	4 µl
poly dI/dC (1 µg/µl)	1 µl
radioaktiv markierte DNA-Sonde	10.000-20.000 cpm
mit ddH <sub>2</sub> O auf 12 µl aufgefüllt	

Dabei kann die Menge des verwendeten unspezifischen Kompetitors (poly dI/dC) variieren. Bei sehr unterschiedlichen Proteinkonzentrationen ist außerdem darauf zu achten, dass die verwendeten Volumina mit entsprechenden Mengen Puffer C ausgeglichen werden, um identische Ionenkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen zu erreichen. Im Falle der spezifischen Competition wurde ein 10-100facher molarer Überschuss an unmarkierter DNA-Sonde im Reaktionsansatz hergestellt. Für *supershift assays* wurde 1 µl gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichtete Antikörperlösung (1 µg/µl) hinzugegeben. Zur Auftrennung wurde ein 6%-iges natives PAA-Gel verwendet. Die benutzte Stromstärke sollte bei bzw. unter 11 mA am Gel liegen. Deshalb lief das Gel in 0,4 x TBE-Laufpuffer ca. 2,5 h bei 200 V vor. Danach wurden die Geltaschen erneut gespült und 6-10 µl der zuvor inkubierten Ansätze (sowie zur Kontrolle der Laufstrecke auf einer separaten Spur 8 µl 6 x *gel loading* Probenpuffer) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte ca. 3 h bei 200 V. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier gebracht und – mit Haushaltsfolie überzogen – unter Vakuum getrocknet. Es folgte die Exponierung auf einem Röntgenfilm (1-14 d, -70°C).



### 2.3.10 RNA-Isolation aus eukaryontischen Zellen

Dieses Protokoll beruht auf der Guanidinium-Thiozyanat/sauren Phenol-Methode<sup>129</sup>. Zur Isolation von RNA aus Gewebekulturzellen (ca.  $1 \times 10^7$ ) wurden diese mit eiskaltem PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen (250g/5 min, 4°C), in 1 ml Trizol-Reagenz durch mehrfaches Pipettieren lysiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, es wurde kurz gevortext, und der Ansatz wurde weitere 3 min inkubiert. Im Anschluss an die Zentrifugation (16.000g/5 min, RT) wurde die wässrige Oberphase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA daraus durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt (16.000g/10 min, RT). Das Pellet wurde nach dem Waschen (16.000g/10 min, RT) mit 1 ml 75%-igem Ethanol 5 min bei RT getrocknet und in 10-12 µl mit DEPC behandeltem ddH<sub>2</sub>O (5 min, 60°C) gelöst. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Reinheit wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft und die RNA bei -70°C gelagert.

### 2.3.11 Die Ribonuklease-Protektions-Analyse

Diese Methode ermöglicht die quantitative Analyse spezifischer RNA-Transkripte. Dabei ist doppelsträngige RNA, die aus der Hybridisierung der isolierten Gesamt-RNA mit spezifischer, radioaktiv markierter, komplementärer mRNA hervorgeht, vor einem Abbau durch Einzelstrang-spezifischer RNasen geschützt. Nach Auftrennung der Ansätze auf einem 5%-igen denaturierendem PAA-Gel kann die geschützte RNA mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert werden. Für die RNase-Protektions-Analyse wurden das Reaktionssystem *RiboQuant* sowie das Protokoll der Firma BD PharMingen verwendet. Dabei befanden sich in sog. *template sets* mehrere unterschiedlich lange und spezifische cDNA-Fragmente, die als Matrizen für eine *in vitro* Transkription von komplementären mRNAs mit radioaktivem <sup>32</sup>P-α-UTP dienen. Für die Hybridisierungsreaktion wurden 5-10 µg der zu untersuchenden Gesamt-RNA mit der entsprechend verdünnten radioaktiven Probe nach Denaturierung (5 min, 95°C) über Nacht bei 56°C inkubiert. Die nicht hybridisierte RNA wurde anschließend durch RNase-Behandlung (45 min, 30°C)

verdaut, mit Proteinase K (20 min, 37°C) die RNase abgebaut sowie die verbleibende RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ammoniumazetat gefällt. Nach der Denaturierung im Probenpuffer (5 min, 95°C) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 5%-igen harnstoffhaltigen PAA-Gel bei ca. 30 W. Dieses Gel wurde zwischen zwei 30 cm langen Glasplatten in einem Abstand von 0,5 mm gegossen. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter Vakuum getrocknet, auf einem Röntgenfilm exponiert und gegebenenfalls die Transkription der RNA mit Hilfe des Phospho-Imagers quantifiziert.

## **2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1 Konfokale Mikroskopie**

Als Untersuchungsobjekte dienten auf Objektträgern aus Glas fixierte histologische Paraffinschnitte humaner Tonsillen, die mit freundlicher Genehmigung des Pathologischen Institutes Würzburg aus dessen Bestand entnommen wurden. In einem ersten Schritt wurde das Präparat in 10%-igem *donkey serum* inkubiert, um unspezifische antigene Epitope durch deren Bindung zu neutralisieren. Daraufhin wurden es mit den spezifischen Antikörpern  $\alpha$ Blimp1/Kaninchen und  $\alpha$ CD3/Maus in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 (die Antikörperkonzentration des Serums war unbekannt und daher wurde die geeignete Verdünnung empirisch ermittelt) für den Zeitraum von einer Stunde überschichtet und dann in einer Färbungsküvette mit 1xPBS 3x für jeweils 5 min gewaschen. Im Anschluss daran wurde der Gewebeschnitt mit den an die Fluorochrome Cy3 bzw. Cy5 gekoppelten polyklonalen Antikörpern  $\alpha$ KaninchenCy3 und  $\alpha$ MausCy5 (beide aus dem Esel) in einer Verdünnung von 1:100 für eine weitere Stunde inkubiert. Daran schlossen sich erneut drei Waschschrte mit 1xPBS für 5 min an, bevor die Präparate mit Floromount G beschickt wurden, welches das Ausbleichen der Fluorochrome verlangsamt. Abschließend wurden mit Hilfe des konfokalen Mikroskops Leica TCS SP2 und der dazugehörigen Computersoftware die unter Anregung durch die entsprechenden Wellenlängen von den Fluorochromen emittierten Lichtsignale detektiert, verrechnet und zur graphischen Darstellung gebracht. Besonderer Dank

gilt hierbei Dr. Andrusis (Pathologisches Institut der Universität Würzburg), der mich bei der Durchführung dieses Experimentes unterstützte.

#### 2.4.2 Isolierung von Kernproteinen und Zytoplasmaextrakten eukaryontischer Zellen

Nach der Zellernte (250g/5 min, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem 1xPBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis im Kühlraum, und die verwendeten Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden sedimentiert (5.200g/1 min), das *pellet* in Puffer A resuspendiert (100 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen) und 20 min inkubiert. In dieser Zeit schwellen die Zellen im hypotonen Puffer. Zur Zellyse wurde die Suspension 8-10 mal mit Hilfe einer 1 ml Einmalspritze durch eine feine Kanüle (26G<sub>3/8</sub>; 0,45 x 10 mm) gezogen. Die Abtrennung des Zytoplasmas erfolgte durch anschließende Zentrifugation (5.200g/2 min). Der Überstand (Zytoplasma) wurde in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das Sediment zweimal vorsichtig (nicht resuspendieren) mit 800 µl Puffer A gewaschen (12.000 g/30 s) und das *pellet* anschließend im einfachen Volumen des Puffers C gelöst. Zur Extraktion der Kernproteine wurden die Reaktionsgefäße 45-60 min auf einem Schüttler (2.000 U/min) inkubiert. Die Kernproteine sowie der ungereinigte Zytoplasmaextrakt wurden durch Zentrifugation (16.000g/30 min) geklärt und die jeweiligen Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentrationen des Kernprotein- bzw. Zytoplasmaextraktes wurden mittels Bradford-Reagenz photometrisch ( $\lambda$  595nm) bestimmt. Zur Langzeitlagerung wurden die Extrakte nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) bei -70°C aufbewahrt.

#### 2.4.3 Luziferase-Reportergen-Assay

Das Luziferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* dient häufig als Reportergen zur Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Typischerweise wird eine zu untersuchende Promotorsequenz vor das Luziferase-Gen in ein Plasmid kloniert. Nach der transienten Kotransfektion von Zellen mit diesem Luziferase-Plasmid und Plasmiden, die für zu untersuchende Faktoren kodieren, kann durch den Luziferase-Reportergen-Assay der transkriptionelle

Einfluss dieser Faktoren auf die Promotor-Sequenz quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen 48-72 h nach der Transfektion geerntet, in 1 ml eiskaltem 1xPBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation (5.200g/1 min, RT) wurden die Zellen durch kurzes Vortexen in 100 µl *harvesting buffer* lysiert und anschließend die Zellfragmente sedimentiert (12.000g/4 min, RT). In einer Mikrotiterplatte wurden pro Kavität zu 50 µl *assay buffer* jeweils 50 µl der geklärten Zelllysate pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit den beiden Puffern ohne Zelllysate. Die Messung der Luziferase-Werte erfolgte in einem Luminometer, wobei die Ansätze jeweils mit 100 µl 5 mM Luziferin, dem spezifischen Substrat der Luziferase, versetzt wurden. Die gemessenen Werte wurden mit den entsprechenden Proteinkonzentrationen gemäß folgender Formel abgeglichen:

$$rLA = 0,5 / \text{Prot}_{\text{konz}} \times \text{aLA}$$

### 3 Ergebnisse

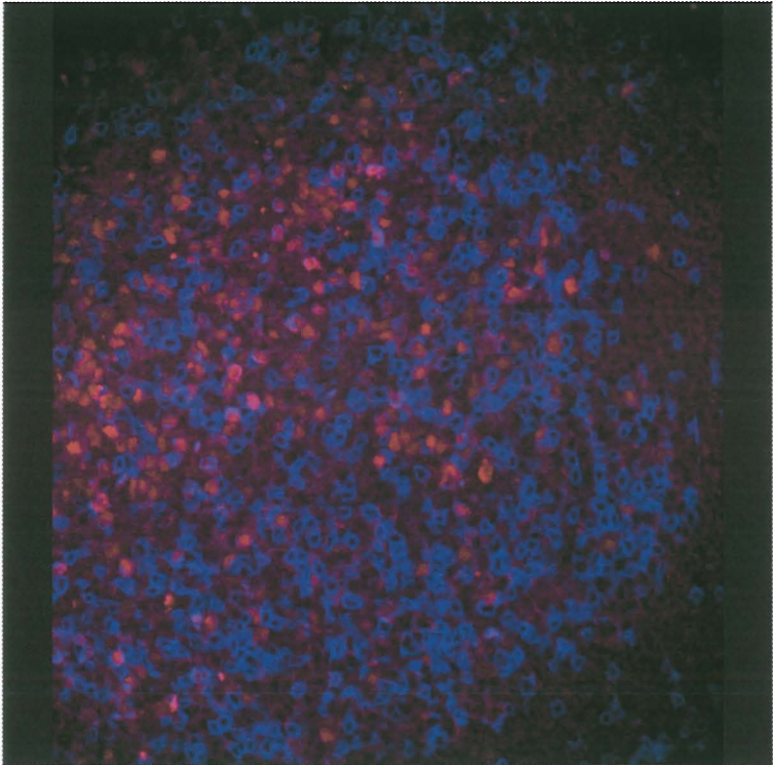
#### 3.1 Follikuläre T-Lymphozyten exprimieren PRDI-BF1

Blimp1 ist in der Lage die terminale Differenzierung hämatopoietischer Zelllinien einzuleiten. Dies wurde für die Differenzierung von myeloischen Progenitorzellen zu reifen MCs und NGCs<sup>84</sup> und für die von naiven BCs zu antikörpersezernierenden PCs<sup>82</sup> gezeigt. Deshalb waren wir daran interessiert zu untersuchen, ob Blimp1 in der zweiten großen lymphatischen Population, also in der Reihe der TCs, eine ähnliche Rolle spielt.

Um die *in vivo* Expression von PRDI-BF1, dem humanen Homolog von Blimp1, auf der Proteinebene nachzuweisen, wurde humanes lymphatisches Gewebe aus der Tonsille mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Zur Identifizierung der TCs wurde das in Paraffin eingebettete und auf einem Objektträger fixierte histologische Präparat in einem ersten Schritt mit murinem  $\alpha$ -CD3 Antikörper inkubiert. Der zum Nachweis von PRDI-BF1 eingesetzte polyklonale Antikörper  $\alpha$ -Blimp1 aus dem Kaninchen war durch Immunisierung mit einem Polypeptid, das die aa 1-350 des murinen Blimp1 und damit die N-terminale saure Aktivierungsdomäne (Exon 3, aa 71-87)<sup>82</sup> enthielt, gewonnen worden. Höchstwahrscheinlich bindet dieser Antikörper daher lediglich das transkriptionell aktive PRDI-BF1 $\alpha$ , nicht jedoch PRDI-BF1 $\beta$ , welches ohne die N-terminale saure Aktivierungsdomäne und mit einer unvollständigen PR-Domäne exprimiert wird<sup>91</sup>. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden die mit Fluorochromen vernetzten polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -MausCy5 und  $\alpha$ -KaninchenCy3, die nach entsprechender Anregung Licht blauer bzw. roter Wellenlänge emittieren, so dass das CD3 der TCs in einer blauen Zellmembranfärbung und PRDI-BF1 in einer roten Zellkernfärbung zur Darstellung kam, eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, exprimieren tatsächlich einige follikuläre TCs in humanem lymphatischem Gewebe aus der Tonsille den terminalen Differenzierungsfaktor PRDI-BF1. Ob alle follikulären TCs durch ein zeitlich begrenztes PRDI-BF1-exprimierendes Stadium laufen oder ob das Protein nur von

einer bestimmten Subpopulation synthetisiert wird und in welchem Verhältnis zueinander die beiden Isoformen PRDI-BF1 $\alpha$  bzw. PRDI-BF1 $\beta$  vorliegen, konnte anhand dieses Versuches nicht beurteilt werden.

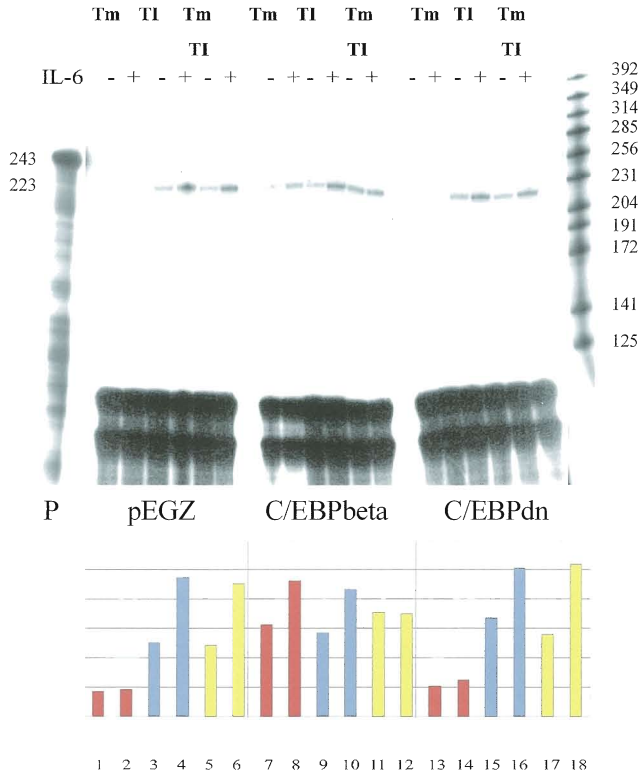


**Abbildung 3.1** Konfokale Mikroskopie eines Lymphfollikels einer humanen Tonsille. Mittels muriner  $\alpha$ -CD3 Antikörper sowie kunikulärer  $\alpha$ -Blimp1 Antikörper und mittels den mit Fluorochromen vernetzten Antikörpern  $\alpha$ -MausCy5 und  $\alpha$ -KaninchenCy3 gelangen folliculäre TCs durch eine blaue Zellmembranfärbung und der Transkriptionsfaktor PRDI-BF1 als rote Zellkernfärbung zur Darstellung. Blaue Ringe zeigen somit CD3<sup>+</sup> TCs, rote Kreise PRDI-BF1 exprimierende Zellen (folliculäre MPs, BCs) und blau umrandete rote Kreise PRDI-BF1 exprimierende folliculäre TCs an.

### 3.2 C/EBP $\beta$ induziert in EL-4 Zellen die Expression von Blimp1-mRNA

Die Expression und DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  konnten in TCs nachgewiesen werden<sup>114</sup>. Da Berberich-Siebelt *et al.* darüber hinaus zeigten, dass C/EBP $\beta$  in TCs die Expression des IL-4 Gens verstärkt, aber die von IL-2 und IFN- $\gamma$  unterdrückt, wurde angenommen, dass C/EBP $\beta$  eine Rolle in der Differenzierung der naiven T<sub>H</sub>0s zu reifen T<sub>H</sub>2s spielt<sup>115</sup>. In noch unveröffentlichten Studien dieses Labors wurde gefunden, dass C/EBP $\beta$  in TCs eine ähnliche Wirkung auf den Zellzyklus hat wie Blimp1 auf den der BCs<sup>94</sup>. Durch die Überexpression von C/EBP $\beta$  werden Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, indem C/EBP $\beta$  c-myc reprimiert und mad4 induziert. Deshalb sollte geprüft werden, ob C/EBP $\beta$  in TCs die Expression des terminalen Differenzierungsfaktors Blimp1 induziert.

Dazu wurden murine EL-4 Thymomzellen wahlweise mit den retroviralen Expressionsvektoren *pEGZ/MCS*, *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* oder *pEGZ/rCEBP $\beta$ dn-ER<sup>TM</sup>* infiziert, in denen die Expression von C/EBP $\beta$  bzw. C/EBP $\beta$ dn (dominant negativ) unter dem Einfluss eines modifizierten Östrogenrezeptors stand. Nach erfolgter Selektion mit dem Antibiotikum Zeocin, wurden die EL-4 Zellen entweder mit 4-Hydroxytamoxifen (Tm), einem synthetischen Östrogenanalogon, oder mit TPA/Ionomycin (TPA/I) – der Phorbolster TPA aktiviert die PKC und Ionomycin erhöht die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration – oder aber mit Tm+TPA/I induziert. In jeweils einem parallelen Stimulationsansatz wurden die Zellen zusätzlich noch mit IL-6 behandelt, welches – zumindest in anderen Zelllinien – das endogene C/EBP $\beta$  über den IL-6R und STAT3 oder andere *pathways*<sup>78</sup> induziert. Nach 18h Inkubationszeit wurde die gesamte zelluläre mRNA nach der sauren Phenol-Methode isoliert<sup>129</sup> und in einem RNase-Protektionsversuch auf die Expression der Blimp1-mRNA hin getestet. Neben der unbehandelten Probe, die als Marker diente, wurden die verschiedenen Ansätze der zellulären RNAs, die zuvor mit der Blimp1-Probe hybridisiert wurden, auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert (s. Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2** RNase-Protektionsversuch zur Induzierbarkeit der Blimp1-mRNA durch C/EBPβ in EL-4 Zellen.

EL-4 Zellen wurden mit *pEGZ/MCS*, *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* oder *pEGZ/rCEBPβdn-ER<sup>TM</sup>* infiziert und entweder mit 4-Hydroxytamoxifen (Tm), mit TPA/Ionomycin (TI) oder mit Tm+TI induziert und sowohl jeweils mit IL-6 (IL-6 +) bzw. ohne (IL-6 -) inkubiert.

Blimp1-mRNA wurde nicht konstitutiv exprimiert (Spuren 1+2) konnte aber unabhängig vom Transdukt mit TI induziert werden (Spuren 3+4, 9+10, 15+16). Unter Induktion mit Tm wurde die Blimp1-mRNA nur nach Infektion mit dem Tm-sensiblen *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>*, also durch C/EBPβ, induziert (Spuren 1+2, 7+8, 13+14). Die nach Induktion mit Tm+TI gesehene Resultate waren geringfügig verändert (Spuren 5+6, 11+12, 17+18). Die zusätzliche Stimulation mit IL-6 führte ohne eine Aktivierung des exogenen C/EBPβ (Spuren 2, 14) zu keiner Induktion der Blimp1-mRNA, unter Aktivierung durch TI (Spuren 4, 10, 16) bzw. Tm+TI (Spuren 6, 18) resultierte jedoch – mit Ausnahme des mit *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* transduzierten Ansatzes (Spur 12) – eine verstärkte Expression.



Im untenstehenden Kasten ist die detektierte Blimp1-mRNA graphisch für die verschiedenen Induktionsbedingungen (rot = Tm, blau = TI, gelb = Tm+TI) und relativ zueinander dargestellt.

Blimp1-mRNA wurde nicht konstitutiv in EL-4 Zellen exprimiert (Spuren 1+2), konnte aber durch TPA/I induziert werden, was die Expressionsdaten aus humanen TCs widerspiegelt. Die Blimp1-mRNA-Induktion erfolgte unabhängig davon, ob die EL-4 Zellen mit dem leeren Kontrollvektor *pEGZ/MCS* (Spuren 3+4), mit dem C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* (Spuren 9+10) oder mit dem für den dominant negativen Faktor C/EBP $\beta$ dn kodierenden Plasmid *pEGZ/rCEBP $\beta$ dn-ER<sup>TM</sup>* (Spuren 15+16) infiziert waren. Wurden die Zellen nur mit Tm, dem spezifischen Aktivator der transduzierten Konstrukte, induziert, resultierte die alleinige Aktivierung von C/EBP $\beta$  in der Expression der Blimp1-mRNA (Spuren 7+8). Im Falle des Kontrollvektors (Spuren 1+2) oder des dominant negativen C/EBP $\beta$ dn (Spuren 13+14) führte die Stimulation mit Tm zu keiner Blimp1-Induktion. Wurden die Zellen mit Tm+TPA/I stimuliert, änderte dies in den Ansätzen mit dem Leervektor (Spuren 5+6) oder mit dem dominant negativen C/EBP $\beta$ dn (Spuren 17+18) weder das Expressionsmuster noch die Expressionsrate der Blimp1-mRNA. Die mit C/EBP $\beta$  infizierten Zellen zeigten unter der Induktion Tm+TPA/I im Vergleich zur Induktion ohne Tm aber eine leicht verstärkte Expression der Blimp1-mRNA (Spur 11).

Alle Ansätze wurden zusätzlich dazu mit IL-6 stimuliert. Diese Signalgebung führte ohne eine Aktivierung des exogenen C/EBP $\beta$ , also in den Ansätzen mit dem Leervektor *pEGZ/MCS* (Spur 2) oder mit der dominant negativen Variante C/EBP $\beta$ dn (Spur 14) zu keiner Blimp1-mRNA-Expression. Allerdings konnte unter Induktion mit TPA/I für alle drei transduzierten Konstrukte eine Zunahme der Blimp1-mRNA detektiert werden (Spuren 4+10+16). Auch nach Induktion mit Tm+TPA/I zeigte sich bei gemeinsamer Stimulation mit IL-6 eine verstärkte Expression von Blimp1 in den Ansätzen, die mit *pEGZ/MCS* (Spur 6) und *pEGZ/rCEBP $\beta$ dn-ER<sup>TM</sup>* (Spur 18) infiziert waren. In dem mit *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* transduzierten Ansatz (Spur 12) jedoch war keine quantitative Zunahme der Blimp1-mRNA zu sehen.

Zusammenfassend wird durch diesen RNase-Protektionsversuch deutlich, dass die mRNA des terminalen Differenzierungsfaktors Blimp1 in TCs induzierbar ist und dass alleine die Aktivierung des transduzierten Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  ausreicht, die Blimp1-Expression in EL-4 Thymomzellen zu initiieren.

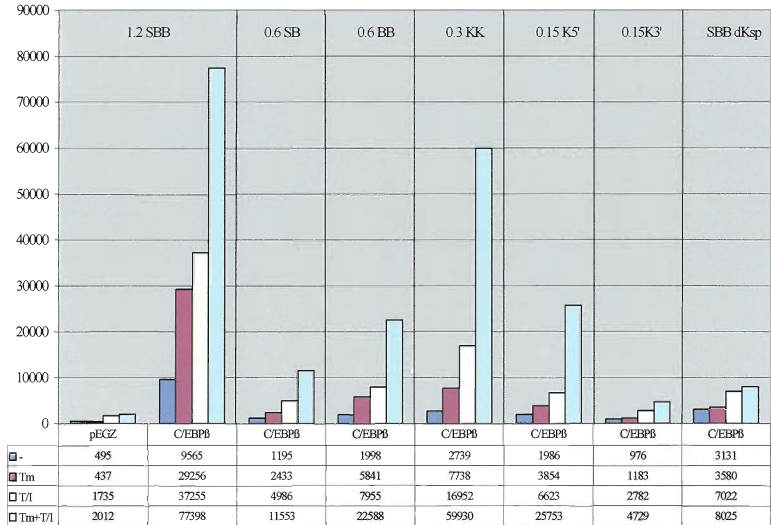
### 3.3 C/EBP $\beta$ aktiviert in transienter Transfektion den Blimp1-Promotor

Um zu bestimmen, ob die durch C/EBP $\beta$  verursachte Induktion der Blimp1-mRNA direkt über die Promotorregion vermittelt wird, wurde die gesamte bekannte Blimp1-Promotorregion<sup>79</sup> vor das Luziferasegen in das Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+* kloniert. Die Primer für das PCR-Produkt Blimp1-Promotor wurden so gewählt, dass im resultierenden DNA-Fragment 1188 bp der unmittelbar stromaufwärts des translationellen Startkodons gelegenen Sequenz – also neben den Promotorsequenzen auch die 5'UTR (*5'-untranslated region*) – des Blimp1-Gens enthalten waren. Das Konstrukt *pTATA<sub>luc</sub>+Blimp1 1.2 kb SBB* wurde daraufhin entweder mit dem Leervektor *pEGZ/MCS* als Negativkontrolle oder mit dem Expressionsvektor *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* transient in EL-4 Thymomzellen transfiziert. Die Zellen wurden uninduziert belassen oder aber mit Tamoxifen (Tm), TPA/Ionomycin (TPA/I) oder mit Tm+TPA/I induziert, nach 24 h geerntet und die relative Luziferaseaktivität (rLA) bestimmt. Die im folgenden präsentierten Daten entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei identischen Versuchen. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen, führte in Übereinstimmung mit den im vorherigen RNase-Protektionsversuch gewonnenen mRNA-Daten (s. Kapitel 3.2) die Induktion mit TPA/I zu einer, wenn auch schwachen, Steigerung der durch den Blimp1-Promotor vermittelten Luziferaseexpression. Unter dem Einfluss von C/EBP $\beta$  wurde die rLA, bezogen auf die Negativkontrolle, je nach Induktionsbedingung 19-67fach gesteigert. Uninduziert resultierte eine 19fache, mit Tm induziert eine 67fache, mit TPA/I eine 21fache und mit Tm+TPA/I eine 38fache Erhöhung des Reportersignals. Versuchsintern, also bezogen auf den uninduzierten Ansatz, ergaben sich für die Induktion mit Tm ca. 3fach, für TPA/I ca. 4fach und für Tm+TPA/I ca. 8fach erhöhte Promotoraktivitäten. Somit konnte gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  Blimp1 in transienter Transfektion über die 1188 bp der Promotorregion aktiviert.

Um den für diesen Effekt verantwortlichen Promotorbereich einzugrenzen, wurden die PCR-Produkte 0.6 kb Sall/BamHI und 0.6 kb BamHI/BamHI, welche die distalen 599 bp bzw. die proximalen 582 bp der 1188 bp Blimp1-Promotorregion enthalten, jeweils in das Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+* kloniert. Wie oben beschrieben erfolgte anschließend die transiente Transfektion der entsprechenden Konstrukte, *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.6 kb SB* bzw. *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.6 kb BB*, die Induktion und die Bestimmung der rLAs. Bezogen auf den uninduzierten Ansatz resultierten für das distale 0.6 kb Sall/BamHI-Promotorfragment ca. 2fach (T<sub>m</sub>), ca. 4fach (TPA/I) und ca. 10fach (T<sub>m</sub>+TPA/I), bzw. für das proximale 0.6 kb BamHI/BamHI-Promotorfragment ca. 3fach (T<sub>m</sub>), ca. 4fach (TPA/I) und ca. 11fach (T<sub>m</sub>+TPA/I) erhöhte rLAs. Wie beim zuvor getesteten Konstrukt wurde durch die Induktion mit T<sub>m</sub>, also letztendlich durch C/EBPβ, eine deutliche Erhöhung der rLAs erzielt. Beide Promotorbereiche waren in der Lage, dass von ihnen kontrollierte Luziferasegen zu aktivieren und beide Fragmente wurden, wie der komplette 1188 bp Blimp1-Promotorbereich, durch C/EBPβ transaktiviert.

Da die proximalen 582 bp des 0.6 kb BamHI/BamHI-Fragmentes eine stärkere Induzierbarkeit vermittelten als die distalen 599 bp des 0.6 kb Sall/BamHI-Fragmentes, wurde dieser Promotorbereich weiter auf das 294 bp KspI/KspI-Fragment eingegrenzt. Das PCR-Produkt wurde in das Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+* kloniert und das Konstrukt *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.3 kb KK* gemäß obigem Schema in transients Transfektion getestet. Bezogen auf den uninduzierten Ansatz intensivierte das 294 bp KspI/KspI-Fragment die rLAs um ca. das 3fache (T<sub>m</sub>), 6fache (TPA/I) und 22fache, so dass es wahrscheinlich wichtige regulatorische Elemente für die C/EBPβ-vermittelte Transaktivierung enthält. Deshalb wurde das entsprechende 294 bp KspI/KspI-Fragment weiter in ein distales 148 bp KspI 5'-Fragment und ein proximales 145 bp KspI 3'-Fragment aufgeteilt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden jeweils in das Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+* kloniert und *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.3 kb KK* sowie die gewonnenen Vektoren *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.15 kb K5'* und *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 0.15 kb K3'* in transients Transfektion untersucht. Das distale 148 bp KspI 5'-Fragment und das proximale

145 bp KspI 3'-Fragment erbrachten 1,9- bzw. 1,2fach (Tm), 3,3- bzw. 2,9fach (TPA/I) und 13,0- bzw. 4,8fach verstärkte rLAs.



**Abbildung 3.3** Transiente Transfektion von EL-4 Zellen mit C/EBPβ und verschiedenen *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1*-Reporterplasmiden.

Angegeben sind die relativen Luziferaseaktivitäten (rLAs) als Balkendiagramme bzw. als Zahlenwerte unter verschiedenen Induktionsbedingungen (dunkelblau = uninduziert, rot = Tamoxifen, gelb = TPA/Ionomycin, hellblau = Tm+T/I). Die Negativkontrolle wurde mit dem Leervektor *pEGZ/MCS*, alle weiteren Ansätze wurden mit dem Expressionsvektor *pEGZ+rCEBPβ-ERT<sup>TM</sup>* und verschiedenen *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1*-Reporterplasmiden (*pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1* -1.2 kb SBB, -0.6 kb SB, -0.6 kb BB, -0.3 kb KK, -0.15 kb K5', -0.15 kb K3' und -ΔKsp) transient transfiziert. C/EBPβ aktivierte das Luziferase-Reportergen am ausgeprägtesten über die 1188 bp der Blimp1-Promotorregion (Spalte 1.2 SBB). Über das proximale 582 bp- (Spalte 0.6 BB) bzw. über das distale 599 bp-Blimp1-Promotorfragment (Spalte 0.6 SB), über das 294 bp KspI/KspI-Fragment (Spalte 0.3 KK) und dessen distalen 148 bp KspI 5'- (Spalte 0.15 K5') bzw. proximalen 145 bp KspI 3'-Anteil (Spalte 0.15 K3') wurden verschiedene Zunahmen der rLAs registriert (s. Text zu 3.3).

Die transiente Transfektion mit der Deletionsmutante *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 ΔKsp* (Spalte SBB ΔKsp) resultierte im Vergleich zur kompletten Blimp1-Promotorregion (Spalte 1.2 SBB) in einer deutlich reduzierten rLA.

Es konnte somit gezeigt werden, dass der 294 bp KspI/KspI-Bereich bezogen auf die 1188 bp der Blimp1-Promotorregion eine wichtige cis-aktivierende Funktion aufweist, die sich auf die distalen 148 bp konzentriert, sich ohne die proximalen 145 bp aber nicht voll entfaltet. Für alle drei Fragmente gilt wiederum, dass sowohl die Induktion des transduzierten C/EBP $\beta$  durch Tm als auch die vom Transdukt unabhängige Induktion mit TPA/I einen deutlichen Effekt auf die rLAs hat.

Um die Bedeutung des KspI/KspI-Fragmentes weiter zu testen, wurde es abschließend aus dem Konstrukt *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1 1.2 kb SBB* deletiert und der neu entstandene Vektor *pTATA<sub>luc</sub>+/Blimp1  $\Delta$ Ksp* wurde wiederum nach dem gängigen Schema transient transfiziert, induziert und die rLAs bestimmt. Die Deletion dieser 294 bp hob die Aktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$  fast vollständig auf. Bezogen auf die intakten 1188 bp der Blimp1-Promotorregion als Positivkontrolle resultierten ca. 3fach (uninduziert), ca. 8fach (Tm), ca. 5fach (TPA/I) und ca. 10fach (Tm+TPA/I) erniedrigte rLAs. Es zeigte sich somit, dass die 294 bp des KspI/KspI-Fragments für die Transaktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$  in transienter Transfektion von Bedeutung sind.

#### **3.4 Der Blimp1-Promotor beinhaltet C/EBP-Bindungssequenzen und ein P1/Pu-b<sub>g</sub>-ähnliches NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv**

Um zu bestimmen, ob die im Luziferase-Reportergen-Assay gemessenen transaktivierenden Effekte von C/EBP $\beta$  auf einer direkten Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem Blimp1-Promotor beruhen, wurde die DNA-Sequenz der 1188 bp umfassenden Blimp1-Promotorregion und insbesondere des 294 bp enthaltenden KspI/KspI-Fragmentes, des vermeintlichen regulatorischen Abschnittes, computergestützt auf mögliche C/EBP-Bindungsmotive (PuTTGCGPyAAPy)<sup>101</sup> hin untersucht. Im proximalen 0.6 kb BamHI/BamHI-Fragment fanden sich fünf mögliche C/EBP-Bindungsmotive (C/EBP1-C/EBP5), die, bei Ausnahme von C/EBP1, im KspI/KspI-Fragment gelegen waren (s. Abbildung 3.4).

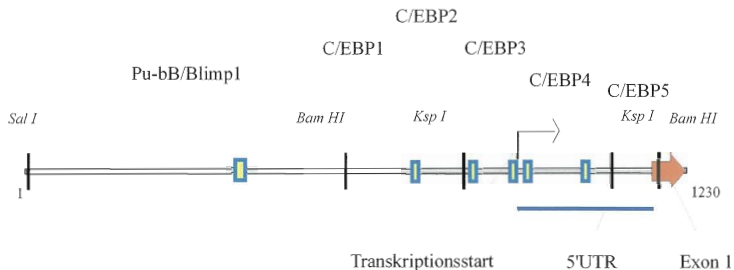
C/EBPcons	Pu	T	T	G	C	G	Py	A	A	Py
C/EBP1 (bp 711-722)	G	Tg	T	G	g	G	T	A	A	aC
C/EBP2 (bp 818-829)	G	T	g	G	g	G	gg	A	A	gC
C/EBP3 (bp 893-904)	G	T	a	G	ga	G	Tg	A	A	T
C/EBP4 (bp 917-925)	A	T	T	G	-	G	T	A	A	a
C/EBP5 (bp 1028-1039)	Gcc	Tc	T	G	C	G	T	t	-	C

**Tabelle 3.1** C/EBP-Konsensussequenz im Vergleich mit putativen C/EBP-Bindungssequenzen in der Blimp1-Promotorregion.

Des weiteren weist der Blimp1-Promotor im distalen 0.6 kb SalI/BamHI-Fragment eine der P1/Pu-b<sub>B</sub> (atcTGGTGTAATaaaATTTTCCAA) des IL-4 Promotors ähnliche Sequenz, also ein kombiniertes NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv<sup>125</sup>, auf. Allerdings sind die jeweiligen Erkennungssequenzen für NFAT und C/EBP in umgekehrter Reihenfolge angeordnet. Von Berberich-Siebelt *et al.* wurden die beiden G<sub>s</sub> des zweiten Triplets und die beiden A<sub>s</sub> des vierten Triplets für die C/EBP-Bindung an die Pu-b<sub>B</sub> des IL-4 Promotors als besonders wichtig ermittelt<sup>115</sup>.

P1/Pu-b <sub>B</sub> /IL-4: atcTGGTGTAATaaaATTTTCCAA
P1/Pu-b <sub>B</sub> /Blimp1 (bp 381-398): ATTTCCAAaTGGTcgAAa

**Tabelle 3.2** P1/Pu-b<sub>B</sub>- NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv im Vergleich mit putativem Blimp1- NFAT-C/EBP-Bindungsmotiv.



**Abbildung 3.4** Schematische Darstellung des Blimp1-Promotors, der 5'UTR und des Exon 1 mit putativen NFAT-C/EBP-Bindungsmotiven.

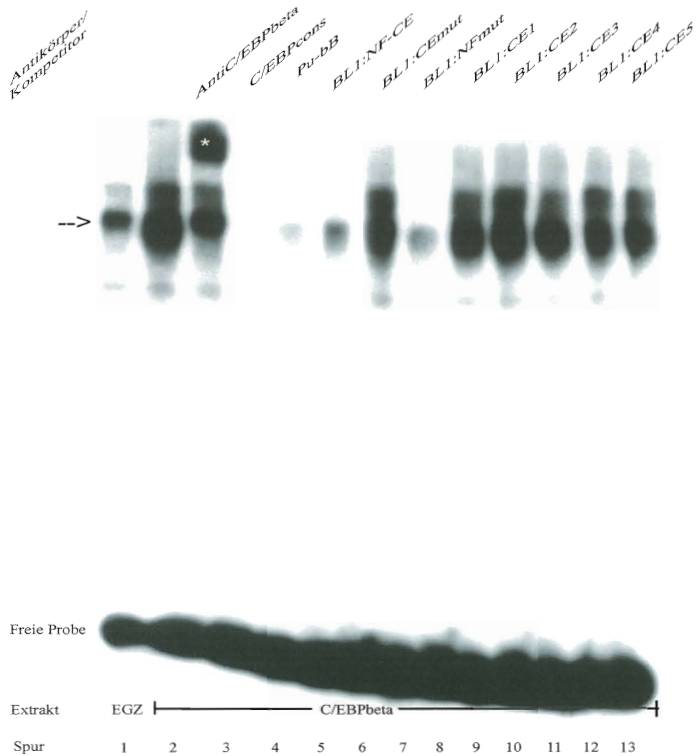
Die Abbildung zeigt den Blimp1-Promotor, die 5'-*untranslated region* (5'UTR, blaue Linie), das Exon 1 (roter, dicker Pfeil) und den Transkriptionsstart (schwarzer, dünner Pfeil) mit einer Gesamtlänge von 1230bp. Ein putatives P1/Pu-b<sub>B</sub>-NFAT-C/EBP-(Pu-bB/Blimp1) und fünf putative C/EBP $\beta$ -Bindungsmotive (C/EBP1-5) sind als blau umrandete, gelbe Kästchen entsprechend ihrer Lokalisation auf dem DNA-Strang dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen (schwarze, vertikale Linien) und die entsprechenden Restriktionsendonukleasen sind zur Orientierung abgebildet.

### 3.5 C/EBP $\beta$ und NFATc1 binden *in vitro* an den Blimp1-Promotor

Die durch Sequenzanalyse ermittelten putativen C/EBP- und NFAT-Bindungsstellen des Blimp1-Promotors wurden anschließend in DNA/Protein-Bindungsstudien, sog. EMSAs (*electrophoretic mobility shift assay*), auf ihre *in vitro* Bindung hin getestet.

In einem ersten EMSA wurde untersucht, ob C/EBP $\beta$  an die entsprechenden Blimp1-Oligonukleotide bindet (s. Abbildung 3.5). Die Probe, das radioaktiv markierte Oligonukleotid C/EBPcons, wurde als Negativkontrolle mit dem Kernproteinextrakt EL-4 EGZ (Spur 1), als Positivkontrolle mit dem Extrakt EL-4 C/EBP $\beta$  (Spur 2), und als versuchsinterne Validitätskontrolle mit dem Extrakt EL-4 C/EBP $\beta$  und dem Antikörper  $\alpha$ -C/EBP $\beta$  (Spur 3), inkubiert. Alle Kernextrakte wurden aus Zellkulturen gewonnen, die für 20 min mit Tm+TPA/I stimuliert waren. Erstaunlicherweise ließ sich schon mit dem Extrakt aus lediglich mit dem Kontrollvektor *pEGZ/MCS* transduzierten Zellen eine Bindungsaktivität an das C/EBPcons Oligonukleotid nachweisen (Spur 1). In dem Extrakt der Zellen, die mit

dem Expressionsvektor *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* retroviral transduziert waren, resultierte ein Komplex, dessen Laufverhalten geringfügig schneller war (Spur 2) als in der Negativkontrolle. Dieser C/EBPcons-C/EBPβ-Komplex konnte in seinem Laufverhalten durch den Antikörper α-C/EBPβ verlangsamt werden (Spur 3), es zeigte sich ein sogenannter *supershift*.



**Abbildung 3.5** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) zur Testung der C/EBPβ-Bindung an das NFAT-C/EBP- und die C/EBP-Motive des Blimp1-Promotors. In allen Spuren (1-13) stellt sich die freie Probe, das Oligonukleotid C/EBPcons, am unteren Bildrand dar. In Spur 1 findet als Negativkontrolle ein Kernproteinextrakt Verwendung, das aus mit



dem Leervektor *pEGZ/MCS* transduzierten EL-4 Zellen stammt. In den Spuren 2-13 wird ein aus EL-4 Zellen, die mit dem retroviralen Expressionsvektor *pEGZ/+CEBPβ-ER<sup>TM</sup>* transduziert sind und das C/EBPβ-Protein überexprimieren, gewonnenes Extrakt verwendet.

In Spur 1 resultiert eine relativ schwächere, in Spur 2 (Positivkontrolle) eine relativ stärkere C/EBPβ-Oligonukleotid-Bande (s. Pfeil). Nach Zugabe des Antikörpers α-C/EBPβ zeigt sich ein partieller *supershift* (Spur 3, Asteriskus), nach spezifischer Kompetition mit dem unmarkierten Oligonukleotid C/EBPcons (alle Kompetitoren sind in 50fachem molarem Überschuss zugesetzt) ein totales Verschwinden der C/EBPβ-Bande (Spur 4). Die folgenden Kompetitionen mit den Oligonukleotiden Pu-b<sub>B</sub> (Spur 5), Blimp1 NFAT-C/EBP (BL1:Nf-CE) (Spur 6) und Blimp1 NFATmut (BL1:Nfmut) (Spur 8) sind fast vollständig, wohingegen sowohl Blimp1 C/EBPmut (BL1:CEmut) (Spur 7) als auch Blimp1 C/EBP1-5 (BL1:CE1-5) (Spuren 9-13) nicht mit der C/EBPcons-Probe um das C/EBPβ-Protein kompetitieren.

In den folgenden Ansätzen wurde versucht, die Bindung von C/EBPβ an die radioaktive Probe mit für den Blimp1-Promotor spezifischen Oligonukleotiden (s. Tabellen 3.1 und 3.2) zu kompetitieren. Mit unmarkiertem C/EBPcons in 50fachem molarem Überschuss als Positivkontrolle wurde erwartungsgemäß eine totale Kompetition erzielt (Spur 4). Auch das Oligonukleotid Pu-b<sub>B</sub> aus dem IL-4-Promotor kompetitierte gut, wenn auch unvollständig, mit dem markierten C/EBPcons (Spur 5). Blimp1 NFAT-C/EBP, die Pu-b<sub>B</sub>-ähnliche Sequenz aus dem Blimp1-Promotor, kompetitierte deutlich um die Bindung des Transkriptionsfaktors C/EBPβ (Spur 6), allerdings nicht so stark wie die eigentliche Pu-b<sub>B</sub> (vergleiche Spur 5 mit Spur 6). Dennoch konnte mit diesen Resultaten eine indirekte Bindung von C/EBPβ an die Pu-b<sub>B</sub>-ähnliche Sequenz aus dem Blimp1 Promotor nachgewiesen werden. Blimp1 C/EBPmut, ein im C/EBP-Bindungsmotiv mutiertes Oligonukleotid, kompetitierte im Vergleich zu Blimp1 NFAT-C/EBP höchstens reduziert (Spur 7), wohingegen Blimp1 NFATmut, ein im NFAT-Bindungsmotiv mutiertes Oligonukleotid, eine zu Blimp1 NFAT-C/EBP identische Kompetition aufzeigte (Spur 8). Die Bindung von C/EBPβ an die Pu-b<sub>B</sub>-ähnliche Sequenz erfolgt somit, unabhängig vom NFAT-Bindungsmotiv, über die C/EBP-Erkennungssequenz.

Obwohl für die Aktivierung des Blimp1-Promotors in der transienten Transfektion vor allem das 294 bp KspI/KspI-Fragment von großer Bedeutung war, welches mit Ausnahme von C/EBP1 alle weiteren gefundenen C/EBP-Bindungsmotive enthält,

zeigten die entsprechenden Oligonukleotide C/EBP1-5 keine Konkurrenz mit der radioaktiven Sonde C/EBPcons um das C/EBP $\beta$ -Protein (Spuren 9-13). Diese Promotorbereiche sind also nicht in der Lage, den Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  direkt zu binden.

In einem weiteren EMSA wurden die Bindungseigenschaften der Pu-b<sub>B</sub>-ähnlichen, kombinierten NFAT-C/EBP-Bindungsstelle, Blimp1 NFAT-C/EBP, genauer untersucht (s. Abbildung 3.6). Der EMSA war zu diesem Zweck dreigeteilt. Im ersten Teil (Spuren 1-5) wurden die wichtigsten Ergebnisse bez. der C/EBP $\beta$ -Bindung an das Oligonukleotid C/EBPcons reproduziert; im zweiten Teil (Spuren 6-10) wurden die NFATc1-Bindungseigenschaften an das Oligonukleotid Pu-b<sub>d</sub>, den Prototypen der NFAT-Konsensussequenz aus dem IL-2-Promotor, getestet. Im dritten Teil schließlich (Spuren 11-17) wurde das Oligonukleotid Blimp1 NFAT-C/EBP direkt untersucht, wobei die Resultate aus den vorausgegangenen Teilen als Referenz dienten. Die verwendeten Kernextrakte EL-4 EGZ und EL-4 C/EBP $\beta$  wurden aus Zellkulturen gewonnen, die für 20 min mit Tm+TPA/I stimuliert worden waren.

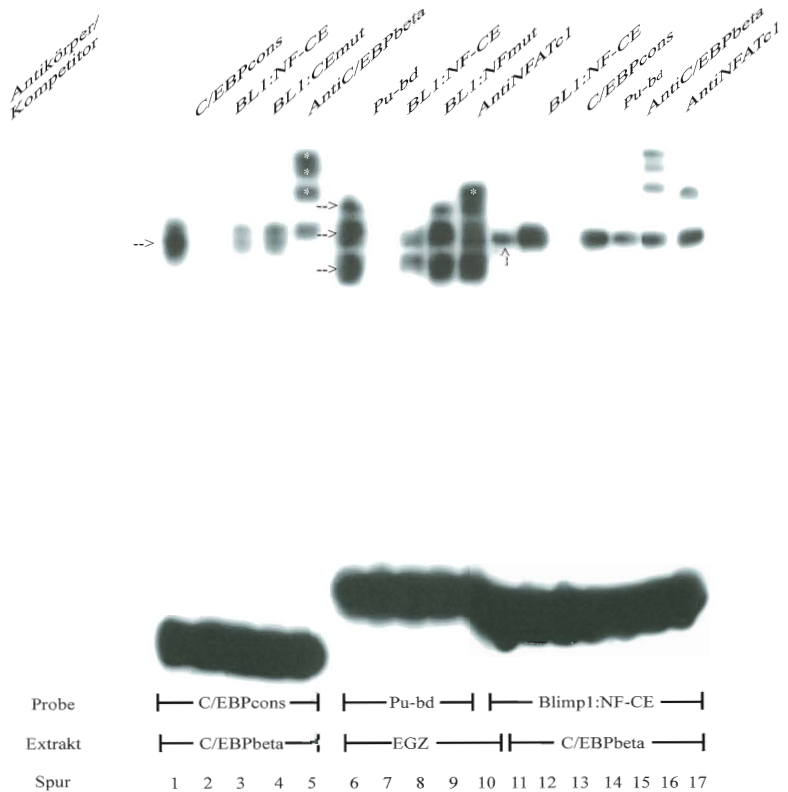
In Spur 1 ist ein EMSA mit der Sonde C/EBPcons und dem Kernextrakt aus EL-4 Zellen zu sehen, in denen C/EBP $\beta$  retroviral überexprimiert wurde. Durch einen 50fachen molaren Überschuss des unmarkierten C/EBPcons-Oligonukleotids konnte diese Komplexbildung vollständig unterdrückt werden (Spur 2), nicht jedoch durch den gleichen molaren Überschuss der Oligonukleotide Blimp1 NFAT-C/EBP oder Blimp1 C/EBPmut (Spuren 3 und 4). Der *supershift* in Spur 5 mittels des Antikörpers  $\alpha$ -C/EBP $\beta$  zeigt, dass sich der Großteil des Komplexes durch die Bindung des C/EBP $\beta$ -Proteins an die C/EBPcons-Sonde rekrutiert. Dadurch wird deutlich, dass das Pu-b<sub>B</sub>-ähnliche Oligonukleotid Blimp1 NFAT-C/EBP aus dem Blimp1-Promotor deutlich besser um die Bindung von C/EBP $\beta$  an seine Konsensussequenz kompetitiert, wenn die putative C/EBP-Bindungsstelle intakt ist (vergleiche mit Abbildung 3.5).

Im zweiten Teil des PAA-Gels wurde als Positivkontrolle für die NFAT-Bindung als Sonde das Oligonukleotid Pu-b<sub>d</sub> aus dem IL-2-Promotor mit dem Extrakt EL-4

EGZ alleine (Spur 6) oder mit unmarkiertem Pu-b<sub>d</sub> als spezifischen Kompetitor (Spur 7) inkubiert. Es zeigten sich die für die NFATs im EMSA typischen drei Banden (Spur 6), die nach Competition mit Pu-b<sub>d</sub> komplett verschwanden (Spur 7). Weiterhin wurde zusätzlich mit dem zu testenden Oligonukleotiden Blimp1 NFAT-C/EBP und dem für die NFAT-Bindung mutierten Blimp1 NFATmut inkubiert. Es resultierte eine partielle Competition aller drei NFAT-Komplexe durch Blimp1 NFAT-C/EBP (Spur 8), aber ein der Positivkontrolle identisches Signal in der Competition mit Blimp1 NFATmut (Spur 9). Dem spezifischen Nachweis des NFATc1-Proteins diente der Antikörper  $\alpha$ -NFATc1, der vor allem Protein des mittleren Komplexes *supershiftete* (Spur 10). Blimp1 NFAT-C/EBP bindet also sowohl den Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  als auch NFATs und, wie für die Bindung von C/EBP $\beta$  die C/EBP-Bindungssequenz, so ist für die spezifische Bindung der NFATs die NFAT-Konsensussequenz notwendig.

Darüber hinaus wurde Blimp1 NFAT-C/EBP als radioaktive Probe direkt auf die Bindung von NFATc1 und C/EBP $\beta$  hin getestet. Mit dem Extrakt EL-4 EGZ (Spur 11) wurde ein Komplex dargestellt, der im PAA-Gel auf der Höhe der mittleren NFAT-Bande lief (vergleiche Spur 11 mit Spur 6). Vergleicht man das Laufverhalten dieser Bande mit der mittleren Bande in Spur 10, die durch den *supershift* mit dem Antikörper  $\alpha$ -NFATc1 verlangsamt wurde, so kann man spekulieren, sie enthielte die Isoform NFATc1. Mit dem Extrakt EL-4 C/EBP $\beta$ , welcher in allen weiteren Ansätzen Verwendung fand (Spuren 12-17), sahen wir einen in seinem Laufverhalten identischen, jedoch quantitativ ausgeprägteren Komplex (Spur 12). Die spezifische Competition mit Blimp1 NFAT-C/EBP im 50fachen molaren Überschuss (Spur 13) war absolut. Die Competitionen mit den C/EBP $\beta$ - bzw. NFATc1-Konsensussequenzen C/EBPcons (Spur 14) und Pu-b<sub>d</sub> (Spur 15) hingegen, welche hochaffin für die entsprechenden Proteine sind, waren lediglich partiell. Dieses Phänomen spricht dafür, dass beide Transkriptionsfaktoren an das Blimp1 NFAT-C/EBP Oligonukleotid gebunden waren und mit dem jeweils spezifischen Kompetitor C/EBPcons oder Pu-b<sub>d</sub> entweder C/EBP $\beta$  oder NFATc1 verdrängt wurden. Um die spezifische Bindung von C/EBP $\beta$  bzw. NFATc1 aufzuzeigen, wurden abschließend die Antikörper  $\alpha$ -C/EBP $\beta$  (Spur 16) bzw.  $\alpha$ -

17) zugesetzt. Beide Antikörper bewirkten einen typischen *supershift* für C/EBP $\beta$  (vergleiche Spur 16 mit Spur 5) bzw. NFATc1 (vergleiche Spur 17 mit Spur 10). Wieder blieb neben dem *supershift* eine Bande in Höhe des eigentlichen *shifts* bestehen. Es ist somit möglich, dass die Proteinfaktoren im Vergleich zu den jeweiligen Antikörpern im molaren Überschuss vorlagen, oder dass Faktoren, gegen die der jeweilige Antikörper nicht gerichtet war, weiterhin an das Oligonukleotid binden konnten.



**Abbildung 3.6** *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) zur Testung der Bindung von C/EBP $\beta$  und NFATc1 an das Blimp1 NFAT-C/EBP-Motiv.

In den Spuren 1-5 stellen sich die freie Probe C/EBPcons, in den Spuren 6-10 die freie Probe Pu-b<sub>a</sub> aus dem IL-2-Promotor und in den Spuren 11-17 die freie Probe Blimp1 NFAT-C/EBP am unteren

Bildrand dar. Die verwendeten Kernproteinextrakte stammen aus EL-4 Zellen, die entweder mit dem Leervektor *pEGZ/MCS* (Spuren 6-11) oder mit dem retroviralen Expressionsvektor *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* (Spuren 1-5 und 12-17) transduziert und so induziert waren, dass sie entweder NFATs oder C/EBPβ exprimierten.

In Spur 1 ist die C/EBPβ-CEBPcons-Bande dargestellt (Pfeil), die nach Competition (alle Kompetitoren sind in 50fachem molarem Überschuss zugesetzt) mit dem unmarkierten C/EBPcons oder Blimp1 NFAT-C/EBP (BL1:Nf-CE) verschwindet (Spur 2) bzw. deutlich reduziert ist (Spur 3). Das Oligonukleotid Blimp1 C/EBPmut (BL1:CEmut) kompetitiert im Vergleich zu Blimp1 NFAT-C/EBP weniger stark (Spur 4). In Spur 5 sieht man einen *supershift* (Asterisken) der C/EBPβ-Bande mit dem Antikörper α-C/EBPβ.

Spur 6 zeigt die für den EMSA typischen drei NFAT-Pu-b<sub>d</sub>-Banden (Pfeile), die nach Competition mit dem unmarkierten Pu-b<sub>d</sub> verschwinden (Spur 7). Blimp1 NFAT-C/EBP kompetitiert deutlich (Spur 8), das mutierte Blimp1 NFATmut (BL1:Nfmut) nicht (Spur 9). In Spur 10 ist nach Zugabe des Antikörpers α-NFATc1 ein *supershift* (Asteriskus) der mittleren NFAT-Bande gezeigt.

Spur 11 mit der Probe Blimp1 NFAT-C/EBP und dem Extrakt EL-4 *pEGZ/MCS* zeigt eine Bande (vertikaler Pfeil), die auf der Höhe der mittleren NFAT-Bande läuft (vergleiche Spur 11 mit 6). Spur 12 mit dem Extrakt EL-4 *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* zeigt eine Bande, die auf der gleichen Höhe läuft wie die Bande in Spur 11, aber stärker ausgeprägt ist. Unter Competition mit dem unmarkierten Blimp1 NFAT-C/EBP (Spur 13) verschwindet diese Bande vollständig, unter Competition mit C/EBPcons (Spur 14) bzw. Pu-b<sub>d</sub> (Spur 15) wird sie reduziert. Die Zugabe von α-C/EBPβ (Spur 16) bzw. von α-NFATc1 (Spur 17) zeigen die zuvor gesehenen *supershift*-Muster (vergleiche Spur 16 mit 5 und Spur 17 mit 10) bei jeweils reduzierter Blimp1 NFAT-C/EBP/ C/EBPβ+NFATc1-Bande.

Es konnte somit gezeigt werden, dass an die Pu-b<sub>B</sub>-ähnlichen Sequenz des Blimp1-Promotors die Transkriptionsfaktoren NFATc1 und C/EBPβ *in vitro* binden und dass dazu deren typische Bindungsmotive notwendig sind. Ob die beiden Proteine gleichzeitig an das selbe DNA-Molekül binden oder sich antagonisieren, blieb hingegen unklar.

### **3.6 NFATc1/A und -C reduzieren in transienter Kotransfektion die Aktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBPβ**

Um zu testen, ob die Transkriptionsfaktoren C/EBPβ und NFATc1 den Blimp1-Promotor über ihre Bindung an die Pu-b<sub>B</sub>-ähnliche Sequenz additiv oder vielleicht sogar synergistisch transaktivieren oder ob die in transienter Transfektion gesehene Aktivierung durch C/EBPβ im Beisein von NFATc1 wie im IL-4-Promotor reduziert wird, wurden erneut EL-4 Thymomzellen mit dem Reporterplasmid

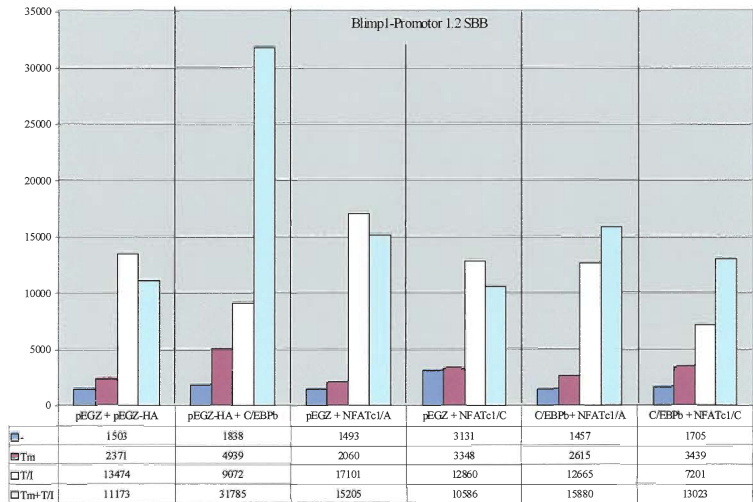
*pTATA<sub>luc</sub>+Blimp1 1.2 kb SBB* und verschiedenen Kontrollplasmiden bzw. NFAT-Expressionsvektoren kotransfiziert. Die Zellen wurden uninduziert belassen oder aber mit Tm, TPA/I, oder mit Tm+TPA/I induziert, nach 24h geerntet und die relative Luziferaseaktivität (rLA) bestimmt (s. Abbildung 3.7). Als Negativkontrolle wurde das Reporterplasmid mit den Leervektoren *pEGZ/MCS* und *pEGZ/MCS-HA* kotransfiziert, wobei die simultane Transfektion der unspezifischen Vektoren der Nivellierung eines evtl. Einflusses der verwendeten DNA-Menge auf die rLA diene. Es resultierten ca. 2fach (Tm), ca. 9fach (TPA/I) und ca. 7fach (Tm+TPA/I) erhöhte rLAs. Wie in den vorangegangenen transienten Transfektionen wurden die rLAs also erneut durch die Induktion mit TPA/I alleine gesteigert.

Als Positivkontrolle wurde der C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* zusammen mit dem Leervektor *pEGZ/MCS-HA* getestet. Bezogen auf die Negativkontrolle resultierten in der Positivkontrolle mit C/EBP $\beta$  eine ca. 1fache (uninduziert), ca. 2fache (Tm), eine ca. 1fache (TPA/I) und eine ca. 3fache (Tm+TPA/I) Verstärkung der rLA, oder versuchsintern eine ca. 3fache (Tm), ca. 5fache (TPA/I) oder ca. 17fache Steigerung der Promotoraktivität. Die oben beschriebene Transaktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$  wurde also wiederum an der Induktion durch Tm gegenüber dem uninduzierten bzw. durch Tm+TPA/I gegenüber dem durch TPA/I alleine induzierten Ansatz deutlich.

Um transaktivierende oder transreprimierende Effekte der NFATc1-Isoformen NFATc1/A bzw. NFATc1/C auf den Blimp1-Promotor zu testen, wurde das Reporterplasmid weiterhin mit dem Leervektor *pEGZ/MCS* und jeweils einem NFATc1-Expressionsvektor, nämlich *pHA-hNFATc1/A* bzw. *pHA-hNFATc1/C*, kotransfiziert. Für NFATc1/A und NFATc1/C konnte, bezogen auf die Negativkontrolle, keine nennenswerte Steigerung der rLAs gemessen werden. Beide NFATc1-Isoformen waren also nicht in der Lage, die Expression des Luziferasegens über den Blimp1-Promotor signifikant zu beeinflussen.

Um mögliche funktionelle Wechselwirkungen zwischen C/EBP $\beta$  und den NFATc1-Isoformen zu untersuchen, wurde das Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+Blimp1 1.2 kb*

SBB mit den Expressionsvektoren *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* und *pHA-hNFATc1/A* bzw. *pHA-hNFATc1/C* kotransfiziert.



**Abbildung 3.7** Transiente Kotransfektion von EL-4 Zellen mit C/EBPβ und/oder NFATc1/A bzw. -/C und dem Reporterplasmid *pTATA<sub>luc</sub>+Blimp1 1.2 kb SBB*.

Angegeben sind die relativen Luziferaseaktivitäten (rLAs) als Balkendiagramme bzw. als Zahlenwerte unter verschiedenen Induktionsbedingungen (dunkelblau = uninduziert, rot = Tamoxifen, gelb = TPA/Ionomycin, hellblau = Tm+T/I). Als Negativkontrolle wurden die Leervektoren *pEGZ/MCS* und *pEGZ/MCS-HA* kotransfiziert, alle weiteren Ansätze wurden, wenn ein Ausgleich der eingesetzten DNA-Menge notwendig war, mit einem der beiden Leervektoren und mit den Expressionsvektoren *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* und/oder *pHA-hNFATc1/A* bzw. *pHA-hNFATc1/C* kotransfiziert.

Bezogen auf die Negativkontrolle resultierte die Positivkontrolle mit *pEGZ/MCS-HA* und *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* insbesondere unter Stimulation mit dem C/EBPβ-Konstrukt-spezifischen Induktor Tm in einer deutlichen Aktivierung des Blimp1-Promotors.

Für die Transfektionen von *pEGZ/MCS* und *pHA-hNFATc1/A* bzw. *pHA-hNFATc1/C* konnten, bezogen auf die Negativkontrolle, keine nennenswerten Steigerungen der rLAs gemessen werden.

In transienter Kotransfektion von *pEGZ/rCEBPβ-ER<sup>TM</sup>* und *pHA-hNFATc1/A* bzw. *pHA-hNFATc1/C* wurde die in der Positivkontrolle gesehene Aktivierung deutlich reduziert.

Bezogen auf die Negativkontrolle sah man für C/EBP $\beta$  und NFATc1/A und -/C keine gesteigerten Promotoraktivitäten mehr, denn relativierte man die jeweiligen rLAs mit der Positivkontrolle, also der gemessenen Transaktivierung durch C/EBP $\beta$  alleine, wurde die Reduktion der Transaktivierung durch die NFATc1-Isoformen deutlich. NFATc1/A reduzierte die rLA 1,3fach (uninduziert), 1,9fach (Tm), 0,7fach (TPA/I) und 2,0fach (Tm+TPA/I) und NFATc1/C erbrachte eine 1,0fach (uninduziert), 1,4fach (Tm), 1,3fach (TPA/I) und 2,4fach (TPA/I) verminderte rLA.

Die Ergebnisse dieser transienten Transfektionen zeigen, dass die Transaktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$  in Kotransfektion mit den Transkriptionsfaktors NFATc1/A und NFATc1/C stark reduziert wird. Die NFATc1-Isoformen selbst weisen keinen transaktivierenden oder transreprimierenden Effekt auf.



## 4 Diskussion

Das murine Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein*)<sup>79,80</sup> oder sein humanes Homolog PRDI-BF1 (*positive regulatory domain I binding factor 1*)<sup>81</sup> wurden ursprünglich als zinkfingerhaltige Transkriptionsfaktoren beschrieben, die ausschließlich während der terminalen Differenzierung der B-Lymphozyten (BCs) zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (PCs) exprimiert werden<sup>82,85,92</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Blimp1 die Expression einer Vielzahl von Genen<sup>93</sup> sowohl durch die direkte sequenzspezifische Bindung an deren Promotoren<sup>97</sup> als auch durch das Rekrutieren transkriptioneller Korepressoren der Groucho-Familie<sup>98</sup> und verschiedener Histondeacetylasen (HDACs)<sup>99</sup> über epigenetische Modifikationen supprimiert. Inzwischen ist ein weitaus komplexeres Expressionsmuster bezüglich der verschiedenen Zellarten und bezüglich der möglichen Expressionszeitpunkte bekannt. Denn neben der Expression in den BCs findet man Blimp1 in den Zellen der myeloischen Reihe<sup>84</sup> und während der Embryonalentwicklung sogar in einer Vielzahl von murinen Organanlagen<sup>130</sup>. Weiterhin wurden verschiedene Isoformen, wie das transkriptionell aktive PRDI-BF1 $\alpha$  und die dominant negative Variante PRDI-BF1 $\beta$ , beschrieben<sup>91</sup>. Im Zuge unserer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der terminale Differenzierungsfaktor PRDI-BF1 darüber hinaus in humanen folliculären T-Lymphozyten (TCs) exprimiert wird. Da das Protein in unseren Schnittbildern nicht in allen CD3<sup>+</sup> TCs nachzuweisen war, stellt sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor nur von einer bestimmten Subpopulation synthetisiert wird oder ob alle folliculären TCs durch ein zeitlich begrenztes PRDI-BF1 exprimierendes Stadium laufen.

Aus hämatopoietischen pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich sowohl naive antigenpräsentierende Zellen (APCs)<sup>2</sup> als auch naive BCs<sup>12</sup> und TCs<sup>19</sup>, welche in die Peripherie auswandern und sich in den entsprechenden Zonen der Epithelien und des sekundären lymphatischen Gewebes organisieren<sup>2,14</sup>. Werden sie über ihre Antigenrezeptoren, also die *toll-like*-Rezeptoren (TLRs)<sup>6,7</sup>, den B-Zell-Rezeptor (BCR)<sup>12,20</sup> oder den T-Zell-Rezeptor (TCR)<sup>20,21</sup> aktiviert,

treten sie erneut in den Zellzyklus ein, proliferieren initial in der sogenannten klonalen Expansion und differenzieren anschließend zu reifen Effektorzellen<sup>2,15,16,33,34</sup>. Nachdem sie ihre immunologische Funktion ausgeübt haben, gehen die meisten Zellen in die Apoptose und halten damit den Leukozytenpool konstant<sup>2</sup>. Diesem Gesamtverhalten liegen Modifikationen der Genexpression zugrunde. Sowohl in Monozyten (MCs) oder Makrophagen (MPs)<sup>84</sup> als auch in BCs<sup>85</sup> wird der terminale Differenzierungsfaktor Blimp1 funktionell mit einer niedrigen Proliferationsrate und mit einem hohen Grad an Zelldifferenzierung und Apoptose in Zusammenhang gebracht<sup>99,128</sup>. Die Differenzierung der naiven TCs resultiert in T-Effektor- (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TCs)<sup>50</sup> oder T-Gedächtniszellen (T<sub>Mem</sub>)<sup>131</sup> (CD45RO), und da letztere nach einer adaptiven Immunantwort persistieren und einen protektiven antigenspezifischen Zellpool bilden, nimmt man an, dass sie in ihrer hoch differenzierten Form ebenfalls ohne eine merkliche Proliferation überdauern. In Analogie zur Differenzierung der BCs und MCs/MPs lässt sich also vermuten, dass Blimp1 in die Reifung der T<sub>Mem</sub> involviert ist und interessanterweise konnte Dr. Berberich-Siebelt in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Schimpl (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) eine im Vergleich zum naiven Phänotyp deutlich höhere Blimp1-Expression in T<sub>Mem</sub> zeigen, wobei die Expressionsrate der CD4<sup>+</sup> T<sub>Mem</sub> diejenige der CD8<sup>+</sup> T<sub>Mem</sub> noch übertraf [persönliche Mitteilung].

CD4<sup>+</sup> TCs differenzieren zu verschiedenen Untergruppen, T<sub>H</sub>1s, T<sub>H</sub>2s<sup>50</sup> und regulatorischen TCs (T<sub>Reg</sub>), CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>-Zellen<sup>132</sup>. Interessanterweise haben CD4<sup>+</sup> TCs, die unter T<sub>H</sub>2-induzierenden Bedingungen kultiviert wurden, eine höhere Blimp1-Expression als die naiven CD4<sup>+</sup> TCs oder T<sub>H</sub>1s (Berberich-Siebelt, unveröffentlichte Daten). Des weiteren zeigte die Arbeitsgruppe Prof. Schimpl, das Blimp1 besonders in T<sub>Reg</sub>-Zellen exprimiert wird. Bei den durch konfokale Mikroskopie dargestellten CD3<sup>+</sup> PRDI-BF1 exprimierenden Zellen könnte es sich also um CD4<sup>+</sup> TCs, die sich im Zuge einer T<sub>H</sub>2-dominierten adaptiven Immunantwort in den Sekundärfollikeln der entsprechenden lymphatischen Organe differenzieren, bzw. um T<sub>Reg</sub> handeln. Um dieser Hypothese nachzugehen, wäre eine systematische Untersuchung verschiedener lymphatischer Gewebetypen mit

Antikörpern gegen CD8, CD4, CD25 und gegen die verschiedenen CD45-Isoformen CD45RA oder CD45RO, anhand derer naive TCs von  $T_{Mem}$  unterschieden werden<sup>133</sup>, mittels konfokaler Mikroskopie hilfreich. Die Unterscheidung zwischen  $T_{H1}$ s und  $T_{H2}$ s müsste anhand des Zytokinmusters durch intrazelluläre Färbung für IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 erfolgen. Dennoch gehen wir deduktiv davon aus, dass es sich bei den in der konfokalen Mikroskopie dargestellten folliculären TCs um genau die durch unsere anderen Versuche ermittelten Subtypen Blimp1-exprimierender TCs handelt.

Turner *et al.* zeigten für die BCL<sub>1</sub>-Zelllinie, dass nach Stimulation mit IL-2 und IL-5 bereits nach einer Stunde eine initiale Zunahme der Blimp1-mRNA um das 5fache zu sehen ist, die auch unter Behandlung mit Anisomycin, einem Proteinsynthese-Inhibitor, unverändert stark bleibt. Nach dieser initialen Induktion kommt es zu einem Abfall der mRNA-Konzentration, bevor diese mit einem Maximum bei 48 Stunden wieder zunimmt, wobei die 5.7 kb lange mRNA-Isoform dominiert. Wird die Stimulation unterbrochen, dann fällt die Blimp1-mRNA zu jedem Zeitpunkt wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück<sup>82</sup>. Hinsichtlich der Blimp1-Expressionskinetik in TCs gibt es im Moment nur ungenügende Erkenntnisse, so dass die Möglichkeit einer zeitweiligen Expression in verschiedenen Subpopulationen nicht ausgeschlossen werden kann. Durch den unter 3.2 beschriebenen RNase-Protektionsversuch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Blimp1-mRNA in EL-4 Thymomzellen nicht konstitutiv exprimiert, sondern erst nach entsprechendem Stimulus induziert wurde. So waren der Phorbolster TPA zusammen mit Ionomycin (TPA/I) geeignete Induktoren, und die Kostimulation mit IL-6 erhöhte die Expressionsrate weiter. Die mit dem Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  retroviral infizierten Zellen konnten alleine mit dem konstruktsspezifischen Induktor 4-Hydroxytamoxifen (Tm), welches in der Negativkontrolle ohne Effekt war, zur Expression von Blimp1-mRNA angeregt werden. Auch in diesen Ansätzen führte die Kostimulation mit IL-6, bei Ausnahme der Tm+TPA/I-Stimulation, zu einer erhöhten Expression. Die Resultate mit dem dominant negativen C/EBP $\beta$ dn waren nahezu identisch mit denen der Negativkontrolle. Detailliertere Untersuchungen zur Expressionskinetik von Blimp1

in TCs in weiteren RNase-Protektionsversuchen und Western-Blot-Analysen, insbesondere auch bezüglich der verschiedenen Isoformen, würden klären, inwieweit das differentielle Expressionsmuster der humanen follikulären TCs nicht nur auf einer für die Subtypen spezifischen, sondern auch auf einer zeitlich regulierten Expression beruht.

Hinsichtlich der potentiellen Signaltransduktionskaskaden scheinen zwei verschiedene Wege die Blimp1-Induktion zu vermitteln. Zum einen resultiert die Stimulation mit TPA und Ionomycin, die ein TCR-Signal imitiert und u.a. zur Aktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren führt<sup>32</sup>, in einer gesteigerten Blimp1-mRNA Expression. Zum anderen ist der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  selbst – zumindest bei retroviraler Überexpression – zur Induktion des Blimp1-Gens in der Lage. Auch wenn C/EBP $\beta$  im pathophysiologischen Rahmen der EL-4 Thymomzellen nur schwach nachweisbar ist, wird C/EBP $\beta$  in primären TCs sehr wohl exprimiert und zeigt gemäß Berberich-Siebelt [persönliche Mitteilung] in T<sub>H</sub>0s, T<sub>H</sub>1s und T<sub>H</sub>2s sogar das gleiche Expressionsmuster wie Blimp1. Somit scheint in primären CD4<sup>+</sup> TCs eine Beteiligung von C/EBP $\beta$  an der Induktion von Blimp1 sehr wahrscheinlich. Durch die Kostimulation mit IL-6 kann in EL-4 Zellen die Expression der Blimp1-mRNA weiter gesteigert werden, obwohl die C/EBP $\beta$ -Expression in CD4<sup>+</sup> TCs nicht, wie in anderen Zellen, durch IL-6<sup>72,73</sup> sondern durch IL-4 induziert wird [Berberich-Siebelt, persönliche Mitteilung]. Für IL-6 ist deshalb zum einen ein Effekt über den IL-6R/Ras/Raf/Mek/Erk-*pathway* denkbar, welcher in der Phosphorylierung und Aktivierung von C/EBP $\beta$  mündet<sup>77</sup>, und zum anderen könnte über den IL-6R/Jak1, Jak2, Tyk2/STAT3-*pathway* Blimp1, da es ein STAT3 *target gene* ist, direkt induziert werden. Da CD4<sup>+</sup> TCs während ihrer Differenzierung zu T<sub>H</sub>S Signale über den TCR erhalten<sup>50</sup>, ist es wahrscheinlich, dass nach Induktion der C/EBP $\beta$ -mRNA und des Proteins durch IL-4 TCR-(oder IL-6-) Signale über das G-Protein Ras zu einer Aktivierung von C/EBP $\beta$  und damit zur Induktion von Blimp1 führen.

In Zusammenarbeit mit der Fa. Boehringer-Ingelheim wurde durch dieses Labor in *microarrays* gezeigt, dass nach Transfektion des C/EBP $\beta$ -Expressionsvektors *pEGZ/rCEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup>* ca. 700 Gene durch Induktion mit Tm und damit durch

C/EBP $\beta$  transaktiviert werden. In denselben *microarrays* wurde gezeigt, dass die Infektion mit dem Leervektor *pEGZ/MCS* und die anschließende Tm-Behandlung zu keiner nennenswerten Genexpression führt, d.h. das künstliche Östrogen ist für die Zelle inert und – wichtiger noch – die C/EBP $\beta$ /Tm-vermittelten Effekte lassen sich auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  zurückführen. Der von uns verwendete C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor zeigte in den uninduzierten Ansätzen der transienten Transfektionen somit eine vernachlässigbare *leakyness*. Darüber hinaus stehen die aus den RNase-Protektionsversuchen gewonnenen Erkenntnisse, dass nämlich C/EBP $\beta$  ein Induktor der Blimp1-Expression in TCs ist, in Einklang mit den Ergebnissen der transienten Transfektionen. Zusammenfassend können diese folgendermaßen interpretiert werden. C/EBP $\beta$  transaktivierte das Blimp1-Gen über die 1188 bp des Blimp1-Promotors direkt nach Induktion durch Tm. Die 294 bp des KspI/KspI-Fragments, der Bereich des mutmaßlichen *core promoters*, waren für die gefundene Transaktivierung durch C/EBP $\beta$  von herausragender Bedeutung, da die relative Luziferaseaktivität nach der Deletion dieses Bereiches drastisch abnahm. Den distalen 148 bp kam hierbei eine größere Bedeutung zu als den proximalen 145 bp. Zum Erreichen der maximalen rLA waren neben dieser unmittelbar stromaufwärts der verschiedenen Initiatorelemente gelegen Sequenz weitere Promotorbereiche nötig. Sowohl die distalen 599 bp des 1188 bp Blimp1-Promotors als auch die proximalen 582 bp besaßen *cis*-aktivierendes Potential. Es ist denkbar, dass sich stromaufwärts des mutmaßlichen *core promoters* ein oder mehrere *upstream promoter elements* befinden, die über den *core promoter* rekrutiert werden und – vermittelt durch C/EBP $\beta$  – zur Regulation der Transkription beitragen. In welchem gesamtregulatorischen Zusammenhang das Blimp1-Gen zu sehen ist, ob es also an andere Gene gekoppelt vorliegt, über eine Locuskontrollregion, einen Insulator, umschriebene *enhancer* oder *silencer* und möglicherweise über *downstream promoter elements*<sup>134</sup> verfügt, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar.

Wider Erwarten konnte in den *electrophoretic-mobility-shift-assays* keine direkte DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  an die proximalen 582 bp des Blimp1-Promotors, also an die in transienter Transfektion für die Transaktivierung durch C/EBP $\beta$  wichtigste

Region, gezeigt werden. Die Möglichkeit, dass unzulängliche oder die falschen Sequenzmotive in den EMSAs getestet wurden, besteht natürlich, ist aber unwahrscheinlich, da alle der Konsensussequenz auch nur entfernt ähnelnden Motive getestet wurden. Allerdings waren die eingesetzten Oligonukleotide mit 17 spezifischen Nukleotiden relativ kurz, so dass unter Umständen umliegende Sequenzmotive, die für eine Bindung denkbarer Heterodimere nötig sind, vernachlässigt wurden. Da sich in der gegenwärtigen Literatur etliche Publikationen finden, in denen eine kooperative Bindung von C/EBP $\beta$  mit anderen Transkriptionsfaktoren oder sonstige Protein-Protein-Wechselwirkungen beschrieben werden, könnte das eine Erklärung sein. Die Bindung des Transkriptionsfaktors c-Myb an den Promotor des *Mim1*-Gens, welcher der Kooperation mit und der DNA-Bindung durch C/EBP $\beta$  bedarf, ist publiziert worden<sup>108,135</sup>. Deshalb wurde der *Blimp1*-Promotor computergestützt auf c-Myb-Konsensussequenzen hin untersucht. Allerdings wurden keine in Frage kommenden c-Myb-Bindungsmotive festgestellt. Ein weiterer Mechanismus der *Blimp1*-Induktion durch C/EBP $\beta$  wäre die indirekte Transaktivierung, also die Bindung von C/EBP $\beta$  an den Promotor eines anderen Transkriptionsfaktors und dessen Induktion. Dieser wiederum könnte dann den *Blimp1*-Promotor sequenzspezifisch binden und transaktivieren. Hinweise auf diese indirekte Aktivierung des *Blimp1*-Promotors durch C/EBP $\beta$  hätten Sequenzmotive bekannter Transkriptionsfaktoren geben können, doch innerhalb des *KspI/KspI*-Fragments blieb auch diese Suche ohne verwertbares Resultat. Trotzdem gehen wir davon aus, dass die stärkere Transaktivierung über den proximalen Promotorbereich indirekt ist, denn erste *ChIP-assays* (*chromatin immunoprecipitation-assays*) zeigten keine nennenswerte C/EBP $\beta$ -Bindung im proximalen Bereich des *Blimp1*-Promotors, wobei andererseits eine Aktivierung des Promotorbereiches nach C/EBP $\beta$ -Aktivierung – gemessen anhand der veränderten Histonazytylierung – zu beobachten war.

Interessant ist die Rolle der Pu-b<sub>B</sub>-ähnlichen, kombinierten NFAT-C/EBP-Bindungsstelle, *Blimp1* NFAT-C/EBP, für die im EMSA sowohl die Bindung von C/EBP $\beta$  als auch die von NFATc1 gezeigt wurde. So kann, obwohl die transaktivierende Wirkung des distalen Bereichs geringer ist, für diesen

Sequenzabschnitt eine direkte Bindung von C/EBP $\beta$  festgestellt werden. Vermutlich aber ist hier die Funktion von C/EBP $\beta$  nicht nur eine reine Transaktivierung, sondern die Integration verschiedener Signalwege, da sich die C/EBP $\beta$ -vermittelte Transaktivierung durch das Vorhandensein aktiver NFAT-Faktoren reprimieren lässt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transaktivierung des Blimp1-Promotors durch C/EBP $\beta$  in Kotransfektion mit den Transkriptionsfaktoren NFATc1/A oder NFATc1/C stark reduziert wurde. Die NFATc1-Isoformen selbst wiesen keinen transaktivierenden oder transreprimierenden Effekt auf. Ob die beiden Transkriptionsfaktoren den Promotor simultan binden, wie es für c-Myb und C/EBP $\beta$  bekannt ist<sup>135</sup>, lässt sich anhand der bloßen DNA/Protein-Bindungsstudien im EMSA nicht beurteilen. Für den IL-4-Promotor konnte gezeigt werden, dass die Kotransfektion von C/EBP $\beta$ - und NFATc2-Expressionsvektoren die Induktion des Promotors im Vergleich zu den einzelnen Transkriptionsfaktoren nicht verstärkt. Weiterhin kompetitieren C/EBP $\beta$  und NFATc2 um die Bindung an die Pu-b $\beta$  des IL-4 Promotors, bei welchem die Sequenzabschnitte der Bindungsmotive für C/EBP $\beta$  und NFAT in einem Nukleotid überlappen. Der Verlust der NFAT-Bindung an die Pu-b $\beta$ , an die ebenfalls beide Proteine binden, verhindert nicht die starke Transaktivierung durch C/EBP $\beta$ , die außerdem gegen pharmakologisch wirksame Dosen von Cyclosporin A resistent ist<sup>115</sup>. Somit sprechen auch die Befunde mit dem Blimp1-Promotor gegen eine Kooperation zwischen C/EBP $\beta$  und NFATc1 an der Pu-b $\beta$ -ähnlichen kombinierten NFAT-C/EBP-Bindungsstelle.

Abschließend stellt sich die Frage nach dem funktionellen Zusammenhang der Transkriptionsfaktoren Blimp1, C/EBP $\beta$  und NFATc1 im Rahmen der Differenzierung naiver TCs hinzu CD4<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> oder T<sub>Mem</sub>. Der terminale Differenzierungsfaktor Blimp1 induziert 30 Gene und unterdrückt die Expression von über 225 Genen<sup>93</sup>, unter ihnen durch sequenzspezifische Bindung den Transkriptionsfaktoren c-Myc<sup>94</sup>. Berberich-Siebelt zeigte in bisher unveröffentlichten Studien, dass C/EBP $\beta$ , welches in TCs die Expression des IL-4-Gens verstärkt und gleichzeitig die der IL-2- und IFN- $\gamma$ -Gene unterdrückt – also die Differenzierung der naiven TCs hinzu reifen T<sub>H</sub>2s unterstützt<sup>115</sup> –, das c-Myc-Gen

supprimiert und das Mad4-Gen induziert. Das Myc/Max/Mad-Netzwerk<sup>136</sup> wird durch C/EBP $\beta$  in seinem Gleichgewicht vom Proliferationssignal zum Zellzyklusarrest verschoben. Auch Knödel *et al.*<sup>128</sup> haben gefunden, dass Blimp1 nicht nur die Expression von c-Myc hemmt, sondern auch die von Mad4 steigert. Somit könnte die Bedeutung von C/EBP $\beta$  darin liegen, Blimp1 zu induzieren, welches dann die Proliferation der TCs beendet und die sich differenzierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> oder T<sub>Mem</sub> in die G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus versetzt, in der sie bis zum erneuten Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen überdauern. Durch unsere unveröffentlichten Versuchesergebnisse wissen wir, dass C/EBP $\beta$  die c-Myc-Expression auch direkt hemmen kann, die Blimp1-Induktion hat damit einen verstärkenden Effekt. Allerdings sind sicherlich viele der durch Blimp1 reprimierten Gene<sup>93</sup> keine *target genes* für C/EBP $\beta$ . So wurde von Knödel *et al.*<sup>128</sup> auch A1, ein Mitglied der proapoptotischen Bcl2-Familie, als Blimp1-*target* beschrieben. Damit erklärt sich die starke Apoptoseinduktion durch Blimp1. C/EBP $\beta$  selbst hat keinen direkten Einfluss auf A1. Somit scheint hinsichtlich der Positionierung der beiden Transkriptionsfaktoren im Signaltransduktionsnetzwerk eine klare Hierarchie gegeben: Blimp1 liegt *downstream* von C/EBP $\beta$  und *upstream* von A1.

Zu welchem Zeitpunkt die NFATs in Erscheinung treten, kann kontrovers diskutiert werden, denn neben der über den TCR und die entsprechenden Kostimulatoren vermittelten initialen Induktion der naiven TCs könnten sie die ruhenden CD4<sup>+</sup> T<sub>Reg</sub> oder T<sub>Mem</sub> über den TCR erneut aktivieren. Es ist zu vermuten, dass unter Bedingungen, bei denen die NFAT-Transkriptionsfaktoren nicht oder unzureichend aktiviert sind, also in einer T<sub>Reg</sub><sup>-</sup>, einer T<sub>Mem</sub><sup>-</sup> oder einer differenzierten, aber nicht restimulierten T<sub>H2</sub>-Zelle, Blimp1 – u.a. über die C/EBP $\beta$ -vermittelte Transaktivierung – exprimiert wird, die Blimp1-Expression aber nach TCR- bzw. Ca<sup>2+</sup>-Signalen über die NFAT-Aktivierung wieder abgeschaltet wird. Damit wäre eine erneute Proliferation der entsprechenden TCs bei wiederhergestellter c-Myc-Expression möglich, und die bereits differenzierten TCs könnten zu einer neuen T-Effektorzellpopulation expandieren.



In einem kürzlich publizierten *review* erörtert Smale<sup>137</sup> die Etablierung und den Erhalt der Lymphozytenidentität durch *gene silencing* und betont dabei die Bedeutung dieser negativen Regulation, zu welcher der terminale Differenzierungsfaktor Blimp1 durch das Rekrutieren transkriptioneller Korepressoren der Groucho-Familie<sup>98</sup>, verschiedener Histondeacetylasen (HDACs)<sup>99</sup> und einer spekulativen Funktion der *positive regulatory domain* als Histonmethyltransferase<sup>83</sup> in der Lage ist.

## 5 Zusammenfassung

Das murine Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein*) und sein humanes Homolog PRDI-BF1 (*positive regulatory domain 1 binding factor 1*) sind als terminale Differenzierungsfaktoren der myeloischen Reihe und der B-Lymphozyten (BCs) beschrieben worden. Über direkte sequenzspezifische Promotorbindung und epigenetische Modifikationen greifen sie größtenteils reprimierend in die Expression einer Vielzahl von Genen ein und werden dabei funktionell mit einer niedrigen Proliferationsrate und einem hohen Grad an Zelldifferenzierung und Apoptose in Zusammenhang gebracht. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Blimp1 auch in der zweiten lymphatischen Zellreihe, also in den T-Lymphozyten (TCs) und hier insbesondere in den Subtypen der T-Helfer-2-Zellen ( $CD4^+ T_H2$ ), der  $CD4^+$  T-Gedächtniszellen ( $CD4^+ T_{Mem}$ ) und der regulatorischen TCs ( $CD4^+ CD25^+ T_{Reg}$ ) exprimiert wird.

Die gefundene Blimp1-Expression ist nicht konstitutiv. Vielmehr wird das Blimp1-Gen über T-Zellrezeptorsignale – über die Proteinkinase C (PKC) und den Anstieg freier intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen – verstärkend über den Interleukin-6-Rezeptor-*pathway*, und über die Aktivität des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  (*CCAAT/enhancer-binding protein*) allein induziert.

Die Transaktivierung des TATA-boxlosen Blimp1-Promotors (ca. 1 kb) durch C/EBP $\beta$  wird stärker über dessen proximale Hälfte vermittelt, an der jedoch keine direkte Bindung des Transkriptionsfaktors nachzuweisen ist, und scheint somit indirekt zu sein. Im Gegensatz dazu bindet das C/EBP $\beta$ -Protein im schwächer transaktivierenden distalen Blimp1-Promotorbereich direkt an eine kombinierte, der P1/Pu-b<sub>B</sub>-des IL-4-Promotors ähnliche NFAT/C/EBP-Bindungssequenz. Die C/EBP-Bindungsstelle liegt hierbei in direkter Nachbarschaft zum NFAT- (*nuclear factor of activated T cells*) Bindungsmotiv. Auch NFATc1 bindet direkt, entwickelt aber kein transaktivierendes Potential sondern reprimiert vielmehr die durch C/EBP $\beta$ -vermittelte Transaktivierung.

## 8 Literaturverzeichnis

---

- 1 R. J. Gibbons, S. L. Gorbach, J. G. Bartlett & N. R. Blacklow. How microorganisms cause disease. *Infectious Diseases*. 1. Auflage, Philadelphia (Saunders, W. B.): 7-106 (1992).
- 2 C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport & M. Shlomchik. Einführung in die Immunologie und die angeborene Immunität. *Immunologie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: 1-96 (2002).
- 3 G. Rassner, U. Steinert & B. Schlagenhauff. Aufbau und Aufgaben des Hautorgans. *Dermatologie*. 6. Auflage, Urban & Fischer Verlag: 5-9 (2000).
- 4 R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein & T. Ganz. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 105-128 (1993).
- 5 M. K. Pangburn & G. D. Ross. The alternative pathway. *Immunobiology of the Complement System*. Orlando (Academic Press): 45-62 (1986).
- 6 K. Sastry & R. A. Ezekowitz. Collectins: pattern recognition molecules involved in first-line host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 5(1): 59-66 (1993).
- 7 C. A. Janeway Jr. & R. Medzhitto. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197-216 (2002).
- 8 A. Moretta, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari & L. Moretta. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 619-648 (1996).
- 9 S. Gosh, M. J. May & E. B. Kopp. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260 (1998).

- 
- 10 G. C. Sen & P. Lengyel. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J. Biol. Chem.* 267(8): 5017-5020 (1992).
- 11 S. H. Clarke & L. W. Arnold. B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig) M<sup>+</sup>B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J. Exp. Med.* 187(8): 1325-1334 (1998).
- 12 F. Melchers, E. ten Boekel, T. Seidl, X. C. Kong, T. Yamagami, K. Onishi, T. Shimizu, A. G. Rolink & J. Andersson. Repertoire selection by pre-B-cell receptors and genetic control of B-cell development from immature to mature B-cells. *Immunol. Rev.* 175: 33-46 (2000).
- 13 L. O'Rourke, R. Tooze & D. T. Fearon. Co-receptors of B lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 9(3): 324-329 (1997).
- 14 J. G. Cyster, S. B. Hartley & C. C. Goodnow. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 371(6496): 389-395 (1994).
- 15 K. Rajewski. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381(6585): 751-758 (1996).
- 16 M. J. Shlomchik, S. Litwin & M. Weigert. The influence of somatic mutation on clonal expansion. *Prog. Immunol. Proc. 7 Int. Cong. Immunol.* 7: 415-423 (1990).
- 17 J. Stavnezer. Immunoglobulin class switching. *Curr. Opin. Immunol.* 8(2): 199-205 (1996).
- 18 J. V. Ravetch. Fc receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 9(1): 121-125 (1997).

- 
- 19 H. J. Fehling, S. Gilfillan & R. Ceredig. Alpha beta / gamma delta lineage commitment in the thymus of normal and genetically manipulated mice. *Adv. Immunol.* 71: 1-76 (1999).
- 20 J. Borst, H. Jacobs & G. Brouns. Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 8(2): 181-190 (1996).
- 21 J. Lin & A. Weiss. T Cell receptor signalling. *J. Cell. Sci.* 114(Pt2): 243-244 (2001).
- 22 A. Weiss & D. R. Littmann. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76(2): 263-274 (1994).
- 23 L. J. Stern & D. C. Wiley. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2: 245-251 (1994).
- 24 I. A. York, A. L. Goldberg, X. Y. Mo & K. L. Rock. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172: 49-66 (1999).
- 25 G. F. Gao, J. Tormo, U. C. Gerth, J. A. Wyer, A. J. McMichael, D. I. Stuart, J. I. Bell, E. Y. Jones & B. Y. Jakobson. Crystal Structure of the complex between human CD8 $\alpha$  and HLA-A2. *Nature* 387(6633): 630-634 (1997).
- 26 K. J. Kleijmeer, S. Morkowski, J. M. Griffith, A. Y. Rudensky & H. J. Geuze. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell. Biol.* 139(3): 639-649 (1997).
- 27 J. Pieters. MHC class II-restricted antigen processing and presentation. *Adv. Immunol.* 75: 159-208 (2000).

- 
- 28 R. Zamoyska. CD4 and CD8: modulators of T cell receptor recognition of antigen and of immune response? *Curr. Opin. Immunol.* 10(1): 82-87 (1998).
- 29 T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin & R. L. Coffmann. Two types of murine helper T-cell clone. I. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136(7): 2348-2357 (1986).
- 30 K. A. Hogquist, A. J. Tomlinson, W. C. Kieper, M. A. McGargill, M. C. Hart, S. Naylor & S. C. Jameson. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* 6(4): 389-399 (1997).
- 31 R. M. Zinkernagel, G. N. Callahan, J. Klein & G. Dennert. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature* 271(5642): 251-253 (1978).
- 32 E. Serfling, F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik & A. Avots. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1498(1): 1-18 (2000).
- 33 A. A. Freitas & B. Rocha. Peripheral T cell survival. *Curr. Opin. Immunol.* 11(2): 152-156 (1999).
- 34 K. Schlienger, N. Craighead, K. P. Lee, B. L. Levine & C. H. June. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96(10): 3490-3498 (2000).
- 35 S. T. Smale & A. G. Fisher. Chromatin structure and gene regulation in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 427-462 (2002).
- 36 I. Dunham. The gene guessing game. *Yeast* 17(3): 218-224 (2000).

- 
- 37 E. J. Richards & S. C. R. Elgin. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108(4): 489-500 (2002).
- 38 T. Jenuwein & C. D. Allis. Translating the histone code. *Science* 293(5532): 1074-1080.
- 39 M. Jaskelioff, I. M. Gavin, C. L. Peterson & C. Logie. SWI-SNF-mediated nucleosome remodeling: role of histone octamer mobility in the persistence of the remodeled state. *Mol. Cell. Biol.* 20(9): 3058-3068 (2000).
- 40 G. J. Narlikar & H.-Y. Fan. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108(4): 475-487 (2002).
- 41 D. Reinberg, G. Orphanides, R. Ebright, S. Akoulitchev, J. Carcamo, H. Cho, P. Cortes, R. Drapkin, O. Flores, I. Ha & al. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present and future. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63: 83-103 (1998).
- 42 N. A. Woychik & M. Hampsey. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 108(4): 453-463 (2002).
- 43 P. Cramer, D. A. Bushnell, J. Fu, A. L. Gnatt, B. Maier-Davis, N. E. Thompson, R. R. Burgess, A. M. Edwards, P. R. David & R. D. Kornberg. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288(5466): 640-649 (2000).
- 44 K. Nishioka & D. Reinberg. Transcription: switching partners in a regulatory tango. *Science* 294(5551): 2497-2498 (2001).
- 45 K. Weiss. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112(4): 441-451 (2003).

- 
- 46 J. M. Matthews & M. Sunde. Zinc fingers: folds for many occasions. *IUBMB Life* 54(6): 351-355 (2002).
- 47 P. R. Hardwidge, L. J. Parkhurst & L. J. Maher 3<sup>rd</sup>. Reflections on apparent DNA bending by charge variants of bZIP proteins. *Biopolymers* 69(1): 110-117 (2003).
- 48 A. S. McLellan, K. Langlands & T. Kealey. Exhaustive identification of human class II basic helix-loop-helix proteins by virtual library screening. *Gene Expr. Patterns* 2(2-3): 329-335 (2002).
- 49 D. J. Lenschow, T. L. Walunas & J. A. Bluestone. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233-258 (1996).
- 50 K. M. Murphy & S. L. Reiner. The lineage decision of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12): 933-944 (2002).
- 51 A. K. Abbas, K. M. Murphy & A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603): 787-793 (1996).
- 52 M. L. Dustin & A. S. Shaw. Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283(5402): 645-650 (1999).
- 53 I. C. Ho & L. H. Glimcher. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109(Supp1): 109-120 (2002).
- 54 J. Magram, S. E. Connaughton, R. R. Warriar, D. M. Carvajal, C. Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. A. Faherty & M. K. Gately. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4(5): 471-481 (1996).
- 55 K. D. Liu, S. L. Gaffen & M. A. Goldsmith. JAK/STAT signalling by cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 10(3): 271-278 (1998).



- 
- 56 A. C. Mullen, F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang & S. L. Reiner. Role of T-bet in commitment of T<sub>H</sub>1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292(5523): 1907-1910 (2001).
- 57 A. C. Mullen, A. S. Hutchins, F. A. High, H. W. Lee, K. J. Sykes, L. A. Chodosh & S. L. Reiner. Hlx is induced and genetically interacts with T-bet to promote heritable T<sub>H</sub>1 gene induction. *Nat. Immunol.* 3(7): 652-658 (2002).
- 58 S. J. Szabo, A. S. Dighe, U. Gubler & K. M. Murphy. Regulation of the interleukin (IL)-12Rβ2 subunit expression in developing T helper 1 (T<sub>H</sub>1) and T<sub>H</sub>2 cells. *J. Exp. Med.* 185(5): 817-824 (1997).
- 59 J. Yang, T. L. Murphy, W. Ouyang & K. M. Murphy. Induction of interferon-γ production in T<sub>H</sub>1 CD4<sup>+</sup> T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.* 29(2): 548-555 (1999).
- 60 S. L. Peng, A. J. Gerth, A. M. Ranger & L. H. Glimcher. NFATc1 and NFATc2 together control both T- and B-cell activation and differentiation. *Immunity* 14(1): 13-20 (2001).
- 61 D. S. Robinson & A. O'Garra. Further checkpoints in T<sub>H</sub>1 development. *Immunity* 16(6): 755-758 (2002).
- 62 B. Oppmann & al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13(5): 715-725 (2002).
- 63 P. Bradding. The role of the mast cell in asthma: a reassessment. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3(1): 45-50 (2003).

- 
- 64 W. Zheng & R. A. Flavell. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for T<sub>H</sub>2 cytokine gene expression in CD4 cells. *Cell* 89(4): 587-596 (1997).
- 65 M. Kimura & al. Regulation of T<sub>H</sub>2-cell differentiation by Mel-18, a mammalian polycomb-group gene. *Immunity* 15(2): 275-287 (2001).
- 66 A. S. Hutchins, A. C. Mullen, H. W. Lee, K. J. Sykes, F. A. High, B. D. Hendrich, A. P. Bird & S. L. Reiner. Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol. Cell* 10(1): 81-91 (2002).
- 67 G. G. Loots, R. M. Locksley, C. M. Blankespoor, Z. E. Wang, W. Miller, E. M. Rubin & K. A. Frazer. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, 5 by cross-species sequence comparison. *Science* 288(5463): 136-140 (2000).
- 68 H. J. Lee, N. Takemoto, H. Kurata, Y. Kamogawa, S. Miyatake, A. O'Garra & N. Arai. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J. Exp. Med.* 192(1): 105-115 (2000).
- 69 I. C. Ho, M. R. Hodge, J. W. Rooney & L. H. Glimcher. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85(): 973-983 (1996).
- 70 M. Li-Weber & P. H. Krammer. Regulation of the IL-4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* 3(7): 534-543 (2003).
- 71 C. E. Rudd & H. Schneider. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3(7): 544-556 (2003).

- 
- 72 S. Diehl & M. Rincon. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 39(9): 531-536 (2002).
- 73 T. Hirano. Interleukin 6 and its receptor: 10 years later. *Int. Rev. Immunol.* 16(3-4): 249-284 (1998).
- 74 T. Taga, M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano & T. Kishimoto. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58(3): 573-581 (1998).
- 75 S. Akira, H. Issihiki, T. Sugita, O. Tanabe, S. Kinoshita, Y. Nishio, T. Nakajima, T. Hirano & T. Kishimoto. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9(6): 1897-1906 (1990).
- 76 D. P. Ramji, A. Vitelli, F. Tronche, R. Cortese & G. Ciliberto. The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP $\delta$ /NF-IL6 $\beta$ , are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms. *Nucl. Acids. Res.* 21(2): 289-294 (1993).
- 77 V. Poli. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.* 273(45): 29279-29282 (1998).
- 78 K. Nakajima, T. Matsuda, Y. Fujitani, H. Kojima, Y. Yamanaka, K. Nakae, T. Takeda & T. Hirano. Signal transduction through IL-6 receptor: involvement of multiple protein kinases, STAT factors and a novel H7-sensitive pathway. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 762: 55-70 (1995).
- 79 C. Tunyaplin, M. A. Shapiro & K. L. Calame. Characterization of the B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) gene, mRNA isoforms and basal promoter. *Nucleic Acids Res.* 28(24): 4846-4855 (2000).
- 80 A. B. Mock, L. Liu, D. Le Paslier & S. Huang. The B-lymphocyte maturation promoting transcription factor BLIMP1/PRDI-BF1 maps to

- 
- D6S447 on human chromosome 6q21-q22.1 and the syntenic region of mouse chromosome 10. *Genomics* 37(1): 24-28 (1996).
- 81 S. Huang. Blimp-1 is the murine homolog of the transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell* 78(1): 9 (1994).
- 82 C. A. Turner Jr., D. H. Mack & M. M. Davis. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 77(2): 297-306 (1994).
- 83 R. Alvarez-Venegas & Z. Avramova. SET-domain proteins of the Su(var) 3-9, E(z) and trithorax families. *Gene* 285(1-2): 25-37 (2001).
- 84 D. Chang, C. Angelin-Duclos & K. Calame. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nat. Immunol.* 1(2): 169-176 (2000).
- 85 C. Angelin-Duclos, G. Cattoretti, K. I. Lin & K. Calame. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with blimp-1 expression in vivo. *J. Immunol.* 165(10): 5462-5471 (2000).
- 86 K. Lo & S. T. Smale. Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene* 182(1-2): 13-22 (1996).
- 87 L. Falquet, M. Pagni, P. Bucher N. Hulo, C. J. Sigrist, K. Hofmann & A. Bairoch. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 30(1): 235-238 (2002).
- 88 A. D. Keller & T. Maniatis. Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 12(5): 1940-1949 (1992).
- 89 I. A. Hope, S. Mahadevan & K. Struhl. Structural and functional characterization of the short acidic transcriptional activation region of yeast GCN4 protein. *Nature* 333(6174): 635-640 (1988).

- 
- 90 M. Rechsteiner. Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of PEST regions. *Adv. Enzyme Regul.* 27: 135-151 (1988).
- 91 I. György, F. György, N. Gosh, E. Seto & K. L. Wright. Identification of a functionally impaired positive regulatory domain I binding factor 1 transcription repressor in myeloma cell lines. *J. Immunol.* 170(6): 3125-3133 (2003).
- 92 D. E. Schliephake & A. Schimpl. Blimp-1 overcomes the block in IgM secretion in lipopolysaccharide/anti- $\mu$ F(ab')<sub>2</sub>-co-stimulated B lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26(1): 268-271 (1996).
- 93 A. L. Schaffer, K. I. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame & L. M. Staudt. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17(1): 51-62 (2002).
- 94 Y. Lin, K. Wong & K. Calame. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276(5312): 596-599 (1997).
- 95 J. F. Piskurich, K. I. Lin, Y. Lin, Y. Wang, J. P. Ting & K. Calame. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Nat. Immunol.* 1(6): 526-532 (2000).
- 96 K. I. Lin, C. Angelin-Duclos, T. Kuo & K. Calame. Blimp-1 dependent repression of Pax5 is required for differentiation of B cells to IgM-secreting plasma cells. *Mol. Cell. Biol.* 22(13): 4771-4780 (2002).
- 97 K. L. Calame, K. Lin & C. Tunyaplin. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 205-230 (2003).

- 
- 98 B. Ren, K. J. Chee, T. H. Kim & T. Maniatis. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Genes Dev.* 13(1): 125-137 (1999).
- 99 J. Yu, C. Angelin-Duclos, J. Greenwood, J. Liao & K. Calame. Transcriptional repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol. Cell. Biol.* 20(7): 2592-2603 (2000).
- 100 D. P. Ramji & P. Foka. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365(Pt3): 561-575 (2002).
- 101 S. Osada, H. Yamamoto, T. Nishihara & M. Imagawa. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 271(7): 3891-3896 (1996).
- 102 G. J. Darlington, S. E. Ross & O. A. MacDougald. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273(46): 30057-30060 (1998).
- 103 Z. Pan, C. J. Hetherington & D. E. Zhang. CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor  $\beta$  signaling in monocyte development. *J. Biol. Chem.* 274(33): 23242-23248 (1999).
- 104 C. Menard, P. Hein, A. Paquin, A. Savelson, X. M. Yang, D. Lederfein, F. Barnabe-Heider, A. A. Mir, E. Sterneck, A. C. Peterson, P. Johnson, C. Vinson & F. D. Miller. An essential role for MEK-C/EBP-pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 36(4): 597-610 (2002).
- 105 C. Nerlov & E. B. Ziff. CCAAT/enhancer-binding protein alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability cooperate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J.* 14(17): 4318-4328 (1995).

- 
- 106 T. A. Pedersen, E. Kowenz-Leutz, A. Leutz & C. Nerlov. Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 15(23): 3208-3216 (2001).
- 107 K. A. Kovacs, M. Steinmann, P. J. Magistretti, O. Halfon & J.-R. Cardinaux. CCAAT/enhancer-binding protein family members recruit the coactivator CREB-binding protein and trigger its phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278(38): 36959-36965 (2003).
- 108 T. H. Tahirov, K. Sato, E. Ichikawa-Iwata, M. Sasaki, T. Inoue-Bungo, M. Shiina, K. Kimura, S. Takata, A. Fujikawa, H. Morii, T. Kumasaka, M. Yamamoto, S. Ishii & K. Ogata. Mechanism of c-Myb-C/EBP $\beta$  cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* 108(1): 57-70 (2002).
- 109 M. Niehof, M. P. Manns & C. Trautwein. CREB controls LAP/CEBP $\beta$  transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17(7): 3600-3613 (1997).
- 110 M. Niehof, K. Streetz, T. Rakemann, S. C. Bischoff, M. P. Manns, F. Horn & C. Trautwein. Interleukin-6 induced tethering of STAT3 to the LAP/CEBP $\beta$  promoter suggest a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3. *J. Biol. Chem.* 276(12): 9016-9027 (2001).
- 111 P. Descombes & U. Schibler. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67(3): 569-579 (1991).
- 112 A. L. Welm, N. A. Timochenko & G. J. Darlington. C/EBP $\alpha$  regulates generation of CEBP $\beta$  isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 1695-1704 (1999).

- 
- 113 I. V. Davydov, D. Bohmann, P. H. Krammer & M. Li-Weber. Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells. *J. Immunol.* 155(11): 5273-5279 (1995).
- 114 M. Li-Weber, P. Salgame, C. Hu, I. V. Davydov & P. H. Krammer. Differential interaction of nuclear factors with PRE-I enhancer element of the human IL-4 promoter in different T cell subsets. *J. Immunol.* 158(3): 1194-1200 (1997).
- 115 F. Berberich-Siebelt, S. Klein-Hessling, N. Hepping, B. Santner-Nanan, D. Lindemann, A. Schimpl, I. Berberich & E. Serfling. CEBP $\beta$  enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN- $\gamma$  induction in T cells. *Eur. J. Immunol.* 30(9): 2576-2585 (2000).
- 116 C. Lopez-Rodriguez, J. Aramburu, A. S. Rakean & A. Rao. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(13): 7214-7219 (1999).
- 117 C. Garcia-Rodriguez & A. Rao. Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP). *J. Exp. Med.* 187(12): 2031-2036 (1998).
- 118 S. Wesselborg, D. A. Fruman, J. K. Sagoo, B. E. Bierer & S. J. Burakoff. Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J. Biol. Chem.* 271(3): 1274-1277 (1996).
- 119 E. S. Masuda, J. Liu, R. Imamura, S. I. Imai, K. I. Arai & N. Arai. Control of NFATx1 nuclear translocation by a calcineurin-regulated inhibitory domain. *Mol. Cell. Biol.* 17(4): 2066-2075 (1997).



- 
- 120 C. R. Beals, N. A. Clipstone, S. N. Ho & G. R. Crabtree. Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* 11(7): 824-834 (1997).
- 121 J. D. Klemm, C. R. Beals & G. R. Crabtree. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr. Biol.* 7(9): 638-644 (1997).
- 122 S. Chuvpilo, A. Avots, F. Berberich-Siebelt, J. Glöckner, C. Fischer, A. Kerstan, C. Escher, I. Inashkina, F. Hlubek, E. Jankevics, T. Brabletz & E. Serfling. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* 162(12): 7294-7301 (1999).
- 123 A. Kel, O. Kel-Margoulis, V. Babenko & E. Wingender. Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J. Mol. Biol.* 288(3): 353-376 (1999).
- 124 E. Serfling, R. Barthelmas, I. Pfeuffer, B. Schenk, S. Zarius, R. Swoboda, F. Mercurio & M. Karin. Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* 8(2): 465-473 (1989).
- 125 S. Chuvpilo, C. Schomberg, R. Gerwig, A. Heinfling, R. Reeves, F. Grummt & E. Serfling. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res.* 21(24): 5694-5705 (1993).
- 126 J. Altschmied & J. Duschl. Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* 23(3): 436-438 (1997).

- 
- 127 D. Lindemann, E. Patriquin, S. Feng & R. C. Mulligan. Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo. *Mol. Med.* 3(7): 466-476 (1997).
- 128 M. Knödel, A. W. Kuss, D. Lindemann, I. Berberich & A. Schimpl. Reversal of Blimp-1-mediated apoptosis by A1, a member of the Bcl-2 family. *Eur. J. Immunol.* 29(9): 2988-2998 (1999).
- 129 P. Chomczynski & N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1): 156-159 (1987).
- 130 D. H. Chang & K. L. Calame. The dynamic expression pattern of B lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) during mouse embryonic development. *Mech. Dev.* 117(1-2): 305-309 (2002).
- 131 S. M. Kaech, E. J. Wherry & R. Ahmed. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2(4): 251-262 (2002).
- 132 E. M. Shevach. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2(6): 389-400 (2002).
- 133 C. A. Michie, A. McLean, C. Alcock & P. C. L. Beverly. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360(6401): 264-265 (1992).
- 134 M. Levine & R. Tjian. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424(6945): 147-151 (2003).
- 135 S. Mink, U. Kerber & K.-H. Klempnauer. Interaction of C/EBP $\beta$  and v-Myb is required for synergistic activation of the mim-1 gene. *Mol. Cell. Biol.* 16(4): 1316-1325 (1996).

- 
- <sup>136</sup> B. Lüscher. Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277(1-2): 1-14 (2001).
- <sup>137</sup> S. T. Smale. The establishment and maintenance of lymphocyte identity through gene silencing. *Nat. Immunol.* 4(7): 607-615 (2003).



## **Danksagung**

Bei Prof. Edgar Serfling möchte ich mich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die interessante und lehrreiche Fragestellung bedanken. Besonderer Dank hierbei gilt Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt für Ihre ausgezeichnete menschliche und fachliche Betreuung während der praktisch-experimentellen und theoretisch-formulierenden Entstehungsphasen dieser Dr.-Arbeit. Weiterhin danke ich Dr. Stefan Klein-Hessling, Dr. Sergei Chuvpilo, Dr. Jan Schulze-Lührmann und Dr. Andris Avots sowie allen anderen damaligen Labormitgliedern für Ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie für das gute Arbeitsklima.

Für unschätzbare technische Assistenz und vor allem für das freundschaftliche Miteinander bedanke ich mich bei Frau Ursula Sauer und Frau Doris Michel.

Dr. Mindaugas Andrusis gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie.

Der Arbeitsgruppe Frau Prof. Anneliese Schimpl danke ich für die wertvollen Informationen bezüglich der Blimp1-Expression in  $T_{Mem}$  und  $T_{Reg}$ -Zellen.

Herrn Andreas Unteidig danke ich für seine Unterstützung als Graphiker und Layouter.

Meinen Großeltern, Eltern und Geschwistern danke ich für Ihre Unterstützung und das Ermöglichen meiner langwierigen Ausbildung.

Diese Dr.-Arbeit ist meiner Großmutter, Frau Katharina Hauck (selig), gewidmet.



## **Lebenslauf**

Name: Fabian Harald Hauck

Geburtsdatum: 27.11.1976

Geburtsort: Erlenbach am Main

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulische Laufbahn:

08/83-06/87 Grundschule Amorbach im Odenwald

08/87-06/96 Karl-Ernst-Gymnasium Amorbach i.O.

### Wehrpflicht:

10/96-10/97 Zivildienstes in der Pflege auf der Privatstation  
der Inneren Medizin, Klinikum der Universität Würzburg

### Hochschulstudium:

04/98-09/98	Studium der romanischen Philologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/98-09/99	Studium der Medizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
10/99- 05/05	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/00	Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0
09/01	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
04/04	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0
05/05	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,0

### Famulaturen:

02/01-04/01	Praxis Michael Lutz, Arzt für Allgemeinmedizin, Amorbach i. O.
09/02-10/02	Kreiskrankenhaus Erlenbach a.M., Gynäkologie und Geburtshilfe
02/03-04/03	Hospital Nacional de Niños, San José, Costa Rica, Pädiatrische Infektiologie

### Praktisches Jahr:

04/04-08/04	Universitäts-Kinderklinik Würzburg, Pädiatrie
-------------	---



08/04-11/04            Lehrkrankenhaus Missionsärztliche Klinik Würzburg, Innere  
Medizin

11/04-03/05            Lehrkrankenhaus Juliusospital Würzburg, Chirurgie

Promotion:

10/01-07/03            Labor Prof. Dr. E. Serfling, Abteilung für Molekulare Pathologie,  
Pathologisches Institut der Universität Würzburg

11/02                    Posterpräsentation, 6<sup>th</sup> Joint Meeting of the Signal Transduction  
Society, Weimar

Zusatzinformationen:

10/04                    Unterweisung im Strahlenschutz nach § 18a Abs. 3 RöV

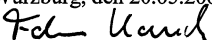
08/85-06/96            Klavierunterricht

11/97-02/98            Sprachaufenthalt in Chile und Peru

08/99-09/99            Sprachaufenthalt in Granada Spanien

09/00-10/00            Sprachaufenthalt in Sevilla Spanien

Würzburg, den 20.05.2005

  
Fabian Hauck

