

## 1.1. T-Zell-Aktivierung

Nachdem T-Lymphozyten ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, zirkulieren sie als naive T-Zellen zwischen den Blutgefäßen und den peripheren lymphatischen Organen. Erst der Kontakt mit einem Antigen gibt der naiven T-Zelle das Signal zur Proliferation und Differenzierung und somit die Möglichkeit, an der adaptiven Immunantwort teilzunehmen. Die körperfremden, im Falle einer Autoimmunerkrankung auch körpereigenen Antigene, werden zu diesem Zweck von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) an deren Oberfläche präsentiert. Hierfür besitzen die 3 Klassen der APCs (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) auf ihrer Oberfläche spezifische Proteinkomplexe, den Haupt-Histokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“ MHC). Mit dem Aufeinandertreffen einer naiven T-Zelle und einem präsentierten Antigen sind die Grundvoraussetzungen der T-Zell-Aktivierung erfüllt.

Zur kompletten Aktivierung benötigt die T-Zelle obligat noch ein zweites, kostimulierendes Signal, das von derselben antigenpräsentierenden Zelle, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt, geliefert werden muss. Das am besten charakterisierte kostimulierende Molekül ist das Glykoprotein B7. Ein Rezeptor von B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28. Eine Bindung von B7 an CD28 führt zur Kostimulierung naiver T-Zellen; entsprechend verhindern manche B7-spezifischen Antikörper die Interaktion und somit die T-Zell-Aktivierung.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Populationen naiver T-Zellen, die sich in einem Transmembran-Glykoprotein unterscheiden. Folgend der CD („cluster of differentiation“)-Nomenklatur spricht man von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Das CD8-Protein bindet Antigene, welche ihr vom MHC Klasse I (MHC I) präsentiert werden. MHC I wird auf jeder Zelle exprimiert und es präsentiert Peptide von Pathogenen, die die Zelle infiziert haben. Dies führt zur Differenzierung der naiven CD8-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen,

deren Aufgabe die Elimination der infizierten Zellen ist. MHC II hingegen wird nur auf APCs exprimiert. Von MHC II werden Fremdmoleküle aus intrazellulären Vesikeln und solche, die von aufgenommenen extrazellulären Bakterien und Toxinen stammen, präsentiert und von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Nach Wirkung der CD4<sup>+</sup> Zellen werden sie auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet. Eine naive CD4<sup>+</sup>- oder Th0-Zelle, kann nach Interaktion mit einem MHCII präsentierten Antigen nun zu verschiedenen Arten von Effektorzellen differenzieren.

Die Anwesenheit verschiedener Lymphokine entscheidet über den einzuschlagenden Differenzierungsweg. Die Konsequenz ist weitreichend, da sich die Zelltypen in ihrer Wirkung auf das Immunsystem stark unterscheiden. Die Bildung von Th1-Zellen führt zur Aktivierung einer zellvermittelten Immunantwort. Th1-Zellen produzieren und sekretieren inflammatorische Zytokine, wie Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) und Interleukin 2 (IL2) und aktivieren somit Makrophagen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen. Im Gegensatz dazu unterstützen Th2-Zellen mit der Sezernierung von IL4, IL5, IL10 und IL13 die humorale Immunität, indem sie die Antikörperproduktion von B-Zellen anregen. In letzter Zeit haben die IL17 viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie mitverantwortlich für manche Autoimmunerkrankungen zu sein scheinen [51].

Auch eine Dysregulation in der Th1-Differenzierung führt häufig zu immunpathologischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen, wohingegen eine unkontrollierte Th2-Entwicklung oft sowohl mit atopischen und allergischen Symptomen als auch mit Asthma einhergeht. Als ein spezifisches Beispiel dient die Infektion mit *Mycobacterium leprae*, dem Erreger der Lepra, der sich in Makrophagenvesikeln vermehrt. Um die Infektion effektiv zu bekämpfen, müssen die Th1-Zellen durch Makrophagen aktiviert werden. Bei Patienten mit normalem Immunstatus werden tatsächlich vorwiegend Th1-Zellen induziert und die intrazellulären Bakterien erkannt, womit die Krankheit einen milden Verlauf nimmt.

Werden jedoch hauptsächlich Th2-Zellen induziert, kommt es stattdessen zu einer humoralen Immunantwort. Die produzierten Antikörper sind nicht in der Lage, die intrazellulären Erreger zu eliminieren und die Krankheit nimmt einen fulminanten, oft letalen Verlauf. Schon aus diesem Beispiel läßt sich die klinische Relevanz für die Forschung auf dem Bereich der Th1/Th2-Differenzierung ableiten und das Bemühen, weitere Teile dieses medizinisch-molekularbiologischen Puzzles zu finden, erklären.

## 1.2. Th1/Th2-Differenzierung

In den letzten Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen eine Vielzahl der regulierenden Zytokine und deren vermittelnden Signalwege inklusive der aktivierten Transkriptionsfaktoren identifizieren können. Beispielsweise treiben bakterielle Stimuli Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK) zur Produktion von IL12 und IFN $\gamma$  an und führen so zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen. Umgekehrt zeigen sowohl IL12<sup>-/-</sup> Mäuse [65], als auch STAT4 (ein IL12 induzierter Faktor) defiziente Mäuse [46, 65, 110] eine gestörte Th1 Produktion. In diesen Mäusen (BALB/c) führt zum Beispiel eine Infektion mit *Leishmania major* zu einer unwirksamen Th2-Antwort [63].

Damit eine naive Th0- zur Th2-Zelle differenziert, ist die Anwesenheit von IL4 obligat. Bis heute ist die Herkunft des initialen IL4 noch nicht geklärt. Die besondere Bedeutung lässt sich aber mit Hilfe von IL4<sup>-/-</sup> Mäusen, die nur noch eine geringe Anzahl an Th2-Zellen produzieren, erkennen [52, 53]. Bei gendefizienten Mäusen, denen der durch IL4 aktivierte Faktor STAT6 fehlt, kommt es sogar zu gar keiner Th2-Differenzierung mehr [47, 48, 103, 112].

Der Aktivierungsweg führt über die entsprechenden Zytokinpromotoren, -enhancer und weitere regulatorische Elemente. Man geht inzwischen von einem 2-Stufen-Modell als differenzierungsentscheidend aus.

Transkriptionsfaktoren rekrutieren Kofaktoren wie Histonacetylasen und Methylasen, die die Regulation der Chromatinstruktur, also Eukaryotischer bzw. Heterochromatisierung, vermitteln, und darüberhinaus die gewebs- und zeitgemäße Aktivierung der Promotoren bewirken [2].

Neben den aktivierenden Zytokinen, wie beispielsweise die oben genannten IL4 und IL12, sind sogenannte Effektorlymphokine charakterisiert, die im Wesentlichen die Th1- bzw. Th2-Funktion vermitteln. Interessant ist, über welche Signalwege und Transkriptionsfaktoren die Chromatinöffnung oder Promotoraktivität der Effektorlymphokine aktiviert bzw. gehemmt werden. Aktuell gelten unter anderem IL12 und  $\text{IFN}\gamma$ , STAT4, JNK2 und T-bet als Stimuli für eine Th1-Differenzierung. Hingegen entwickeln sich bei der Anwesenheit von IL4 bzw. der Aktivierung von STAT6, c-Maf, GATA3, NIP45 und NFAT vermehrt Th2-Zellen.

Der erste Differenzierungsschritt besteht hierbei in der Remodulation der entsprechenden Genloci durch Demethylierung. Mit Hilfe von „DNase I hypersensitivity analysis“ konnte gezeigt werden, dass sich bei der Th1-Differenzierung die Chromatinstruktur des  $\text{IFN}\gamma$  Locus, sowie bei der Th2-Differenzierung die Chromatinstruktur der IL4 und IL13 Loci „öffnet“ und so die Interaktion mit nachfolgenden Faktoren vereinfacht bzw. erst ermöglicht wird [2]. Neue Daten bestätigen diesen Mechanismus auch für die Aktivierung des IL2-Promotors. Die Arbeitsgruppe um Rao konnte mit Hilfe der sehr empfindlichen Methode der sogenannten „real-time PCR“ die Remodelierung des proximalen IL2-Promotors nach Stimulation beweisen. Sie konnte auch zeigen, dass dieser Schritt abhängig von der Anwesenheit bestimmter Transkriptionsfaktoren ist, hingegen nicht von einer Modifikation der Histone [89]. Erst in diesem Zustand sind die Promotoren empfänglich für eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die sowohl aktivierende als auch hemmende Wirkung zeigen können.

Es wurden eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert, die sehr spezifisch in eine Differenzierungsrichtung arbeiten. GATA3, c-Maf und

NF-ATc1 führen über eine Transaktivierung des IL4-Promotors zur Erhöhung von intrazellulärem IL4 und damit, wie schon oben beschrieben, zur Th2-Differenzierung. Li-Weber et. al wiesen 1995 nach [30], dass auch C/EBP $\beta$ , ein Transkriptionsfaktor der Leucin-Zipper Familie, zumindest in humanen Tumorzellen, an den IL4-Promotor bindet. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass auch in primären T-Zellen der Maus der intrazelluläre Level an IL4 durch C/EBP $\beta$  erhöht wird. Desweiteren gewannen wir Hinweise darauf, dass C/EBP $\beta$  zusätzlich eine die IL2- und IFN $\gamma$ -Expression hemmende Wirkung besitzt [11]. Da vor allem IFN $\gamma$  als Katalysator der Th1-Differenzierung gilt, könnte hierdurch die Th2-Differenzierung zusätzlich unterstützt werden.

### **1.3. Zytokinpromotoren**

Die große Bedeutung der Zytokine im allgemeinen und, wie oben erwähnt, bei der Th1/Th2-Differenzierung im speziellen, setzt eine genaue Regulation ihrer Synthese voraus. Die RNA-Polymerase als „Motor“ des Transkriptionsvorganges muß also einer exakten Steuerung unterliegen. Als universelles Protein benötigt es spezifische Steuerungsmechanismen zur Transkription der erforderlichen Zytokine. Diese Funktion übernehmen im Zusammenspiel mit Enhancern und weiteren regulatorischen Elementen dem Zytokin-Gen vorgeschaltete Sequenzen, sogenannte Promotoren, die eine Transkription ermöglichen oder aber blockieren können. Erst durch die Aktivierung seines Promotors kann ein Gen bzw. ein Zytokin-Gen „abgelesen“ werden. Aktivierung erfolgt in diesem Fall durch die Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren an den Promotor. Erst jetzt kann die RNA-Polymerase das zu transkribierende Gen binden und so die Transkription starten. Im Folgenden wird nun der IL2 Promotor, der bezüglich dieser Arbeit im Vordergrund steht, etwas genauer betrachtet.

### 1.3.1. IL2 - Promotor

Eine große Anzahl Veröffentlichungen verschiedener Forschungsgruppen haben inzwischen die Region von ca. 300 Basenpaaren unmittelbar vor dem IL2-Gen als das wichtigste Kontrollelement sowohl für die Induktion als auch für die T-Zell-spezifische Transkription des IL2-Gens beschrieben [28, 34, 36]. Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren-Bindungsstellen des IL2-Promotors.

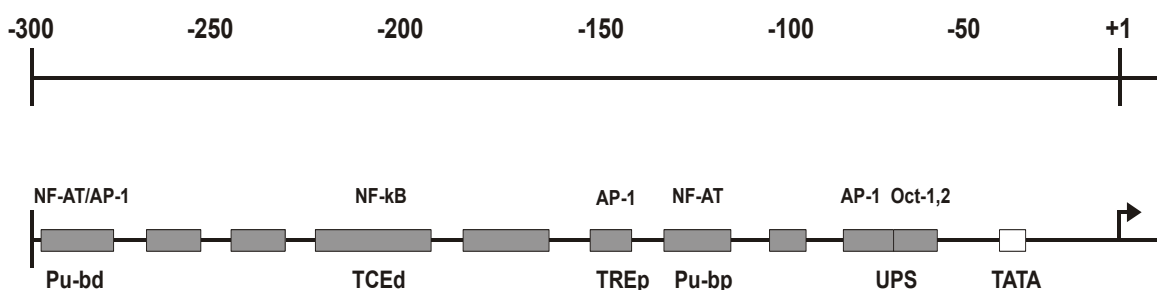


Abb.1: IL2-Promotor

obere Zeile: Position der Basenpaare ( +1 = Transkriptionsstart)

untere Zeile: oben: Bindungsfaktoren; unten: Bindungselemente

Die Sequenzhomologie der humanen und murinen Promotorregion beträgt ca. 90 %, wobei die identifizierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nahezu identisch sind. Bisher wurde der aktivierende Einfluß von 4 Transkriptionsfaktoren (NF-AT, NF- $\kappa$ B, AP-1 und Oct) nachgewiesen, die alle über multiple Bindungsstellen wirken [41].

Das proximal gelegene UPS-Element („upstream promoter region“), positioniert zwischen -63 und -93, beinhaltet zwei sich überlappende Bindungsstellen für AP-1 und Octamer-Faktoren. Die Bindung beider Faktoren an das UPS-Element ist obligat für eine Aktivierung des gesamten Promotors. Mutationen, die jeweils nur eine von beiden Bindungsstellen funktionsunfähig machen, führen zu einer Reduktion der

Aktivität auf ca. 40 % der Grundaktivität. Mutationen in beiden Bindungsstellen verursachen sogar einen kompletten Aktivitätsverlust [81]. Das Überlappen beider Bindungsstellen ist ein Hinweis auf Kooperation bzw. Abhängigkeit beider bindenden Faktoren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das Einfügen von 5 oder 10 Basenpaaren zwischen beide Bindungsstellen ebenfalls zu einer starken Reduktion der Transaktivierung über die UPS bindenden Faktoren führt [81].

Um Position -150 befindet sich mit TREp („TPA responsive element proximal“) eine weitere Bindungsstelle für AP-1. Das Sequenzmotiv entspricht nicht ganz der perfekten AP-1-Stelle aus dem humanen Kollagenase-Promotor (TRE) und besitzt somit auch eine 10-mal schwächere Affinität. Wird TREp aus dem IL2-Promotor durch eine Punktmutation weiter verändert, führt dies zu einer leichten Abschwächung der Promotoraktivität. Das Einfügen einer perfekten AP-1 Stelle (TRE) erhöht wiederum die Aktivität des Promotors [41].

Das nächste Element, TCEd („T cell element distal“), ist zwischen -215 und -191 positioniert und zeigt eine schwache Affinität zu dem Faktor NF- $\kappa$ B. Auch hier resultiert aus der Konversion in ein perfektes NF- $\kappa$ B-Bindungsmotiv ein starker Anstieg der Promotor-Aktivität [41]. Zusätzlich konnte die Bindung von  $\kappa$ B-Faktoren, insbesondere p65 (RelA), nachgewiesen werden [17]. Über diese Faktoren wird der suppressive Effekt von den Aktivatoren der Protein Kinase A (PKA) auf den IL2-Promotor vermittelt [74].

NF-AT Faktoren binden und aktivieren den IL2-Promotor schließlich an den zwei purinreichen Sequenzen Pu-bp und Pu-bd (proximale und distale Purin-box). Lokalisiert sind die beiden Bindungsstellen an den Positionen um -145 und -285. Eine besondere Eigenschaft der Bindung von NF-AT Faktoren an Zytokinpromotoren ist die Beteiligung von AP-1 Faktoren. Belegt wurde dies anhand von Studien der distalen Pu-b des IL2-

Promotors. In 3'-Richtung, ungefähr 10 Basenpaare von der NF-AT Bindungsstelle entfernt, befindet sich eine „nicht-perfekte“ AP-1 Bindungsstelle (TRE) [24, 130]. Obwohl beide Faktoren unabhängig voneinander ihr Motiv binden können, kommt es bei einer gemeinsamen Bindung zu einer stabilisierenden Kooperation. Durch direkte Protein-Protein-Kontakte binden sowohl NF-AT als auch AP-1 stabiler an die DNA [44, 45, 80]. Inzwischen sind die Strukturanalysen der NFAT-AP1-Dimere bekannt [24], die die Protein-Protein-Interaktion sowie die Bindung an die DNA bestätigen und darüberhinaus veranschaulichen.

## **1.4. C/EBP**

### **1.4.1. Struktur**

Die Mitglieder der C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding-Protein) Familie bilden strukturell den Prototyp der bZIP-Familie der Transkriptionsfaktoren. Die bZIP-Domäne besteht aus der basischen DNA-Bindungsdomäne und dem sogenannten „Leucin-Zipper“, der Dimerisierung mit anderen Leucin-Zipper enthaltenden Proteinen ermöglicht. Somit bilden die verschiedenen C/EBP-Faktoren Homo- und Heterodimere. Gezeigt wurde auch, dass die Dimerisierung eine Grundvoraussetzung für die Bindung an DNA und somit für die Transaktivierung darstellt [54]. In verschiedenen Studien wurden darüberhinaus Heterodimere mit den Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B oder Fos/Jun Familie nachgewiesen [116]. N-terminal schliesst sich die DNA-Bindungsdomäne mit einer Länge von 20 Aminosäuren an. Die Transaktivierungsdomäne, verantwortlich für transkriptionelle Aktivierung oder Hemmung, befindet sich am N-terminalen Ende des Moleküls.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten sechs verschiedene C/EBP-Familienmitglieder klassifiziert werden, die alle einen identischen Aufbau in der Dimerisations- und Bindungsdomäne aufweisen und sich nur in ihrer



Transaktivierungsdomäne unterscheiden. Nomenklatorisch hat sich die Bezeichnung der Subtypen mit den griechischen Buchstaben  $\alpha$ - $\zeta$  in der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung durchgesetzt [19]. In älteren Veröffentlichungen finden sich noch eine Vielzahl von Synonymen (Tabelle 1).

<b>Name</b>	<b>alternative Bezeichnung</b>
C/EBP $\alpha$	C/EBP
<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	<b>NF-IL6, IL-6DBP, LAP, CRP2, AGP/EBP, NF-M, ApC/EBP [5, 23, 31, 83, 100, 120]</b>
C/EBP $\gamma$	Ig/EBP
C/EBP $\delta$	CELF, CRP3, NF-IL6b, ReC/EBP2
C/EBP $\epsilon$	CRP1
C/EBP $\zeta$	CHOP, Gadd 153

Tabelle 1: Nomenklatur der C/EBP-Familienmitglieder

### 1.4.2. Funktion

In den letzten Jahren konnten viele Studien zeigen, dass die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in den verschiedensten zellulären Prozessen spielt. Insbesondere die Bereiche Zelldifferenzierung, Inflammation, Geweberegeneration und Stoffwechselprozesse werden unter anderem von C/EBP-Faktoren reguliert. Dies wurde durch verschiedene Ansätze, wie die Analyse der Promotoren von Zielgenen, Inhibition bzw. Überexpression von C/EBP in Zellkultur-Systemen oder durch Generierung spezifischer Knock-out-Mäuse bestätigt.

Die Bedeutung von C/EBP-Faktoren für die Zelldifferenzierung ist inzwischen in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen worden. Unter anderem spielen C/EBP-Faktoren in Hepatozyten, Brustdrüsenepithelien, Lutealzellen, Keratinozyten, Neuronen, intestinalen Epithelien, Adipozyten und myeloiden Zellen eine wichtige Rolle. Konkrete Erkenntnisse gibt es vor allem über den Einfluß auf die Differenzierung von Adipozyten und myeloiden Zellen sowie auf die Immunmodulation.

#### Adipozyten:

Die Beobachtung, dass es insbesondere in enddifferenzierten Zellen des Fettgewebes zu einer hohen Expression von C/EBP $\alpha$  kommt, führte zu der genaueren Untersuchung des Einflusses der C/EBP-Faktoren auf die Adipogenese. Mehrere Arbeitsgruppen konnten mit verschiedenen Ansätzen die wichtige Bedeutung von C/EBP in der Fettzelldifferenzierung herausarbeiten.

- Überexpression von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  in Vorläufer-Fettzellen (3T3-L1) führt auch in Abwesenheit hormoneller Stimuli zur Initialisierung der Differenzierung [126].
- Exprimiert die gleiche Zelllinie (3T3-L1) eine C/EBP $\alpha$ -Antisense-mRNA, kommt es hingegen zu keiner Initialisierung der Differenzierung [60].
- Fehlt es embryonalen Fibroblasten an C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$ , differenzieren sie trotz hormoneller Stimulation nicht [110].
- C/EBP $\alpha$ -defiziente Mäuse sterben kurz nach Geburt an Hypoglykämien und zeigen hierbei ein stark reduziertes Fettgewebe [117].

#### Myeloide Zellen:

Die Hypothese, dass C/EBP-Faktoren eine Funktion bei der Differenzierung von myeloiden Zellen übernehmen, entstand durch mehrere Beobachtungen. Beispielsweise ist die C/EBP $\beta$ -Expression während der Makrophagen-Differenzierung stark erhöht [74]. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine exogene Überexpression von C/EBP

zahlreiche Zielgene in myeloiden Zellen aktiviert [16, 58, 82, 121]. Offensichtlich wurde die Bedeutung von C/EBP-Faktoren auf das System der myeloiden Zellen durch Studien an Knock-out-Mäusen. So sind myeloide Zellen in C/EBP $\epsilon$ -defizienten Mäusen nicht in der Lage das Stadium der Myeloblasten zu überschreiten und führen somit in eine deutliche Neutropenie [128].

Immunmodulation:

Die Bedeutung von C/EBP-Faktoren als ein Mediator in der Immunantwort wurde schon vor Jahren erkannt. Tatsächlich wurde C/EBP $\beta$  aufgrund seiner transaktivierenden Aktivität nach Stimulation mit IL1 und IL6 identifiziert [3, 83].

Mittlerweile ist bekannt, dass die Aktivität von C/EBP-Faktoren durch viele inflammatorische Substanzen, wie zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) oder Zytokine, reguliert wird. Die gesteigerte Expression von C/EBP $\beta$  und C/EBP $\delta$  wurde in diesem Zusammenhang unter anderem in Hepatozyten, Makrophagen, renalen Mesangiumzellen und Astrogliazellen nachgewiesen [3, 4, 21, 40, 82, 83, 86, 111].

Zusätzlich wurden inzwischen Bindungsstellen für C/EBP in einer Vielzahl von Genen, die sich an der Immunantwort beteiligen, identifiziert. Zu nennen sind hier Gene von Zytokinen und deren Rezeptoren, hepatogenen Akut-Phase-Proteinen und Proteinen verschiedener Signaltransduktionsketten. Deutlich wird dies vor allem in Untersuchungen an Knock-out-Mäusen. Beispielsweise zeigen C/EBP $\epsilon$ -defiziente Mäuse eine verlangsamte Neutrophilen-Migration bei einer in-vivo Infektionsreaktion und folglich eine abgeschwächte bakterizide Immunantwort [58].

### 1.4.3. C/EBP $\beta$

1990 entdeckte und analysierte die Arbeitsgruppe um Poli et al. ein Protein, IL-6DBP, welches an das sogenannte IL6-responsive-element verschiedener Akut-Phase Gene in Hepatozyten bindet [83]. Aufgrund struktureller Homologien definierten die Autoren IL-6DBP als neues Mitglied der Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren. Retrospektiv war dies die Erstbeschreibung von C/EBP $\beta$ . In den folgenden Jahren wurde offensichtlich, dass C/EBP $\beta$  nicht nur in der Leber, sondern auch in vielen anderen Systemen eine wichtige Rolle spielt.

Inzwischen ist das komplette Gen von C/EBP $\beta$  sowohl des Menschen, der Maus als auch der Ratte sequenziert. Höchste Expressionsraten werden in Leber, Lunge, Darm und Fettgewebe [19, 23, 31, 120], bei Mäusen zusätzlich noch in Milz, Nieren und Herz [19] gemessen. Die Tatsache, dass die Stimulation mit Lipopolysacchariden, IL1, IL6, Glucokortikoiden oder Glukagon zu einer gesteigerten Expression von C/EBP $\beta$  führt, lässt eine Funktion als Mediator bei der akuten Immunantwort vermuten [3, 4, 6, 67]. Dies zeigen auch die phänotypischen Veränderungen bei C/EBP $\beta$ -defizienten Mäusen. Sie sind extrem anfällig gegenüber Infektionen mit *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhi*. Als Ursache für den letalen Ausgang dieser Infektionen werden gestörte Funktionen von Makrophagen, insbesondere die Unfähigkeit phagozytierte Bakterien in den Phagosomen zu konservieren, vermutet [100, 110]. Andere Veränderungen bestehen in einer gestörten Fettspeicherung und weiblicher Sterilität, erniedrigter IL12-Konzentration und gestörter Th1-Entwicklung [100]. Inwieweit diese Veränderungen direkt auf das Fehlen von C/EBP $\beta$  zurückzuführen sind bzw. indirekt durch die überbordende Produktion von IL6 in diesen Mäusen verursacht werden, ist zumindest für die gestörte Th1-Entwicklung nicht untersucht.

Wie bereits erwähnt, konnten mehrere Studien zeigen, dass C/EBP $\beta$  Promotoren verschiedener Akut-Phase-Proteine bindet und aktiviert, beispielsweise die Promotoren von TNF, IL8 und G-CSF [3, 83]. Andererseits wirken diese Proteine wiederum positiv auf die Transkription

oder Aktivität von C/EBP $\beta$  [3, 4]. Ansatzpunkte sind hierbei eine Erhöhung der Bindungsfähigkeit von C/EBP an die Ziel-DNA (TGF- $\beta$ , EGF) [87], die Steigerung des Aktivierungspotentials (Ca<sup>2+</sup>, IL6, MAPK-Aktivatoren, PKC-Aktivatoren) [73, 82, 86, 115, 131] oder Konzentrationserhöhung im Zellkern (cAMP, LPS, TNF $\alpha$ , TPA) [49, 127]. Andere Faktoren wiederum führen auf der Ebene der mRNA, also der Transkription, zu einer gesteigerten C/EBP $\beta$ -Aktivität (IFN $\gamma$ , IL1, IL6, LPS, NGF, VIP, cAMP, Glukagon, Glucokortikoide, Noradrenalin und Wachstumshormone) [3, 4, 5, 20, 21, 27, 40, 66, 108, 111, 126].

Aus C/EBP $\beta$ -mRNA können mindestens 3 verschiedene Isoformen (Abb. 2) entstehen, LAP\* „liver activating protein“ (38 kDa), LAP (35 kDa) und LIP „liver inhibiting protein“ (20 kDa), wobei in den meisten Geweben vor allem LAP und LIP nachgewiesen wurden [32]. Unter bestimmten Umständen wird ein Startcodon zwischen der Aktivierungs- und Bindungsdomäne erkannt, was zum verkürzten ribosomalen Ablesen der mRNA und zur Synthese von LIP führt [18].

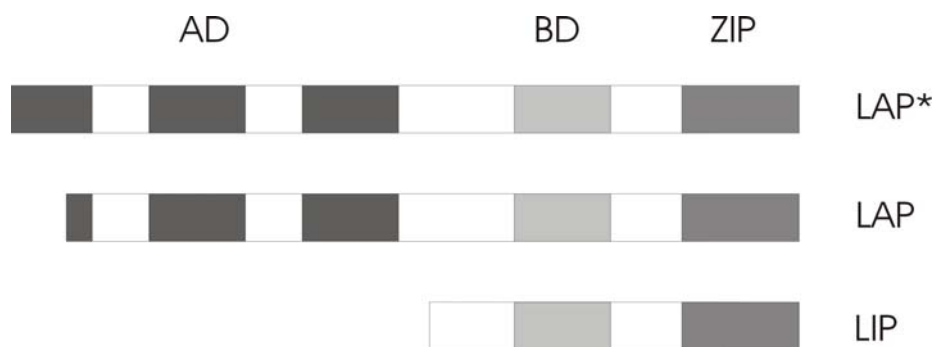


Abb. 2: CEBP $\beta$ -Isoformen: Aktivierungsdomäne (AD), Bindungsdomäne (BD), Leucin-Zipper (ZIP)

Strukturell unterscheiden sich die beiden Isoformen LAP und LIP somit in dem Vorhandensein der Aktivierungsdomäne, und so kann LIP, dem die Aktivierungsdomäne fehlt, funktionell als dominant negativer Inhibitor wirken [32].

## 2. Ergebnisse

### 2.1. C/EBP $\beta$ reprimiert die IL2-Expression

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  die Konzentration von IL4-RNA in murinen primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten und Milz transgener Mäuse (DO11.10 TCR) hochreguliert und in EL4-Zellen sogar induziert [11]. C/EBP $\beta$  bindet direkt an den IL4-Promotor und transaktiviert ihn. Gleichzeitig war aufgefallen, dass die RNA-Konzentration von IL2 und IFN $\gamma$ , Lymphokine, die in Th1 Zellen exprimiert werden, herunterreguliert wird. Um die Reduktion von Th1-Lymphokinen genauer zu untersuchen, wurden EL4-Zellen mit einem C/EBP $\beta$ -exprimierenden Retrovirus infiziert. Dieses Virus beinhaltet C/EBP $\beta$ -LAP cDNA. Durch Fusion mit der Hormon-Bindungs-Sequenz des Östrogenrezeptors wird das exprimierte C/EBP $\beta$ -Protein im Zytoplasma mit Hsp70 komplexiert und damit inaktiv gehalten. Aktivierung ist durch 4-Hydroxytamoxifen (Tm) möglich. Tm wirkt hierbei als synthetischer Ligand des leicht modifizierten Östrogenrezeptors [62] und führt zur Kernlokalisierung und Aktivität von C/EBP $\beta$ . Nach Stimulation der Zellen mit TPA und Ionomycin, die eine Signalgebung über den TCR ersetzen, sollte die intrazelluläre IL2-Expression, zur Kontrolle auch die intrazelluläre IL4-Expression, mit und ohne Tm quantitativ bestimmt werden. Zum Vergleich wurden EL4-Zellen, die mit einem Retrovirus infiziert waren, dem die C/EBP $\beta$  cDNA fehlte (EGZ), analysiert.

Zur Bestimmung der Zytokinexpression innerhalb der Zellen wurden intrazelluläre Färbungen gegen IL2/IL4 und anschließende FACS-Analysen durchgeführt. Dafür wurde bei einem Teil der infizierten und TPA/Ionomycin stimulierten Zellen eine nukleäre C/EBP $\beta$ -Expression durch die Inkubation mit Tm initiiert. Der Sekretionshemmer Brefeldin verhindert eine Ausschüttung der exprimierten Zytokine und ermöglichte so eine quantitative Bestimmung. Nach Aufschluß der Zellen mit dem Detergens Saponin konnten fluoreszenz-markierte Antikörper gegen IL2 bzw. IL4 in die Zellen gelangen.

Die FACS-Analyse zeigte die Auswirkungen von C/EBP $\beta$  auf die IL4- und IL2-Expression. Das Ergebnis wird in Abb. 3 und 4 verdeutlicht. Die infizierten EL4-Zellen waren nach Zeo-Selektion zu fast hundert Prozent grün-fluoreszierend und damit wahrscheinlich auch C/EBP $\beta$  positiv. Letzteres wurde im Westernblot von diesen Zellen nach Dedektion des Östrogenrezeptors bestätigt. Nach Zusatz von Tm zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IL4 Expression (obere Zeile, oberer rechter Quadrant). Im Vergleich dazu ergab sich keine Änderung der IL4 Konzentration in den Zellen, die mit dem Kontrollvirus exprimierenden Retrovirus infiziert wurden (untere Zeile).

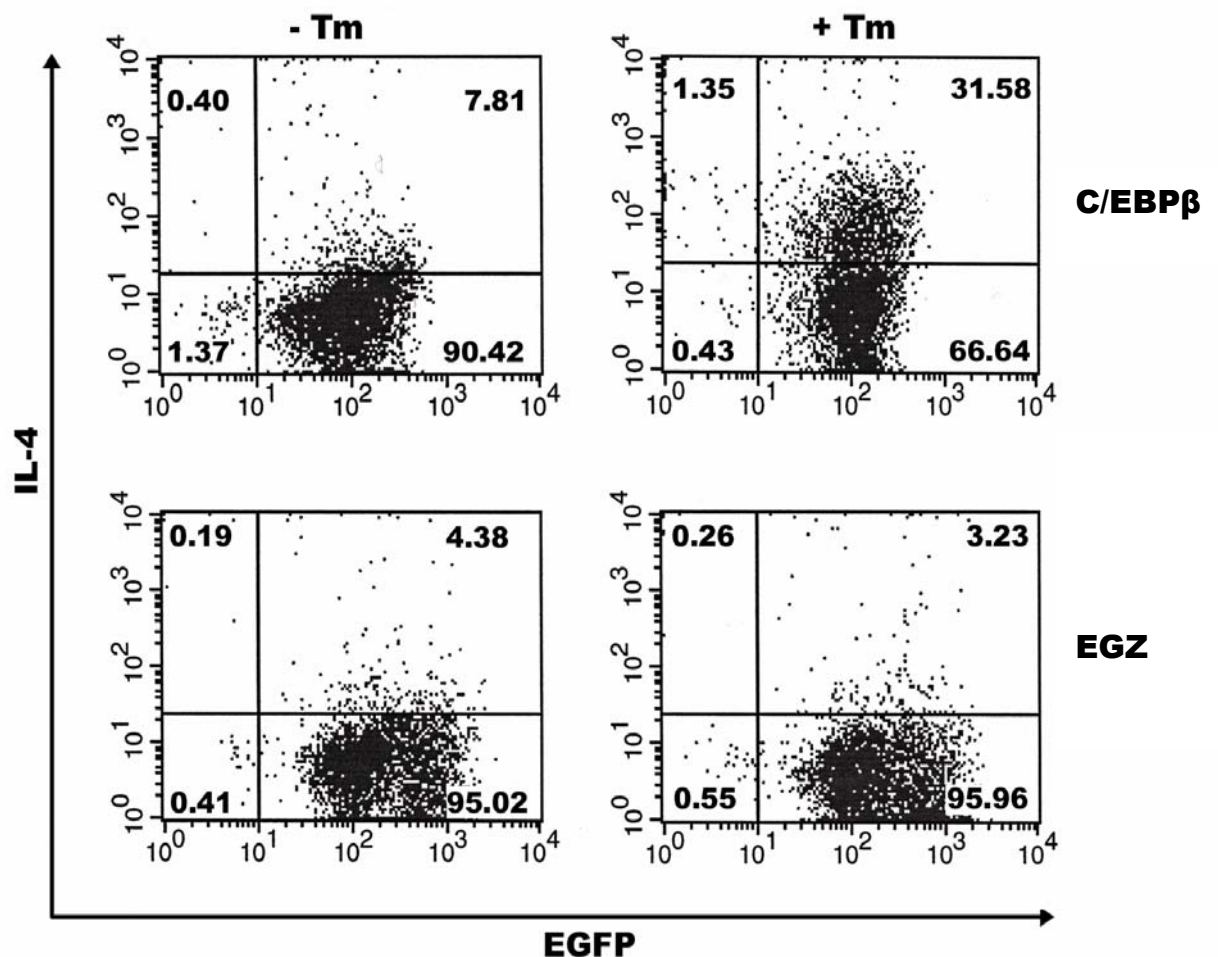


Abb. 3: Intrazelluläre IL4-Färbung. EL4-Zellen wurden durch den Retrovirus pEGZ/C/EBP $\beta$ -ER oder pEGZ/MCS infiziert. Nach Stimulation mit Tamoxifen wurde die IL4-Produktion durch intrazelluläre Färbung bestimmt.

Im parallel angesetzten Versuchsaufbau wurde die Wirkung von intrazellulär erhöhter C/EBP $\beta$ -Konzentration auf die IL2-Expression gemessen (Abb. 4). Nach Stimulation mit TPA/Ionomycin kam es sowohl in der C/EBP $\beta$  positiven Population wie auch in der Kontrollgruppe bei ca. einem Viertel der Zellen zur IL2-Expression (linke Diagramme, obere rechte Quadranten). Nach zusätzlicher Aktivierung der nukleären C/EBP $\beta$ -Expression durch Gabe von Tm zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlicher Rückgang der IL2-Expression in der C/EBP $\beta$  positiven Population (rechte Diagramme, obere rechte Quadranten).

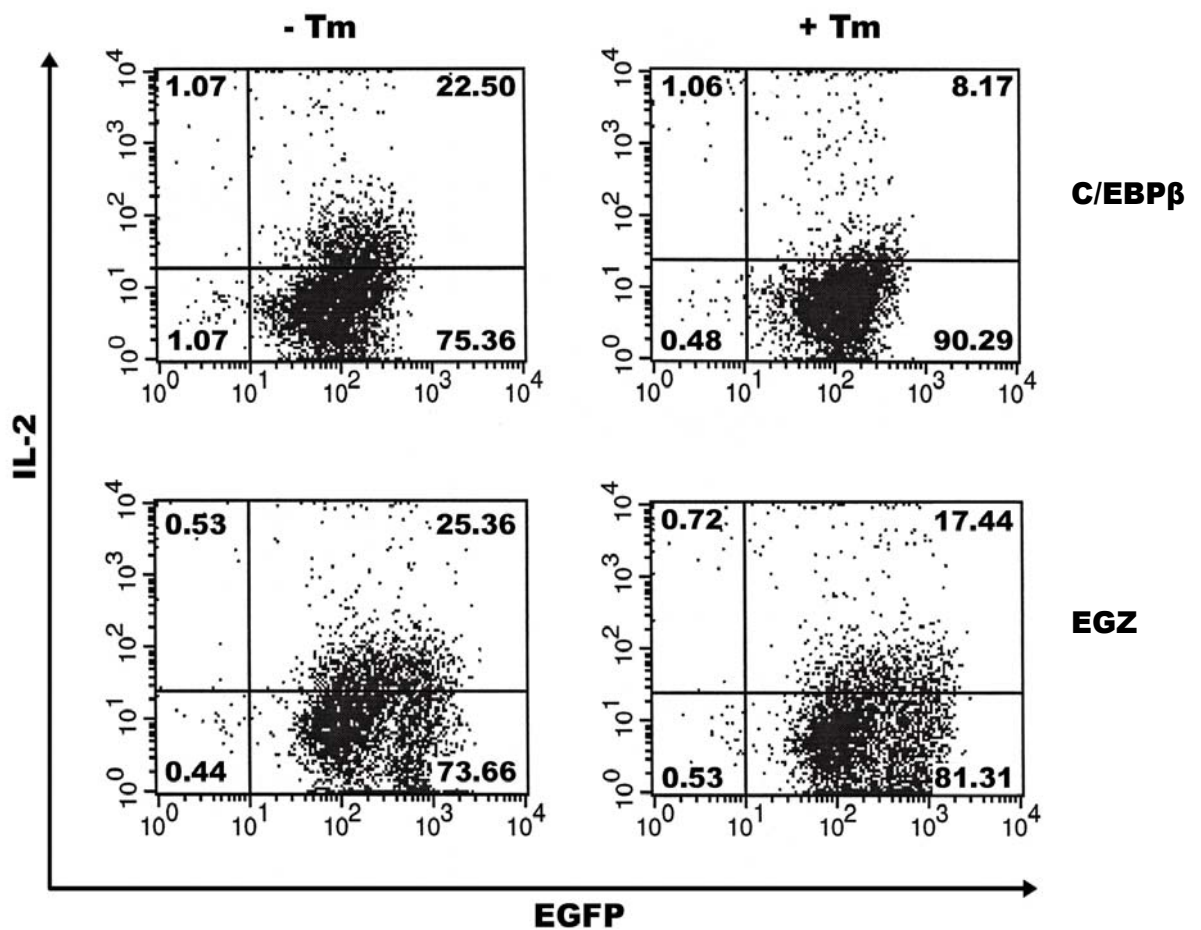


Abb. 4: Intrazelluläre IL2-Färbung. EL4-Zellen wurden durch den Retrovirus pEGZ/C/EBP $\beta$ -ER oder pEGZ/MCS infiziert. Nach Stimulation mit Tamoxifen wurde die IL2-Produktion durch intrazelluläre Färbung bestimmt.



Zusammenfassend konnte die Abnahme von IL2 durch C/EBP $\beta$ -Aktivität auch auf Proteinebene demonstriert werden. Damit wird die Differenzierung durch C/EBP $\beta$  Richtung Th2 erneut unterstrichen.

## **2.2. C/EBP $\beta$ reprimiert den IL2 Promotor**

Der Einfluss von C/EBP $\beta$  auf die Zytokinexpression und damit auf die Zytokinumgebung naiver T-Zellen wird auf RNA-Ebene vermittelt. Deshalb wurde die direkte Wirkung einer C/EBP $\beta$ -Transaktivierung bzw. Transrepression auf Zytokinpromotoren, im speziellen auf den IL2- und IL4-Promotor, untersucht. Da wir für den IL4-Promotor additive Effekte von C/EBP $\beta$  und NFAT gefunden hatten, wurde weiterhin der Einfluß von C/EBP auf die Transaktivierung des IL2-Promotors durch NFAT untersucht. Die Promotoren wurden zu diesem Zweck in den sogenannten tata-luc-Vektor kloniert. Dieser enthält neben dem Reporter gen Luciferase einen Minimalpromotor, der zwar eine TATA-Box, aber kein CCAAT-Element, das durch C/EBP aktiviert würde, enthält. Aktivierende oder hemmende Einflüsse von Transkriptionsfaktoren auf die Zytokinpromotoren lassen sich somit anhand der gemessenen Aktivität des exprimierten Luciferins ableiten. Transfiziert wurden murine EL4-Zellen. C/EBP $\beta$  wurde mit Hilfe des pMEX-Vektors, d.h. unter der Kontrolle von MSV, und NFATc2 unter der Kontrolle von RSV (Bluescript) exprimiert. Das Reporter gen und die Transaktivatoren bzw. Transrepressoren wurden im Verhältnis 1:3 beigegeben. Ausgewertet wurde die Luciferaseaktivität ohne und mit Stimulation des Zellansatzes durch TPA und Ionomycin.

Erwartungsgemäß wurde der IL4-Promotor durch C/EBP $\beta$  aktiviert, was zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität um das 5-7 fache gegenüber der Grundaktivität führte. Die Aktivierung über C/EBP $\beta$  war stärker als die Aktivierung über NF-ATc2. Bei der Transfektion beider

Transkriptionsfaktoren zeigte sich eine Summation beider aktivierenden Effekte (Abb. 5).

Die Kotransfektion des IL2-Promotors mit C/EBP $\beta$  hingegen führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität um das 2-4 fache gegenüber der Grundaktivität. In der Kontrolle zeigte der IL2 Promotor eine deutliche Aktivitätszunahme nach Kotransfektion mit NF-ATc2. Wurden beide Transkriptionsfaktoren transfiziert, hob sich die aktivierende Wirkung von NF-ATc2 und die repressive Wirkung von C/EBP $\beta$  gegenseitig auf (Abb. 5).

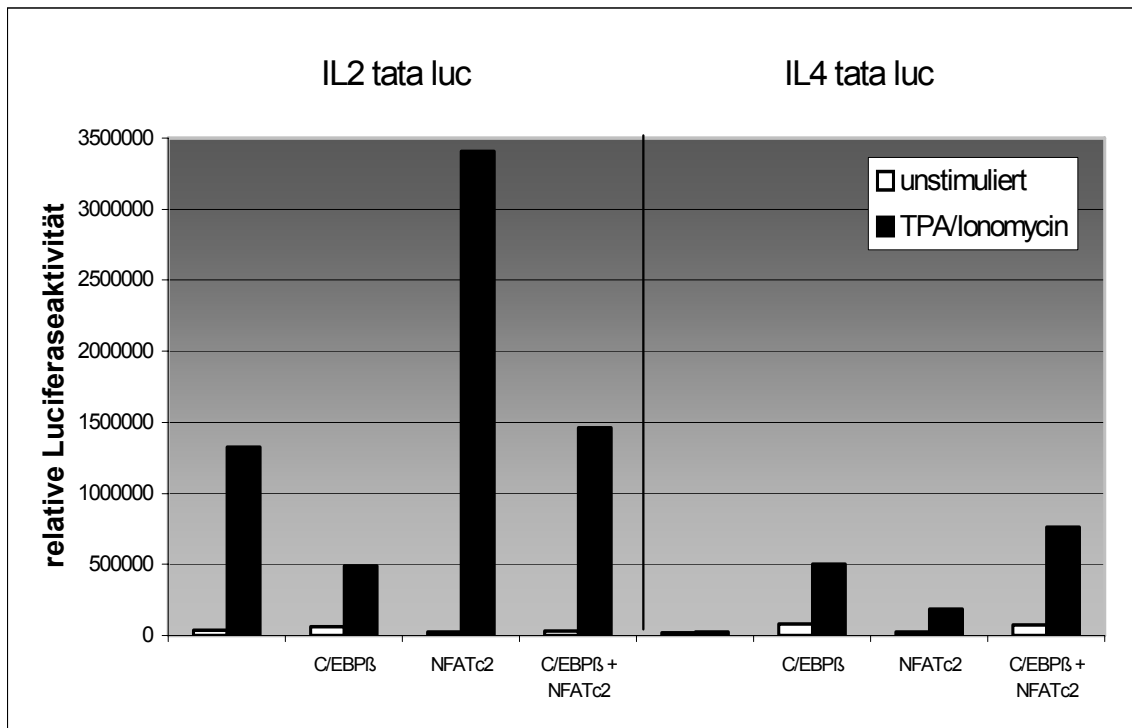


Abb. 5: C/EBP $\beta$  inhibiert die IL2- und stimuliert die IL4-Aktivität in EL4-Zellen. DEAE-Transfektionen von IL2- und IL4-Promotor-Reporter-Genkonstrukten und Expressionsvektoren für C/EBP $\beta$  und NFATc2. Auswertung der Luciferaseaktivität mit und ohne Stimulation mit TPA/Ionomycin.

### 2.3. C/EBP $\beta$ vermittelt seinen reprimierenden Effekt auch in nicht-lymphoiden Zellen

In einer zweiten Versuchsreihe sollte nun der Effekt von C/EBP $\beta$  auf den IL2- und IL4-Promotor in nicht-lymphoiden Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Vektoren (IL2 tata luc bzw. IL4 tata luc) mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Präzipitation in humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293T transfiziert. Nach Kotransfektion mit pMSV bzw. pMSV-C/EBP $\beta$  wurden die Zellansätze mit TPA/Ionomycin und teilweise zusätzlich mit dem PKA-Aktivator Forskolin stimuliert. Forskolin führt über die Aktivierung der Proteinkinase A zu Phosphorylierungen von C/EBP $\beta$ , die Kernlokalisierung und DNA-Bindung positiv beeinflussen [26,114].

Abb. 6 zeigt die Effekte von C/EBP $\beta$  auf die IL2-Promotor-Aktivität. In allen 3 Ansätzen führte die Kotransfektion mit C/EBP $\beta$  zu einer Aktivitätsreduktion des Promotors. Die zusätzliche Stimulierung durch Forskolin reduzierte die TPA/Ionomycin-vermittelte Aktivität des IL2-Promotors leicht, was auch in Anwesenheit von C/EBP $\beta$  nicht verstärkt wurde. Die Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  durch PKA führt in diesem System also zu keiner Aktivitätssteigerung.

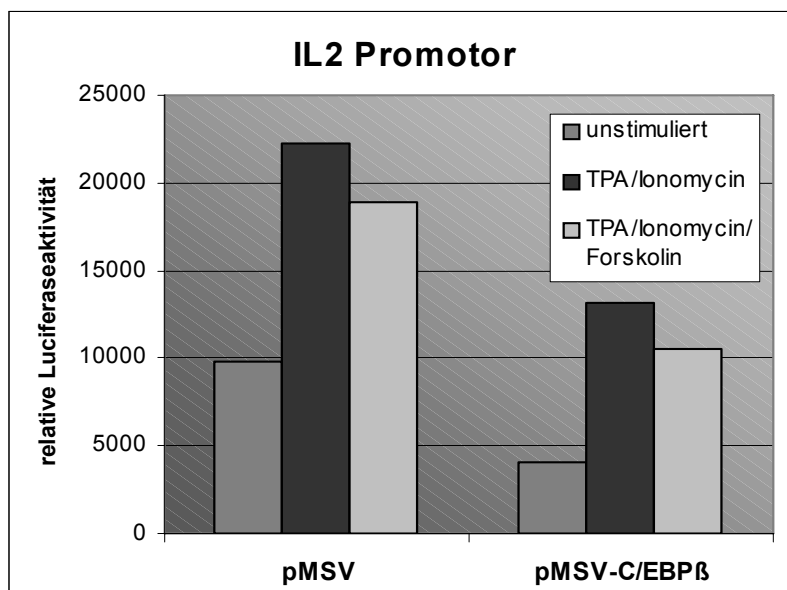


Abb. 6: C/EBP $\beta$  inhibiert die IL2-Aktivität in 293T-Zellen. Kotransfektion von pMSV bzw. pMSV-C/EBP $\beta$  und IL2-tata-luc mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation. Auswertung der Luciferaseaktivität ohne und nach Stimulation mit TPA/Ionomycin oder TPA/Ionomycin plus Forskolin.

Abb. 7 zeigt im Parallelversuch den Effekt von C/EBP $\beta$  auf den IL4-Promotor. Es zeigte sich erneut der stimulierende Effekt auf die Promotoraktivität, der besonders in nicht stimulierten Zellen deutlich wurde. In diesem Versuch verstärkte die Stimulation mit Forskolin den aktivierenden Effekt leicht.

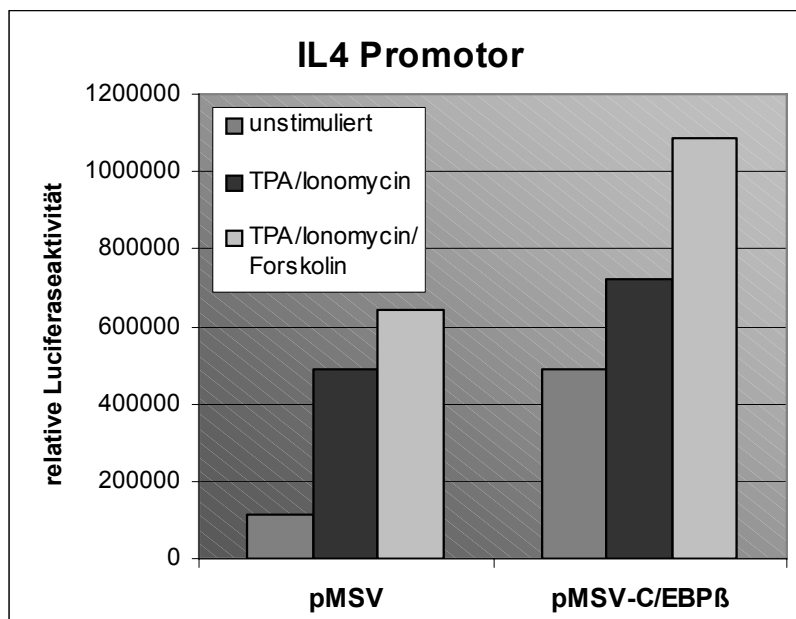


Abb. 7:

C/EBP $\beta$  stimuliert die IL4-Aktivität in 293T-Zellen. C/EBP $\beta$  stimuliert die IL4-Aktivität in 293T-Zellen. Kotransfektion von pMSV bzw. pMSV-C/EBP $\beta$  und IL4-tata-luc mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation. Auswertung der Luciferaseaktivität ohne und nach Stimulation mit TPA/Ionomycin oder TPA/Ionomycin plus Forskolin.

## 2.4. Verkürzung des IL2 Promotors führt zum Aktivitätsverlust

Um den Mechanismus, der zur Aktivitätsreduktion des IL2-Promotors durch C/EBP $\beta$  führt, zu erkennen, wurde untersucht, ob innerhalb des Promotors eine Bindungsstelle für C/EBP $\beta$  existiert, die möglicherweise direkt für die C/EBP $\beta$ -vermittelte Inhibition verantwortlich ist. Das würde bedeuten, dass sich bei Fehlen dieses Teilstückes die Aktivitätsreduktion nicht mehr so deutlich darstellt. Aus diesem Grund bestand der erste Ansatz in der Herstellung von IL2-Promotor-Deletionsmutanten. Dafür sollte der IL2-Promotor sowohl vom 5'- als auch vom 3'- Ende her verkürzt werden. Die Aktivität der Deletionsmutanten sollte anschließend in weiteren Transfektionen ermittelt werden.

Fragmente des IL2-Promotors, denen Teile des 3'- Endes verschiedener Länge fehlten, existierten bereits, mussten aber in den tata luc-Vektor umgesetzt werden. Teilstücke des Promotors mit abnehmender Länge des 5'- Endes wurden mittels Exonuclease III / S I - Deletion erzeugt. Diese Exonuclease verkürzt den DNA-Strang in einer Reaktionsgeschwindigkeit, die abhängig von der NaCl-Konzentration im Reagenz ist. Bei einer NaCl-Konzentration, bei der die Reaktion sehr langsam abläuft, konnten nach Beenden der Reaktion zu vorher definierten Zeitpunkten, eine Vielzahl, am 5'- Ende verkürzter Fragmente des Promotors, hergestellt werden. Diese wurden direkt in den tata-luc-Vektor ligiert.

Abb. 8 zeigt, wie sich die verkürzten Fragmente gegenüber dem kompletten IL2-Promotor darstellten, nachdem sie mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem tata-luc-Vektor herausgeschnitten worden waren. Durch Sequenzierung wurden diejenigen Klone zur weiteren Analyse bestimmt, deren Fragmente zwischen schon bekannten Bindungsstellen endeten (Abb. 9).

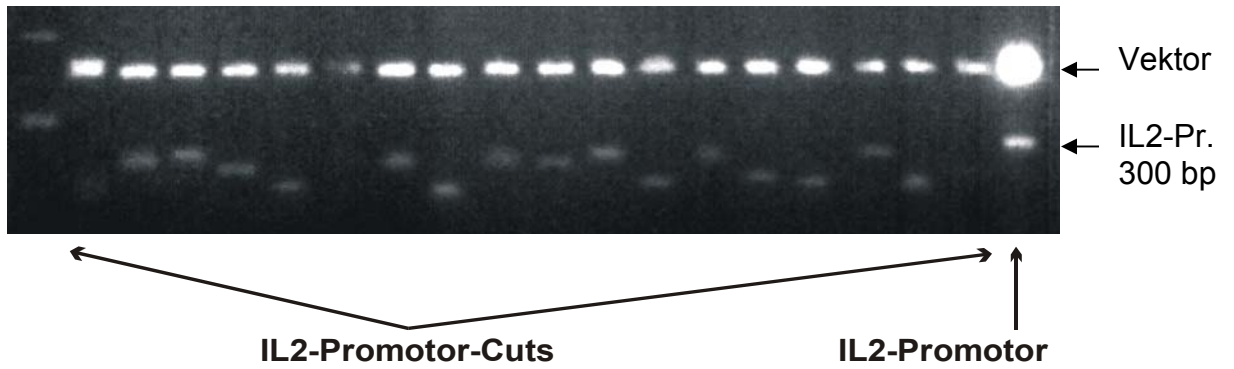


Abb. 8: Deletionsmutanten und kompletter IL2-Promotor nach Restriktionsverdau

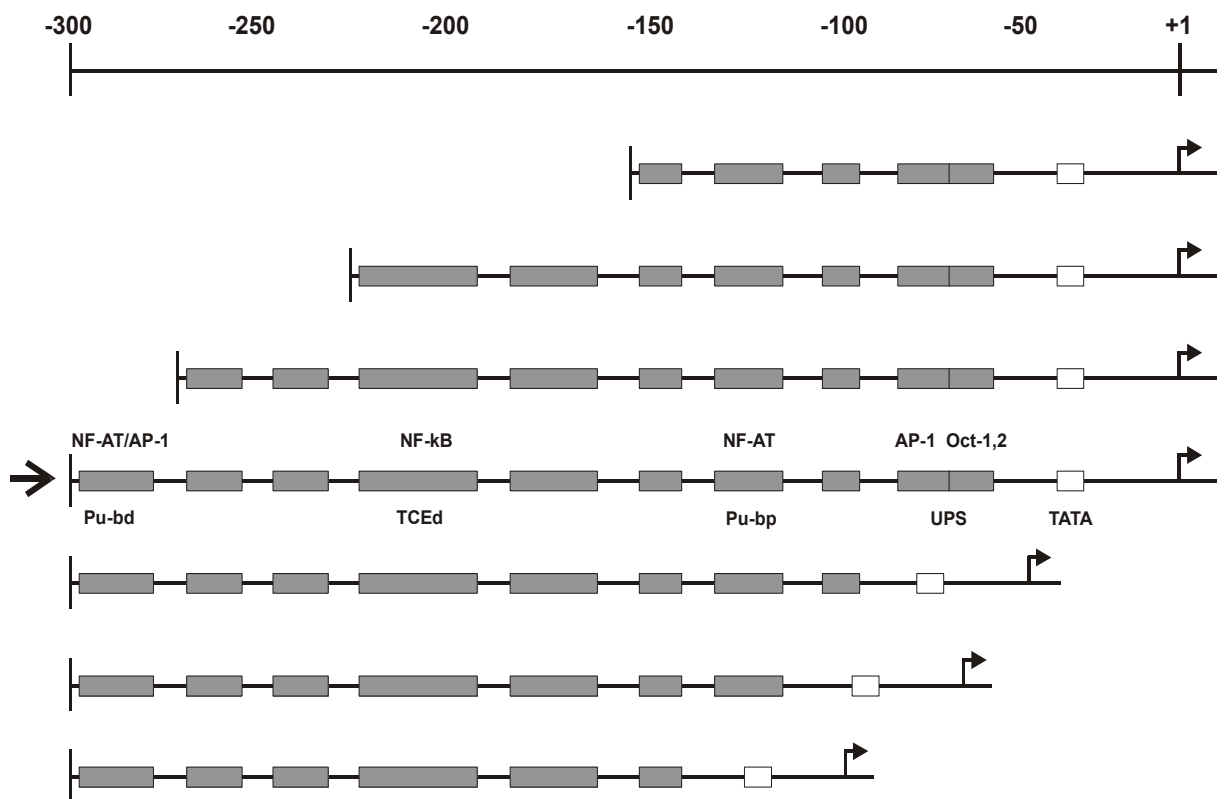


Abb. 9: Schematische Darstellung des IL2-Promotors (Pfeil) und der IL2-Promotor-Deletionsmutanten, deren Aktivitäten nachfolgend in Reporterassays bestimmt wurden.

Nach DEAE/Dextran-Transfektion des IL2-Promotors bzw. der abgebildeten Deletionsmutanten und Kotransfektion von pMSV-C/EBP $\beta$  bzw. pMSV in EL4-Zellen zeigte sich im Vergleich zum kompletten Promotor bei allen Fragmenten eine Reduktion der relativen Luciferaseaktivität um mindestens den Faktor 100 (keine Abb.). Schon das Fehlen der randständigen Bindungselemente, sowohl am 3'- als auch am 5'- Ende, führte praktisch zum Funktionsverlust des Promotors.

Dieser starke Aktivitätsverlust ist dadurch zu erklären, dass der Promotor von zwei für seine Transaktivierung sehr wichtigen Elementen begrenzt wird. Am 5'- Ende befindet sich, wie schon in der Einleitung erwähnt, die distale Pu-Box. Sie bindet sowohl NF-AT als auch Faktoren der AP-1 Familie. Schon bei alleinigem Verlust dieser Bindungsstelle war nahezu keine Grundaktivität mehr messbar. Das UPS-Element am 3'- Ende des Promotors besitzt ein vergleichbares Aktivitätspotential. Als Bindungsstelle für die AP-1 und Octamer Faktoren, führt auch sein alleiniger Verlust zu einer dramatischen Reduktion der Luciferaseaktivität um den Faktor 100.

Dies bedeutete aber auch, dass im Bezug auf die Eingrenzung eines inhibitorischen Elements im IL2-Promotor keine Auswertung möglich war.

## **2.5. C/EBP $\beta$ bindet und aktiviert das UPS-Element des IL2-Promotors**

Nachdem der Versuch, die mögliche inhibierende Bindungsstelle durch Transfektion mit IL2-Promotor-Deletionsmutanten zu erkennen, zu keinem auswertbaren Ergebnis führte, sollte eine direkte Bindung zwischen C/EBP $\beta$  und einzelnen Abschnitten des Promotors in vitro untersucht werden. Wegen der Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen der perfekten C/EBP-Bindungsstelle und der Bindungsstelle für AP-1 innerhalb des UPS-Elements, wurde zuerst dieses Element analysiert.

C/EBP $\beta$ :                                    **T T G C G C A A**

AP-1 / UPS<sub>IL2</sub> (-88 / -81):    ... **A T G T G T A A** ...

Mit Hilfe eines EMSA (electro mobility shift assay) wurde untersucht, ob C/EBP $\beta$  direkt an das UPS-Motiv des IL2-Promotors bindet. Dazu wurden 293T-Zellen mit pMSV-C/EBP $\beta$  transfiziert und nach 20h mit TPA/Ionomycin stimuliert. Kernextrakte, die nach weiteren 24h präpariert worden waren, wurden mit radioaktiv markierter UPS-Sequenz inkubiert.

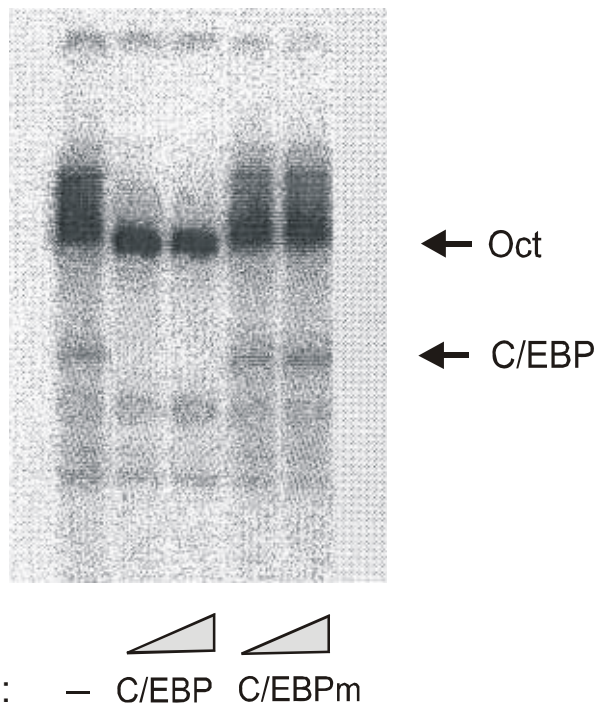


Abb. 10: C/EBP $\beta$  bindet an das UPS-Element des IL2-Promotors

In der ersten Spur erkennt man zwei mit Pfeilen gekennzeichnete Banden. Neben der typischen oberen Bande, die durch Bindungen von Octamerfaktoren entsteht, zeigte sich eine untere Bande. Nach Kompetetierung mit einem Überschuß an unmarkiertem C/EBP $\beta$ -Oligo war diese Bande nicht mehr zu erkennen (Spur 2 + 3). Eine Kompetetierung



durch ein C/EBP $\beta$ -Mutanten-Oligo (C/EBP $_M$ ), das nicht bindungsfähig ist, führte hingegen zu keiner Veränderung (Spur 4 + 5). Deshalb entspricht die untere Bande einem Komplex von C/EBP $\beta$  und UPS-Bindungsstelle.

Zur Klärung, ob eine Interaktion mit dieser wichtigen Transaktivierungsdomäne zu einer Hemmung führt, wurde das UPS-Element oligomerisiert und in den tata-luc-Vektor kloniert. EL4-Zellen wurden mit 5 x UPS-tata-luc und pMSV bzw. pMSV-C/EBP $\beta$  kotransfiziert. Wie in Abb. 11 zu sehen, zeigte sich wider Erwarten ein aktivierender statt eines reprimierenden Effektes. Allerdings verifiziert die über das UPS-Element vermittelte Aktivität von C/EBP $\beta$  die beobachtete Bindung in vitro auch in vivo.

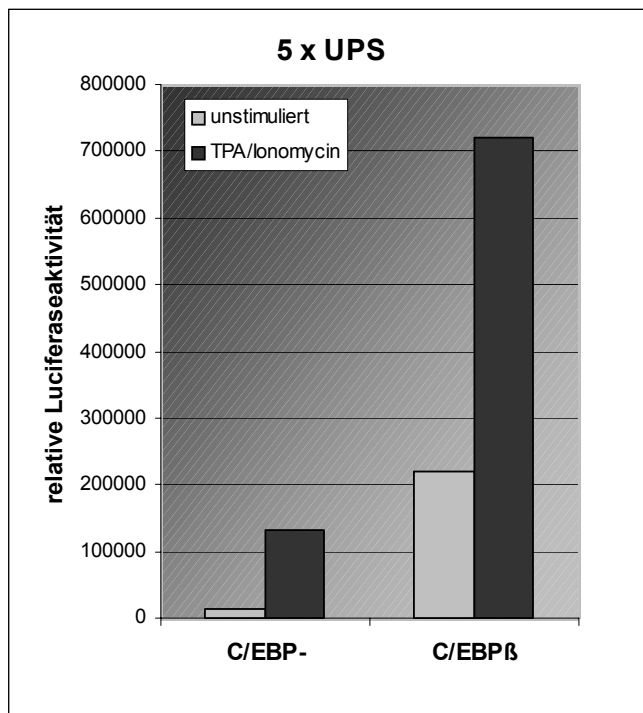


Abb. 11:

C/EBP $\beta$  aktiviert das UPS-Element des IL2-Promotors. Die DEAE-Transfektion eines 5-fachen UPS-Polymers gebunden an das Luciferase-Reportergen zeigt nach Kotransfektion mit C/EBP $\beta$  und Stimulation mit TPA/Ionomycin eine deutliche Aktivitätssteigerung.

## 2.6. C/EBP $\beta$ inhibiert die Pu-b<sub>d</sub> ohne direkte Bindung

Unsere Arbeitsgruppe [11] und die Arbeitsgruppe um Li-Weber [30] konnten nachweisen, dass C/EBP innerhalb des IL4-Promotors an die AP-1 Bindungsstelle bindet, die unmittelbar einer NF-AT-Bindungsstelle (Pu-b<sub>D</sub>) anliegt. Solch eine schwache AP-1 Bindungsstelle befindet sich auch neben der distalen Pu-box (Pu-b<sub>d</sub>) im IL2-Promotor. Möglicherweise könnte C/EBP $\beta$  dort mit dem aktivierenden AP-1 um die Bindung konkurrieren.

Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden EL-4 Zellen mit einem dreifachen Pu-b<sub>d</sub> Polymer und C/EBP bzw. zur Positivkontrolle mit NF-AT transfiziert. Tatsächlich führte die Kotransfektion mit C/EBP $\beta$  zu einer Aktivitätsreduktion des Polymers, gemessen an einer Halbierung der relativen Luciferaseaktivität. NF-AT hatte wiederum eine aktivierende Wirkung.

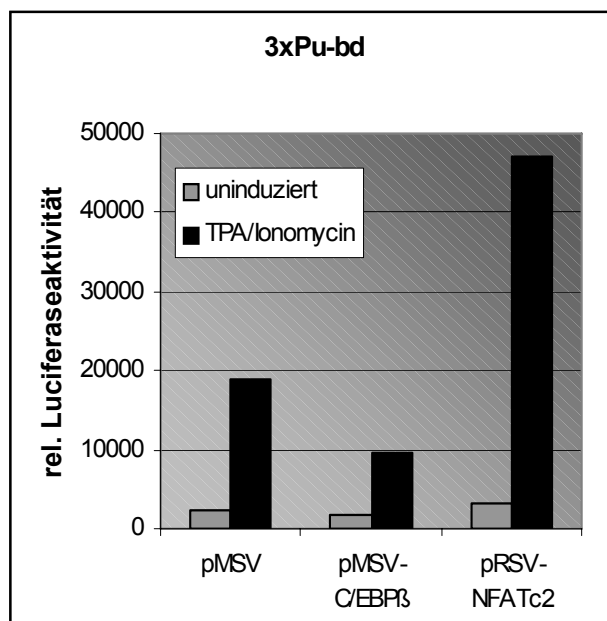


Abb. 12:

C/EBP $\beta$  reduziert und NFATc2 erhöht die Aktivität der Pu-b<sub>d</sub> des IL2-Promotors. Die DEAE-Transfektion eines 3-fachen Pu-b<sub>d</sub>-Polymers gebunden an das Luciferase-Reportergen zeigt nach Kotransfektion mit C/EBP $\beta$  und Stimulation mit TPA/Ionomycin eine deutliche Reduktion der Aktivität.

Zur Klärung, ob die Pu-b<sub>d</sub> tatsächlich als C/EBP-Bindungsstelle fungiert, wurde erneut ein EMSA durchgeführt. Kernextrakte aus humanen 293T Zellen, die mit Kontrollvektor oder C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor transfiziert waren, wurden hierzu mit der markierten Pu-b<sub>d</sub>-Sequenz inkubiert. Als Kontrolle dienten die Sequenzen der Pu-b<sub>D</sub> und Pu-b<sub>B</sub> aus dem IL4 Promotor, die unsere Arbeitsgruppe bereits als Bindungsstelle beschrieben hatte.

Abb. 13 zeigt das Ergebnis des EMSA. Die erste Spalte beschreibt die markierten Proben (Pu-b<sub>D</sub>, Pu-b<sub>B</sub> und Pu-b<sub>d</sub>), darunter erkennt man die spezifischen Kompetitierungen. Die mit dem Pfeil markierten Banden ergeben sich aus der Komplexbildung zwischen den markierten Proben und C/EBP $\beta$ . Die bereits vorbeschriebene Bindung von C/EBP $\beta$  an die Pu-b<sub>D</sub> des IL4-Promotors wird in den Spuren 1-7 deutlich. Spur 1 zeigt ohne Zugabe von C/EBP $\beta$  erwartungsgemäß keine Bande. Im Gegensatz dazu bildet C/EBP $\beta$  in Spur 2 einen Komplex mit der Pu-b<sub>D</sub>. Diese Bande ist nach Zugabe eines Überschusses unmarkierten C/EBP aufgrund der Kompetetierung nicht mehr nachweisbar (Spur 3). Wird die Kompetetierung durch eine nicht bindende Mutante C/EBPm durchgeführt, kommt es erneut zur Komplexbildung (Spur 4). Spur 5 zeigt, dass die Kompetetierung mit Pu-b<sub>D</sub> die Komplexbildung nicht eindeutig vermindert. Hingegen führt die Zugabe von Pu-b<sub>B</sub> zu einer deutlich schwächeren Bande, da die unmarkierte Pu-b<sub>B</sub> mit der Pu-b<sub>D</sub> um die Bindung mit C/EBP $\beta$  kompetitiert (Spur 6). Der supershift durch C/EBP-Antikörper in Spur 7 verdeutlicht die Spezifität der Komplexbildung zwischen C/EBP $\beta$  und Pu-b<sub>d</sub>.

Spuren 8 bis 11 bestätigen erneut die vorbeschriebene Bindung zwischen C/EBP $\beta$  und der Pu-b<sub>B</sub> des IL4-Promotors. In der Zusammensetzung entsprechen diese Spuren den ersten 4 Spuren, wobei als markierte Probe diesmal Pu-b<sub>B</sub> beigegeben wurde. Auch hier zeigt sich eine spezifische Bande durch Komplexbildung, die sich durch unmarkiertes C/EBP (Spur 9), nicht aber durch die Mutante C/EBPm (Spur 10),

kompetetieren lässt. Die Spuren 12 bis 15 beinhalten als markierte Probe die Pu-b<sub>d</sub> des IL2-Promotors. Hier zeigt sich nach Zugabe von C/EBP $\beta$  keine spezifische Bande, so dass eine direkte Bindung von C/EBP an die Pu-b<sub>d</sub>, zumindest für die in vitro Bedingungen des EMSA ausgeschlossen werden konnte.

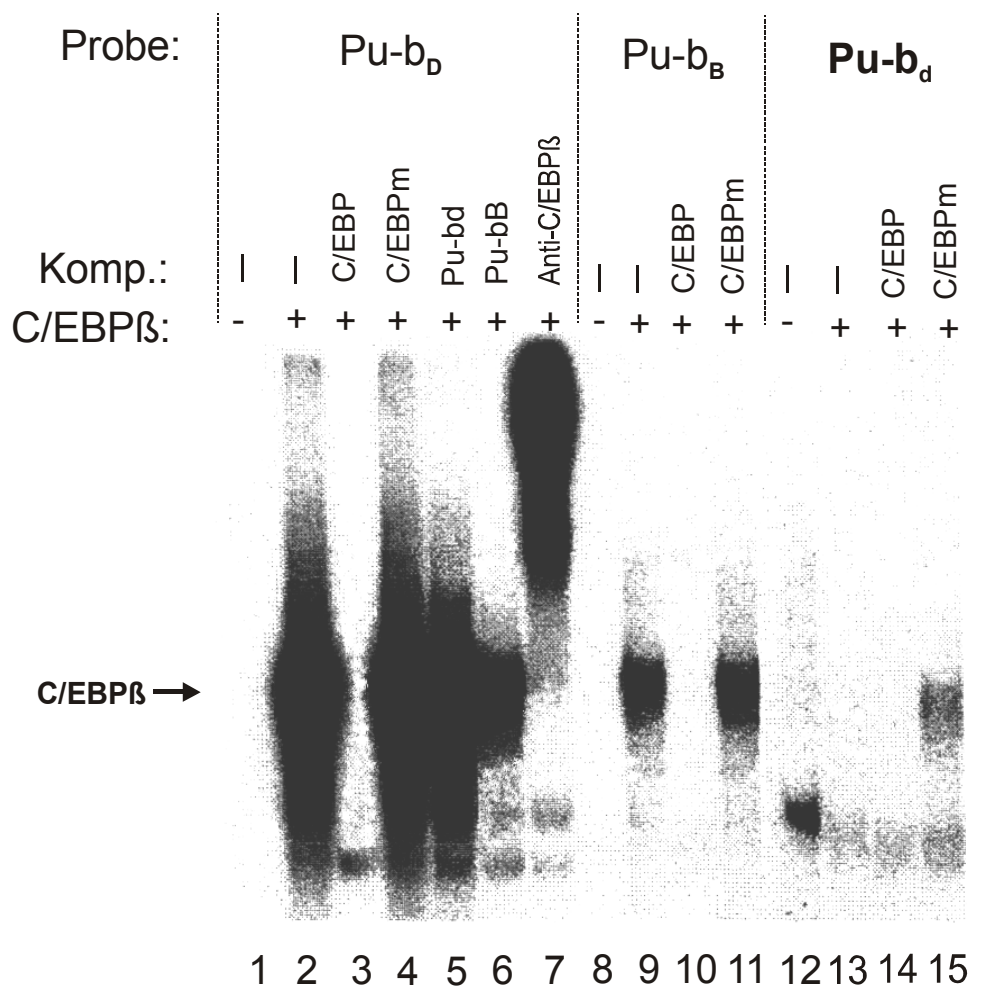


Abb. 13:

C/EBP bindet nicht die Pu-bd des IL2-Promotors. Kernextrakte von 293-Zellen, die mit C/EBP $\beta$ -Expressionsvektor inkubiert waren, wurden in einem EMSA mit Pu-b<sub>D</sub> (Spur 1-7), Pu-b<sub>B</sub> (Spur 8-11) und Pu-b<sub>d</sub> (Spalt 12-15) inkubiert.

## 2.7. C/EBP $\beta$ bindet nicht das TCEd-Element des IL2-Promotors

Wie bereits erwähnt, ist auch die Familie der  $\kappa$ B-Faktoren an der Aktivierung des IL2 Promotors beteiligt. Die Bindung von NF- $\kappa$ B erfolgt über das zentrale Element TCEd (distales T cell element), positioniert zwischen -215 und -191 [17, 42, 59]. Eine direkte Bindung von C/EBP $\beta$  an dieses Element könnte die aktivierende Wirkung von NF- $\kappa$ B verhindern und so die Gesamtaktivität reduzieren.

In einem EMSA wurden Kernextrakte aus, mit Leervektor oder C/EBP $\beta$ -Expressions-Vektor transfizierten, 293T-Zellen und dem markierten TCEd-Element des IL2-Promotors inkubiert. Zur Positivkontrolle dienten wiederum Ansätze mit der markierten Pu-b<sub>D</sub> des IL4-Promotors. Abb. 14 zeigt das Ergebnis der EMSA. In die Spuren 1 bis 9 wurden die markierte Probe TCE<sub>d</sub> ohne (1-4) und mit C/EBP $\beta$  (5-9) aufgetragen. Es zeigte sich keine spezifische Bande als Hinweis auf eine Komplexbildung von TCE<sub>d</sub> und C/EBP $\beta$ . Auch der supershift mit anti-C/EBP $\beta$  führte zu keiner Veränderung. In den Kontrollspuren 10 bis 16, die als markierte Proben Pu-b<sub>D</sub> beinhalteten, zeigte sich ein spezifischer Komplex (Spur 13 + 14), der durch Kompetetierung mit C/EBP $\beta$  nicht mehr nachzuweisen war (Spur 15). Durch die Reaktion mit anti-C/EBP $\beta$  im supershift (Spur 16) liess sich erneut die Bindung von C/EBP $\beta$  an die Pu-b<sub>D</sub> bestätigen.

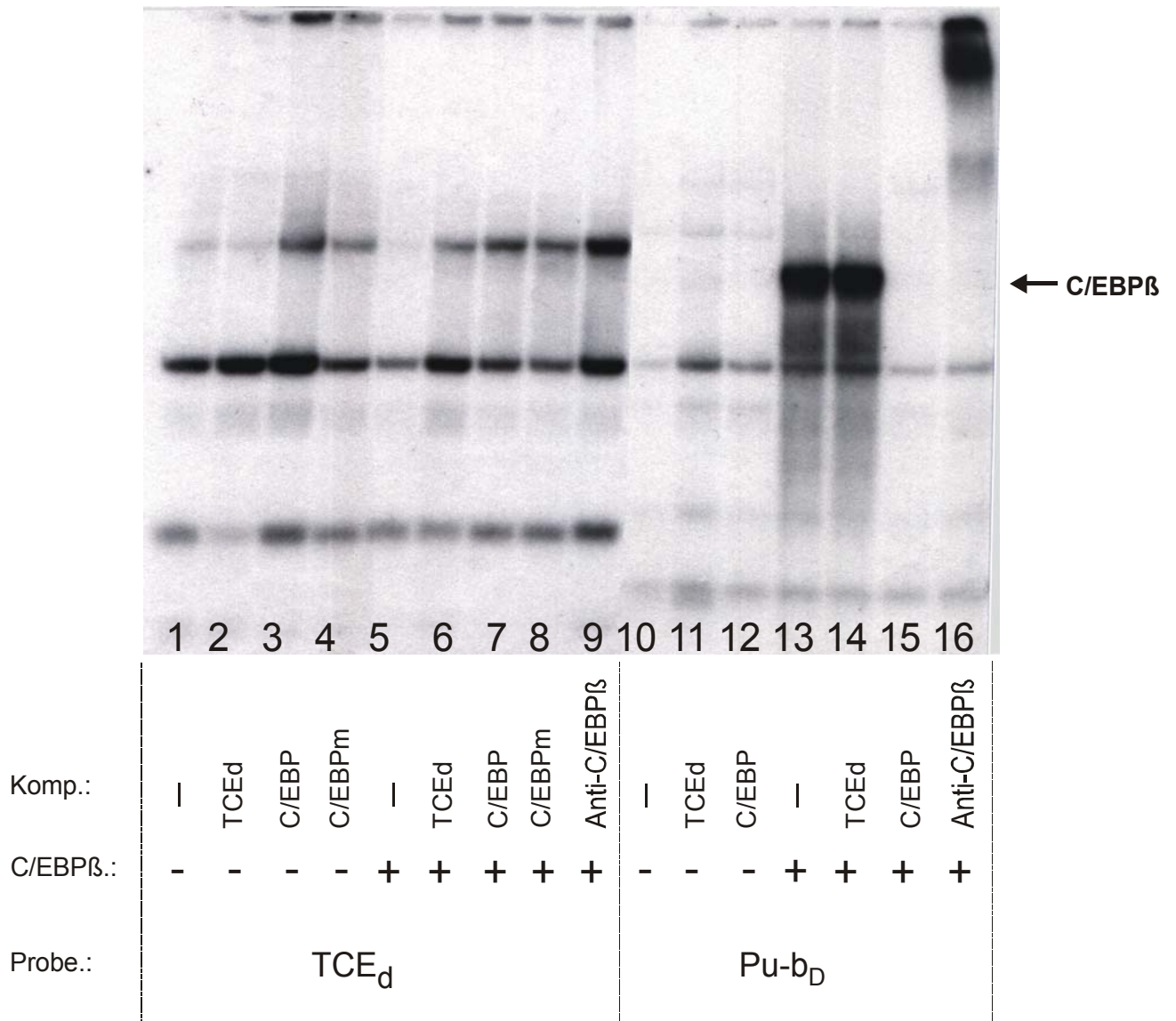


Abb. 14:

C/EBP bindet nicht das TCEd-Element des IL2-Promotors. Kernextrakte von 293T-Zellen, die mit C/EBPβ-Expressionsvektor inkubiert waren, wurden in einem EMSA mit TCEd (Spur 1-9) und Pu-bD (Spur 10-16) inkubiert.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Zellen**

Murine T-Lymphomzellen der Zelllinie EL-4 wuchsen in mit 5% fötalem Kälberserum (FCS) angereichertem RPMI-Medium. Humane embryonale Nierenzellen (HEK) der Zelllinie 293T wuchsen in mit 10% FCS angereichertem Dulbecco modifiziertem Eagle-Medium (DMEM).

#### **3.2. Transfektionen**

Die EL-4 Zellen wurden nach dem konventionellen DEAE/Dextran Protokoll transfiziert [62]. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/ml benutzt. Die Zugabe der DNA erfolgte im Verhältnis 1:3 bezüglich Reportergen und Expressionsvektoren (2µg tata luc-Vektor / 6µg C/EBP bzw. NFAT). Die Induktion mit TPA (10ng/ml) und Ionomycin (0,5 µM) erfolgte nach 20 Stunden, die Ernte nach weiteren 24 Stunden.

Die Transfektion der 293T-Zellen erfolgte nach dem konventionellen Calcium-Phosphat-Präzipitationsprotokoll. 16 Stunden vor Transfektion wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/10ml Ansatz verdünnt. Die Zugabe der DNA erfolgte im Verhältnis 1:5 bezüglich Reportergen und Expressionsvektoren (50ng tata luc-Vektor / 250ng C/EBP bzw. NFAT). Die Induktion mit TPA (10ng/ml), Ionomycin (0,5 µM) und Forskolin (50µM) erfolgte nach 20 Stunden, die Ernte nach weiteren 24 Stunden.

### **3.3. Bestimmung der Luciferaseaktivität**

Die Bestimmung der Luciferaseaktivität erfolgte bei beiden Transfektionstechniken 24 Stunden nach Induktion. Dazu wurden die Zellansätze zuerst mit PBS gewaschen. Nach Behandlung mit Harvesting-Mix und Essay-Puffer und Zugabe von ATP wurde die Messung durchgeführt. Zur Abgleichung erfolgte aus den gleichen Proben die Proteinbestimmung mittels Photometer (595nm).

### **3.4. Präparation von Kernextrakten**

Die Herstellung der Kernextrakte erfolgt nach dem Prinzip wie beschrieben bei [99]. Es wurde allerdings kein Nonidet 40 hinzugefügt, stattdessen wurden Zellen durch Scherkräfte geöffnet, indem man sie 10-mal durch eine dünne Injektionsnadel (26 gauge, 0,375 in.) passieren ließ. Nach Zentrifugation wurde das Kernpellet dreimalig in großer Menge Swelling-Puffer gewaschen. Die in Salz löslichen Kernproteine wurden jetzt durch 15-minütiges kräftiges Schütteln im Kühlraum extrahiert. Dann wurden die Kernproteine durch Zentrifugation für 15 Min. bei 12.000 rpm von restlichen hochmolekularen Bestandteilen gereinigt und in Mikroreaktionsgefäße überführt. 2 µl konnten nun zur Proteinbestimmung eingesetzt werden. Gelagert wurden die Kernextrakte nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .



### 3.5. EMSA

In den Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) wurden die Kernextrakte benutzt, die wie oben beschrieben gewonnen wurden. 1–2 µg der Kernextrakte wurden hierfür mit 10000 cpm der <sup>32</sup>P-markierten Oligonukleotide und 10µg Poly dIdC als unspezifischen Inhibitor für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Für supershifts wurde 1µl Antikörper gegen C/EBPβ (Santa Cruz, Katalognummer sc-150x und sc-746x) mitinkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 5% Polyacrylamid(PAA)-Gel aufgetragen. Die Fraktionierung erfolgte über 2 – 3 Stunden bei 220 V und Raumtemperatur. Anschließend erfolgte für 15 Minuten die Fixierung des Gels in 10%-er Essigsäure. Getrocknet wurde das Gel 30 Minuten bei 80°C. Die Autoradiographie wurde für 12 Stunden bei –70°C durchgeführt.

### 3.6. Konstruktion des retroviralen Vektors

Der Konstruktion des retroviralen Vektors pEGZ/MCS durch unsere Arbeitsgruppe [11] basiert auf dem ursprünglichen Vektor pczCFG2 hCD8 IEYZ [61]. Hierbei wurde die U3 Region des 5`LTR des murinen Leukämie-Virus (MuLV) durch den CMV Enhancer ersetzt. Der Originalvektor beinhaltet als Zielgen die humane CD8 cDNA (hCD8). In den infizierten Zellen wird die Expression des chimären Kontrollgens [enhanced green fluorescent protein (EGFP) und zeozin resistance protein (Zeo)] und des Zielgens durch die interne ribosomale entry site (IRES) des Enzephalomyokarditis-Virus gesteuert. Durch Ersetzen der hCD8-cDNA durch eine Sequenz, die Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme (EcoRI, SmaI und BamHI) enthält (multiple cloning site; MCS), entstand der Vektor pEGZ/MCS. Die C/EBPβ cDNA wurde aus dem definierten Konstrukt pMSV-C/EBPβ [120] umgesetzt und an die modifizierte Hormonbindungsstelle des Östrogenrezeptors gebunden, wie es bereits für das chimere c-MycER<sup>TM</sup>-Konstrukt vorbeschrieben ist [62]. Die

Expression von pEGZ/CEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup> in infizierten T-Zellen wurde mit Hilfe von flow cytometry untersucht.

### **3.7. Transfektion/Infektion mit dem retroviralen Vektor**

Die rekombinanten retroviralen Partikel entstanden mit Hilfe des pHIT packaging system. Diese Methode ist in der Literatur ausführlich beschrieben [106]. Zusammenfassend wurden 293T Zellen mit Hilfe der konventionellen Calcium-Phosphat-Transfektion sowohl mit den Expressionskonstrukten der murinen Leukämieviren für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT456) als auch den retroviralen Vektoren pEGZ/CEBP $\beta$ -ER<sup>TM</sup> oder pEGZ/MCS kotransfiziert. Nach 16 Stunden wurde die Transfektionslösung durch RPMI-Medium ersetzt. Weitere 24 und 48 Stunden später wurde der virale Überstand geerntet und durch einen 0,45- $\mu$ m Filter von verunreinigenden Zellen getrennt. Abschließend wurde Polybrene (Sigma) bis zu einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml zugegeben. Mit 2,5ml des viralen Überstandes wurden anschließend 1x10<sup>5</sup> EL-4 Zellen für 3 Stunden zentrifugiert (33°C, 1000rpm), gewaschen und in neues Medium umgesetzt. Diese Prozedur wurde nach 24 Stunden wiederholt. Aufgrund der Selektion durch Zeocin (250  $\mu$ g/ml) wurden hohe Infektionsraten (>80%) erreicht. Dies wurde mittels fluorescence activated cell sorting (FACSVantage, Becton Dickinson) überprüft.

### **3.8. Herstellung der Deletionsmutanten (EXOIII/S1 Deletion Kit)**

Zur Herstellung der Deletionsmutanten des IL2-Promotors wurde das EXOIII/S1 Deletion Kit der Firma MBI Fermentas benutzt. Die Exonuklease ermöglicht rasche unidirektionale Deletionen von DNA. Dabei wurden Plasmide zuerst linearisiert, dann verkürzte die

Exonuklease in einer individuell zu bestimmenden Reaktionsgeschwindigkeit den DNA-Strang am 3'-Hydroxy-Ende.

Die initiale Linearisierung des Ursprungplasmids IL2 tata luc erfolgte durch das Restriktionsenzym Bam H1. Die Deletionsgeschwindigkeit der ExonukleaseIII ist abhängig von der Umgebungstemperatur und der Pufferkonzentration. Bei Raumtemperatur und Verdünnung des Puffers mit 100mM NaCl ergab sich eine Deletionsgeschwindigkeit von ungefähr 20bp/min. Nach dem Start der Reaktion wurde für 25 Minuten in minütlichen Abständen 2µl des Ansatzes in 7,5µl des S1 Nuklease pipettiert um damit die Deletionsreaktion zu stoppen. Die Religation erfolgte nach Standardprotokoll mit der DNA-Ligase T4.

Nach Transformation in E. coli Kulturen (Top F) und Miniprep wurden die gewonnenen Klone durch Restriktionsspaltungen charakterisiert und gegebenenfalls sequenziert.

### **3.9. Präparation von Plasmid-DNA**

#### **3.9.1. Miniprep**

3 ml Selektionsmedium wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft und für mindestens 15 Std. bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und durch 30 Sek. Zentrifugation bei 12.000 rpm pelletiert. Die Plasmid-Aufbereitung erfolgte nun nach dem Protokoll des JETprep-Miniprep-System der Firma GENOMED (Plasmid DNA Isolation and Purification). Die fertige DNA wurde in der Regel mit 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert, zur Kontrolle auf ein Elektrophoresegel aufgetragen, im Restriktionsverdau eingesetzt und sequenziert.

#### **3.9.2. Maxiprep**

Die Bakterien einer großen Übernachtskultur (250-500 ml) wurden durch 10 Min. Zentrifugation im JA-10 Rotor bei 5.000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in dem RNase-haltigen Puffer des Kits resuspendiert und

dann weiter entsprechend der Instruktionen des Herstellers präpariert. Es wurde für diese Arbeit der Quiagen-Maxi-Kit, sowie der Nucleobond-AX-Kit verwendet. Das DNA-Pellet wurde am Schluß zunächst in 500 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, die DNA-Konzentration bestimmt und die DNA mit Restriktionsspaltungen und nachfolgender Gelelektrophorese kontrolliert.

#### 4. Diskussion

Unsere Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vorkommt und vor allem in Th2-Zellen aktiv ist [11]. Er wirkt aktivierend auf die Promotorregion des IL4-Gens und inhibierend auf die Promotorregion des IL2-Gens. Somit beeinflusst C/EBP $\beta$  die Differenzierung von naiven T-Helfer Zellen in Richtung Th2-Zellen. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch FACS-Analysen gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  die Konzentration von IL4-RNA in murinen primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten und Milz transgener Mäuse (DO11.10 TCR) hochreguliert und in EL4-Zellen sogar induziert (Abb.3) [11]. C/EBP $\beta$  bindet direkt an den IL4-Promotor und transaktiviert ihn. Gleichzeitig werden die RNA-Konzentration von IL2 und IFN $\gamma$ , Lymphokine, die in Th1 Zellen exprimiert werden, herunterreguliert, was sich wiederum durch FACS-Analysen auch auf Proteinebene bestätigen ließ (Abb. 4). Dies steht generell im Einklang mit der Tatsache, dass die Mitglieder der C/EBP-Transkriptionsfaktoren in verschiedensten Geweben spezifische Funktionen während der Differenzierung ausüben. Allerdings lassen der Phänotyp der C/EBP $\beta$ -knock-out Mäuse eher auf einen Th1- als auf einen Th2-Phänotyp schließen. Abgesehen von der Nicht-Produktion des IL7, eines der Hauptlymphokine der frühen B- und T-Zellentwicklung [56, 57], ist das Muster der Zytokinproduktion in C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup>-Mäusen relativ normal. Dies kann auf funktionelle Redundanz zwischen den Familienmitgliedern zurückgeführt werden [55], aber das Fehlen von C/EBP $\beta$  resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *Candida*, *Listeria* und *Salmonella*, was auf einen funktionellen Defekt der Makrophagen hindeutet. Entsprechend ist der IL12 Spiegel niedrig, die DTH-Reaktion vermindert und die Th1-Immunantwort gestört. Allein die geringe Menge an (Nicht-T-Zell-produziertem) IL12 kann die abgeschwächte Th1-Antwort erklären. Darüberhinaus werden Splenomegalie, periphere Lymphadenopathien und extramedulläre Hämatopoese beobachtet und völlig unerwarteterweise eine dramatische Erhöhung des IL6-Spiegels.

Der Phänotyp erinnert die Autoren an die Krankheit „Multicentric Castleman's Disease“, bei der auch erhöhte IL6-Spiegel eine große Rolle spielen [100]. Tatsächlich konnten die Auswirkungen der fehlenden C/EBP $\beta$ -Expression durch das Einkreuzen von IL6<sup>-/-</sup>-Mäusen weitestgehend aufgehoben werden. So ist es auch zu vermuten, dass durch die aberrant hohe Expression von IL6 und daraus folgender STAT3-Aktivierung und SOCS-Expression die IFN $\gamma$ -Produktion gehemmt wird bzw. die Th2-Differenzierung direkt gefördert wird [90, 91]. Erneute Analysen der Interleukinexpressionen bzw. Th1/Th2-Antworten an den C/EBP $\beta$  x IL6<sup>-/-</sup> doppel-knock-out Mäusen wurden nicht durchgeführt, werden aber Gegenstand weiterer Untersuchungen im Labor Serfling sein.

Da C/EBP $\beta$  als Transkriptionsfaktor DNA über spezifische Erkennungssequenzen bindet, und damit seinen Einfluss auf die Zytokinexpression durch Regulation der RNA-Menge vermittelt, wurde die direkte Wirkung von C/EBP $\beta$  auf den IL2-Promotor, also eine Transrepression, untersucht. Der IL2-Promotor ist durch eine Vielzahl von Studien als der Bereich von ca. 300 Basenpaaren direkt vor dem IL2-Gen definiert worden. Die Homologien zwischen humanem und murinem Promotor betragen ca. 90 %, wobei die Sequenzen der definierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nahezu identisch sind.

Der Einfluss von C/EBP $\beta$  auf die Aktivität des IL2-Promotors wurde mit Hilfe von Transfektionsversuchen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass C/EBP $\beta$  die Aktivität eines Luciferasereportegenkonstruktes, dem der IL2-Promotor vorgeschaltet war, deutlich reprimiert (Abb. 5). Die Aktivierung des Promotors über Transkriptionsfaktoren wurde für die Faktoren NF-AT, NF- $\kappa$ B, AP-1 und Oct belegt [81].

Die hemmende Wirkung von C/EBP $\beta$  auf den IL2-Promotor könnte durch verschiedene Mechanismen zustande kommen. Eine direkte Bindung von C/EBP $\beta$  an ein Repressorelement wäre denkbar und kann auch nicht

ausgeschlossen werden. Da aber der 300bp-IL2-Promotor nicht weiter reduziert werden kann, er also von der Synergie seiner positiv wirkenden Elemente abhängig ist, war es nicht möglich, die Repression mit Hilfe von Promotor-Deletionsmutanten einzugrenzen. So war das UPS-Element, positioniert am 3`Ende zwischen -63 und -93, essentiell für die Funktion des gesamten Promotors. Aber auch bei Fehlen der am 5`-Ende gelegenen Pu-bd (-285) war aufgrund eines enormen Aktivitätsverlustes keine Auswertung möglich. Dieses Element, Bindungsstelle für NF-AT und AP-1, ist somit ebenfalls obligat für eine ausreichende Promotorfunktion.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass C/EBP $\beta$  an ein wichtiges positives DNA-Bindungselement bindet und somit dieses für den aktivierenden Faktor blockiert. Bei Verlust dieses Elementes gingen dann nicht nur die durch C/EBP $\beta$  reprimierenden, sondern auch die durch den verdrängten Faktor transaktivierenden Eigenschaften verloren. Auch bei diesem Szenario geben Deletionsmutanten keinen Aufschluss.

Andererseits könnte es über eine Dimerbildung zwischen C/EBP $\beta$  und aktivierenden Faktoren auch zu einer Aktivitätshemmung kommen. Beispielsweise ist die Dimerisierung zwischen C/EBP $\beta$  und NF- $\kappa$ B durch Vinson et al. beschrieben [116]. Eine direkte Bindung von C/EBP $\beta$  an das NF- $\kappa$ B-Element des IL2-Promotors TCE<sub>d</sub> konnte aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 14), was nicht ausschließt, dass C/EBP $\beta$  bei Bindung an ein anderes Element im IL2-Promotor oder ohne eigene DNA-Bindung mit NF- $\kappa$ B interagieren und letzteres hemmen könnte.

Ausgehend von unseren Ergebnissen, dass C/EBP $\beta$  im IL4-Promotor NFAT/AP-1-Bindungsstellen erkennt, und der Tatsache, dass das 3-fache Polymer der Pu-bd aus dem IL2-Promotor nach Kotransfektion mit C/EBP $\beta$  in EL4-Zellen eine deutliche und dem Gesamtpromotor vergleichbare Aktivitätsabnahme aufweist (Abb. 12), war es wahrscheinlich, dass C/EBP $\beta$  die distal gelegene NFAT/AP-1-Stelle im IL2-Promotor direkt bindet. Überraschenderweise ließ sich keine direkte Bindung an die Pu-b<sub>d</sub> nachweisen (Abb. 13). Interessanterweise ließ sich

aber die direkte Bindung von C/EBP $\beta$  an das UPS-Element zeigen. Die wichtige Bedeutung von UPS mit seinen beiden Bindungsstellen für AP-1 und Octamer-Faktoren für die Gesamtaktivität des Promotors wurde von unserer Arbeitsgruppe schon früher dokumentiert und anhand der Promotordeletionsmutanten erneut in dieser Arbeit verdeutlicht. Obwohl keine Punktmutationen in das UPS-Element eingeführt wurden, ist davon auszugehen, dass C/EBP $\beta$  wie im IL4 Promotor die AP-1-Erkennungsstelle bindet und bei Bindung mit AP-1 konkurriert. Bestätigung der Bindung, aber nicht der reprimierenden Wirkung auf den Gesamtpromotor zeigte das 5-fache UPS-Polymer nach Transfektion in EL4-Zellen und Kotransfektion mit C/EBP $\beta$ , denn es war eine deutliche Aktivitätssteigerung zu verzeichnen. C/EBP $\beta$  bindet also UPS, führt aber zumindest bei isoliertem Einsatz dieses Elements in Reporterstudien zu einer Aktivierung und nicht zu der erwarteten Repression.

Viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren können sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren wirken. Das äußert sich in ihrer Rekrutierung in verschiedene Multi-Proteinkomplexe, die die Aktivität individueller Promotoren/Enhancer und damit die Transkription stimulieren oder hemmen. Möglicherweise interagiert im kompletten Promotor das an UPS gebundene C/EBP $\beta$  also mit weiteren gebundenen Transkriptionsfaktoren, was zur Bildung anderer Multiproteinkomplexe führt. Andererseits führt neben der aktivierenden Form von C/EBP $\beta$  (LAP) auch die natürlich entstehende, dominant negative (LIP) Version zur Repression von IL2 (F. Berberich-Siebelt, unveröffentlicht). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Rekrutierung anderer Multiproteinkomplexe entscheidend ist. Stattdessen favorisieren wir die einfache Hypothese, dass die AP-1 Bindung innerhalb des UPS von entscheidender Bedeutung für die Gesamtaktivität des IL2-Promotors ist und bei Konkurrenz durch C/EBP $\beta$  oder seine dominant negative Form verloren geht.



## 5. Zusammenfassung

Die Differenzierung von naiven T-Helfer Zellen zu Th1 oder Th2 Zellen ist ein richtungsweisender Schritt der adaptiven Immunantwort und abhängig von der Zytokinumgebung, der von ihnen regulierten Signalwege sowie deren transkriptionellen Effektoren. In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass durch die Expression von C/EBP $\beta$  wesentliche Aspekte der T-Helferzellreifung induziert werden können. In Th2-Zellen unterstützt C/EBP $\beta$  die Differenzierung, indem es einerseits die Aktivierung des Leitlymphokins IL4 fördert [11] und andererseits durch Repression von c-myc einen G1-Arrest des Zellzyklus verursacht und somit die Proliferation stoppt [10]. Durch Infektion von EL4 Zellen mit einem C/EBP $\beta$ -exprimierenden retroviralen Vektor und anschließender RNA-Analyse bzw. intrazellulärer Färbungen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  die Aktivierung des IL2-Gens auf RNA und damit auch auf Proteinebene inhibiert und somit die Differenzierung zu Th1-Zellen einschränkt.

Die reprimierende Wirkung von C/EBP $\beta$  auf IL2 wird über seinen Promotor und zumindest u. a. über die NFAT/AP1-Bindungsstelle Pu-b<sub>d</sub> vermittelt. C/EBP $\beta$  bindet aber nicht mit hoher Affinität an die Pu-b<sub>d</sub>, wohingegen UPS, das kombinierte AP1/Oct-Bindungselement, C/EBP $\beta$  rekrutiert. Isoliert als Polymer wird UPS positiv von C/EBP $\beta$  beeinflusst. Die Bindung von C/EBP $\beta$  innerhalb des Gesamtpromotors wirkt inhibierend, weil es wahrscheinlich mit AP1, das für die positive Interaktion mit anderen gebundenen Faktoren benötigt wird, um DNA-Bindung konkurriert

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] **Abbas AK**, Murphy KM, Sher A (1996) „*Functional diversity of helper T lymphocytes.*“; Nature 383(6603):787-93
- [2] **Agarwal S**, Rao A (1998) „*Modulation of Chromatin Structure Regulates Cytokine Gene Expression during T Cell Differentiation*“; Immunity 9:765-75
- [3] **Akira S**, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990) „*A nuclear factor for IL-expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family.*“; EMBO J 9(6):1897-906
- [4] **Alam T**, An MR, Papaconstantinou J (1992) „*Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response.*“; J. Biol. Chem. 267: 639-638
- [5] **Alberini CM**, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER (1994) „*C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in Aplysia.*“; Cell 76(6):1099-114
- [6] **An MR**, Hsieh CC, Reisner PD, Rabek JP, Scott SG, Kuninger DT, Papaconstantinou J (1996) „*Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response.*“; Mol Cell Biol. 16(5):2295-306
- [7] **Antonson P**, Stellan B, Yamanaka R, Xanthopoulos KG (1996) „*A Novel Human CCAAT/Enhancer Binding Protein Gene, C/EBPe, Is Expressed in Cells of Lymphoid and Myeloid Lineages and Is Localized on Chromosome 14q11.2 Close to the T-Cell Receptor  $\alpha/\delta$  Locus*“; Genomics 35:30-38
- [8] **Attema JL**, Reeves R, Murray V, Levichkin I, Temple MD, Tremethick DJ, Shannon MF (2002) „*The human IL-2 gene promoter can*

*assemble a positioned nucleosome that becomes remodeled upon T cell activation.*“; J Immunol 169(5):2466-76

[9] **Avots A**, Hoffmeyer A, Flory E, Cimanis A, Rapp UR, Serfling E (1997) „*GABP Factors Bind to a Distal Interleukin 2 (IL-2) Enhancer and Contribute to c-Raf-Mediated Increase in IL-2 Induction*“; Mol. Cell. Biol. 17(8):4381-89

[10] **Berberich-Siebelt F**, Berberich I, Andrulius M, Santner-Nanan B, Jha MK, Klein-Hessling S, Schimpl A, Serfling E (2006) “SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells

[11] **Berberich-Siebelt F**, Klein-Hessling S, Hepping N, Santner-Nanan B, Lindemann D, Schimpf A, Berberich I, Serfling E (2000) „*C/EBP $\beta$  enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN- $\gamma$  induction in T cells.*“; Eur. J. Immunol. 30:2576-85

[12] **Bergmann C**, Van Hemmen JL, Segel LA (2001) „*Th1 or Th2: how an appropriate T helper response can be made.*“; Bull Math Biol 63(3):405-30

[13] **Bird JJ**, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL (1998) „*Helper T Cell Differentiation Is Controlled by the Cell Cycle*“; Immunity 9:229-37

[14] **Brabletz T**, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E (1993) „*Transforming Growth Factor  $\beta$  and Cyclosporin A Inhibit the Inducible Activity of the Interleukin-2 Gene in T Cells through a Noncanonical Octamer-Binding Site*“; Mol. Cell. Biol. 13(2):1155-62

[15] **Brabletz T**, Pietrowski I, Serfling E (1991) „*The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer*“; Nucleic Acids Res 19(1):61-67

- [16] **Bretz JD**, Williams SC, Baer M, Johnson PF, Schwartz RC (1994) „*C/EBP-related protein 2 confers lipopolysaccharide-inducible expression of interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 to lymphoblastic cell line.*“; Proc Natl Acad Sci USA 91:7306-10
- [17] **Briegel K**, Hentsch B, Pfeuffer I, Serfling E (1991) „*One base pair change abolishes the T cell-restricted activity of a kB-like proto-enhancer element from the interleukin 2 promoter.*“; Nucleic Acids Res 19(21):5929-36
- [18] **Calkhoven CF**, Muller C, Leutz A (2000) „*Translational control of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression.*“; Genes Dev. 14(15):1920-32
- [19] **Cao Z**, Umek RM, McKnight SL (1991) „*Regulated Expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3t3-L1 cells*“; Genes Dev. 5, 1538-1567
- [20] **Cardineaux JR**, Allaman I, Magistretti PJ (2000) „*Pro-inflammatory cytokines induce the transcription factors C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  in astrocytes.*“; Glia 29:91-7
- [21] **Cardineaux JR**, Magistretti PJ (1996) „*Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)- $\beta$  and C/EBP $\delta$  in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism.*“; J. Neurosci. 16:919-29
- [22] **Cerdan C**, Serfling E, Olive D (2000) „*The C-class chemokine, lymphotactin, impairs the induction of Th1-type lymphokines in human CD4<sup>+</sup> T cells*“; BLOOD 96(2):420-28
- [23] **Chang CJ**, Chen TT, Lei HY, Chen DS, Lee SC (1990) „*Molecular cloning of a transcription factor AGP/EBP, that belongs to members of the C/EBP family.*“; Mol Cell Biol 10(12):6642-53

- [24] **Chen L**, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998) „*Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA.*“; Nature 392(6671):42-8
- [25] **Chen X**, Liu W, Ambrosino C, Ruocco MR, Poli V, Romani L, Quinto I, Barbieri S, Holmes KL, Venuta S, Scala G (1997) „*Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBP $\beta$ .*“; Blood 90:156.64
- [26] **Chinery R**, Brockman JA, Dransfield DT, Coffey RJ (1998) „*Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299.*“; J Biol Chem 273(24):15308
- [27] **Clarkson RW**, Chen CM, Harrison S, Wells C, Muscat GE, Waters MJ (1995) „*Early response of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein- $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) and C/EBP $\delta$ .*“; Mol. Endocrinol. 9:108-20
- [28] **Crabtree GR** (1989) „*Contigent genetic regulatory events in T lymphocyte activation.*“; Science 243(4889):355-61
- [29] **Darlington GJ**, Ross SE, MacDougald OA (1998) „*The Role of C/EBP Genes in Adipocyte Differentiation (Minireview)*“; J. Biol. Chem. 273(46):30057-60
- [30] **Davydov IV**, Krammer PH, Li-Weber M (1995) „*Nuclear factor-IL6 activates the human IL-4 promoter in T cells*“; J Immunol 155(11):5273-9
- [31] **Descombes P**, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U (1990) „*LAP, a novel member of the C/EBP gene family, encodes a liver-enriched transcriptional activator protein.*“; Genes Dev 4(9):1541-51
- [32] **Descombes P**, Schibler U (1991) „*A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA*“; Cell 67(3), 569-79

- [33] **Dong C**, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA (1998) „*Defective T Cell Differentiation in the Absence of Jnk1*“; Science 282:2092-95
- [34] **Durand DB**, Bush MR, Morgan JG, Weiss A, Crabtree GR (1987) „*A 275 basepair fragment at the 5' end of the interleukin 2 gene enhances expression from a heterologous promotor in response to signals from the t cell antigen receptor*“; J. Exp. Med. 165:395-407
- [35] **Flavell RA** (1999) „*The molecular basis of T cell differentiation.*“; Immunol Res 19(2-3):159-68
- [36] **Fujita T**, Shibuya H, Ohashi T, Yamanishi K, Taniguchi T (1986) „*Regulation of human interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes.*“; Cell 46(3):401-5
- [37] **Galien R**, Evans HF, Garcia T (1996) „*Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-kappa B binding sites in interleukin-6 promotor inhibition by estrogens.*“; Mol Endocrinol 10(6):713-22
- [38] **Garrity PA**, Chen D, Rothenberg EV, Wold BJ (1994) „*Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors.*“; Mol Cell Biol 14(3):2159-69
- [39] **Glimcher LH**, Singh H (1999) „*Transcription Factors in Lymphocyte Development – T and B Cells Get Together (meeting Review)*“; Cell 96:13-23
- [40] **Granger RL**, Hughes TR, Ramji DP (2000) „*Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines.*“; Biochem. Biophys. Acta 1510:171-9
- [41] **Hentsch B**, Mouzaki A, Pfeuffer I, Rungger D, Serfling E (1992) „*The weak, fine-tuned binding of ubiquitous transcription factors to the Il-2*“

*enhancer contributes to ist T cell-restricted activity“; Nucleic Acids Res 20(11):2675-65*

**[42] Hoyos B**, Ballard DW, Bohnlein E, Siekevitz M, Greene WC (1989) „*Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression.*“; Science 244(4903):457-60

**[43] Iacobelli M**, Wachsman W, McGuire KL (2000) „*Repression of IL-2 Promoter Activity by the Novel Basic Leucine Zipper p21<sup>SBFT</sup> Protein*“; J. Immunol. 165: 860-68

**[44] Jain J**, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A (1992) „*Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun.*“; Nature 356(6372):801-4

**[45] Jain J**, Miner Z, Rao A (1993) „*Analysis of the preexisting and nuclear forms of nuclear factor of activating T cells.*“; J Immunol 151(2):837-48

**[46] Kang SM**, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ (1992) „*NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.*“; Science 256(5062):1452-6

**[47] Kaplan MH**, Grusby MJ (1998) „*Regulation of T helper cell differentiation by STAT molecules.*“; J Leukoc Biol 64(1):2-5

**[48] Kaplan MH**, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ (1996) „*Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells.*“; Immunity 4(3):319-9

**[49] Katz S**, Kowenz-Leutz E, Muller C, Meese K, Ness SA, Leutz A (1993) „*The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells.*“; EMBO J 12(4):1321-32

**[50] Kinoshita S**, Akira S, Kishimoto T (1992) „*A member of the C/EBP family, NF-IL6 $\beta$ , forms a heterodimer and transcriptionally synergizes with NF-IL6.*“; Proc Natl Acad Sci USA 89:1473-6

- [51] **Kolls JK**, Linden A (2004) "Interleukin-17 family members and inflammation."; *Immunity* 21(4):467-76
- [52] **Kopf M**, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G (1993) „*Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses.*“; *Nature* 362(6417):245-8
- [53] **Kuhn R**, Rajewsky K, Muller W (1991) „*Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice.*“; *Science* 254(5032):707-10
- [54] **Landschulz WH**, Johnson PF, McKnight SL (1989) „*The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite.*“; *Science* 243(4899):1681-8
- [55] **Lanzavecchia A**, Giandomenica I, Viola A, (1999) „*From TCR Engagement to T Cell Activation: A Kinetic View of T Cell Behavior (Minireview)*“; *Cell* 96:1-4
- [56] **Lekstrom-Himes J** (2001) „*The role of C/EBP $\epsilon$  in the terminal stage of granulocyte differentiation.*“; *Stem Cells* 19:125-33
- [57] **Lekstrom-Himes J**, Xanthopoulos KG (1998) „*Biological Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Family of Transcription Factors (Minireview)*“; *J. Biol. Chem.* 273(44):28545-48
- [58] **Lekstrom-Himes J**, Xanthopoulos KG (1999) „*CCAAT/enhancer binding protein  $\epsilon$  is critical for effective neutrophil-mediated response to inflammatory challenge.*“; *Blood* 93:3096-105
- [59] **Leonardo MJ**, Kuang A, Gifford A, Baltimore D (1988) „*NF-kappa B protein purification from bovine spleen: nucleotide stimulation and binding site specificity.*“; *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23):8825-9
- [60] **Lin FT**, Lane MD (1994) „*CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program.*“; *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):8757-61



- [61] **Lindemann D**, Patriquin E, Feng S, Mulligan RC (1997) „*Versatile retrovirus vector system for regulated gene expression in vitro and in vivo.*“; Mol. Med. 3:466-76
- [62] **Littlewood TD**, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI (1995) „*A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins.*“; Nucleic Acids Res. 23:1686-90
- [63] **Locksley RM**, Scott P (1991) „*Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function.*“; Immunol Today 12(3):A58-61
- [64] **Luthman H**, Magnusson G (1983) „*High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells.*“; Nucleic Acids Res. 11(5):1295-308
- [65] **Magram J**, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK (1996) „*IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses.*“; Immunity 4(5):471-81
- [66] **Matsuno F**, Chowdhury S, Gotoh T, Iwase K, Matsuzaki H, Takatsuki K, Mori M, Takiguchi M (1996) „*Induction of C/EBP $\beta$  gene by dexamethasone and glucagon in primary-cultured rat hepatocytes.*“; J. Biochem. (Tokyo) 119:524-32
- [67] **McKnight SL** (2001) „*McBindall – a better name for CCAAT/enhancer binding proteins?*“; Cell 107(3), 259-61
- [68] **Metz R**, Ziff E (1991) „*cAMP stimulates the C/EBP related transcription factor rNF-IL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription.*“; Genes Dev. 5:1754-66

- [69] **Miner KT**, Croft M (1998) „*Generation, Persistence, and Modulation of Th0 Effector Cells: Role of Autocrine IL-4 and IFN- $\gamma$* “; J. Immunol. 160:5280-87
- [70] **Montaner S**, Perona R, Saniger L, Lacal JC (1999) „*Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors.*“; J Biol Chem 274(13):8506-15
- [71] **Mosmann TR**, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffmann RL (1986) „*Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins.*“; J Immunol. 136(7):2348-57
- [72] **Murphy KM**, Heimberger AB, Loh DY (1990) „*Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TCRlo thymocytes in vivo.*“; Science 250(4988):1720-3
- [73] **Nakajima T**, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S (1993) „*Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6.*“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2207-11
- [74] **Natsuka S**, Akira S, Nishio Y, Hashimoto S, Sugita T, Isshiki H, Kishimoto T (1992) „*Macrophage differentiation-specific expression of NF-IL6, a transcription factor for interleukin-6.*“; Blood 79(2):460-6
- [75] **Neumann M**, Griesshammer T, Chuvpilo S, Kneitz B, Lohoff M, Schimpl A, Franza BR Jr, Serfling E (1995) „*RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A*“; EMBO J 14(9):1991-2004
- [76] **O`Garra A**, Steinmann L, Gijbels K (1997) „*CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in autoimmunity.*“; Curr Opin Immunol. 9(6):872-83
- [77] **O`Garra A** (1998) „*Cytokines Induce the Development of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets*“; Immunity 8:275-83

- [78] **Osada S**, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M (1996) „DNA Binding Specificity of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Transcription Factor Family“; J. Biol. Chem. 271(7):3891-96
- [79] **Paul WE**, Seder RA (1994) „Lymphocyte responses and cytokines.“; Cell 76(2):241-51
- [80] **Peterson BR**, Sun LJ, Verdine GL (1996) „A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1.“; Proc Natl Acad Sci USA 93(24):13671-6
- [81] **Pfeuffer I**, Klein-Heßling S, Heinfling A, Chuvpilo S, Escher C, Brabletz T, Hentsch B, Schwarzenbach H, Matthias P, Serfling E (1994) „Octamer Factors Exert a Dual Effect on the IL-2 and IL-4 Promoters“; J. Immunol. 153: 5572-85
- [82] **Poli V** (1998) „The Role of C/EBP Isoforms in the control of Inflammatory and Native Immunity Functions (Review)“; J. Biol. Chem. 273, 27815-27822
- [83] **Poli V**, Mancini FP, Cortese R (1990) „IL-6DBP, a nuclear protein involved in Interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP“; Cell 63, 643-653
- [84] **Powell JD**, Lerner CG, Ewoldt GR, Schwartz RH (1999) „The – 180 Site of the IL-2 Promoter Is the Target of CREB/CREM Binding in T Cell Anergy“; J. Immunol. 163:6631-39
- [85] **Ramji DP**, Foka P (2002) „CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation“; Biochem. J. 365, 561-575
- [86] **Ramji DP**, Vitelli A, Tronche F, Cortese R, Ciliberto G (1993) „The two C/EBP isoforms, IL-6DBP/NF-IL6 and C/EBP $\delta$ /NF-IL6 $\beta$ , are induced by IL-6 to promote acute phase gene transcription via different mechanisms.“; Nucleic Acids Res 21:289-94

- [87] **Rana B**, Xie Y, Mischoulon D, Bucher NL, Farmer SR (1995) „*The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle.*“; J. Biol. Chem. 270:18123-32
- [88] **Randak C**, Brabletz T, Hergenröther M, Sobotta I, Serfling E (1990) „*Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL2-enhancer*“; EMBO J 9(8):2529-36
- [89] **Rao S**, Procko E, Shannon MF (2001) „*Chromatin remodeling, measured by a novel real-time polymerase chain reaction assay, across the proximal promoter region of the IL-2 gene.*“; J Immunol 167(8):4494-503
- [90] **Rincon M**, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997) „*Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells.*“; J. Exp. Med. 185:461-69
- [91] **Rincon M**, Flavell RA (1997) „*T-cell subset: transcriptional control in the Th1/Th2 decision*“; Curr Biol 7(11):R729-32
- [92] **Roesler WJ** (2001) „*The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression.*“; Annu. Rev. Nutr. 21:141-65
- [93] **Romagnani S** (1991) „*Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more.*“; Immunol Today 12(8):256-7
- [94] **Romagnani S** (1991) „*Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease.*“; Int J Clin Lab Res 21(2):152-8
- [95] **Rothenberg EV**, Ward SB (1996) „*A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation*“; Proc. Natl. Acad. Sci. 93:9358-65

- [96] **Roy SK**, Wachira SJ, Weihua X, Hu J, Kalvakolanu DV (2000) „*CCAAT/Enhancer-binding Protein- $\beta$  Regulates Interferon-induced Transcription through a Novel Element*“; J. Biol. Chem. 275(17):12626-32
- [97] **Rudd C** (1999) „*Adaptors and Molecular Scaffolds in Immune Cell Signaling (Minireview)*“; Cell 96:5-8
- [98] **Santner-Nanan B**, Wagner S, Wolf M, Kneitz B, Hunig T, Schimpl A (1998) „*In vitro skewing of TCR transgenic CD4<sup>+</sup> T cells from interleukin-2 deficient mice towards Th1 and Th2 in the absence of exogenous interleukin-2.*“; Eur Cytokine Netw. 9(3 Suppl):17-25
- [99] **Schreiber E**, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1988) „*Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assays (PCBA).*“; EMBO 7:4221
- [100] **Screpanti I**, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, et al. (1995) „*Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP  $\beta$ -deficient mice*“; EMBO J 14(14):3596
- [101] **Serfling E**, Barthelmäs R, Pfeuffer I, Schenk B, Zarius S, Swoboda R, Mercurio F, Karin M (1989) „*Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes*“; EMBO J 8(2):465-73
- [102] **Sher A**, Coffman RL (1992) „*Regulation of immunity to parasites by T cells and T-cell-derived cytokines.*“; Annu Rev Immunol. 10:385-409
- [103] **Shimoda K**, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN (1996) „*Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene.*“; Nature 380(6575):630-3
- [104] **Siebenlist U**, Durand DB, Bressler P, Holbrook NJ, Norris CA, Kamoun M, Kant JA, Crabtree GR (1986) „*Promoter region of interleukin-*

*2 gene undergoes chromatin structure changes and confers inducibility on chloramphenicol acetyltransferase gene during activation of T cells*“; Mol Cell Biol 6(9):3042-9

[105] **Singh VK**, Mehotra S, Agarwal SS (1999) „*The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: ist relevace to autoimmunity and allergy.*“; Immunol Res 20(2):147-61

[106] **Soneoka Y**, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffith JC, Romano G, Kingsmann SM, Kingsman AJ (1995) „*A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.*“; Nucleic Acids Res. 23:628-33

[107] **Stein B**, Cogswell PC, Baldwin AS Jr. (1993) „*Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction*“; Mol Cell Biol 13(7):3964-74

[108] **Sterneck E**, Johnson PF (1998) „*CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  is a neuronal transcriptional regulator activated by nerve growth factor receptor signaling.*“; J. Neurochem. 70:2424-33

[109] **Stricker K**, Serfling E, Krammer PH, Falk W (1993) „*An NF-kappa B-like element plays an essential role in interleukin-1-mediated costimulation of the mouse interleukin-2 promoter.*“; Eur J Immunol 23(7):1475-80

[110] **Tanaka T**, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) „*Defective adipocyte differentiation in mice lacking C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene.*“; EMBO 16(24):7432-43

[111] **Tengku-Muhammad TS**, Hughes TR, Ranki H, Cryer A, Ramji DP (2000) „*Differential regulation of macrophage CCAAT-enhancer binding protein isoforms by lipopolysaccharide and cytokines.*“; Cytokine 12:1430-6

[112] **Thierfelder WE**, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld

GC, Ihle JN (1996) „*Requirement for STAT4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells.*“; Nature 382(6587):171-4

[113] **Thomassin H**, Hamel D, Bernier D, Guertin M, Belanger L (1992) „*Molecular cloning of two C/EBP-related proteins that bind to the promoter and the enhancer of the alpha 1-fetoprotein gene. Further analysis of C/EBP beta and C/EBP gamma.*“; Nucleic Acids Res 20(12):3091-8

[114] **Trautwein C**, van der Geer P, Karin M, Hunter T, Chojkier M (1994) „*Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements.*“; J Clin Invest 93:2554-61

[115] **Trautwein C**, Caelles C, van der Geer P, Hunter T, Karin M, Chojkier M (1993) „*Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain.*“; Nature 364:544-47

[116] **Vinson CR**, Hai T, Boyd SM (1993) „*Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design.*“; Genes Dev 7(6):1047-58

[117] **Wang ND**, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ (1995) „*Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice.*“; Science 269(5227):1108-12

[118] **Ward SB**, Hernandez-Hoyos G, Chen F, Waterman M, Reeves R, Rothenberg EV (1998) „*Chromatin remodeling of the interleukin-2 gene: distinct alterations in the proximal versus distal enhancer regions*“; Nucleic Acids Res 26(12):2923-34

[119] **Wedel A**, Ziegler-Heitbrock HW (1995) „*The C/EBP family of transcription factors.*“; Immunobiology 193(2-4):171-85

- [120] **Williams SC**, Cantwell CA, Johnson PF (1991) „*A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro.*“; *Genes Dev* 5(9):1553-67
- [121] **Williams SC**, Du Y, Schwartz RC, Weiler SR, Ortiz M, Keller JR, Johnson PF (1998) „*C/EBP $\epsilon$  is a myeloid-specific activator of cytokine, chemokine, and macrophage-colony-stimulating factor receptor genes.*“; *J. Biol. Chem.* 273:13493-501
- [122] **Xia C**, Chesire JK, Patel H, Woo P (1997) „*Cross-talk between transcription factors NF-kappa B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes.*“; *Int J Biochem Cell Biol* 29(12):1525-39
- [123] **Yamanaka R**, Lekstrom-Himes J, Barlow C, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG (1998) „*CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis (Review)*“; *Int. J. Mol. Med.* 1:213-21
- [124] **Yang DD**, Conze D, Whitmarsh AJ, Barrett T, Davis RJ, Rincon M, Flavell RA (1998) „*Differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2.*“; *Immunity* 9(4):575-85
- [125] **Yea SS**, Yang KH, Kaminski NE (2000) „*Role of Nuclear Factor of Activated T-Cells and Activator Protein-1 in the Inhibition of Interleukin-2 Gene Transcription by Cannabinol in EL4-Cells*“; *JPET* 292:597-605
- [126] **Yeh WC**, Cao Z, Classon M, McKnight SL (1995) „*Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins.*“; *Genes Dev.* 9(2):168-81
- [127] **Yin M**, Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Chatterjee S, Diehl AM (1996) „*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Promotes Nuclear Localization of Cytokine-inducible CCAAT/Enhancer Binding Protein Isoforms in Hepatocytes*“; *J. Biol. Chem.* 271(30):17974-78
- [128] **Zhang DE**, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG (1997) „*Absence of granulocyte colony-stimulating factor*



*signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice.*“; Proc Natl Acad Sci USA 94(2):569-74

**[129] Zhang L, Nabel GJ (1994)** „*Positive and negative regulation of IL-2 gene expression: role of multiple regulatory sites.*“; Cytokine 6(3):221-8

**[130] Zhou P, Sun LJ, Dotsch V, Wagner G, Verdine GL (1998)** „*Solution structure of the core NFATC1/DNA complex.*“; Cell 92(5):687-96

**[131] Zhu S, Yoon K, Sterneck E, Johnson PF, Smart RC (2002)** „*CCAAT/enhancer binding protein- $\beta$  is a mediator of keratinocyte survival and skin tumorigenesis involving oncogenic ras signalling.*“; Proc Natl Acad Sci USA 99:207-12

## 7. Abkürzungen

AP-1	activating protein 1
APC	Antigenpräsentierende Zelle
bZIP	basic leucine zipper
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CD	cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
HEK	human embryotic kidney (cells)
IL	Interleukin
MHC	major hisocompatibility complex
NF-AT	nuclear factor of activated T cells
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
Pu-b	purinreiche Box
TCE <sub>d</sub>	distales T-cell element
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zellen	T-Helfer Zellen
Tm	4-hydroxytamoxifen
TPA	12-o-tetradedaconyl-phorbol-13-acetat

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt für Ihre geduldige und hochqualifizierte Betreuung mit viel persönlichem Einsatz vom ersten Tag im Labor bis zur abschließenden Korrektur. Danken möchte ich zusätzlich Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling, der mir das Thema überlassen hat und jederzeit für eine fachliche Diskussion und zielstrebige Hilfestellung zur Verfügung stand. Seine Arbeitsgruppe betreute mich über 6 Monate in Ihrem Labor und ermöglichte mir die Durchführung der ausführlichen experimentellen Untersuchungen. Besonders erwähnen und danken möchte ich Dr. Stefan Klein-Heßling für seine fachliche Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern Gisela und Ulrich Hepping, die mir mit viel Geduld und finanziellem Aufwand mein Studium und die Promotion erst ermöglichten.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Nico Hepping
Geburtsdatum	23. Juni 1975
Geburtsort	Gräfelfing

### Schulbildung

08/1981 – 06/1985	Grundschule Höchberg
08/1985 – 05/1994	Friedrich-König-Gymnasium Würzburg
07/1994	Hochschulreife

### Hochschulausbildung

10/1994 – 02/1997	Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg
03/1997	Ärztliche Vorprüfung
04/1997 – 07/2000	Klinisches Studium an der Universität Würzburg
03/1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000 – 09/2001	Praktisches Jahr
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung –gut-

### Tätigkeit als Arzt im Praktikum/ Assistenzarzt

seit 05/2002	Universitätskinderklinik Bonn
--------------	-------------------------------

### Publikationen

“C/EBP $\beta$  enhances IL-4 but impairs IL-2 and IFN- $\gamma$  induction in T cells“  
European Journal of Immunology  
2000. 30: 2576-2585

Bonn, Juli 2006

Nico Hepping