

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof.Dr.med.K.Wilms

Transkriptionelle Regulation des CD23a-Promotors in Zellen
chronischer lymphatischer Leukämien vom B-Zelltyp

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Tim Philipp Gross
aus Bad Bramstedt

Würzburg, April 2003

Referent: Prof.Dr.med. H.-P. Tony

Koreferentin: Prof.Dr.med. H.Rückle-Lanz

Dekan: Prof.Dr.med. S.Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2003

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Der niedrig affine Immunglobulin E Rezeptor (CD23)	1
1.1.1 Struktur und Vorkommen	1
1.1.2 Funktion	2
1.1.2.1 Rolle von CD23 bei der IgE-Regulation	4
1.2 Klinik	5
1.2.1 Rheumatoide Arthritis	5
1.2.2 Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp	5
1.2.2.1 Biologie der B-CLL	6
1.2.2.2 CD23 und die CLL	7
1.3 Regulation der CD23-Expression	8
1.4 Molekulare Struktur des CD23 Gens und seiner Transkripte	12
2 FRAGESTELLUNG	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Reagentien, Geräte, Lösungen	16
3.2 Gewinnung von B-Lymphozyten	18
3.3 Herstellung von Kernextrakten	19
3.4 Durchflusszytometrie	20
3.5 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)	21
3.6 DNase-I-in vitro Footprinting	25
3.6.1 Herstellung geeigneter Vektoren:	28
3.6.2 Gewinnung von Vektor-DNA und DNase-I-in vitro Footprinting	30

4 RESULTATE	31
4.1 Untersuchung des CD23a-Core-Promotors mittels EMSA	31
4.1.1 Stimulation von B-CLL- und normalen B-Lymphozyten	31
4.1.2 Gel-Retardierungsexperimente (EMSA)	33
4.2 Charakterisierung von putativen STAT6-Bindungsstellen im CD23a-Core-Promotor	37
4.3 Vorbereitungen für DNase-I-Footprint-Experimente durch Herstellung geeigneter Vektoren und Etablierung einer Positivkontrolle	40
5 DISKUSSION	45
6 ZUSAMMENFASSUNG	53
7 LITERATUR	55
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	65

1 Einleitung

1.1 Der niedrig affine Immunglobulin E Rezeptor (CD23)

1.1.1 Struktur und Vorkommen

Der niedrig affine Rezeptor für Immunglobulin E (FcεRII) wurde erstmals 1975 beschrieben und trägt seit 1987 die Bezeichnung „CD23“ [1, 2]. Das gleiche Molekül wurde auch als Oberflächenmarker von Epstein-Barr-Virus-transformierten B-Lymphozyten „EBVCS“ und als B-Zell Aktivierungantigen „Blast-2“ charakterisiert [3].

CD23 ist ein sogenanntes Typ II Glykoprotein, da sich sein Carboxy-terminaler Anteil extrazellulär und sein Amino-terminaler Anteil zytoplasmatisch befindet. Es gehört zur Lektin-Familie vom C-Typ, da die Bindung von IgE an die Lektin-Domäne Kalzium (Ca^{2+})-abhängig ist [4]. Somit stellt CD23 eine Ausnahme dar, denn alle weiteren Immunglobulin-Rezeptoren gehören zur Immunglobulin-Überfamilie.

Zwischen der Carboxy-terminalen Lektin-Domäne und dem transmembranen Anteil befindet sich die alpha-helikale Stiel-Region, welche durch charakteristische repetitive Aminosäuresequenzen eine Oligomerisierung mehrerer CD23 Moleküle über Trimerbildung ermöglicht. Dadurch erhöht sich die Bindungsaffinität im Vergleich zum Monomer rund zehnfach [5].

Beim Menschen existieren die Isoformen a und b des CD23-Rezeptors, welche sich nur in ihrer kurzen Amino-terminalen zytoplasmatischen Domäne unterscheiden, die 7 beziehungsweise 6 Aminosäuren umfaßt [6].

Es konnte gezeigt werden, dass nur der CD23a-Rezeptor zur Endozytose von IgE-gebundenem Antigen befähigt, während die IgE-abhängige Phagozytose von CD23b vermittelt wird [7].

Die Expression der Isoform CD23a beschränkt sich auf reife IgD/IgM positive B-Lymphozyten und erlischt hier nach Isotypen-Wechsel und Immunglobulin-Sekretion [8]. Auch Eosinophile exprimieren beide Isoformen [9], während CD23b auf verschiedenen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Langerhans-Zellen, folliculären dendritischen Zellen, Stromazellen des Knochenmarks und epithelialen Zellen des Thymus induziert werden kann [3]. Auch glatte Muskelzellen vermögen

CD23 zu exprimieren, hierbei zeigt die glatte Atemwegsmuskulatur von Asthmatikern eine erhöhte Expression im Vergleich zu Gesunden [10]. Analoges gilt auch für die CD23-Expression auf Enterozyten von sensibilisierten Mäusen und Ratten [11] [12].

Außerdem wurden die Isoformen a' und b' beschrieben, denen die transmembranäre Region fehlt und die somit nur im Zytoplasma vorzufinden sind und eine regulative Funktion auf die CD23-Expression haben könnten [13].

Neben der membrangebundenen Form existieren diverse lösliche Formen von CD23 (sCD23), welche durch proteolytische Abspaltung der membrangebundenen Form entstehen und ein Molekulargewicht zwischen 12 und 37 kD haben [14]. Eine Abspaltung von CD23 von der Zellmembran ist unter dem Einfluß verschiedener Proteasen möglich, beispielsweise durch eine membrangebundene noch nicht näher identifizierte Metalloprotease, durch Proteasen aktivierter neutrophiler Granulozyten oder auch durch das Allergen „Der p I“ der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* [15] [16] [17].

1.1.2 Funktion

CD23 bindet IgE mit einer rund 100 – 1000fach geringeren Affinität als der hochaffine IgE-Rezeptor (FcεRI), welcher in erster Linie auf Basophilen und Mastzellen zu finden ist und dort die Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp vermittelt; ein über IgE gebundenes Allergen vermag über eine Quervernetzung der IgE-Rezeptoren eine Degranulation von Mediatoren wie beispielsweise Histamin auszulösen [18].

CD23 vermittelt auf Makrophagen, Monozyten und Eosinophilen eine IgE-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität gegenüber Parasiten [19], weitere IgE-abhängige Funktionen von CD23 auf Monozyten beinhalten die Phagozytose IgE-opsonierter Partikel sowie die Bildung von Superoxiden[3].

Eine Aktivierung monozytärer Zellen, welche zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1β (IL-1β), IL-6 und Tumor Nekrose Faktor-α (TNFα) durch diese Zellen führt, geschieht durch Bindung von CD23 an die monozytären

Oberflächenmoleküle CD11b-CD18 und CD11c-CD18, die zur β_2 -Integrin Familie der Adhäsionsproteine gehören [20]. Auch die Bildung des Makrophagen-Inflammatorischen-Proteins-1 α und β (MIP-1 α , MIP-1 β), welche bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen zu einem Entzündungsherd von Bedeutung sind, ist auf diesem Wege möglich [21].

B-Lymphozyten können über CD23 in IgE-abhängiger Weise T-Lymphozyten Antigen präsentieren, wobei dieser Mechanismus nicht antigenspezifisch ist [22] [23]. Auch Langerhans-Zellen und follikuläre dendritische Zellen verfügen über diese Fähigkeit der Antigenpräsentation [24].

An einem Mausmodell wurde untersucht, ob die CD23 Expression auf B-Lymphozyten oder auf follikulären dendritischen Zellen für die über IgE-Immunkomplexe vermittelte Verstärkung der spezifischen Antikörperantwort verantwortlich ist; es zeigte sich, dass die CD23-positiven B-Lymphozyten hierfür verantwortlich sind [25].

An Jejunum-Enterozyten sensibilisierter Mäuse konnte gezeigt werden, dass der transepitheliale Allergentransport über IgE in Verbindung mit CD23 vermittelt wird [11].

Für die lösliche Form von CD23, sCD23, sind verschiedene zytokinartige Eigenschaften beschrieben worden:

So hat sich sCD23 als autokriner Wachstumsfaktor in einigen normalen und EBV-transformierten B-Zelllinien und als Differenzierungsfaktor für Prothymozyten erwiesen [26] [27].

Auch verhindert es in Verbindung mit IL-1 α die Apoptose von B-Zentrozyten in Keimzentren über die Induktion des antiapoptotisch wirkenden bcl-2 Proteins [28] [29].

Eine Bindung von sCD23 an CD11b-CD18 oder CD11c-CD18 auf Monozyten hat wie oben beschrieben proinflammatorische Effekte, ferner wird die Migration der Makrophagen inhibiert [30].

1.1.2.1 Rolle von CD23 bei der IgE-Regulation

Immunglobulin E spielt eine Rolle bei der immunologischen Abwehr von parasitären Infektionen wie der Schistosomiasis, zumindest aber in den Industrienationen mit ihrer stetig zunehmenden Prävalenz an allergischen Erkrankungen steht seine Funktion als Hauptmediator von Hypersensitivitätsreaktionen des Soforttyps im Vordergrund.

Die Synthese von IgE wird, wie auch jene von CD23, unter anderem von den Zytokinen IL-4 und IL-13 induziert [31]. CD23 spielt bei der Kontrolle der IgE-Produktion eine noch nicht völlig geklärte Rolle:

Auf der einen Seite gibt es Hinweise, dass CD23 als positiver Regulator der IgE-Synthese dient. So war bei CD23-defizienten Mäusen die beim Wildtyp beobachtete über IgE-Immunkomplexe vermittelte Verstärkung einer Antikörperantwort, welche auch IgE beinhaltete, nicht zu beobachten [32]. Auch verhinderte die Gabe von Anti-CD23-Antikörpern bei Ratten eine spezifische IgE-Antwort [33].

Zudem potenziert sCD23 die IL-4-induzierte IgE-Synthese durch Bindung an CD21 [34]. Eine Inhibierung der Bildung von sCD23 durch einen Proteasehemmer, welcher die membranäre Form vor der Abspaltung bewahrte, hatte auch inhibitorischen Einfluss auf die IL-4-induzierte IgE-Produktion [35].

Andererseits konnte ein negativer Einfluß von CD23 auf die IgE-Synthese nachgewiesen werden. So waren bei CD23-defizienten Mäusen die antigenspezifischen IgE-Spiegel bei einer Immunantwort auf thymusabhängige Antigene erhöht [36]. Zwei weitere mit CD23-defizienten Mäusen arbeitende Gruppen fanden in diesem Zusammenhang allerdings keine signifikanten Veränderungen der IgE-Spiegel [37] [32]. Aber auch eine Hyperreagibilität der Atemwege sensibilisierter CD23-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp spricht dafür, daß CD23 einen senkenden Einfluß auf den IgE-Spiegel hat [38].

Auch die Überexpression von CD23 in seiner membranären Form bei CD23-transgenen Mäusen führte zu erniedrigten IgE-Spiegeln [39] [40].

Anzumerken ist, dass Mäuse nur eine der menschlichen Isoform a verwandte CD23-Form und dies nur auf B-Lymphozyten und folliculären dendritischen Zellen [41] exprimieren; bei sensibilisierten Mäusen wurde CD23 auch auf Enterozyten gefunden [11].

1.2 Klinik

Neben seiner Involvierung in die Regulation von IgE-Antworten, die bei parasitären Infektionen und Atopien von Bedeutung ist, und in die Immunabwehr über IgE-vermittelte Antigenpräsentation spielt CD23 auch bei anderen Krankheitsbildern eine Rolle.

1.2.1 Rheumatoide Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA), einer chronisch entzündlichen Erkrankung, findet sich häufig ein erhöhter Spiegel von sCD23 in der Synovialflüssigkeit, wobei Makrophagen die sCD23-Hauptquelle zu sein scheinen [42]. Erhöhte sCD23-Spiegel in der Synovialflüssigkeit sind mit einer erosiven Form der RA assoziiert [43]. Eine Abspaltung der membranären CD23-Form von Synovialmakrophagen mittels einer Protease von aktivierten Neutrophilen ist denkbar, und die Interaktion von sCD23 mit CD11b und CD11c auf Makrophagen könnte über die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einen wichtigen Mechanismus bei der Rekrutierung von Entzündungszellen und der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung spielen [16] [21].

Ein Blick auf das Mausmodell der RA, die Kollagen-induzierte Arthritis, unterstreicht die Rolle von CD23: Bei CD23-defizienten Mäusen zeigte sich ein verzögertes Auftreten und ein geringerer Schweregrad der Erkrankung im Vergleich zum Wildtyp [44]. Auch eine Behandlung einer Kollagen-induzierten Arthritis mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD23 zeigte eine dosisabhängige Verbesserung der Erkrankung [45].

1.2.2 Chronisch lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp

Eine im Vergleich zu Gesunden veränderte Expression von CD23 und Regulation selbiger zeigt sich auf den B-Lymphozyten von an chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) Erkrankten.

Die CLL vom B-Zelltyp (B-CLL) ist die häufigste Leukämieform in der westlichen Welt, charakterisiert durch die klonale Proliferation und Akkumulation von

neoplastischen B-Lymphozyten mit einem mittleren Diagnosealter von 64 Jahren und zeigt als einzige Leukämieform keine Assoziation zu einer Exposition mit Chemikalien oder Radioaktivität [46].

Gemäß der Kiel- sowie der R.E.A.L.(Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms)-Klassifikation gehört die CLL zu den niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen [47]. In der Klinik sind die Staging-Systeme nach Rai und Binet üblich, sie ermöglichen die Einteilung der Patienten in verschiedene Risikogruppen mit unterschiedlicher Prognose [48] [49].

1.2.2.1 Biologie der B-CLL

Die B-Lymphozyten exprimieren typischerweise CD5 und CD23 und minimale Mengen an Oberflächenimmunglobulinen, meist vom IgM oder IgD-Typ. Desweiteren charakteristisch sind eine schwache bis fehlende Expression von CD22 und CD79b sowie die fehlende Expression des FMC7-Antigens. Anhand dieser verschiedenen Oberflächenmarker wurde ein Scoring-System entwickelt, welches die Differentialdiagnose zu anderen B-lymphozytären Erkrankungen ermöglichen soll [50].

Die weit überwiegende Mehrzahl der B-Lymphozyten ist in der G₀- oder frühen G₁-Phase des Zellzyklus arretiert, zeigt aber phänotypisch durch Expression von Aktivierungsmarkern wie CD23 und CD27 einen Zustand der Aktivierung [46].

Somatische Mutationen der Immunglobulin-Schwerkettengene, welche üblicherweise in den Keimzentren stattfinden, lassen die CLL in 2 etwa gleich große Gruppen einteilen: Eine besteht aus immunologisch naiven und CD38-positiven B-Lymphozyten mit unmutierten Immunglobulin-Schwerkettengenen und hat eine vergleichsweise schlechte Prognose, die andere hat eine gute Prognose, ist CD38-negativ und besteht aus weiter differenzierten B-Lymphozyten mit somatischen Mutationen in den Immunglobulin-Schwerkettengenen [51, 52].

Chromosomale Aberrationen zeigen sich in über 80% der CLL Fälle [53]. Am häufigsten findet sich in 55% der Fälle eine 13q-Deletion, die mit einer guten Prognose assoziiert ist; in der Häufigkeit folgen eine 11q-Deletion sowie die Trisomie 12, beide Aberrationen sind mit einer ungünstigen Prognose verbunden [53].

Die für die CLL typische progressive Akkumulation von reifen ruhenden B-Lymphozyten resultiert aus einer Suppression des programmierten Zelltodes, der

Apoptose; es finden sich erhöhte Spiegel antiapoptotischer Proteine wie bcl-2 und bcl-xL [54]. Auch zeigt sich eine allenfalls schwache Expression von Fas (CD59), einem Rezeptor, über den die Apoptose vermittelt werden kann, sowie eine deutliche Resistenz gegenüber auf diesem Wege induzierter Apoptose [54].

Allerdings gehen CLL-B-Lymphozyten in vitro schnell auf dem Wege der Apoptose zugrunde, was auf überlebenswichtige Milieufaktoren in vivo hinweist [55]. So haben beispielsweise CD4⁺-T-Lymphozyten Oberflächenrezeptoren bzw. Liganden wie CD5, CD154 und CD27, welche eine Interaktion mit B-Lymphozyten (CD5-CD72, CD154-CD40, CD27-CD70) ermöglichen und so ein für das Überleben permissives Zytokinmilieu induzieren können [56]. Auch eine Bindung an die β_1 - und β_2 -Integrine von Stromazellen im Knochenmark erhöht die Überlebenschancen [57].

1.2.2.2 CD23 und die CLL

Bei der CLL sind die überwiegende Mehrzahl der B-Lymphozyten CD23-positiv. Die Höhe der CD23-Expression wurde einerseits mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht [58, 59], andere Arbeiten kamen jedoch zu dem Schluss, dass die CD23-Expression mit einem aggressiveren Verlauf assoziiert sei [60-62]. In einer Untersuchung am M.D. Anderson Cancer Center konnte aber kürzlich gezeigt werden, dass von 23 (=6% aller CLL-Patienten dieses Kollektivs) ursprünglich als CD23-negative CLL-Fälle diagnostizierten Patienten nur bei einem einzigen die Diagnose CLL aufrecht erhalten werden konnte und die übrigen 22 an anderen lymphoproliferativen Erkrankungen wie z.B. dem Mantelzelllymphom litten [63].

Die lösliche Form von CD23, sCD23, hat bei der CLL prognostische Bedeutung [64]: Patienten mit erhöhten sCD23-Spiegeln haben eine deutlich schlechtere Prognose, auch gingen bei Patienten im Frühstadium die sCD23-Spiegel der Krankheitsprogression um rund 4 Jahre voraus [64]. Auch eine kurze Verdopplungszeit des sCD23-Serumspiegels weist auf einen aggressiven Krankheitsverlauf hin [65].

Weitere Prognosefaktoren sind beispielsweise die Serumspiegel von Thymidinkinase, LDH, β_2 -Mikroglobulin und IgA sowie chromosomale Aberrationen, das Muster der Knochenmarksinfiltration und die Lymphozytenverdopplungszeit [54].

Die B-Lymphozyten der CLL überexprimieren CD23 beider Isoformen im Vergleich zu unstimulierten B-Lymphozyten Gesunder, bei welchen nur die Isoform CD23a auftritt [66].

Eine Schlüsselrolle bei der Zellaktivierung von B-Lymphozyten erscheint möglich und Stimulationsexperimente mittels IL-4 und Quervernetzung des B-Zellrezeptors über Anti-IgM zeigte eine Induktion vornehmlich der Isoform b, welche somit an der Zellproliferation beteiligt zu sein scheint [67]. Auch konnte durch Versuche mit Antisense Oligonukleotiden gegen die CD23a und b-mRNA, welche bei diesen Versuchen zur Überexpression der entsprechenden CD23-Proteine führte, gezeigt werden, dass die Isoform b einen verstärkenden Effekt auf die IL-4 und IgM-vermittelte DNA-Synthese hatte [67]. Zudem konnte bei sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befindlichen CLL-B-Lymphozyten über CD23b-Antisense-Oligonukleotide ein Eintritt in die G₁- und S-Phase induziert werden und ein Synergismus mit TNF- α bei der Verstärkung der Zellaktivierung gezeigt werden [67].

Auch eine Induktion des Zellwachstums von CLL-B-Lymphozyten durch IL-2 und IFN α war mit einer vermehrten Bildung von CD23b-mRNA verbunden [67].

Die Isoform b zeigt folglich eine Verbindung mit zellproliferativen Vorgängen, während CD23a mit dem programmierten Zelltod assoziiert zu sein scheint: Die Gabe von IL-4 und IFN- γ kann die Hydrocortison-induzierte Apoptose verhindern, und die überlebenden B-CLL Lymphozyten exprimieren hauptsächlich CD23a [68].

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, kommt es bei der CLL zu einer Überexpression des Proto-Onkogens Notch2, welches beim Transformationsprozess der CLL eine wichtige Rolle spielen könnte und welches eine aktivierende Wirkung auf die CD23a-Transkription hat [69].

1.3 Regulation der CD23-Expression

B-Lymphozyten der CLL zeigen im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten eine veränderte Regulation der CD23-Expression:

Beide Gruppen verlieren in vitro rasch ihre Fähigkeit zur CD23 Expression, welche aber reinduziert werden kann [67].

Interleukin-4 induziert in normalen B-Lymphozyten und in B-CLL-Lymphozyten die Expression der Isoformen CD23a und CD23b. Die CLL-B-Zellen unterscheiden sich jedoch dadurch, dass bei Kostimulation mit Interferon γ eine vermehrte CD23-Expression auftritt, während Interferon γ in normalen B-Zellen sowie in Monozyten die IL-4-induzierbare CD23-Expression reprimiert [70].

Interleukin-4

Da dem Interleukin-4 bei der CD23-Expression eine wichtige Rolle spielt, soll ein kurzer Blick auf die Signaltransduktion vom IL-4-Rezeptor bis zum Zellkern geworfen werden:

IL-4 entfaltet seine Wirkung über den sogenannten Jak-STAT-Signaltransduktionsweg. Der IL-4-Rezeptor besteht aus der IL-4-Rezeptor α -Kette (IL-4R α) und der gemeinen γ -Kette, die mit der Januskinase 1 (Jak1) bzw. Januskinase 3 (Jak3) assoziiert sind [71]. Als essentiell für die IL-4-Signaltransduktion gelten IL-4R α sowie Jak1 [72]. Eine Aktivierung dieses Rezeptors durch Bindung von IL-4 führt über eine Heterodimerisierung der beiden genannten Ketten zu einer Aktivierung der Januskinasen, welche sich gegenseitig transphosphorylieren und durch Phosphorylierungen von Tyrosinresten der Ketten Bindungsstellen für ein weiteres Protein der Signaltransduktionskaskade, STAT6, bilden [73]. STAT6 gehört zu der 7 Mitglieder umfassenden Familie der STAT-(„signal transducers and activators of transcription“) Proteine, und hat, wie kürzlich bei IL-4 stimulierten B-Lymphozyten von Mäusen gezeigt wurde, überraschenderweise sowohl einen positiven als auch einen negativen regulatorischen Einfluß auf die Genexpression [74].

STAT6 bindet mit seiner Src Homologie 2 (SH2) Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste, wird nun seinerseits an einem Tyrosinrest phosphoryliert, was eine Homodimerisierung zweier STAT6 Moleküle mit konsekutiver Translokation in den Nukleus ermöglicht [73].

STAT6 bindet bevorzugt an eine durch 4 Nukleotide getrennte TTC/GAA-Bindungssequenz der Kern-DNA, aber auch eine durch 3 Nukleotide getrennte Sequenz wird gebunden (TTCN₃₋₄GAA)[75].

Einen schematischen Überblick des IL-4-Jak/STAT-Signaltransduktionsweges gibt die Abbildung 1:

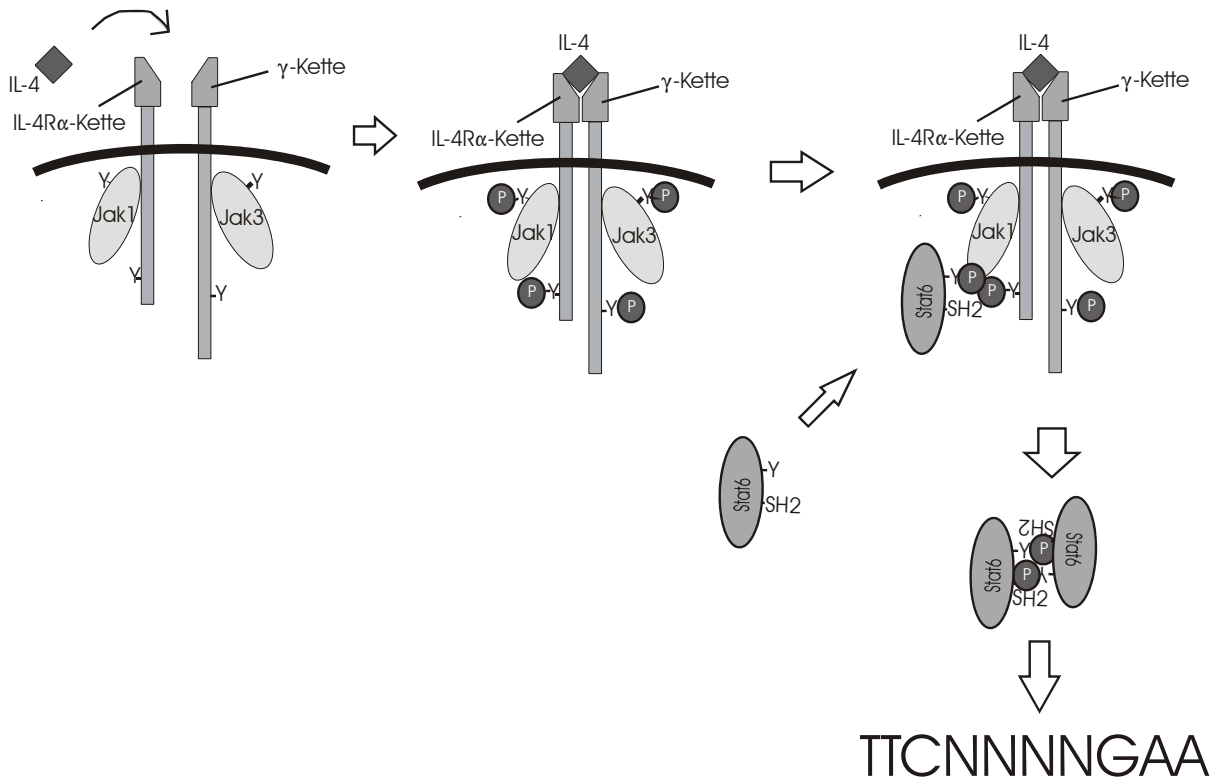


Abb1.: Der IL-4-Jak/STAT-Signaltransduktionsweg (Y: Tyrosinrest), modifiziert nach [76]

Als ein Inhibitor der IL-4 vermittelten Signaltransduktion gilt ein Mitglied der SOCS- („suppressor of cytokine signaling“-)Familie, SOCS-1, welches die Aktivierung von Jak1 und STAT6 zu hemmen vermag [77]. Auch das Proto-Onkogen Bcl-6, welches in IL-4- und STAT6-abhängiger Weise exprimiert wird, zeigt hemmenden Einfluss auf die STAT6-Aktivität im Sinne einer negativen Rückkopplung [78].

Interferon γ

IFN γ zeigt als Th1-Zytokin auf verschiedenen Ebenen einen IL-4 Antagonismus: Es gilt zum einen als ein Induktor von SOCS-1, zum anderen kann es über eine

posttranskriptionelle Destabilisierung der IL-4R α -mRNA eine Herunterregulierung des IL-4-Rezeptors bewirken [79] [80].

Es vermag allerdings bei der B-CLL die Isoform CD23a zu induzieren und wirkt hier überdies sogar synergistisch mit IL-4, während es auf normalen B-Lymphozyten vermutlich über eine Destabilisierung der CD23-mRNA zu einer verminderten IL-4-vermittelten CD23-Expression führt [81] [68, 82] .

Phorbolmyristatazetat

Phorbolmyristatazetat (PMA), ein unphysiologisches Mitogen, welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, führt bei der CLL zu einer starken Induktion beider Isoformen, auf normalen B-Lymphozyten ist nur eine vergleichsweise schwache Induktion von CD23b beobachtbar [68].

Einen zusammenfassenden Überblick gibt Tabelle 1:

Modulatoren der Expression	CD23 Expression auf normalen B-Lymphozyten	CD23 Expression auf CLL B-Lymphozyten
IL-4	++++	+
IFN γ	\pm	(+)
IL-4 + IFN γ	++	++++
PMA	+	+++

Tab.1: Einfluss von IL-4, IFN γ und PMA auf die CD23-Expression

1.4 Molekulare Struktur des CD23 Gens und seiner Transkripte

Einen Überblick über die Organisation von Exons und Introns im CD23 Gen und über die Bildung der CD23a- und CD23b-mRNA gibt Abbildung 2:

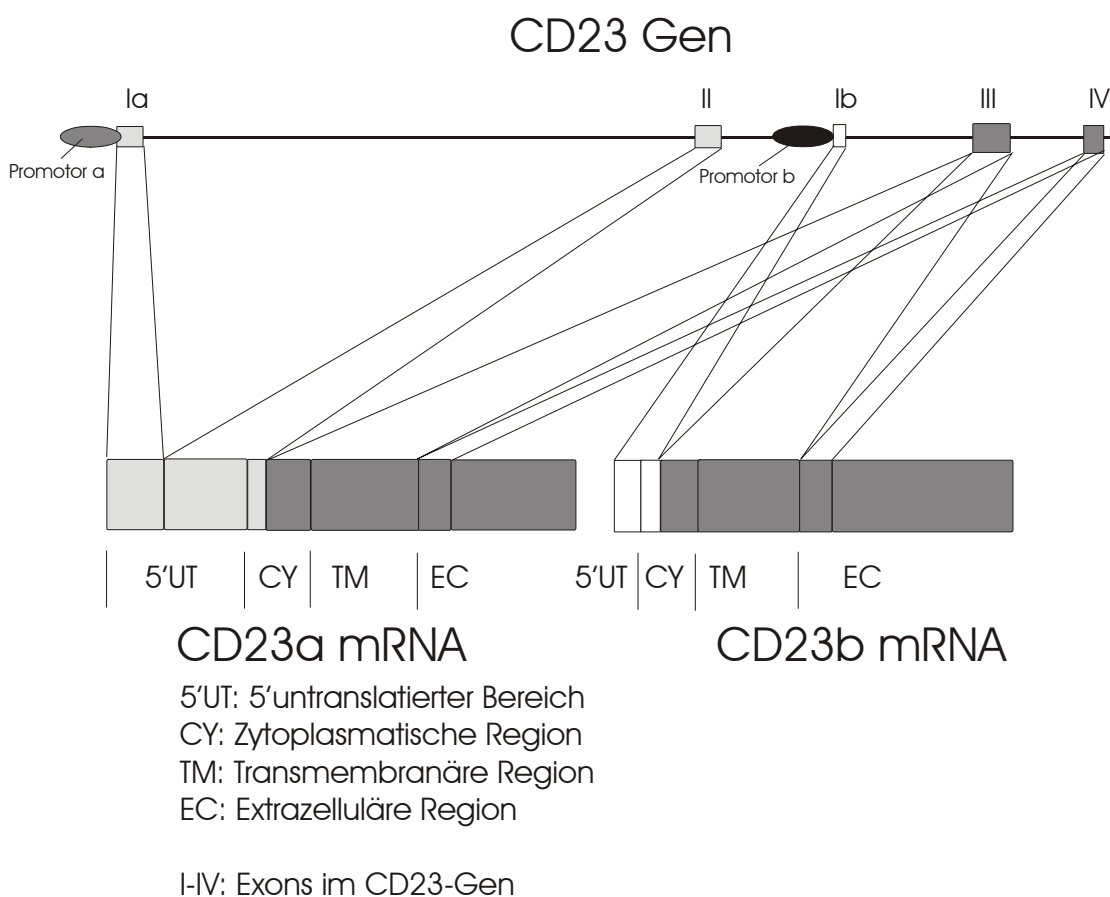


Abbildung 2: Aufbau des CD23 Gens und Bildung der CD23a und CD23b mRNA (nach [6])

Durch alternatives Spleicen unter Verwendung unterschiedlicher Exons (Exon Ia und II für die CD23a-mRNA; Exon Ib nur für die CD23b-mRNA) zu Beginn der Transkription sowie der Benutzung der Promotoren a bzw. b entstehen somit 2 unterschiedliche Transkripte [6]. Ab Exon III gleichen sich beide Transkripte.

Eine nähere Untersuchung des humanen CD23a-Promotors ergab folgendes Bild [83]:

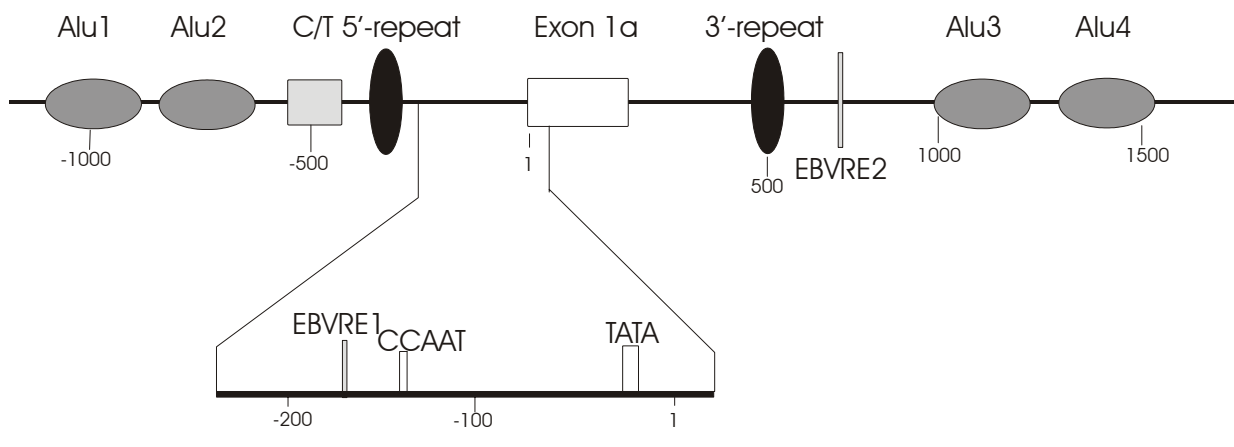


Abbildung 3: CD23a-Promotoranalyse nach Suter et al. [84], ergänzt mit EBV-responsiven Elementen

Der sogenannte CD23a-Core-Promotor liegt zwischen Position -190 und $+80$, die Zahlenangaben beziehen sich auf den Beginn des Exons Ia ($=1$).

Wie Deletionsversuche zeigen konnten, hat die CCAAT-Box einen positiven Einfluss auf die Promotoraktivität [84]. Von derselben Arbeitsgruppe wurde ein negativer Einfluss der pyrimidinreichen C/T-Region auf die Promotoraktivität sowie ein IL-4-responsives Element, welches rund 250 Basenpaare stromaufwärts der TATA-Box liegt, identifiziert [84]. Die insgesamt 4 Alu-Sequenzen und die beiden repetitiven Elemente umrahmen den CD23a-Core-Promotor in einer nahezu symmetrischen Form. Diese Struktur zeigte einen stark inhibitorischen Effekt auf die Promotoraktivität, denkbar ist in vivo eine Schleifenbildung der DNA mittels dieser repetitiven Elemente, wodurch die Genexpression supprimiert werden könnte [83].

Mittlerweile sind auch 2 EBV-responsive Elemente (EBVRE) in der Umgebung des CD23a-Promotors beschrieben worden: EBVRE-1 liegt im Anfangsbereich des CD23a-Core-Promotors, EBVRE-2 stromabwärts im Intron I [85].

EBVRE-1 bindet den zellulären Transkriptionsfaktor CBF1 und vermag so mit dem viralen Transkriptionsfaktor EBNA-2 zu interagieren [86]. EBVRE-2 stellt eine Bindungsstelle für das Ku Autoantigen dar, welches die DNA-bindende Komponente einer DNA-abhängigen Proteinkinase ist, die über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren eine Regulation der Transkription vermittelt [85].

Die Expression von CD23 ist eng verbunden mit den immortalisierenden Funktionen des Epstein-Barr-Viruses und könnte bei diesem Prozess eine zentrale Rolle spielen [85].

Am murinen CD23a-Promotor sind mittlerweile Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren STAT6, NF- κ B und C/EBP charakterisiert worden [87].

Eine Analyse des humanen CD23b-Promotors ergab Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, AP2, NF- κ B, NF-AT und STAT6 sowie ein IL6-responsives Element und eine CAAT-Box [88] [89].

2 Fragestellung

Die veränderte Genregulation von CD23 auf B-CLL-Zellen dient als Grundfragestellung der vorliegenden Arbeit. Vor allem die Regulation der dominant exprimierten CD23a-Isoform sollte durch Promotoranalysen untersucht werden.

Während der CD23b-Promotor im Vergleich zum CD23a-Promotor relativ gut charakterisiert ist, sind die Daten zum CD23a-Promotor äußerst lückenhaft.

Im Mittelpunkt des Interesses stand die Bindung von Transkriptionsfaktoren von normalen sowie CLL-B-Lymphozyten an die CD23a-Core-Promotor-DNA nach Stimulation durch verschiedene Zytokine bzw. Mitogene. Hierzu wurden aus den stimulierten Zellen Kernextrakte gewonnen und über Gel-Retardierungsexperimente eine DNA-Protein-Interaktion untersucht.

Da Interleukin-4 bei der CD23-Expression eine Schlüsselrolle zukommt, war neben der Identifikation anderer Transkriptionsfaktoren vor allem die Charakterisierung einer Bindungsstelle von STAT6 im CD23a-Promotor ein wesentliches Ziel.

3 Material und Methoden

3.1 Reagentien, Geräte, Lösungen

Chemikalien, Reagentien etc.:

AET (2-Aminoethylisothioroniumbromid)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Ficoll Hypaque	Amersham Pharmacia, Freiburg
L-Glutamat	Gibco
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)	Gibco
HCl (Salzsäure)	Roth, Karlsruhe
Heparin Novo	Novo Nordisk, Mainz
Hepes	Roth, Karlsruhe
Interferony	Rentschler, Laupheim
Interleukin-4	Prof. Sebald, Würzburg
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxis (KOH)	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe

Natriumphosphat (Na ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Seromed
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
PMA (Phorbolmyristataacetat)	Sigma, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfourid)	Sigma, Deisenhofen
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI Kulturmedium 1640	Gibco
Schafblut	BAG, Lich
Spermidin	AG Gieseler, Med.Poliklinik
Streptomycin	Seromed
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma, Deisenhofen

Weitere Geräte und Materialien:

Brutschrank	Forma Scientific
β-Counter	Beckmann
Durchflusszytometer	Becton Dickinson
Elektrophoresekammern	Biorad, München und Hoeffler, USA
Filme XO-Mat AR	Kodak
Filmentwickler „Optimax“	Protec
Gewebekulturflaschen u. -platten	Greiner
Photometer	Amersham Pharmacia
Vakuumgeltrockner	Hoeffler, USA
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugen: Eppendorffzentrifuge; Hettich Rotanda AP; Hettich EBA12R, Beckmann	
Ultrazentrifuge	

Lösungen (weitere Puffer etc. siehe in den entsprechenden Abschnitten):

TBE (10fach): 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA

PBS: 155 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

TE: 1 mM EDTA, 10mM Tris

3.2 Gewinnung von B-Lymphozyten

Für die Stimulationsexperimente sowie die Herstellung von Kernextrakten war die Gewinnung von B-Lymphozyten notwendig. Freundlicherweise stimmten B-CLL-Patienten, die eine Konsultation in der Med. Poliklinik Würzburg hatten und bei denen keine medikamentöse Therapie indiziert war, einer Blutspende (ca.40ml) zu. Normale B-Lymphozyten wurden aus Tonsillae Palatinae, die aus Routinetonsillektomien eines niedergelassenen HNO-Arzt (Dr.med.v.Köckritz, Würzburg) stammten, gewonnen.

Ficollierung

Aus dem B-CLL-Blut mussten zunächst in einem ersten Schritt die peripheren mononukleären Blutzellen von den übrigen Blutbestandteilen abgetrennt werden. Hierzu wurde das heparinisierte Blut mit HBSS + 1% FCS verdünnt und dann jeweils ca. 20ml vorsichtig auf ein mit 25ml Ficoll Hypaque gefülltes Bluecap geschichtet. Es folgte eine 25minütige Zentrifugation nach welcher die mononukleären Zellen über dem Ficoll als Bande flottieren, während alle anderen Bestandteile ein Pellet am Röhrchenboden gebildet haben. Diese Bande wurde dann abgesaugt, 2x mit RPMI + 1% FCS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

Die Tonsillen wurden kleingeschnitten und mittels eines Spritzenstempels durch ein Teesieb gepresst, wobei mit HBSS + 1% FCS nachgespült wurde. Nach dem Absetzen von Zellbrocken wurde der Überstand in analoger Weise ficolliert und weiterverarbeitet. Die jeweilige Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer errechnet.

Rosettierung

Die Rosettierung dient der Trennung von T- und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten können über ihren CD2-Rezeptor an das CD58-Oberflächenmolekül auf

Schaferythrozyten binden. Eine Vorbehandlung der Schaferythrozyten mit 2-Aminoethylisothioniumbromid (AET) macht CD58 zugänglicher für T-Lymphozyten: es bilden sich „Rosetten“ aus einer T-Zelle und mehreren Schaferythrozyten.

Um eine Rosettenbildung zu erreichen, wurden die Lymphozyten mit einem 20fachen Überschuss an Schaferythrozyten versetzt, 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und über Nacht bei 4°C im Kühlraum belassen. Das daraufhin entstandene Pellet wurde dann vorsichtig resuspendiert und die Suspension wie im vorigen Abschnitt beschrieben ficolliert; nun bestand die entstandene Bande aus B-Lymphozyten, während die Rosetten das Pellet bildeten. Die Bande wurde nun wie schon beschrieben wieder abgesaugt, 2x gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen sowie die Zellzahl bestimmt.

Zellkultur

Die B-Lymphozyten wurden in RPMI + 10% FCS unter Zusatz von PenicillinG (100 U/ml), Streptomycin (100ng/ml) und L-Glutamat (5mM) in einer 6-Well-Platte mit einer Konzentration von ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Konzentration der zugesetzten Stimulantien betrug für IL-4 20ng/ml, für IFN γ 1000U/ml und für PMA 30ng/ml.

Kernextrakte wurden jeweils nach 2 Stunden und nach 24 Stunden gewonnen; die CD23-Expression wurde nach 40 Stunden in der Durchflusszytometrie gemessen.

3.3 Herstellung von Kernextrakten

Puffer A: 10mM HEPES/KOH 7.9; 1.5mM MgCl₂; 10mM KCl

Puffer B: 20mM HEPES/KOH 7.9; 420mM NaCl; 25% Glycerol; 1.5 mM MgCl₂; 0.2mM EDTA

Puffer D: 20mM HEPES/KOH 7.9; 0.2mM EDTA; 20% Glycerol; 10mM KCl

Kernextrakte wurden nach dem folgenden Protokoll gewonnen, den Puffern waren zuvor Proteaseinhibitoren zugesetzt worden (Aprotinin 1:1000; Leupeptin 1:1000; Pepstatin 1:1000; PMSF 1:100; DTT 1:1000)

- Zellen 20 Sekunden bei 12000 g pelletieren, Volumen des Pellets bestimmen
- 1x mit 30 Vol. PBS waschen
- Zellen in 1 Vol. Puffer A aufnehmen und 15 Minuten auf Eis schwellen lassen
- Zellyse durch 5x Durchziehen der Suspension durch eine 1ml-Spritze mit einer 25 5/8 G Nadel (Spritze zuvor mit Puffer A benetzen)
- 20 Sekunden bei 12000g zentrifugieren
- Pellet in 2/3 Vol. Puffer C aufnehmen und 30 Minuten auf Rotator im Kühlraum
- 5 Minuten zentrifugieren bei 4°C
- Überstand abnehmen und gegen Puffer D dialysieren

Die Kernproteine wurden nach photometrischer Konzentrationsbestimmung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Neben der Herstellung von Kernextrakten aus B-CLL- und normalen B-Lymphozyten wurden auch Kernextrakte aus Wil-2-Zellen, einer lymphoblastoiden EBV-transformierten B-Zelllinie (ATCC-Nr. CRL-8885) sowie aus Zellen der Linie 293 (embryonale epitheliale Nierenzellen, ATCC-Nr. CRL-1573) hergestellt.

3.4 Durchflusszytometrie

Um die Wirkung der Stimulationsexperimente im Hinblick auf die CD23-Expression beurteilen zu können, wurden die Zellen nach 40 Stunden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei werden die Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts. Die Vorwärts-Lichtstreuung korreliert mit der Zellgröße, die Seitwärtsstreuung mit ihrer Granularität.. Als weiterer Parameter kann die Fluoreszenz bestimmt werden: Es ist möglich, gleichzeitig mehrere Antikörper einzusetzen, die gegen verschiedene Antigene gerichtet und an verschiedene Farbstoffe gekoppelt sind, z.B. an Fluoreszein-Isothiocyant (FITC) oder an Phycoerythrin (PE). Beide Farbstoffe werden durch Laserlicht der Wellenlänge 488nm angeregt, haben jedoch unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionsmaxima.

So lässt sich mit Hilfe der Antikörper CD19-PE (Becton Dickinson, Heidelberg) und CD23-FITC (Dianova, Hamburg) zum einen der prozentuale Anteil der CD23-positiven

B-Zellen als auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), welche ein Maß für die Expressionsstärke pro Zelle darstellt, ermitteln. Hierzu wurden pro Ansatz 10^6 Zellen mit den genannten Antikörpern markiert und per Durchflusszytometrie analysiert. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest-Software.

3.5 Electro Mobility Shift Assay (EMSA)

Dieses Verfahren dient dem Nachweis von DNA-Protein-Interaktionen. Hierbei inkubiert man einen Zellkernextrakt mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment. Ferner wird ein synthetischer repetitiver DNA-Strang (Poly(dIdC), Amersham Pharmacia, Freiburg) hinzugefügt, um unspezifische Bindungen abzufangen. Eine Auftrennung von freien Sonden und DNA-Oligonukleotiden, an welche Proteine gebunden haben, gelingt durch eine Elektrophorese in einem sogenannten nativen, also nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel. DNA-Proteinkomplexe zeigen eine verminderte Wanderungsgeschwindigkeit.

Eine weitere Retardierung des Wanderungsverhaltens eines DNA-Proteinkomplexes erhält man durch Zusatz eines spezifischen Antikörpers gegen das an das Oligonukleotid gebundene Kernprotein; es resultiert ein sogenannter Supershift, womit der Nachweis eines bestimmten Proteins gelungen ist. Alternativ kann es durch den Antikörper auch zu einer Inhibierung der DNA-Protein-Interaktion kommen, wodurch die Bande im EMSA verschwindet. Hierzu wird der EMSA-Ansatz (s.u.) 15 Minuten mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert.

In Kompetitionsversuchen wird dem Ansatz ein nicht radiomarkiertes Oligonukleotid (z.B. das gleiche oder eines mit einer bekannten Konsensus-Sequenz, meist in steigenden Überschussmengen) hinzugegeben, welches mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment um die Proteinbindung konkurriert.

Verwendete Oligonukleotide:

Der CD23a-Core-Promotor wurde im EMSA mit den folgenden 9 Oligonukleotid-Doppelsträngen (Amersham Pharmacia, Freiburg) untersucht. Die Oligonukleotide sind jeweils rund 35-40 Basenpaare lang und überlappen sich mit dem jeweils folgenden um

rund 5 Basenpaare. Alle Angaben sind in 5'-3'-Richtung, der Core-Promotor beginnt mit dem Oligonukleotid-Einzelstrang CP1a (CP1b ist der hierzu komplementäre Einzelstrang) und endet schließlich mit dem Oligonukleotid-Paar CP9a/CP9b.

CP1a: GGTTACATCTTGACGCTACCACTCACCTCCTTCAGCCC

CP1b: AGGGCTGAAGGAGGTGAGTGGTAGCGTCAAGATGTG

CP2a: AGCCCTGTGGGAACTTGCTGCTTAACATCTCTAGT

CP2b: GAGAACTAGAGATGTAAAGCAGCAAGTTCCCACAGG

CP3a: TAGTTCTCACCCAATTCTTTACCTGAGAAATGGAGA

CP3b: GTTATCTCCATTTCTCAGGTAAGAGAATTGGGTGAGAA

CP4a: GGAGATAATAATAACACGGACTTCACCCGGGTGTGGG

CP4b: GCTCCCCACACCCGGGTGAAGTCCGTGTTATTACT

CP5a: GTGGGAGCACCAGGAGAGGCCATGCGTGTAATGTTA

CP5b: GGATAACATTACACGCATGGCCTCTCCTTGGTGCTCC

CP6a: TGTTATCCGGGTGGCAAGCCCATATTTAGGTCTATGAAA

CP6b: TATTTTCATAGACCTAAATATGGGCTTGCCACCCGGATA

CP7a: TGAAAATAGAAGCTGTCAGTGGCTCTACTTTCAGAACA

CP7b: GCTTTCTTCTGAAAGTAGAGCCACTGACAGCTTCTATTT

CP8a: GAAGAAAGTGTCTCTCTTCCTGCTTAAACCTCTGTCTC

CP8b: GTCAGAGACAGAGGTTTAAGCAGGAAGAGAGACACTTT

CP9a: GTCTCTGACGGTCCCTGCCAATCGCTCTGGTCGAC

CP9b: GGGGTGACACCAGAGCGATTGGCAGGGACCGTCAGA

Zur Untersuchung von putativen STAT6-Bindungsstellen (unterstrichen) im CD23a-Promotor wurden folgende Oligonukleotide verwendet (von MWG, München):

CD23a-S1a: CAGCCCTGTGGGAACTTGCTG

CD23a-S1b: AGCAGCAAGTTCCCACAGGG

CD23a-S2a: TCTTACCTGAGAAATGGAAG

CD23a-S2b: ATCTCCATTTCTCAGGTA

Für Konkurrenzexperimente wurde die schon bekannte STAT6-Bindungsstelle (unterstrichen) im CD23b-Promotor verwendet [88]:

CD23b-IL4REa: AGCTTGAATTTCTAAGAAAGAGGGA

CD23b-IL4REb: AGCTTCCCTCTTTCTTAGAAATTCA

Zunächst mussten die als Einzelstränge gelieferten Oligonukleotide zu komplementären Paaren hybridisiert werden ("Annealing"). Hierzu wurde je ein komplementäres Paar in gleichen Mengen (z.B. 50µg) in 100µl H₂O 5 Minuten bei 96°C erhitzt und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration sowie der Reinheit erfolgte in Quarzglasküvetten photometrisch.

Antikörper für Supershifts:

Stat6 (S-20)(Santa Cruz, Heidelberg): polyklonaler Kaninchenantikörper gegen den Carboxy-Terminus von humanem STAT6

Radioaktive Markierung der Oligonukleotide:

Die Oligonukleotidpaare wurden durch den Einbau von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10mCi/ml; Amersham Pharmacia, Freiburg) in den komplementären Strang des 5'-überstehenden

Stranges („sticky end“) durch Klenow-Fragment (Amersham Pharmacia, Freiburg) radioaktiv markiert.

Ansatz:

100ng Oligonukleotid
2mM dXTP (also unmarkierte dATP, dGTP, dTTP)
50 μ Ci α^{32} P-dCTP
10 U Klenow-Fragment
Klenow-Puffer
H₂O ad 50 μ l

Inkubation für 1 Stunde bei 29°C, danach Klenow-Inaktivierung durch kurzes Erhitzen auf 75°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits (QIAGEN, Hilden) entfernt und die radiomarkierten Oligonukleotide schließlich im QIA-Elutionspuffer aufgenommen und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (β -Counter) ermittelt.

Eine Ausnahme bezüglich der radioaktiven Markierung stellte das Oligonukleotidpaar CD23a-S2a/b dar: Da hier keine Einbaumöglichkeit für α^{32} P-dCTP gegeben war, erfolgte die Markierung mit γ^{32} P-dATP und der T4-Polynukleotidkinase (beides von Amersham Pharmacia, Freiburg).

EMSA-Ansatz (Inkubation von Kernextrakten mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden):

Bindungspuffer (5fach): 50mM HEPES (pH 7,9); 70% Glycerol; 0,5mM EDTA; 100mM NaCl; 20mM MgCl₂; 10mM DTT; 10mM Spermidin

Bindungspuffer für STAT6-EMSA (5fach, optimiert von Ruth Seggewiß, AG Tony): 50 mM HEPES (pH 7,8); 5 mM EDTA; 25 mM MgCl₂; 50% Glycerol

Ansatz:

10µg Kernextrakt

2µg Poly(dIdC)

Bindungspuffer

radioaktiv markiertes Oligonukleotid (ca. 40.000 counts per minute)

H₂O ad 20 µl

Inkubation 30 Minuten auf Eis

Elektrophoretische Auftrennung:

5% Polyacrylamid-Gel (50ml Ansatz): 8ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), 5ml 5xTBE, 37ml H₂O; Polymerisation durch Zugabe von 500 µl APS10% und 50µl TEMED

Gellaufpuffer: 0,5xTBE

Das Gel wurde 30 Minuten bei 90V unbeladen laufen gelassen, dann wurde es mit den entsprechenden EMSA-Ansätzen beladen und bei 250V so lange laufen gelassen, bis ein mitlaufender Blaumarker $\frac{3}{4}$ der Gesamtlaufstrecke zurückgelegt hatte. Das Gel wurde nun auf Whatman-Papier aufgenommen, auf einem beheizten Vakuumgeltrockner getrocknet und dann für 24-48h in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80°C belichtet.

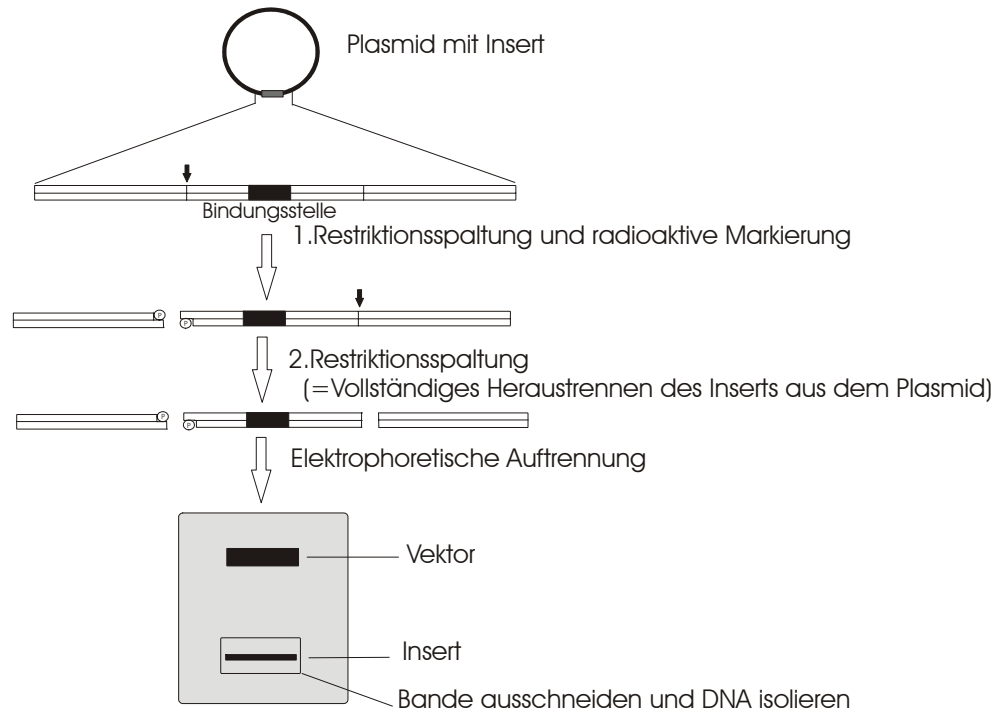
3.6 DNase-I-in vitro Footprinting

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen stellt das DNase-I-in vitro Footprinting dar. Es liefert im Vergleich zum EMSA sequenzspezifische genaue Informationen über die einzelnen Kontaktpunkte zwischen DNA und Proteinen. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass eine Proteinbindung an eine bestimmte DNA-Sequenz die entsprechenden Phosphodiesterbindungen des Nukleotidstranges vor einer durch DNase-I-vermittelten Hydrolyse schützt. So sind bei

ungebundener DNA nach DNase-I-Verdau statistisch Fragmente sämtlicher Größen vorhanden, bei Proteinbindung hingegen fehlen die so geschützten Fragmente und nach elektrophoretischer Auftrennung ist ein entsprechendes Fenster („Footprint“) erkennbar. Diese „Footprints“ lassen sich durch Vergleich mit einer parallel durchgeführten DNA-Sequenzierung genau lokalisieren.

Abbildung 4 zeigt schematisch das Prinzip des DNase-I-in vitro Footprinting.

1. Vorbereitung einer DNA-Sonde



2. DNase-I-Footprinting

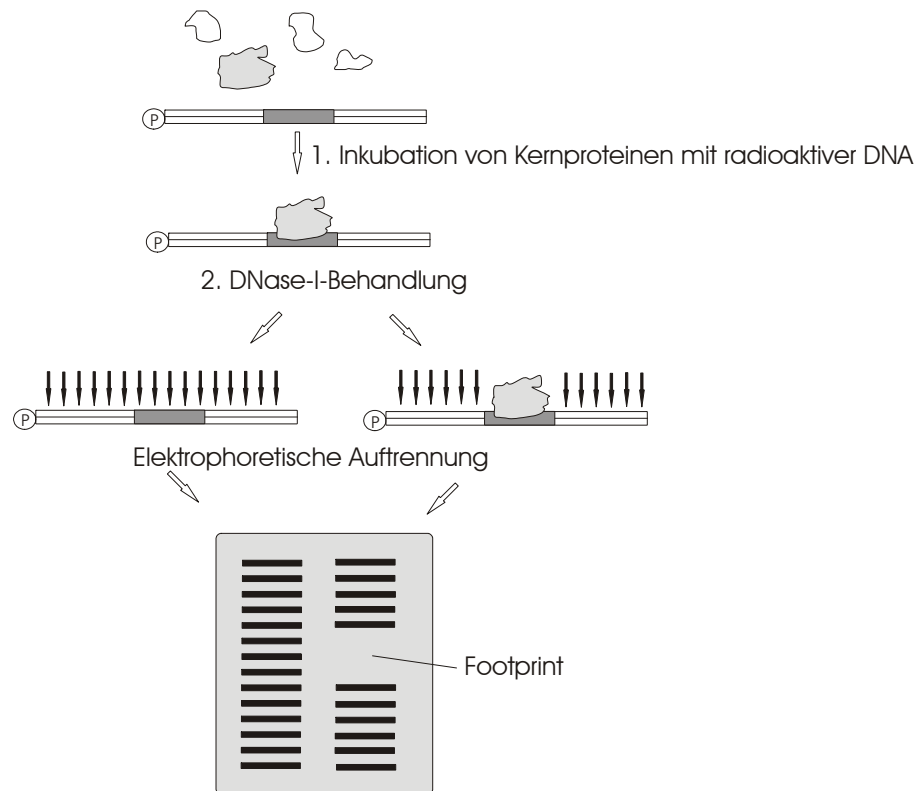


Abb.4: DNase-I in vitro Footprinting

3.6.1 Herstellung geeigneter Vektoren:

Als Vorbereitung für das Footprinting war die Herstellung von Bakterienplasmiden, welche jeweils einen bestimmten Abschnitt des CD23a Core-Promotors enthielten, nötig.

Ein ca. 1400 Bp umfassender Bereich des CD23a Promotors, welcher auch den Core-Promotor-Bereich enthielt, lag bereits kloniert in einem pZero-2-Plasmid vor und wurde freundlicherweise von Stefan Kleinert überlassen.

Aus diesem Plasmid, pZero23a, wurden mittels Restriktionsenzymen DNA-Fragmente herausgeschnitten und jeweils in einen neuen Klonierungsvektor (pZero-2-Plasmid (Invitrogen, Leek, NL)) kloniert. Diese neuen Plasmide wurden dann in E.coli DH5 α transformiert, und über Bakterienkulturansätze wurden ausreichende Mengen an Plasmid-DNA gewonnen.

Allgemeiner Ansatz für das Schneiden mit Restriktionsenzymen:

1 μ g DNA

1U Restriktionsenzym + dazugehörigen Puffer

H₂O ad 15 μ l

Inkubation 1h bei 37°C oder 25°C (je nach Enzym), danach Hitzeinaktivierung des Enzyms.

Verwendete Restriktionsenzyme:

BamH1, EcoRV, Sma: New England Biolabs, Frankfurt

EcoR1: Roth, Karlsruhe

Sall, BsgI: Amersham Pharmacia, Freiburg

Die geschnittene DNA wurde auf einem mit Etidiumbromid (Sigma, Deisenhofen) versetzten Agarosegel aufgetrennt, das gesuchte Fragment unter UV-Beleuchtung aus dem Gel herausgeschnitten und mittels des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (QIAGEN, Hilden) aus dem Gel extrahiert.

Klonierung des ausgeschnittenen Fragments in ein neues Plasmid:

Um nun ein Fragment in ein neues Plasmid (pZero-2) zu klonieren, wurde dieses zunächst aufgeschnitten. Je nach Beschaffenheit der Schnittstellen des Plasmids und des respektiven Fragments war, wenn es sich um nicht komplementäre „sticky ends“, also überhängende 5'-Enden handelte, eine Umwandlung in „blunt ends“ durch Auffüllen dieser Überhänge mittels Klenow-Fragment (s. EMSA-Abschnitt) nötig.

Die Ligation von Fragment und Plasmid nach vorheriger Dephosphorylierung durch Calf Intestine Phosphatase (CIP) mittels T4-DNA-Ligase mit dem „Rapid DNA Ligation Kit“ (Boehringer Mannheim).

Ein Kontrollverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen diente der Bestätigung einer erfolgreichen Klonierung des Fragments in das Plasmid.

Eine Ansequenzierung mit dem T7-Sequencing-Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) brachte auch den Nachweis einer erfolgreichen Klonierung und gab zudem Auskunft über die Orientierung des Inserts, da bei „blunt ends“ hier zwei Möglichkeiten bestehen.

Transformation von *E.coli* DH5 α :

Zur raschen Vervielfältigung der neuen Plasmide mussten diese zunächst in Bakterien eingebracht werden. Hierzu wurden ca. 0,5 μ g Plasmid-DNA in einem Transformationsröhrchen mit 100 μ l frisch aufgetauten kompetenten *E.coli* DH5 α zusammengemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert, 1 Minute in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten, wieder 2 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte Zugabe von 0.9ml LB, Inkubation bei 37°C in einem Schüttler (250 U/min) und anschließende Ausplattierung auf Agarplatten.

Den Agarplatten war IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid von Sigma, Deisenhofen) zugesetzt, welches bei pZero-2-Plasmiden ohne Insert die Expression des letalen Gens *ccdB* induziert.

3.6.2 Gewinnung von Vektor-DNA und DNase-I-in vitro Footprinting

Präparation von Plasmid-DNA

Um genügend Plasmid-DNA für Footprinting Versuche zur Verfügung zu haben, wurden von jedem Plasmid über Bakterienkultur gemäss dem „QIAGEN-tip 100 (Midi)“-Protokoll (QIAGEN, Hilden) rund 100µg DNA gewonnen.

DNase-I-in vitro Footprinting

Für die Footprinting-Versuche wurde das „Core Footprinting System“ (Promega, Mannheim) verwandt, die Versuche wurden gemäss dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Eine radioaktive Markierung von DNA erfolgte wie im EMSA-Abschnitt beschrieben.

4 Resultate

4.1 Untersuchung des CD23a-Core-Promotors mittels EMSA

B-CLL-Lymphozyten und normale B-Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression von CD23 beider Isoformen sowie auch in ihrer diesbezüglichen Regulation durch Zytokine. Ob und inwiefern sich bei verschiedenen Stimulationsansätzen Veränderungen im Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an die DNA des CD23a-Core-Promotors ergeben, sollte mittels Gel-Retardierungsexperimenten, den sogenannten „Electro Mobility Shift Assays“ (EMSA) untersucht werden.

Für diese Experimente wurde der knapp 300 Bp große CD23a-Core-Promotor in 9 etwa gleich große Fragmente unterteilt.

Hierzu wurden 9 Oligonukleotidpaare genutzt, die jeweils eine Länge von ca. 35-40 Bp hatten, und die zusammen die knapp 300 Bp lange DNA-Sequenz des CD23a-Core-Promotors abdeckten, wobei sich benachbarte Oligonukleotide in ihrer Sequenz um ca. 5 Bp überlappten. Die Oligonukleotidpaare wurden radioaktiv markiert, mit Kernproteinextrakten aus den verschiedenen Stimulationsansätzen inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

4.1.1 Stimulation von B-CLL- und normalen B-Lymphozyten

Um Kernextrakte verschiedener Stimulationsansätze für die EMSAs zu erhalten, mussten zunächst B-Lymphozyten aus dem Blut von B-CLL-Patienten bzw. aus den Tonsillen gesunder Spender gewonnen werden, die dann folgendermaßen stimuliert wurden:

1. nicht
2. mit Interleukin-4
3. mit Interferon γ
4. mit Interleukin-4 und Interferon- γ
5. mit Phorbolmyristatazetat (PMA)

Anschließend wurden jeweils

- a. nach 2 Stunden und
- b. nach 24 Stunden

Kernextrakte gewonnen.

Die CD23-Expression von jedem Ansatz wurde jeweils 40 Stunden nach Stimulationsbeginn mittels der Durchflusszytometrie bestimmt und war damit auch Nachweis einer erfolgreichen Stimulation.

Abbildung 5 zeigt die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD23 aller Ansätze als Maß für die Stärke der CD23-Expression.

Die Werte entsprechen der in der Einleitung dargelegten differentiellen Regulation der CD23-Expression bei B-CLL und normalen Lymphozyten: IL-4 induziert bei beiden die CD23-Expression, die B-CLL-Lymphozyten zeigen jedoch bei Kostimulation mit IFN- γ eine verstärkte CD23-Expression, während diese bei normalen B-Lymphozyten bei Kostimulation mit IFN- γ reprimiert wird.

Somit konnte von einer erfolgreichen Stimulation ausgegangen werden.

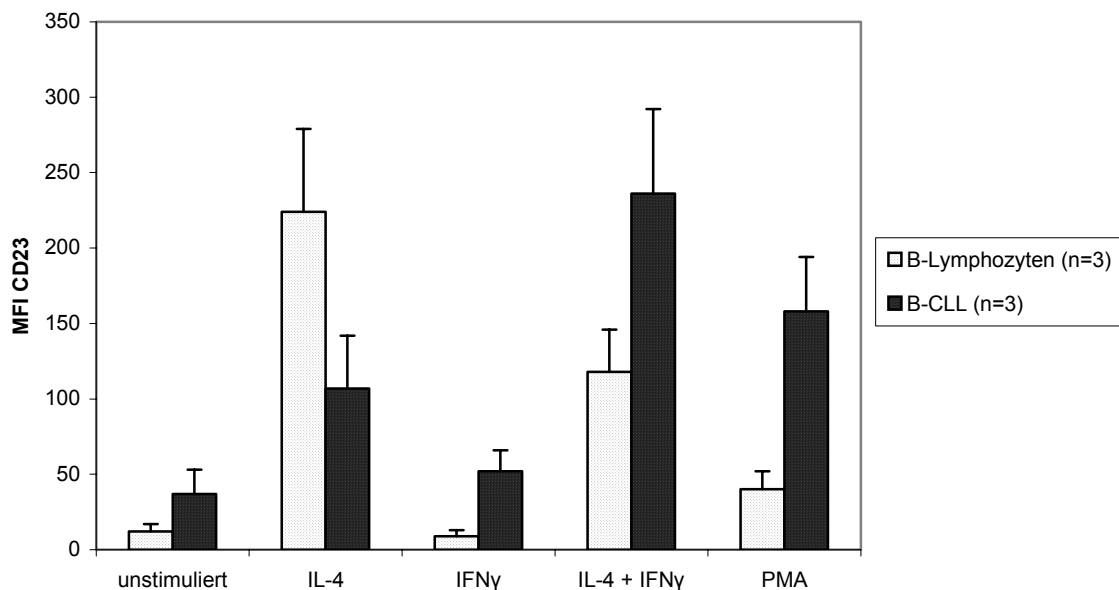


Abb.5: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD23 in der Durchflusszytometrie als Maß für die CD23-Expression nach verschiedenen Stimulationsansätzen

4.1.2 Gel-Retardierungsexperimente (EMSA)

Um zu untersuchen, ob die differentielle Expression und Regulation der CD23-Expression auf einem veränderten Transkriptionsfaktorenprofil auf CD23a-Core-Promotorebene beruht, wurden mit den aus den verschiedenen Stimulationsansätzen gewonnenen Kernextrakten Gel-Retardierungsexperimente (EMSA) durchgeführt.

Die EMSA-Experimente ergaben bei allen Stimulationsansätzen ein einheitliches Bandenmuster.

Somit zeigte sich im Gegensatz zur differentiellen CD23-Expression auf der Zelloberfläche von normalen bzw. CLL-B-Lymphozyten nach Zellstimulation gemäß oben genanntem Schema bei den DNA-Protein-Interaktionen im Bereich des CD23a-Core-Promotors kein Unterschied. Stets fanden sich charakteristische Banden bei den Oligonukleotiden 2, 4, 5, 6, 8 und 9.

Die Abbildungen 6a und b zeigen exemplarisch die sich gleichenden Bandenmuster bei EMSA-Experimenten mit Kernextrakten von normalen unstimulierten B-Lymphozyten (Abb.6a) im Vergleich mit PMA stimulierten CLL-B-Lymphozyten (Abb.6b).

Somit ergab die Untersuchung des CD23a-Core-Promotors mittels EMSA keine Erklärung auf der DNA-Protein-Interaktionsebene im Core-Promotorbereich für die differentielle Regulation der CD23-Expression.

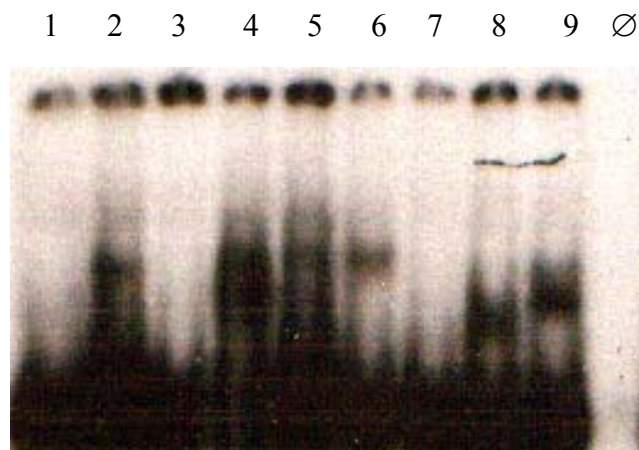


Abb.6a

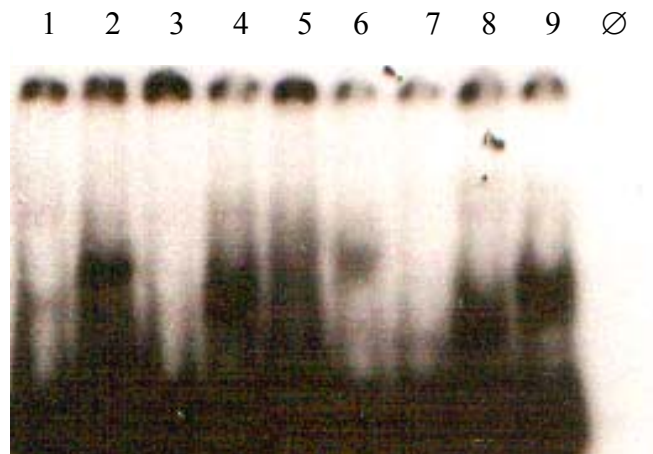


Abb.6b

Abb. 6a und b: Gleiches Bandenmuster im EMSA bei zwei unterschiedlichen Stimulationsansätzen (1-9: Oligonukleotide 1-9, Ø:Negativkontrolle)

Bei EMSA-Experimente mit Kernextrakten aus Wil-2-Zellen, einer humanen EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinie mit konstitutiv hoher CD23-Expression, fehlte im Vergleich zu den vorigen EMSA-Experimenten die Bande bei Oligonukleotid 5 und im Bereich des Oligonukleotids 6 zeigte sich hier eine charakteristische Dreierbande (Abbildung 7).

Dies könnte mit einer veränderten Regulation der CD23-Expression bei EBV-transformierten Zellen durch differente Transkriptionsfaktoren zusammenhängen.

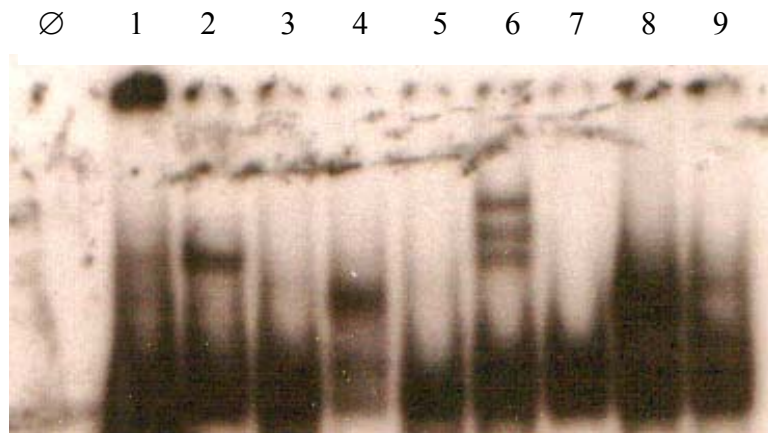


Abb. 7 : EMSA mit Kernextrakten aus Wil-2-Zellen, charakteristische Dreierbande bei Oligonukleotid 6 (1-9: Oligonukleotide 1-9, Ø:Negativkontrolle)

Um einen Vergleich mit nicht-hämatogenen Zellen zu erhalten, wurden EMSA-Experimente mit Kernextrakten aus 293-Zellen, einer humanen embryonalen Nierenepithel-Zelllinie durchgeführt.

Hier fanden sich nur bei den Oligonukleotiden 2, 6 und 9 charakteristische Banden (Abbildung 8).

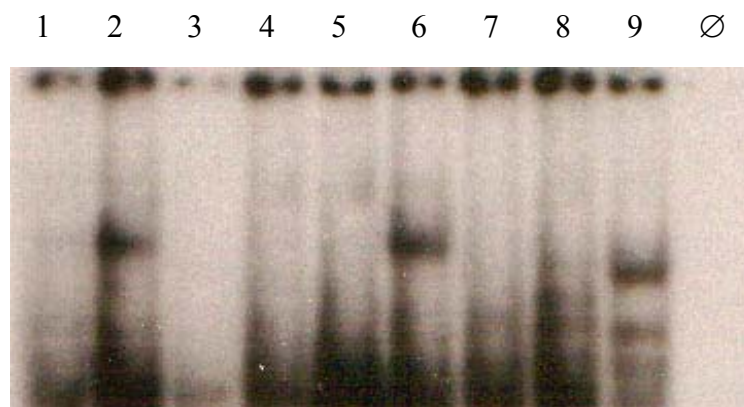


Abb. 8: EMSA mit Kernextrakten aus 293-Zellen. Charakteristische Bandenbildung bei Position 2, 6 und 9 (1-9: Oligonukleotide 1-9, Ø:Negativkontrolle)

4.2 Charakterisierung von putativen STAT6-Bindungsstellen im CD23a-Core-Promotor

Die Interleukin-4-induzierte Expression des CD23 Gens ist schon seit längerem bekannt; eine zentrale Rolle hierbei spielt die über den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg vermittelte Aktivierung des des Transkriptionsfaktors STAT6 (vgl. Abb.1 in der Einleitung). Für den CD23b Promotor ist bereits eine STAT6-Bindungsstelle charakterisiert worden [88]. In dieser Arbeit wurden 2 putative STAT6-Bindungsstellen, bei denen von ihrer Sequenz her eine Bindung möglich erschien, genauer im Hinblick auf eine STAT6-Bindung untersucht. Der folgende Textkasten zeigt einen Überblick:

Bekannte Bindungsstellen (Sites):

TTC NNN(N) GAA : STAT6 Konsensus Site [74]

TTC TAA GAA : STAT6 Site im CD23b-Promotor [88]

Putative Sites im CD23a-Core-Promotor:

CCT GTGG GAA : Site I (Position 29-38 im Core-Promotor)

TAC CTGA GAA: Site II (Pos. 77-86)

Site I und II wurden bezüglich ihres STAT6-Bindungsvermögens mittels EMSA untersucht. Hierzu wurden die beiden Oligonukleotide nach Hybridisierung mit ihrem komplementären Strang radioaktiv markiert, mit IL-4 stimulierten Kernextrakten inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine eventuell auftretende DNA-Proteinbindung hinsichtlich ihrer Spezifität zu bestätigen, wurde jeweils ein zusätzlicher Reaktionsansatz zudem noch mit einem Anti-STAT6-Antikörper inkubiert.

Wie die Abbildung 9 zeigt, kommt es bei der Site II zu einer deutlichen Bandenbildung, welche im entsprechenden Ansatz mit Anti-STAT6-Antikörpergabe nicht mehr vorhanden ist. Somit ist für die Site II die STAT6-Bindung nachgewiesen. Im Ansatz mit Site I ist dagegen keine Bandenbildung als Hinweis einer möglichen STAT6-Bindung sichtbar.

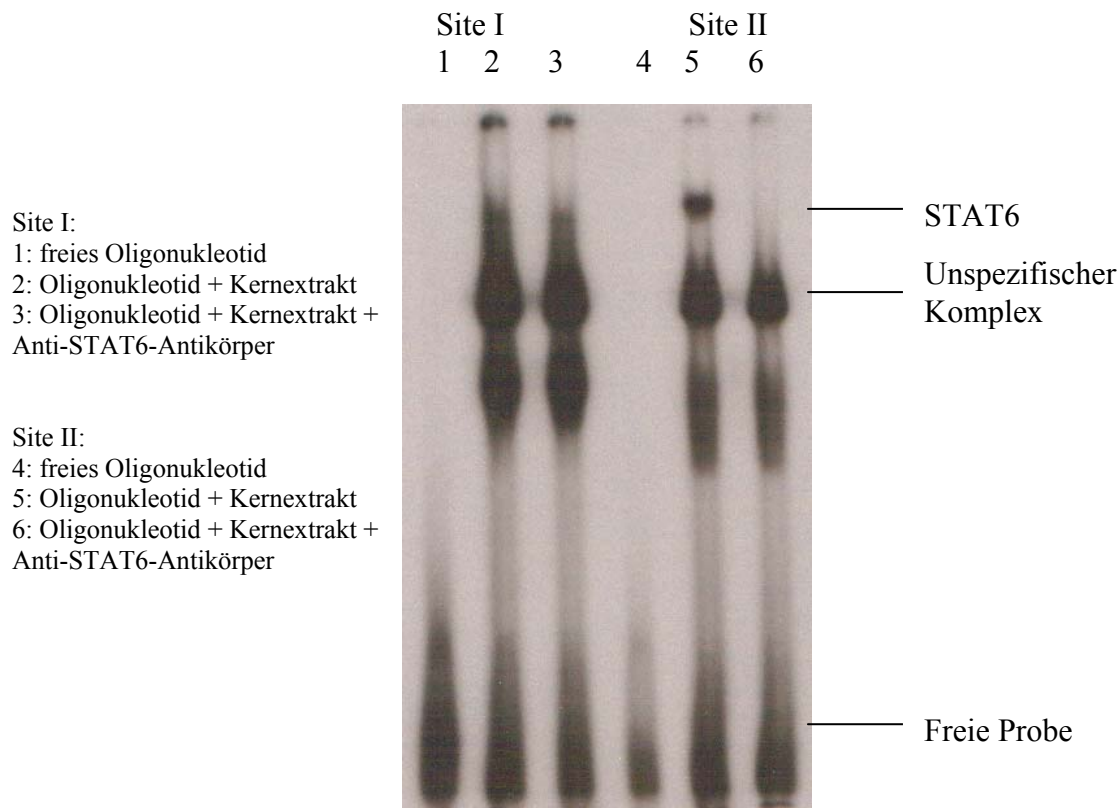


Abb.9: Untersuchung der Sites I und II auf STAT6-Bindung

Zur weiteren Bestätigung dieser Resultate und um einen Vergleich der Site II zur bekannten Bindungssequenz des CD23b-Promotors zu erhalten, wurden EMSA-Kompetitionsexperimente durchgeführt.

Hierbei wurde im ersten Ansatz die bekannte STAT6-Bindungssequenz des CD23b-Promotors radioaktiv markiert und nach Zugabe von Kernextrakten mit steigendem Überschuss (1-1000facher Überschuss) der gleichen, aber unmarkierten Sequenz sowie mit steigenden unmarkierten Mengen an Oligonukleotiden der Sites I und II kompetiert. Wie die Abbildung 10 zeigt, gelingt mit der Site I selbst in 1000fachem Überschuss keine Competition mit der radioaktiv markierten STAT6-Bindungsstelle des CD23b-Promotors.

Site II vermag erfolgreich zu kompetieren, allerdings ist die Kompetitionsfähigkeit der unmarkierten STAT6-Bindungsstelle des CD23b-Promotors (CD23b-Site) um die

STAT6 Bindung höher, was somit auf eine höhere STAT6-Bindungsaffinität der CD23b-Site hinweist.

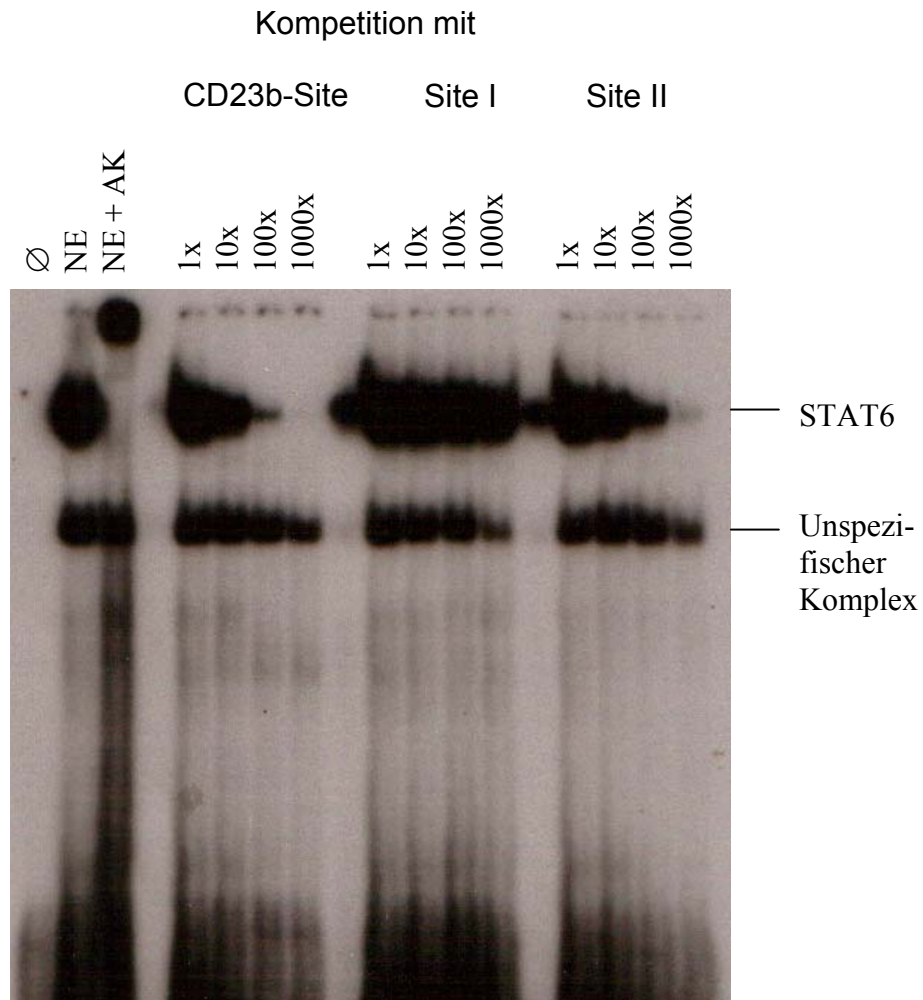


Abb.10: EMSA-Kompetitionsexperimente der radioaktiv markierten STAT6-Bindungsstelle des CD23b-Promotors (=CD23b-Site) mit steigendem Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden der CD23b-Site sowie der Sites I und II. (Die ersten 3 Bahnen dienen der Positiv- bzw. Negativkontrolle. Ø: keine Zugabe von nukleären Extrakten; NE: Zugabe von nukleären Extrakten; NE + AK: zusätzlich noch Gabe eines Anti-STAT6-Antikörpers)

Im folgenden EMSA-Kompetitionsexperiment wurde die vorhandene, wenn auch niedrigere STAT6-Bindungsaffinität im Vergleich zur CD23b-Site bestätigt. Das Experiment ähnelt im Aufbau dem vorigen, nur wurde jetzt die Site II radioaktiv markiert und mit unmarkierten Oligonukleotiden der Site II sowie der CD23b-Site kompetiert (Abbildung 11)

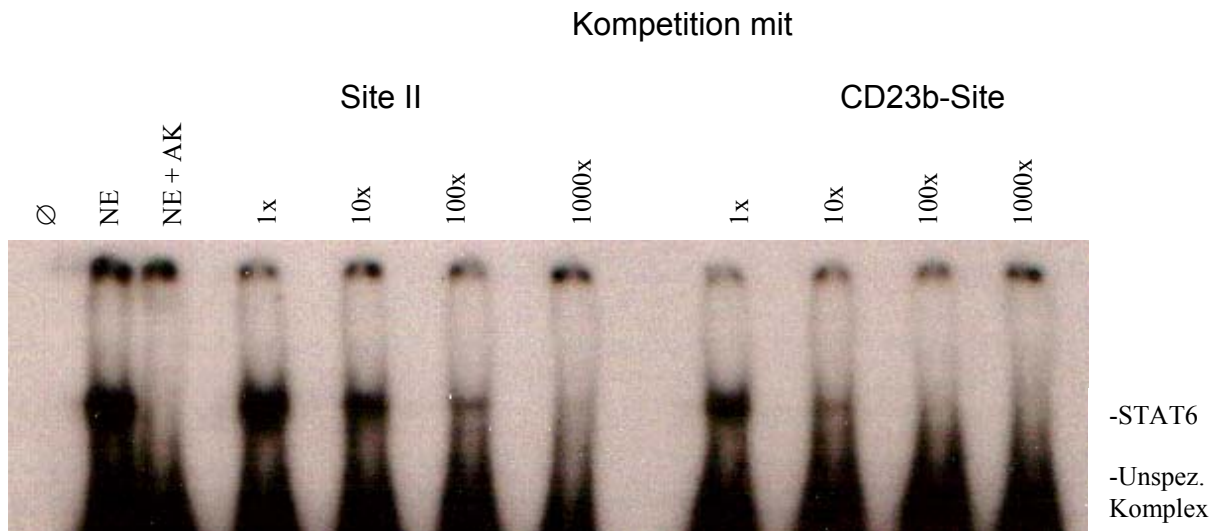


Abb.11: EMSA-Kompetitionsexperimente der radioaktiv markierten Site II mit steigendem Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden der Site II sowie der CD23b-Site. (Die ersten 3 Bahnen dienen der Positiv- bzw. Negativkontrolle. ∅: keine Zugabe von nukleären Extrakten; NE: Zugabe von nukleären Extrakten; NE + AK: zusätzlich noch Gabe eines Anti-STAT6-Antikörpers)

4.3 Vorbereitungen für DNase-I-Footprint-Experimente durch Herstellung geeigneter Vektoren und Etablierung einer Positivkontrolle

Ein weiteres Vorhaben bestand darin, DNA-Protein-Interaktionen im CD23a-Core-Promotorbereich mit dem DNase-I-Footprint-Verfahren zu untersuchen. Dieses Verfahren ist komplexer als das EMSA-Verfahren, bietet aber genaue sequenzspezifische Informationen über Bindungen von Proteinen an DNA. Dies ist auch zur näheren Charakterisierung der typischen in den EMSAs mit Kernextrakten von EBV-transformierten Wil-2-Zellen auftretenden Dreierbande interessant. Abbildung 4 im Methodenteil zeigt einen schematischen Überblick des Verfahrens.

Die im Footprint-Verfahren zu untersuchende DNA-Sonde hat üblicherweise eine Länge von rund 300 Bp. Da die visuelle Auflösung in den Randbereichen nach elektrophoretischer Gelauf trennung abnimmt, erschien es sinnvoll, den CD23a-Core-

Promotor, welcher knapp 300 Bp lang ist, in 3 jeweils rund 300 Bp lange konsekutive Fragmente aufzuteilen, die sich um jeweils 100-150 Bp überlappen.

Ein rund 1400 Bp umfassender Bereich des CD23a Promotors, welcher auch den Core-Promotor-Bereich enthielt, lag bereits kloniert in einem pZero-2-Plasmid vor.

Aus diesem wurden daher 3 sich überlappende Fragmente mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel isoliert.

Jedes dieser Fragmente wurde nun jeweils in einen neuen pZero-2-Vektor kloniert, der zuvor jeweils mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aufgeschnitten worden war.

Einen zusammenfassenden Überblick über die Klonierung der 3 neuen Vektoren (als pZeroCoreP1-3 bezeichnet), der auch Aufschluss über die verwendeten jeweiligen Schnittstellen gibt, liefert Abbildung 12:

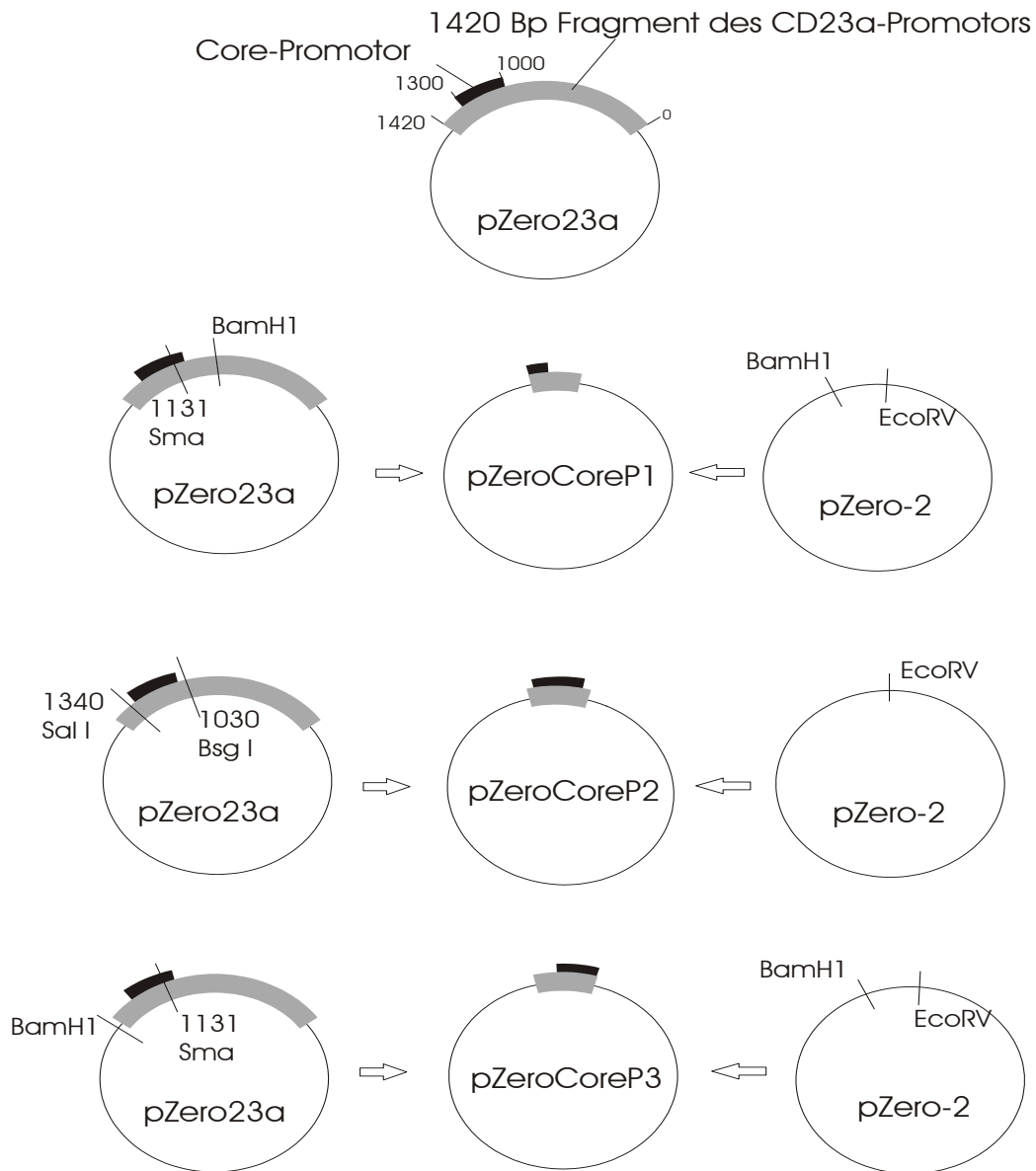


Abb.12: Klonierung von CD23a-Core-Promotor-Fragmenten aus pZero23a in pZero-2-Plasmide

Kompetente E.coli wurden mit jeweils einem dieser Vektoren transformiert. Nach anschließender Plasmidpräparation wurde jeweils ein Kontrollverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen durchgeführt und so die erfolgreiche Klonierung bestätigt.

Eine Ansequenzierung der Vektoren gab neben einer weiteren Bestätigung des Klonierungserfolges Aufschluss über die Orientierung des Inserts im jeweiligen

Plasmid, da bei der Klonierung von „blunt ends“ 2 Orientierungsmöglichkeiten bestehen.

Mit diesen 3 neu klonierten Vektoren ist die Grundlage für die Untersuchung des CD23a-Core-Promotors mit der DNase-I-Footprint-Technik geschaffen worden.

Die sich anschließenden DNase-I-Footprint Experimente lieferten keine kontinuierlich reproduzierbaren Resultate. Das Footprint-Verfahren ist im Vergleich zum EMSA komplex und weist eine Vielzahl an kritischen und zu optimierenden Parametern auf.

Das System konnte aber zumindest so weit etabliert werden, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors AP2 an seine Bindungsstelle in einem DNA-Fragment des SV40-Promotors als Positivkontrolle gelang.

Abbildung 13 zeigt den durch AP2 hervorgerufenen „Footprint“.

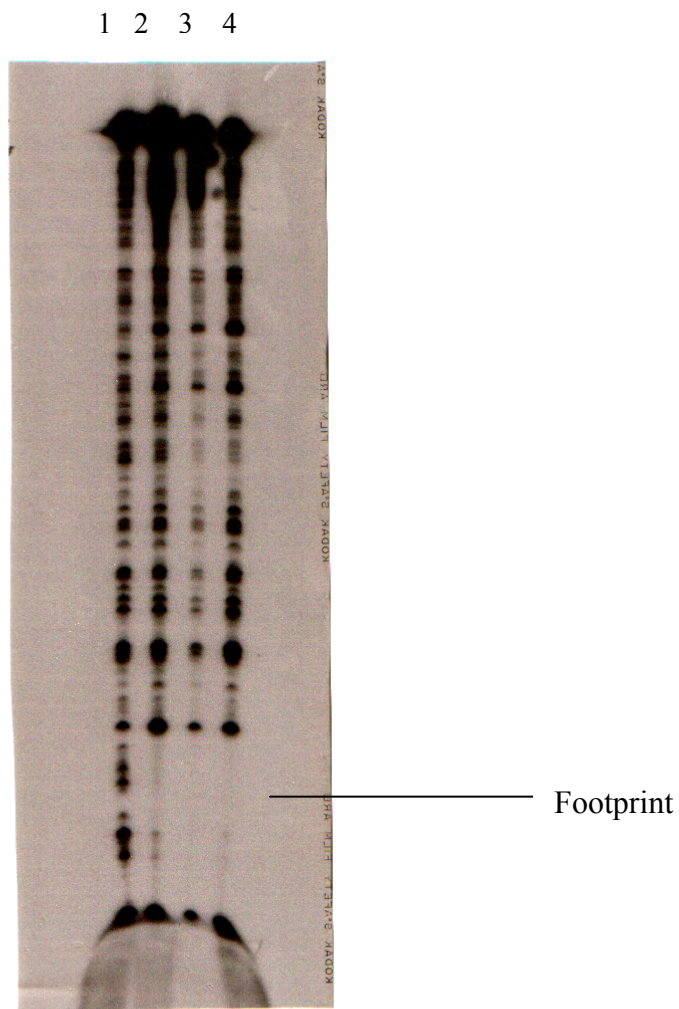


Abb.13: DNase-I-Footprint Positivkontrolle: Bahn 1 zeigt die elektrophoretische Auftrennung ohne DNA-Proteinbindung; in den Bahnen 2-4 entsteht durch den in steigenden Mengen zugegebenen Transkriptionsfaktor AP2 ein „Footprint“

5 Diskussion

Die Überexpression des niedrig-affinen Rezeptors für Immunglobulin E, CD23, zählt zu den Hauptcharakteristika der chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zelltyp. Die pathophysiologische Bedeutung dieses Oberflächenmarkers bei der B-CLL ist noch unklar, allerdings steht die Expression der Isoform b in einem Zusammenhang mit zellproliferativen Vorgängen, während CD23a mit der Apoptose in Verbindung gebracht wird [68, 69].

Da sich B-CLL-Lymphozyten und normale B-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Expression und Regulation der beiden CD23-Isoformen unterscheiden (vgl. Tab.1 und Abb.5), sollte in dieser Arbeit der Core-Promotorbereich von CD23a genauer untersucht werden; von besonderem Interesse war dabei auch das Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors STAT6, dessen Aktivierung und Bindung an die entsprechende DNA-Sequenz über den durch Interleukin-4 vermittelten JAK/STAT-Signaltransduktionsweg erfolgt (Schema Abb.1).

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren an die DNA des knapp 300 Bp langen CD23a-Core-Promotors wurde dieser für Gel-Retardierungsexperimente (EMSA) mit Kernextrakten in 9 etwa gleich lange Oligonukleotidpaare aufgeteilt.

B-Lymphozyten von B-CLL-Patienten sowie von gesunden Spendern wurden jeweils in 5 verschiedenen Ansätzen stimuliert und von jedem dieser Ansätze wurden nach 2 Stunden sowie nach 24 Stunden Kernextrakte gewonnen.

Jeder dieser Stimulationsansätze wurde nach 40 Stunden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich seiner CD23-Expression untersucht. Wie die Abbildung 5 zeigt, ergab sich das erwartete und in der Einleitung beschriebene Bild einer differentiellen Regulation der CD23-Expression von B-CLL-Lymphozyten im Vergleich mit normalen B-Lymphozyten: B-CLL-Lymphozyten zeigen bei Kostimulation mit Interleukin-4 und Interferon- γ eine vermehrte CD23-Expression, während Interferon- γ in normalen B-Zellen die IL4-induzierbare CD23-Expression reprimiert. Somit konnte von erfolgreichen Stimulationsansätzen ausgegangen werden.

Die mit den aus den verschiedenen Stimulationsansätzen gewonnenen Kernextrakten durchgeführten Gel-Retardierungsexperimente zeigten im Gegensatz zur differentiellen Oberflächenexpression von CD23 ein ausgesprochen einheitliches Bild mit stets den gleichen charakteristischen Banden. Somit ergeben sich keine Hinweise dafür, dass qualitativ unterschiedliche Transkriptionsfaktoren in den B-CLL-Lymphozyten bzw. durch unterschiedliche Stimulation im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten induziert werden, die an die untersuchten Promotoranteile binden.

Die EMSA-Experimente auf der DNA-Protein-Interaktionsebene im Core-Promotorbereich liefern somit keine Erklärung für die differentielle Expression und Regulation des CD23-Gens.

Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Erklärungsansätze:

Zu bedenken ist zunächst, dass der hier betrachtete CD23a-Core-Promotor mit seinen knapp 300 Bp nur einen relativ kleinen Teilbereich des gesamten, rund 2800 Bp langen CD23a-Promotors darstellt (vgl. Abb. 3). Somit konnten in diesem Ansatz mögliche regulative Elemente im übrigen Promotorbereich nicht mituntersucht werden. Analoges gilt auch für sogenannte Enhancer-Regionen, welche sich oft viele tausend Basenpaare stromauf- oder abwärts vom Transkriptionsstartpunkt befinden und einen verstärkenden Einfluss auf die Genexpression ausüben [90].

Auch gibt es Transkriptionsfaktoren, welche nicht erst nach über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelte Stimulation in den Nukleus translozieren und an ihre spezifische DNA-Sequenz binden, sondern die konstitutiv in an DNA-gebundener Form vorliegen und deren jeweiliger Aktivierungszustand beispielsweise von ihrem Phosphorylierungszustand abhängt [91].

Auch konnte mittlerweile für verschiedene Krankheitsbilder gezeigt werden, dass es eine Vielzahl von mutierten Transkriptionsfaktoren gibt, welche zwar ihre DNA-Bindungsfähigkeit erhalten haben, sich aber hinsichtlich ihrer Regulation der Expression des entsprechenden Gens von ihren unmutierten Gegenstücken deutlich unterscheiden [92].

Nicht auszuschließen ist auch, dass bei diesem Versuchsansatz mit der Gewinnung von Kernextrakten zu zwei fixen Zeitpunkten und mit der Verwendung eines Universalbindungspuffers, der nicht für sämtliche Transkriptionsfaktoren optimal sein

kann, andere für die Genexpression wichtige und unter Umständen nur kurzfristig an die DNA bindende Transkriptionsfaktoren nicht erfasst wurden.

Ferner handelt es sich bei den Gel-Retardierungsexperimenten um *in vitro* Experimente; *in vivo* hängt die Genexpression nicht nur von der eigentlichen DNA-Sequenz, sondern auch von vielen anderen Faktoren wie beispielsweise ihrer Konformation oder ihrem jeweiligen Methylierungszustand ab.

Weiterhin ist in Betracht zu ziehen, dass wir uns mit Blick auf das DNA-Protein-Interaktionsmuster auf der Transkriptionsebene des CD23-Gens befinden und bis zur Oberflächenexpression des CD23-Moleküls noch mehrere Schritte folgen, welche noch weiteren Regulationsmechanismen unterliegen. So konnte beispielsweise für Interferon- γ gezeigt werden, dass es eine Faktor zu induzieren vermag, welcher auf die CD23-mRNA normaler B-Lymphozyten einen destabilisierenden Einfluss ausübt [82].

Zusätzlich zu den Gel-Retardierungsexperimenten mit Kernextrakten aus B-CLL- sowie normalen B-Lymphozyten wurden auch EMSAs mit Kernextrakten aus Wil-2-Zellen, einer humanen EBV-transformierten lymphoblastoiden B-Zelllinie mit konstitutiv hoher CD23-Expression, durchgeführt.

Hierbei zeigte sich ein leicht verändertes Bandenmuster: Die Bande bei Oligonukleotid 5 fehlte, bei Oligonukleotid 6 trat eine charakteristische Dreierbande auf (Abb.7).

Dies könnte mit einer veränderten Regulation der CD23-Expression bei EBV-transformierten Zellen zusammenhängen.

EBV-immortalisierte Zellen zeigen eine konstitutiv hohe CD23-Expression, und CD23 ist möglicherweise bei der Immortalisation durch das Epstein-Barr Virus beteiligt [85]. Ein EBV-responsives Element im Intron 1 des CD23-Gens (EBVRE-2 in Abb. 3) bindet bei EBV-positiven Zellen einen Proteinkomplex, welches das sogenannte Ku-Autoantigen enthält [85]. Beim Ku-Autoantigen handelt es sich um die DNA-bindende Komponente einer DNA-abhängigen Proteinkinase, welche eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und somit ihren Aktivierungsgrad zu modulieren vermag [93].

Ein weiteres EBV-responsives Element liegt im CD23a-Promotor (EBVRE-1 in Abb.3 bzw. Oligonukleotid 2 beim EMSA). Für dieses Element ist bekannt, dass es über die

Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors CBF1 zu einer Interaktion mit dem viralen Protein EBNA-2, für welches eine Transaktivierung des CD23a-Promotors bekannt ist, kommt [86] [94].

Da das veränderte EMSA-Bandenmuster mit Kernextrakten EBV-transformierter Zellen auf eine veränderte Regulation der CD23-Expression hindeuten könnte, wäre eine genauere Untersuchung beispielsweise der Dreierbande bei Oligonukleotid 6 interessant. Um genaue sequenzspezifische Informationen über DNA-Protein-Interaktionen zu erhalten, ist das DNase-I-Footprint Verfahren hilfreich (Schema s. Abb.4). Mit der Klonierung von 3 neuen Vektoren sowie der Etablierung einer Positivkontrolle ist eine Grundlage für die weitere Untersuchung des CD23a-Core-Promotors mit der DNase-I-Footprint-Technik geschaffen worden.

Die Interleukin-4 Responsivität des CD23-Gens ist schon länger bekannt [6]. IL-4 ist der stärkste Induktor von CD23 auf normalen B-Zellen [95]. Es vermittelt seine Wirkung über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Abb. 1), und wie die fehlende IL-4-Responsivität STAT6-defizienter Mäuse belegt, kommt STAT6 eine bedeutende Rolle bei der CD23-Expression zu [96]. Zudem werden STAT6 auch anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben, da es auch auf die Transkription des anti-apoptotisch wirkenden Proto-Onkogens bcl-xL aktivierenden Einfluss hat [97]. Diese Eigenschaft erscheint im Hinblick auf die bei der B-CLL verminderte Apoptoserate interessant.

Der Promotor der Isoform CD23b ist schon eingehend hinsichtlich seiner IL-4-Responsivität untersucht worden und eine STAT6-Bindungsstelle im CD23b-Promotor ist bereits charakterisiert worden [88].

Dagegen ist der CD23a-Promotor beim Menschen nur unzureichend charakterisiert.

In dieser Arbeit wurden nun 2 putative STAT6-Bindungsgebiete im CD23a-Core-Promotor mittels EMSA untersucht. Es zeigte sich, dass nur eines der beiden putativen STAT6-Bindungsgebiete auch tatsächlich ein STAT6-Bindungsvermögen aufwies, das durch Konkurrenz mit einem anti-STAT6-Antikörper bewiesen werden konnte.

Konkurrenzexperimente mit der STAT6-Site des CD23b-Promotors, deren Nukleotidsequenz der Konsensus-STAT6-Site entspricht, ergaben, dass die STAT6-Site im CD23a-Promotor eine etwa 10fach geringere Bindungsaffinität aufwies (vgl. Abb.11).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass STAT6, welches zur Familie der „Signal Transducers and Activators of Transcription“ gehört, neben seinem positiven regulatorischen Einfluss auf die Genexpression IL-4-stimulierter B-Lymphozyten überraschenderweise auch repressorische Eigenschaften auf die Expression vieler Gene hat [74].

Es wurde gezeigt, dass STAT6 zudem sekundäre transkriptionale Regulatoren induziert, wodurch es möglich erscheint, dass sich die IL-4-induzierte Genexpression in einer durch mehrere Transkriptionsfaktoren vermittelten kaskadenartigen Art und Weise vollzieht. Bezüglich der IL-4-induzierten CD23-Expression wurde nachgewiesen, dass STAT6 den Transkriptionsfaktor Krox20 induziert, der für eine maximale IL-4-vermittelte Transkription erforderlich ist und dessen potentielle Bindungsstelle sich stromaufwärts des Core-Promotorbereichs befindet [74].

Ein verändertes Zusammenspiel von STAT6 mit weiteren Transkriptionsfaktoren könnte ursächlich für die differentielle Regulation der CD23-Expression sein; bei der B-CLL liegt beispielsweise NF κ Bp52 vermehrt nukleär transloziert vor und könnte für die vermehrte CD23-Expression mitverantwortlich sein [98]. Der CD23a-Promotor weist 2 putative NF- κ B-Bindungsstellen auf und Untersuchungen an murinen B-Lymphozyten deuten darauf hin, dass die IL-4- und CD40-Ligand-vermittelte Superinduktion von CD23 auf einer kooperativen Interaktion von STAT6 und NF- κ B beruhen könnte [87]. Ein möglicher Synergismus von Mitgliedern der STAT- sowie der NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilien ist schon bei der Expression anderer Gene beschrieben worden [99].

Desweiteren ist für den Keimbahn- ϵ -Promotor, der auch IL-4-induzierbar ist, ein funktioneller Synergismus von STAT6 und C/EBP β (CAAT-Box Enhancer Binding Protein β) bekannt [100]. Ein solcher Synergismus bezüglich der CD23-Expression konnte allerdings an murinen B-Lymphozyten nicht bestätigt werden [87].

Natürlich können nicht nur transkriptionsaktivierende Faktoren an einen Promotor binden, sondern auch solche mit repressorischer Wirkung. Eine solche Rolle wird dem Transkriptionsfaktor Egr-1 bei der CD23-Expression zugeschrieben [101].

Mittlerweile gibt es auch Hinweise dafür, dass STAT6 nicht nur durch eine Tyrosinphosphorylierung über den bekannten JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

aktiviert wird, sondern dass die IL-4-vermittelte transkriptionale Aktivierung durch STAT6 auch multiple Serin/Threonin-Kinase Signaltransduktionswege mit der Phosphorylierung von STAT6-Serinresten involviert und so die STAT6-Aktivität weiter moduliert werden kann [102]. Eine konstitutive Phosphorylierung an Serinresten ist bei B-Lymphozyten von B-CLL-Patienten für die Faktoren STAT1 und STAT3 bekannt [103].

Bezüglich der differentiellen Regulation der CD23-Expression gibt es mehrere Erklärungsansätze:

Das Proto-Onkogen *bcl-6* wird in STAT6-abhängiger Weise exprimiert und gilt als potenter transkriptionaler Repressor, welcher somit die STAT6-induzierte CD23-Expression im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmt [74, 104]. Dieser Regelkreis könnte bei der B-CLL gestört sein.

Auch Interferon- γ hat, zumindest bei normalen B-Lymphozyten, einen inhibitorischen Einfluss auf die IL-4-induzierte CD23-Expression.

Denkbar ist eine Konkurrenz des durch IFN- γ aktivierten Transkriptionsfaktor STAT1 mit STAT6 um seine Bindungsstelle im CD23b-Promotor, welche, da sie in ihrer Sequenz 3 Spacer-Nukleotide enthält, auch von anderen Faktoren der STAT-Familie gebunden werden kann [75, 105]. Eine solche Bindung von STAT1 an die STAT6-Site des CD23b-Promotors ist nachgewiesen [106]. Die STAT6-Site im CD23a-Promotor hingegen weist 4 Spacer-Nukleotide auf und kann somit nur STAT6 binden. IFN- γ führt auch zur Bildung von SOCS-1 (Silencer Of Cytokine Signalling-1), welches über eine Hemmung der Januskinase-1 (Jak1) des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges die Aktivierung von STAT6 inhibiert [79] [77]. Auch auf posttranskriptionaler Ebene konnte eine negativ-regulatorische Wirkung von IFN- γ gezeigt werden, welche über eine Destabilisierung der CD23-mRNA sowie der IL-4-Rezeptorkette α -mRNA vermittelt wird [82] [80]. Auch eine IFN- γ -induzierte Phosphatase, welche zur Dephosphorylierung und Inaktivierung von STAT6 führen könnte, wäre denkbar.

Die hier beschriebenen Mechanismen können allerdings nicht den bei B-CLL Lymphozyten auftretenden Synergismus hinsichtlich der CD23-Expression von IL-4 und IFN- γ erklären.

Interessant erscheint die Beobachtung, dass eine kombinierte IL-4 und IFN- γ -Stimulation humaner tonsillärer mononukleärer Zellen rund 2 Stunden nach Stimulationsbeginn zu einer transienten Hochregulation der CD23-mRNA führte [106]. Denkbar wäre, dass bei der B-CLL dieser Synergismus überwiegt und es somit zu einer vermehrten CD23-Expression kommt, wenn eine hinreichende IFN- γ -vermittelte Induktion einer de novo Synthese negativ-regulatorischer Faktoren wie SOCS-1 oder eines mRNA-Destabilisators ausbleibt.

Eine weitere Überlegung bezüglich der differentiellen Regulation der CD23-Expression zwischen B-CLL- und normalen B-Lymphozyten wäre, dass STAT6 überexprimiert oder konstitutiv nukleär transloziert vorliegt. Eine konstitutive Aktivierung von STAT-Faktoren ist bei akuten Leukämien bekannt, und bei der B-CLL ist eine verstärkte nukleäre Translokation der Transkriptionsfaktoren NFATp und NF- κ Bp52 beschrieben worden [98]. STAT6 liegt allerdings bei der B-CLL weder in überexprimierter Form, noch konstitutiv in den Zellkern transloziert vor [107].

Allerdings zeigten B-CLL Lymphozyten im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten keine Korrelation zwischen der Menge an nukleär transloziertem STAT6 und ihrer CD23-Oberflächenexpression, was dafür spricht, dass es wahrscheinlich noch zusätzliche Regulationsmechanismen gibt [107]. Neben einem möglichen veränderten Zusammenspiel von STAT6 mit weiteren Transkriptionsfaktoren spricht auch das vergleichsweise starke Induktion der CD23-Expression auf B-CLL Lymphozyten durch Phorbolmyristatazetat, dessen Wirkung über die Proteinkinase C vermittelt wird, dafür, dass ein veränderte Involvierung alternativer Signaltransduktionswege bei der Regulation der CD23-Expression eine wichtige Rolle spielen könnte.

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass bei der B-CLL das Proto-Onkogen Notch2 stark überexprimiert wird und dass CD23a ein Zielgen von Notch2 ist; somit kommt auch Notch2 eine Rolle bei der aberranten CD23-Expression und möglicherweise auch bei der charakteristischen verringerten Apoptoserate der B-CLL zu [69].

Somit stellt die STAT6-induzierte Expression des untersuchten Oberflächenmarkers zweifelsohne einen wichtigen, aber nicht den einzigen Regulationsmechanismus dar. Ein Zusammenspiel bei der Regulation der CD23-Expression mit weiteren

Transkriptionsfaktoren, die zum Teil wie z.B. Krox20 in STAT6-abhängiger Weise exprimiert werden, ist erst ansatzweise geklärt. Zudem weisen auch alternative Signaltransduktionswege und der Einfluss von Proto-Onkogenen wie bcl-6 und Notch2 auf weitere Regulationsmechanismen der CD23-Genexpression hin, die dann noch durch Regulationsmechanismen auf posttranskriptionaler Ebene modifiziert werden können.

6 Zusammenfassung

Die Expression und Regulation des Gens für den niedrig affinen Immunglobulin E-Rezeptor, von welchem beim Menschen zwei Isoformen existieren, unterscheidet sich deutlich zwischen B-Lymphozyten der chronisch lymphatischen Leukämie und normalen B-Zellen. Eine Untersuchung auf Promotorebene erscheint daher interessant; da der Promotor der Isoform b schon relativ gut charakterisiert ist, wurde in dieser Arbeit der CD23a-Core-Promotor näher betrachtet. Ein besonderes Augenmerk galt dabei putativen Bindungsstellen für STAT6.

Das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an Promotor-DNA wurde mit Gel-Retardierungsexperimenten (EMSA) untersucht. Hierzu wurden CD23a-Core-Promotor-Oligonukleotide zusammen mit Kernproteinextrakten aus Stimulationsansätzen von B-CLL- und normalen B-Zellen mit IL-4, IFN- γ und PMA genutzt.

Die EMSA-Experimente zeigten trotz unterschiedlicher Stimulationsansätze ein sich wiederholendes Bandenmuster, sodass die DNA-Protein-Interaktion auf Core-Promotorebene keine ausreichende Erklärung für die differentielle Regulation der Genexpression lieferte. Allerdings zeigten analoge EMSA-Versuche mit Kernextrakten einer EBV-transformierten Zelllinie ein leicht verändertes Bandenmuster, was auf ein verändertes Profil an Transkriptionsfaktoren am CD23a-Core-Promotor nach EBV-Transformation hindeuten kann. Eine weitere Analyse der Core-Promotorregion mittels der DNase-I-Footprint-Technik wurde durch die Klonierung geeigneter Vektoren und Etablierung einer Positivkontrolle vorbereitet.

Da IL-4 den Hauptregulator auch der CD23a-Expression darstellt, war ein zentraler Teil der Arbeit die Charakterisierung von STAT6-Bindungsstellen im CD23a-Core-Promotor. Durch Sequenzanalyse wurden 2 putative STAT6-Bindungsstellen identifiziert. Mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten konnte für eine der beiden Stellen (Nukleotidsequenz TAC CTGA GAA, Position 77-86 im CD23a-Core-Promotor) eine STAT6-Bindungsfähigkeit nachgewiesen werden; diese Bindungsstelle zeigte im Vergleich zu ihrem schon bekannten Gegenpart im CD23b-Promotor ein etwas schwächeres Bindungsvermögen für STAT6.

Entscheidend für die Regulation der CD23-Expression sind wahrscheinlich das Zusammenspiel von STAT6 mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Krox20 und NF- κ B sowie alternative Signaltransduktionswege; auch Proto-Onkogene wie bcl-6 und Notch2 sind bei der Expression von CD23 von Bedeutung. Deren Rolle für die Pathogenese der B-CLL muss noch untersucht werden.

7 Literatur

1. Lawrence, D.A., W.O. Weigle, and H.L. Spiegelberg, *Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes, and neutrophils*. J Clin Invest, 1975. **55**(2): S. 368-87.
2. Bonnefoy, J.Y., et al., *Production and characterization of a monoclonal antibody specific for the human lymphocyte low affinity receptor for IgE: CD 23 is a low affinity receptor for IgE*. J Immunol, 1987. **138**(9): S. 2970-8.
3. Delespesse, G., et al., *The low-affinity receptor for IgE*. Immunol Rev, 1992. **125**: S. 77-97.
4. Richards, M.L. and D.H. Katz, *The binding of IgE to murine Fc epsilon RII is calcium-dependent but not inhibited by carbohydrate*. J Immunol, 1990. **144**(7): S. 2638-46.
5. Dierks, S.E., et al., *The oligomeric nature of the murine Fc epsilon RII/CD23. Implications for function*. J Immunol, 1993. **150**(6): S. 2372-82.
6. Yokota, A., et al., *Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression*. Cell, 1988. **55**(4): S. 611-8.
7. Yokota, A., et al., *Two forms of the low-affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmic domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): S. 5030-4.
8. Kikutani, H., et al., *Fc epsilon receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching*. J Exp Med, 1986. **164**(5): S. 1455-69.
9. Abdelilah, S.G., et al., *Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/CD23 expressed by human eosinophils*. Int Immunol, 1998. **10**(4): S. 395-404.
10. Hakonarson, H., et al., *Altered expression and action of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII (CD23) in asthmatic airway smooth muscle*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(3 Pt 1): S. 575-84.
11. Yu, L.C., et al., *Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4*. Gastroenterology, 2001. **121**(2): S. 370-81.

12. Yang, P.C., et al., *Enhanced intestinal transepithelial antigen transport in allergic rats is mediated by IgE and CD23 (FepsilonRII)*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): S. 879-86.
13. Yoshikawa, T., et al., *Characterization of novel FepsilonRII/CD23 isoforms lacking the transmembrane (TM) segment in human cell lines*. Mol Immunol, 1999. **36**(18): S. 1223-33.
14. Letellier, M., M. Sarfati, and G. Delespesse, *Mechanisms of formation of IgE-binding factors (soluble CD23)--I. Fc epsilon R II bearing B cells generate IgE-binding factors of different molecular weights*. Mol Immunol, 1989. **26**(12): S. 1105-12.
15. Marolewski, A.E., et al., *CD23 (FepsilonRII) release from cell membranes is mediated by a membrane-bound metalloprotease*. Biochem J, 1998. **333**(Pt 3): S. 573-9.
16. Brignone, C., et al., *Proteases produced by activated neutrophils are able to release soluble CD23 fragments endowed with proinflammatory effects*. Faseb J, 2001. **15**(11): S. 2027-9.
17. Shakib, F., O. Schulz, and H. Sewell, *A mite subversive: cleavage of CD23 and CD25 by Der p 1 enhances allergenicity*. Immunol Today, 1998. **19**(7): S. 313-6.
18. Corry, D.B. and F. Kheradmand, *Induction and regulation of the IgE response*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): S. B18-23.
19. Capron, M., et al., *Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes*. J Immunol, 1987. **139**(6): S. 2059-65.
20. Lecoanet-Henchoz, S., et al., *CD23 regulates monocyte activation through a novel interaction with the adhesion molecules CD11b-CD18 and CD11c-CD18*. Immunity, 1995. **3**(1): S. 119-25.
21. Rezzonico, R., et al., *Ligation of CD11b and CD11c beta(2) integrins by antibodies or soluble CD23 induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta production in primary human monocytes through a pathway dependent on nuclear factor-kappaB*. Blood, 2001. **97**(10): S. 2932-40.

22. Pirron, U., et al., *IgE-dependent antigen focusing by human B lymphocytes is mediated by the low-affinity receptor for IgE*. Eur J Immunol, 1990. **20**(7): S. 1547-51.
23. Kehry, M.R. and L.C. Yamashita, *Low-affinity IgE receptor (CD23) function on mouse B cells: role in IgE-dependent antigen focusing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): S. 7556-60.
24. Mudde, G.C., et al., *IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture?* Immunol Today, 1990. **11**(12): S. 440-3.
25. Gustavsson, S., S. Wernersson, and B. Heyman, *Restoration of the antibody response to IgE/antigen complexes in CD23-deficient mice by CD23+ spleen or bone marrow cells*. J Immunol, 2000. **164**(8): S. 3990-5.
26. Swendeman, S. and D.A. Thorley-Lawson, *The activation antigen BLAST-2, when shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells*. Embo J, 1987. **6**(6): S. 1637-42.
27. Mossalayi, M.D., et al., *Soluble CD23 (Fc epsilon RII) and interleukin 1 synergistically induce early human thymocyte maturation*. J Exp Med, 1990. **171**(3): S. 959-64.
28. Liu, Y.J., et al., *Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis*. Eur J Immunol, 1991. **21**(8): S. 1905-10.
29. Liu, Y.J., et al., *Recombinant 25-kDa CD23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center B cells: evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis*. Eur J Immunol, 1991. **21**(5): S. 1107-14.
30. Flores-Romo, L., et al., *Soluble fragments of the low-affinity IgE receptor (CD23) inhibit the spontaneous migration of U937 monocytic cells: neutralization of MIF-activity by a CD23 antibody*. Immunology, 1989. **67**(4): S. 547-9.
31. Sutton, B.J. and H.J. Gould, *The human IgE network*. Nature, 1993. **366**(6454): S. 421-8.
32. Fujiwara, H., et al., *The absence of IgE antibody-mediated augmentation of immune responses in CD23-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): S. 6835-9.

33. Flores-Romo, L., et al., *Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23*. Science, 1993. **261**(5124): S. 1038-41.
34. Aubry, J.P., et al., *CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production*. Nature, 1992. **358**(6386): S. 505-7.
35. Mayer, R.J., et al., *Inhibition of CD23 processing correlates with inhibition of IL-4-stimulated IgE production in human PBL and hu-PBL-reconstituted SCID mice*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(5): S. 719-27.
36. Yu, P., et al., *Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23*. Nature, 1994. **369**(6483): S. 753-6.
37. Stief, A., et al., *Mice deficient in CD23 reveal its modulatory role in IgE production but no role in T and B cell development*. J Immunol, 1994. **152**(7): S. 3378-90.
38. Cernadas, M., et al., *CD23 and allergic pulmonary inflammation: potential role as an inhibitor*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(1): S. 1-8.
39. Texido, G., et al., *Transgene CD23 expression on lymphoid cells modulates IgE and IgG1 responses*. J Immunol, 1994. **153**(7): S. 3028-42.
40. Payet, M.E., E.C. Woodward, and D.H. Conrad, *Humoral response suppression observed with CD23 transgenics*. J Immunol, 1999. **163**(1): S. 217-23.
41. Maeda, K., et al., *Murine follicular dendritic cells and low affinity Fc receptors for IgE (Fc epsilon RII)*. J Immunol, 1992. **148**(8): S. 2340-7.
42. Huissoon, A.P., et al., *Increased expression of CD23 in rheumatoid synovitis*. Scand J Rheumatol, 2000. **29**(3): S. 154-9.
43. Ribbens, C., et al., *Increased synovial fluid levels of soluble CD23 are associated with an erosive status in rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol, 2000. **120**(1): S. 194-9.
44. Kleinau, S., et al., *Importance of CD23 for collagen-induced arthritis: delayed onset and reduced severity in CD23-deficient mice*. J Immunol, 1999. **162**(7): S. 4266-70.
45. Plater-Zyberk, C. and J.Y. Bonnefoy, *Marked amelioration of established collagen-induced arthritis by treatment with antibodies to CD23 in vivo*. Nat Med, 1995. **1**(8): S. 781-5.

46. Caligaris-Cappio, F., *Biology of chronic lymphocytic leukemia*. Rev Clin Exp Hematol, 2000. **4**(1): S. 5-21.
47. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. Blood, 1994. **84**(5): S. 1361-92.
48. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): S. 219-34.
49. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. **48**(1): S. 198-206.
50. Matutes, E., et al., *The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL*. Leukemia, 1994. **8**(10): S. 1640-5.
51. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): S. 1840-7.
52. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): S. 1848-54.
53. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): S. 1910-6.
54. Wendtner, C.M., et al., *New aspects on the pathogenesis, diagnostic procedures, and therapeutic management of chronic lymphocytic leukemia*. Int J Hematol, 2001. **73**(1): S. 32-8.
55. Ghia, P. and F. Caligaris-Cappio, *The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms*. Adv Cancer Res, 2000. **79**: S. 157-73.
56. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. J Clin Oncol, 1999. **17**(1): S. 399-408.
57. Lagneaux, L., et al., *Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells*. Blood, 1998. **91**(7): S. 2387-96.

58. Dadmarz, R. and J.C. Cawley, *Heterogeneity of CLL: high CD23 antigen and alpha IFN receptor expression are features of favourable disease and of cell activation*. Br J Haematol, 1988. **68**(3): S. 279-82.
59. Geisler, C.H., et al., *Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1991. **78**(7): S. 1795-802.
60. Gibson, J., et al., *CD23 antigen expression in CLL*. Br J Haematol, 1989. **72**(4): S. 598.
61. Newman, R.A., et al., *Phenotypic markers and BCL-1 gene rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. Blood, 1993. **82**(4): S. 1239-46.
62. Lavabre-Bertrand, T., et al., *CD23 antigen density is related to serum gamma globulin level, bone marrow reticulin pattern, and treatment in B chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1994. **13**(1-2): S. 89-94.
63. DiRaimondo, F., et al., *The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease*. Cancer, 2002. **94**(6): S. 1721-30.
64. Sarfati, M., et al., *Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1996. **88**(11): S. 4259-64.
65. Schwarzmeier, J.D., et al., *The role of soluble CD23 in distinguishing stable and progressive forms of B-chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(3): S. 549-54.
66. Sarfati, M., *CD23 and chronic lymphocytic leukemia*. Blood Cells, 1993. **19**(3): S. 591-6; discussion 597-9.
67. Fournier, S., et al., *Role for low-affinity receptor for IgE (CD23) in normal and leukemic B-cell proliferation*. Blood, 1994. **84**(6): S. 1881-6.
68. Fournier, S., et al., *The two CD23 isoforms display differential regulation in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 1995. **89**(2): S. 373-9.
69. Hubmann, R., et al., *Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. **99**(10): S. 3742-7.
70. Goller, M.E., et al., *Regulation of CD23 isoforms on B-chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Res, 2002. **26**(9): S. 795-802.

71. Wurster, A.L., T. Tanaka, and M.J. Grusby, *The biology of Stat4 and Stat6*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): S. 2577-84.
72. Reichel, M., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain cytoplasmic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction of IL-4-specific gene expression*. *J Immunol*, 1997. **158**(12): S. 5860-7.
73. Imada, K. and W.J. Leonard, *The Jak-STAT pathway*. *Mol Immunol*, 2000. **37**(1-2): S. 1-11.
74. Schroder, A.J., et al., *Cutting edge: STAT6 serves as a positive and negative regulator of gene expression in IL-4-stimulated B lymphocytes*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): S. 996-1000.
75. Ehret, G.B., et al., *DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): S. 6675-88.
76. Horvath, C.M., *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(10): S. 496-502.
77. Losman, J.A., et al., *Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): S. 3770-4.
78. Wurster, A.L., et al., *Stat6 and IRS-2 cooperate in interleukin 4 (IL-4)-induced proliferation and differentiation but are dispensable for IL-4-dependent rescue from apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(1): S. 117-26.
79. Venkataraman, C., et al., *Repression of IL-4-induced gene expression by IFN-gamma requires Stat1 activation*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): S. 4053-61.
80. So, E.Y., H.H. Park, and C.E. Lee, *IFN-gamma and IFN-alpha posttranscriptionally down-regulate the IL-4-induced IL-4 receptor gene expression*. *J Immunol*, 2000. **165**(10): S. 5472-9.
81. Delespesse, G., M. Sarfati, and R. Peleman, *Influence of recombinant IL-4, IFN-alpha, and IFN-gamma on the production of human IgE-binding factor (soluble CD23)*. *J Immunol*, 1989. **142**(1): S. 134-8.
82. Lee, C.E., S.R. Yoon, and K.H. Pyun, *Mechanism of interferon-gamma down-regulation of the interleukin 4-induced CD23/Fc epsilon RII expression in human B cells: post-transcriptional modulation by interferon-gamma*. *Mol Immunol*, 1993. **30**(3): S. 301-7.

83. Suter, U., R. Bastos, and H. Hofstetter, *Molecular structure of the gene and the 5'-flanking region of the human lymphocyte immunoglobulin E receptor*. *Nucleic Acids Res*, 1987. **15**(18): S. 7295-308.
84. Suter, U., G. Texido, and H. Hofstetter, *Expression of human lymphocyte IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23). Identification of the Fc epsilon RIIa promoter and its functional analysis in B lymphocytes*. *J Immunol*, 1989. **143**(9): S. 3087-92.
85. Shieh, B., et al., *Regulation of the human IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23) by Epstein-Barr virus (EBV): Ku autoantigen binds specifically to an EBV-responsive enhancer of CD23*. *Int Immunol*, 1997. **9**(12): S. 1885-95.
86. Ling, P.D., et al., *EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1*. *J Virol*, 1994. **68**(9): S. 5375-83.
87. Tinnell, S.B., et al., *STAT6, NF-kappaB and C/EBP in CD23 expression and IgE production*. *Int Immunol*, 1998. **10**(10): S. 1529-38.
88. Kohler, I. and E.P. Rieber, *Allergy-associated I epsilon and Ec epsilon receptor II (CD23b) genes activated via binding of an interleukin-4-induced transcription factor to a novel responsive element*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(12): S. 3066-71.
89. Kneitz, C., et al., *The CD23b promoter is a target for NF-AT transcription factors in B-CLL cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1588**(1): S. 41-7.
90. Rosenthal, N., *Regulation of gene expression*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(14): S. 931-3.
91. Brivanlou, A.H. and J.E. Darnell, Jr., *Signal transduction and the control of gene expression*. *Science*, 2002. **295**(5556): S. 813-8.
92. Latchman, Y., et al., *Association of immunological changes with clinical efficacy in atopic eczema patients treated with traditional Chinese herbal therapy (Zemaphyte)*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996. **109**(3): S. 243-9.
93. Giffin, W., et al., *Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription*. *Nature*, 1996. **380**(6571): S. 265-8.
94. Wang, F., et al., *Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element*. *J Virol*, 1991. **65**(8): S. 4101-6.

95. DeFrance, T., et al., *Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes*. J Exp Med, 1987. **165**(6): S. 1459-67.
96. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(6575): S. 627-30.
97. Wurster, A.L., et al., *IL-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent upregulation of Bcl-xL*. J Biol Chem, 2002. **22**: S. 22.
98. Schuh, K., et al., *Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients*. Leuk Lymphoma, 1996. **23**(5-6): S. 583-92.
99. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1995. **154**(10): S. 5235-44.
100. Mikita, T., M. Kurama, and U. Schindler, *Synergistic activation of the germline epsilon promoter mediated by Stat6 and C/EBP beta*. J Immunol, 1998. **161**(4): S. 1822-8.
101. Dinkel, A., et al., *Transcription factor Egr-1 activity down-regulates Fas and CD23 expression in B cells*. J Immunol, 1997. **159**(6): S. 2678-84.
102. Pesu, M., et al., *Interleukin-4-induced transcriptional activation by stat6 involves multiple serine/threonine kinase pathways and serine phosphorylation of stat6*. Blood, 2000. **95**(2): S. 494-502.
103. Frank, D.A., S. Mahajan, and J. Ritz, *B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): S. 3140-8.
104. Dent, A.L., et al., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. Science, 1997. **276**(5312): S. 589-92.
105. Seidel, H.M., et al., *Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): S. 3041-5.
106. Park, H.J., E.Y. So, and C.E. Lee, *Interferon-gamma-induced factor binding to the interleukin-4-responsive element of CD23b promoter in human tonsillar*

mononuclear cells: role in transient up-regulation of the interleukin-4-induced CD23b mRNA. Mol Immunol, 1998. **35**(4): S. 239-47.

107. Kneitz, C., et al., *STAT6 and the regulation of CD23 expression in B-chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Res, 2000. **24**(4): S. 331-7.

8 Abkürzungsverzeichnis

CD	Cluster of Differentiation
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein Barr Virus
EBNA2	EBV Nuclear Antigen 2
EBVRE	EBV-responsives Element
E.coli	Escherichia coli
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	Flourescence Activated Cell Sorter
FITC	Flourescence-Isothiocyanat
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
MFI	Mittlere Floureszenz Intensität
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-Cells
NF κ B	Nuclear Factor κ B
OD	Optical Density
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolmyristatazetat
RNA	Ribonukleinsäure
SH2	Src Homology 2
SOCS	Silencer Of Cytokine Signalling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription

(verwendete Reagentien: siehe bitte auch Abschnitt 3.1)

Danksagung

Herrn Prof.Dr.med.H.P.Tony danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine betreuende Unterstützung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr.rer.nat.M.Goller sowie bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Immunologischen Labors der Medizinischen Poliklinik in Würzburg für ihre vielfältigen Hilfestellungen und die freundliche Einweisung in die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit verwandten Methodiken.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Tim Philipp Gross
Geburtsdatum/-ort: 20.03.1973 in Gießen
Eltern: Prof.Dr.med.Wolfgang L. Gross und Gudrun G. Gross

Schulische Laufbahn:

1979 – 83 Grundschule in Kiel-Heikendorf
1983 – 90 Heinrich-Heine-Gymnasium in Kiel-Heikendorf
(1990 Umzug nach Bad Bramstedt/Holstein)
1990 – 92 Jürgen-Fuhlendorf-Gymnasium Bad Bramstedt, Abitur

Wehrdienst:

07/92 – 06/93 Grundwehrdienst in der Stabs- und Versorgungskompanie des Panzerbataillons 183 in Neumünster

Hochschulausbildung:

07/93 – 09/93 Krankenpflegepraktikum am Hôpital Necker in Paris
10/93 – 09/96 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
10/96 – 11/00 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

Praktisches Jahr:

Chirurgie:

10/99 - 01/00 Allgemein- und Unfallchirurgie, Université Lausanne, Schweiz

Innere Medizin:

02/00 – 03/00 University Hospital, University of Alabama in Birmingham, USA
1 Monat Rheumatologie (Director: Prof. R.P.Kimberly, M.D.)
1 Monat Gastroenterologie/Hepatologie (Director: Prof. C.D.Elson, M.D.)

04/00 – 05/00 Hammersmith Hospital, Imperial College School of Medicine, London, UK
Nephrologie in der Renal Section (Head: Prof. C.D.Pusey, FRCP FRCPATH)

Ophthalmologie:

06/00 – 09/00 Universitätsaugenklinik Würzburg (Direktor: Prof.Dr.med. F.Grehn)

Arzt im Praktikum

Seit 15.07.2002 in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie u. Endokrinologie
(Direktor: Prof.Dr.med.M.P.Manns), Med. Hochschule Hannover

Hannover, d. 17.04.2003

