

**Aus dem Pathologischen Institut**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

**Die transkriptionelle Regulation  
der Proteintyrosinkinase p 56 lck  
als Schlüsselenzym der Thymozytenreifung**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Corinne König**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Februar 2004**

**Referent: Prof. Dr. Dr. E. Serfling**

**Koreferentin: Prof. Dr. A. Schimpl**

**Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 18. Mai 2004**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Entwicklung der T-Zellen.....	2
1.2	Der T-Zell-Rezeptor .....	4
1.3	Die lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase <i>lck</i> .....	5
1.3.1	p56 <sup>lck</sup> ist ein Schlüsselenzym der Thymozytenreifung.....	7
1.3.2	p56 <sup>lck</sup> in der Signaltransduktion .....	9
1.4	Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression.....	10
1.4.1	Der Transkriptionsfaktor NF-AT .....	11
1.4.1.1	Mitglieder der NF-AT-Familie.....	11
1.4.1.2	Die Aktivierung von NF-AT .....	12
1.4.1.3	Die Bedeutung und Aufgaben der NF-ATs.....	14
1.5	Problemstellung.....	17
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>19</b>
2.1	NF-AT bindet den proximalen <i>lck</i> Promotor <i>in vitro</i> .....	19
2.1.1	Nachweis der Bindung mittels "Footprinting" .....	19
2.1.2	Nachweis der Bindung mittels "Bandshift" .....	20
2.2	NF-AT aktiviert den proximalen <i>lck</i> -Promotor .....	22
2.2.1	Nachweis durch Multimere der NF-AT <sub><i>lck</i></sub> -Bindestellen.....	22
2.2.2	Synergismus zwischen NF-AT-Faktoren und Ets-1 bzw. c-Myb .....	24
2.3	Nachbarschaftliche Bindung von NF-AT und c-Myb .....	26
2.4	Analyse des proximalen <i>lck</i> -Promotors durch Deletionsmutanten.....	28
2.5	NF-AT1 / c-Myb binden an den proximalen <i>lck</i> -Promotor <i>in vivo</i> .....	30
2.5.1	Nachweis der Bindung durch Chromatin-Immunpräzipitation .....	30
2.5.2	Einfluss von NF-AT auf den proximalen <i>lck</i> -Promotor <i>in vivo</i> .....	31
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>34</b>
3.1	Die transkriptionelle Regulation des proximalen <i>lck</i> -Promotors .....	34
3.2	Die Aktivierung von <i>lck</i> und NF-AT: ein "Autokriner Loop" .....	38
3.3	Die NF-AT-I <sub><i>lck</i></sub> -Bindestelle ist "composite element" für NF-AT und c-Myb .....	39
3.4	Bedeutung der NF-AT-Bindung an den proximalen <i>lck</i> -Promotor .....	41

<b>4 Zusammenfassung .....</b>	<b>44</b>
<b>5 Anhang.....</b>	<b>45</b>
5.1 Material.....	45
5.1.1 Antibiotika .....	45
5.1.2 Geräte und Gebrauchsmaterial .....	45
5.1.3 Chemikalien und Lösungen .....	47
5.1.4 Lösungen und Puffer .....	50
5.1.5 Nährmedien .....	53
5.1.6 Reaktionssysteme (Kits).....	53
5.1.7 Enzyme .....	54
5.1.8 Bakterienstämme .....	54
5.1.9 Gewebekulturzellen.....	54
5.1.10 Primer .....	55
5.1.11 Oligonukleotide .....	55
5.1.12 Biotin-Oligonukleotide für "Pull-down"-Experimente .....	56
5.1.13 Verwendete Plasmide .....	57
5.1.13.1 Luciferase-Plasmide .....	57
5.1.13.2 Eukaryontische Expressionsvektoren.....	58
5.1.13.3 GST-Expressionsvektor.....	58
5.1.13.4 T7-Polymerase-Vektor .....	59
5.1.14 Antikörper und Proteine .....	59
5.1.14.1 Primäre Antikörper.....	59
5.1.14.2 Sekundäre Antikörper.....	60
5.1.15 Größenmarker .....	60
5.2 Methoden.....	60
5.2.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA.....	60
5.2.1.1 Ethanolpräzipitation .....	60
5.2.1.2 Phenol/Chloroform-Extraktion.....	60
5.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	61
5.2.2.1 Am Spektralphotometer.....	61
5.2.2.2 Am Agarose-Minigel.....	61
5.2.3 DNA-Gelelektrophorese.....	61

5.2.3.1	Agarosegele .....	61
5.2.3.2	Polyacrylamidgele .....	62
5.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten .....	62
5.2.4.1	Isolierung aus Agarosegelen.....	62
5.2.4.2	Isolierung aus Polyacrylamidgelen.....	63
5.2.5	Klonierungstechniken .....	63
5.2.5.1	Restriktionsspaltung .....	63
5.2.5.2	Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow Polymerase .....	64
5.2.5.3	Dephosphorylierung .....	64
5.2.5.4	Ligation.....	64
5.2.6	Sequenzierung von DNA.....	65
5.2.6.1	Die Sequenzierungsreaktion .....	65
5.2.6.2	Die Probenaufbereitung .....	65
5.2.6.3	Die Probenanalyse .....	66
5.2.6.4	Sequenzierung durch chemische Modifikation .....	66
5.2.7	Bakterienkulturen .....	67
5.2.7.1	Übernachtskulturen .....	67
5.2.7.2	Erhaltungskulturen.....	68
5.2.7.3	Herstellung kompetenter Bakterien.....	68
5.2.7.4	Transformation .....	68
5.2.7.5	Präparation von Plasmid-DNA.....	69
5.2.7.5.1	Miniprep .....	69
5.2.7.5.2	Maxiprep.....	69
5.2.8	Zellkultur .....	69
5.2.8.1	Bestimmung der Zellzahl .....	70
5.2.8.2	Umsetzung von Zellkulturen .....	70
5.2.8.3	Transfektion von DNA in Zellen.....	70
5.2.8.4	Induktion der Zellen .....	71
5.2.8.5	Der "Luciferase-Assay" .....	71
5.2.9	Herstellung von Proteinextrakten .....	72
5.2.9.1	Gesamtzellextrakte für "Western Blot"-Experimente .....	72
5.2.9.2	Kernproteine zum Einsatz für "Bandshift"-Experimente .....	73

5.2.9.3	Präparation rekombinanter GST-Proteine aus E. coli .....	73
5.2.10	Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten .....	74
5.2.11	Untersuchung von DNA/Protein-Interaktionen.....	75
5.2.11.1	Der "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA).....	75
5.2.11.1.1	"Annealing" von Oligonukleotiden .....	75
5.2.11.1.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden .....	75
5.2.11.1.3	Der "Bandshift-Assay" .....	76
5.2.11.2	"Footprinting" .....	77
5.2.11.3	"Chromatin-Immunopräzipitation" (ChIP).....	77
5.2.11.4	Der Bio-"Pull down"-Assay .....	79
5.2.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und "Western Blot" .....	79
5.2.13	RNA-Präparation und "RNA-Protection-Assay" .....	82
5.2.13.1	Gewinnung von RNA .....	82
5.2.13.2	Der "RNase-Protection-Assay" .....	82
5.3	Abkürzungen .....	82
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

Von Perlen baut sich eine Brücke,  
hoch über einen grauen See,  
sie baut sich auf im Augenblicke,  
und schwindelnd steigt sie in die Höh;

Der höchsten Schiffe höchste Masten  
ziehn unter ihren Bogen hin,  
sie selber trug noch keine Lasten  
und scheint, wie du ihr nahst, zu fliehn.

Sie wird erst mit dem Strom und schwindet,  
sowie des Wassers Flut versiegt.  
So sprich, wo sich die Brücke findet,  
und wer sie künstlich hat gefügt?

FRIEDRICH SCHILLER [110]

In diesem Rätsel beschreibt der Dichter den Regenbogen als Brücke aus Wassertropfen, die plötzlich entsteht, sich aber der näheren Betrachtung entzieht. Vergleichbares passiert in einer Zelle, wenn sie aktiviert wird. Innerhalb von kürzester Zeit kann sich ein Signalbogen ausbilden, der den Weg zwischen der Zellmembran und dem Kern überbrückt. Einzelne "Perlen" dieser Signalübertragung sind bekannt und gut untersucht, andere dagegen scheinen noch vor ihrer Erforschung zu "fliehen". Denn mit jeder neuen Entdeckung tun sich weitere Rätsel auf, die neue Experimente nach sich ziehen.

1838/1839 wurde von M.J. Schleiden und Th. Schwann beschrieben, dass alle Lebewesen, Pflanzen und Tiere aus Zellen (cellula, lat. Kämmerchen) bestehen. Diese Zellen seien die kleinsten in Kultur selbstständig lebensfähigen Bauelemente des Organismus [14]. Mit diesem damals revolutionären Wissen wurde die Basis für eine neue Wissen-

schaft geschaffen, die Zytologie. Durch die Beschäftigung mit den Zellen gewann man einen Einblick in ihre Vermehrung (Rudolf Virchow "omnis cellula e cellula" – jede Zelle entsteht aus einer Zelle), ihre Reaktion auf das Umgebungsmilieu und den Zellstoffwechsel [14]. Außerdem stellte sich heraus, dass es Zellen unterschiedlicher Differenzierung gibt, die für verschiedene Aufgabenbereiche zuständig sind.

Besonders differenzierte Zellen bilden einen wesentlichen Bestandteil des Immunsystems. Dieses komplizierte Netzwerk aus zellulären und azellulären (humoralen) Bestandteilen schützt den Organismus vor Verletzungen seiner Integrität. Ausgangspunkt für die Entwicklung aller Immunzellen ist eine pluripotente hämatopoetische Stammzelle, die bis zu der Entstehung von funktionellen Abwehrzellen verschiedene Reifungsprozesse durchlaufen muss.

Eine wesentliche Prägung erfahren die Zellen durch den Ort ihrer Ausdifferenzierung: Die im Thymus gereiften T-Lymphozyten werden zu Trägern der zellulären Immunantwort. Die B-Lymphozyten, die im Knochenmark differenzieren, sind Vorläuferzellen der antikörperproduzierenden Plasmazellen und Vermittler der humoralen Abwehr [52]. Ein gesunder Erwachsener besitzt etwa  $10^{12}$  Lymphozyten, von denen täglich  $10^9$  absterben. Es ist somit eine kontinuierliche Regeneration des Lymphozyten-Pools notwendig, sonst wären alle Abwehrzellen nach ca. 3 Jahren aufgebraucht [27].

## 1.1 Die Entwicklung der T-Zellen

T-Zell-Vorläufer entstehen aus Stammzellen in Knochenmark, Leber und Milz und durchlaufen die Entwicklungsstufen bis zum reifen Lymphozyten im Thymus (Thymopoese). Erst dann wandern sie in periphere lymphatische Organe aus, oder rezirkulieren im Blutkreislauf. Es existieren im wesentlichen zwei Hauptgruppen von T-Zellen, die anhand ihrer Oberflächenmoleküle unterschieden werden können. Diese Rezeptorstrukturen werden mit "CD" und einer Zahl bezeichnet. CD steht hierbei für "cluster of differentiation" oder "cluster determinant" und bedeutet, dass es sich um Differenzierungsantigene handelt, die durch bestimmte Gruppen ("cluster") von monoklonalen Antikörpern definiert worden sind [55].



Die erste Hauptgruppe exprimiert den Corezeptor CD4 und ist vor allem für die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung verantwortlich. Wegen der Vermittlerfunktion zwischen B- und T-Zellen werden sie auch als T-Helferzellen bezeichnet. CD4<sup>+</sup>-Zellen produzieren bestimmte Botenstoffe, die das richtige Milieu für die Zellaktivierung schaffen. Antigen wird von den T-Helferzellen im Kontext mit dem so genannten "major histocompatibility complex" (MHC) der Klasse II erkannt. Diese aus zwei Transmembranketten bestehende Antigenpräsentiergruppe kann den CD4<sup>+</sup>-Zellen das Fremdpeptid optimal anbieten und eine Immunreaktion in Gang setzen.

Die T-Helferzellen können unter Berücksichtigung der von ihnen sezernierten Zytokine in Th1- (Produktion von Interferon- $\gamma$  und Interleukin-2) und Th2-Zellen (Produktion der Interleukine 4, 10, 13 und 5) unterteilt werden.

Die zweite Hauptgruppe der T-Zellen bilden die CD8-positiven, sog. cytotoxischen T-Lymphozyten. Bei diesen Zellen erfolgt die Antigenerkennung im Zusammenhang mit Molekülen der MHC-Klasse-I, die beim Menschen auf allen kernhaltigen Zellen in unterschiedlicher Dichte vorhanden sind. Der Kontakt führt zur Zerstörung von Zielzellen, die Fremdanigen auf ihrer Oberfläche tragen [60].

Zu Beginn der Thymozytenreifung exprimieren die naiven T-Zellen weder das CD4- noch das CD8-Oberflächenmolekül. Diese unreifen Thymozyten liegen im Bereich des Thymuskortex und werden "doppelt negative" Zellen (DN-Zellen) genannt. Im Laufe des Reifungsprozesses kommt es dann zur Expression der (pre-) T-Zell-Rezeptorketten, des CD3-Komplexes und zunächst beider Oberflächenmarker CD4 und CD8. Aus diesem Grund werden die Zellen in diesem Reifungsstadium auch als "doppelt positiv" (DP-Zellen) bezeichnet [19].

Mit dem Erscheinen des T-Zell-Rezeptors auf der Zelloberfläche sind die Thymozyten in der Lage, Antigene zu erkennen, die in der Folge ihre weitere Entwicklung beeinflussen. So können gegen den eigenen Organismus gerichtete, autoreaktive T-Zellen erkannt und deletiert werden (negative Selektion). Im Rahmen der positiven Selektion werden T-Zellen ausgewählt, die den körpereigenen MHC-Komplex besonders gut erkennen. 99% der in den Thymus eingewanderten T-Zellen fallen dieser Selektion zum Opfer [27]. Die überlebenden Lymphozyten differenzieren sich schließlich weiter in CD4- oder CD8- positive Zellen. Welche Rolle bei diesem Differenzierungsschritt der

MHC-Komplex und die exprimierten Oberflächenmoleküle selbst spielen, ist noch unklar.

Zwei verschiedene Möglichkeiten, das sog. stochastische und das instruktionelle Modell, werden diskutiert [102]. Das *stochastische* Modell geht davon aus, dass einer der beiden Corezeptoren zufällig herunterreguliert wird. Nachdem eine T-Zelle den MHC-Komplex nur dann erkennt, wenn gleichzeitig der richtige Corezeptor bindet, werden dann nur die Zellen ausreifen, bei denen ein passender Rezeptor-Corezeptor-Komplex vorliegt. Der *instruktionelle* Ansatz dagegen nimmt an, dass durch den Erstkontakt zwischen dem Klasse-I-MHC und CD8 das Verschwinden des CD4-Markers initiiert wird. Ebenso sei im Umkehrschluss der Kontakt des Klasse-II-MHC mit CD4 verantwortlich für den Verlust von CD8 [44, 102].

## 1.2 Der T-Zell-Rezeptor

Die Beteiligung an der Ausreifung der T-Lymphozyten ist eine der frühesten Aufgaben des T-Zell-Rezeptor-Komplexes. Bis es jedoch zu der Expression der Glykoproteinketten auf der Oberfläche der unreifen T-Zellen kommt, müssen sie selbst in einem komplizierten Prozess gebildet werden. Um zu gewährleisten, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Fremdpeptide erkannt werden kann, wurde im Laufe der Evolution ein System entwickelt, das eine sehr große Variabilität für die Rezeptorketten ermöglicht.

Eine Proteinkette des T-Zell-Rezeptors besteht aus einer konstanten (C-) Region für die Verankerung in der Zellmembran und einem variablen Abschnitt (V-Region), der für die Antigenerkennung verantwortlich ist [121]. Die für den variablen Anteil kodierenden DNA-Abschnitte sind über eine weite Strecke des entsprechenden Chromosoms verteilt und untereinander frei kombinierbar. Sie werden V-, D-, J- und C-Segmente genannt [52]. Zusätzlich zu dem zufälligen "*Rearrangement*" dieser Gensegmente kommt es zu einer Modifikation der Rezeptorgene durch Addition und Punktmutation von Nukleotiden. Die sog. *kombinatorische Diversität* wird zusätzlich dadurch erhöht, dass der von den Effektorzellen exprimierte Rezeptor durch die Assoziation von *zwei* dieser variablen Glykoproteinketten gebildet wird [125]. In der Mehrzahl der Fälle (85 – 95 %) handelt es sich hierbei um eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette, seltener um die Kombination einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette [52].

Neben den Proteinketten des T-Zell-Rezeptors bilden der mehrkettige CD3-Komplex und, je nach Differenzierungsstufe, die Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 weitere Bestandteile des Rezeptorkomplexes [107]. Um eine T-Zelle über den Rezeptor zu aktivieren, reicht es nicht aus, sie mit löslichem Antigen zu stimulieren. Erst die *richtige* Präsentation, eingebettet in den MHC-Komplex, löst eine Signalkaskade in das Zellinnere aus (MHC-Restriktion) [55].

Da keine der Komponenten des T-Zell-Rezeptorkomplexes eine eigene Enzymaktivität besitzt, mit der das Aktivierungssignals ins Zellinnere übertragen werden kann, werden an den Rezeptor *Proteintyrosinkinasen* rekrutiert. Durch die Aktivierung der Kinasen p56<sup>lck</sup>, p59<sup>fyn</sup> und ZAP-70 kommt es zu einer Phosphorylierung von verschiedenen Zellstrukturen, wie z. B. der  $\zeta$ -Kette des CD3-Komplexes [10, 108], und damit zur Aktivierung Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Signalwege (siehe 1.4.1.2.).

### 1.3 Die lymphozytenspezifische Proteintyrosinkinase *lck*

Proteintyrosinkinasen übernehmen als wichtige Elemente der Signaltransduktion die Übertragung der Information des aktivierten Rezeptors in das Zellinnere. Auf diese Weise sind sie an der Regulation von Zellantwort, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt [12]. Zur näheren Charakterisierung können die Proteintyrosinkinasen (PTKs) in zwei Hauptgruppen unterteilt werden.

In der ersten Gruppe werden Kinasen mit eigener Rezeptorstruktur zusammengefasst. Sie besitzen einen durch die Zellmembran reichenden, transmembranen Anteil, an den ein Ligand direkt binden kann. Hierzu gehören beispielsweise die Rezeptoren des "platelet derived growth factor" (PDGF) und des "epidermal growth factor" (EGF) [72]. Die zweite Gruppe umfasst Proteintyrosinkinasen, die sich an die Membran anlagern, jedoch nicht transmembranös verankert sind. Zu diesen PTKs gehört die Familie der *src*-Kinasen, die neun gut charakterisierte Mitglieder umfasst: p60<sup>src</sup>, p56<sup>lyn</sup>, p59<sup>fyn</sup>, p59<sup>yes</sup>, p62<sup>yrk</sup>, p59<sup>hck</sup>, p55<sup>fgr</sup>, p55<sup>blk</sup> und p56<sup>lck</sup> [93].

Der Grundbauplan dieser Kinasen stimmt weitgehend überein [104]. Am aminoterminalen Ende befindet sich eine myristinsäurereiche Sequenz, die die Assoziation an die Zellmembran ermöglicht. In diesem Bereich liegen bei der lymphozytenspezifischen Kinase *lck* ("*l*ymphoid *T*-*c*ell *p*rotein *t*yrosine *k*inase") sog. "unique sequence motifs"

[126], die für die Interaktion dieser Kinase mit den Corezeptormolekülen CD4 und CD8 nötig sind [104, 115, 128].

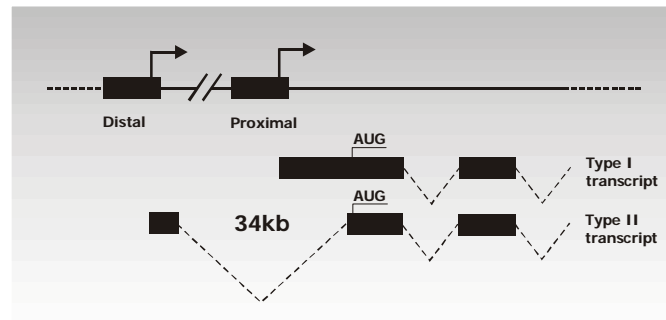
Innerhalb des N-terminalen Anteils befinden sich bei den *src*-Kinasen zwei relativ konservierte Abschnitte, die sog. "*src* homology domains" SH2 und SH3. Sie übernehmen vor allem regulatorische Aufgaben. Nach Dephosphorylierung der SH2-Domäne können Proteine gebunden und z. B. Protein-Kinase-Signalkomplexe gebildet werden [74]. Eine weitere *src*-typische Sequenz (SH1-Domäne) befindet sich in der carboxyterminalen Hälfte und vermittelt die Kinaseaktivität.

In dieser Region besitzt die *lck* eine Phosphorylierungsstelle in Position Tyr 505, die als wichtiger Regulator der Kinase wirksam ist. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Autophosphorylierung dieser Stelle die Kinaseaktivität hemmt, während die Mutation von Tyr 505 die Aktivität steigert und das onkogene Potential erhöht [2, 5, 74]. Erstaunlicherweise führte auch die experimentelle *Deletion* der SH1-Domäne zu einer Aktivitätssteigerung. Dies wurde zum einen durch den Verlust eines negativ regulierenden Bereiches und zum anderen durch die bessere Zugänglichkeit der SH2-Domäne erklärt [137]. Ein weiteres, die Kinaseaktivität modulierendes Motiv liegt am C-terminalen Ende. Hier kann eine Phosphorylierung durch einen negativen Regulator der *src*-Tyrosinkinasen (Csk) zu einer Inaktivierung der *lck* führen [86].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass viele verschiedene Mechanismen existieren, die in die Kontrolle der Kinasefunktion der lymphozytenspezifischen Kinase *lck* eingreifen: Die Bindung von Proteinen an SH2 oder SH3, die Phosphorylierung durch Rezeptor-Proteintyrosinkinasen und Csk und die Autophosphorylierung an Tyr 505 [13].

Darüber hinaus ist die *Transkription* der *lck* wichtig, die ihre Verfügbarkeit in den jeweiligen Entwicklungsstadien bestimmt und limitiert. Wie bei den Genen für die Produktion von Zytokinen, Rezeptoren und anderen Zellbestandteilen unterliegt die Expression des *lck*-Gens transkriptionellen Kontrollelementen des *lck-Locus* [4].

Eine Besonderheit des *lck*-Gens besteht darin, dass die Transkription entwicklungsabhängig über zwei *verschiedene*, durch 34 kb (Kilobasen) getrennte Promotorelemente erfolgt [3, 37] (siehe Abb. 1.1). Der *distale* (oder 5') Promoter steuert die Expression sowohl in Thymozyten als auch in reifen T-Zellen [134], während der *proximale* (oder 3') Promotor vor allem im Thymus zur Zeit der frühen Lymphopoese aktiv ist [37].



**Abbildung 1.1: Die Struktur der transkriptionellen Einheit der Proteintyrosinkinase p56<sup>lck</sup>.** Das *lck*-Gen besitzt zwei Promotoren, einen distalen und einen proximalen, die 34 Kilobasen voneinander getrennt sind. Transkription durch den proximalen Promotor führt zur Entstehung der sog. Typ I Transkripte, die Transkription durch den distalen Promotor zur Entstehung von Typ II Transkripten. Die Transkripte unterscheiden sich nur am 5'-Ende, das nicht für das Protein kodiert.

Die zwei Promotoren des *lck*-Gens ermöglichen eine effiziente Transkription in unreifen und in reifen Zellen, da sie durch unterschiedliche transaktivierende Faktoren ("transacting factors") reguliert werden [4].

Bei der Erstbeschreibung der Kinase p56<sup>lck</sup> waren diese Regulationsmechanismen noch unbekannt. Die Entdeckung der lymphozytenspezifischen Kinase *lck* beruhte auf der Isolierung eines fehlregulierten Proteins, das in der Maus-Lymphomzelllinie LSTRA überexprimiert war [17, 75, 130]. Später fanden sich erhöhte Level von *lck*-Transkripten auch in nicht-lymphatischen Neoplasien, wie z. B. beim Colon-Carcinom oder beim kleinzelligen Bronchialcarcinom [109, 127]. Wie andere Mitglieder der *src*-Proteinkinasefamilie hat also auch die *lck* onkogenes Potential, und ihre Aktivierung durch Mutation kann zu der Transformation einer Zelle führen [122].

Im Normalfall ist die Expression des *lck*-Gens jedoch auf das *lymphatische* Kompartiment beschränkt und gut reguliert. Transkripte sind bevorzugt in T-Zellen, weniger in B-Zellen oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nachweisbar [92] und kontrollieren durch ihre wichtige Rolle bei der Signaltransduktion die T-Zell-Entwicklung und Differenzierung.

### 1.3.1 p56<sup>lck</sup> ist ein Schlüsselenzym der Thymozytenreifung

Sobald die ersten hämatopoetischen Zellen die Thymusanlage besiedeln sind *lck*-Transkripte im Thymus zu finden [101]. Wie wichtig die regulierte Expression des *lck*-

Gens bereits in diesem Stadium für die Entwicklung der T-Zellen ist, zeigte sich in Experimenten, die in die natürliche Regulation eingriffen.

Überexpression von *lck* in jungen Thymozyten führte zu schwerwiegenden Störungen der Thymozytenreifung. Die Zellen waren nicht in der Lage, einen funktionellen T-Zell-Rezeptor auszubilden. Schon die Verdopplung der *lck*-Menge reichte aus, um die T-Zell-Reifung ganz zu verhindern [1].

Doch auch ein Mangel an *lck* ist nicht mit der normalen Entwicklung vereinbar. In Mäusen, bei denen das *lck*-Gen "ausgeschaltet" wurde (*lck*-knock-out, *lck*<sup>-/-</sup>), ist der Thymus atrophisch, die Zahl der "doppelt positiven" Zellen dramatisch reduziert und reife CD4- oder CD8-Zellen werden kaum ausgebildet [80]. Ähnlich gravierend ist der Defekt bei der Mutante R273 *lck*, der durch die Substitution eines kritischen Aminosäurerestes *lck*-Kinaseaktivität fehlt [66].

Trotz der deutlichen Veränderungen im Thymus sind *lck*<sup>-/-</sup>-Mäuse phänotypisch gesund und lebensfähig [80]. Dies spricht dafür, dass die Vermittlung der *Zellreifung* im Thymus eine Aufgabe ist, für die die *lck* allein verantwortlich ist, während andere Funktionen von verwandten Kinasen übernommen werden können.

So zeigt sich ein derartiger Reifungsstopp der T-Zellen nur nach Ausschaltung des *lck*-Gens. Knock-out-Mäuse, die für die verwandte *src*-Kinase p59<sup>lyn</sup> defizient sind, haben einen normal entwickelten Thymus [6, 119].

T-Zell-Reifungsdefekte, die denen des *lck*-knock-outs ähnlich sind, findet man dagegen bei Mäusen, denen aufgrund gezielter Genausschaltung ("targeted disruption") eine wichtige Komponente des frühen T-Zell-Rezeptors (pre-TCR) fehlt [83]. In RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen eine Störung des TCR-Rearrangements vorliegt (siehe 1.2), ist die T-Zell-Reifung im Stadium der naiven "doppelt negativen" Zellen blockiert, und es sind keine ausgereiften CD4- oder CD8-Zellen nachweisbar [82].

Überträgt man jedoch ein *lck*-Transgen mit *konstitutiver* Kinaseaktivität auf die Tiere, wird der Reifungsstopp überwunden, und 90% der Thymozyten werden entweder als CD4- oder CD8-positive Zellen detektierbar [83]. Die dauerhaft aktive *lck* ist demnach in der Lage, das fehlende T-Zell-Rezeptorsignal zu ersetzen und den Rezeptordefekt somit zu kompensieren.

Nach dem gleichen Prinzip kann die Thymopoese bei Mäusen, denen die  $\alpha$ -Kette des pre-TCR fehlt und eine stark verminderte Zellzahl im Thymus aufweisen [32], durch

das *lck*-Transgen wiederhergestellt werden [33]. Die *lck* vermittelt also die dem pre-T-Zell-Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktion als treibende Kraft der frühen Thymozytenreifung [15].

Doch auch in der weiteren Entwicklung bis hin zur reifen T-Zelle spielt die Assoziation der *lck* mit dem TCR-Komplex eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung der *lck* kann die Verteilung und die Expression von TCR-Elementen beeinflusst werden [133]. Die Kinase bindet an die cytoplasmatischen Anteile der Corezeptormoleküle CD4 oder CD8 [104, 115, 128] und ist im Rahmen des sog. "lineage commitment" an der Ausdifferenzierung der Thymozyten zu CD4- bzw. CD8-positiven Zellen beteiligt [44].

Es wurde gezeigt, dass die *lck* mit stärkerer Affinität an CD4 als an CD8 bindet [133] und eine stärkere *lck*-Aktivierung zu der bevorzugten Entwicklung von CD4-positiven Zellen führt. Experimentell entwickelten sich Thymozyten mit einem MHC der Klasse II, die normalerweise in CD4-Zellen differenzieren, durch die Reduktion der *lck*-Aktivität in funktionelle CD8-Zellen [44].

Das würde bedeuten, dass die Ausdifferenzierung der T-Zellen im wesentlichen von zwei Gegebenheiten beeinflusst werden kann: Erstens durch den *T-Zell-Rezeptor*, der mit einer gewissen Affinität an den spezifischen MHC-Komplex bindet, und zweitens durch die Stärke des *lck*-Signals während der positiven Selektion [44].

### 1.3.2 p56<sup>lck</sup> in der Signaltransduktion

Die erste nachweisbare Veränderung innerhalb der Zelle, nachdem Antigen an den T-Zell-Rezeptor gebunden hat, ist die Phosphorylierung von Tyrosinresten [54]. Diese Phosphorylierung durch Proteintyrosinkinasen startet die Signalkaskade in das Innere der Zelle [61]. Wird die Aktivität der Kinasen inhibiert, verhindert das die Aktivierung der Zelle, weil das Signal den Zellkern nicht erreicht [53]. So konnten *lck*-defiziente Jurkat-T-Zellen beispielsweise nicht mehr über den TCR stimuliert werden [120].

Für die schnelle Reaktion auf die Rezeptorsignale binden Kinasen häufig an cytoplasmatische Anteile von Rezeptorstrukturen. Für die Tyrosinkinase *lck* sind bisher Interaktionen mit multiplen Oberflächenmolekülen nachgewiesen [118].

Von besonderer Bedeutung ist die bereits beschriebene Assoziation mit den Corezeptoren CD4 oder CD8 [104, 115, 128], durch die eine optimale Antigenstimulation möglich

ist [38]. Alternative Signalwege, in die die *lck* involviert ist, beruhen auf einer Verbindung mit CD45 [85, 89] und CD38 [21].

Daneben wurden spezifische Bindungen zwischen der katalytischen Domäne der *lck* und der  $\beta$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors festgestellt [42]. Über Interleukin-2 (IL-2), ein wichtiges Zytokin für die T-Zell-Proliferation [16], kann somit auch eine *lck*-Aktivierung erfolgen, die unabhängig von CD4 oder CD8 ist [48].

Durch die Weitergabe des Rezeptorsignals ist die *lck* an der Aktivierung anderer Kinasen und Adaptormoleküle der Signalkaskade und damit an der Koordination der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt.

Die *src*-Kinase  $p59^{fyn}$ , die auch cytoplasmatisch an den T-Zell-Rezeptorkomplex gebunden ist [106], ist in CD4-negativen Zellen inaktiv, kann aber durch konstitutiv exprimierte *lck* aktiviert werden. Diese Tatsache spricht für eine funktionelle Interaktion zwischen den beiden Kinasen [9]. Weitere Kooperationen bestehen mit der Phospholipase C, die zusammen mit *lck* präzipitiert werden konnte [132], mit der ZAP-70-Kinase [30], mit PAK 1 ("p21 ras activated kinase 1") [138] und mit dem Protooncogen *vav* [135]. Erst vor kurzer Zeit wurde die *lck* außerdem als Regulator für PKC  $\theta$  identifiziert [68].

Ziel der Signaltransduktion, die durch die *lck* angestoßen wird, ist die Induktion von Genen im Zellkern. Diese kann direkt erfolgen, oder durch die Aktivierung von DNA bindenden Faktoren, die die Genexpression regulieren (s. 1.4).

Über die aktivierte Tyrosinkinase *lck* und  $p24$  ras wird beispielsweise der Transkriptionsfaktor NF-AT stimuliert (s. 1.4.1.2) [8]. Umgekehrt kann ein Block im Signalweg, z. B. die fehlende *lck*-abhängige Phosphorylierung der PKC  $\theta$  durch Mutation des Zielmotivs, die Induktion von NF-AT verhindern [68].

## 1.4 Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression

Dass die Expression eines Gens zur rechten Zeit am rechten Ort stattfindet, beruht zu einem großen Teil auf einer kontrollierten Transkription. Hierfür sind Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Das sind Proteine, die in der Lage sind, spezifisch an die DNA zu binden und damit die Effektivität der Genexpression zu beeinflussen.



Voraussetzung für die Interaktion mit der DNA ist, dass die Faktoren, wenn sie sich nicht bereits im Kern befinden, in den Zellkern transloziert werden. Außerdem muss die DNA mindestens so weit "geöffnet" sein, dass ein Faktor die für ihn spezifische Sequenz erkennen und binden kann [52]. Obwohl sich die Vielzahl der Transkriptionsfaktoren in ihrer Struktur (z. B. "Leucin-Zipper", "C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger") und in ihrer Wirkungsweise ("enhancer", "silencer") unterscheiden, stimmen sie doch in einem groben Bauplan überein.

Transkriptionsfaktoren besitzen in der Regel eine DNA-bindende Domäne (DBD), sowie eine Transaktivierungsdomäne (TAD) über die mit anderen Proteinen Kontakt aufgenommen werden kann [87]. Manche Proteine lagern sich zu Dimeren zusammen (z. B. p50 und p65 Heterodimere von NF-κB oder Jun/Fos Heterodimere des AP1-Komplexes), andere binden direkt als Monomere an die DNA (z. B. NF-AT oder c-Myb) [87].

Häufig nachweisbare Interaktionen zwischen zwei verschiedenen DNA-bindenden Faktoren führten zur Identifizierung von sog. "*composite elements*", die Bindungsmotive von zwei Transkriptionsfaktoren in unmittelbarer Nachbarschaft besitzen. Derartige Informationen werden in Datenbanken genutzt, um potentielle Zielgene von Transkriptionsfaktoren zu identifizieren [43, 56]. Ein bekanntes Beispiel sind NF-AT-Bindungsstellen (NF-AT-"sites"), die häufig eine gemeinsame Bindung von NF-AT und Mitgliedern des AP1-Komplexes ermöglichen [98].

## **1.4.1 Der Transkriptionsfaktor NF-AT**

### *1.4.1.1 Mitglieder der NF-AT-Familie*

Das Akronym NF-AT steht für "nuclear factors of activated T-cells" und beschreibt eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Zytokinexpression in aktivierten T-Zellen reguliert. Entdeckt wurde diese Eigenschaft zuerst durch die Aktivierung der Il-2-Produktion nach spezifischer Bindung von NF-AT an zwei verschiedene Sequenzmotive des Interleukin-2-Promotors [49, 114, 116]. Mittlerweile wurden verschiedene weitere sog. "target genes" für NF-AT identifiziert [99].

Die Struktur der zuerst klonierten NF-AT Faktoren (NF-AT1 bis NF-AT4)\* zeigt deutliche Übereinstimmungen in der etwa 300 Aminosäuren umfassenden DNA-bindenden Domäne mit Sequenzhomologien von bis zu 75%. Wegen der Ähnlichkeit zu der DBD der Rel/NF- $\kappa$ B-Faktoren wird sie auch als sog. "Rel similarity domain" bezeichnet [99]. Die transaktivierende Domäne der NF-ATs liegt am prolinreichen aminoterminalen Ende [114]. Zwischen der DBD und der TAD befindet sich ein Bereich, der durch die Phosphorylierung von Serinmotiven reguliert werden kann. Auch die für den Transport in und aus dem Zellkern nötigen Sequenzen, das sog. "nuclear localisation signal" bzw. das "nuclear export signal", wurden in diesem Bereich identifiziert [57].

Unterschiede bestehen vor allem an dem C-terminalen Ende. Durch sog. "*alternatives Splicing*" entstehen darüber hinaus unterschiedliche Isoformen. So gibt es für NF-AT2 drei Isoformen, die sich in ihrer Länge unterscheiden und deren Expression von der Reife der T-Zelle abhängig ist. Während die naiven T-Lymphozyten die zwei längeren Formen synthetisieren, bildet die reife Effektorzelle nur die kurze Isoform NF-AT2A [23].

Neben den bereits beschriebenen klassischen Mitgliedern der NF-AT-Familie wurde zuletzt ein weiteres, NF-AT ähnliches Protein kloniert, das als NF-AT5 oder TonEBP ("tonicity enhancer binding protein") bezeichnet wird [69, 79]. NF-AT5 weist jedoch, im Vergleich zu NF-AT1-4, einige wichtige Unterschiede auf. NF-AT5 fehlt, abweichend vom gemeinsamen Grundbauplan, die TAD am N-terminalen Ende. Außerdem ist NF-AT5 im Gegensatz zu den klassischen NF-AT-Faktoren in der Lage, wie NF $\kappa$ B-Faktoren Homodimere zu bilden. Ein weiterer Unterschied besteht in der Regulation von NF-AT5, dessen Aktivierung unabhängig ist von Calcineurin (siehe 1.4.1.2) [114].

#### 1.4.1.2 Die Aktivierung von NF-AT

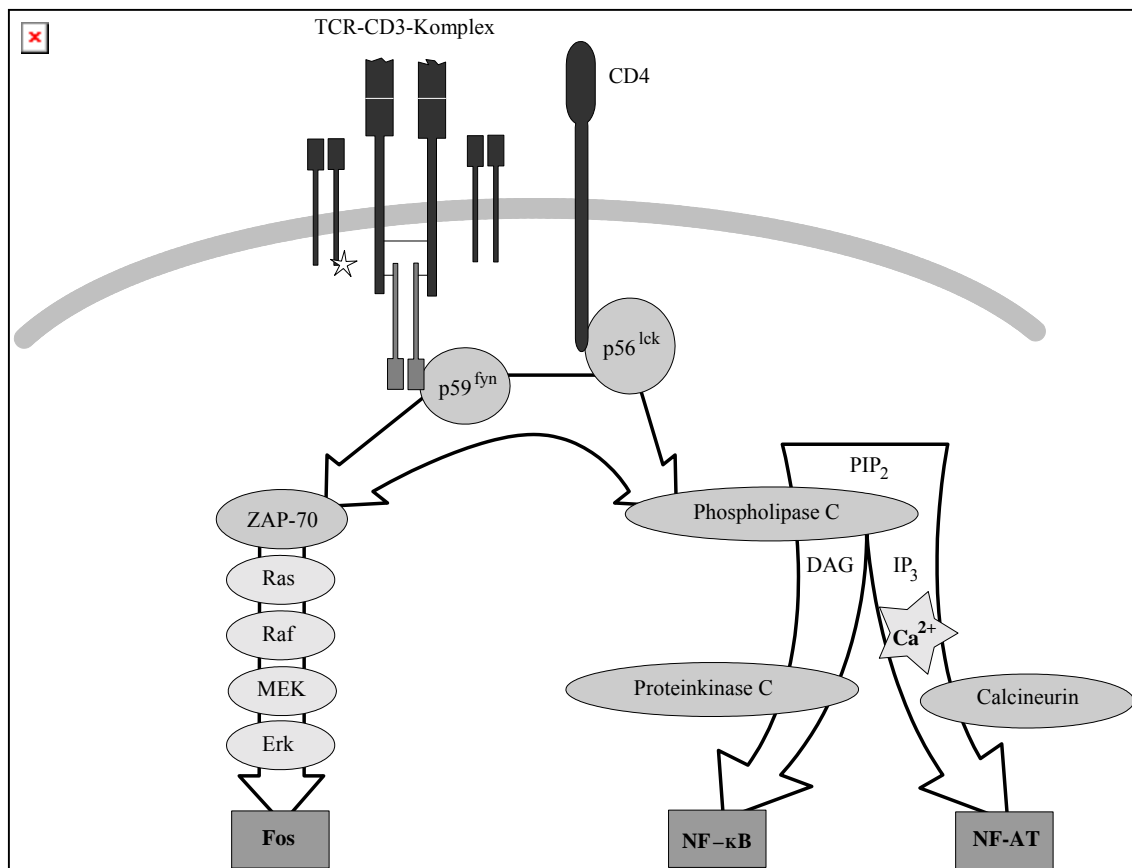
Die Aktivierung der in der ruhenden Zelle inaktiven, phosphorylierten NF-ATs erfolgt nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors innerhalb von wenigen Minuten in einem Calcium-abhängigen Prozess. Hieran sind im wesentlichen zwei Signalwege beteiligt [52]:

---

\* Es sind auch andere Bezeichnungen für die NF-AT Faktoren gebräuchlich: NF-AT1 (NF-ATp, NF-ATc2), NF-AT2 (NF-ATc, NF-ATc1), NF-AT3 (NF-ATc4), NF-AT4 (NF-ATx, NF-ATc3)

Zunächst kommt es durch die Bindung eines Liganden an den T-Zell-Rezeptor zu einer Phosphorylierung von CD3-Ketten und zur Aktivierung von ZAP-70.

Im Rahmen des ersten Signalweges wird dann das GTP-bindende ras-Protein aktiviert, das wiederum eine Kaskade von Proteinkinasen (Raf/MEK/Erk) anstößt. Ergebnis ist u. a. die Induktion des Fos-Proteins, ein Bestandteil des AP1-Komplexes (s. Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Über den T-Zell-Rezeptor ausgelöste Signalkaskaden.** Nach Bindung eines Liganden an den T-Zell-Rezeptor werden die Kinasen *fyn* und *lck* aktiviert. Es kommt zu einer Phosphorylierung der  $\zeta$ -Kette des CD3-Komplexes (markiert durch einen Stern), der Aktivierung von ZAP-70 und der Induktion einer Kaskade über Ras/Raf bis zur Aktivierung des Fos-Proteins (AP1-Transkriptionsfaktoren). Der zweite Signalweg führt über die Aktivierung der Phospholipase C zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>). DAG aktiviert die Proteinkinase C und damit den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. IP<sub>3</sub> setzt Calcium aus intrazellulären Speichern frei. Dies aktiviert Calcineurin, und schließlich die NF-AT-Transkriptionsfaktoren.

Parallel führt der zweite Signalweg zu einer Aktivierung der Phospholipase C, die Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. DAG aktiviert zunächst die Proteinkinase C, die dann an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt ist. Durch IP<sub>3</sub> kommt es zu einer Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern. Außerdem werden Ca<sup>2+</sup>-spezifische

Ionenkanäle geöffnet, die zu einem Einstrom von extrazellulärem Calcium führen. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle an, bindet die cytoplasmatische Proteinphosphatase Calcineurin an das regulatorische Zentrum der NF-ATs. Die Transkriptionsfaktoren werden durch Dephosphorylierung aktiviert und schließlich in den Zellkern transloziert (s. Abb. 1.2).

Dort binden die NF-ATs an eine bestimmte Kennungssequenz (Basenfolge "T<sub>A</sub>GGAAAA") und induzieren die Transkription von sog. "activation induced genes" [8]. Dies sind vor allem - jedoch nicht nur - Zytokine, die für die Proliferation, Expansion und Reaktivität der T-Zellen verantwortlich sind [52].

Durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalweg blockiert und die Expression von Zytokinen heruntergefahren [11, 31]. Auf diese Weise kann z. B. die Abstoßungsreaktion nach Transplantation gehemmt werden. Angriffspunkt für beide Medikamente ist die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin, die durch intrazellulär gebildete Komplexe aus den sog. Immophilinen und CsA bzw. FK506 blockiert wird [67]. Die Hemmung von Calcineurin verhindert die Aktivierung von NF-AT und die Induktion von Zytokinen.

#### 1.4.1.3 Die Bedeutung und Aufgaben der NF-ATs

Als der Zusammenhang zwischen der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und der NF-AT-Familie entdeckt wurde, dachte man zunächst, dass die Expression von NF-AT eine alleinige Eigenschaft von T-Zellen sei. Später stellte sich heraus, dass die vier NF-AT-Faktoren in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und nicht auf das lymphatische Kompartiment beschränkt sind [47].

Welche Relevanz die einzelnen NF-AT Faktoren *in vivo* besitzen und wie sich ein Mangel eines NF-AT-Faktors phänotypisch manifestiert, war eine Frage, die in "Knock-out"-Experimenten geklärt werden sollte. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Abb. 1.3.

Mäuse mit einer Defizienz für NF-AT1 (NF-AT1<sup>-/-</sup>) kommen scheinbar gesund zur Welt und entwickeln dann, im Alter von wenigen Wochen, deutliche Veränderungen der Immunantwort im Sinne einer erhöhten Aktivierung des Immunsystems [111]. Die Lymphozyten dieser Mäuse sind in ihrer Zahl vermehrt und exprimieren vor allem Rezeptor-

ren, die reife, aktivierte Zellen kennzeichnen (z. B. CD69 und CD44) [111]. Als Zeichen der lymphozytären Aktivierung und Hyperproliferation kommt es zu einer Vergrößerung der lymphatischen Organe und einer verspäteten Involution des Thymus [46, 111]. Darüber hinaus zeigt sich eine veränderte Zytokinproduktion mit einer verminderten Produktion von Th2-typischen Zytokinen, z.B. Interleukin-4. Die Sekretion von Il-2 bleibt dagegen durch den "Defekt" unbeeinträchtigt [46, 111, 136].

NF-AT2 defiziente Mäuse sterben bereits in utero aufgrund von Defekten bei der Bildung der Herzklappen [28]. Im Labor hergestellte NF-AT2<sup>-/-</sup>-Thymozyten, die durch die Injektion von embryonalen Stammzellen in RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen\* entstanden, zeigen ebenfalls eine Reduktion der Th2-Zytokine bei normaler Il-2-Produktion [97, 140]. Dies spricht dafür, dass ein NF-AT-Faktor den Mangel von NF-AT1 bzw. NF-AT2 zum Teil kompensieren kann.

Im Gegensatz zu der NF-AT2-Defizienz führte die alleinige Ausschaltung von NF-AT4 nur zu geringen phänotypischen Veränderungen. Es zeigte sich jedoch eine Störung der Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten. Dies könnte durch eine gesteigerte Apoptose der "doppelt positiven" T-Zellen bedingt sein. [39, 90].

In Doppel-"knock-out"-Experimenten wurden Mäuse gezüchtet, die zwei NF-AT-Faktoren nicht bilden können. NF-AT1<sup>-/-</sup>2<sup>-/-</sup>-Tiere wurden durch die Neubesiedlung von RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen mit embryonalen Stammzellen gewonnen. Bei komplettem Defekt der Il-2-, Il-10-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Synthese der T-Zellen zeigte sich eine gesteigerte B-Zellaktivierung, die mit einer vermehrten IgG1- und IgE-Produktion einherging [91].

Bei NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Tieren kam es ebenfalls zu einer starken Reduktion der Il-2- sowie der Interferon- $\gamma$ -Synthese [96]. Durch eine vermehrte T-Zell- und B-Zell-Proliferation weisen diese Tiere eine gesteigerte Produktion von Th2-Lymphokinen, erhöhte IgE- und IgG1-Spiegel im Serum, sowie lymphozytäre Infiltrationen von Organen auf [100, 96].

NF-AT3<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben durch eine defekte Angiogenese bereits intrauterin [40]. Durch zusätzliche, experimentelle Ausschaltung von NF-AT1 in diesen NF-AT3<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Tieren treten Entwicklungsstörungen des embryonalen neuronalen Systems auf [41].

Zusammengefasst führt der Mangel des Transkriptionsfaktors NF-AT zu einer veränderten Genexpression in Lymphozyten. Dies zeigt sich durch eine Alteration der Zellrei-

---

\* Diese Mäuse haben einen Defekt im "Recombination Activating Gene" und zeigen damit ein gestörtes T-Zell-Rezeptor-Rearrangement [97].

fung im Thymus, eine gesteigerte oder verminderte Aktivierung der Zellen und durch Unterschiede im exprimierten Zytokinmuster. Neben dieser wichtigen Bedeutung für die Entwicklung und Funktion des Immunsystems, belegen die beschriebenen "Knock-out"-Experimente einen Einfluss von NF-AT bei der Ausbildung des Gefäß- und Nervensystems. Dass sich manche dieser Defekte erst bei der Ausschaltung von *zwei* Mitgliedern der NF-AT-Familie manifestieren, zeigt, dass die NF-AT-Faktoren nicht nur Einzelaufgaben erfüllen, sondern auch überlappende Funktionen wahrnehmen.

NF-AT-Faktor	Phänotyp der NF-AT defizienten Maus
NF-AT1	Hyperproliferation von Lymphozyten, Vergrößerung der lymphatischen Organe, verspätete Involution des Thymus. Th2-Zytokine vermehrt, Il-2-Synthese normal [46, 111, 136].
NF-AT2	Intrauteriner Fruchttod (Tag 12-14) bei Defekten der Herzklappenbildung. NF-AT2-defiziente Lymphozyten zeigen eine verminderte Synthese von Th2-Zytokinen, Il-2-Produktion normal [28].
NF-AT3	Kein auffälliger Phänotyp.
NF-AT4	Verminderte Ausreifung von SP-Zellen bei Zunahme der Apoptose von DP-Zellen [39, 90].
NF-AT1/NF-AT2	Hyperaktivierung von B- und T-Zellen, starke Abnahme der Il-2-, Il-10-, TNF $\alpha$ - und IFN $\gamma$ -Synthese. Vermehrte Produktion von IgG1 und IgE [91].
NF-AT1/NF-AT4	Hyperproliferation von Lymphozyten (Infiltration von Organen, Splenomegalie), stark vermehrte Produktion von Th2-Lymphokinen, IgE und IgG1 [100, 96].
NF-AT3/NF-AT4	Intrauteriner Fruchttod (ca. Tag 11) bei defekter Angiogenese [40].
NF-AT1/ NF-AT3/NF-AT4	Defekt beim Auswachsen embryonaler Neurone [41].

**Abbildung 1.3: Der Phänotyp von NF-AT-defizienten Mäusen.**

## 1.5 Problemstellung

Die Proteintyrosinkinase *lck* besitzt zwei verschiedene Promotoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der T-Zell-Entwicklung aktiv sind [3, 37]. Die *lck*-Transkripte, Typ I vom proximalen und Typ II vom distalen Promotor, unterscheiden sich nur in den am 5'-Ende liegenden Bereichen, die nicht für das Protein kodieren [129]. Die Promotorsequenzen selbst sind völlig verschieden, und die vor der Transkriptions-Startstelle liegenden Regionen, die durch Regulationsfaktoren gebunden werden können, weisen somit keine Ähnlichkeiten auf [123]. Es spricht also vieles dafür, dass die beiden Promotoren deshalb zu unterschiedlichen Zeiten aktiv sind, weil sie durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Da der *proximale* Promotor bevorzugt in *unreifen* Thymozyten nachweisbar ist, ist die Entdeckung seiner Regulatoren von besonderer Bedeutung. Die gleichen Faktoren könnten nämlich am frühen Entwicklungsprogramm der T-Zelllinie beteiligt sein [64].

Die Kontrolle des proximalen *lck*-Promotors ist auch deshalb interessant, weil er experimentell häufig für die Expression von Transgenen in Thymozyten eingesetzt wird [18, 36]. Die Interpretation des Phänotyps der transgenen Tiere ist davon abhängig, wann und in welcher Menge das Transgen exprimiert wird [15]. Auf diese Weise können Regulatoren des proximalen *lck*-Promotors die Wirkung des Transgens und das Ergebnis des Experimentes nachhaltig beeinflussen.

Um die für die Regulation wichtigen Bereiche des *lck*-Typ-I-Promotors zu identifizieren, wurden bereits experimentell unterschiedlich verkürzte Varianten der am 5'-Ende liegenden Promotersequenz hergestellt. Dabei zeigte sich, dass eine sog. "flanking sequence" von etwa 600 Basenpaaren (Position -584 bis +37, bezogen auf die Startstelle der Transkription) alle Informationen enthält, die für die gewebe- und entwicklungspezifische Aktivität des proximalen Promotors nötig sind [4]. Schließlich wurden die ersten Sequenzmotive identifiziert, über die der Promotor aktiviert werden kann: Ein sog. "Ets binding element" (EBE) [64] für den Transkriptionsfaktor Ets-1 und eine Bindungsstelle für c-Myb [77].

Einleitend wurde beschrieben, dass die lymphozytenspezifische Kinase *lck* als wichtiger Teil der Signalkaskade im Rahmen des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Signalweges zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT führen kann. Die Aufgabe dieser Arbeit bestand

nun darin, herauszufinden, ob die im Thymus konstitutiv aktiven NF-AT-Faktoren [112] wiederum im Rahmen eines "*autokrinen loops*" in der Lage sind, den proximalen Promotor der *lck* zu aktivieren. In weiterführenden Experimenten war dann die Frage zu klären, ob die Interaktion von NF-AT und dem Promotor auch *in vivo* im Thymus stattfindet. Schließlich sollte ein Einblick in die biologische Relevanz der Transaktivierung von *lck* durch NF-AT gewonnen werden.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 NF-AT bindet den proximalen *lck* Promotor *in vitro*

#### 2.1.1 Nachweis der Bindung mittels "Footprinting"

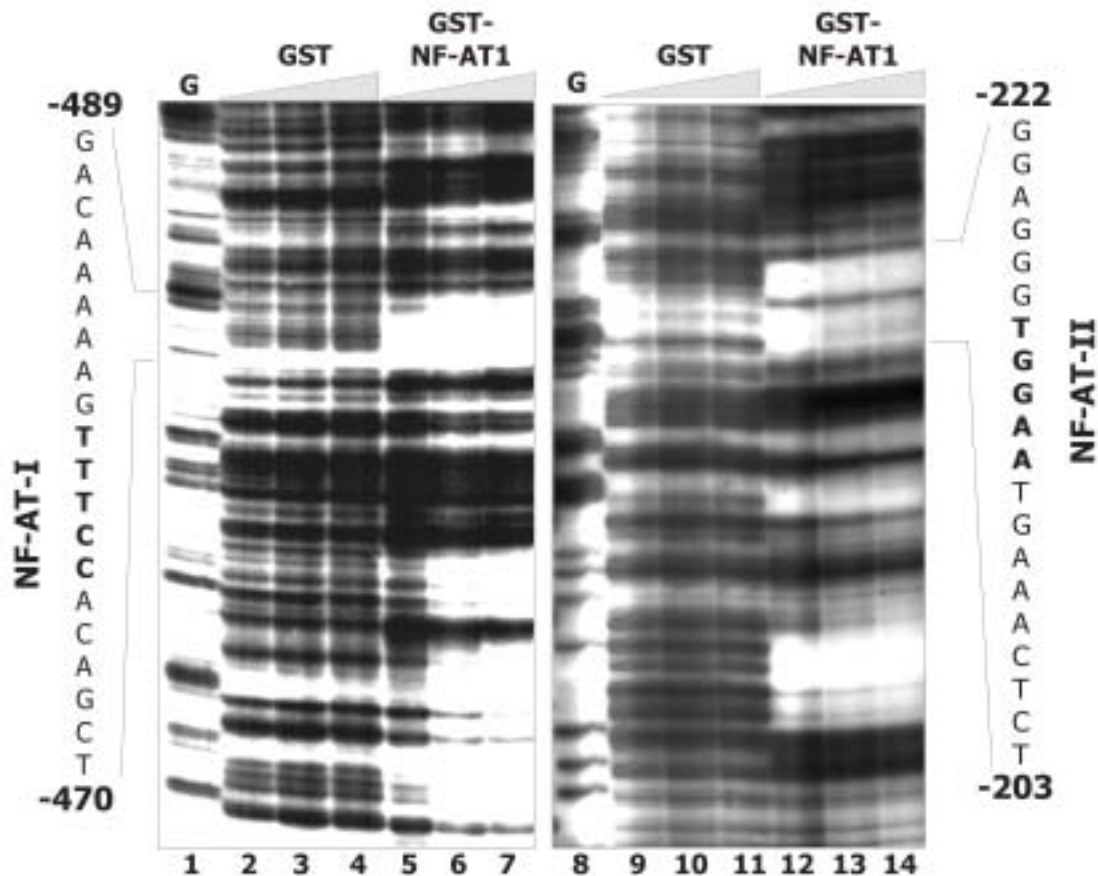
Um die Bindung von NF-AT1 an den proximalen Promotor des *lck*-Gens nachzuweisen und Kontaktstellen zu identifizieren wurde ein sogenanntes "*DNA-Footprinting*" durchgeführt (s. 5.2.11.2). Für dieses Experiment wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden der proximalen Promotorsequenz eingesetzt, die mit einem NF-AT1-Fusionsprotein (s. 5.2.9.3) und anschließend mit DNase I inkubiert wurden. Weil die Proteinbindung die DNA vor dem Abbau durch das Enzym schützt, kann die DNase an diesen Stellen nicht schneiden. Auf diese Weise entstehen viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente, Stücke einer bestimmten Länge fehlen jedoch bei der späteren Auftrennung im Gel.

Um "Footprints" über die gesamten zu untersuchenden 740 Basenpaare zu erhalten, wurde die proximale Promotor-Sequenz aus beiden Richtungen untersucht. Dazu wurden zwei unterschiedliche radioaktive Proben aus dem Vektor GL3-*lck* (s. 5.1.13.1) hergestellt. Für die eine DNA-Sonde wurde das 5'-Ende der Promotorsequenz an der Xho I-Schnittstelle des GL3-*lck*-Vektors markiert (Spuren 1 - 7 in Abb. 2.1), für die andere das 3'-Ende an der Hind III-Schnittstelle (Spuren 8 - 14 in Abb. 2.1).

Für die "Footprinting"-Reaktion wurde die radioaktiv markierte DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen des GST-NF-AT1-Proteins inkubiert (Spuren 5 - 7 und 12 - 14 in Abb. 2.1). Als Kontrolle wurden parallel Ansätze mit GST-Protein *ohne* NF-AT1 mitgeführt (Spuren 2 - 4 und 9 - 11 in Abb. 2.1). Dann erfolgte der partielle Verdau der Proben mit DNase I, die Aufreinigung und die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamid-Gel.

Es zeigten sich verschiedene weiß ausgesparte Bereiche der *lck*-Typ-I-Promotor-Sequenz, wo die Bindung des GST-NF-AT1-Proteins zu einem "Footprint" geführt hatte. Durch sog. "*chemisches Sequenzieren*" (s. 5.2.6.4) entstand nach elektrophoretischer Auftrennung eine Sequenzierungsleiter, die die Position von Guanosinen (G) in der Sequenz anzeigt. Unter Zuhilfenahme dieser G-Markierungen (Spuren 1 und 8 in Abb.

2.1) wurde den NF-AT-bindenden Bereichen die zugehörige DNA-Sequenz des proximalen Promotors zugeordnet. Das Sequenzmotiv im Bereich Pos. -480 bis -476 wurde im Folgenden NF-AT-I<sub>lck</sub> und der Bereich Pos. -216 bis -212 NF-AT-II<sub>lck</sub> genannt.



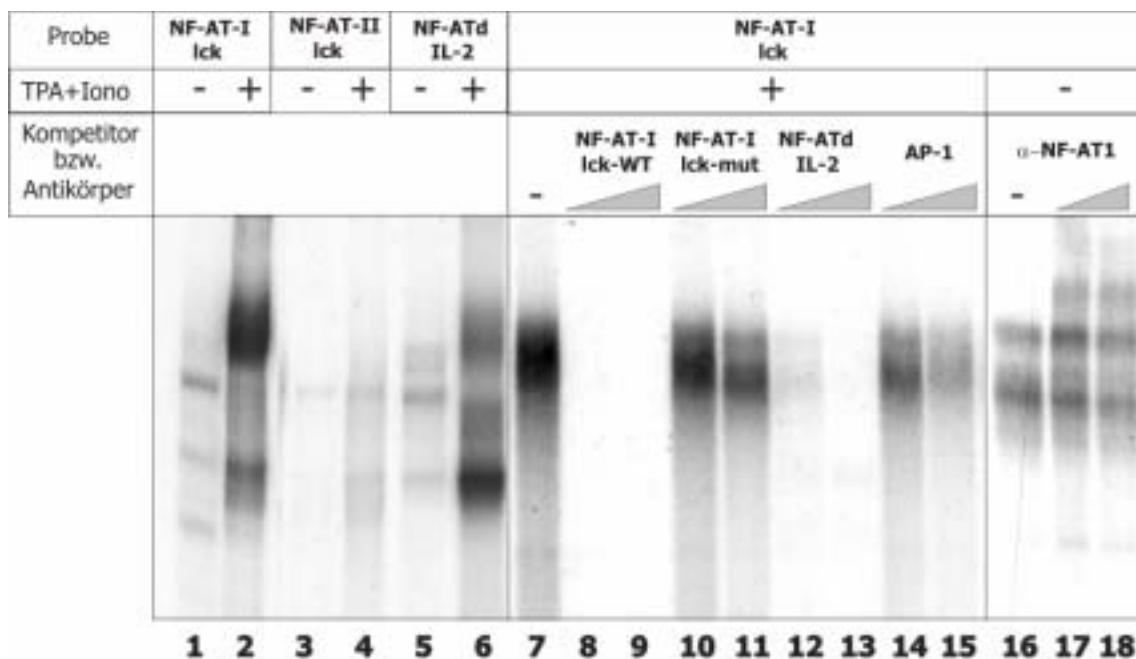
**Abbildung 2.1: NF-ATs binden an mehrere Stellen des proximalen *lck*-Promotors.** Eine radioaktiv markierte Probe der Sequenz des proximalen *lck*-Promotors wurde mit zunehmender Konzentration (0,25 - 5 µg) von GST-Protein (Spuren 2 - 4 und 9 - 11) oder der gleichen Menge von GST/NF-AT1-Protein (Spuren 5 - 7 und 12 - 14) inkubiert. Nach partiellem Verdau mit DNase I wurden die Proben in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Unter Zuhilfenahme der G-spezifischen Sequenzierungsreaktion (Spuren 1 und 8) konnte die Sequenz den weiß ausgesparten "Footprint"-Stellen zugeordnet werden.

### 2.1.2 Nachweis der Bindung mittels "Bandshift"

Um die identifizierten NF-AT-Bindungsstellen genauer zu untersuchen, wurden sog. "Bandshifts" oder "Electrophoretic Mobility Shift Assays" (EMSAs) durchgeführt (s. 5.2.11.1).

Zunächst wurden Oligonukleotide mit den NF-AT-I- und NF-AT-II-Motiven des *lck*-Promotors sowie der bekannten, distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2-Promotors (NF-ATd-IL2), radioaktiv markiert. Dann wurden diese Proben zum einen mit Kernproteinen von nicht induzierten (Spuren 1, 3, 5 in Abb. 2.2) oder mit Phorbol ester (TPA) und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin behandelten Jurkat-T-Zellen (Spuren 2, 4, 6 in Abb. 2.2) und zum anderen mit Kernextrakt aus frisch isolierten, murinen Thymozyten inkubiert (Spuren 7 - 18).

Es zeigte sich, dass die NF-AT-I<sub>*lck*</sub>-Sequenz (Spuren 1, 2 und 7 - 18) ein ähnliches Bindungsmuster aufweist wie die distale Purinbox des IL-2-Promotors (Spuren 5 und 6), für die die Bindung von NF-AT bekannt ist. Das andere NF-AT-Motiv des proximalen *lck*-Promotors NF-AT-II<sub>*lck*</sub> weist dagegen eine deutlich schwächere Proteinbindung auf (Spuren 3 und 4).



**Abbildung 2.2: Bandshift-Experimente mit den NF-AT-Sequenzen des proximalen *lck*-Promotors.** Kernproteine von nicht induzierten (Spuren 1, 3, 5) und mit TPA und Ionomycin behandelten Jurkat-Zellen (Spuren 2, 4, 6) oder von frisch aus Mäusethymus isolierten Zellen (Spuren 7 - 18) wurden mit der Sequenz der NF-AT-Bindungsstelle des murinen Interleukin-2-Promotors (Spuren 5, 6) oder den Bindungsstellen NF-AT-I (Spuren 1, 2, 7 - 18) und NF-AT-II (Spuren 3, 4) inkubiert. In Konkurrenzexperimenten wurden 10 µg bzw. 50 µg der Wildtyp NF-AT-I-Sequenz (Spuren 8, 9), der mutierten NF-AT-I-Sequenz (Spuren 10, 11), der distalen NF-AT-Sequenz des IL-2-Promotors (Spuren 12, 13) und einer AP-1-Sequenz (Spuren 14, 15) eingesetzt. In Spuren 17 und 18 wurden der Bindungsreaktion 0,5 µg bzw. 5 µg eines NF-AT1-spezifischen Antikörpers zugesetzt.

Die Spezifität der Protein/DNA-Komplexe konnte in Konkurrenzexperimenten nachgewiesen werden. Hierzu wurden 10 µg bzw. 50 µg des unmarkierten NF-AT-I-Oligonukleotids zum Reaktionsansatz gegeben. Durch die Konkurrenz der nicht-radioaktiven DNA mit der markierten Probe kam es zu einem Verschwinden des NF-AT-Komplexes (Spuren 8 und 9). Analog dazu war die unmarkierte Sequenz der Purinbox des Il-2-Promotors in der Lage, die radioaktive Komplexbildung zu verhindern (Spuren 12 und 13). Der in der Bindungssequenz mutierte Kompetitor NF-AT-I<sub>lck</sub>-mut (CCAA statt GGAA, s. 5.1.11) in Spuren 10 und 11 sowie ein als Kompetitor eingesetztes Oligonukleotid einer AP-1-Bindungsstelle in Spuren 14 und 15 beeinträchtigten die NF-AT-Bindung dagegen kaum.

Der Beweis, dass NF-AT in den Protein/DNA-Komplexen enthalten ist, sollte durch die Zugabe von 0,5 µg bzw. 5 µg eines spezifischen Antikörpers zum Reaktionsansatz erbracht werden. In Spuren 17 und 18 in Abb. 2.2 zeigt sich eine anteilige Verschiebung des NF-AT-Komplexes im Sinne eines sog. "supershifts". Dass nicht der ganze Komplex durch den Antikörper bewegt werden kann, könnte daran liegen, dass *verschiedene* NF-AT-Faktoren an die Sequenz binden und der Antikörper nur den Teil "shiftet", gegen den er gerichtet ist.

## 2.2 NF-AT aktiviert den proximalen *lck*-Promotor

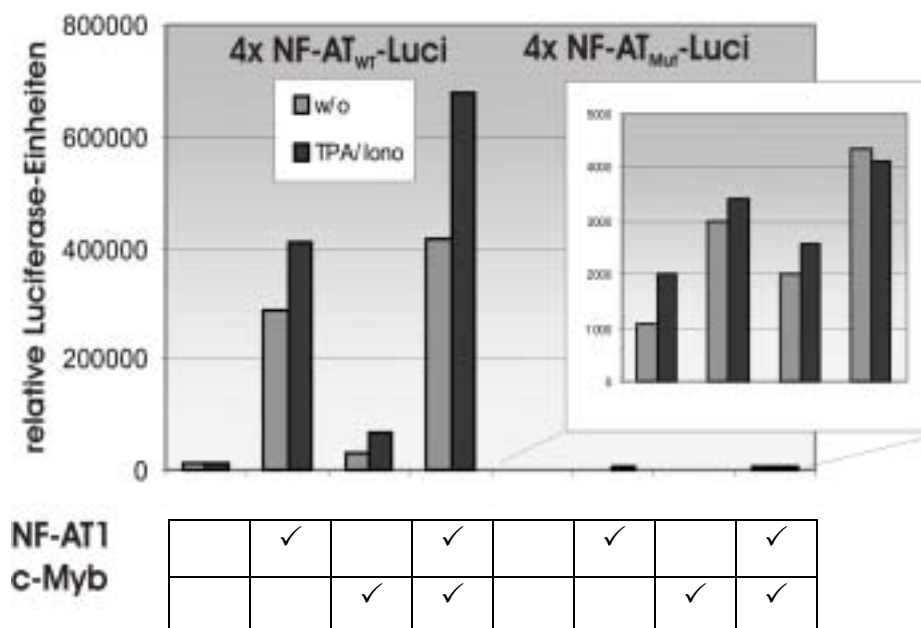
### 2.2.1 Nachweis durch Multimere der NF-AT<sub>lck</sub>-Bindestellen

Nachdem die spezifische Bindung von NF-AT an die identifizierten Bindungsstellen nachgewiesen war, stellte sich die Frage, ob und wie NF-ATs die Aktivität des proximalen *lck*-Promotors in Zellen verändern.

Ein künstliches Modell für die Untersuchung der möglichen NF-AT-Transaktivierung bot die Klonierung von mehreren, aneinander gereihten NF-AT-I<sub>lck</sub>-Oligonukleotiden (Multimeren) in einen Luciferasevektor (TATA-luci). Dieser Vektor enthält selbst einen kurzen 'core'-Promotor, der in transfizierten Zellen zu einer minimalen Luciferaseaktivität führt (s. 5.2.8.5). Wird jedoch eine Transkriptionseinheit in den Vektor kloniert, die als Verstärker ("enhancer") wirksam ist, kommt es zu einem deutlichen Anstieg der detektierbaren Luciferaseaktivität [87]. Es wurden Luciferasevektoren mit 4 Kopien des

NF-AT-I-Motivs (4x NF-AT<sub>WT</sub>-Luci) bzw. 4 Kopien der mutierten NF-AT-I-Sequenz (CC statt GG in der Hauptbindungsstelle; 4x NF-AT<sub>Mut</sub>-Luci) hergestellt, durch Restriktionsverdau (s. 5.2.5.1) und Sequenzierung (s. 5.2.6) kontrolliert und in Transfektionsexperimenten eingesetzt.

MCCRACKEN et al. beschrieben bereits die Transaktivierung des humanen *lck*-Typ-I-Promotors durch den Transkriptionsfaktor c-Myb [102]. In unseren Experimenten wurde die Aktivierung der Vektorkonstrukte nach Cotransfektion von Expressionsvektoren für c-Myb und/oder NF-AT1 untersucht. Abbildung 2.3 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes in Jurkat-T-Zellen. Die für den Vektor mit der *mutierten* Sequenz erhaltene Luciferaseaktivität (Spalte 5 - 8) ist um ein Vielfaches geringer als die Aktivität des 4x NF-AT<sub>WT</sub>-Luci-Vektors (Spalte 1 - 4). Bei Cotransfektionen kommt es zu einer deutlichen Transaktivierung des Wildtyp-Vektors durch NF-AT1 (Spalte 2 in Abb. 2.3). Der Einfluss von c-Myb auf diesen Vektor ist gering (Spalte 3 in Abb. 2.3).



**Abbildung 2.3: Transfektionsexperiment mit NF-AT-*lck*-Multimeren.** Vier Oligonukleotide (Multimere) der NF-AT-I-Sequenz (Wildtyp WT) bzw. der mutierten NF-AT-I-Sequenz (CC statt GG in der NF-AT-Kernsequenz) wurden in einen Vektor kloniert, der einen Minimal-Promotor und als Reportergen das Luciferasegen enthält. Die Reportervektoren wurden alleine oder zusammen mit Expressionsvektoren für NF-AT1 und/oder c-Myb in Jurkat-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nicht (w/o) oder mit TPA und Ionomycin induziert (TPA/Iono). Es zeigt sich eine gemeinsame Transaktivierung des Wildtyp-Vektors durch NF-AT1/c-Myb (Spalte 4).

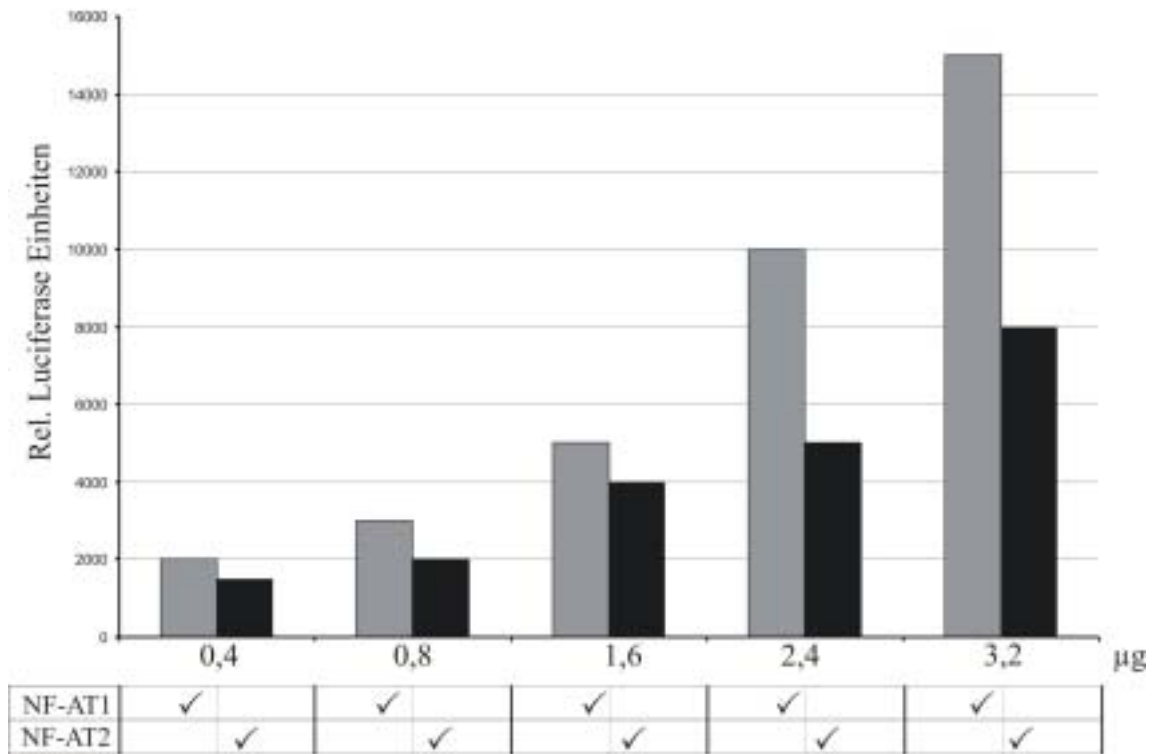
Es zeigte sich jedoch bei der gemeinsamen Transfektion *beider* Faktoren eine Aktivitätszunahme, die deutlich über die einfache Addition der Einzelwerte der c-Myb- und NF-AT1-Aktivierung hinausgeht (Spalte 4 in Abb. 2.3), was für eine *Kooperation* dieser Transkriptionsfaktoren spricht. In deutlich geringerem Ausmaß zeigt sich die beschriebene Transaktivierung ebenfalls bei der mutierten Variante, allerdings *ohne* den Effekt der Kooperation (kleines Diagramm in Abb. 2.3).

### 2.2.2 Synergismus zwischen NF-AT-Faktoren und Ets-1 bzw. c-Myb

In weiteren Transfektionen wurde das Vektorkonstrukt *GL3-lck*, das 740 Basenpaare der proximalen *lck*-Promotorsequenz umspannt, eingesetzt (s. 5.1.13.1). Da der Basisvektor (*GL3-basic*) keinen *eigenen* Promotor besitzt, steht die Transkription des Luciferase-Reportergens unter Kontrolle der *klonierten* Promotorsequenz (*lck*). Die Cotransfektion von Transkriptionsfaktoren, die an den Promotor binden, führt dann über die Transaktivierung dieses Promotors zu einem Anstieg der messbaren Luciferaseaktivität. Neben verschiedenen Expressionsvektoren für die Mitglieder der NF-AT-Familie (NF-AT1, 2 und 4) wurden in mehreren Assays zusätzlich c-Myb sowie der Transkriptionsfaktor Ets-1 (s. hierzu auch 3.1) cotransfiziert.

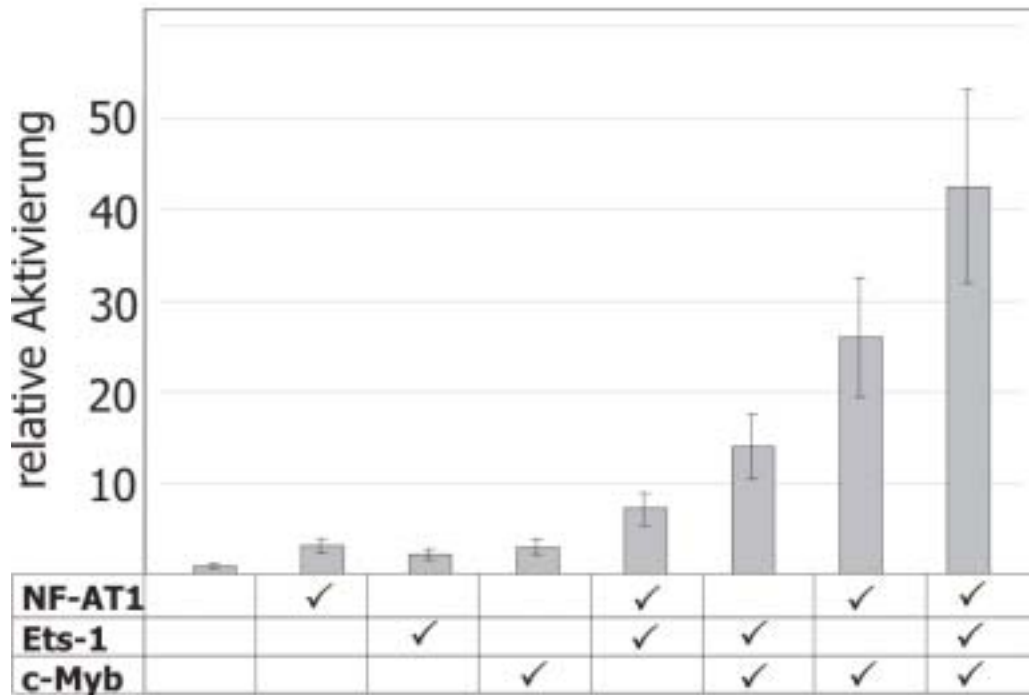
MCCRACKEN et al. identifizierten im proximalen *lck*-Promotor der Maus ein positiv regulierendes Element. Die Bindung von Ets-1 an dieses Element führte zu einer Aktivierung des Promotors [101]. In weiterführenden Experimenten wurde festgestellt, dass Ets-1 und c-Myb den Typ-I-Promotor des *lck*-Gens synergistisch aktivieren [102]. In unseren Transfektionsexperimenten, in Jurkat-T-Zellen und HEK-293-Zellen (s. 5.1.9), wurden die Transkriptionsfaktoren sowohl einzeln als auch kombiniert eingesetzt, um eine Kooperation bei der Aktivierung des *lck*-Promotors zu erkennen.

Zuerst wurde die Aktivierung des Vektorkonstrukts *GL3-lck* durch NF-ATs untersucht (s. Abb. 2.4). Die Transfektion des Vektors *GL3-lck* in Jurkat-Zellen, zusammen mit zunehmenden Konzentrationen von NF-AT1 (0,4 µg bis 3,2 µg; graue Säulen in Abb. 2.4) bzw. NF-AT2 (0,4 µg bis 3,2 µg; schwarze Säulen in Abb. 2.4), führte zu einer Steigerung der Luciferaseexpression über den proximalen *lck*-Promotor. Die Aktivierung durch NF-AT2 war zwar, wie durch NF-AT1 titrierbar, fiel aber insgesamt geringer aus.



**Abbildung 2.4: Transfektion des GL3-*lck*-Vektors in Jurkat-T-Zellen.** Steigende Konzentrationen von NF-AT1- (graue Säulen) und NF-AT2-Expressionsvektoren (schwarze Säulen) wurden zusammen mit dem GL3-*lck*-Luciferase-Reportervektor in Jurkat-Zellen transfiziert. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung, die bei NF-AT1 stärker ausfällt als bei NF-AT2.

Cotransfektionen, wie sie in Abb. 2.5 dargestellt sind, wurden mit suboptimalen Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren durchgeführt, so dass in den Ansätzen mit nur *einem* Aktivator die messbare Luciferaseaktivität kaum über die basale Aktivität des Ausgangsvektors ansteigt. Die *gemeinsame* Transfektion von Ets-1 und c-Myb führte, wie erwartet, zu einem mehr als zehnfachen Aktivitätsanstieg, während es bei der Kombination von Ets-1 mit NF-AT1 lediglich zu einer Addition der Einzelaktivierungen kam. Wie schon bei der Untersuchung der NF-AT-Multimere (s. 2.3.1) zeigte sich auch in diesen Experimenten eine synergistische Aktivierung durch NF-AT1 und c-Myb. Die Cotransfektion dieser beiden Faktoren bewirkte eine über zwanzigfache Zunahme der Luciferaseexpression (Spalte 7 in Abb. 2.5). Eine noch höhere Aktivitätssteigerung konnte durch die gemeinsame Transfektion aller *drei* Faktoren (NF-AT1 + c-Myb + Ets-1) erzielt werden (Spalte 8 in Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5: NF-AT1 und c-Myb erhöhen die Aktivität des proximalen *lck*-Promotors in synergistischer Weise.** HEK-293-Zellen wurden mit dem GL3-*lck*-Vektor und mit suboptimalen Konzentrationen der Expressionsvektoren für NF-AT1, Ets-1 bzw. c-Myb transfiziert, wie in der Tabelle angezeigt. Die Zellen wurden jeweils mit Phorbol ester und Ionomycin induziert. Es zeigt sich eine synergistische Aktivierung durch NF-AT1 und c-Myb (Spalte 7) und bei Cotransfektion aller drei Transkriptionsfaktoren (Spalte 8). Die Fehlerbalken resultieren aus 5 Wiederholungen des selben Experimentes.

### 2.3 Nachbarschaftliche Bindung von NF-AT und c-Myb

Um die Interaktion zwischen c-Myb und NF-AT bei der Regulation des *lck*-Typ-I-Promotors zu verstehen, untersuchten wir zunächst die Möglichkeit, dass beide Faktoren gemeinsam an die DNA binden. Bei der Analyse der Promotorsequenz fiel auf, dass sich unweit des NF-AT-*I<sub>lck</sub>*-Kernmotivs für die NF-AT-Bindung (TTTCC) eine potentielle c-Myb-Bindungsstelle (AAC) befindet. In einem Experiment sollten nun die Bindungseigenschaften an die unmutierte "Wildtyp"-Sequenz mit denen an eine in der c-Myb- (NF-AT-*I<sub>M12m</sub>*) bzw. in der NF-AT-Bindungsstelle (NF-AT-*I<sub>Nm</sub>*) mutierten Sequenz verglichen werden.

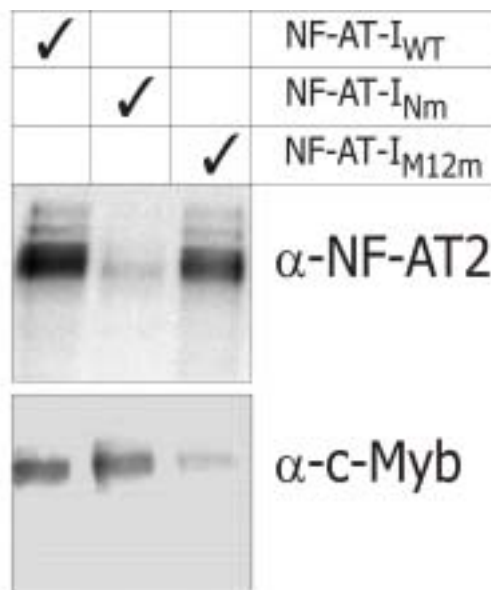
Die in Abb. 2.6 B dargestellten biotinierten Oligonukleotide wurden in einem sog. "Pull down"-Experiment eingesetzt (s. 5.2.11.4). Nach Inkubation mit Kernextrakt von Jurkat-T-Zellen können die Oligonukleotide durch die Biotinmarkierung isoliert und die daran gebundenen Proteine eluiert werden. In Abb. 2.6 A ist das Ergebnis eines "Wes-



tern-Blots" (s. 5.2.12) der so erhaltenen Proteine dargestellt. Sind die beiden Bindungsstellen für NF-AT und c-Myb intakt (NF-AT-I<sub>WT</sub>), so können *beide* Faktoren mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden (Spalte 1 in Abb. 2.6 A). Nach Mutation des NF-AT-Motivs fehlt die NF-AT-Bande, während c-Myb nach wie vor nachweisbar ist (Spalte 2 in Abb. 2.6 A). Umgekehrt bleibt die NF-AT-Bindung auch nach Mutation der c-Myb-Bindungsstelle erhalten, während die c-Myb-Bindung nicht mehr nachweisbar ist (Spalte 3 in Abb. 2.6 A).

Es wurde gezeigt, dass NF-AT und c-Myb nachbarschaftlich und vor allem unabhängig voneinander an die Sequenz des proximalen *lck*-Promotors binden (s. NF-AT-I<sub>WT</sub> in 2.6 B). Letztere Schlussfolgerung lässt sich aus den Präzipitationen mit den mutierten Oligonukleotiden ziehen: trotz Zerstörung beider c-Myb-Bindeorte bindet NF-AT2 noch an den *lck*-Promotor und Unterdrückung der NF-AT-Bindung führt zu keiner wirklichen Abnahme der c-Myb-Bindung.

A)



**Abbildung 2.6: A) NF-AT und c-Myb binden nachbarschaftlich aber unabhängig voneinander an den proximalen *lck*-Promotor.** Am 5'-Ende biotinierte Oligonukleotide der NF-AT-I-Bindungsstelle (unterstrichen in B) mit zwei c-Myb-Motiven (Fettdruck in B), jeweils Wildtyp oder mutiert, wurden an Streptavidin-Perlen gekoppelt und mit Kernextrakt von TPA/Ionomycin induzierten Jurkat-T-Zellen inkubiert. Die an die DNA gebundenen Proteine wurden eluiert und ein "Western-Blot" mit den angezeigten Antikörpern (gegen NF-AT2 bzw. c-Myb) durchgeführt. NF-AT und c-Myb binden spezifisch an das Oligonukleotid der NF-AT-I<sub>WT</sub>-Sequenz (Spur 1). Die Mutation der Myb-Motive verhindert die Bindung von NF-AT nicht (Spur 3), umgekehrt kann Myb auch nach Mutation des NF-AT-Motivs noch an den proximalen *lck*-Promotor binden (Spur 2).

**B)** NF-AT-I<sub>WT</sub> (Wildtyp):

AGCTTGACAAAAAGTTTCCACAGCTAAACCAGGCA  
                                   c-Myb1 NF-AT                                  c-Myb2

NF-AT-I<sub>Nm</sub> (NF-AT-Motiv mutiert):

AGCTTGACAAAAAGTTTGGACAGCTAAACCAGGCA  
                                   c-Myb1 NF-ATmut                                  c-Myb2

NF-AT-I<sub>M12m</sub> (beide c-Myb-Motive mutiert):

AGCTTGACAAAAATTTTCCACAGCTACACCAGGCA  
                                   c-Myb1mut NF-AT                                  c-Myb2mut

**Abbildung 2.6: B) Biotinilierte Oligonukleotide der Wildtyp-Sequenz NF-AT-I<sub>WT</sub> und mit Mutationen der NF-AT- bzw. der Myb-Bindestellen.**

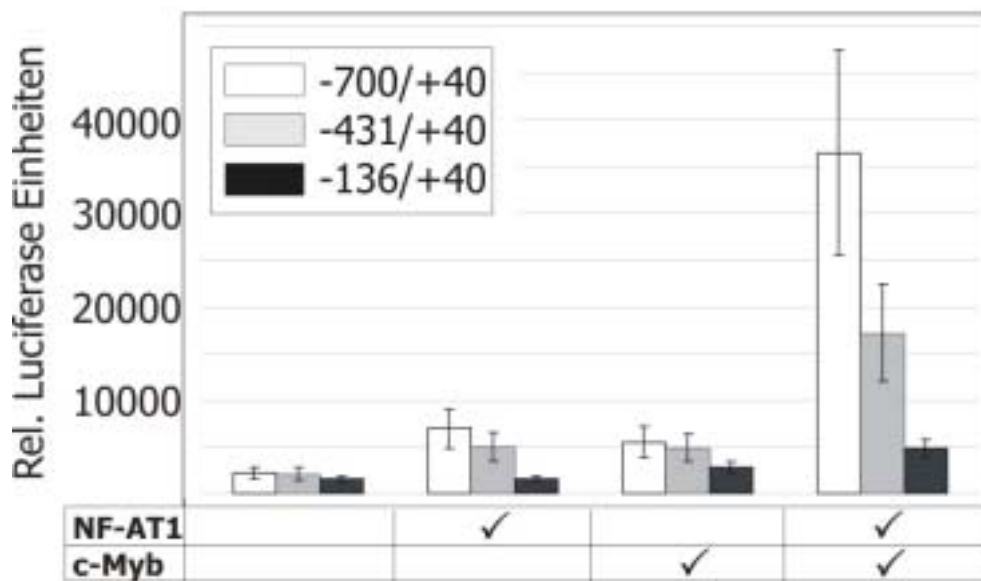
## 2.4 Analyse des proximalen *lck*-Promotors durch Deletionsmutanten

Die Bedeutung der NF-AT-I<sub>lck</sub>-Bindestelle für die Aktivierung des proximalen *lck*-Promotors wurde mittels Deletionsmutanten untersucht. Ausgehend von dem Vektor GL3-*lck* (–700 bis +40 der proximalen *lck*-Promotorsequenz) entstand durch Deletion (s. 5.2.5.1) das Vektorkonstrukt GL3-*lck* (–431/+40), das nur den NF-AT-II<sub>lck</sub>-Bindeort und die Ets-1- und c-Myb-Bindungsstellen enthält. In dem noch kürzeren Vektor GL3-*lck* (–136/+40) wurde zusätzlich NF-AT-II<sub>lck</sub> deletiert, so dass keines der von uns beschriebenen NF-AT-Motive mehr vorhanden ist. Das Ets-bindende Element (–118 bis –113) und die kritische c-Myb-Stelle (bei der Maus –76 bis –71) blieben erhalten.

Das Ergebnis eines "Luciferase-Assays" nach Transfektion dieser zwei Vektorkonstrukte in Jurkat-T-Zellen im Vergleich zu dem Ausgangsvektor GL3-*lck* (–700/+40) zeigt Abb. 2.7. Die Cotransfektion von NF-AT1 führte zu einer Transaktivierung, die in der ersten Deletionsmutante GL3-*lck* (–431/+40) bereits geringer ausfällt, im Vergleich zum Ausgangsvektors. Die Deletion beider NF-AT-Bindungsstellen verhindert eine Aktivierung (Spalte 2 in Abb. 2.7).

Bei der alleinigen Cotransfektion von c-Myb (Spalte 3 in Abb. 2.7) zeigte sich dagegen auch für die *kürzeste* Deletionsmutante- da die c-Myb-Bindungsstelle erhalten blieb - ein Anstieg der Luciferaseaktivität.

Interessant ist vor allem das Ergebnis der Cotransfektion von NF-AT1 *und* c-Myb (Spalte 4 in Abb. 2.7): Der Wildtyp-Vektor zeigte eine deutliche Aktivierung durch das Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren. Bei der längeren Deletionsmutante ist die Luciferaseaktivität zwar um die Hälfte reduziert, geht aber über die einfache Addition der Werte bei *alleiniger* Transfektion eines Faktors hinaus. Möglicherweise ist dies durch die gemeinsame Bindung an die noch erhaltene NF-AT-II<sub>lck</sub>-Stelle erklärbar. Nach der Deletion auch dieses Bereiches findet man bei dem Vektor GL3-*lck* (-136/+40) keine synergistische Aktivitätssteigerung durch Cotransfektionen mit c-Myb und NF-AT1. Mit Hilfe dieses Ergebnisses ließ sich die Region, die für die *kooperative* Transaktivierung des proximalen *lck*-Promotors durch NF-AT und c-Myb nötig ist, auf den Sequenzbereich -700 bis -136 eingrenzen.



**Abbildung 2.7: Die synergistische Aktivierung des proximalen *lck*-Promotors durch NF-AT und c-Myb erfolgt im Bereich (-700/-136).** Auf der Basis des Ausgangsvektors GL3-*lck* (-700/+40) wurden Deletionsmutanten hergestellt. GL3-*lck* (-431/+40) enthält NF-AT-II und die c-Myb- und Ets-Bindungsstellen. Im Konstrukt GL3-*lck* (-136/+40) fehlen NF-AT-Bindungsstellen. Cotransfektionen erfolgten mit Vektoren für NF-AT1 und c-Myb. Die *synergistische* Aktivierung durch NF-AT1 und c-Myb zeigte sich beim Vektor GL3-*lck* (-700/+40) und in geringerem Ausmaß auch bei der Mutante GL3-*lck* (-431/+40), nicht aber bei der Deletionsmutante GL3-*lck* (-136/+40). Die Fehlerbalken resultieren aus 3 Wiederholungen des Experimentes.

## 2.5 NF-AT1 / c-Myb binden an den proximalen *lck*-Promotor *in vivo*

### 2.5.1 Nachweis der Bindung durch Chromatin-Immunpräzipitation

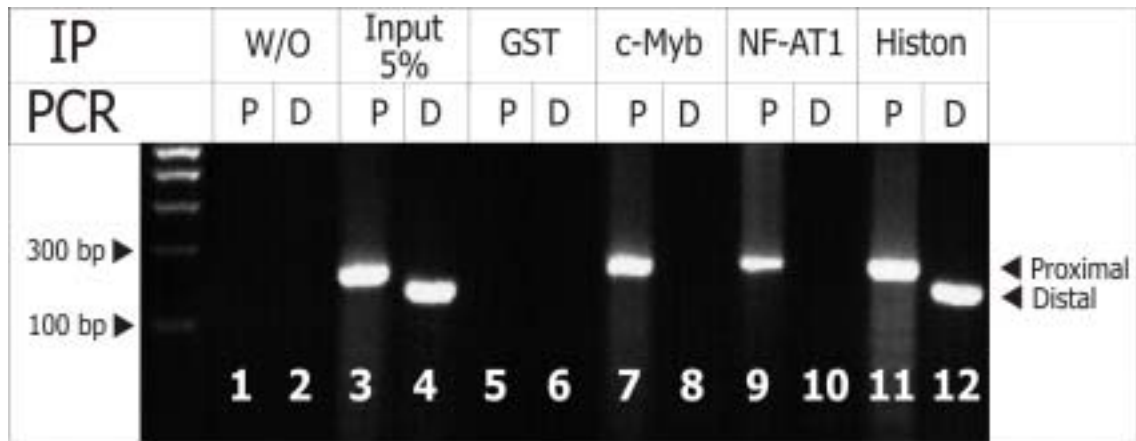
Die bisherigen Experimente beschränkten sich auf den Nachweis der Bindung und der Aktivierung des proximalen *lck*-Promotors *in vitro*. Dass NF-ATs im Thymus tatsächlich an den Promotor binden und eine Aktivierung *in vivo* möglich ist, sollte durch Chromatin-Immunpräzipitationen (CHIP) gezeigt werden (s. 5.2.11.3).

Im ersten Schritt wurden Thymozyten aus Mäusethymi isoliert und mit Formaldehyd fixiert, wodurch es im Zellkern zu einer Verbindung ("crosslink") von Chromatin und DNA-gebundenen Proteinen kommt. Nach Fragmentierung der DNA wurde die aufgereinigte, proteinbesetzte Chromatinfraction mit spezifischen Antikörpern für die gesuchten Transkriptionsfaktoren NF-AT1 und c-Myb präzipitiert. Nach Abtrennung der Proteine wurden mit dieser NF-AT1 bzw. c-Myb bindenden DNA PCR-Reaktionen mit Primern durchgeführt, die spezifisch den proximalen bzw. distalen *lck*-Promotor erkennen. Eine detektierbare PCR-Bande entstand demnach nur, wenn das durch den Antikörper präzipitierte Protein *in vivo* an den jeweiligen Promotor gebunden war.

Zur Positivkontrolle wurde in einem Ansatz ein Antikörper mitgeführt, der gegen ein sicher an die DNA gebundenes Protein gerichtet ist (Antikörper gegen acetylierte Histone). Als Negativkontrolle dienten Antikörper gegen GST-Protein, das nicht an DNA bindet.

Abb. 2.8 zeigt CHIP-PCR-Ergebnisse. Ohne Antikörper (Spuren 1 und 2) sowie mit einem GST-Antikörper (Spuren 5 und 6) können weder der proximale noch der distale Promotor des *lck*-Gens nachgewiesen werden. Eine Präzipitation mit Histon-Antikörpern führte zum Nachweis der spezifischen Bande *beider* Promotoren (Spuren 11 und 12). Diese sind vergleichbar mit denen der PCR der verdünnten "Input"-DNA, die vor dem Präzipitationsschritt asserviert wurde und demnach DNA-Fragmente *beider lck*-Promotoren enthält (Spuren 3 und 4). Nach der Präzipitation mit einem c-Myb Antikörper (Spuren 7 und 8) bzw. einem NF-AT1-Antikörper (Spuren 9 und 10) lässt sich nur die Bande des *proximalen lck*-Promotors nachweisen.

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sowohl c-Myb als auch NF-AT1 *in vivo* an den *proximalen*, nicht aber an den distalen Promotor der lymphozytenspezifischen Kinase *lck* binden.



**Abbildung 2.8: NF-AT und c-Myb binden den proximalen *lck*-Promotor *in vivo*.** Frisch isolierte murine Thymozyten wurden mit Formaldehyd behandelt, um die DNA-gebundenen Proteine und das Chromatin zu vernetzen ("crosslink"). Die gebundenen Protein/DNA-Komplexe präzipitierten wir mit den oben angezeigten Antikörpern (Immunpräzipitation "IP"). Die präzipitierten DNA-Fractionen wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die verwendeten Primer erkennen spezifisch den proximalen ("P", PCR-Produkt von 266 bp Länge) bzw. den distalen *lck*-Promotor ("D", PCR-Produkt von 168 bp Länge). Ohne Protein (1, 2) bzw. mit Antikörpern gegen GST (5, 6), die nicht an die DNA bindet, entsteht keine Bande. In der Input-DNA sind beide Promotoren nachweisbar (3, 4), durch Histon-Antikörper können beide Promotoren präzipitiert werden (11, 12). c-Myb (7, 8) und NF-AT1-Antikörper (9, 10) präzipitieren jeweils nur Chromatin des *proximalen lck*-Promotors. Auf der linken Seite wurde ein Größenmarker aufgetragen.

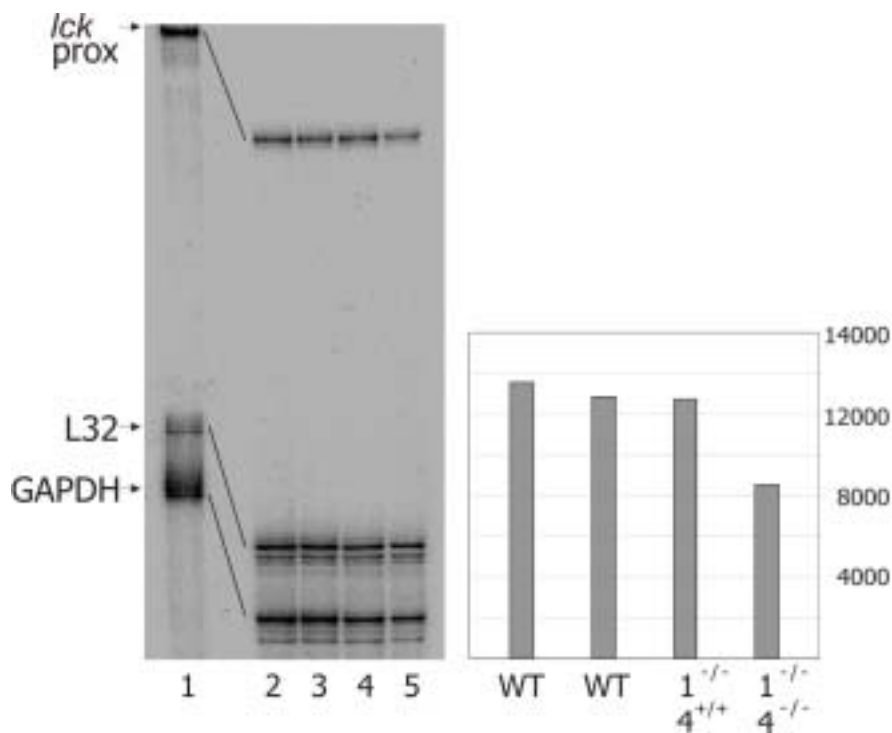
### 2.5.2 Einfluss von NF-AT auf den proximalen *lck*-Promotor *in vivo*

Um herauszufinden, welche biologische Relevanz die Bindung von NF-AT-Faktoren an den *lck*-Typ-I-Promotor hat, wurden *lck*-Transkripte in NF-AT-defizienten Mäusen untersucht. Unter den Nachkommen von NF-AT1-negativen (-/-) und NF-AT4-heterozygoten Mäusen (+/-) wurden Tiere mit alleiniger Defizienz für NF-AT1 (NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>+/+</sup>) und die Träger des "Doppel-knock-outs" (NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>) selektiert.

Für die Untersuchung der *lck*-Transkripte im sog. "RNA-Protection-Assay" (s. 5.2.13.2) wurde eine radioaktiv markierte, sequenzspezifische RNA-Sonde (s. 5.2.13.2) für das Typ-I-Transkript des proximalen *lck*-Promotors eingesetzt. Die einzelsträngige Sonde lagert sich mit dem komplementären Transkript zu einem Doppelstrang zusammen und schützt es dadurch vor einem nachfolgenden Abbau durch Ribonuklease.

In Abb. 2.9 ist das Ergebnis eines Experimentes dargestellt, in dem die Menge der Transkripte des proximalen *lck*-Promotors in Thymozyten von zwei normalen "Wildtyp"-Mäusen (WT) mit der in Thymozyten von einer NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>+/+</sup>- und einer NF-

AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Maus verglichen wird. Zur quantitativen Analyse wurden in den Hybridisierungen neben der *lck*-Sonde Einzelstrangsonden eingesetzt, die konstitutiv aktive Gene, sog. "housekeeping genes" (GADPH bzw. L32), detektieren. Mit Hilfe dieser Standards wurden bei der Quantifizierung der radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imager (s. 5.1.2) die Werte der *lck*-Typ-I-Transkripte normalisiert und in der Balkengraphik dargestellt. Die beiden Wildtyp-Mäuse sowie die Maus mit alleiniger NF-AT1-Defizienz weisen kaum Unterschiede in der Konzentration der *lck*-Typ-I-Transkripte auf (gleich starke Banden "lck prox." der Spuren 2 - 4 bzw. gleich hohe Balken WT und 1<sup>-/-</sup>4<sup>+/+</sup> in der Graphik in Abb. 2.9). Die doppelt-defiziente NF-AT 1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Maus zeigte dagegen eine Reduktion der vom proximalen *lck*-Promotor transkribierten RNA um 30% (schwächere "lck prox."-Bande in Spur 5 bzw. niedrigerer Balken 1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup> in der Graphik in Abb. 2.9).



**Abbildung 2.9: Reduktion der Transkripte des proximalen *lck*-Promotors in NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Aus den Thymi von Mäusen mit alleiniger Defizienz für NF-AT1 (NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>+/+</sup>) und von doppelt-defizienten Tieren (NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>) wurde RNA isoliert und mit einer *lck*-Typ-I-Promotor-spezifischen radioaktiven Sonde inkubiert. Als Standards wurden Sonden eingesetzt, die konstitutiv aktive Gene detektieren (L32, GAPDH). Die Balkengraphik zeigt die Quantifizierung der *lck*-Transkripte mittels Phosphor-Imager in Relation zu den Werten der "housekeeping genes" L32 und GAPDH bei zwei "Wildtyp"-Mäusen (WT), einer NF-AT1-defizienten Maus (1<sup>-/-</sup>4<sup>+/+</sup>) und einer NF-AT1- und NF-AT4-defizienten Maus (1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>). Nur bei letzterer zeigt sich eine Reduktion der *lck*-Typ-I-Transkripte um 30%.

Dass der Verlust von NF-AT1 und NF-AT4 einen derartigen Einfluss auf die Menge der *lck*-Typ-I-Transkripte hat, bestätigt die Rolle von NF-AT als wichtigen Transkriptionsfaktor für den proximalen Promotor des *lck*-Genes *in vivo*. Möglicherweise kann demnach, wie bei der Il-2-Sekretion beschrieben (s. 1.4.1.3), der Mangel an NF-AT1 durch NF-AT4 kompensiert werden.

### 3 Diskussion

Die Proteintyrosinkinase *lck* wird bereits in der frühen Embryogenese während der T-Zell-Differenzierung exprimiert [92]. Zunächst erfolgt die Transkription über den proximalen der beiden *lck*-Promotoren, bis schließlich in den reifen, peripheren T-Zellen fast ausschließlich der distale Promotor aktiv ist [134].

Dass die Genexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung durch *verschiedene* Promotoren reguliert wird, wurde schon für das  $\alpha$ -Amylase-Gen der Maus [117] und das Adh-Gen von *Drosophila melanogaster* [26] beschrieben. Wie beim *lck*-Gen unterscheiden sich die über die beiden Promotoren entstehenden Transkripte auch dort nur in der am 5'-Ende liegenden nicht-translatierten Region. Außerdem ist jeweils der proximale Promotor in *frühen* Entwicklungsstadien aktiv, während die Transkription über den distalen Promotor erst *später* induziert wird [101]. Für das Adh-Gen von *Drosophila melanogaster* wurde ein stadienspezifischer "enhancer" identifiziert, der den Promotorwechsel einleitet, indem er den proximalen Promotor unzugänglich macht [117].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die beiden *lck*-Promotoren Unterschiede in der transkriptionellen Regulation aufweisen, die für die stadienspezifische Aktivität des Promotors von Bedeutung sein könnten. Die "Nuclear Factors of Activated T-cells" (NF-ATs) wurden als neue Aktivatoren des *proximalen* Promotors identifiziert. In Chromatin-Immunopräzipitationen (CHIP) konnte gezeigt werden, dass NF-AT1 an die *proximale*, nicht aber an die *distale* Promotor-Sequenz bindet (siehe 2.5.1). In NF-AT1-NF-AT4-defizienten Mäusen zeigte sich eine deutliche Reduktion der *lck*-Typ-I-Transkripte (s. 2.5.2). NF-ATs spielen demnach für die Aktivität des *lck*-Gens zum Zeitpunkt der Thymozytenreifung eine wichtige Rolle.

#### 3.1 Die transkriptionelle Regulation des proximalen *lck*-Promotors

Die Reifung der Thymozyten findet in einem besonderen Milieu statt, das durch die Interaktion der unreifen T-Lymphozyten mit den Stromazellen des Thymus aufrecht erhalten wird. Intrathymische Signale aktivieren induzierbare Transkriptionsfaktoren,



die für eine stadiengerechte Genexpression sorgen [112]. Zu dieser Zeit findet die Expression des *lck*-Gens "über" den *proximalen* Promotor statt. Im Gegensatz zu den meisten anderen Promotoren enthält die vor dem Startcodon liegende regulatorische Sequenz des proximalen *lck*-Promotors im Bereich –30 bis –60 (gezählt in Basenpaaren vom Transkriptionsstart aus) weder eine sog. "TATA-Box" noch eine CAAT-Sequenz oder GC-reiche Abschnitte, die eine effiziente Transkription steuern könnten [3, 113].

Es sind jedoch verschiedene Regulatoren des proximalen *lck*-Promotors bekannt, die an spezifische Bereiche der am 5'-Ende liegenden Sequenz binden. Durch transgene Tiere mit verkürzten Typ-I-Promotoren wurde festgestellt, dass 584 Basen der 5'-Sequenz ausreichen, um eine stadiengerechte Expression von Reportergenen über den proximalen *lck*-Promotor zu erzielen [4]. Im Bereich zwischen –365 und –328 wurde die Bindung eines Kernproteins beschrieben, das als "B-Faktor" bezeichnet wurde [4]. YAMADA et al. konnten zeigen, dass das Zink-Finger Protein mt $\beta$  ein Bestandteil dieses "B-Faktors" ist [139]. Dieses Protein bindet an GC- oder GT-reiche DNA-Abschnitte und wurde erstmalig durch seine Bindung an den CD3 $\delta$ -"enhancer" isoliert [139].

Von MCCRACKEN et al. wurde die Sequenz zwischen Pos. –118 und –113 als Bindungsstelle für Ets-Transkriptionsfaktoren identifiziert (Ets-bindendes Element, EBE) [64]. Charakteristisch für die Ets-Familie\* ist eine homologe Region von 85 Aminosäuren, die die DNA-Bindung an das purinreiche Kernmotiv GGAA(T) vermittelt [25]. Ets-1 wird nur in lymphoiden Zellen exprimiert [20] und bindet spezifisch an das EBE des proximalen *lck*-Promotors *in vitro* [64]. Auch für andere T-Zell-spezifische Gene, wie z. B. im "enhancer" für die  $\alpha$ -Kette des T-Zell-Rezeptors [45], sind EBEs bekannt, die von Ets-1 gebunden werden. Dass die von MCCRACKEN beschriebene Ets-Sequenz für die Aktivierung des proximalen *lck*-Promotors nötig ist, wurde durch die Einführung von Mutationen im Ets-Motiv bewiesen, die zu einem vollständigen Verlust der Promotoraktivität führten [64].

Ein charakteristisches Merkmal von Ets-Proteinen ist, dass sie häufig mit anderen Faktoren interagieren und *gemeinsam* die Expression von Genen induzieren [87]. So konnte für den Ets-Faktor Elf-1 eine Beteiligung an dem NF-AT/AP-1-Komplex nachgewiesen werden, der das Il-2-Gen aktiviert [124].

---

\* z. B. Ets-1, Ets-2, GABP $\alpha$ , Elf-1, Fli-1

Für den humanen *lck*-Promotor wurde neben dem Ets-bindenden Element (hier in Position –97 bis –90) eine spezifische Bindungsstelle für c-Myb, die zwischen den Pos. –59 und –54 gelegen ist, beschrieben [77]. Es konnte gezeigt werden, dass c-Myb in transienten Transfektionen – alleine und zusammen mit Ets-1 – den proximalen *lck*-Promotor aktiviert, und dass die Mutation des c-Myb-Motivs die transkriptionelle Aktivierung verhindert.

Die von MCCracken et al. beschriebene c-Myb-Bindungsstelle liegt in einem von zwei Sequenzbereichen, in denen die Basenfolge zwischen Maus und Mensch über etwa 40 Basenpaare konserviert ist. Auf diese Weise wurde analog zu dem c-Myb-Motiv im humanen Typ-I-Promotor (–59 bis –54) die c-Myb-Sequenz des murinen proximalen *lck*-Promotors in Pos. –76 bis –71 identifiziert. In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chromatin-Immunopräzipitation konnte zudem gezeigt werden, dass c-Myb *in vivo* an den murinen *lck*-Typ-I-Promotor bindet (s. 2.5.1.).

c-Myb wird regulär vor allem in *unreifen* hämatopoetischen Zellen exprimiert, also zur gleichen Zeit, in der die Expression des *lck*-Gens über den *proximalen* Promotor stattfindet. Eine Veränderung der Proteinstruktur von c-Myb, z. B. die Deletion einer regulatorischen Domäne am C-terminalen Ende, kann zu einer Transformation von Zellen führen.

Wegen dieses onkogenen Potentials wurde untersucht, ob c-Myb an der aberranten Expression von *lck*-Typ-I-Transkripten im Kolon-Karzinom und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom beteiligt ist [109, 127]. Es stellte sich heraus, dass die Transkription der *lck*-Typ-I-mRNA in lymphatischen Zellen und T-Zell-Leukämie-Zelllinien durch *andere* Transkriptionsfaktoren reguliert wird, als in den Kolon-Karzinom-Zelllinien SW 620 und Colo 201 [76]. In letzteren Zellen ist c-Myb nur in sehr geringer oder nicht detektierbarer Menge vorhanden. Anstelle der c-Myb-Bindungsmotivs wurde eine Bindungsstelle für die sog. "High Mobility Group"-Familie (HMG) identifiziert. HMG-Proteine aktivieren den proximalen *lck*-Promotor in den Kolon-Karzinomzellen über einen alternativen Aktivierungsweg zusammen mit Ets-1 [76].

Da NF-ATs, wie Ets-1 und c-Myb, in lymphatischen Zellen exprimiert werden und darüber hinaus zur Zeit der T-Zell-Reifung konstitutiv im Zellkern zu finden sind [112] wurde in der vorliegenden Arbeit die Beteiligung dieser Faktoren an der transkriptionellen Aktivierung des proximalen Promotors des *lck*-Gens untersucht. Durch

"Footprinting" und chemisches Sequenzieren wurden zwei NF-AT-Bindungsstellen um die Pos. -480/-476 (NF-AT-I<sub>lck</sub>) und -216/-212 (NF-AT-II<sub>lck</sub>) im murinen *lck*-Typ-I-Promotor identifiziert (s. 2.1.1). Der Einsatz der entsprechenden Sequenzmotive im EMSA führte mit Kernextrakten von Jurkat-T-Zellen bzw. frisch isolierten Thymozyten zur Ausbildung von NF-AT-spezifischen Komplexen (s. 2.1.2). Es zeigte sich, dass die Bindung an die weiter vom Transkriptionsstart entfernte NF-AT-I<sub>lck</sub>-site stärker ist als die an NF-AT-II<sub>lck</sub>. In Experimenten mit Proteinextrakten aus Kolon-Karzinomzellen konnte *keine* derartige NF-AT-Bindung nachgewiesen werden (ohne Abbildung), was dafür spricht, dass weder c-Myb (s. oben) noch NF-AT an der aberranten *lck*-Typ-I-Transkription in diesen Zellen beteiligt ist. NF-AT1 bindet jedoch - wie durch Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt wurde - wie c-Myb an die *lck*-Sequenz des proximalen Promotors *in vivo* (s. 2.5.1).

Die von uns identifizierten NF-AT-Motive in der Sequenz des proximalen *lck*-Promotors liegen nicht in einem der beschriebenen, zwischen Maus und Mensch konservierten DNA-Bereiche. Dennoch zeigt der Vergleich der humanen und der murinen Sequenz, dass auch der humane proximale *lck*-Promotor potentielle NF-AT-Bindungsstellen in Pos. -457/-453 (TTTCC) und in Pos. -175/-170 (GGAAA) enthält.

*lck*-Defizienz durch Gen-"knock-out" bzw. die Überexpression einer katalytisch inaktiven Mutante führt zu einer Atrophie des Thymus und einer stark reduzierten Zahl von T-Zellen [66, 80]. Die *verstärkte* Expression der *lck* geht dagegen mit einer verspäteten Entwicklung der Thymozyten und der Ausbildung von Tumoren einher [1]. Dadurch wird deutlich, dass eine strenge Regulation des *lck*-Gens nötig ist. Neben den beschriebenen transkriptionellen Regulationsmöglichkeiten spielen hierbei zusätzlich translationale und posttranslationale Mechanismen eine wichtige Rolle.

So zeigten sich bei der genauen Untersuchung der *lck*-Expression in "doppelt-negativen" Thymozyten nur geringfügige Veränderungen der Transkript-Konzentrationen im Laufe des Entwicklungsprozesses. Die Anzahl der Transkripte wurde zwischen zwei Entwicklungsstufen weniger als verdoppelt, was für eine relativ kontinuierliche Transkription spricht. Das *lck*-Protein war dagegen zunächst nicht nachweisbar, stieg dann deutlich an und nahm schließlich zwischen zwei Zellstadien (CD44<sup>+</sup>25<sup>+</sup> und CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) um das zwanzigfache zu. Hierfür werden translationale und posttranslationale Modifikationen verantwortlich gemacht [15].

### 3.2 Die Aktivierung von *lck* und NF-AT: ein "Autokriner Loop"

Die lymphozytenspezifische Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> bindet mit ihrer N-terminalen Domäne an die cytoplasmatischen Anteile der CD4- und CD8-Glykoproteine [103, 115, 128]. Durch diese Assoziation an die Corezeptoren des T-Zell-Rezeptor-Komplexes wird die *lck* aktiviert, und die Signalkaskade in das Zellinnere beginnt mit der Phosphorylierung von Tyrosinresten [54].

"Knock-out"-Mäuse, die für CD4 und CD8 defizient sind, zeigen eine normale Struktur des Thymus und haben keine verminderte Zahl von Thymozyten [95]. Dass *lck*<sup>-/-</sup>-Mäuse gravierende Thymozytenreifungsstörungen aufweisen [80], hängt also *nicht* mit dem Verlust des CD4/CD8-assoziierten Signalweges zusammen. Diese Oberflächenmarker werden ohnehin erst in späteren Reifungsstadien exprimiert (s. 1.2). Es müssen demnach *andere* Faktoren für die Aktivierung der Proteintyrosinkinase zur Zeit der frühen Thymusentwicklung verantwortlich sein.

Durch die Aktivierung der Proteintyrosinkinase *lck* werden im wesentlichen drei Hauptsignalwege "angestoßen" (s. 1.4.1.2 und Abb. 1.2). Im Rahmen des sogenannten calciumabhängigen Signalweges werden NF-AT-Proteine durch Dephosphorylierung aktiviert, wodurch ihre Translokation in den Kern ermöglicht wird [67].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Cotransfektion von NF-AT-Expressionsvektoren zu einer titrierbaren Transaktivierung des proximalen *lck*-Promotors führte (s. 2.2.2). NF-ATs sind somit umgekehrt in der Lage, die Proteintyrosinkinase *lck* zu aktivieren: NF-AT und *lck* bilden demnach einen "autokrinen loop". Darüber hinaus ist eine gegenseitige Aktivierung der Familie der NF-ATs und der Kinase *lck* auch durch die Bindung von NF-AT an den Il-2-Promotor möglich. Diese führt zu einer Induktion der Il-2-Produktion [98, 113]. Interleukin-2 kann seinerseits die *lck* unabhängig vom CD4- oder CD8-Rezeptor aktivieren [48], und das dadurch ausgelöste Ca<sup>2+</sup>-Signal kann wiederum die NF-AT-Aktivierung aufrechterhalten.

Trotzdem führt die gegenseitige Stimulation *nicht* zu einer dauerhaften Aktivität beider Proteine. Dies liegt daran, dass es multiple Faktoren gibt, die in die beschriebenen "Aktivierungsloops" eingreifen und eine Überstimulation verhindern. Der Transkriptionsfaktor Ets-1, der den proximalen *lck*-Promotors aktivieren kann [64], wird beispielsweise durch einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration herunterreguliert und hat außerdem einen hemmenden Einfluss auf die Il-2-Produktion [114].

Experimentell kann die Aktivierung der NF-ATs durch Cyclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK 506) verhindert werden, da sie Calcineurin inhibieren (s. Abb. 1.2) [92, 101]. Dennoch konnte in den von uns durchgeführten, transienten Transfektionen mit NF-AT1 und c-Myb *keine* eindeutige Hemmung der Zellaktivierung durch CsA erzielt werden (ohne Abbildung). Ein Grund dafür könnte sein, dass c-Myb von CsA in einer Calcineurin-unabhängigen Weise beeinflusst werden kann [7]: Das zelleigene Cyclophilin cyp40 bindet an c-Myb und behindert dadurch die Anlagerung an die DNA. Die Behandlung mit Cyclosporin A setzt c-Myb aus dieser hemmenden Bindung frei, indem es konkurrierend an cyp40 bindet [65]. Für die Aktivität des proximalen *lck*-Promotors bedeutet dies, dass sie durch die CsA-vermittelte NF-AT-Hemmung gesenkt, aber durch die CsA-abhängige c-Myb-Aktivierung gesteigert werden kann.

Eine Aktivierung der NF-AT-Transkriptionsfaktoren ist dagegen durch die Kombination eines Calcium-Ionophors (z. B. Ionomycin) und eines Phorbolster (z. B. TPA) möglich, durch die die frühen Ereignisse der T-Zell-Aktivierung simuliert werden [70]. In unseren Experimenten war eine deutliche *Aktivitätssteigerung* des *lck*-Promotorkonstrukts durch die Stimulation mit TPA/Ionomycin zu erzielen, während in anderen Arbeiten eine *Hemmung* der *lck* nach der Zellstimulation beschrieben wurde [73]. Dass die *lck* so unterschiedlich auf die Stimulation anspricht, könnte durch die Unterschiede in der Konzentration bzw. der Art der Stimuli oder der untersuchten Zellen bedingt sein [35]. LEUNG und MIYAMOTO konnten zeigen, dass die Stimulation von T-Zellen mit TPA zu einer *Reduktion* von Typ-I-Transkripten und zu einem Anstieg der Transkripte des *distalen* Promotors führt [63]. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die kontinuierliche Stimulation der Zelle eine Beschleunigung der natürlichen Reifung bedingt, die mit der Reduktion der Typ-I-Transkripte einhergeht.

### **3.3 Die NF-AT- $I_{lck}$ -Bindestelle ist "composite element" für NF-AT und c-Myb**

Bei der Erstbeschreibung der NF-ATs wurden zunächst *zwei* NF-AT-Komponenten unterschieden. Die *cytosolische* Komponente des NF-AT-Komplexes, die in den T-Zellen bereits vor der Stimulation des Rezeptors vorhanden ist, und eine *induzierbare* Komponente, die sich im Zellkern befindet (NF-ATn für nuclear) [51, 98]. Erst später

wurden die Jun/Fos-Proteine, Mitglieder der "Leucin-Zipper"-Familie DNA-bindender Proteine, als NF-ATn identifiziert [50, 88].

Jun/Jun-Homo- oder Jun/Fos-Heterodimere lagern sich als AP-1-Komplex zusammen und stabilisieren die Bindung von NF-AT an die DNA. Am besten untersucht ist die distale NF-AT Bindungsstelle im Il-2-Promotor, die sog. distale "Purinbox", die gleich neben einer schwachen AP-1-"site" (TGTTTCA) liegt [98]. An dieser Stelle wird ein NF-AT/Jun/Fos-Komplex ausgebildet, der zehnmal stärker an die DNA bindet als NF-AT bzw. AP-1 alleine [50]. Man bezeichnet diesen Transkriptionskomplex, der den Il-2-Promotor effektiv aktiviert, auch als Verstärker ("enhanceosome"), und die gemeinsame Bindungsstelle als "composite element" [99].

Alle vier klassischen NF-AT-Faktoren sind in der Lage, auf diese Weise mit den AP-1-Proteinen zu interagieren. [47]. Die Mitglieder der Jun/Fos-Familie, die im NF-AT/AP-1-Komplex nachgewiesen werden können, sind jedoch verschieden und vom Typ der Zelle und ihrer Aktivierung abhängig [114].

NF-AT-"composite elements" wurden für eine Vielzahl von Genen beschrieben [78], wobei die meisten NF-AT-Bindungsstellen in Zytokinpromotoren eine AP1-"site" enthalten [98]. Andere mögliche Bindungspartner der NF-ATs sind GATA-Proteine oder Octamer-Faktoren. Es wurde gezeigt, dass GATA2 und NF-AT2 in Myeloblasten coexprimiert werden, und GATA4 und NF-AT3 in einem experimentellen System miteinander reagieren [81, 84]. Der Interleukin-4-Promotor enthält mehrere Bindungsstellen für NF-AT und die Octamer-Faktoren Oct-1 und Oct-2 [98].

Die in dieser Arbeit beschriebenen NF-AT-Bindungsstellen NF-AT-I<sub>lck</sub> (−480/−476) und NF-AT-II<sub>lck</sub> (−216/−212) des proximalen *lck*-Promotors weisen in ihrer Nähe *keine* palindromische Sequenz auf, die auf eine AP-1-"site" hinweisen könnte. In "Bandshift"-Experimenten zeigte sich eine Kompetition des AP-1-Oligonukleotids für die distale NF-AT-Bindungsstelle des Il-2-Promotors, nicht aber für die NF-AT-I<sub>lck</sub>-Sequenz (s. 2.1.2).

Nachdem sich in den transienten Transfektionen eine deutliche Kooperation der Faktoren NF-AT und c-Myb gezeigt hatte (s. 2.2.2), stellte sich die Frage, ob beide Transkriptionsfaktoren auch *gemeinsam* an die DNA binden. Durch die Analyse von Deletionsmutanten fanden wir, dass die Kooperation von NF-AT und c-Myb im Sequenzbereich zwischen Pos. −700 und −136 stattfinden muss (s. 2.4).

Die Untersuchung der Sequenz in der Nähe der NF-AT Bindungsstellen führte zu der Identifikation von c-Myb-Motiven (AAC) in der Nähe von NF-AT-I<sub>lck</sub> in Position -481/-479 und -487/-485. Im DNA-"Pull down"-Versuch wurde gezeigt, dass eine Bindung von c-Myb und NF-AT an ein NF-AT-I<sub>lck</sub>-Oligonukleotid stattfindet, die durch die Mutation in den jeweiligen Kernsequenzen verhindert werden kann (s. 2.3). Der Verlust der NF-AT-Bindungsstelle beeinträchtigte die Bindung von c-Myb kaum, umgekehrt war die NF-AT-Bindung auch nach Mutation der Myb-Motive möglich. NF-AT und c-Myb binden somit nachbarschaftlich an den proximalen *lck*-Promotor ohne in der Bindung voneinander abhängig zu sein. Auch in der Nähe von NF-AT-II<sub>lck</sub> befindet sich eine c-Myb-Stelle in Pos. -208/-206, die bisher nicht auf die Bindung des Proteins untersucht wurde.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass NF-AT und c-Myb in unmittelbarer Nähe und voneinander unabhängig an den proximalen *lck*-Promotor binden und ihn synergistisch aktivieren. Es handelt sich bei NF-AT-I<sub>lck</sub> somit um eine neue Form eines NF-AT-"*composite elements*".

### 3.4 Bedeutung der NF-AT-Bindung an den proximalen *lck*-Promotor

Die Proteintyrosinkinase *lck* ist ein wichtiges Schlüsselenzym der Thymozytenreifung und eine wichtige Komponente der intrazellulären Signalkaskade im Rahmen der T-Zell-Aktivierung. Auch die Familie der NF-ATs ist durch die Induktion der Zytokinproduktion sowohl an der T-Zell-Reifung als auch an der Zellantwort beteiligt.

Während die Stärke des *lck*-Signals die Entscheidung beeinflusst, welchen Oberflächenmarker (CD4 oder CD8) die "einfach positive" Zelle trägt [44], können die NF-ATs durch die Induktion von Il-2 oder Il-4 die Subdifferenzierung der CD4-positiven Zellen in Th1- bzw. Th2-Zellen steuern. So kommt es ohne NF-AT2 zu einer *reduzierten* Produktion von Il-4 und damit zu einer Hemmung der Differenzierung in Th2-Zellen [96, 140]. In NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Mäusen führte dagegen die massiv *verstärkte* Il-4-Synthese zur bevorzugten Ausbildung von Th2-Zellen mit der Folge von atopischen Erkrankungen, wie allergischer Blepharitis, Pneumonie und Lymphadenopathie [96]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die verschiedenen Mitglieder der NF-AT-Familie in den

Differenzierungsprozessen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. NF-AT2 ist ein *Aktivator* und NF-AT1 bzw. NF-AT4 sind *Repressoren* der Interleukin-4-Produktion zu sein [57].

In den von uns durchgeführten Experimenten wurden Expressionsvektoren für NF-AT1, 2 und 4 eingesetzt. Alle NF-ATs waren in der Lage, den *lck*-Typ-I-Promotor zu aktivieren. Dass diese Aktivierung für NF-AT2 geringer ausfiel als für NF-AT1 oder 4 wurde zwar in verschiedenen Transfektionen bestätigt, könnte ursächlich aber auch mit der Güte der Expressionsvektoren zusammenhängen.

Durch die Chromatin-Immunopräzipitation konnten wir beweisen, dass NF-AT1 *in vivo* an den proximalen *lck*-Promotor bindet (s. 2.5.1). Es stellte sich die Frage, welche biologische Relevanz diese NF-AT-Bindung an den *lck*-Typ-I-Promotor hat. In "Western Blot"-Experimenten wurde zunächst die *lck*-Proteinkonzentrationen in Thymozyten von NF-AT1-"dominant negativen"- und "Wildtyp"-Mäusen verglichen. Es zeigte sich kein Einfluss des "dominant negativen" Transgens auf die *lck*-Menge (ohne Abbildung). Im "RNA-Protection-Assay" mit RNA aus verschiedenen NF-AT-"knock-out"-Mäusen wurde deutlich, dass der alleinige Mangel von NF-AT1 tatsächlich nur zu einer *geringen* Reduktion der *lck*-Transkripte führte (s. 2.5.2). Erst bei der Analyse von RNA aus den Thymozyten von NF-AT1<sup>-/-</sup>4<sup>-/-</sup>-Tieren konnte eine Senkung der *lck*-m-RNA-Konzentrationen um etwa 30% nachgewiesen werden (s. 2.5.2). Diese Herunterregulation der *lck*-Transkripte ist mit der Il-2-Produktion vergleichbar, die in NF-AT1<sup>-/-</sup>-Mäusen *nicht* beeinträchtigt ist, während in den NF-AT1-NF-AT4 doppelt defizienten Mäusen eine deutliche Reduktion der Il-2-Synthese beobachtet wird [96]. Ob die hier gezeigte Abnahme der *lck*-Transkripte einen Einfluss auf den Phänotyp der NF-AT defizienten Mäuse haben könnte, bleibt zu untersuchen.

Eine Erkrankung, die mit der Aktivierung von *lck* und NF-AT in Verbindung gebracht worden ist, ist die erworbene Immunschwäche AIDS, die durch das HIV-Virus hervorgerufen wird. Das Glykoprotein gp120 der Virushülle kann an den CD4-Corezeptor binden und so die membranständigen Kinasen *lck* und *fyn* aktivieren [29]. Durch diese Kinasen wird ein Aktivierungssignal generiert ("partial gene activation signal"), das - wie in der normalen T-Zell-Signaltransduktion - zur Translokation von NF-AT in den Zellkern führt [38]. Die Aktivierung der NF-AT-Faktoren und die damit induzierte Zytokinproduktion könnten für die bevorzugte Differenzierung der T-Helferzellen zu



Th2-Zellen verantwortlich sein, welche bei AIDS-Patienten beobachtet wird [24]. Die Aktivierung des proximalen *lck*-Promotors im Rahmen eines "autokrinen loops" könnte somit für die Manifestation von AIDS im Sinne eines "circulus vitiosus" von Bedeutung sein.

Die Existenz eines NF-AT/c-Myb-"composite elements" eröffnet neue Aspekte für die Untersuchung möglicher Zielgene der NF-AT-Transkriptionsfaktoren insbesondere im Thymus. Wie bereits einleitend erwähnt wird der proximale *lck*-Promotor häufig für die experimentelle Expression von Transgenen in Thymozyten eingesetzt [18, 36] und macht diese dadurch zu artifiziellen Zielgenen von NF-AT und c-Myb. Aus diesem Grund muss der Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren auf die transkriptionelle Regulation dieses Promotors bei der Durchführung und Interpretation solcher Experimente berücksichtigt werden.

## 4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation des proximalen Promotors der lymphozytenspezifischen Proteintyrosinkinase *lck* untersucht. Das Hauptaugenmerk richtete sich auf die Beteiligung der Familie der NF-AT-Transkriptionsfaktoren an der Kontrolle der Promotoraktivität. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass NF-ATs aus Zellkulturzellen sowie aus frisch isolierten Thymozyten spezifisch an Sequenzmotive in der regulatorischen Region des *lck*-Typ-I-Promotors binden. Die NF-AT-Bindungsstellen mit der höchsten Affinität wurden in Pos. -480/-476 (NF-AT-I<sub>*lck*</sub>) und in Pos. -216/-212 (NF-AT-II<sub>*lck*</sub>) identifiziert. Eine Mutation in den Bindungsmotiven verhinderte dementsprechend die Ausbildung von NF-AT-Komplexen mit der DNA.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass NF-AT-Faktoren den proximalen *lck*-Promotor allein und zusammen mit Faktoren der Ets-Familie bzw. c-Myb aktivieren können. Die Untersuchung der Interaktion von NF-AT und c-Myb ergab, dass die beiden Transkriptionsfaktoren unmittelbar benachbart an die DNA binden. Unter Berücksichtigung dieses Bindungsverhaltens und der Kooperation in der Transaktivierung des Promotors konnten wir somit eine neue Form eines NF-AT-"composite elements" beschreiben.

Bei der Untersuchung von NF-AT-"knock out"-Mäusen auf Anzeichen einer *lck*-Bildungsstörung zeigte sich eine deutliche Reduktion der *lck*-Typ-I-Transkripte in NF-AT1-NF-AT4 doppelt defizienten Tieren. Dies belegt die Relevanz der NF-AT-Faktoren für die Aktivität des proximalen *lck*-Promotors *in vivo*.

## 5 Anhang

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Antibiotika

- Ampicillin Hoechst, Frankfurt, BRD
- Penicillin-Streptomycin Gibco/BRL, Eggenstein, BRD

#### 5.1.2 Geräte und Gebrauchsmaterial

- Autoklav Stiefenhofer, Peiting, BRD
- Blotgerät Transphorlid Hoefler, Freiburg, BRD
- Brutschrank Heraeus, Hanau, BRD
- DC-Folien (Kieselgel, 60 F<sub>254</sub>) Merck, Darmstadt, BRD
- DNA-Sequenzierer 373 A Applied Biosystems, Weiterstadt, BRD
- Einmalkanülen (26G 3/8; 0,45 x 10 mm) Hartenstein, Würzburg, BRD
- Einmalküvetten Hartenstein, Würzburg, BRD
- Eismaschine Genheimer, Hettstadt, BRD
- Geldokumentationssystem Herolab, Wiesloch, BRD
- Gelkammern Stratagene, Amsterdam, Niederlande,  
Hoefler, Freiburg, BRD
- Gelrockner BioRad, München, BRD
- Gewebekulturflaschen (50, 250, 500 ml) Greiner, Frickenhausen, BRD
- Gewebekulturplatten (6-well, 12-well) Greiner, Frickenhausen, BRD
- Glaswaren Schott, Mainz, BRD
- Heizblöcke Hartenstein, Würzburg, BRD
- Kryotubes (2ml) Greiner, Frickenhausen, BRD
- Lichtmikroskope Olympus, Hamburg, BRD,  
Leica, Wetzlar, BRD
- Luminometer Berthold, Pforzheim, BRD

- Mikroliter Pipetten	Eppendorf, Hamburg, BRD, Brand, Wertheim a.M., BRD	
- Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD	
- Parafilm	Hartenstein, Würzburg, BRD	
- PCR-Gerät 2400	Perkin Elmer, Vaterstetten, BRD	
- Phosphor-Imager	Molecular Dynamics, Krefeld, BRD	
- Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, BRD	
- Polypropylenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, BRD, Nunc, Wiesbaden-Biebrich, BRD	
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, BRD, Eppendorf, Hamburg, BRD	
- Röntgenfilme (BioMax, X-Omat)	Kodak, Stuttgart, BRD	
- Rotoren	JA-10 JA-14 J2-HS J2-21 SW 55 TI	Beckmann, München, BRD Beckmann, München, BRD Beckmann, München, BRD Beckmann, München, BRD Beckmann, München, BRD
- Schüttelinkubator	Hartenstein, Würzburg, BRD, New Brunswick, NJ, USA	
- Scintillations-Meßgerät	Canberra Packard, Frankfurt, BRD	
- Spannungsquelle	Amersham, Freiburg, BRD	
- Spektralphotometer	Pharmacia, Freiburg, BRD	
- Sterilbank	Heraeus, Hanau, BRD, Gelaire, Opera, Italien	
- Sterilfilter (0,2 µM/ 0,45 µM)	Schleicher & Schuell, Dassel, BRD	
- Stickstoff-Tanks	tec-lab, Königstein/Ts., BRD	
- UV-Stimulationsgerät UVT-20M	Herolab, Wiesloch, BRD	
- Vortexer	Hartenstein, Würzburg, BRD	
- Waagen	Precisa 300 MC	Precisa, Dietikon, Schweiz
- Wasserbäder	Hartenstein, Würzburg, BRD	
- Westernblot-Apparatur	Hoefer, Freiburg, BRD	
- Whatman Papier	Hartenstein, Würzburg, BRD	

- Zählkammer (Neubauer improved)	Brand, Wertheim a.M., BRD
- Zellsiebe (70 µM)	Falcon, Heidelberg, BRD
- Zentrifugen	
Microzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, BRD
Hochleistungszentrifuge	Beckmann, München, BRD
Ultrazentrifuge	Beckmann, München, BRD
Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau, BRD

### 5.1.3 Chemikalien und Lösungen

Die Gebrauchslösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt und in der Regel autoklaviert oder sterilfiltriert.

- Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, BRD
- Agarose Typen II und VII	Roth, Karlsruhe, BRD
- Aminosäuren (nicht-essentiell; 100x)	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Ammoniumformiat (NH <sub>4</sub> -Formiat)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- ATP-Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Bacto-Trypton	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Borsäure	Merck, Darmstadt, BRD
- Bradford-Reagenz (5x)	BioRad, München, BRD
- Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
- BSA Fraktion V	Boehringer, Mannheim, BRD
- Butanol (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Cäsiumchlorid (CsCl)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Cyclosporin A (CsA)	Sandoz, Nürnberg, BRD
- DEAE-Dextran	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Dimethylsulfat	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen, BRD

- DMEM-Medium	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- DMSO: 25 % Dimethylsulfoxid in TBS	Roth, Karlsruhe, BRD
- dNTPs (desoxy-Nukleosid-Triphosphate)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA • 2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe, BRD
- EGTA (Na <sub>4</sub> EGTA)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Ethylacetat	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Ficoll	Pharmacia, Freiburg, BRD
- Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, BRD
- Formamid	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Glutamin	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Glutathion	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Glutathion-Agarose-"beads" (GST-"beads")	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Glycerol	Roth, Karlsruhe, BRD
- Glykogen	Roth, Karlsruhe, BRD
- Glycerin (87%)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Glyzin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, BRD
- Harnstoff	Roth, Karlsruhe, BRD
- Hefeextrakt	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin- N'-(3-Propansulfonsäure))	Roth, Karlsruhe, BRD
- Ionomycin (5 mM)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Isopropanol (2-Propanol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim, BRD
- Kaliumazetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Leupeptin Hydrochlorid	Roche, Mannheim, BRD
- Luciferin	AppliChem, Darmstadt, BRD

- Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Fluka, Neu-Ulm, BRD
- $\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, BRD
- MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Methanol ( $\text{CH}_4\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Milchpulver	Saliter, Obergünzburg, BRD
- MOPS (4-Morpholinpropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Natriumazetat ( $\text{NaOAc}$ )	Merck, Darmstadt, BRD
- Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt, BRD
- Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Natriumfluorid ( $\text{NaF}$ )	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, BRD
- Natrium-Orthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Fluka, Neu-Ulm, BRD
- Natrium-Pyruvat ( $\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_3\text{Na}$ ; 100 mM)	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Nonident P 40 (NP-40): Ethylenphenylpolyethylenglycol	Roth, Karlsruhe, BRD
- Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg, BRD
- Phenol	Roth, Karlsruhe, BRD
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg, BRD
- Piperidin	Sigma, Deisenhofen, BRD
- poly(dI/dC)	Boehringer, Mannheim, BRD
- PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Ponceau-Rot	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Proteinase-Inhibitoren-Cocktail	Boehringer, Mannheim, BRD
- radioaktive Nukleotide (10 mCi/ml)	DuPont, Bad Homburg, BRD
- RPMI 1640	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Rubidiumchlorid ( $\text{RbCl}$ )	Roth, Karlsruhe, BRD
- Salmonsperm DNA	Boehringer, Mannheim, BRD
- Salzsäure ( $\text{HCl}$ )	Merck, Darmstadt, BRD
- Sarkosyl	Sigma, Deisenhofen, BRD
- SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe, BRD

- Sephadex G-50	Pharmacia, Freiburg, BRD
- Streptavidin-Perlen	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Superfect Transfektionsreagenz	Quiagen, Hilden, BRD
- Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- TPA (12-O-tetradedaconyl-phorbol-13-acetat): 100 µg/ml in Ethanol	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Tris (2-Amino-2-(Hydroxylmethyl)- 1,3-Propandiol)	Roth, Karlsruhe, BRD
- Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Trizol	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Trypanblau 0,1 %	Gibco/BRL, Eggenstein, BRD
- Tween 20	Roth, Karlsruhe, BRD
- Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg, BRD

#### 5.1.4 Lösungen und Puffer

Die Lösungen wurden mit durch Filtration gereinigtem Wasser angesetzt und im Anschluss daran entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Wenn nicht anders angegeben, wurde der pH-Wert mit 1 N HCl eingestellt.

- Bindungspuffer für EMSA-Experimente (3x):  
60 mM Hepes pH 7,9; 3 mM DTT; 3 mM EDTA; 150 mM KCl; 12 % Ficoll
- "Blue Juice" (Farbpuffer):  
100 mM EDTA; 80 % Glycerin; 0,025 % Bromphenolblau;  
0,025 % Xylencyanol FF
- "Chromatin-Immunopräzipitations"-Puffer:  
Formaldehyd-Lösung:  
3 ml 36,5 % Formaldehyd; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA;  
50 mM Hepes pH 8,0  
"Lysis-Puffer":  
50 mM Hepes pH 7,5; 140 mM NaCl; 50 mM EDTA; 10 % Glycerol;  
0,5 % NP-40; 0,25 % Triton-X-100; Proteinase-Inhibitoren-Cocktail



"Puffer I":

10 mM Tris pH 8,0; 0,2 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA;  
1 mM PMSF; Proteinase-Inhibitoren-Cocktail

"Puffer II":

10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 1 mM PMSF;  
Proteinase-Inhibitoren-Cocktail

"Dialyse-Puffer":

10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10 % Glycerol

RIPA-Puffer:

1 % Triton-X-100; 0,1 % Na-deoxycholate; 0,1 % SDS; 140 mM NaCl  
1 mM PMSF; Proteinase-Inhibitoren-Cocktail

- "Elutionspuffer":

100 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 20 mM Glutathion; 1 mM DTT

- Extraktionspuffer für Kernproteine:

"Puffer A":

10 mM Hepes pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA  
1 mM DTT; 0,5 mM PMSF

"Puffer C":

20 mM Hepes pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT;  
1 mM PMSF

- "Footprinting"-Puffer:

"Puffer Z":

1 M Hepes pH 7,8; 25 mM KOH; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 % Glycerol;  
0,1 % NP-40; 50 mM KCl

"Stop"-Puffer:

0,2 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 % SDS, 20 µg tRNA

- KLB-Puffer (Ganzzellextrakte):

20 mM Hepes pH 7,5; 50 mM β-Glycerophosphat; 20 mM NaF; 2 mM EDTA  
2 mM EGTA; 1 mM Na-Orthovanadat; 10 % Glycerin; 1 % Triton-X-100  
0,02 % NaN<sub>3</sub>

- Ladepuffer für SDS-Gele (2x; Lämmli-Puffer):
  - 100 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau; 20 % Glycerin
  - 20 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,5 % DTT
- Laufpuffer für SDS-Gele (10x):
  - Tris 30,3 g/l; Glycin 144,1 g/l; 10 % SDS 100 ml/l
- Puffer für den "Luciferase-Assay":
  - "Harvesting"-Puffer:
    - 35 mM Tris pH 7,8; 50 mM MES, 0,1 % Triton-X-100, 1 mM DTT
  - "Assay"-Puffer.
    - 83 mM Tris pH 7,8; 12,5 mM MES, 25 mM  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ;
    - Spatelspitze ATP
- Luciferinlösung:
  - 28 % Luciferin, 50 mM  $\text{KHPO}_4$  pH 7,8; Lagerung von Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$
- PBS:
  - 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;
  - 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- PBS-MM:
  - PBS ohne  $\text{CaCl}_2$  und  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM NaF; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA;
  - 5 mM DTT; 10 mM PMSF; 1 mM Leupeptin
- RF1-Puffer (kompetente Zellen):
  - 100 mM RbCl; 50 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM  $\text{CaCl}_2$
  - 15 % Glycerin; mit 0,2 M Eisessig auf pH 5,8 eingestellt
- RF2-Puffer:
  - 10 mM RbCl; 10 mM MOPS; 75 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 15 % Glycerin;
  - mit 0,2 M Eisessig auf pH 6,8 eingestellt
- 10x TAE:
  - 400 mM Tris pH 8,0 (Essigsäure); 10 mM EDTA
- 5x TBE:
  - 450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0

- TBS:

25 mM Tris; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>;  
0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- TE:

10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8,0

- Transferpuffer:

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

- Waschpuffer für "Western Blots":

0,1 % Tween in PBS

### 5.1.5 Nährmedien

- DMEM(+)-Medium:

500 ml DMEM-Medium; 5 ml 100x nichtessentielle Aminosäuren;  
5 ml 10 mM Natriumpyruvat; 5 ml 200 mM Glutamin; 1 ml β-Mercaptoethanol;  
10<sup>5</sup> I.E. Penicillin/Streptomycin; 5 ml fetales Kälberserum (FCS)

- LB-Medium:

10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; auf 1 l ddH<sub>2</sub>O  
für Agarplatten: 1,5 % Agar

- 2x YT-Medium:

16 g Bacto-Trypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; auf 1 l ddH<sub>2</sub>O

- RPMI(+)-Medium:

1000 ml RPMI-Medium; 7 ml 200 mM Glutamin; 10<sup>5</sup> I.E. Penicillin G;  
50 ml fetales Kälberserum (FCS)

### 5.1.6 Reaktionssysteme (Kits)

- ECL Chemolumineszenz-System

Amersham, Braunschweig, BRD

- Jetprep-Plasmid-Miniprep-Kit

Genomed, Bad Oeynhausen, BRD

- Jetsorb-Gel-Extraktions-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen, BRD
- Nucleobond-AX-Maxiprep-Kit	Nucleobond, Düren, BRD
- Quiagen Maxiprep-Kit	Quiagen, Hilden, BRD
- Quiagen PCR-Aufreinigung	Quiagen, Hilden, BRD
- Quiagen RNeasy-RNA-Isolationssystem	Quiagen, Hilden, BRD
- TaqDyePrimer Sequenzierungskit	Perkin Elmer, Vaterstetten, BRD

### 5.1.7 Enzyme

- DNA-Polymerase I und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- Klenow-Fragment und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- DNase I	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Proteinase K	Sigma, Deisenhofen, BRD
- Pwo-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- Restriktionsendonukleasen und. Puffer	Boehringer, Mannheim, BRD
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- RNase A	Boehringer, Mannheim, BRD
- Shrimp Alkaline Phosphatase und Puffer	USB, Cleveland, Ohio, USA
- T4-DNA-Ligase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- T4-Polynukleotidkinase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- T7-Polymerase und Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
- Taq-DNA-Polymerase und PCR-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD

### 5.1.8 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der verwendeten Plasmide wurden verschiedene Stämme von *Escherichia coli* benutzt: DH5 $\alpha$ , TOP10, XL1 Blue

### 5.1.9 Gewebekulturzellen

Jurkat: humane T-Zell-Lymphomlinie

EL-4:	murine T-Zell-Lymphomlinie
HEK 293 T:	humane Nierenkarzinomzellen (human embryonic kidney)
LS 180, SW 620, LOVO:	humane Colonkarzinom-Zelllinien

### 5.1.10 Primer

Universal-Primer	Pharmacia, Freiburg, BRD
Reverse-Primer	Pharmacia, Freiburg, BRD
GL3-RV-Primer	Promega/Boehringer, Mannheim, BRD
TATA-luci-Primer	Promega/Boehringer, Mannheim, BRD

Alle anderen verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, BRD) in hohem Reinheitsgrad (high salt purification) lyophilisiert bestellt. Die Aufnahme der Oligonukleotide erfolgte in ddH<sub>2</sub>O, in einer Konzentration von 100 pmol/μl.

Primer für 740bp-Fragment des proximalen Promotors des *lck*-Gens:

Mlck-700/XhoI            5' – CGC TCG AGA AGA CTA TGC AGT AAG ACC t – 3'

Mlck+40/HindIII        5' – GCA AGC TTG CTG AAT CGT GGG ATT CAA – 3'

Primer für 266bp-Fragment des proximalen Promotors des *lck*-Gens:

lck-proximal<sub>mouse</sub>        5' – ACG ATT CAG CGC TTC TGT CT – 3'

lck-prox/rev<sub>mouse</sub>        5' – TAC CGA GAT CTT GCT GTC CA – 3'

Primer für 168bp-Fragment des distalen Promotors des *lck*-Gens:

lck-distal<sub>mouse</sub>            5' – GAT GTA TGG GAC CCA AGA G – 3'

lck-dist/rev<sub>mouse</sub>        5' – CTG GCC TAT TCA CAT GAT GC – 3'

### 5.1.11 Oligonukleotide

NF-ATd Il-2 (Pu-b<sub>D</sub>)

5' – TCG ACA AAG AGG AAA ATT TTG TTC ATA CAG AAG – 3'

5' – GAT CCT TCT GTA TGA AAC AAA TTT TCC TCT TTG – 3'

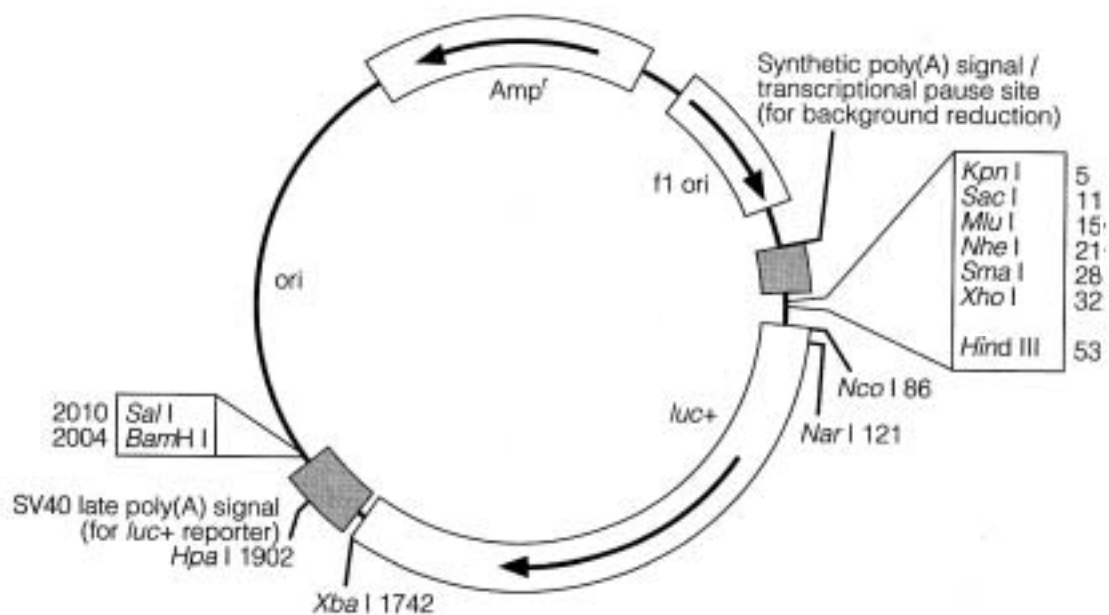


### 5.1.13 Verwendete Plasmide

#### 5.1.13.1 Luciferase-Plasmide

Für die Untersuchung des proximalen Promotors der Tyrosinkinase *lck* wurde zunächst ein Ausgangsvektor mit der Promotorsequenz hergestellt. Durch die Amplifikation des Typ-I-Promotors der Maus aus genomischer DNA mit Hilfe von Pwo-Polymerase erhielten wir ein Promotorfragment von 740 Basenpaaren (Pos. -700 bis +40 in Bezug auf den Transkriptionsstart). Dieses Fragment wurde dann zwischen die Xho I- und Hind III-Klonierungsstellen des Luciferasevektors GL3-basic (Promega) kloniert (s. Abb. 5.1).

- GL3-*lck*:



**Abbildung 5.1: Die Grundstruktur des GL3-basic-Vektors.** Als Reportergen wird die Leuchtkäfer-Luciferase exprimiert (*luc+*). *f1 ori* ist eine Sequenz aus einem Bakterienplasmid, die als Replikationsstartpunkt fungiert. Die Ampicillinresistenz ( $Amp^r$ ) ermöglicht die Selektion des rekombinanten Plasmids. In die verschiedenen Restriktionsschnittstellen (z. B. Xho I und Hind III) kann fremde DNA inseriert werden. Die Polyadenylierungssignale (poly(A)-Signale) erhöhen die Stabilität der Transkripte. Das Poly(A)-Signal des SV40-Virus am Ende des Reportergens verhindert die aberrante Transkription aus der Gegenrichtung. (Aus: Promega-Katalog Biological Research Products, 1999)

- GL3-*lck* (-431/+40):  
Deletionsmutante von GL3-*lck* ohne die NF-AT-I-"site" des proximalen Promotors, hergestellt durch Restriktionsspaltung mit Cfr I und Re-Ligation des Vektors.
- GL3-*lck* (-136/+40):  
Deletionsmutante von GL3-*lck* ohne beide NF-AT-"sites" des proximalen Promotors, hergestellt durch Restriktionsspaltung mit Nhe I und Re-Ligation des Vektors.
- 4x NF-AT-I:  
4 Kopien der NF-AT-I-"site" vor dem TK-Promotor des Luciferase-Gens im TATA-luci-Vektor (Promega/Boehringer, Mannheim, BRD); kloniert in die Sal I-Schnittstelle der "multiple cloning site".
- 4x NF-AT-I<sub>mut</sub>:  
4 Kopien der mutierten NF-AT-I-"site" kloniert in die Sal I-Schnittstelle des TATA-luci-Vektors (s. o.).

#### 5.1.13.2 *Eukaryontische Expressionsvektoren*

- NF-AT2: NF-AT2-cDNA kloniert in den pRSV-Expressionsvektor [23].
- NF-AT1: NF-AT1-cDNA kloniert in den pRSV-Expressionsvektor [23].
- c-Myb: Expressionvektor von A. Leutz, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, zur Verfügung gestellt.
- Ets-1: pKCR3-c-ets1 von Sybille Blumenthal, Institut für Zellbiologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

#### 5.1.13.3 *GST-Expressionsvektor*

- pGex-NF-AT1: NF-AT1-cDNA, kloniert in die Sma I-Erkennungssequenz des GEX2-Vektors (Promega/Boehringer, Mannheim, BRD), kodiert für ein Fusionsprotein aus GST und der DNA-bindenden Domäne von NF-AT1. Der Vektor wurde freundlicherweise von Stefan Klein-Heßling aus unserem Labor zur Verfügung gestellt.



#### 5.1.13.4 T7-Polymerase-Vektor

- pGEM-T Easy-*lck*: 266 bp des proximalen *lck*-Promotors (amplifiziert durch PCR mit genomischer DNA) kloniert in die EcoRI-Schnittstelle des pGEM-T Easy-Vektors von Promega/Boehringer, Mannheim, BRD. Der Vektor enthält den *Promotor* der T7-RNA-Polymerase. Unter Zugabe von T7-Polymerase und radioaktiv markierten Nucleotiden entstand durch Transkription die sequenzspezifische RNA-Sonde für den proximalen *lck*-Promotor.

### 5.1.14 Antikörper und Proteine

#### 5.1.14.1 Primäre Antikörper

- Anti-NF-AT1 ( $\alpha$ -NF-AT1):

Es wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene NF-AT1-Antikörper verwendet, die uns freundlicherweise von Anjana Rao, Boston, zur Verfügung gestellt wurden. Der Antikörper gegen das "Peptid 67.1" erkennt etwa 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende aller NF-AT1-Isoformen (human und murin). Der Antikörper "T2B1" ist gegen den C-Terminus des murinen NF-AT1 gerichtet (Isoform C).

- Anti-c-Myb ( $\alpha$ -c-Myb):

Kommerzieller Antikörper (mouse monoclonal, Katalog-Nr. 05-175), Upstate/Biomol, Hamburg, BRD.

- Anti-GST ( $\alpha$ -GST):

Kommerzieller Antikörper (rabbit polyclonal, Katalog-Nr. sc-459), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA

- Anti-acetylierte Histon ( $\alpha$ -Histon):

Kommerzieller Antikörper (rabbit polyclonal, Katalog-Nr. 06-599), Upstate/Biomol, Hamburg, BRD.

#### 5.1.14.2 *Sekundäre Antikörper*

Als sekundäre, an Peroxidase gekoppelte Antikörper wurden zum einen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper und zum anderen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper eingesetzt (Amersham, Freiburg, BRD).

#### 5.1.15 **Größenmarker**

GeneRuler (100 bp, 1 kb) DNA-Größenmarker, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD.  
BenchMark Protein-Größenmarker, Gibco/BRL, Eggenstein, BRD.

## 5.2 **Methoden**

Soweit nicht anders vermerkt sind die nachfolgend aufgeführten Methoden dem Standardwerk "Molecular Cloning" [71, 105] entnommen.

### 5.2.1 **Reinigung und Konzentrierung von DNA**

#### 5.2.1.1 *Ethanolpräzipitation*

Zur Fällung einer DNA-Lösung wird diese mit 2,5 Volumen 96-%igem Ethanol und 0,1 Volumen 3 M NaOAc versetzt und anschließend 10 min auf Trockeneis bzw. eine halbe Stunde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dann wird 15 min bei 12000 rpm im Kühlraum zentrifugiert, das Pellet mit 70-%igem Ethanol und dann mit der gleichen Menge 96-%igem Ethanol gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet. Je nach der Art der weiteren Verwendung wird die DNA entweder in ddH<sub>2</sub>O bzw. TE-Puffer aufgenommen.

#### 5.2.1.2 *Phenol/Chloroform-Extraktion*

Zur Reinigung einer DNA-Lösung von Proteinen wird diese mit gleichem Volumen eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1

ausgeschüttelt. Die Phasentrennung erfolgt durch ca. 2 minütige Zentrifugation in der Mikrozentrifuge bei 12 000 rpm. Phenolrückstände können durch erneutes Ausschütteln mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt werden.

## **5.2.2 Konzentrationsbestimmung von DNA**

### *5.2.2.1 Am Spektralphotometer*

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine Nukleinsäureprobe im Verhältnis 1:50 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die optische Dichte (OD) photometrisch gegen das Lösungsmittel bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Mit dem erhaltenen Wert lässt sich mit Hilfe von Referenzwerten (OD von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA von 40 µg/ml) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration errechnen.

### *5.2.2.2 Am Agarose-Minigel*

Nach kurzer Elektrophorese kann die Konzentration eines DNA-Fragmentes an einem 1-%igen Agarose-Minigel (s. 5.2.3.1) abgeschätzt werden. Hierzu wird neben der DNA-Probe dasselbe Volumen einer DNA-Lösung bekannter Konzentration aufgetragen und 15 min eine Spannung von ca. 120 V angelegt. Der Intensitätsvergleich erlaubt den Rückschluss auf die zu ermittelnde DNA-Konzentration.

## **5.2.3 DNA-Gelelektrophorese**

### *5.2.3.1 Agarosegele*

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Je nach Größe des zu analysierenden Fragmentes wird eine 0,4- bis 2,5-%ige Agaroselösung in 1x TAE mit 1 mg/l Ethidiumbromid (EtBr) hergestellt, die Agarose durch kurzes Erhitzen gelöst und in eine horizontale Gelkassette eingefüllt.

Zur Aussparung von Probestaschen im Gel wird direkt nach dem Eingießen der Lösung ein Kamm eingesetzt. Nach Erhärten der Agarose wird der Kamm herausgenommen, die Gelkassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Laufpuffer (1x TAE mit 1 mg/l EtBr) überschichtet.

Vor dem Auftragen der DNA-Probe wird diese mit etwa 1/6 Volumen (Vol.) Farbpuffer versetzt und neben einem käuflich erworbenen Standard-Marker (meist 1 kb) in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird mit ca. 10,5 V pro cm Agarosegel durchgeführt. Anschließend kann die DNA im UV-Licht durch Anregung der Verbindung aus EtBr und DNA sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden.

### 5.2.3.2 *Polyacrylamidgele*

Für "Electrophoretic Mobility Shift Assays" (EMSA) und zur Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurden Polyacrylamidgele verwendet.

	6%	10%	15%
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	8 ml	18 ml	25 ml
5x TBE	4 ml	10 ml	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	38 ml	32 ml	15 ml
TEMED	75 µl	50 µl	50 µl
APS (10%)	500 µl	300 µl	300 µl

Diese Gel-Lösung wird sofort nach Zugabe der Polymerisationsinduktoren TEMED und APS blasenfrei zwischen zwei saubere, durch 1 mm "spacer" getrennte Glasplatten gegossen. Zur Aussparung der Probestaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation erfolgt der Lauf in 0,4x TBE bzw. 1x TBE bei 200 - 300 Volt.

## 5.2.4 **Isolierung von DNA-Fragmenten**

### 5.2.4.1 *Isolierung aus Agarosegelen*

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe eines präparativen Agarosegels (niedrigere Spannung und größere Probestaschen als bei analytischen Gelen) wird das ge-

wünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die weitere Isolierung erfolgte unter Verwendung des Jetsorb-Gel-Extraktions-Kits nach der Anleitung des Herstellers.

#### 5.2.4.2 *Isolierung aus Polyacrylamidgelen*

DNA-Fragmente geringeren Molekulargewichts, wie z. B. radioaktiv markierte Oligonukleotide, werden über Polyacrylamidgele getrennt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel mit einer Haushaltsfolie abgedeckt und 1-5 min ein Film aufgelegt. An den Seiten des Gels fixierte Fluoreszenzmarker dienen der späteren Orientierung. Anhand des entwickelten Filmes können entsprechende Fragmente identifiziert und mit dem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Gelstücke werden dann in einem Mikroreaktionsgefäß mit einer 200 µl-Pipettenspitze zerstoßen und mindestens 4-5 Stunden bei Raumtemperatur in TE-Puffer mit 0,1 M KCl geschüttelt. Die Reinigung des Ansatzes von verbleibenden Gelstücken erfolgt durch Filtration über eine mit Glaswolle gestopfte 1-ml-Pipettenspitze.

### 5.2.5 **Klonierungstechniken**

#### 5.2.5.1 *Restriktionsspaltung*

Die käuflich erworbenen Restriktionsendonukleasen und die dazu gelieferten Reaktionspuffer wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet.

Für die Spaltung von 1 µg DNA verwendet man in der Regel 1 Einheit einer (oder mehrerer) Restriktionsendonuklease(n) – eine "unit" eines Restriktionsenzym(s) ist die Menge, die 1 µg DNA in 1 Std. spaltet.

Ein Reaktionsansatz enthielt in der Regel etwa 1-10 µg DNA in einem Volumen von 20-50 µl. Dieser wurde 1-2 Std. bei 37 °C mit einer Enzymaktivität von 1-3 U/µg eingesetzter DNA inkubiert. Danach wird ein Aliquot des Ansatzes parallel zu einem DNA-Größenmarker auf einem Agarosegel getrennt (s. 5.2.3.1).

#### 5.2.5.2 *Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow Polymerase*

Um die bei der Spaltung mit den meisten Restriktionsenzymen entstehenden überhängenden Enden ("sticky ends") aufzufüllen und so in glatte Enden ("blunt ends") zu überführen, wird die DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I behandelt. Hierzu wird 1 µg DNA in 1x Klenow-Puffer ("nick-translation"-Puffer) mit 2 mM dNTPs und zwei Einheiten Klenow-Fragment 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 5.2.5.3 *Dephosphorylierung*

Um die Re-Ligation kompatibler Vektorenden von gespaltenen DNA-Molekülen zu verhindern, werden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe der "Shrimp Alkaline Phosphatase" (SAP) entfernt. Dazu wird ca. 1 µl DNA mit 16 µl ddH<sub>2</sub>O und 2 µl 10x SAP-Puffer versetzt. Nach Zugabe des Enzyms (1 µl = 1 U) wird der Reaktionsansatz eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C wird das Enzym anschließend inaktiviert. Jetzt kann die DNA direkt für die Ligation eingesetzt werden.

#### 5.2.5.4 *Ligation*

Für die Insertion eines DNA-Fragmentes in ein zuvor linearisiertes und dephosphoryliertes Plasmid (s.5.2.5.3) wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4-DNA-Ligase) verwendet.

Das Insert wurde in unterschiedlichem Überschuss (z. B. 2-, 4-, oder 10-fach) zum Vektor eingesetzt. Zu Vektor und Fragment gibt man 2 µl des 10x T4-Ligationspuffer und 2 µl der T4-Ligase (10 U) hinzu. Mit ddH<sub>2</sub>O wird dann bis zum Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgt entweder bei Raumtemperatur (20 °C) für 2 Stunden bzw. 14 Stunden bei 14 °C. Der Reaktionsansatz kann dann direkt für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt werden (s. 5.2.7.4).

## 5.2.6 Sequenzierung von DNA

### 5.2.6.1 Die Sequenzierungsreaktion

Beim "Taq Cycle Sequencing" zur DNA-Sequenzierung wird die bakterielle Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet. Im Verlauf des Sequenzierungsprogrammes wird die zu untersuchende DNA zunächst thermisch denaturiert und der Sequenzierungsprimer angelagert ("annealed"). Von dem Primer ausgehend wird ein komplementärer Strang synthetisiert, bis es durch den Einbau eines *Di*-desoxynukleotids (ddNTP) zum Abbruch der Kette kommt. Die auf diese Weise entstehenden unterschiedlich langen DNA-Stränge erlauben durch ihre charakteristischen Längen einen Rückschluss auf die Positionen des jeweiligen Nukleotids in der gesuchten Sequenz.

Es wurde der "TaqDyePrimer Sequenzierungskit" mit einem "Sequencing Mix" aus ddNTPs, dNTPs, 5x TACS-Puffer und der AmpliTaq DNA-Polymerase verwendet. Die Analyse mit dem 373 A Sequenziergerät ermöglicht den Einsatz aller vier ddNTPs in einem Reaktionsansatz, weil diese mit Hilfe ihrer gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe unterschieden werden können [62].

Eine typische Reaktion bestand in der Regel aus:

1,0 µg DNA (in einem Volumen von 5 µl, der Rest wurde durch ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt)  
 2,0 µl "Sequencing Primer" (10 ng)  
 7,0 µl " Sequencing Mix"

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte dann in der PCR-Maschine für 25 - 30 folgender Zyklen:

15 s	96 °C
15 s	48 °C
4 min	60 °C

### 5.2.6.2 Die Probenaufbereitung

Nach der PCR werden zunächst die nicht verarbeiteten, fluoreszenz-markierten ddNTPs abgetrennt, weil diese die Analyse beeinträchtigen würden. Hierzu werden zunächst mit G-50-Sephadex in präparierten 200 µl Pipettenspitzen kleine Säulen hergestellt (Zentri-

fugation bei 3 000 rpm für 3 min). Dann wird die PCR-Reaktion aufgetragen und erneut 3 min bei 3 000 rpm zentrifugiert. Die so aufgereinigten Sequenzierungsprodukte werden dann mit 72 µl 96-%igem Ethanol und 1 µl 3M NaOAc versetzt und für 10 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wird vorsichtig abgesaugt und das fast unsichtbare Pellet bei 60 °C getrocknet.

#### 5.2.6.3 *Die Probenanalyse*

Die Auftrennung der Sequenzierungsproben im 373 A Sequenziergerät erfolgt in einem 6%-igen Polyacrylamidgel. Die Sekundärstrahlung der Fluoreszenzfarbstoffe wird nach Anregung mit einem Argonlaser über ein Filter und einen "Photomultiplier" aufgezeichnet. Aus dem so ermittelten Rohdatenbild lässt sich mit Hilfe eines Analyseprogrammes die Sequenz der untersuchten DNA-Proben ermitteln.

#### 5.2.6.4 *Sequenzierung durch chemische Modifikation*

Eine weitere Möglichkeit zur Sequenzierung von DNA bietet das sog. chemische Sequenzieren nach der Maxam-Gilbert-Technik. Eine spezifische Base wird hierbei durch chemische Modifikation so markiert, dass ihre Position in einer Sequenz nachvollzogen werden kann.

Ausgangspunkt ist die zu untersuchende DNA als einzelsträngige, radioaktiv markierte DNA-Sonde. Um diese DNA-Sonde herzustellen wurden ca. 50 µg des GL3-*lck*-Vektor mit einem der Klonierungsenzyme (Xho I oder Hind III) linearisiert. Nach Überprüfung der Linearisierung auf einem Agarosegel wurde der Vektor mit Chloroform und Isopropanol aufgereinigt und in destilliertem Wasser aufgenommen. Im nächsten Schritt erfolgte die radioaktive Markierung. Hierzu wurde dem Vektor Reaktionspuffer,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, die weiteren unmarkierten dNTPs sowie Klenow-Polymerase zugesetzt (s. 5.2.5.2) und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde der nun radioaktiv markierte und linearisierte Vektor mit dem anderen Restriktionsenzym (s. oben) verdaut und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Das so gewonnene Fragment des proximalen *lck*-Promotors wurde aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert, präzipitiert und in Wasser



aufgenommen. Die am 3'-Ende markierte DNA-Sonde wurde dann entsprechend der Methode nach CHUVPILLO et al. [22] auf DEAE-Papier/DE81 (Whatman) aufgebracht. Die kleinen Papierstücke wurden 5-mal mit Wasser und 5-mal mit 96-%igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Dann wurden die Papierstückchen für die sog. "G-Reaktion" auf Haushaltsfolie gelegt und mit 1 % Dimethylsulfat in 50 mM NH<sub>4</sub>-Formiat (pH 3,5) getränkt. Ein Überschuss an Flüssigkeit sollte vermieden werden. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde das Papier mit Folie abgedeckt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Dimethylsulfat kommt es zu einer partiellen Methylierung an den Guanosin-Basen der eingesetzten DNA-Sonde. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Papierstücke in kaltem (-20 °C), 96-%igem Alkohol aufgenommen. Dann folgten Waschschrte jeweils 5-mal mit 70-%igem Alkohol bzw. destilliertem Wasser und erneut mit Alkohol. Anschließend wurden die Papierstücke getrocknet.

Im nächsten Schritt erfolgte die Spaltung der DNA-Sonde an den methylierten Guanosinen durch Piperidin. Hierzu wurden die Papierstücke in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert und mit 1 M Piperidin für 30 min bei 100 °C erhitzt. Piperidin wurde dann durch erneutes Waschen mit Ethanol und Wasser entfernt (s. o.) und die Papierstücke getrocknet. Um die DNA zu eluieren wurden die Papierstücke in Pipettenspitzen gegeben, 50 µl 1 M NaCl / 10 mM EDTA und 5 µl tRNA als Träger zugesetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Eluat in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die DNA wurde dann mit 96-%igem Alkohol präzipitiert, mit 70-%igem Alkohol gewaschen und getrocknet. Nach Aufnahme in Formamid wurde die Probe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Auf dem mit dem Gel belichteten Film lassen sich dann anhand der unterschiedlich langen radioaktiven Fragmente die Positionen der G-Nukleotide ermitteln.

## **5.2.7 Bakterienkulturen**

### *5.2.7.1 Übernachtskulturen*

Für die spätere Isolierung von Plasmiden wird eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte in 3 ml Selektionsmedium (LP-Medium mit Ampicillin) eingesetzt und bei 37 °C mindestens 5 Std. geschüttelt. Soll eine größere Menge an DNA präpariert wer-

den (Maxiprep), kann die aufgewachsene 3-ml-Kultur in eine große Flasche mit 250-500 ml Selektionsmedium überführt werden, die dann wiederum über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert wird.

#### 5.2.7.2 *Erhaltungskulturen*

Zur Konservierung einer Bakterienkultur werden zu einer Übernachtskultur 0,5 Volumen 86-%iges Glycerin gegeben. Der Ansatz wird gut gemischt und bei -70 °C gelagert.

#### 5.2.7.3 *Herstellung kompetenter Bakterien*

Eine 5-ml-Übernachtskultur wird mit LB-Medium (s. 5.1.5) im Verhältnis 1:100 verdünnt und so lange im Schüttler bei 37 °C inkubiert, bis die bei 550 nm gemessene optische Dichte (OD) der Bakterienkultur 0,50-0,55 erreicht. Dann werden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und im Anschluss bei 4 °C mit 2500 rpm abzentrifugiert. Dann wird das Bakterienpellet in 40 ml eisgekühltem RF1-Puffer (s. 5.1.5) aufgenommen, 15 min auf Eis gestellt und erneut abzentrifugiert. Jetzt resuspendiert man in 7 ml kaltem RF2-Puffer (s. 5.2.5) und inkubiert wieder 15 min auf Eis.

Für den späteren Gebrauch können Aliquots in Mikroreaktionsgefäßen in einem Gemisch aus Trockeneis und Ethanol eingefroren und bei -70 °C gelagert werden.

Die Transformationsrate (s. 5.2.7.4) und damit Güte der kompetenten Bakterien kann mit verschiedenen Plasmidkonzentrationen getestet werden und sollte bei ungefähr  $10^7$  Kolonien pro µg eingesetzter DNA liegen.

#### 5.2.7.4 *Transformation*

Die bei -70 °C gelagerten kompetenten Bakterien werden langsam (über ca. 20 min) auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Bakterienlösung gibt man das zu transformierende Plasmid, mischt vorsichtig und inkubiert 30 min auf Eis. Dann wird der Transformationsansatz 1 min bei 42 °C "geschockt", 1 min auf Eis gestellt, mit 1 ml Medium (*ohne* Antibiotikum) aufgefüllt und etwa eine halbe Stunde bei 37 °C geschüttelt. Etwa 100-500 µl der

Bakteriensuspension werden dann auf vorbereiteten Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen, bei Raumtemperatur getrocknet, in Haushaltsfolie eingewickelt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nur Bakterien, die das Ampicillin-Resistenzgen im eingesetzten Plasmid enthalten, können sich vermehren und sichtbare Kolonien bilden.

#### 5.2.7.5 *Präparation von Plasmid-DNA*

##### 5.2.7.5.1 Miniprep

3 ml Selektionsmedium (LP-Medium mit Ampicillin) werden mit einer Bakterienkolonie beimpft und für mindestens 5 Std. bei 37 °C geschüttelt. Die Zellsuspension wird dann in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße transferiert und durch 30 s Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert. Im Anschluss wird unter Verwendung des Jetprep-Plasmid-Miniprep-Kit nach Herstellermanuskript verfahren. Fertige DNA wurde in der Regel mit 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen, im Restriktionsverdau eingesetzt und sequenziert.

##### 5.2.7.5.2 Maxiprep

Zunächst werden die Bakterien einer großen Übernachtskultur (250-500 ml) durch 10 min Zentrifugation im JA-10 Rotor bei 5000 rpm pelletiert. Das Zellpellet wird dann in dem ersten Puffer eines Reaktions-Kits resuspendiert. Die weitere Präparation erfolgte entsprechend der Instruktionen des Herstellers. Es wurden für diese Arbeit der Quiagen-Maxi-Kit sowie der Nucleobond-AX-Kit verwendet (s. 5.1.6). Das DNA-Pellet wurde am Schluss in 500 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst, die DNA-Konzentration bestimmt und die DNA durch Restriktionsverdau und nachfolgende Gelelektrophorese analysiert.

#### 5.2.8 **Zellkultur**

Die verwendeten EL-4- und Jurkat-T-Zellen wurden in mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS) angereichertem RPMI-Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 5.2.8.1 *Bestimmung der Zellzahl*

Um die Zellzahl der in Suspension befindlichen Jurkat- oder EL-4-Zellen zu bestimmen, werden 20 µl Zellsuspension 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau ("bluestain") versetzt, der alle *toten* Zellen anfärbt. Auf diese Weise kann unter dem Mikroskop in der Zählkammer dann die Anzahl der hell leuchtenden lebenden Zellen bestimmt werden. Durch Auszählen der Zellen von 16 Quadraten ergab sich nach Multiplikation mit dem Faktor  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor 2 die Dichte der Kultur in Zellen pro ml.

#### 5.2.8.2 *Umsetzung von Zellkulturen*

Wenn Zellen über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden, muss das Medium in regelmäßigen Abständen gewechselt werden, um Stoffwechselendprodukte zu entfernen und die Zellen mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Dazu überführt man die Zellen in sterile Plastikröhrchen und zentrifugiert 5 min bei 1 000 rpm und 37 °C ab. Dann wäscht man das Pellet einmal mit Medium, resuspendiert es in frischem Medium und gibt die Zellen verdünnt auf eine Dichte von ca.  $1 \times 10^5$ /ml zurück in die Kulturgefäße.

#### 5.2.8.3 *Transfektion von DNA in Zellen*

Es gibt verschiedene Verfahren, DNA-Vektoren in Zellen einzuschleusen. Für das für diese Arbeit optimierte Verfahren zur Transfektion von Jurkat-Suspensionszellen sowie adhärennten 293-T-Zellen verwendeten wir das Superfect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen:

Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen auf eine Dichte von etwa  $1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Auf diese Weise erlangen die Zellen eine Dichte von etwa  $2 \times 10^5$  Zellen/ml am Transfektionstag. Vor der Transfektion wird die Zellzahl kontrolliert, und die Zellen werden nach Zentrifugation (5 min bei 1 000 rpm und 37 °C) in frisches Medium aufgenommen. War die Zelldichte noch zu gering, werden die Zellen in weniger Medium resuspendiert, oder eine größere Menge abzentrifugiert, um die richtige Ausgangsdichte zu erhalten.

Die Zellsuspension wird dann in 6-well-Kulturschalen überführt (1,5 ml pro Schale) und im Brutschrank 2-3 Std. bis zur Transfektion inkubiert.

Für den Transfektionsansatz benötigt man Medium *ohne* Antibiotikazusatz, in das zuerst die DNA und dann das Superfect-Reagenz pipettiert wird. Für eine 6-well-Schale rechnet man:

- 4 µg DNA, davon 0,8 µg Reporter-Vektor und 3.2 µg Expressionsvektoren
- mit Medium ohne Antibiotika aufgefüllt auf 75 µl
- Zugabe von 5 µl Superfect-Reagenz.

Nach Zugabe von Superfect wird der Ansatz vorsichtig gemischt (nicht vortexen), 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die vorbereiteten Kulturschalen verteilt. 4-5 Std. nach der Transfektion werden die Zellen induziert (s. 5.2.8.4). Der "Luciferase-Assay" wird nach 20-24 Std. durchgeführt (s. 5.2.8.5).

Es sollte darauf geachtet werden, dass für den Transfektionsansatz die original "Safe-lock"-Eppendorf Reaktionsgefäße verwendet werden, weil anderes Plastikmaterial eventuell das Superfect-Reagenz in seiner Wirkung beeinträchtigt. Mit dieser Methode wurden von uns Transfektionsergebnisse bis zu 95% erzielt.

#### 5.2.8.4 *Induktion der Zellen*

Nach etwa 4-5 Std. werden die Zellen induziert. Dazu werden von dem Phorbolster TPA (12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) 20 ng/µl zugegeben. Ionomycin soll eine Endkonzentration von 0,5 µM erreichen. Cyclosporin A (CsA) wird in der Regel in einer Konzentration von 0,1 µg/ml eingesetzt.

#### 5.2.8.5 *Der "Luciferase-Assay"*

Ist ein Reporter-gen-Vektor in die Zelle eingeschleust, steuert der im Vektorkonstrukt enthaltene, zu untersuchende Promotor die Transkription des Reportergens. Durch die gleichzeitige Transfektion von Transkriptionsfaktoren kann die Aktivität des Promotors beeinflusst werden. Die entstehenden Reporter-gentranskripte werden von der Zelle

selbst im Zytoplasma translatiert. Das Genprodukt kann aus dem Cytoplasma gewonnen und quantifiziert werden.

Viele Vektoren enthalten als Reportergen die *Leuchtkäfer-Luciferase*. Diese Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons. Die Stärke der Chemolumineszenzreaktion kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden.

Der "Luciferase-Assay" wurde etwa 20-24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. Zunächst werden die Zellen mit ihrem Medium in Reaktionsgefäße überführt ("geerntet"). Bei adhärent wachsenden Zellen ist ein mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Mediums nötig, um die Zellen vollständig vom Untergrund zu lösen. Nach kurzer Zentrifugation (1 min bei 3 000 rpm) wird das Medium entfernt und das Zellpellet mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Dann werden die Zellen durch kurzes Vortexen in 100 µl des "Harvesting"-Puffers (s. 5.1.4) suspendiert und durch diesen lysiert. Die cytoplasmatischen Bestandteile lassen sich dann durch 4 min Zentrifugation bei 12 000 rpm abtrennen. Die Höhlungen einer Mikrotiterplatte werden mit je 50 µl "Assay-Puffer" (s. 5.1.4) und 50 µl der Zelllysate gefüllt. Als Kontrolle werden Ansätze mit beiden Puffern mitgeführt, die kein Lysat enthalten. Dann werden 100 µl 5 mM Luciferin als Substrat zugesetzt, und die Reaktion wird im Luminometer gemessen.

### **5.2.9 Herstellung von Proteinextrakten**

Proteinextrakte sollten grundsätzlich im Kühlraum oder Eisbad hergestellt werden. Lösungen sind eisgekühlt zu verwenden.

#### *5.2.9.1 Gesamtzellextrakte für "Western Blot"-Experimente*

Gesamtzellextrakte wurden für diese Arbeit sowohl aus Kulturzellen als auch aus frisch isolierten Zellen von Mäuse-Thymi gewonnen. Hierzu wird der Thymus zunächst entnommen, mit Hilfe eines kleinen Siebes ("cell strainer") zerrieben, und die Zellen werden in Medium aufgenommen. Jetzt kann mit ihnen wie mit den in Suspension befindlichen Kulturzellen verfahren werden.

Zuerst werden die Zellen 5 min bei 1 500 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in 1 ml eisgekühltem PBS (s. 5.1.4) resuspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß über-

führt. Nach kurzer Zentrifugation (30 s) wird der Überstand entfernt, zu dem Zellpellet werden ca. 3 Vol. eiskalter KLB-Puffer (s. 5.1.4) gegeben und durch Vortexen gut gelöst. Dann werden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und, um die Zellmembranen aufzubrechen, zwischendurch mehrmals geschüttelt. Anschließend zentrifugiert man 10 min bei 12 000 rpm. Der so gewonnene Überstand kann als Gesamtzellextrakt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder nach Proteinbestimmung und Konzentrationsabgleich direkt mit Laemmli-Puffer versetzt im "Western Blot" verwendet werden.

#### 5.2.9.2 *Kernproteine zum Einsatz für "Bandshift"-Experimente*

Für die Herstellung von Kernextrakten werden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Zuerst wird die Zellsuspension 5 min bei 1 500 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und das Pellet dann in 1 ml "Puffer A" (s. 5.1.4) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis werden die geschwollenen Zellen im Kühlraum durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (s. 5.1.2) mit einer 1 ml Spritze lysiert. Die Kerne bleiben hierbei größtenteils intakt und können nun durch 2-minütige Zentrifugation bei 8 000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  vom cytoplasmatischen Überstand abgetrennt werden. Die so erhaltenen *cytoplasmatischen* Proteine können für Proteinanalysen oder zur RNA-Isolierung eingesetzt werden.

Das *Kernpellet* wird noch zwei weitere Male mit 1 ml "Puffer A" gewaschen und schließlich in ca. 2 Vol. "Puffer C" resuspendiert. Die in der Salz-Fraktion löslichen Kernproteine werden dann durch 15-minütiges, kräftiges Schütteln im Kühlraum extrahiert. Daraufhin werden die Kernproteine durch 15 min Zentrifugation bei 12 000 rpm von restlichen hochmolekularen Bestandteilen gereinigt und in saubere Mikroreaktionsgefäße überführt. 2  $\mu\text{l}$  dienen nun zur Proteinbestimmung. Gelagert werden die Kernextrakte nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.2.9.3 *Präparation rekombinanter GST-Proteine aus E. coli*

Um in "Footprinting"-Experimenten (s. 5.2.11.2) die Bindungsstellen für NF-AT-Transkriptionsfaktoren identifizieren zu können, ist der Einsatz einer großen Menge von

gereinigtem NF-AT-Protein nötig. Um dieses Protein herzustellen, wurde zunächst ein GST-Expressionsvektor kloniert (pGex-NF-AT1, s. 5.1.13.3), der nach Transformation in Bakterien zur Expression eines Fusionsprotein aus GST und NF-AT1 führt. Der GST-Anteil ermöglicht hierbei die Isolation des Proteins durch die Affinität von GST zu Glutathion-Agarose-"beads".

Zur Gewinnung des Proteins aus *E. coli* wird eine entsprechende Übernachtskultur (s. 5.2.7.1) zunächst mit 2x YT-Medium 1:10 verdünnt, Glucose bis zu einer Konzentration von 0,1 % zugegeben und bei 37 °C im Schüttler so lange inkubiert wird, bis die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) zwischen 1 und 2 liegt. Dann wird durch Zugabe von IPTG (0,2 mM) die Expression des rekombinanten Proteins induziert und der Ansatz weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt werden die Zellen 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in PBS-MM (s. 5.1.4) gelöst. Dann wird die Suspension auf Eis gestellt und bei maximaler Amplitude in 0,5-s-Intervallen für 5 min sonifiziert. Jetzt wird die Zellsuspension 30 min bei 4 °C und 5000 rpm abzentrifugiert und dann 50 % GST-"beads" (ca. 1 ml "beads" für 250 ml Zellen) zugegeben und für eine halbe Stunde im Kühlraum unter ständiger Bewegung inkubiert.

Im Anschluss werden die "beads" abzentrifugiert, zweimal mit PBS-MM gewaschen und mit 1 ml PBS-MM in Mikroreaktionsgefäße überführt. Nach einem erneuten Waschschrift wird schließlich PBS komplett entfernt.

Um das GST-Fusionsprotein zu eluieren, kann entweder eine Glutathion-Lösung (30 mg Glutathion auf 10 ml 25 mM Tris, pH 8,0) verwendet werden oder mit Laemmli-Puffer 10 min aufgekocht werden. Das Protein wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel kontrolliert.

### **5.2.10 Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten**

Es werden 1-10 µl Proteinextrakt in 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 mit ddH<sub>2</sub>O) pipettiert, die Lösung wird gut gemischt und die Extinktion im Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Der Proteingehalt kann dann über eine mit bekannten Konzentrationen von BSA erstellte Eichgerade ermittelt werden.



## 5.2.11 Untersuchung von DNA/Protein-Interaktionen

### 5.2.11.1 Der "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA)

#### 5.2.11.1.1 "Annealing" von Oligonukleotiden

Um die Bindung von Proteinen an DNA-Motive zu untersuchen, werden komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide mit der zu untersuchenden Sequenz zu einem Doppelstrang zusammengefügt ("annealing"). Hierzu werden die kommerziell erworbenen Einzelstrang-Oligonukleotide in einer Pufferlösung aufgenommen und in einen auf Maximaltemperatur (knapp 100 °C) vorgeheizten Heizblock gestellt. Ein Ansatz enthielt in der Regel:

50 µl Oligonukleotid 1 (upper)
50 µl Oligonukleotid 2 (lower)
12 µl 10x Orange-Puffer (kommerzieller Restriktionspuffer)
8 µl ddH <sub>2</sub> O

Der Heizblock wurde dann - nach Abschaltung - abgedeckt über Nacht in den Kühlraum gestellt.

#### 5.2.11.1.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der *E. coli* DNA-Polymerase I können 3'-Enden von DNA-Fragmenten aufgefüllt werden. Dabei wird der komplementäre 5'-Überhang als "template" benutzt. Zur radioaktiven Markierung von bereits durch "annealing" aneinandergelagerten Oligonukleotiden wurde folgender Ansatz hergestellt:

1,0 µl "Annealing"-Mix (50 ng DNA)
1,5 µl 10x Klenow-Puffer oder Orange Puffer
0,5 µl dNTP-Mix "ohne C", entspricht je 2 nmol dGTPs , dTTPs, dATPs
1,5 µl [ $\alpha^{32}$ P]dCTP
0,5 µl Klenow-Polymerase, mit ddH <sub>2</sub> O auf 15 µl aufgefüllt.

Nach Zugabe des Enzyms wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  "blue juice" (s. 5.1.4) gestoppt.

Unphosphorylierte 5'-Enden können alternativ auch mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK) markiert werden. Der Ansatz für diese Reaktion enthält in 20  $\mu\text{l}$  50 ng DNA, 2  $\mu\text{l}$  PNK-Puffer, 2  $\mu\text{l}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]dATP und eine Einheit T4-Polynukleotidkinase. Diese Reaktion wird eine Stunde bei 31 °C inkubiert und dann gestoppt.

Um den jeweiligen Ansatz von freien Nukleotiden zu befreien, wird er auf ein 10-%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und für ca. 3 Std. bei 150 V aufgetrennt. Die Bande des markierten Oligonukleotides wird dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA eluiert (s. 5.2.4.2). Die Aktivität der radioaktiven Probe wird im Szintillationszähler mittels Cerencov-Messung bestimmt.

#### 5.2.11.1.3 Der "Bandshift-Assay"

Um festzustellen, ob ein Protein *in vitro* an eine bestimmte DNA-Sequenz bindet, werden die Proteine mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert, die die entsprechenden Sequenzmotive enthalten. Entstehende Komplexe werden an einem Polyacrylamidgel (s. 5.2.3.2) aufgetrennt und sichtbar gemacht. Wird DNA von Protein gebunden, wandert sie langsamer im Gel und ist somit leicht von ungebundener DNA zu trennen. Unspezifische Bindung an die Probe wird durch Zusatz eines vielfachen Überschusses eines Kompetitors - wie poly(dI/dC) oder auch sonifizierter Lachs-Spermien-DNA - verhindert. Um die spezifische Bindung zusätzlich zu beweisen, kann das entsprechende, *nichtmarkierte* Oligonukleotid zugesetzt werden, das mit der markierten Probe um die Proteinbindung konkurriert und die Entstehung der spezifischen radioaktiv markierten Komplexe verhindert. Ein EMSA-Ansatz bestand in der Regel aus:

Probe	Kompetitoren	Kernproteine	3x Bindepuffer	poly(dI/dC)	ddH <sub>2</sub> O
2 $\mu\text{l}$ (5 000 cpm)	1 $\mu\text{l}$ (25 bzw. 50 ng)	ca. 4 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	auf 15 $\mu\text{l}$

Die radioaktive Probe wurde zuletzt zugegeben, und die fertigen Ansätze wurden etwa eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurden die Reaktionen auf ein bereits 2 Std. bei 220 V vorgelaufenes 5-%iges Polyacrylamidgel parallel zu einem Farbmarker auf-

getragen. Nach dem Lauf (ca. 2,5 Std. bei 220 V in 0,4 TBE) wird das Gel vorsichtig von einer Glasplatte befreit und ca. 15 min in eine Fixierungslösung mit 10-%iger Essigsäure gelegt. Dann wird eine doppelte Lage Whatman-Papier auf das Gel gelegt, kurz angestrichen und von der Platte abgezogen. Mit Haushaltsfolie bedeckt wird das Gel nun für etwa  $\frac{1}{2}$ -1 Std. bei 80 °C auf dem Gelrockner getrocknet. Dann wird der EMSA entweder auf Film, oder zur schnellen Analyse, auf eine Phosphor-Imager-Platte aufgelegt.

#### 5.2.11.2 "Footprinting"

Durch das sogenannte "Footprinting" lassen sich Stellen der DNA identifizieren, an denen ein Protein-Kontakt besteht, weil der Schutz der Proteinbindung den Abbau der DNA durch DNase verhindert.

Für den Versuch wurde eine einsträngige, radioaktiv markierte DNA-Sonde eingesetzt (s. 5.2.6.4). Es wurde zunächst ein Reaktionsansatz mit der DNA-Sonde, dem unspezifischen Kompetitor poly(dI/dC), 10 % PVP und TE-Puffer präpariert und auf Eis gestellt. Als Protein wurde ein GST-Fusionsprotein für NF-AT1 (s. 5.2.9.3) sowie das GST-Protein alleine in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Um die Komplexbildung der DNA mit dem Protein zu erleichtern, wurden die Proben 60 min in dem Inkubationspuffer "Puffer Z" (s. 5.1.4) inkubiert. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 25 µl des radioaktiven Mixes, 1 µl Protein und 20 µl Pufferlösung.

Dann wurden die Proben vom Eis genommen und nach 2 min mit 50 µl 5 mM CaCl<sub>2</sub> / 1,5 mM EDTA und 10 µl DNase I versetzt. Nach Mischen der Probe wurde erneut 2 min inkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe von 100 µl "Stop-Puffer" (s. 5.1.4) beendet. Dann erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Präzipitation. Nach dem Waschen des Pellets wurde es in 3 µl Formamid aufgenommen, und die Probe auf ein denaturierendes, harnstoffhaltiges (7 %) Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### 5.2.11.3 "Chromatin-Immunopräzipitation" (ChIP)

Um die Bindung von Kernproteinen an die DNA auch *in vitro* nachzuweisen, werden Zellen mit einer Formaldehyd-Lösung (s. 5.1.4) behandelt, die dazu führt, dass die Pro-

teine auch bei der späteren DNA-Isolierung fixiert bleiben ("crosslink"). Das Experiment wurde mit Thymus-Zellen von etwa 4 Wochen alten Mäusen durchgeführt. Zuerst wurde der entnommene Thymus durch ein Zellsieb ("cell-strainer") gestrichen und in DMEM-Medium suspendiert. Im Anschluss daran wurden je 10 ml der Thymus-Zellsuspension mit 1 ml Formaldehyd-Lösung 15 bzw. 45 min auf Eis inkubiert. Die Formaldehyd-Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin bis zu einer Endkonzentration von 0,125 M gestoppt.

Dann wurde die Zellsuspension 5 min bei 4 °C und 1 500 rpm abzentrifugiert, das Pellet einmal mit kaltem PBS (s. 5.1.4) gewaschen, in 10 ml des "Lysis-Puffers" (s. 5.1.4) resuspendiert und im Kaltraum für 10 min inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen erneut pelletiert, in "Puffer I" aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur zum Schwellen gebracht. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in "Puffer II" resuspendiert und bei maximaler Einstellung 10-mal 20 s sonifiziert. Danach wird das Volumen neu bestimmt, Sarkosyl (0,5%) und CsCl (576,8 µg/ml) werden zugegeben, und es wird 36 Std. im SW 55 TI Rotor bei 40 000 rpm zentrifugiert.

Aus den Zentrifugenröhrchen werden dann 0,5-ml-Fractionen durch vorsichtiges Punktieren des Bodens in Mikroreaktionsgefäße gesammelt. Auf einem 1-%igen Agarosegel werden die DNA-haltigen Ansätze identifiziert und in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Dann wird in 5 Liter kaltem "Dialyse-Puffer" (s. 5.1.4) zweimal (4 Std. bzw. über Nacht) in 25-mm-Membranen dialysiert.

Je 500 µl Chromatin-Lösung wird dann an RIPA-Puffer-Konditionen angeglichen (s. 5.1.4), 5 µg des gewünschten Antikörpers werden für die Präzipitation zugegeben, und auf dem Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag werden 40 µl in RIPA-Puffer gequollene und über Nacht mit Lachs-Spermien-DNA geblockte Protein-"beads" zu dem Präzipitationsansatz dazugegeben und für weitere 3 Std. im Kühlraum geschüttelt. Dann wird mehrmals mit RIPA-Puffer unter Zusatz von 0,5 M NaCl und 100 µg/ml t-RNA gewaschen. Schließlich wird durch Zusatz von 100 µl TE-Puffer mit 0,5 % SDS und Proteinase K (Endkonzentration 200 µg/ml) während der Inkubation bei 55 °C 3 Std. und 65 °C über Nacht die DNA-Bindung der Proteine wieder aufgehoben. Die DNA-Ansätze werden nun durch zweimalige Phenol/Chloroform- und einmalige Chloroform-Extraktion gereinigt (s. 5.2.1.2) und mit

20 µg Glykogen präzipitiert. Sie können dann, in 100 µl TE gelöst, für die PCR eingesetzt werden:

<u>PCR-Ansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>	
Immunopräzipitierte DNA	20,0 µl	94 °C	3 min
10 mM dNTPs	1,0 µl	94 °C	30 s
10x PCR-Puffer (mit MgCl <sub>2</sub> )	5,0 µl	56 °C	30 s 30 Zyklen
Primer #1	0,5 µl	72 °C	30 s
Primer #2	0,5 µl	72 °C	2 min
TaqPolymerase	0,5 µl	4 °C	→ ∞
ddH <sub>2</sub> O	22,5 µl		

#### 5.2.11.4 Der Bio-"Pull down"-Assay

Im "Pull down"-Experiment kann das Bindungsverhalten von Proteinen an ein DNA-Motiv untersucht werden. Eine Biotin-Markierung der Oligonukleotide (s. 5.1.12) ermöglicht eine Kopplung der DNA an Streptavidin-Perlen (s. 5.1.3). Dadurch kann die DNA nach Inkubation (bei 4 °C, 30 min auf dem Schüttler) mit Proteinextrakten (s. 5.2.9.2) mittels Zentrifugation (bei 4 °C mit 2500 rpm, 5 min) isoliert werden. Im nächsten Schritt werden dann die gebundenen Proteine eluiert und somit selektiv gewonnen. Die Identifikation dieser Proteine erfolgt nun mit Hilfe eines "Western Blots" (s. 5.2.12).

#### 5.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und "Western Blot"

Die Fraktionierung und Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgt mit denaturierenden Polyacrylamidgelen. Sie bestehen aus einem 4-%igen Sammelgel und einem 6- bis 15-%igen Trenngel mit unterschiedlichen pH-Werten.

Trenngel (10 ml)	1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30 %)	2,0-5,0 ml
	10 % SDS	0,1 ml
	ddH <sub>2</sub> O	5,3-2,3 ml
	10 % APS	0,1 ml
	TEMED	8,0 µl

Sammelgel (10 ml)	1,0 M Tris pH 6,8	1,25 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (30 %)	1,7 ml
	10 % SDS	0,1 ml
	ddH <sub>2</sub> O	6,8 ml
	10 % APS	0,1 ml
	TEMED	10,0 µl

Zuerst wird eine Glasplatte, die mit zwei "Spacern" von einer ebenso großen Keramikrückfläche getrennt ist, zum Gießen des Gels in eine Vorrichtung senkrecht eingespannt. Dann wird die Trenngel-Lösung hergestellt und so eingegossen, dass die Platte zu etwa  $\frac{3}{4}$  gefüllt ist. Das Trenngel wird mit einem Butanol/Wasser-Gemisch überschichtet, damit es gleichmäßig polymerisiert. Ist das Gel fest, gießt man das Gemisch wieder ab und füllt die Platte bis zum Rand mit Sammelgel-Lösung. Dann wird der Kamm zur Aussparung der Ladetaschen eingesetzt.

Zur Auftrennung der Proteine in dem SDS-Gel verwendet man einen glycinhaltigen Laufpuffer. Der isoelektrische Punkt von Glycin liegt ungefähr bei einem pH von 6. Bei niedrigem pH liegt Glycin deshalb in protonierter und bei höherem pH in anionischer Form vor. Im Sammelgel mit seinem niedrigen pH-Wert können deshalb die Chlorid-Ionen als Leitonen schneller wandern als die protonierten Glycinionen (Folgeionen), und es kommt zur Ladungstrennung. Dadurch entsteht lokal eine erhöhte Spannung, die dazu führt, dass die Proteine beschleunigt werden und unabhängig von der Größe fast zur gleichen Zeit das Trenngel erreichen. Im Trenngel führt nun der höhere pH-Wert dazu, dass Glycin in die anionische Form wechselt und genau so schnell im elektrischen Feld wandert, wie das Chlorid-Ion. Auf diese Weise werden die Proteine jetzt nach ihrer Größe aufgetrennt.

Für die Analyse im "Western Blot" wurden in der Regel 10 bis 20 µg der Proteinextrakte (s. 5.2.9) eingesetzt. Zuerst wird dem Extrakt Laemmli-Puffer zugesetzt, nach gutem Mischen werden die Proteine dann im Heizblock bei 100 °C 5 min denaturiert. Im Anschluss daran wird kurz zentrifugiert und das Gel geladen. Der Lauf erfolgt bei 10 V/cm mit SDS-Elektrophorese-Puffer mit 0,1% SDS.

Nach der Elektrophorese wird die Glasplatte vorsichtig entfernt, das Gel abgezogen und auf eine mit Transferpuffer (s. 5.1.4) befeuchtete Nitrocellulose-Membran gelegt. Diese wird zwischen feuchtes Whatman-Papier eingelegt und über Nacht in Transferpuffer bei 400 V geblottet.

Am nächsten Tag können die Proteine auf der Membran zunächst mit Ponceau-Rot sichtbar gemacht werden. Danach wäscht man die Membran zur Entfärbung mit ddH<sub>2</sub>O und beginnt den spezifischen Proteinnachweis. Zum Blockieren unspezifischer Bindung inkubiert man die Membran zunächst für eine Stunde in 5 % Milchpulver in PBS mit 0,05 % Tween. Dann wird der erste, *spezifische* Antikörper, in entsprechender Milchlösung verdünnt, auf die Membran gegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Dann wird die Membran mehrere Male in PBS mit 0,05 % Tween gewaschen (einmal 15 min und dreimal 5 min) und schließlich mit dem *sekundären* Antikörper, der gegen den ersten gerichtet und an Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Im Anschluss daran wird die Membran wie zuvor gewaschen.

Um die spezifische Proteinbindung sichtbar zu machen, wurde das ECL-System eingesetzt (s. 5.1.6). Mit Hilfe der ECL-Komponenten kann man durch Lichtemission Antigene detektieren, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper gebunden sind. Die Peroxidase katalysiert im alkalischen Milieu die Oxidation von Luminol. Wenn Luminol in den Grundzustand zurückfällt, wird Licht erzeugt, das durch die Exposition eines Filmes sichtbar gemacht werden kann. Diese Reaktion erfolgt sehr schnell mit einem Maximum bei 5-20 min und hat eine Halbwertszeit von etwa 60 min.

Nach dem letzten Waschen wird die Membran angetrocknet und zwischen eine Klarsichtfolie eingelegt. Eine 1:1-Mischung beider ECL-Komponenten wird eine Minute auf die Membran gegeben und dann ein Film angelegt. Je nach Stärke des erwarteten Signals werden verschiedene Expositionen unterschiedlicher Dauer durchgeführt.

### 5.2.13 RNA-Präparation und "RNA-Protection-Assay"

#### 5.2.13.1 Gewinnung von RNA

Für die RNA-Präparation wurde das Trizol-Reagenz der Firma Gibco nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zusätzlich wurde, um Gewebezellen zu homogenisieren, der "Rneasy-Quiashredder" von Quiagen eingesetzt.

#### 5.2.13.2 Der "RNase-Protection-Assay"

Die Durchführung des "RNase-Protection-Assays" (Riboquant) erfolgte mit Hilfe des Kits von Pharmingen in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers. Mit Hilfe des spezifischen Primers für den proximalen *lck*-Promotor wurde zur Herstellung der sequenzspezifischen RNA-Sonde genomische DNA amplifiziert und in einen Transkriptionsvektor des T7-Bakteriophagen (s. 5.1.13.4) kloniert. Durch die Transkription mit der Bakteriophagen-RNA-Polymerase und radioaktiv markierten Nukleotiden entstand eine große Anzahl radioaktiver RNA-Moleküle mit der zu dem Typ-I-Transkript komplementären Sequenz. Bei der Inkubation mit RNA lagern sich korrespondierende RNA-Stränge aneinander, die vor dem Abbau durch RNase geschützt sind. Die zusammengelegerten Komplexe können durch die radioaktive Markierung der Sonde nach Auftrennung auf einem denaturierenden Gel sichtbar gemacht werden.

## 5.3 Abkürzungen

$\alpha$ -	.....	Anti-
A	.....	Adenosin
Abb.	.....	Abbildung
Adh	.....	Alkoholdehydrogenase
AIDS	.....	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AP-1	.....	Activator Protein 1
bp	.....	Basenpaare



bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
C	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium(-Ion)
CD	cluster of differentiation, cluster determinant
cDNA	copy-DNA
CHIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cm	Centimeter
cpm	counts per minute
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerin
DBD	DNA-bindende Domäne
DC-Folie	Dünnschicht-Chromatographie-Folie
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotide
dI/dC	desoxy-Inositol/desoxy-Cytosin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DN-Zelle	"doppelt negative"-Zelle
DP-Zelle	"doppelt positive"-Zelle
EBE	Ets-bindendes Element
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fetales Kälberserum
FK 506	Tacrolimus
G	Guanin
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HMG	High Mobility Group
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin

IP <sub>3</sub> .....	Inositoltrisphosphat
kb .....	Kilobasen
l .....	Liter
<i>lck</i> .....	lymphoid T-cell protein tyrosine kinase
µg .....	Mikrogramm
M .....	molar
MHC .....	major histocompatibility complex
MHC .....	Haupthistokompatibilitätskomplex
min .....	Minute
ml .....	Milliliter
mM .....	millimolar
mRNA .....	Messenger-RNA
NF-AT .....	Nuclear Factor of activated T-cells
nm .....	Nanometer
OD .....	optische Dichte
PAGE .....	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR .....	Polymerase Kettenreaktion
PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PKC .....	Proteinkinase C
PNK .....	Polynukleotidkinase
Pos. ....	Position
PTK .....	Proteintyrosinkinase
r.l.u. ....	relative luciferase units
RNA .....	Ribonukleinsäure
rpm .....	rounds per minute
s .....	Sekunde
s. ....	siehe
SAP .....	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SH .....	<i>src</i> -homology
sog. ....	sogenannt
SP-Zelle .....	"single positive"-Zelle (trägt CD4 oder CD8)

Std.	.....	Stunde
T	.....	Thymin
TAD	.....	transaktivierende Domäne
TCR	.....	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	.....	T-Helferzelle
Tyr	.....	Tyrosin
U	.....	Unit (Enzym-Einheit)
V	.....	Volt
Vol.	.....	Volumen
wt	.....	wildtyp
z. B.	.....	zum Beispiel

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abraham, K.M., S.D. Levin, J.D. Marth, K.A. Forbush, R.M. Perlmutter (1991). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88, 3977-3981.
2. Abraham, K.M., S.D. Levin, J.D. Marth, K.A. Forbush, R.M. Perlmutter (1991). J. Exp. Med. 173, 1421-1432.
3. Adler, H.T., P.J. Reynolds, C.M. Kelley, B.M. Sefton (1988). J. Virol. 62, 4113-4122.
4. Allen, J.M., K.A. Forbush, R.M. Perlmutter (1992). Mol. Cell. Biol. 12, 2758-2768.
5. Amrein, K.E., B.M. Sefton (1988). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85, 4247.
6. Appleby, M.W., J.A. Gross, M.P. Cooke, S.D. Levin, X. Quian, R.M. Perlmutter (1992). Cell 70, 751-763.
7. Aramburu, J., A. Rao, C. Klee (2000). Curr. Top. Cell. Regul. 36, 237-294.
8. Baldari, C.T., A. Heguy, J.L. Telford (1993). J. Biol. Chem. 268, 2693-2698.
9. Baldari, C.T., M.M. Di Somma, E. Milia, M. Bergman, J.L. Telford (1995). Eur. J. Immunol. 25, 919-925.
10. Baniyash, M., P. Garcia-Morales, E. Luong, L.E. Samelson, R.D. Klausner (1988). J. Biol. Chem. 263, 18255.
11. Brabletz, T., I. Pietrowski, E. Serfling (1991). Nucleic. Acids Res. 19, 61-67.
12. Brickel, P.M. (1992). Crit. Rev. Oncogenesis 3, 401-446.
13. Brown, M.T., J.A. Cooper (1996). Biochim. Biophys. Acta, 1287, 121-149.
14. Bucher O., H. Wartenberg (1997). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 12. Auflage, Verlag Hans Huber, 11-12.
15. Buckland, J., D.J. Pennington, L. Bruno, M.J. Owen (2000). Eur. J. Immunol. 30, 8-18.
16. Cantrell, D.A., K.A. Smith (1984). Science 224, 1312-1316.
17. Casnellie, J.E., M.L. Harisson, K.E. Hellshom, E.G. Krebs (1983). J. Biol. Chem. 258, 10738-10742.
18. Chaffin, K.E., C.R. Beals, T.M. Wilkie, K.A. Forbush, M.I. Simon, R.M. Perlmutter (1990). EMBO J. 9, 3821-3829.

19. Chan, I.T., A. Limmer, M.C. Louie, E.D. Bullock, W.P. Fung Leung et al. (1993). *Science* 261, 1581-1584.
20. Chen, J.H. (1985). *Mol. Cell. Biol.* 5, 2993-3000.
21. Cho, Y.-S., M.-K. Han, Y.B. Choi, Y. Yun, J. Shin, U.-H. Kim (2000). *J. Biol. Chem.* 275, 1685-1690.
22. Chuvpilo, S., M. Zimmer, A. Kerstan, J. Glöckner, A. Avots, C. Escher, C. Fischer, I. Inashkina, E. Jankevics, F. Berberich-Siebelt, E. Schmitt, E. Serfling (1999). *Immunity* 10, 261-269.
23. Chuvpilo, S., V.V. Kravchenko (1984). *FEBS Letters* 179, 34-36.
24. Clerici, M., G.M. Shearer (1994). *Immunol. Today* 15, 875.
25. Clevers, H.C., M.A. Oosterwegel, K. Georgopoulos (1993). *Immunol. Today* 14 (12), 591-596.
26. Corbin, V., T. Maniatis (1989). *Nature (London)* 337, 279-282.
27. Daubenberger, C. (1997). *Start-Sonderheft Immunologie*, Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, 11-28
28. de la Pompa, J.L., L.A. Timmerman, H. Takimoto, A.J. Elia, E. Samper, J. Potter, A. Wakeham, L. Marengere, B.L. Langille, G.R. Crabtree, T.W. Mak (1998). *Nature* 392, 182-186.
29. Di Somma, M.M., B. Majolini, E. Burastero, J.L. Telford, C.T. Baldari (1996). *Eur. J. Immunol.* 26, 2181-2188.
30. Duplay, P., M. Thome, F. Hervé, O. Acuto (1998). *J. Exp. Med.* 179, 1163.
31. Emmel, E.A., C.L. Verweij, D.B. Durand, K.M. Higgins, E. Lacey, G.R. Crabtree (1989). *Science* 246 (4937), 1617-1620.
32. Fehling, H.J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, H. v. Boehmer (1995). *Nature* 375, 795-798.
33. Fehling, H.J., B.M. Iritani, A. Krotkova, K.A. Forbush, C. Laplace, R.M. Perlmutter, H. v. Boehmer (1997). *Immunity* 6, 703-714.
34. Fung-Leung, W.-P., M. Schilham, A. Rahemtulla, T.M. Kündig, M. Vollenweider, J. Potter, W. v. Ewijk, T.W. Mak (1991). *Cell* 65, 443-449.
35. Furue, M., S.I. Katz, Y. Kawakami (1990). *J. Immunol.* 144 (2), 736-739.
36. Garvin A.M., K.M. Abraham, K.A. Forbush, A.G. Farr, B.L. Davison, R.M. Perlmutter (1990). *Int. Immunol.* 2, 173-180.

37. Garvin, A.M., S. Pawar, J.D. Marth, R.M. Perlmutter (1988). *Mol. Cell. Biol.* 8, 3058-3064.
38. Glaichenhaus, N., N. Strastri, D.R. Littman, J.M. Turner (1991). *Cell* 64, 511.
39. Gomez, J., A.C. Martinez, A. Gonzalez, A. Garcia, A. Rebollo (1998). *Oncogene* 17, 1235-1243.
40. Graef, I.A., F. Chen, L. Chen, A. Kuo, G.R. Crabtree (2001). *Cell* 105, 863-875.
41. Graef, I.A., F. Wang, F. Charron, L. Cheng, J. Neilson, M. Tessier-Lavigne, G.R. Crabtree (2003). *Cell* 113, 657-670.
42. Hatakeyama, M., T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S.D. Levin, R.M. Perlmutter, T. Tanigushi (1991). *Science* 252, 1523-1528.
43. Heinemeyer, T., E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A.E. Kel, O.V. Kel, E.V. Ignatieva, E.A. Ananko, O.A. Podkolodnaya, F.A. Kolpakow, N.L. Podkolodny, N.A. Kolchanov (1998). *Nucl. Acids Research* 26, 362-367.
44. Hernández-Hoyos, G., S.J. Sohn, E.V. Rothenberg, J. Alberola-Ila (2000). *Immunity*, Vol.12, 313-322.
45. Ho, I.C., N.K. Bhat, L.R. Gottschalk, T. Lindsten, C.B. Thompson, T.S. Papas, J.M. Leiden (1990). *Science* 250, 814-818.
46. Hodge, N.R., A.M. Ranger, F.C. de la Brousse, T. Hoey, M.H. Grusby, L.H. Glimcher (1996). *Immunity* 4, 397-405.
47. Hoey, T., Y.L. Sun, K. Williamson, X. Xu (1995). *Immunity* 2, 461-472.
48. Horak, I.D., R.E. Gress, P.J. Lucas, E.M. Horak, T.A. Waldmann, J.B. Bolen (1991). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 1996-2000.
49. Jain, J., C. Loh, A. Rao (1995). *Cur. Opin. Immunol.* 7, 333-342.
50. Jain, J., P.G. McCaffrey, V.E. Valge-Archer, A. Rao (1992). *Nature* 356, 801-804.
51. Jain, J., Z. Miner, A. Rao (1993). *J. Immunol.* 151 (2), 837-848.
52. Janeway, C.A., P. Travers (1997). *Immunologie*, 2.Auflage, Spektrum Verlag GmbH, 164.
53. June, C.H., M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, G.L. Schieven, J.N. Siegel, A.F. Phillips, L.E. Samelson (1990). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7722-7726.
54. June, C.H., M.C. Fletcher, J.A. Ledbetter, L.E. Samelson (1990). *J. Immunol.* 144, 1591-1599.

55. Kayser, F.H., K.A. Bienz, J. Eckert, R.M. Zinkernagel (1998). *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 43-104.
56. Kel, A., O. Kel-Margoulis, V. Babenko, N.A. Kolchanov, E. Wingender (1999). *J. Mol. Biol.* 288(3), 353-376.
57. Kiani, A., A. Rao, J. Aramburu (2000). *Immunity* 12, 359-372.
58. Kiani, A., J.P.B. Viola, A.H. Lichtman, A. Rao (1997). *Immunity* 7, 849-860.
59. Kikkawa, U., Y. Nishizulca (1986). *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2, 149-178.
60. Kisielow, P., H. v. Boehmer (1995). *Adv. Immunol.* 58, 87-209.
61. Klausner, R.D., L.E. Samelson (1991). *Cell* 64, 875-878.
62. Lee, L.G., C.R. Connel, S.L. Woo, R.D. Cheng, B.F. Ardle, C.W. Fuller, N.D. Halloran, R.K. Wilson (1992). *Nucl. Acid. Res.* 20, 2471-2483.
63. Leung, S., N.G. Miyamoto (1991). *J. Cell. Physiol.* 148, 344-352.
64. Leung, S., S. McCracken, J. Ghysdael, N.G. Miyamoto (1993). *Oncogene* 8, 989-997.
65. Levenson, J.D., S.A. Ness (1998). *Mol. Cell* 1, 203-211.
66. Levin, S.D., S.J. Anderson, K.A. Forbush, R.M. Perlmutter (1993). *EMBO J.* 12, 1671-1680.
67. Liu, J., J.D. Farmer, W.S. Lene, J. Friedman, I. Weisman, S.L. Schreiber (1991). *Cell* 66, 807-815.
68. Liu, Y., S. Witte, Y.-C. Liu, M. Doyle, C. Elly, A. Altman (2000). *J. Biol. Chem.* 5, 3603-3609.
69. López-Rodríguez, C., J. Aramburu, A.S. Rakeman, P.G. Hogan, A. Rao (1999). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7214-7219.
70. MacDonald, H.R., M. Nabholz, (1986). *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2, 231-253.
71. Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook (1982). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
72. Marshall, C.J. (1995). *Cell* 80, 179-185.
73. Marth, J.D., D.B. Lewis, C.B. Wilson, M.E. Gearn, E.G. Krebs, R.M. Perlmutter (1987). *EMBO J.* 6, 2727-2734.
74. Marth, J.D., J.A. Cooper, C.S. King, S.F. Ziegler, D.A. Tinker, R.W. Overell, E.G. Krebs, R.M. Perlmutter (1988). *Mol. Cell. Biol.* 8, 540.
75. Marth, J.D., R. Peet, E.G. Krebs, R.M. Perlmutter (1985). *Cell* 43, 393.

76. McCracken, S., C.S. Kim, Y. Xu, M. Minden, N.G. Miyamoto (1997). *Oncogene* 15, 2929-2937.
77. McCracken, S., S. Leung, N.G. Miyamoto (1994). *Oncogene* 9, 3609-3615.
78. Miner, J.N., K.R. Yamamoto (1991). *Trends Biochem. Sci.* 16, 423-426.
79. Miyakawa, H., S.K. Woo, S.C. Dahl, J.S. Handler, H.M. Kwon (1999). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2536-2542.
80. Molina, T.J., K. Kishihara, D.P. Siderovski, W. v. Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C.J. Paige, K.U. Hartmann, A. Veillette, D. Davidson, T.W. Mak (1992). *Nature* 357, 161-164.
81. Molkenin, J.D., J.-R. Lu, C.L. Antos, B. Maskham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, E.N. Olson (1998). *Cell* 93, 215-228.
82. Mombaerts, P., J. Iacomini, R.S. Johnson, K. Hernup, S. Tonegawa, V.E. Papaioannou (1992). *Cell* 68, 869-877.
83. Mombaerts, P., S.J. Anderson, R.M. Perlmutter, T.W. Mak, S. Tonegawa (1994). *Immunity* 1, 261-267.
84. Musaro, A., K.J. McCullagh, F.J. Naya, E.N. Olson, N. Rosenthal (1999). *Nature* 400, 581-585.
85. Mustelin, T., K.M. Coggeshall, A. Altman (1989). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6302-6306.
86. Nada, S., M. Okada, A. Mac Auley, J.A. Cooper, H. Nakagawa (1991). *Nature* 351, 69-72.
87. Neurath, M., X. Ma, S. Petterson (1997). *DNA/Protein Interaktionen*, Spektrum Akad. Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin. Kapitel 1, 8, 14.
88. Northrop, J.P., K.S. Ullman, G.R. Crabtree (1993). *J. Biol. Chem.* 268, 2917-2923.
89. Ostergaard, H.L., D.A. Shackelford, T.R. Hurley, P. Johnson, R. Hyman, B.M. Sefton, I.S. Trowbridge (1989). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8959-8963.
90. Oukka, M., I.C. Ho, F.C. de la Brousse, T. Hoey, M.J. Grusby, L.H. Glimcher (1998). *Immunity* 9, 295-304.
91. Peng, S.L., A.J. Gerth, A.M. Ranger, L.H. Glimcher (2001). *Immunity* 14, 13-20.
92. Perlmutter, R.M., J.D. Marth, D.B. Lewis, R. Peet, S.F. Ziegler, C.B. Wilson (1988). *J. Cell. Biochem.* 38, 117-126.



93. Perlmutter, R.M., J.D. Marth, S.F. Ziegler, A.M. Garvin, S. Pawar, M.P. Cooke, K.M. Abraham (1988). *Biochim. Biophys. Acta* 948, 245-262.
94. Quian, D., A. Weiss (1997). *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 205-212.
95. Rahemtulla, A., W.P. Fung-Leung, M.W. Schilham, T.M. Kündig, S.R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C.J. Paige, R.M. Zinkernagel, R.G. Miller, T.W. Mak (1991). *Nature* 353, 180-184.
96. Ranger, A.M., M. Oukka, J. Rengarajan, L.H. Glimcher (1998). *Immunity* 9, 627-635.
97. Ranger, A.M., M.R. Hodge, E.M. Gravallese, M. Oukka, L. Davidson, F.W. Alt, F.C. de la Brousse, T. Hoey, L.H. Glimcher (1998). *Immunity* 8, 125-134.
98. Rao, A. (1994). *Immunol. Today* 15, 274-280.
99. Rao, A., C. Luo, P.G. Hogan (1997). *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747.
100. Rengarajan, J., B. Tang, L.H. Glimcher (2002). *Nat. Immunol.* 3, 48-54.
101. Reynolds, P.J., J. Lesley, J. Trotter, R. Schulte, R. Hyman, B.M. Sefton (1990). *Mol. Cell. Biol.* 10, 4266-4270.
102. Robey, E., B.J. Fowlkes, J.W. Gordon, D. Kioussis, H. v. Boehmer, F. Ramsdell, R. Axel (1991). *Cell* 64, 99-107.
103. Rudd, C.E., J.M. Trevillyan, J.D. Dasgupta, L.L. Wong, S.F. Schlossman (1988). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5190.
104. Rudd, C.E., O. Janssen, K.V.S. Prasad, M. Raab, A. da Silva, J.C. Telfer, M. Yamamoto (1993). *Biochim. Biophys. Acta* 1155, 239-266.
105. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2. Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
106. Samelson, L.E., A.F. Phillips, E.T. Luong, R.D. Klausner (1990). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4358.
107. Samelson, L.E., J.B. Harford, R.D. Klausner (1985). *Cell* 43, 223.
108. Samelson, L.E., M.D. Patel, A.M. Weissman, J.B. Harford, R.D. Klausner (1986). *Cell* 46, 1083.
109. Sartor, O., F.S. Gregory, N.S. Templeton, S. Pawar, R.M. Perlmutter, N. Rosen (1989). *Mol. Cell. Biol.* 9, 2983-2988.
110. Schiller, F. (1984). *Gedichte und Prosa*. 1. Auflage, Manesse Verlag Zürich, 175.

111. Schuh, K., B. Kneitz, J. Heyer, U. Bommhardt, E. Jankevics, F. Siebelt, K. Pfeffer, H.K. Müller-Hermelink, A. Schimpl, E. Serfling (1998). *Eur. J. Immunol.* 28, 2-10.
112. Sen, J., Y. Shinkai, F.W. Als, R. Sen, S.J. Burakoff (1994). *J. Exp. Med.* 180, 2321-2327.
113. Serfling, E., M. Jasin, W. Schaffner (1995). *Trends Genet.* 1, 224-230.
114. Serfling, E., S. Klein-Hessling, R. Marienfeld, M. Neumann, T. Twardzik, A. Avots (1998). The Role of NF-AT and NF- $\kappa$ B Transcription Factors in the control of Il-2 Expression. In Druck.
115. Shaw, A.S., K.E. Amrein, C. Hammond, D.F. Stern, B.M. Sefton, J.K. Rose (1989). *Cell* 59, 627-636.
116. Shaw, J.P., P.J. Utz, D.B. Durand, J.J. Toole, E.A. Emmel, G.R. Crabtree (1988). *Science* 241 (4862), 202-205.
117. Shaw, P., B. Sordat, U. Schibler (1985). *Cell* 40, 907-912.
118. Stefanova, I., V. Horejsi, I.J. Ansotegui, W. Kapp, H. Stockinger (1991). *Science (Wash. DC)* 254, 1016.
119. Stein, P. L., H.-M. Lee, S. Rich, P. Soriano (1992). *Cell* 70, 741.
120. Straus, D.B., A. Weis (1992). *Cell* 70, 585-593.
121. Strominger, J.L. (1989). *Science* 244, 943-950.
122. Sun, G., A.K. Sharma, R.J.A. Budde (1998). *Oncogene* 17, 1587-1595.
123. Takadera, T., S. Leung, A. Gernone, Y. Koga, Y. Takihara, N.G. Miyamoto, T.W. Mak (1989). *Mol. Cell. Biol.* 9, 2173-2180.
124. Thompson, C.B., C.Y. Wang, I.C. Ho, P.R. Bohjanen, B. Petryniak, C.H. June, S. Miesfeldt, L. Zhang, G.J. Nabel, B. Karpinski, et al. (1992). *Mol. Cell. Biol.* 12, 1043-1053.
125. Tonegawa, S. (1983). *Nature* 302, 575-581.
126. Veillette, A., D. Davidson (1992). *Trends Genet.* 8, 61-66.
127. Veillette, A., F.M. Foss, E.A. Sausville, J.B. Bolen, N. Rosen (1987). *Oncogene Res.* 1, 357-374.
128. Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, J.B. Bolen (1988). *Cell* 55, 301.
129. Voronova, A.F., H.T. Adler, B.M. Sefton (1987). *Mol. Cell. Biol.* 7, 4407-4113.
130. Voronova, A.F., J.E. Buss, T. Patschinsky, T. Hunter, B.M. Sefton (1984). *Mol. Cell. Biol.* 4, 2705-2713.

131. Wange, R.L., L.E. Samelson (1996). *Immunity* 5, 197-205.
132. Weber, J.R., G.M. Bell, M.Y. Han, T. Pawson, J.B. Imbroden (1992). *J. Exp. Med.* 176, 373-379.
133. Wiest, D.L., L. Yuan, J. Jefferson, P. Benveniste, M. Tsokos, R.D. Klausner, L.H. Glimcher, L.E. Samelson, A. Singer (1993). *J. Exp. Med.* 178, 1701-1712.
134. Wildin, R.S., A.M. Garvin, S. Pawar, D.B. Lewis, K.M. Abraham, K.A. Forbush, S.F. Ziegler, J.M. Allen, R.M. Perlmutter (1991). *J. Exp. Med.* 173, 383-393.
135. Wu, J., S. Katzay, A. Weiss (1995). *Mol. Cell. Biol.* 15, 4337-4346.
136. Xanthoudakis, S., J.P.B. Viola, K.T.Y. Shaw, C. Luo, J.D. Wallace, P.T. Bozza, T. Curran, A. Rao (1996). *Science* 272, 892-895.
137. Xu, H., D.R. Littman (1993). *Cell* 74, 633-643.
138. Yablonski, D., L.P. Kane, D. Quian, A. Weiss (1998). *EMBO J.* 17, 5647-5657.
139. Yamada, A., S. Takaki, F. Hayashi, K. Georgopoulos, R.M. Perlmutter, K. Takatsu (2001). *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 21, 18082-18089.
140. Yoshida, H., H. Nishina, H. Takimoto, L.E.M. Marengere, A.C. Wakeham, D. Bouchard, Y.-Y. Kong, T. Ohleki, A. Strahinian, M. Bachmann, P.S. Ohestri, J.M. Penninger, G.R. Crabtree, T.W. Mak (1998). *Immunity* 8, 115-124.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. E. Serfling, der mein Interesse für die wissenschaftliche Arbeit geweckt und mich während meiner Arbeit im Labor stets gefördert und unterstützt hat.

Ohne Andris Avots, meinen wissenschaftlichen Lehrer, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Von seinem großen Wissen über die Geheimnisse der Signaltransduktion und von seinem außergewöhnlichen Engagement habe ich sehr profitiert. Seine Diskussionen und Aufmunterungen haben mir geholfen durchzuhalten. Schön war, dass neben der wissenschaftlichen Zusammenarbeit auch Gespräche "außerhalb des Labors" geführt wurden. Besonders zu erwähnen sind hier die Einladungen bei Olga Reimer, die mir die ersten Schritte im Labor beigebracht und einen Vorgeschmack russischer Kochkunst vermittelt hat.

Ein Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern des "Serfling-Teams", die mit mir zusammengearbeitet haben. Jan Schulze-Lührmann, Stefan Klein-Heßling und Ralf Marienfeld, die mich ohne zögern toleriert haben, obwohl ich Medizinerin bin, Thomas Twardzik, der den Mäusestall leitete, "Rike" Berberich-Siebelt für nette unwissenschaftliche Gespräche und Sergei Chuvpilo für das Sequenzieren der vielen Proben.

Ein weiterer Dank geht nach Amerika an das Labor von Anjana Rao im Center of Blood Research, Harvard, Boston, für die freundliche Aufnahme, die vielen Tipps und die Hilfe bei der Chromatin-Immunopräzipitation, besonders an Orly, Debbie, John, Mamta, Rupinder, Jeff, Suneet, Christina, José und natürlich Anjana.

Ich möchte nicht vergessen, den Menschen zu danken, die mich zu dem gemacht haben, was ich bin, meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester.

Und ein besonderer Dank gilt meinem Mann Thomas für die Geduld und die Liebe während des Verfassens dieser Arbeit.

## Lebenslauf

*Name:* Corinne König, geb. Stibbe

*Adresse:* Welzstraße 7, 97080 Würzburg

*Geburt:* 17. August 1976 in Hannover

*Nationalität:* Deutsch

*Familienstand:* verheiratet

*Schulbildung:* 1982-1986 Grundschule, Hannover, Heidelberg, Würzburg

1986-1995 Schönborn-Gymnasium, Würzburg

Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)

*Studium der* 1995-2002 Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

*Humanmedizin:* 08/97 Ärztliche Vorprüfung (Note 2,33)

08/98 Teil 1 der Ärztlichen Prüfung (Note 2)

ab 10/98 Doktorarbeit am Pathologischen Institut, Würzburg,  
bei Prof. Dr. Dr. E. Serfling

03/01 Teil 2 der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

04/02 Teil 3 der Ärztlichen Prüfung (Note 1)

*Beruf:* 06/02-11/03 Ärztin im Praktikum,

Universitäts-Kinderklinik, Würzburg

seit 12/03 Wissenschaftliche Assistentin,

Universitäts-Kinderklinik, Würzburg

*Wissenschaft:* 03/99 15. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für  
Immunologie, Stuttgart (Vortrag zum Thema: "The  
Expression of Protein Tyrosine Kinases in T Cells is  
controlled by NF-AT Factors")

12/99 Promomed-Kongress, Würzburg (Buchpreis der Jury)

09/99-10/99 Forschungsarbeit, Center of Blood Research,

und 03/00 Harvard University, Boston, USA

11/00 Millennium Meeting der Signal Transduction Society,  
Berlin (Posterdemonstration)

Würzburg, 22. Mai 2004