

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Müller-Hermelink

**Die massive Expression von NF-ATc/A ist eine Eigenschaft
Antigen-erfahrener Th1- und Th2-Zellen und trägt zur selektiven
Induktion des IL-4 Promotors in Th2-Zellen bei**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christian Fischer
aus Ochsenfurt

Würzburg, Juni 2002

Referent: Professor Dr. E. Serfling
Korreferentin: Professor Dr. A. Schimpl
Dekan: Professor Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2003

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	NF-AT - Eine Familie von Transkriptionsfaktoren	1
1.1.1	Zielgene von NF-AT-Faktoren	2
1.1.2	Domänenstruktur der NF-AT-Faktoren	3
1.1.3	Aktivierung der NF-AT-Faktoren in T-Zellen	6
1.1.4	Expressionsmuster der NF-AT-Faktoren	10
1.1.5	NF-AT-defiziente Mäuse	10
1.2	Isoformen von NF-ATc	14
1.2.1	NF-ATc-Isoformen unterscheiden sich in ihren C-terminalen Peptiden	14
1.2.2	Alternative Polyadenylierung von NF-ATc-Isoformen	17
1.3	T-Zelldifferenzierung	18
1.3.1	Zytokine und die T-Zelldifferenzierung	19
1.3.2	Kontrolle des IL-4 Promotors und des <i>cis</i> -regulatorischen Elements Pu-b _B	20
1.3.3	Transkriptionsfaktoren und die T-Zelldifferenzierung	23
1.4	Fragestellung	27
2	MATERIAL UND METHODEN	29
2.1	Material	29
2.1.1	Tiere	29
2.1.2	Gewebekulturzellen	29
2.1.3	Murine CD4 ⁺ T- und CD4 ⁺ /CD62L ^{high} T-Zellen	29
2.1.4	Nährmedien	29
2.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
2.1.6	Chemikalien und Lösungen	31
2.1.7	Puffer	32
2.1.8	Reaktionssysteme	37
2.1.9	Enzyme	37
2.1.10	Radioaktivität	37
2.1.11	Proteingrößenmarker	37

2.1.12	Oligonukleotide	38
2.1.13	Eukaryontische Expressionsvektoren	38
2.1.14	Cytokine	38
2.1.15	Antikörper zur Immundetektion von NF-AT-Proteinen	39
2.1.16	Sekundärantikörper zur Immundetektion von NF-AT-Proteinen	39
2.1.17	Antikörper für die Separation muriner CD4 ⁺ T- und CD4 ⁺ /CD62L ^{high} T-Zellen	39
2.1.18	Antikörper für die Stimulation und Kultur muriner CD4 ⁺ T-Zellen	40
2.1.19	Antikörper für ELISA	40
2.2	Methoden	41
2.2.1	Kultivierung von Suspensionszellen und adhärenen Zellen	41
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	42
2.2.3	Induktion lymphoider Tumorzellen und adhärenen Zellen	42
2.2.4	Präparation von CD4 ⁺ T-Zellen aus BALB/c Ann-Mäusen	42
2.2.5	<i>In vitro</i> Differenzierung CD4 ⁺ T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen	44
2.2.6	Ernten der Zellen	46
2.2.7	Transfektion von DNA in adhärenen Zellen	46
2.2.8	Präparation von Kernproteinextrakten (Schreiber <i>et al.</i> , 1998)	47
2.2.9	Bestimmung des Proteingehaltes von Kernproteinextrakten (Bradford, 1976)	47
2.2.10	Protein-Gelelektrophorese (SDS PAGE)	48
2.2.11	Western blot	48
2.2.12	DNA-Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel	49
2.2.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Polyacrylamidgel	50
2.2.14	DNA/Protein-Bindungsstudien	50
2.2.15	Präparation von Gesamtzell-RNA aus eukaryontischen Zellen	51
2.2.16	Bestimmung von RNA-Konzentrationen	52
2.2.17	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	53
2.2.18	Northern blot	53
2.2.19	"Ribonuclease Protection Assay" (RPA)	54
2.2.20	"Enzymatic linked Immunosorbent Assay" (ELISA)	55
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Konstitutive und induzierbare Synthese von NF-ATc-Isoformen in lymphoiden Zellen	57

3.2	Expression der NF-ATc-Isoformen im Zuge der Differenzierung von T-Zellen	60
3.2.1	Modell der <i>in vitro</i> Differenzierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen	61
3.2.2	Massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen	66
3.3	NF-ATc und NF-ATp bilden Komplexe mit der Pu-b _B des IL-4 Promotors in Th2-Zellen	69
4	DISKUSSION	72
4.1	NF-ATc/B und NF-ATc/C regulieren die transkriptionelle Aktivität und die Genexpression in naiven CD4 ⁺ T-Zellen	72
4.2	Die massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A ist eine Eigenschaft Antigen-erfahrener Th1- und Th2-Zellen	73
4.3	Unterschiedliche Bindungseigenschaften von NF-ATc an die Pu-b _B des IL-4 Promotors tragen zur selektiven Expression des IL-4-Gens in Th2-Zellen bei	77
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATURVERZEICHNIS	84

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin/Adenosin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Ag	Antigen
AP-1	"Aktivator Protein 1"
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin/Cytidin
[Ca ²⁺] _i	intrazellulären Kalziums
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy DNA
C/EBP	„CCAAT enhancer binding protein“
Ci	Curie
CK	Caseinkinase
CoA	Coenzym A
cpm	"counts per minute"
CsA	Cyclosporin A
CTD	carboxyterminale Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
d	desoxy
DAG	Diacylglycerin
DC-Folie	Dünnschicht-Chromatographie-Folie
dd	didesoxy
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	"doppelt negativ"
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	"doppelt positiv"
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EMSA	"electrophoretic mobility shift assay"
Erk	"extracellular signal regulated kinase"
FCS	fötales Kälberserum
FKBP	FK-Bindungsproteine
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GM-CSF	"granulocyte-macrophage colony-stimulating factor"
GSK	Glykogen Synthase Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HMG	"high mobility group"
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus-Proteinkinase
JNK/SAPK	"Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase"
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LT	Lymphotoxin
Min.	Minute
mRNA	messenger RNA
N-terminal	Amino-terminal
NF-AT	"Nuclear Factor of Activated T cells"
NHR	NF-AT Homologie Region
NK	"natural killer"
NLS	"nuclear localisation signal"
NO	Stickoxid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OAP	Oktamer assoziiertes Protein
Oct	Oktamer

PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK	Proteinkinase
PL	Phospholipase
PP	Proteinphosphatase
Pu-b	Purin-box
R	Rezeptor
RHD	Rel-Homologie-Domäne
rpm	Umdrehungen in der Minute
RSD	"Rel Similarity domain"
SCID	"severe combined immunodeficiency"
SP-1	"specificity protein-1"
SRE	"serum response element"
STAT	"signal transducer and activator of transcription"
TAD	"transcription activation domain"
T _{cyt}	zytotoxische T-Zelle
TGF	"transforming growth factor"
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-o-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TTP	Thymidintriphosphat
TZR	T-Zellrezeptor
UPS	"upstream promoter site"
V	Volt
Vol.	Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 NF-AT - Eine Familie von Transkriptionsfaktoren

Als NF-AT ("Nuclear factor of activated T cells") wurde ursprünglich ein T-Zell-spezifischer, nukleärer und induzierbarer Proteinkomplex bezeichnet, der nach Aktivierung von Jurkat T-Zellen an die distale NF-AT-Bindungsstelle (Pu-b_d) des menschlichen Interleukin 2 (IL-2) Promotors bindet (Shaw *et al.*, 1988). Bald darauf wurden NF-AT-Bindungsstellen in den Promotoren zahlreicher anderer Gene identifiziert, darunter die Gene für IL-3, IL-4, GM-CSF, IFN- γ und TNF α (Thompson *et al.*, 1992; Chuvpilo *et al.*, 1993; Cockerill *et al.*, 1993; Goldfeld *et al.*, 1993; Penix *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1996; Sica *et al.*, 1997; Duncliffe *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich bei NF-AT nicht um ein einzelnes Protein, sondern vielmehr um eine Familie von Transkriptionsfaktoren. Vier dieser eng miteinander verwandten und bis heute charakterisierten NF-AT-Proteine zeichnen sich durch eine hohe Sequenzhomologie innerhalb ihrer DNA-bindenden Domäne ("rel similarity domain", RSD) aus. Darüber hinaus besitzen sie mit ihrer N-terminalen transaktivierenden Domäne (TAD-A) sowie Calcineurin-bindenden regulatorischen Region (RR) einen gemeinsamen strukturellen Aufbau. Zunächst konnten NF-ATp (NF-AT1, NF-ATc2) und NF-ATc (NF-AT2, NF-ATc1) als Faktoren, die nach T-Zell-Aktivierung an die Pu-b_d des IL-2 Promotors binden, identifiziert und deren cDNAs aus Genbanken von Jurkat T-Zell-cDNA isoliert werden (McCaffrey *et al.*, 1993; Northrop *et al.*, 1994). Die hohe Sequenzhomologie innerhalb der zentralen DNA-bindenden Region ermöglichte schließlich mittels Screening von Jurkat T-Zell- und menschlichen PBL-cDNA-Genbanken das Klonieren von NF-AT3 (NF-ATc4) und NF-AT4 (NF-ATc3, NF-ATx) (Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995). Nahezu alle NF-AT-Faktoren werden in unterschiedlichen Isoformen, die sich im wesentlichen in der Struktur und Länge ihrer C-Termini unterscheiden, synthetisiert (Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1996b; Park *et al.*, 1996; Lyakh *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 1998; Sherman *et al.*, 1999; Chuvpilo *et al.*, 1999b).

In jüngster Zeit wurde in drei Labors ein Gen kloniert, das für ein NF-AT-verwandtes Protein kodiert. Dieses Protein wurde ursprünglich als ein durch osmotischen Schock induzierter Faktor isoliert und deshalb als TonEBP ("tonicity enhancer binding protein")

bezeichnet (Miyakawa *et al.*, 1999). Obwohl dieses Protein sich sowohl funktionell als auch strukturell von den vier bisher charakterisierten NF-AT-Proteinen unterscheidet, wurde es aufgrund seiner Sequenzhomologie von 41-45% mit der RSD der bereits bekannten NF-AT-Faktoren NF-AT5 genannt (Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999). Jedoch weist NF-AT5 weder Sequenzhomologien zur NF-AT-typischen N-terminalen TAD-A noch zur Calcineurin-bindenden regulatorischen Region auf (Miyakawa *et al.*, 1999; Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999).

1.1.1 Zielgene von NF-AT-Faktoren

NF-AT-Faktoren werden auch von anderen hämatopoetischen Zellen, darunter B-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen, sowie in Monozyten und Makrophagen exprimiert (Brabletz *et al.*, 1991; Verweij *et al.*, 1990; Yaseen *et al.*, 1993). Neben der distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2 Promotors, die ARRE-2 ("antigen receptor response element 2", Shaw *et al.*, 1988) oder Pu-b₀ im Falle des murinen IL-2 Promotors (Serfling *et al.*, 1989) genannt wird und in den meisten DNA-Protein-Bindungsstudien als Prototyp einer NF-AT-Bindungsstelle mit dem Kernmotiv GGAAA dient, wurden eine Vielzahl weiterer Bindungsstellen für NF-AT-Faktoren in den Promotoren und Enhancern von Zytokingenen identifiziert. So besitzt der IL-2 Promotor von Mensch und Maus neben der distalen Bindungsstelle eine weitere hochaffine Bindungsstelle für NF-AT-Faktoren an der Nukleotidposition -145 (Randak *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1992). Später wurden zusätzlich drei Bindungsstellen mit niedriger Bindungsaffinität an den Nukleotidpositionen -45, -90 und -160 beschrieben (Rooney *et al.*, 1995a). Auch in den Promotoren und Enhancern der Gene für GM-CSF, IL-3, IL-5, TNF α und IFN- γ konnten bis heute - neben fünf NF-AT-Bindungsmotiven innerhalb des IL-4 Promotors von Mensch und Maus (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 1995b; Li-Weber *et al.*, 1998) - zahlreiche NF-AT-Bindungsstellen identifiziert werden (Thompson *et al.*, 1992; Cockerill *et al.*, 1993; Goldfeld *et al.*, 1993; Penix *et al.*, 1993; Masuda *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1997; Sica *et al.*, 1997; Duncliffe *et al.*, 1997). Der schwere Immundefekt SCID ("severe combined immunodeficiency"), der mit einer Störung der Lymphokinsynthese von IL-2, IL-3, IL-4 und IL-5 einhergeht, ist auf den Verlust der NF-AT-Aktivierung zurückzuführen (Castigli *et al.*, 1993; Feske *et al.*, 1996 und 2000). Die Kontrolle der Genregulation durch NF-AT-Faktoren beschränkt

sich jedoch nicht alleine auf Lymphokingene. Auch in den Promotoren der Gene, die für p21^{Waf1} sowie die Oberflächenmoleküle Fas-Ligand und CD40-Ligand kodieren, wurden NF-AT-Bindungsstellen identifiziert (Tsitsikov *et al.*, 1994; Tsytsykova *et al.*, 1996; Latinis *et al.*, 1997; Holtz-Heppelmann *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 1999; Rengarajan *et al.*, 2000; Santini *et al.*, 2001). Ebenso gelang die Charakterisierung zweier NF-AT-Bindungsstellen innerhalb des CD25/IL-2R α Promotors (Schuh *et al.*, 1998). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass NF-AT-Faktoren die Promotoraktivität weiterer pro- und anti-apoptotischer Gene sowie Gene für die Regulation des Zellzyklus und zahlreicher anderer Transkriptionsfaktoren kontrollieren (Kel *et al.*, 1999; Mages *et al.*, 1998).

1.1.2 Domänenstruktur der NF-AT-Faktoren

NF-ATp (NF-AT1), NF-ATc (NF-AT2), NF-AT3 und NF-AT4 besitzen mehrere Proteindomänen, die eine hohe Sequenzhomologie untereinander aufweisen (Abb. 1). Dazu zählen die DNA-Bindungsdomäne (RSD), die regulatorische Region (RR) und die N-terminale transaktivierende Region (TAD-A).

Die ungefähr 300 Aminosäuren umfassende DNA-Bindungsdomäne, die sowohl Sequenzmotive für die DNA-Bindung als auch für die Interaktion mit AP-1-Proteinen und ein Kernlokalisierungssignal (NLS1) beherbergt (Beals *et al.*, 1997a), weist eine Sequenzhomologie von 68-73% zwischen den vier "eigentlichen" NF-AT-Faktoren auf (Hoey *et al.*, 1995). Aufgrund einer Sequenzhomologie von 17-19% mit der DNA-bindenden Rel-Domäne der NF- κ B-Faktoren wird diese Domäne auch als Rel-ähnliche Domäne ("rel similarity domain", RSD) bezeichnet. Einige Sequenzen der DNA-Bindungsregion von NF-ATp, insbesondere ein oktamer Oligopeptid nahe dem N-Terminus der Rel-ähnlichen Domäne, besitzen sogar eine weitaus höhere Homologie mit der entsprechenden Bindungssequenz von NF- κ B-Faktoren (Jain *et al.*, 1995). Das für die DNA-Bindung der NF-AT-Faktoren verantwortliche Kernmotiv GGAAAA entspricht einer Hälfte der NF- κ B "consensus" Sequenz und erklärt, warum NF-AT- und NF- κ B-Faktoren an überlappende DNA-Bindungsmotive binden können (McCaffrey *et al.*, 1992).

Die RSD ist für die Interaktion mit AP-1-Proteinen bei der gemeinsamen Bindung an komplexe NF-AT/AP-1-Motive verantwortlich (Jain *et al.*, 1995; Wolfe *et al.*, 1997).

Solche komplexen Bindungssequenzen enthalten neben dem für die Bindung von NF-AT-Faktoren essentiellen Motiv T/AGGAAAA eine spezifische Sequenz als Bindungsstelle für AP-1-Faktoren (Boise *et al.*, 1993; Serfling *et al.*, 1995). Die gemeinsame Bindung von NF-AT- und AP1-Faktoren an eine zusammengesetzte Bindungsstelle wurde ursprünglich für die distale NF-AT-Bindungsstelle Pu-b_d des IL-2 Promotors nachgewiesen. Dabei wurde der NF-AT-Komplex zunächst als Heterodimer aus zwei Komponenten beschrieben, einer ubiquitären nukleären Komponente NF-AT_n ("nuclear NF-AT") und einer T-Zell-spezifischen zytosolischen und präexistenten Komponente NF-AT_{p/c} ("cytosolic/preexisting NF-AT"). Während der Cyclosporin A (CsA)- und FK506-sensitive Kerntransport des präexistenten NFAT_{p/c} Ca²⁺-Mobilisierung und [Ca²⁺]_i-Anstieg benötigte, erforderte die *de novo* Synthese von NF-AT_n Phorbol ester (Flanagan *et al.*, 1991). Erst später wurde NF-AT_n in T-Zellen als AP-1 identifiziert, das aus Dimeren der Fos- und Jun-Proteine zusammengesetzt ist und mit NF-AT_{p/c} an der DNA-Bindung und der transkriptionellen Aktivierung kooperiert (Jain *et al.*, 1992; Boise *et al.*, 1993; Northrop *et al.*, 1993; Yaseen *et al.*, 1994). Andererseits konnte eine dominant negative c-Jun Mutante die transkriptionelle Aktivität der distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2 Promotors inhibieren (Petrak *et al.*, 1994). Da NF-AT- und AP-1-Faktoren keine Komplexe in Lösung bilden, ermöglicht erst die Bindung von NF-AT-Faktoren an die Pu-b_d die Bindung von AP-1-Faktoren an zusammengesetzte NF-AT/AP-1-Bindungsstellen (Peterson *et al.*, 1996). Ursprünglich für den IL-2 Promotor nachgewiesen wurden solche zusammengesetzten Bindungsstellen zwischenzeitlich auch in den Promotoren anderer Lymphokingene charakterisiert (Jain *et al.*, 1993; Kel *et al.*, 1999).

Die regulatorische Region, die auch als NF-AT-Homologie-Region (NHR) bezeichnet wird, umspannt ungefähr 400 Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Hälfte der NF-AT-Faktoren und erstreckt sich zwischen der TAD-A und der RSD. Anders als die RSD verfügt sie nur über einen geringen Grad an Sequenzhomologie von insgesamt 23-35% zwischen den NF-AT-Faktoren (Luo *et al.*, 1996c). Jedoch konnten innerhalb der regulatorischen Region neun konservierte Sequenzmotive identifiziert werden, die neben zahlreichen Ser-Phosphorylierungsstellen (Serin-reiche Region, SRR) drei Kopien der SP-Box (SP1-3) und ein Kernlokalisierungssignal ("nuclear localisation signal", NLS) beherbergen (Ho *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1996c; Beals *et al.*, 1997a). Die Ser-Phosphorylierung durch Ser/Thr-Proteinkinasen führt zur

Maskierung des Kernlokalisierungssignals und folglich zur Retardierung von NF-AT im Zytoplasma (Beals *et al.*, 1997a).

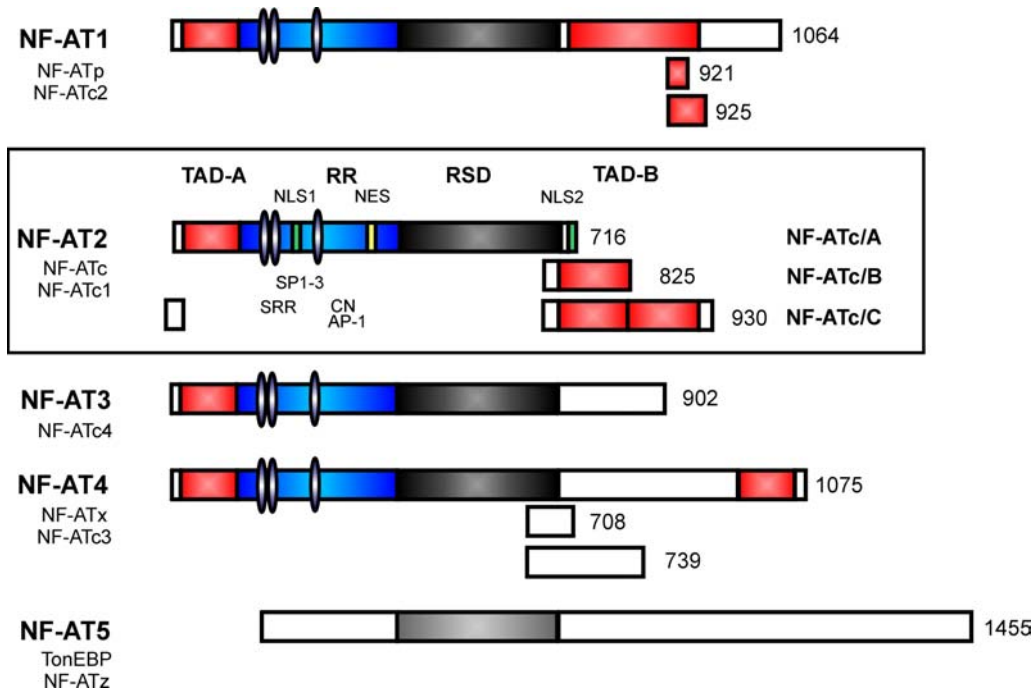


Abbildung 1. Struktureller Aufbau der NF-AT-Faktoren. Die DNA-bindende Domäne der NF-AT-Faktoren (RSD) ist jeweils als schwarzgraue Box, die C- und N-terminalen transaktivierenden Domänen, TAD-A und TAD-B, sind als rote Boxen dargestellt. Die regulatorische Region (RR), die sich jeweils in der N-terminalen Hälfte der NF-AT-Faktoren zwischen der TAD-A und der RSD befindet, besitzt eine Serin-reiche Region (SRR) und 3 SP-Motive (SP1-3). Die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin (CN) bindet an die regulatorische Region und führt zu einer Dephosphorylierung der Serinmotive. Diese Region ist außerdem für die Interaktion von NF-AT- mit AP-1-Faktoren (AP-1) verantwortlich. Für NF-ATc (NF-AT2) wurden zusätzlich zwei Kernlokalisierungssignale (NLS1, NLS2) und ein Kernexportsignal (NES) beschrieben. NF-ATc wird in verschiedenen Spleissvarianten (NF-ATc/A, NF-ATc/B und NF-ATc/C), die sich vor allem in der Länge ihrer C-Termini unterscheiden, exprimiert. Ähnliches gilt für NF-AT1 und NF-AT4.

In analoger Weise zieht die Deletion der SP-Box oder die Mutation der Serine zu Alaninen eine konstitutive Kernlokalisierung der NF-AT-Faktoren nach sich (Beals *et al.*, 1997a; Masuda *et al.*, 1997). Die Ser-Phosphorylierungsstellen sind zugleich Substrate für die Proteinphosphatase Calcineurin, die ihrerseits über eine Ser-Dephosphorylierung die Translokation von NF-AT in den Nukleus induziert (Luo *et al.*, 1996c; Rao *et al.*, 1997; Shibasaki *et al.*, 1996).

Außerhalb der DNA-Bindungsdomäne und der regulatorischen Region sind die Sequenzhomologien gering. Die ungefähr 200 Aminosäuren umspannende N-terminale Region eines jeden NF-AT-Proteins verfügt über die funktionellen Eigenschaften einer starken transaktivierenden Domäne (TAD-A). Darüber hinaus besitzen einige Isoformen von NF-AT-Faktoren, darunter eine Isoform von NF-ATc (NF-ATc/C), eine zusätzliche C-terminale transaktivierende Domäne, TAD-B. Die C-terminalen Peptide von NF-ATp und NF-ATc/C weisen ungefähr 30% Sequenzhomologie auf.

1.1.3 Aktivierung der NF-AT-Faktoren in T-Zellen

Die frühe Aktivierung von NF-AT-Faktoren wurde für NF-ATp (Ruff und Leach, 1995; Wesselborg *et al.*, 1996), NF-ATc (Northrop *et al.*, 1994) und NF-AT4 (Shibasaki *et al.*, 1996) im Detail untersucht. Drei Schritte der Aktivierung werden unterschieden: Dephosphorylierung, Kerntranslokation und Zunahme der DNA-Bindungsaffinität. In ruhenden T-Zellen befinden sich NF-AT-Faktoren - im Ser-phosphorylierten Zustand - im Zytoplasma und weisen eine geringe DNA-Bindungsaffinität auf. T-Zellaktivierung mit konsekutiver Ca^{2+} -Mobilisierung und intrazellulärem $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg führt zu einer raschen Dephosphorylierung von NF-AT-Proteinen mit konsekutiver nukleärer Translokation und einer Zunahme ihrer DNA-Bindungsaffinität (Northrop *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995; Ruff und Leach, 1995; Shaw *et al.*, 1995; Loh *et al.*, 1996a und 1996b; Shibasaki *et al.*, 1996; Neal und Clipstone, 2000; Okamura *et al.*, 2000). Jeder einzelne dieser Schritte kann durch die Immunsuppressiva CsA und FK506, die die Aktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin blockieren, gehemmt werden (Liu *et al.*, 1991).

Calcineurin, eine Ser/Thr-Proteinphosphatase des Typs 2B, die ubiquitär exprimiert wird (Kincaid *et al.*, 1990), ist ein heterodimeres Enzym. Es besteht aus Calcineurin A, einer katalytischen Untereinheit von 59kD, und Calcineurin B, einer regulatorischen

Untereinheit von 19kD (Klee *et al.*, 1988). Aktivierung von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR) und die CD4/CD8-Korezeptoren führt zu einer raschen Zunahme freier intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen, die gemeinsam mit Calmodulin (CM) an die 59kD Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin binden, eine Konformationsänderung einleiten und die katalytische Funktion von Calcineurin aktivieren (Loh *et al.*, 1996b; Wesselborg *et al.*, 1996). Sowohl die Interaktion von Calcineurin mit NF-AT als auch die De-Phosphorylierung finden innerhalb der regulatorischen Region statt (Luo *et al.*, 1996c; Shibasaki *et al.*, 1996; Wesselborg *et al.*, 1996; Masuda *et al.*, 1997). Aktiviertes dephosphoryliertes Calcineurin wird mit NF-AT als Calcineurin/NF-AT-Komplex in den Kern transloziert (Ruff und Leach, 1995; Shaw *et al.*, 1995; Loh *et al.*, 1996a). Für die nukleäre Translokation von NF-AT-Faktoren ist ein geringer, aber anhaltender intrazellulärer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg notwendig (Timmerman *et al.*, 1996; Dolmetsch *et al.*, 1997). Überexpression einer konstitutiv aktiven Form von Calcineurin A, CAM-AI, führt in Jurkat T-Zellen zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung von NF-AT-Faktoren und dementsprechender Induktion des IL-2 Promotors (O'Keefe *et al.*, 1992).

Die Glykogen-Synthase-Kinase 3, deren Aktivität nach Stimulierung über den TCR gehemmt wird (Beals *et al.*, 1997b), phosphoryliert NF-AT-Faktoren an Ser-Resten innerhalb der SP-Box und induziert über eine Maskierung des Kernlokalisationsignals den Kernexport (Beals *et al.*, 1997a). Sowohl die Deletion der SP-Box als auch die Mutation der Serine zu Alaninen innerhalb der SP-Box führen zur konstitutiven Kernlokalisierung der NF-AT-Faktoren (Beals *et al.*, 1997a; Masuda *et al.*, 1994). Demgegenüber supprimiert die transgene Expression der Glykogen-Synthase-Kinase 3 in COS-Zellen die Ca^{2+} -Calcineurin-induzierte nukleäre Translokation von koexprimiertem NF-ATc (Beals *et al.*, 1997b). Weitere Ser/Thr-Proteinkinasen, die als Gegenspieler von Calcineurin entweder NF-AT-Faktoren im Zytoplasma retardieren oder den Kernexport induzieren, wurden zwischenzeitlich identifiziert. So wird in einer jüngst veröffentlichten Arbeit berichtet, dass die MAP/SAP-Kinasen Erk1, JNK3 und p38 α sowie die Casein-Kinase II (CKII) vornehmlich die Serine 172 und 187 innerhalb der Serin-reichen Region (SRR) von NF-ATc phosphorylieren und entsprechend die Kerntranslokation inhibieren (Porter *et al.*, 2000).

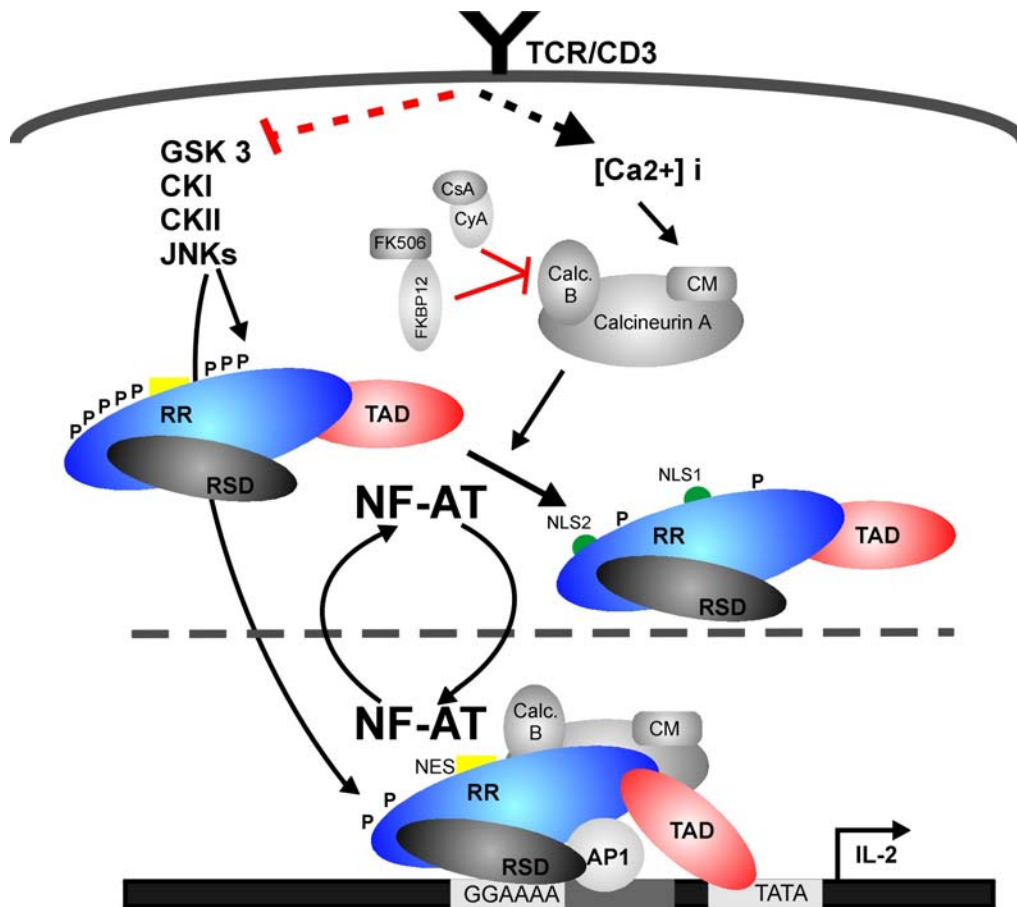


Abbildung 2. Aktivierung von NF-AT-Faktoren in T-Zellen. In ruhenden T-Zellen liegen NF-AT-Faktoren im phosphorylierten Zustand im Zytosol vor. Die Serin-Phosphorylierung innerhalb der regulatorischen Region (RR) maskiert die Kernlokalisierungssignale (NLS1, NLS2) und die für die DNA-Bindung notwendigen Sequenzmotive. Ohne Ca^{2+} und Calmodulin ist die katalytische Untereinheit von Calcineurin, CNA, inaktiv. T-Zellaktivierung über den T-Zellrezeptor (TCR) führt zu einem raschen Anstieg des freien intrazellulären Calciums ($[Ca^{2+}]_i$). Daraufhin bindet der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex (CM) an Calcineurin A. Aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert NF-AT-Faktoren und führt zu deren Konformationsänderung mit konsekutiver Freigabe der Kernlokalisierungssignale und der DNA-bindenden Sequenzmotive. Dies hat die nukleäre Translokation und die Zunahme der DNA-Bindungsaffinität der NF-AT-Faktoren zur Folge. Die Immunsuppressiva Cyclosporin A (CsA) und FK506 binden niedermolekulare Proteine, die sog. Cyclophiline CyA und FK506BP, und hemmen die Phosphatase Calcineurin. Als Gegenspieler des Calcineurins wirken sowohl die Ser/Thr-spezifischen Proteinphosphatasen GSK 3, CK I und CK II als auch die Kinase JNK, indem sie NF-AT-Faktoren phosphorylieren und deren nukleären Export induzieren (Serfling *et al.*, 2000).

Vergleichsweise hemmt die Kinase JNK durch Phosphorylierung der Serine 163 und 165 die nukleäre Translokation von NF-AT4 (Chow *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang erklärt sich die Beobachtung, dass JNK1-defiziente Mäuse neben einer konstitutiven Kernakkumulation von NF-ATc eine entsprechende lymphatische Hyperproliferation mit vorzugsweiser Th2-Zelldifferenzierung aufweisen (Dong *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung und der nukleäre Transport von NF-AT4 werden weiterhin durch die Casein-Kinase I (CKI) kontrolliert, wobei die Phosphorylierung der Aminosäuren 177-184 durch CKI α *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen wurde, und die Überexpression einer dominant negativen Mutante von CKI α zum Verlust der Phosphorylierung führte (Zhu *et al.*, 1998).

Die Lokalisation von NF-AT innerhalb der Zellkompartimente ist vom Gegenspiel der Kinase-Phosphatase-Aktivität abhängig. Vor diesem Hintergrund läßt sich der Wirkungsmechanismus der Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506, deren klinischer Einsatz auf dem Gebiet der Organtransplantation große Fortschritte ermöglichte, veranschaulichen (Calne *et al.*, 1979). Das zyklische Peptid CsA und das Makrolid FK506 binden an die zytoplasmatischen niedermolekularen Cyclophiline (CyA) und FK506-Bindungsproteine (FK506BP), die als Immunophiline bezeichnet werden (Schreiber, 1991). Die dimeren Komplexe CsA/CyA und FK506/FKBP12 binden Calcineurin A und blockieren durch eine Hemmung der katalytischen Aktivität von Calcineurin die nukleäre Translokation von NF-AT-Faktoren (Liu *et al.*, 1991; Bram *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1995). Beide Immunsuppressiva unterdrücken demnach aufgrund einer fehlenden Induktion verschiedener Lymphokingene, darunter der IL-2 und IL-4 Gene, eine funktionelle Immunantwort (Krönke *et al.*, 1985). Neben der subzellulären Lokalisation beeinflusst die Stärke der Bindungsaffinität die Aktivität von NF-AT-Faktoren. Sowohl die Aktivierung von Calcineurin als auch die nachfolgende *in vitro* Dephosphorylierung von NF-AT-Faktoren führen zu einer Zunahme ihrer DNA-Bindungsaffinität. Demgegenüber reduziert die *in vitro* Phosphorylierung von NF-AT-Faktoren die DNA-Bindungsaktivität (Neal und Clipstone, 2000; Okamura *et al.*, 2000).

1.1.4 Expressionsmuster der NF-AT-Faktoren

Der Modus der Expression der NF-AT-Faktoren variiert deutlich. Während die mRNA von NF-ATp konstitutiv in vielen Geweben und insbesondere in Zellen des lymphatischen Gewebes nachweisbar ist (Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995), wird eine starke Expression der mRNA für NF-ATc nahezu ausschließlich in Zellen des lymphatischen Gewebes und in embryonalen Zellen der Herzklappen und der Herzscheidewände beobachtet (Northrop *et al.*, 1994; Aramburu *et al.*, 1995; Hoey *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995; de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998a). Eine Synthese der mRNA von NF-AT3 läßt sich weder im Thymus noch in der Milz oder in PBLs, jedoch in vielen nicht-lymphatischen Geweben nachweisen (Hoey *et al.*, 1995; Ho *et al.*, 1995; Masuda *et al.*, 1995). NF-AT4-mRNA wird vorzugsweise und in hohen Konzentrationen in doppelt-positiven Thymozyten synthetisiert (Masuda *et al.*, 1995; Oukka *et al.*, 1998; Kuo und Leiden, 1999; Amasaki *et al.*, 2000). Untersuchungen der Proteinsynthese der NF-AT-Faktoren zeigten, dass NF-ATp und NF-ATc vor allem in peripheren Lymphozyten synthetisiert werden, wobei NF-ATp konstitutiv exprimiert wird (Rao *et al.*, 1997), während die Synthese von NF-ATc induzierbar ist und erst nach Stimulation der Zellen mit Ca^{2+} -Ionophoren erfolgt (Northrop *et al.*, 1994; Lyakh *et al.*, 1997).

1.1.5 NF-AT-defiziente Mäuse

Unter den bis heute charakterisierten NF-AT-Faktoren spielen NF-ATc und NF-ATp eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Lymphokinen. Beide Transkriptionsfaktoren werden in hohen Konzentrationen in peripheren T-Lymphozyten exprimiert, sind in transienten Transfektionsversuchen starke Aktivatoren der IL-2 und IL-4 Promotoren (Rao *et al.*, 1997) und unterscheiden sich kaum in ihren DNA-Bindungseigenschaften (Hoey *et al.*, 1995; Wolfe *et al.*, 1997). Diese Übereinstimmungen lassen vermuten, daß NF-ATp und NF-ATc eine ähnliche Funktion bei der Induktion von Genen im Rahmen der T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung ausüben. Erstaunlicherweise unterscheiden sich dennoch NF-ATc- und NF-ATp-defiziente Mäuselinien hinsichtlich ihrer Organ-bezogenen Phänotypen, der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen sowie der Induktion von Lymphokinen.

Inaktivierung des NF-ATc-Gens führt aufgrund schwerwiegender Defekte in der embryonalen Entwicklung der Herzklappen und Herzsepten zum vorzeitigen Tod der Mäuseembryonen am 13. - 17. Tag nach der Befruchtung (de la Pompa *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998a). NF-ATc-defiziente Thymozyten, die nach Blastozysteninjektion von NF-ATc-defizienten embryonalen Stammzellen in RAG^{-/-} Mäusen generiert wurden, weisen schwere Defekte der intrathymischen Entwicklung auf, die mit einer Reduktion der Anzahl unreifer, doppelt-positiver CD4⁺/CD8⁺-Thymozyten und einer Thymushypoplasie einhergehen (Yoshida *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b). Assoziiert mit einer Abnahme der Proliferation peripherer NF-ATc-defizienter T-Lymphozyten ist die Synthese von IL-4 und IL-6 sowie von Serum-IgE stark vermindert (Yoshida *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b).

Inkohärente Ergebnisse ergaben sich hinsichtlich der Auswirkungen der NF-ATc-Defizienz auf die Synthese von IL-2. Während NF-ATc-defiziente T-Zellen aus einer von zwei generierten knock-out Mäuselinien mehr IL-2 als vergleichbare wildtypische T-Zellen synthetisierten (Ranger *et al.*, 1998b), blieb die IL-2 Synthese peripherer T-Zellen der anderen NF-ATc-defizienten Mäuselinie unbeeinflusst (Yoshida *et al.*, 1998). Störungen der Herz- und Thymusgenese im Rahmen der embryonalen Entwicklung wurden in NF-ATp-defizienten Mäusen nicht beobachtet. Zellen des extraartikulären Bindegewebes dieser Mäuse weisen jedoch eine spontane Differenzierungsneigung zu Knorpelzellen mit enchondraler Ossifikation auf. Zusätzlich wurde das Auftreten von neoplastischen Veränderungen in den Knorpelzellen beobachtet (Ranger *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur Annahme, NF-ATp-defiziente Mäuse müßten an einer Immundefizienz leiden, führte die Inaktivierung des NF-ATp-Gens neben einer Retardierung der Thymusinvolution (Schuh *et al.*, 1998) zu einer progredienten Akkumulation voraktivierter lymphoider Zellen und einer konsekutiven Megalie der lymphatischen Organe mit vergrößerten Keimzentren in Milz und Lymphknoten (Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Schuh *et al.*, 1997 und 1998). Interessanterweise wiesen CD4⁺T-Zellen eine verstärkte Expression der für Zellaktivierung typischen Oberflächenmarker CD69 und CD44 auf, wohingegen L-Selectin und CD62L/MEL14 als Oberflächenmarker für naive T-Lymphozyten in verminderter Konzentration nachweisbar waren (Schuh *et al.*, 1997 und 1998). T-Zellen aus den Lymphknoten NF-ATp-defizienter Mäuse zeigten einen 2-3-fachen Anstieg der sekundären Immunantwort nach Ovalbumin-Behandlung (Xanthoudakis *et al.*, 1996)

oder nach Stimulation mit Superantigen (SEA) oder anti-CD3-Antikörpern (Schuh *et al.*, 1998).

Faktor	Expressionsmodus	Phänotyp NF-AT ^{-/-} - Mäuse
NF-AT1 ^{-/-} NF-ATp NF-ATc2	konstitutive Synthese in zahlreichen Zellen; prädominante Expression in peripheren Lymphozyten	Hyperproliferation peripherer Lymphozyten mit konsekutiver Splenomegalie und Lymphadenopathie mit verstärkter Bildung von Keimzentren; retardierte Thymusinvolutions; dysregulierte Synthese von Th2-Lymphokinen mit gesteigerter Th2-gerichteter Immunantwort; normale IL-2 Synthese; gestörte Chondrogenese mit Neigung zur Ossifikation und neoplastischer Transformation
NF-AT2 ^{-/-} NF-ATc NF-ATc1	prädominante Expression in peripheren Lymphozyten; Induzierbare Synthese in Th1- und Th2-Zellen	Störung der Entwicklung von Herzklappen und Herzsepten mit letalem Ausgang <i>in utero</i> 13.5 Tage nach Befruchtung; Reduktion der Anzahl von CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Thymozyten in RAG ^{-/-} /NF-ATc ^{-/-} -Mäusen; Thymushypoplasie mit verringerter lymphozytärer Proliferation und beeinträchtigter Synthese von Th2-Lymphokinen
NF-AT1 ^{-/-} /2 ^{-/-}	siehe oben	verringerte Synthese von Th1- und Th2-Lymphokinen; gestörte CD40- und Fas-Ligand-Expression; ungestörte TCR-vermittelte T-Zell-Proliferation und Aktivierung; dysregulierte B-Zell-Homöostase mit Hyperproliferation von B-Zellen und Plasmazellinfiltration von Endorganen
NF-AT4 ^{-/-} NF-ATx NF-ATc3	konstitutive Synthese mit vorzugsweiser Expression im Thymus	Störung der positiven Selektion von Thymozyten; gesteigerte Apoptose von doppelt-positiven Thymozyten; gesteigerte Aktivierung von T-Zellen
NF-AT1 ^{-/-} /4 ^{-/-}	siehe oben	gesteigerte Synthese von Th2-Lymphokinen; verringerte Synthese von Th1-Lymphokinen; Hyperproliferation peripherer Lymphozyten mit Splenomegalie; verminderte Fas-vermittelte Apoptose; konstitutive nukleäre Akkumulation von NF-ATc/A
NF-AT3 ^{-/-} /4 ^{-/-}	siehe Text	generalisierte Störung der Angiogenese mit letalem Ausgang <i>in utero</i> 11.5 Tage nach Befruchtung

Expression von NF-AT-Faktoren und Phänotypen NF-AT-defizienter Mäuse (Serfling *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2001; Graef *et al.*, 2001).

Außerdem konnte eine retardierte Deletion von CD4⁺Vβ11⁺T-Zellen von NF-ATp-defizienten Mäusen nach Stimulierung mit Superantigen beobachtet werden, obwohl ursprünglich keine Störung der Fas-vermittelten Apoptose nachweisbar war (Schuh *et al.*, 1998).

Ein gemeinsames Merkmal aller drei unabhängig voneinander etablierten NF-ATp-defizienten Mäuselinien stellt die Dysregulation der IL-4 Synthese dar, die für eine gesteigerte Th2-gerichtete Immunantwort von NF-ATp-defizienten Mäusen verantwortlich ist. T-Lymphozyten von zwei dieser NF-ATp-defizienten Mäuselinien wiesen zwar eine Reduktion der frühen IL-4-RNA Synthese auf (Hodge *et al.*, 1996b; Schuh *et al.*, 1997), zeichneten sich jedoch zu späteren Zeitpunkten der Zellaktivierung durch eine Zunahme der Synthese von IL-4-RNA und der IL-4 Sekretion aus (Hodge *et al.*, 1996b; Kiani *et al.*, 1997). Die Konsequenz der gesteigerten IL-4 Synthese ist eine verstärkte Th2-gerichtete Immunantwort, die mit erhöhten Serumtitern von IgE, Eosinophilie und einer erhöhten Infektanfälligkeit für *Leishmania major* einhergeht (Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997; Viola *et al.*, 1998). Einige dieser phänotypischen Merkmale sind noch ausgeprägter in NF-ATp/NF-AT4-doppelt-defizienten Mäusen, deren T-Lymphozyten die Th2-Lymphokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 in großen Mengen synthetisierten, während die Synthese von IL-2 und IFN-γ reduziert war (Ranger *et al.*, 1998c). Folglich leiden diese Mäuse an allergischer Blepharitis und interstitieller Pneumonitis und weisen einen 10-20-fachen Anstieg der Serumtiter für IgG1 und IgE auf (Ranger *et al.*, 1998b). Eine damit einhergehende generalisierte Lymphadenopathie und Splenomegalie ist Ausdruck einer Hyperproliferation peripherer Lymphozyten. Die Induktion des Fas-Liganden und die Fas-vermittelte Apoptose sind in diesen Zellen supprimiert (Ranger *et al.*, 1998b). Interessanterweise führt die NF-ATp/NF-AT4-Defizienz zu einer konstitutiven nukleären Akkumulation der NF-ATc-Isoform NF-ATc/A (Ranger *et al.*, 1998c).

Die alleinige Inaktivierung des vorwiegend in doppelt-positiven Thymozyten exprimierten NF-AT4 hat hingegen keinen Einfluß auf die T-Zelldifferenzierung. Allerdings weisen NF-AT4-defiziente Mäuse eine Beeinträchtigung der Entwicklung von CD4- und CD8-einfach-positiven Thymozyten, eine gleichzeitig gesteigerte Aktivierung peripherer T-Zellen sowie eine gesteigerte Apoptose doppelt-positiver Thymozyten auf (Oukka *et al.*, 1998).

Die gleichzeitige Inaktivierung der NF-ATc- und NF-ATp-Gene führte in T-Zellen zu einem völligen Verlust der Expression der Th1- und Th2-typischen Lymphokine IL-2,

IFN- γ und IL-4. Interessanterweise wiesen diese Zellen - trotz gestörter Effektor-Funktionen - die Fähigkeit zur TCR-vermittelten T-Zellaktivierung und Proliferation auf. Dies spiegelt sich in einer verstärkten Expression des Aktivitätsmarkers CD69 sowie einer verminderten Expression von CD62L und CD45RB wider. In B-Lymphozyten führte die Inaktivierung von NF-ATp und NF-ATc – ähnlich der NF-ATp-Defizienz – zu einem Hyperproliferationssyndrom mit deutlich erhöhten Titern für IgG₁- und IgE-Serumimmunglobulinen sowie Plasmazellinfiltration von Endorganen, insbesondere von Lungen, Nieren und Leber (Peng *et al.*, 2001).

Die gleichzeitige Inaktivierung von NF-AT3 und NF-AT4 führte aufgrund schwerwiegender Defekte im Rahmen der Angiogenese zum vorzeitigen Tod der Mäuseembryonen am 11.5 Tag nach der Befruchtung (Graef *et al.*, 2001). Neben einer verminderten Gefäßversorgung des Dottersacks wiesen die Mäuseembryonen insbesondere eine fehlgeleitete und enthemmte Vaskularisierung des embryonalen Neuralrohrs sowie der Wirbelkörperanlagen auf. Die Ausbildung unzureichend differenzierter Gefäße scheint selektiv durch eine insuffiziente Rekrutierung von Vorläufer-Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen bedingt zu sein (Graef *et al.*, 2001).

1.2 Isoformen von NF-ATc

1.2.1 NF-ATc-Isoformen unterscheiden sich in ihren C-terminalen Peptiden

Mitglieder der Familie der NF-AT-Transkriptionsfaktoren werden in multiplen Isoformen exprimiert. Dies wurde zunächst detailliert für NF-ATp und NF-AT4 gezeigt (Luo *et al.*, 1996a; Imamura *et al.*, 1998). Chuvpilo und Kollegen wiesen nach, dass eine Vielzahl von T-Zellen in ähnlicher Weise NF-ATc in unterschiedlichen Isoformen exprimieren (Chuvpilo *et al.*, 1999a). Sie klonierten aus einer menschlichen Namalwa B-Zell-cDNA-Genbank drei unterschiedliche cDNAs des Transkriptionsfaktors NF-ATc und zeigten, dass sich die drei klonierten und als NF-ATc/A, NF-ATc/B und NF-ATc/C bezeichneten

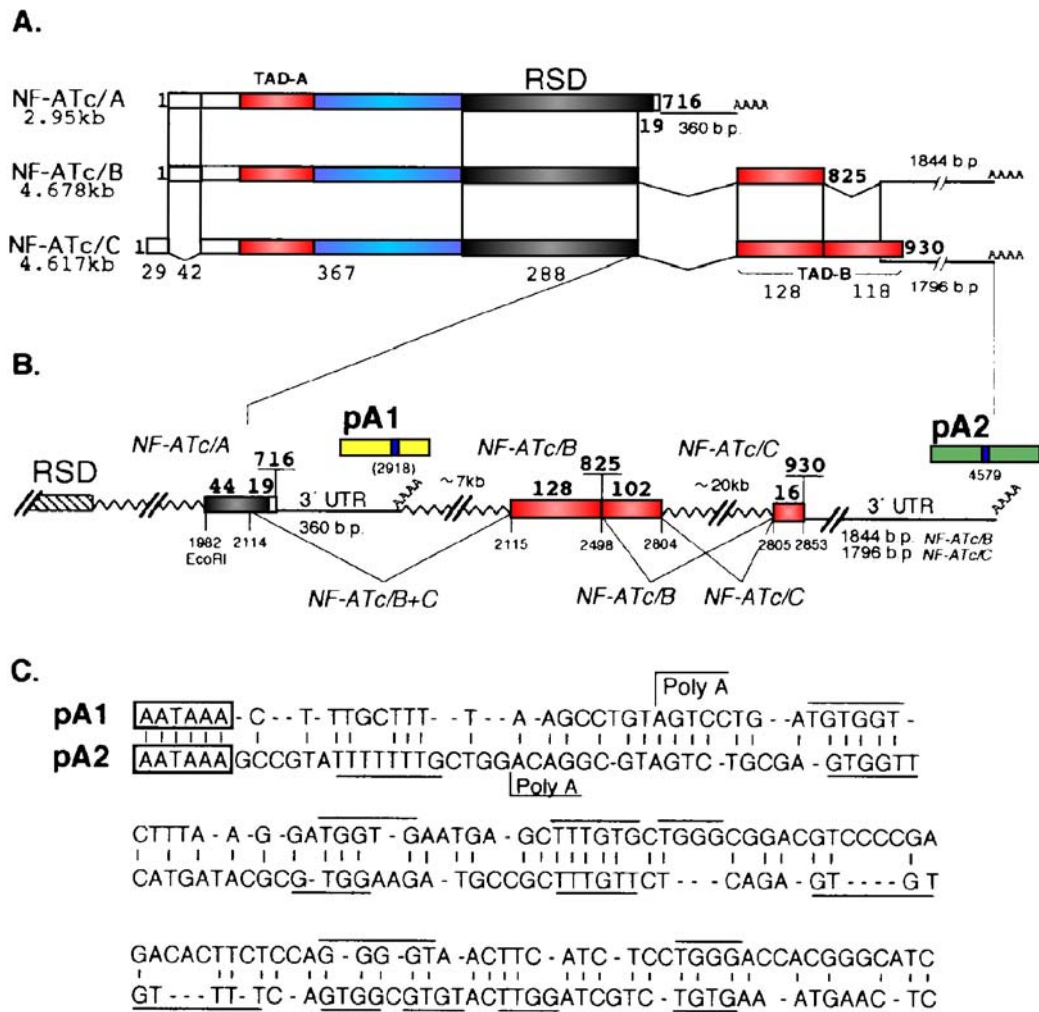


Abbildung 3. NF-ATc-Isoformen unterscheiden sich durch die Struktur ihrer C-Termini (aus Chuvpilo *et al.*, 1999a).

(A) Schematische Darstellung der NF-ATc-cDNAs, die aus einer Namalwa B-Zell-cDNA-Genbank isoliert wurden. Die transaktivierenden Domänen TAD-A und TAD-B sowie die DNA-bindende Rel-ähnliche Domäne (RSD) der NF-ATc-Isoformen sind hervorgehoben. Die nichttranslatierten 3'-mRNA-Sequenzen von 360 bp (für NF-ATc/A), 1844 bp (für NF-ATc/B) und 1796 bp (für NF-ATc/C) sind als schwarze Linien dargestellt. Die Zahl 1 kennzeichnet das Kodon für den Translationsstart, während die übrigen Zahlen für die Anzahl der Aminosäuren der jeweils kodierten Proteine stehen.

(B) Struktur der 3'-Hälfte des menschlichen chromosomalen NF-ATc-Gens. Die Orte der alternativen Spleissvorgänge für die Generierung von NF-ATc/B und NF-ATc/C sowie die Positionen der Polyadenylierungsstellen pA1 und pA2 sind angegeben. (2918) und 4579 entsprechen den Nukleotidpositionen des zentralen T-Nukleotids innerhalb des "poly A addition" Motivs AATAAA der Isoformen NF-ATc/A und NF-ATc/C.

(C) Sequenzen der Polyadenylierungsstellen pA1 und pA2. Die "poly A addition" Motive AATAAA sind in Boxen dargestellt und befinden sich ungefähr 20 bp in 5'-Richtung von den Polyadenylierungsstellen. GT-reiche Sequenzen des RNA-Primärtranskripts als Bindungsstellen für CstF-64 sind unterstrichen.

Isoformen vor allem in der Struktur und Länge ihrer C-Termini unterscheiden (Chuvpilo *et al.*, 1999a). NF-ATc/A ist als kürzeste Isoform identisch mit dem bereits von Northrop und Kollegen beschriebenen NF-ATc (Northrop *et al.*, 1994). Indes unterscheidet sich die Isoform NF-ATc/B von NF-ATc/A durch das Fehlen eines für NF-ATc/A typischen C-terminalen 19-AS-Peptids und die zusätzliche Existenz eines C-terminalen 128-AS-Peptids. NF-ATc/C besitzt darüber hinaus ein weiteres C-terminales Peptid von 118 AS. Anstelle des N-terminalen 42-AS-Peptids von NF-ATc/A und NF-ATc/B weist NF-ATc/C ein ungleiches N-terminales Peptid von 29 AS auf. Einheitlich besitzen alle drei Isoformen eine nichttranslatierte C-terminale mRNA. Während NF-ATc/B und NF-ATc/C mit einer nichttranslatierten 3'-mRNA Sequenz von 1844 respektive 1796 Nukleotiden versehen sind, weist NF-ATc/A 360 Nukleotide als nichttranslatierte mRNA am 3'-Ende auf.

Die beiden zusätzlichen, die Aminosäuren von Position 685 bis 930 umspannenden C-terminalen Peptide von NF-ATc/C besitzen im Vergleich zu den entsprechenden Sequenzen von NF-ATp eine Sequenzhomologie von 30,6% (Luo *et al.*, 1996a; Chuvpilo *et al.*, 1999b). Hierbei weist die in NF-ATc/C proximal gelegene Region von AS 685 bis 812 eine Homologie von 36,7% zu NF-ATp auf. Das Prolin-reiche NF-ATc/C-spezifische Peptid von AS 813 bis 930 hingegen besitzt außer einem identischen Dekapeptid von AS 911 bis 920 eine geringe Homologie zu NF-ATp (Luo *et al.*, 1996a; Chuvpilo *et al.*, 1999b). Dieses Dekapeptid beinhaltet drei Leuzin/Isoleuzin-Motive und könnte demzufolge ein Kernexportsignal darstellen (Klemm *et al.*, 1997). Eine ähnliche Aminosäuresequenz wurde in der C-terminalen transaktivierenden Domäne von NF-ATx1, der längsten Isoform von NF-AT4, identifiziert (Imamura *et al.*, 1998). Prolin-reiche Peptide erscheinen gewöhnlich in zahlreichen transaktivierenden Domänen eukaryontischer Transkriptionsfaktoren (Triezenberg, 1995). In analoger Weise beherbergt das Prolin-reiche Peptid von NF-ATc/C - im Gegensatz zu den Isoformen NF-ATc/A und NF-ATc/B - eine zweite transaktivierende Domäne, TAD-B. Transiente Transfektionsassays mit cDNA-Vektoren der drei NF-ATc-Isoformen und Promotoren, die multiple Kopien der NF-AT-Motive der distalen NF-AT-Bindungsstelle Pu-b_d des IL-2 Promotors und der NF-AT-Bindungsstelle Pu-b_B des IL-4 Promotors enthielten, wiesen individuelle transaktivierende Eigenschaften der drei NF-ATc-Isoformen nach. In diesen Studien trat NF-ATc/C als stärkster Transaktivator hervor, gefolgt von NF-ATc/A, während NF-

ATc/B nur 50% der transaktivierenden Stärke von NF-ATc/A erreichte (Chuvpilo et al., 1999b).

1.2.2 Alternative Polyadenylierung von NF-ATc-Isoformen

Chuvpilo und Kollegen analysierten die 3'-Hälfte des menschlichen chromosomalen NF-ATc-Gens und wiesen die Beteiligung alternativer Spleiss- und Polyadenylierungsvorgänge an der Synthese von NF-ATc-Isoformen nach (Chuvpilo et al., 1999a). Entsprechend Abbildung 3 B sind die für NF-ATc/B und NF-ATc/C spezifischen Genabschnitte in zwei Exons, die für Peptide von 230 beziehungsweise 16 Aminosäuren kodieren, organisiert. Ferner beinhaltet das 3'-Exon nichttranslatierte mRNA Sequenzen von 1844 bp für NF-ATc/B und 1796 bp für NF-ATc/C. Im Zuge der Synthese von NF-ATc/B erfolgt ein Spleissen innerhalb der cDNA Positionen von 2498 bis 2805. An dieser Stelle wird ein Terminierungs-Codon eingefügt, so dass die folgenden 48 bp als Teil innerhalb der nichttranslatierten 3'-mRNA von insgesamt 1844 bp miteinbezogen werden. Bei der Synthese von NF-ATc/C entsteht durch Spleissen innerhalb der cDNA Positionen 2804 und 2805 ein C-terminales mRNA Fragment, das für ein Peptid aus 16 Aminosäuren und eine 3'-mRNA Sequenz von 1796 Nukleotiden kodiert. Für das ausschließlich in NF-ATc/A vorhandene C-terminale Peptid von 19 Aminosäuren kodiert ein Exon, das darüber hinaus eine für die vorangehenden 44 Aminosäuren kodierende DNA-Sequenz von 132 bp und eine nichttranslatierte 3'-mRNA von 360 bp beherbergt. Innerhalb dieses 3'-mRNA Segments befindet sich das AATAAA "poly A addition" Motiv, ungefähr 20 bp vor der Polyadenylierungsstelle pA1 angeordnet, die von mehreren kurzen GT-reichen Abschnitten gefolgt wird und für die Polyadenylierung von NF-ATc/A verantwortlich ist (Abb. 3 C). Diese Motive sind ebenso Teil der distalen Polyadenylierungsstelle pA2, deren Polyadenylierung NF-ATc/B- und NF-ATc/C-RNAs bildet (Chuvpilo et al., 1999a).

1.3 T-Zelldifferenzierung

Die Funktionen des Immunsystems werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen ausgeführt und moduliert. Antigenerkennung über den T-Zellrezeptor-Komplex (TCR) und kostimulatorische Signale über das CD28-Oberflächenmolekül (Schwartz, 1992; Mueller *et al.*, 1989; June *et al.*, 1990; Linsley *et al.*, 1993) stellen den ersten Schritt der Aktivierung naiver CD4⁺T-Zellen dar und vermitteln über eine Synthese von IL-2 und Expression des IL-2-Rezeptors deren klonale Expansion und Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen (Hsieh *et al.*, 1993; Rocken *et al.*, 1992; Kamogawa *et al.*, 1993; Seder und Paul, 1994). Diese beiden Populationen unterscheiden sich jeweils durch ein bestimmtes Muster von Zytokinen und dementsprechenden individuellen immunmodulatorischen Eigenschaften (Mosmann und Coffman, 1989; Paul und Seder, 1994). Th1-Zellen exprimieren neben IL-2 die inflammatorischen Zytokine IFN- γ und Lymphotoxin (LT). IFN- γ aktiviert in Makrophagen phagozytotische und lytische Prozesse und aktiviert demzufolge die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger (Sher und Coffman, 1992). Dysregulierte zelluläre Immunreaktionen spielen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese organspezifischer Autoimmunerkrankungen (O'Garra und Murphy, 1993; Powrie und Coffman, 1993; Liblau *et al.*, 1995). Th2-Zellen exprimieren vorwiegend die Lymphokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Mosmann und Coffman, 1989). IL-4 moduliert die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen und reguliert ferner den Ig-Klassenwechsel zu IgG1 und IgE (Paul, 1991). Eine effiziente Abwehr gegen Helminthen setzt eine vorwiegend humorale Th2-gerichtete Immunantwort voraus (Trinchieri, 1995). Indes bildet eine überschießende Th2-gerichtete Immunreaktion die Grundlage für atopisch-allergische Erkrankungen (Romagnani, 1994).

Ursprünglich für CD4⁺T-Zellen der Maus beschrieben (Mosmann *et al.*, 1986; Cherwinski *et al.*, 1987) konnten unterschiedliche T-Zell-Populationen mit einer selektiven Synthese von Lymphokinen auch für Zellen des menschlichen Immunsystems charakterisiert werden (Romagnani *et al.*, 1991; Del Prete *et al.*, 1991). Darüber hinaus wurden menschliche und murine T-Zellklone isoliert, die Zytokine beider Th-Zellsubtypen synthetisieren, und als Th0-Zellen bezeichnet (Sher und Coffman, 1992; Romagnani *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 1996). Ob diese Zellen Vorläuferzellen mit dem Potential zur Differenzierung sowohl in Th1- als auch in Th2-

Zellen sind oder eine eigenständige differenzierte Zellpopulation repräsentieren, ist noch nicht völlig geklärt (Mosmann *et al.*, 1991; Kamogawa *et al.*, 1993).

1.3.1 Zytokine und die T-Zelldifferenzierung

Unterschiedliche Faktoren beeinflussen die Differenzierung des naiven CD4⁺T-Lymphozyten zum Th1- oder Th2-Phänotyp. Sowohl die Konzentration des Antigens (Bretscher *et al.*, 1992; Constant *et al.*, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1995; Mosmann und Sad, 1996) als auch die Art der Kostimulation naiver CD4⁺T-Zellen sind dabei von Bedeutung. Die Liganden für die CD28-Oberflächenmoleküle B7.1 und B7.2, die an der Oberfläche von Makrophagen, aktivierten B-Zellen und dendritischen Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden (Liu *et al.*, 1992; Larsen *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1993), tragen zur differentiellen Entwicklung bei (Kuchroo *et al.*, 1995; Lenschow *et al.*, 1995). Dementsprechend hemmen *in vivo* blockierende Antikörper gegen B7.1 die Differenzierung zu Th1-Zellen, Antikörper gegen B7.2 die Differenzierung zu Th2-Zellen (Thompson, 1995).

Den entscheidenden Einfluß haben jedoch spezifische Zytokine zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation über den TCR der naiven CD4⁺T-Zelle (Seder und Paul, 1994; Abbas *et al.*, 1996). IL-4, das in der Initialphase der Immunantwort hauptsächlich von Mastzellen, Basophilen und einer Subpopulation der CD3⁺CD4⁺NK1.1⁺T-Zellen exprimiert und bereitgestellt wird (Yoshimoto und Paul, 1994), leitet in Verbindung mit einem Antigen und kostimulatorischen Signalen die Differenzierung zu Th2-Zellen ein (Le Gros *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990). Demgegenüber spielen IL-12 und IFN- γ die entscheidende Rolle bei der Differenzierung zu Th1-Zellen (Hsieh *et al.*, 1993; Seder *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1994a; Seder und Paul, 1994). Ursprünglich als "cytotoxic lymphocyte maturation factor" (CLMF, Stern *et al.*, 1990) oder als "natural killer cell stimulatory factor" (NKSF, Kobayashi *et al.*, 1989) beschrieben, wird IL-12 vorwiegend von Makrophagen und Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (APC) nach deren Aktivierung über bakterielle Antigene synthetisiert (Trinchieri *et al.*, 1992; Macatonia *et al.*, 1995) und stimuliert natürliche Killerzellen zur Synthese von IFN- γ (Tripp *et al.*, 1993; Mattner *et al.*, 1993). Schmitt und Kollegen konnten zeigen, dass IL-12 und IFN- γ allein nur schwache Induktoren für die Differenzierung naiver CD4⁺T-Zellen in Th1-Zellen sind. Erst die Anwesenheit beider Zytokine ist für eine

Differenzierung in Th1-Zellen ausreichend (Schmitt *et al.*, 1994b). Gleichzeitig inhibiert IL-12 die Entwicklung in IL-4-produzierende Th2-Zellen (Manetti *et al.*, 1993; Schmitt *et al.*, 1994a). Bei simultaner Stimulierung von CD4⁺T-Zellen mit IL-12 und IL-4 dominiert schließlich bei Erreichen einer bestimmten Schwellenwertkonzentration von IL-4 die Th2-gerichtete Differenzierung über den immunmodulatorischen Effekt von IL-12 (Seder und Paul, 1994; Schmitt *et al.*, 1994a).

1.3.2 Kontrolle des IL-4 Promotors und des *cis*-regulatorischen Elements Pu-b_B

Da IL-4 bei der Th2-Zelldifferenzierung die zentrale Rolle einnimmt (Le Gros *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990; Hsieh *et al.*, 1993) und die Regulationsmechanismen des IL-4 Gens für das Verständnis transkriptioneller Vorgänge bei der T-Zelldifferenzierung notwendig sind, werden an dieser Stelle die Struktur des IL-4 Promotors und die Transkriptionskontrolle des IL-4 Gens dargestellt.

Als IL-4 Promotor werden die ersten 270 bp vor dem Transkriptionsstart, die eine T-zellspezifische, induzierbare und durch die Immunsuppressiva CsA und FK506 hemmbare Regulation des IL-4 Gens vermitteln, bezeichnet (Bruhn *et al.*, 1993; Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993; Todd *et al.*, 1993). Jenseits dieser Region konnte in menschlichen Jurkat T-Zellen, die nur geringe Mengen an IL-4 exprimieren, ein "silencer-Element" ("negative regulatory element", NRE) identifiziert werden. Durch Suppression eines positiv regulatorischen Elements (PRE-1), das sich von -239 bis -224 bp innerhalb des IL-4 Promotors erstreckt, hemmt es die Aktivität des IL-4 Promotors (Li-Weber *et al.*, 1992, 1993). In Mastzellen wurde ein intronischer Enhancer charakterisiert, der an der Kontrolle des IL-4 Promotors beteiligt ist (Henkel *et al.*, 1992). Jenseits des 3'-Endes des IL-4 Promotors gelang zudem die Identifikation eines durch NF-AT-Faktoren induzierbaren und Cyclosporin A-sensitiven Enhancers (Agarwal *et al.*, 2000).

DNase I-Footprint-Experimente identifizierten innerhalb des IL-4 Promotors mehrere Erkennungssequenzen für DNA-bindende Faktoren, darunter vier *cis*-regulatorische Elemente, die NF-AT-Faktoren binden, und als Purin-reiche Boxen Pu-b_{A-D} bezeichnet wurden. Sie weisen Sequenzhomologien zu den beiden hochaffinen NF-AT-Bindungsstellen des IL-2 Promotors auf und beherbergen das für die DNA-Bindung von NF-AT-Faktoren notwendige Kern-Motiv GGAAAA (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*,

1993). Gezielte Punktmutationen innerhalb der Purin-reichen Boxen Pu-b_{A-D} heben die funktionelle Bedeutung der NF-AT-Faktoren für die transkriptionelle Aktivierung des IL-4 Promotors hervor. Dementsprechend verlor die Mutante der distalen NF-AT-Bindungssequenz Pu-b_D jegliche transkriptionelle Aktivität des IL-4 Promotors, während Mutanten des Elements Pu-b_C nur noch 20-25% (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993), die des Elements Pu-b_A 65% Restaktivität aufwiesen (Chuvpilo *et al.*, 1993; Li-Weber *et al.*, 1994).

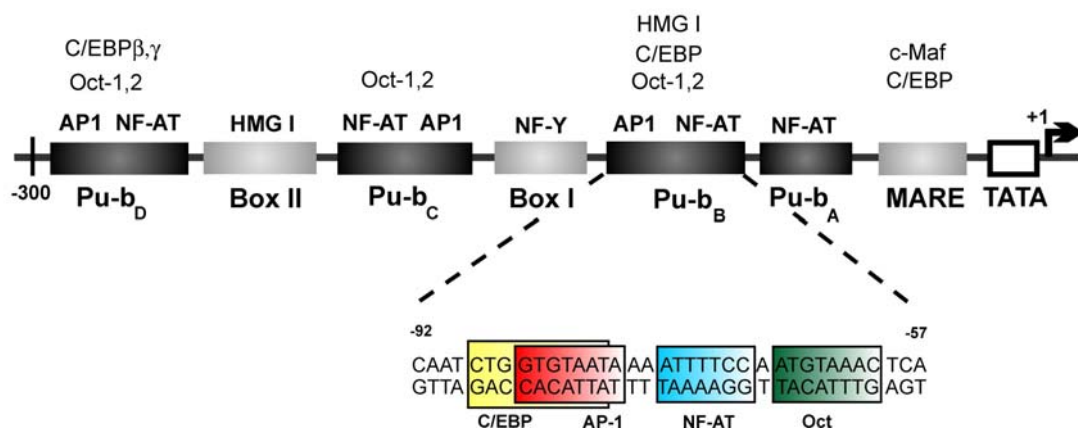


Abbildung 4. Schematische Darstellung des murinen IL-4 Promotors und des cis-regulatorischen Elements Pu-b_B. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die in DNase I-Footprint-Experimenten ermittelt wurden (Chuvpilo *et al.*, 1993), sind als Boxen dargestellt. Schwarz gefüllte Boxen zeigen Bindungselemente, die von NF-AT-Faktoren erkannt, und als Purin-reiche Boxen Pu-b_A, Pu-b_B, Pu-b_C und Pu-b_D bezeichnet werden. Pu-b_B wurde als Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren NF-AT, AP-1, C/EBP, Oct-1,2 und HMG I charakterisiert (Klein-Hessling *et al.*, 1996). Daneben sollten Octamer- und AP-1-Faktoren aufgrund ihrer Sequenzhomologie auch die Pu-b_C und Pu-b_D binden können (Chuvpilo *et al.*, 1993). Die Sequenz der Pu-b_B von -92 bis -57 bp zeigt die essentiellen Basenpaare für die Bindung von NF-AT, AP-1, C/EBP und Oct-Faktoren.

Die am besten erforschte NF-AT-Bindungsstelle innerhalb des IL-4 Promotors ist das cis-regulatorische Element Pu-b_B, das in unterschiedlichen Studien auch als P1 (Wenner *et al.*, 1997), CS1-Element (Bruhn *et al.*, 1993), P-site (Matsuda *et al.*, 1994;

Kubo *et al.*, 1994), UPSIL-4 ("upstream promotor site", Pfeuffer *et al.*, 1994) und ARE ("activation responsive element", Tara *et al.*, 1995) bezeichnet wurde. Die 35 bp messende Pu-b_B umfasst die Nukleotide von -92 bis -57 des IL-4 Promotors. Gezielte Punktmutationen innerhalb dieser Sequenz führten zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität des IL-4 Promotors von 75-80% (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993). NF-AT-Faktoren binden zusammen mit AP-1-Proteinen an die Pu-b_B, die um die Position -82 eine TRE-ähnliche Sequenz als Bindungsstelle für AP-1-Faktoren enthält (Chuvpilo *et al.*, 1993). Dabei stabilisiert eine gemeinsame Bindung von NF-AT- und AP-1-Faktoren nicht nur die DNA-Bindung beider Faktoren, sondern steigert darüber hinaus in synergistischer Weise die transkriptionelle Aktivität des IL-4 Promotors (Jain *et al.*, 1992; Boise *et al.*, 1993; Northrop *et al.*, 1993; Yaseen *et al.*, 1994). EMSA-Versuche identifizierten JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 als solche AP-1-Komponenten, die an der gemeinsamen Bindung mit NF-AT-Faktoren beteiligt sind (Rooney *et al.*, 1995b).

Zudem dient die Pu-b_B als niedrigaffine Bindungsstelle für Octamer-Faktoren (Chuvpilo *et al.*, 1993; Pfeuffer *et al.*, 1994) und weist eine entsprechende Sequenzhomologie zur "upstream promotor site" des IL-2 Promotors auf (UPS, Serfling *et al.*, 1995). Im Gegensatz zum UPS-Element des IL-2 Promotors sind innerhalb der Pu-b_B des IL-4 Promotors die Bindungsstellen für Octamer- und AP-1-Faktoren nicht überlappend angeordnet, sondern durch ein NF-AT-Bindungsmotiv voneinander getrennt. Außerdem ließen sich durch Überexpression des Faktors Oct-2 in T-Zellen weder ein Polymer der Pu-b_B transaktivieren noch eine Aktivitätszunahme des IL-4 Promotors erreichen (Pfeuffer *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang wiesen kompetitive Bindungsstudien nach, dass NF-AT-Faktoren in der Lage sind, Oct-2 von ihrer DNA-Bindung an die Pu-b_B zu verdrängen (Pfeuffer *et al.*, 1994).

Aufgrund einer kontinuierlichen 12-fachen A+T Nukleotidfolge stellt die Pu-b_B eine hochaffine Bindungsstelle für HMG I(Y)-Proteine dar, die an doppelsträngige A+T Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als drei Basenpaare binden (Chuvpilo *et al.*, 1993). DNA-Bindungsstudien wiesen eine kompetitive Bindung von NF-AT- und HMG I(Y)-Faktoren an die Pu-b_B des IL-4 Promotors nach (Klein-Hessling *et al.*, 1996). Demgegenüber reduziert die Mutation einer hochaffinen HMG I(Y)-Bindungsstelle die HMG I(Y)-Bindung und führt zu einer konsekutiven Zunahme der Aktivität des IL-4 Promotors (Klein-Hessling *et al.*, 1996).

1.3.3 Transkriptionsfaktoren und die T-Zelldifferenzierung

STAT-Faktoren, die von Lymphokinen aktiviert werden, spielen eine besonders wichtige Rolle bei der Differenzierung von T-Zellen. Zwei Mitglieder aus der Familie der STAT-Faktoren ("signal transducer and activators of transcription"), STAT6 und STAT4, wirken dabei als Gegenspieler. Die wichtige Funktion des IL-4 induzierten Transkriptionsfaktors STAT6 bei der Th2-Zelldifferenzierung wurde in drei unabhängig voneinander generierten STAT6-defizienten Mäuselinien belegt (Takeda *et al.*, 1996; Shimoda *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1996a). Obwohl STAT6 in zahlreichen Geweben und hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Hou *et al.*, 1994; Schindler *et al.*, 1994), fehlen STAT6-defizienten Mäusen organische Fehlentwicklungen. Allerdings besitzen STAT6-defiziente Mäuse schwere Defekte bei der IL-4-vermittelten Immunantwort. Dementsprechend führt die STAT6-Defizienz zu einem Verlust der Expression des IL-4 Rezeptors (Takeda *et al.*, 1996) sowie des IgE-Klassenwechsels in B-Zellen (Shimoda *et al.*, 1996). Interessanterweise verlieren naive STAT6-defiziente T-Zellen zudem die Eigenschaft, sich nach *in vitro* Stimulation mit IL-4 zu Th2-Zellen zu differenzieren (Kaplan *et al.*, 1996a). STAT6 reguliert die Aktivität des IL-4 Promotors in Th2-Zellen nicht alleine durch Bindung an die Pu-b_C, sondern auch durch Bindung an ein "silencer"-Element, das in der untranslatierten 3'-Region des IL-4 Gens lokalisiert ist. Demgemäß führen Mutationen der STAT6-Bindungsstelle innerhalb dieses "silencer"-Elements zu einer Abnahme der Aktivität des IL-4 Promotors in Th2-Zellen (Kubo *et al.*, 1997).

IL-12, das wesentlich an den initialen Differenzierungsschritten der Th1-Zellentwicklung beteiligt ist, steigert die transkriptionelle Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT4 (Bacon *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 1995). Die Inaktivierung des STAT4-Gens führt zu schwerwiegenden Defekten der IL-12-vermittelten Immunantwort. Dazu zählen unter anderem die Synthese von IFN- γ und die Aktivierung zytolytischer Funktionen von NK-Zellen (Thierfelder *et al.*, 1996). Außerdem verlieren naive CD4⁺T-Zellen STAT4-defizienter Mäuse die Fähigkeit, sich nach Stimulation mit IL-12 zu Th1-Zellen zu differenzieren. In vergleichbarer Weise unterbleibt die Th1-Zelldifferenzierung dieser Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*, einem Erreger, der physiologischerweise eine Th1-gerichtete Immunantwort im Wirtsorganismus induziert (Magram *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1996b).

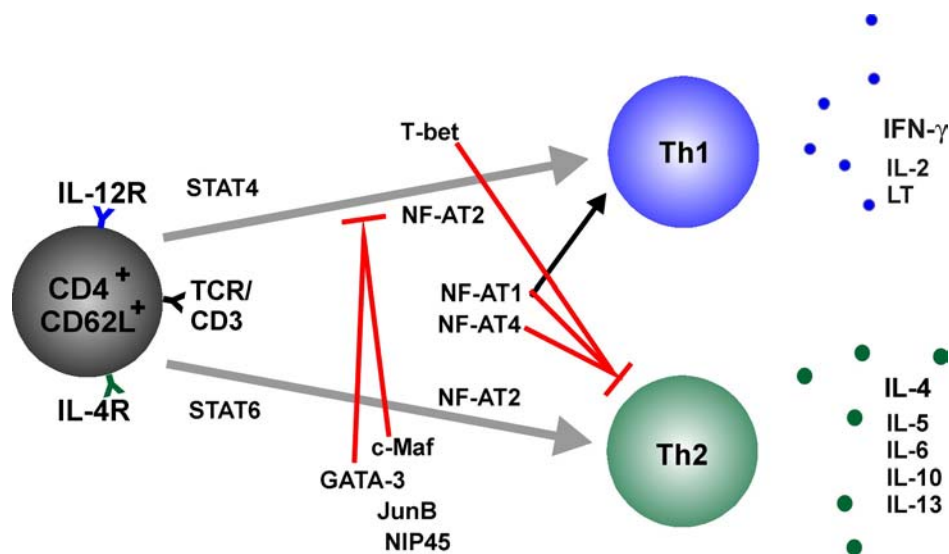


Abbildung 5. Die Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Differenzierung naiver CD4⁺T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen (nach Serfling *et al.*, 2000). T-Zellen werden bezüglich ihres Musters der Lymphokinexpression zu Th1- und Th2-Zellen klassifiziert. Gleichzeitige Stimulation naiver CD4⁺T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor Komplex und den IL-12 bzw. IL-4 Rezeptor stellen den wesentlichen Schritt der Differenzierung zu Th1-beziehungsweise Th2-Zellen dar. Darüber hinaus üben eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren einen Einfluß auf die T-Zelldifferenzierung aus. So auch die beiden antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren STAT4 und STAT6. Inaktivierung des STAT4-Gens führt zu schwerwiegenden Defekten der Th1-Zellentwicklung, während die Defizienz des STAT6-Gens eine verminderte Th2-Zelldifferenzierung als Folge hat. T-bet und GATA-3 kontrollieren neben ihrer Rolle bei der T-Zelldifferenzierung ebenso die Expression von Lymphokinen in Th-Effektorzellen. Überexpression von T-bet führt zu einer starken Induktion von IFN- γ , während gleichzeitig die Synthese Th2-typischer Lymphokine supprimiert wird. Demgegenüber induziert GATA-3 die Synthese der Th2-typischen Lymphokine und führt zu einer verminderten Th1-gerichteten Immunantwort. NF-ATc reguliert die Differenzierung sowohl zu Th1- als auch zu Th2-Zellen und induziert die Expression der Th1- und Th2-typischen Lymphokine. c-Maf scheint die Th2-Differenzierung durch eine selektive Kontrolle des IL-4 Promotors zu regulieren, denn Inaktivierung von c-Maf führt zu einem vollständigen Verlust der IL-4 Synthese ohne jedoch die Synthese anderer Th2-typischer Lymphokine zu beeinflussen. Inaktivierung des NF-ATp-Gens resultiert in einer Zunahme der Synthese der Th2-typischen Lymphokine und einer gesteigerten Th2-gerichteten Immunantwort. Obwohl NF-ATp die Promotoren fast aller Lymphokingene positiv reguliert, scheint NF-ATp in der späten Phase der Immunantwort die Funktion eines Repressors der Th2-typischen Lymphokine auszuüben und die Th2-gerichtete Immunantwort zu terminieren.

T-bet, ein vorzugsweise in Th1-Zellen exprimiertes Protein aus der Familie der T-box Transkriptions- und Differenzierungsfaktoren, trägt über die Aktivierung des IFN- γ Promotors zur Th1-Zelldifferenzierung bei. Dabei steigert IFN- γ durch Zunahme der Expression des IL-12-Rezeptors die Wirkung von IL-12, das seinerseits über den Transkriptionsfaktor STAT4 die Entwicklung zu Th1-Zellen induziert. Die retrovirale Überexpression von T-bet in Th2-Zellen führt nicht nur zu einer Aktivierung der IFN- γ Produktion, sondern supprimiert in diesen Zellen gleichzeitig die Synthese von IL-4 und IL-5 (Szabo *et al.*, 2000).

Neben der Pu-b_D als Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren C/EBP β und C/EBP γ beherbergt der IL-4 Promotor an Position -43 bis -35 bp eine zusätzliche proximale Bindungsstelle für C/EBP-Faktoren. In Transfektionsversuchen führt die retrovirale Überexpression von C/EBP β in EL-4 Thymomzellen und Jurkat T-Zellen bei gleichzeitiger Reduktion der Expression von IL-2 und IFN- γ zu einer gesteigerten Aktivität des IL-4 Promotors (Berberich-Siebelt *et al.*, 2000). C/EBP-Faktoren gehören wie AP-1-Faktoren zur großen Gruppe der "basic leucine zipper" Proteine. Im Gegensatz zu AP-1-Faktoren kooperieren C/EBP-Faktoren jedoch nicht mit NF-AT-Faktoren bei der Induktion des IL-4 Promotors, sondern kompetitieren vielmehr mit diesen um die Bindung an die Pu-b_D des IL-4 Promotors (Berberich-Siebelt *et al.*, 2000).

Aufgrund ihrer selektiven Expression in Th2-Zellen und Th2-Zelllinien (Zhang *et al.*, 1997) rückten die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und c-Maf zunehmend ins Interesse der Erforschung der T-Zelldifferenzierung. Transfektion von Th2-Zelllinien mit einem GATA-3 "antisense"-cDNA-Expressionsvektor führte zu einer verringerten Synthese der Th2-typischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 IL-10 und IL-13 (Zheng und Flavell, 1997), während demgegenüber die transgene Expression von GATA-3 in der B-Lymphomzelllinie M12, die *per se* kein endogenes IL-4 exprimiert, eine Transaktivierung des IL-4 Promotorkonstruktes bewirkte (Zheng und Flavell, 1997). Zheng und Flavell generierten CD4/GATA-3-transgene Mäuse, deren CD4⁺T-Zellen mehr GATA-3 exprimierten. Diese Zellen synthetisierten - nach *in vitro* Differenzierung zu Th1-Zellen - neben Th1-Lymphokinen zusätzlich Th2-typische Lymphokine, wie IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 (Zheng und Flavell, 1997). Analog dazu wiesen spätere Studien nach, dass GATA-3 nicht nur die Transkription von IL-4 und IL-5 induziert (Zhang *et al.*, 1997; Ranganath *et al.*, 1998), sondern gleichzeitig die Differenzierung zu Th1-Zellen inhibieren kann (Ouyang *et al.*, 1998).

Erste Hinweise für eine Beteiligung von c-Maf bei der Th2-Zelldifferenzierung lieferten Studien zur Expression von c-Maf in Th-Zellsubtypen. Dabei wurde eine vorzugsweise Expression von c-Maf-mRNA in Th2-Zelllinien nachgewiesen (Ho *et al.*, 1996). c-Maf bindet an eine Sequenz, die als "c-Maf responsive element" (MARE) bezeichnet wurde und innerhalb der Positionen -42 bis -37 bp des IL-4 Promoters vor der Pu-b_A lokalisiert ist (Ho *et al.*, 1996). Transiente Transfektionsversuche zeigten, dass c-Maf den IL-4 Promotor in Th1-Zelllinien und in der B-Lymphomzelllinie M12 transaktivieren kann (Ho *et al.*, 1996). Noch eindrucksvoller konnte die Induktion des endogenen IL-4 Promoters durch die Kotransfektion der M12-Lymphomzelllinie mit c-Maf- und NF-ATp-Expressionsvektoren gesteigert werden, indem sie an eine gemeinsame DNA-Sequenz, die Bindungsmotive für beide Transkriptionsfaktoren beinhaltet, binden (Ho *et al.*, 1996). Folglich führte die Überexpression von c-Maf in transgenen Mäusen zu einer prädominanten Th2-Zelldifferenzierung und Th2-gerichteten Immunantwort, die mit einer gesteigerten Synthese Th2-typischer Lymphokine und der IL-4-abhängigen Immunglobuline IgG1 und IgE einhergingen (Ho *et al.*, 1998). Offenbar reguliert c-Maf die Th2-Zelldifferenzierung durch eine selektive Kontrolle des IL-4 Promoters: während die Inaktivierung von c-Maf in CD4⁺T-Zellen einen fast vollständigen Verlust der IL-4 Synthese zur Folge hatte, blieb die Synthese anderer Th2-typischer Lymphokine unbeeinflusst (Kim *et al.*, 1999).

Die Identifizierung der *cis*-regulatorischen Elemente Pu-b_{A-D} innerhalb des IL-4 Promoters, dessen Induzierbarkeit durch Ionomycin als auch dessen Hemmbarkeit durch Cyclosporin A heben die funktionelle Bedeutung der NF-AT-Faktoren für die Transaktivierung des IL-4 Promoters hervor (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 1994 und 1995b). Inzwischen wurden vier Mitglieder der Familie der NF-AT-Faktoren charakterisiert (Rao *et al.*, 1997; Crabtree, 1999; Kiani *et al.*, 2000), und Studien sowohl mit NF-ATp- als auch mit NF-ATc-defizienten Mäusen belegen einen wesentlichen Beitrag beider NF-AT-Faktoren an der selektiven Induktion des IL-4 Gens und der Th2-Zelldifferenzierung. Demzufolge geht die Inaktivierung des NF-ATc-Gens mit einer Beeinträchtigung der Synthese der Th2-typischen Lymphokine IL-4, IL-6 und IL-10 (Ranger *et al.*, 1998b; Yoshida *et al.*, 1998) einher. Indes resultiert die Inaktivierung des NF-ATp-Gens in NF-ATp-defizienten Mäusen in einer verstärkten Th2-gerichteten Immunantwort, die in der späten Phase der T-Zellaktivierung mit einer vermehrten Synthese von IL-4 und anderen Th2-typischen Lymphokinen einhergeht (Hodge *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997). Noch ausgeprägter finden sich diese

phänotypischen Veränderungen in NF-ATp- und NF-AT4-doppelt-defizienten Mäusen (Ranger *et al.*, 1998c). Auf diesen Beobachtungen basierte zunächst die Hypothese, NF-ATc induziere die IL-4 Synthese, während NF-ATp und NF-AT4 eine hemmende Wirkung auf die IL-4 Synthese ausübten. Indes zeigte sich, dass NF-ATp-defiziente Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen keine Unterschiede in den absoluten Spitzenwerten der IL-4 Transkripte, sondern eher eine insgesamt prolongierte Phase der IL-4-Gentranskription aufwiesen (Kiani *et al.*, 1997). Zudem führte in zwei unabhängig voneinander generierten NF-ATp-defizienten Mäuselinien die Inaktivierung von NF-ATp in der initialen Phase der Immunantwort ebenso wie die NF-ATc-Defizienz zu einer Beeinträchtigung der Synthese der Th2-typischen Lymphokine (Hodge *et al.*, 1996b; Schuh *et al.*, 1997). Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass sowohl NF-ATc als auch NF-ATp die frühe Induktion des IL-4 Promotors regulieren, aber darüber hinaus NF-ATp gegebenenfalls gemeinsam mit NF-AT4 für die Terminierung der Aktivität des IL-4 Promotors in der Spätphase der IL-4-vermittelten Immunantwort verantwortlich ist (Kiani *et al.*, 1997 und 2000; Serfling *et al.*, 2000).

Jüngste Ergebnisse lassen darüber hinaus auf eine Beteiligung von NF-ATp und NF-ATc an der Th1-gerichteten Immunantwort schließen. T-Zellen transgener Mäuse, die eine dominant negative Version von NF-ATc exprimieren und mit *Mycobacterium bovis* infiziert wurden, wiesen eine verringerte Synthese von IFN- γ auf. Dabei induziert *Mycobacterium bovis* regelmäßig eine Th1-gerichtete Immunantwort im Wirtsorganismus (Erb *et al.*, 1998). In vergleichbarer Weise führte die Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort in NF-ATp-defizienten Mäusen durch die Infektion mit *Mycobacterium bovis* zu einer verminderten Synthese von IFN- γ (Erb, K., Twardzik, T. *et al.*, in Bearbeitung).

1.4 Fragestellung

Klonierungsarbeiten in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. E. Serfling zeigten, dass NF-ATc in drei Isoformen mit individuellen transaktivierenden Eigenschaften exprimiert wird. Trotz identischer DNA-Bindungsstellen wiesen Studien mit NF-ATp- und NF-ATc-defizienten Mäusen nach, dass beide NF-AT-Faktoren ein individuelles Muster an unterschiedlichen Zielgenen, insbesondere an Lymphokingenen, besitzen. Desweiteren könnte ein unterschiedlicher Expressionsmodus beider NF-AT-Faktoren

zu einer selektiven Induktion von Lymphokinpromotoren beitragen. Während NF-ATp konstitutiv exprimiert wird, beschrieben Northrop und Kollegen NF-ATc als einen induzierbaren Transkriptionsfaktor (Northrop *et al.*, 1994). Vor diesem Hintergrund stellten wir uns die Fragen, ob sich (1.) dieser beschriebene Modus der induzierbaren Synthese auf alle NF-ATc Isoformen übertragen lässt, und (2.) ob eine veränderbare nukleäre Zusammensetzung an NF-ATc-Isoformen mit unterschiedlichen transaktivierenden Eigenschaften zu einer selektiven Gentranskription im Zuge der T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung beiträgt.

Zunächst untersuchten wir die Expression von NF-ATc-Isoformen sowie deren RNA-Transkription in unterschiedlichen lymphoiden T- und B-Tumorzelllinien. In Zusammenarbeit mit PD Dr. E. Schmidt (Immunologisches Institut der Universität Mainz) charakterisierten wir schließlich anhand des Modells der *in vitro* Differenzierung naiver CD4⁺T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen den Expressionsmodus von NF-ATc-Isoformen im Zuge der T-Zelldifferenzierung.

Dabei stellten wir fest, dass nur die Expression der kurzen Isoform NF-ATc/A induziert wird, während die der längeren Isoformen, NF-ATc/B und NF-ATc/C, nahezu konstitutiv verläuft. Interessanterweise erfolgt die Induktion der NF-ATc/A-Isoform nur in Antigen-erfahrenen Effektor-T-Zellen, nicht jedoch in naiven T-Zellen. Das wird aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Benutzung einer proximalen, gering-affinen poly A-"site", pA1, bedingt, die nur bei hohen Konzentrationen von poly A-Faktoren – wie sie in Effektor-T-Zellen vorliegen – erkannt wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Es wurden Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c Ann im Alter von acht bis zwölf Wochen verwendet. Der Stamm wurde ursprünglich vom Zentralinstitut für Versuchstierforschung, Hannover, bezogen und im Tierstall des Immunologischen Instituts der Universität Mainz weitergezüchtet.

2.1.2 Gewebekulturzellen

Jurkat	humane T-Zell-Lymphomlinie
A3.01	humane T-Zell-Lymphomlinie
H9	humane T-Zell-Lymphomlinie
Raji	humane B-Zell-Lymphomlinie (Burkitt-Lymphom)
Daudi	humane B-Zell-Lymphomlinie (Burkitt-Lymphom)
293	embryonale Nierenkarzinomzellen des Menschen

2.1.3 Murine CD4⁺T- und CD4⁺/CD62L^{high}T-Zellen

CD4⁺T- und CD4⁺/CD62L^{high}T-Zellen werden aus den Milzen von Balb/c Ann-Mäusen über MACS-Säulen mit an Microbeads (Miltenyi Biotec) gekoppelten Antikörpern gegen CD4 und CD62L gewonnen. Diese Zellen werden gemäß einem *in vitro* Differenzierungsmodell zu Th1- und Th2-Zellen differenziert (Schmitt *et al.*, 1994a).

2.1.4 Nährmedien

DMEM (+)-Medium	500 ml	DMEM-Medium
	5 ml	100x nichtessentielle Aminosäuren
	5 ml	100 mM Natriumpyruvat

	7 ml	200 mM Glutamin
	1 x 10 ⁵ I.E.	Penicillin G
	1 x 10 ⁵ I.E.	Streptomycinsulfat
	5 % (v/v)	fötale Kälberserum (FCS)
RPMI (+)-Medium	500 ml	RPMI-1640-Medium
	5 ml	100x nichtessentielle Aminosäuren
	5 ml	100 mM Natriumpyruvat
	7 ml	200 mM Glutamin
	12,5 ml	10%iges Na ₂ HCO ₃
	1 x 10 ⁵ I.E.	Penicillin G
	1 x 10 ⁵ I.E.	Streptomycinsulfat
	5 ml/10 Liter	25%ige HCl
	5 % (v/v)	fötale Kälberserum (FCS)
LB-Medium	1 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Hefeextrakt
	0,5 %	NaCl
	+1,5 %	Agar (für Agar-Platten)
MEM	10,58 g/l	MEM-Trockenpulver
	4,7 g/l	HEPES
IMDM	17,67 g/l	IMDM-Trockenpulver
	3,02 g/l	NaHCO ₃
	1%	Penicillin G
	1%	Streptomycinsulfat
	5 x 10 ⁻⁵ M/l	2-Mercaptoethanol
Testmedium	IMDM	
	5%	FCS
	1%	Glutamin
	1%	Natriumpyruvat

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotgerät TransphorLid	Hoefer
Gelkammern	Hoefer
Geltrockner	BioRad
Hochleistungszentrifuge	Beckman
Kühlzentrifuge	Heraeus
Mikrozentrifuge	Eppendorf
3MM-Papier	Whatman
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll
Nylonmembran Qiabrane	Qiagen
Phosphor Imager	Molecular Dynamics
Röntgenfilme (BioMax)	Kodak
Ultrazentrifuge	Beckman
Zählkammer	Hartensein
Zellkulturplatten	
6-well Flachboden	Costar
24-well Flachboden	Costar
48-well Flachboden	Costar
96-well Spitzboden	Greiner
96-well Immunoassay-Platten	Geiner

2.1.6 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agar-Agar	Sigma
Agarose	Roth
2,2'-Amino-bis-(3-Ethylbenzthiazolin- 6-Sulfonsäure) (ABTS)	Sigma
Ammoniumperoxydsulfat (APS)	Sigma
Ampicillin, 40 mg/ml	Hoechst
Bradford-Reagenz (5x)	BioRad
Brefeldin A	Sigma
Bromphenolblau	Merck
BSA Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Boehringer

Chloroform, RNase-frei	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
ECL Western blotting analysis system	Amersham
EDTA	Sigma
Essigsäure	Roth
70% (v/v) Ethanol	Roth
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco/BRL
Glutaminlösung	Roth
H ₂ O ₂	Fluka
Ionomycin: 5mM	Sigma
Isopropanol, RNase- frei	Roth
Methylenblau	Sigma
MPOS	Sigma
Natriumpyruvatlösung	Seromed
Nukleotide $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (10mCi/ml)	DuPont
Oligonukleotide	MWG-Biotech
Poly (dG/dC)	Boehringer
Poly (dI/dC)	Boehringer
Ponceau-Red	Sigma
Temed (Tetramethylenethyldiamin)	Sigma
TPA (12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat)	Sigma
Trypanblau	Gibco
Tween 20	Roth

2.1.7 Puffer

Die Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert.

ATV-Lösung	8,00 g	NaCl
	0,27 g	KCl

	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,20 g	KH ₂ PO ₄
	0,10 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	1,25 g	Na ₂ -EDTA
	1,25 g	Trypsin
		ddH ₂ O ad 1 Liter
		mit HCl auf pH 7,2 titrieren
Bindungspuffer für EMSA (3x)	60 mM	Hepes pH 7,9
	3 mM	DTT
	3 mM	EDTA
	150 mM	KCl
	12%	Ficoll
Blocking-Puffer	1%	BSA in PBS (1x)
BSA-Puffer	0,1%	BSA in PBS (1x)
Citrat-Puffer	40 mM	Citronensäure
	60 mM	Na ₂ HPO ₄ (pH 4,4)
Coating-Puffer	0,1 M	Na ₂ HPO ₄ (pH 9,2)
Denhardt's Lösung	10 g	Ficoll 400
	10 g	Polyvinylpyrolidon MW 360000
	10 g	BSA
		ad 500 ml ddH ₂ O
DNA-Färbelösung	80%	Glycin
	100mM	EDTA
	0,025%	Bromphenolblau
	0,025%	Xylenxyanol F
ELISA-Wasch-Puffer	0,1%	Tween 20 in PBS (1x)

Erythrozytenlysepuffer	8,29g	NH ₄ Cl
	1,0g	KHCO ₃
	0,037g	EDTA
		ad 1l H ₂ O
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
	0,4 M	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
"Großer MACS" (GM)-Puffer	0,5%	BSA
	0,01%	NaN ₃
	5 mM	EDTA in PBS (1x)
2xHBS	50 mM	Hepes, pH 7,05
	280 mM	NaCl
	0,75 mM	Na ₂ HPO ₄
	0,75 mM	NaH ₂ PO ₄
Kalzium-Mix	0,1 M	Hepes, pH 7,05
	0,5 M	CaCl ₂

Klenow-Puffer (5x)	250 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM	MgCl ₂
	5 mM	DTT
Ladepuffer für SDS-Gele (2x)	100mM	Tris pH6,8
	4%	SDS
	0,2%	Bromphenolblau
	20%	Glycerin
	20%	Methanol
	0,5%	DTT
Laufpuffer für SDS-Gele (5x)	15,1g	Tris
	94g	Glycin
Milchpulverlösung zum Blocken	5%	Magermilchpulver in 1x TBS-Tween
10xMOPS	220 mM	MOPS pH 7,0
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA
PBS	140mM	NaCl
	2,7mM	KCl
	8,1mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5mM	KH ₂ PO ₄
10xPonceau-Red	2%	Ponceau-red
	30%	Trichloressigsäure
RNA-Ladepuffer	100 µl	10xMOPS
	500 µl	Formamid
	185 µl	Formaldehyd
	40 mg	Ficoll 400
	0,4%	Bromphenolblau

RNA-Hybridisierungspuffer	25 ml	20xSSPE
	50 ml	Formamid
	5 ml	100xDenhardt's Lösung
	1 g	SDS
		0,1 mg/ml Hering-Sperm-DNA 1 mg/ml Hefe-RNA
1xTAE	48,4g	Tris
	11,4 ml	Essigsäure
	3,72g	EDTA
		auf 1l ddH ₂ O
1xTBE	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
TBS	25mM	Tris
	137mM	NaCl
	5mM	KCl
	7mM	CaCl ₂
	0,5mM	MgCl ₂
	0,6mM	Na ₂ HPO ₄
TE	10mM	Tris
	1mM	EDTA mit HCl _{konz.} auf pH 8 einstellen
Transferpuffer	0,48M	Tris
	0,39M	Glycin
	20%	Methanol
20xSSPE	3,6 M	NaCl
	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ H ₂ PO ₄ pH 7,0

	20 mM	EDTA
20xSSC	3 M	NaCl
	0,3 M	NaCitrat
Waschpuffer für Western Blots	0,1%	Tween in PBS

2.1.8 Reaktionssysteme

RNeasy Kit	QUIAGEN
ECL Western blotting analysis system	Amersham
RiboQuant (RPA) Kit	PharMingen
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec
Streptavidin-Beads	Miltenyi Biotec
MACS Anti-FITC-MicroBeads	Miltenyi Biotec
Trizol-Reagens	GibcoBRL

2.1.9 Enzyme

DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	MBI Fermentas
RNase	Boehringer
MACS MultiSort Release Reagent	Miltenyi Biotec
Streptavidin-POD	La Roche

2.1.10 Radioaktivität

³² P-ATP (3000 Ci/mMol)	Amersham
------------------------------------	----------

2.1.11 Proteingrößenmarker

10 kD-Leiter	GibcoBRL
--------------	----------

10 kD	40 kD	70 kD	100 kD	160 kD
20 kD	50 kD	80 kD	110 kD	

Rekombinantes Ratten Interferon-gamma (rIFN- γ)

Das verwendete rIFN- γ wurde von Dr. G. R. Adolf (Ernst Behringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt.

2.1.15 Antikörper zur Immundetektion von NF-AT-Proteinen

AA 1-654 (mAb-A)

Monoklonaler Maus-anti-NF-ATc-Antikörper (IgG1). Dieser Antikörper wurde von der Firma Alexis bezogen und erkennt spezifisch ein Epitop, das innerhalb der AA-Sequenz 205-293 von NF-ATc/A liegt.

AA 735-825 (pAb-B)

Dieser polyklonale Antikörper wurde von der Firma Eurogenetic mit Hilfe eines GST-Fusionsproteins, das für die AA-Sequenz 735-825 von NF-ATc/B kodiert, durch Immunisierung von Kaninchen hergestellt und detektiert spezifisch NF-ATc/B und NF-ATc/C.

Anti-67.1 (Ab-p)

Antikörper gegen das 67.1 Peptid nahe dem N-Terminus des murinen NF-AT1 (NF-ATp). Dieser Antikörper erkennt NF-ATp von Mensch und Maus und besitzt keine Kreuzreaktivität mit NF-ATc, NF-AT3 oder NF-AT4.

2.1.16 Sekundärantikörper zur Immundetektion von NF-AT-Proteinen

Sekundäre, an Peroxidase gekoppelte Antikörper dienen zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western blot. Verwendet werden Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Amersham) und Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham).

2.1.17 Antikörper für die Separation muriner CD4⁺T- und CD4⁺/CD62L^{high}T-Zellen

H129.19-bio (Ratte anti-Maus-CD4-biotin)

Der Klon H129.19 wurde von Dr. H. Huber (Hautklinik Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

GK1.5-FITC (Ratte anti-Maus CD4)

Der Klon GK1.5 wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, TIB 207) bezogen und der Antikörper FITC-markiert.

Mel-14-bio (Ratte anti-Maus Mel-14-biotin)

Der Klon wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, TIB 132) bezogen und der Antikörper biotinyliert.

2.1.18 Antikörper für die Stimulation und Kultur muriner CD4⁺T-Zellen

H57-597 (Hamster anti-Maus T-Zellrezeptor- $\alpha\beta$)

Der Klon wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA, TIB 218) bezogen

37.51 (Hamster anti-Maus CD28)

Der Klon wurde von Dr. J. P. Allison durch Dr. G. Leclercq (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

XMG1.2 (Ratte anti-Maus IFN- γ)

Dieser Antikörper wurde von Dr. A. O'Garra (DNAY Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt und zur Neutralisierung von endogen gebildeten IFN- γ zur Zellkultur gegeben.

BVD4-1D11 (Ratte anti-Maus IL-4)

Dieser Antikörper wurde von Dr. A. O'Garra (DNAY Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.19 Antikörper für ELISA

R46A2 und AN.18.17.24 (Ratte anti-Maus IFN- γ)

Beide Antikörper wurden von Dr. M. Lohoff (Institut für klinische Mikrobiologie, Erlangen) zur Verfügung gestellt. AN-18.17.24 wurde in biotinylierter Form als Sekundärantikörper eingesetzt.

BVD4-1D11 und BVD6-24G2 (Ratte anti-Maus IL-4)

Beide Antikörper wurden von Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt. BVD6-24G2 wurde in biotinylierter Form als Sekundärantikörper eingesetzt.

JES6-1A12, JES6-5H4 und 90.2-bio (anti-IL-2)

Es handelt sich um Ratte-anti-Maus-IL-2 Antikörper der IgG_{2a} bzw. IgG_{2b} Subklasse. Die beiden Klone JES6-1A12 und JES6-5H4 wurden von Dr. A. O'Garra (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Antikörper des Klons 90.2 von Dr. habil. E. Schmitt affinitätsgereinigt und biotinyliert.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Suspensionszellen und adhärenenten Zellen

Die verwendeten Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturen gehalten. Als Kulturmedium dienen für Suspensionszellen (Jurkat-, A3.01-, H9-, Raji- und Daudi-Zellen) RPMI (+) und für adhärenente Zellen (293-Zellen) DMEM (+). Regelmäßiges Umsetzen dient dazu, Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen und die Kulturen von Stoffwechselendprodukten zu reinigen. Suspensionszellen werden zusammen mit dem Kulturmedium in Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 Min. bei 250 * g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Waschen der Kulturen wird der Niederschlag mit dem entsprechenden Medium resuspendiert, und der Ansatz erneut zentrifugiert. Abschließend werden die Zellen in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/ml mit frischem Medium in die Kulturgefäße zurückgegeben.

Nach dem Wachsen der adhärenenten Zellen in DMEM (+)-Medium bis zu einer konfluenten Schicht werden die Zellen umgesetzt. Dabei wird das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt, die Zellen werden mit 5 ml ATV-Lösung überschichtet und 5 Min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden sie entsprechend den

Suspensionszellen zentrifugiert und gewaschen. Nach Rückführung der Zellen in frische Schalen wird das Kulturvolumen auf 10 ml eingestellt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit Hilfe der Thomas-Zählkammer, in der zweimal 16 Quadrate der Grundfläche 0,1mm² eingraviert sind, bestimmt. Zur Darstellung der abgestorbenen Zellen werden 20 µl der zu messenden Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau "bluestain", einem Farbstoff, der tote Zellen blau anfärbt, gemischt. Anschließend kann unter Verwendung der Zählkammer und einem Mikroskop die Anzahl der nicht blau gefärbten, d.h. vitalen Zellen bestimmt werden. Die Summe der Zellen in beiden Zählfeldern, multipliziert mit dem Faktor 10⁴, ergibt die Dichte der Kultur in Zellen/ml.

2.2.3 Induktion lymphoider Tumorzellen und adhärenter Zellen

Zur Stimulation der Zellen werden in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedene Konzentrationen der Stimulantien TPA und Ionomycin verwendet. Während der Stimulationsdauer mit TPA und/oder Ionomycin werden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

	T-Tumorzellen	B-Tumorzellen	293-Zellen
TPA	20 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
Ionomycin	1 µmol/ml	1 µmol/ml	1 µmol/ml

2.2.4 Präparation von CD4⁺T-Zellen aus BALB/c Ann-Mäusen

2.2.4.1 Präparation von Gesamtmilzzellen

Verwendet werden BALB/C Ann-Mäuse im Alter 8 bis 12 Wochen. Die Milzen dieser Mäuse werden im Zellsieb zerrieben, und die Zellen setzen sich ab. Der Überstand wird abpipettiert und bei 1600 Upm 10 Min. zentrifugiert. Die vorhandenen Erythrozyten werden durch Inkubation im Erythrozytenlysepuffer (1 ml/Milz) 3 Min. lysiert. Zur Entfernung von entstandenen Zellaggregaten wird das Lysat mit MEM + 2% FCS über

eine mit Nylonwatte (30 μm) gestopfte Pasteurpipette aufgereinigt. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Thomas-Zählkammer.

2.2.4.2 Präparation von CD4⁺T-Zellen

Die Separation von CD4⁺T-Zellen erfolgt aus dem Gesamtmilzelleextrakt über MACS-Säulen mit an Microbeads-gekoppelten Antikörpern gegen den Oberflächenmarker CD4. Dafür werden jeweils 1×10^8 Zellen aus Gesamtmilzelleextrakt in 1 ml GM-Puffer mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ H129.19bio (Stocklösung 200 $\mu\text{g/ml}$) 10 Min. bei 4°C inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit GM-Puffer wird nichtgebundenes H129.19bio entfernt. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation der 1×10^8 Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin-Beads (Stocklösung 200 $\mu\text{g/ml}$) in 1 ml GM-Puffer bei 4°C für weitere 10 Min.. Die Zellen werden ml-weise über die MACS-Säulen gegeben und mit 5 ml GM-Puffer je Säule eluiert. Dabei dürfen max. 5×10^8 Zellen für eine Säule benutzt werden. Das Eluat wird bei 1600 U/min abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml GM-Puffer aufgenommen, und je 5 ml der Suspension werden erneut über eine Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen im Testmedium erfolgt die Bestimmung der Zellzahl.

2.2.4.3 Präparation von CD4⁺/CD62L^{high}T-Zellen

Die Reinigung von CD4⁺/CD62L^{high}T-Zellen aus den Milzen von BALB/c Ann-Mäusen wird mit dem Anti-FITC MultiSort Kit von Miltenyi Biotec durchgeführt. Mittels sukzessiver positiver Selektion gegen die Oberflächenmarker CD4 und CD62L über MACS-Säulen werden dabei naive CD4⁺T-Zellen aus den Gesamtmilzelleextrakten isoliert.

1×10^8 Zellen aus Gesamtmilzelleextrakt werden in 1 ml eisgekühltem BSA-Puffer aufgenommen und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GK1.5-FITC (Stocklösung 200 $\mu\text{g/ml}$) 10 Min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden jeweils in 5 ml BSA-Puffer gewaschen und bei 1600 Upm abzentrifugiert. 1×10^8 der CD4-FITC-markierten Zellen werden im zweiten Schritt nach DNA-Verdau durch Zusatz von 100 U/ml DNase (Stocklösung 5000 U/ml) mit 20 $\mu\text{g/ml}$ des sekundären Antikörpers anti-FITC-MSB (Stocklösung 200 $\mu\text{g/ml}$) in 1 ml eisgekühltem BSA-Puffer 15 Min. bei 4°C inkubiert und anschließend in 5 ml BSA-Puffer gewaschen. Es folgt nun hintereinander die zweimalige positive Selektion der CD4⁺Zellen über jeweils eine MACS-Säule. Dabei sollte die Ausbeute der CD4⁺-Zellen

bei etwa 10% liegen. Zur enzymatischen Entfernung der MACS MicroBeads werden 1×10^8 Zellen mit 8 μl MACS MultiSort Release Reagent (Stocklösung 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 Min. bei Raumtemperatur in 1 ml BSA-Puffer inkubiert und anschließend mit 5 ml BSA-Puffer gewaschen. Zur Depletion von "non-released" Zellen werden die Zellen erneut über eine MACS-Säule gegeben, wobei sich diesmal die "released" CD4^+ Zellen im Durchlauf befinden.

Zur positiven Selektion von $\text{CD62L}^{\text{high}}(\text{Mel14}^{\text{high}})$ Zellen werden jeweils 1×10^8 CD4^+ Zellen in 1 ml eisgekühltem GM-Puffer mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mel-14bio (Stocklösung 1 mg/ml) 10 Min. bei 4°C inkubiert, anschließend einmal in 5 ml GM-Puffer gewaschen und mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptavidin-Beads (Stocklösung 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10 Min. bei Raumtemperatur in 1 ml GM-Puffer inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch Waschen in 5 ml GM-Puffer erfolgt wie oben beschrieben die positive Selektion der $\text{CD62L}^{\text{high}}$ Zellen über zweimalige Passage über MACS-Säulen. Die $\text{CD4}^+/\text{CD62L}^{\text{high}}$ -Zellen werden nach der Eluation zweimal in GM-Puffer gewaschen und in entsprechender Menge Testmedium aufgenommen.

Die Effizienz und die Reinheit sowohl der positiven Selektion der Zellseparation als auch der "release" Reaktion werden in den jeweils beschriebenen Schritten mittels Durchflusszytometrie analysiert und quantifiziert.

2.2.5 *In vitro* Differenzierung CD4^+ T-Zellen in Th1- und Th2-Zellen

2.2.5.1 "Coating" mit Antikörpern

Die Stimulation der CD4^+ T-Zellen erfolgt auf 6-"well" Platten. Dafür werden die Näpfe sukzessive mit den Antikörpern anti- $\text{TCR}\alpha\beta$ (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und anti-CD28 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 2 ml PBS (1x) pro Napf beschichtet und bei 37°C für jeweils 30 Min. inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger nicht-gebundener Antikörper werden die Näpfe zwischen den beiden Inkubationsschritten und schließlich nach der letzten Inkubation mit PBS (1x) einmal bzw. dreimal gewaschen.

2.2.5.2 Differenzierungsphase, Tag 1 - 3

Die *in vitro* Differenzierung der CD4^+ T-Zellen erfolgt durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit definierten Zytokinen und Zytokinantikörpern in den mit anti- $\text{TCR}\alpha\beta$ und anti-

CD28 beschichteten Näpfe. Die Konzentration der Zellen beträgt 5×10^6 Zellen pro Napf. Die Differenzierung wird im Testmedium mit den entsprechenden Zusätzen durchgeführt:

	Th1-Zellen	Th2-Zellen
Cytokine Antikörper	IL-12 (3000 U/ml) anti-IL4 (10 μ g/ml)	IL4 (1000 U/ml) anti-IFN- γ (10 μ g/ml)

2.2.5.3 Proliferationsphase, Tag 4 - 7

Am 3. Tag der *in vitro* Differenzierung werden die differenzierten Zellen auf die Hälfte ihrer Konzentration verdünnt, in unbeschichtete Näpfe umgesetzt und ohne Stimulus im entsprechenden Inkubationsansatz mit Testmedium inkubiert. An den Tagen 4 bis 7, die der Proliferationsphase der Zellen dienen, werden die Zellen jeweils erneut verdünnt und in den entsprechenden Ansätzen inkubiert:

	Th1-Zellen	Th2-Zellen
Proleukinfutter	Testmedium hr IL-2 (100 U/ml)	
LNC4.2-Futter		Testmedium hr IL-2 (100U/ml) IL4 (200 U/ml) P388D1 (1/1000 U/ml)

2.2.5.4 Restimulation, Tag 7

Am letzten Tag der Proliferationsphase werden die Zellen geerntet, einmal mit Testmedium gewaschen und gezählt. Zur Restimulation werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /well entsprechend mit TPA/Ionomycin oder mit den Antikorpfern anti-TCR $\alpha\beta$ und anti-CD28 inkubiert und induziert.

	CD4 ⁺ T-Zellen
TPA Ionomycin anti-TCR $\alpha\beta$ anti-CD28	20 ng/ml 1 μ mol/ml 2 μ g/ml 5 μ g/ml

2.2.6 Ernten der Zellen

Lymphoide Suspensionszellen sowie CD4⁺T-Zellen werden zusammen mit dem Kulturmedium in entsprechende Zentrifugationsgefäße überführt. An den Wänden der Kulturgefäße verbliebene Zellen werden durch leichtes Nachspülen mit PBS mit Hilfe einer Pipette abgelöst. Die Zellsuspension wird 5 Min. bei 250 * g zentrifugiert, und der Niederschlag wird mit 10 ml PBS durch erneutes Zentrifugieren gewaschen. Der Resuspensionspuffer wird abhängig vom nachfolgenden Experiment gewählt.

Bei adhärennten Zellen wird zunächst das Medium mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt. Durch Überschichtung der Zellen mit mit 5 ml ATV und Inkubation für 5 Min. im Brutschrank erfolgt die Trennung der adhärennten Zellen vom Boden. Das Waschen der Zellen vom Kulturmedium wird analog den Suspensionszellen durchgeführt.

2.2.7 Transfektion von DNA in adhärennte Zellen

Die Transfektion von adhärennten Zellen erfolgt nach der Kalzium-Phosphat-Kopräzipitations-Methode (Jordan *et al.*, 1996). Die Transfektionslösung für einen Analyseansatz enthält 2-10 μ g DNA, die mit TE auf 240 μ l eingestellt und anschließend mit 240 μ l Kalzium-Mix gut gemischt wird. Nach 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wird dem Ansatz 480 μ l 2x HBS zugegeben, erneut gut gemischt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionslösung wird anschließend direkt in die Schalen, in denen die kultivierten Zellmonolayer zu einer 70%igen konfluenten Schicht herangewachsen sind, pipettiert und vorsichtig mit dem Kulturmedium gemischt. Inkubation der Zellkulturen über 14 Std. im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ diene der Kopräzipitation des Kalziumphosphats und der DNA. Am nächsten Morgen werden

die Zellen mit TBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Die Induktion der Zellen erfolgte 20 Std. nach der Transfektion.

2.2.8 Präparation von Kernproteinextrakten (Schreiber *et al.*, 1998)

Kernproteinextrakte werden grundsätzlich im Kühlraum oder Eisbad hergestellt. Sämtliche Lösungen und Puffer sollten eiskalt gehalten werden. Für die Präparation von Kernproteinextrakten werden 1×10^7 Zellen bei 1000 rpm 5 Min. abzentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen und das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 Sek. Zentrifugation bei 5000 rpm wird das Zellpellet schließlich in 600 μ l Puffer A sanft resuspendiert. Nachdem die Zellen 15 Min. auf Eis geschwollen sind, werden sie durch 10-maliges Aufziehen der Suspension in einer Kanüle mit einem Durchmesser von G26^{3/8} durch Scherung zerkleinert, wobei die Zellkerne intakt bleiben. Durch 2 Min. Zentrifugation bei 6000 rpm werden die Zellkerne vom zytoplasmatischen Überstand getrennt. Der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthält, wird bei 20000 rpm 15 Min. abzentrifugiert und kann sowohl für Proteinanalysen als auch zur RNA-Isolierung verwendet werden. Die Zellkerne werden in 100 μ l Puffer C resuspendiert und die Kernproteine durch 15 minütiges Schütteln bei 4°C extrahiert. Zur Abtrennung der hochmolekularen Bestandteile (Kernmembranen und ihr anhaftenden chromosomalen DNA) wird der Ansatz 15 Min. bei 12000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Proben in flüssigem Stickstoff in Aliquots eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.9 Bestimmung des Proteingehaltes von Kernproteinextrakten (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Kernproteinkonzentrationen wird die Methode nach Bradford angewandt. Dabei werden 1-10 μ l Kernproteinextrakt mit 1 ml 1x Bradford-Reagenz (5x Bradford-Reagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt) gemischt, und die Extinktion wird bei 578 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden, die durch Messung der Extinktionen bekannter BSA-Konzentrationen (1; 2,5; 5; 7,5; 10 μ g) in 1x Bradford-Reagenz erstellt wurde, lassen sich die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen.

2.2.10 Protein-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Um Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes zu fraktionieren, werden sie in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dieses setzt sich aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 12 %igen Trenngel mit jeweils unterschiedlichen pH-Werten zusammen.

	Trenngel 5%	Sammelgel 12%
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	4 ml	1,7 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
ddH ₂ O	3,3 ml	6,8 ml
APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	8,0 µl	10 µl

Zunächst wird das Trenngel zwischen die senkrecht stehenden und mit 100% Ethanol gereinigten Glasplatten bis ungefähr 3 cm unterhalb der oberen Glasplattenkante aufgefüllt. Damit die Oberfläche des Gels gleichmäßig polymerisiert, wird die Gellösung sogleich mit ddH₂O gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation wird das Isobutanol abgegossen und das Sammelgel eingefüllt. Zur Formung der Geltaschen wird ein Kamm zwischen die beiden Glasplatten eingesetzt, und die Polymerisation des Sammelgels abgewartet. 10-20 µl der zu fraktionierenden Proteinextrakte werden zunächst mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Ladepuffer gemischt und 5 Min. bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei 35-40 mA pro Proteingel. Als Laufpuffer dient 1x SDS-Laufpuffer.

2.2.11 Western blot

Für den immunologischen Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper werden die Proteine nach der Fraktionierung in der SDS-PAGE zunächst in einer Transferkammer 14 Std. bei 400 V in Transferpuffer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Dokumentation des Proteinstandards und späteren Zuordnung der Proteine nach deren Molekulargewicht, wird die Membran zunächst mit Ponceau-Red angefärbt und zwischen zwei Klarsichtfolien in der Kopiermaschine fotokopiert. Anschließend wird die

Membran in TBS-Tween gewaschen, und zur Verhinderung einer unspezifischen Proteinbindung in 5% Milchpulver in PBS mit 0,05% Tween für eine Std. geblockt. Der primäre spezifische Antikörper wird entsprechend verdünnt in die Milchlösung pipettiert, und die Membran wird darin eine Std. inkubiert. Nach einmaligem 15 minütigen und dreimaligem 5 minütigen Waschen der Membran in TBS + 0,05% Tween wird die Membran in einer frischen Milchlösung mit dem sekundären, an Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (1x 15 Min., 3x 5 Min.) mit TBS-Tween erfolgt die Immundektection unter Anwendung des ECL Western Blotting Analysis Systems nach Anleitung des Herstellers. Die Membran wird dazu leicht angetrocknet und zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die ECL-Lösungen werden auf die Membran pipettiert, und ein Röntgenfilm wird für die Dauer von 10-60 Min. angelegt.

2.2.12 DNA-Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel

Zur Durchführung von "electrophoretic mobility shift assays" (EMSA) und zur Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente werden 6%- bzw. 15%-ige native Polyacrylamidgele verwendet. Die Polyacrylamidlösung wird sofort nach Zugabe der Radikalbildner TEMED und APS luftblasenfrei zwischen zwei saubere, durch 1mm Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen. Die Elektrophorese erfolgt nach der Polymerisation des Polyacrylamidgels in 0,4xTBE bzw. 1xTBE als Laufpuffer bei 200 - 300 Volt.

Polyacrylamidgel	6%	15%
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	8 ml	25 ml
5xTBE	4 ml	10 ml
ddH ₂ O	38 ml	15 ml
TEMED	75 µl	50 µl
APS (10%)	500 µl	300 µl

2.2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Polyacrylamidgel

Polyacrylamidgele dienen zum Auftrennen von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Nach der Elektrophorese wird das Gel mit einer Klarsichtfolie abgedeckt und 5 Min. mit einem Film exponiert. Fluoreszenzmarker, die am Rand des Gels angebracht werden, dienen der späteren Orientierung. Danach wird der Film auf das Gel gelegt, und die entsprechenden Banden werden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einer 200 µl Pipettenspitze zerstoßen und anschließend mindestens 4-5 Std. bei Raumtemperatur in 0,1 M KCl enthaltendem TE unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Abtrennung des Eluates von den Gelstücken erfolgt in einer mit Glaswolle gestopften 1 ml Pipettenspitze.

2.2.14 DNA/Protein-Bindungsstudien

2.2.14.1 "Annealing" von Oligonukleotiden

DNA-Bindungsstudien werden mit doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Das 'Annealing' der komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide zum Doppelstrang erfolgt, indem man 1-10 µg komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide mit 0,1 M KCl in TE auf 40 µl auffüllt, 3 Min. bei 88°C, 10 Min. bei 65°C, 30 Min. bei 37°C und 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.14.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Nach dem Anlagern der komplementären Einzelstrang-Oligonukleotide zum Doppelstrang werden die Proben an ihren 3'-Enden radioaktiv markiert. Das Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I kann 3'-Enden von DNA-Fragmenten auffüllen, indem es die 5'-Überhänge als Vorlage benutzt. Ein Ansatz zur radioaktiven Markierung besteht aus 50 ng DNA, 2 µl 5x Klenow-Puffer, je 2 nmol dGTPs, dCTGs und dTTPs, je 2 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP und 1 U Klenow-Enzym und wird mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Nach 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 5 µl DNA-Farbpuffer ("blue juice") gestoppt.

Zur Reinigung von freien Nukleotiden wird die Probe sofort auf ein 15%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und 3 Std. bei 150 Volt getrennt. Die Bande des radioaktiven

Oligonukleotides wird ausgeschnitten und die DNA eluiert. Die Aktivität der markierten Probe wird im Szintillationszähler nach Cerenkov bestimmt.

2.2.14.3 "Electrophoretic Mobility Shift Essay" (EMSA; Schreiber *et al.*, 1988)

Um die *in vitro* DNA-Bindung von Proteinen zu ermitteln, werden Proteine mit radioaktiv markierten DNA-Sequenzmotiven inkubiert und die entstehenden Komplexe an einem nativen Polyacrylamidgel auftrennt. DNA-Fragmente, an die Proteine gebunden sind, zeigen eine verzögerte Wanderungsgeschwindigkeit im Gel und können somit von ungebundener DNA abgetrennt werden. Synthetische Kompetitoren, wie poly dI/dC oder poly dG/dC, verhindern in diesen Versuchen unspezifische DNA-Bindung durch Proteine an die Bindeprobe, indem sie als 2.000-10.000facher Überschuß dem Versuchsansatz hinzugefügt werden. Der Nachweis einer spezifischen DNA-Protein-Wechselwirkung erfolgt durch Konkurrenz mit einem Überschuß des entsprechenden nichtmarkierten Oligonukleotides.

Zu 3 µg Kernproteinextrakt werden 700 ng polydI/dC (poly dG/dC), 3 µl 3xBindungspuffer und 5.000 cpm (ungefähr 0,2 ng) radioaktiv markierte DNA gegeben. Das Endvolumen wird mit ddH₂O auf 9 µl eingestellt. Nach 15 Min. Inkubation auf Eis werden die Proben parallel zu einem Farbmaler auf ein 5%-igen Polyacrylamidgel, das ca. 2 Std. vorgelaufen ist, aufgetragen. Nach Beendigung der SDS-PAGE bei 200 Volt in 0,4xTBE wird das Gel zunächst für 10 Min. in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend auf 3MM-Whatman Papier bei 80°C auf dem Geltrockner getrocknet. Die Exposition an einem Röntgenfilm erfolgt normalerweise mit Verstärkerfolien 1 - 3 Tage bei -70°C.

2.2.15 Präparation von Gesamtzell-RNA aus eukaryontischen Zellen

2.2.15.1 RNA-Präparation mit TRIzol-Reagens

Eukaryontische Gesamtzell-RNA wurde unter Verwendung des TRIzol-Reagens (GibcoBRL) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll isoliert. Es wurden ausschließlich RNase-freie Plastikwaren und Lösungen verwendet. 1×10^8 Zellen wurden zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten geerntet, sedimentiert, nach möglichst vollständigem Absaugen des Überstandes in 1 ml Trizol resuspendiert und 5

min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Trizol wurden die Zellen lysiert und sämtliche Proteine aufgrund des enthaltenen Guanidiniumisothiocyanats sofort denaturiert, so dass ein enzymatischer Abbau der RNA vermieden wurde. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (15 min, 13000 Upm), um klar getrennte Phasen zu erhalten. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, ohne die organische Phenol/Chloroform-Phase sowie die das gefällte Protein enthaltende weiße Interphase zu berühren. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt, sedimentiert (10 min, 13000 Upm, 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes mit 1ml 70% Ethanol gewaschen (10 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt, die sedimentierte RNA getrocknet und in 12-20 µl DEPC-H₂O in Abhängigkeit von der zu erwartenden RNA-Menge gelöst und dann bei -20°C gelagert.

2.2.15.2 RNA-Präparation mit RNeasy Kit (QUIAGEN)

Zur Präparation von Gesamtzell-RNA aus CD4⁺T-Zellen wurde das kommerziell erhältliche RNeasy Kit von QUIAGEN verwendet und gemäß den Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Zur Homogenisierung der Zellen wurden zusätzlich QIAshredder der Firma QUIAGEN benutzt. Isolierte RNAs werden bei -70°C in RNase-freiem ddH₂O gelagert.

2.2.16 Bestimmung von RNA-Konzentrationen

Die RNA-Konzentrationen wurden fotometrisch durch die Messung der Absorption einer 1:70 Verdünnung in einer Mikroküvette (70µl Volumen) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Hierbei entspricht eine A₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis zwischen den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm läßt eine Abschätzung der Reinheit der RNA zu. Absolut reine RNA-Präparation besitzt ein 260/280 Verhältnis von 2,0. Die Integrität und die Größenverteilung der gereinigten RNA kann mittels Elektrophorese im denaturierenden Agarosegel und Ethidiumbomid-

Färbung kontrolliert werden. Für eukaryontische Zellen erscheinen im gefärbten Gel zwei scharfe Banden für die 28S und 18S ribosomale RNA.

2.2.17 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Gesamt-RNA werden denaturierende Agarosegele verwendet, die die Auflösung von Sekundärstrukturen gewährleisten. Pro Spur werden etwa 10 µg RNA eingesetzt. Zum Laden wird die RNA in 20 µl RNA-Ladepuffer resuspendiert und 15 Min. bei 68°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 2 V/cm Gellänge in 1xMOPS als Laufpuffer. Die Gele werden nach der Elektrophorese 20 Min. in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt (1,0 µg/ml Ethidiumbromid in 1xMOPS) und 45 Min. in ddH₂O entfärbt. Die Banden der 28S- und 18S-rRNA sind im UV-Licht sichtbar.

Agarose/Formaldehyd-Gel	1,5% / 6%
Agarose	4,5 g
10xMOPS	30 ml
Formaldehyd (37%)	50 ml
ddH ₂ O	220 ml

2.2.18 Northern blot

Die in Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennte Gesamtzell-RNA wird mit Hilfe der Kapillar-Blot-Technik auf ungeladene Nylonmembran (Qiabrane, Qiagen) übertragen, wobei der Transfer mit 10xSSC 16 bis 18 Std. erfolgt. Anschließend werden die Membranen in 2xSSC gespült, und die RNA wird nach kurzem Trocknen der Filter durch UV-"Crosslinking" fixiert. Zusätzlich werden die Northern Blots im Anschluß an die UV-Fixierung 30 Min. bei 80°C gebacken. Der Transfer der RNA kann durch eine Methylenblaufärbung überprüft werden. Hierzu wurde die Membran 10 Min. in 50 mM NaOH gelegt und anschließend 60 Sec. in 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2)/0,03% Methylenblau inkubiert. Die Entfärbung der Membran wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O erreicht. Die Hybridisierung der Membran erfolgt in Hybridisierungspuffer über Nacht bei 65°C mit einer ³²P-ATP markierten doppelsträngigen DNA-Sonde, die zuvor 10 Min. bei 95°C denaturiert wurde. Um

unspezifisch gebundene DNA von der Membran zu entfernen, wird sie mit 2xSSC und 0,1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Stringenteres Waschen erfolgte durch Temperatursteigerung auf 65°C und Absenkung des SSC-Gehalts bis 0,1 %. Es folgte die Exposition der Membran über 1-2 Tage und die Entwicklung der Filme.

2.2.19 "Ribonuclease Protection Assay" (RPA)

Nach vorliegenden spezifischen DNA-Sequenzen (Matrizen) werden mithilfe von RNA-Polymerasen radioaktiv markierte "anti-sense" RNA-Sonden definierter Länge hergestellt. Diese können dann durch eine Hybridisierungsreaktion mit entsprechenden Sequenzen aus einer gegebenen RNA-Population doppelsträngige RNA-Segmente bilden. Eine anschließende Behandlung des Reaktionsgemisches mit Ribonukleasen eliminiert dann überschüssige freie Sonden sowie andere einzelsträngige RNA. Die verbleibenden RNA-Stränge sind durch die Hybridisierung mit der spezifischen Sonden-RNA doppelsträngig und radioaktiv markiert. Sie sind durch ihre Doppelsträngigkeit vor der Zerstörung durch Ribonukleasen geschützt und können mit Hilfe eines denaturierenden Polyacrylamidgels analysiert werden. Die Sondenpolymere werden hierfür so synthetisiert, dass sie etwas länger sind als die zu detektierende RNA-Sequenz und bei der Hybridisierung kurze einzelsträngige Überhänge bilden. Diese werden dann durch Ribonuklease eliminiert. Die geschützten Sequenzen sind daher nach der Ribonuklease-Behandlung etwas kürzer als die freie Sonde und können dadurch auf dem Gel von dieser unterschieden und identifiziert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurde das "RiboQuant® Multi-Probe RNase Protection Assay System" der Firma Pharmingen verwendet. Es handelt sich dabei um einen Kit, der alle notwendigen Reagenzien für die Durchführung von Sondensynthese, Hybridisierung und Ribonuklease-Behandlung enthält und zusammen mit verschiedenen "Sonden-Sets" ("Multi-Probe Template Sets") desselben Herstellers verwendet wird. Diese dienen zur gleichzeitigen Identifizierung mehrerer mRNA-Species in einer Probe von Gesamt-RNA und enthalten außerdem Sonden zur Erkennung von Haushaltsgenen als interne Standards. Hier wurden die Matrizen-Sets "mCK-1" zur Identifizierung von Lymphokin-RNAs der Maus verwendet. Die geschützten Proben wurden im Anschluss über ein 5 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel nach einer Vorlaufzeit von 2 Std. bei 50 Watt mit 0,5xTBE als Laufpuffer aufgetrennt. Unbehandeltes Sondenmisch wurde aufgetragen, um eine

Identifikation der geschützten Proben zu ermöglichen. Nach Beendigung der SDS-PAGE wird das Gel zunächst für 10 Min. in 10 %iger Essigsäure fixiert und anschließend auf 3MM-Whatman Papier bei 80°C auf dem Vakuumgeltrockner getrocknet. Die Exposition an einem Röntgenfilm erfolgte normalerweise mit Verstärkerfolien bei -70°C. Alternativ wird die Radioaktivität im Phosphorimager quantifiziert.

Polyacrylamidgel	5%
40% Acrylamid	8,85 ml
2% Bisacrylamid	9,31 ml
10xTBE	7,45 ml
Harnstoff	35,82 g
ddH ₂ O	ad 74,5 ml auffüllen
TEMED	60 µl
APS (10%)	450 µl

2.2.20 "Encymatic linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

Die ELISA-Ansätze zur Bestimmung der Synthese von IL-2, IFN- γ und IL-4 werden mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin entwickelt. Dazu werden ELISA-Platten mit dem Antikörper BVD4-1D11 (1µg/ml) für die Bestimmung von IL-4, mit dem Antikörper R46A2 (1µg/ml) für die Bestimmung von IFN- γ bzw. mit dem Antikörper JES6-1A12 (1 µg/ml) für die Bestimmung von IL-2 in 50 µl/well Coating-Puffer 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer werden die nichtgebundenen Stellen unselektiv mit 100 µl/well Block-Puffer 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank geblockt. Überschüssiges BSA wird durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Kulturüberstände der nichtinduzierten und stimulierten naiven CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen werden in 1/2-Schritten in BSA-Puffer titriert und 1 Std. bei 37°C in den ELISA-Platten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit den sekundären biotinylierten Antikörpern 1 Std. bei 37°C. Dazu dienen BVD6-24G2 (0,6 µg/ml) zur Detektion von IL-4, AN18.17.24 (0,45µg/ml) zur Bestimmung von IFN- γ und 90.2 (1,34 µg/ml) sowie JES6-5H4 (2 µg/ml) zur Bestimmung von IL-2. Nach der Entfernung nichtgebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen wird Streptavidin-Peroxidase (Stammlösung 500 U/ml) in einer Konzentration von 50 mU/ml

in 50 µl/well BSA-Puffer zum Ansatz hinzugegeben und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgt die enzymatische Reaktion in 50 µl/well Citratpuffer durch Zugabe von ABTS (1-2 mg/ml Citratpuffer) und einer 0,3 %igen H₂O₂ Lösung. Die quantitative Auswertung der enzymatischen Reaktion wird photometrisch bei 414 nm durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konstitutive und induzierbare Synthese von NF-ATc-Isoformen in lymphoiden Zellen

Die molekularen Klonierungsarbeiten und die Charakterisierung der Isoformen des Transkriptionsfaktors NF-ATc in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. E. Serfling stellten die Frage nach deren funktioneller Bedeutung im Rahmen der T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung. Zunächst interessierte uns der Expressionsmodus der NF-ATc-Isoformen in verschiedenen lymphoiden Zellen. Wir untersuchten deshalb T-Tumorzellen, darunter Jurkat T-Zellen, A3.01 und H9 T-Zellen sowie Daudi und Raji B-Tumorzellen. Die Stimulation dieser Zellen wurde mit dem Phorbol ester TPA und dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin durchgeführt. Nach der Präparation der Kernproteine aus nichtinduzierten und induzierten Zellen erfolgte die Fraktionierung der NF-ATc-Proteine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie deren Immundetektion mittels NF-ATc-spezifischer Antikörper im Western blot-Versuch.

Abbildung 6 A zeigt eine Stimulationskinetik von Jurkat T-Zellen. Kerne von unbehandelten Jurkat T-Zellen besitzen relativ geringe Mengen an NF-ATc-Proteinen, die größer als 100 kDa sind. Nach der Behandlung mit TPA und Ionomycin steigt die Konzentration dieser Kernproteine über einen Zeitraum von 30 Min. bis 4 Stunden stetig an (Abb. 6 A, Spuren 1-5). Schließlich erscheint nach einer Behandlungsdauer von 4 Stunden ein kürzeres, prominentes NF-ATc-Protein, das ein Molekulargewicht von ungefähr 90 kDa besitzt (Abb. 6 A, Spur 5) und in der Größe mit dem von Northrop und Kollegen klonierten NF-ATc übereinstimmt (Northrop *et al.*, 1994). Western blot-Versuche unter gleichen Stimulationsbedingungen zeigen, dass ähnliche Muster von nukleären NF-ATc-Proteinen typisch für viele T- und B-Zelllinien sind. So exprimieren A3.01 T- und Daudi B-Zellen nach einer Stimulationsdauer von 4 Stunden ebenso das kurze NF-ATc-Protein von 90 kDa (Abb. 6 B und C, Spur 2). Andere lymphoide Zellen, darunter Raji B-Lymphomzellen, synthetisieren das 90 kDa NF-ATc-Protein nur in geringen Mengen (Abb. 6 C, Spur 4), während in H9 T-Zellen die Expression dieses NF-ATc-Proteins nicht detektierbar ist (Abb. 6 B, Spur 4).

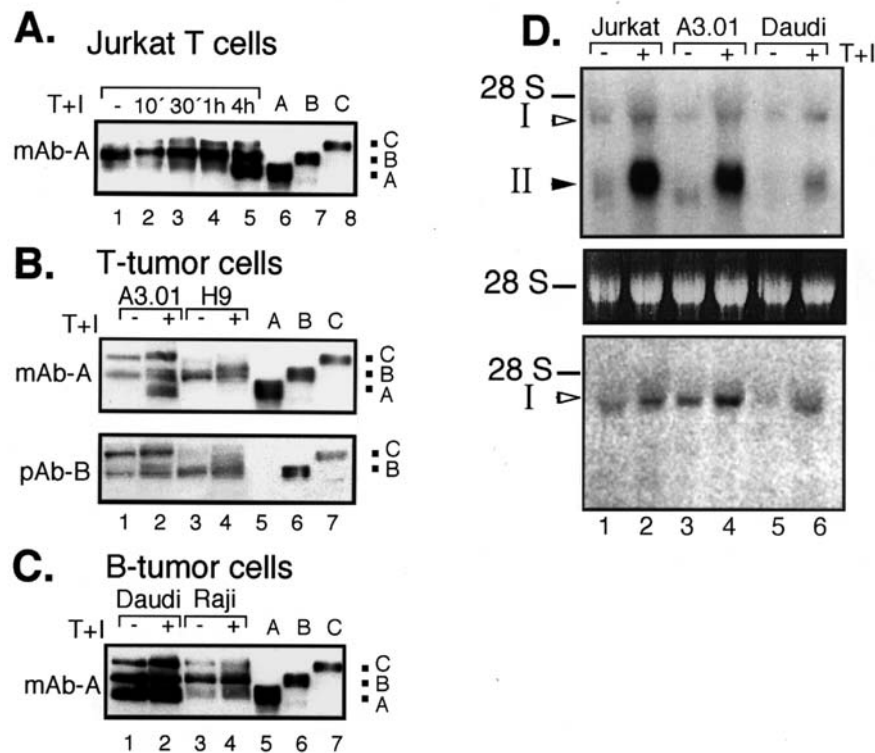


Abbildung 6. Drei nukleäre NF-ATc-Proteine werden in lymphoiden Tumorzellen exprimiert.

(A) 10 µg Kernproteine von nichtinduzierten Jurkat T-Zellen (-, Spur 1) oder Jurkat T-Zellen, die für die Dauer von 10 Minuten bis 4 Stunden (Spuren 2 bis 5) mit TPA und Ionomycin stimuliert wurden, wurden fraktioniert und mit dem monoklonalen NF-ATc-spezifischen Antikörper mAb-A immunodetektiert. Proteine von 293 Zellen, die mit NF-ATc/A-, B- und C-cDNA-Expressionsvektoren transfiziert wurden, werden im gleichen Gel nach Molekulargröße aufgetrennt (A, B und C in Spuren 6 bis 8). Die Stimulationskinetik zeigt eine konstitutive Synthese der NF-ATc-Isoformen NF-ATc/B und C sowie eine massive nukleäre Akkumulation von NF-ATc/A nach 4 Stunden Stimulation.

(B) Kernproteine von nichtinduzierten (-) und 4 Stunden mit TPA und Ionomycin stimulierten (+) A3.01 und H9 T-Zellen werden fraktioniert und immunodetektiert. Dabei erkennt der monoklonale Antikörper mAb-A die NF-ATc-Isoformen NF-ATc/A, B und C, der polyklonale Antikörper pAb-B die Isoformen NF-ATc/B und C.

(C) Immunodetektion von NF-ATc-Isoformen in nichtinduzierten (-) und über 4 Stunden induzierten (+) Raji und Daudi B-Zellen mittels des monoklonalen Antikörpers mAb-A.

(D) Induktion von NF-ATc/A-RNA in Jurkat Zellen im Northern Blot Experiment. Jurkat und A3.01 T-Zellen sowie Daudi B-Zellen wurden entweder nichtinduziert belassen (-) oder mit TPA/Ionomycin 4 Stunden stimuliert (+). Die RNAs wurden isoliert, an einem Formaldehyd-Agarose-Gel fraktioniert und auf eine Nylonmembran geblotet. Die Hybridisierung der isolierten RNAs erfolgte mit einer Probe, die entweder NF-ATc/A-, B- und C-RNAs (oberer Schaukasten) oder ausschließlich NF-ATc/B- und C-RNAs erkannte (unterer Schaukasten). Banden von 28rRNA dienen als Ladekontrolle. Deutlich zu erkennen ist die induzierbare *de novo* Synthese von NF-ATc/A-RNA in Jurkat und A3.01 T-Zellen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass die in den untersuchten lymphoiden Tumorzellen exprimierten Proteine tatsächlich mit den in unserem Labor klonierten Isoformen des Transkriptionsfaktors NF-ATc übereinstimmen, wurden 293 Zellen mit Expressionsvektoren aller drei NF-ATc-cDNAs transfiziert, und Kernproteinextrakte der transfizierten 293 Zellen wurden gemeinsam mit den Kernproteinen der zu untersuchenden lymphoiden Zellen im SDS-Polyacrylamid-Gel nach der Molekülgröße fraktioniert. 293 Zellen selbst zeichnen sich durch eine sehr geringe endogene Expression von NF-AT-Proteinen aus (unpubl. Daten). Abbildung 6 zeigt, dass transfizierte 293 Zellen Proteine synthetisieren, die in Größe mit den untersuchten Proteinen aus Jurkat und anderen lymphoiden T- und B-Tumorzellen identisch sind (Abb. 6 A, Spuren 6-8; Abb. C und B, Spuren 5-7).

Der spezifische Identitätsnachweis der NF-ATc/B- und NF-ATc/C-Isoformen erfolgte in Western blot-Versuchen, in denen der monoklonale Antikörper mAb-A, der gegen die Rel-ähnliche Domäne von NF-ATc, und der polyklonale Antikörper pAb-B, der gegen das C-terminale Peptid von NF-ATc/B gerichtet ist, verwendet wurden. Während mAb-A spezifisch gegen Epitope der RSD aller drei NF-ATc-Isoformen gerichtet ist, erkennt pAb-B ausschließlich die Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C (Abb. 6 A-C). Demzufolge stimmt das NF-ATc-Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 90 kDa mit dem bereits von Northrop und Kollegen klonierten NF-ATc-Protein überein (Northrop *et al.*, 1994). Die beiden längeren NF-ATc-Proteine mit einem Molekulargewicht von 100 kDa und größer, deren Expression wir in unterschiedlichen lymphoiden Tumorzellen beobachten konnten, sind identisch mit den von Chuvpilo und Kollegen klonierten NF-ATc/B- und NF-ATc/C-Proteinen (Chuvpilo *et al.*, 1999a).

Die induzierbare nukleäre Akkumulation von Transkriptionsfaktoren kann allein auf der Induktion des Kerntransports von im Zytoplasma präexistenten Faktoren beruhen. Andererseits kann sie auch Folge der *de novo* Synthese des Transkriptionsfaktors sein. Zur Charakterisierung des Transkriptionsmodus von NF-ATc-RNAs führten wir Northern blot-Versuche durch. Abbildung 6 D zeigt NF-ATc-RNAs der untersuchten lymphoiden Tumorzellen. Jurkat und A3.01 T-Zellen sowie Daudi B-Zellen wurden entweder nichtinduziert belassen oder 4 Stunden mit TPA und Ionomycin stimuliert. Nach der Präparation und elektrophoretischer Fraktionierung der RNAs in Agarose-Gelen erfolgte deren Hybridisierung mit radioaktiv markierten Proben, die entweder RNA-Transkripte aller drei NF-ATc-Isoformen (oberer Schaukasten) oder nur RNA-Transkripte der beiden NF-ATc-Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C (unterer

Schaukasten) erkennen. Die RNAs der nichtinduzierten lymphoiden Tumorzellen besitzen zwei unterschiedliche Gruppen von NF-ATc-RNAs mit ungefähr 4,6 kb (Abb. 6 D, Fraktion I) beziehungsweise 3 kb (Abb. 6 D, Fraktion II). Dabei stimmt die Gruppe der NF-ATc-RNAs von ungefähr 4,6 kb mit den RNAs der Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C überein, die andere Gruppe von ungefähr 3 kb mit der RNA der Isoform NF-ATc/A. Der Northern blot-Versuch zeigt im besonderen, dass die 4-stündige Stimulation von Jurkat und A3.01 T-Zellen mit TPA und Ionomycin zu einem 8-10-fachen Anstieg der *de novo* Synthese der 3 kb-RNA führte (Abb. 6 D, Fraktion II, Spuren 2 und 4), während ein nur geringer, kaum 2-facher Anstieg der 4,6 kb-RNAs beobachtet wurde (Abb. 6 D, Fraktion I, Spuren 2 und 4).

Wir konnten somit zeigen, dass NF-ATc-Isoformen in unterschiedlicher Weise in lymphoiden Tumorzellen synthetisiert werden. Dabei variiert der Expressionsmodus in Abhängigkeit von der Art der Tumorzelle. H9 T-Zellen und Raji B-Zellen synthetisieren konstitutiv die beiden Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C, während NF-ATc/A in Raji B-Zellen nur in geringen Mengen, in H9 T-Zellen hingegen keine Expression von NF-ATc/A nachweisbar war. In A3.01 und Jurkat T-Zellen wurden die Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C konstitutiv exprimiert. Darüber hinaus führte die 4-stündige Stimulation dieser Zellen mit TPA und Ionomycin zu einer massiven Induktion der *de novo* Synthese und der konsekutiven nukleären Akkumulation der Isoform NF-ATc/A.

3.2 Expression der NF-ATc-Isoformen im Zuge der Differenzierung von T-Zellen

Bislang betrachteten wir die Expression von NF-ATc-Isoformen ausschließlich in lymphoiden Tumorzellen. Um herauszufinden, ob der unterschiedliche Modus einer konstitutiven und induzierbaren Synthese von NF-ATc-Isoformen nur eine Eigenschaft dieser Tumorzellen ist oder aber auch für native T-Zellen zutrifft, untersuchten wir die Expression von NF-ATc-Isoformen in murinen T-Zellen. Diese Arbeiten erfolgten in Kooperation mit PD Dr. E. Schmitt vom Immunologischen Institut der Universität Mainz. Im dortigen immunzytologischen Labor werden naive CD4⁺T-Zellen aus den Milzen von Mäusen isoliert und gemäß eines dort etablierten *in vitro* Differenzierungsmodells in Th1- und Th2-Zellen differenziert (Schmitt *et al.*, 1994a, b). Der Wahl dieser Versuchsanordnung ging die Fragestellung voraus, ob eine unterschiedliche nukleäre

Zusammensetzung an NF-ATc-Isoformen mit individuellen transaktivierenden Eigenschaften für eine differenzierte T-Zellentwicklung und eine selektive und zellspezifische Gentranskription verantwortlich ist.

3.2.1 Modell der *in vitro* Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen

Verwendet wurden BALB/c Ann Mäuse im Alter von 8 bis 16 Wochen. Naive $CD4^+$ T-Lymphozyten aus den Milzen dieser Mäuse, die hohe Konzentrationen an CD62L-Ligand exprimieren, wurden mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ und gegen das CD28-Oberflächenmolekül stimuliert.

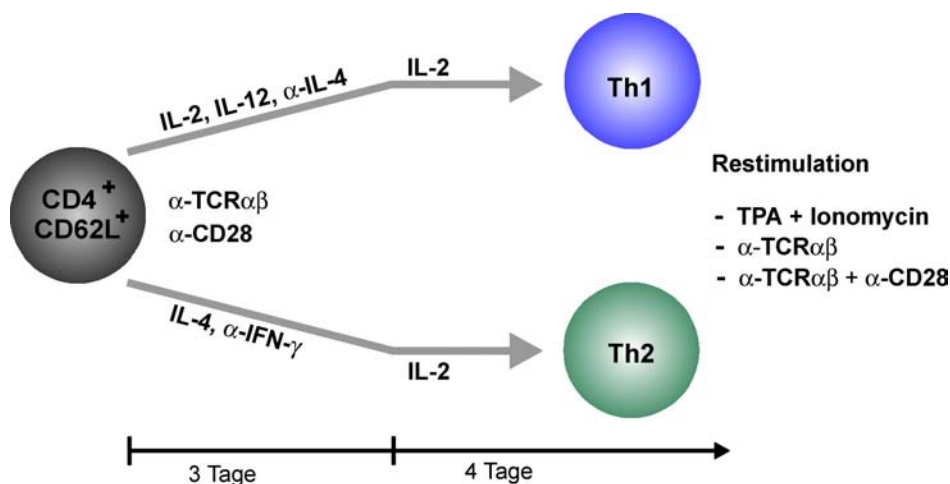


Abbildung 7. *In vitro* Differenzierung naiver $CD4^+$ / $CD62L^{\text{high}}$ T-Zellen zu Th1- und Th2-Zellen. Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden aus den Milzen von BALB/c Ann Mäusen isoliert, indem Antikörper gegen CD4 und CD62L benutzt wurden, die an Dynabeads gekoppelt waren. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Antikörpern gegen CD28 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in Iscove-Medium stimuliert (Schmitt *et al.*, 1994a). Die Differenzierung zu Th1-Zellen erfolgte bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit IL-12 (1000 U/ml), IL-2 (10 ng/ml) und Antikörpern gegen IL-4 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 3 Tage, die Differenzierung zu Th2-Zellen in Gegenwart von IL-4 und Antikörpern gegen IFN- γ . Nach der Differenzierung erfolgte eine 4-tägige Proliferationsphase in Gegenwart des Wachstumsfaktors IL-2. Anschließend wurden die naiven $CD4^+$ T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen entweder mit TPA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ allein oder mittels Kostimulation über das CD2-Oberflächenmolekül restimuliert.

Abbildung 7 zeigt, dass sich $CD4^+$ -T-Zellen in Anwesenheit definierter Zytokine und Zytokinantikörper innerhalb drei Tage *in vitro* zu Th1- und Th2-Zellen differenzieren. Dabei führt die gleichzeitige Inkubation der $CD4^+/CD62L^{high}$ -T-Zellen in einem Nährmedium mit den Zytokinen IL-2 und IL-12 und mit Antikörpern gegen IL-4 zu einer Differenzierung in Th1-Zellen. In Anwesenheit des Zytokins IL-4 und eines Antikörpers gegen $IFN-\gamma$ hingegen differenzieren $CD4^+/CD62L^{high}$ -T-Zellen zu Th2-Zellen (Schmitt *et al.*, 1994a). Nach dem Differenzierungsvorgang werden Th1- und Th2-Zellen 4 Tage mit IL-2 inkubiert. Diese Zeit dient der Proliferation der Zellen, wobei IL-2 als Wachstumsfaktor notwendig ist. Am 4. Tag der Proliferationsphase werden die Th1- und Th2-Zellen erneut entweder mit TPA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ allein oder mittels Kostimulation über CD28 6 beziehungsweise 13 Stunden stimuliert. Wir untersuchten zunächst die Expression der Lymphokine IL-2, IL-4 und $IFN-\gamma$ im ELISA sowie deren RNA-Synthese im RNase-Protektionsversuch.

Abbildung 8 zeigt, dass nichtinduzierte naive $CD4^+$ -T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen erwartungsgemäß weder IL-2 noch IL-4 oder $IFN-\gamma$ synthetisieren (Abb. 8, Spuren 1, 4 und 7). 13 Stunden Stimulation der naiven $CD4^+$ -T-Zellen mit TPA und Ionomycin führte zu einer massiven Synthese von IL-2 und zur Synthese nur geringer Mengen von $IFN-\gamma$. IL-4 läßt sich unter diesen Stimulationsbedingungen nicht detektieren (Abb. 8, Spur 3). Bei kürzeren Stimulationszeiten, z. B. von 6 Stunden, können keine der untersuchten Lymphokine im Überstand der naiven $CD4^+$ -T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8, Spur 2). Th1-Zellen exprimieren nach einer Zweitstimulation mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ bereits nach 6 Stunden große Mengen an $IFN-\gamma$. IL-2 wird von diesen Zellen in geringeren Konzentrationen synthetisiert, während IL-4 in vernachlässigbaren Konzentrationen im Überstand nachweisbar ist (Abb. 8, Spur 6). Restimulation von Th2-Zellen mit Antikörpern gegen $TCR\alpha\beta$ induziert nach 6 Stunden eine massive IL-4 Synthese, während weder eine Expression von IL-2 noch von $IFN-\gamma$ gemessen wird (Abb. 8, Spur 9). Im Vergleich zur Stimulation mit Antikörpern zeigten sich hinsichtlich der Expression von IL-4 kaum Unterschiede, wenn Th2-Zellen mit TPA und Ionomycin stimuliert wurden. In Th1-Zellen allerdings führt die Stimulation mit TPA und Ionomycin zu einer deutlich geringeren Synthese von $IFN-\gamma$ und einer kaum nachweisbaren Synthese von IL-2 (Abb. 8, Spuren 5 und 8).

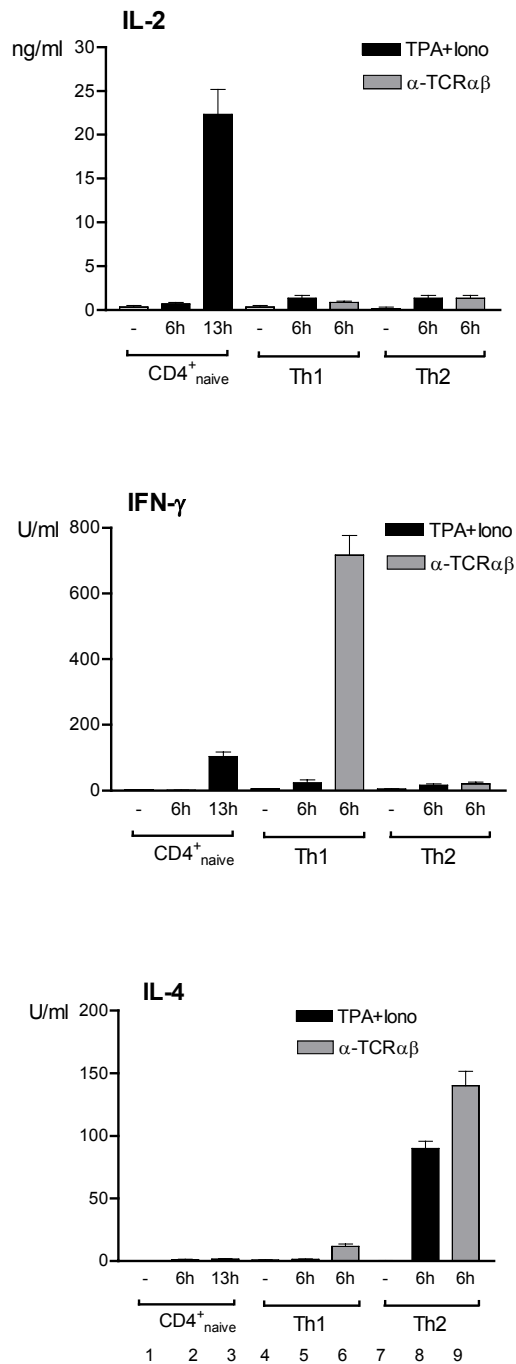


Abbildung 8. Lymphokin-Synthese von naiven CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen. Naive CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen wurden entweder mit TPA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen TCRαβ 6 bzw. 13 Stunden stimuliert oder nichtinduziert belassen (-). Aus den Überständen wurden die Lymphokine IL-2, IL-4 und IFN-γ mittels ELISA gemessen. 13 Stunden Stimulation naiver CD4⁺T-Zellen mit TPA und Ionomycin führte zu einer massiven Synthese von IL-2. Th1-Zellen exprimierten nach 6 Stunden Stimulation mit Antikörpern gegen TCRαβ große Mengen an IFN-γ, während IL-4 kaum nachweisbar war. Gleiche Stimulationsbedingungen induzierten in Th2-Zellen die ausschließliche Synthese von IL-4. Gezeigt werden repräsentative Experimente von mehr als zwei Versuchen.

Die zum Teil divergierenden Daten hinsichtlich der Lymphokinexpression unter diesen beiden Stimulationsbedingungen führen wir auf die jeweils unterschiedlichen Stimulationsintensitäten zurück. So vermuten wir, dass die Stimulation mit TPA und Ionomycin sehr wahrscheinlich aufgrund eines zu starken und unphysiologischen Stimulationsreizes frühzeitig Apoptose in den untersuchten Zellen induziert.

Abbildungen 9 A und B zeigen die Synthese der Lymphokin-RNAs in naiven CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen. Die RNAs der Zellen wurden mit Hilfe des RNeasy Kits isoliert. Nach der Sondensynthese, Hybridisierung und Ribonukleasebehandlung der radioaktiv markierten doppelsträngigen Lymphokin-RNAs im RNase-Protektionsversuch erfolgte schließlich deren Fraktionierung im Polyacrylamid-Gel. Die transkribierten Lymphokine wurden im Phosphorimager quantifiziert und ihre relativen Expressionsniveaus in Abbildung 9 C graphisch dargestellt. Stimulation naiver CD4⁺T-Zellen mit TPA und Ionomycin führte bereits nach 6 Stunden zu einer massiven Transkription der IL-2-RNA, die im Verlauf einer 13-stündigen Stimulationsdauer zusätzlich auf mehr als das 3-fache ansteigt (Abb. 9 B, Spuren 2 und 3). Restimulation mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ für 6 Stunden induzierte in Th1-Zellen vorzugsweise eine massive Transkription der IFN- γ -RNA und eine geringere der IL-2-RNA. IL-4-RNA wurde in diesen Zellen kaum synthetisiert (Abb. 9 A, Spur 2; Abb. 9 B, Spur 6). Im Gegensatz dazu führten gleiche Stimulationsbedingungen in Th2-Zellen zur Transkription der Th2-typischen IL-4-, IL-5- und IL-10-RNAs (Abb. 9 A, Spur 4; Abb. 9 B, Spur 9). Nach Stimulation von Th1- und Th2-Zellen mit TPA und Ionomycin beobachteten wir keine nennenswerten Unterschiede in der relativen Verteilung der untersuchten Lymphokin-RNAs im Vergleich zur Stimulation mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$. Allerdings konnten in Th1- und Th2-Zellen, die mit TPA und Ionomycin stimuliert worden waren, insgesamt höhere absolute Konzentrationen der transkribierten Lymphokin-RNAs nachgewiesen werden (Abb. 9 B, Spuren 5 und 8).

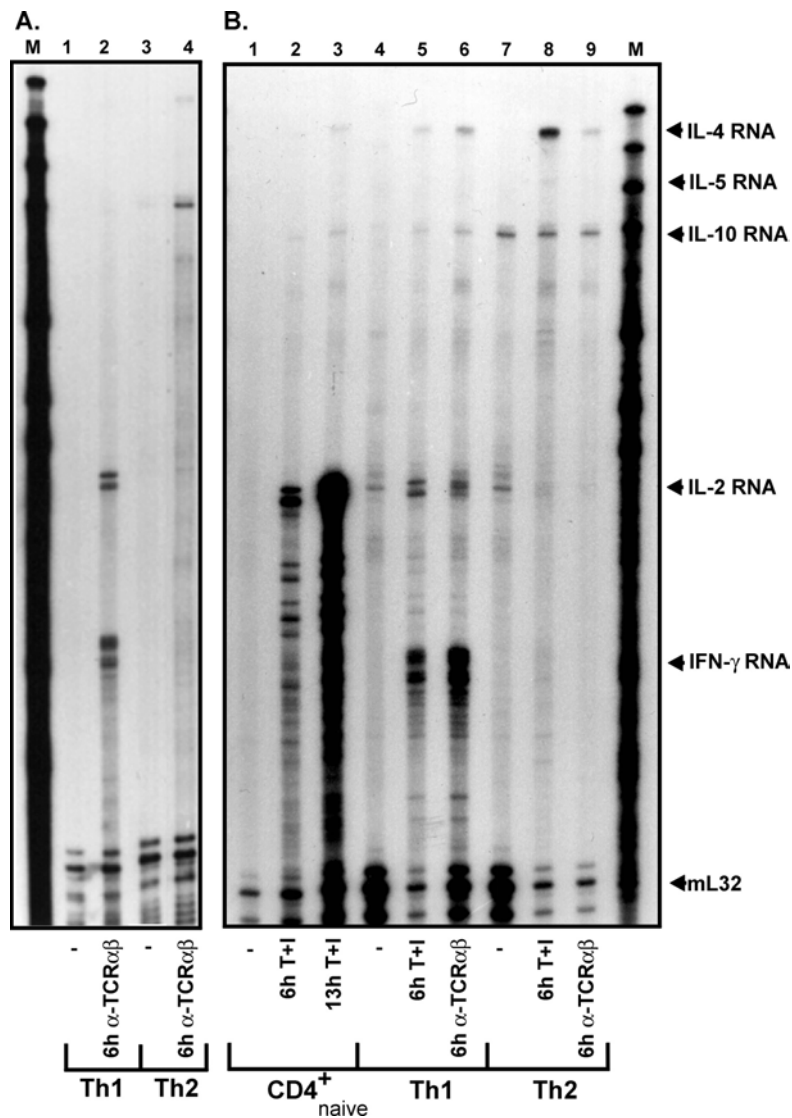


Abbildung 9 A und B. RNase-Protektionsversuch mit Synthese der Lymphokin-RNAs in naiven CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen. Naive CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen wurden entweder nichtinduziert belassen (-) oder mit TPA und Ionomycin (B, Spuren 2, 3, 5 und 8) oder mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ (A, Spuren 2 und 4; B, Spuren 6 und 9) 6 bzw. 13 Stunden stimuliert. Die RNAs dieser Zellen wurden mit Hilfe des RNeasy Kits (Quiagen) isoliert und mittels des RiboQuant (RPA) Kits (PharMingen) analysiert. Radioaktiv markierte Proben dienen als Größenmarker (M). Als interne Kontrolle wird die protektierte RNA des Gens mL32 angezeigt. Stimulation naiver CD4⁺T-Zellen mit TPA und Ionomycin führte über den Zeitraum von 6 (B, Spur 2) und 13 Stunden (B, Spur 3) zu einer massiven Synthese der IL2-RNA. 6 Stunden Stimulation mit TPA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ führte in Th1-Zellen zur Synthese der IFN- γ - und IL-2-RNAs (A, Spur 2; B, Spuren 5 und 6), während in Th2-Zellen vorzugsweise die Th2-Lymphokingene IL-4, IL-5 und IL-10 transkribiert wurden (A, Spur 4; B, Spuren 8 und 9). Gezeigt werden repräsentative Ergebnisse von mehr als zwei Versuchen.

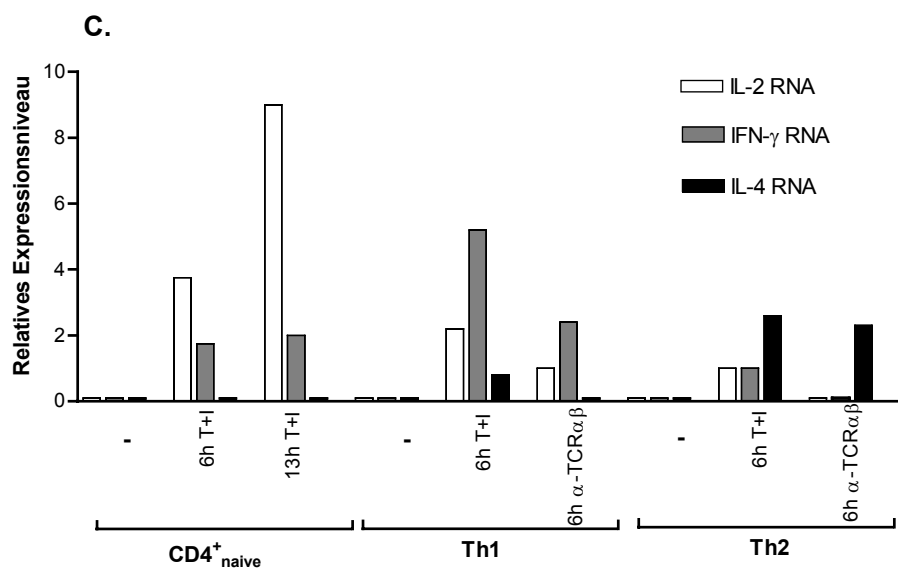


Abbildung 9 C. Graphische Darstellung der Lymphokin-RNA Synthese in naiven CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen. Gezeigt werden die relativen Expressionsniveaus der Lymphokine IL-2, IFN- γ und IL-4 nach Quantifizierung der Lymphokin-RNAs (in Abbildung 9 A und B) im Phosphorimager.

IL-2 ist das erste Lymphokin, das nach Stimulation naiver CD4⁺T-Lymphozyten transkribiert und synthetisiert wird (Ehlers *et al.*, 1991). Dies zeigen die Abbildungen 8 und 9 mit der Darstellung der Synthese von IL-2-RNA und der Sekretion von IL-2 nach Stimulation naiver CD4⁺T-Zellen mit TPA und Ionomycin oder mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation von *in vitro* differenzierten Th1-Zellen zu einer vorzugsweisen und massiven Synthese von IFN- γ -RNA und Expression von IFN- γ , während in Th2-Zellen die ausschließliche Synthese der RNAs der Th2-typischen Lymphokine IL-4, IL-5 und IL-10 sowie die Expression von IL-4 festzustellen ist.

3.2.2 Massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen

Mit dem *in vitro* Differenzierungsmodell können wir Zellen generieren, die sich, wie Abbildungen 8 und 9 zeigen, *per definitionem* (Mosmann *et al.*, 1989) im Muster der Lymphokinexpression unterscheiden. Deshalb erlaubte uns das *in vitro* Differenzierungsmodell zu untersuchen, ob die Heterogenität der Expression von NF-

ATc-Isoformen eine potentielle Rolle bei der selektiven Induktion von Lymphokinen und der konsekutiven phänotypischen Differenzierung von T-Zellen spielt. Zunächst analysierten wir die Expression und das nukleäre Auftreten der NF-ATc-Isoformen im Verlauf der T-Zelldifferenzierung und T-Zellaktivierung in Western blot-Versuchen. Dazu wurden naive CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen entweder nichtinduziert belassen oder mit TPA und Ionomycin beziehungsweise mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ allein oder mittels Kostimulation über CD28 stimuliert.

In Abbildung 10 wurden 10 μ g der zu fraktionierenden Kernproteinextrakte dieser Zellen im SDS-Polyacrylamid-Gel nach der Molekulargröße aufgetrennt und die NF-ATc-Proteine mit Hilfe des NF-ATc-spezifischen monoklonalen Antikörpers mAb-A immunodetektiert. Während sich in den Kernproteinextrakten nichtinduzierter CD4⁺T-Zellen keine NF-ATc-Faktoren nachweisen lassen (Abb. 10 A, Spur 1), führen 5 Stunden Stimulation dieser Zellen mit TPA und Ionomycin zum nukleären Auftreten von zwei NF-ATc-Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 100 kDa (Abb. 10 A, Spur 2). *In vitro* Differenzierung geht in ruhenden Th1- und Th2-Zellen zunächst mit einer Zunahme nukleärer NF-ATc-Proteine, insbesondere der NF-ATc-Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 100 kDa, einher (Abb. 10 A, Spuren 3 und 5; Abb. 10 B, Spuren 1 und 4). Schließlich führt die 5-stündige Stimulation von Th1- und Th2-Zellen mit TPA und Ionomycin zum vorwiegenden Auftreten eines kürzeren NF-ATc-Proteins mit einem Molekulargewicht von 90 kDa in den Kernen beider Zelltypen (Abb. 10 A Spuren 4 und 6). Andere Stimulationsversuche, in denen Th1- und Th2-Zellen mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ allein oder mittels Kostimulation über CD28 stimuliert wurden, führen sogar zu einem nahezu kompletten Umschalten von der Expression der größeren NF-ATc-Isoformen hin zu einer massiven nukleären Akkumulation des kürzeren NF-ATc-Proteins mit einem Molekulargewicht von 90 kDa (Abb. 10 B, vergleiche Spur 1 mit Spuren 2 und 3 bzw. Spur 4 mit Spuren 5 und 6). In einer Stimulationskinetik mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ über 45 Minuten (Abb. 10 C, Spuren 2 und 6), 2 Stunden (Spuren 3 und 7) und 4 Stunden (Spuren 4 und 8) kann die massive Expression des 90 kDa NF-ATc-Proteins erst nach einer Stimulationszeit von 4 Stunden in Th1- und Th2-Zellen beobachtet werden.

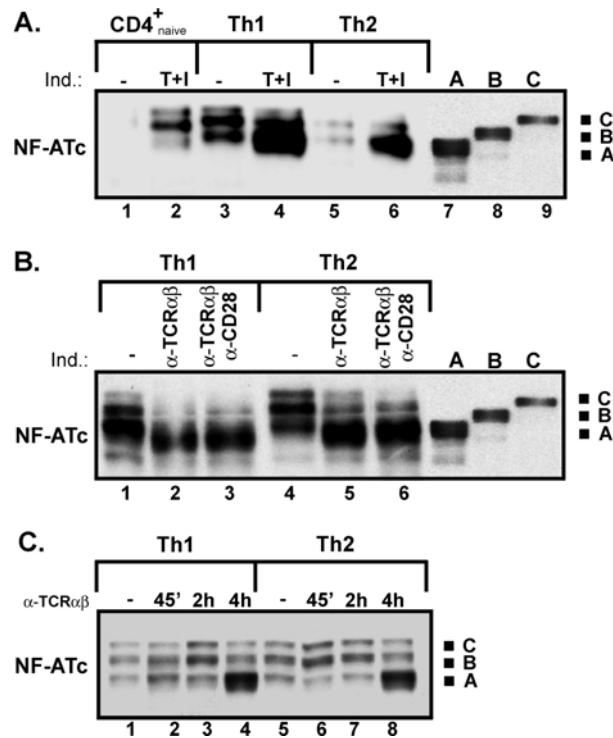


Abbildung 10. Massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen.

(A) Naive CD4⁺T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen wurden nichtinduziert belassen (-) oder 5 Stunden mit TPA und Ionomycin stimuliert. 10µg Kernproteinextrakte von naiven CD4⁺T-Zellen (Spuren 1 und 2), Th1- (Spuren 3 und 4) und Th2-Zellen (Spuren 5 und 6) wurden an einem 10%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Proteine von 293 Zellen, die mit NF-ATc/A-, NF-ATc/B- und NF-ATc/C-cDNA-Expressionsvektoren transfiziert wurden, wurden im gleichen SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargröße aufgetrennt (A, B und C). Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran folgte ein Western blot mit dem NF-ATc-spezifischen monoklonalen Antikörper mAb-A. Stimulation mit TPA und Ionomycin führte zu einer massiven nukleären Akkumulation der induzierbaren NF-ATc-Isoform NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen (Spuren 4 und 6). Die massive Induktion von NF-ATc/A findet dagegen in naiven CD4⁺T-Zellen nicht statt (Spur 2).

(B) 5 Stunden Stimulation von Th1- und Th2-Zellen mit Antikörpern gegen TCRαβ allein oder mittels Kostimulation über CD28 induzierte in gleicher Weise eine massive Synthese von NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen (Spuren 2, 3 und 4, 6).

(C) In einer Stimulationskinetik mit Antikörpern gegen TCRαβ mit den Zeitpunkten 45 Minuten (Spuren 2 und 6), 2 Stunden (Spuren 3 und 7) und 4 Stunden (Spuren 4 und 8) wurde die massive Synthese von NF-ATc/A erst nach einer Stimulationsdauer von 4 Stunden beobachtet.

293 Zellen, die mit allen drei NF-ATc-cDNA-Vektoren transfiziert und gemeinsam mit den Kernproteinen der Th1- und Th2-Zellen im SDS-Polyacrylamid-Gel fraktioniert wurden, synthetisieren Proteine, die in Größe mit den zu untersuchenden Proteinen aus Th1- und Th2-Zellen identisch sind. Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper mAb-A im Western blot-Versuch diente als spezifischer Identitätsnachweis, so dass es sich bei den dargestellten Proteinen um die von Chuvpilo und Kollegen klonierten NF-ATc-Isoformen NF-ATc/A, NF-ATc/B und NF-ATc/C handelt, deren Expression wir anfänglich in lymphoiden Tumorzellen nachwiesen (Northrop *et al.*, 1994; Chuvpilo *et al.*, 1999a und 1999b).

Wir konnten zeigen, dass stimulierte naive CD4⁺T-Zellen ausschließlich die Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C exprimieren. Diese beiden Isoformen werden zudem konstitutiv in ruhenden Th1- und Th2-Zellen synthetisiert. Im Zuge der T-Zelldifferenzierung erlangen Antigen-erfahrene Th1- und Th2-Zellen die Fähigkeit zur massiven und induzierbaren Synthese der Isoform NF-ATc/A, eine Eigenschaft, die naiven CD4⁺T-Zellen fehlt.

3.3 NF-ATc und NF-ATp bilden Komplexe mit der Pu-b_B des IL-4 Promotors in Th2-Zellen

Sowohl die zellspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren als auch deren posttranslationale Modifizierungen und kooperative Interaktionen untereinander stellen potentielle Mechanismen dar, die einer selektiven Induktion von Zytokinen zugrunde liegen können. Wir konnten zeigen, dass die Stimulation von Th1- und Th2-Zellen in beiden Zelltypen zu einer vergleichbaren Induktion und nukleären Akkumulation von NF-ATc führt. Deshalb interessierte uns, ob unterschiedliche Bindungseigenschaften von NF-AT-Faktoren an einer selektiven Transkription von Lymphokinen in Th1- und Th2-Zellen beteiligt sind. Für die NF-AT-DNA-Bindungsstudien wählten wir die Pu-b_B des IL-4 Promotors. Zum einen, weil das immunmodulatorische Lymphokin IL-4 die zentrale Rolle bei der Th2-Zelldifferenzierung spielt (Le Gros *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990), zum anderen, weil gezielte Punktmutationen eine wesentliche Beteiligung der Pu-b_B an der Induzierbarkeit des IL-4 Promotors nachwiesen (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993). Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der DNA-Bindungsstudien mit der radioaktiv markierten Pu-b_B

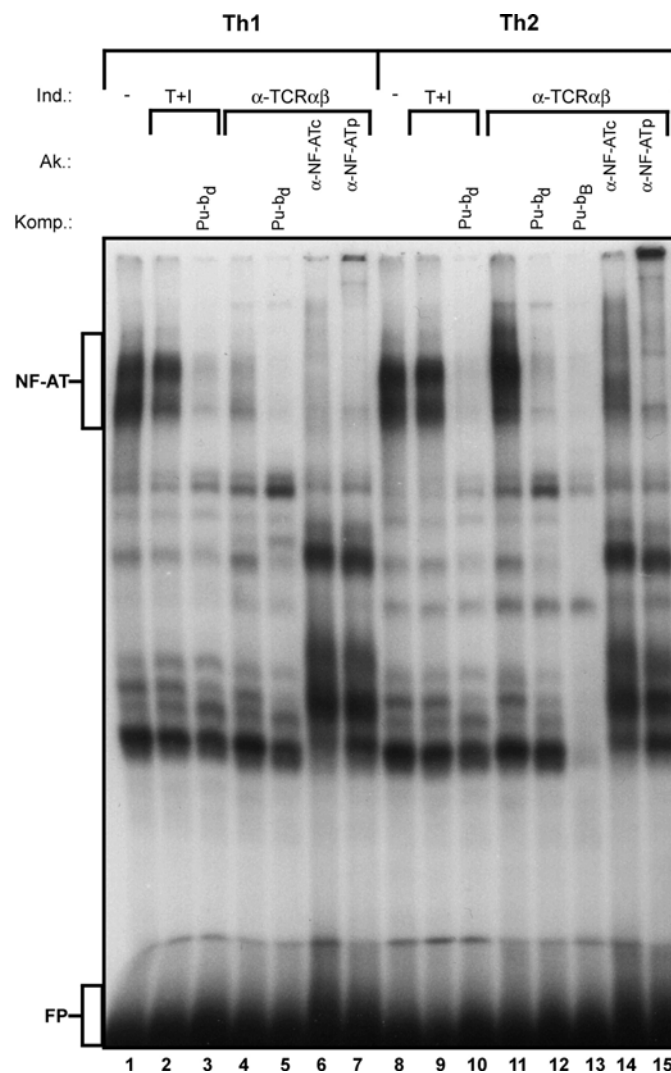


Abbildung 11. NF-ATc und NF-ATp bilden Komplexe mit der Pu-b_B des IL-4 Promotors in Th2-Zellen. 2 µg Kernproteinextrakt aus Th1- (Spuren 1-7) und Th2-Zellen (Spuren 8-15) wurden mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid der Pu-b_B inkubiert. Zur unspezifischen Kompetition wurden dem Ansatz jeweils 2 µg poly dI/dC zugesetzt. Vor der Präparation der Kernproteinextrakte wurden Th1- und Th2-Zellen entweder nichtinduziert (-, Spuren 1 und 8) belassen oder 5 Stunden mit TPA und Ionomycin (Spuren 2, 3, 9 und 10) oder mit Antikörpern gegen TCRαβ (Spuren 4 bis 7 und 11 bis 15) stimuliert. Zur spezifischen Kompetition dienten 100 ng der distalen NF-AT-Bindungsstelle des IL-2 Promotors Pu-b_d (Spuren 3, 5, 10 und 12) oder 100 ng Pu-b_B des IL-4 Promotors (Spur 13) im vielfachen molaren Überschuss. Zum Nachweis der Spezifität der DNA-Protein-Komplexe wurden 1 µl des NF-ATc-spezifischen monoklonalen Antikörpers mAb-A (Spuren 6 und 14) oder 0,5 µl des NF-ATp-spezifischen polyklonalen Antikörpers pAb-p (Spuren 7 und 15) dem Inkubationsansatz hinzugefügt. Die Position der freien radioaktiven Probe (FP) sowie des NF-AT-DNA-Komplexes (NF-AT) werden gezeigt. Man beachte die selektive Bindung von NF-ATc und NF-ATp an die Pu-b_B des IL-4 Promotors in Th2-Zellen nach Stimulation mit Antikörpern gegen TCRαβ (Spur 11).

als NF-AT-Bindungsstelle. Kernproteinextrakte von Th1- (Abb. 11, Spuren 1-7) und Th2-Zellen (Abb. 11, Spuren 8-15) werden in Anwesenheit von poly dl/dC, das als unspezifischer Kompetitor eine DNA-Bindung von NF-AT-Faktoren gestattet, mit der radioaktiv markierten Pu-b_B des murinen IL-4 Promotors inkubiert und im SDS-Polyacrylamid-Gel nach der Molekulargröße fraktioniert. Die Generierung des DNA-Protein-Komplexes, der in der für NF-AT-Faktoren zu erwartenden Größe beobachtet wurde, kann spezifisch durch die Zugabe sowohl der Pu-b_d (Abb. 11, Spuren 3, 5, 10 und 12) als auch der Pu-b_B (Abb. 11, Spur 13) im vielfachen molaren Überschuss kompetitiert werden. Die gleichzeitige Inkubation der Kernproteinextrakte von Th2-Zellen und der radioaktiv markierten Pu-b_B mit dem NF-ATc-spezifischen monoklonalen Antikörper mAb-A führte zu einer deutlichen Reduktion des DNA-Protein-Komplexes (Abb. 11, Spuren 6 und 14), die Zugabe des NF-ATp-spezifischen polyklonalen Antikörpers pAb-p zu einem "Supershift" des Komplexes in Richtung höheren Molekulargewichtes (Abb. 11, Spuren 7 und 15). Demzufolge handelt es sich bei den dargestellten Komplexen um DNA-Protein-Komplexe, an deren Generierung NF-ATc- und NF-ATp-Faktoren beteiligt sind.

Die DNA-Bindungsstudien zeigen im besonderen, dass sich NF-AT-Faktoren in den Kernproteinextrakten von Th1- und Th2-Zellen deutlich in ihren DNA-Bindungseigenschaften unterscheiden. So führten 5 Stunden Stimulation von Th1-Zellen mit TPA und Ionomycin zu einer Abnahme der NF-AT-Komplexe (Abb. 11, Spuren 1 und 2), Stimulation mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ über den gleichen Zeitraum darüber hinaus zu einem fast vollständigen Verlust der NF-AT-Komplexgenerierung in diesen Zellen (Abb. 11, Spuren 1 und 4). Demgegenüber läßt sich kaum ein Unterschied in der NF-AT-Komplexbildung von Kernproteinextrakten aus nichtinduzierten und mit TPA und Ionomycin stimulierten Th2-Zellen erkennen (Abb. 11, Spuren 8 und 9). Schließlich beobachten wir jedoch eine deutliche Zunahme der Bildung von NF-AT-Komplexen, wenn Kernproteinextrakte von Th2-Zellen nach Stimulation mit Antikörpern gegen TCR $\alpha\beta$ mit der radioaktiv markierten Pu-b_B als NF-AT-Bindungsstelle inkubiert wurden (Abb. 11, Spuren 8 und 11).

Diese Ergebnisse weisen nicht nur unterschiedliche Bindungseigenschaften von NF-AT-Faktoren an die Pu-b_B des IL-4 Promotors in Th1- und Th2-Zellen nach, sondern belegen im besonderen die zellspezifische Bindung von NF-ATc und NF-ATp an eine funktionell wichtige NF-AT-Bindungsstelle innerhalb des IL-4 Promotors unter der Bedingung der selektiven IL-4-RNA Synthese und Expression von IL-4 in Th2-Zellen.

4 DISKUSSION

4.1 NF-ATc/B und NF-ATc/C regulieren die transkriptionelle Aktivität und die Genexpression in naiven CD4⁺T-Zellen

Im Gegensatz zu NF-ATp, das konstitutiv in zahlreichen lymphoiden Zellen synthetisiert wird, wurde NF-ATc ursprünglich als ein in aktivierten T-Zellen induzierbarer Transkriptionsfaktor beschrieben (Northop *et al.*, 1994; Lyakh *et al.*, 1997). Wir konnten zeigen, daß die induzierbare Expression nur für NF-ATc/A, der kürzesten der drei NF-ATc-Isoformen, zutrifft. Die beiden längeren Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C werden dagegen ebenso wie NF-ATp konstitutiv in vielen lymphoiden Tumorzellen sowie in Th1- und Th2-Zellen exprimiert.

Nahe dem N-Terminus besitzen alle drei NF-ATc-Isoformen eine starke transaktivierende Domäne, TAD-A (Avots *et al.*, 1999). Zusätzlich beherbergen die C-terminalen Peptide von NF-ATc/C eine zweite transaktivierende Domäne, TAD-B (Chuvpilo *et al.*, 1999b). Während beide transaktivierenden Domänen im Modus ihrer Aktivierung übereinstimmen, unterscheiden sie sich wesentlich in der Stärke ihrer transaktivierenden Eigenschaften. Demzufolge besitzt die C-terminale TAD-B der Isoform NF-ATc/C nur etwa 15% der transaktivierenden Potenz der N-terminalen TAD-A (Chuvpilo *et al.*, 1999b). Die Existenz einer zusätzlichen C-terminalen transaktivierenden Domäne ist nicht ausschließlich eine Eigenschaft der langen NF-ATc/C-Isoform. So beherbergen fast alle Isoformen von NF-ATp eine C-terminale PQ-reiche Sequenz von ungefähr 220 Aminosäuren, die mehr als 30% Homologie mit dem C-terminalen Peptid von NF-ATc/C aufweist und funktionelle Eigenschaften einer transaktivierenden Domäne besitzt (Luo *et al.*, 1996b; Chuvpilo *et al.*, 1999b). Analog dazu wurde eine zusätzliche transaktivierende Domäne innerhalb des C-Terminus der längsten Isoform NF-ATx1 von NF-AT4 identifiziert (Imamura *et al.*, 1998).

Transiente Transfektionsversuche mit cDNA-Vektoren der drei NF-ATc-Isoformen und Promotoren, die aus multiplen Kopien der distalen NF-AT-Bindungsstelle Pu-b_d des IL-2 Promotors und der Pu-b_B des IL-4 Promotors zusammengesetzt waren, ließen individuelle transaktivierende Eigenschaften der NF-ATc-Isoformen erkennen. Demzufolge trat in diesen Studien die Isoform NF-ATc/C als stärkster Transaktivator hervor. Die N-terminale transaktivierende Domäne TAD-A scheint also zusammen mit

der C-terminalen TAD-B die transkriptionelle Aktivität der Isoform NF-ATc/C zu kontrollieren. Indessen übt das C-terminale Peptid der Isoform NF-ATc/B die Funktion eines transkriptionellen Repressors aus und erklärt die Eigenschaft von NF-ATc/B als schwachen Transaktivator (Chuvpilo *et al.*, 1999b). Da sich hinsichtlich der transkriptionellen Aktivierung des IL-5 Promotors keine Unterschiede zwischen den NF-ATc-Isoformen in Transfektionsversuchen beobachten ließen (Chuvpilo *et al.*, 1999b), vermuten wir, dass NF-ATc-Isoformen individuelle transkriptionelle Eigenschaften in Abhängigkeit vom Kontext des Promotors aufweisen.

Als wichtigster Wachstumsfaktor für die Proliferation naiver CD4⁺T-Zellen dient IL-2, das nach Stimulation dieser Zellen als erstes Lymphokin synthetisiert wird (Ehlers *et al.*, 1991). Dabei korrelieren in naiven CD4⁺T-Zellen die *de novo* Synthese von IL-2-RNA sowie die Expression von IL-2 mit dem nukleären Auftreten der Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C. Die Charakterisierung einer zusätzlichen C-terminalen transaktivierenden Domäne der Isoform NF-ATc/C sowie offensichtliche Unterschiede hinsichtlich ihrer individuellen transaktivierenden Eigenschaften bei der Induktion der Promotoren der Gene für IL-2, IL-4 und IL-5 legen nahe, dass NF-ATc-Isoformen individuelle Funktionen bei der Kontrolle von Lymphokingenen im Rahmen der T-Zellaktivierung und T-Zelldifferenzierung ausüben. In diesem Zusammenhang scheinen die Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C die transkriptionelle Aktivität und die Expression des IL-2-Gens in naiven CD4⁺T-Zellen, die ausschließlich diese beiden NF-ATc-Isoformen exprimieren, zu regulieren.

4.2 Die massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A ist eine Eigenschaft Antigen-erfahrener Th1- und Th2-Zellen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A, der kürzesten NF-ATc-Isoform, nicht in naiven CD4⁺T-Zellen stattfindet, sondern eine individuelle Eigenschaft antigenerfahrener Th1- und Th2-Zellen darstellt (Chuvpilo *et al.*, 1999a). Dabei könnten die massive *de novo* Expression und nukleäre Akkumulation von NF-ATc/A durch das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes für die Induktion bestimmter Zielgene in Th-Effektorzellen verantwortlich sein.

Schwellenwerte von Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion verschiedener Gene, die an der Differenzierung, Aktivierung und Proliferation

sowie an der Apoptose von eukaryontischen Zellen beteiligt sind. Während der Entwicklung von *Drosophila* verteilen sich Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Bicoid, in einem Konzentrationsgradienten entlang der embryonalen *anterior-posterior* Achse. Ab einem gewissen Schwellenwert werden Promotoren von Bicoid-Zielgenen, die hochaffine Bindungsstellen beherbergen, aktiviert und leiten zelluläre Differenzierungsvorgänge ein. Andere Promotoren mit niedrigaffinen Bindungsstellen bleiben hingegen inaktiv. Trotz einer kontinuierlichen Verteilung des Transkriptionsfaktors Bicoid ermöglichen Schwellenwerte die gleichzeitige Aktivierung und Expression unterschiedlicher Gruppen von Genen im Kopf- und im thorakalen Bereich des *Drosophila* Embryos (Driever *et al.*, 1992).

Aktivierung, Differenzierung und Apoptose von Thymozyten oder peripheren T-Lymphozyten werden von der Stärke der Interaktion zwischen dem präsentierten Antigen und dem TCR bestimmt. Dabei leitet eine starke Interaktion Apoptose ein, während eine schwache Interaktion das Überleben der Thymozyten gewährleistet (Jameson *et al.*, 1995). Signalübertragungswege, die bei der Selektion von Thymozyten verantwortlich sind, konnten in jüngster Zeit identifiziert werden (Alberola-Ila *et al.*, 1996). Unklar bleibt allerdings der Mechanismus, auf welche Weise TCR-Signale unterschiedlicher Stärke in die Expression von spezifischen Genen "übersetzt" werden. Ein an dieser Konversion beteiligter Mechanismus scheint die schrittweise Phosphorylierung der CD3 ξ Kette zu sein (Neumeister Kersh *et al.*, 1998); ein anderer möglicherweise die Existenz bestimmter Schwellenwerte für Transkriptionsfaktoren.

Die transkriptionelle Induktion des IL-2 Gens in T-Lymphozyten setzt das Zusammenfügen aller unmittelbar aufwärts der Promotorregion bindenden Transkriptionsfaktoren voraus (Rothenberg und Ward, 1996). Der ungefähr 300 bp messende IL-2 Promotor umfaßt aneinandergereihte Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, darunter NF-AT-, NF-kB-, Octamer- und AP-1-Faktoren (Pfeuffer *et al.*, 1994; Serfling *et al.*, 1995). Diese Faktoren besitzen jeweils mehr als eine Bindungsstelle innerhalb des IL-2 Promotors, wobei der Verlust der Bindung eines Faktors an eine hochaffine Bindungsstelle in einem dramatischen Rückgang der Promotoraktivität resultiert. In Versuchen mit Reporter genen, die von multiplen NF-AT-Bindungsstellen kontrolliert werden, muß die Konzentration der NF-AT-Faktoren einen kritischen Schwellenwert übersteigen, um das Reporter gen zu aktivieren (Fiering *et al.*, 1990).

Chuvpilo und Kollegen zeigten, dass alternative Spleiss- und Polyadenylierungsvorgänge an der Transkription des menschlichen chromosomalen NF-ATc-Gens beteiligt sind. Dieser Vorgang beruht auf der Existenz zweier Polyadenylierungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten für Polyadenylierungsfaktoren. In naiven CD4⁺T-Zellen ist vorzugsweise die hochaffine distale Polyadenylierungsstelle pA2 aktiv und trägt zur Generierung der beiden langen Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C bei. Als Folge der Polyadenylierung an der niedrigaffinen proximalen Polyadenylierungsstelle pA1 im Zuge der Differenzierung erlangen Th1- und Th2-Zellen die Fähigkeit zur raschen und induzierbaren Synthese von NF-ATc/A (Chuvpilo et al., 1999a).

Die Bildung eukaryontischer mRNA mit korrekten 3'-Enden ist ein komplexer Vorgang, der ein weites Spektrum an Polyadenylierungsfaktoren und RNA-Polymerase II erfordert (Hirose *et al.*, 1998). Für das Schneiden und die Polyadenylierung von RNA-Polymerase II Transkripten *in vitro* sind "cleavage polyadenylation specificity factor" (CPSF), "cleavage stimulatory factor" (CstF), "cleavage factors" I und II (CFI, CFII) und poly A-Polymerase notwendig (Colgan und Manley, 1997). Der tetramere CPSF bindet bei diesem Vorgang das AATAAA "poly A addition signal", während CstF, der aus den drei Untereinheiten CstF-50, 64 und 77 besteht, die GT-reichen Motive abwärts des "poly A addition signal" des Primärtranskripts bindet (Colgan und Manley, 1997). Chuvpilo und Kollegen wiesen nach, dass CstF-64 mit höherer Affinität an die distale Polyadenylierungsstelle bindet, und vermuten die allgemein geringe Konzentration an Polyadenylierungsfaktoren in naiven T-Zellen, darunter auch CstF-64, als Grund für ein unzureichendes Erkennen und die Inaktivität der proximalen Polyadenylierungsstelle pA1 (Chuvpilo *et al.*, 1999a). T-Zelldifferenzierung und T-Zellaktivierung führen schließlich zu einem Anstieg der Konzentrationen an Polyadenylierungsfaktoren (Edwalds-Gilbert *et al.*, 1997; Martincic *et al.*, 1998) und ermöglichen das Erkennen der schwächeren proximalen Polyadenylierungsstelle mit konsekutiver Synthese von NF-ATc/A in Th1- und Th2-Zellen (Chuvpilo *et al.*, 1999a).

Zwischenzeitlich charakterisierten und klonierten Chuvpilo und Kollegen das chromosomale murine NF-ATc-Gen, das – ähnlich dem menschlichen NF-ATc-Gen (Chuvpilo *et al.*, 1999b) – in mehreren Isoformen exprimiert wird, die sich in der Länge ihrer C- und N-terminalen Peptide unterscheiden und deren Synthese entscheidend von der Aktivität zweier Promotoren, P1 und P2, sowie von mindestens zwei Polyadenylierungsstellen, pA1 und pA2, kontrolliert wird (Chuvpilo *et al.*, 2002). Die massive Induktion der Isoform NF-ATc/A beruht auf der Aktivierung des stark

induzierbaren Promotors P1 und der Polyadenylierung an der proximalen Polyadenylierungsstelle pA1. Die Synthese der langen Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C hingegen wird über die Aktivität des schwachen Promotors P2 gesteuert und unterliegt stets der Kontrolle der Polyadenylierung an der distalen hochaffinen Polyadenylierungsstelle pA2 (Chuvpilo *et al.*, 2002). Neben DNA-Methylierungsvorgängen spielen NF-AT-Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Induzierbarkeit des Promotors P1, der neben einer niedrig-affinen NF-AT-Bindungsstelle, NF-AT₉₀ (Zhou *et al.*, 2002), zwei tandemartig angeordnete NF-AT-Bindungsstellen, NF-AT_{tand}, an Position -650 beherbergt, an die NF-ATp und NF-ATc mit hoher Bindungsaffinität binden. Während die Pu-b_d des IL-2 Promotors zusammengesetzte NF-AT/AP-1-Bindungsstellen aufweist, konnten keine AP-1-Bindungsstellen in 3'-Richtung von NF-AT_{tand} oder NF-AT₉₀ identifiziert werden. Ob andere Transkriptionsfaktoren an der Bindung von NF-AT-Faktoren an NF-AT_{tand} beteiligt sind, ist bisher unklar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass NF-AT-Faktoren selbst über eine Autoregulation der Aktivität des NF-ATc Promotors P1 die massive Induktion der Isoform NF-ATc/A in Effektor-T-Zellen kontrollieren (Chuvpilo *et al.*, 2002).

Die Änderung der Zusammensetzung an NF-ATc-Isoformen mit individuellen transkriptionellen Eigenschaften und darüber hinaus die nukleäre Akkumulation hoher Konzentrationen an NF-ATc/A könnten durch das Erreichen eines kritischen Schwellenwertes neben der Aktivierung von Lymphokinen für die Induktion anderer NF-AT-Zielgene verantwortlich sein (Chuvpilo *et al.*, 1999a und 1999b; Fiering *et al.*, 1990). Der relativ späte Beginn der massiven und induzierbaren Synthese von NF-ATc/A könnte ein Hinweis dafür sein, dass solche potentiellen, von NF-ATc/A kontrollierten Zielgene zu späteren Zeitpunkten innerhalb der G1 Phase oder während des Übergangs von der G1 zur S Phase induziert werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um Zielgene, die an der Apoptose beteiligt sind; beispielsweise das Gen für den Fas-Liganden, das Bindungsstellen für NF-AT-Faktoren besitzt und nach Stimulation von Th1- und Th2-Zellen, nicht aber von naiven CD4⁺T-Zellen aktiviert wird (Latinis *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1999; Rengarajan *et al.*, 2000). Die Promotoren solcher Gene scheinen hohe Schwellenwertkonzentrationen an NF-ATc, die durch die massive und induzierbare Synthese von NF-ATc/A bereitgestellt werden, zur Aktivierung zu benötigen.

Neben der genaueren Analyse von Nicht-Lymphokinpromotoren, die unter der Kontrolle von NF-AT-Faktoren stehen, würde die Etablierung von Mäusemutanten, die

eine defekte Synthese der einen oder der anderen NF-ATc-Isoform aufweisen, ein detaillierteres Wissen über die funktionelle Bedeutung der NF-ATc-Isoformen bei der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen im Zuge der T-Zelldifferenzierung und T-Zellaktivierung vermitteln.

4.3 Unterschiedliche Bindungseigenschaften von NF-ATc an die Pu-b_B des IL-4 Promotors tragen zur selektiven Expression des IL-4-Gens in Th2-Zellen bei

Das immunmodulatorische Zytokin IL-4 spielt die zentrale Rolle bei der Th2-Zelldifferenzierung (Mosmann *et al.*, 1986; Le Gros *et al.*, 1990; Swain *et al.*, 1990; Schmitt *et al.*, 1994a und 1994b; Seder und Paul, 1994; O'Garra, 1998) und übt eine wesentliche Funktion bei der Immunabwehr gegen Parasiten (Sher und Coffman, 1992) und der Pathogenese allergischer Entzündungen aus (O'Garra und Murphy, 1993; Powrie und Coffman, 1993; Liblau *et al.*, 1995). Obwohl die Wirkung von IL-4 im Rahmen der Regulation der Immunantwort sehr genau charakterisiert ist, sind die einer selektiven und zellspezifischen Expression des IL-4 Gens zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt.

Die Identifizierung der *cis*-regulatorischen Elemente Pu-b_{A-D} innerhalb des IL-4 Promotors, dessen Induzierbarkeit durch Ionomycin als auch dessen Hemmbarkeit durch Cyclosporin A heben die funktionelle Bedeutung der NF-AT-Faktoren für die Induktion des IL-4 Promotors hervor (Chuvpilo *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 1994 und 1995b). Da NF-AT-Faktoren sowohl in Th1- als auch in Th2-Zellen exprimiert werden und die Gene zahlreicher Th1- und Th2-typischer Zytokine funktionell wichtige NF-AT-Bindungsstellen beherbergen, schien eine wesentliche Beteiligung von NF-AT-Faktoren an der Regulation der T-Zelldifferenzierung lange Zeit unwahrscheinlich. Jüngste Studien mit NF-ATp- und NF-ATc-defizienten Mäusen ließen allerdings einen zum Teil gegensätzlichen Einfluss von NF-ATp und NF-ATc auf die Th1- und Th2-Zelldifferenzierung erkennen.

Demzufolge führte die Inaktivierung des NF-ATp-Gens in mehreren Mäuselinien zu einer Dysregulation der Synthese von IL-4. Während die frühe IL-4 Synthese in Zellen zweier unabhängig voneinander generierten NF-ATp-defizienten Mäuselinien beeinträchtigt war (Hodge *et al.*, 1996b; Schuh *et al.*, 1997), wiesen die gleichen Zellen

eine prolongierte IL-4 Synthese in der späten Phase der T-Zellaktivierung mit konsekutiv gesteigerter Th2-gerichteter Differenzierung im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen auf (Hodge *et al.*, 1996b; Xanthoudakis *et al.*, 1996; Kiani *et al.*, 1997; Viola *et al.*, 1998). Die Inaktivierung des NF-ATc Gens führte zwar in vergleichbarer Weise zu einer Reduktion der Synthese von IL-4 und darüber hinaus anderer Th2-typischer Lymphokine, ging aber gleichzeitig - und im Gegensatz zu NF-ATp-defizienten Mäuselinien - mit einer verminderten Th2-Zelldifferenzierung einher (Yoshida *et al.*, 1998; Ranger *et al.*, 1998b). Ähnliche Ergebnisse bestätigten Versuche mit transgenen Mäusen, die eine dominant negative Version von NF-ATc exprimieren. Infektion dieser Mäuse mit *Nippostrongylus brasiliensis*, einem Erreger, der regelmäßig eine Th2-gerichtete Immunantwort im Wirtsorganismus induziert, führte zu einer deutlichen Verminderung der Synthese von IL-4 und IL-5 im Vergleich zu T-Zellen wildtypischer Mäuse (Twardzik, T., Erb, K., *et al.*, in Bearbeitung). Offenbar spielen NF-ATp und NF-ATc *in vivo* eine zum Teil gegensätzliche Rolle bei der Kontrolle der IL-4 Synthese und Th2-Zelldifferenzierung. Beide Faktoren induzieren im Zuge der frühen T-Zellaktivierung die Aktivität des IL-4 Promotors. In der späten Phase der T-Zellaktivierung scheint jedoch NF-ATp allein die Funktion eines Repressor hinsichtlich der IL-4 Synthese auszuüben und schließlich die Terminierung der IL-4-vermittelten Immunantwort zu vermitteln.

Sowohl die Expression von NF-AT-Faktoren in unterschiedlichen Geweben als auch die Variabilität ihrer transaktivierenden Eigenschaften sind noch nicht endgültig geklärt (Rao *et al.*, 1997; Chuvpilo *et al.*, 1999b). Zusätzlich werden NF-AT-Faktoren, insbesondere NF-ATp und NF-ATc, in verschiedenen Spleissversionen exprimiert (Luo *et al.*, 1996a; Imamura *et al.*, 1998; Chuvpilo *et al.*, 1999a und 1999b). Diese Heterogenität macht sie zu potentiellen Kandidaten, die im Rahmen einer selektiven Gentranskription Einfluß auf die Differenzierung von T-Zellen nehmen könnten. Zwei Studien, die die transkriptionelle Aktivität einer polymeren NF-AT-Bindungsstelle in Th1- und Th2-Zellen transgener Mäuse untersuchten, ließen eine prädominante Aktivität dieser polymeren NF-AT-Bindungsstelle in Th2-Zellen erkennen (Rincon und Flavell, 1997; Wenner *et al.*, 1997). Darüber hinaus war in Zelllinien des Th2-Typs die Bindung von NF-ATp und NF-ATc für die Induktion der transkriptionellen Aktivität des PRE-I Elements innerhalb des IL-4 Promotors notwendig, während in Zelllinien des Th1-Typs keine Bindung von NF-AT-Faktoren beobachtet wurde, und das PRE-I

Element in diesem Fall keine transkriptionelle Aktivität besaß (Davydov, *et al.*, 1995b; Li-Weber *et al.*, 1997).

Ergänzend zu diesen Ergebnissen wiesen wir in DNA-Bindungsstudien die induzierbare Bindung von NF-ATc an die Pu-b_B des IL-4 Promotors in aktivierten Th2-Zellen - nicht aber in Th1-Zellen - nach. Damit belegten wir insbesondere die selektive Bindung von NF-ATc an eine proximale NF-AT-Bindungsstelle des IL-4 Promotors ausschließlich unter der Bedingung der Synthese von IL-4-RNA und der Expression von IL-4. Ähnliche Bindungseigenschaften von NF-AT-Faktoren in Abhängigkeit vom Th-Zellsubtyp wurden in diesem Zusammenhang auch in anderen Labors beobachtet. So berichteten Murphy und Kollegen ebenso von einer selektiven Bindung von NF-AT-Faktoren an die Pu-b_B in Th2-Zellen (Wenner *et al.*, 1997). In vergleichbarer Weise wurde eine Th2-zellspezifische Bindung von NF-AT-Faktoren an die *cis*-regulatorischen Elemente Pu-b_A (P0; Li-Weber *et al.*, 1998) und Pu-b_D (P4; Li-Weber *et al.*, 1997) mit konsekutiver transkriptioneller Aktivierung des IL-4 Promotors beschrieben. Darüber hinaus identifizierten jüngst Rao und Kollegen einen induzierbaren und Cyclosporin A-sensitiven Enhancer jenseits des 3'-Endes des IL-4 Gens und wiesen die *in vivo* Bindung von NF-ATp an diesen Enhancer in stimulierten Th2-, nicht aber in Th1-Zellen nach (Agarwal *et al.*, 2000).

Die unterschiedlichen DNA-Bindungseigenschaften von NF-AT-Faktoren spiegeln sich nicht in deren nukleären Konzentrationen in Th1- und Th2-Zellen wider. Stimulation dieser Zellen führte nämlich in beiden Fällen zu einer vergleichbaren massiven Synthese der induzierbaren NF-ATc-Isoform NF-ATc/A. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass andere zellspezifische Faktoren oder posttranslationale Modifizierungen von Transkriptionsfaktoren zur Th2-zellspezifischen Interaktion von NF-AT mit den *cis*-regulatorischen Elementen Pu-b_A, Pu-b_D und - in erster Linie - Pu-b_B des IL-4 Promotors beitragen. Prototyp für eine gemeinsame Bindung mit NF-AT-Faktoren ist die Familie der AP-1-Faktoren. Die kooperative Bindung von AP-1- und NF-AT-Faktoren an eine zusammengesetzte NF-AT/AP-1-Bindungsstelle innerhalb der Pu-b_B übt einen synergistischen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität des IL-4 Promotors aus (Boise *et al.*, 1993; Chuvpilo *et al.*, 1993; Yaseen *et al.*, 1994). JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 wurden als AP-1-Komponenten identifiziert, die an der gemeinsamen DNA-Bindung mitwirken (Rooney *et al.*, 1995b). Dabei wurde in allen bisherigen Studien eine vorrangige Beteiligung von JunB an der NF-AT/AP-1-Komplexbildung gezeigt (Boise *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 1995b). JunB wird jedoch im

Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Familie der AP-1-Faktoren selektiv in Th2-Zellen während der T-Zelldifferenzierung induziert. Darüber hinaus führt die Überexpression von JunB in transgenen Th1-Zellen zur Synthese der Th2-typischen Lymphokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und induziert die Th2-Zelldifferenzierung (Li *et al.*, 1999). Die Hypothese, dass NF-AT-Faktoren abhängig vom Zusammenspiel mit AP-1-Faktoren die Expression unterschiedlicher Gene sogar in einem einzelnen Zelltyp induzieren können, wurde durch Ergebnisse aus dem Labor von Rao und Kollegen bestätigt. Studien mit einer mutanten Version von NF-ATp, die die Fähigkeit zur Interaktion mit AP-1-Faktoren verlor, allerdings unveränderte Eigenschaften hinsichtlich ihrer DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivierung besaß, bestätigten, dass die Expression von IL-4 und ferner von IL-2, GM-CSF und IL-3 gänzlich abhängig von der Kooperation zwischen NF-AT- und AP-1-Faktoren ist, während NF-AT-Faktoren für die Induktion der Promotoren von IL-13 und TNF α nicht auf die gemeinsame Interaktion mit AP-1-Faktoren angewiesen sind (Macian *et al.*, 2000).

Ein weiteres aussagekräftiges Modell für eine zellspezifische Genregulation ist die Induktion der Gene für IL-3 und GM-CSF. Beide Zytokingene sind eng benachbart im Genom lokalisiert und werden über gemeinsame Signalwege aktiviert. Dennoch zeichnen sich beide Gene durch einen unterschiedlichen Expressionsmodus aus. Während die Expression des IL-3 Gens vorzugsweise in aktivierten T-Zellen stattfindet (Duncliffe *et al.*, 1997), kann das GM-CSF-Gen in unterschiedlichen Zellen, darunter T-Zellen, myeloischen Zellen, Epithelzellen und Fibroblasten, induziert werden (Cockerill *et al.*, 1995 und 1999). Die Enhancer beider Zytokingene besitzen sowohl einfache NF-AT-Motive als auch zusammengesetzte NF-AT/AP-1-Bindungsstellen. Der IL-3 Enhancer beherbergt darüber hinaus, vergleichbar mit dem IL-4 Promotor, eine zusätzliche zusammengesetzte NF-AT/Oct-Bindungsstelle (Duncliffe *et al.*, 1997). In jüngster Zeit konnte der Beweis erbracht werden, dass die T-zellspezifische transkriptionelle Aktivität des IL-3 Enhancers auf einer kooperativen Bindung von NF-AT- und Octamer-Faktoren an eine zusammengesetzte NF-AT/Oct-Bindungsstelle beruht (Bert *et al.*, 2000).

Mit der Entdeckung von GATA-3 und c-Maf wurden zwei Transkriptionsfaktoren, die an einer Th2-zellspezifischen Induktion des IL-4 Gens beteiligt sind, charakterisiert. GATA-3 und c-Maf werden selektiv in Th2-Zellen exprimiert (Ho *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997), sind Zielgene des IL-4-induzierten Transkriptionsfaktor STAT6 (Ho *et al.*, 1996; Zheng und Flavell, 1997; Kurata *et al.*, 1999) und transaktivieren den IL-4

Promotor (Ranganath *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 1996, 1998). Studien mit c-Maf-defizienten und c-Maf-transgenen Mäusen wiesen einen selektiven Einfluß von c-Maf auf die Induktion des IL-4 Gens nach (Ho *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999). Noch eindrucksvoller konnte die Induktion des endogenen IL-4 Promotors durch die Kotransfektion der M12-Lymphomzelllinie mit c-Maf- und NF-ATp-Expressionsvektoren beobachtet werden. NF-ATp und c-Maf binden in diesem Fall eine beide Bindungsmotive umfassende DNA-Sequenz und steigern in synergistischer Weise die Aktivität des IL-4 Promotors (Ho *et al.*, 1996). Darüber hinaus führte die Kotransfektion von c-Maf, NF-ATp und NIP45 ("NF-AT interacting protein") zu einer mehr als 200-fachen Induktion eines IL-4 Promotorkonstruktes in HepG2-Zellen und zu einer vergleichbar gesteigerten Transaktivierung des endogenen IL-4 Promotors in M12-Lymphomzelllinien (Hodge *et al.*, 1996a).

Aufgrund einer kontinuierlichen 12-fachen A+T Nukleotidfolge stellt die Pu-b_B - neben der Box II des IL-4 Promotors - eine hochaffine Bindungsstelle für HMG I(Y)-Proteine, die an doppelsträngige A+T Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als drei Basenpaare binden, dar (Chuvpilo *et al.*, 1993). DNA-Bindungsstudien wiesen eine kompetitive Bindung von NF-AT- und HMG I(Y)-Faktoren an die Pu-b_B nach (Klein-Hessling *et al.*, 1996). In umgekehrter Weise reduziert die Mutation der hochaffinen HMG I(Y)-Bindungsstelle die HMG I(Y)-Bindung und führt zu einer konsekutiven Zunahme der Aktivität des IL-4 Promotors (Klein-Hessling *et al.*, 1996). Da HMG I(Y)-Proteine in verschiedenen T-Zellen und in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert werden, könnten sie zu einer zellspezifischen und selektiven Induktion des IL-4 Promotors beitragen.

Der ubiquitär und konstitutiv exprimierte Faktor NF-Y (Glimcher und Kara, 1992) bindet an die IL-4-Promotor-Y Box (Box I) und beeinflusst die Gesamtaktivität des IL-4 Promotors (Szabo *et al.*, 1993). In diesem Zusammenhang wurde zwischenzeitlich der früher beschriebene P-Element-bindende Komplex NF-P, der selektiv in D10-Th2-Zelllinien an die Pu-b_B des IL-4 Promotors bindet (Szabo *et al.*, 1993), als Komplex aus NF-Y und NF-ATp identifiziert (Li-Weber *et al.*, 1994).

Ein weiteres Beispiel für eine zellspezifische Expression sowie selektive Gentranskription ist der Transkriptionsfaktor C/EBP β , der in IL-4-produzierenden Zellen, nicht aber in Th1-Zelllinien exprimiert wird und an der Induktion des IL-4 Promotors beteiligt ist (Davydov *et al.*, 1995a; Li-Weber *et al.*, 1997). Die retrovirale Überexpression von C/EBP β in EL-4 T-Tumorzellen und primären T-Zellen führt zu

einer gesteigerten IL-4 Expression und zu einer Suppression der Synthese der Th1-typischen Lymphokine IL-2 und IFN- γ (Berberich-Siebelt *et al.*, 2000). Eine kooperative Beteiligung von C/EBP- und NF-AT-Faktoren an der Kontrolle des IL-4-Gens im Kontext der selektiven Induktion von Lymphokingenen sowie der Th2-Zelldifferenzierung wird durch die Beobachtung untermauert, dass in Th1-Zelllinien die Bindung von C/EBP γ allein, hingegen in Zelllinien des Th2-Typs die gemeinsame Bindung von C/EBP β und C/EBP δ (NF-IL6 β) zusammen mit NF-ATp und NF-ATc an das PRE-I Element nachgewiesen werden konnte (Li-Weber *et al.*, 1997).

Die Vielfalt der an der Induktion und Aktivität des IL-4 Promotors beteiligten Transkriptionsfaktoren legt die Vermutung nahe, dass die Th2-zellspezifische Expression des IL-4 Promotors von einem multifaktoriellen System kontrolliert und reguliert wird. Unsere Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass zellspezifische Bindungseigenschaften von NF-AT-Faktoren an die Pu-b $_B$ des IL-4 Promotors einen Mechanismus der selektiven IL-4 Expression in Th2-Zellen darstellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von NF-ATc erfolgt in drei Isoformen mit jeweils individuellen transaktivierenden Eigenschaften. Wir konnten zeigen, dass nur die Expression der kurzen Isoform NF-ATc/A induziert wird, während die der längeren Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C nahezu konstitutiv verläuft. Naive CD4⁺T-Zellen exprimieren ausschließlich die Isoformen NF-ATc/B und NF-ATc/C. Deren nukleäres Auftreten korreliert mit der starken Synthese der IL-2-RNA und der Expression von IL-2 in diesen Zellen. Im Zuge der T-Zelldifferenzierung erlangen Antigen-erfahrene Th1- und Th2-Zellen die Fähigkeit zur massiven und induzierbaren *de novo* Synthese der kurzen Isoform NF-ATc/A. Die massive Induktion von NF-ATc/A mit einer konsekutiven Änderung der Zusammensetzung an nukleären NF-ATc-Isoformen mit individuellen transaktivierenden Eigenschaften ermöglicht offenbar das Erreichen kritischer Schwellenwerte für Transkriptionsfaktoren und die Induktion spezifischer Zielgene. Neben der Synthese von Lymphokinen kontrollieren solche Gene sehr wahrscheinlich den Zellzyklus und die Induktion der Apoptose. Interessanterweise erfolgt die Induktion der NF-ATc/A-Isoform nur in Antigen-erfahrenen Effektor-T-Zellen, nicht jedoch in naiven T-Zellen. Dies wird infolge alternativer Spleiss- und Polyadenylierungsvorgänge durch die Benutzung einer proximalen, gering-affinen poly A-"site", pA1, bedingt, die nur bei hohen Konzentrationen von poly A-Faktoren – wie sie in Effektor-T-Zellen vorliegen – erkannt wird.

Eine wesentliche Beteiligung von NF-AT-Faktoren an der Induzierbarkeit des IL-4 Promotors ist seit langem bekannt; ebenso die zentrale Rolle von IL-4 bei der Th2-Zelldifferenzierung. Neben NF-AT-Faktoren tragen weitere nukleäre Faktoren, darunter AP-1, GATA3, c-Maf und C/EBP, zur Induktion des IL-4 Promotors bei. Aufgrund der Vielfalt der an der Induktion und Aktivität des IL-4 Promotors beteiligten Transkriptionsfaktoren wird die Th2-zellspezifische Expression des IL-4 Gens offenbar von einem multifaktoriellen System kontrolliert und reguliert. In diesem Zusammenhang wiesen unsere Ergebnisse die induzierbare und zellspezifische Bindung von NF-ATc an das *cis*-regulatorische Element Pu-b_B des IL-4 Promotors in Th2-Zellen nach und belegen im besonderen, dass unterschiedliche Bindungseigenschaften von NF-ATc zu einer selektiven Expression des IL-4 Gens in Th2-Zellen beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. (1996). *Nature* 383, 787-739
2. Agarwal, S., Avni, O., Rao, A. (2000). *Immunity* 12, 643-652
3. Alberola-Ila, J., Hogquist, K.A., Swan, K.A., Bevan, M.J., Perlmutter, R.M. (1996). *J. Exp. Med.* 184, 9-18
4. Amasaki, Y., Miyatake, S., Arai, N., Arai, K. (2000). *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 1-9
5. Aramburu, J., Azzoni, L., Rao, A., Perussia, B. (1995). *J. Exp. Med.* 182, 801-810
6. Avots, A., Buttmann, M., Chuvpilo, S., Escher, C., Smola, U., Bannister, A., Rapp, U., Kouzarides, T. und Serfling, E. (1999). *Immunity*. 10, 515-524
7. Bacon, C.M., Petricoin, E.F., Ortaldo, J.R., Rees, R.C., Larner, A.C., Johnston, J.A., O'Shea, J.J. (1995). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92, 7307-7311
8. Beals, C.R., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Crabtree, G.R. (1997a). *Genes&Development*. 11, 824-834
9. Beals, C.R., Sheridan, C.M., Turck, C.W., Gardner, P., Crabtree, G.R. (1997b). *Science* 275, 1930-1934
10. Berberich-Siebelt, F., Klein-Hessling, S., Hepping, N., Santner-Nannan, B., Lindemann, D., Schimpl, A., Berberich, I., Serfling, E. (2000). *Eur.J.Immunol.* 30, 2576-2585
11. Bert, A.G., Burrows, J. Hawwari, A., Vadas, M.A. und Cockerill, P.N. (2000). *J.Immunol.* 165, 5646-5655
12. Boise, L.H., Petryniak, B., Mao, X., June, C.H., Wang, C.Y., Lindsten, T., Bravo, R., Kovary, K., Leiden, J.M., Thomson, C.B. (1993). *Mol.Cell.Biol.* 13, 1911-1919
13. Brabletz, T., Pietrowski, I., Serfling, E. (1991). *Nucleic Acid Res.* 19, 61-67
14. Bram, R.J., Hung, D.T., Martin, P.K., Schreiber, S.L. und Crabtree, G.R. (1993). *Mol.Cell.Biol.* 13, 4760-4769
15. Bretscher, P.A., Wei, G., Menon, J.N., Bielefeldt-Ohmann, H. (1992). *Science* 257, 539-542
16. Bruhn, K.W., Nelms, K., Boulay, J.L., Paul, W.E., Leonardo, M.J. (1993). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90, 9707-9711

17. Calne, R.Y., Rolles, K., White, D.J., Thiru, S., Evans, D.B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.N., Henderson, R.G., Aziz, S., Lewis, P. (1979). *Lancet* 2, 1033-1036
18. Castigli, E., Pahwa, R., Good, R.A., Geha, R.S., Chatila, T.A. (1993). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 4728-4732
19. Cherwinski, H.M., Schuhmacher, J.H., Brown, K.D., Mosmann, T.R. (1987). *J.Exp.Med.* 166, 1229-1244
20. Choi, M.S.K., Brines, R.D., Holman, M.J., Klaus, G.G.B. (1994). *Immunity* 1, 179-187
21. Chow, C.W., Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M., Davis, R.J. (1997). *Science* 278, 1638-1641
22. Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glöckner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T., Serfling, E. (1999b). *J.Immunol.* 162, 7294-7301
23. Chuvpilo, S., Jankevics, E., Tyrsin, D., Akimzhanov, A., Moroz, D., Jha, M.K., Schulze.Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Feoktistova, E., König, T., Avots, A., Schmitt E., Berberich-Siebelt, F., Schimpl, A. und Serfling E. (2002). *Immunity*. In press.
24. Chuvpilo, S., Schomberg, C., Gerwig, R., Heinfling, A., Reeves, R., Grummt, F., Serfling, E. (1993). *Nucleic Acids Res.* 21, 5694-5704
25. Chuvpilo, S., Zimmer, M., Kerstan, A., Glöckner, J., Avots, A., Escher, C., Fischer, C., Inashkina, A., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., Schmitt, E., Serfling, E. (1999a). *Immunity*, 10, 161-269
26. Cockerill, P.N., Bert, A.G., Jenkins, F., Ryan, G.R., Shannon, M.F., Vadas, M.A. (1995). *Mol.Cell.Biol.* 15, 2071-2079
27. Cockerill, P.N., Bert, A.G., Roberts, D., Vadas, M.A. (1999). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 15097-15102
28. Cockerill, P.N., Shannon, M.F., Bert, A.G., Ryan, G.R., Vadas, M.A. (1993). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 2466-2470
29. Colgan, D.F. und Manley, J.L. (1997). *Genes Dev.* 11, 2755-2766
30. Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T., Bottomly, K. (1995). *J.Exp.Med.* 182, 1591-1596
31. Crabtree, G.R. (1999). *Cell* 96, 611-614
32. Davydov, I.V., Bohmann, D., Krammer, P.H., Li-Weber, M. (1995b). *Gene* 161, 271-275

33. Davydov, I.V., Krammer, P.H., Li-Weber, M. (1995a). *J.Immunol.* 155, 5273-5279
34. De la Pompa, J.L., Timmerman, L.A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A.J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., et al. (1998). *Nature* 392, 182-186
35. Del Prete, G.F., De Carli, M., Mastromauro, C. (1991). *J.Clin.Invest.* 88, 346-350
36. Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S, Goodnow, C.C., Healy, J.I. (1997). *Nature* 386, 855-858
37. Dong, C., Yang, D.D., Wysk, M., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1998). *Science* 282, 2092-2095
38. Driever, W. (1992). In *Transcriptional Regulation*, S.L. McKnight and K.R. Yamamoto, eds. 1221-1250
39. Duncliffe, K.N., Bert, A.G., Vadas, M.A., Cockerill, P.N. (1997). *Immunity* 6, 175-185
40. Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K.L., Milcarek, C. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25, 2547-2561
41. Ehlers, S. und Smith, K.A. (1991). *J.Exp.Med.*, 173, 25-36
42. Emmel, E.A., Verweij, C.L., Durand, D.B., Higgins, K.M., Lacy, E., Crabtree, G.R. (1989). *Science* 246, 1617-1620
43. Erb, K.J., Holloway, J.W., Sobeck, A., Moll, H., Le Gros, G. (1998). *J.Exp.Med.* 187, 561-569
44. Fargeas, C., Wu, C.Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T., Delespesse, G. (1992). *Eur.J.Immunol.* 22, 2173-2176
45. Feske, S., Draeger, R., Peter, H.H., Eichmann, K., Rao, A. (2000). *J Immunol.* 165, 297-305
46. Feske, S., Müller, J.M., Graf, D., Kroczeck, R.A., Dräger, R., Niemeyer, C., Baeuerle, P.A., Peter, H.H., Schlesier, M. (1996). *Eur.J.Immunol.* 26, 2119-2126
47. Fiering, S., Northrop, J.P., Nolan, G.P., Mattila, P.S. Crabtree, G.R., Herzenberg, L.A. (1990). *Genes Dev.* 4, 1823-1834
48. Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J., Crabtree, G.R. (1991). *Nature* 352, 803-807
49. Glimcher, L.H. und Kara, C.J. (1992). *Annu.Rev.Immunol.* 10, 13-49

50. Goldfeld, A.E., McCaffrey, P.G., Strominger, J.L., Rao, A. (1993). *J.Exp.Med.* 178, 1365-1379
51. Gonzalez, G.a., Menzel, P., Leonard, J., Fischer, W.H., Montminy, M. (1991). *Mol.Cell.Biol.* 11, 1306-1312
52. Graef, I.A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A. und Crabtree, G.R. (2001). *Cell.* 105, 863-875
53. Granelli-Piperno, A., Andrus, L., Steinman, R.M. (1986). *J.Exp.Med.* 163, 922-937
54. Guler, M.L., Gorham, J.D., Hsieh, C.-S., Mackey, A.J., Steen, R.G., Dietrich, W.F., Murphy, K.M. (1996). *Science* 271, 984-987
55. Heinzl, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., Gately, M.K. (1993). *J.Exp.Med.* 177, 1505-1509
56. Henkel, G., Weiss, D.L., McCoy, R., Delouchery, T., Tara, D., Brown, M.A. (1992). *J.Immunol.* 149, 3239-3246
57. Hirose, Y. und Manley, J.L. (1998). *Nature* 395, 93-96
58. Ho, A.M., Jain, J., Rao, A., Hogan, P.G. (1994a). *J.Biol.Chem.* 269, 28181-28186
59. Ho, I.-C., Hodge, M.R., Rooney, J.W., Glimcher, L.H. (1996). *Cell* 85, 973-983
60. Ho, I.C., Lo, D., Glimcher, L.H. (1998). *J.Exp.Med.* 188, 1859-1866
61. Ho, S.N., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Li, X., Francke, U., Crabtree, G.R. (1995). *J. Biol. Chem.*, 270, 19898-19907
62. Hodge, M.R., Chun, H.J., Rengarajan, J., Alt, A., Lieberson, R., Glimcher, L.H. (1996a). *Science* 274, 1903-1905
63. Hodge, M.R., Ranger, A.M., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1996b). *Immunity* 4, 397-405
64. Hoey, T., Sun, Y.-L., Williamson, K., Xu, X. (1995). *Immunity* 2, 461-472
65. Hotz-Heppelmann, C.J., Algeciras, A., Badley, A.D. und Paya, C.V. (1998). *J. Biol. Chem.* 273, 4416-4423
66. Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Bresseur, M., McKnight, S.L. (1994). *Science* 265, 1701-1706
67. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M. (1993). *Science* 260, 547-549
68. Imamura, R., Masuda, E.S., Naito, Y., Imai, S., Fujino, T., Takano, T., Arai, K., Arai, N. (1998). *J. Immunol.* 161, 3455-3463

69. Jacobson, N.G., Szabo, S.J., Weber-Nordt, R.M., Zhong, Z., Schreiber, R.D., Darnell, J.E., Murphy, K.M. (1995). *J.Exp.Med.* 181, 1755-1762
70. Jain, J., Burgeon, E., Badalian, T.M., Hogan, P.G., Rao, A. (1995). *J.Biol.Chem.* 270, 4138-4145
71. Jain, J., McCaffrey, P.G., Valge-Arxher, V.E., Rao, A. (1992). *Nature* 356, 801-804
72. Jain, J., Miner, Z., Rao, A. (1993). *J.Immunol.* 151, 837-848
73. Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Bevan, M.J. (1995). *Annu.Rev.Immunol.* 13, 93-126
74. Jordan, M., Schallhorn, A., und Wurm, F.M. (1996). Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601
75. June, C.H., Ledbetter, J.A., Lisle, P.S., Thompson, C.B. (1990). *Immunol.Today* 11, 211-216
76. Kamogawa, Y., Minasi, L.E., Carding, S.R., Bottomly, K., Flavell, R.A. (1993). *Cell.* 75, 985-995
77. Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J. (1996). *Immunity* 4, 313-319
78. Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J. (1996). *Nature* 382, 174-177
79. Kel, A., Kel-Margoulis, O., Bebenko, V., Kolchanov, N., Wingender, E. (1999). *J.Mol.Biol.* 288, 353-376
80. Kiani, A., Roa, A., Aramburu, J. (2000). *Immunity* 12, 359-372
81. Kiani, A., Viola, J.P.B., Lichtman, A.H., Rao, A. (1997). *Immunity* 7, 849-860
82. Kim, J.I., Ho, I.C., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1999). *Immunity* 10, 745-751
83. Kincaid, R.L., Giri, P.R., Higuchi, S., Tamura, J., Dixon, S.C., Marietta, C.A., Amorese, D.A., Martin, B.M. (1990). *J.Biol.Chem.* 265, 11312-11319
84. Klee, C.B., Draetta, G.F., Hubbard, M.J. (1988). In *Adv Enzymol Relat Area Mol Biol.* 61, 149-200
85. Klein-Hessling, S., Schneider, G., Heinfing, A., Chuvpilo, S., Serfling, E. (1996). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 93, 15311-15316
86. Klemm, J.D., Beals, C.R., Crabtree, G.R. (1997). *Curr.Biol.* 7, 638-644
87. Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989). *J.Exp.Med.* 170, 827-845

88. Krönke, M., Leonard, W.J., Depper, J.M., Greene, W.C. (1985). *J.Exp.Med.* 161, 1593-1598
89. Kubo, M., Kincaid, R.L., Ransom, J.T. (1994). *J.Biol.Chem.* 269, 19441-19446
90. Kubo, M., Ransom, J., Webb, D., Hashimoto, Y., Tada, T., Nakayama, T. (1997). *EMBO J.* 16, 4007-4020
91. Kuchroo, V.K., Prbhu Das, M., Brown, J.A., Ranger, A-M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., Glimcher, L.H. (1995). *Cell* 80, 707-718
92. Kuo, C.T. und Leiden, J.M. (1999). *Annu.Rev.Immunol.* 17, 149-187
93. Kurata, H., Lee, H., O'Garra, A. und Arai, N. (1999). *Immunity* 11, 677-688
94. Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S., Lowrey, R.P. (1992). *J.Exp.Med.* 176, 1215-1220
95. Latinis, K.M., Norian, L.A., Eliason, S.L., Koretzky, G.A. (1997). *J.Biol.Chem.* 272, 31427-31434
96. Le Gros, G., Ben-Sasson, S.Z., Seder, R., Finkelman, F.D., Paul, W.E. (1990). *J.Exp.Med.* 172, 921-929
97. Lenschow, D.J., Ho, S.C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K.C., Bluestone, J.A. (1995). *J.Exp.Med.* 173, 721-730
98. Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., Flavell, R., Bottomly, K. (1993). *J.Immunol.* 151, 6742-6750
99. Li, B., Tournier, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1999). *EMBO J.* 18, 420-432
100. Liblau, R., Singer, S., McDevitt, H. (1995). *Immunol.Today* 16, 34-38
101. Linsley, P.S. und Ledbetter, J.A. (1993). *Annu.Rev.Immunol.* 11, 191-212
102. Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. (1991). *Cell* 66, 807-815
103. Liu, Y., Jones, B., Brady, W., Janeway, C.A., Linsley, P.S. (1992). *Eur.J.Immunol.* 22, 2855-2859
104. Li-Weber, M., Davydov, I.V., Krafft, H., Krammer, P.H. (1994). *J.Immunol.* 153, 4122-4132
105. Li-Weber, M., Eder, A., Krafft-Szepa, H., Krammer, P.H. (1992). *J.Immunol.* 148, 1913-1918
106. Li-Weber, M., Krafft, H., Krammer, P.H. (1993). *J.Immunol.* 151, 1371-1379
107. Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C., Davydov, I.V., Laur, O., Klevenz, S., Krammer, P.H. (1998). *J.Immunol.* 161, 1380-1389

108. Li-Weber, M., Salgame, P., Hu, C., Davydov, I.V., Krammer, P.H. (1997). *J.Immunol.* 158, 1194-1200
109. Locksley, R.M. und Scott, P. (1991). *Immunol.Today* 12, 58-61
110. Loh, C., Carew, L.A., Kim, J., Hogan, P.G., Rao, A. (1996a). *Mol. Cell. Biol.* 16, 3945-3954
111. Loh, C., Shaw, K.T.-Y., Carew, J., Viola, J.P.B., Luo, C., Perrino, B.A., Rao, A. (1996b). *J.Biol.Chem.* 271, 10884-10891
112. Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H.W., Duncan, G.S., Bischof, S., Röllinghoff, M., Mak, T.W. (1997). *Immunity* 6, 681-689
113. Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A.S., Rao, A. (1999). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96, 7214-7219
114. Luo, C., Burgeon, E., Carew, J.A., McCaffrey, P.G., Baldalian, T.M., Lane, W.S., Hogan, P.G., Rao, A. (1996a). *Mol.Cell.Biol.* 16, 3955-3966
115. Luo, C., Burgeon, E., Rao, A. (1996d). *J.Exp.Med.* 184, 141-147
116. Luo, C., Shaw, K.T.-Y., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B.A., Hogan, P.G., Rao, A. (1996c). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8907-8912
117. Luo, Z., Tzivion, G., Belshaw, P.J., Vavas, D., Marshall, M., Avruch, J. (1996b). *Nature* 383, 181-185
118. Lyakh, L., Ghosh, P., Rice, N.R. (1997). *Mol.Cell.Biol.* 17, 2475-2484
119. Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.-S., Culpepper, J., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M., O'Garra, A. (1995). *J.Immunol.* 154, 5071-5079
120. Macian, F., Garcia-Rodriguez, C., Rao, A. (2000). *EMBO J.* 19, 4783-4795
121. Mages, H.W., Baag, R., Steiner, B., Kroczeck, R.A.. (1998). *Mol.Cell.Biol.* 18, 7157-7165
122. Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., Gately, M.K. (1996). *Immunity* 4, 471-481
123. Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S. (1993). *J.Exp.Med.* 177, 1199-1204
124. Martincic, K., Campbell, R., Edwalds-Gilbert, G., Souan, L., Lotze, M.T., Milcarek, C. (1998). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 95, 11095-11100
125. Masuda, E.S., Liu, J., Imamura, R., Imai, S.I., Arai, K.I., Arai, N. (1997). *Mol.Cell.Biol.* 17, 2066-2075

126. Masuda, E.S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K.-I., Arai, N. (1995). *Mol.Cell.Biol.* 15, 2697-2706
127. Masuda, E.S., Tokumitsu, H., Tsuboi, A., Shlomai, J., Hung, P., Arai, K., Arai, N. (1993). *Mol.Cell.Biol.* 13, 7399-7407
128. Masuda, I., Masuda, E.S., Tsuboi, A., Behnam, S., Arai, N., Arai, K. (1994). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 199, 439-446
129. Matsuda, I., Masuda, E.S., Tsuboi, A., Behnam, S., Arai, N., Arai, K. (1994). *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 199, 439-446
130. Mattila, P.S., Ullman, K.S., Fiering, S., Emmel, E.A., McCutcheon, M., Crabtree, G.R., Herzenberg, L.A. (1990). *EMBO J.* 9, 4425-4433
131. Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rde, E., Germann, T. (1993). *Eur.J.Immunol.* 23, 2202-2208
132. McCaffrey, P.G., Jain, J., Jamieson, C., Sen, R. und Rao, A. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 1864-1871
133. McCaffrey, P.G., Luo, C., Kerppola, T.K., Jain, J., Badalian, T.M., Ho, A.M., Burgeon, E., Lane, W.S., Lambert, J.N., Curran, T., Verdine, G.L., Rao, A., Hogan, P.G. (1993). *Science* 262, 750-754
134. Miyakawa, H., Woo, S.K., Dahl, S.C., Handler, J.S., Kwon, H.M. (1999). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96, 2538-2547
135. Mosmann, R.T. und Sad, S. (1996). *Immunol. Today* 17, 138-146
136. Mosmann, T.R. und Coffman, R.L. (1989). *Annu.Rev. Immunol.* 7, 145-173
137. Mosmann, T.R., Cherwinski, H.M., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L. (1986). *J.Immunol.* 136, 2348-2357
138. Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Street, N.F., Budd, R. O`Gara, A., Fong, T.A.T., Bond, M.W. , Moore, K.W.M., Sher, A., Fiorentino, D.F. (1991). *Immunol. Rev.* 123, 23-28
139. Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Schwartz, R.H. (1989). *Annu.Rev.Immunol.* 7, 445-480
140. Nagelkerken, L., Gollob, K.J., Tielemans, M., Coffman, R.L. (1993). *Eur.J.Immunol.* 23, 2306-2310
141. Neal, J.W. und Clipstone, N.A. (2001). *J.Biol.Chem.* 276, 3666-3673
142. Neumeister Kersh, E., Shwq, A.S., Allen, P.M. (1998). *Science* 281, 572-575
143. Northop, J.P., Ho, S.N., Chen, L., Thomas, D.J., Timmerman, L.A., Nolan, G.P., Admon, A., Crabtree, G.R. (1994). *Nature* 369, 497-502

144. Northrop, J.P., Ullman, K.S., Crabtree, G.R. (1993). *J.Biol.Chem.* 268, 2917-2923
145. O`Keefe, S.J., Tamura, J., Kincaid, R.L., Tocci, M.J., O`Neill, E.A. (1992). *Nature* 357, 692-694
146. O`Garra, A. (1998). *Immunity* 8, 275-283
147. O`Garra, A. und Murphy, K.M. (1993). *Curr.Opin.Immunol.* 5, 880-886
148. Okamura, H., Aramburu, J., Garcia-Rodriguez, C., Viola, J.P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P.G., Rao, A. (2000). *Mol.Cell* 6, 539-550
149. Oukka, M. Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J., Glimcher, L.H. (1998). *Immunity* 9, 295-304
150. Ouyang, W. Jacobson, N.G., Bhattacharya, D, Gorham, J.D., Fenoglio, D., Sha, W.C. Murphy, T.L., Murphy, K.M. (1999). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96, 3888-3893
151. Ouyang, W., Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., Murphy, K. (2000). *Immunity* 12, 27-37
152. Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K. Bhattacharya, D., Muphy, T.L., Sha, W.C., Murphy, K.M. (1998). *Immunity* 9, 745-755
153. Park, J., Takeuchi, A., Sharma, S. (1996). *J.Biol.Chem.* 271. 20914-20921
154. Paul, W.E. (1991). *Blood* 77, 1859-1870
155. Paul, W.E. und Seder, R.A. (1994). *Cell* 76, 241-251
156. Peng, S.L., Gerth, A.J., Ranger, A.M. und Glimcher L.H. (2001). *Immunity.* 14, 13-20
157. Penix, L., Weaver, W.M., Pang, Y., Young, H.A., Wilson, C.B. (1993). *J.Exp.Med.* 178, 1483-1496
158. Peterson, B.R., Sun, L.J., Verdine, G.L. (1996). *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 13671-13676
159. Petrak, D., Memon, S.A., Birrer, M.J., Ashwell, J.D., Zacharchuk, C.M. (1994). *J.Immunol.* 153, 2046-2051
160. Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S., Keterlaar, H., Sette, A., Bottomly K. (1995). *J.Exp.Med.* 181, 1569-1574
161. Pfeuffer, I., Klein-Heßling, S., Heinfling, A., Chuvpilo, S., Escher, C., Brabletz, T., Hentsch, B., Schwarzenbach, H., Matthias, P., Serfling, E. (1994). *J.Immunol.* 153, 5572-5585

162. Porter, C.M., Havens, M.A., Clipstone, N.A. (2000). *J.Biol.Chem.* 275, 3543-3551
163. Powrie, F. und Coffman, R.L. (1993). *Immunol.Today* 14, 270-274
164. Randak, C., Brabletz, T., Hergenröther, M., Sobotta, I., Serfling, E. (1990). *EMBO. J.*, 9, 2529-2536
165. Ranganath, S., Ouyang, W., Bhattacharya, D., Sha, W.C., Grupe, A., Peltz, G., Murphy, K.M. (1998). *J.Immunol.* 161, 3822-3826
166. Ranger, A.M., Gerstenfeld, L.C., Wang, J., Kon, T., Bae, J., Gravalles, E.M., Glimcher, M.J., Glimcher, L.H. (2000). *J.Exp.Med.* 191, 9-22
167. Ranger, A.M., Grusby, M.J., Hodge, M.R., Gravalles, E.M., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H.S., Glimcher, L.H. (1998a). *Nature* 392, 186-190
168. Ranger, A.M., Hodge, M.R., Gravalles, E.M., Oukka, M., Davidson, L., Alt, F.W., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M., Glimcher, L.H. (1998b). *Immunity* 8, 125-134
169. Ranger, A.M., Oukka, M., Rengarajan, J., Glimcher, L.H. (1998c). *Immunity* 9, 627-635
170. Rao, A., Luo, C., Hogan, P.G. (1997). *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747
171. Rengarajan, J., Mittelstadt, P.R., Mages, H.W., Gerth, A.J., Kroczeck, R.A., Ashwell, J.D., Glimcher, L.H. (2000). *Immunity* 12, 293-300
172. Rincón, M. und Flavell, R.A. (1997). *Mol.Cell.Biol.* 17, 1522-1534
173. Rincón.M. und Flavell, R.A. (1994). *EMBO J.* 13, 4370-4381
174. Rocken, M., Saurat, J.H., Hauser, C. (1992). *J. Immunol.* 148, 1031-1036
175. Romagnani, S. (1991). *Immunol.Today* 12, 256-257
176. Romagnani, S. (1994). *Annu.Rev.Immunol.* 12, 227-257
177. Rooney, J.W., Hodge, M.R., McCaffrey, P.G., Rao, A., und Glimcher, L.H. (1994). *EMBO J.* 13, 625-633
178. Rooney, J.W., Hoey, T., Glimcher, L.H. (1995b). *Immunity* 2, 473-483
179. Rooney, J.W., Sun, Y.-L., Glimcher, L.H., Hoey, T. (1995a). *Mol.Cell.Biol.* 15, 6299-6310
180. Rothenberg, E.V. und Ward. S.B. (1996). *Annu.Rev. Immunol.* 15, 707-747
181. Ruegemer, J.J., Ho, S.N., Augustine, J.A., Schlager, J.W., Bell, M.P., McKean, D.J., Abraham, R.T. (1990). *J.Immunol.* 144, 1767-1776

182. Ruff, V.A. und Leach, K.L. (1995). *J.Biol.Chem.* 270, 22602-22607
183. Ruff, V.A., Leach, K.L. (1995). *Annu.Rev.Biochem.* 270, 22602-22607
184. Santini, M.P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L. und Dotto, G.P. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9575-9580
185. Schindler, C., Kashleva, H., Pernis, A., Pine, R., Rothman, P. (1994). *EMBO J.* 13, 1350-1356
186. Schmitt, E., Hoehn, P., Germann, T., Rüde, E. (1994). *Eur.J.Immunol.* 24, 343-347
187. Schmitt, E., Hoehn, P., Huels, C., Goedert, S., Palm, N., Rüde, E., Germann, T. (1994b). *Eur.J.Immunol.* 24, 793-798
188. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M. und Schaffner, W. (1988). *EMBO J.* 7, 4221-4229
189. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1989). *Nucleic Acids Res.* 17, 6419-6420
190. Schreiber, S.L. (1991). *Science* 251, 283-287
191. Schuh, K., Kneitz, B., Heyer, J., Siebelt, F., Fischer, C., Jankevics, E., Rüde, E., Schmitt, E., Schimpl, A., Serfling, E. (1997). *Immunol. Lett.* 57, 171-175
192. Schuh, K., Kneitz, B., Heyer, J., Bommhardt, U., Jankevics, E., Siebelt, F., Pfeuffer, K., Müller-Hermelink, H.K., Schimpl, A., Serfling, E. (1998). *Eur.J.Immunol.* 28, 2456-2466
193. Schuh, K., Twardzik, T., Kneitz, B., Heyer, J., Schimpl, A., Serfling, E. (1998). *J.Exp. Med.* 188, 1369-1373
194. Schwartz, R.H. (1992). *Cell* 71, 1065-1068
195. Seder, R.A. und Paul, W.E. (1994). *Annu.Rev.Immunol.* 12, 635-673
196. Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., Paul, W.E. (1993). *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90, 10188-10192
197. Serfling, E., Avots, A., Neumann, M. (1995). *Biochem. Biophys. Acta* 1263, 181-200
198. Serfling, E., Barthelmäs, R., Pfeuffer, I., Schenk, B., Zarius, S., Swoboda, R., Mercurio, F., Karin, M. (1989). *EMBO J.* 8, 465-473
199. Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Chuvpilo, S., Jankevics, E., Klein-Hessling, S., Twardzik, T., Avots, A. (2000). *Biochem. Biophys. Acta* 1498, 1-18
200. Shaw, J.P., Utz, P.J., Durand, D.B., Toole, J.J., Emmel, E.A., Crabtree, G.R. (1988). *Science* 241, 202-205

201. Shaw, K.T., Ho, A.M., Raghavav, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Sharma, S., Rao, A., Hogan, P.G. (1995). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 11205-11209
202. Sher, A. und Coffman, R.L. (1992). *Annu.Re.Immunol.* 10, 385-409
203. Sherman, M.A., Powell, D.R., Weiss, D.L., Brown, M.A. (1999). *J.Immunol.* 162, 2820-2828
204. Shibasaki, F., Price, E.R., Milan, D., McKeon, F. (1996). *Nature*, 382, 370-373
205. Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp, R.A., Chu, C., Quelle, F.W., Nosaka, T., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G., Paul, W.E., Ihle, J.N. (1996). *Nature* 380, 630-633
206. Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., Young, H.A. (1997). *J.Biol.Chem.* 272, 30412-30420
207. Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., Chizzonite, R. et al. (1990). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 87, 6808-6812
208. Swain, S.L., Huston, G., Tonkonogy, S., Weinberg, A. (1991). *J.Immunol.* 147, 2991-3000
209. Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G. (1990). *J.Immunol.* 145, 3796-3806
210. Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E., Subramanyam, J.M. Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., Schaub, R.G. (1993). *J.Exp.Med.* 177, 1757-1802
211. Szabo, S., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.M. (1997). *J.Exp.Med.* 185, 817-824
212. Szabo, S., Jacobson, N.G., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.M. (1995). *Immunity* 2, 665-675
213. Szabo, S.J., Gold, J.S., Murphy, T.L., Murphy, K.M. (1993). *Mol.Cell.Biol.* 13, 4793-4805
214. Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., Glimcher, L.H. (2000). *Cell* 100, 655-669
215. Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T., Akira, S. (1996). *Nature* 380, 627-630
216. Taki, S., Sato, T., Ogasawara, K. Fukuda, T., Sato, M., Hida, S., Suzuki, G., Mitsuyama, M., Shin, E.H., Kojima, S., Taniguchi, T., Asano, Y. (1997). *Immunity* 6, 673-679
217. Tara, D., Weiss, D.L. und Brown, M.A. (1995). *J.Immunol.* 154, 4592-4602

218. Thierfelder, W.E., van Deursen, J.M., Yamamoto, K., Tripp, R.A., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Sangster, M.Y., Vignali, D.A., Doherty, P.C., Grosveld, G.C., Ihle, J.N. (1996). *Natur* 382, 171-174
219. Thompson, C.B. (1995). *Cell* 81,979-982
220. Thompson, C.B., Wang, C.Y., Ho, I.C., Bohjanen, P.R., Petryniak, B., June, C.H., Miesfeldt, S., Zhang, L., Nabel, G.J., Karpinski, B., Leiden, J.M. (1992). *Mol.Cell.Biol.* 12, 1043-1053
221. Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P. Crabtree, G.R. (1996). *Nature* 383, 837-840
222. Todd, M.D., Grusby, M.J., Lederer, J.A, Lacy, E., Lichtman, A.H., Glimcher, L.H. (1993). *J.Exp.Med.* 177, 1663-1674
223. Triezenberg, S.J. (1995). *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5, 190-196
224. Trinchieri, G. (1995). *Annu.Rev.Immunol.* 13, 251-276
225. Trinchieri, G., Wysocka, M., Dàndrea, A. (1992). *Prog.Growth Factor Res.* 4, 355-368
226. Tripp, C.S., Wolf, S.F., Unanue, E.R. (1993). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90, 3725-3729
227. Tsai, E.Y., Jain, J., Pesavento, P.A., Rao, A., Goldfeld, A.E. (1996). *Mol.Cell.Biol.* 16, 459-467
228. Tsitsikov, E.N., Ramesh, N., Gehe, R.S. (1994). *Mol.Immunol.* 31, 895-900
229. Tsytsykova, A.V., Tsitsikov, E.N., Geha, R.S. (1996). *J.Biol.Chem.* 271, 3763-3770
230. Verweij, C.L., Guidos, C., Crabtree, G.R. (1990). *J.Biol.Chem.* 265, 15788-15795
231. Viola, J.P., Kiani, A., Bozza, P.T., Rao, A. (1998). *Blood* 91, 2223-2230
232. Wenner, C.A., Szabo, S.J., Murphy, K.M. (1997). *J.Immunol.* 158, 765-773
233. Wesselborg, S., Fruman, D.A., Sagoo, J.K., Bierer, B.E., Burakoff, S.J. (1996). *J.Biol.Chem.* 271, 1274-1277
234. Wolfe, S.A., Zhou, P., Dötsch, V., Chen, L., You, A., Ho, S.N., Crabtree, G.R., Wagner, G., Verdine, G.L. (1997) *Nature* 385, 172-176
235. Xanthoudakis, S., Viola, J.P.B., Shaw, K.T.Y., Luo, C., Wallace, J.D., Bozza, P.T., Curran, T., Rao, A. (1996). *Science* 272, 892-895
236. Xiao, S., Matsui, K., Fine, A., Zhu, B., Marshak-Rothstein, A., Widom, R.L., Ju, S.T. (1999). *Eur.J.Immunol.* 29, 3456-3465

-
237. Yaseen, N.R., Maizel, A.L., Wang, F., und Sharma, S. (1993). *J.Biol.Chem.* 268, 14285-14293
238. Yaseen, N.R., Park, J., Kerppola, T., Curran, T., Sharma, S. (1994). *Mol.Cell.Biol.* 14, 6886-6895
239. Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L.E.M., Wakeham, A.C., Bouchar, D., Kong, Y-A., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., et al. (1998). *Immunity* 8, 115-124
240. Yoshimoto, T. und Paul, W.E. (1994). *J.Exp.Med.* 179, 1285-1295
241. Zhang, D., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., Ray A. (1997). *J.Biol.Chem.* 272, 21597-21603
242. Zheng, W.-P. und Flavell, R.A. (1997). *Cell* 89, 587-59
243. Zhou, B., Cron, R.Q., Wu, B., Genin, A., Wang, Z., Liu, S., Robson, P. und Baldwin, H.S. (2002). *J. Biol. Chem.* 277, 10704-10711
244. Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J.C., Yano, T., Dotsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., McKeon, F. (1998). *Cell* 93, 851-858

DANKSAGUNG

Ganz besonders herzlich möchte ich Herrn Professor Dr. Edgar Serfling danken. Die Zeit, die ich zur Anfertigung meiner Arbeit in seinem Labor verbringen durfte, waren wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich. Neben der Überlassung des Themas danke ich Ihm speziell für seine stets freundliche Unterstützung und sein persönliches Engagement am Fortkommen meiner Arbeit. Immer war er daran interessiert, mir eine breite Ausbildung und ein fundiertes Verständnis der Molekularbiologie zu vermitteln. Auch nach dem Abschluß meiner Arbeiten in seinem Labor hatte er stets ein offenes Ohr für mich.

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mir lehrreiche Gesprächspartner waren und mit ihrer gegenseitigen Hilfsbereitschaft das überaus angenehme Klima in diesem Labor prägten. Besonders hervorheben möchte ich Herrn Dr. Sergej Chuvpilo, Frau Dr. Fredericke-Siebelt, Herrn Dr. Stefan Klein-Hessling, Herrn Dr. Ralf Marienfeld und Herrn PD Dr. Manfred Neumann.

Ein besonderer Dank geht an Frau Ilona Petrowski, die in der Zellkultur wertvolle Arbeit geleistet hat sowie an Frau Alexandra Hobel für unermüdliche Zellpräparationen.

Schließlich danke ich Herrn PD Dr. Edgar Schmitt für die stets herzliche Zusammenarbeit und die überaus großzügige Bereitstellung und Mitbenutzung seiner Laborausstattung und Versuchsmodelle. Seine Expertise auf dem Gebiet der Zellimmunologie waren eine zusätzliche Bereicherung für mich.

LEBENS LAUF

Christian Fischer

geb. am 23.09.1972 in Haßfurt

09/1979 - 07/1983	Grundschule, Knetzgau
09/1983 - 07/1992	Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg
07/1992	Abitur
08/1992 - 10/1993	Zivildienst, Rettungssanitäter BRK Würzburg
10/1993 - 11/2000	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/1995	Ärztliche Vorprüfung
08/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/1999 - 07/2000	Praktisches Jahr Chirurgie, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Cornell University, New York, USA Neurologie, Neurologische Klinik der Universität Würzburg Innere Medizin, Medizinische Klinik der Universität Würzburg
11/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 4/2001	Arzt im Praktikum Charité, Campus Virchow Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Prof. Dr. B. Wiedenmann

