

Aus dem Institut für Immunologie
des Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. F. Nolte

**Regulation der Genexpression
des Ratten T-Zell-Differenzierungsmarkers RT6**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jing Fang

aus Hubei, V. R. China

Hamburg, 07. 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am: *05. Dezember 2000*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: *Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß*

Referent: *Priv. Doz. Dr. Friedrich Haag*

Korreferent: *Prof. Dr. Friedrich Nolte*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
1.1. Immunregulation und T-Lymphozyten.....	4
1.1.1. Eine zentrale Rolle bei der T-Zell Entwicklung spielt die positive Selektion.....	4
1.1.2. Die regulatorische Rolle der T-Zellen bei der Immunantwort	5
1.1.3. Autoimmunität.....	5
1.2. RT6-Defekte in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen	6
1.2.1. DP-BB Ratte	6
1.2.2. Die peripheren T-Zellen der DP-BB Ratte weisen einen unreifen Phänotyp auf	6
1.2.3. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I (TI-DM).....	7
1.3. RT6 bezeichnet ein T-zell-spezifisches Oberflächen-Alloantigen-System	8
1.4. RT6 ist ein T-Zell-Oberflächen-Enzyme des Nukleotidstoffwechsels.....	8
1.4.1. RT6 gehört zu der bei Eukaryonten neu entdeckten Genfamilie der ADP-Ribosyltransferasen	9
1.4.2. ADP-Ribosylierungen führen zur Hemmung von Effektorfunktionen der CTLs	10
1.5. Diabetes, T-Lymphopenie und RT6-Expressionsdefekt der BB Ratte	10
1.6. Aufklärung der RT6-Genstruktur	11
1.7. Zielsetzung	13
2. MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1. Herstellung der pGL3 Reporter-gen-Konstrukte.....	15
2.1.1. PCR-Amplifikation ausgewählter RT6 Promotor-Elemente.....	15
2.1.2. Klonierung der RT6 Promotorfragmente in den pCR 2.1 Vektor	16
2.1.3. Transformation der Reporter-gen-Konstrukte in Escherichia coli (E. coli)	17
2.1.4. PCR-Screening Verfahren - Colony-PCR	17
2.1.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	18
2.1.6. Die DNA-Sequenzierung nach der "dideoxy-chain termination" Methode	18
2.1.7. Sequenzspezifische Spaltung der DNA mit Restriktions-Endonukleasen	20
2.1.8. Dephosphorylierung des 5' Endes eines Vektors.....	20
2.1.9. Elektrophorese des Restriktionsverdau	21
2.1.10. DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel	21
2.1.11. Umklonierung von DNA-Fragmenten in den pGL3-Vektor	21
2.1.12. Maxi-Plasmid-Präparation.....	22
2.1.13. Photometrische DNA-Mengenbestimmung	23
2.1.14. Konstruktion der pGL3-Enhancer-Reporter-gen- Vektor	23
2.2. Reporter-gen-Assays.....	23
2.2.1. Zellkultivierung	23
2.2.2. Zellverarbeitung für Transfektion	24
2.2.3. Transfektion per Elektroporation	24
2.2.4. Lumineszenz-Luziferase Assay	25
2.3. Gel-Retentionanalyse, Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	25
2.3.1. Präparation von Proteinextrakten.....	26
2.3.2. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide und Aufreinigung der DNA-Sonden	27
2.3.3. Zubereitung des nichtdenaturierenden Polyacrylamidgels	29
2.3.4. Bindereaktion	30
2.3.5. Lauf der Elektrophorese	30
2.3.6. Auswertung der Gel-Retentionsanalyse	31

2.4. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR in Vitro.....	31
2.4.1. Vorbereitung der PCR- und Mutagenese-Primer	31
2.4.2. Mutagenese-PCR und Isolierung der Produkte.....	32
2.4.3. Rekombinations-PCR und Isolierung der Produkte	32
2.4.4. Klonierung der Mutante in den pGL3-Basic-Vektor und den pGL3-Enhancer-Vektor.....	33
2.5. Werkzeuge zur Sequenzanalyse und Dokumentation	33
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Molekulare Sequenzanalyse des RT6-Promotors.....	34
3.1.1. Strukturelle Komponenten des RT6-Promotors	34
3.1.2. Analyse des Transkriptionsstarts mittels Promotor Prediction Programm	37
3.2. Funktionelle Charakterisierung des RT6-Promotors in Reporter-Gen-Assays.....	38
3.2.1. Luciferase – Expressionsvektoren.....	38
3.2.2. Molekulare Klonierung der RT6-Promotorfragmente in den pCR 2.1 Vektor	41
3.2.3. Umklonierung von RT6 ^b Promotorbereichen in den pGL3 Basic-Vektor	43
3.2.4. Überblick der Konstrukte-Herstellung für die Reporter-Gen-Assays.....	45
3.2.5. Reporter-Gen-Assays mittels der Transfektion durch Elektroporation.....	46
3.2.6. Luciferaseaktivität der pGL3 Vektoren in EpD3-Zellen	47
3.2.7. Funktionelle Analyse der zellspezifischen RT6-Promotoraktivität.....	47
3.2.8. Analyse des 5'-Endes des RT6-Promotors	48
3.2.9. Analyse des 3'-Endes des RT6-Promotors	50
3.2.10. Bestimmung des Minimal-Promotors und relevanter Promotorelemente	51
3.3. Die Wirkung des SV 40 Enhancers auf die RT6-Expression	52
3.3.1. Umklonierung der Promotorfragment in den pGL3 Enhancer Vektor	52
3.3.2. Wirkung des SV40 Enhancers auf den RT6-Promotor.....	53
3.3.3. Bindestellen im SV40 Enhancer	54
3.4. Gelretentionanalyse zur Charakterisierung von regulatorischen Sequenzen.....	55
3.4.1. Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	55
3.4.2. Auswahl der Oligonukleotide für die Mobility Shift Untersuchungen.....	56
3.4.3. Experimentparameter in EMSA.....	57
3.4.4. Zell-spezifische Bindung an das Oligonukleotid EMSA-A3A4 im Mobility Shift.....	58
3.4.5. Mobility Shift mit Oligonukleotid EMSA-A3A4 in verschiedenen Lymphozyten	59
3.4.6. Unspezifische Bindung an Oligonukleotid EMSA-A5A6 in Mobility Shift Assay	60
3.5. Analyse des Einflusses des TATA-Elements auf die RT6-Expression	61
3.5.1. Mutagenese des TATA-Motivs und des GC-Elements mittels PCR.....	61
3.5.2. Das RT6-Gen benötigt kein TATA-Motiv für die Initiation der Transkription	64
4. DISKUSSION	66
4.1. Strukturanalyse des RT6-Promotors	66
4.2. Charakterisierung eines Minimal-Promotors und zusätzlicher relevanter Bereiche	69
4.3. Die Aktivität des RT6-Promotors wird durch den SV40-Enhancer gesteigert.....	71
4.4. Das TATA-Element spielt keine Rolle für die RT6-Expression.....	72
4.5. Andere Mechanismen der RT6-Genregulation	73
4.5.1. RT6-Expression wird zum Teil durch alternative Transkriptions-Initiation gesteuert	73
4.5.2. Die RT6-Expression wird durch Alternatives Spleißen gesteuert	75
4.5.3. mRNA-Abbau-Kontrolle.....	75
4.6. Analyse potentieller regulatorischer Elemente und ihrer Bedeutung für die T-Zell Entwicklung .	76

5. ZUSAMMENFASSUNG.....	78
6. BIBLIOGRAPHIE	80
7. ABBILDUNGSINDEX.....	95
8. ABKÜRZUNGEN.....	96
9. ERKLÄRUNG.....	97
10. DANKSAGUNG.....	98

1. Einleitung

1.1. Immunregulation und T-Lymphozyten

Das Immunsystem besteht aus dem zentralen lymphatischen Gewebe (Knochenmark, Thymus), dem sekundären lymphatischen Gewebe (Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques im Darm) und den Lymphozyten im Blut. T-Lymphozyten und B-Lymphozyten sind wichtige Effektorzellen der adaptiven Immunität, wobei die T-Lymphozyten Helferfunktionen für andere Immuneffektorzellen übernehmen und als zytotoxische Zellen für die Eliminierung von veränderten körpereigenen bzw. fremden Zellen verantwortlich sind. Um die immunologischen Effektorfunktionen auszuführen, müssen Lymphozyten sich zu reifen Immunzellen entwickeln und dabei Phasen der Aktivierung und der Differenzierung durchlaufen (Skerka and Zipfel, 1998).

1.1.1. Eine zentrale Rolle bei der T-Zell Entwicklung spielt die positive Selektion

T-Präkursoren (Vorläuferzellen) gelangen in den Thymus und reifen hier unter dem Einfluß von Thymusepithel und Lokalfaktoren zu antigenreaktiven T-Zellen. Diese Phase der primären Differenzierung von T-Zellen ist aus der Sicht des Klinikers besonders interessant. Die Immunreaktivität eines Individuums wird bereits hier entscheidend geprägt (Ollier and Symmons, 1995). Im Verlauf der T-Zell-Entwicklung im Thymus werden aus vielen Zellen wenige (5%) ausgewählt, die in die Peripherie entlassen werden. Nur Zellen, die ein Überlebenssignal empfangen, können sich weiterentwickeln (Scott, 1993). Das Überleben reifer T-Zellen während ihrer gesamten Entwicklung hängt von einer feinen Balance zwischen positiven und negativen Signalen ab, welche durch die Bindung ihres Antigenrezeptors (TZR) an einen MHC / Peptid-Liganden vermittelt werden (Freitas and Rocha, 1997; Freitas and Rocha, 1999; Tanchot et al., 1997).

Beobachtungen weisen darauf hin, daß ähnliche Mechanismen auch für naive Zellen in der Peripherie gelten, möglicherweise auch für das ganze Leben einer T-Zelle (Rocha and von Boehmer, 1991). Auch nach positiver Selektion und Emigration aus dem Thymus benötigen T-Zellen Überlebenssignale (Freitas and Rocha, 1999; Tanchot et al., 1997).

Im großen und ganzen weiß man jedoch nur wenig über die Signale, die spätere Phasen der T-Zell Entwicklung steuern. Wichtige Mechanismen der Toleranzentstehung sind zum einen die positive und negative Selektion der T-Zellvorläufer im Thymus und zum anderen

die Anergisierung potentiell autoreaktiver T-Zellen (Fowlkes and Ramsdell, 1993; Kisielow et al., 1988).

1.1.2. Die regulatorische Rolle der T-Zellen bei der Immunantwort

Im Rahmen der gerichteten Immunabwehr spielen T- und B-Lymphozyten eine entscheidende regulierende und kontrollierende Rolle bei der Steuerung und Koordination. Der Verlauf einer Immunantwort wird bestimmt durch die Fähigkeit von T-Zellen, Antigene ihrer Umwelt spezifisch zu erkennen und in unterschiedlicher Weise auf sie zu reagieren. Stärke und Dauer der Wechselwirkung zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APC) entscheiden wesentlich, ob die T-Zelle mit Proliferation und Differenzierung, mit Anergie oder Apoptose reagiert (Haag and Nolte, 1999). Neben den T-Effektorzellen (wie z.B. CTL) entstehen im Rahmen einer Immunantwort antigenspezifische Regulatorzellen sowohl für die humorale als auch zellvermittelte Immunität. T-Regulatorzellen beeinflussen nahezu alle immunologische Effektorzellen: Die Regulation der Immunantwort beruht damit auf einer antigenspezifischen Aktivierung und Suppression. Das Versagen dieses Regulationsmechanismus könnte zu Autoimmunität führen.

1.1.3. Autoimmunität

Die Autoimmunität hat zelluläre und humorale Bestandteile. Für die zellulären Anteile sind cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen verantwortlich. Beide Zelltypen können Zielzellen lysieren. Der humorale Anteil der Autoimmunität besteht in der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen. Die meisten B-Zellen benötigen die Hilfe von T-Zellen, um Autoantikörper zu produzieren. Auch im gesunden Organismus sind autoreaktive T- Zell-Klone nachweisbar, befinden sich jedoch entweder in einem anergen Zustand (Blackman et al., 1991; Mueller et al., 1989; Rocha and von Boehmer, 1991), oder werden von einer regulierend wirkenden T-Zellpopulation an der Entfaltung zerstörerischer Aktivität gehindert (Mason and Fowell, 1992).

Das T-Zell Differenzierungsantigen RT6 ist ein Oberflächenmarker für reife, ruhende T-Zellen. Defekte der Expression dieses Markers sind in Tiermodellen für Autoimmun-Erkrankungen, wie im BB-Rattenmodell für den autoimmunen insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IDDM) und Modellen für den systematischen Lupus erythematisches (SLE), mit erhöhter Erkrankungsanfälligkeit assoziiert (Koch-Nolte et al., 1995; Matthes et al., 1997).

1.2. RT6-Defekte in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen

1.2.1. DP-BB Ratte

Ein gut charakterisiertes Tiermodell des menschlichen IDDM ist die „Bio Breeding“ BB-Ratte. Von diesem Stamm existieren zwei Sublinien, die diabetesanfällige **BB-DP (diabetes prone) Ratte**, und die diabetesresistente **BB-DR (diabetes resistant) –Ratte**. Der BB-DP Rattenstamm entwickelt mit einer kumulativen Inzidenz von 50-80% im Alter von 60-120 Tagen einen IDDM (Greiner et al., 1986; Rossini et al., 1985). In diesem Modell ist die erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen (der insulinabhängige Diabetes mellitus) mit einem RT6 Expressionsdefekt der T-Zellpopulation assoziiert (Greiner et al., 1986; Greiner et al., 1987; Haag et al., 1993).

Bei der DP-BB Ratte findet sich eine ausgeprägte T-Zell Lymphopenie, verbunden mit einem fast vollständigen Fehlen der RT6 positiven T-Zellpopulation (Crisa et al., 1993; Greiner et al., 1986). Interessant ist, daß auch bei einem anderen Tiermodell des juvenilen Diabetes, der NOD Maus, eine signifikant reduzierte Expression des murinen Rt6 zu finden ist (Prochazka et al., 1991).

Überträgt man nun jungen diabetesanfälligen Ratten von diabetesresistenten Ratten RT6-tragende T-Zellen oder Milzzellen, so kann man den Ausbruch des Diabetes verhindern (Burstein et al., 1989; Rossini et al., 1984). Depletion der RT6+ T-Lymphozyten junger DR-BB Ratten durch RT6 spezifische monoklonale Antikörper erhöht die Diabetesinzidenz von weniger als 1% auf über 50% (Greiner et al., 1987). Bemerkenswert ist, daß auf intraepithelialen Lymphozyten des Darmes eine ungefähr zehnfach höhere RT6 Expression als auf peripheren T-Zellen zu finden ist (Fangmann et al., 1990). Auch die intraepithelialen Lymphozyten der DP-BB Ratte exprimieren meßbare, aber im Vergleich zu nichtdiabetischen Ratten sehr stark verminderte Mengen RT6 (Fangmann et al., 1991).

1.2.2. Die peripheren T-Zellen der DP-BB Ratte weisen einen unreifen Phänotyp auf

Es wurde gezeigt, daß diejenigen Zellen, die aus dem Thymus auswandern ("recent thymic migrants", RTMs), phänotypisch nicht voll ausgereifte T-Zellen sind (Thiele et al., 1987). In der Ratte tragen RTMs wie die Thymuslymphozyten den Oberflächenmarker Thy-1. Sie werden im Lauf der postnatalen Ontogenese zunehmend durch Zellen ersetzt, welche zunächst den Differenzierungsmarker RT6, und dann zusätzlich das Oberflächenantigen CD45RC tragen (Bell et al., 1992; Haag et al., 1993; Hosseinzadeh and Goldschneider,

1993; Thiele et al., 1987). Bei adulten Ratten entsprechen 70 - 90% der peripheren T-Zellen dem Phänotyp $RT6^+/Thy-1^-$, davon exprimiert die Mehrzahl außerdem das Merkmal CD45RC (Haag et al., 1993; Mojcik et al., 1988). Die peripheren T-Zellen der DP-BB Ratte besitzen den für unreife RTMs charakteristischen Phänotyp $RT6^-/Thy-1^+$ (Haag et al., 1993; Thiele et al., 1989). Ob die Differenzierung von $RT6^-$ zu $RT6^+$ Zellen ein endogen vorprogrammierter Reifungsschritt ist, oder die Reaktion auf ein von der Zelle empfangenes Signal darstellt, ist nicht bekannt.

Im Ratten-Tiermodell für den IDDM konnte eine protektiv wirkende T-Zellsubpopulation mit Oberflächenphänotyp $CD4^+$, $CD45RC^{low}$, $RT6^+$ nachgewiesen werden (Fowell and Mason, 1993; Fowell et al., 1991; Mason and Powrie, 1998). Bei einem anderen, durch Thymektomie und Bestrahlung induzierten Rattenmodell des IDDM konnte die protektive T-Zellsubpopulation auf eine Fraktion der $CD4^+$ T-Zellen mit dem Oberflächenmarkerprofil $CD45RC^{low}$, TZR (α/β), $Thy-1^-$, $RT6^+$ eingegrenzt werden (Mason and Powrie, 1998). Zusammengenommen sprechen diese Beobachtungen für eine regulatorische Rolle einer Subpopulation $RT6$ -positiver Zellen.

1.2.3. Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I (TI-DM)

Mit Hilfe des Leukozytenmigrations-Inhibitionstestes konnten Nerup u. Mitarbeiter (1971), unter Verwendung von Pankreasextrakten als Antigen, eine spezifische Sensibilisierung von Lymphozyten von Typ-I-Diabetikern nachweisen (Nerup et al., 1971). Dies gelang in ähnlicher Weise MacCuish und Mitarbeitern (MacCuish et al., 1974).

Das klinische Bild vom Diabetes mellitus Typ I (TI-DM) bei BB-Ratte und NOD-(non-obese diabetic) Maus ist geprägt durch einen spontanen insulinabhängigen Diabetes nach Zerstörung der β -Inselzellen und nachfolgender Infiltration mit lymphatischen Zellen (Ollier and Symmons, 1995). Huang und Maclaren (Maclaren and M, 1976) sowie Lang und Mitarbeiter (Lang et al., 1987) berichteten über eine verstärkte Cytoadhärenz der Lymphozyten von Typ-I Diabetikern an insulinsezernierende Zellen.

Auf einen direkten zytotoxischen Effekt gegen Beta-Zellen deuten die Befunde von Charles (Charles et al., 1983) sowie Boitard und Mitarbeitern (Boitard et al., 1981) hin. In weitergehenden Untersuchungen konnten die an den Betazellen abgelagerten Lymphozyten als $CD8^+$ Zellen identifiziert werden (Lampeter et al., 1987). Lohmann et al. konnten durch Untersuchung von zytotoxischen Reaktionen gegen Betazellen den Nachweis eines

spezifischen Suppressordefektes bei Typ-I-Diabetikern führen (Lohmann et al., 1986). Dies ist ein Hinweis, daß in diesen Krankheiten die Autoimmunität mit Störungen der Fähigkeit zur Ausbildung normaler reifer, ruhender T-Zellen verbunden ist.

In dem menschlichen Typ-I-Diabetes analogen Tiermodellen konnte das Auftreten eines Diabetes mellitus durch Transfusion von Blutzellen gesunder Tiere verhindert werden (Rossini et al., 1984; Scott et al., 1986). Außerdem konnte die Entwicklung eines Diabetes durch Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen aktivierte T-Zellen unterdrückt werden (Hahn et al., 1987; Herold et al., 1987; Shizuru et al., 1988).

1.3. RT6 bezeichnet ein T-zell-spezifisches Oberflächen-Alloantigen-System

Der T-Lymphozyten Differenzierungsmarker RT6 wird spezifisch auf reifen langlebigen T-Zellen, intraepithelialen Lymphozyten (IELs) und einer Subpopulation natürlicher Killer (NK-) Zellen exprimiert (Fangmann et al., 1990; Wonigeit et al., 1997). RT6 ist ein T-Zell-spezifisches Oberflächenantigen der Ratte, welches im Verlauf der post-thymischen Entwicklung auf der Mehrzahl der peripheren T-Zellen exprimiert wird (Butcher and Howard, 1977; DeWitt and McCallough, 1975; Thiele et al., 1987). Auf T-Zellen der Ratte erscheint RT6 erst in der Peripherie, während in der Maus bereits die am weitesten entwickelten "einzelpositiven" Zellen vor dem Export in die Peripherie RT6⁺ sind (Koch-Nolte et al., 1999).

Transkripte von RT6 werden in sekundären lymphatischen Geweben, hauptsächlich in der Milz nachgewiesen. Das Molekulargewicht der entsprechenden Proteine schwankt zwischen 25 und 35 kD (je nach Glykosylierungsgrad) (Koch et al., 1987; Thiele et al., 1986). Das RT6 System weist einen ausgeprägten Polymorphismus auf (Haag et al., 1990).

In der Ratte sind zwei Hochpolymorphe Allele eines einzigen Genortes bekannt, RT6.1 (kodiert von *RT6a*) und RT6.2 (kodiert von *RT6b*). Interessanterweise werden diese beiden Allele asymmetrisch exprimiert (Thiele et al., 1993). Die Maus verfügt über zwei RT6-Gene (Rt6-1 und Rt6-2) (Koch et al., 1990).

1.4. RT6 ist ein T-Zell-Oberflächen-Enzyme des Nukleotidstoffwechsels

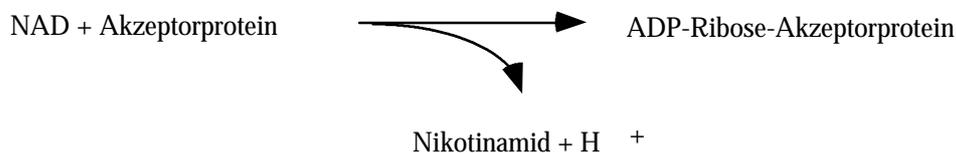
Neben den Rezeptoren finden sich auf der Lymphozytenoberfläche auch viele Enzyme. Es handelt sich dabei vor allem um Peptidasen und Enzyme des Nukleotidstoffwechsels.

Obwohl die biologische Bedeutung vieler dieser sog. „Ektoenzyme“ noch unklar ist, mehren sich die Hinweise, daß Enzyme der T-Zelloberfläche eine wichtige Rolle bei der Modulation der Signalübertragung an der T-Zellmembran spielen (Haag and Nolte, 1999).

1.4.1. RT6 gehört zu der bei Eukaryonten neu entdeckten Genfamilie der ADP-Ribosyltransferasen

RT6 gehört nicht nur aufgrund von Sequenzhomologie zur Familie der Mono ADP-Ribosyltransferasen (ARTs), sondern das RT6 Protein der Ratte (Haag et al., 1995) und der Maus (Koch-Nolte et al., 1996; Moss et al., 1992; Rigby et al., 1996) besitzt tatsächlich entsprechende Enzymaktivitäten. Mono ADP-Ribosylierung ist eine enzymatisch vermittelte post-translationale Proteinmodifikation, die als Wirkungsmechanismus bakterieller Toxine (Inaktivierung der Proteinbiosynthese) entdeckt wurde und mittels derer spezifische Zielproteine in ihrer Funktion beeinflußt werden können. Auch bei Eukaryonten stellt die reversible ADP-Ribosylierung einen bekannten Mechanismus der Regulation der Funktion zellulärer Proteine dar (Moss et al., 1992; Takada et al., 1993). Inzwischen wird angenommen, daß viele Organismen diesen Mechanismus auch für die Regulierung des endogenen Metabolismus nutzen. Sequenzanalysen deuten an, daß die meisten bisher bekannten ARTs bei Vertebraten GPI (Glykosylphosphatidylinositol) - verankerte Membranproteine sind.

Diese Enzyme spalten extrazelluläres NAD (eNAD) und transferieren die dadurch freiwerdende ADP-Ribose-(ADPR) Einheit spezifisch auf Akzeptorproteine, welche dadurch in ihrer Funktion verändert werden (Nemoto et al., 1996; Ueda and Hayaishi, 1985; Zolkiewska et al., 1992).



Nach Stimulierung der T-Zelle durch anti-CD3-Ak verschwindet RT6 durch die Wirkung einer Metalloprotease von der Zelloberfläche (Koch-Nolte et al., 1999).

1.4.2. ADP-Ribosylierungen führen zur Hemmung von Effektorfunktionen der CTLs

Die endogenen ARTs sind an der Regulation wichtiger Immunreaktionen – z.B. der Kontrolle zytotoxischer T-Zellen und der Leukozytenmigration beteiligt. ADP-Ribosylierungsreaktionen auf der Oberfläche zytotoxischer T-Zellen (CTLs) der Maus führen zur Hemmung wichtiger Effektorfunktionen dieser Zellen, wie der Proliferation, der Adhäsion an Zielzellen, sowie des zytotoxischen Potentials (Wang et al., 1997; Wang et al., 1994).

Zu den modifizierten Proteinen gehören sowohl das Integrin LFA-1 als auch der Korezeptor für MHC I-Moleküle, CD8. Die Modifizierung eines bisher nicht identifizierten Proteins, p40, welches mit der intrazellulären Tyrosinkinase p56^{lck} (lymphocyte kinase, 56 kD) verbunden ist, führt zur Inaktivierung von p56^{lck} (Wang et al., 1996). Es ist möglich, daß p40 mit CD8 identisch ist (Haag and Nolte, 1999).

Die hemmende Wirkung von NAD bleibt aus, wenn vorher die GPI-verankerten Proteine durch enzymatische Abspaltung von der Zelloberfläche entfernt werden (Wang et al., 1994).

1.5. Diabetes, T-Lymphopenie und RT6-Expressionsdefekt der BB Ratte

Typ I Diabetes, wie viele andere Autoimmunkrankheiten, könnte auf eine Imbalance zwischen Effektor- und Regulator-T-Zellen zurück gehen (Brown, 1996; Rashba et al., 1993). Zunächst hat man gedacht, RT6 selbst könnte der Gendefekt sein, der in BB-DP Ratten zu Lymphopenie und Diabetes führt. Kreuzt man BB-DP Ratten (homozygot für RT6^a-RT6.1) mit einem für RT6^b homozygoten Stamm (Wistar-Furth-Ratte), so findet man auf den T-Lymphozyten der F1 Nachkommen normale Mengen sowohl von RT6.2 als auch von RT6.1 Protein (Angelillo et al., 1988; Crisa et al., 1990). Die hier angeführten Studien zeigen, daß das RT6a Gen der DP-BB Ratte strukturell intakt ist, aber nicht angeschaltet wird (Thiele et al., 1989).

Aus den Kreuzungsversuchen muß man den Schluß ziehen, daß der genetische Defekt nicht im RT6 Gen selbst (in cis) zu suchen ist, sondern in trans, d.h. in einem anderen Gen, dessen Produkt für die Anschaltung des RT6 Gens notwendig ist. Am wahrscheinlichsten ist ein Defekt im System der Transaktivatoren (Kuhlenbäumer, 1996). Entscheidend für die Ausprägung des autoimmunen IDDM der BB-Ratte ist eine periphere T-Zell-

Lymphopenie, welche auf ein Defekt in einem unbekanntem Gen auf Chromosom 4 zurückzuführen ist (Jacob et al., 1992; Markholst et al., 1991).

Wenn man sich die T-Zellen der BB-Ratte anschaut, stellt man fest, daß im wesentlichen die Population der RT6-positiven Zellen fehlt. Die peripheren T-Zellen der BB Ratte sind kurzlebig und weisen einen aktivierten Phänotyp sowie eine hohe Apoptoserate auf (Hernandez et al., 1999; Iwakoshi et al., 1998; Ramanathan et al., 1998).

Diabetes, T-Zell-Lymphopenie und RT6-Expressionsdefekt der DP-BB Ratte werden durch eine einzige Variante eines Gens bestimmt, das man *lyp* (für Lymphopeniegen) genannt hat, und das auf Chromosom 4 der Ratte kartiert wurde (Jacob et al., 1992). Das Gen konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Eine attraktive Hypothese ist in diesem Zusammenhang, daß der *lyp* Gendefekt der BB-DP Ratte einen direkt für die Anschaltung des RT6 Gens wichtigen Transkriptionsfaktor betrifft. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, daß die Gene der direkt für die RT6 Anschaltung verantwortlichen Transkriptionsfaktoren intakt sind, ihrerseits aber von *lyp* abhängig sind (Haag, 1996).

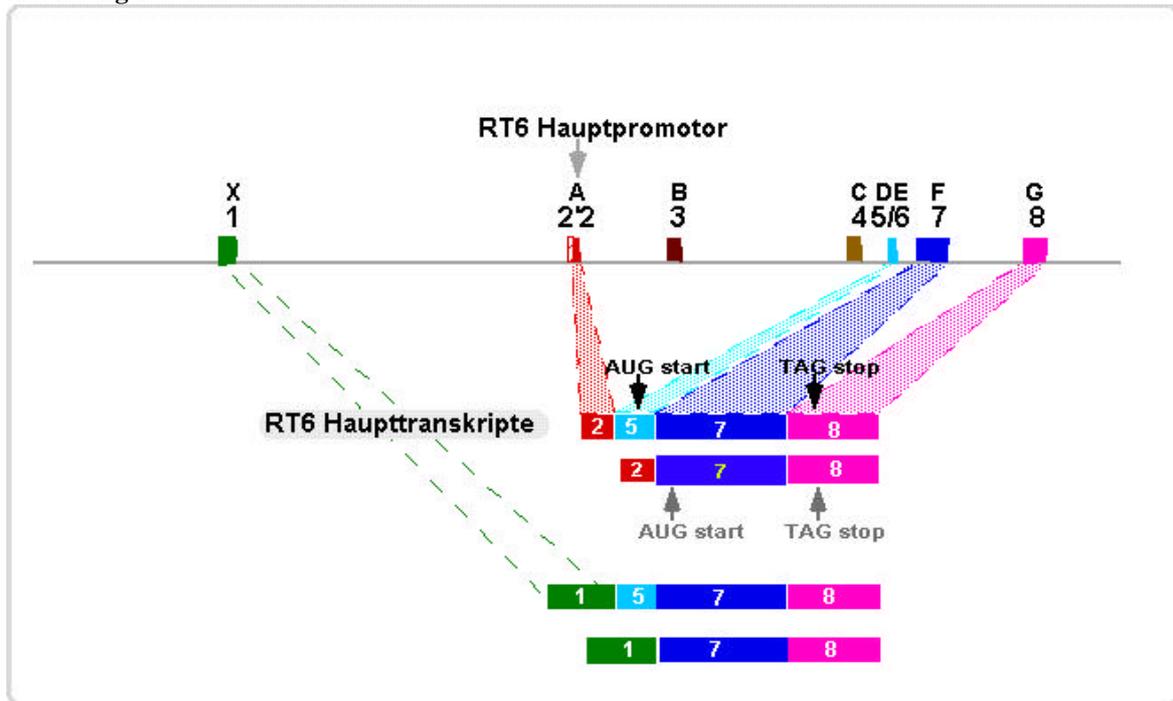
Obwohl eine direkte Beteiligung des RT6 Expressionsdefekts an der Erkrankung bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte, ist dieses im Lichte der immunregulatorischen Effekte der ADP-Ribosylierung (s.o.) eine attraktive Hypothese. Dies wirft die Frage auf, ob vererbte und erworbene Fehlfunktionen dieser regulatorischen Enzyme klinische Bedeutung haben und ob diese merkwürdigen fernen Verwandten bakterieller Toxine sowie ihre Inhibitoren therapeutisch nutzbar sein könnten.

1.6. Aufklärung der RT6-Genstruktur

Die Aufklärung der RT6 Genstruktur eröffnet vielfältige Möglichkeiten zur Untersuchung der Funktion und Regulation des RT6. Das RT6 Gen wurde der „linkage group 1“ auf Chromosom 1 der Ratte zugeordnet (Butcher et al., 1979). Die RT6 Gene von der Ratte (Haag et al., 1996) und Maus (Koch et al., 1990; Prochazka et al., 1991) wurden kloniert.

Die komplette 20 kb Sequenz des RT6^b Allotyps der Ratte liegt vor. Die komplette Exon / Intron-Struktur des RT6 Gens wurde untersucht (**Abb. 1**).

Abbildung 1. Struktur des RT6 Gens



Die relative Lage der Exons zueinander wurde durch PCR-Amplifikation der λ -Phagen DNA mit Exon-spezifischen Primern bestimmt. Acht Exons (1-8) wurden hier dargestellt. Der in Exon 2 gelegene Promotor 2 wurde als der Hauptpromotor in Transkription aus T-Lymphozyten der erwachsenen Ratten identifiziert. In Ratten Milzzellen überwiegt die Spleiß-Variante **2-5-7-8**. (Abbildung modifiziert nach F. Haag).

Acht Exons des RT6 Gens wurden identifiziert, von denen, soweit bekannt, nur 3 (**5-7-8**) translatiert werden (Kuhlenbäumer et al., 1997). Es finden sich aber auch andere Kombinationen. Im 5' untranslatierten Bereich (5' UTR) sind vier Exons (**1,2,3,4**) bekannt (Haag et al., 1993). Exon **5** kodiert dabei ausschließlich für das N-terminale Signalpeptid. Exon **6** kommt in allen identifizierten Spleißvarianten nur alternativ zu Exon 5 vor (Haag et al., 1993). Das Hauptexon **7**, welches für das gesamte native Peptid kodiert, ist mit 649 bp ungewöhnlich groß (Hawkins, 1988). Exon **8** kodiert ein C-terminales Signalpeptid, welches bei der Phosphatidylinositolverankerung in der Zellmembran abgespalten wird (Koch et al., 1990).

Die Startpunkte des RT6 Gens der Ratte wurden durch S1-Nuklease-Verdau und die 5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) Technik ermittelt. Zwei unabhängige Startpunkte wurden identifiziert (Haag et al., 1996). Die Mehrheit der Transkripte, die in Milzzellen erwachsener Tiere nachgewiesen werden können, beginnt mit Exon 2 (Kuhlenbäumer et al., 1997). Repetitive Elemente sind im RT6 Gen zahlreich vertreten und weisen einen Allelenpolymorphismus auf. Solche Elemente kommen im Genom häufig vor, und werden als wichtiges Hilfsmittel für die Kartierung von Genen ausgenutzt. Ihre biologische Bedeutung ist jedoch nach wie vor Gegenstand der Spekulation.

1.7. Zielsetzung

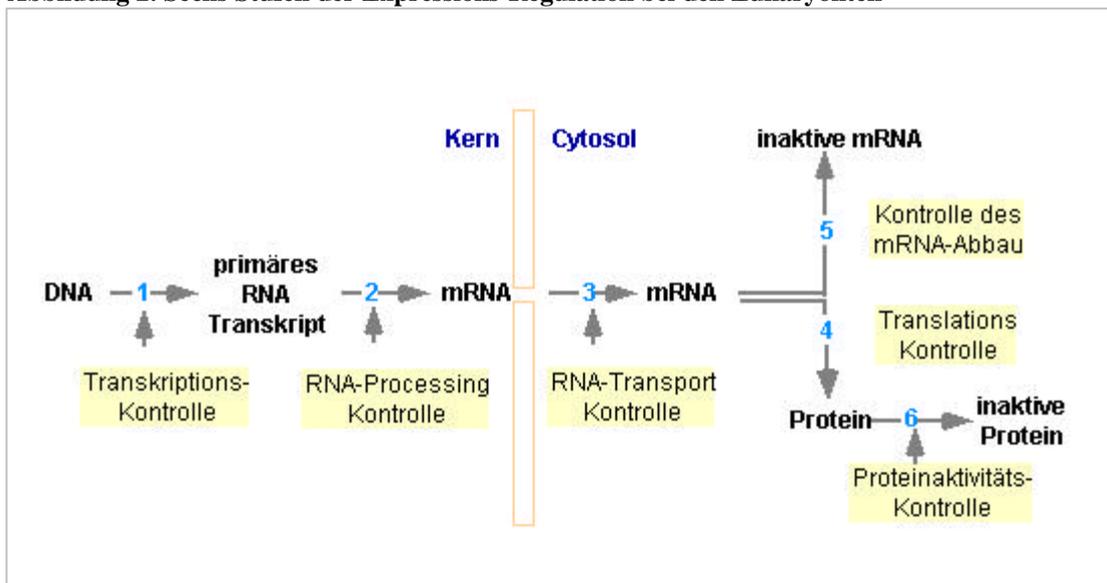
Unsere Gruppe beschäftigt sich seit langem mit der Funktion und Regulation des T Zell-Differenzierungsmarkers RT6, und seiner Bedeutung innerhalb des BB-Rattenmodells für den autoimmunen insulinpflichtigen Diabetes mellitus, sowie seine Rolle im Rahmen der Regulation der Immunantwort und der T-Zell Entwicklung.

Ziel dieser Arbeit ist Untersuchungen zur Aufklärung der Promotorstruktur und Charakterisierung der Genregulation des T-Zell Differenzierungsmarkers RT6.

Das RT6 Gen weist zwei unabhängige Promotor-Bereiche auf (Kuhlenbäumer et al., 1997). Der im Bereich von Exon 2 gelegene Promotor 2 wurde mittels 5' RACE Analyse mit anschließendem Southern Blot und Hybridisieren mit Exon-spezifischen Sonden als der aktivere Promotor in Transkripten aus Milzzellen einer erwachsenen Ratte identifiziert (Kuhlenbäumer et al., 1997). Die Schwerpunkt meiner Arbeit ist die Analyse der Transkriptions-Regulation des RT6 Gens durch den Promotor 2.

Gen-Expression kann auf jeder Stufe des Informationstransfers von DNA zu RNA und Protein erfolgen (**Abb. 2**). Die Expression bei Eukaryoten wird vorwiegend auf der Ebene der Transkription reguliert.

Abbildung 2. Sechs Stufen der Expressions-Regulation bei den Eukaryonten



Eine Zelle kann die von ihr hergestellten Proteine regulieren, indem sie (1) kontrolliert, wann und wie oft ein bestimmtes Gen transkribiert wird (Transkriptions-Kontrolle); (2) feststellt, wie das primäre RNA-Transkript gespleißt oder sonst wie verändert wird (RNA-Processing-Kontrolle); (3) auswählt, welche fertiggestellten mRNAs vom Zellkern in das Cytoplasma exportiert werden. (RNA-Transport-Kontrolle); (4) auswählt, welche mRNA im Cytoplasma durch Ribosomen transkribiert werden (Translations-Kontrolle); (5) selektiv bestimmte mRNA-Moleküle im Cytoplasma destabilisiert (mRNA-Abbau-Kontrolle); oder (6) selektiv festgelegte Proteinmoleküle nach ihrer Synthese aktiviert, inaktiviert oder räumlich abgrenzt (Protein-Aktivitäts-Kontrolle). (modifiziert nach U.a. von Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995).

Zur Aufklärung der Promotor-Struktur und Lokalisierung von regulatorisch wirksamen Elementen werden die Sequenz-Analysen mittels Datenbank, Subklonierungen der Promotor-Regionen in Plasmid-Vektoren, Transfektion von Reporter-gen-Konstrukten – Reporter-gen-Assays, Mutagenese in vitro, sowie Enhancer Untersuchung und Mobility Shift Analyse durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

Die verwendeten Reagenzien, wenn nicht anders im Text angegeben, stammen von den Firmen Merck, Sigma, Boehringer Mannheim, Pharmacia, BioRad und Gibco BRL.

2.1. Herstellung der pGL3 Reporter-gen-Konstrukte

Fragmente des *RT6*-Promotors 2 werden durch PCR amplifiziert und in den pCR 2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach der Sequenzanalyse werden sie in den pGL3-Basic Vektor (Promega) umklontiert.

2.1.1. PCR-Amplifikation ausgewählter RT6 Promotor-Elemente

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen werden nach dem Amplifikationsverfahren nach Gilliland (Gilliland et al., 1989) durchgeführt. Jeder Ansatz enthält 20 µl und setzt sich aus einer 1:1000 Verdünnung der zu amplifizierenden DNA, jeweils zwei verschiedenen Primern, PCR Puffer (10X Perkin-Elmer Cetus: 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,01% Gelatin) und DNA Polymerase (Ampli Taq Gold Polymerase, PE Biosystems) zusammen. Als Negativkontrolle wird in jedem Experiment, anstelle der DNA Wasser (aqua ad iniectabilia, a.i.) eingesetzt. Alle Ansätze werden mit 20-30 µl Paraffinöl überschichtet und anschliessend in einem Thermo Cycler amplifiziert.

Primer

RV2	GGAAGACGCCAAAAACATAAAG
RV3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
TAF	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
TAR	GACGTTGTAAAACGACGGCCAG
A2R	GGCAGCTGGGTCTCTGTCTC
A3R	CTGAGAAGGTGTTTGGCAGC
AFB	AGTTGGTCAGAAACTATTGG
AFC	GGCCGAGGGAGATAATGGGTTC
PF 1	GCCTCAGTAATATGGGGTAG

Reaktionsansatz:

13 µl	Mix 65 (550 µl H ₂ O, 90 µl 10 x PCR-Puffer, 15 µl 10 mM dNTP-Mix)
2 µl	1x PCR-Puffer
1 µl	DNA-Matrize in H ₂ O (1-10 ng)
1 µl	Primer 1 (50 ng/µl)
1 µl	Primer 2 (50 ng/µl)
2 µl	H ₂ O,
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl), Beckmann

PCR-Programm

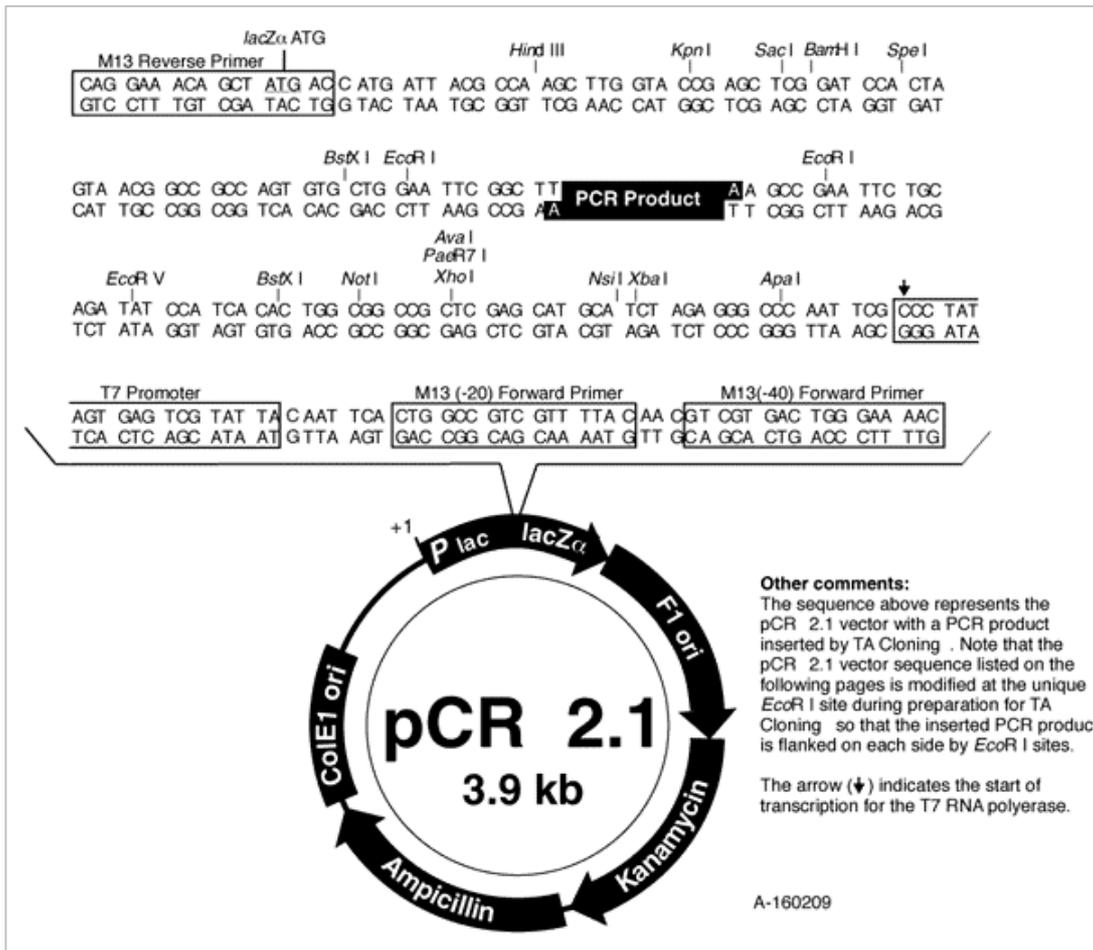
Schritte	Denaturierung	Hybridisieren (Annealing)	Elongation (Extension)	N
1	94°C 5'			1
2	94°C 1'	50-65°C 1'	72°C 2-3'	27
3			72°C 5'	1

Ein Teil (1/10-1/5) des Reaktionsansatzes wird zur Kontrolle gelektrophoretisch untersucht. Die Amplifikationsprodukte werden im Agarosegel (Marker: λDNA-Hind III/φX-174 DNA-Hinc II Digest) elektrophoretisch größenfraktioniert und die DNA durch UV-Bestrahlung nach Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.1.2. Klonierung der RT6 Promotorfragmente in den pCR 2.1 Vektor

Der pCR 2.1 Vektor (Invitrogen) (Abb.3) ist ein 3,9 Kilobasen großes Plasmid, das sich besonders für die Klonierung von PCR-Produkten eignet und zu diesem Zweck eingesetzt wird.

Abbildung 3. pCR 2.1 Vektor



Der Vektor enthält eine multiple Klonierungsstelle (MCS) im lacZ-Gen (s. Abschnitt 2.2.1.4) und das Amp-resistenzgen als positive Selektionskassette.

Die PCR-Amplifikate werden direkt in den Vektor pCR2.1 unter Verwendung des TA-Cloning Kit (Invitrogen) kloniert.

Die Ligation wird in einem molaren Verhältnis (Vektor : Insert) von 1 : 2 mit 2 Units T4-Ligase angesetzt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Bei der Ligation der DNA Fragmente wird entsprechend den im TA Cloning™ System empfohlenen Anweisungen der Firma Invitrogen vorgegangen.

2.1.3. Transformation der Reporter-gen-Konstrukte in Escherichia coli (E. coli)

Die Einschleusung von DNA in Zellen wird bei eukaryontischen Zellen **Transfektion** und bei prokaryontischen **Transformation** genannt.

Zur Transformation werden ultrakompetente Bakterien der Stämme INV- α F' (Invitrogen), XL-1-Blue und XL-1-Blue (Stratagene) verwendet.

Host strain	Firma	Genotype
INV- α F'	Invitrogen	endA1, recA1, hsdR17(r-k,m+k), supE44, l-, thi-1, gyrA, relA1, f80, lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF), deoR+, F'
XL-1-Blue	Stratagene	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, lac {F'pro AB, lacIq Z Δ M15, n10 (tetr)}
XL-2-Blue MRF'	Stratagene	recA1, endA1, gyrA96, thi-1 hsdR17, supE44, relA1, lac {F'pro AB, lacIq Z Δ M15, Tn10(tetr Amy Camr)}

Die Bakterien werden langsam über ca. 10 Minuten auf Eis aufgetaucht und evtl. aliquotiert. Es erfolgt die Zugabe von 1 μ l Ligationsansatz und 1 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol pro 50 μ l kompetente Bakteriensuspension. Nach vorsichtigem Mischen erfolgt 30 min. Inkubation auf Eis, 30 sec Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und 2 min. auf Eis. (Sambrook et al., 1989). Dann wird SOC-Medium (LB-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast, 10 g/l NaCl, pH 7,0 mit 20 mM Glucose) hinzugefügt, und der Ansatz wird bei 37 °C im Brutschrank für 1 Stunde auf einem Schüttler inkubiert. Danach werden 200 μ l dieser Kultur auf LB/Amp (LB-Agar + 150 ug/ml Ampicillin) Agarplatten, die vorher mit X-gal und IPTG behandelt werden, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.4. PCR-Screening Verfahren - Colony-PCR

Die erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragments in den Klonierungsvektor führt zur Zerstörung eines Indikatorgens, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Mit Hilfe dieses Enzyms wird das Galactose-Analogon X-Gal zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

Rekombinante Bakterien sind nicht mehr in der Lage, das Enzym β -Galactosidase herzustellen, zu sehen an der weißen Farbe dieser Bakterienkolonien.

Zur Kontrolle von transformierten Bakterien werden am Tag nach der Transformation etwa 2-3 weisse Bakterienkolonien pro Konstrukt durch direkte PCR auf korrekt ligierte Plasmidkonstrukte getestet. Dazu werden Bakterien mittels einer Pipettenspitze zur Strichkultur auf eine frische Agarplatte angeimpft und die an der Pipettenspitze verbliebenen Bakterien in 3 μ l Lysis-Puffer denaturiert. Je 1 μ l dieses Bakterienlysats wird als PCR-Matrize eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerasen-Kettenreaktion werden die Produkte im Agarosegel analysiert.

2.1.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Nach PCR-Screening werden transformierte Bakterien mit den gewünschten rekombinanten Plasmiden (positive Klonen) in 5 ml LB/Amp-Medium (LB-Medium +150 μ g/ml Ampicillin, Boehringer Mannheim) eingeimpft und über Nacht vermehrt. Die Präparation von Plasmid DNA wird mit dem "Qiagen Plasmid DNA MiniPrepTM Kit" nach dem Protokoll des Herstellers vorgenommen, welches auf der optimierten alkalischen Lysis Methode basiert (Birnboim and Doly, 1979).

Die Plasmid-DNA wird durch alkalische Lyse der Bakterien freigesetzt und nach Präzipitation der bakteriellen Proteine und der chromosomalen DNA über Säulen gereinigt. Anschließend erfolgt die photometrische Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und Restriktionsverdau von Miniprep-Produkten zur Kontrolle der geschnittenen Fragmente.

2.1.6. Die DNA-Sequenzierung nach der "dideoxy-chain termination" Methode

Sequenzierungen von DNA werden nach dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Hierbei wird die DNA ausgehend von einem Primer durch eine DNA-Polymerase repliziert. Durch Verwendung von 2',3'- Didesoxynukleotid-triphosphaten (ddNTP) im Gemisch mit 2' dNTPs kommt es an statistisch verteilten Positionen in der Sequenz zum Kettenabbruch, da die zur Verlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Die Abbruch-Produkte können in einem hochauflösenden denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel analysiert werden. Als Sequenzer-primer werden Plasmid- oder cDNA-spezifische Primer mit einer Länge von mindestens 18 Nukleotiden verwendet.

AmpliTaq[®]FS Big Dye Terminator

Zur Sequenzierung werden der AmpliTaq[®]FS Big Dye Terminator Kit (ABI) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Sequenzier-PCR

In dünnwandige Reaktionsgefäße für Perkin Elmer Thermocycler TC 2400 oder TC 9600 werden folgende Reagenzien zusammen pipettiert:

Big-Dye-Premix	4-8	µl
DNA-Template	1	µl
Plasmid-DNA (ds DNA)	0,5-1,0	µg
PCR-Produkte (0,2-5 kb)	10-200	ng
Primer	10	pmol
H ₂ O	ad 20	µl

Hier wird das Thermozyklus-Verfahren unter Einsatz der thermostabilen DNA-Polymerase Amplitaq[™] und Fluoreszenz-farbstoff-markierter Terminatoren angewendet.

Temperaturprogramm bei Perkin Elmer Thermocycler:

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	94°C	1 Minute
2 Denaturierung	94°C	30 Sekunden
3 Primerbindung	55°C	15 Sekunden 25x
4 Extension	60°C	4 Minuten
5	4°C	

Aufreinigung des Reaktionsansatzes durch Ethanol-Fällung

Pro 20 µl PCR-Ansätze werden 2 µl 3M NaAcetat (pH 4, 6) und 50 µl 95% EtOH versetzt, Anschließend wird 15 Minuten bei RT 15.000 rpm zentrifugiert. Danach wird das Pellet (u. U. nicht sichtbar!!) mit 250 µl 70% EtOH gespült und 5 Minuten bei RT 15.000 rpm zentrifugiert, EtOH wird entfernt und das Pellet wird getrocknet (wenn eilig: Speed Vac).

Sequenzreaktion

Die Sequenzreaktion wird im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg auf einem ABI 377 Sequence Analyser aufgetrennt. Das trockene Pellet wird in 25 µl TSR (template suppression reagent) aufgenommen, 2 Minuten bei 90°C renaturiert, und anschließend auf Eis gestellt.

Die Sequenzanalyse

Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgt mit dem DNA-STAR Programm-Paket (Lasergene, U. K.) und Sequencher (Gene Codes, USA).

2.1.7. Sequenzspezifische Spaltung der DNA mit Restriktions-Endonukleasen

Sequenzspezifische Spaltung der DNA wird mit verschiedenen Restriktionsenzymen im Einfach- und Doppelverdau durchgeführt.

Folgende Restriktionsendonukleasen (Pharmacia, MBI Fermentas, New England Biolabs): EcoR I (von *Escherichia coli*), Hind III (von *Haemophilus Influenza*), Sac I (von *Streptomyces achromogenes*), Xba I (von *Xanthomonas badrii*), Xho I (von *Xanthomonas holcicola*) und Restriktionsenzympuffer, One Phor AllTM, von Pharmacia, sowie 10x Puffer von MBI Fermentas und New England Biolabs werden verwendet.

Verdauungsansatz:

	1	µg	DNA
	10	U	Enzym A
	10	U	Enzym B
	2	µl	10 x Puffer
	0,2	µl	BSA 100 x
Ad	20	µl	H ₂ O

Dabei wird jeweils 1µg DNA mit 10-15 Units Enzym in geeignetem Puffer für 1h bei 37°C inkubiert. Bei Doppelverdauung wird zum Teil nach Inkubation mit Enzym A umgepuffert und erst im zweiten Schritt mit Enzym B inkubiert. Folgende Restriktions-Endonukleasen werden dabei eingesetzt: Hind III, Sac I, Xho I und Xba I. Wenn möglich, wird die gerichtete Klonierung mit überstehenden Enden (sticky end) durchgeführt, d.h., das Fragment wird mit zwei unterschiedlichen Restriktions-Endonukleasen herausgeschnitten, um es dann in einen Vektor mit kompatiblen Enden zu ligieren.

2.1.8. Dephosphorylierung des 5' Endes eines Vektors

Um Religation enzymatisch geschnittener Vektoren zu verhindern, werden diese nach Restriktion für etwa 60 Minuten mittels 10 U CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Hierzu wird das ursprüngliche Reaktionsvolumen mit 20 µl 1 x CIP-Puffer (50 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA pH 8, 5) versetzt und mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt, danach mit 10 µl Strataclean Resin (Stratagene) durchgemischt, 2 Minuten RT zentrifugiert. Die Proteine binden an Strataclean-ResinTM und werden damit entfernt. Die Überstände werden anschließend für die Gelelektrophorese vorbereitet.

2.1.9. Elektrophorese des Restriktionsverdaus

Zur elektrophoretischen Auftrennung von restriktionsverdauter Plasmid DNA wird der gesamte Restriktionsverdau auf 1.0-1.5% Agarosegelen in einem TBE-Puffer (0,089 M Tris/HCl, 0,089 M Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) größenfraktioniert und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht (Ausubel et al., 1988).

2.1.10. DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel

Nach Identifizierung der gewünschten aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht und Photographie werden die entsprechenden DNA-Banden von Vektor und Insert mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels des Jetsorb Gel Extraktionskits, (Genomed) nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Dabei wird die DNA zuerst mittels eines TBE-Solubilizers gelöst. Die solubilisierte DNA wird an eine Matrix gebunden, in zwei verschiedenen Waschschritten gewaschen, luftgetrocknet und schließlich mit EB Puffer eluiert.

2.1.11. Umklonierung von DNA-Fragmenten in den pGL3-Vektor

Die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene DNA des Plasmids, welche als zukünftiger Vektor dient, und des Inserts, welche die gewünschte zu exprimierende Information trägt, wird im Verhältnis 1 zu 3-10 zwischen Vektor und Insert gemischt, mit jeweils 10% des Restriktionsvolumens 10x Ligasepuffer, β -Mercaptoethanol und 1 μ l DNA-Ligase in 20 μ l Reaktionsvolumina versetzt.

Kompatible, überlappende DNA-Enden werden eine Stunde bei RT und stumpfe Enden über Nacht bei 17 °C inkubiert. XhoI und Hind III Restriktionsendonukleasen werden dabei eingesetzt.

Es folgen Sequenzierung und DNA-Maxi-Präparation von pGL3 Plasmid DNA unter Verwendung des Jetstar DNA-Maxi-Präparationskits.

2.1.12. Maxi-Plasmid-Präparation

Die Isolierung gereinigter pGL3-DNA erfolgt über die Säulen des Jetstar Maxi-Prep™, Kits, und wird gemäß dem Protokoll des „Plasmid Kits Maxi“ durchgeführt. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly.

In Gegenwart von Puffer 1 (100 µg/ml Rnase A, 50 mM TRIS/HCl, 10 mM EDTA, pH8,0) und Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) werden die Bakterien lysiert, DNA und Proteine denaturiert. Die Trennung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA basiert auf dem Größenunterschied der DNA-Moleküle. Deshalb müssen alle Handhabungen sehr vorsichtig ausgeführt werden, um eine Scherung der DNA-Moleküle zu vermeiden. Das Zellysate wird durch Verwendung von Puffer 3 (2,55 M KAc, pH 4,8) neutralisiert. Aufgrund der hohen Salzkonzentration bildet sich ein Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zelltrümmern und denaturierten Proteinen. Die kleinere Plasmid-DNA verbleibt in Lösung. In Kombination mit einer Qiagen-Säule erfolgt durch Bindung der Plasmid-DNA und anschließender Elution eine selektive Anreicherung überspiralierter Plasmid-DNA (Birnboim und Doly 1979).

Plasmidklone werden von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher aufgepickt und in einer Vorkultur aus 3 ml LB/Amp-Medium bei 37°C bis zu einer Optischen Dichte (OD) von ca. 0,5 angezchtet.

250 ml LB/Amp-Medium wird für die Übernachtskultur verwendet. Nach Überimpfen mit der Vorkultur und Zugabe von Ampicillin wird der Ansatz bei 37°C bebrütet.

Nach der Anzucht wird der Ansatz in Sorvall-Rotorbecher für Sorvall-Zentrifugen überführt und 15 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien werden mit 10 ml Puffer 1 versetzt, in Sorvall-Zentrifugenbecher überführt und mit 10 ml Puffer 2 bedeckt und für 5 Minuten inkubiert. 10 ml Puffer 3 werden dazupipettiert und 20 Minuten bei 4°C inkubiert.

Während die Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert werden; wird das Präzipitat 45 Minuten bei 20000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das klare Lysat wird nach der Zentrifugation auf die Säulen gegeben und dreimal mit QCC-Puffer gespült. Nach Zugabe von 15 ml QF-Puffer wird die zuvor gebundene Plasmid-DNA eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt.

Nach Zentrifugation wird das Sediment in 400 µl TE aufgenommen. Zur weiteren Fällung der DNA wird die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und 2 Volumen Ethanol versetzt und in einer Heraeus Biofuge 5 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wird wiederholt mit Ethanol gewaschen. Bevor das Sediment in 200 µl TE aufgenommen wird, wird dieses nach Entfernung des Alkohols kurz getrocknet. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt am Photometer bei 260 nm.

2.1.13. Photometrische DNA-Mengenbestimmung

Die Messung der Optischen Dichte (OD) gereinigter DNA erfolgt an einem Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260 nm (DNA/RNA) und 280 nm (Protein). In Quarzküvetten wird eine 1:100 Verdünnung der DNA gemessen. Die Umrechnung der DNA-Konzentration erfolgt nach der Voraussetzung, dass 1 OD bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die Absorptionsmaxima von DNA (260 nm) und Proteinen (280 nm) werden gemessen, um die Reinheit der DNA abzuschätzen.

2.1.14. Konstruktion der pGL3-Enhancer-Reporter-gen- Vektor

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Techniken werden in analoger Weise zur Umklonierung der Promotorfragmente in den pGL3 Enhancervektor angewendet.

2.2. Reporter-gen-Assays

2.2.1. Zellkultivierung

Zelllinien

Die Zelllinien EpD3, NK und Rat-1 werden verwendet. Die EpD3 Zelllinie ist eine T Zell Hybridoma Zelllinie, die das T Zell Alloantigen RT6.2 stabil exprimiert (Koch et al., 1988). Sie wurde nach Polyethylenglykol-vermittelter Zellfusion von C58NT Ratten Thymoma Zellen und Lymphozyten aus mit Ovalbumin immunisierten DA Ratten erhalten, wie bei Köhler und Milstein, sowie Conzelmann et al. beschrieben (Conzelmann et al., 1982; Galfre and Milstein, 1982).

Rat-1 ist eine RT6 nicht exprimierende Fibroblasten Zelllinie, die wurde freundlicherweise von M. Wegener (ZMNH) zur Verfügung gestellt. NK ist eine RT6.2⁺ NK-Zelllinie, sie wurde freundlicherweise von K. Wonigeit (Hannover) zur Verfügung gestellt.

Medien für T-Zellen

- 500 ml RPMI, GIBCO BRL
- 10% Fötale Kälberserum, Greiner
- 1% Penicillin / Streptomycin, GIBCO BRL
- 1% Glutamin, GIBCO BRL
- 1% Minimum Essentiell Medium, not-essential aminoacids, GIBCO
- 4,6 µl β-Mercaptoethanol, Sigma

Medium für Fibroblasten:

- 475 ml DMEM, GIBCO BRL
- 15% Fötale Kälberserum, Hyclone
- 1% Penicillin / Streptomycin,
- 1% Glutamin,
- 1% Minimum Essentiell Medium, not-essential aminoacids,
- 4,6 µl β-Mercaptoethanol,

Alle in der Zellkultur verwendeten Plastikartikel stammen, sofern nicht anders angegeben, von der Firma NUNCLON, die verwendeten Zellkultur-Medien von der Firma GIBCO BRL. Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist oben angegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C/5% CO₂ im Zellkulturschrank. Die Zellen werden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

2.2.2. Zellverarbeitung für Transfektion

Die Zellen werden von Kulturflaschen in 50 ml Röhren überführt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm werden sie in 10 ml PBS resuspendiert und gezählt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 Zellen / ml in Wachstumsmedium aufgenommen.

Fibroblasten der Zelllinie Rat-1 werden bis zur 70% und 90% Subkonfluenz hochgezüchtet. Auf eine 10 cm Platte werden 5 ml 10% Trypsin-EDTA gegeben, und die Platte wird 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgt durch Zugabe von Kulturmedium. Zuerst wird das Kulturmedium abgesaugt, dann werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen in der gewünschten Konzentration ausplattiert.

2.2.3. Transfektion per Elektroporation

Je 700 µl der Zell-Suspension werden in sterile Elektroporationsküvetten (Bio-Rad, Elektrodenabstand: 0,4 cm) überführt. Nach Zugabe von 10 µg DNA (Maxi-Präps in destilliertem Wasser) wird der Küvetteninhalt durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Elektroporation erfolgt in drei Parallelansätzen nach 5 minütiger

Inkubation bei Raumtemperatur (RT) in einem Elektroporationsapparat der Firma Bio-Rad unter für die jeweilige Zelllinie optimalen Parametern. Dabei sind die optimalen Bedingungen 0,3 kV und 960 μ F für EpD3-Zellen und Fibroblasten, sowie 0,25 kV und 960 μ F für NK-Zellen.

Nach 10 minütiger Inkubation bei RT werden die Zellen in 50 ml-Zellkulturflaschen, in der 10 ml Medium vorgelegt ist, überführt. Anschließend werden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.4. Lumineszenz-Luziferase Assay

Die Luciferase-Aktivität der transfizierten Zellen wird 24 h bis 48 h nach der Elektroporation gemessen. Das Kulturmedium aus der 50 ml Zellkultur Flasche wird 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen, 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, dann werden die Zellen in 250 μ l Harvest/Assay Buffer (88 mM MES pH 7,8, 88 mM Tris pH 7,8, 12,5 mM MgOAc, 2,5 mM ATP, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, vor dem Gebrauch zusammengesetzt) aufgenommen, und 20 Minuten bei RT zur Lyse inkubiert. 0,2 ml Zellysate wird in das Reaktionsgefäß zugegeben und die Lichtemission wird im Luminometer direkt gemessen. Dabei erfolgt die Zugabe von 200 μ l Luciferin-Lösung (0,5 mM luciferin in 5 mM KHPO₄ pH 7,8) automatisch im Luminometer.

2.3. Gel-Retentionanalyse, Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass DNA-Moleküle in einer Gelelektrophorese langsamer wandern, wenn ein Protein oder ein Proteinkomplex an sie gebunden hat. Binden während einer Inkubation mit Zellkernproteinen ein oder mehrere Proteine an diese DNA-Sequenzen, so „verschiebt“ sich die Bande aufgrund der langsameren Wanderungsgeschwindigkeit der DNA/Proteine an diese DNA-Protein-Komplexe im Gel nach oben (daher die Bezeichnung Shift).

EMSA eignet sich, um spezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen auf Affinität, Stöchiometrie und Kooperation zu untersuchen. Mithilfe dieser Methode können einzelne Proteine aus einem "rohen" Zellextrakt und auch spezifische DNA-Fragmente aus einem Gemisch identifiziert werden. Durch die elektrophoretische Größenfraktionierung werden freie Proteine, freie DNA-Fragmente und DNA-Protein-Komplexe voneinander getrennt.

2.3.1. Präparation von Proteinextrakten

Zellernte

Außer der Zelllinie EpD3 und Rat-1 Fibroblasten, die in Abschnitt 2.2.1 beschrieben sind, werden folgende Zelllinien verwendet: EpSM 30, C58NT und EL4 Lymphomzelllinie.

Die EpSM 30 Zelllinie (Eppendorf SM 30) ist eine RT6.1 stabil exprimierende T Zell Hybridoma Zelllinie, die von Lewis (RT6a) Ratten Milz Zellen stammt (Haag et al., 1988; Haag et al., 1990). Die Zelllinie wurde durch Fusion peripherer T-Zellen mit C58NT erhalten (Conzelmann et al., 1982; Galfre and Milstein, 1982).

C58NT, eine RT6-negative Thymoma-Zelllinie, wurde freundlicherweise von M. Nabholz zur Verfügung gestellt.

Zellen werden in jeweils zwei 10 cm Kulturplatten bis zur Subkonfluenz 70 und 90% hochgezüchtet. Suspensionskulturen (RT6⁺ EpD3) werden in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und direkt abzentrifugiert. Adhärent wachsende Zellen (Fibroblasten) werden mit einem Gummischaber ohne Trypsin gelöst.

Alle folgende Schritte werden auf Eis ausgeführt. Die Zellen werden in kaltem PBS gewaschen für 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen werden mit 10 ml TBS (Tris buffered Saline) gewaschen und bei 1500 g für 5 Minuten erneut abzentrifugiert. Das Sediment wird in 1 ml TBS resuspendiert und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Zellzahl pro Röhrchen wird auf 1×10^6 Zellen eingestellt. Die Zellen werden 5 Minuten pelletiert. Das Sediment wird mit N₂ oder Trockeneis schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Ganzzellextraktion durch Einfrieren und Auftauen

Zellen werden in 3 Volumina *Hochsalz Puffer* (20 mM HEPES pH 7,8, 80 mM NaCl, 0,2 M KCl, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) oder *Niedersalz Puffer* (20 mM HEPES, 80 mM NaCl, 0,08 M KCl, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) (50 µl für 1×10^6 Zellen) resuspendiert, und in Trockeneis / Ethanol eingefroren und wieder aufgetaut. Dies wird 3 mal wiederholt. Dann wird bei 4°C 1400 rpm für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt.

Complete Proteaseinhibitor (Boehringer Mannheim), welcher Phenylmethansulfonyl fluoride (PMSF) enthält, und DTT-Lösungen werden bei -20 °C aufgehoben. Vor

Gebrauch wird PMSF in einer Endkonzentration von 0,5 mM und DTT in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt und der Puffer wird bei 4° C aufgehoben.

Die Pellets der Niedrigsalz-Extrakte werden dann mit 100 µl Hochsalzpuffer nachextrahiert. Der Überstand wird für 20 Minuten bei 45000 rpm zentrifugiert. Nach Proteinbestimmung wird der Überstand schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Modifizierte Miniextraktionsmethode nach Schreiber

Diese Methode (Schreiber et al., 1989) beruht auf der chemischen Lyse der Zellmembran sowie nachfolgender mechanischer Lyse der Kernmembran. Sie ist vor allem für kleinere Zellmengen ab 5×10^5 geeignet. Alle Schritte werden in einem Eisbehälter durchgeführt.

Das Zellsediment von oben wird in 100 µl kaltem *Puffer A* (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1,0 mM DTT, 0,5 mM PMSF) mit einer gelben Pipettenspitze resuspendiert, auf Eis für 15 Minuten inkubiert und 5 Minuten bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wird mit einer Pipettenspitze abgesaugt, um Zellverluste zu vermeiden. Dann wird 25 µl 10 % NP-40 zugegeben und die Lysate werden kräftig mit Vortex gemischt, und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch NP-40 erfolgt die chemische Lyse der Zellmembran. Die Zellysate wird 30 sec bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wird gesammelt und in Aliquots (5 x 80 µl) eingefroren, Das Pellet wird in 12 µl *Puffer C* (20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, eiskalt) gelöst, und bei 4°C 15 Minuten auf einer Schüttelplatte stark geschüttelt. Durch diesen Vorgang erfolgt die mechanische Lyse der Kernmembran.

Das Kernlysate wird 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wird in 10 µl Portion aliquotiert. Nach Bestimmung der Protein-Konzentration werden die Kernproteine bei -70°C aufbewahrt. 1-2 µl Extrakt enthalten ca. 2-4 µg Proteine, in Bandshift Assays für 3 µg Poly dIdC. Die Proteinkonzentration wird mittels Protein-Assay Reagent BCA Kit, Pierce bestimmt.

2.3.2. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide und Aufreinigung der DNA-Sonden

Da Transkriptions-Faktoren in der Regel an doppelsträngige DNA binden, synthetisch jedoch nur Einzelstrang-DNA hergestellt werden kann, ist eine Anlagerung (Annealing) von zwei komplementären DNA-Strängen erforderlich, um eine intakte Bindestelle zu erhalten.

Oligonukleotide

EMSA-A3	GATCAATTTAAGTTGGTCAGAACTATTGGATGTCTAACCTGAAAGTGAAAGCA
EMSA-A4	GATCTGCTTTCACCTTCAGGTTAGACATCCAATAGTTTCTGACCAACTTAAATT
EMSA-A5	GATCAAGCAGGTAGTTCCCAGAGGAAAC
EMSA-A6	GATCGTTTCCTCTGGGAACTACCTGCTT

Annealing von komplementären einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden

Die Methode beruht auf einer initialen Denaturierung beider DNA-Einzelstrangproben mit anschließender langsamer Abkühlung, um eine erneute Dissoziation zu vermeiden.

Zum Annealing werden gleiche Mengen der komplementären Einzelstränge DNA z. B: EMSA-A3 (2,64 µg/µl) 9,5 µl (25 µg) und EMSA-A4 (2,42 µg/µl) 10,3 µl (25 µg) sowie TEN 60 µl zusammengefügt, und mit H₂O oder 1/10 TE bis 100 µl auffüllt. Danach wird auf 80 °C 5 Minuten erhitzt, und langsam auf RT abgekühlt. Es wird bei -20 °C gelagert.

Fill-in Reaktion der 5' Overhang Bindungssequenz:

Zur radioaktiven Markierung wird ³³P-dCTP von Amersham verwendet. Durch eine Auffüllreaktion („fill-in“) werden die doppelsträngigen Oligonukleotide mit α³³P-dCTP markiert. Vorteil des Fill-in ist, dass nur Doppelstrang-DNA an überhängenden 5' Enden markiert werden kann. Je nach α³³P –Nukleotid, das zur Verfügung steht, werden die anderen dNTPs kalt dazugegeben.

Pro Ansatz wird 2 µl doppelsträngiges Promotoroligo (50-100 ng) mit 10 µl demin. Wasser, 2 µl Restriktionsenzym-Puffer M (BMB) und 1 µl eines AGT-Mix (je 33 nM, Pharmacia) versetzt. Anschließend werden 5 µl α³³P-dCTP (3000 Ci/mM) und 1 µl Klenow_Polymerase (2 u/µl, Boehringer Mannheim) dazupipettiert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Weiterhin inkubiert die Probe 10 Minuten bei RT und die Reaktion wird durch rasches Abkühlen auf Eis gestoppt.

Abtrennung der freien radioaktiv markierten Nukleotide nach der Markierung

Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide werden Sephadex G25 Spin-Columns (Boehringer Mannheim Biochemica) verwendet.

Nachdem der Quellpuffer von der Säule durch Zentrifugieren entfernt worden ist, wird der Ansatz mit 50 µl TEN (40 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 150 mM NaCl) versetzt und auf die Säule aufgetragen. Eluiert wird durch erneutes Zentrifugieren in 100 µl vorgelegten TEN-Puffer.

Quantifizieren des Einbaus

2 µl des Eluats werden auf „ready cap´s (Beckmann) zur Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler pipettiert, der die resultierenden counts per Minute (cpm) angibt, die je nach Einsatzmenge auf cpm/ul umgerechnet werden. Cerenkov Strahlung wird gemessen. Gute Signale erhält man häufig mit 25000 cpm in einem Volumen von 1 µl pro Ansatz. Die Proben werden bei 4 °C gelagert oder direkt verwendet. Oligonukleotide werden eventuell weiter verdünnt.

Es gibt einen großen Spielraum in der Menge markierten Oligonukleotids, die man einsetzen kann. Oligonukleotide werden bei 4°C 14000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die konzentrierte radioaktive Sonde sollte erst kurz vor Verwendung verdünnt werden.

2.3.3. Zubereitung des nichtdenaturierenden Polyacrylamidgels

Polyacrylamid entsteht in Gegenwart von Acrylamid, Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethyldiamin (TEMED). Freie Radikale des APS aktivieren das Acrylamid und führen zur Bildung einer längeren Kette. Die Lösung dieses Polymers ist viskös, bildet aber kein Gel. Das Gel wird durch Quervernetzung mit N,N'-Methylen-bisacrylamid erhalten (Cooper, 1981).

Zur Durchführung einer Gel-Retentionsanalyse wird ein 6% Polyacrylamidgel angesetzt. Dazu wird 30 ml Acrylamid (39% Acrylamid:1% Bisacrylamid), 20 ml 5 x TBE-Puffer und 10 g Glycerol mit 150 ml demin. Wasser gemischt und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.

Vorher werden 33 x 40 cm große Glasplatten sorgfältig gereinigt. Vor dem Zusammenbau der Platten wird eine Glasplatte mit Acrylase (Stratagene) besprüht, um das spätere

Ablösen des Gels von der Platte erleichtern. Bevor das Gel gegossen wird, werden die Platten aufeinander gelegt, mit Spacern (1,5 mm) versehen und durch Klammern arretiert.

Zu den 200 ml Acrylamid-Lösung werden 0,05% TEMED (140 µl) und 10 % APS (700 µl) pipettiert. Vor dem Gießen wird der Ansatz gut vermischt, anschließend wird ein Kamm mit 4 mm weiten Zähnen eingesetzt und auch dieser mit Klammern arretiert. Nach maximal 5 Stunden sind die Gele vollständig auspolymerisiert und können verwendet werden.

2.3.4. Bindereaktion

Die Bindung der Zellextrakte an markierte RT6 DNA-Oligonukleotide erfolgt in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß oder in einer Microtiterplatte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Das Oligonukleotid wird mit Wasser auf 1 : 8 verdünnt. Pro Ansatz werden 8 µl 40 x Bindungspuffer (ZnCl 10 µM, 3 mM DTT, 0,5 µg Poly dI-dC, 293 µl H₂O) und 4 µl Zellextrakte (20 µg Protein) in einer Microtiterplatte für 20 Minuten bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von 2 µl radioaktiv markierten $\alpha^{33}\text{P}$ - Target DNA wird erneut bei RT 20 Minuten inkubiert.

Die Bindungsbedingungen für verschiedene Proteine können sehr unterschiedlich sein. Wenn man unterschiedliche Extraktmengen benutzt, sollte man entsprechend mit Extraktionspuffer ausgleichen. Allgemein gilt, dass die DNA-Bindung sensitiv gegen Salz ist. Eine Erhöhung der Salzkonzentration kann also die Spezifität erhöhen.

2.3.5. Lauf der Elektrophorese

Nach Entfernung des Kammes wird das Gel im Kühlraum in eine Gelkammer eingespannt, die Kammer oben und unten mit 0,5 x TBE Puffer (0,089 M Tris-Base-Hydroxymethan, 0,089 M Borsäure, 0,5 M EDTA pH 8,0) befüllt und die Taschen mit Puffer ausgespült. Laufpuffer und Puffertank bzw. Kammer werden auf 4 °C vorgekühlt. Vor dem Beladen der Gele werden die Ansätze mit 4 µl „loading buffer“ - 6 x Glycerin-Auftragspuffer (15 % Ficoll, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol, 1 µg/L Ethidiumbromid, 1 mM EDTA) versetzt. Nach einstündigem Vorlauf bei 300 V werden die Taschen beladen und der Lauf bei 150 Volt über Nacht durchgeführt. Laufbedingungen werden so gewählt, dass die Gele sich nicht maßgeblich aufwärmen.

Das Gel wird so lange laufen gelassen, bis die Bromphenolblaufront ca. 1 cm vor dem Ende der Glasplatte angelangt ist. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel vorsichtig auf Whatman-Papier transferiert, und auf einem Geltrockner (80°C für 2 Stunden) getrocknet.

2.3.6. Auswertung der Gel-Retentionsanalyse

Erste Exponate des an Whatman-Papier getrockneten Gels werden an einem Fujix Imager (BAS 2000) ausgewertet. Dazu wird das Gel in einer Filmkassette befestigt und eine „Imagingplatte“ für 2 Stunden aufgelegt. Anschließend wird die Platte im Fujix Analyzer eingescannt, der die vom Gel auf die Imagingplatte übertragende Strahlungsenergie in elektrische Signale umwandelt, so dass eine Abbildung der Gel-Retentionsanalyse auf einem Bildschirm erscheint. Die Ergebnisse am Gerät lassen sich über einen Drucker ausdrucken und archivieren. Anschließend werden Röntgenfilme (Kodak XAR5) in der Filmkassette für 2 Tage bei – 70 °C exponiert. Der Film wird in der Dunkelkammer entnommen und entwickelt.

2.4. Zielgerichtete Mutagenese mittels PCR in Vitro

2.4.1. Vorbereitung der PCR- und Mutagenese-Primer

Die Primer werden gemäß dem Syntheseprotokoll des Herstellers in autoklaviertem Wasser gelöst und auf 100 µM eingestellt, 5 Minuten bei 50 °C im Heizblock erwärmt, Stocklösungen werden eingefroren.

Mutageneseprimer

GcmutF	ATA AAG GGG GAA AAG CAC TGA CTT
GcmutR	AAG TCA GTG CTT TTC CCC CTT TAT

Kurz vor Gebrauch werden Primer in frischen Eppendorf-Gefäßen auf die Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt (10 + 90 µl H₂O; mit Deckeletikett beschriftet!).

2.4.2. Mutagenese-PCR und Isolierung der Produkte

Der Standard-Reaktionsansatz besteht aus:

	5	µl	10 x Pfu-Polymerasepuffer,
	1	µl	Pfu-Polymerase (Stratagene)
	2,5	µl	dNTP- Mix (2,5 mM je Nukleotid, Pharmacia)
	100	ng	DNA-Matrize
	3	µl	Vorwärts-Primer (10 µM), (RV3, GCMutF)
	3	µl	Rückwärts-Primer (10 µM), (RV2, GCMutR)
Ad	20	µl	H ₂ O

Für n Reaktionen alle Volumina mal n + 1 als Mastermix auf Eis vorbereiten.

Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit
1 Denaturierung	94°C	3 Minuten
2 Denaturierung	94°C	40 Sekunde
3 Primerbindung	50°C	40 Sekunde 22x
4 Extension	72°C pro 1 kb	60 Sekunde
5 Extension	72°C	5 Minuten

Nach Ablauf der Reaktion werden Ansätze mit 1/20 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und das gesamte Volumen wird über ein 1,5-2 %iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetrennt. Die Banden werden auf dem Transilluminator ausgeschnitten und in vorher beschriftete Eppendorf-Gefäße eingesetzt. Die PCR-Fragmente werden aus dem Gel mittels Spin-Columns vom Jetsorb Kit isoliert.

2.4.3. Rekombinations-PCR und Isolierung der Produkte

Anschließend wird eine Rekombinations-PCR mit den End-Primern (RV3 und RV2) angesetzt. Bei der Rekombinations-PCR werden das 5' PCR-Fragment und das 3' PCR-Fragment vereinigt. Zur Erhöhung der Ausbeute werden pro Mutante 2 identische Ansätze hergestellt.

Abgewandelter Reaktionsansatz aus:

5	µl	10x Pfu-Polymerasepuffer
1	µl	Pfu-Polymerase,
3	µl	dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid),
3	µl	Vorwärts-Primer (10 µM)
3	µl	Rückwärts-Primer (10 µM)
<hr/>		
ad 50	µl	H ₂ O

Für jede Reaktion separat die entsprechenden Primer im 0,5 ml RG vorlegen

4	µl	Eluat des 5'-PCR-Fragments
4	µl	Eluat des 3'-PCR-Fragments

Für 2 n Reaktionen alle Volumina mal 2 n + 1 als Mastermix auf Eis vorbereiten.

Das PCR-Temperaturprogramm von Abschnitt 2.5.2 wird verwendet. Bei Bedarf wird die Extensionszeit erhöht. Die Banden werden wie oben beschrieben mit der Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Banden, die subkloniert werden sollen, werden ausgeschnitten und über Kopplung an eine Glasmatrix von Spin-Columns (Jetsorb, GENOMED) aus dem Gel aufgereinigt. Die Gel-Extraktion wird mit 50 µl H₂O eluiert.

2.4.4. Klonierung der Mutante in den pGL3-Basic-Vektor und den pGL3-Enhancer-Vektor

Die im Abschnitt 2.1. beschriebenen Techniken werden in analoger Weise zur Klonierung der mutierten Promotorfragmente in den pGL3 Vektor angewendet. Dazu werden die PCR-Produkte und pGL3 Vektoren mit den Restriktionsenzymen Sac I und Hind III verdaut.

2.5. Werkzeuge zur Sequenzanalyse und Dokumentation

Die DNA Sequenzanalyse wird mittels des Programme DNA-Star und Sequencher durchgeführt. Die RT6 Promotorstrukturanalyse und die Untersuchung der Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren werden mit Hilfe der BCM Search Launcher und der Datenbank MatInspector / TRANSFAC (Transcription factor Database) und eukaryotic Promotor Prediction by Neural Network durchgeführt. Die Dokumente werden mit Microsoft Office 98, Word, Excel, PowerPoint, Endnote 3.0, Canvas 6.0, Adobe-PhotoShop 5.0, präsentiert und mit Cricket Graphik 3.0, Sigma Plot 5,0 ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Molekulare Sequenzanalyse des RT6-Promotors

Ein typisches eukaryotisches Gen kann bis zu vier verschiedene modulatorische Kontrollelemente der Transkription enthalten. Erstens gibt es den Promotor selbst, der oft eine TATA-Box enthält; zweitens sind unmittelbar stromaufwärts vom Promotor Elemente vorhanden, die für die effiziente Transkription in allen Zelltypen verantwortlich sind; drittens sind weitere Elemente zwischen den stromaufwärts gelegenen Promotorelementen eingebettet, die Gene in bestimmten Geweben oder als Reaktion auf bestimmte Stimuli aktivieren. Schließlich findet man zusätzlich die weiter entfernt liegenden Enhancerelemente, die die Genaktivität entweder in allen Geweben erhöhen oder selbst reguliert werden (Neurath et al., 1997).

Voraussetzung für die Initiation der Transkription ist, daß die Transkriptionsfaktoren in einer bestimmten Ordnung einen Komplex bilden, an den die RNA-Polymerase bindet. Kurze Sequenzelemente, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden, liegen meist stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts.

Als methodischen Ansatz zur Untersuchung der Regulation der RT6-Gen-Expression habe ich folgende Experimente durchgeführt: die Sequenzanalyse mit Hilfe einer auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen spezialisierten Datenbank, Reporter-Gen Assays, Mobility-Shift-Untersuchungen, sowie *in vitro* Mutagenese.

3.1.1. Strukturelle Komponenten des RT6-Promotors

Aus der Untersuchung von cDNA-Klonen wurden acht Exons und zwei Transkriptionsstartstellen (TSS) des RT6-Gens identifiziert (Kuhlenbäumer et al., 1997). Funktionelle Analysen der mit TSS1 und TSS2 verbundenen Promotor-Regionen zeigten, daß in EpSM30 Zellen der Promotor vor TSS2 stärker wirkt als derjenige vor TSS1 (Haag et al., 1996).

Ein ca. 1,2 kb 5' von Exon 2 bis ca. 200 bp 3' von Exon 2 umfassendes Fragment des RT6-Promotors wurde aus genomischer DNA der Sprague Dawley Ratte kloniert und sequenziert (Kuhlenbäumer, 1996). Dieser im Bereich von Exon 2 gelegene Hauptpromotor wurde zur Vorhersage potentieller Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit der TRANSFAC Datenbank (The Transcription Factor Database) (Knüppel et al., 1994;

Promotor-Elemente wie TATA und CCAAT-Boxen werden in angemessenen Positionen gefunden.

Im Bereich von Exon 2 findet sich ein AP Element. Die Zusammensetzung und Expression des AP-1-Komplexes ist wichtig für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten. Am Transkriptionsstart befindet sich ein CACCC-Element (+3/+7). Die CACCC-Box ist ein Kernmotiv (minimal essential binding site) von Bindungssequenzen der KLF (Krüppel-like factors) Familie (Anderson et al., 1995; Miller and Bieker, 1993).

An der Position -29 bis -23 befindet sich eine potentielle TATA-Box (GATAAAG). Unmittelbar 5' der TATA-Box findet man ein nahezu ideales Ets-1 Bindemotiv (-41/-31), und ein IRF1/2 (Interferon Regulatory Factor 1/2) Bindemotiv (-55 bis -43). Die IRF-1/2 Stelle ist in eine Reihe von c-Myb und c-Myc / Max Stellen eingebettet.

Im Bereich -65 / -70 vor dem Transkriptionsstart 2 findet man eine invertierte CCAAT-Box. CCAAT-Boxen befinden sich meist im Bereich zwischen den Nukleotiden -50 und -100. Eine weitere putative Bindestelle existiert für die Faktor GATA an der Position -153 bis -148.

Zusätzlich finden sich auch Elemente, die in den regulatorischen Regionen T-Zell-spezifischer Gene vorkommen. Unter diesen sind die NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Stelle (-716 bis -707), das Ikaros Bindemotiv (-715 bis -703), NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) (GGAAAA) und die Lyf-1 (Lymphocyte Factor 1) Stelle an Position -478 bis -470 zu finden. Die NF- κ B Stelle überlappt mit einem Ikaros- und NF-AT-Bindemotiv.

Die Sequenzen der Bindestellen für putative Transkriptionsfaktoren sind in **Tabelle 1.** in 5'→3' Richtung aufgelistet.

Tabelle 1. potenzielle Bindestellen für Transkriptions-Faktoren im RT6-Promoter.

Inspecting sequence RT6-Promotor 2 (1 - 1509):

matrix name	matrix position(str)	core simil.	matrix simil.	sequence
GATA1	480 (+)	1.000	0.994	agggGATAAatggg
NFKB	524 (-)	1.000	0.882	ctGGGAactacctg
NFKAPPAB	526 (-)	1.000	0.915	GGGAactacc
IK1	527 (-)	1.000	0.920	ctctGGGAactac
IK2	528 (-)	1.000	0.960	ctctGGGAacta
NFAT	535 (+)	1.000	0.974	cagagGAAAActc
LYF1	764 (-)	1.000	0.916	cttGGGAgg
TATA	869 (-)	1.000	0.944	ataTAAAatgtcgat
TATA	1212 (+)	1.000	0.862	ggaTAAAgggggccc
IRF1	1187 (+)	1.000	0.912	tgaaagtGAAAgc
IRF2	1187 (+)	1.000	0.890	tgaaagtGAAAgc
MYCMAX	1195 (+)	1.000	0.828	aaagCACGttgtcc
GATA1	1085 (-)	1.000	0.923	ctaaGATAgtttt
GATA1	1085 (-)	1.000	0.929	tctaaGATAgtttt
CAAT	1170 (-)	1.000	0.880	gacatCCAAtag
CMYB	1137 (-)	1.000	0.819	aattaggtagGTTGcatt
CMYB	1148 (+)	1.000	0.829	cctaatttaaGTTGgtca
CMYB	1192 (+)	1.000	0.822	gtgaaagcacGTTGtcca
CMYB (TSS2)	1237 (-)	1.000	0.834	aaaaacgggtGTTGcaga
CETS1	1209 (+)	0.926	0.877	acAGGAtaaa
AP	1270 (-)	1.000	0.976	ggCAGCggg
MZF1	1323 (+)	1.000	0.960	gaaGGGGa
MZF1	1344 (+)	1.000	0.986	agaGGGGa

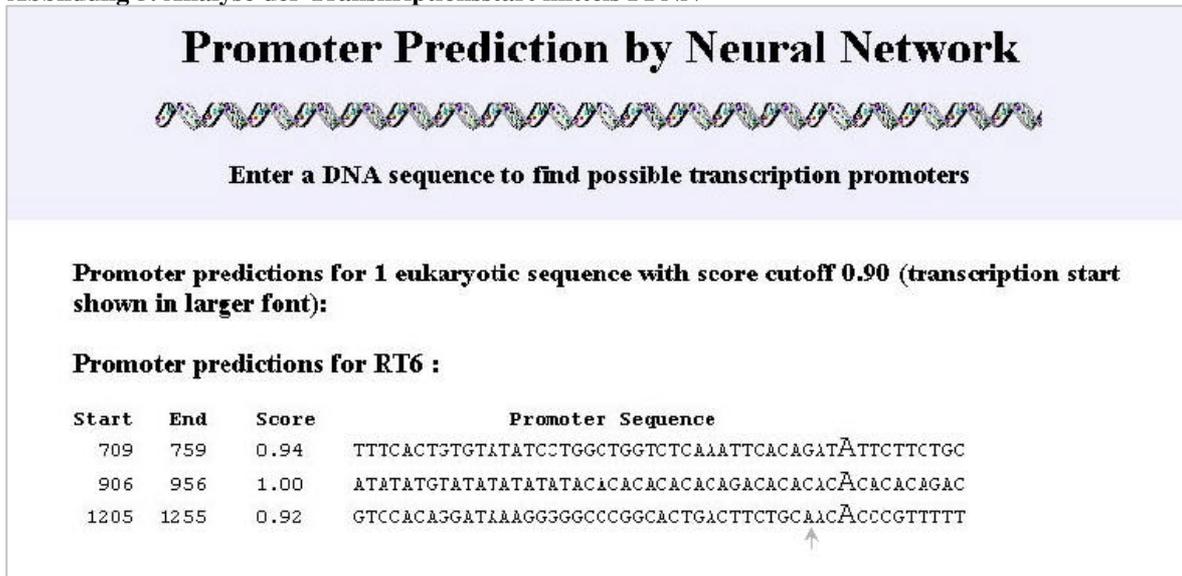
Durch Vergleich mit der TRANSFAC Datenbank, die Konsensussequenzen transaktivatorbindender DNA-Abschnitte enthält, wird eine Reihe von putativen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in diesem Bereich identifiziert. Die Kernmotive sind in der Tabelle groß gekennzeichnet.

3.1.2. Analyse des Transkriptionsstarts mittels Promotor Prediction Programm

Das Programm "Promotor Prediction by Neural Network" (PPNN) ist eine Methode zum Auffinden von eukaryotischen und prokaryotischen Promotoren in einer DNA-Sequenz.

Die RT6-Promotorsequenz wird mit dem PPNN analysiert. Nach Analyse durch das Netzwerk werden die in **Abb. 5** angegebenen drei Sequenzabschnitte als potentielle Transkriptions-Startstellen gefunden. Ein Startpunkt davon, der dritte, befindet sich unmittelbar 3 bp nach der experimentell definierten RT6-TSS2 (Haag et al., 1996). Der Autor des Programms behauptet, daß die Vorhersagegenauigkeit der Transkriptionsstartpunkte +/-3 bp beträgt.

Abbildung 5. Analyse der Transkriptionsstart mittels PPNN



Das Ergebnis von PPNN ergibt eine Liste von Sequenzabschnitten von 51 Basen, die sich über den Bereich von -40 bis +11 des potentiellen Promotors erstrecken. In der PPNN Analyse werden 3 mögliche Startpunkte des RT6-Promotors vorhergesagt. Die Nukleotide, die als Startpunkt in Frage kommen, sind groß dargestellt. Der experimentell ermittelte Transkriptionsstartpunkt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Grundlage für die Vorhersage einer Transkriptions-Startstelle durch das PPNN-Programm besteht vor allem aus zwei Teilen: zum einen die Erkennung der TATA-Box, zum anderen die Erkennung des „Initiator-Elements“. Als Initiator wird der Sequenz-Abschnitt bezeichnet, der sich um den Transkriptionsstart erstreckt. Das Nukleotid +1 eukaryontischer Gene ist meistens ein Adenin (Bucher and Trifonov, 1986). Hinzu kommt, daß sich im „richtigen“ Abstand eine putative TATA-Box befindet. Beide Teile werden in einer Ausgabeeinheit kombiniert, die Wahrscheinlichkeitswerte zwischen 0 und 1 angibt. Diese Methode wird genau in (Reese, 1996; Reese, 1995) beschrieben.

3.2. Funktionelle Charakterisierung des RT6-Promotors in Reporter-Gen-Assays

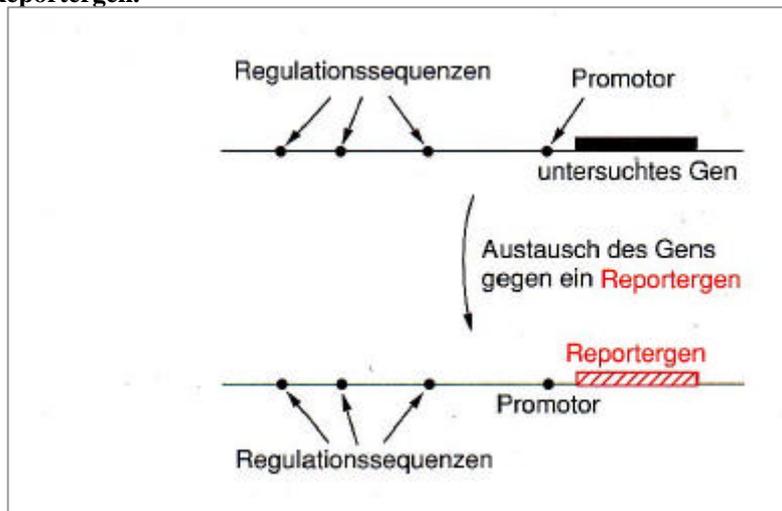
Zur Untersuchung der RT6-Promotoraktivität werden die Promotorbereiche des RT6-Gens in den Vektor pGL3 kloniert, welcher als Reporter-Gen das Luziferase-Gen enthält. Durch Reporter-Gen-Analysen wird es möglich, relevante Abschnitte des RT6-Promotors zu identifizieren.

3.2.1. Luciferase – Expressionsvektoren

Um die spezifische Aktivität eines Promotors in Zellen zu untersuchen, in denen das zugehörige Gen normalerweise exprimiert wird, setzt man ein heterologes Gen in einem geeigneten Vektor unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotor-Abschnittes. Das

heterologe Gen, welches leicht nachzuweisen sein muß, wird **Reporter-gen** genannt (**Abb. 6**).

Abbildung 6. Reporter-gen.

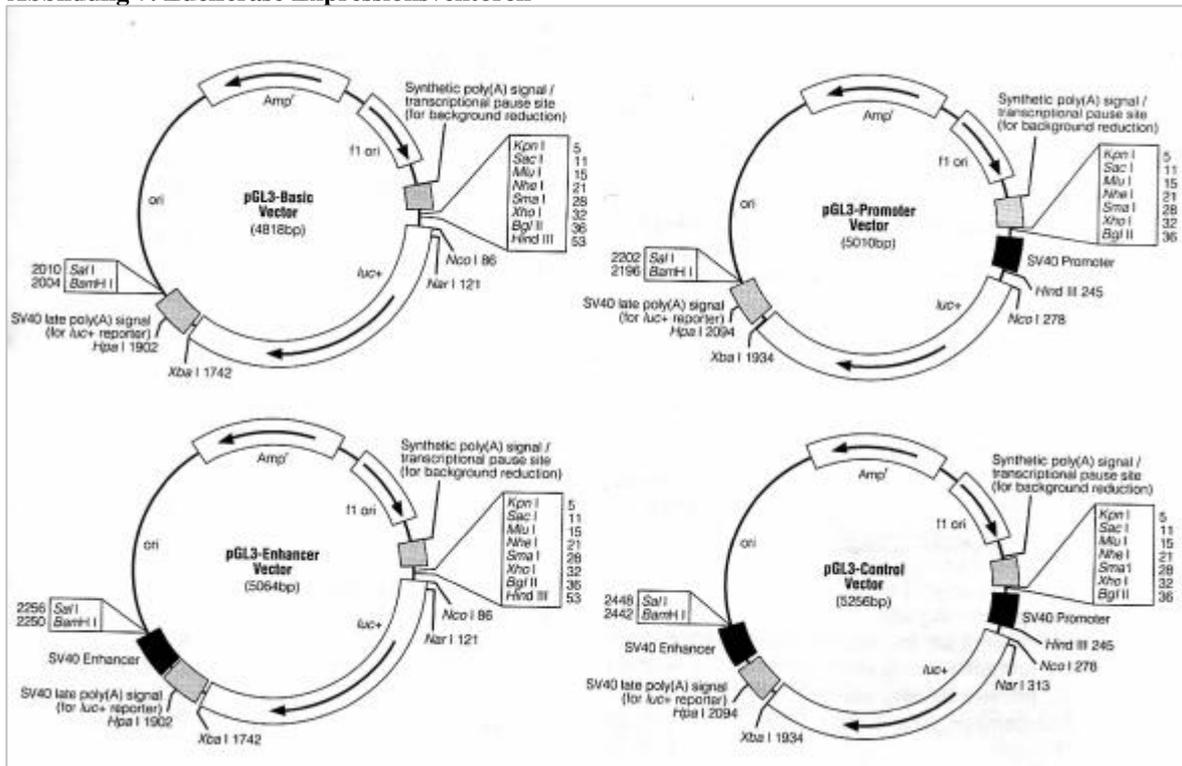


Man benutzt ein Reporter-gen, das mit der stromaufwärts gelegenen Region des klonierten Gens verknüpft ist und dieses ersetzt. (Abbildung aus T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger 1996).

Ein solches Reporter-gen muß man sorgfältig auswählen. Zuerst muß es einen Phänotyp codieren, den der Wirtsorganismus von sich aus noch nicht besitzt. Außerdem muß der Phänotyp des Reporter-gens nach der Klonierung relativ leicht nachzuweisen sein, und im Idealfall sollte man ihn auch quantitativ bestimmen können (Brown, 1996).

Zur Untersuchung der Promotor-Funktion werden die Vektoren aus der pGL3-Serie (Promega) verwendet, welche ein modifiziertes Luciferase-gen als Reporter-gen tragen (**Abb. 7**). Das Luciferase-Gen wird aus drei Organismen gewonnen: den Leuchtbakterien *Vibrio harveyii* und *V. fischeri* sowie dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* (Brown, 1996). Ein Luciferaseaktivität-Assay ist mit Hilfe eines Luminometers schnell, einfach und sensitiv durchzuführen. In **Abbildung 7** sind Luciferase-Reportervektoren dargestellt, wie sie von der Firma Promega kommerziell angeboten werden.

Abbildung 7. Luciferase Expressionsvektoren



Die Firma Promega bietet eine Reihe von Luciferase-Expressions-plasmiden an (GeneLight[®], pGL-Expressions-Vektoren). Es stehen für das Luciferasegen vier verschiedene Vektoren zur Verfügung, nämlich pGL3-Basic-, pGL3-Promoter-, pGL3-Enhancer-, und pGL3-Control-Vektor.

Diese Vektoren basieren auf pUC19. Alle Vektoren für Reporterstudien, wie andere Plasmide, enthalten auch bestimmte Sequenz-Abschnitte, die für die Funktion des Plasmids wichtig sind. Solche Sequenzen sind zum einen ein bakterieller Replikations-Startpunkt, der die Vermehrung des Vektors in *E. coli* ermöglicht, zum anderen ein Antibiotika-Resistenzgen für die Selektion des rekombinierten Plasmids sowie eine Vielzahl von Restriktions-Schnittstellen, in die fremde DNA- Sequenzen eingefügt werden können. Die eukaryotische Transkriptions-Einheit umfaßt Sequenzen, die das Reporter-gen codieren, Intron-Sequenzen, die das Spleißen des Transkripts ermöglichen, sowie Polyadenylierungssignale, die die Stabilität der Transkripte innerhalb der transfizierten Zellen erhöhen (Neurath et al., 1997).

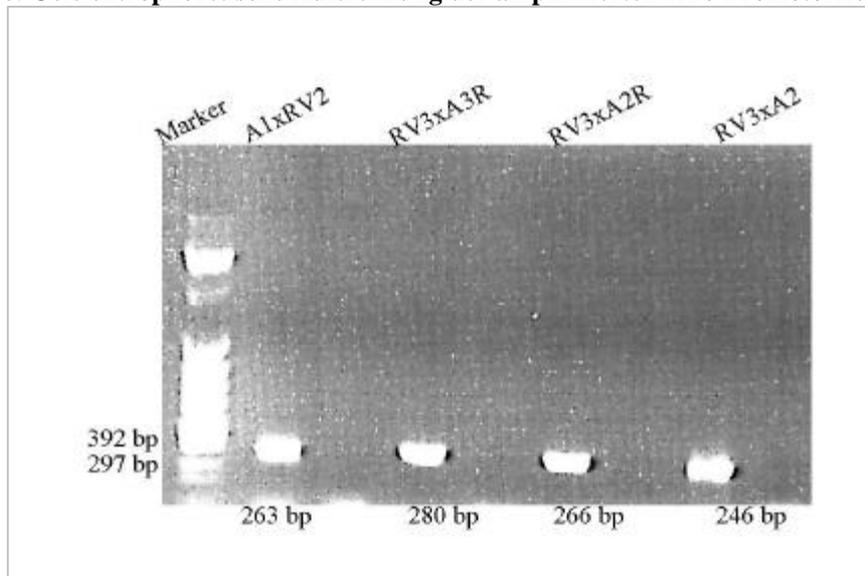
Die Vektoren der pGL3-Serie besitzen zusätzlich ein zweites Polyadenylierungssignal stromaufwärts vor dem Luciferasegen. Dieses Signal terminiert unerwünschte RNA-Transkriptionsvorgänge, die unter Umständen in Säugerzellen stromaufwärts vom Luciferasegen an Plasmidsequenzen initiiert werden. So wird gewährleistet, daß das Reporter-gen nicht von der beliebigen Sequenz aus, sondern nur von der zu untersuchenden Sequenz aus, abgelesen wird.

3.2.2. Molekulare Klonierung der RT6-Promotorfragmente in den pCR 2.1Vektor

Um funktionelle Abschnitte im *RT6*-Promotor zu lokalisieren und die regulatorischen Elemente zu ermitteln, wird eine Reihe Luciferase-Gen-Konstrukte, die interessante Promotorfragmente des *RT6^b* Gens enthalten, aufgrund der bisherigen Untersuchungen hergestellt.

Zuerst werden die verschiedenen Fragmente des *RT6*-Promotors mittels PCR amplifiziert. Zur PCR-Amplifikation (**Abb. 8**) werden zum einen Primer (A3R, A2R, A2, A1), die von dem *RT6*-Promotor abgeleitet sind, zum anderen Primer (RV3, RV2), die von der Vektorsequenz abgeleitet sind, verwendet. Als Matrize wird das bereits klonierte Konstrukt pGL3bA/AFB+150, welches den Promotorbereich von -85 bis + 150 enthält, verwendet.

Abbildung 8. Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten RT6-Promotorfragmente

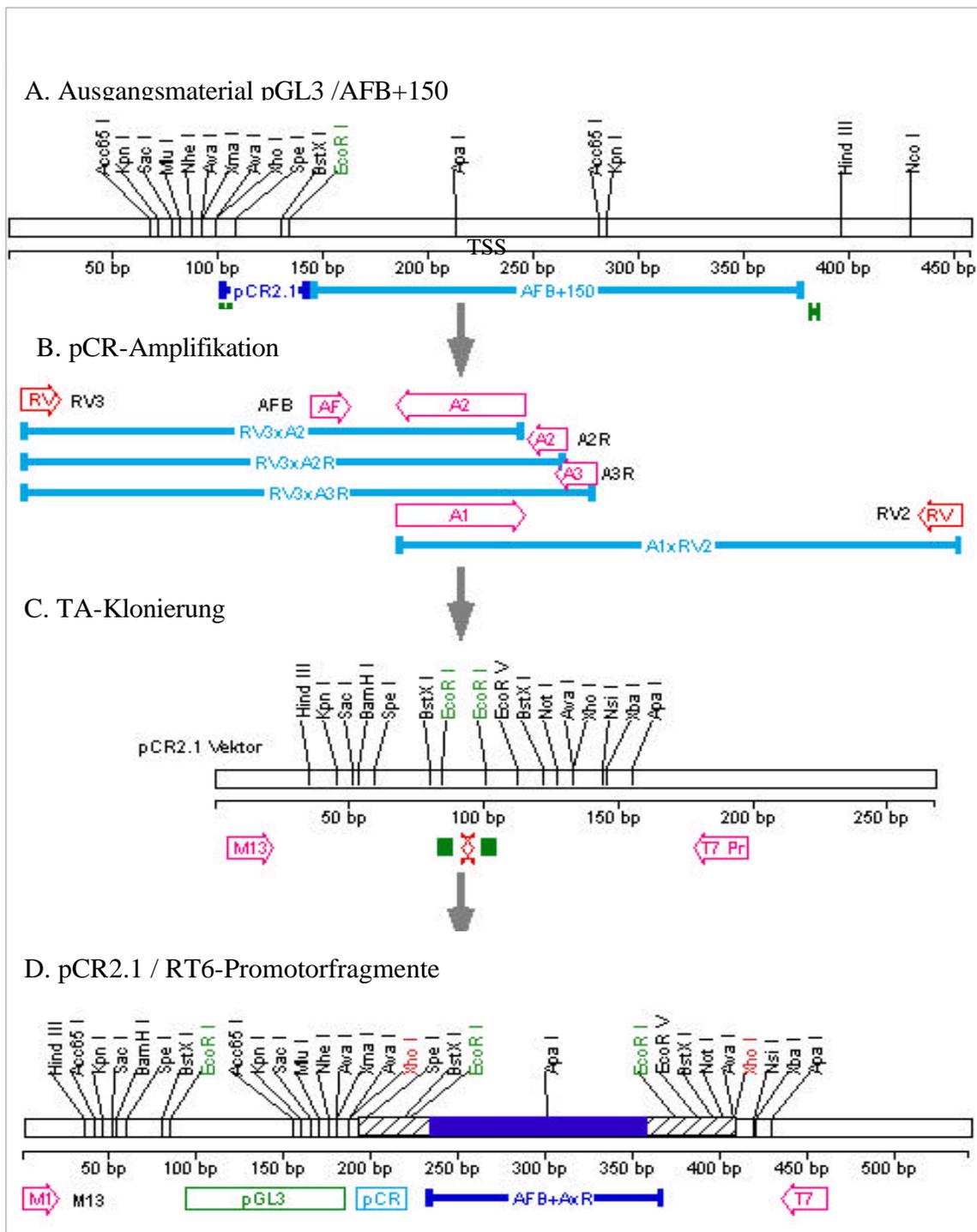


Die gewünschten DNA-Abschnitte werden mit spezifischen Primerpaaren aus pGL3 DNA und Matrizen durch PCR amplifiziert. Die PCR Amplifikationsprodukte aus dem *RT6*-Promotorbereich sind in einem mit Ethidiumbromid gefärbtem Agarosegel dargestellt. In der äußersten Spur ist ein Molekulargewichtsmarker (λ DNA-Hind III/ ϕ x-174 DNA-Hinc II Digest) aufgetragen. Über dem Gel stehen die eingesetzten Primer.

Mit unterschiedlichen Primerpaaren (A1*RV2, RV3*A3R, RV3*A2R, RV3*A2) aus dem *RT6*-Promotor und dem Vektor werden DNA-Fragmente zwischen 250 und 300 bp aus dem pGL3bA/AFB+150-Konstrukt amplifiziert. In der **Abb. 8** sind die erwarteten Banden zu erkennen.

Nach PCR-Amplifikation werden die PCR Produkte in den Plasmidvektor pCR 2.1 kloniert (**Abb. 9**). Der Vektor pCR 2.1 kann PCR-Produkte, die an ihren 3'-Enden ein überhängendes Adenin tragen, direkt aufnehmen, ein Vorgang, der als „TA-Klonierung“ bezeichnet wird. Hierzu wird das TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet.

Abbildung 9. Schematische Darstellung der Klonierung der RT6-Promotorbereiche in den pCR 2.1

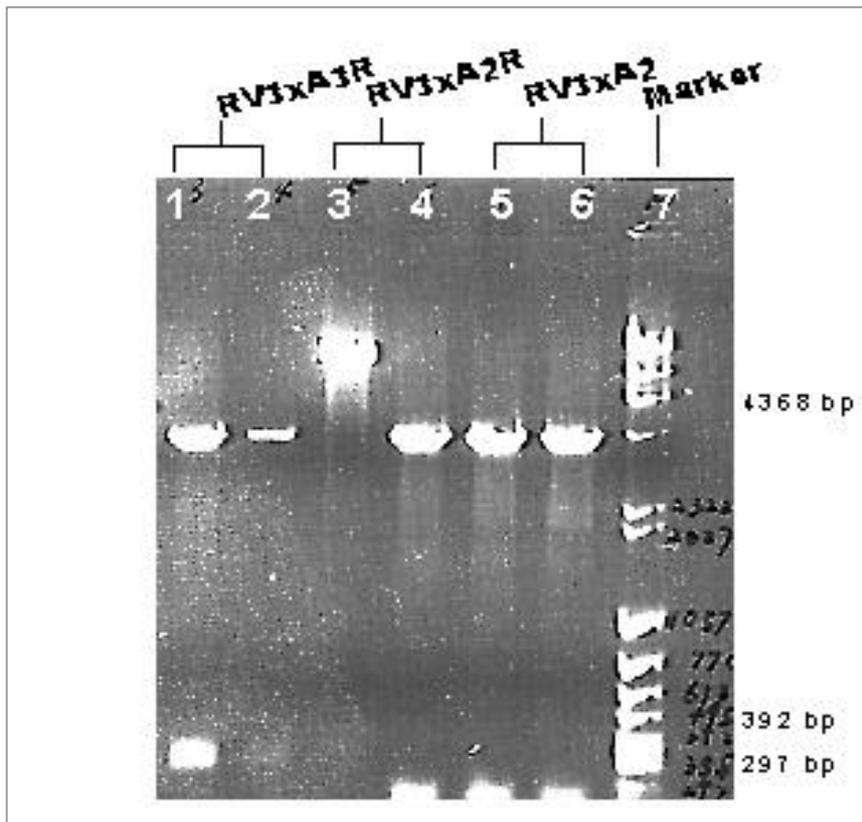


Diese Abbildung stellt A. Matrix, B. PCR-Amplifikation, C. TA-Klonierung und D. pCR 2.1 Konstruktarte dar. Ausgewählte RT6-Promotorbereiche, welche sich in ihren 5'- und 3'-Enden, sowie in den von ihnen enthaltenen vorhergesagten Transkriptionsfaktor-Bindestellen unterscheiden, werden mittels PCR amplifiziert. Als Primer werden AFB, A2, A2R, A3R und RV2, RV3 verwendet. Die RV3 x A2, RV3 x A2R, RV3 x A3R und A1 x RV2 sind PCR-Amplifikate. Die Produkte werden dann in den Vektor pCR 2.1 kloniert.

Nach erfolgreicher Klonierung wird die rekombinierte DNA in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Um zu prüfen, ob Bakterienkolonien ein Plasmid mit dem richtigen Insert enthalten, werden Restriktionsverdau der DNA-Minipreps als Screeningverfahren nach Transformation der pCR 2.1 Konstrukte und PCR-Screening angewendet. Die gereinigte

DNA wird mit dem Restriktionsenzym EcoR I behandelt, das auf beiden Seiten des Inserts schneidet (**Abb. 10**).

Abbildung 10. Restriktionsverdau der PCR-Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease EcoR I



Verschiedene pCR 2.1 Klone werden mit EcoR I verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Um die DNA sichtbar zu machen, erfolgte eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid und anschließend UV-Bestrahlung. In der letzten Spur wird ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Dabei befindet sich in zwei nebeneinanderliegenden Spuren DNA aus Klonen, die mit dem gleichen Konstrukt transformiert worden sind. Die im Gel langsamer laufenden obere Banden sind die geschnittenen Vektoren, die schneller migrierenden das Insert.

In den Spuren 1, 4, 5 und 6 sind die erwarteten Banden bei ca. 300 bp zu finden. Die klonierten Fragmente werden sequenziert, und die korrekten Konstrukte werden zur weiteren Klonierung genutzt.

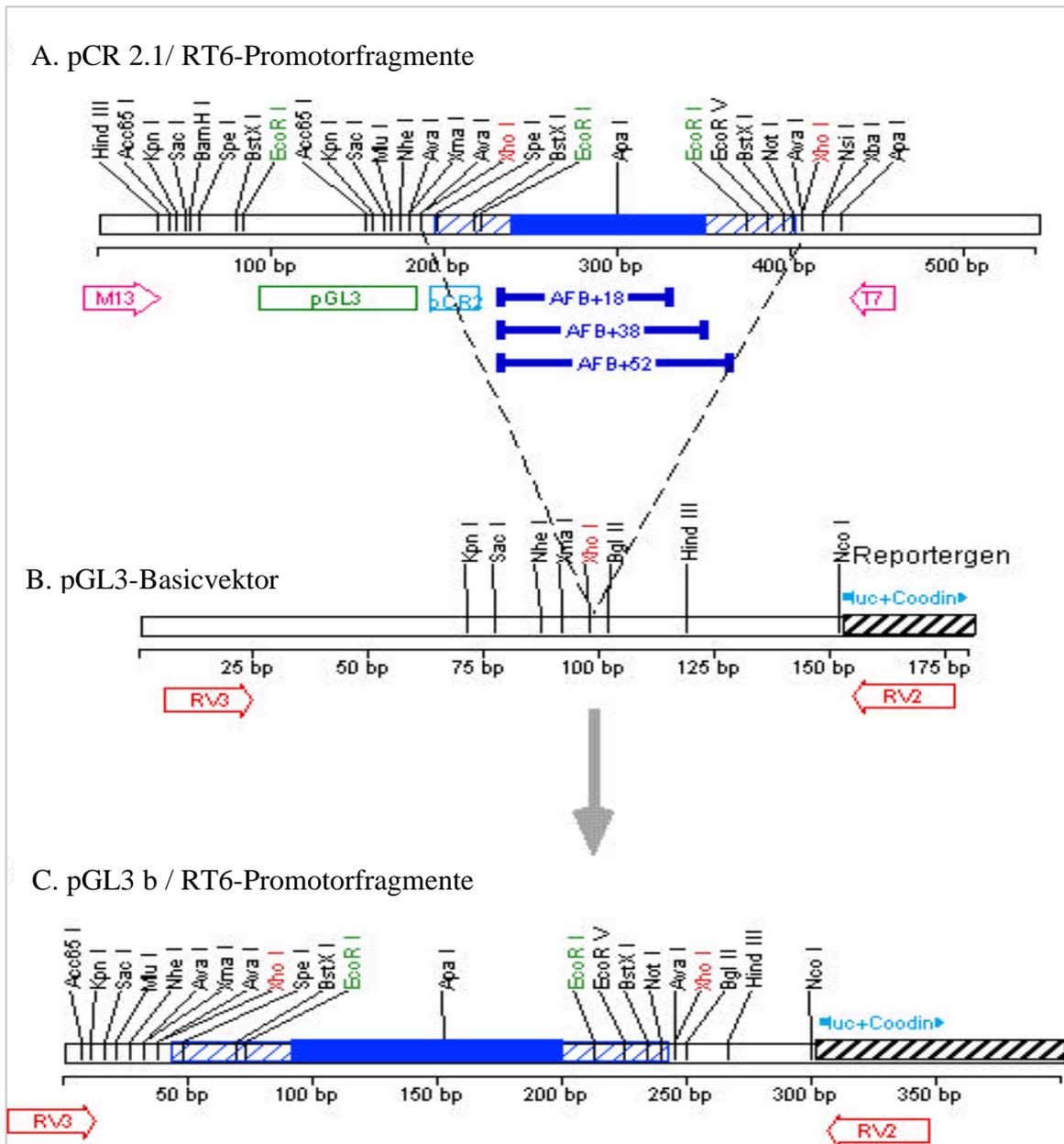
3.2.3. Umklonierung von RT6^b Promotorbereichen in den pGL3 Basic-Vektor

Eine sequenzspezifische Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen wird nach DNA-Präparation zum einen zum Zwecke der Herstellung der einzelnen rekombinanten RT6 enthaltenden Plasmide, zum anderen zur Überprüfung der klonierten Plasmide durchgeführt.

Nach Restriktionsverdau werden die DNA-Fragmente in den pGL3 Vektor, der zur Analyse der transkriptionellen Aktivität der Promotor-Abschnitte in Reporter-gen-Studien dienen kann, umkloniert. Dies geschieht durch Herausschneiden der Promotorfragmente

aus pCR 2.1 mit entsprechenden Restriktionsenzymen, und anschließender Klonierung in die Schnittstellen des pGL3 Vektors (Abb. 11).

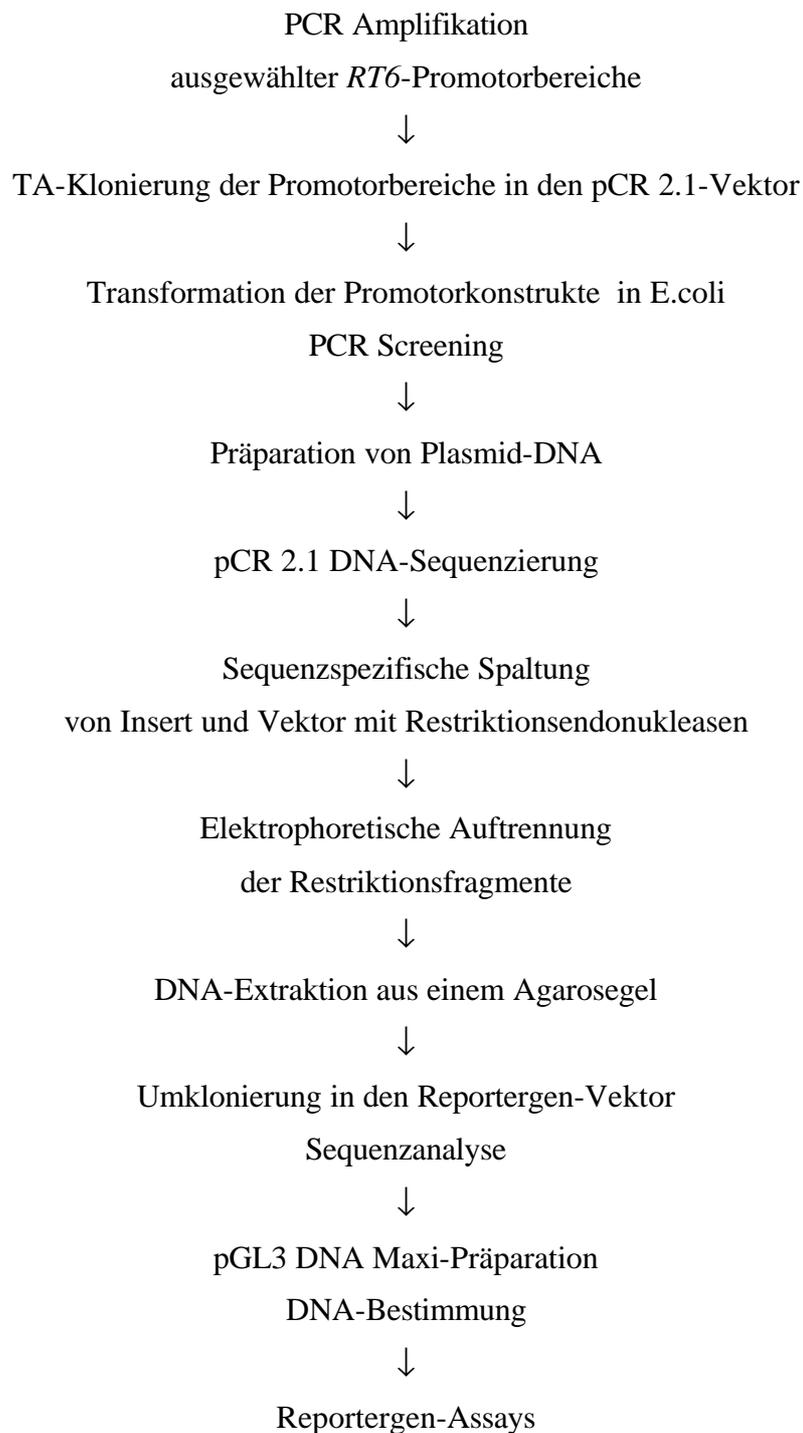
Abbildung 11. Klonierungsstrategie der RT6.2 Reporter-Gen-Konstrukte



Die ausgewählten RT6-Promotor-Bereiche werden durch Xho I Restriktionsverdau in den pGL3-Basicvektor umklontiert. A: Multiple Cloning Site (MCS) der pCR 2.1 Konstrukte, B: MCS des pGL3-Basicvektors, C: MCS der pGL3 Konstrukte.

3.2.4. Überblick der Konstrukte-Herstellung für die Reporter-gen-Assays

Das folgende Fließschema gibt einen Überblick über die Strategie zur Klonierung ausgewählter Promotorabschnitte in den pGL3 Vektor.

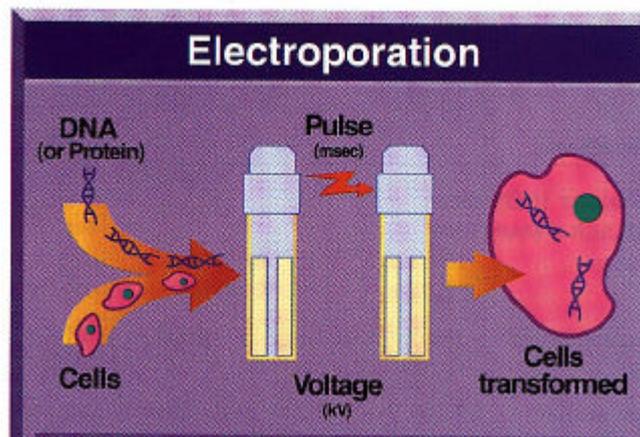


3.2.5. Reportergen-Assays mittels der Transfektion durch Elektroporation

Um die DNA in Zellen zu transfizieren, wird die Transfektionsmethode der Elektroporation verwendet, bei der durch Anlegen eines elektrischen Feldes DNA in Zellen eingebracht werden kann (**Abb. 12**).

Die Anforderungen, die an die Transfektionsmethode gestellt werden, bestehen darin, eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen und möglichst auch schwer zu transfizierende Zellen (T-Zellen) zur Expression des Reportergens zu bringen.

Abbildung 12. Prinzip der Elektroporation



Bei einer Vielzahl von Säugerzellen führt das Anlegen eines kurzen Hochspannungsimpulses vorübergehend zur Bildung von nanometergroßen Poren in der Plasmamembran. Die DNA gelangt entweder direkt durch diese Poren ins Cytoplasma oder infolge der Umverteilung der Membrankomponenten bei der Schließung der Poren. (Abbildung aus BioRad Katalog 1999)

In Vorversuchen wird ermittelt, daß eine optimale transiente Expression bei EpD3 Zellen und Fibroblasten mit einer Spannung von 300 V/cm erreicht wird, und bei NK-Zellen die Spannung 250 V/cm beträgt.

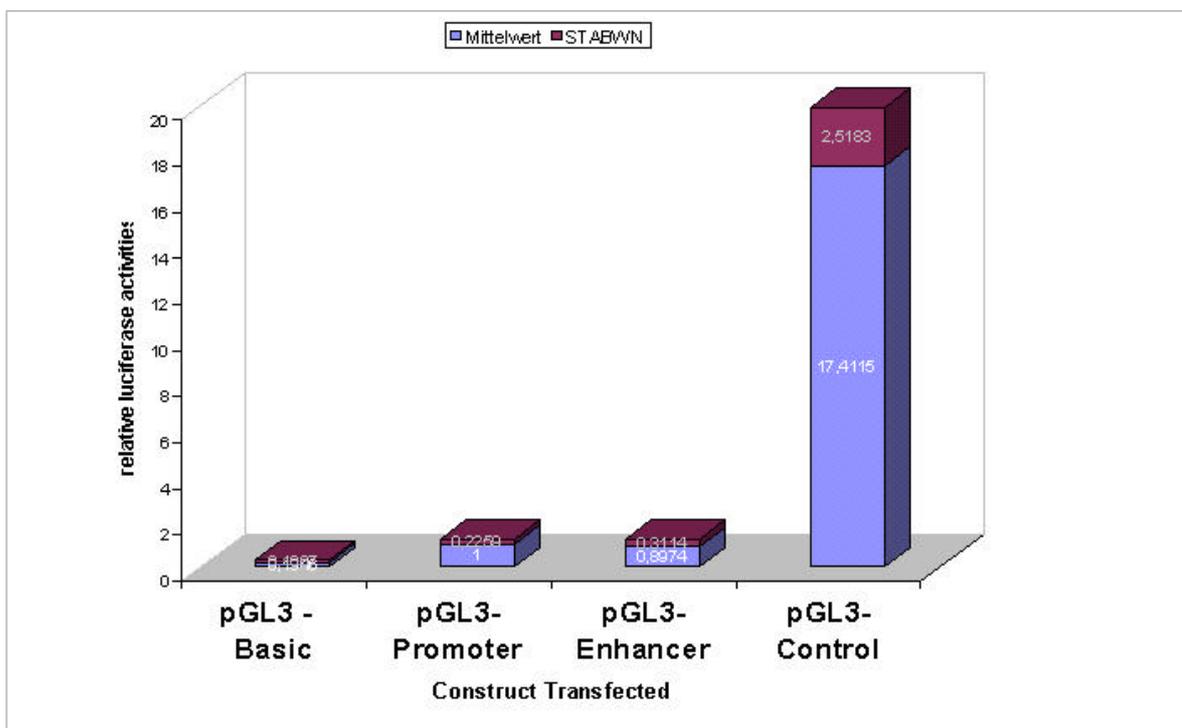
Die Reportergen-Konstrukte werden in transienten Transfektionen mittels Elektroporation auf ihre Aktivität in Zelllinien, die aus lymphatischen sowie nicht-lymphatischen Zellen abgeleitet sind, untersucht. Nach der Transfektion des Konstrukts ist die ins Cytosol abgegebene Menge des Transgenprodukts (der von den Zellen produzierten Luciferase) ein Maß für die Promotorstärke des klonierten Fragments. In dem folgenden Reportergen-Assay stellen die Balken den Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar, die Standardabweichung (STABWN) ist angegeben.

3.2.6. Luciferaseaktivität der pGL3 Vektoren in EpD3-Zellen

Mit Reportergen-Assays kann man nicht nur die Regulations-Elemente lokalisieren, sondern auch die Funktion einzelner Abschnitte ermitteln.

Um die Transkription des Luciferasegens in den verwendeten Zellen zu untersuchen, werden die vier von der Firma Promega gelieferten pGL3-Vektoren in einem Vorversuch in die RT6.2 exprimierende EpD3 Zelllinie transfiziert, und ein Reportergen-Assay wird durchgeführt (**Abb. 13**).

Abbildung 13. Luciferase Expression der pGL3 Vektoren in EpD3 Zellen.



In diesen Experimenten wird die Luciferase-Expression in EpD3 Zellen, die mit den pGL3 Standard - Vektoren transfiziert werden, verglichen. Die Aktivität des SV40 Promotors wird auf 1 normalisiert.

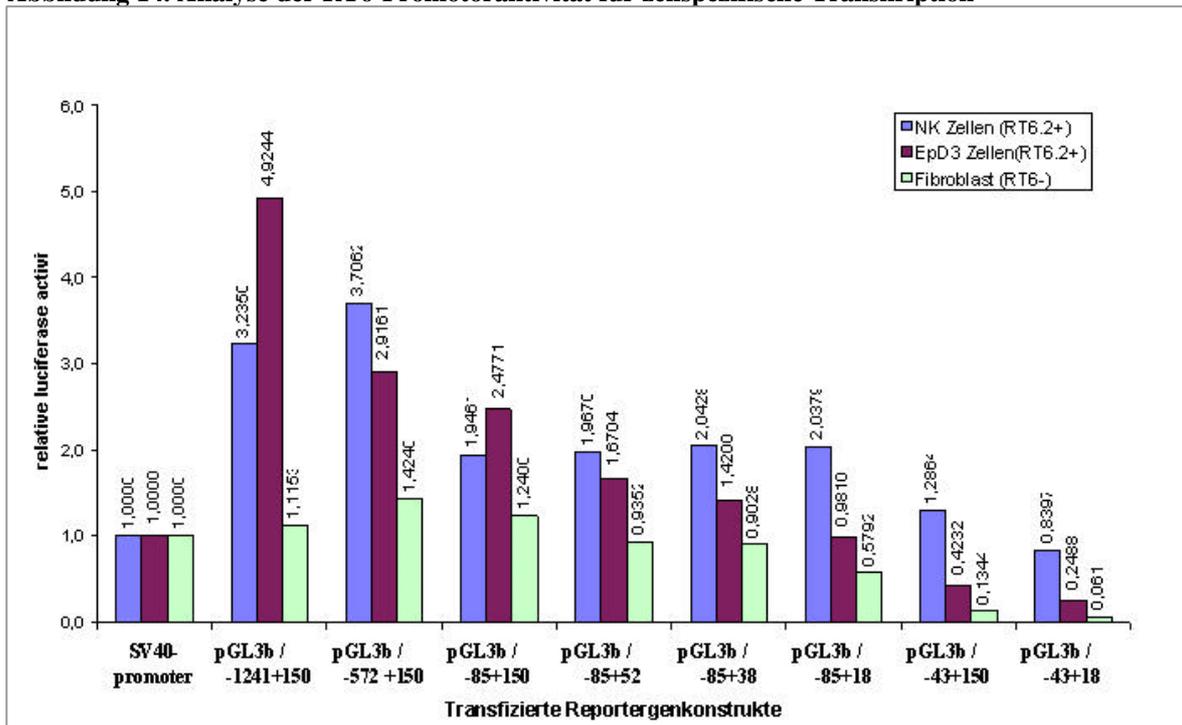
In diesen Assays stieg die produzierte Luciferase bei dem Control-Vektor deutlich an. Dieser Vektor enthält den SV40-Promotor, der in einer Vielzahl von Säugerzellen aktiv ist, und den SV40 Enhancer.

3.2.7. Funktionelle Analyse der zellspezifischen RT6-Promotoraktivität

Bestimmte Promotoren sind nur in bestimmten Geweben aktiv. Um zellspezifische Promotoraktivität zu untersuchen, werden die hergestellten Konstrukte in RT6 exprimierende und nicht-exprimierende Zelllinien mittels Elektroporation transient transfiziert und in Reportergen Assays untersucht (**Abb. 14**).

Als Zelllinien in diesen Versuchen habe ich das T-Zell Hybridom EpD3 (RT6.2⁺), eine Fusion der Thymoma Zelllinie C58NT mit Ratten T-Zellen, eine RT6.2⁺ NK-Zelllinie, sowie die RT6-negative Fibroblasten-Zelllinie Rat 1 verwendet. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aktivität der untersuchten Abschnitte des RT6-Promotors bei RT6-exprimierenden EpD3 (RT6.2⁺) und NK-Zellen (RT6.2⁺) höher als bei der RT6-nicht-exprimierenden Zelllinie (Fibroblasten) ist. Das weist auf eine lymphozytenspezifische Promotoraktivität hin.

Abbildung 14. Analyse der RT6-Promotoraktivität für zellspezifische Transkription



In Reporterger Assays wird der pGL3-Promotorvektor, welcher das Luziferasegen unter Kontrolle des SV40-Promotors enthält, als positive Kontrolle und Standard verwendet. Nach Transfektion in unterschiedliche Zelllinien wird die von den RT6-Promotorfragmenten vermittelte Promotoraktivität mit derjenigen des im pGL3-Promotorvektor enthaltenen viralen SV40 Promotors verglichen. In diesem Versuch wird die Aktivität des SV40 Promotors auf 1 normalisiert.

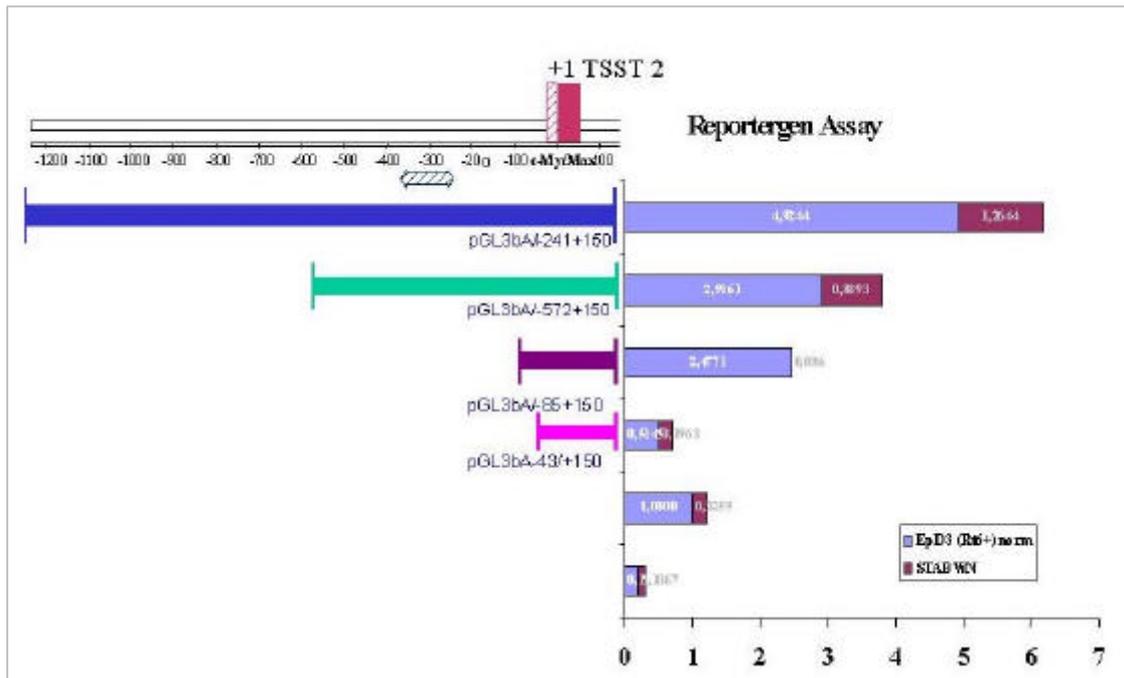
Wie in **Abb. 14** zusammenfassend dargestellt ist, ist die Promotoraktivität der meisten klonierten Fragmente in RT6⁺ Zelltypen EpD3 und NK-Zellen größer als die des SV40 Promotors. Darüberhinaus sind die Promotoraktivitäten in RT6⁺ EpD3 Zellen viel stärker als in Fibroblasten. Die Promotoraktivität in Fibroblasten ist bei den meisten Fragmenten ungefähr wie die des SV40 Promotors. Diese Befunde stärken die Hypothese, daß es sich bei dieser Region um einen zellspezifischen Promotorbereich handelt.

3.2.8. Analyse des 5'-Endes des RT6-Promotors

Zur Analyse der funktionalen 5' Promotor-Grenze werden die in **Abb. 14** gezeigten Fragmente pGL3bA/-1241+150, /-572+150, /-85+150, /-43+150 in EpD3 Zellen

transfiziert. Man beachte, daß die Promotoraktivität in Beziehung zur Größe der Promotorbereiche steht (**Abb. 15**), und eine erhebliche Absenkung der Promotorstärke zwischen Fragment $-85/+150$ und $-43/+150$ beobachtet wird. Dieses könnte auf das Vorliegen wichtiger regulatorischen Elemente in der Region zwischen -85 und -43 hindeuten. Die Deletionsexperimente mit den oben genannten Konstrukten ergaben, daß das kleinste untersuchte Promotorfragment $-43/+150$ noch eine meßbare Promotoraktivität hatte.

Abbildung 15. 5' Endanalyse des RT6-Promotors



Links sind die Promotorfragmente, rechts wird ihre Aktivität im Luciferase-Assay dargestellt. Als Zelllinie in dem Versuch wird das T-Zell Hybridom EpD3 (RT6.2⁺) verwendet. In Reporter-Gen Assays wird der pGL3-Promotorvektor als positive Kontrolle und Standard, und pGL3-Basic als negative Kontrolle verwendet. In diesem Versuch wird die Aktivität des SV40 Promotors auf 1 normalisiert.

Zur Überprüfung der klonierten Fragmente werden Restriktions-Verdaue mit Sac I und Hind III durchgeführt (**Abb. 16**).

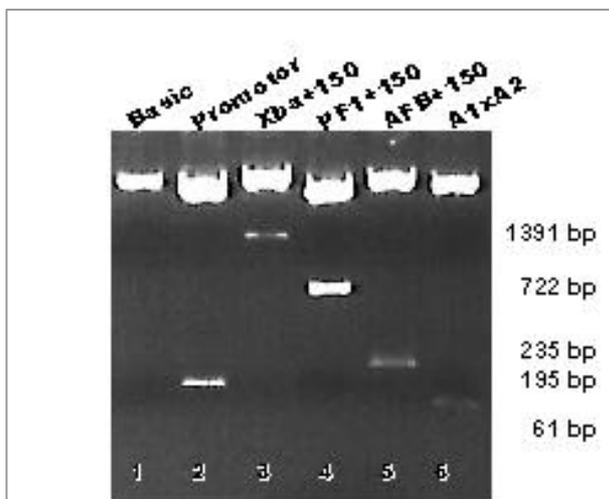


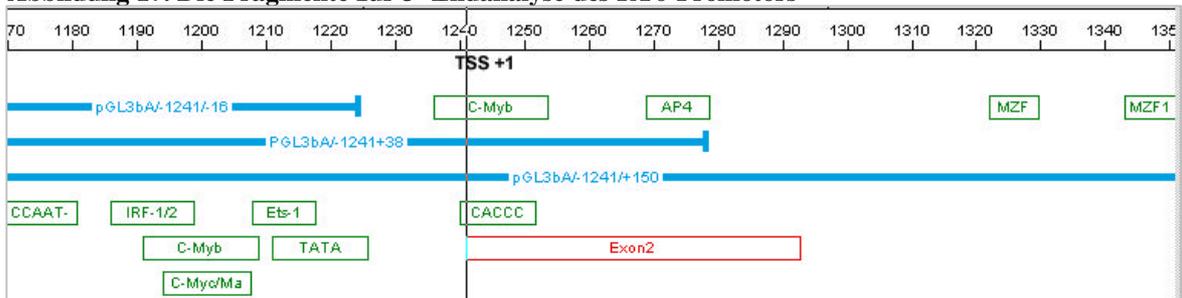
Abbildung 16. Restriktionsverdaue der pGL3-Konstrukte mit Sac I und Hind III.

Die obengenannten DNA-Fragmente der pGL3-Konstrukte sowie der Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Promotor werden in diesem Agarosegel als Bands detektiert.

3.2.9. Analyse des 3' Endes des RT6-Promotors

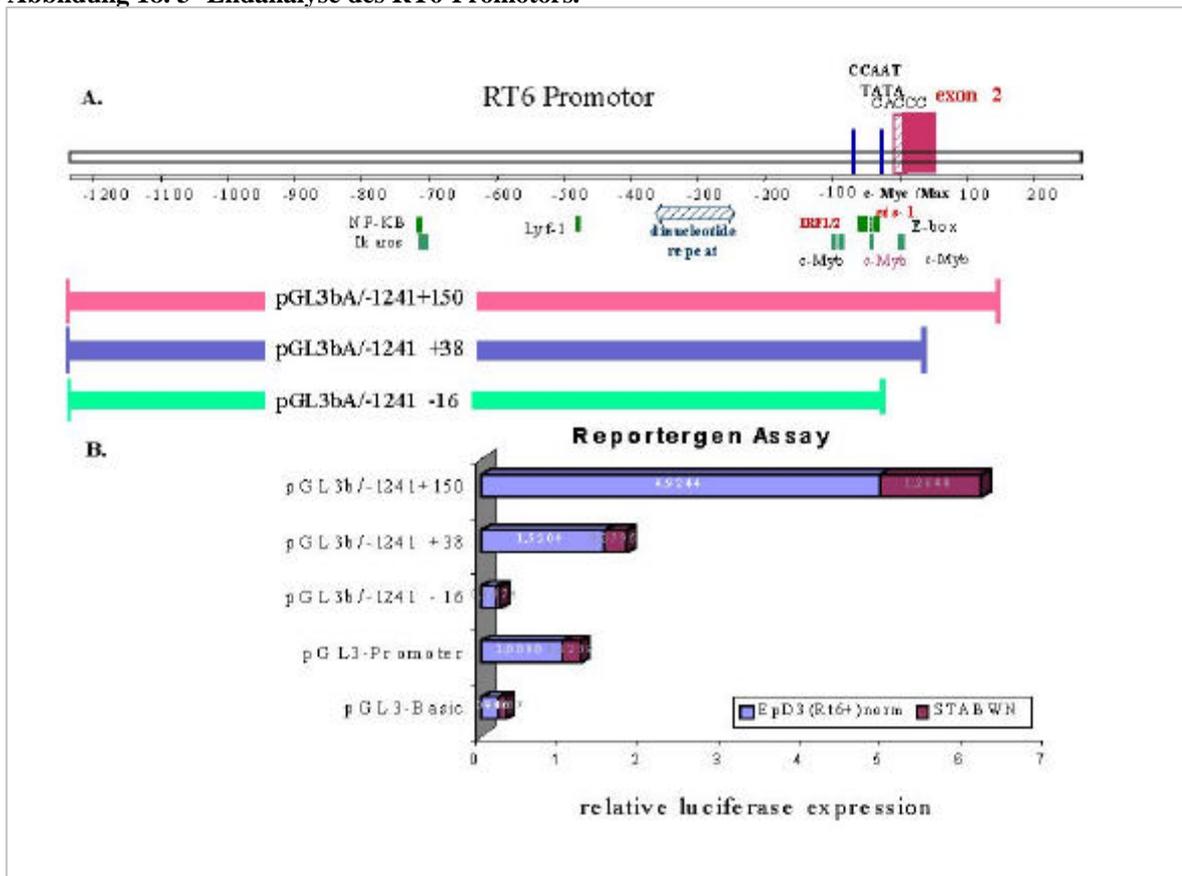
Die für die Analyse des 3'-Endes des Promotorbereiches verwendeten Fragmente sind schematisch in **Abb. 17** dargestellt. Entsprechende pGL3-Konstrukte werden in EpD3-Zellen transfiziert und in Reporter-Gen-Assays untersucht (**Abb.18**).

Abbildung 17. Die Fragmente zur 3' Endanalyse des RT6-Promotors



Die blauen Balken stellen die im Reporter-Gen Assay verwendeten Fragmente dar. Die vorhergesagten Elemente sind durch grüne Kästchen markiert.

Abbildung 18. 3' Endanalyse des RT6-Promotors.



In dieser Abbildung sind die RT6-Promotorkarte, die zu untersuchenden Fragmente (A) und die Ergebnisse der Reporter-Gen-Assays zur 3' Ende-Analyse des RT6-Promotors 2 (B) dargestellt. Als Zelllinie wird das T-Zell Hybridom EpD3 (RT6.2⁺) verwendet. Der pGL3-Promotor-Vektor wird als positive Kontrolle und Standard, und der pGL3-Basic-Vektor als negative Kontrolle verwendet. Die Aktivität des SV40 Promotors wird auf 1 normalisiert.

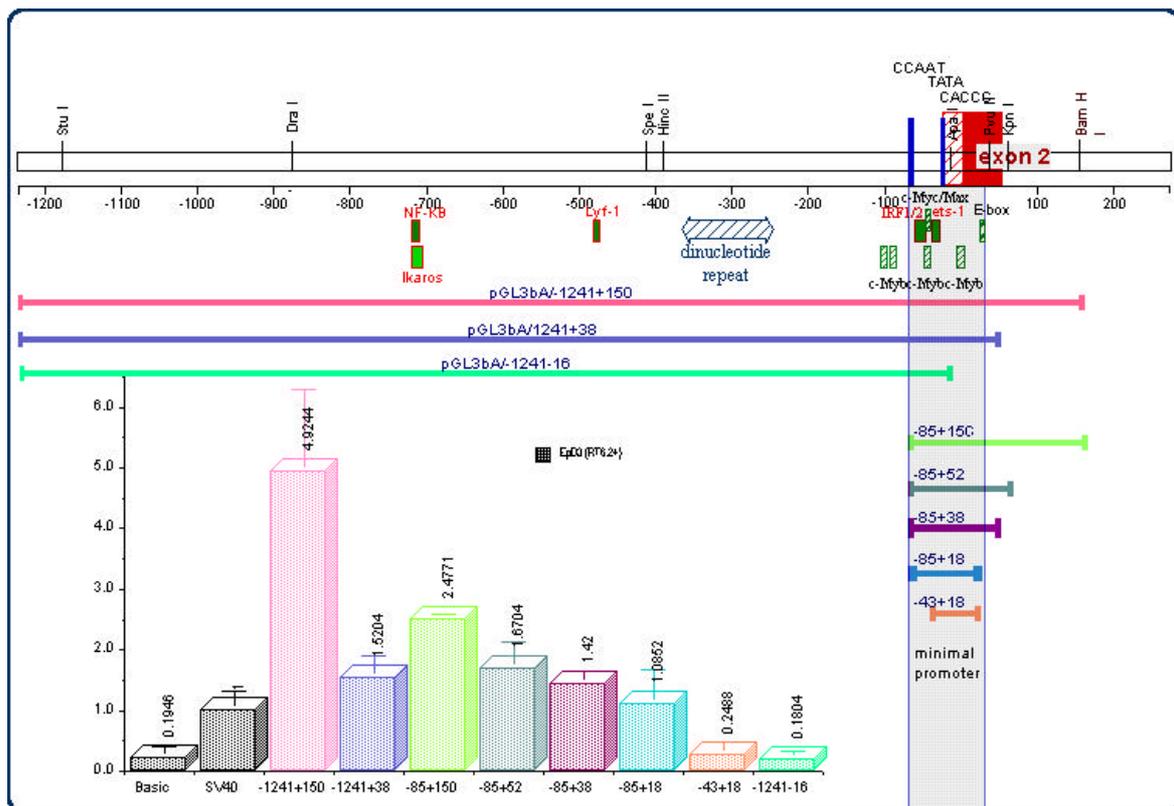
Die Ergebnisse zeigen, daß wenn man den Promotor von der 3' Seite aus in 3'→5' Richtung schneidet, die gesamte Promotoraktivität drastisch zurück geht. Die 3'

Endanalyse zeigt eine eindeutige Absenkung der Promotoraktivität in der Region zwischen +38 und -16. Das Promotorfragment -1241/-16 kann allein keine meßbare Promotoraktivität für die Transkription vermitteln, obwohl es ein TATA-Motiv besitzt, nicht aber die stromabwärts gelegenen Bindungstellen z.B. für den CACCC-Faktor, C-Myb, AP und MZF1. Die Ergebnisse weisen daraufhin, daß die Sequenzregion abwärts von -16 bp für die Transkription erforderlich ist.

3.2.10. Bestimmung des Minimal-Promotors und relevanter Promotorelemente

Normalerweise befinden sich die Steuersequenzen ungefähr 100 bp stromaufwärts des Startpunkts, manchmal auch weiter davon entfernt (Voet and Voet, 1992). Das Fragment, das den Abschnitt -85/ +150 enthält, zeigt eine höhere Promotoraktivität als die des SV40 Promotors.

Abbildung 19. Deletionsexperimente zur Bestimmung des RT6-Minimal-Promotors



Dargestellt sind die transienten Expressionsversuche zur Untersuchung der regulatorischen Region. Oben: Promotorkarte; Mitte und Rechts: verwendete DNA-Fragmente, welche unterschiedliche Regionen bezogen auf die RT6-Transkription Start Stelle präsentieren; Links unten: transiente Expression; Rechts: Der Minimal-Promotor ist durch Schatten gekennzeichnet.

Zur näheren 3' Promotoranalyse wird der Abschnitt -85/+150 in 3' → 5' Richtung weiter gekürzt. Dabei wird eine Serie kleinerer Promotorfragmente (-85/+52, -85/+38, -85/+18, -43/+18) an dem Transkriptionsstart, wie in **Abb. 19** rechts gezeigt, gewonnen. Von Abschnitt -85/+150 bis Abschnitt -85/+18 findet man noch ein signifikantes Grundniveau

der Expression. Die Promotoraktivität des Reporter-gen-Konstrukts pGL3b/-85+18 ist etwa dreifach so stark wie die von pGL3b/-43+18. Abschnitt -43/+18 hat nur noch eine kleine basale Aktivität. D.h. es gibt einen Abfall der Promotorstärke in der Sequenzregion zwischen -85 und -43. Die Ergebnisse der 3'- und 5'-Endanalyse (s. Abschnitt 3.2.8) deuten gemeinsam darauf hin, daß die Region -85/-43 funktionell relevant ist. Aus den in **Abb. 20** dargestellten Ergebnisse kann man schließen, daß die DNA Sequenzen am Transkriptionsstart für die Transkription erforderlich sind, und die Promotorregion **-85/+18** des RT6-Gens als **Minimal-Promotor** bezeichnet werden kann. Bei dem Konstrukt pGL3b/-1241-16 findet eine sehr geringe Expression statt. Dies deutet darauf hin, daß die Region **-16/+18** essentiell für die Transkription ist.

3.3. Die Wirkung des SV 40 Enhancers auf die RT6-Expression

Eines der charakteristischen Merkmale der eukaryotischen Genexpression ist die Existenz von Sequenzelementen, die sich in großem Abstand vom Startpunkt der Transkription befinden und die Gen-Expression beeinflussen können. Solche Elemente können stromaufwärts oder stromabwärts oder auch innerhalb einer Transkriptionseinheit liegen und in jeder Orientierung relativ zum Startpunkt wirksam sein. Der erste untersuchte Verstärker stellte einen kleinen Abschnitt des Genoms eines tierischen Virus, des Affen-Virus 40 (SV40), dar.

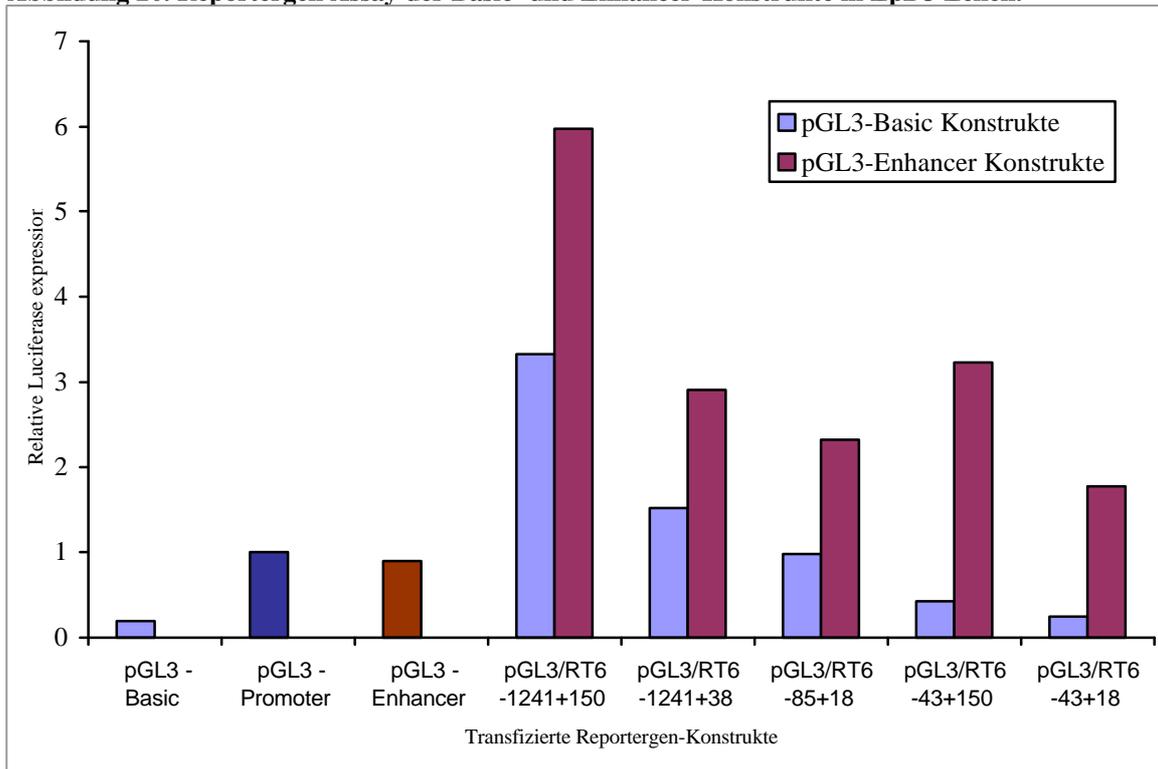
3.3.1. Umklonierung der Promotorfragment in den pGL3 Enhancer Vektor

Um die Einwirkung eines heterologen Enhancers auf den RT6-Promotor zu untersuchen, wird der pGL3 Enhancervektor eingesetzt, der den SV40 Enhancer enthält. Eine Reihe von Enhancer-Konstrukten, die unterschiedliche Fragmente des RT6-Promotors enthalten, werden durch Umklonierung aus den pGL3-Basic Konstrukten hergestellt.

3.3.2. Wirkung des SV40 Enhancers auf den RT6-Promotor

Um die Promotoraktivität der von mir untersuchten Fragmente in Gegenwart oder Abwesenheit des SV40-Enhancers zu vergleichen, wird eine Serie von entsprechenden Konstrukten in den Vektoren pGL3-Basic und pGL3-Enhancer in EpD3-Zellen transfiziert (Abb. 20).

Abbildung 20. Reporteragen Assay der Basic- und Enhancer-Konstrukte in EpD3 Zellen.



Die Transkriptionseffizienzen von Basic- und Enhancerkonstrukten werden in diesem Versuch verglichen. Basic- und Enhancer-Konstrukte mit gleichen Promotorelementen sind unter der X Achse mit einem Namen gekennzeichnet. Die blauen Balken stellen die Promotoraktivität des pGL3-Basicvektors und der Basic-Konstrukte dar. Die roten Balken stellen die Promotoraktivität des Enhancervektors und der Enhancer-Konstrukte dar. Der dunkel blaue Balken stellt das Expressionsniveau des pGL3 Promotor-vektors dar.

Das Ergebnis zeigt, daß das Transkriptionsniveau des Luciferase-Gens nach der Verbindung der RT6-Promotorfragmente mit den Verstärker-Elementen des SV40 Genoms mehr als zweifach gesteigert wird. Das Verstärkungsverhältnis bei den Fragmenten -1241/+150 bis -85/+18 ist ungefähr gleich. Die stärksten Effekte im Vergleich mit den Promotor-Konstrukten ohne das Enhancer-Element sind bei den Fragmenten -43/+150 und -43/+18 festzustellen. Das Fragment -43/+18 zeigt im pGL3-Basic-Vektor eine Aktivität, die kaum meßbar über der des pGL3-Basic Leervektors hinausgeht. Offensichtlich führt das Vorliegen eines SV40 Enhancers im pGL3-Vektor zu einer Verstärkung der Luziferase-Expression im Vergleich zu dem Ursprungskonstrukt.

3.3.3. Bindestellen im SV40 Enhancer

Wie Promotoren enthalten auch Enhancer mehrere Bindestellen für miteinander interagierende Transkriptionsfaktoren. In vielen Fällen sind diese Elemente identisch mit denen, die sich unmittelbar stromaufwärts des Promotors befinden (Neurath et al., 1997). Man geht davon aus, daß Transkriptionsfaktoren, die an Regionen nahe des Promotors binden, mit den weiter davon entfernten enhancerbindenden Faktoren interagieren können, indem sich eine DNA-Schleife bildet.

Die SV40 Enhancersequenz (244 bp) des pGL3-Enhancervektors, Nukleotide 2005 - 2249 bp auf der von Promega mitgelieferten Vektorkarte wird mit der TRANSFAC-Datenbank analysiert. Die Analyse der Enhancersequenz zeigt, daß einige der im SV40 Enhancer vorhergesagten Transkriptionsfaktorbindungsstellen (z.B.: AP1, MZF, OCT1 und NF-kB) die gleichen sind wie die, die für den RT6-Promotor vorhergesagt werden. Die durch TRANSFAC vorhergesagten Bindungsstellen sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

Tabelle 2. Bindestellen im SV40 Enhancer

Solution parameters:				
sequence file:	SV40 Enhancer.seq	core sim:	1.00	matrix sim: 0.96
matrix name	matrix position(str)	core simil.	matrix simil.	sequence

Inspecting sequence SV40Enhancer (1 - 250):				
V\$AP1_Q2	87 (+)	1.000	0.975	gcTGACTaatt
V\$AP1FJ_Q2	87 (+)	1.000	0.965	gcTGACTaatt
V\$AP1_Q4	87 (+)	1.000	0.970	gcTGACTaatt
V\$S8_01	89 (-)	1.000	0.977	gcatctcaATTAgta
V\$OCT1_06	92 (+)	1.000	0.964	ctaattgagATGCa
V\$MZF1_01	126 (+)	1.000	0.968	gctGGGGa
V\$MZF1_01	135 (+)	1.000	0.962	cctGGGGa
V\$NFKB_Q6	137 (+)	1.000	0.996	tgGGGActttccac
V\$NFKB_C	138 (+)	1.000	1.000	gGGGActttcca
V\$CREL_01	139 (+)	1.000	0.984	gggactTTCC
V\$NFKAPPAB_01	139 (+)	1.000	0.989	GGGActttcc
V\$NFKAPPAB65_01	139 (+)	1.000	0.985	gggactTTCC
V\$LMO2COM_01	147 (-)	1.000	0.961	aacCAGGtggtg
V\$AP1FJ_Q2	159 (+)	1.000	0.965	gcTGACTaatt
V\$AP1_Q4	159 (+)	1.000	0.970	gcTGACTaatt
V\$AP1_Q2	159 (+)	1.000	0.975	gcTGACTaatt
V\$S8_01	161 (-)	1.000	0.977	gcatctcaATTAgta
V\$OCT1_06	164 (+)	1.000	0.964	ctaattgagATGCa
V\$MZF1_01	198 (+)	1.000	0.968	gctGGGGa
V\$MZF1_01	207 (+)	1.000	0.962	cctGGGGa
V\$NFKB_Q6	209 (+)	1.000	0.996	tgGGGActttccac
V\$NFKB_C	210 (+)	1.000	1.000	gGGGActttcca
V\$NFKAPPAB_01	211 (+)	1.000	0.989	GGGActttcc
V\$NFKAPPAB65_01	211 (+)	1.000	0.985	gggactTTCC
V\$CREL_01	211 (+)	1.000	0.984	gggactTTCC

Putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im SV40 Enhancer, wie oben beschrieben, werden durch Computeranalyse vorhergesagt, z.B. AP1, MZF, OCT1 und NF-kB, Ikaros usw.

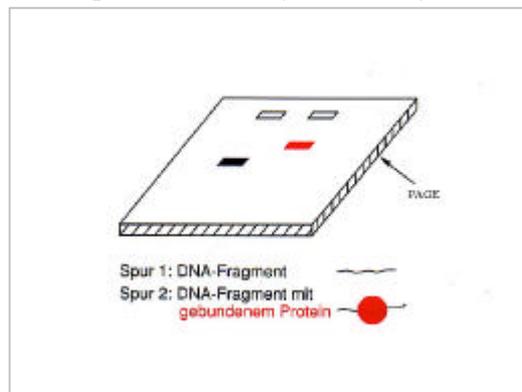
3.4. Gelretentionanalyse zur Charakterisierung von regulatorischen Sequenzen

Die sequenzspezifische Bindung von Protein an doppelsträngige DNA kann mit verschiedenen Techniken untersucht werden. Eine der Methoden ist der Electrophoretic Mobility Shift Assay, abgekürzt EMSA, oder auch Gelretardation Assay genannt.

3.4.1. Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)

Eine Steuersequenz ist ein DNA-Abschnitt, an den ein Regulatorprotein binden kann. Deshalb sollte es möglich sein, die Steuersequenzen stromaufwärts von einem klonierten Gen zu identifizieren, indem man in dem betreffenden Abschnitt nach Protein-Bindestellen sucht. Bindet ein Faktor, der mit der RNA-Polymerase zusammenwirkt, an seine Zielsequenz, kommt es zu einer im Vergleich zum freien Oligonukleotid reduzierten Wanderungsgeschwindigkeit im Gel, dem Gelshift (**Abb. 21**).

Abbildung 21. Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays



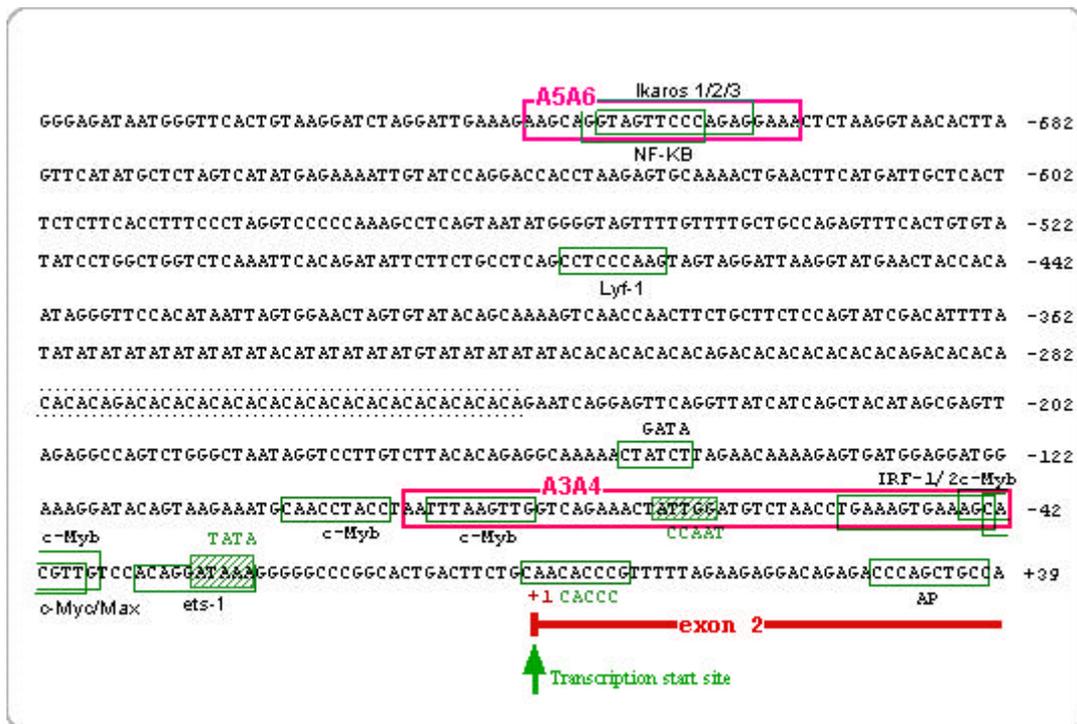
Mit Mobility Shift kann man ein DNA-Fragment, das ein gebundenes Protein trägt, nachweisen, denn seine Beweglichkeit ist geringer als die des reinen, nicht im Komplex gebundenen DNA-Moleküls. Das gebundene Protein verringert die Beweglichkeit eines DNA-Fragments in der Gelelektrophorese (Abbildung modifiziert nach T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger 1996).

Es stellt sich die Frage, ob es auf einem RT6-Promotorfragment zur *in vitro* Protein-DNA-Bindung kommt.

3.4.2. Auswahl der Oligonukleotide für die Mobility Shift Untersuchungen

Der Auswahl der Sequenzabschnitte, die im Mobility Shift Assay näher untersucht werden sollen, wurden die Vorhersage möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die Konservierung von Abschnitten zwischen den Genen von Ratte und Maus, sowie die Ergebnisse der Reporter-gen-Assays zugrunde gelegt. Dies führt zur Auswahl des in **Abb 22** mit A3A4 und A5A6 bezeichneten Sequenzabschnitte.

Abbildung 22. Design der Oligonucleotid des RT6-Promotors für Mobility Shift



Die für EMSA ausgewählten Sequenzen sind in dieser Abbildung rot gekennzeichnet. Die Zielsequenz EMSA-A3/A4 befindet sich in der Position -90 / -41 des RT6-TSS2, enthält die putative CCAAT-Box, C-Myb, IRF-1/2 Elemente. EMSA-A5/A6 befindet sich in der Position von -520 bis -543, enthält die Steuersequenz für die Transkriptionsfaktoren Ikaros, NF-kappaB und NFAT.

3.4.3. Experimentparameter in EMSA

Bei diesen Versuchen werden Zellextrakte mit einem radioaktiv markierten Promotoroligonukleotid inkubiert, von dem vermutet wird, daß es die Zielsequenz für spezifische Transkriptionsfaktoren enthält.

Die Zellkernextrakte werden aus den in Abschnitt 2.3.1. beschriebenen lymphatischen Zelllinien der Ratte (EpD3, EpSM30 und C58NT) und der Maus (EL4), sowie aus der nicht-lymphatischen Fibroblastenlinie der Ratte (rat-1) präpariert. Die in unserem Labor etablierte T-T Hybridomzelllinie EpD3 exprimiert nur RT6.2, nicht aber RT6.1. Die Zelllinie SM30 exprimiert ausschließlich RT6.1.

Die Zellproteine werden unter verschiedenen Bedingungen gewonnen. Im Hochsalzextrakt (**H**) finden sich Proteine vorwiegend aus dem Zellkern, im Niedersalzextrakt (**L**) vorwiegend aus dem Cytoplasma. Der Extrakt LH, der vorwiegend DNA-gebundene Proteine enthält, wird zuerst mit Niedersalz extrahiert, das verbleibende Pellet wird dann mit Hochsalz nachextrahiert.

Ferner werden synthetische repetitive DNA-Sequenzen (Poly dI-dC) als DNA-Kompetitor in allen EMSA Versuchen zugegeben, um unspezifische Bindungen abzufangen und falschpositive Band-Shift Phänomene möglichst zu vermeiden. In diesem Versuch wird die spezifische Bindung von Proteinen an das Oligonukleotid EMSA-A3A4 ermittelt.

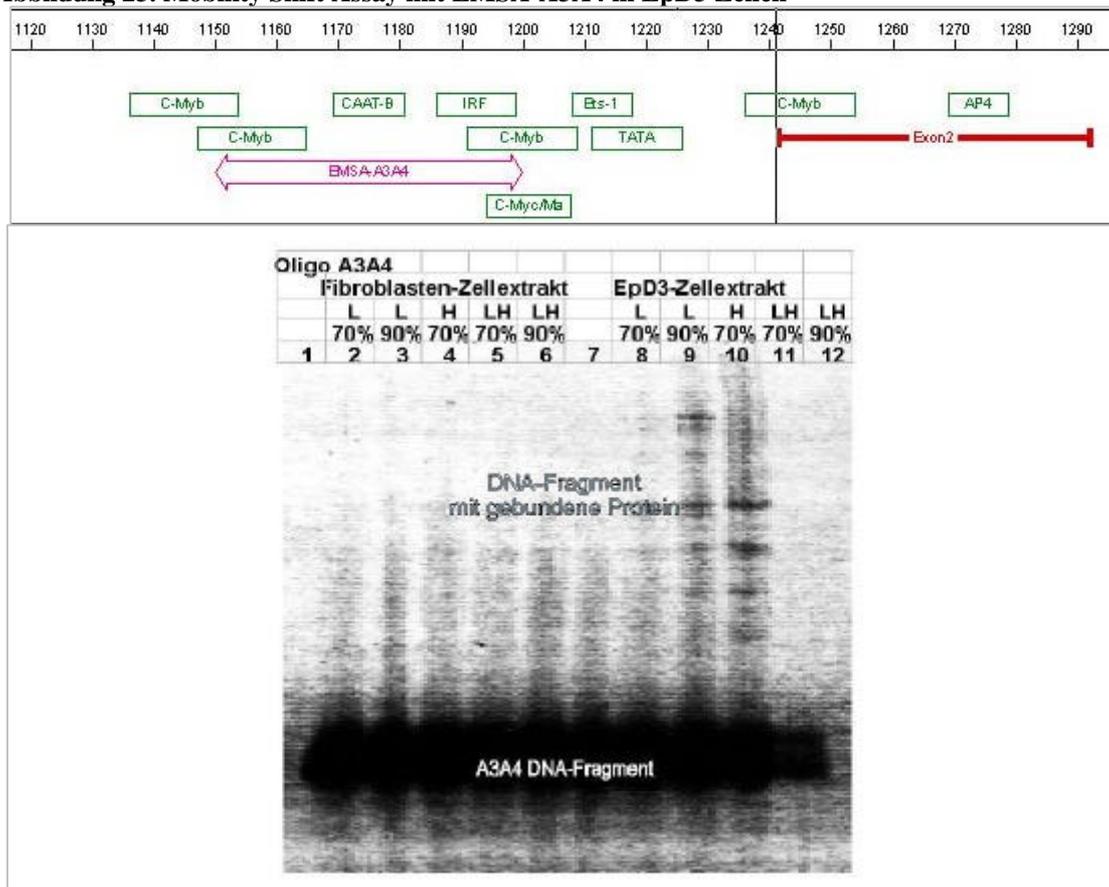
Die Transkriptionsfaktoren haben teilweise definierte Consensus-Erkennungssequenzen, viele in Promotoren vorkommende Bindestellen weichen jedoch erheblich von der Consensus-Sequenz ab. Oftmals erkennen bestimmte Transkriptionsfaktoren mehrere DNA-Sequenzen, denen ein charakteristisches DNA-Motiv (core motif) gemein ist. Obwohl verschiedene verwandte Transfaktoren an das gleiche Kernmotiv binden können, entscheiden die das Kernmotiv flankierenden Nucleotide, welches Protein an einem bestimmten DNA-Abschnitt mit welcher Affinität binden kann.

3.4.4. Zell-spezifische Bindung an das Oligonukleotid EMSA-A3A4 im Mobility Shift

Die Proteinbindung an EMSA-A3A4 (-91/-41), welches als potentielle Bindestellen die Elemente CCAAT-Box, C-Myb, IRF-1/2 enthält, wird hier untersucht. Als Zelllinien in diesem Versuch werden die T-Zell Hybridome EpD3 (RT6.2⁺), sowie die RT6-negative Fibroblasten-Zelllinie Rat-1 verwendet. Die Ganzzellextrakte werden durch Einfrieren und Auftauen präpariert (Abschnitt 2.3.1). Die Zellen werden in jeweils zwei 10 cm Kulturplatten bis zur Subkonfluenz 70% und 90% hochgezüchtet (**Abb. 23**). Die Idee dabei ist, zu prüfen, ob die Zell Proliferation und Aktivierung für die Bindung der Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielt.

Proteinfreie DNA-Moleküle, die für den Assay radioaktiv markiert werden, sind in der Autoradiographie als Bande unten im Gel sichtbar. Nach Bindung an EMSA A3A4 erkennt man zwei Hauptbanden bei EpD3 Zellextrakten, jedoch nicht bei Fibroblasten.

Abbildung 23. Mobility Shift Assay mit EMSA-A3A4 in EpD3 Zellen

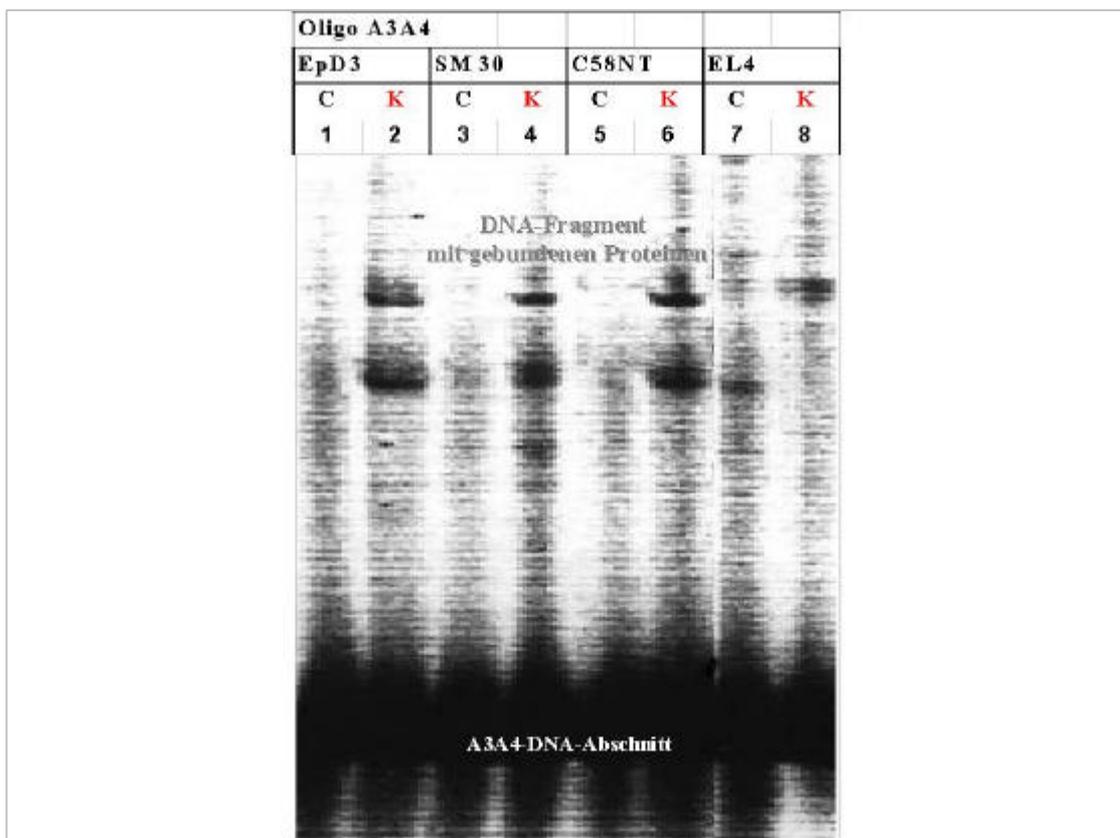


Oben: Das zu untersuchende EMSA-A3A4 Oligonukleotid und darin eingebettete Elemente. Unten: Die entstehenden Protein-DNA-Komplexe werden durch PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt. Spur 1 ist eine Kontrolle und zeigt lediglich die freien EMSA-A3A4 DNA, und die Spuren 2 bis 12 sind mit einer Mischung von DNA und Protein aufgetragen. Die Spuren 9,10 zeigen multiple Banden von DNA Fragmenten mit gebundenen Proteinen. H: Hochsalz-Extrakt, L: Niedersalz-Extrakt, LH: Der Niedersalz-Extrakt wird noch mit Hochsalz nachextrahiert. die Prozentsätze (70% und 90%) zeigen die Zell-Konfluenz.

3.4.5. Mobility Shift mit Oligonukleotid EMSA-A3A4 in verschiedenen Lymphozyten

Um die Spezifität der Bindung zu testen, wird diese EMSA in anderen Lymphozyten durchgeführt. Als Zelllinien für den in **Abb. 24** dargestellten EMSA werden die T-Zell Hybridome EpD3 (RT6.2⁺), EpSM30 (RT6.1⁺), sowie T-Zell-Hybridom C58NT von der Ratte und EL4 Zelllinien von der Maus verwendet. In diesem Versuch werden die Zellextrakte nach dem Protokoll von Schreiber (Schreiber et al., 1989) präpariert (s. Abschnitt 2.3.1), wobei eine Zytoplasmatische und eine Kernfraktion entstehen.

Abbildung 24. Mobility Shift mit EMSA A3A4 in Lymphozyten Zelllinien.



Der inkubierte Gemisch aus DNA und Protein ist in allen Spuren aufgetragen. Cytoplasma abgekürzt als C und Kernextrakt abgekürzt als K.

In diesem Gel ist kein Band bei den Ratten Zelllinien im Cytoplasma (C) aufgetaucht, aber bei den Kernextrakten (K) der untersuchten Lymphozyten sind deutlich zwei Banden zu erkennen. Außerdem liegen bei Maus EL4 Zellen zwei Banden mit unterschiedlicher Größe in C und K vor. Diese Befunde zeigen, daß es in T-Lymphozyten Faktoren gibt, die an diesen Promotor-Bereich (EMSA-A3A4) binden. Sie weisen darauf hin, daß der dem Oligonukleotid A3A4 entsprechende Bereich des Promotors für die Transkription wichtig sein könnte. Es stellt sich die Frage, welche der Faktoren an diese Stelle binden, und ob die gebundenen Proteine in verschiedenen Lymphozyten identisch sind.

3.4.6. Unspezifische Bindung an Oligonukleotid EMSA-A5A6 in Mobility Shift Assay

In weiteren Versuchen wird das Oligonukleotid EMSA-A5/A6 (Abb. 25) auf die beschriebene Weise analysiert. Die Zellextrakte werden aus den Zelllinien EpD3, SM30, C58NT, Fibroblasten und EL4 nach dem Protokoll von Schreiber präpariert und mit dem Promotor-Abschnitt (EMSA-A5A6) inkubiert. Ein Bindungskomplex aus EMSA-A5A6 DNA mit einem oder mehreren Kernproteinen ist in allen untersuchten Zelllinien aufgetreten (Abb. 26).

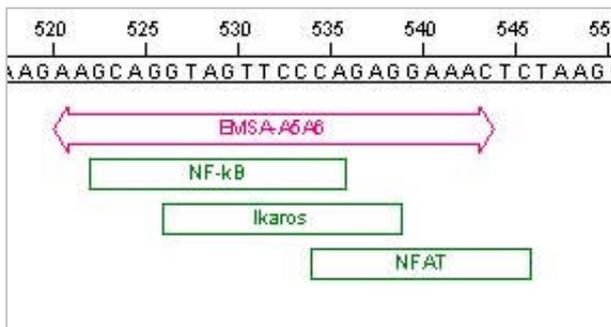
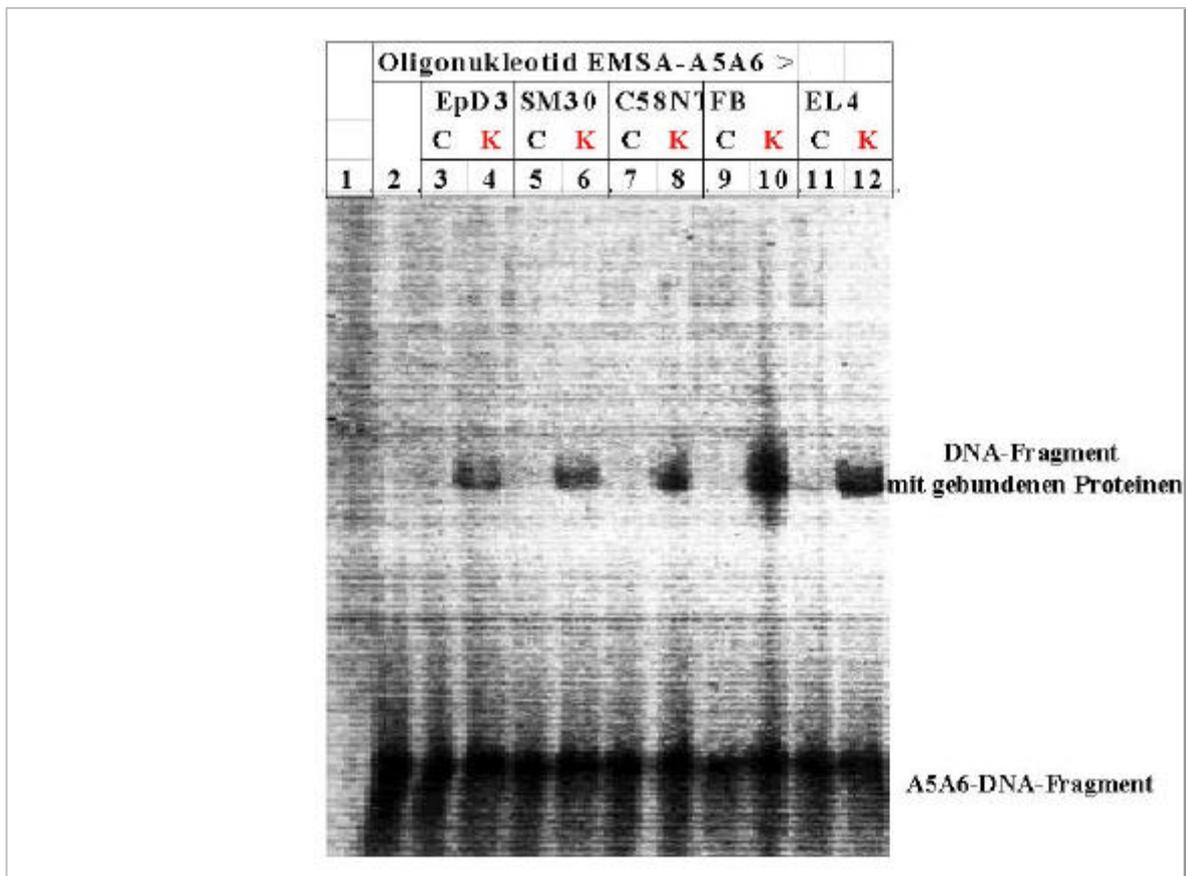


Abbildung 25. Oligonukleotid EMSA-A5/A6
EMSA-A5A6 befindet sich in der Position von –520 bis –543 bp und enthält Bindungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren NF-kappaB, Ikaros und NFAT.

Diese Versuche zeigen, daß ein oder mehrere nuklear lokalisierte Proteine an das Oligo A5/A6 binden, und diese aber,

falls es sich um identische Proteine handelt, nicht zell-spezifisch exprimiert werden.

Abbildung 26. Mobility Shift Assay mit Oligonukleotid EMSA-A5A6



Die Spur 1 ist die Leerkontrolle. Die Spur 2 ist freie DNA-Sonde, und in den Spuren 3 bis 12 sind jeweils mit inkubierten Gemisch aus DNA und Protein aus den Zelllinien EpD3, EpSM30, C58NT, Fibroblasten und EL4 aufgetragen. Die Bindungskomplexe sind in den Kernextrakten aus den vorliegenden Zellen zu erkennen.

Zusammengenommen lassen sich mittels EMSA Proteinbindungen an die Sequenzen EMSA-A3A4 und A5A6 nachweisen.

3.5. Analyse des Einflusses des TATA-Elements auf die RT6-Expression

Die meisten Promotoren enthalten eine TATA-Box, die normalerweise ungefähr 25 bp bis 30 bp stromaufwärts des Startpunkts liegt. Das TATA Element stellt das einzige stromaufwärts gelegene Promotor-Element dar, das in Bezug auf den Startpunkt eine relativ fixe Position einnimmt [Zenzie, 1992 #10; Neurath, 1997 #8]. Die TATA-Box bestimmt in der Regel den exakten Transkriptionsstart [Gill, 1994 #191]. Offensichtlich bilden die Promotor-Sequenzen, die stromaufwärts der TATA-Box liegen, die primären DNA-Bindestellen für RNA-Polymerase II und andere Proteine, die an der Initiation der Transkription mitwirken.

Der RT6-Promotor 2 enthält an der Position –29 bp stromaufwärts des Startpunkts ein putatives TATA-Motiv (ggATAAAgggggcccg) mit einem direkt stromabwärts gelegenen GC-reichen Sequenzabschnitt. Solche Abschnitte stellen oft Bindestellen für Zink-Finger-Proteine dar.

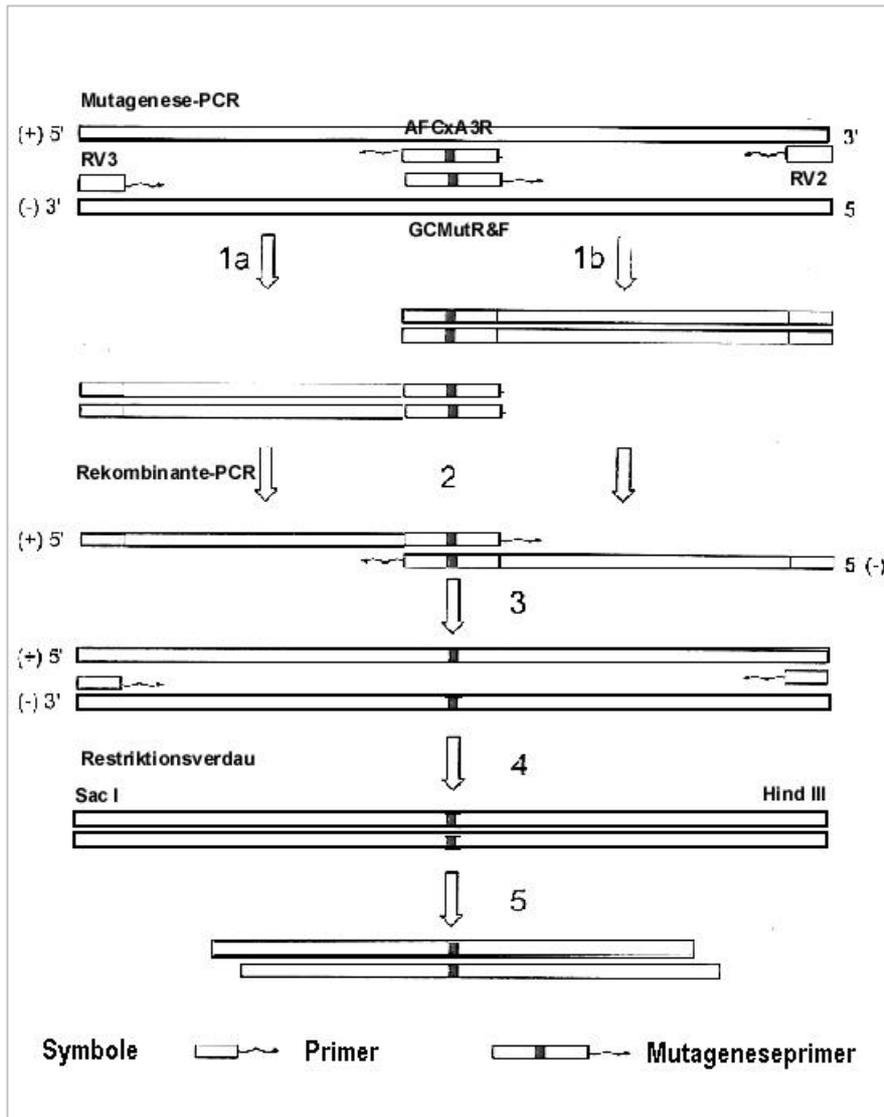
3.5.1. Mutagenese des TATA-Motivs und des GC-Elements mittels PCR

Eine Mutation in einem der konservierten Abschnitte kann die Initiationseffizienz eines Promotors stark erhöhen oder erniedrigen.

Um diese potentiellen DNA/Protein Kontaktpunkte, sowie die Bedeutung des GC-reichen Elements für die Transkription zu ermitteln, wird eine GC-Mutagenese mittels PCR nach dem Schema von Abbildung **Abb. 27** durchgeführt, Dabei wird die Basenfolge CCCG durch AAAA ausgetauscht (**Abb. 28**).

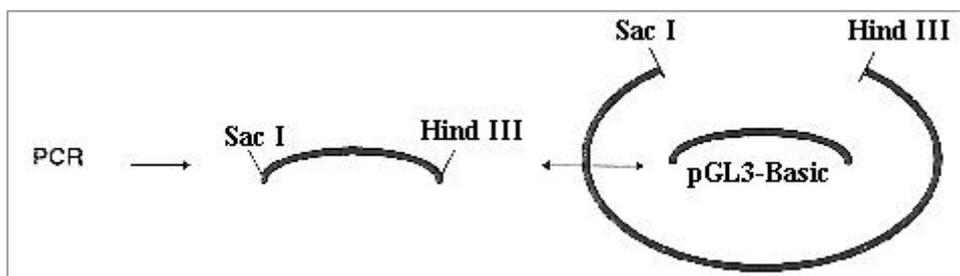
Eine TATA-Mutante (ggATGAagggggcccg) ist durch Ersetzen von A durch G innerhalb des putativen TATA-Motivs spontan bei einer PCR entstanden.

Abbildung 27 A. Schematische Darstellung der Mutagenese durch zweifach rekombinante PCR.



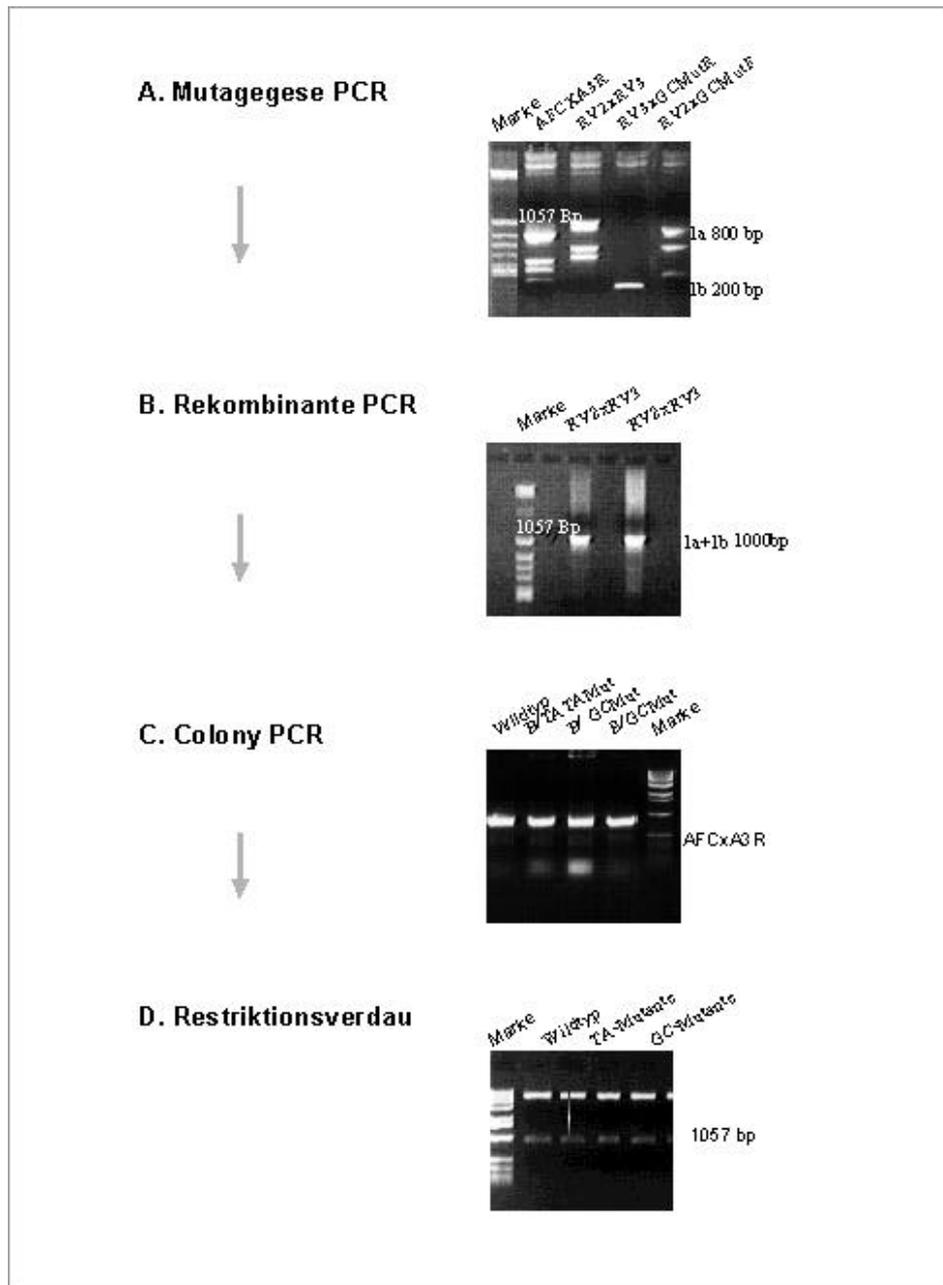
(1a,1b) Separate Amplifikation zweier im Bereich des Mutageneseprimers (GCMutR, GCMutF) überlappender Produkte. (2-4) In einer anschließenden PCR-Reaktion rekombinierten die Produkte aus (1) und werden im folgenden exponentiell amplifiziert. (5) Restriktionsverdau mit Enzymen (Sac I und Hind III) zur Ligation in den Vektor.

Abb. 27 B Prinzip des „Kassetten-Austausches“



Es zeigt das Prinzip des Kassetten-Austausches. Zum gezielten Genaustausch des Rt6-Gens wird der Vektor pGL3 (4,9 kb) verwendet.

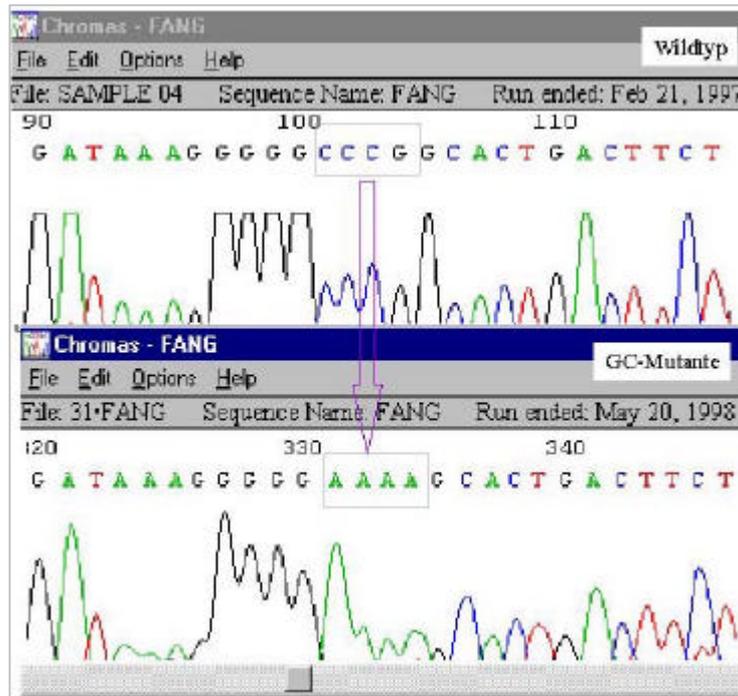
Abbildung 28. Mutagenese-Analyse des GC-Elements im Agarosegel.



- A. Das Mutagenese PCR Produkt wird über ein 1,5% Agarosegel aufgetrennt, 5' und 3' PCR-Fragmente werden ausgeschnitten und extrahiert. 5'-PCR-Fragment (1a, ca. 800 bp) und 3'-PCR-Fragment (1b, ca. 200 bp) werden mittels PCR mit den Primern (GCMutR*RV3; GCMutF*RV2) amplifiziert.
- B. B. Rekombinante PCR mit den Endprimern RV3 und RV2. Das 5' PCR-Fragment (1a) und 3' PCR-Fragment (1b) werden vereinigt. Die Banden (1a+1b) liegen wie erwartet bei ca. 1 kb. Banden werden über Agarosegel und Spin Columns aufgereinigt. Es folgt dann Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektor mit Sac I und Hind III, Ligation mit T4 Ligase und die Transformation.
- C. Zur Identifikation der „korrekten“ Transformanten werden Colony-PCR mit Primer AFC und A3R angesetzt. Im Gel sind die erwarteten Banden zu erkennen.
- D. Durch Restriktionsverdau mit den Enzymen Sac I und Hind III wird Plasmid-DNA zur Kontrolle der klonierten Fragmente ausgeschnitten. Die Inserts liegen auf der richtigen Höhe.

Bei der Herstellung der GC-Mutante (**ggATAAAgggggaaaa**) wird ein *in vitro* Austausch von CCCG durch AAAA mittels PCR durchgeführt (**Abb. 29**).

Abbildung 29. Mutagenese in Vitro des TATA- Motivs des RT6-Promotors in Sequenzanalyse



Im Wildtyp (unten) lagen keine Mutationen im Bereich einer der vorhergesagten potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindestellen im Hauptpromotor vor. Die GC-Mutante (oben) zeigte einen Austausch der Sequenz CCCG gegen AAAA in diesem Bereich.

3.5.2. Das RT6-Gen benötigt kein TATA-Motiv für die Initiation der Transkription

Zu dem Zweck der Analyse des RT6-TATA-Elements werden die mutierten Sequenzen an ein Reporter-gen gehängt, dessen Gen-Produkt, Luciferase, sich leicht messen läßt, so daß der Effekt der Mutation auf die Transkription untersucht werden kann.

Zu diesem Zweck wird eine Serie von Mutationskonstrukten des RT6-Gens der Ratte in den pGL3 Vektor kloniert, und im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz zur Reporter-gen-Analyse des RT6-Promotors eingesetzt (**Abb.30**). Die Ergebnisse zeigen keinen eindeutigen Unterschied von Promotoraktivität zwischen Wildtyp und der TATA-Mutanten.

Untersucht werden die Plasmide pGL3b -85 /+52, welches die Wildtypesequenz enthält, pGL3b -85 /-16, welche die TATA-Box enthält, aber keine stromabwärts davon gelegene Elemente, sowie die Mutanten, bei denen die TATA-Box oder die GC-reiche Sequenz durch *in vitro* Mutagenese zerstört wurde.

Abbildung 30. Mutagenese-Analyse im Reporter-gen-Assay.

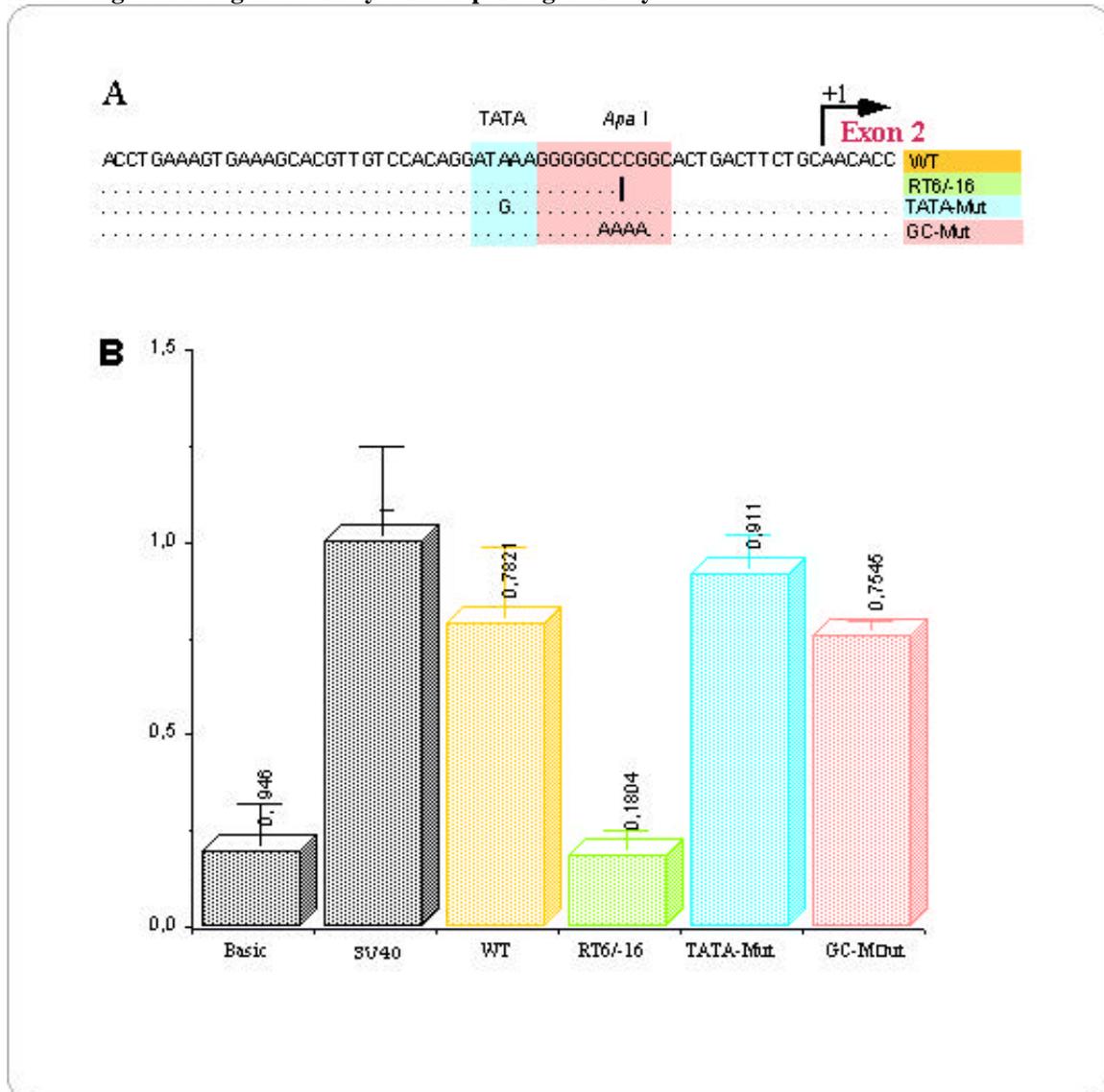


Abb. 30 A zeigt die vor dem Startpunkt liegenden Sequenzen der Wildtyp- und RT6/-16-Fragmente, sowie die TATA- und GC-Mutanten. **Abb. 30 B** stellt die Transkriptionseffizienz der pGL3-Basic, -Promotor, -WT, -RT6-16, und -TATA-Mutante, GC-Mutante in EpD3 Zellen dar.

Die Expressionsaktivität bei WT, TATA- und GC-Mutante ist ungefähr gleich groß wie die des pGL3 Promotorvektors. RT6/-16, welches das TATA-Element besitzt, aber stromabwärts gelegene Sequenzen nicht enthält, hat keine Aktivität. Wie bereits in **Abb. 30** gezeigt ist dieser Abschnitt alleine für die Transkription des RT6-Gens nicht funktionsfähig. Die Reporter-gen-Assays zeigen, daß die Mutationen sowohl des TATA-Motivs, als auch des GC- reichen Elements die Promotoraktivität in der EpD3 Zelllinie nicht beeinflussen.

4. Diskussion

Die Expression eukaryotischer Gene ist ein komplexer Prozeß, der auf verschiedenen Ebenen reguliert werden kann: der Transkription, der RNA-Prozessierung, RNA-Stabilität, des RNA-Transports vom Zellkern und der Translation. Die meisten der bis heute charakterisierten eukaryotischen Gene werden auf Transkriptionsebene reguliert (Alberts et al., 1995). Die Voraussetzung für die Transkription ist in allen Fällen ein stabiler Initiationskomplex, der sich zwischen der relevanten RNA Polymerase (RNAP) und der Promotor-Region bildet. Dies geschieht mit Hilfe von bestimmten Hilfsfaktoren, die für jedes Transkriptionssystem unterschiedlich sind. Die Zellen der Eukaryonten enthalten eine große Anzahl Sequenz-spezifischer DNA-bindender Proteine, deren Hauptfunktion es ist, Gene an- oder abzuschalten. Im Moment verstehen wir noch sehr wenig über die molekularen Details der Kontrollmechanismen der Transkription. Studien der letzten Jahre belegen, daß die Entwicklung von Lymphozyten sowie deren Proliferation und Differenzierung durch ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk von Transkriptions-Faktoren kontrolliert wird.

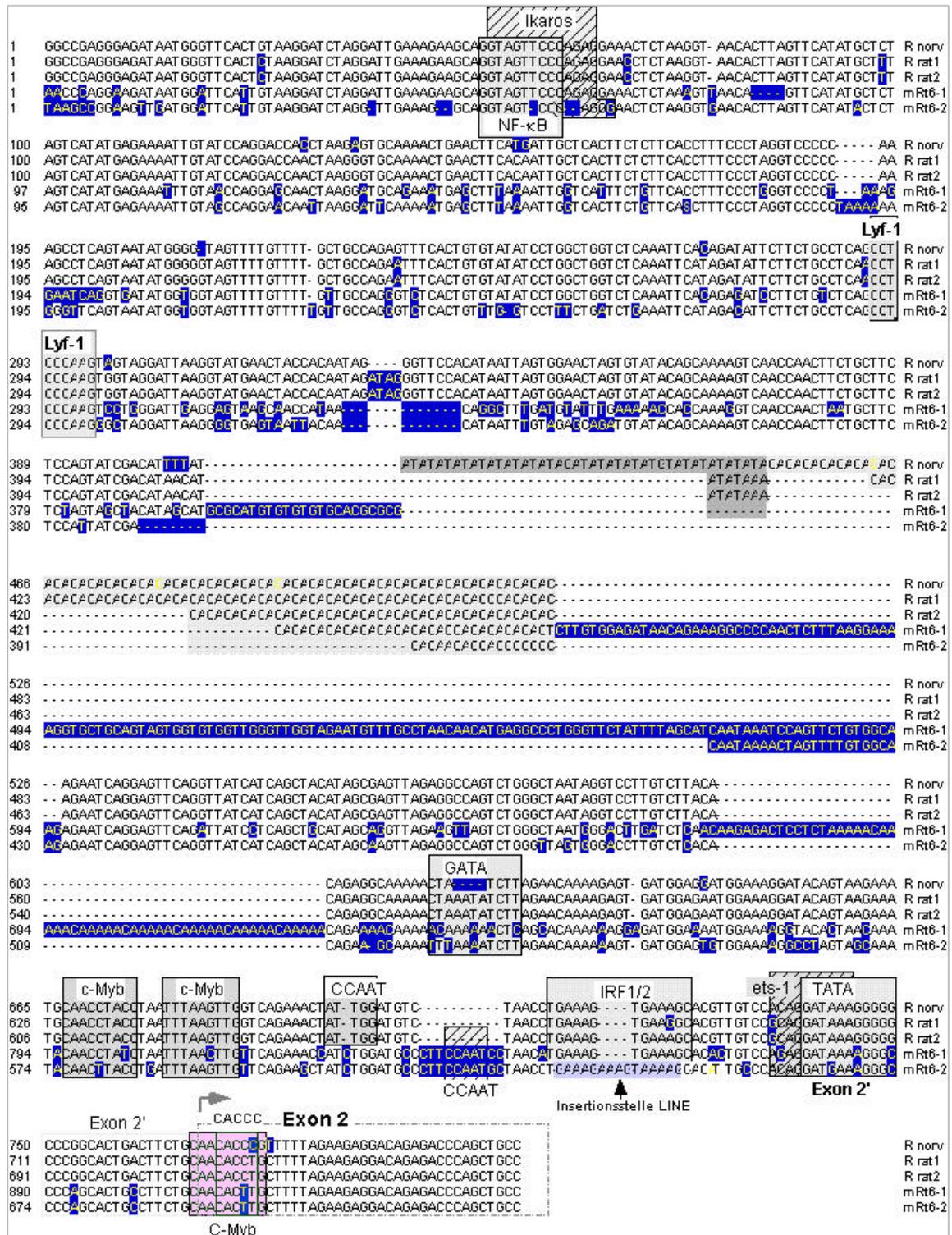
4.1. Strukturanalyse des RT6-Promotors

Die Promotor-Region des RT6-Gens von *Rattus norvegicus* wird mit entsprechenden Abschnitten zweier aus *R. rattus* klonierter Gene (R rat1 und R rat2), sowie der Rt6-1 und Rt6-2 Gene der Maus verglichen (**Abb. 31**). Hierdurch kann man Anhaltspunkte über potentiell regulatorische Sequenzen gewinnen, da diese häufig evolutionär relativ hoch konserviert sind.

Alle untersuchten Gene (RT6^b Gen von *R. norvegicus*, zwei Gene von *R. rattus*, beide RT6-Gene der Maus) weisen in Exon 2 ein hohes Maß an Übereinstimmung auf. Der Sequenzvergleich zeigt, daß viele der potentiellen Bindestellen für Transkriptions-Faktoren zwischen Ratte und Maus konserviert sind.

Das Rt6-2 Gen der Maus unterscheidet sich von den anderen Genen durch die Insertion eines repetitiven, ca. 6 kb großen LINE-Elements in die Region zwischen TATA- und CCAAT-Box (Insertionsstelle in der **Abb. 31** deletiert und durch einen Pfeil markiert). Bemerkenswerterweise zeigt das Rt6-2 Gen der Maus auch stromaufwärts des LINE Elements weiter Homologie zu den entsprechenden Bereichen der anderen Gene (Haag et al., 1996).

Abbildung 31. Sequenzvergleich der vor Exon 2 liegenden Promotorregion des RT6-Gens von *R. norvegicus* (*R. norv.*) und *R. rat 1/2* von *R. rattus* sowie *Rt6-1/2* der Maus



Die vor Exon 2 liegenden Bereiche der beiden *Rt6*-Gene der Maus, sowie der entsprechende Abschnitt zweier verschiedener, aus *R. rattus* isolierter Gene wurden sequenziert und mit der Sequenz des *RT6^b*-Gens von *R. norvegicus* verglichen. Sequenzen, die von der Mehrheit der Sequenzen abweichen, sind blau hervorgehoben. Eine Region repetitiver TA- (grau) und CA- (hellgrau) Dinukleotide ist ebenfalls hervorgehoben. Die in der Rattensequenz gefundenen putativen Bindestellen sind gekennzeichnet, ebenso das Exon 2. Man beachte, daß das *Rt6-2*-Gen der Maus zwischen CCAAT- und TATA- Box durch ein ca. 6 kb langes repetitives LINE Element (in dieser Darstellung herausgeschnitten) unterbrochen wird. Die an der Insertionsstelle duplizierte Sequenz ist hellblau untergelegt und durch einen Pfeil markiert. (Abbildung modifiziert nach F. Haag: Habil. Der T-Zell – Differenzierungsmarker *RT6*, 1996).

Beide Gene der Maus weisen 5´ dieser Stelle eine Insertion relativ zu den Rattengen auf, welche ein **CCAAT**-Element enthält. Das korrespondierende Element der Gene von *R. norvegicus* und *R. rattus* liegt etwas nach 5´ verschoben in der umgekehrten Orientierung vor. Die Mehrzahl der bei *R. norvegicus* vorhergesagten Bindestellen sind erhalten. Die **TATA**-Box und das **CACCC**-Elemente sind noch nicht einmal zu *R. rattus* konserviert! Die bei *R. norvegicus* vorhergesagte Bindestelle für den Transkriptionsfaktor **GATA** ist in keinem der anderen Gene konserviert. Diese Beobachtung spricht gegen eine funktionelle Bedeutung dieses Elements. Die vorhergesagte Bindestelle für **IRF-1/2** ist ebenfalls in allen Genen vorhanden.

Die **NF-kB** und **Ikaros**-Stellen sind in den Rattengen und in Rt6-1 hundertprozentig konserviert, und weisen in Rt6-2 nur eine leichte Modifikation auf. Das **Lyf-1** Element ist in allen fünf analysierten Sequenzen ohne Abweichung erhalten.

NF-kB-Familie umfaßt eine Gruppe von Transkriptions-Faktoren, die dadurch charakterisiert sind, daß sie an eine spezifische DNA-Sequenz (Konsensus: 5´-GGGACTTCC-3´) binden. Funktionelle Studien haben gezeigt, daß **NF-kB** ein wichtiger Transkriptions-Faktor von Lymphozyten und zahlreichen anderen Zellen ist, dem bedeutende physiologische Aufgaben zukommen.

Ikaros ist ein lymphozyten-spezifischer Transkriptions-Faktor, der im frühen Stadium der Lymphozytenentwicklung exprimiert wird und wahrscheinlich an der T-Zell-Differenzierung beteiligt ist. **Ikaros** ist ein C2H2-Zinkfinger-Protein, das an eine G-reiche Sequenz (5´-TGGGGGT-3´) bindet. Die Expression von Ikaros ist weitgehend auf T-Zellen und einige B-Zelllinien beschränkt. Ikaros-knockout-Mäuse haben weder B- und T-Zellen, noch natürliche Killerzellen. Ikaros ist somit ein Schlüsselprotein der frühen Lymphozytenentwicklung, das die Differenzierung pluripotenter Stammzellen in Lymphozyten zu fördern scheint.

In dieser Stelle liegt eine nahezu ideale Bindestelle für den **NF-AT** (GGAAAA) Faktor. Wie schon aus dem Namen (s. Abschnitt 3.1.1) hervorgeht wird NF-AT allerdings nur in aktivierten T-Zellen wirksam. **NF-AT** ist ein Faktor, der bei der Transkriptionsaktivierung verschiedener Zytokine (u. a. Interleukin 2, 3 und TNF alpha) nach T-Zell-Aktivierung eine führende Rolle spielt. Eine Transkriptionsaktivierung des RT6-Gens durch NF-AT steht also im Widerspruch zu der Beobachtung, daß RT6 vorwiegend auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird (Hunt and Lubaroff, 1992).

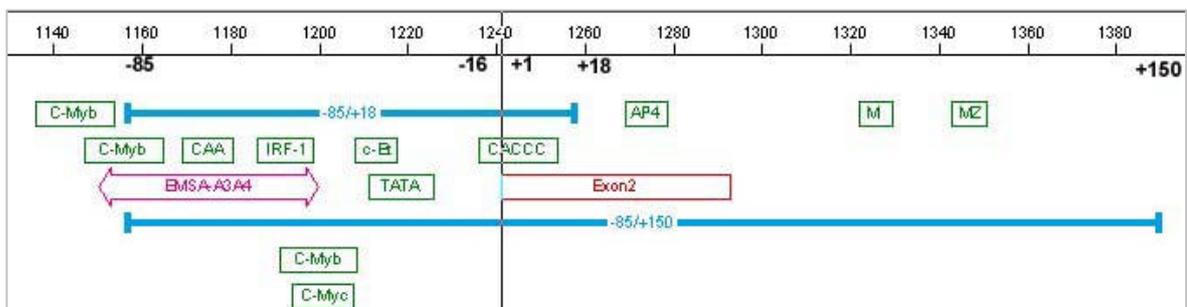
Das **Lyf-1** Protein ist ein Produkt des Ikaros-Lokus, welcher für eine Gruppe von Zinkfinger Transkriptions-Faktoren kodiert, die durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer RNA entstehen (Hahm et al., 1994; Molnar and Georgopoulos, 1994). Lyf-1 wird in T- und B-Zellen während eines großen Teils ihrer Entwicklung exprimiert, und gilt als allgemeiner aktivierender Faktor für die Transkription lymphozytenspezifischer Gene (Lo et al., 1991).

4.2. Charakterisierung eines Minimal-Promotors und zusätzlicher relevanter Bereiche

Die Ergebnisse der 5' und 3' Analyse des Promotors (Abschnitte 3.2.8 und 3.2.9) deuten darauf hin, daß der Sequenzabschnitt zwischen den Nucleotiden -85 und $+18$ einen Minimal-Promotor in dem Sinn darstellt, daß dieser Abschnitt für sich alleine in der Lage ist, Zell-spezifische Promotor-Aktivität zu vermitteln.

In dieser Region befinden sich vom Startpunkt aus stromaufwärts folgende potentielle Bindemotive: **CACCC-**, **TATA-**, **ETS-1-**, **C-Myc-**, **C-Myb-**, **IRF-1/2-**, **CCAAT-**, **C-Myb-Faktoren**. In **Abbildung 32** ist der Minimal-Promotor in Balken und die in dieser Region vorhergesagten Elemente sind in Kästchen dargestellt.

Abbildung 32. Darstellung des Minimal-Promotors und der darin eingebetteten Bindemotive



Diese Abbildung zeigt die Promotorfragmente $-85/+18$ (Minimal), $-85/+150$ (Effizient) und die durch grüne Kästchen gekennzeichnete Elemente, sowie das rot gerahmte Exon 2 und den rosa gekennzeichneten EMSA-A3A4-Abschnitt.

Es ist gezeigt worden, daß an der Polymerasebindungsreaktion eine Vielzahl funktioneller Abschnitte der primären DNA beteiligt sind (Alberts et al., 1995). Der RT6-Promotor braucht wahrscheinlich eines oder mehrere dieser Elemente, um effizient funktionieren zu können.

Am Transkriptionsstart befindet sich ein **CACCC**-Element ($+3/+8$), ein „minimal essential binding site“ der KLF Familie (s. Abschnitt 4.6.). Die **TATA**-Box liegt normalerweise in einer Position um das Nucleotid -30 stromaufwärts vom Transkriptionsstart in den

Promotoren von regulierten Genen. Sie fehlt in den Promotoren von Haushaltsgenen. Dafür haben diese ein funktionsfähiges Inr-Element (Knippers, 1997). Die Ets-1 Stelle (-41/-31) überlappt mit der TATA-Box. **Ets-1** reguliert zahlreiche Promotoren und Enhancer und scheint ein wichtiger Regulator der B-Zelldifferenzierung zu sein. Ein charakteristisches Merkmal von Ets-Proteinen ist, daß sie mit anderen Faktoren interagieren, um Genexpression zu induzieren.

C-Myc und **C-Myb** sind die zellulären Gegenstücke der viralen Protoonkogene v-myc und v-myb. Beide Proteine sind Transkriptions-Faktoren, denen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation zukommt (Neurath et al., 1997). Die **IRF-1/2** Stelle (-55/-43) überlappt mit C-Myb und C-Myc / Max Stellen.

Mittels Mobility-Shift Analyse konnte die spezifische Bindung von Proteinen aus RT6⁺ Zellen an das Oligonukleotid EMSA-A3A4 (-91/-41) und unspezifische Bindung von Proteinen aus RT6⁺ und RT6⁻ T-Zelllinien an das Oligonukleotid EMSA-A5A6 (-543/-520) nachgewiesen werden. Die erste Region enthält putative Bindungsstellen von C-Myb-, CCAAT-, und IFR-1/2-Elemente, und die zweite putative Bindungsstellen von NF-κB und Ikaros. Es ist unklar, welche Proteine es sind, die in Lymphoyten, jedoch nicht in Fibroblasten an die Sequenz EMSA A3A4 binden. Möglicherweise handelt es sich um die Bindung der vorhergesagten Transkriptions-Faktoren an ihre DNA-Erkennungssequenz.

Da das für die Untersuchung verwendete DNA-Molekül A3A4 nicht nur eine einzige Bindestelle enthält und keine Antikörper gegen die genannten Transkriptions-Faktoren zur Verfügung stehen, bleibt noch aufzuklären, welcher Faktor an das Oligonukleotid bindet. Eine weitere Eingrenzung relevanter Bindestellen könnte mittels Mobility Shift mit weiter verkleinerten einzelnen Elementen ermittelt werden.

Eine weitere Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Identität eines Transkriptions-Faktors zu ziehen, sind Konkurrenzexperimente, da der DNA-Protein-Komplex durch eine bekannte Bindestelle spezifisch kompetitiert werden kann. Darüber hinaus kann durch Inkubation des Komplexes mit Transkriptions-Faktor-spezifischen-Antikörpern vor der Auftrennung eine weitere Retardierung, ein „Supershift“ induziert werden, welcher die Anwesenheit des Transkriptions-Faktors in den Komplexen beweist (Brown, 1996).

4.3. Die Aktivität des RT6-Promotors wird durch den SV40-Enhancer gesteigert

Neben den Promotorbereichen können auch von der Initiationsstelle entfernt liegende Elemente die Transkriptionshäufigkeit positiv oder negativ modulieren (sog. "Enhancer" (Verstärker)- oder "Silencer"-Elemente). Transkriptionsverstärker (Enhancer) aktivieren die Transkription und können relativ zur Startstelle der Transkription wechselnde Positionen und Orientierungen einnehmen.

Aber wie wirken sie? Zwei plausible Hypothesen, die sich wechselseitig nicht ausschließen, sind nachfolgend aufgeführt: Enhancer sind „Zutrittsstellen“ auf der DNA für RNA-Polymerase II, möglicherweise weil sie eine geringere Bindungsaffinität für Histone haben, die normalerweise Eukaryonten-DNA umgeben und damit vermutlich die Bindung der RNA-Polymerase II an DNA blockieren. Andererseits können Enhancer die lokale Konformation der DNA derart verändern, daß die Bindung von RNA-Polymerase II erleichtert wird. Enhancer können durch Transkriptions-Faktoren erkannt werden, die die Bindung der RNA-Polymerase II an einen nahegelegenen Promotor fördern. Die Flexibilität der DNA-Helix erlaubt es auch, daß durch Schleifenbildung noch weiter entfernt gebundene Proteine die RNA-Polymerase an einem Promotor beeinflussen können.

Die in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Experimente zeigen, daß der SV 40 Enhancer eine verstärkende Wirkung auf den RT6-Promotor hat. Der Einfluß betrifft besonders die Region $-43/+18$ nahe dem Startpunkt, welche für sich allein keine meßbare transkriptionelle Aktivität besitzt. Damit wird gezeigt, daß die Region $-43/+18$ die Eigenschaften eines **Kern-Promotors** besitzt, eine Region, die für die Initiation der Transkription an der Transkriptionsstartstelle notwendig ist, die aber für sich alleine nicht in der Lage ist, meßbare Transkriptionsaktivität zu vermitteln.

Enhancer scheinen eine wichtige Mittlerrolle bei der selektiven Genexpression zu besitzen. Es ist auch für RT6 zu erwarten, daß Enhancer für die zellspezifische Expression eine Rolle spielen. Um nach diesen Elementen zu suchen, sollte das gesamte RT6-Gens auf das Vorkommen regulatorischer Elemente durch Transfektion von Reporter-gen-Konstrukten durchmustert werden.

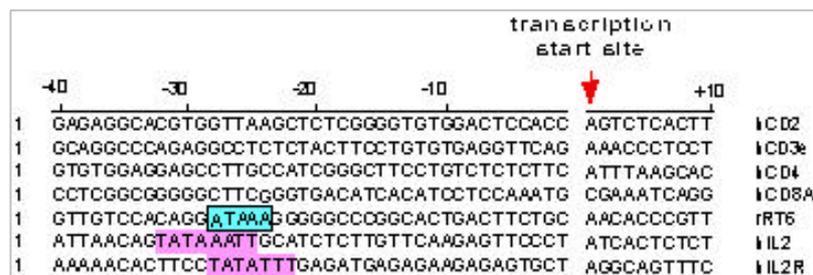
4.4. Das TATA-Element spielt keine Rolle für die RT6-Expression

Es ist gezeigt worden, daß an der Polymerasebindungsreaktion eine Vielzahl funktioneller Abschnitte der primären DNA beteiligt sind. Beispiele dafür sind u.a. die TATA-Box und der Transkriptionsstartpunkt (Initiator) bei Eukaryoten (Jawahery et al., 1994). Diese Sequenzelemente kommen in vielen Promotoren vor und werden konstitutiv genutzt.

In der unmittelbaren Umgebung der TSS2 des RT6-Gens findet sich eine putative TATA-Box (-29/-23). Diese entspricht nicht genau der idealen Konsensus-Sequenz (Wingender, 1993). Die TATA-Box vor Transkriptionsstart 2 (GATAAAG) weist an Position 1 ein G an Stelle eines A auf. Eine systematische Untersuchung von Mutationen der TATA-Konsensussequenz zeigte, daß dieser Basen-Austausch zu einer Reduktion der Aktivität auf ca. 10% führt (Wobbe and Struhl, 1990).

Stromabwärts von dem TATA-Bindemotiv finden wir einen GC-reichen Bereich, der oft als Bindestelle für Zinkfinger Proteine auftritt. Die Befunde der Reporter-gen-Assays zeigen, daß eine Mutation des TATA-Elements zu keiner Veränderung der Promotor-Aktivität führt und die Mutation des GC-reichen Abschnitts auch wirkungslos ist. Im Verlauf der T-Zell Reifung wird RT6, wie die T-Zell Gene CD2, CD3E, CD4, und CD8A, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt angeschaltet und danach konstitutiv exprimiert, im Gegensatz zu aktivierungsbedingt angeschalteten Genen, wie IL-2 oder IL-2 Rezeptor.

Abbildung 33. Promotorbereiche einiger Entwicklungs- und Aktivierungsbedingt exprimierter T-Zell Gene



In dieser Abbildung wird die Promotor-Sequenz am Transkriptionsstart einiger T-Zell Gene vergleichend analysiert. Die TATA Motive von IL-2 und IL-2R, sowie das von mir untersuchte TATA-Element des RT6-Gens, sind schattiert.

Der Vergleich der Promotorabschnitte der genannten Gene deutet darauf hin, daß die entwicklungsbedingt konstitutiv exprimierten, im Gegensatz zu den Aktivierungsbedingt exprimierten T-Zell Genen über keine funktionelle TATA-Box verfügen (**Abb. 33**). Die von mir durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß das RT6-Gen auch in Hinblick auf seine Promotor-Struktur Gemeinsamkeiten mit anderen konstitutiv exprimierten T-Zell

Genen aufweist, und deuten darauf hin, daß diese Gruppe von Genen möglicherweise durch gemeinsame Mechanismen reguliert werden können. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß kürzlich festgestellt werden konnte, daß die Kontrolle der DNA-Methylierung einen wichtigen Anteil an der Regulation der RT6-Expression hat (Rothenburg et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Auch für CD8A konnte eine Beteiligung der DNA-Methylierung an der Expressionskontrolle festgestellt werden (Pestano et al., 1999).

4.5. Andere Mechanismen der RT6-Genregulation

Die meisten Eukaryonten-Gene werden nur über die Initiation der Transkription spezifisch gesteuert. Viele Gene reagieren aber zusätzlich auch auf andere, sekundäre Regulationsvorgänge.

4.5.1. RT6-Expression wird zum Teil durch alternative Transkriptions-Initiation gesteuert

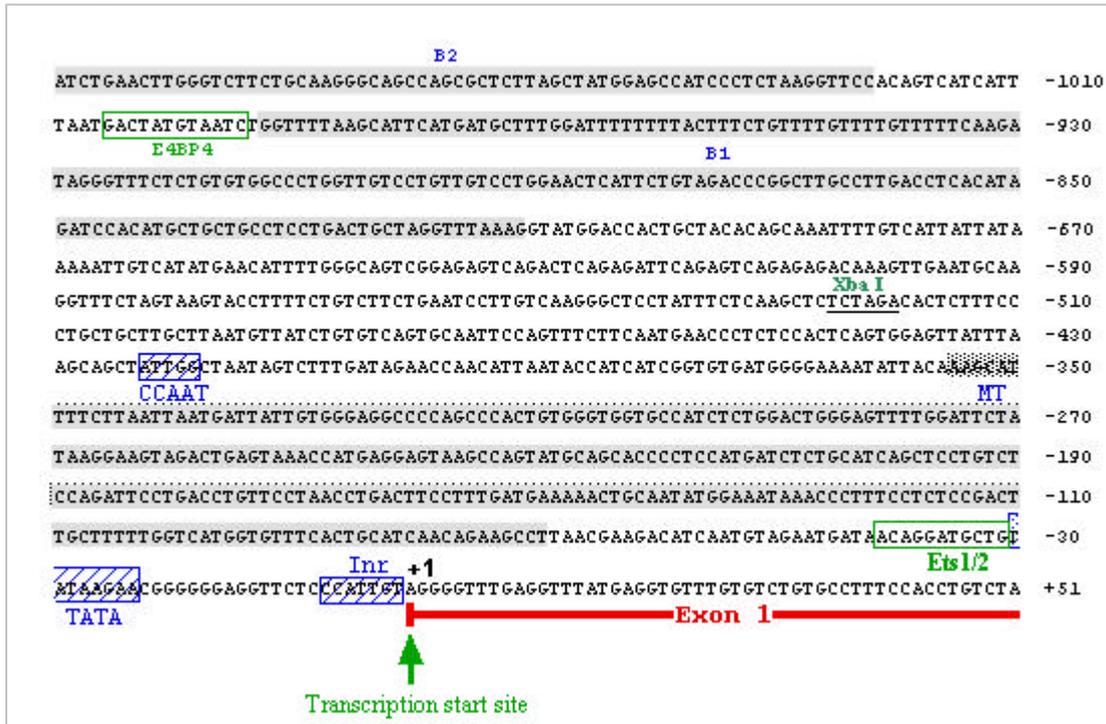
Das RT6-Gen besitzt zwei Transkriptionsstartstellen. Die postulierte Funktion von TSS1 als Transkriptionsstartstelle wird durch in angemessenen Abständen vorkommende typische Promotor-Elemente (**Abb. 34**) untermauert (Haag et al., 1996).

Es wird in zukünftigen Untersuchungen interessant sein, die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Techniken in analoger Weise wie zur Charakterisierung des Promotor 2 auch zur Analyse des Promotor 1 einzusetzen.

Die beiden Promotorregionen des RT6-Gens weisen deutliche Unterschiede auf. Beide enthalten als Kernpromoterelement eine TATA-Box, wobei in beiden Fällen deren Sequenz von der kanonischen TATA-Konsensussequenz TATAAA abweicht. Die Auswirkung solcher Sequenzabweichungen wurden in HeLa-Zellen untersucht. Danach ist zu erwarten, daß die mit TSS1 verbundene TATA-Box (Sequenz) die basale Transkription mit einer höheren Effizienz (ca. 60% der Wildtyp-Sequenz) vermittelt als diejenige von TSS2 (ca. 10 % der Wildtyp-Sequenz) (Wobbe and Struhl, 1990).

Im Gegensatz zu TSS1 weist die mit TSS2 verbundene Promoterregion eine Vielzahl von vorhergesagten Bindestellen aktivierender Faktoren auf, die aus anderen in T-Zellen exprimierten Genen bekannt sind. Es ist denkbar, daß diese Elemente wesentlich zur T-Zell-Spezifität der RT6-Expression beitragen.

Abbildung 34. Die Sequenz des mit Exon 1 verbundenen RT6-Promotors



Durch TRANSFAC Datenbank wurden etwa 1100 Nukleotide 5' von Exon 1 analysiert. Exon 1 beginnt mit dem in der Abb. 34 mit +1 bezeichneten Adenin, und ist durch eine Balken gekennzeichnet. Die repetitiven Elementen sind schraffiert. Vorhergesagte Bindestellen für Transkriptions-Faktoren sind durch Kästen gekennzeichnet. Die TATA-Box in der Position -30, das Inr-Element am Transkriptionsstart, sowie ein invertiertes CCAAT Element sind durch gestreifte Kästen hervorgehoben. (Abbildung modifiziert nach F. Haag: Habil. Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6)

Auch der Promotor 1 wird mit Hilfe des PPNN-Programms auf eine potentielle Promotor-Sequenz analysiert (Abb. 35).

Abbildung 35. Vorhersage der Transkriptionsstartstellen des Promotors 1 mit dem PPNN-Programm

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.98 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for RT6-Promotor 1 (3,7 kb)

Start	End	Score	Promoter Sequence
676	726	0.99	ACAGAGACACCTTTAAAAGGGGGAAATTATAGGTAATCAC A CTCATTAAAT
3590	3640	0.99	CAGGATGCTGTATAAGAACGGGGGAGGTTCTCCATTGT A GGGGTTTGA ↳+1 Exon 1

Das Ergebnis von PPNN ergibt eine Liste von Sequenzabschnitten von 51 Basen, die sich über den Bereich von -40 bis +11 des potentiellen Promotors erstrecken. Die Startpunkte der Transkription, die als Transkriptionsstart in Frage kommen, sind groß angegeben. In der PPNN Analyse werden 2 mögliche Startpunkte des RT6-Promotors 1 vorhergesagt.

In der PPNN Analyse stimmt die Position der 2. Startstelle hundertprozentig mit der experimentell definierten TSS1 (Kuhlenbäumer, 1996) überein. Die Benutzung von mehreren unabhängigen Transkriptionsstartstellen ist bei eukaryontischen Genen nicht

ungewöhnlich. Die beiden Initiationsstellen sorgen vermutlich für unterschiedliche Transkriptionsgeschwindigkeiten.

4.5.2. Die RT6-Expression wird durch Alternatives Spleißen gesteuert

Die Ergebnisse der 5' RACE PCR zeigen, dass die 5' UTR des RT6-Gens in unterschiedlichster Weise gespleißt werden kann. Die am häufigsten gefundene Spleißvariante **2-5-7-8** weist ein einziges langes offenes Leseraster auf, welches in Exon 5 beginnt (Kuhlenbäumer, 1996). Stromaufwärts der kodierenden Region finden sich vier, nicht translatierte Exons. Exons 1 bis 4 kodieren verschiedene Varianten der 5'UTR. Exons 5 und 6 kodieren alternative N-terminale Enden des Proteins. Allen RT6-Transkripten sind die Exon 7 und 8 gemeinsam, welche für das naive Protein und die für die GPI-Membranverankerung notwendige C-terminale Signalsequenz kodieren (Haag et al., 1996).

Alternatives Spleißen kann viele Funktionen haben. Dazu zählen die Erzeugung unterschiedlicher Formen eines Proteins (zum Beispiel: CD45 (Deans et al., 1989)); die Beeinflussung der Translation durch Startcodons und kurze offene Leseraster in der 5' UTR (Kozak, 1987; Kozak, 1991); sowie die Erzeugung von Unterschieden in der mRNA Stabilität verschiedener Spleißvarianten (Oliveira et al., 1995). Durch RNA-Spleißen kann die Produktion verschiedener Formen eines Proteins von ein und demselben Gen reguliert werden. Die Mechanismen der Spleißstellen-Auswahl zur Regulation des RNA-Spleißens sind noch nicht verstanden.

4.5.3. mRNA-Abbau-Kontrolle

Eukaryontische mRNAs werden im Cytoplasma mit sehr unterschiedlicher Geschwindigkeit abgebaut. Fertig prozessierte Eukaryonten-mRNA besitzt ein wohldefiniertes 3'-Ende: dabei handelt es sich fast immer um einen 3'-Poly (A)-Schwanz von ca. 100 bis 200 Nukleotiden Länge. Die Poly (A) –Schwänze, die an fast alle eukaryontische mRNAs angeheftet werden, tragen offensichtlich zum Schutz der Moleküle vor Abbau bei. In RT6-Exon G werden zwei unterschiedliche Polyadenylierungssignale benutzt (Kuhlenbäumer, 1996). Dies geht aus dem Vergleich der Sequenzen unterschiedlicher cDNA-Klone heraus. Das Poly A Signal 1 ist ein „schwaches“ Poly A Signal, Poly A Signal 2 entspricht genau der bei vielen Genen vorkommenden Konsensussequenz (Birnstiel et al., 1985).

4.6. Analyse potentieller regulatorischer Elemente und ihrer Bedeutung für die T-Zell Entwicklung

Wie in der Einleitung geschildert, könnte die RT6-Gen-Expression für das Überleben der T-Zellen notwendig sein. Eine attraktive Hypothese ist in diesem Zusammenhang, daß der *lyp*-Gendefekt der BB-DP Ratte einen direkt für die Anschaltung des RT6-Gens wichtigen Transkriptions-Faktor betrifft.

Die Gene höherer Eukaryonten werden gewöhnlich durch kombinatorische Effekte mehrerer verschiedener positiv und negativ wirkender Gen-Regulatorproteine reguliert. Gen-Regulatorproteine können die Gentranskription aktivieren oder unterdrücken. Für das Einschalten des RT6-Gens sind ebenfalls mehrere Signale verschiedener Gen-Regulatorproteine erforderlich. Jedes dieser Gen-Regulatorproteine kommt nur in wenigen Kopien je Zelle vor, und sie erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz, die gewöhnlich nur 8-15 Nucleotide lang ist.

Zu den klassischen Strukturmotiven des RT6-Promotors zählt man vor allem die TATA- und CCAAT-Boxen. Letztere ist häufig bei TATA-Box-losen Genen, die oft für sogenannte Haushalts-Proteine kodieren, zu finden. Die Mutagenese-Untersuchung des TATA-Motivs zeigt, daß das TATA-Element des RT6-Promotors funktionslos ist (Fang et al., 1999). Die funktionelle Promotoranalyse und DNA/Protein-Interaktionen weisen darauf hin, daß der Promotorbereich -85/-43, wo sich das CCAAT-Element (-72/-60) befindet, funktionell relevant für die Transkription ist. Der Sequenzvergleich spricht auch dafür, daß das **CCAAT**-Element, welches bei der Ratte anders als bei der Maus konfiguriert ist, möglicherweise die durch Promotor-Elemente im Kernbereich vermittelte basale Transkription verstärkt.

Die Deletionsexperimente und Enhancer-Untersuchungen zeigen, daß die Promotor-Region **-43/+18** als Kern-Promotor bezeichnet werden kann. Die Analyse des 3' Endes von RT6-Promotor 2 (Abschnitt 3.2.9.) deutet daraufhin, daß die Sequenzregion abwärts von -16 bp für Transkription erforderlich ist. Diese Beobachtungen führen gemeinsam dazu, daß die Promotor-Region **-16/+18** besonders wichtig für Transkription ist. In diesem Bereich findet sich ein **CACCC**-Element, eine mögliche Bindestelle für Transkriptions-Faktoren der KLF Familie (s. u.). Ein Mobility Shift Assay mit dieser Sequenzregion zeigt, daß Proteine aus RT6 exprimierenden Zellkern an diesem Sequenzabschnitt binden (pers.

Mitteilung von Prof. H-G. Thiele). Das RT6-Gen benötigt möglicherweise dieses CACCC-Element für seine Transkription.

Die "Krüppel-like factors" KLFs sind eine kleine Familie von C2H2-Zinkfinger-Transkriptions-Faktoren, welche durch ein hohes Maß an Sequenzidentität in ihren DNA-bindenden Domänen gekennzeichnet sind, und Homologie zu dem Krüppel Protein aus *Drosophila* aufweisen (Anderson et al., 1995; Kuo et al., 1997; Miller and Bieker, 1993). Viele von ihnen sind an der Regulation von Reifungsvorgängen beteiligt. KLFs können sowohl inhibitorische als auch aktivierende Wirkungen auf die Transkription ihrer Zielgene ausüben (Turner and Crossley, 1998; Turner and Crossley, 1999). Die Familienmitglieder sind BKLF (basic KLF), EKLF (erythroid KLF), GKLF (gut-enriched KLF), LKLF (lung KLF), und UKLF (ubiquitous KLF).

Es wurde gezeigt, daß der ruhende Phänotyp in T-Zellen aktiv durch Expression von **LKLF** induziert werden muß (Kuo et al., 1997), und daß Langlebigkeit mit der aktiven Aufrechterhaltung des Ruhezustands verbunden ist (Freitas and Rocha, 1997). LKLF wird vornehmlich in Blutgefäßen, der Lunge, und in lymphatischem Gewebe exprimiert (Anderson et al., 1995; Kuo et al., 1997; Kuo et al., 1997). Innerhalb des Immunsystems wird LKLF sowohl von B- als auch von T-Zellen exprimiert. Bei letzteren ist die Expression jedoch auf CD4+ und CD8+ "einzelpositiv" Zellen im Thymus, sowie auf periphere T-Zellen beschränkt. In peripheren T-Zellen wird LKLF nach Zellaktivierung sowohl transkriptionell als auch post-translational, vermutlich durch Proteolyse, herunterreguliert (Kuo and Leiden, 1999; Kuo et al., 1997).

Da die DNA-bindenden Domänen der Mitglieder der KLF Familie einen hohen Grad an Sequenzidentität aufweisen, ist es möglich, daß LKLF an dieses Sequenzelement bindet. Die Gemeinsamkeiten zwischen RT6 und LKLF in Bezug auf Expressionsprofil und Funktion werfen die Frage auf, ob LKLF an der Regulation der RT6-Expression beteiligt ist. Das RT6 Gen weist ein interessantes Expressionsmuster auf. Es ist auf T-Zellen beschränkt, erscheint bei diesem jedoch erst zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt, nachdem die Reifung der Zellen abgeschlossen ist. Die von mir vorgelegte Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Mechanismen, die diesem Expressionsmuster zugrunde liegen, indem sie Bereiche des Promotors definiert, die für die Expression in T-Zellen wichtig sind. Es wird späteren Arbeiten vorbehalten bleiben, die Mechanismen der Expressionskontrolle im Detail aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6 bezeichnet eine T-Zell-spezifische, über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Zelloberflächen-Mono-(ADP-ribosyl) transferase (ART) der Säugetiere. Er wird spezifisch auf reifen langlebigen T-Zellen, intraepithelialen Lymphozyten (IELs) und einer Subpopulation natürlicher Killer (NK) Zellen exprimiert. ADP-Ribosylierung auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) der Maus führt zu Hemmung wichtiger Effektorfunktion dieser Zellen, wie der Proliferation, der Adhäsion an Zielzellen, sowie des zytotoxischen Potentials. Im BB Rattenmodell für den autoimmunen insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM), ist die Krankheitsempfänglichkeit verbunden mit einer Lymphopenie, die durch Fehlen der RT6-exprimierenden Zellen charakterisiert werden kann. Diabetes, T-Lymphopenie und RT6-Expressionsdefekt der BB Ratte werden durch eine einzige Genvariante bestimmt, die man *lyp* (für Lymphopeniegen) genannt hat, und die auf Chromosom 4 der Ratte kartiert wird. Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der RT6-Gen-Regulation, um sich der Fragen anzunähern, ob der RT6-Expressionsdefekt und die Erkrankungsanfälligkeit im BB-Rattenmodell eine gemeinsame Ursache haben. Das RT6 weist 2 unabhängige Promotorbereiche auf. In dieser Arbeit wird die Promotoranalyse aufgrund bisheriger Untersuchungen auf Promotor 2 fokussiert.

Die experimentell ermittelten Transkriptionsstartstellen werden vom Programm „Promotor Prediction by Neural Network“ bestätigt. Mittels TRANSFAC Datenbank werden sowohl typische Elemente eukaryontischer Promotoren, als auch lymphozyten-spezifische Transkriptionsfaktorenbindungsstellen (TFBS) von diesem Promotor vorhergesagt. Promotorfragmente, welche sich in ihren 5'- und 3'-Enden, sowie in den von ihnen enthaltenen putativen TFBS unterscheiden, werden durch PCR amplifiziert und in den pGL3-Basic-Reportervektor kloniert. Reportergen Assays zeigen, daß der RT6 Promotor zellspezifisch die Transkription in T- und NK-Zellen stärker als in Fibroblasten vermittelt. Durch Deletionsversuche habe ich einen minimalen Bereich von **-85/+18** definiert, der in T-Zellen eine meßbare Promotoraktivität besitzt. Durch Vorschalten des heterologen SV40 Promotors konnte der Bereich **-43/+18** als Kern-Promotor identifiziert werden. Mobility Shift Untersuchungen zeigen, daß bisher noch unbekannte Kernproteine an Oligonukleotide binden, die aus den Bereichen -540/-520 (putative NF-kB-, Ikaros-TFBS) und -90/-41 (vorhergesagte CCAAT-, IRF-1/2-, C-Myb-TFBS) abgeleitet sind. Durch *in vitro* Mutagenese wird gezeigt, daß weder die Zerstörung eines mutmaßlichen TATA Elements noch die Mutation eines GC reichen Sequenzelements die Promotoraktivität in EpD3 Zellen beeinflusst. RT6 gehört damit zu einer Gruppe entwicklungsbedingt exprimierter T-Zell-spezifischen Gene, wie CD3E, CD4, CD8A, die alle keine funktionale TATA-Box besitzen.

Die Deletionsversuche zeigen, daß die Promotorregion **-16/+18** für Transkription essentiell ist. In diesem Bereich findet sich ein **CACCC**-Element. Es handelt sich dabei um ein Kernmotiv der Bindungsstellen für Zinkfinger Proteine der **KLF** (Krüppel-like factor) -Familie. Viele von diesen sind an der Regulation von Reifungsvorgängen beteiligt. Es wurde gezeigt, daß der ruhende Phänotyp in T-Lymphozyten aktiv durch Expression von **LKLF** (lung KLF) induziert werden muß, und daß Langlebigkeit mit der Aufrechterhaltung des Ruhezustands verbunden ist. RT6 und LKLF zeigen eine funktionelle Gemeinsamkeit, insofern sie beide an der Erhaltung des ruhenden Phänotyps beteiligt sind. Es ist eine attraktive Hypothese, daß LKLF an der Regulation der RT6-Expression beteiligt ist. Dies muß in weiteren Experimenten geklärt werden.

6. Bibliographie

1. Alberts, U. a. v., Bruce, A., Bray, Dennis, Lewis, Julian, Martin, R., Keith, R., and Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*, VCH Wiley Verlag).
2. Anderson, K. P., Kern, C. B., Crable, S. C., and Lingrel, J. B. (1995). Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family, *Mol Cell Biol* 15, 5957-65.
3. Angelillo, M., Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Nakamura, N., McKeever, U., and Rossini, A. (1988). Absence of RT6+ T cells in diabetes-prone biobreeding/Worcester rats is due to genetic and cell developmental defects, *J Immunol* 141, 4146-51.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., J.G., S., and Struhl, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York.
5. Bell, E. B., Yang, C. P., Sarawar, S. R., and Sparshott, S. M. (1992). The cyclic expression of CD45R isoforms on CD4 T cells, *Biochem Soc Trans* 20, 198-202.
6. Birnboim, H., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In *Nucleic-Acids-Res.*, pp. 1513-23.
7. Birnstiel, M. L., Busslinger, M., and Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site!, *Cell* 41, 349-59.
8. Blackman, M. A., Finkel, T. H., Kappler, J., Cambier, J., and Marrack, P. (1991). Altered Antigen Receptor Signaling in Anergic T Cells From Self-tolerant T-cell Receptor β -chain Transgenic Mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6682 - 6686.
9. Boitard, C., Debray, S. M., Pouplard A, Assan R, and J, H. (1981). Lymphocytes from diabetics suppress insulin release in vitro. In *Diabetologia*, pp. 41-6.
10. Brown, T. A. (1996). *Gentechnologie für Einsteiger*, Vol 2. Aufl. (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg).
11. Bucher, P., and Trifonov, E. N. (1986). Compilation and analysis of eukaryotic POLII promoter sequences, *NuclAcids Res* 14, 10009-10026.

12. Burstein, D., Mordes, J. P., Greiner, D. L., Stein, D., Nakamura, N., Handler, E. S., and Rossini, A. A. (1989). Prevention of diabetes in BB/Wor rat by single transfusion of spleen cells. Parameters that affect degree of protection, *Diabetes* 38, 24-30.
13. Butcher, G. W., and Howard, J. C. (1977). An alloantigenic system on rat peripheral T cells, 1, 12.
14. Butcher, G. W., Clarke, S., and Tucker, E. M. (1979). Close linkage of peripheral T-lymphocyte antigen A (PtaA) to the hemoglobin variant Hbb on linkage group I of the rat, *Transplant Proc* 11, 1629-1630.
15. Charles, M., Suzuki, M., Waldeck, N., Dodson, L., Slater, L., Ong, K., Kershner, A., Buckingham, B., and Golden, M. (1983). Immune islet killing mechanisms associated with insulin-dependent diabetes: in vitro expression of cellular and antibody-mediated islet cell cytotoxicity in humans., *J Immunol* 130(3), 1189-94.
16. Conzelmann, A., Corthesy, P., Cianfriglia, M., Silva, A., and al., e. (1982). Hybrids between rat lymphoma and mouse T cells with inducible cytolytic activity, *Nature* 298.
17. Cooper, T. G. (1981). *Biochemische Arbeitsmethoden.*, Walter de Gruyter Berlin, New York).
18. Crisa, L., Greiner, D. L., Mordes, J. P., MacDonald, R. G., Handler, E. S., Czech, M. P., and Rossini, A. A. (1990). Biochemical studies of RT6 alloantigens in BB/Wor and normal rats. Evidence for intact unexpressed RT6a structural gene in diabetes-prone BB rats, *Diabetes* 39, 1279-88.
19. Crisa, L., Sarkar, P., Waite, D. J., Haag, F., Koch-Nolte, F., Rajan, T. V., Mordes, J. P., Handler, E. S., Thiele, H.-G., Rossini, A. A., and Greiner, D. L. (1993). An RT6a Gene Is Transcribed and Translated in Lymphopenic Diabetes-Prone BB Rats, *Diabetes* 42, 688-695.
20. Deans, J., Boyd, A., and Pilarski, L. (1989). Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD-45 (T200) involve rapid activation of alternative mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R, *J Immunol* 143.

21. DeWitt, C. W., and McCallough, M. (1975). AgF: serological and genetic identification of a new locus in the rat governing lymphocyte membrane antigens, *Transplant* 19, 310-314.
22. Fang, J., Rothenburg, S., F, K.-N., HG, T., and Haag, F. (1999). Mutation of a putative TATA motif does not affect transcription by the promoter of the rat T cell differentiation marker RT6., *Transplant Proc* 31 (3), 1629-30.
23. Fangmann, J., Schwinzer, R., Hedrich, H. J., Kloting, I., and Wonigeit, K. (1991). Diabetes-prone BB rats express the RT6 alloantigen on intestinal intraepithelial lymphocytes, *Eur J Immunol* 21, 2011-5.
24. Fangmann, J., Schwinzer, R., Winkler, M., and Wonigeit, K. (1990). Expression of RT6 alloantigens and the T-cell receptor on intestinal intraepithelial lymphocytes of the rat, *Transplant Proc* 22, 2543-4.
25. Fowell, D., and Mason, D. (1993). Evidence that the T Cell Repertoire of Normal Rats Contains Cells with the Potential to Cause Diabetes. Characterization of the CD4+ T Cell Subset That Inhibits This Autoimmune Potential, *J Exp Med* 177, 627 - 636.
26. Fowell, D., McKnight, A. J., Powrie, F., Dyke, R., and Mason, D. W. (1991). Subsets of CD4+ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity, *Immunol Rev* 123, 37.
27. Fowlkes, B. J., and Ramsdell, F. (1993). T-cell tolerance, *Current Opinion in Immunology* 5, 873-879.
28. Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997). Lymphocyte survival: a red queen hypothesis [see comments], *Science* 277, 1950.
29. Freitas, A. A., and Rocha, B. (1999). Peripheral T cell survival, *Curr Opin Immunol* 11, 152-6.
30. Galfre, G., and Milstein, C. (1982). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures, *MethEnzymol* 73.

31. Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages, *Cell* 79, 143-56.
32. Georgopoulos, K., Moorre, D. D., and Derfler, B. (1992). Ikaros, an early Lymphoid-Specific Transcription Factor and a Putative Mediator for T-Cell Commitment Science, *Science* 258, 808-812.
33. Gill, G. (1994). Transcriptional initiation. Taking the initiative, *Curr Biol* 4, 374-6.
34. Gilliland, G., Perrin, S., and Bunn, H. F. (1989). In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction - quantitation of initial concentration of target sequences, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
35. Greiner, D. L., Handler, E. S., Nakanko, K., Mordes, J. P., and Rossini, A. A. (1986). Absence of the RT6 T cell subset in diabetes-prone BB/W rats, *J Immunol* 136, 148-151.
36. Greiner, D. L., Mordes, J. P., Handler, E. S., Angelillo, M., Nakamura, N., and Rossini, A. A. (1987). Depletion of RT6.1+ T lymphocytes induces diabetes in resistant biobreading/Worcester (BB/W) rats, *J Exp Med* 166, 461-75.
37. Haag, F. (1996) Der T-Zell Differenzierungsmarker RT6: ein polymorphes System GPI-verankerter Oberflächenproteine mit Verwandtschaft zu bakteriellen ADP-ribosylierenden Toxinen, Habilitationsschrift, Universität Hamburg.
38. Haag, F., and Nolte, F. (1999). Oberflächenenzyme von T-Zellen modulieren die Signalübermittlung an der "immunologischen Synapse", *BIOforum* 22, 534-536.
39. Haag, F., Andresen, V., Karsten, S., Koch, N. F., and Thiele, H. (1995). Both allelic forms of the rat T cell differentiation marker RT6 display nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-glycohydrolase activity, yet only RT6.2 is capable of automodification upon incubation with NAD, *Eur J Immunol* 25, 2355-61.
40. Haag, F., Koch, F., and Thiele, H. G. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the rat T-cell alloantigen RT6.1, *Nucleic Acids Res* 18, 1047.

41. Haag, F., Koch, F., and Thiele, H. G. (1990). Polymorphism between rat T-cell alloantigens RT6.1 and RT6.2 is based on multiple amino acid substitutions, *Transplant Proc* 22, 2541-2542.
42. Haag, F., Koch, F., Kashan, A., and Thiele, H. G. (1988). Establishment of rat T cell hybridomas expressing the T cell differentiation marker RT6.1 and the rat T cell receptor for antigen as detected by monoclonal antibody HIS.42. (abstract), *Immunobiol* 178, 105.
43. Haag, F., Kuhlenbäumer, G., Koch-Nolte, F., Wingender, E., and Thiele, H.-G. (1996). Structure of the gene encoding the rat T cell ecto-ADP-ribosyltransferase RT6, *J Immunol* 157, 2022-2030.
44. Haag, F., Kuhlenbäumer, G., Matthes, M., Hollmann, C., Rothenburg, S., Thiele, H.-G., and Koch-Nolte, F. (1996). Identification of two independent promoters in the gene for the T-cell activation antigen RT6. In 27th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie (Hamburg, FRG).
45. Haag, F., Nolte, F., Hollmann, C., and Thiele, H.-G. (1993). Analysis of the Gene for the Rat T Cell Alloantigen RT6: Evidence for Alternative Splicing in the 5' Region, *Transpl Proc* 25, 2884-2885.
46. Haag, F., Nolte, F., Lernmark, A., Simrell, C., and Thiele, H.-G. (1993). Analysis of T cell surface marker profiles during the postnatal ontogeny of normal and diabetes prone-rats., *Transpl Proc* 25, 2831-2832.
47. Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G. S., Turck, C., and Smale, S. T. (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene, *Mol Cell Biol* 14, 7111-23.
48. Hahn, H., Lucke, S., Kloting, I., Volk, H., Baehr, R., and Diamantstein, T. (1987). Curing BB rats of freshly manifested diabetes by short-term treatment with a combination of a monoclonal anti-interleukin 2 receptor antibody and a subtherapeutic dose of cyclosporin A. In *Eur J Immunol*, pp. 1075-8.
49. Hawkins, J. D. (1988). A survey on exon and intron lengths, *Nucl Acids Res* 16, 9893-9908.

-
50. Hernandez, H., G., Joseph, S., Miller, N. G., and Butcher, G. W. (1999). The lymphopenia mutation of the BB rat causes inappropriate apoptosis of mature thymocytes, *Eur J Immunol* 29, 1832-41.
 51. Herold, K., Montag, A., and Fitch, F. (1987). Treatment with anti-T-lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozocin. In *Diabetes*, pp. 796-801.
 52. Hosseinzadeh, H., and Goldschneider, I. (1993). Recent Thymic Emigrants in the Rat Express a Unique Antigenic Phenotype and Undergo Post-Thymic Maturation in Peripheral Tissues, *J Immunol* 150, 1670 - 1679.
 53. Hunt, H. D., and Lubaroff, D. M. (1992). Identification of functional T cell subsets and surface antigen changes during activation as they relate to RT6, *Cell Immunol* 143, 194-211.
 54. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In *Gene.*, pp. 23-8.
 55. Inoue, S., Sugai, M., Murooka, Y., Paik, S. Y., Hong, Y. M., Ohgai, H., and Suginaka, H. (1991). Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from *Staphylococcus aureus*, *Biochem Biophys Res Commun* 174, 459-64.
 56. Iwakoshi, N. N., Goldschneider, I., Tausche, F., Mordes, J. P., Rossini, A. A., and Greiner, D. L. (1998). High frequency apoptosis of recent thymic emigrants in the liver of lymphopenic diabetes-prone BioBreeding rats, *J Immunol* 160, 5838-50.
 57. Jacob, H. J., Pettersson, A., Wilson, D., Mao, Y., Lernmark, Å., and Lander, E. S. (1992). Genetic dissection of autoimmune type I diabetes in the BB rat, *Nature Genetics* 2, 56 - 60.
 58. Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie, G. B., and Smale, S. T. (1994). DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 14, 116-27.
 59. Kappler, J. W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell* 49, 273 - 280.

-
60. Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+CD8+ thymocytes., *Nature* 333, 742 - 746.
 61. Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*, Thime Georg Verlag).
 62. Knüppel, R., Dietze, P., Lehnberg, W., Frech, K., and Wingender, E. (1994). TRANSFAC Retrieval Programm: A Newwork Model Database of Eukaryotic Transcription Regulating Sequences and Proteins, *J of Coputational Biology* 1, 191-198.
 63. Koch, F., Haag, F., and Thiele, H. G. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence for the mouse homologue of the rat T-cell differentiation marker RT6, *Nucleic Acids Res* 18, 3636.
 64. Koch, F., Haag, F., Kashan, A., and Thiele, H. G. (1989). Construction of a rat T-cell hybridoma cDNA expression library and isolation of a cDNA clone for the rat T-cell differentiation marker RT6.2, *Immunology* 67, 344-350.
 65. Koch, F., Haag, F., Kashan, A., and Thiele, H. G. (1990). Primary structure of rat RT6.2, a nonglycosylated phosphatidylinositol-linked surface marker of postthymic T cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 964-967.
 66. Koch, F., Kashan, A., and Thiele, H. G. (1988). Production of a rat T cell hybridoma that stably expresses the T cell differentiation marker RT6.2, *Hybridoma* 7, 341-353.
 67. Koch, F., Kashan, A., and Thiele, H. G. (1988). The rat T-cell differentiation marker RT6.1 is more polymorphic than its alloantigenic counterpart RT6.2, *Immunol* 65, 259-265.
 68. Koch, F., Thiele, H. G., and Low, M. (1987). Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the rat T cell antigens RT6.2 and Thy.1, *Transplant Proc* 19, 3140-3143.
 69. Koch-Nolte, F., Duffy, T., Nissen, M., Kahl, S., Killeen, N., Haag, F., and Leiter, E. H. (1999). A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution and inbred strain variation. In *J. Immunol.*, pp. 6014-22.

-
70. Koch-Nolte, F., Klein, J., Hollmann, C., Kühl, M., Haag, F., Gaskins, R., Leiter, E., and Thiele, H.-G. (1995). Defects in the structure and expression of the genes for the T cell marker Rt6 in NZW and (NZB x NZW) F1 mice, *Int Immunol* 7, 883-890.
 71. Koch-Nolte, F., Kühl, M., Haag, F., Cetkovic-Cvrlje, M., Leiter, E. H., and Thiele, H.-G. (1996). Assignment of the human and mouse genes for muscle ecto-mono-ADP-ribosyltransferase to a conserved linkage group on human chromosome 11p15 and mouse chromosome 7, *Genomics* 36, 215-216.
 72. Koch-Nolte, F., Petersen, D., Balasubramanian, S., Haag, F., Kahlke, D., Willer, T., Kastelein, R., Bazan, F., and Thiele, H.-G. (1996). Mouse T cell membrane proteins Rt6-1 and Rt6-2 are arginine/protein mono(ADPribosyl)transferases and share secondary structure motifs with ADP-ribosylating bacterial toxins., *J Biol Chem* 271, 7686-7693.
 73. Koevary, S., Rossini, A. A., Stoller, W., Chick, W., and Williams, R. M. (1983). Passive transfer of diabetes in the BB/W rat, *Science* 220, 727 - 728.
 74. Kozak, M. (1987). An Analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs., *Nucleic Acids Research* 15.
 75. Kozak, M. (1991). An Analysis of Vertebrate mRNA Sequences: Intimations of translational control, *JCellBiol* 115, 887-903.
 76. Kuhlenbäumer, G. (1996) Die Genstruktur des Ratten T-Lymphozyten Differenzierungsmarkers RT6, Dissertation, University Hamburg.
 77. Kuhlenbäumer, G., Haag, F., Koch-Nolte, F., and Thiele, H.-G. (1997). Transcription of the gene for the rat T-cell differentiation marker RT6 in adult rat spleen cells is mainly mediated by a promoter 5' of exon 2, *Transpl Proc* 29, 1701-1702.
 78. Kuhlenbäumer, G., Rothenburg, S., Matthes, M., Hollmann, C., Wingender, E., Thiele, H. G., Koch-Nolte, F., and Haag, F. (1997). Expression of the RT6 mono (ADP-ribosyl) transferases is regulated by two promoter regions. In *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono (ADP-Ribosyl) Transferases and Related Enzymes*, F. Haag, and F. Koch-Nolte, eds. (New York, Plenum Press), pp. 265-270.

-
79. Kuo, C. T., and Leiden, J. M. (1999). Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function [In Process Citation], *Annu Rev Immunol* 17, 149-87.
 80. Kuo, C. T., Veselits, M. L., and Leiden, J. M. (1997). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival [see comments], *Science* 277, 1986-90.
 81. Kuo, C. T., Veselits, M. L., Barton, K. P., Lu, M. M., Clendenin, C., and Leiden, J. M. (1997). The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis, *Genes Dev* 11, 2996-3006.
 82. Lampeter, E., Bierwolf, B., Krug, J., Verlohren, H., Lohmann, D., and Cossel, L. (1987). Electron microscopical investigations on lymphocyte cytotoxicity against beta-cells in recent onset IDDM. In *Diabetes Res*, pp. 159-67.
 83. Lang, F., Maugendre, D., Houssaint, E., B, C., and Sai, P. (1987). Cytoadherence of lymphocytes from type I diabetic subjects to insulin-secreting cells. Marker of anti-beta-cell cellular immunity. In *Diabetes*, pp. 1356-64.
 84. Lo, K., Landau, N. R., and Smale, S. T. (1991). LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes, *Mol Cell Biol* 11, 5229-43.
 85. Lohmann, D., Krug, J., Lampeter, E., Bierwolf B, and HJ, V. (1986). Cell-mediated immune reactions against B cells and defect of suppressor cell activity in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. In *Diabetologia*, pp. 421-5.
 86. MacCuish, A., Irvine, W., Barnes EW, and LJ, D. (1974). Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. In *Lancet*, pp. 1529-31.
 87. Maclaren, N., and M, C. (1976). How much insulin? In *Am J Dis Child*, pp. 1307-8.
 88. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., and Mehta, K. (1994). Human CD38: a glycoprotein in search of a function, *Immunol Today* 15, 95-97.

-
89. Markholst, H., Eastman, S., Wilson, D., Andreasen, B. E., and Lernmark, A. (1991). Diabetes segregates as a single locus in crosses between inbred BB rats prone or resistant to diabetes, *J Exp Med* 174, 297-300.
 90. Mason, D., and Fowell, D. (1992). T-cell subsets in autoimmunity, *Curr Op Immunol* 4, 728 - 732.
 91. Mason, D., and Powrie, F. (1998). Control of immune pathology by regulatory T cells, *Current Opinion in Immunology* 10, 649-655.
 92. Matthes, M., Hollmann, C., Bertuleit, H., Köhl, M., Thiele, H.-G., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (1997). 'Natural' Rt6-1 and Rt6-2 'knock-out' mice. In *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono(ADP-Ribosyl)Transferases and Related Enzymes*, F. Haag, and F. Koch-Nolte, eds. (New York, Plenum Press), pp. 271-274.
 93. Miller, I. J., and Bieker, J. J. (1993). A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins, *Mol Cell Biol* 13, 2776-86.
 94. Mojcik, C. F., Greiner, D. L., Medlock, E. S., Komschlies, K. L., and Goldschneider, I. (1988). Characterization of RT6 bearing rat lymphocytes - ontogeny of the RT6+ subset, *Cell Immunol* 114, 336-246.
 95. Molnar, A., and Georgopoulos, K. (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins, *Mol Cell Biol* 14, 8292-303.
 96. Moss, J., Stanley, S. J., Nightingale, M. S., Murtagh, J. J., Monaco, L., Mishima, K., Chen, H. C., Williamson, K. C., and Tsai, S. C. (1992). Molecular and immunological characterization of ADP-ribosylarginine hydrolases, *J Biol Chem* 267, 10481-8.
 97. Moss, J., Stevens, L. A., Cavanaugh, E., Okazaki, I. J., Bortell, R., Kanaitsuka, T., Mordes, J. P., Greiner, D. L., and Rossini, A. A. (1997). Characterization of mouse Rt6.1 NAD:arginine ADP-ribosyltransferase, *J Biol Chem* 272, 4342-6.

-
98. Mueller, D. L., Jenkins, M. K., and Schwartz, R. H. (1989). Clonal Expansion versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signal Determines the Outcome of T Cell Receptor Occupancy, *Annu Rev Immunol* 7, 445 - 480.
 99. Nemoto, E., Stohlman, S., and Dennert, G. (1996). Release of a glycosylphosphatidylinositol-anchored ADP-ribosyltransferase from cytotoxic T cells upon activation, *J Immunol* 156, 85-92.
 100. Nemoto, E., Yu, Y., and Dennert, G. (1996). Cell surface ADP-ribosyltransferase regulates lymphocyte function-associated molecule-1 (LFA-1) function in T cells, *J Immunol* 157, 3341-9.
 101. Nerup, J., Andersen, O., G, B., J, E., and JE, P. (1971). Anti-pancreatic cellular hypersensitivity in diabetes mellitus. In *Diabetes.*, pp. 424-7.
 102. Neurath, M., Ma, X., and Pettersson, S. (1997). *DNA/Protein-Interaktionen*, Spektrum akademischer Verlag).
 103. Oliveira, D. B., Gillespie, K., Wolfreys, K., Mathieson, P. W., Qasim, F., and Coleman, J. W. (1995). Compounds that induce autoimmunity in the brown Norway rat sensitize mast cells for mediator release and interleukin-4 expression, *Eur J Immunol* 25, 2259-64.
 104. Ollier, W., and Symmons, D. P. M. (1995). *Autoimmunität*, Spektrum akademischer Verlag).
 105. Pestano, G., Zhou Y, Trimble LA, Daley J, Weber GF, and H, C. (1999). Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death., *Science* 284 (5417), 1187-91.
 106. Prochazka, M., Gaskins, H. R., Leiter, E. H., Koch-Nolte, F., Haag, F., and Thiele, H. G. (1991). Chromosomal localization, DNA polymorphism, and expression of Rt-6, the mouse homologue of rat T-lymphocyte differentiation marker RT6, *Immunogenetics* 33, 152-156.
 107. Ramanathan, S., Norwich, K., and Poussier, P. (1998). Antigen activation rescues recent thymic emigrants from programmed cell death in the BB rat, *J Immunol* 160, 5757-64.

-
108. Rashba, E. J., Reich, E. P., Janeway, C. A., and Sherwin, R. S. (1993). Type 1 diabetes mellitus: an imbalance between effector and regulatory T cells?, *Acta Diabetol* 30, 61-69.
 109. Reese, M. G. a. E., F.H. (1995). Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. Paper presented at: The Seventh International Genome Sequencing and Analysis Conference (Hilton Head Island, South Carolina. Abstract).
 110. Reese, M. G., Harris, N.L. and Eeckman, F.H. (1996). Large Scale Sequencing Specific Neural Networks for Promoter and Splice Site Recognition. Paper presented at: Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium (Publishing Co, Singapore,).
 111. Rigby, M. R., Bortell, R., Stevens, L. A., Moss, J., Kanaitsuka, T., Shigeta, H., Mordes, J. P., Greiner, D. L., and Rossini, A. A. (1996). Rat RT6.2 and mouse Rt6 locus 1 are NAD+:arginine ADP ribosyltransferases with auto-ADP ribosylation activity, *J Immunol* 156, 4259-4265.
 112. Rocha, B., and von Boehmer, H. (1991). Peripheral Selection of the T Cell Repertoire, *Science* 251, 1225 - 1228.
 113. Rossini, A. A., Faustman, D., Woda, B. A., Like, A. A., Szymanski, I., and Mordes, J. P. (1984). Lymphocyte transfusions prevent diabetes in the Bio-Breeding/Worcester (BB/W) rat, *J Clin Invest* 74, 39 46.
 114. Rossini, A. A., Mordes, J. P., and Like, A. A. (1985). Immunology of Insulin-dependent Diabetes mellitus, *Ann Rev Immunol* 3, 289 - 320.
 115. Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H.-G., and Haag, F. (zur Veröffentlichung eingereicht). A role for DNA methylation in monoallelic and tissue specific expression of the rat T cell differentiation alloantigen RT6.
 116. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

-
117. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors., *ProcNatlAcadSci* 74, 5463-5467.
 118. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. In *Nucleic Acids Res*, pp. 6419.
 119. Scott, J., Engelhard, V., Curnow, R., and Benjamin, D. (1986). Prevention of diabetes in BB rats. I. Evidence suggesting a requirement for mature T cells in bone marrow inoculum of neonatally injected rats. In *Diabetes*, pp. 1034-40.
 120. Scott, P. (1993). Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets, *Curr Opin Immunol* 5, 391 - 397.
 121. Shizuru, J., Taylor, E. C., Banks, B., Gregory, A., and Fathman, C. (1988). Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. In *Science*, pp. 659-62.
 122. Skerka, C., and Zipfel, P. F. (1998). Molekulare Mechanismen der Immunregulation - Das EGR-1 Zinkfingerprotein fungiert als Aktivator des Interleukin- 2 (IL-2) *Gens, BIOform* 9, 513-516.
 123. Takada, T., Iida, K., and Moss, J. (1993). Cloning and site-directed mutagenesis of human ADP-ribosylarginine hydrolase, *J Biol Chem* 268, 17837-43.
 124. Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Perarnau, B., Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells [see comments], *Science* 276, 2057-62.
 125. Thiele, H. G., Arndt, R., Stark, R., and Wonigeit, K. (1979). Detection and partial molecular characterization of the rat-T-lymphocyte surface protein L21 by allo-(anti-RT Ly 2.2) and xeno-(anti-RT-LN-LyIg-)sera, *Transplant Proc* 11, 1636-1638.
 126. Thiele, H. G., Koch, F., and Kashan, A. (1987). Postnatal distribution profiles of Thy-1+ and RT6+ cells in peripheral lymph nodes of DA rats., *Transplant Proc* 19, 3157-3160.

127. Thiele, H. G., Koch, F., Haag, F., and Wurst, W. (1989). Evidence for normal thymic export of lymphocytes and an intact RT6a gene in RT6 deficient diabetes prone BB-rats, *Thymus* 14, 137-143.
128. Thiele, H. G., Koch, F., Hamann, A., and Arndt, R. (1986). Biochemical characterization of the T-cell alloantigen RT6.2, *Immunol* 59, 195-201.
129. Thiele, H.-G., Haag, F., and Nolte, F. (1993). Asymmetric Expression of RT6.1 and RT6.2 Alloantigens in (RT6axRT6b)F1 Rats Is Due to a Pretranslational Mechanism, *Transpl Proc* 25, 2786-2788.
130. Turner, J., and Crossley, M. (1998). Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators, *Embo J* 17, 5129-40.
131. Turner, J., and Crossley, M. (1999). Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger, *Trends Biochem Sci* 24, 236-40.
132. Ueda, K., and Hayaishi, O. (1985). ADP-ribosylation, *Ann Rev Biochem* 54, 73-100.
133. Voet, D., and Voet, J. G. (1992). *Biochemie*, Weinheim: VCH.).
134. Wang, J., Nemoto, E., and Dennert, G. (1996). Regulation of CTL by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) involves ADP-ribosylation of a p56lck-associated protein, *J Immunol* 156, 2819-2827.
135. Wang, J., Nemoto, E., and Dennert, G. (1997). Regulation of cytotoxic T cell functions by a GPI-anchored ecto-ADP-ribosyltransferase. In *Adv Exp Med Biol*, pp. 191-201.
136. Wang, J., Nemoto, E., Kots, A. Y., Kaslow, H. R., and Dennert, G. (1994). Regulation of cytotoxic T cells by ecto-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) correlates with cell surface GPI-anchored/arginine ADP-ribosyltransferase, *J Immunol* 153, 4048-58.
137. Wingender, E. (1993). *Gene Regulation in Eukaryotes* (Weinheim, VCH).
138. Wingender, E. (1994). Recognition of regulatory regions in genomic sequences, *J Biotechnol* 35, 273-280.

-
139. Wingender, E., Heinemeyer, T., and Lincoln, D. (1991). in *Genome analysis - Form Sequence to Function*, BioTechForum-Advances in molecular genetics, 95-108.
 140. Wobbe, C. R., and Struhl, K. (1990). Yeast and human TATA-binding proteins have nearly identical DNA sequence requirements for transcription in vitro, *Mol Cell Biol* 10, 3859-67.
 141. Wonigeit, K. (1997). Expression of RT6 on activated rat T cells. In *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono (ADP-Ribosyl) Transferases and Related Enzymes*, F. Haag, and F. Koch-Nolte, eds. (New York, Plenum Press), pp. 257-264.
 142. Wonigeit, K., Dinkel, A., Fangmann, J., and Thude, H. (1997). Expression of the ectoenzyme RT6 is not restricted to resting peripheral T cells and is differently regulated in normal peripheral T cells, intestinal IELs and NK cells. In *ADP-Ribosylation in Animal Tissues: Structure, Function, and Biology of Mono (ADP-Ribosyl) Transferases and Related Enzymes*, F. Haag, and F. Koch-Nolte, eds. (New York, Plenum Press), pp. 229-240.
 143. Zenzie, G. B., O'Shea, G. A., and Smale, S. T. (1992). Similar mechanisms for transcription initiation mediated through a TATA box or an initiator element, *J Biol Chem* 267, 2823-30.
 144. Zolkiewska, A., Nightingale, M. S., and Moss, J. (1992). Molecular characterization of NAD:arginine ADP-ribosyltransferase from rabbit skeletal muscle, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11352-11356.

7. Abbildungsindex

Abbildung 1. Struktur des RT6 Gens	12
Abbildung 2. Sechs Stufen der Expressions-Regulation bei den Eukaryonten	13
Abbildung 3. pCR 2.1 Vektor	16
Abbildung 4. Strukturelle Komponenten des RT6-Gens und Sequenzanalyse des RT6-Promotors 2.....	35
Abbildung 5. Analyse der Transkriptionsstart mittels PPNN.....	38
Abbildung 6. Reportergeren.....	39
Abbildung 7. Luciferase Expressionsvektoren.....	40
Abbildung 8. Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifzierten RT6-Promotorfragmente	41
Abbildung 9. Schematische Darstellung der Klonierung der RT6-Promotorbereiche in den pCR 2.1	42
Abbildung 10. Restriktionsverdau der PCR-Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease EcoR I.....	43
Abbildung 11. Klonierungsstrategie der RT6.2 Reportergeren-Konstrukte.....	44
Abbildung 12. Prinzip der Elektroporation	46
Abbildung 13. Luciferase Expression der pGL3 Vektoren in EpD3 Zellen.....	47
Abbildung 14. Analyse der RT6-Promotoraktivität für zellspezifische Transkription	48
Abbildung 15. 5´ Endanalyse des RT6-Promotors	49
Abbildung 16. Restriktionsverdaue der pGL3-Konstrukte mit Sac I und Hind III.....	49
Abbildung 17. Die Fragmente zur 3´ Endanalyse des RT6-Promotors.....	50
Abbildung 18. 3´ Endanalyse des RT6-Promotors.....	50
Abbildung 19. Deletionsexperimente zur Bestimmung des RT6-Minimal-Promotors	51
Abbildung 20. Reportergeren Assay der Basic- und Enhancer-Konstrukte in EpD3 Zellen.....	53
Abbildung 21. Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assays	55
Abbildung 22. Design der Oligonucleotid des RT6-Promotors für Mobility Shift.....	56
Abbildung 23. Mobility Shift Assay mit EMSA-A3A4 in EpD3 Zellen	58
Abbildung 24. Mobility Shift mit EMSA A3A4 in Lymphozyten Zelllinien.....	59
Abbildung 25. Oligonukleotid EMSA-A5/A6	60
Abbildung 26. Mobility Shift Assay mit Oligonukleotid EMSA-A5A6.....	60
Abbildung 27 A. Schematische Darstellung der Mutagenese durch zweifach rekombinante PCR.	62
Abbildung 28. Mutagenese-Analyse des GC-Elements im Agarosegel.....	63
Abbildung 29. Mutagenese in Vitro des TATA- Motivs des RT6-Promotors in Sequenzanalyse	64
Abbildung 30. Mutagenese-Analyse im Reportergeren-Assay.	65
Abbildung 31. Sequenzvergleich der vor Exon 2 liegenden Promotorregion des RT6-Gens von <i>R. norvegicus</i> (<i>R. norv.</i>) und <i>R. rat 1/2</i> von <i>R. rattus</i> sowie <i>Rt6-1/2</i> der Maus	67
Abbildung 32. Darstellung des Minimal-Promotors und der darin eingebetteten Bindemotive.....	69
Abbildung 33. Promotorbereiche einiger Entwicklungs- und Aktivierungsbedingt exprimierter T-Zell Gene.....	72
Abbildung 34. Die Sequenz des mit Exon 1 verbundenen RT6-Promotors	74
Abbildung 35. Vorhersage der Transkriptionsstartstellen des Promotors 1 mit dem PPNN-Programm.....	74

8. Abkürzungen

ADP	Adenosind iphosphat
ART	ADP-Ribosyltransferase
BB	Bio-Breeding
BB-DP	BB-diabetes prone
BB-DR	BB-diabetes resistant
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure nach deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'3'- Desoxynukleosidtriphosphat
A=dATP	2'3'- Desoxyadenosintriphosphat
C=dCTP	2'3'- Desoxycytidinintriphosphat
G=dGTP	2'3'- Desoxyguanintriphosphat
T=dTTP	2'3'- Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetate
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
GPI	Glycanphosphatidylinositol
HEPES	Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus
kD	Kilo Dalton
LFA-1	Lymphocyte Function Antigen-1 (Integrin) Adhäsionsmoleküle
LT	Escherichia coli toxin
M	Mol
NAD	Nicotinamid- A denin- D inukleotid
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
OD _{nn}	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge (nn)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethansulfonyl fluoride
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure nach ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT6	Ratte Transplantationsantigen 6
RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyle sulfate)
TAE	Puffer (Tris-Acetic acid-EDTA)
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Puffer (Tris-Borat-EDTA)
TE	Puffer (Tris-EDTA)
Tris	Tris hydroxymethylaminomethan
TSS	Transkriptionsstartstelle (transcription start site)

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 10. 07. 2000

Veröffentlichungen, die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit enthalten

- Fang, J., Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., and Haag, F. (1998). The rat T cell differentiation marker RT6 belongs to a group of constitutively expressed t cell-specific genes whose promoters lack a TATA element, *Immunobiology* 199 (3-5), 394.
- Fang, J., Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H.-G., and Haag, F. (1998). The promoter of the rat T cell differentiation marker RT6 belongs to subgroup of T cell-specific promoters that lack a functional TATA element, *Biological chemistry* 379, 563.
- Fang, J., Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Thiele, H.-G., and Haag, F. (1999). Mutation of a Putative TATA Motif Does Not Affect Transcription by the Promoter of the Rat T Cell Differentiation Marker RT6, *Transplantation Proceedings* 31, 1629-1630.

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wird unter der Leitung von PD Dr. F. Haag und Prof. Dr. med. F. Nolte angefertigt, denen möchte ich für die Überlassung des Themas, Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für die hilfreiche wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie Diskussionsbereitschaft, die zum konstruktiven Austausch von Gedanken und Ergebnissen führte, danken. Weiteren möchte ich Frau S. Bauschus für die technische Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe. Borgmeyer vom Institut für Entwicklungsneurobiologie des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) am Universitätskrankenhaus, der mich bei Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) theoretisch und praktisch unterstützte.

Für die Überlassung der Luminometer für Luciferase Assay möchte ich PD Dr. Michael Wegner und Dr. Elisabeth Sock der Forschungsgruppen für Neurale Genexpression des ZMNH danken.

Lebenslauf

Jing FANG

24. 01. 1963 geboren in Wuhan / V. R. China

1970 – 1975 Grundschule, Wuhan

1975 – 1980 Mittelschule, Wuhan

1980 – 86 Medizinstudium
Tongji Medizinische Universität Wuhan / China

1986 – 94 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Akademie für Medizinwissenschaften Hubei

08. 1992 Ernennung zur Oberärztin (Wissenschaftliche Assistentin)

05.-06.93 Wissenschaftlicher Austausch in der mikrobiologischen Bekämpfung gegen Malaria bei der Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage – KABS e. V. Ludwigshafen am Rhein im Rahmen des Kooperationsprojekts zwischen Hubei/China und Baden-Württemberg/Deutschland

1994 – 96 Forschungstätigkeit als DAAD-Stipendiatin und Gastwissenschaftlerin im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der medizinischen Universität zu Lübeck (MUL)

1996. 10 Forschungstätigkeit als Gastwissenschaftlerin im Rahmen des DFG-Sonderforschungsbereiches 367 im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der MUL

11.96-11.99 Aufbaustudium Molekularbiologie an der Universität Hamburg
Graduation am 29.11 1999 in Molekularbiologie

1997 – 2000 Dissertation im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf der Universität Hamburg
Rigorosum am 1.2.01 im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

10.2000 - Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg