

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.

