

Regulation und Funktion des MiT-Transkriptionsfaktors TFEC

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. Rer. Nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sabine Sulzbacher
aus Lappersdorf

Regensburg 2003

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. M. Rehli

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Hauska

1. Gutachter: Prof. Dr. Modrow

2. Gutachter: PD Dr. Rehli

3. Prüfer: Prof. Dr. Schneuwly

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 1999 bis September 2003 in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Mansky KC, Sulzbacher S, Purdom G, Nelsen L, Hume DA, Rehli M, Ostrowski MC. (2002). The microphthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter. *Leukoc Biol.* 2002 Feb;71(2):304-10.

Teile dieser Arbeit wurden in Vorträgen/Postern vorgestellt:

2001 35th Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Barcelona
“The macrophage-specific transcription factor mTFEC can function as a transcriptional activator.” S. Sulzbacher, R. Andreesen, M. Rehli
(oral presentation)

2001 Meeting of the European Macrophage & Dendritic Cell Society, Vienna
“The myeloid-specific transcription factor TFEC is regulated by IL-4.” S. Sulzbacher, R. Andreesen, M. Rehli
(poster presentation)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen danke ich für seine Anregungen und für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Modrow für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation herzlich bedanken.

Mein Dank gilt vor allem PD Dr. Michael Rehli für seine Geduld, die gute Betreuung und den Australienaufenthalt, den Höhepunkt meiner Promotion.

Bei PD Dr. Marina Kreutz und PD Dr. Stefan Krause möchte ich mich für die guten Anregungen bedanken.

Sabine P. danke ich für ihre engagierte Hilfe bei meiner Dissertation und den netten Unterhaltungen.

Ich möchte auch meinen Dank an allen Arbeitskollegen aussprechen. Danke an Alexandra für ihre Freundschaft und Liebenswürdigkeit, Achims Mutter, die ihren Sohn vorbildlich erzogen hat, Carol für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Zuspruch, Krishna für die Einführung unseres Horrorvideoabend und ihren Tips bei den Western Blot-Analysen, Liane, Lucia für ihre technischen Ratschläge, der ewig strahlenden Monika, unserer jungen Mutter Hang Pham, Viola für den Austausch von Erlebnisberichten über unsere „Kleinen Lieblinge“, Sabine L. und Stefan K., die mir neues Vertrauen in die Mediziner gaben, und natürlich auch Eva, Alice, Claudia und allen anderen aus der Häma/Onko.

Natürlich möchte ich mich auch bei Mathias bedanken, dessen kleine Scherze mir den Alltag fröhlicher gestalteten. Leider sahen wir uns immer zu wenig, oder war es vielleicht doch besser so?

Mein herzlicher Dank gilt auch Sven, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, der immer wieder den armen Computer vor meinen zerstörerischen Attacken schützen mußte und den ich wahrscheinlich oft an den Rand eines Nervenzusammenbruchs gebracht habe.

Ich möchte mich auch bei den Leuten der Allo-KMT bedanken, die mich während des Schreibens in ihrem Büro beherbergt haben.

Im Besonderen möchte ich mich bei Jana Fritsche für ihre ehrliche Freundschaft bedanken, mit der sie mir über die schweren Zeiten hinweggeholfen hat. Danke Jana, dass ich mit dir über alles reden und lachen konnte. Wenn man die Sachen mit Humor nimmt ist nichts mehr so schlimm wie es scheint.

Meinen größten Dank gebührt aber meinen Eltern, meinen „Kleinen“ und Freunden, sie habe mich immer wieder an die schönen Seiten des Lebens erinnert.

Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Das System der mononukleären Phagozyten	2
1.2.1	Ontogenese	2
1.2.2	Biologische Funktionen der monozytären Zellen	6
1.2.2.1	Phagozytose.....	6
1.2.2.2	Zytotoxizität	7
1.2.2.3	Antigenprozessierung und -präsentation	7
1.2.2.4	Sekretion löslicher Faktoren.....	8
1.2.3	Differenzierungsabhängige zelluläre Veränderungen	8
1.2.3.1	Morphologie	9
1.2.3.2	Funktionen.....	9
1.2.3.3	Oberflächenantigene.....	11
1.3	Modelle für die Differenzierung von Makrophagen und DC	11
1.4	Transkriptionelle Genregulation im mononukleären Phagozytensystem	13
1.5	Die MiT-Familie von Transkriptionsfaktoren	17
1.5.1	Der Transkriptionsfaktor TFEC	19
1.5.2	Die übrigen Mitglieder der MiT-Familie.....	20
2	ZIELSETZUNG	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Materialien und Geräte	24
3.1.1	Chemikalien	24
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel	24
3.1.3	Geräte	25
3.1.4	<i>E. Coli</i> -Stämme.....	26
3.1.5	Zelllinien	26
3.1.6	Molekulargewichtstandards	26
3.1.7	Plasmid-Vektoren	26
3.1.8	Primersequenzen.....	27
3.1.9	Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits	28
3.2	Mausstämme	29
3.3	Zellkultur	29
3.3.1	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	30
3.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
3.3.3	Isolierung und Kultivierung primärer humaner Zellen.....	31
3.3.3.1	Monozytenisolierung durch Gegenstromelutriation.....	31
3.3.3.2	Kultivierung von Monozyten	32
3.3.3.2.1	Differenzierung von Monozyten in Makrophagen.....	32
3.3.3.2.2	Differenzierung von Monozyten in dendritenähnlichen Zellen	32
3.3.4	Isolierung und Kultivierung primärer muriner Knochenmarkszellen	33

3.3.4.1	Differenzierung der Knochenmarkszellen in Knochenmarksmakrophagen (BMM)	33
3.3.4.2	Verwendetes Reagenz:	33
3.3.4.3	Differenzierung der Knochenmarkszellen in Dendritische Zellen.....	33
3.3.5	Kultivierung humaner und muriner Zelllinien	34
3.3.5.1	Kulturbedingungen und Passagierung.....	34
3.3.5.2	Nachweis von Mykoplasmen	34
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.4.1	Kultivierung von Bakterien	34
3.4.2	Präparation und Analyse von DNA.....	35
3.4.2.1	Plasmidvektoren	35
3.4.2.1.1	Plasmid Mini/Midi/Maxi-Prep (alkalische Lyse).....	35
3.4.2.1.2	Präparation von chemisch kompetenten E. Coli	35
3.4.2.1.3	Transformation von chemisch kompetenten E.Coli	36
3.4.2.2	Agarose-Gele für DNA	36
3.4.2.3	Präparation von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion	37
3.4.2.4	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	37
3.4.2.5	DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	38
3.4.2.6	“Polymerase Chain Reaktion” (PCR)	38
3.4.2.7	Ortsspezifische Mutagenese durch PCR	39
3.4.2.8	Lightcycler	41
3.4.2.9	Transiente Transfektionen von RAW264.7	42
3.4.2.10	Stabile Transfektionen von RAW264.7	43
3.4.2.11	Genotypisierung von Mäusen.....	44
3.4.2.12	Kultivierung von Hefen.....	44
3.4.2.13	Präparation von kompetenten Hefen	45
3.4.2.14	Transformation von Hefen	46
3.4.2.15	Yeast Two Hybrid-System	46
3.4.2.16	Quantitativer α -Galactosidase-Assay.....	49
3.4.3	Präparation und Analyse von RNA.....	50
3.4.3.1	RNA Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987).....	50
3.4.3.2	RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit	51
3.4.3.3	1 % Agarose-Gel für RNA	51
3.4.3.4	Northern Blotting - RNA-Transfer.....	52
3.4.3.5	Hybridisierung von Northern Blots.....	53
3.5	Proteinchemische Methoden	53
3.5.1	Gesamtzelllysate von BMM	53
3.5.2	Proteinexpression in <i>E. Coli</i> und Proteinaufreinigung.....	54
3.5.3	<i>In-vitro</i> -Translation von Proteinen	55
3.5.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA	56
3.5.5	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page.....	56
3.5.6	Western-Blotting (Semi-dry-Technik)	58
3.5.7	Nachweis und Charakterisierung von Proteinen	59
3.5.7.1	Coomassiefärbung von Proteinen in Gelen.....	59
3.5.7.2	Immunfärbung von Proteinblots.....	59
3.5.8	Herstellung von Zellkernextrakten	60
3.5.9	“Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)	61
3.5.10	Immunpräzipitation	63
3.6	Immunologische Methoden	64
3.6.1	Immunisierung von Kaninchen	64
3.6.2	Aufreinigung von Antikörpern über Chromatographie	64

3.6.2.1	Bindung des Liganden an die Säule	64
3.6.2.2	Aufreinigung des Antikörpers	65
3.7	Microarray	67
4	ERGEBNISSE	70
4.1	Regulation von mTFEC durch pro- und anti-inflammatorische Stimuli.....	70
4.1.1	Erhöhung der mRNA-Expression von mTFEC durch verschiedene Stimuli	70
4.1.2	mTFEC-Zeitkinetik in mit IL-4 und LPS stimulierten BMM	73
4.1.3	Dosisabhängigkeit der mTFEC-Induktion in mit IL-4 und LPS stimulierten BMM	75
4.1.4	mTFEC-Proteinexpression in stimulierten BMM	76
4.1.4.1	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen mTFEC.....	76
4.1.4.1.1	Produktion eines mTFEC-GST-Fusionsproteins	76
4.1.4.1.2	Untersuchung des polyklonalen Antikörpers auf Spezifität.....	76
4.1.4.1.3	Spezifität des aufgereinigten polyklonalen Antikörpers	78
4.1.4.2	Charakterisierung des mTFEC-Proteins in stimulierten BMM.....	79
4.1.5	Expression in murinen DC.....	80
4.1.6	Untersuchung der Regulation des proximalen Promotors von mTFEC	81
4.1.6.1	Transaktivierung des Promotors.....	82
4.1.6.2	Regulation der LPS-Induktion durch NF- κ B	84
4.1.6.2.1	Mutation der NF- κ B Bindungsstelle des proximalen Promotors von mTFEC	84
4.1.6.2.2	DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B an dessen Bindungsstelle im mTFEC-Promotor in stimulierten RAW 264.7	85
4.1.6.3	Regulation der IL-4-Induktion durch STAT6	87
4.1.6.3.1	Mutation der STAT6-Bindungsstellen im proximalen Promotor von mTFEC	87
4.1.6.3.2	DNA-Bindungsaktivität von STAT6 an dessen Bindungsstellen im mTFEC-Promotor in stimulierten BMM.....	88
4.1.6.3.3	Expression in IL-4 stimulierten BMM von STAT6 ^{-/-} -Mäusen	89
4.1.7	Identifizierung einer Aktivierungsdomäne im C-Terminus von mTFEC	90
4.1.8	Microarray-Analysen mit IL-4-stimulierten BMM von 129/SvJ- und TFEC ^{-/-} -Mäusen	93
4.1.9	Überprüfung der Microarray-Ergebnisse durch Northern Blot-Analysen.....	95
4.2	Charakterisierung des humanen TFEC-Homologen	95
4.2.1	Expression von hTFEC in verschiedenen myeloischen und lymphatischen Zellen	96
4.2.2	Differenzierungsabhängige Expression von hTFEC	97
4.2.3	Induktion in Monozyten und Makrophagen.....	99
4.2.3.1	hTFEC-Induktion durch LPS	99
4.2.3.2	hTFEC-Induktion durch IL-4	100
5	DISKUSSION	102
5.1	Wirkt das Maushomologe von TFEC als Aktivator oder Repressor?	102
5.2	Regulation und Funktion des Maushomologen von TFEC	103
5.2.1	Regulation der LPS-induzierten mTFEC-Expression	104
5.2.2	Regulation der IL-4-induzierten mTFEC-Expression.....	105
5.2.3	Makrophagen und T _H 1 / T _H 2 dominierte Immunantwort – Rolle für TFEC in alternativ aktivierte Makrophagen der Maus?	107
5.3	Regulation des humanen TFEC	111

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
7	LITERATURVERZEICHNIS	116

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AD	Aktivierungsdomäne
ADCC	Antikörper-abhängige Zytotoxizität
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierenden Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
bHLH	Basische Helix-Loop-Helix
BIS	N, N'-Methylenbisacrylamid
BMDC	DC aus Knochenmarkszellen
BMM	Knochenmarksmakrophagen
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CBF	core binding factors
cDNA	Komplementäre DNA
C/EBP	„CCAAT/enhancer binding protein“
CDR	Codierende Region
cprm	“Counts per minute”
CR	Komplementrezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	“Electrophoretic Mobility Shift Assay”
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten-CSF
GM-CFU	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie bildende Einheit
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HANKS	“Balanced Salt Solution”
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
His	Histidin
ICAM	“Intercellular adhesion molecule”
ICSBP	Interferon consensus sequence binding protein
IFN	Interferon
IG	Immunoglobulin
IL	Interleukinen
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
IRF-8	“interferon regulatory factor 8“
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Langerhanszelle
Leu	Leucin
LFA-1	“lymphocyte function-associated antigen”
LPS	Lipopolysacchrid
M	Mol
MAPK	“mitogen-activated protein kinase”

MCAF	“human macrophage chemoattractant and activating factor”
MCS	„multiple cloning site”
M-CSF	Makrophagen-CSF
mg	Milligramm
MHC	Moleküle des Haupthistokompatibilitäts-komplexes
min	Minuten
MiT	Mikrophthalmia/TFE
ml	Milliliter
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPS	mononukleären Phagozytensystem
mRNA	Messenger-RNA
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OLC	Osteoklasten-artige Zellen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
PNP	p-nitrophenyl α-D-Galactopyranosid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Toswell Park Memorial Instiut
RT	Raumtemperatur
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sMALP-2	„macrophage-activating mycoplasma lipopeptide”
SOCS	„suppressor of cytokine signaling“
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-β	“Tissue growth factor-β”
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	“tartrate-resistant acid phosphatase”
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-β-D-Galktopyranosid
z.B.	Zum Beispiel
Zip	Leucin-Zipper

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem rettet uns vor dem sicheren Tod durch Infektionen. Jedes Wirbeltier mit einem gestörten Immunsystem ist der tödlichen Gefahr von Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Sogar Wirbellose besitzen ein primitives Abwehrsystem, das sich hauptsächlich auf phagozytierende Zellen (Freßzellen) stützt. Solche Zellen, vor allem Makrophagen und Neutrophile, spielen zwar auch eine wichtige Rolle beim Schutz des Wirbeltierorganismus vor Infektionen, sie sind hier aber nur eine Komponente einer sehr viel komplexeren und ausgeklügelteren Abwehrstrategie. Die verschiedenen Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems der Wirbeltiere können eindringende Organismen und von ihnen abgegebene Giftstoffe zerstören und beseitigen. Wegen der zerstörerischen Wirkungsweise des Immunsystems, darf die Immunreaktionen ausschließlich gegen Moleküle erfolgen, die für den Organismus fremd sind, und niemals gegen Moleküle des eigenen Körpers. Die Fähigkeit, fremde von eigenen Molekülen zu unterscheiden, ist eine grundlegende Eigenschaft des Immunsystems.

Die frühen Phasen einer Abwehrreaktion beruhen auf der **angeborenen Immunantwort**, bei der der Organismus über eine Vielzahl von Resistenzmechanismen einen Krankheitserreger erkennt und auf seine Anwesenheit reagiert. Die angeborene Immunität ist in allen Individuen und zu jeder Zeit gegeben, sie nimmt selbst bei wiederholtem Kontakt mit dem Erreger nicht zu. Zu den hier relevanten Abwehrmechanismen zählen Phagozytose, intrazelluläres Töten von Pathogenen und Sekretion von zytotoxischen und mikrobiziden Metaboliten und Proteinen. Bei der angeborenen Immunantwort spielen Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), Mastzellen und Natürliche-Killer (NK)-Zellen eine bedeutende Rolle.

Einer Abwehrreaktion im Rahmen der angeborenen Immunität folgt normalerweise eine sehr spezifische **adaptive Immunantwort**. Unter der adaptiven Immunantwort versteht man die Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen. Dazu gehört auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das einen langfristigen Schutz vor einer erneuten Infektion bietet. Die adaptive Immunantwort

wird von sogenannten B- und T-Lymphozyten vermittelt. Auf der Zelloberfläche der B-Lymphozyten befinden sich spezielle Immunglobuline, die als Antigenrezeptoren fungieren. Werden B-Zellen durch Kontakt mit einem Antigen aktiviert, so differenzieren sie zu sogenannten Plasmazellen, die lösliche Antikörper mit der Spezifität des ursprünglichen Rezeptors produzieren. Dagegen bilden T-Lymphozyten transmembrane Antigenrezeptoren aus, die kurze Peptide erkennen können, welche von MHC-Molekülen (Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden (Abbas *et al.*, 1997; Janeway C.A. and Travers P., 1997).

1.2 Das System der mononukleären Phagozyten

1.2.1 Ontogenese

Der Ursprung aller Blutzellen ist in den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks zu finden (siehe Abb. 1). Wenn diese selbsterneuernden Stammzellen durch Wachstumsfaktoren zur Teilung angeregt werden, können myeloische oder lymphatische Stammzellen entstehen. Die lymphatische Stammzelle differenziert in Gegenwart von den Interleukinen IL-1, -2, -4, -7 und IL-10 zu T-Lymphozyten. Sind aber neben diesen Interleukinen noch IL-5 und IL-6 vorhanden, entstehen B-Lymphozyten. Durch einen IL-15-Stimulus differenzieren aus der lymphatischen Linie auch die NK-Zellen.

Die myeloische Stammzelle entwickelt sich in Anwesenheit von Erythropoetin zu Erythrozyten. Wenn bei der Differenzierung dieser Stammzelle IL-3, GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), IL-1 und IL-6 vorhanden sind, können fünf andere Zelltypen entstehen, deren Differenzierungsweg durch zusätzliche Faktoren festgelegt wird. Hierbei fördert IL-11 und Thrombopoetin die Differenzierung zu Thrombozyten, ein bisher unbekannter Faktor die Differenzierung zu basophilen Granulozyten und IL-5 die Entwicklung zu eosinophilen Granulozyten. Die letzten beiden Zelltypen aus der myelischen Linie, neutrophile Granulozyten und Monozyten, entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der GM-CFU (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie bildende Unit). Granulozyten-CSF (G-CSF), IL-3 und GM-CSF regulieren deren Differenzierung in neutrophile Granulozyten. Wenn aber G-CSF durch M-CSF (Makrophagen-CSF) ersetzt wird, kommt es zur Differenzierung in Monozyten, die sich wiederum durch die Faktoren GM-CSF, IL-4

und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) zu myeloische dendritische Zellen, durch M-CSF und einem unbekanntem Faktor zu Gewebemakrophagen oder durch M-CSF und RANK-L zu Osteoklasten entwickeln können (Abbas *et al.*, 1997).

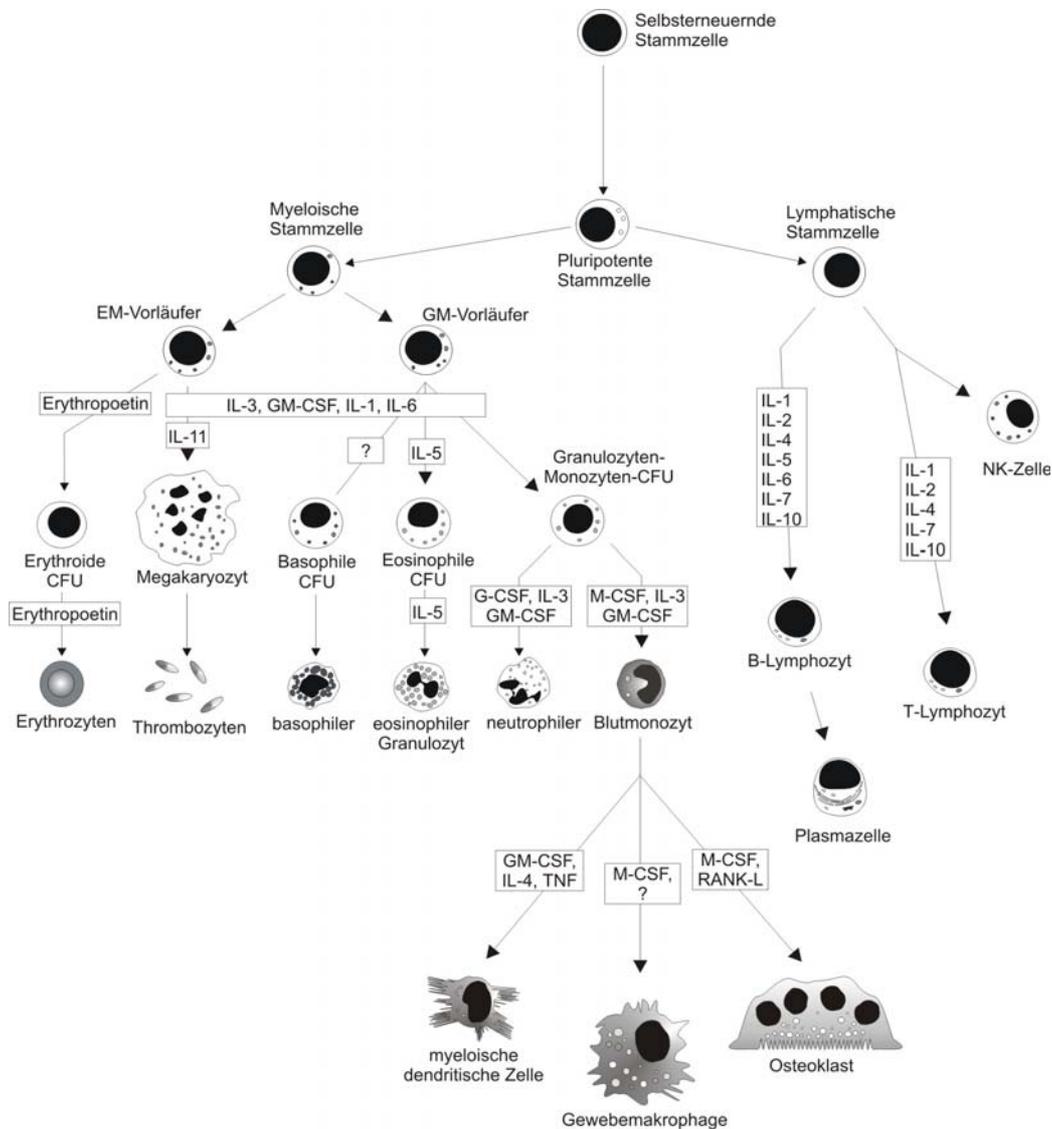


Abbildung 1: Der Stammbaum der Hämatopoese (modifiziert nach Abbas *et al.*, 1997; Kirchner *et al.*, 1993).

Dabei differenziert der GM-CFU-Vorläufer über das Monoblasten- und Promonozyten-Stadium mit abnehmender Teilungsrate zu Monozyten (siehe Abb. 2). Nach ca. 24 h verlassen die Monozyten das Knochenmark und gelangen in die Blutzirkulation, um anschließend in die Gewebe auszuwandern (Meuret and Hoffmann, 1973). Studien an Mäusen von (van Furth and Cohn, 1968) zeigten, dass Monozyten in der Blutbahn ein Halbwertszeit von 17,4 h haben. Im Mensch konnte eine Halbwertszeit von 70 h nachgewiesen werden (Whitelaw, 1966).

Die Auswanderung der peripheren Monozyten in das Gewebe (Extravasation) erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst kommt es zu einer Adhärenz der Monozyten an die Gefäßwand durch eine Bindung der Glykoproteine (z.B. „lymphocyte function-associated antigen“ (LFA-1)) der Monozyten an die Moleküle des Endothels (z.B. interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-1) (Dustin *et al.*, 1986; Rothlein *et al.*, 1986). Danach beginnt die Diapedese, bei der das von den Monozyten und Endothelzellen exprimierte „platelet endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM) die transendotheliale Wanderung der Monozyten ermöglicht (Muller and Randolph, 1999).

Randolph *et al.*, 1998 zeigte, dass der im Gewebe verbleibende Teil der Monozyten sich zu Makrophagen entwickelt. Die anderen Monozyten, die wieder in abluminal-luminaler Richtung aus dem Gewebe durch das Endothel auswandern, differenzieren zu DC, ein Prozeß, der durch das endothele Gewebe ausgelöst zu werden scheint. Zur vollständigen Differenzierung werden aber noch zusätzliche Stimuli, wie die Phagozytose von Partikeln oder Mikroorganismen, benötigt. Unter nicht-entzündlichen Bedingungen entwickeln sich Monozyten in Abhängigkeit vom Gewebe in verschiedene Arten von mononukleären Phagozyten (siehe Tab. 1), die für mehrere Monate als residente Makrophagen im Gewebe verbleiben und vermutlich nicht mehr in die Blutbahn zurückkehren.

Ist aber eine Entzündung vorhanden, wandern die Monozyten im Gewebe einen Konzentrationsgradienten aus Chemokinen, wie z.B. „human macrophage chemoattractant and activating factor“ (MCAF), die von Zellen am Infektionsherd ausgeschüttet werden, entlang (Janeway C.A. and Travers P., 1997). Dort differenzieren sie abhängig vom Mikromilieu zu aktivierten Makrophagen oder DC aus (van Furth and Cohn, 1968).

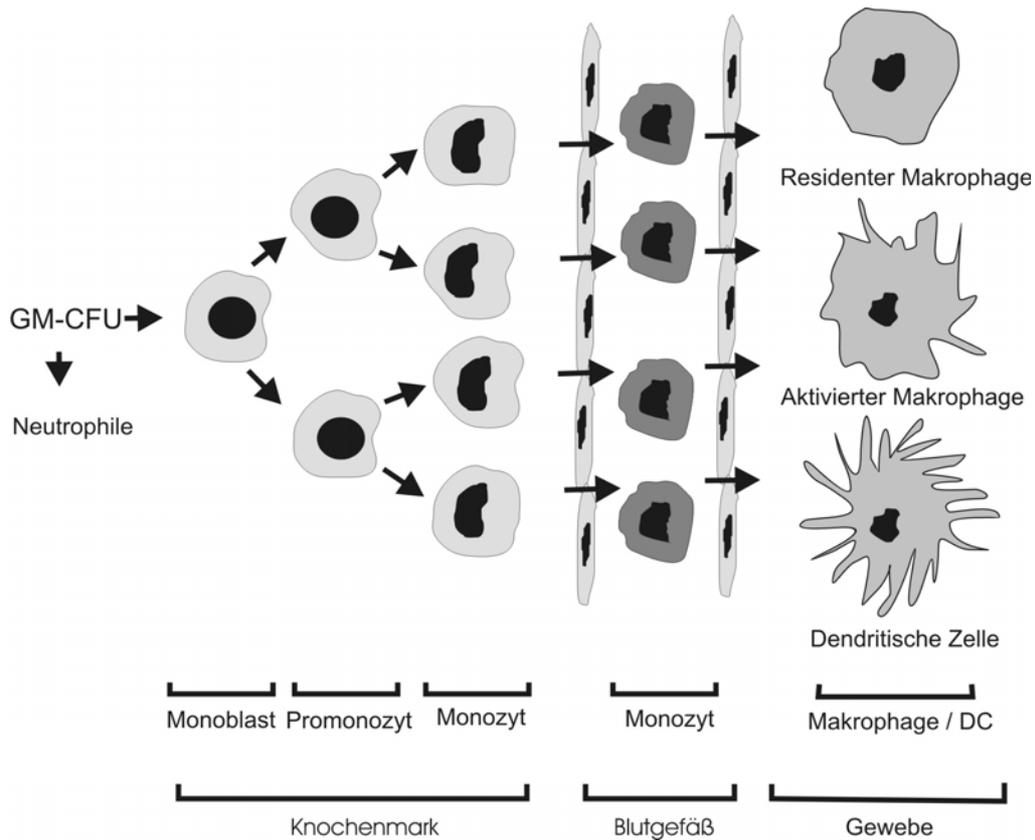


Abbildung 2: Differenzierung der Vorläuferzellen zu Makrophagen.

Gewebe	Zelltyp
Bindegewebe	Histiozyten
Entzündliches Gewebe	Reaktive Makrophagen/Multinukleäre Riesenzellen
Gastrointestinaltrakt	Mukosamakrophagen
Granulom	Mehrkernige Makrophagen
Haut	Histiozyten/Langerhanszelle
Knochen	Osteoklasten
Körperhöhlen	Exudatmakrophagen (Pleuro-, Peritonealmakrophagen)
Leber	Kupferzellen
Lunge	Alveolarmakrophagen
Milz	Milzmakrophagen
Plazenta	Hofbauer-Zellen
Synovium	Typ A-Zellen
Tumorgewebe	Tumor-assoziierte Makrophagen
Zentrales Nervensystem	Mikroglia

Tabelle 1: Makrophagen in unterschiedlichen Geweben.

1.2.2 Biologische Funktionen der monozytären Zellen

Monozyten, Makrophagen und DC spielen sowohl bei der erworbenen als auch bei der angeborenen Immunantwort eine bedeutende Rolle. Zur ihren Funktionen gehören die Phagozytose, Zytotoxizität und Sekretion biologisch aktiver Substanzen. Zur Antigenpräsentation sind hauptsächlich Monozyten und DC befähigt (van Furth, 1982). DC besitzen auch die Fähigkeit, durch Hemmung oder Modulierung der T-Zell-Aktivität eine periphere Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen auszulösen (Steinman *et al.*, 2000).

1.2.2.1 Phagozytose

Mononukleäre Phagozyten und Neutrophile sind für die angeborene Abwehr gegen mikrobielle Invasoren zuständig. Da Neutrophile Probleme haben, große Partikel zu phagozytieren, sind die mononukleären Phagozyten in dieser Hinsicht effizienter (Cohn, 1968). Neben Pathogenen werden im Rahmen der Gewebshomöostase auch alternde Zellen von Makrophagen phagozytiert. Makrophagen und Granulozyten, die für die Abwehr von Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen) am wichtigsten sind, werden durch einen Gradienten von chemotaktischen Molekülen, die von den Pathogenen ausgeschieden werden, zu den Eindringlingen geführt (Metchnikoff, 1905). Zu phagozytierende Bakterien oder Partikel sind häufig mit Komplement C3b und IgG/M-Antikörpern opsoniert, die die Aufnahme und Zerstörung von Pathogenen erleichtern. Makrophagen besitzen mehrere Rezeptoren, mit denen sie pathogene Substanzen erkennen können. Dazu zählen z.B. der Mannoserezeptor, die Scavengerrezeptoren, die viele Sialinsäureliganden binden, sowie CD14, ein LPS-bindendes Molekül, oder der Komplementrezeptor 1 (CR1), der Komplement C3b bindet. Diese Rezeptor-Liganden-Bindung löst die Phagozytose aus, bei der z.B. ein Bakterium internalisiert und in einem Phagosom eingeschlossen wird. Im Makrophagen verschmelzen Lysosomen mit dem Vesikel und setzen hydrolytische Enzyme frei, die das Bakterium zerstören können (Johnston and Zucker-Franklin, 1988).

Obwohl viele Mikroorganismen phagozytiert und verdaut werden, gibt es einige Pathogene, die Makrophagen parasitieren und sich in ihnen vermehren. Wenn aber der Makrophage aktiviert wird, werden diese intrazellulären Pathogene inhibiert oder zerstört. Beispiele für solche Mikroorganismen sind Listerien, Salmonellen, Leishmanien und Trypanosomen (Nathan *et al.*, 1980).

1.2.2.2 Zytotoxizität

Makrophagen und Monozyten können kontaktabhängig und -unabhängig zytotoxisch auf andere Zellen wirken.

Bei der **Antikörper-abhängigen Zytotoxizität** (ADCC) erkennen Makrophagen Antikörper-beladene Zellen durch ihre Fc-Rezeptoren. Sie binden an die Immunglobuline und zerstören die Zellen z.B. durch Sekretion von Hydrogenperoxidase (Fanger *et al.*, 1989; van Schie *et al.*, 1992).

Bei der **Antikörper-unabhängigen Zytotoxizität** binden Makrophagen mit bisher unbekanntem Rezeptoren an Carbohydratstrukturen der Zellen und bewirken eine Lyse dieser Zellen (Bonta and Ben Efraim, 1993). Ebenso wie bei ADCC erfolgt die Lyse durch Produktion von Hydrogenperoxidase (Nathan *et al.*, 1979).

Zytotoxizität kann auch durch **lösliche Faktoren** unabhängig von einem direkten Kontakt zwischen Makrophagen und den Zellen ausgelöst werden. Bei diesem Vorgang kommt es zur Sekretion von Zytokinen (TNF, IL-1 β), reaktiven Sauerstoffverbindungen und Stickstoffoxiden, die zu einer Lyse der angegriffenen Zellen führen (Bonta and Ben Efraim, 1993; Pozzi and Weiser, 1992; Aliprantis *et al.*, 1996).

1.2.2.3 Antigenprozessierung und -präsentation

Neben B-Zellen und Monozyten zählen DC zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die in der Lage sind, eine spezifische Immunantwort einzuleiten. Prinzipiell gibt es zwei Wege der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle. Beim intrazellulären Weg werden zytosolische Proteine durch proteolytische Mechanismen degradiert und über MHC-I Moleküle, die von allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, den zytotoxischen CD8⁺T-Zellen präsentiert, die die Fremd-Antigen-präsentierende Zelle töten. Dagegen werden auf MHC-II-Molekülen durch Phagozytose aufgenommene exogene Proteine von professionellen APC präsentiert. Die phagozytierten Partikel werden in endosomale Proteasen enthaltende Vesikel eingeschlossen, die später mit Endosomen des Golgi-Komplexes fusionieren, welche ebenfalls saure Proteasen enthalten. Vesikel mit Peptidfragmenten verschmelzen mit MHC-II enthaltenden Vesikeln und nach der Bindung der Peptide an MHC-II-Moleküle wird dieser Komplex an die Zelloberfläche der APC transportiert. T-Zell-Rezeptoren auf CD4⁺-T-Zellen interagieren mit dem MHC-II/Peptid-Komplex der APC. Zur Aktivierung von naiven T-Zellen wird zusätzlich

noch ein zweites costimulatorisches Signal benötigt. Dieses Signal wird durch die Bindung der B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) der APC an CD28 auf den T-Zellen ausgelöst. Die Antigenerkennung durch die naiven T-Zellen induziert die Sekretion von IL-2 und die Expression hochaffiner IL-2 Rezeptoren. IL-2 bindet an diese Rezeptoren und unterstützt so das T-Zell-Wachstum und die autokrin-induzierte Differenzierung. Dies führt zur Bildung einer unreifen T-Effektorzelle, die sich zu einer antigenspezifischen T_H1- oder T_H2-Zelle entwickeln kann, deren Cytokinprodukte für die Aktivierung und Differenzierung naiver CD8⁺T-Zellen bzw. B-Zellen benötigt werden (Abbas *et al.*, 1997; Auger and Ross, 1992).

1.2.2.4 Sekretion löslicher Faktoren

Mononukleäre Phagozyten können über 100 Substanzen mit einem Molekulargewicht von 32 Da (Superoxid-Anionen) bis zu 440 kDa (Fibronektin) sezernieren, deren Effekte von der Induktion des Zellwachstums bis zur Einleitung des Zelltodes führen können und in alle Stadien der Entzündung eingreifen. Zu den Sekretionsprodukten gehören Enzyme (z.B. Phosphatasen und Proteasen), Enzym- und Zytokin-Inhibitoren (z.B. Phospholipase-Inhibitor und IL-1-Inhibitor), Komplementkomponenten (z.B. C1), reaktive Sauerstoffverbindungen (Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale), extrazelluläre Matrixproteine (z.B. Fibronektin), Zytokine (z.B. IL-1 α/β , IL-6, TNF und TGF- β („transforming growth factor“- β)) und Chemokine (z.B. IL-8 und MCP-1) (Nathan, 1987; Auger and Ross, 1992).

1.2.3 **Differenzierungsabhängige zelluläre Veränderungen**

Während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder DC finden deutliche phänotypische Veränderungen statt, die meistens auf transkriptionellen Prozessen basieren. Die Expression von Genen, die phänotypische Veränderungen während der Differenzierung verursachen, werden im allgemeinen von Differenzierungsstimuli reguliert.

1.2.3.1 Morphologie

Makrophagen sind um ein bis zu zehnfaches größer als Monozyten. Während der Differenzierung nimmt das Kern/Zytoplasma-Verhältnis ab. Zudem bilden Makrophagen im Gegensatz zu den relativ runden Monozyten typische Ausläufer, sogenannte Pseudopodien, aus, die für die Fortbewegung im Gewebe und zur Phagozytose benutzt werden (Johnston and Zucker-Franklin, 1988; Lohmann-Matthes, 1981). Bei der Differenzierung von Monozyten zu DC kommt es ebenfalls zu einer Größenzunahme und Verlagerung des Kern/Zytoplasma-Verhältnisses. Im Vergleich zu den Makrophagen besitzen DC viele lange filamentöse Zytoplasmafortsätze, die sogenannten Dendriten, von denen diese Zellen auch ihren Namen bekommen haben (Nathan, 1987).

1.2.3.2 Funktionen

Neben der Morphologie sind auch viele Funktionen im mononukleären Phagozytensystem (MPS) differenzierungsabhängig (siehe Abb. 3). Makrophagen sind zytotoxischer als Monozyten (Andreesen *et al.*, 1983a; Munn and Cheung, 1989) und weisen eine erhöhte phagozytotische Aktivität auf (Jungi and Hafner, 1986). Dagegen vermindert sich die Fähigkeit zur Antigenpräsentation während der Differenzierung (Peters *et al.*, 1987; Ettensohn *et al.*, 1989; Schlesier *et al.*, 1994). Weitere Unterschiede treten bei verschiedenen Enzymaktivitäten auf: die Peroxidase-Aktivität nimmt ab, während die Aktivität der „Tatrate resistant acid phosphatase“ (TRAP) und des Lysozyms steigt (Andreesen *et al.*, 1983a; Musson, 1983). Auch bei der geregelten Ausschüttung von Botenstoffen kommt es zu Veränderungen, z.B. sezerniert der Makrophage mehr TNF, GM-CSF, M-CSF und IL-12. Dafür sezernieren Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten kein IL-1 β und weniger IL-6 (Trinchieri, 1998; Wewers and Herzyk, 1989; Scheibenbogen and Andreesen, 1991; Krause *et al.*, 1992).

Bei der Differenzierung von Monozyten zu DC erhöht sich die phagozytotische Aktivität (Sallusto *et al.*, 1995) und ebenso die Fähigkeit zur Antigenpräsentation (Steinman, 1991; Sallusto *et al.*, 1995; Pure *et al.*, 1990). Neben diesen Hauptfunktionen der DC, wurde auch eine geringe Zytotoxizität der DC gegenüber Bakterien beschrieben (Vidalain *et al.*, 2001). DC produzieren mehr TNF, IL-12 und IL-6 als Monozyten (Cella *et al.*, 1996; Grohmann *et al.*, 1998; Riva *et al.*, 1996; Kolb-

Maurer *et al.*, 2003), aber eine Sekretion von IL-1 β (McKenzie *et al.*, 1989; Vakkila *et al.*, 1990) konnte nicht nachgewiesen werden. Zwischen Monozyten und DC gibt es auch Unterschiede in der Enzymaktivität, z.B. erhöht sich die Aktivität des Lysozyms und die Peroxidaseaktivität verringert sich im Laufe der Differenzierung (Pickl *et al.*, 1996).

Mikrobielle Produkte (wie LPS und CpG-DNA) und inflammatorische Zytokine (TNF und IFN- γ) oder Zell-Zell-Kontakt (CD40-Ligation) lösen die Reifung der DC aus. Während des Reifungsprozesses verringert sich die Phagozytose-Fähigkeit und die zur Antigenpräsentation benötigten costimulatorischen Moleküle (z.B. CD80/CD86) werden stärker exprimiert (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Zhou and Tedder, 1996).

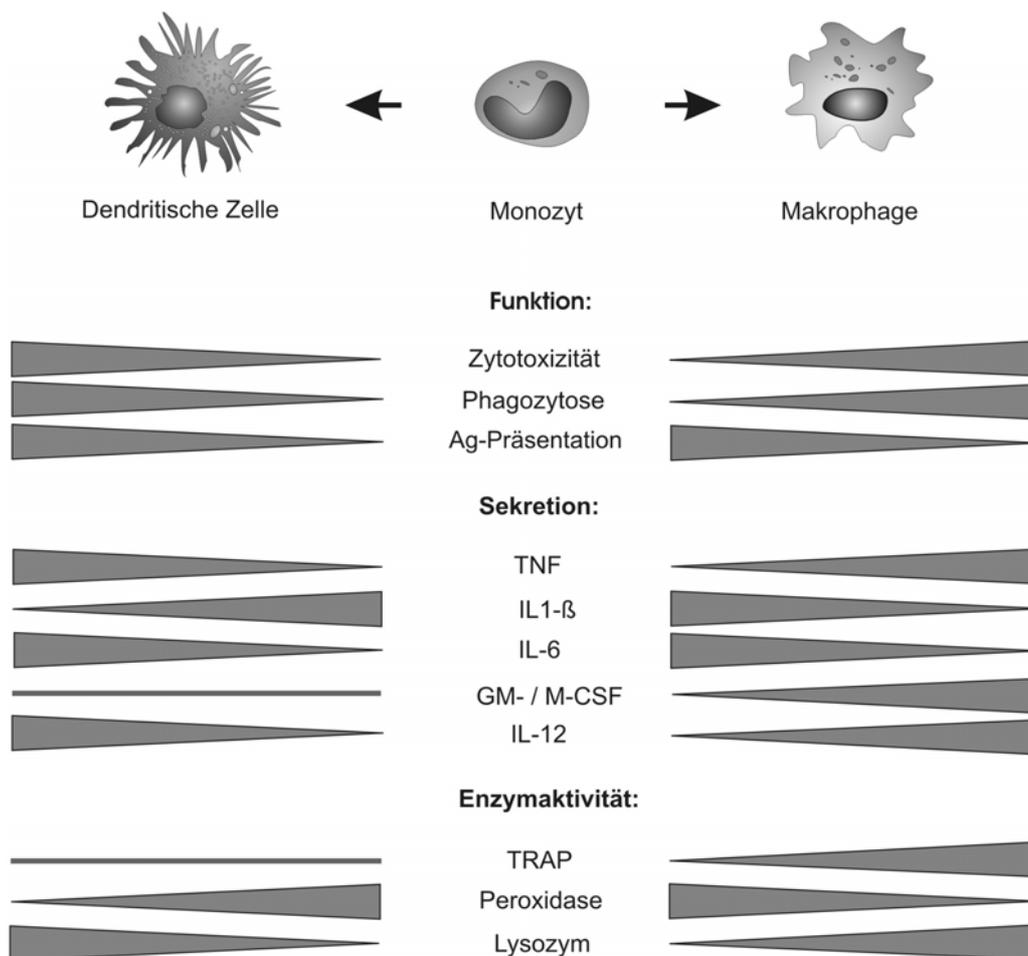


Abbildung 3: Auflistung einiger Funktionen von Monozyten, Makrophagen und DC, die sich während der Differenzierung verändern.

1.2.3.3 Oberflächenantigene

Neben Morphologie und Funktion werden vor allem Oberflächenantigene zur phänotypischen Charakterisierung hämatopoetischer Zellen verwendet. Die Mehrzahl der Oberflächenantigene sind nicht linienspezifisch, dennoch gibt es einige Oberflächenantigene auf mononukleären Zellen, die differenzierungsassoziiert exprimiert werden.

Zum Beispiel wird das linienspezifische Oberflächenantigen CD14 (Peters *et al.*, 1996) oft benutzt, um Monozyten und Makrophagen von anderen hämatopoetischen Zellen abzugrenzen. Zur Unterscheidung von Monozyten und Makrophagen können Antikörper gegen den Fc γ III-Rezeptor (Clarkson and Ory, 1988) und gegen Carboxypeptidasen M (MAX.1, MAX.11) oder CD84 (MAX.3) (Andreesen *et al.*, 1986; Krause *et al.*, 2000) verwendet werden, die auf Makrophagen stärker exprimiert werden als auf Monozyten. Im Gegensatz dazu findet man auf der Oberfläche von Monozyten mehr L-Selektin (Prieto *et al.*, 1994) als auf Makrophagen, und zur Identifizierung von DC kann das Antigen CD1a (Peters *et al.*, 1996) nützlich sein.

1.3 Modelle für die Differenzierung von Makrophagen und DC

Da gereinigte humane und murine Makrophagen und DC nur selten in größerer Anzahl verfügbar sind, sind Untersuchungen von funktionellen Aspekten und Differenzierungsvorgängen im mononukleären Phagozytensystem nur schwer mit primären Zellen durchführbar. Aus diesem Grund greift man auf geeignete Modellsysteme für *In-vitro*-Untersuchungen zurück.

Ein gutes Modellsystem für den Reifungsprozeß von in das Gewebe eingewanderten humanen Monozyten ist die *In-vitro*-Differenzierung von frisch isolierten humanen Blutmonozyten. Monozyten differenzieren in Anwesenheit von humanem Serum zu Makrophagen, welche in Funktion und Morphologie den ruhenden Gewebemakrophagen oder reaktiven Histiozyten entsprechen (Andreesen *et al.*, 1983b; Musson, 1983).

Alternativ zum Makrophagendifferenzierungsweg können humane Monozyten durch Kultivierung in fötalem Kälberserum unter Zusatz von GM-CSF und IL-4 zu Zellen ausdifferenzieren, die in ihren Eigenschaften unreifen DC ähneln. Die terminale

Reifung der DC wird durch Stimulierung mit LPS oder TNF erreicht (Peters *et al.*, 1996; Romani *et al.*, 1994).

Ein weiteres, häufig verwendetes Modellsystem zur Gewinnung von DC ist die Kultivierung von gereinigten CD34⁺-Vorläuferzellen mit Stammzellofaktor (SCF), GM-CSF und TNF (Caux *et al.*, 1992; Santiago-Schwarz *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1995).

Ein *In-vitro*-Modell zur Differenzierung von murinen Makrophagen stellt die Kultivierung von frisch isoliertem Knochenmark eines Femurs mit humanem M-CSF dar (Ross *et al.*, 1998; Santiago-Schwarz *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1995).

Primäre aktivierte Makrophagen werden von Mäusen gewonnen, denen einige Tage vor dem Entfernen der Makrophagen aus dem Peritoneum Thioglykolsäure intraperitoneal injiziert wurde (Fahey, III *et al.*, 1992; Santiago-Schwarz *et al.*, 1992).

Zur Gewinnung von murinen DC wird frisch isoliertes Knochenmark mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Um eine vollständige Reifung zu erreichen, werden die DC mit LPS oder TNF stimuliert (Angaben von Katharina Huettner, St. Anna Kinderspital, Wien).

In einigen experimentellen Untersuchungen wird allerdings auf etablierte und charakterisierte myeloische Zelllinien zurückgegriffen, da diese in unbegrenzter Zahl zur Verfügung stehen, im Gegensatz zu primären Zellen immortalisiert sind und keine spenderabhängigen Varianzen aufweisen.

Beispiele dafür sind:

	Makrophagen-Zelllinien	DC-Zelllinien
Maus	RAW 264.7 (ATCC-Nr.: TIB-71)	JAWSII (ATCC-Nr.: CRL-11904)
	J774 (DSMZ-Nr.: ACC170)	D1 (Winzler <i>et al.</i> , 1997)
Human	THP-1 (DSMZ-Nr.: ACC16)	-
	(Mono/Mac-6) MM6 (Ziegler-Heitbrock <i>et al.</i> , 1988)	-

Tabelle 2: Beispiele für humane und murine Makrophagen- und DC-Zelllinien.

1.4 Transkriptionelle Genregulation im mononuklären

Phagozytensystem

Differenzierungs- und Aktivierungssignale werden von Rezeptormolekülen auf der Zelloberfläche eingefangen. Das induzierte Signal wird über spezifische Signalwege in den Nukleus weitergeleitet, wo dadurch aktivierte oder induzierte Transkriptionsfaktoren zusammen mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase an DNA-Elemente in Promotor-/Enhancer-Bereichen binden und den Initiationskomplex für die Transkription bilden.

Die Bindung der aktivierten oder induzierten Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungssequenzen vermittelt die spezifische Expression von Zielgenen und ist die Grundlage der transkriptionellen Genregulation. Diese spezifischen Transkriptionsfaktoren können als Aktivatoren oder Repressoren wirken und sind für die gewebsspezifische Differenzierung der verschiedenen Zelltypen, einschließlich der hämatopoetischen Linie, zuständig.

Untersuchungen über die Regulation myeloischer Gene und über die Entstehung von Leukämien haben gezeigt, dass sowohl in der myeloischen Differenzierung als auch in der Leukämogenese bestimmte Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen.

Die Promotoren einiger Makrophagen-spezifischer Gene zeichnen sich durch gemeinsame Merkmale aus. Sie besitzen meistens weder eine TATA-Box noch eine Initiatorsequenz, dafür aber Bindungsstellen für bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie PU.1, C/EBP, GATA, AML-1 und AP-1, die an der Regulation der Differenzierung myeloischer Zellen beteiligt sind (siehe Abb. 4).

PU.1 ist ein Mitglied der Ets-Familie und wird stark in myeloischen Zellen, B-Zellen und Granulozyten exprimiert (Chen *et al.*, 1995; Klemsz *et al.*, 1990). Dieser wichtige Regulator der myeloischen Differenzierung wird schwach in humanen CD34⁺-Stammzellen exprimiert und während der myeloischen Differenzierung hochreguliert (Voso *et al.*, 1994). PU.1 reguliert eine Reihe von spezifisch myeloischen Genen, z.B. M-CSF Rezeptor (c-fms; (Ross *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1994b), CD11b (Pahl *et al.*, 1993) und CD18 (Rosmarin *et al.*, 1995). PU.1^{-/-}-Mäuse haben keine B-Zellen und Monozyten und eine stark reduzierte Neutrophilen-Entwicklung. Die PU.1-Defizienz führt zu einem frühen Tod *in utero* (Scott *et al.*, 1994) oder kurz nach der Geburt (McKercher *et al.*, 1996). Guerriero *et al.*, 2000 untersuchten die Rolle von

PU.1 während der Entwicklung von DC und stellten fest, dass neugeborene PU.1^{-/-}-Mäuse (Guerriero *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 1994) funktionelle CD8 α ⁺ lymphatische DC aber keine CD8 α ⁻ myeloischen DC produzieren. Andererseits wurde an den Embryonen des lethalen PU.1^{-/-}-Stammes (Guerriero *et al.*, 2000; McKercher *et al.*, 1996) gezeigt, dass PU.1 die Differenzierung von lymphatischen und myeloischen DC reguliert (Anderson *et al.*, 2000; Guerriero *et al.*, 2000).

Da PU.1 nur ein schwacher Aktivator ist (Guerriero *et al.*, 2000; Tenen *et al.*, 1997), benötigt dieser Transkriptionsfaktor noch andere Coaktivatoren, um sein volles Aktivierungspotential zu erreichen. Auch scheint PU.1 mit einer Anzahl von Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren zu interagieren (Koyama, Tetradis, Tsukada; unpublished results), einschließlich **c-Jun**, einem wichtigen Coaktivator von PU.1 bei der Transaktivierung von myeloischen Promotoren (Behre *et al.*, 1999; Guerriero *et al.*, 2000). c-Jun ist eine Komponente des **AP-1** Transkriptionsfaktorkomplexes (Bohmann *et al.*, 1987), der in viele zelluläre Prozesse einschließlich Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Streßreaktion involviert ist (Whitmarsh and Davis, 1996). Die verstärkte Expression von c-Jun während der Monozytendifferenzierung deutet darauf hin, dass dieser Faktor auch hier eine Rolle spielen könnte (Gaynor *et al.*, 1991; Lord *et al.*, 1993; Mollinedo *et al.*, 1993). Behre *et al.*, 1999 entdeckten, dass c-Jun als Coaktivator die Transaktivierung des c-fms- und des minimalen Thymidin-Kinase-Promotors durch PU.1 fördert. c-Jun bindet nicht direkt an den Promotor, sondern interagiert mit PU.1 und verstärkt auf diese Weise dessen Transaktivierungspotential.

In dem AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex bildet c-Jun mit c-Fos ein Heterodimer (Bohmann *et al.*, 1987; Whitmarsh and Davis, 1996), wobei c-Fos hier nicht mit c-Jun an seiner kooperativen Funktion beteiligt ist, sondern im Gegenteil die Coaktivierung von c-Jun und PU.1 blockiert. c-Fos scheint mit PU.1 als Bindungspartner um c-Jun zu konkurrieren (Behre *et al.*, 1999).

C/EBP α ist ein Mitglied der Familie der **C/EBP** (CCAAT/enhancer binding protein) Transkriptionsfaktoren und ebenfalls ein bedeutender Regulator in der Entwicklung und Funktion des myelomonozytischen Systems. Die C/EBP-Familie besteht aus sechs Mitgliedern und ist an der Entwicklung und Funktion von hämatopoetischen Zellen, Adipozyten und Hepatozyten beteiligt (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos,

1998). Die drei Familienmitglieder C/EBP α , C/EBP β und C/EBP ϵ aktivieren die Transkription einiger myeloischer Gene (z.B. das GM-CSF-Rezeptor-Gen) kooperativ mit PU.1 (Hohaus *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu besitzen C/EBP γ und C/EBP ξ einen dominant-negativen Charakter. Da die aktivierenden Mitglieder im hämatopoetischen System hauptsächlich in der myeloischen Linie (Granulozyten, Monozyten und Eosinophile) und die inhibierenden C/EBP ubiquitär exprimiert werden (Muller, 1995; Radomska *et al.*, 1998), wird vermutet, dass die myeloische Entwicklung und Funktion durch die unterschiedlichen Kombinationen von C/EBP-Faktoren in Homo- und Heterodimeren redundant reguliert wird.

C/EBP α ist auch ein Inhibitor von PU.1, aber mit einer anderen Wirkungsweise als c-Fos. C/EBP α verdrängt den Coaktivator c-Jun von der PU.1-DNA-Bindedomäne und supprimiert so das Transaktivierungspotential von PU.1 (Behre *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2002). Durch die Suppression von PU.1 durch C/EBP α wird die Differenzierung von Granulozyten ausgelöst. Ebenso inhibiert C/EBP α komplett die TNF-abhängige Entwicklung von Langerhans-Zellen (LC) durch PU.1. Die Balance zwischen PU.1 und C/EBP in den pluripotenten myeloischen Vorläuferzellen ist somit die wichtigste Komponente in der Entwicklung von LC und Granulozyten (Behre *et al.*, 1999; Iwama *et al.*, 2002).

Einige **GATA**-Faktoren sind ebenfalls an der Entwicklung myeloischer Zellen beteiligt. GATA-1 reguliert viele erythroide Gene einschließlich des Erythropoetin-Rezeptors und des Stammzellen-Leukämie-Faktors und ist somit ein wichtiger Faktor für die Erythrozytenentwicklung (Orkin, 1992). Die Mutation von GATA-1 führt zu einem Verlust der Erythrozytendifferenzierung (Fujiwara *et al.*, 1996; Pevny *et al.*, 1995). Während der Differenzierung der multipotenten Vorläufer zu Erythrozyten wird GATA-1 aktiviert und gleichzeitig die Expression von PU.1 und dessen Zielgenen, z.B. des M-CSF-Rezeptors, reprimiert (Voso *et al.*, 1994). Während der monozytären Differenzierung wird hingegen PU.1 aktiviert und GATA-1 und GATA-2 supprimiert (Lee *et al.*, 1991; Voso *et al.*, 1994). Die Inhibierung der durch PU.1 induzierten Transaktivierung von myeloischen Promotoren erfolgt durch die Verdrängung von c-Jun durch GATA-Proteine, ähnlich wie bei C/EBP α . Auf der anderen Seite ist auch PU.1 fähig, das Aktivierungspotential von GATA-1 und GATA-2 zu hemmen (Zhang *et al.*, 1999).

AML1 ist ein Mitglied der „core binding factors“ (CBF) und ist notwendig für die normale Entwicklung aller hämatopoetischen Linien (Okuda *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996). Dieser Faktor wird im hämatopoetischen Gewebe und während der myeloischen Differenzierung, aber auch in Skelettmuskeln und Nervengewebe exprimiert (Zhu *et al.*, 1994). AML1 aktiviert viele für die myeloische Entwicklung relevante Gene wie den M-CSF-Rezeptor, GM-CSF, Myeloperoxidase und Neutrophilenelektrolytase (Frank *et al.*, 1995; Nuchprayoon *et al.*, 1994; Pabst *et al.*, 2001; Yergeau *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1994b; Zhang *et al.*, 1994a). Die Translokation t(8;21)(q22;q22), die zu einer Fusion von AML1 mit dem Corepressor ETO (Era *et al.*, 1995) führt, gehört zu den häufigsten chromosomalen Abnormalitäten in der AML (acute myeloid leukemia) und ist für ungefähr 10% aller AML-Fälle und 40% der AML mit French-American-British (FAB) M2-Phänotyp verantwortlich (Downing, 1999; Lowenberg *et al.*, 1999).

Wie AML1 kann auch das Fusionsprodukt AML1-ETO als transkriptioneller Aktivator von AP-1, BCL-2 und M-CSF-Rezeptor (Frank *et al.*, 1999; Klampfer *et al.*, 1996; Rhoades *et al.*, 1996) fungieren, in einem anderen Kontext jedoch auch als Repressor wirken (Meyers *et al.*, 1995). AML1-ETO blockiert die C/EBP α -abhängige Aktivierung seines eigenen Promotors und hemmt somit die normale Granulozytendifferenzierung von myeloischen Zellen (Pabst *et al.*, 2001). Weiterhin blockiert AML1-ETO die transkriptionelle Aktivität von PU.1 durch die Verdrängung des Coaktivators c-Jun (Vangala *et al.*, 2003).

Interferon consensus sequence binding protein (**ICSBP**), auch „interferon regulatory factor 8“ (IRF-8) genannt, ist ein IFN γ -induzierbarer Transkriptionsfaktor der IRF-Familie (Taniguchi *et al.*, 1999). ICSBP ist ein hämatopoetischer Transkriptionsfaktor, der in Knochenmarks-Vorläuferzellen, Makrophagen und Lymphozyten exprimiert wird (Tamura and Ozato, 2002; Tsujimura *et al.*, 2003). ICSBP^{-/-}-Mäuse haben Defekte in der Makrophagenfunktion, einschließlich der Fähigkeit, IL-12p40 und einige IFN γ -induzierbare Gene zu exprimieren (Tamura and Ozato, 2002). Unreife ICSBP^{-/-}-DC aus Knochenmarkszellen sind nach Aktivierungssignalen unfähig zu reifen und CD8 α und IL-12p40 zu exprimieren. Wiederherstellung der ICSBP-Expression über retrovirale Transduktion zeigte, dass dieser Faktor bei der Differenzierung von CD8 α ⁻ und CD8 α ⁺ DC und der Expression von IL-12p40 und MHC-II benötigt wird. Somit ist ICSBP für die frühe Differenzierung und Reifung von

DC (Tsujiura *et al.*, 2003) und für die Makrophagenentwicklung wichtig und hemmt im Gegensatz dazu die Granulozytenentwicklung (Tamura and Ozato, 2002).

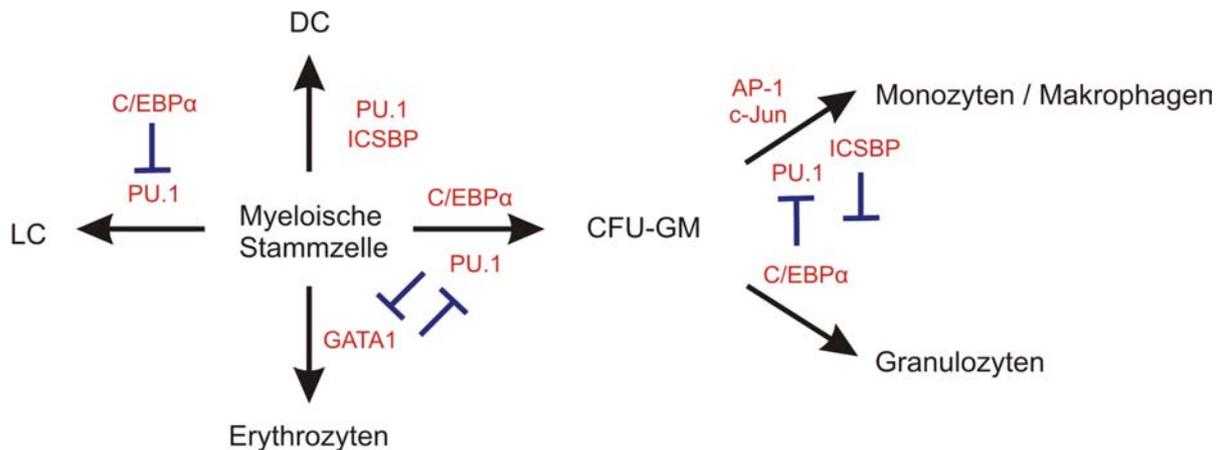


Abbildung 4: Übersichtsschema über einige wichtige Transkriptionsfaktoren in den myeloischen Linien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des Transkriptionsfaktors TFEC, einem Mitglied der MiT-Familien, in Makrophagen und DC untersucht.

Mikrophthalmia/TFE (MiT)-Proteine können mit einer Reihe der oben genannten Transkriptionsfaktoren interagieren. Ein Interaktionspartner von Mitf und TFE3, Mitgliedern der MiT-Familie, ist der Transkriptionsfaktor Ets (Tian *et al.*, 1999), und c-Fos und PU.1 wurden ebenfalls als mit Mitf interagierende Proteine beschrieben. Desweiteren wird spekuliert, dass eine Interaktion zwischen Mitf und PU.1 für die Genexpression in Osteoklasten und für deren Differenzierung notwendig ist (Luchin *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 1999). Mitf bindet auch an den Transkriptionsfaktor PEPB2, mit denen es synergistisch das Mastzell-spezifische Gen MMCP-6 aktiviert. Da PEPB2 anscheinend auch bei der Hämatopoese eine wichtige Rolle spielt und an der Regulation des M-CSF-Rezeptors beteiligt ist, könnte Mitf auch in der Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen bzw myeloischen Zellen involviert sein (Clarke and Gordon, 1998; Morii *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1994a).

1.5 Die MiT-Familie von Transkriptionsfaktoren

Die MiT-Faktoren werden in die große Familie der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren eingeordnet, die alle das sogenannte DNA-Motif *E-Box* (CANNTG) binden (Hemesath *et al.*, 1994). Zu den bHLHZip-Proteinen gehören z.B. die Unterfamilien Myc, Max, Mad, USF und MiT. Die charakteristische bHLHZip-Domäne besteht aus

einer basischen (b) Domäne, die für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich ist, einer Dimerisierungs-Domäne (HLH) und einen Leucin-Zipper (Zip), der für die Stabilisierung der Dimerisierung wichtig ist. Ein anderes Merkmal der bHLHZIP-Proteine ist, dass sie nur innerhalb der Unterfamilie Dimere bilden können. Das trifft auch bei der MiT-Familie zu, für die Homo- und Heterodimerisierung innerhalb der MiT-Mitglieder nachgewiesen wurden (Beckmann *et al.*, 1990; Carr and Sharp, 1990; Mansky *et al.*, 2002b; Nechushtan *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1993).

Die MiT-Familie besteht aus den vier Mitgliedern TFEC, TFE3, TFEB und Mitf, deren charakteristischen Domänen im folgenden Übersichtsschema aufgeführt sind:

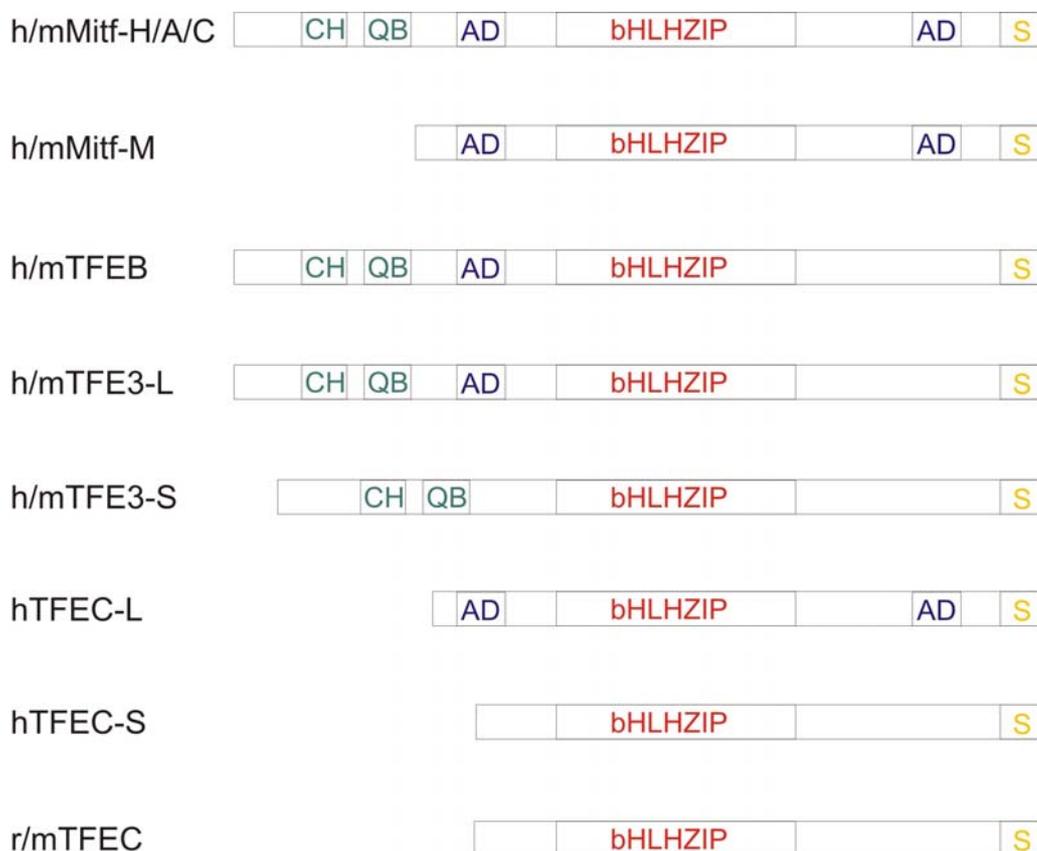


Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Isoformen der MiT-Familienmitglieder. CH: helix-formende Domäne; QB: glutaminreiche basische Domäne; AD: Aktivierungsdomäne; bHLHZip: basische Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Domäne.

1.5.1 Der Transkriptionsfaktor TFEC

Unsere Arbeitsgruppe Rehli *et al.*, 1999 entdeckte, dass mTFEC als einziges Mitglied der MiT-Familie spezifisch in Makrophagen und Osteoklasten exprimiert wird. Der Faktor mTFEC wurde nur in Makrophagen-Zelllinien, primären Makrophagen (Knochenmarksmakrophagen und Peritonealmakrophagen) und schwach in OLC (Osteoklasten-artige Zellen) detektiert, nicht aber in Fibroblasten, Melanozyten und Lymphozyten.

TFEC aus der Ratte (rTFEC) wurde von (Zhao *et al.*, 1993) aus einem Chondrosarkom isoliert, aber es konnte keine Expression in Chondrozyten und Chondrosarkom-Zelllinien nachgewiesen werden. Da mTFEC eine makrophagen- und osteoklastenspezifische Expression aufweist, stammte das rTFEC-Transkript möglicherweise von in den Primärtumor eingewanderten Makrophagen.

Die stärkste Expression von rTFEC wurde in der Niere, Milz und Lunge gefunden (Zhao *et al.*, 1993). Eine Transkription der humanen Isoform konnte ebenfalls in Niere, Milz und Leukozyten, jedoch nicht in der Lunge nachgewiesen werden (Chung *et al.*, 2001).

Der mTFEC-Promotor zeigt bemerkenswerte Ähnlichkeit mit den Promotoren von verschiedenen makrophagenspezifischen Genen, wie den M-CSF-Rezeptor- und PU.1-Genen. Der Promotor besitzt weder eine TATA-Box noch eine Consensus-Initiator-Sequenz oder eine GC-reiche Region. Stattdessen hat er zum Beispiel putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren PU.1, NF- κ B, AP-1 und C/EBP- β , die für eine myeloische Entwicklung relevant sind (Rehli *et al.*, 1999).

Die Funktion von TFEC ist noch ungeklärt. Zu Beginn der Arbeit war nur bekannt, dass rTFEC, das wie die murine Isoform und im Gegensatz zur humanen Isoform keine N-terminale Aktivierungsdomäne besitzt, als Repressor der TFE3-abhängigen Transaktivierung des IgH-Enhancers wirken kann (Zhao *et al.*, 1993). Untersuchungen an einer TFEC-defizienten Maus zeigten keine phänotypischen Abnormalitäten (Steingrimsson *et al.*, 2002).

1.5.2 Die übrigen Mitglieder der MiT-Familie

Mitf ist das am besten untersuchte Mitglied der MiT-Familie. Mehrere verschiedene Isoformen, die sich alle im N-Terminus unterscheiden, werden spezifisch in Melanozyten, Mastzellen, Osteoklasten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert (Hodgkinson *et al.*, 1993; Hornyak *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Kitamura *et al.*, 2002; Luchin *et al.*, 2000; Rehli *et al.*, 1999).

Seit 1942 wurden mindestens 20 verschieden mutierte Allele des *Mitf*-Locus in der Maus charakterisiert, deren Effekte vom Verlust der Pigmentierung, Taubheit, Reduktion der Mastzellen und NK-Zellen, Degeneration der Retina bis zur Osteopetrose reichen können (Moore, 1995; Steingrimsson *et al.*, 1994). Defekte des humanen *Mitf* werden mit dem autosomal dominanten Waardenberg-Syndrom 2A in Verbindung gebracht, dessen Krankheitsbild ein variierender Taubheitsgrad und ungleichmäßige Pigmentierung ist (Read and Newton, 1997; Tachibana, 1999; Tassabehji *et al.*, 1994).

In Osteoklasten ist *Mitf* ein wichtiger Aktivator der TRAP- (Luchin *et al.*, 2000; Tassabehji *et al.*, 1994), Cathepsin K- und E-Cadherin-Gene (Mansky *et al.*, 2002a; Motyckova *et al.*, 2001). TRAP („Tatrate resistant acid phosphatase“) ist ein oft verwendeter Marker zur Erkennung früher Vorläuferzellen von Osteoklasten, der aber auch in Makrophagen und DC exprimiert wird (Lamp and Drexler, 2000). Cathepsin K ist eine Cystein-Protease, die Proteinkomplexe in der Knochenmatrix degradiert und E-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül. Interessant ist auch, dass *Mitf* den anti-apoptotischen Faktor BCL-2 in Osteoklasten reguliert. Das BCL-2-Protein ist in *Mitf*^{mi/mi}-Osteoklasten im Vergleich zu Wildtyp-Osteoklasten stark reduziert und BCL-2^{-/-}-Mäuse entwickeln genauso wie *Mitf*^{mi/mi}-Mäuse eine schwere Osteopetrose (McGill *et al.*, 2002).

Die Funktion von *Mitf* in Makrophagen oder DC ist noch ungeklärt, allerdings wurde bei den Makrophagen von *Mitf*^{mi/mi}-Mäusen eine reduzierte Superoxiddismutase-Aktivität, eine erhöhte O²⁻ und NO-Produktion und ein verstärktes Potential zum Töten von Tumorzellen beobachtet (Rohan *et al.*, 1997).

Der Transkriptionsfaktor **TFE3** wurde über seine Bindung an die E-Box des B-Zell-spezifischen IgH-Enhancers kloniert und wird ubiquitär in verschiedenen Geweben und Zelllinien exprimiert (Artandi *et al.*, 1994; Rehli *et al.*, 1999).

Es existieren zwei Isoformen von TFE3. TFE3-L ist ein langes Transkript mit einer zusätzlichen N-terminalen Aktivierungsdomäne (AD), das dadurch ein stärkerer Aktivator ist als die kürzere Variante TFE3-S, das nur die allgemeine C-terminale AD besitzt (siehe Abb. 4).

TFE3^{-/-}-Mäuse entwickeln sich außer einer beeinträchtigten B-Zell-Aktivierung normal (Merrell *et al.*, 1997). Viele Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass TFE3, genauso wie Mitf in die Entwicklung und Funktion von Osteoklasten involviert ist.

TFE3 und Mitf scheinen in Osteoklasten durch M-CSF kontrolliert zu werden. M-CSF aktiviert die MAPK („mitogen-activated protein kinase“), die TFE3 an der Aminosäure (AS) S119 und Mitf an der AS S73 phosphoryliert, was eine Rekrutierung des Cofaktors p300/CBP auslöst (Weilbaecher *et al.*, 2001). In Melanozyten wurde gezeigt, dass eine Interaktion von p300/CBP und Mitf zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von Mitf führt (Hemesath *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1997).

Die Osteoklasten von Mäusen mit den mutierten Allelen Mitf^{mi-vga9}/Mitf^{mi-vga9} und Mitf^{Mi-wh}/Mitf^{Mi-wh} sowie TFE3^{-/-}-Mäuse entwickeln sich normal, doch bei den Doppelmutanten Mitf^{mi-vga9}/TFE3^{-/-} und Mitf^{Mi-wh}/TFE3^{-/-} bildet sich eine schwere Osteopetrose aus (Steingrimsson *et al.*, 2002).

Weilbaecher *et al.*, 1998 zeigte, dass *mib/mib*-Ratten, die eine altersabhängige Abschwächung einer angeborenen Osteopetrose aufweisen, eine große Deletion im Mitf-Locus besitzen und dass Mitf und TFE3 in Osteoklasten Heterodimere bilden können. Da das TFE3-, aber nicht das verkürzte Mitf-Protein in den *mib/mib*-Osteoklasten entdeckt wurde, wurde vermutet, dass TFE3 oder auch ein anderes MIT-Familienmitglieder nach einiger Zeit die Funktion des mutierten Mitf übernimmt und die Osteoklastenentwicklung und -funktion wieder herstellt.

In den letzten Jahren wurden Zielgene von TFE3 in Osteoklasten identifiziert, die auch von Mitf reguliert werden. Alleine und in Kooperation mit Mitf transaktiviert TFE3 das TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)- und Cathepsin K-Gen (Mansky, 2002; Motyckova *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass TFE3 und Mitf redundante Proteine sind und an der Regulation der Osteoklastenentwicklung und -funktion beteiligt sind.

Über **TFEB** ist bis heute am wenigsten bekannt. Von TFEB wurde bisher nur eine Isoform beschrieben. Der Faktor wurde wie TFE3 über seine Bindung an ein E-Box-Element im adenoviralen "major late promoter" (MLP) isoliert (Carr, 1990; Rehli *et al.*, 1999) und ist ebenso ubiquitär exprimiert (Rehli *et al.*, 1999).

TFEB-defiziente Mäuse sterben an Tag 10 im Uterus, vermutlich durch einen Defekt in der Vaskularisierung der Plazenta, was zu embryonaler Hypoxie und allgemeiner Unterversorgung führt (Steingrimsson *et al.*, 2002). Bis jetzt wurde nur eine Funktion von TFEB in Melanozyten nachgewiesen, wo es wie Mitf und TFE3 als Aktivator des TRP1-Gens fungiert .

Die meisten Untersuchungen haben sich mit der Funktion der MiT-Familienmitglieder in Osteoklasten, Melanozyten und Mastzellen befaßt. Welche Rolle diese Familie in der Differenzierung oder Aktivierung der Makrophagen einnimmt wurde bis heute jedoch kaum erforscht. Deshalb war es besonders von Interesse, eine eingehende Charakterisierung der makrophagen- und osteoklastenspezifischen Faktor TFEB durchzuführen.

2 Zielsetzung

Die Funktion des makrophagen- und osteoklastenspezifischen Transkriptionsfaktors TFEC ist noch weitgehend ungeklärt, seine gewebespezifische Expression könnte jedoch auf eine besondere Bedeutung für die Differenzierung oder Aktivierung von Makrophagen hindeuten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb die Regulation und Funktion dieses Transkriptionsfaktors mittels molekularbiologischer und biochemischer Methoden näher untersucht werden. Ein Schwerpunkt der Arbeit waren mRNA- und Protein-Expressionsstudien in unterschiedlich stimulierten humanen und Mausmakrophagen, sowie die molekulare Analyse der Regulationsmechanismen. Zusätzlich sollten Makrophagen aus TFEC-defizienten Mäusen in ihrem basalen und induzierbaren Expressionsmuster mittels DNA-Microarrays mit normalen Makrophagen verglichen werden. Gene, die ein verändertes Expressionsmuster in TFEC^{-/-}-Mäusen zeigen, sollten weiter charakterisiert und die Rolle von TFEC bei ihrer Regulation untersucht werden. Außerdem sollten in Makrophagen mit TFEC assoziierte Proteine mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems identifiziert und weiter charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen, falls nichts anderes vermerkt wird. Die Interleukine wurden von der Firma PeproTech (Rocky Hill, USA) geliefert. Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert, die radioaktiv markierten Substanzen wurden von der Firma Pharmacia-Amersham (Freiburg) bezogen und die cDNAs für die Sonden wurden von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig) radioaktiv-markiert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart (Regensburg) durchgeführt.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Gewebekulturschalen	Falcon, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville, USA
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon Transfermembran	MSI, Westboro, USA
Petrischalen	Falcon, Heidelberg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme X-Omat AR5	Kodak, Rochester, USA
Sterilfilter (0,45 µm)	Millipore, Eschborn
Zentrifugenröhrchen (15, 50, 225 ml)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturschalen	Falcon Heidelberg
Zellschaber	Nunc, Naperville

3.1.3 Geräte

Autoklav	Technomara, Fernwald
β-Counter (Tri-CARB 1600 TR)	Canberra Packard, Frankfurt
Blutzellseparator CS 3000	Baxter Healthcare, Derrfield, USA
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Densitometer	Molecular Dynamics, Krefeld
Elektrophoreseapparaturen:	
Hoefer HE 33	Pharmacia Biotech, Freiburg
"Slabgel"-Apparatur Maxigel	Biometra, Göttingen
Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Blue Marine	Serva, Heidelberg
Gel-Dokumentationssystem	Intas, Göttingen
	Herolab, Wiesloch
Light Cycler	Roche, Mannheim
Mikroskop (AxioLab)	Zeiss, Oberkochen
PCR-Thermocycler (MJ Research PTC 200)	Biozym Diagnostic, Oldendorf
pH-Meter	Knick, Berlin
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	Cole-Parmer, Chicago, USA
Schweißgerät (für Teflonbeutel) Fermant 400	Josten und Kettenbaum, Bensberg
Spannungs- und Stromquellen	Bachofer, Reutlingen
Sterilbank (Lamin Air:HA 2472)	Heraeus, Osterode
Stratalinker UV Crosslinker 1800	Stratagene, Heidelberg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS Spektrometer (Lambda2)	Perkin Elmer, Überlingen
Zentrifugen:	
Elutriator J6-MC	Beckmann, München
Minifuge T	Heraeus, Osterode
PicoFugeTM	Stratagene, Heidelberg
Sigma 4K10	Braun, Osterode

3.1.4 *E. Coli*-Stämme

DH10 β	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
TOP10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

3.1.5 Zelllinien

HL-60	humane akute monozytische Leukämiezelllinie (DSMZ No ACC 3)
J-774	murine Monozyten-Makrophagen-Zelllinie(DSMZ No ACC 170)
MonoMac-6	humane monozytische Leukämiezelllinie (DSMZ No ACC 124)
NIH 3T3	Fibroblastenzelllinie (ATCC CRL-1658)
RAW 264.7	murine Monozyten-Makrophagen-Zelllinie(ATCC TIB-71)
THP-1	humane akute monozytische Leukämiezelllinie (DSMZ No ACC 16)
U937	humane monozytische Lymphomzelllinie (DSMZ NoACC 5)

3.1.6 Molekulargewichtstandards

DNA-Längenstandards:

1 kb Plus DNA Leiter, synthetisch (Gibco, Eggenstein):

Fragmentlängen (bp): 12000-2000/1 kb-Stufen 1650 1000 850 650 500-100/100 bp- Stufen

ϕ X174/*HaellI*-Verdau (Gibco, Eggenstein):

Fragmentlängen (bp): 1353 1078 872 603 310

Protein-Molekulargewichtsstandard:

Kaleidoskop Standard (BioRad, München):

Masse (kDa): 202.000 133.000 71.000 41.800 30.600 17.800 6.900

Hier ist nur ein Beispiel angegeben, wegen unterschiedlicher Chargen variierte die Masse leicht.

3.1.7 Plasmid-Vektoren

Plasmid	Herkunft
PGEM	Promega, Mannheim
pGEX-KG	Zur Verfügung gestellt von Thomas Dobner (medizinische Mikrobiologie; Regensburg)
pGL2-Basic	Promega, Mannheim
pGL2-CMV	Promega, Mannheim
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
pGL3-CMV	Promega, Mannheim
pSTAT6	RZPD

TK-STAT6x4	Zur Verfügung gestellt von Douglas Konrad
pCL1	Clontech
pAS2.1	Clontech
pGAD424	Clontech
pTD1-1	Clontech
pVA3-1	Clontech
pADGAL4.2	Clontech
pcDNA3.1	Invitrogen
pRC/CMV-hTFEC	Zur Verfügung gestellt von S. Shibahara
pGEM-mTFEC	Labor
pGEM-mTFE3	Labor
pGEM-mMitf-A	Labor
pGL2-mTFEC	Labor
pGL2-mTFEC-NF-κB	Labor
pGL3-mTFEC	Labor
pGL3-STAT6u/M	Labor
pGL3-STAT6m/M	Labor
pGL3-STAT6i/M	Labor
pSTAT6	Labor
pAS2.1-neu	Labor
Δ222	Labor
Δ272	Labor
Δ293	Labor
pAS2.1-neu-Mi	Labor
pGEX-KG-cTFEC	Labor

3.1.8 Primersequenzen

Sequenzierprimer:

M13 forward	5'-ttg taa aac gac ggc cag tg-3'
M13 reverse	5'-gga ggc agc tat gac cat gat-3'
pAD-GAL_S	5'-tgagatggtgcacgatgc-3'
pAD-GAL_AS	5'-aagataccccaccaaacc-3'

PCR-Primer:

Maus-Tfect1	5'-cgactaggccatcttctga-3'
Maus-Tfect2	5'-gaacaaggcagaaggaccaac-3'
Maus-Tfect3	5'-gggaggattggaagacaatc-3'
LC-hTFEC-S	5'-cacaacctcattgaagaaga-3'

LC-hTFEC-AS	5'-gggctctctgttctttt-3'
TFEC_GEX_S	5'-gctagaattccacgtgctcatggtctacc-3'
TFEC_GEX_AS	5'-tacgctcgaggatgcttgagcctgttgc-3'
mTFEC Δ 220_S	5'-ccacatcaccaagtaag-3'
mTFEC Δ 220_AS	5'-catgggtgtagtggtcattcagct-3'
mTFEC Δ 272_S	5'-tcctggcttcaactcgg-3'
mTFEC Δ 272_AS	5'-aatgcgctgacttattcctcttcaaagcgg-3'
mTFEC Δ 293_S	5'-tcctggcttcaactcgg-3'
mTFEC Δ 293_AS	5'-aatgcgctgacttagagtagtgggtccgtcc-3'

Oligonukleotide für Gelshifts:

tfec-kB	5'-agagtccaggaaagccctaag-3'
tfec-kB-M	5'-agagtccagtcgctgcctaag-3'
KB-cons	5'-tagatggggaatccccagcc-3'
tfec-stat6i	5'-tgtaaattctggggaaaaatg-3'
tfec-stat6i-M	5'-tgtaaattctggggtctaaatg-3'
tfec-stat6m	5'-cagtgttctgaagaaacttac-3'
tfec-stat6m-M	5'-cagtgttctgatctaacttac-3'
tfec-stat6u	5'-tctaattcttgggaagatcaat-3'
tfec-stat6u-M	5'-tctaattcttgtctagattcaat-3'

3.1.9 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

Enzyme:

High Fidelity Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase SuperScript II	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim

Protease-Inhibitoren:

Antipain	Roche, Mannheim
Aprotinin	Roche, Mannheim
Chymostatin	Roche, Mannheim
E64	Roche, Mannheim
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Roche, Mannheim

Pepstatin	Roche, Mannheim
PMSF	Sigma, Deisenhofen

Kits:

Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
ECF Western blotting reagent packs	Amersham (Freiburg)
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
pCR2.1-Cloning Kit	Invitrogen, San Diego, CA, USA
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QiaexII Agarose-Extraktionskit	Qiagen, Hilden

3.2 MäusstämmeVerwendete Mäusstämme:

Mäusstamm	Herkunft
BALB/c	Charles River, Kißlegg
129/SvJ	Charles River, Kißlegg
STAT6 ^{-/-}	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Gessner, Universität Erlangen.
Zucht von TFEC ^{-/-}	Männliche TFEC ^{-/-} -Mäuse freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Steingrimmson, Universität von Island, Reykjavik.

Für sämtliche Experimente wurden männliche Tiere verwendet.

3.3 ZellkulturVerwendete Medien und Zusätze:

500 ml RPMI 1640-Medium (niedriger Endotoxingehalt; BioWhittaker, Roche) enthielten folgende Zusätze (Gibco BRL, Eggenstein):

5 ml (2 mM)	L-Glutamin
5 ml (1x)	MEM nicht-essentielle Aminosäure
2 ml (1x)	Vitamine
2,5 ml (100U/ml)	Penicillin-Streptomycin
5 ml (1 mM)	Natriumpyruvat
1 ml (50 µM)	2-Mercaptoethanollösung (in PBS)

Trypanblau-Lösung: 200 mg (0.2%) Trypanblau
ad 100 ml mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung

FCS: fötales Kälberserum; die Seren wurden vor Gebrauch bei 56°C für 30 min inaktiviert.

PBS: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Biochrom, Berlin)

3.3.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Verwendetes Material:

Neubauer Zählkammer

Um die Zellzahl und die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurde der Trypanblau-Ausschlußtest angewendet. Dabei wurden die Zellen mit der Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer innerhalb eines Großquadrates (=16 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Dichte der vitalen Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl: } z \text{ (Zellen/ml)} = Z \times V \times 10^4$$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm²)

V = Verdünnungsfaktor

3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Verwendete Reagenzien:

Einfríermedium:	RPMI 1640	50 %
	FCS	40 %
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %

Einfrieren:

Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen geerntet und in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Die Zelldichte sollte zwischen 3-5x10⁶ Zellen/ml betragen. Danach wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt und in Isopropanol-gefüllten Kryoboxen (Nalgene, USA) für mind. 24h bei -70°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in Flüssigstickstoff.

Auftauen:

Die Zellen wurden zügig bei 37°C aufgetaut und sofort danach in 20 ml warmen serumhaltigem Medium aufgenommen. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen abzentrifugiert (1.200 rpm, 8 min, 4°C) und in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die gewaschenen Zellen in eine Zellkulturflasche überführt.

3.3.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Zellen

3.3.3.1 Monozytenisolierung durch Gegenstromelutriation

Verwendete Reagenzien:

Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg)

H₂O/6% H₂O₂ (Braun, Melsungen)

HANKS: Balanced Salt Solution (Biochrom) mit 6% autologem Plasma

Gesunden Spendern wurde mittels einer Leukapherese aus dem peripheren Blut Leukozyten abgenommen (Graw et al., 1971). Die mononukleären Zellen (MNCs) wurden durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque aus dem Leukozyten-Konzentrat abgetrennt und dreimal mit PBS gewaschen (Johnson et al., 1977). Aus diesen MNCs wurden schließlich die Monozyten über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) isoliert. Die Elutriation wurde mit einer Beckmann-Zentrifuge (J6-MC) und einer 50 ml Elutriations-Kammer durchgeführt, die vor jeder Benutzung mit einer 6%-igen Wasserstoffperoxidlösung sterilisiert und mit 500 ml PBS gespült wurde. Danach wurde die Pumpe bei einer konstanten Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2500 rpm bei 4°C mit HANKS geeicht. Bei einer Durchflußrate von 52 ml/min wurde die Kammer mit den MNCs beladen. Bei einer konstanten Umdrehungszahl der Zentrifuge von 2500 rpm wurden durch eine stufenweise Erhöhung der Durchflußrate die Zellen nach Größe aufgetrennt und abgesammelt. In der letzten Fraktion befanden sich die größten Zellen der MNC-Population, die Monozyten, die bei 1200 rpm 8 min bei 4°C abzentrifugiert, in RPMI-Medium aufgenommen und gezählt wurden. Die Ausbeute an Monozyten war spenderabhängig und betrug zwischen 10-20% der eingesetzten MNCs. Die Reinheit der Monozytenfraktion, die über die CD14-Expression durchflußzytometrisch bestimmt wurde, lag bei 85-95%.

Fraktion	Durchflußrate (ml/min)	Hauptanteil an Zellen in der Fraktion
Ia	52	Thrombozyten/Erythrozyten
Ib	57	kleinere B-Lymphozyten
IIa	64	kleine B-Lymphozyten
IIb	74	größere T-Lymphozyten
IIc	82	größere T-Lymphozyten
IId	92	große T-Lymphozyten
III	111	Monozyten

Tabelle 3: Einstellungsparameter für die Elutriation und abgesammelte Zelltypen.

3.3.3.2 Kultivierung von Monozyten

Verwendete Reagenzien:

humanes AB-Serum

rhGM-CSF: rekombinanter humaner Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (Sandoz-Essex, München)

rhIL-4: rekombinantes humanes Interleukin-4 (Schering-Plough, New Jersey, USA)

rhTNF: rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α (Promocell, Heidelberg)

3.3.3.2.1 *Differenzierung von Monozyten in Makrophagen*

Um vitale Monozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung entnehmen zu können, wurden diese in hydrophoben Teflonbeuteln kultiviert (Johnson et al., 1977). Die Monozyten wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 und 2% AB-Serum unter Standardkulturbedingungen gehalten. Nach der jeweiligen Kulturperiode wurden die Zellen im Beutel morphologisch unter dem Mikroskop begutachtet und die Beutel für 30 min auf 4°C abgekühlt. Die durch anschließendes Rubbeln abgelösten Zellen wurden geerntet, danach gezählt (Trypanblau-Ausschlußtest) und für weitergehende Experimente eingesät (Andreesen et al. 1983b).

Wenn für weitere Experimente keine vitalen Monozyten bzw. Makrophagen benötigt wurden, konnten alternativ unbeschichtete Petrischalen (Falcon, 150x15 mm) verwendet werden, in denen die Zellen ebenfalls mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingesät wurden.

Die Ausbeute hing von der Kulturdauer ab und betrug nach 7 Tagen etwa 20-50%.

3.3.3.2.2 *Differenzierung von Monozyten in dendritenähnlichen Zellen*

Durch Kultivierung von 1×10^6 Monozyten/ml RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS), rekombinatem humanem Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (rGM-CSF; 35 ng/ml) und rekombinatem humanem Interleukin-4 (rIL-4; 500U/ml) wurden dendritische Zellen (DC) gewonnen (Romani et al, 1994). Um die terminale Reifung dieser eher unreifen DC zu induzieren, wurden die Zellen nach fünf Tagen in Kultur mit 10 ng/ml LPS oder mit 10 ng/ml rekombinatem humanem TNF für zwei zusätzliche Tage stimuliert. Die Ausbeute betrug ungefähr 30-50 %.

3.3.4 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Knochenmarkszellen

3.3.4.1 Differenzierung der Knochenmarkszellen in Knochenmarksmakrophagen (BMM)

3.3.4.2 Verwendetes Reagenz:

humanes M-CSF (CETUS, Emeryville, USA)

Der Femur von Mäusen des Stammes BALB-C oder SVJ129 wurde herauspräpariert und in 70% Ethanol auf Eis bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Leukozyten mit eiskaltem PBS aus dem Femur herausgelöst und gezählt. Die Ausbeute eines Femurs betrug zwischen $5-10 \times 10^6$ Zellen. Die Leukozyten wurden in einer Zelldichte von $5 \times 10^6/10$ ml RPMI incl. 10 % FCS und 200 ng/ml humanem M-CSF in Petrischalen eingesät. Am 5. Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen morphologisch begutachtet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit einem weichen Zellschaber von den Petrischalen abgelöst, in M-CSF freiem Medium gewaschen und in einer Zelldichte von $10 \times 10^6/20$ ml RPMI 1640 incl. 10% FCS und 200 ng/ml humanem M-CSF in Gewebekulturschalen eingesät. Am Tag 7 wurden die BMM (bone marrow derived macrophages) für 0,5 h bis 48 h stimuliert und danach geerntet.

3.3.4.3 Differenzierung der Knochenmarkszellen in Dendritische Zellen

Verwendete Reagenzien:

rmGM-CSF rekombinanter muriner Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (Peprotech, Rocky Hill, USA)

rmIL-4 rekombinantes murines Interleukin-4 (Peprotech, Rocky Hill, USA)

Die Leukozyten wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben präpariert. Anschließend wurden $7-8 \times 10^6$ Zellen in 50 ml RPMI incl. 10 % FCS eingesät und mit 30 ng/ml rmGM-CSF und 50 ng/ml rmIL-4 versetzt. Am 8. Tag konnten sie wahlweise stimuliert oder gleich geerntet werden.

3.3.5 Kultivierung humaner und muriner Zelllinien

3.3.5.1 Kulturbedingungen und Passagierung

Zusätzlich verwendete Reagenzien:

T/E (Gibco):	0,05 %	Trypsin
	0,02 %	EDTA

Die verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, in RPMI 1640 mit allen Zusätzen und 10 % FCS kultiviert und bei 37°C, 7% Kohlendioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und entweder mit einem weichen Zellschaber abgelöst oder 5 bis 10 min mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C inkubiert und gewaschen. Anschließend konnten die Zellen in Medium mit Serum aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen eingesetzt werden.

3.3.5.2 Nachweis von Mykoplasmen

In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Der Nachweis erfolgte über einen ELISA mit dem Mycoplasma Detection Kit (Roche, Mannheim).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von Bakterien

Verwendete Reagenzien:

LB-Medium:	10 g (1 %)	Trypton
	5 g (0,5 %)	Hefeextrakt
	10 g (1 %)	NaCl
	600 µl (5 M)	NaOH
	ad 1000 ml H ₂ O; pH 7,5	
LB-Platten	15 g (1,5 %)	Agar
	1000 ml LB-Medium	

Die Kultivierung erfolgt in LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) unter Schütteln bei 37°C. Zur langfristigen Lagerung der Bakteriensuspension wurden Glycerinkulturen aus 0,5 ml Bakteriensuspension und 1ml 100 % Glycerin hergestellt und bei -70°C gelagert.

3.4.2 Präparation und Analyse von DNA

3.4.2.1 Plasmidvektoren

3.4.2.1.1 *Plasmid Mini/Midi/Maxi-Prep (alkalische Lyse)*

Zur Plasmid Präparation wurde der Qiagen Plasmid Purification Kit oder das Promega Wizard Plus SV Miniprep-DNA Purification System benutzt.

3.4.2.1.2 *Präparation von chemisch kompetenten E. Coli*

Verwendete Reagenzien:

ψ Broth-Medium	20 g (2,0 %)	Bacto Tryptone (Difco)
	5 g (0,5 %)	Bacto Hefeeextract (Difco)
	8,18 g (0,4 %)	MgSO ₄ •7H ₂ O
	0,745 g (10 mM)	KCl
	mit KOH auf pH 7,6 einstellen; ad 1000ml mit H ₂ O	
TfBI	6,045g (100 mM)	RbCl ₂
	4,5 g (50 mM)	MnCl ₂
	1,472 g (30 mM)	KOAc
	0,735 g (10 mM)	CaCl ₂ •2H ₂ O
	75 ml (15 %)	Glycerin
	mit 0,2 M HOAc auf pH 5,8 einstellen; ad 500 ml mit H ₂ O; filtersterilisieren (0,22 µm Filter) und bei 4°C lagern	
TfBII	1,047 g (10 mM)	MOPS/NaOH; pH 7,0
	0,605 g (10 mM)	RbCl ₂
	5,523 g (75 mM)	CaCl ₂
	75 ml (15 %)	Glycerin
	ad 500 ml mit H ₂ O; filtersterilisieren (0,22 µm Filter) und bei 4°C lagern	

Der Bakterienstamm wurde auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Eine von diesen Kolonien wurde gepickt und damit 5 ml ψ Broth-Medium angeimpft und die Kultur bei 37°C unter Schütteln auf OD₅₅₀ 0,3 anwachsen gelassen. Mit dieser Bakterienkultur wurden wiederum 100 ml vorgewärmtes ψ Broth-Medium angeimpft. Nachdem 2-3 h später eine OD₅₅₀ von 0,48 erreicht worden war, wurden die Bakterien auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Suspension in 50 ml Falconröhrchen überführt und in einem vorgekühlten Rotor bei 2.500 rpm für 5 min und 4°C abzentrifugiert. Nach einem kurzen Vortexen des Pellets wurden die Zellen in eiskaltem 30 ml TfBI aufgenommen und für 0-5 min (Inkubationszeit war abhängig vom Bakterienstamm) auf Eis inkubiert. Nun wurden die Bakterien wieder abzentrifugiert (2.500 rpm, 5 min, 4°C) und in 4 ml eiskaltem

TfBII vorsichtig resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden in 0,2 ml Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

3.4.2.1.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. Coli*

Verwendetes Medium:

SOC-Medium	20 g (2 %)	Bacto Trypton (Difco)
	5 g (0,5 %)	Bacto Hefeextract (Difco)
	0,6 g (10mM)	NaCl
	0,2 g (3 mM)	KCl
	ad 1000 ml mit H_2O ,	
	autoklavieren und zum gekühlten Medium Folgendes hinzufügen:	
	10 ml (10 mM)	1 M MgCl_2 , sterilfiltriert
	10 ml (10 mM)	1M MgSO_4 , sterilfiltriert
	10 ml (20 mM)	2M Glucose, sterilfiltriert

Pro Transformation wurden 50 μl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, zu denen 0,1-1 μg DNA (das Volumen sollte nicht mehr als 5 μl betragen) hinzugefügt wurde. Nach vorsichtigem Vermischen wurde die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 60 sec. Sofort danach wurden die Bakterien für 1-2 min auf dem Eis abgekühlt. Damit das Resistenzgen exprimiert werden konnte, wurden die transformierten Bakterien in 250 μl SOC-Medium für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden davon 50-150 μl auf LB-Agar Platten ausgestrichen, die das für die Selektion der transformierten Bakterien benötigte Antibiotikum enthielten, und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einigen der gewachsenen Kolonien wurden Kulturen für Minipreps angeimpft. Eine erfolgreiche Klonierung der Sequenz wurde durch einen Restriktionsverdau nachgewiesen. Von den positiven Minipreps wurde eine Glycerinkultur angelegt.

3.4.2.2 Agarose-Gele für DNA

Verwendete Reagenzien:

TAE (50x)	242,3 g (2 M)	Tris
	20,5 g (250 mM)	NaAc/HAc; pH 7,8
	18,5 g (50 mM)	EDTA
	ad 1000 ml mit H_2O	
DNA-Laufpuffer (5x)	500 μl (50 mM)	Tris/HCl; pH 7,8
	500 μl (1 %)	20 % SDS
	1 ml (50 mM)	0,5 M EDTA; pH 8,0
	4 ml (40 %)	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
	ad 10 ml mit H_2O	

Gelkonzentration	1 % Agarose	
	TAE (1x)	50 ml
Agarose	0,5 g	1,5 g
Ethidiumbromid (10 μ g/ μ l)	2,5 μ l	7,5 μ l

Tabelle 3: Zusammensetzung unterschiedlich konzentrierter Agarose-Gele

Die Agarose wurde in dem 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Dann ließ man die Lösung wieder auf ca. 60°C abkühlen, bevor das Ethidiumbromid hinzugefügt wurde. Nach kurzem Rühren wurde die flüssige Agaroselösung in den Gelschlitten gegossen, der nachdem das Gel fest war, in die Gelelektrophorese-Kammer eingesetzt wurde. Als Laufpuffer wurde 1x TAE benutzt. Die DNA-Proben wurden mit dem DNA-Ladepuffer 4:5 gemischt und in die Geltaschen geladen. Abhängig von der Gelgröße erfolgte der Lauf bei 40-100 V für 1-3 h. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, so dass die DNA mittels eines UV-Bildschirms sichtbar gemacht werden konnte.

3.4.2.3 Präparation von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

DNA-Fragmente wurden nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR-Amplifikation über ein Agarosegel aufgetrennt. Auf dem UV-Schirm wurde das gewünschte Fragment ausgewählt und mit einem Skalpell die Bande aus dem Gel geschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel, wurde der QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die DNA-Menge wurde entweder im Gel im Vergleich mit einem DNA-Marker mit bekannten DNA-Fragmentkonzentrationen (z.B. ϕ 174/ *Hae*) abgeschätzt, oder alternativ mit einem Photometer bestimmt. Dabei wurde die DNA-Menge gemäß der mittleren OD_{260} (10 μ g dsDNA) =1 berechnet

3.4.2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente bzw. Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen an den entsprechenden Stellen geschnitten. Der Vektor wurde mit denselben Enzymen verdaut und mit 1 U CIP (calf intestinal phosphatase) für 30 min bei 37°C dephosphoryliert, um eine Selbstligation des Vektors zu verhindern. Die Ligation des aufgereinigten DNA-Fragments (75-150 ng) und Vektors (25-50 ng) erfolgte in einer 10 μ l-Reaktion über Nacht bei 15°C mit 1 U T4 DNA-Ligase in Ligasepuffer. Für die

Transformation von chemisch kompetenten Bakterien wurden 2 μ l dieser Reaktion benutzt.

PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden über den von der *Taq*-Polymerase erzeugten 3'-polyA-Überhang in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen, San Jose, USA) ligiert und nach der Vorschrift des Herstellers in TOP10F oder TOP10F'-Zellen des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen) transformiert. Ein Blau/Weiß-Screening wurde benutzt, um erfolgreich ligierte Transformanten zu erkennen. Hierbei wurden die transformierten Bakterien auf X-Gal überschichtete LBamp-Platten ausgestrichen. Der pCR2.1-Vektor besitzt ein lacZ-Gen, in das die "Multiple Cloning site" (MCS) eingesetzt wurde. Bei Selbstligation des Vektors wird so funktionelle β -Galactosidase exprimiert, die das auf der Platte verteilte X-Gal zu einem blauen Produkt umsetzt. Erfolgt eine Insertion in diese MCS entsteht eine mutierte, nicht funktionelle β -Galactosidase, die das X-Gal nicht umsetzen kann. So erscheinen die Kolonien weiß. Von diesen weißen Kolonien wurden Minipreps angefertigt und diese verdaut, um festzustellen, ob die Klonierung erfolgreich war. Zur Überprüfung einer korrekten Insertion und fehlerlosen Amplifikation der Sequenz wurden die Konstrukte mit vektorspezifischen Primern sequenziert.

3.4.2.5 DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen

Bei den Sequenzierungen wurde die "dye deoxy terminator cycle sequencing"-Methode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Didesoxynukleotid-Terminatoren angewandt. Die Sequenzierungen wurden von der Firma "geneart", Regensburg durchgeführt.

Die Sequenzvergleiche wurden in der Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/) mit dem Programm BLAST v2.0 vollzogen.

3.4.2.6 "Polymerase Chain Reaktion" (PCR)

Verwendete Reagenzien:

DNA- Polymerase	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase oder Expand High Fidelity Polymerase (Roche) mit dazugehörigem Puffer
Primer	sense/antisense-Primer (10 μ M)
dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 25 mM)

Bei dieser Methode werden mit zwei entgegengesetzt orientierten, spezifischen Primern (sense und antisense) aus geringen Mengen an DNA-Proben bestimmte Gensequenzen in großer Menge amplifiziert (Mullis et al., 1986). Die PCR-Reaktionen wurden in dickwandigen 0,5 ml PCR-Röhrchen (Eppendorf) angesetzt. Das normale Volumen eines Reaktionsansatzes betrug 25 μ l. Die Reaktion wurde in einem MJ research PTC 200 Thermocycler (Biozym) durchgeführt.

Reaktionmix:

50 ng – 1 μ g	DNA
0,5 μ l	sense-primer
0,5 μ l	antsense-Primer
0,5 μ l	25 mM dNTP
2,5 μ l	10x Puffer
0,5 μ l	Polymerase
ad 25 μ l	H ₂ O (DNase und RNase frei)

Amplifikationsschritte	PTC 200		
Denaturierung	95°C	30 sec	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	15 sec	10-40 Zyklen
Annealing	65°C	15 sec	
Polymerisation	72°C	70 sec	
letzter, verlängerter Polymerisationsschritt	72°C	5 min	1 Zyklus
Abkühlung/Beendung der Reaktion	15°C		

Tabelle 4: PCR-Beispiel

3.4.2.7 Ortsspezifische Mutagenese durch PCR

Verwendete Reagenzien:

Taq-DNA Polymerase mit Puffer (10x, Roche)
 High Fidelity Polymerase mit Puffer (10x, Roche)
 dNTP (je 10 mM)
 Genspezifische Primer (GS und GAS)
 Sense und Antisense Primer mit Mutationen (PXS und PXAS)
 Sense und Antisense Primer mit Mutationen

Reaktionsmix (für 1 Ansatz):

PCR-Reaktionen	1. PCR	2. PCR	3. PCR
DNA Matrize	1 μ g	1 μ g	10 μ l gelgereinigtes Fragment
Taq-DNA Puffer (10x)	10 μ l	10 μ l	---
High Fidelity Puffer (10x)	---	---	10 μ l
dNTP (je 10 mM)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
GS (10 pmol/ μ l)	5 μ l	---	5 μ l
GAS (10 pmol/ μ l)	---	5 μ l	5 μ l
PXS (10 pmol/ μ l)	---	5 μ l	---

PXAS (10 pmol/μl)	5 μl	---	---
H ₂ O	ad 98 μl	ad 98 μl	ad 98 μl
Taq-DNA Polymerase	2 μl	2 μl	---
High Fidelity Polymerase	---	---	2 μl

Auflistung der Plasmide mit einer ortsspezifischen Mutation und bei der Mutagenese eingesetzten Primer:

Plasmid	Primer	Primername	Primersequenz
Allgemein	GS	pGL2-primer1	5'-tgtatcttatggctactgtaactg-3'
	GAS	pGL2-primer2	5'-ctttatgttttggcgtctcca-3'
pGL2-mTFEC-NF _κ B	PXS	pGL2-mTFEC-NF _κ B-S	5'-cagagtccagtcgctgccctaattg-3'
	PXAS	pGL2-mTFEC NF _κ B-AS	5'-ccattagggcagcgaactggactctg-3'
pGL2-STAT6u/M	PXS	gp-uS6M-S	5'-ctgtctaattctctgtctagatcaattat-3'
	PXAS	p-uS6M-AS	5'-ccaagaataattgatctagacaagaagatt-3'
pGL2-STAT6m/M	PXS	gp-mS6M-S	5'-ggacagtgttctgatctaactactgttaa-3'
	PXAS	p-mS6M-AS	5'-tgccttacaagtaagtagatcagaacact-3'
pGL2-STAT6i/M	PXS	gp-iS6M-S	5'-cattgtaaattctgggctcsaaatgtttatt-3'
	PXAS	p-iS6M-AS	5'-cccataataaacatttgagcccagaattt-3'

Durch den Einsatz eines Primers, welcher die gewünschte Mutation besitzt, lassen sich zusammen mit einem genspezifischen Primer gezielt Mutationen an einem Ende einer durch PCR amplifizierten DNA-Sequenz einbauen. Bei gleichzeitiger Mutation des überlappendem Komplementärstrangs lässt sich nach Hybridisierung der beiden mutierten Stränge mit den beiden genspezifischen Primern eine cDNA mit der entsprechenden Mutation hochamplifizieren.

Angewendet wurde diese Methode zur Herstellung von Mutationen im proximalen Promotor, um die Promoteraktivität im Vergleich von nicht-mutierter DNA in Luziferase-Experimenten zu messen.

Der 1. und 2. PCR-Ansatz wurde auf 4 Ansätze (25 μl/Ansatz) verteilt und die Amplifikation durchgeführt. Nach 7, 9, 11 und 13 Zyklen wurde jeweils ein Ansatz herausgenommen und auf 0°C gelagert. Nach Ablauf des letzten Zyklus wurden alle Ansätze 5 min bei 72°C inkubiert, kurz auf 0°C gestellt und dann vollständig auf ein Agarosegel aufgetragen. Sichtbare DNA-Banden bei der niedrigsten Zyklenzahl wurden ausgeschnitten (zur Minimierung der DNA-Polymerase bedingten Fehler) und die Produkte der 1. und 2. PCR gemeinsam aus dem Gel extrahiert. Die DNA wurde in 20 μl H₂O aufgenommen. 10 μl davon wurden im 3. PCR eingesetzt.

Wiederum wurde der Gesamtansatz geviertelt und die PCR durchgeführt. Es wurde ebenfalls nach 7, 9, 11 und 13 Zyklen je ein Ansatz herausgenommen und für den letzten Schritt die Ansätze wieder 5 min bei 72°C inkubiert. 4 µl der Ansätze wurden auf einem Agarosegel analysiert und die DNA der PCR-Reaktion mit der niedrigsten Zyklenzahl zur Klonierung verwendet.

Das Vorhandensein der Mutation wurde durch eine Sequenzierung überprüft. Korrekt mutierte Fragmente wurden in den pGL3- oder pGL2-Luziferase-Reporter-Vektor kloniert.

3.4.2.8 Lightcycler

cDNA-Synthese:

Für die RT-PCR wurde 1 µg RNA in 10 µl H₂O (DNase und RNase frei) aufgenommen und folgende Reaktion gestartet:

10 µl	RNA (1 µg)
1 µl	Oligonukleotid-Primer ("Random Decamer", Ambion)
1 µl	dNTP (10 mM)
→ 5 min bei 65°C	im PCR-Cycler
→ Eis	
4 µl	5x Erststrangpuffer (Qiagen)
2 µl	DTT (0,1 M; Qiagen)
1 µl	RNase-Inhibitor (Amersham)
→ 2 min bei 42°C	im PCR-Cycler
1 µl	SuperScript II (200 U/µl; Invitrogen)
→ 50 min bei 42°C	im PCR-Cycler
→ 15 min bei 70°C	im PCR-Cycler
→ bei -20°C lagern	

Der Ansatz wurde wahlweise mit 30-130 µl H₂O (RNase und DNase frei) verdünnt.

Amplifikation mit dem Lightcycler:

Für den folgenden Ansatz wurde SYBR Green zur fluoreszenten Detektion, maximal der zweiten Ableitung (Punkte maximaler Steigung der Konzentration versus Zykluscurve), zur Quantifizierung eingesetzt.

Reaktionsmix:

10 µl	Mastermix (QuantiTect SYBR Green PCR-Kit, Qiagen)
7 µl	H ₂ O (QuantiTect SYBR Green PCR-Kit, Qiagen)
0,5 µl	sense-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	antisense-Primer (10 pmol/µl)

In den Glaskapillaren wurden 2 µl cDNA vorgelegt und dann 7 µl Reaktionsmix hinzupipettiert. Von einer cDNA wurden zwei Ansätze angesetzt, der erste Ansatz mit den β-Aktin-Primern und der zweite mit den Primern des untersuchten Gens. β-Aktin wurde als Referenz für die Quantifizierung verwendet. Zur Berechnung der Standardkurve wurden zwei Verdünnungen von einer Probe angesetzt (1; $1/10$; $1/100$) und als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet.

Die Kapillaren wurden vorsichtig in das Karussell gesteckt und in der "LC-carousel" – Zentrifuge kurz abzentrifugiert. Nachdem das Karussell in den Lightcycler eingepaßt wurde, konnte die Reaktion gestartet werden. Die Amplifikationseffizienz (E) wurde mit der Formel $E=10^{-1/\text{Steigung der Standardkurve}}$ bestimmt und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die Reinheit der Produkte wurde über den Schmelzpunkt bestimmt.

Lightcyclerprogramm:

Denaturierung:	95°C	900 sec	1 Zyklus
Amplifikation:	95°C	15 sec	
	56°C	20 sec	45 Zyklen
	72°C	25 sec	
Schmelzkurve:	95°C	0 sec	1 Zyklus
	65°C	15 sec	
	95°C	0 sec	
Kühlen:	15°C		

3.4.2.9 Transiente Transfektionen von RAW264.7

Verwendete Reagenzien:

OPTIMEM1 mit Glutamin (GibcoBRL)
 Super Fect; Transfektionsreagenz (Qiagen)
 PBS
 Luciferase Assay System (Promega)

Am ersten Tag wurden pro Ansatz 500.000 RAW 264.7-Zellen in 2 ml RPMI incl 10 % FCS in ein Well eingesät (6-Well-Platte, Falcon). Am darauffolgenden Tag wurde die Transfektion durchgeführt. Dazu wurden 100 µl OPTMEM1 in einem sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt, zu denen 3 µl Reporterplasmid und 10 µl Super Fect dazugegeben und kurz gevortext. Bei Cotransfektionen wurden 2 µg Reporterplasmid und 1 µg Expressionsplasmid eingesetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei RT wurden 600 µl RPMI incl. 10 % FCS hinzugefügt, und der Ansatz wurde sofort vorsichtig auf die gewaschenen (2x mit 2 ml sterilem PBS auf RT) Zellen getropft. Die Zellen im Brutschrank für 3 h inkubiert und anschließend wurde

der Überstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischem RPMI incl. 10 % FCS überschichtet. Am dritten Tag wurden die Zellen stimuliert und anschließend geerntet. Beim Ernten wurden die Zellen gewaschen, mit 350 µl 1x Lysepuffer (cell culture lysis reagent; Luciferase Assay System) überschichtet und für 10 min bei RT unter Schütteln lysiert. Zur Vervollständigung der Lyse wurde der Überstand mit den Zellfragmenten ein mal auf Trockeneis gefroren und wieder aufgetaut. Danach wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, RT). Der Überstand wurde für den Luciferase-Assay benutzt. Zur Messung der Luciferaseaktivität im Luminometer wurden zu 20 µl Probe 100 µl LAR1 (Luciferasesubstrat; Luciferase Assay System) hinzugegeben, gemischt und die Enzymaktivität sofort gemessen. Die Luciferaseaktivitätswerte wurden auf die Proteinmenge im jeweiligen Lysat normiert, die über eine BCA-Preinbestimmung erhalten wurde.

3.4.2.10 Stabile Transfektionen von RAW264.7

Verwendete Reagenzien:

siehe 3.5.2.8
G418 (Neomycin)

Das Prinzip der stabilen Transfektion basiert auf der hohen Wahrscheinlichkeit, dass zugleich zu dem Resistenzgen (Neomycin)-tragendem Vektor pcDNA3.1 noch das Reporterplasmid in dieselbe Zellen transfiziert wird, da es in der doppelten Menge eingesetzt wird. Nach der Zugabe von G418 (Neomycin) starben alle Zellen, die nicht das Plasmid pcDNA3.1 und damit wahrscheinlich auch nicht das Reporterplasmid im Genom stabil eingebaut hatten.

Bei der stabilen Transfektion wurden am ersten Tag $2,5 \times 10^6$ Zellen in 10 ml RPMI incl. 10 % FCS pro Petrischale eingesetzt. Einen Tag später folgte die eigentliche Transfektion. Hierbei wurden 500 µl OPTIMEM1 in einem sterilem Gefäß vorgelegt und 15 µg linearisierte DNA (10 µg Reporterplasmid + 5 µg pcDNA3.1) und 50 µl Super Fect (vorher kurz vortexen) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurden 3 ml RPMI incl. 10 % FCS hinzupipettiert. Dieser Reaktionsansatz wurde vorsichtig auf die gewaschenen Zellen getropft und die Zellen für 3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 10 ml RPMI incl. 10 % FCS überschichtet. Am dritten Tag wurde das Medium durch ein Selektionsmedium ersetzt, das zusätzlich 350 µg/ml

G418 (Neomycin) enthält. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurde an jedem dritten Tag das Selektionsmedium ausgetauscht. Die wenigen überlebenden transfizierten Zellen ließ man zwei Wochen anwachsen. Für die Experimente wurden alle positiv transfizierten Zellen gepoolt, um durch die Transfektion auftretende Positionseffekte auszuschließen.

3.4.2.11 Genotypisierung von Mäusen

Eine Genotypisierung von Mäusen wurde durchgeführt, um TFEC^{-/-}, TFEC^{+/-} und TFEC^{+/+} Tiere zu unterscheiden. Hierfür wurde den Mäusen ein ca. 1,5 cm langes Gewebefragment vom Schwanzende mit einem Skalpell entfernt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Um die Tiere auseinanderzuhalten, wurden sie am Ohr durch Kerben markiert. Die DNA wurde aus dem Gewebe mit dem DNeasy Tissue Kit (Quiagen) extrahiert und in einer PCR amplifiziert. Pro Tier wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt. In der ersten wurde das Primerpaar Tfect1 und Tfect2 und in der zweiten das Primerpaar Tfect1 und Tfect3 verwendet. Abhängig bei welcher Reaktion es zu einer DNA-Amplifikation kam, konnte der Genotyp bestimmt werden:

Primerpaar	TFEC +/+	TFEC -/-	TFEC +/-
Tfect1 + Tfect2 (208 bp)	X	-	X
Tfect1 + Tfect3 (182 bp)	-	X	X

3.4.2.12 Kultivierung von Hefen

Verwendete Reagenzien:

YPD-Medium:	20 g (2 %) 10 g (1 %)	Pepton (Difco) Hefe Extract (Difco)
	ad 950 ml mit H ₂ O; pH 5,8 und 50 ml (2 %)	autoklavieren Sterile Dextrose (40 %)
YPD-Platten	18 g (1,8 %) 1000 ml YPD-Medium	Agar (Sigma)
SD-Medium:	20 g (2 %) 6,7 g (1 %)	Agar "Yeast Nitrogene gene base" (Difco)
	0,62 g (1,8 %) 100 mg (0.01 %) 20 mg (0,002 %) 20 mg (0,002 %)	CSM-His-Leu-Trp L-Leucin (Sigma) L-Histidin (Sigma) L-Tryptophan (Sigma)
	ad 950 ml mit H ₂ O; pH 5,8 und	autoklavieren Sterile Dextrose (40 %)

Selektionsmedien:	
SD-Leu-Medium:	SD-Medium ohne Leucin
SD-Trp-Medium:	SD-Medium ohne Tryptophan
SD-Leu-Trp-Medium:	SD-Medium ohne Leucin und Tryptophan

Die Kultivierung des Hefestammes Y190⁺ erfolgte im YPD-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf YPD-Agarplatten bei 30°C für 2-3 Tage. Zur Selektion von Hefen, die mit dem Plasmid pAS2-1 (trägt trp1-Selektionsmarker) transformiert wurden, wurde das SD-Trp-Medium verwendet. Hefen, die mit dem Plasmid pADGAL4.2 transformiert wurden, wurden durch das SD-Leu-Medium selektioniert. Eine Selektion von Hefen, die mit beiden Plasmiden cotransformiert wurden, erfolgte mit dem SD-Leu-His-Medium. Bei der Herstellung von Glycerinkulturen wurde die Hefesuspension mit 25 % Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert.

3.4.2.13 Präparation von kompetenten Hefen

Verwendete Reagenzien:

LiAc-Puffer (10x):	10,2 g (1M) ad 100 ml H ₂ O; pH 7,5; autoklavieren	Lithiumacetat
TE-Puffer (10x) :	1,21 g (0.1 M) 0,375 g (10 mM) ad 100 ml H ₂ O; autoklavieren	Tris/HCl; pH 7,5 EDTA
Li/TE- Puffer:	4 ml (1x) 4 ml (1x) ad 40 ml mit sterilem H ₂ O; autoklavieren	10x LiAc 10x TE
YPD-Medium	siehe 3.5.2.10	

Um die Hefen kompetent zu machen wurden am Abend des Vortages 30 ml YPD-Medium mit Y190⁺-Hefen angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die Hefen auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,3 verdünnt. Nachdem davon 200 ml auf einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 angewachsen waren, wurden sie abzentrifugiert (5 min, 2.200 rpm, RT) und das Pellet wurde zweimal mit 40 ml sterilem H₂O und zweimal mit 10 ml Li/TE-Puffer (ab hier Hefen nicht mehr vortexen, zum Resuspendieren nur pipettieren) gewaschen. Am Schluß wurde das Hefepellet in 1100 µl Li/TE-Puffer aufgenommen. Die kompetenten Hefen mussten sofort zur Transformation verwendet werden. Die Präparation erfolgte bei RT.

3.4.2.14 Transformation von Hefen

verwendete Reagenzien:

50 % PEG	50 g ad 10 ml mit sterilem H ₂ O, autoklavieren	PEG 4000
TE-Puffer (1x) :	1 ml (1x) ad 10 ml mit sterilem H ₂ O	10x TE (siehe 3.5.2.11)
Li/TE/PEG-Puffer:	300 µl (1x) 300 µl (1x) 2,4 ml (40 %)	10x TE 10x LiAc (siehe 3.5.2.11) 50 % PEG
Li/TE-Puffer:	(siehe 3.5.2.11)	
Carrier-DNA:	"Sonicated Salmon Sperm DNA", Stratagene	

Zur Transformation bei RT wurden pro Ansatz 10 µl Li/TE-Puffer, 5 µl denaturierte Carrier-DNA, 2 µg Plasmid-DNA und 50 µl kompetente Hefen zusammenpipettiert und ganz leicht gevortext. Nun wurden 300 µl Li/TE/PEG-Puffer hinzugegeben und die Lösung wiederum vorsichtig gevortext. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert (10 sec, 13.000 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl TE mit der Pipette resuspendiert und die Zellen abzentrifugiert (10 sec, 13.000rpm, RT). Der Überstand wurde bis auf 50 µl entfernt, in denen die Hefen resuspendiert wurden, die daraufhin auf der jeweiligen Selektionsplatte ausgestrichen wurden. Die ausgestrichenen Hefen wurden drei Tage bei 30°C inkubiert.

3.4.2.15 Yeast Two Hybrid-System

Verwendete Reagenzien:

Z-Puffer:	16,1 g 5,5 g 0,75 g 0,246 g ad 1000 ml mit sterilem H ₂ O, pH 7; autoklavieren	Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O KCl MgSO ₄ •7H ₂ O
X-GAL-Lösung:	200 mg Ad 10 ml DMF (N,N-Dimethylformamide) bei -20°C im Dunkeln lagern	X-GAL
Puffer Z/X-gal	100 ml 0,27 ml 1,67 ml	Z-Puffer β-Mercaptoethanol X-GAL-Lösung
Filterpapier :	75 mm-Filter für 100 mm-Platten 125 mm-Filter für 150 mm-Platten	

Das Prinzip des Yeast Two Hybrid-Systems basiert auf dem Fakt, dass viele eukaryotischen Transkriptionsfaktoren aus zwei physikalisch separaten und funktionell unabhängigen Domänen bestehen. Der GAL4-Transkriptionsfaktor in der Hefe besteht aus einer DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD). Die DNA-BD bindet die UAS („upstream activating sequence“), die im Promotor des lacZ- und His3-Gens liegt. Zur Initiierung der Transkription wird allerdings noch die AD benötigt, die mit weiteren Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagiert. In dem Yeast Two Hybrid-System bindet ein Protein X fusioniert mit der DNA-BD an die UAS, kann aber ohne eine AD die Transkription nicht aktivieren. Das Protein Y mit der AD fusioniert kann dies alleine ebensowenig. Interagieren aber beide Proteine (X und Y) kommt es zu einer Expression der Reportergene lacZ und His3 (siehe Abb. 6).

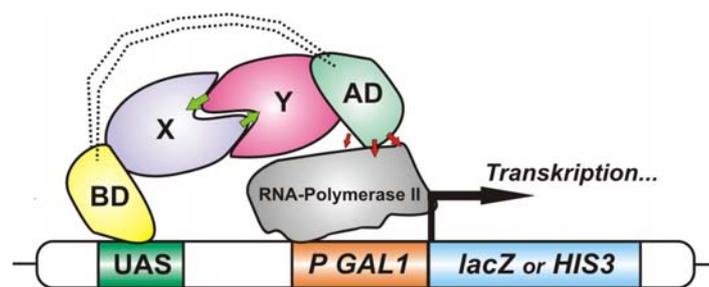


Abbildung 6: Schema über das Yeast Two Hybrid-Systems

Der Yeast Two Hybrid wurde nach dem Matchmaker Two Hybrid-System2 Protokoll von Clontech durchgeführt. In unserem Experiment war das Protein X die CH- und QB-Domäne des Transkriptionsfaktors Mitf, dessen Genfragment in den Vektor pAS2.1 kloniert wurde, der für die DNA-BD und für das Selektionsgen *trp1* codiert. Dieses Konstrukt wurde als „bait“ bezeichnet. Das Protein Y waren die murinen Proteine aus einer Mausgenom-Bank, dessen Genfragmente in den Vektor pACT2 kloniert wurden („prey“), der für die AD und für das Selektionsgen *leu2* codiert.

Zur Untersuchung, ob das bait schon alleine den Promotor des Reportergens aktivieren kann, wurde die ersten Kontrolltransformationen im Hefestamm Y190⁺ durchgeführt und auf den jeweiligen Selektionsplatten ausgestrichen (siehe Tabelle 5). Nach zwei Tagen wurde ein β -Galactosidase-Assay durchgeführt. Hierbei wurde ein Filter vorsichtig auf die Selektionsplatte mit den angewachsenen Kolonien gelegt

und wieder langsam abgezogen. Nachdem der Filter kurz in flüssigem Stickstoff gelegt und wieder trocken war, wurde dieser in dem Puffer Z/X-GAL gelegt und bei 30°C für einige Stunden inkubiert. Färben sich die Kolonien blau, dann wurde der Promotor des Reportergens lacZ aktiviert.

Ansatz	Plasmide	Selektionsmedium	
1.	pCL1	SD-Leu	Positivkontrolle
2.	pTD1 + pVA3	SD-Leu –Trp	Positivkontrolle
3.	pAS2.1	SD-Trp	Negativkontrolle
4.	bait	SD-Trp	
5.	bait + pGAD 424	SD-Leu-Trp	

Tabelle 5: Erste Kontrolltransformationen.

Falls das bait bei den Kontrolltransformationen negativ war, wurde das bait und prey in einem großen Transformationsansatz cotransformiert. Selektioniert wurde auf Leu, Trp und auch His, das hier als Reportergen diente. Durch die Selektion auf His konnte eine große Anzahl von interagierenden Proteinen untersucht werden. Die größten roten Kolonien wurden gepickt und auf SD-Leu-Trp-His-Platten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde mit den Kolonien ein β -Galactosidase-Assay durchgeführt. Von den positiven Transformanten wurde die DNA extrahiert und das prey sequenziert. Die Klone, deren Sequenzen im richtigen Leseraster waren, wurden für abschließende Kontrolltransformationen (siehe Tabelle 6) verwendet.

Ansatz	Plasmide	Selektionsmedium	
1.	pCL1	SD-Leu	Positivkontrolle
2.	pTD1+pVA3	SD-Leu-Trp	Positivkontrolle
3.	pAS2.1	SD-Trp	Negativkontrolle
4.	bait	SD-Trp	
5.	bait+pGAD 424	SD- Leu Trp	
6.	positive Klone	SD-Leu	
7.	positive Klone + bait	SD-Leu-Trp	
8.	positive Klone + pAS2.1	SD-Leu-Trp	
9.	positive Klone + drei unspezifische baits	SD-Leu-Trp	

Tabelle 6: Zweite Kontrolltransformationen.

3.4.2.16 Quantitativer α -Galactosidase-Assay

Verwendete Reagenzien:

PNP- α -Gal-Lösung:	30,1 mg (100 mM) ad 10 ml mit H ₂ O, filtersterilisieren (0,22 μ m Filter)	“p-nitrophenyl α -D-Galactopyranosid” (Sigma)
NaOAc (1x) :	4,1 g (0,5 M) ad 100 ml mit H ₂ O	NaOAc
Assay-Puffer:	1 ml (33,33 %) 2 ml (66,66 %)	PNP- α -Gal-Lösung 1x NaOAc
Stopplösung (10x):	10,6 g (1 M)	Na ₂ CO ₃

Dieser Assay ist eine sensitive Methode für die Detektion und Quantifizierung der extrazellulären Hefe- α -Galactosidaseaktivität, die durch die Expression des MEL1-Reportergens zustande kommt, das eine GAL4-abhängige UAS (upstream activating site) besitzt. Die pAS2-1 Plasmidkonstrukte tragen eine GAL4-DNA-Bindedomäne (BD) und zusätzlich ein Insert. Wenn das Insert einen aktivierenden Effekt hat, wirkt es mit der GAL4-DNA-BD als Transkriptionsfaktor und aktiviert MEL1.

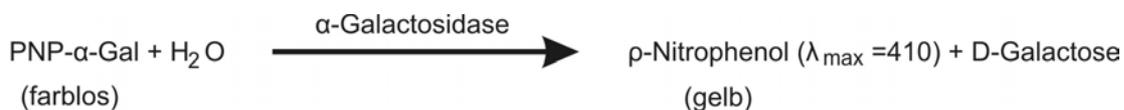


Abbildung 7: Reaktion beim quantitativen α -Galactosidase-Assay.

Bei dem quantitativen α -Galactosidase-Assay wurde am Vorabend mit pAS2-1-Konstrukten transformierte Hefen 5 ml Flüssigkulturen angeimpft. Für jeden Ansatz wurden Dreifachwerte angesetzt. Am nächsten Morgen wurden 10 ml Kultur auf einen OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt und auf eine OD₆₀₀ von 0,5-1,0 hochwachsen gelassen. Nach dem Abzentrifugieren der Hefen (3 min, 13.000 rpm, RT), wurde der Überstand abgenommen und bis zum Gebrauch bei RT gelagert. Für den Assay wurden je Ansatz 16 μ l vom Überstand und 48 μ l Assay-Puffer pro Well in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, bei 30°C für 60 min inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion, wurden 136 μ l 10x Stopplösung dazugegeben. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 404 nm gemessen.

3.4.3 Präparation und Analyse von RNA

3.4.3.1 RNA Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (1987)

Verwendete Reagenzien:

Diethylpyrocarbonat (DEPC)- Wasser:	500 µl DEPC (0,1 %); ad 500 ml mit H ₂ O; gut schütteln, über Nacht bei RT reagieren lassen und 2x autoklavieren	
Solution D:	47,2 g (4 M) 2,5 ml (25 mM) 1,67 ml (0,5 %) ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC}	Guanidinthiocyanat 1 M NaCitrat; pH 7,0 Sodium N-lauroylsarcosinat- Lösung
NaAcetat (2 M)	16,4 g (2 M) ad 50 ml mit H ₂ O _{DEPC} auf pH 4,0 mit Essigsäure (ca. 40ml) ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC}	NaAcetat (wasserfrei)
Phenol _{wassergesättigt, ungepuffert} :	frisches Phenol im Wasserbad schmelzen 0,1 g 60 ml H ₂ O _{DEPC} zugeben und schütteln, einen Tag absetzen lassen (Phenol sollte zu ¼ mit H ₂ O _{DEPC} überschichtet sein)	8-Hydroxychinolin
Chloroform-Isoamylalkohol: (49:1)	2 ml ad 100 ml mit Chloroform	Isoamylalkohol
Isopropanol:	bei 4°C lagern	
Ethanol (80 %):	80 ml ad 100 ml mit H ₂ O _{DEPC} (bei 4°)	Ethanol (100%)
Polypropylen-Röhrchen	Chloroform/Phenol-beständig	

Solution D wurde frisch mit 7 µl/ml Mercaptoethanol versetzt. Bei adhärenen Zellen wurde das Medium abgegossen und Solution D auf die Zellen gegeben (4 ml pro Schale (Ø 150 mm)). Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt, mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (0,9x40 mm) in ein steriles 14 ml Röhrchen überführt und durch mehrmaliges die Spritze ziehen homogenisiert. Nach dem Ansäuern des Lysats mit NaAcetat (2 M, pH 4) (0,1 ml pro 1ml Lysat) wurde es sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Nichtadhärente Zellen wurden abzentrifugiert und direkt mit der entsprechenden Menge Solution D versetzt. Anschließend wurden sie sofort mit einer Spritze wie oben homogenisiert.

Auf 1 ml Lysat wurde die gleiche Menge Phenol und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol pipettiert und die Lösung gut geschüttelt. (Es sollte sich eine milchige Suspension bilden, eventuell musste noch Chloroform zugegen werden). Die

Suspension wurde 15 min auf Eis gestellt, für 20 min mit 10.000 g bei 4°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase ohne Interphase abgenommen.

Der Überstand wurde mit dem gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt, kräftig geschüttelt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Zentrifugieren (20 min, 10.000 g, 4°C), wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde erneut in 0,6 ml Solution D gelöst und in ein RNase-freies 1,5 ml - Röhrchen überführt.

Das gelöste RNA-Pellet wurde nochmal mit dem gleichem Volumen Isopropanol aufgefüllt, kräftig geschüttelt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem Zentrifugieren (20 min, 10.000g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem Ethanol (80 %) gewaschen. Die Lagerung erfolgte gelöst in H₂O_{DEPC} bei -20°C oder in 100 % Ethanol bei -80°C (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Photometer vermessen (OD₂₆₀ =1 entspricht 40 µg/ml RNA). Die Reinheit der RNA wurde mit dem Verhältnis OD₂₆₀:OD₂₈₀ bestimmt und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.4.3.2 RNA-Extraktion mit dem RNeasy Kit

Bei den Maus-Knochenmarksmakrophagen wurde die RNA-Extraktion auch mit dem RNeasy Kit von Qiagen durchgeführt. Die adhärenen Knochenmarksmakrophagen wurden zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 5 ml PBS überschichtet. Nachdem die Gewebekulturschalen für 10 min auf Eis abgekühlt wurden, wurden die Zellen vorsichtig mit einem weichen Zellschaber abgelöst. Die Makrophagen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann in 4 ml Lysepuffer vom Kits aufgenommen. Die weitere Extraktion erfolgte laut Protokoll des Herstellers.

3.4.3.3 1 % Agarose-Gel für RNA

Verwendete Reagenzien:

MOPS (20x):	42 g (0,4 M) 4,1 g (100 mM) 3,7 g (20 mM) ad 500 ml mit H ₂ O _{DEPC} , dunkel lagern	MOPS/NaOH pH 7,0 NaAc EDTA
RNA-Ladepuffer:	10 ml (50 %) 3,5 ml (2,2M) 1 ml 0,8 ml (0,04 %) 0,2 g (1 %) ad 20 ml mit H ₂ O _{DEPC} , in 1 ml Portionen bei -20°C lagern, 5 µl/ml Ethidiumbromid vor Gebrauch zugeben	Formamid deionisiert 37 % Formalin 20x MOPS Bromphenolblau 1 % in H ₂ O Ficoll (in 2 ml H ₂ O gelöst)

Agarose	0,5 g	1,5 g
H ₂ O _{DEPC}	38 ml	115 ml
20 x MOPS	2,5 ml	7,5 ml
Formaldehyd	8,8 ml	26,5 ml
Endvolumen	50 ml	150 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung der RNA-Agarose-Gele.

Die Agarose wurde im 1xMOPS/H₂O_{DEPC}-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, und wieder auf 60°C abgekühlt. Dann wurde unter dem Abzug das Formaldehyd unter Rühren hinzugegeben und die Agaroselösung zügig in den Gel-Schlitten gegossen. Zu den RNA-Proben wurde der Ladepuffer pipettiert (1 Teil RNA Probe in H₂O_{DEPC} und 4 Teile RNA-Ladepuffer), die Proben 20 min bei 65°C denaturiert und danach kurz auf Eis abgekühlt. Nach dem kurzen Abzentrifugieren der Proben, wurden sie in die Probetaschen des mit 1x Laufpuffer überschichteten Gels geladen. Bei Probegelen wurde die Elektrophorese bei 40 V für 4-6 h, bei Gelen für Northern-Blots über Nacht bei 16 V durchgeführt.

3.4.3.4 Northern Blotting - RNA-Transfer

Verwendeter Reagenzien:

SSC (20x)	88 g (0,3 M)	Na ₃ Citrate•2H ₂ O / HCl; pH 7,0
	175 g (3 M)	NaCl
	ad 1000 ml mit H ₂ O; autoklavieren	

Nach der Gelelektrophorese des RNA-Gels erfolgte der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran. Die Nylonmembran (Magna NT, MSI) wurde auf Gelgröße zurechtgeschnitten, kurz mit H₂O benetzt und dann für 10 min in 20xSSC geschwenkt. Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben luftblasenfrei auf zwei Lagen mit 20xSSC getränktem Whatman 3MM Filterpapier gelegt, die sich auf einer Glasplatte befanden und deren Ende in den Puffer reichten. Die Membran wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und an den Rändern mit Kunststoffstreifen abgedichtet, damit der Puffer nicht neben dem Gel nach oben gesaugt werden konnte. Nach zusätzlichen zwei Lagen mit 20xSSC getränktem Filterpapier, wurde ein etwa 10 cm hoher Stapel Zellstoff aufgelegt und der Aufbau leicht beschwert (Sambrook et al., 1989).

Die Vollständigkeit des Transfers wurde unter UV-Licht kontrolliert, anschließend wurde der Blot UV (120 mj/cm², bei 254 nm) „crossgelinkt“, fotografiert und zum Schluß getrocknet.

3.4.3.5 Hybridisierung von Northern Blots

Verwendete Reagenzien:

Hybridisierungslösung:	ULTRAhyb™-Hybridisierungslösung (Ambion, Austin, USA)	
niedrig stringenter Waschpuffer 1:	50 ml (2x) 2,5 ml (0,1 %) ad 500 ml mit H ₂ O	20x SSC 20 % SDS
hoch stringenter Waschpuffer 2:	2,5 ml (0,1 %) 2,5 ml (0,1 %) ad 500 ml mit H ₂ O	20x SSC 20 % SDS

Die Northern Blot Membran wurde 4 h bei 42°C in Hybridisierungs-Röhren mit der UltraHyb-Hybridisierungs-Lösung (15-25 ml) prähybridisiert. Anschließend wurde die ³²P-markierte cDNA-Sonde (100.000 cpm/ml; cDNA wurde von Hartmann Analytic (Braunschweig) gelabelt) dazugegeben und hybridisierte über Nacht.

Nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung wurde die Membran mit 30 ml Waschpuffer 1 abgepült, dann zweimal mit diesem Puffer (30 ml) für 5 min bei 32 °C und danach zweimal für 15 min mit dem Waschpuffer 2 (30 ml) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde die Radioaktivität der Membran mit einem Handmonitor gemessen. Bei geringer Strahlung (0-0,3 Bq/cm²) wurde der Waschvorgang beendet oder bei zu hoher Strahlung die Temperatur etwas erhöht.

Für die Autoradiographie wurden die Membranen im feuchtem Zustand in Frischhaltefolie eingewickelt, in der Röntgenkassette mit Screen (Amersham) fixiert und bei RT exponiert (für ³²P-markierte Sonden über Nacht bis zu 7 Tage).

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Gesamtzelllysate von BMM

Verwendete Reagenzien:

PBS		
SDS-Probenpuffer PP (2x):	10 ml (20 %) 5 ml (125 mM) 2 g (4 %) 5 ml (10 %) 10 mg (0,02 %) ad 50 ml mit H ₂ O	Glycerin 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8 SDS 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau

Die Gewebekulturschalen mit den BMMs wurden zur Bearbeitung auf Eis gestellt und mit PBS gewaschen. Nach dem vollständigen Entfernen des PBS wurden 700 µl 1xSDS-Probenpuffer (2x PP mit aqua bidest 1:1 verdünnt) auf 10 x 10⁶ Zellen

gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden sie 5 min bei 95°C lysiert, 30 sec gevortext und wieder 5 min bei 95°C aufgeköcht. Das Gesamtzelllysate wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Für einen Western Blot wurden die Lysate aufgetaut und vor der Beladung des Gels noch einmal 5 min bei 95°C denaturiert. Für ein kleines Gel (Minigel) wurden 20 µl des Zelllysates pro Spur aufgetragen.

3.5.2 Proteinexpression in *E.Coli* und Proteinaufreinigung

Verwendete Reagenzien:

2x YTA ^{Amp} -Medium:	16 g (1,6 %) 10 g (1 %) 5 g (0,5 %) ad 1000 ml mit H ₂ O; pH 7,0 1 ml (100 µg/ml)	Trypton Hefe Extrakt NaCl Ampicillin (100 mg/ml)
Glutathion-Elutionspuffer:	0,154 g ad 50 ml mit 50 mM Tris/HCl; pH 8	Glutathion
Thrombin-Lösung:	500 U ad 500 µl mit PBS (4°C); Aliquots wurden bei -70°C gelagert.	Thrombin
IPTG (100 mM):	238 mg ad 10 ml mit H ₂ O	IPTG
PMSF (100 mM):	1,74 g ad 10 ml mit Isopropanol	PMSF (Phenylmethylsulfonsäure)

75 % Glutathion-Sepharose 4B (Amersham)

Poly-Prep Chromatographie-Säulen (BioRad)

Proteinexpression:

Zur Herstellung des Fusionsproteins GST-cTFEC, mit dem eine Immunisierung vorgenommen wurde, wurde der Klonierungsvektor pGEX-KG benutzt, da er zwischen der GST-Sequenz und der „multiple cloning site“ eine Thrombin-Schnittstelle besitzt, durch die das GST-Protein von dem zu exprimierenden Peptid abgespalten werden kann. Eine Glycin-reiche Sequenz (PGISGGGG), die unmittelbar unterhalb der Thrombin-Schnittstelle liegt, erhöht sehr stark die Effizienz der Thrombin-Spaltung (Guan und Dixon, 1991). Das GST-Protein ist stark immunogen und wurde zur Aufreinigung des Fusionsproteins benutzt. Das c-terminale Ende von mTFEC wurden mit den Primern TFEC-GEX-S und TFEC-GEX-AS aus dem pGL2-mTFEC- Vektor amplifiziert und in den Vektor pGEX-KG kloniert

(pGEX-KG-cTFEC). Nach der Klonierung wurde das Plasmidkonstrukt in DH-10 β -Bakterien transformiert und mit 100 ml einer Über-Nacht-Kultur 1000 ml 2xYTA^{Amp} angeimpft. Nachdem die Bakterienkultur einen OD₆₀₀ von 1,3 erreicht hatte, wurde 1 ml 100 mM IPTG hinzugefügt und die Bakterienkultur für weitere 3 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (20 min, 3.500 g, 4°C). Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem PBS incl. 500 μ l 100 mM PMSF (1 mM Endkonzentration) resuspendiert. Die Zellen wurden mit einem Sonicator (Bandelin, Berlin) unter Kühlung in kurzen Impulsen so lange bearbeitet, bis sie vollständig lysiert waren. Das Lysat wurde mit 2,5 ml 20 % Triton-X 100 (1 % Endkonzentration) versetzt und 30 min bei 4°C leicht geschwenkt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 12.000 g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

Proteinaufreinigung:

Zur Proteinaufreinigung wurden 0,665 ml 75 % Glutathion-Sepharose 4B in die Chromatographie-Säulen gefüllt. Nach dem Absetzen der Sepharose, wurde diese mit 5 ml PBS (4°C) gewaschen. Das Bakterienlysate wurde auf die Säule gegeben, die anschließend dreimal mit 5 ml PBS gewaschen wurde. Danach wurde die untere Öffnung wieder verschlossen und die Säule mit 0,5 ml Glutathion-Elutions-Puffer für 10 min bei RT inkubiert. Nun wurde die Säule wieder geöffnet und 100 μ l Fraktionen abgenommen. Der Elutionsschritt wurde noch zweimal wiederholt. Aliquots der Fraktionen wurden in einem SDS-Gel kontrolliert, das mit Coomassie Blau angefärbt wurde. Die Fraktionen mit höherer Proteinkonzentration wurden gepoolt und der Proteingehalt mittels Bradfordmethode mit dem Bio-Rad Protein Assay-Kit bestimmt. Das GST-Fusionsprotein konnte an einer Thrombin-Schnittstelle, die hinter dem GST lag, gespalten werden. Hierbei wurde 1 mg Protein mit 10 U Thrombin bei RT für 1h inkubiert. Das GST-Fusionsprotein und das von GST abgespaltene Protein wurde für die Immunisierung von Kanninchen und für die Antikörperaufreinigung benutzt.

3.5.3 *In-vitro*-Translation von Proteinen

Eine cDNA wurde in einen Expressionsvektor mit einem T7 oder T3-Promoter kloniert. Mit Hilfe des "TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems" von Promega konnte diese cDNA *in-vitro* translatiert werden. Die Durchführung erfolgt laut Protokoll des Herstellers.

3.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA

Verwendete Reagenzien:

Working Reagent	50 Teile Bicinchoninic-acid (BCA) (Sigma) 1 Teil $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in H_2O (w/v) (Sigma) frisch ansetzen, ca. 2 Tage stabil
Proteinstandard	BSA, 6 Konzentrationen von 200 - 1200 $\mu\text{g/ml}$; stufenweise Erhöhung um 200 $\mu\text{g/ml}$

Von jeder Proteinprobe wurde eine Doppelbestimmung in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Pro Well wurden 10 μl der Proteinprobe bzw. des Proteinstandards und 200 μl Working Reagent pipettiert. Danach wurde die Platte 30 sec. geschüttelt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Extinktion (OD) des violettfarbenen BCA-Komplexes bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Standardgeraden berechnet (Smith *et al.*, 1985).

3.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Page

Verwendete Reagenzien:

Acrylamid-Stammlösung AA (30 %):	146 g 4,0 g (% C = 2,67) alternativ für Silbergele: PDA 5,0 g ad 500 ml mit H_2O	Acrylamid BIS (Bisacrylamid, BIORAD) als Crosslinker PDA (Piperazine Diacrylamid, BIORAD)
Untergelpuffer:	90,83 g (1,5 M) ad 500 ml mit H_2O	Tris/HCl; pH 8,8
Obergelpuffer:	30 g (0,5 M) ad 500 ml mit H_2O	Tris/HCl; pH 6,8
SDS-Stammlösung:	10 g (10 %) ad 100 ml mit H_2O	SDS
Trispuffer (TP):	13 g (1,25 M) ad 100 ml mit H_2O	Tri/HCl; pH 6,8
SDS-Probenpuffer (PP) (2x):	10 ml (20 %) 5 ml (125 mM) 2 g (4 %) 5 ml (10 %) 10 mg (0,02 %) ad 50 ml mit H_2O	Glycerin 1,25 M TP SDS 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	100 mg (10 %) ad 1 ml mit H_2O ; frisch ansetzen	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x):	15 g (40 mM) 216 g (0,95 M)	Tris Glycin

15 g (0,5 %)
ad 3000 ml mit H₂O

SDS

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Serva

Gel-Stammlösungen	Untergele				Obergel
	7,5 %	10 %	12 %	15 %	
Obergelpuffer					5 %
Untergelpuffer	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml	25 ml
SDS (10 %)	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
AA (30 %)	25 ml	33 ml	40 ml	50 ml	16,65 ml
H ₂ O	ad 100 ml				

Tabelle 9: Zusammensetzung der Unter- und Obergelstammlösungen.

	Untergel	Obergel
Stammlösung	10 ml	5 ml
TEMED	10 µl	5 µl
APS (10 %)	50 µl	40 µl

Tabelle 10: Pipettierschema für Unter- und Obergele.

Um eine vollständige Polymerisation des Untergels (Trenngels) zu gewährleisten, wurde dieses am Tag vor der Elektrophorese hergestellt. Für ein Maxigel wurden dabei 12 ml und für ein Minigel 5 ml Stammlösung benötigt. Das gegossene Gel wurde mit wenigen Tropfen wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und 30 min bei RT stehen gelassen. Nach der Polymerisation des Untergels wurde das Isobutanol abgegossen, das Gel mit H₂O gewaschen, mit verdünntem Untergelpuffer (1:3) überschichtet und zum vollständigen Auspolymerisieren über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurde der Untergelpuffer entfernt, das Obergel gegossen und der Kamm eingesteckt. Nach der Polymerisation des Gels (mindestens 30 min) wurde das fertige Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit Elektrodenpuffer (Laemmli-Puffer (5x) 1:5 verdünnt) befüllt. Die Proben wurden mit SDS-PP (2x) im Verhältnis 1:1 vermischt, 5 min auf 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 18 mA pro Gel bei der kleinen Kammer oder 25 mA pro Gel bei der großen Kammer für 60 bzw. 180 min (Shapiro et al., 1967, Laemmli et al., 1970).

3.5.6 Western-Blotting (Semi-dry-Technik)

Verwendete Pufferlösungen:

Anodenpuffer A :	36,3 g (0,3 M) 200 ml (20 %) ad 1000 ml mit H ₂ O	Tris ; pH 10,4 Methanol
Anodenpuffer B :	3.03 g (25 mM) 200 ml ad 1000 ml mit H ₂ O	Tris; pH 10,4 Methanol
Anodenpuffer C :	5,20 g (4 mM) 200 ml (20 %) ad 1000 ml mit H ₂ O	ε-Amino-n-Caprone Säure; pH 7,6 Methanol

Zur Immobilisierung von Proteinen aus SDS-Gelen wurden diese durch elektrophoretischen Transfer im Semi-dry-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) geblottet. Jeweils drei Lagen Whatman 3mm Filterpapiere (Millipore) wurden in die drei Anodenpuffer eingelegt. Danach wurde die Membran auf Gelgröße ausgeschnitten und benetzt. PVDF-Membranen wurden zuerst kurz mit Methanol und dann in Blotpuffer B geschwenkt; Nitrocellulose-Membranen wurden nur mit Blotpuffer B angefeuchtet. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen, und nach Entfernung des Obergels kurz in Blotpuffer B geschwenkt. Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2 \text{ Gelfläche}$ für die Dauer von 45 min (Towbin *et al.*, 1979).

Kathode
3 Lagen Filterpapier inPuffer C getränkt
Gel
Membran
3 Lagen Filterpapier inPuffer B getränkt
3 Lagen Filterpapier inPuffer A getränkt
Anode

Abbildung 7: Aufbau eines Western Blots.

3.5.7 Nachweis und Charakterisierung von Proteinen

3.5.7.1 Coomassiefärbung von Proteinen in Gelen

Verwendete Lösung:

Bio-Safe™ Coomassie (BioRad, München)

Nachdem die SDS-Gele dreimal für 5 min mit 200 ml dest. H₂O gewaschen wurden, wurden die Proteine unter Schütteln mit 50 ml Coomassielösung angefärbt. Nach ca. 1 h wurde die Färbelösung abgesaugt und durch dest. H₂O ersetzt, mit dem das SDS-Gel über Nacht entfärbt wurde. Durch die Färbung wurden die Proteine als blaue Banden auf hellem Hintergrund sichtbar.

3.5.7.2 Immunfärbung von Proteinblots

Verwendete Lösungen:

TBS (2x):	9,7 g (40 mM) 35,1 g (300 mM) ad 2000 ml mit H ₂ O	Tris/HCl; pH 7,4 NaCl
Waschlösung (TBST):	1000 ml 2 ml (0,1 %) ad 2000 ml mit H ₂ O	TBS (2x) Tween-20
Blockierungs-Lösung:	5,0 g (5 %) 100 ml	BSA TBST
Antikörper:	primärer Antikörper in 5 % BSA (5,0 g BSA in 100 ml TBST); sekundärer Antikörper (im ECF Western blotting reagent packs Kit enthalten) in TBST	
Substrat:	ECF-Substrat (ECF Western blotting reagent packs; Amersham)	

Die Membranen wurden nach dem elektrophoretischen Transfer über Nacht bei 4°C in TBST gelagert. Nach dem Abnehmen des Waschpuffers wurde die Membran unter Schwenken bei RT für 30 min in der Blockierungs-Lösung inkubiert, danach dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1h bei RT mit dem primären Antikörper (anti-mTFEC; Verdünnung 1:100) gefärbt. Anschließend wurde die Membran ein zweites Mal gewaschen und dann eine weitere Stunde mit dem sekundären Antikörper (Goat anti-rabbit, AP-gekoppelt; Verdünnung 1:1000) inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurde zur Visualisierung das ECF-Substrat nach Vorschrift des Herstellers benutzt.

3.5.8 Herstellung von Zellkernextrakten

Verwendete Reagenzien:

frisch ansetzen und auf Eis arbeiten

Puffer A (hypotonisch)	100 µl (10 mM)	1 M HEPES; pH 7,9
	15 µl (1,5 mM)	1 M MgCl ₂
	100 µl (10 mM)	2 M KCl
	50 µl (0,5 mM)	100 mM DTT
	10 µl (20 µg/ml)	10 µg/µl Antipain
	40 µl (80 µg/ml)	20 µg/µl Chymostatin
	5 µl (10 µg/ml)	20 µg/µl E 46
	25 µl (2,5 µg/µl)	1 µg/µl Leupeptin
	10 µl (1 µg/µl)	1 µg/µl Pepstatin
	10 µl (2 µg/µl)	2 µg/µl Aprotinin
	100 µl (1 mM)	100 mM PMSF
	100 µl (1 mM)	100 mM Natrium-o-vanadate
	ad 10 ml mit H ₂ O;	
	DTT, Proteasen und Phosphatase-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugegeben.	
Puffer B (hypotonisch)	900 µl	Puffer A
	100 µl	NP-40 (0,4-1 %)
Puffer C (hypertonisch)	20 µl (20 mM)	1 M HEPES, pH 7,9
	84 µl (420 mM)	5 M NaCl
	310 µl (25 %)	80% Glycerol
	1,5 µl (1,5 mM)	1 M MgCl ₂
	0,4 µl (0,2 mM)	0,5 M EDTA , pH 8,0
	5 µl (0,5 mM)	100 mM DTT
	2,5 µl (50 µg/ml)	20 µg/µl Antipain
	8 µl (160 µg/ml)	20 µg/µl Chymostatin
	1 µl (20 µg/ml)	20µg/µl E 46
	5 µl (5,0 µg/ml)	1 µg/µl Leupeptin
	1 µl (1 µg/ml)	1 µg/µl Pepstatin
	5 µl (0,5 mg/ml)	100 µg/µl Pefabloc SC
	1 µl (2 µg/ml)	2 µg/µl Aprotinin
	10 µl (1,0 mM)	100 mM PMSF
	10 µl (1,0 mM)	100 mM Sodium-o-vanadate

Das Prinzip der Zellkernextraktion beruhte auf einem hypotonischen bzw. hypertonen Effekt der verschiedenen Puffer. Der erste Puffer A ist hypotonisch und bewirkt ein Aufblähen der Zellen. Der Puffer B lysiert die Zellmembran, lässt aber die Kernmembran intakt, und der letzte Puffer C hat hypertone Eigenschaften, so dass der lösliche Kerninhalt über osmotischen und durch hohe Zentrifugalkraft ausgelösten Druck aus dem Zellkern gepresst wird.

Mindestens 10×10^6 Zellen wurden geerntet und zweimal mit 20 ml eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in Puffer A resuspendiert (1 ml/ $1-2 \times 10^7$ Zellen) und in Eppendorfgefäße transferiert (0,5-1 ml/Gefäß). Nachdem die Zellsuspension 3 min auf Eis inkubiert wurde, wurden die Zellen abzentrifugiert (6

min, 2.500 rpm, 0°C) und das Zellpellet wurde in 150-200 µl Puffer A resuspendiert. Die gleiche Menge an Puffer B wurde hinzugegeben und die Suspension wurde kurz gevortext. Während die Zellen für 5-15 min auf Eis inkubiert wurden, wurde die Reaktion unter dem Mikroskop beobachtet. Die Inkubation wurde gestoppt, wenn die meisten der Zellkerne freigesetzt waren. Daraufhin wurden die Zellkerne für 6 min bei 2.500 rpm und -9°C abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der Zellkerne in 30-60 µl Puffer C (ungefähr gleiches Volumen wie Pellet), folgte eine Inkubation auf Eis für 10-15 min und ein letzter Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm, -9°C). Die löslichen Kernbestandteile wurde abgenommen und in Aliquots bei -70 °C gelagert.

3.5.9 “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)

Verwendete Reagenzien:

10 x Elektrophoresepuffer, TGE (pH 8,3):	15,14 g (250 mM) 72,07 g (1,92 M) 2 ml (2 mM) ad 500 ml mit H ₂ O	Tris Glycerin 500 mM EDTA; pH 8,0
10x Gelpuffer:	90,8 g (1,5 M) In 1 ml H ₂ O gelöst	Tris/HCl; pH 8,8
Acrylamid-Stammlösung (AA):	40 % Acrylamid (Roche)	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED (Serva)		
Ammoniumperoxodisulfa, APS:	100 mg (10 %) NH ₄ (S ₂ O ₈) in 1 ml H ₂ O gelöst (frisch ansetzen)	
Nukleotidmischung:	1 µl pro 100 mM Nukleotid (1 mM/Nukleotid) 97 µl H ₂ O	
(α- ³² P) dXTP:	50 µCi (3.000 µCi/mmol) Amersham, Braunschweig X= radio-markiertes Nukleotid (dGTP, dCTP, dTTP oder ATP)	
NICK-Säulen:	Sephadex G50 Größenausschluß-Säulen, Pharmacia, Freiburg	
Poly (dl/dC):	Poly(dl/dC) (1 µg/µl)	
5 % Essigsäure		
10x Bindungspuffer: (frisch ansetzen)	20 µl (200 mM) 2 µl (20 mM) 30 µl (600 mM) 10 µl (10 mM) 2 µl (10 mM) Ad 100 µl mit H ₂ O (36 µl)	1M HEPES; pH 7,9 1 M MgCl ₂ 2M KCl 100 mM DTT 500 mM EDTA; pH 8,0

Am Vortag wurde ein 8 %-iges TGE-Gel (siehe Tabelle 9) gegossen, so dass es über Nacht bei 4 °C vollständig auspolymerisieren konnte. Am nächsten Tag wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Elektrodenpuffer (0,5 x TBE) hinzugefügt. Danach wurden die vorbereiteten Proben in die Geltaschen geladen.

Endkonzentration an AA	8 %
AA-Stammlösung (30 %)	4 ml
Gelpuffer (10 %)	1,5 ml
Glycerin (50 %)	0,75 ml
TEMED	15 µl
APS	75 µl
H ₂ O	8,66 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung des 8 %igen TGE-Gels.

Probenvorbereitung:

Eine doppelsträngige DNA-Sonde wurde hergestellt, indem 100 pmol komplementäre einzelsträngige synthetische Oligonukleotide (sense/antisense, 5'-Überhang von 3-6 bp) in 20 µl H₂O annealed wurden. Dazu wurde der Ansatz für 10 min 10-15°C über dem kalkulierten Schmelzpunkt des doppelsträngigen Oligonukleotides erhitzt und für 45-60 min bei 5 °C unter dem Schmelzpunkt annealed und wieder auf RT abgekühlt, um 5 µM (5 pmol/µl) doppelsträngiges Oligonukleotid zu erhalten.

Die doppelsträngige Sonde wurde mit ³²P mit folgendem Ansatz end-gelabelt:

2 µl	10x Klenowpuffer (InViTek, Berlin)
1 µl	doppelsträngiges Oligonukleotid (5 pmol/µl)
1 µl	dNTP - dXTP (1 mM/Nukleotid)
5 µl	dXTP (α- ³² P)
1 µl	Klenow-Enzym (2 U/µl)
10 µl	H ₂ O

Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt und das Volumen mit 30 µl TE auf 50 µl gebracht. Die radioaktiv-markierte Sonde wurde auf die mit TE äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach dem Einspülen der Sonde mit 350 µl TE erfolgte die Elution mit 1 ml TE, wobei 3-Tropfen-Fractionen abgesammelt wurden. Die drei Fractionen mit der größten Radioaktivität wurden gepoolt und bei -20°C gelagert.

Für den EMSA wurde folgender Reaktionsmix pipettiert:

Reaktionsmix:

1,5 µl (12 %)	80 % Glycerin
1 µl (1x)	10x Bindungspuffer
0,5 µl (0,05 µg/µl)	1 µg/µl poly d(I/C)
1,5 µl	ca. 25 fmol/µ radioaktiv-markierte Sonde
1 µl	Kompetitor, 200-facher Überschuß (optional)
1 µl	ca. 5 µg/µl Zellkernextrakt
1 µl	200 µg/0,1 ml Antikörper (optional)
	ad 10 µl mit H ₂ O

Bei den Ansätzen wurden zuletzt die Kernextrakte vorsichtig untergemischt. Der Reaktionsmix wurde bei RT bei 20 min inkubiert. Für Supershifts wurde danach der Antikörper (1 µl) gegen das zu untersuchende DNA-bindende Protein zum Schluß hinzupipettiert und der Reaktionsmix weitere 15 min bei RT inkubiert. Nun konnten die Proben geladen werden. In die erste Tasche wurden 5 µl 0,02 % Bromphenolblau-Lösung geladen, um die Position der ungebundenen Sonde an der Lauffront zu verfolgen. Das Gel lief für 2-3 h bei 180 V. Noch bevor die Lauffront des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Lauf beendet, das Gel in 5 % Essigsäure für 10 min fixiert, auf ein Whatman 3MM Filterpapier gelegt und unter Vakuum für 1 h bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde über Nacht bei RT ohne intensivierenden Screen autoradiografiert.

3.5.10 Immunpräzipitation

Verwendete Reagenzien:

TBS (1x):	9,16 g (20 mM) 35,1 g (150 mM) ad 4000 ml mit H ₂ O	Tris/HCl; pH 7,4 NaCl
Lysepuffer:	0,5 ml (1 %) 0,5 g (1 %) 0,5 ml (1 %) 49 ml bei 4°C lagern	Triton X-100 BSA PMSF 1x TBS
Verdünnungspuffer:	0,25 ml (0,1 %) 0,25 g (0,1 %) 248,5 ml bei 4°C lagern	Triton X-100 BSA 1x TBS
Trispuffer:	3 g (0,05 M) ad 500 ml H ₂ O	Tris/HCl; pH 6,8
Protein G-Sepharose (Amersham, Freiburg)		

Ein 1,5 ml Eppendorfgefäß wurde mit Lysepuffer gefüllt, 10 min bei RT inkubiert und danach wieder vollständig entleert. Nun wurden 5 µl *in-vitro* translatiertes Protein, 195 µl Verdünnungspuffer und 2 µl Serum bzw. Präimmunserum in dieses Eppendorfgefäß pipettiert und die Lösung für 90 min bei 4°C in einem Rotierer inkubiert. Anschließend wurde 10 µl Protein G-Sepharose 1:1 mit Verdünnungspuffer verdünnt und zu dem Reaktionsmix pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation (90 min, 4°C, im Rotierer) wurde die Sepharose gewaschen: 4x mit 1 ml Verdünnungspuffer, 2x mit 1 ml TBS (1x) und 1x mit 1 ml 0,05 M Tris/HCl (zwischen den Waschsritten wurde die Sepharose für 1 min, bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Für einen Western Blot wurde das Pellet aufgetaut, in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer (siehe 3.4.5) aufgenommen (nicht vortexen) und 5 min bei 95°C unter starkem Schwenken erhitzt. Nach einem kurzen Abkühlen auf Eis, wurde die Probe gut gevortext und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf das SDS-Gel geladen.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung eines polyklonalen Serums wurden 2 Kaninchen mit 0,5 mg in: 39,92 µl Glutathion Elutionspuffer (siehe 3.4.2) eines GST-Fusionsproteins dreimal im Abstand von 4 Wochen immunisiert (Davids Biotechnologie, Regensburg). Als Kontrollserum für spätere Versuch wurde vor der Immunisierung Serum abgenommen (Präimmunserum).

3.6.2 Aufreinigung von Antikörpern über Chromatographie

3.6.2.1 Bindung des Liganden an die Säule

Verwendete Reagenzien:

HCl-Lösung:	115 µl (1mM) ad 1 ml mit H ₂ O	8,7 M HCl
Puffer A:	3,05 ml (0,5 M) 2,93 g (0,5 M) ad 100 ml mit H ₂ O; pH 8,3	Ethanolamin NaCl
Puffer B:	0,602 ml (0,1 M) 2,93 g (0,5 M)	16,6 M HAc NaCl

	ad 100 ml mit H ₂ O; pH 4	
Lagerungspuffer:	0,35 g (0,05 M) 1 ml (0,2 %) ad 50 ml mit H ₂ O; pH 7	Na ₂ HPO ₄ 10 % NaN ₃
Ligand:	0,5-10 mg/ml (GST und GST-Fusionsprotein)	
Alle Puffer und das Serum wurden mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert.		
Säulen:	HiTrap affinity columns, NHS-activated, 1 ml (Amersham)	

Der obere Deckel der Chromatographiesäule wurde entfernt und aufbewahrt. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde ein Tropfen eiskalte 1 mM HCl-Lösung auf die obere Öffnung der Säule gegeben, so dass die obere Fläche vollständig benetzt war. Danach musste die Säule mit einem Spritzenadapter verschlossen und der untere Verschluss entfernt werden. Mit einer 2 ml Spritze, die an dem Adapter befestigt wurde, wurde das Isopropanol der Säule dreimal mit 2 ml 1 mM HCl (4°C) ausgewaschen. Anschließend wurde die Säule sofort mit 1 ml Ligandenlösung beladen und verschlossen. Nach einer Inkubation von 15-30 min bei 25 °C oder 4 h bei 4°C konnte das Waschen und Deaktivieren beginnen. Hierbei wurde die beladene Säule jeweils dreimal mit 2 ml Puffer A, 2 ml Puffer B und 2 ml Puffer A gewaschen und dann 15-30 min bei RT stehen gelassen, wobei die untere Öffnung der Säule verschlossen wurde. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, danach wurde die Säule mit 2 ml PBS (Puffer mit neutralem pH-Wert) gewaschen. Nun konnte die mit dem Liganden beladene Säule mit der Lagerungslösung gefüllt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert werden.

3.6.2.2 Aufreinigung des Antikörpers

Verwendete Reagenzien:

gesättigte Ammonium-sulfatlösung:	76 g (5,8 M) ad 100 ml mit H ₂ O, unter Rühren bis unter den Siedepunkt erhitzen, über Nacht bei RT stehen lassen und bei RT lagern	Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄
HCl:	11,5 µl (1 mM) ad 100 ml mit H ₂ O	8,7 M HCl
Elutionspuffer A:	0,75 g (100 mM) ad 100 ml mit H ₂ O; pH 2,5	Glycin
Elutionspuffer B:	0,61 ml (100 mM) ad 100 ml mit H ₂ O; pH 11,5	Ethanolamin
Lagerungspuffer:	0,35 g (0,05 M) 1 ml (0,2 %) ad 50 ml mit H ₂ O; pH 7	Na ₂ HPO ₄ 10 % NaN ₃

Tris-Puffer (1 M):	12,1 g (1 M) ad 100 ml mit H ₂ O; pH 8,8	Tris/HCl
BSA-Puffer:	5 mg (0,5 %) ad 1 ml mit H ₂ O	BSA (Albumin, bovin)
Tris-Puffer (50 mM):	0,6 g (50 mM) ad 100 ml mit H ₂ O; pH 8,8	Tris/HCl

Alle Puffer und das Serum wurden mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

Ammoniumsulfatfällung:

Zuerst musste das polyklonale Serum mit Ammoniumsulfat gefällt werden. 5 ml polyklonales Serum wurde bei 4°C für 30 min bei 3.000 g zentrifugiert. Zu dem abgenommenen Überstand wurde 5 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung tröpfchenweise unter Schwenken hinzugegeben und 1 h bei 4°C auf dem Rotierer inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (15 min, 3.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 1.250 µl PBS aufgenommen.

Zur Entfernung des noch vorhandenen NH₂SO₄ wurde das Serum gegen PBS dialysiert und mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

1. Abtrennung GST-spezifischer Antikörper

Mit Hilfe der ersten Chromatographie wurden die GST-Antikörper aus dem polyklonalem Serum entfernt.

Die ligandenbeladene Säule wurde mit dem Schlauchsystem an die Pumpe angeschlossen und mit 3 ml PBS und 3 ml Elutionspuffer gewaschen. Nach erfolgter Equilibrierung mit 10 ml PBS wurde die Säule langsam mittels einer Spritze mit dem polyklonalem Serum beladen. Um sicher zu gehen, dass alle GST-Antikörper des Serums an den Ligand gebunden haben, wurde der Durchfluß zweimal durch die Säule geleitet. Bei einer Durchflußrate von 0,25 ml/min dauerte dieser Vorgang ca. 40 min. Danach wurde die Säule mit 3 ml PBS gewaschen, um den Rest aus der Säule und dem Schlauchsystem zu erfassen. Der Durchfluß einschließlich dieser 3 ml PBS (Serum) wurde mit 0,02 % NaAzid versetzt und bei 4°C gelagert. Die gebundenen GST-Antikörper wurden mit 3 ml 100 mM Glycin und mit 3 ml 100 mM Ehanolamin eluiert. Zum Schluß musste die Säule mit dem Lagerungspuffer gefüllt und bei 4 °C gelagert werden.

2. Affinitätsreinigung TFEC-spezifischer Antikörper

Die GST-TFEC-beladene Säule wurde an die Pumpe angeschlossen und mit 5 ml PBS, 5 ml 100 mM Glycin und 10 ml PBS gewaschen. Nun wurde die Säule mit dem vorgereinigten polyklonalem Serum (Durchfluß von GST-Säule) 1 h beladen, wobei die TFEC-spezifischen Antikörper an das GST-Fusionsprotein banden. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml PBS wurde der Antikörper mit 6 ml 100 mM Glycin eluiert. Es wurden 500 µl-Fraktionen abgenommen und in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, in denen 50 µl 1 M Tris und 50 µl BSA vorgelegt waren, um eine Anlagerung der Antikörper an die Gefäßwand zu verhindern. Nachdem die Säule mit 5 ml 50 mM Tris gewaschen wurde, folgte die Elution der Säule mit 6 ml 100 mM Ethanolamin. Wieder wurden 500 µl-Fraktionen abgenommen. Zum Schluß wurde die Säule mit 10 ml PBS gewaschen, mit 3 ml Lagerungslösung gefüllt und bei 4°C gelagert. Die Fraktionen wurde ebenfalls bei 4°C aufbewahrt. 4 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt, um festzustellen, in welchen Fraktionen sich der Antikörper befand. Danach wurde die AK-Fraktionen gegen PBS + 0,1 % NaAzid dialysiert und bei 4°C gelagert.

3.7 Microarray

Verwendete Reagenzien:

5x First Strand Buffer	
Superscript III	
DTT	0,1 M
dNTP-Mix ohne dTTP	10 mM pro Nukleotid
dTTP	2,5 mM
Amino-allyl UTP	2,5 mM
EDTA	20 mM
NaOH	1M
HCl	1 M
Natrium-Bicarbonat	0,1 M
Hydroxylamin	4 M
Hefe-tRNA	8 µg/µl
Piero's-Bindungspuffer:	5 M Guanidine SCN 10 mM Tris pH 7,0-7,1 0,03 % Gelatine 2 ng/µl Hefe tRNA
Stammlösung:	10% Matrix (Sigma Diatomaceous Earth) 3,5 M GuHCl 20% Glycerol 0,1 mM EDTA 200 mM NaOAc pH 4,8-5,0
Waschpuffer 1:	2x SSC

	0,1 % SDS
Waschpuffer 2:	1x SSC
Waschpuffer 3:	0,5x SSC
Farbstoff Cy3-aminoallyl und Cy5-aminoallyl (Amersham)	in 45 µl DMSO lösen
GFXtm PCR DNA and Gel band purification-Kit (Amersham)	
MicroSpin TM S-200 HR-Säulen (Amersham)	
NIA-Chip	

Bei dem Microarray wurde das „indirect labeling protocol“, beschrieben unter <http://www.imb.uq.edu.au/groups/hume/>, verwendet.

cDNA-Synthese:

Die mit dem QiagenRNeasy-Kit extrahierte RNA wurde präzipitiert und 30 µg RNA in 9,5 µl sterilem H₂O aufgenommen. Für jede Reaktion wurden zwei Ansätze angefertigt. Zu der RNA wurde 1 µl Primer Oligo dT von einer 2 µg/µl Stammlösung hinzugefügt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Nachdem der Ansatz kurz abzentrifugiert und 5 min bei 0°C abgekühlt worden ist, wurden 16,5 µl des folgenden Mastermix hinzupipettiert:

6 µl	5x First strand buffer
3 µl	0,1 M DTT
1,5 µl	dNTPs ohne dTTP (jedes 10 mM)
3,6 µl	2,5 mM dTTP
2,4 µl	2,5 mM amino-allyle UTP

Nach einer Inkubation von 5 min bei 50°C wurde 2 µl Superscript III in den Reaktionsmix gegeben und die cDNA-Synthese für 55 min durchgeführt.

RNA-Hydrolyse und Aufreinigen der cDNA:

Nach der cDNA-Synthese wurde zu dem Reaktionsansatz

2,5 μ l 20 mM EDTA

1,5 μ l 1 M NaOH

hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 70°C wurde noch 1,5 μ l 1M HCl in den Ansatz gegeben, um die NaOH zu neutralisieren.

Die cDNA wurde mit 450 μ l Piero's-Bindungspuffer versetzt und über GFX-Säulen nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Nachdem die cDNA mit 50 μ l H₂O eluiert wurde, erfolgte das Trocknen der cDNA im Speed Vac. Das cDNA-Pellet wurde in 9 μ l Natrium-Bicarbonat aufgenommen.

Kopplungsreaktion und Hybridisierung:

Pro Ansatz wurde jeweils 2,8 μ l des Farbstoffes Cy3-aminoallyl und Cy5-aminoallyl aliquotiert und im Speed Vac getrocknet. Danach wurde das Farbstoffpellet mit der gelösten cDNA aufgenommen und 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Anschließend wurden 4,5 μ l 4 M Hydroxylamin dazu pipettiert und weitere 15 min im Dunkeln inkubiert. Der Cy3 und Cy5-Ansatz für jede cDNA-Probe wurde gepoolt und über MicroSpin-Säulen aufgereinigt. Das Volumen der cDNA wurde auf 17 μ l verringert und danach wurden 3 μ l Hefe-tRNA, 5,1 μ l 20xSSC und 0,9 μ l 10 % SDS hinzugegeben, die eine unspezifische Bindung verhindern sollten. Nun wurde der Reaktionsansatz für 1 min auf 95°C erhitzt und nachdem er wieder auf RT abgekühlt war, wurde mit dem Ansatz ein NIA-Chip über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde der NIA-Chip mit Puffer 1 und 2 für 5min und mit Puffer 3 für 2 min gewaschen und danach durch kurzes Zentrifugieren getrocknet. Danach folgte das Scannen der Slides mit dem ScanArray5000 (BioDiscovery) und Auswertung mit der DigitalGenom Software (Molecular Ware).

4 Ergebnisse

Im Gegensatz zu den MiT-Mitgliedern TFEB und TFE3 wird TFEC nicht ubiquitär sondern sehr spezifisch in einigen myeloischen Zelltypen exprimiert. In der Maus wurde TFEC in Makrophagen und Osteoklasten und im Menschen bis jetzt nur in DC nachgewiesen. Da die Mechanismen makrophagenspezifischer Genregulation am Beginn der Doktorarbeit noch unklar waren, interessierte uns die Regulation des spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktors TFEC, aber auch seine Funktion in Makrophagen.

4.1 Regulation von mTFEC durch pro- und anti-inflammatorische Stimuli

4.1.1 Erhöhung der mRNA-Expression von mTFEC durch verschiedene Stimuli

Zu Beginn der Doktorarbeit war noch nichts über die der makrophagenspezifischen Expression zugrundeliegenden genregulatorischen Mechanismen oder die Funktion von TFEC in Makrophagen bekannt.

Zur Untersuchung der Regulation der mTFEC-Expression wurden Knochenmarksmakrophagen (BMM) von BALB/c-Mäusen mit verschiedenen anti- und pro-inflammatorischen Stimuli für 4 und 24 h behandelt. Als anti-inflammatorische Zytokine wurden IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- β und als pro-inflammatorische Stimuli wurden IL-1 β , GM-CSF, LPS (Lipopolysaccharide) oder sMALP-2 („soluble macrophage-activating mycoplasma lipopeptide“) benutzt. Die Northern Blot-Analyse zeigte eine starke Hochregulierung des mTFEC-Transkripts in IL-4-, IL-13-, GM-CSF- oder LPS-stimulierten BMM nach 4 h Stimulierung (siehe Abb. 8). Weitere 20 h später wurde das gleiche Bandenmuster detektiert, nur das Signal in den LPS-stimulierten Zellen war wieder auf die ursprüngliche Stärke gesunken. Somit wird die mTFEC-Expression in BMM von Wildtyp-Mäusen sowohl von anti- als auch pro-inflammatorischen Stimuli reguliert.

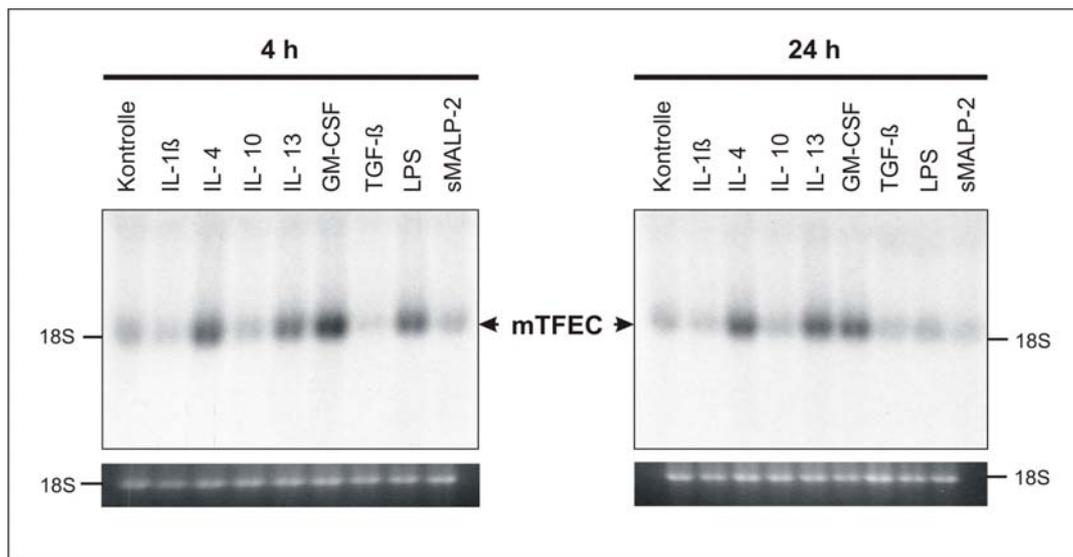


Abbildung 8: Northern Blot-Analyse der mTFEC-Expression in stimulierten BMM (BALB/c). Die BMM wurden mit IL-1 β (10 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-13 (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), TGF- β (10 ng/ml), LPS (10 μ g/ml) oder sMALP-2 (50 U/ml) für 4 h und 24 h stimuliert. Als Sonde wurde die vollständige codierende Region (CDR) von mTFEC (-99 bis +669) verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

Da für spätere Experimente BMM von TFEC^{-/-}-Mäusen mit einem 129/SvJ-Hintergrund verwendet wurden, wurde auch die Regulation der mTFEC-Expression in BMM von 129/SvJ-Mäusen untersucht (siehe Abb. 9). Die Makrophagen der Mauslinie 129/SvJ verhielten sich mit einer Ausnahme genauso wie die BMM von BALB/c-Mäusen. Im Unterschied zu BALB/c wurde die mTFEC-Expression im 129/SvJ-Stamm auch durch eine 4 h-ige sMALP-2-Stimulierung induziert. Eine Stimulierung der BMM mit IL-4 und LPS für 24 h ergab eine stärkere Erhöhung der mTFEC-Expression als mit IL-4 alleine.

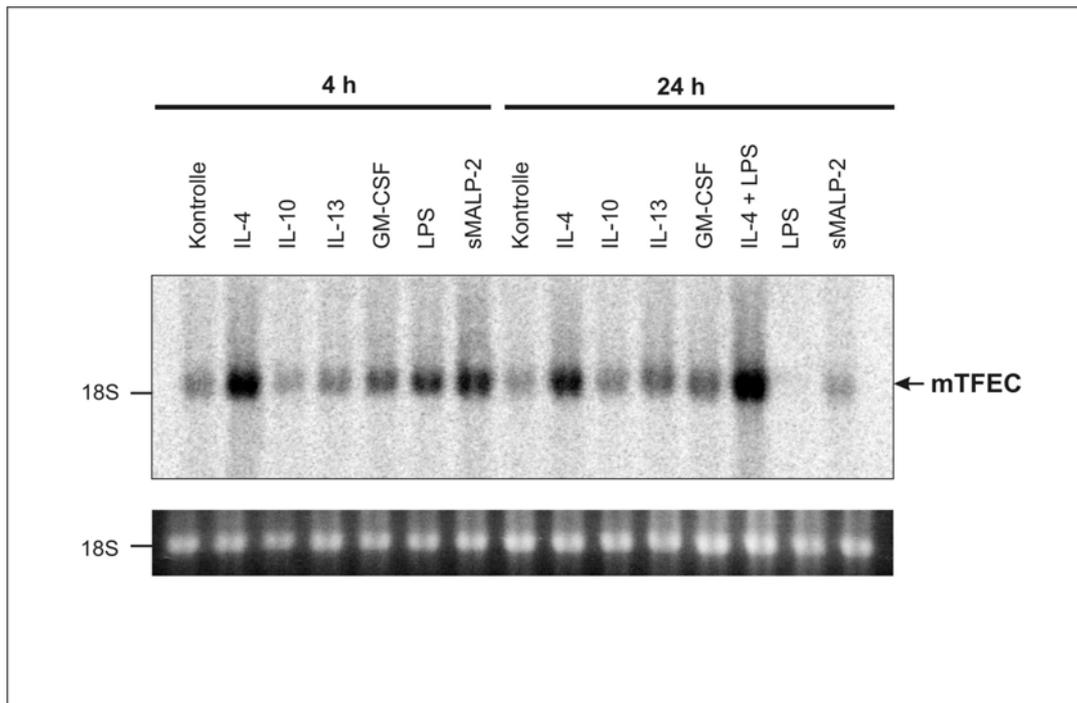


Abbildung 9: Northern Blot-Analyse der mTFEC-Expression in stimulierten BMM (129/SvJ). Die BMM wurden mit IL-4 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-13 (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), LPS (10 µg/ml) oder sMALP-2 (50 U/ml) für 4 h und 24 h oder mit IL-4 (10 ng/ml) + LPS (10 µg/ml) für 24 h stimuliert. Als Sonde wurde die mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

Zusätzlich wurde die Regulation der mTFEC-Transkription durch dieselben Stimuli in einer murinen Makrophagen-Zelllinie (RAW 264.7) untersucht, die für spätere Versuche als Modellsystem verwendet wurde (siehe Abb. 10). Die Stimulierung der RAW 264.7-Zellen bewirkte ebenfalls eine Hochregulierung der mTFEC-mRNA-Expression durch IL-4, GM-CSF, IL-13, LPS oder sMALP-2. Im Gegensatz zu den Primärzellen war die dieser Zelllinie mit IL-4 + GM-CSF resultierte in einer ähnlich hohen Expression wie nach Stimulierung mit IL-4 oder GM-CSF alleine.

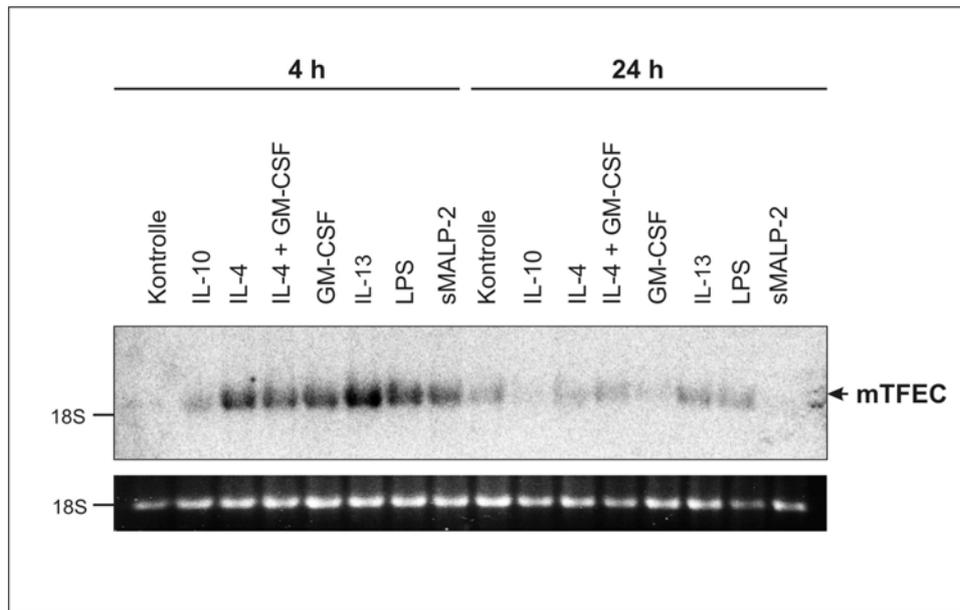


Abbildung 10: Northern Blot-Analyse der mTFEC-Expression in stimulierten RAW 264.7-Zellen. Die Zellen wurden mit IL-10 (20 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml), IL-13 (10 ng/ml), IL-4 (5 ng/ml) + GM-CSF (5 ng/ml), LPS (10 μ g/ml) oder sMALP-2 (50 U/ml) für 4 h und 24 h stimuliert. Als Sonde wurde die mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.1.2 mTFEC-Zeitkinetik in mit IL-4 und LPS stimulierten BMM

Um zu untersuchen, in welchem Zeitraum IL-4 und LPS die stärkste Expression von mTFEC bewirkt und wie lange sich die induzierte mRNA in Makrophagen nachweisen lässt, wurden weitere Northern Blot-Analysen durchgeführt.

BMM von BALB/c-Mäusen wurden 0, 2, 4, 6, 8, 24 oder 48 h mit IL-4 stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen benutzt (siehe Abb. 11). Die stärkste Expression der mTFEC-mRNA war bereits nach 2 h IL-4-Stimulierung beobachtbar. Danach nahm die Stärke des Signals langsam ab, wobei aber noch nach 48 h eine leichte Hochregulierung des Transkripts erkennbar war.

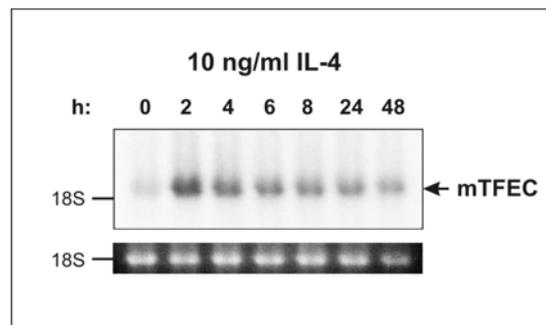


Abbildung 11: Kinetik der mTFEC-Expression in mit IL-4 stimulierten BMM (BALB/c). Die Zellen wurden für 0, 2, 4, 6, 8, 24 oder 48 h mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte BMM verwendet. Als Sonde wurde mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

Um bei späteren Experimenten mit der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 die optimale Stimulierungsdauer zu verwenden, wurde auch diese Zelllinie mit IL-4 für 0, 2, 4, 6 oder 8 h behandelt. Die Northern Blot-Analyse zeigte das gleiche Bild wie bei den Primärzellen, die höchste Expression von mTFEC wurde nach einer Stimulierungsdauer von 2 h erreicht (nicht gezeigt).

Dasselbe Experiment wurde auch mit LPS durchgeführt. Da das mTFEC-Signal in mit LPS behandelten BMM viel schneller auf das Ausgangsniveau zurückkehrte als in mit IL-4-stimulierten Zellen (siehe Abb. 8), vermuteten wir, dass es zu einer früheren Induktion von mTFEC durch LPS kommen könnte. Deswegen wurden BMM für 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 oder 25 h mit LPS behandelt (siehe Abb. 12). mTFEC wurde bereits nach 1 h schwach exprimiert und nach 2 h war das Signal am intensivsten. Dann verringerte sich die Stärke der Bande wieder und kehrte nach 6 h auf das ursprüngliche Niveau zurück.

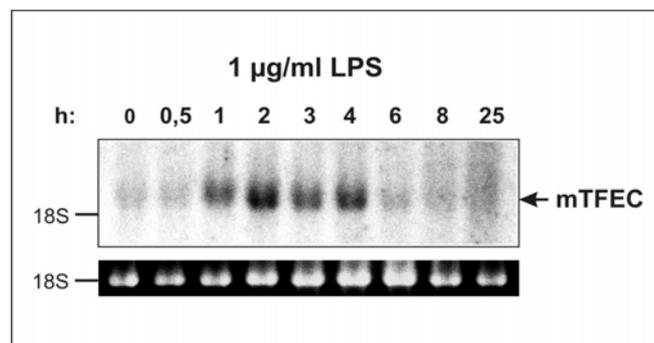


Abbildung 12: Kinetik der mTFEC-Expression in mit LPS stimulierten BMM (BALB/c). Die Zellen wurden für 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 oder 25 h mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Als Sonde wurde die mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.1.3 Dosisabhängigkeit der mTFEC-Induktion in mit IL-4 und LPS stimulierten BMM

Das nächste Experiment sollte Aufschluß darüber geben, welche Konzentration von IL-4 und LPS eine Expressionsänderung von mTFEC hervorruft.

BMM wurden mit 0, 0.1, 1, 10 oder 25 ng/ml IL-4 für 2 h behandelt (siehe Abb. 13). Bereits eine Dosis von 1 ng/ml IL-4 bewirkte eine Induktion der mTFEC-Expression. Die Steigerung der IL-4 Konzentration bis auf 25 ng/ml verursachte einen proportionalen Anstieg der Signalstärke.

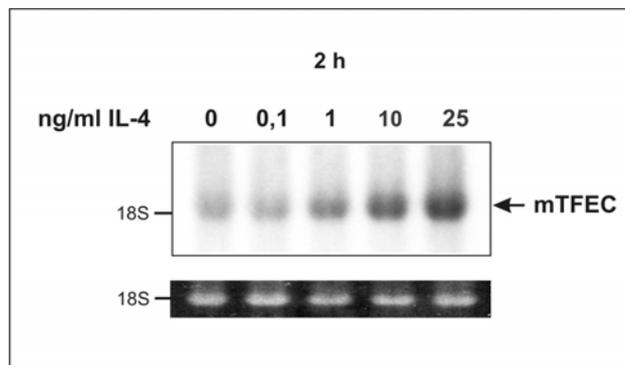


Abbildung 13: Dosisabhängigkeit der mTFEC-Expression in mit IL-4 stimulierten BMM (BALB/c). Die Zellen wurden mit 0, 0.1, 1, 10 oder 25 ng/ml IL-4 für 2 h stimuliert. Als Sonde wurde die mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

Zur Untersuchung der dosisabhängigen Induktion von mTFEC durch LPS wurden BMM mit 0, 0.01, 0.1, 1 oder 10 ng/ml LPS für 2 h stimuliert (siehe Abb. 14). Eine leichte Induktion von mTFEC trat schon mit 10 pg/ml LPS auf, die sich mit zunehmender Konzentration von LPS noch erheblich steigern ließ.

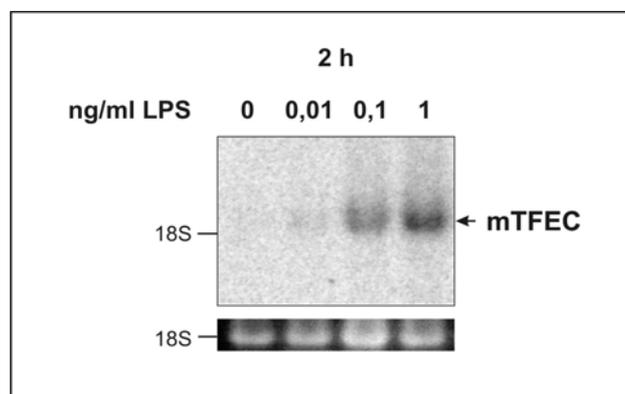


Abbildung 14: Kinetik der mTFEC-Expression in mit LPS stimulierten BMM (BALB/c). Die Zellen wurden für 0, 0.01, 0.1 oder 1 ng/ml LPS für 2 h stimuliert. Als Sonde wurde die mTFEC-cDNA verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.1.4 mTFEC-Proteinexpression in stimulierten BMM

4.1.4.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen mTFEC

Der erste Abschnitt der Arbeit untersuchte die mTFEC-Expression in Maus-Makrophagen nur auf der mRNA-Ebene. Um Untersuchungen auf der Proteinebene zu ermöglichen, wurde ein polyklonales anti-mTFEC-Serum hergestellt.

4.1.4.1.1 *Produktion eines mTFEC-GST-Fusionsproteins*

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers wurde das Fusionsprotein GST-cTFEC in Bakterien exprimiert und aufgereinigt, um damit anschließend zwei Kaninchen zu immunisieren.

Das verwendete Proteinfragment von mTFEC (cTFEC) umfasste das C-terminale Ende (139 AS) inklusive Stopcodon und zusätzliche 24 bp der nicht codierenden Sequenz. Dieses Fragment von mTFEC wurde ausgewählt, weil es in mTFEC und hTFEC-L zu 94 % identische AS besitzt. Somit war die Wahrscheinlichkeit groß, dass das polyklonale Serum eventuell zur Detektierung beider Isoformen benutzt werden könnte. Außerdem unterscheidet sich dieses C-terminale Ende stark von den anderen Mitgliedern der MiT-Familie, ein Antiserum sollte somit keine Kreuzreaktionen zeigen.

Die produzierten Seren A und B wurden mit Immunpräzitationen und Western Blot-Analysen auf ihre Spezifität überprüft.

4.1.4.1.2 *Untersuchung des polyklonalen Antikörpers auf Spezifität*

Um zu untersuchen, ob die Seren natives mTFEC spezifisch detektieren können, wurden die mit ³⁵S-markierten *in-vitro* translatierten Proteine mMif-A, mTFE3 und mTFEC mit den polyklonalen Seren A und B und den dazugehörigen Präimmunseren immunpräzipitiert. Vom mTFEC-Ansatz wurde die doppelte Menge verwendet, weil dessen Markierung mit ³⁵S schwächer war als bei den anderen Proteinen. Die *in-vitro* translatierten, nicht immunpräzipitierten Proteine mMif-A, mTFE3 und mTFEC, wurden als Größenstandard bei der SDS-PAGE mitgeführt (siehe Abb. 15). Das Ergebnis der Immunpräzitation zeigte, dass das Serum A spezifisch das native Protein mTFEC mit dem Molekulargewicht von 35 kDa binden konnte. Hierbei erschienen zwei Signale (35 und 37 kDa), da bei der *In-vitro*-

Translation wahrscheinlich zwei unterschiedliche ATGs der CDR von mTFEC als Startcodons verwendet wurden.

Die Kontrollen aus der MiT-Familie, mMitf-A und mTFE3, wurden von dem Serum A nicht detektiert, auch kam es zu keiner Bindung mit der humanen TFE3-Isoform (nicht gezeigt). Ebenfalls wurde keine unspezifische Bindung des Präimmunserums an TFE3 nachgewiesen. Das Serum B war nicht fähig, mTFEC oder hTFEC-L zu erkennen (nicht gezeigt).

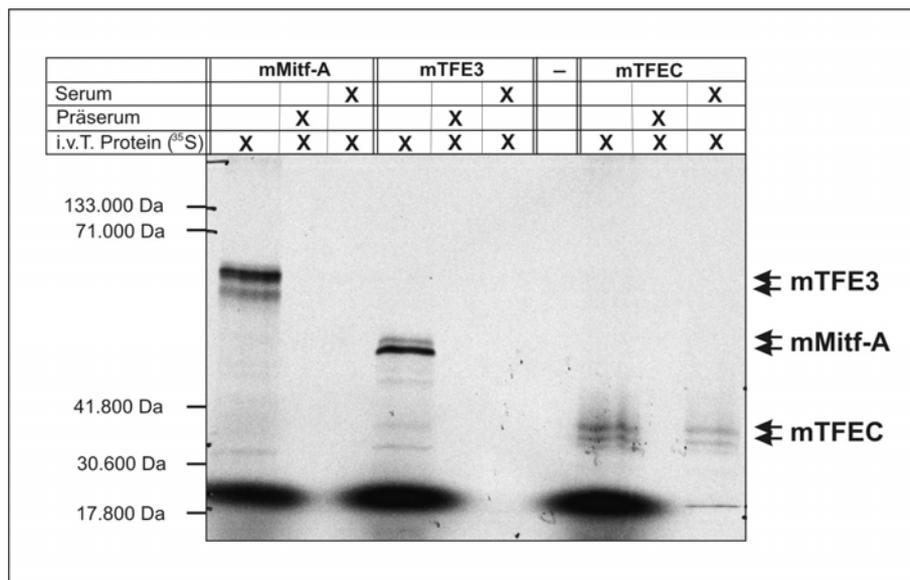


Abbildung 15: Immunpräzipitation mit den *in-vitro* translatierten Proteinen mMitf, mTFE3 und mTFEC, die mit ³⁵S markiert wurden. 5 µl mMitf-A, 5 µl mTFE3 und 10 µl mTFEC wurden mit dem polyklonalem Serum A und dem dazugehörigen Präimmunserum durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Kaleidoskopmarker verwendet.

Um die Spezifität der polyklonalen Seren A und B gegen denaturierte Proteine zu testen, wurden bei der Western Blot-Analyse die *in-vitro* translatierten Proteine mMitf-A, mTFE3, mTFEC und hTFEC-L und zusätzlich vier verschiedene Konzentrationen des Fragments cTFEC eingesetzt (siehe Abb. 16). Da das polyklonale Serum A noch nicht affinitäts-aufgereinigt war, kam es noch zu vielen unspezifischen Bindungen. Bei mTFEC tauchten zwei zusätzliche Banden bei ungefähr 35 kDa auf, die bei mMitf-A und mTFE3 nicht vorhanden waren, und deshalb wahrscheinlich die spezifischen Banden repräsentierten. Diese beiden Signale waren bei mTFEC stärker als bei hTFEC-L. Das Serum detektierte bereits schwach 2 ng des Fragments cTFEC, das Signal verstärkte sich mit zunehmender Konzentration. Neben dem 13 kDa großen cTFEC-Fragment wurde noch das GST-

Protein, das sich wegen einer unvollständigen Aufreinigung des cTFEC-Proteins noch im Lysat befand, mit dem Molekulargewicht von 26 kDa detektiert. Wie bei der Immunpräzipitation war das Serum B nicht fähig, hTFEC-L und cTFEC zu erkennen (nicht gezeigt).

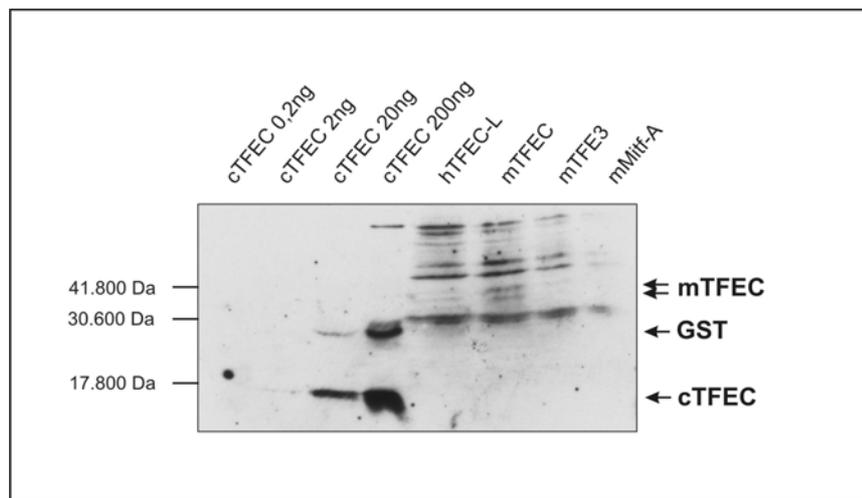


Abbildung 16: Western Blot-Analyse mit *in-vitro* translatierten MiT-Proteinen und dem cTFEC-Fragment. Je 10 μ l *In-vitro*-Translatat von mMif-A, mTFE3, mTFEC und hTFEC-L und 200ng, 20 ng, 2 ng und 0,2 ng cTFEC-Fragment pro Spur wurden aufgetragen. Die Antikörperfärbung erfolgte mit dem polyklonalem Serum A. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Kaleidoskopmarker benutzt.

Von den beiden polyklonalen Seren konnte nur das Serum A spezifisch die Proteine mTFEC (denaturiert und nativ) stark und hTFEC-L (denaturiert) schwach detektieren. Dieses Serum wurde anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt und für weitere Experimente verwendet.

4.1.4.1.3 Spezifität des aufgereinigten polyklonalen Antikörpers

Nach der Aufreinigung des polyklonalen Serums A wurde die Reinheit des polyklonalen Antikörpers getestet. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse mit den *in-vitro*-translatierten Proteinen mMif-A, mTFE3, mTFEC und hTFEC-L und mit zwei verschiedenen Konzentrationen des cTFEC-Fragments als Positivkontrolle durchgeführt (siehe Abb. 17). Der Antikörper anti-TFEC detektierte nur mTFEC und im Gegensatz zu den Ergebnissen vor der Aufreinigung nicht mehr hTFEC-L. Die Detektion erfolgte sehr spezifisch, es wurden keine zusätzlichen Signale bei den *in-vitro* translatierten Proteinen beobachtet. Auch erfolgte keine Kreuzreaktion mit den anderen Mitgliedern der MiT-Familie und es kam zu einer sehr empfindlichen

Erkennung des Proteinfragments durch den Antikörper. Das im Proteinlysate enthaltene GST wurde ebenfalls nicht mehr detektiert.

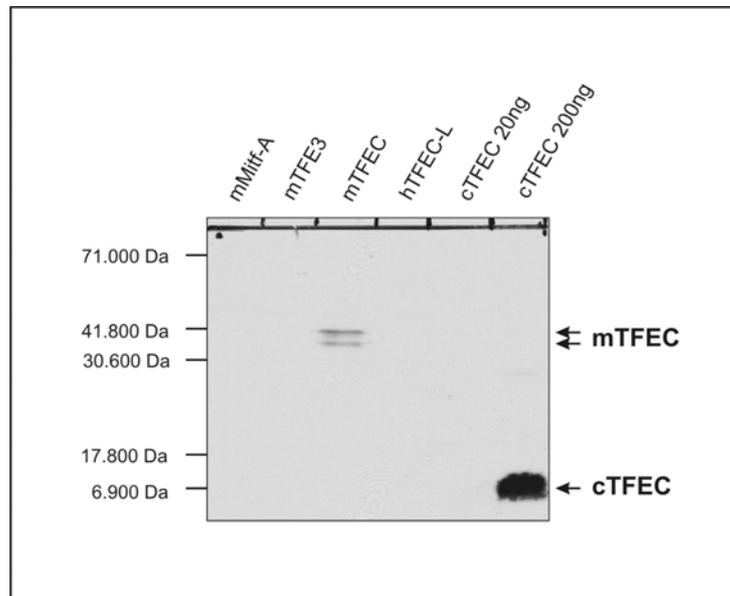


Abbildung 17: Western Blot-Analyse mit *in-vitro* translatierten Proteinen und dem cTFEC-Fragment. 10 μ l von mMitf-A, mTFEC, mTFEC und hTFEC-L und 200 ng und 20 ng des cTFEC-Fragments wurden aufgetragen. Die Antikörperfärbung erfolgte mit dem Antikörper anti-TFEC. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Kaleidoskopmarker verwendet.

4.1.4.2 Charakterisierung des mTFEC-Proteins in stimulierten BMM

Nach der Produktion des polyklonalen Antikörpers gegen mTFEC wurde die zelluläre Expression des Proteins untersucht.

BMM von BALB/c-Mäusen wurden für 6 und 12 h mit IL-4 oder LPS stimuliert. Mit den Gesamtzelllysaten der stimulierten Makrophagen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (siehe Abb. 18). Der Antikörper anti-mTFEC konnte das Protein erst nach 12 h IL-4-Stimulierung detektieren. In LPS behandelten BMM konnte das mTFEC-Protein weder nach 6 h noch nach 12 h nachgewiesen werden. Von sechs unabhängigen Experimenten konnte nur in zwei Western Blot-Analysen das mTFEC-Protein nachgewiesen werden. Die Probleme bei der Reproduzierbarkeit könnten an einer schnellen Degradation des mTFEC-Proteins liegen, die durch PEST-ähnliche Sequenzen, die bereits in dem humanen Homologen gefunden wurden, im Protein hervorgerufen werden könnte.

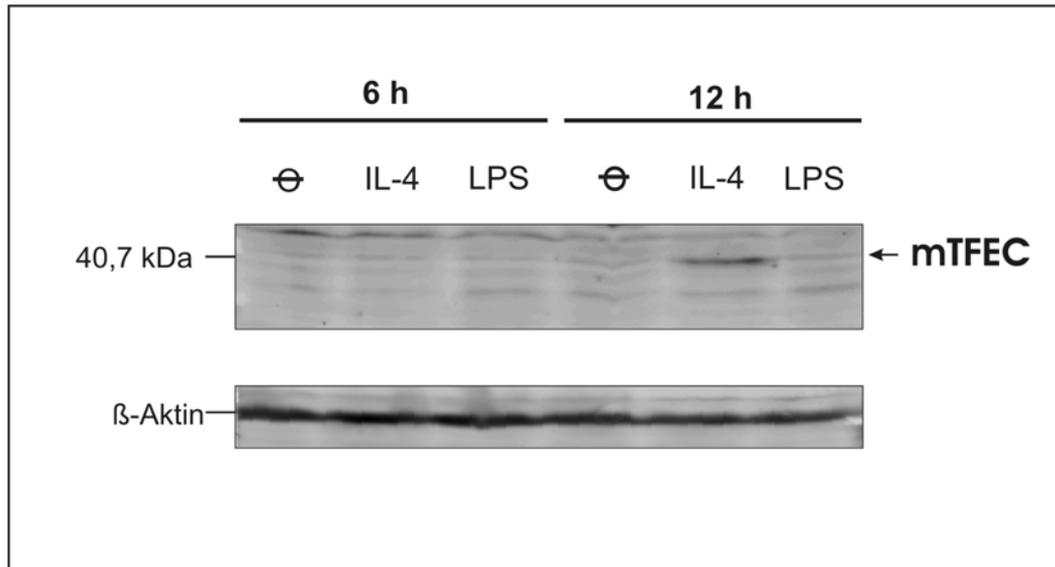


Abbildung 18: Western Blot-Analyse mit Gesamtzelllysaten von mit IL-4 und LPS-stimulierten BMM (BALB/c). Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-4 oder 1 µg/ml LPS für 6 und 12 h stimuliert. Bei der Immunfärbung wurde der polyklonale Antikörper anti-mTFEC eingesetzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Kaleidoskopmarker verwendet. Gleichmäßige Beladung des Blots wurde mittels einer β-Aktin-Färbung kontrolliert.

4.1.5 Expression in murinen DC

Ob die DC der Maus ebenfalls mTFEC exprimieren, wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurden DC aus Knochenmarkszellen (BMDC) von BALB/c-Mäusen generiert und mit IL-4, IL-10, IL-13 oder LPS für 4 und 24 h stimuliert (siehe Abb. 19). Im Gegensatz zu den Makrophagen wurde mTFEC bereits sehr stark in den unstimulierten DC exprimiert. Die drei verwendeten Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 verursachten keine erhöhte Expression von mTFEC in den DC, durch LPS-Stimulierung fiel die Expression nach 4 h unter das Ausgangsniveau zurück und konnte nach 24 h kaum mehr nachgewiesen werden. Die hohe basale Expression und der fehlende Effekt nach einer Stimulierung mit IL-4 und IL-13 könnte an den Kulturbedingungen liegen, da die DC durch Kultivierung des Knochenmarks mit GM-CSF und IL-4 generiert wurden.

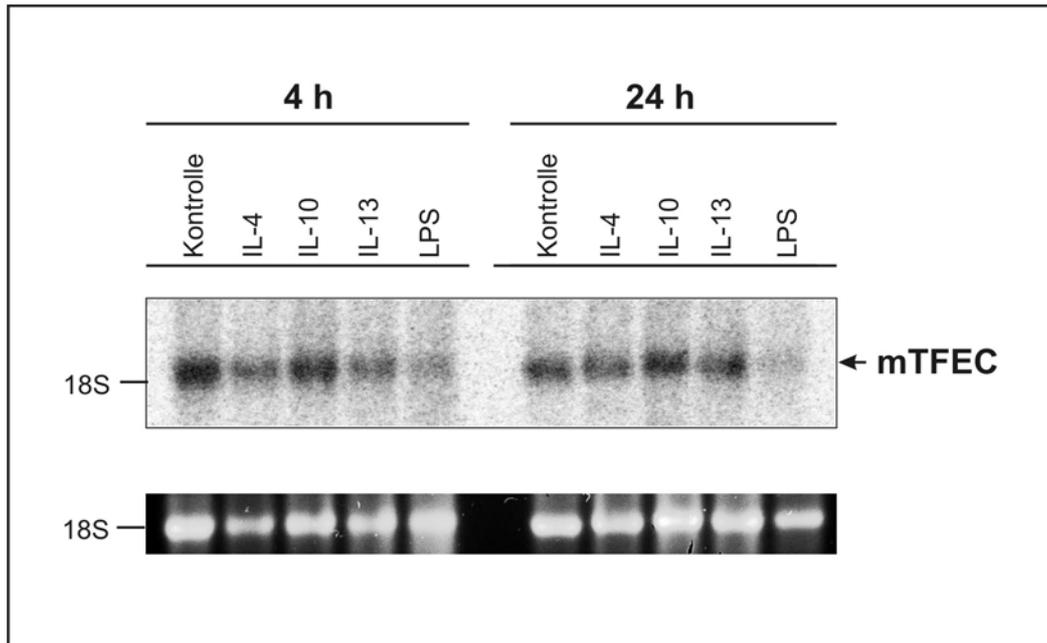


Abbildung 19: Northern Blot-Analyse der mTFEC-Expression in stimulierten BMDc (BALB/c). Die BMDc wurden mit 10 ng/ml IL-4 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-13 (10 ng/ml) oder LPS (1 µg/ml) für 4 und 24 h behandelt. Als Sonde wurde die CDR von mTFEC verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.1.6 Untersuchung der Regulation des proximalen Promotors von mTFEC

Ein Sequenzvergleich zeigte, dass der 200 bp oberhalb vom Startcodon gelegene proximale Promotor von mTFEC und hTFEC konserviert ist und eine 70 %-ige Identität (LALIGN-Genestream Resource Center) aufweist (siehe Abb. 20). Der proximale Promotor besitzt weder eine TATA-Box noch einen GC-reichen Sequenzabschnitt, dafür aber einige makrophagenspezifische Elemente, wie mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren C/EBP, AP-1 und PU.1. Außerdem gibt es noch andere interessante putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF-κB, der in der LPS-Antwort eine wichtige Rolle spielt, und STAT6, der am IL-4-Signalweg beteiligt ist. Die putativen Erkennungssequenzen für STAT6 sind allerdings nur im murinen, nicht aber im humanen proximalen Promotor vorhanden. Um zu untersuchen, ob diese beiden Transkriptionsfaktoren für die Induktion der mTFEC-Expression notwendig sind, wurden Promotoranalysen und Bindungsstudien in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 und in BMM durchgeführt.



Abbildung 20: Sequenzvergleich des proximalen Promotors von mTFEC und hTFEC. Putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren sind farblich markiert. Der Transkriptionsstart ist durch einen Stern gekennzeichnet.

4.1.6.1 Transaktivierung des Promotors

Bei der Durchführung der Promotoranalysen wurde die stabile Transfektion der transienten Transfektion aus mehreren Gründen vorgezogen. Einerseits zeigen die Ergebnisse von Dalpke *et al.*, 2001, dass in Bakterien vorkommende unmethylierte CpG-DNA sogenannte SOCS („suppressor of cytokine signaling“)-Proteine induzieren können. Da diese SOCS-Proteine die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen verhindern, wurde die transiente Transfektion vermieden, damit nicht die unmethylierten CpG-Sequenzen der Reporterplasmide in den transfizierten Zellen die Aktivierung von SOCS-Proteine auslösen. Außerdem wird durch die stabile Transfektion die Induktion einer LPS-Toleranz vermieden, die ansonsten die Detektion einer eventuellen LPS-Antwort verhindern würde. Um durch die

Transfektion auftretende Positionseffekte herauszumitteln, wurden alle transfizierten Klone für jeweils einen Ansatz verwendet.

Zur Untersuchung der Regulation des mTFEC-Gens wurde der proximale murine Promotor in das Luziferase-Reporter-Plasmid pGL2-Basic kloniert. Die Promotorkonstrukte pGL2-mTFEC und der pGL2-Basic wurden stabil in RAW 264.7-Zellen transfiziert. Die stabilen Transfektanten wurden mit IL-4, IL-13, GM-CSF, LPS oder sMALP-2 für 5 h stimuliert und anschließend wurde die Luziferase-Aktivität gemessen (siehe Abb. 21). Nur die Stimulierung der Transfektanten mit LPS führte zu einer erhöhten Promotoraktivität. Es kam zu einer 2,5-fachen Steigerung der Aktivität gegenüber den unstimulierten Transfektanten.

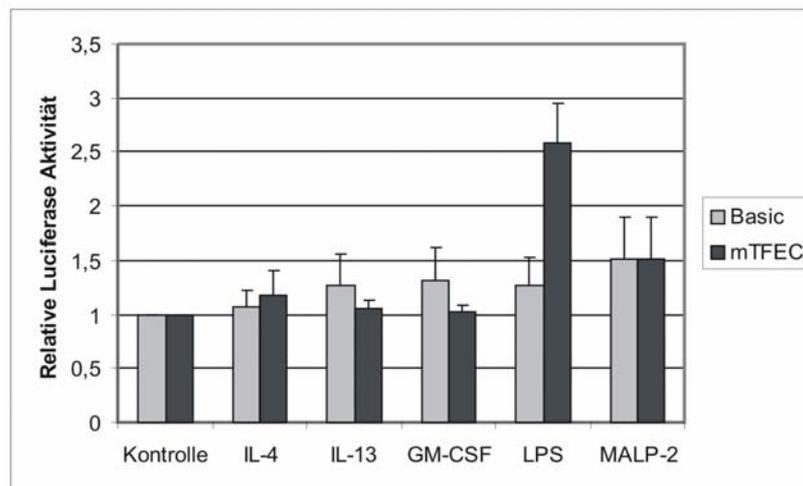


Abbildung 21: Induzierte Promotoraktivität des mTFEC-Promotors. Bei dieser Promotoranalyse wurde die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 mit pGL2-mTFEC und pGL2-Basic stabil transfiziert. Nach 3 Wochen wurden die Transfektanten mit 10 ng/ml IL-4, 10 ng/ml IL-13, 10 ng/ml GM-CSF, 1 µg/ml LPS oder 50 U/ml sMALP-2 für 5 h stimuliert und anschließend die Luziferase-Aktivität gemessen. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse von zwei unabhängigen Transfektionen herangezogen (Mittelwert ± SD).

4.1.6.2 Regulation der LPS-Induktion durch NF- κ B

Die nächsten Experimente mit dem Wildtyp-Promotor und einem Promotor, dessen NF- κ B-Bindungsstelle mutiert wurde, sollte Aufschluß geben, ob diese NF- κ B-Erkennungssequenz für die Regulation der mTFEC-Expression durch LPS verantwortlich ist.

4.1.6.2.1 *Mutation der NF- κ B Bindungsstelle des proximalen Promotors von mTFEC*

Eine stabile Transfektion mit den Vektoren pGL2-Basic, pGL2-mTFEC oder pGL2-NF- κ B/M, der eine Mutation in der NF- κ B-Erkennungssequenz enthält (siehe Abb. 22), wurde in der Zelllinie RAW 264.7 durchgeführt. Die stabilen Transfektanten wurden mit IL-4 oder LPS für 5 h stimuliert und anschließend die Luziferase-Aktivität bestimmt (siehe Abb. 23). Die Stimulierung mit IL-4, die als Kontrolle mitgeführt wurde, hatte wie vermutet nur einen sehr leichten bis keinen Effekt auf die Aktivität des intakten und des mutierten Promotors. Allerdings führte die Behandlung der mit pGL2-mTFEC transfizierten Zellen mit LPS zu einer verstärkten Promotoraktivität (3,2-fach), die durch die Mutation der NF- κ B-Bindungsstelle fast vollständig zurückging (1,2-fach). Somit scheint die NF- κ B-Erkennungssequenz tatsächlich an der LPS-induzierten mTFEC-Expression beteiligt zu sein.

MTFEC: 5'---CCAG**GAAA**TGCCCTAATGGG---3'
NF- κ B/M: 5'---CCAG**TCGCT**GCCCTAATGGG---3'

Abbildung 22: Sequenz der NF- κ B-Bindungsstelle und der mutierten Erkennungssequenz im murinen proximalen Promotor. Die NF- κ B-Bindungsstelle ist grau unterlegt. Die ausgetauschten Basen sind farblich markiert, wt: blau, mutiert: rot.

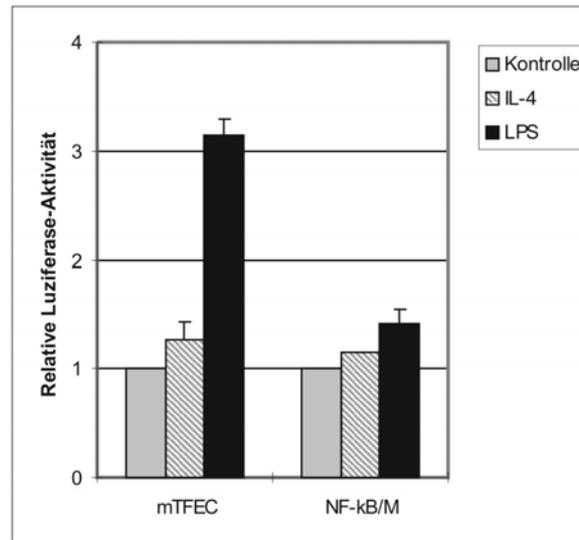


Abbildung 23: Einfluß der NF-κB-Bindungsstelle im mTFEC-Promotor auf die LPS-induzierte Promotoraktivität. Promotoranalyse, bei der RAW 264.7-Zellen mit den Promotorkonstrukten pGL2-Basic, pGL2-mTFEC oder pGL2-NF-κB/M (enthält mutierte NF-κB-Bindungsstelle) transfiziert wurden. Nach drei Wochen wurden die stabilen Transfektanten mit 10 ng/ml IL-4 oder 1 µg/ml LPS für 5 h stimuliert und anschließend die Luziferase-Aktivität gemessen. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse von zwei unabhängigen Transfektionen benutzt (Mittelwert ± SD).

4.1.6.2.2 DNA-Bindungsaktivität von NF-κB an dessen Bindungsstelle im mTFEC-Promotor in stimulierten RAW 264.7

Im vorangegangenen Experiment wurde nachgewiesen, dass die NF-κB-Bindungsstelle des mTFEC-Promotors eine wichtige Rolle in der LPS-Antwort spielt. Ob nun wirklich der Transkriptionsfaktor NF-κB diese Bindungsstelle erkennt und bindet, wurde durch einen „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) geklärt. Für dieses Experiment wurden nukleäre Proteine (ZE) von RAW 264.7-Zellen benutzt, die 30 min mit LPS oder ohne Stimulus behandelt wurden. Als radioaktiv markierte Sonde wurde das tfec-κB-Oligonukleotid (ein 23 bp langer Promotorabschnitt, der die NF-κB Bindungsstelle enthält) verwendet (siehe Abb. 24). Dabei zeigte sich, dass die Interaktion zwischen dem markierten Oligonukleotid und den nukleären Proteinen aus LPS-stimulierten RAW 264.7-Zellen viel stärker war als aus unstimulierten Zellen. Um zu zeigen, dass das mit dem markiertem Oligo interagierende Protein nur an die NF-κB-Erkennungssequenz bindet, wurden drei verschiedene nicht markierte Oligonukleotide als Kompetitoren im 100-fachem Überschuß eingesetzt: tfec-κB, tfec-κB-M (gleicher Promotorabschnitt mit der mutierten NF-κB-Bindungsstelle) und die NF-κB Konsensussequenz (κB-cons). Die Inkubation mit den nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden tfec-κB und κB-cons verursachte eine Verdrängung des markierten Oligonukleotids. Bei Verwendung des

Oligonukleotids *tfec-κB-M*, kam es zu keiner Konkurrenz. Um den bindenden Faktor zu identifizieren, wurde eine Supershift-Analyse mit einem anti-p65-Antikörper durchgeführt. Der Faktor p65 ist einer von fünf bekannten Mitgliedern der NF-κB Familie, die innerhalb der Familie Dimere bilden (Adcock, 1997; Vermeulen *et al.*, 2002). Und tatsächlich kam es bei der Verwendung von einem Antikörper gegen p65 zu einem Supershift, der durch die Vergrößerung des DNA-Protein-Komplexes nach Bindung des Antikörpers entsteht. Diese *In-vitro*-Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB auch *in-vivo* an die putative Bindungsstelle im proximalen Promotor von *m/h* TFEC bindet und für die durch LPS induzierte Expression von *mTFEC* essentiell ist.

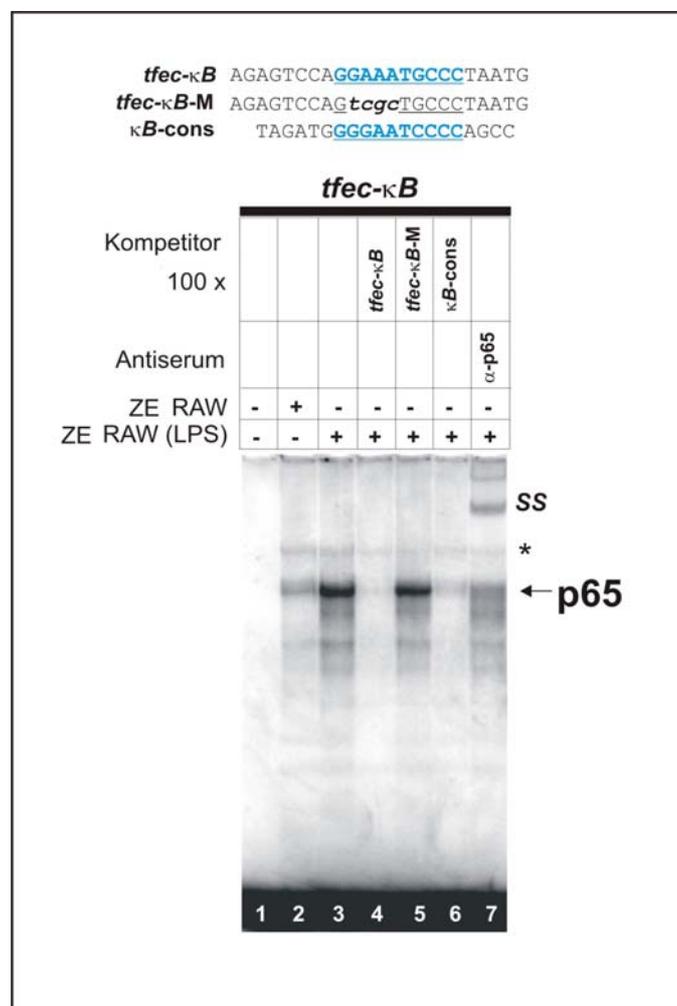


Abbildung 24: EMSA zur Untersuchung der NF-κB-Bindungsstelle des TFEC-Promotors. Analyse der Bindung nukleärer Proteine von unbehandelten und 30 min mit LPS (1 μg/ml) behandelten RAW 264.7-Zellen an das radioaktiv markierte Oligonukleotid *tfec-κB* (enthält NF-κB-Bindungsstelle). Als Kompetitoren wurden die nicht radioaktiv markierten Oligonukleotide *tfec-κB*, *tfec-κB-M* (enthält mutierte NF-κB-Bindungsstelle) und κB-cons (enthält NF-κB-Konsensussequenz) im 100-fachen Überschuß eingesetzt. Der Supershift wurde mit dem Antikörper anti-p65 durchgeführt. Der Pfeil markiert die spezifische Bande, die unspezifische Bande ist durch ein Stern gekennzeichnet und die Markierung „SS“ zeigt den „Supershift“ an.

4.1.6.3 Regulation der IL-4-Induktion durch STAT6

Nachdem bewiesen wurde, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B an der LPS-Antwort beteiligt ist, wurde untersucht, welche Rolle der Transkriptionsfaktor STAT6 in der IL-4-Regulation der mTFEC-Expression in Makrophagen spielt. Im Gegensatz zu NF- κ B, dessen Bindungsstelle im murinen wie auch humanen proximalen Promotor von TFEC konserviert ist, sind die drei putativen STAT6-Bindungsstellen nur im murinen Promotor zu finden. Die folgenden Versuche sollten Hinweise liefern, ob und welche von diesen drei putativen Bindungsstellen von STAT6 erkannt werden und für die IL-4-induzierte mTFEC-Expression wichtig sind.

4.1.6.3.1 *Mutation der STAT6-Bindungsstellen im proximalen Promotor von mTFEC*

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, erhöhte IL-4 nicht die mTFEC-Promotoraktivität in RAW 264.7-Zellen.

Obwohl in den vorhergehenden Experimenten IL-4 die mTFEC-Expression (mRNA und Protein) in BMM verstärkt hatte, ließ sich dieser Befund mit den Reporterkonstrukten in RAW 264.7- und J774-Zellen weder in transienten noch stabilen Transfektionen nachstellen. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an einem Defekt im STAT6-Signalweg, der vor kurzem von Welch et al., 2002 für RAW 264.7-Zellen beschrieben wurde. Die IL-4-Sensibilität der Zellen wurde daher durch die Co-Transfektion eines STAT6-Expressionsplasmids erhöht, so dass IL-4-induzierte Effekte sichtbar wurden.

Neben dem Reporter-Plasmid pGL3-mTFEC wurden drei zusätzliche mTFEC-Promotorkonstrukte generiert, die jeweils eine Mutation in einer der drei putativen STAT6-Bindungsstellen besaßen. Bei dem Promotorkonstrukt pGL3-STAT6u/M wurde die putative 5'-gelegene, bei pGL3-STAT6m/M die mittlere und bei pGL3-STAT6i/M die 3'-gelegene STAT6-Bindungsstelle mutiert. Die drei mutierten Promotorkonstrukte, pGL3-Basic, pGL3-mTFEC und pGL3-STAT6 (Positivkontrolle mit vier repetitiven STAT6-Bindungsstellen) wurden jeweils mit dem STAT6-Expressionsplasmid pSTAT6 in RAW 264.7-Zellen transient cotransfiziert. Am 2. Tag nach der Transfektion wurde die Zellen mit IL-4 für 16 h stimuliert und die Luziferase-Aktivität des Promotors gemessen (siehe Abb. 25). Die IL-4-Stimulierung erhöhte die mTFEC-Promotoraktivität um das dreifache im Vergleich zur Kontrolle. Die Mutation der mittleren oder 3'-gelegenen STAT6-Bindungsstelle führte zu einer fast vollständigen Inhibierung der Promotoraktivität. Das Mutieren der 5'-gelegene

STAT6-Erkennungssequenz hatte allerdings keinen Effekt auf die TFEC-Promotoraktivität.

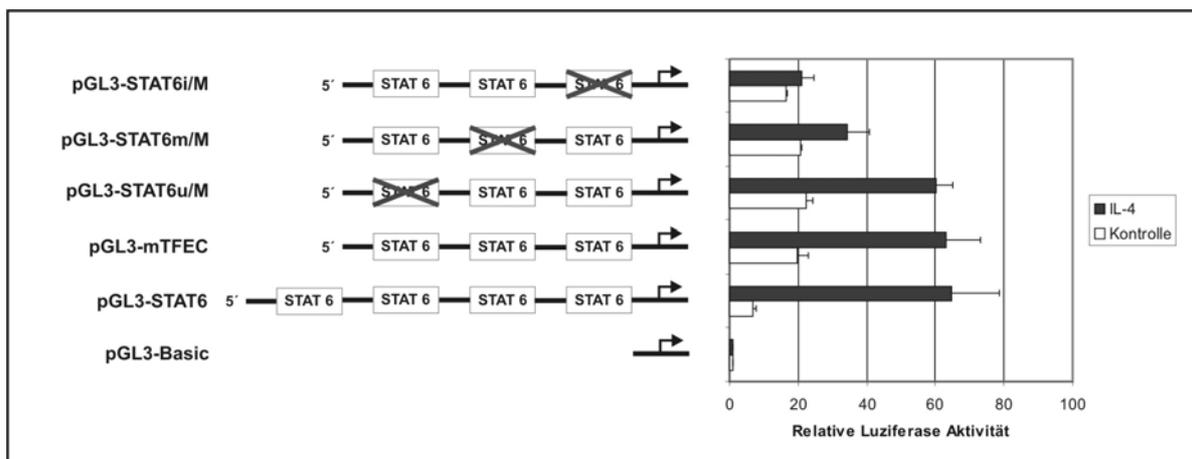


Abbildung 25: Einfluß der STAT6-Bindungsstellen im mTFEC-Promotor auf die IL-4-induzierte Promotoraktivität. Für die Promotoranalyse wurden RAW 264.7-Zellen mit pGL3-Basic, pGL3-STAT6 (Positivkontrolle mit vier repetitiven STAT6-Bindungsstellen), pGL3-mTFEC, pGL3-STAT6u/M (5'-gelegene STAT6-Bindungsstelle mutiert), pGL3-STAT6m/M (mittlere STAT6-Bindungsstelle mutiert), oder pGL3-STAT6i/M (3'-gelegene STAT6-Bindungsstelle mutiert) mit dem STAT6-Expressionsplasmid (pSTAT6) cotransfiziert. Die Transfektanten wurden mit 20 ng/ml IL-4 oder ohne Stimulus für 16 h behandelt und anschließend die Luciferase-Aktivität ermittelt. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden zwei unabhängige Experimente herangezogen (Mittelwert \pm SD).

4.1.6.3.2 DNA-Bindungsaktivität von STAT6 an dessen Bindungsstellen im mTFEC-Promotor in stimulierten BMM

In EMSAs wurde untersucht, welche der drei Bindungsstellen von dem Transkriptionsfaktor STAT6 erkannt wird und ob eine Behandlung von BMM mit IL-4 zu einer erhöhte STAT6-Bindung an dessen putative Erkennungsstellen im proximalen Promotor führt.

In diesem Experiment wurden nukleäre Proteine aus für 2 h mit IL-4 stimulierten und unstimulierten BMM von BALB/c-Mäusen mit den drei radioaktiv markierten Oligonukleotiden tfec-stat6i (3'-gelegene STAT6-Bindungsstelle), tfec-stat6m (mittlere STAT6-Bindungsstelle) und tfec-stat6u (5'-gelegene STAT6-Bindungsstelle) eingesetzt (siehe Abb. 26). Ein DNA-Protein-Komplex konnte nur zwischen den drei Sonden und den Proteinen aus den IL-4-stimulierten Zellen nachgewiesen werden, wobei es mit der Sonde tfec-stat6u nur zu einer sehr schwachen Bindung kam. Eine Verdrängung der Sonden wurde durch den Einsatz von nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden erreicht. Diese Kompetition konnte durch eine Mutation der einzelnen STAT6-Bindungsstellen in den nicht markierten Oligonukleotiden verhindert werden. Anhand von Supershift-Analysen mit STAT5- und STAT6-

Antikörpern konnte das bindende Protein als STAT6 identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass STAT6 auch nach einer IL-4-Stimulierung an die mittlere und 3'-gelegene Bindungsstelle im mTFEC-Promotor bindet

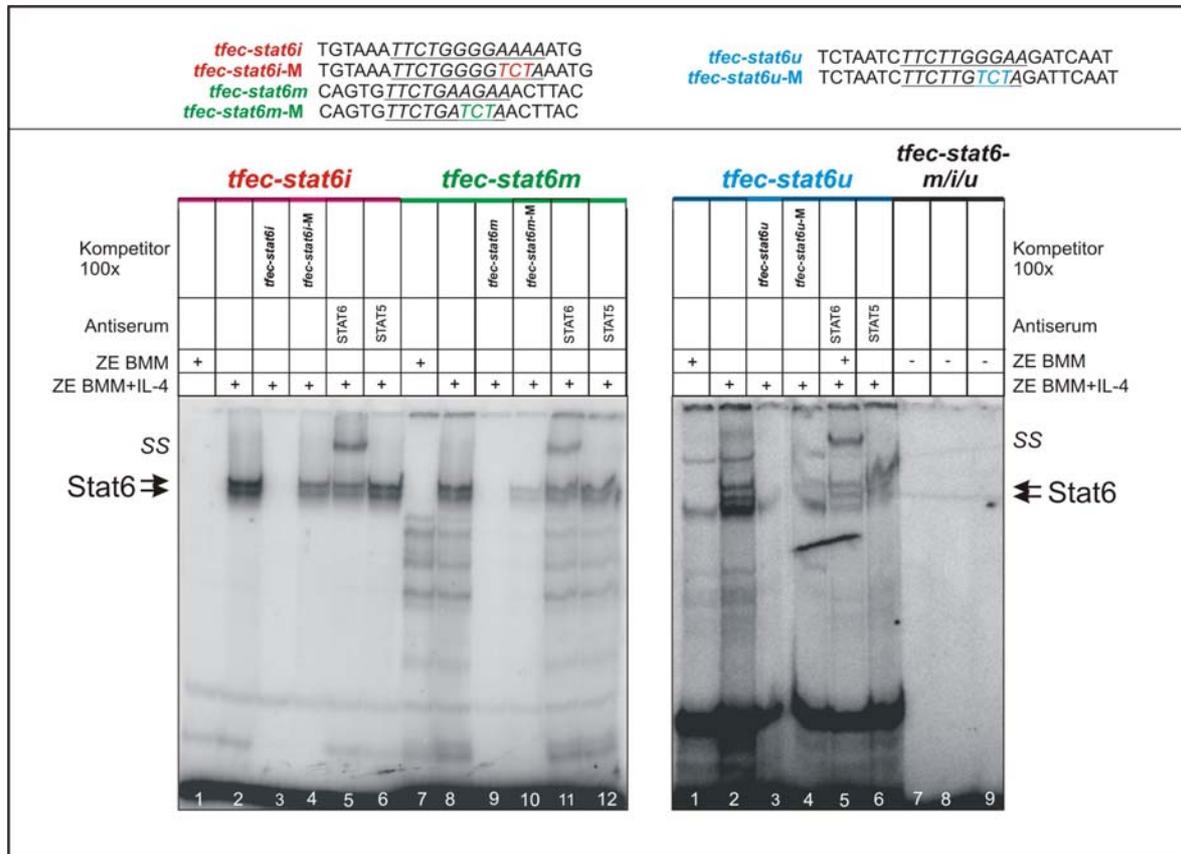


Abbildung 26: EMSA zur Untersuchung der drei STAT6-Bindungsstellen. Hierzu wurden nukleäre Proteine von unstimulierten und mit 10 ng/ml IL-4 für 2h stimulierten BMM und die radioaktiv markierten Oligonukleotiden *tfec-stat6i* (besitzt 5'-gelegene STAT6-Bindungsstelle), *tfec-stat6m* (besitzt mittlere STAT6-Bindungsstelle) und *tfec-stat6u* (besitzt 3'-gelegene STAT6-Bindungsstelle) verwendet. Als Kompetitoren wurden dieselben Oligonukleotide und Oligonukleotide mit den mutierten STAT6-Bindungsstellen (*tfec-stat6i-M*, *tfec-stat6m-M* und *tfec-stat6u-M*), aber ohne radioaktive Markierung, im 100-fachen Überschuß eingesetzt. Der Supershift wurde mit den Antikörpern anti-STAT6 und anti-STAT5 ausgeführt. Die Pfeile markieren die beiden spezifischen Banden und die Bezeichnung „SS“ kennzeichnet den „Supershift“.

4.1.6.3.3 Expression in IL-4 stimulierten BMM von STAT6^{-/-}-Mäusen

Einen weiteren Beweis für die Abhängigkeit der von IL-4 induzierten mTFEC-Expression von dem Transkriptionsfaktor STAT6 sollte die Analyse von STAT6-defizienten BMM erbringen.

BMM von STAT6^{-/-}-Mäusen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Gessner, Universität Erlangen) wurden 0, 2, 4, 6 oder 8 h mit IL-4 stimuliert. Als Kontrolle wurden IL-4 stimulierte BMM von BALB/c-Mäusen verwendet (siehe Abb. 27). Die mTFEC-Expression wurde wie in den Wildtyp-BMM durch IL-4 reguliert,

wobei die höchste Expression nach 2 h auftrat. In BMM aus STAT6^{-/-}-Mäusen wurde TFEC erwartungsgemäß nicht durch IL-4 hochreguliert.

Da weder nach 2 h noch nach 8 h eine erhöhte mTFEC-Expression beobachtet wurde, scheint die Abwesenheit von STAT6 eine Erhöhung der Expression nicht nur zu verzögern oder abzuschwächen, sondern vollständig zu verhindern. Dieses Ergebnis zeigte, dass STAT6 für die IL-4-Regulation von mTFEC essentiell ist.

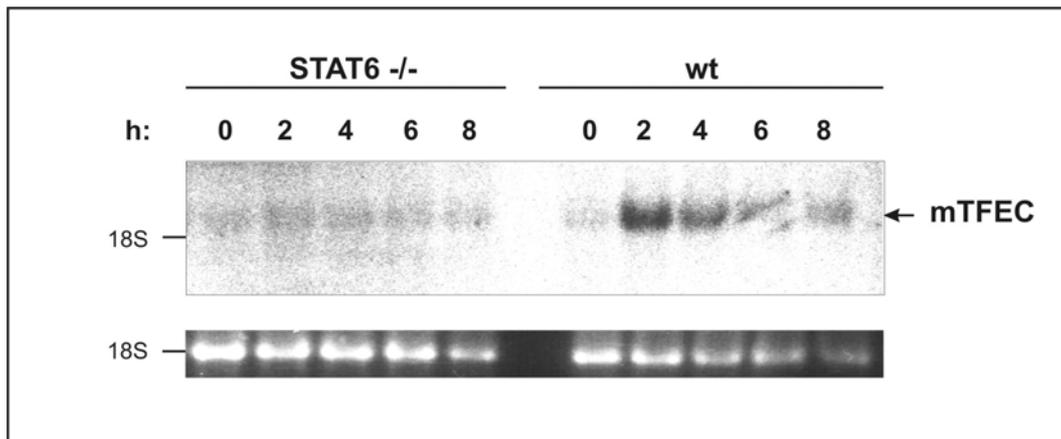


Abbildung 27: Northern Blot-Analyse der mTFEC-Expression in IL-4 stimulierten BMM von STAT6^{-/-} bzw. BALB/c-Mäusen. Die BMM wurden 0, 2, 4, 6 oder 8 h mit 10 ng/ml IL-4 stimuliert. Die Hybridisierung erfolgte mit der mTFEC-Sonde. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.1.7 Identifizierung einer Aktivierungsdomäne im C-Terminus von mTFEC

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung von Interaktionspartnern der MiT-Proteine. Dazu wurden über das Yeast Two Hybrid-System mit mMif-A interagierende Proteine gesucht.

In diesem Experiment wurde die N-terminale Sequenz -23 bis +471 bp (157 AS) von mMif-A als „bait“ benutzt. Diese Sequenz beinhaltete die Helix-formende CH-Domäne (33 AS; 56-88 AS) und die glutaminreiche QB-Domäne (18 AS; 127-144 AS), die putative Interaktionsdomänen darstellen. Die beiden Domänen sind stark konserviert und in allen Mitgliedern der MiT-Familie außer in TFEC und Mif-M enthalten. Nachdem sich die Eignung des Vektorkonstrukts mMif-pAS2.1-neu in Kontrolltransformationen gezeigt hatte, wurde damit eine cDNA-Bank mit murinen Genen „gescreent“ und 31 interagierende Klone isoliert. Eine anschließende Sequenzierung und weitere Kontrollexperimente mit den Klonen engten den Kreis der putativ interagierenden Proteine auf vier Klone ein.

Zur Klonierung des mMif-A-Fragments wurde in der MCS („multiple cloning site“; blau) des ursprünglichen Vektors pAS2.1 eine Basendeletion (rotes Kreuz)

vorgenommen, wodurch der modifizierte Vektor pAS2.1-neu entstand (siehe Abb. 28). Durch die Klonierung des mMitf-A-Fragments in den Vektor pAS2.1-neu kam das 3. Stopcodon des Vektors in das Leseraster. In dem letzten Kontrollversuch wurde untersucht, ob die vier Klone mit der Peptidsequenz zwischen dem 1. und 3. Stopcodon (14 AS; grün) interagierten. Dafür wurde der leere Vektor pAS2.1 (3. Stopcodon im Leseraster) oder der leere Vektor pAS2.1-neu (1. Stopcodon im Leseraster) mit den vier Klonen in Hefen transformiert und das Potential zur Aktivierung des lacZ-Promotors überprüft.

Das Ergebnis zeigte, dass alle vier Klone unspezifisch mit dem 14 AS langen Peptidfragment des Vektors und nicht mit dem mMitf-A-Fragment interagierten.

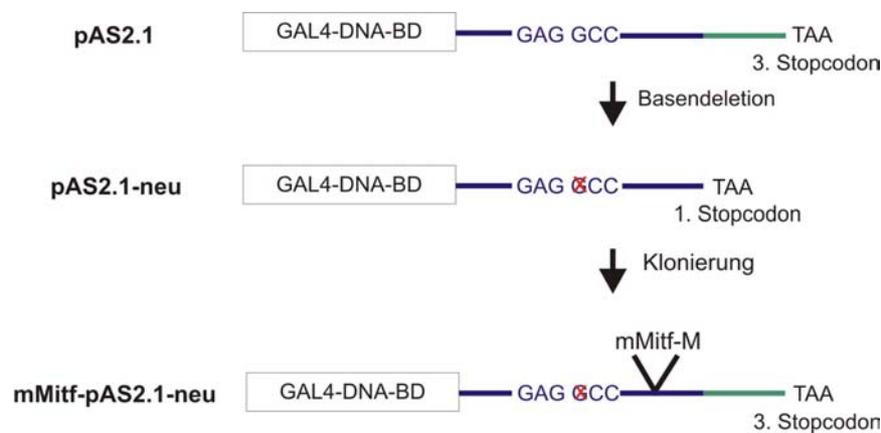


Abbildung 28: Klonierungsschema für den Vektor mMitf-pAS2.1-neu. Der Vektor pAS2.1-neu entstand durch eine Basendeletion (rotes Kreuz) in der MCS (blau) des pAS2.1-Vektors. Diese Modifikation brachte das 1. Stopcodon ins Leseraster. Die zusätzlichen 14 AS, die sich zwischen dem 1. und 3. Stopcodon befinden, sind grün markiert. Die Klonierung des mMitf-M-Fragments in den Vektor pAS2.1-neu ließ das 3. Stopcodon ins Leseraster kommen.

Nach dem somit erfolglosen Abschluß dieses ersten Experiments wurde ein zweiter Two Hybrid-Versuch mit dem vollständigen mTFEC und der bHLHZip-Domäne (105 AS; 99–204 AS) von mTFEC durchgeführt. Der vollständige Transkriptionsfaktor und das Fragment wurden wieder in den pAS2.1-Vektor kloniert und mit diesen Konstrukten die anfänglichen Kontrolltransformationen durchgeführt. Überraschenderweise war der vollständige Faktor mTFEC fusioniert mit der Gal4-DNA-Bindedomäne fähig, das lacZ-Promotor zu aktivieren, während die bHLHZip-Domäne inaktiv war. Da mTFEC genauso wie rTFEC und im Gegensatz zu hTFEC-L keine N-terminale Aktivierungsdomäne besitzt, wurde bis jetzt angenommen, dass mTFEC kein aktivierender sondern eher ein inhibierender Transkriptionsfaktor ist.

Diese Annahme wurde auch durch die Ergebnisse von Zhao *et al.*, 1993 unterstützt, die rTFEC als Repressor der TFE3-abhängigen Transaktivierung des IgH-Enhancers identifizierten. Unser Experiment deutete aber darauf hin, dass mTFEC auch als transkriptioneller Aktivator wirken kann.

Da die bHLHZip-Domäne von mTFEC kein Aktivierungspotential besaß, mußte die Aktivierungsdomäne entweder N- oder C-terminal liegen. Der C-Terminus besitzt eine serinreiche (18 AS; 294–311 AS) und daneben eine leicht konservierte (15 AS; 274–288 AS) Region, die auch bei den anderen MiT-Mitgliedern vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ließ das N-terminale Ende keine auffallenden Strukturen erkennen. Für einen quantitativen α -Galactosidase-Assay im Hefestamm Y190⁺ wurden neben den Originalkonstrukten noch drei weitere Konstrukte angefertigt, die verschieden große Deletionen im C-Terminus von mTFEC besaßen und wie die anderen Konstrukte mit der Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DNA-BD) fusioniert waren (Δ 293, Δ 272, Δ 222). Bei dem Konstrukt Δ 293 wurde die letzten AS 294–318 (serinreiche Region) deletiert, bei Δ 272 fehlten weitere 21 AS (leicht konservierte Region) und bei Δ 222 waren 98 AS am C-Terminus deletiert. Als negative Kontrolle wurde ein Konstrukt nur mit der DNA-Bindedomäne (leerer pAS2.1-Vektor) und als Positivkontrolle der vollständige Transkriptionsfaktor Gal4 verwendet. Nach der Transformation der Konstrukte wurde die Aktivität des MEL1-Reportergens, induziert durch den Faktor Gal4 oder die Fusionsprodukte (Gal4-DNA-BD-TFEC), gemessen (siehe Abb. 29). Die Deletion der serinreichen Region führte zu einem geringen Abfall der α -GAL-Aktivität, die sich durch eine Deletion der konservierten Region weiter verringerte. Eine zusätzliche Verkürzung des C-Terminus konnte die transkriptionelle Aktivität noch stärker vermindern. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mTFEC in der C-terminalen Region 222–317 AS eine Aktivierungsdomäne besitzt und somit nicht nur als Inhibitor, sondern auch als Aktivator bei der transkriptionellen Regulation wirken kann.

Ein kompletter Yeast Two Hybrid-Versuch zur Identifizierung von Interaktionspartnern der bHLHZip-Domäne von TFEC wurde aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.

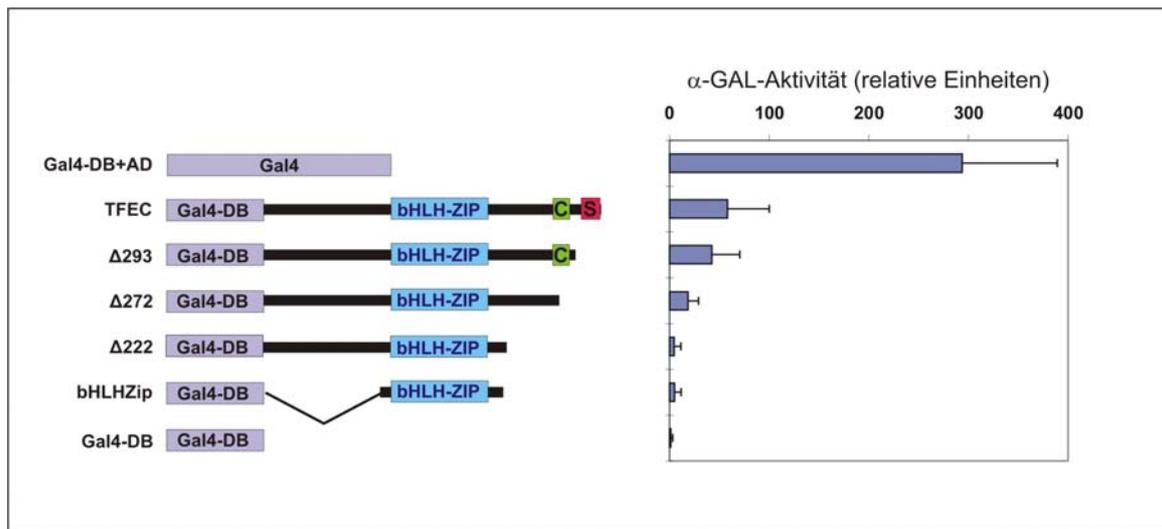


Abbildung 29: Quantitativer α -Galactosidase-Assay zur Lokalisierung der Aktivierungsdomäne. Der Assay wurde mit den Fusionskonstrukten Gal4-DNA-BD-mTFEC, Gal4-DNA-BD-bHLHZip, Gal4-DNA-BD- Δ 293, Gal4-DNA-BD- Δ 272 und Gal4-DNA-BD- Δ 222 durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der vollständige Transkriptionsfaktor Gal4 und als Negativkontrolle nur die Gal4-DNA-BD verwendet. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse von zwei unabhängigen Transformationen des Hefestammes Y190⁺ herangezogen, wobei die Durchschnittswerte von sechs einzelnen Hefekolonien für jedes Experiment verwendet wurden.

4.1.8 Microarray-Analysen mit IL-4-stimulierten BMM von 129/SvJ- und TFEC^{-/-}-Mäusen

Um zu sehen, in welchem molekularen Zusammenhang mTFEC eine Rolle spielen könnte, sollten von mTFEC regulierte Gene identifiziert werden. Dafür wurde die Methode der Microarray-Hybridisierung ausgewählt. Zuerst wurden BMM von 129/SvJ- und TFEC^{-/-}-Mäusen, die beide denselben genetischen Hintergrund hatten, generiert, und anschließend mit IL-4 für 16 h stimuliert oder als Kontrolle nicht behandelt. Mit der RNA aus diesen Zellen wurde in einem Microarray-Experiment cDNA-Chips (cDNA von 17,5 Tage alten C57BL/6-Embryos) hybridisiert. Um unspezifische Ergebnisse auszuschließen, wurde die RNA von zwei verschiedenen Ansätzen angefertigt. Bei dem Transport der RNA wurde diese allerdings so beschädigt, dass nur ein Experiment zum Vergleich von mit IL-4 stimulierten TFEC^{-/-}- und 129/SvJ-BMM durchgeführt werden konnte, von dem auch nur ein auswertbares Ergebnis erzielt wurde. Deswegen wurde noch ein zusätzliches Experiment zum Vergleich von unstimulierten und 16 h mit IL-4 stimulierten BALB/c-BMM durchgeführt. Die Ergebnisse beider Experimente wurden miteinander verglichen und diejenigen Klone isoliert, die in beiden Versuchen eine signifikant unterschiedliche Expression aufwiesen (siehe Abb. 30). Als Signifikant wurde ein Verhältnis der Signalstärken von wt+IL-4 / wt+unstim. und k.o.+IL-4 / wt+IL-4 entweder $\leq 0,5$ oder \geq

2 definiert. Zielgene sind also jeweils doppelt so stark bzw. nur halb so stark exprimiert; ein Verhältnis von 1 entspricht einer gleich starken Expression. Drei der Klone waren von bekannten (*Fbxo6b*, *Csf3r* und *Mrps6*) und die anderen sechs von unbekanntem Genen.

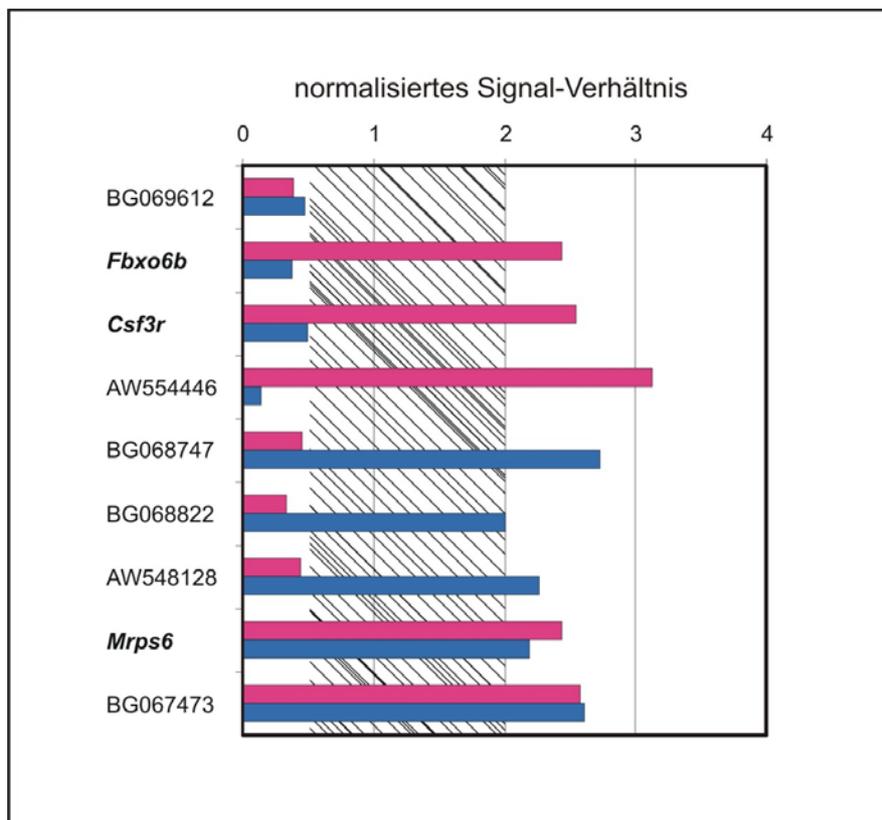


Abbildung 30: Normalisiertes Signal-Verhältnis von neun isolierten Klonen, die eine signifikant unterschiedliche Expression zeigten. Die roten Balken zeigen das Verhältnis von wt+IL-4 / wt+unstimuliert und die blauen Balken das Signal-Verhältnis von ko+IL-4 / wt+IL-4 an. Bei einer signifikanten Expressionsänderung ist das Verhältnis $\leq 0,5$ oder ≥ 2 . Ein Verhältnis von 1 gibt eine gleich starke Expression an. Die Ergebnisse wurden auf den Hintergrund (Signal auf keine cDNA enthaltende Chipfläche) normalisiert.

Diese neun Klone konnten aufgrund ihres Expressionsverhaltens in vier verschiedene Gruppen zusammengefasst werden:

Gruppe	Klone	TFEC ^{-/-} -BMM	Effekt von IL-4
1	BG069612	↓	↓
2	Fbxo	↓	↑
	Csfr3r		
	AW564446		
3	BG068747	↑	↓
	BG068822		
	AW548128		
4	Mrps6	↑	↑
	BG067473		

Tabelle 12: Gruppierung der neun isolierten Gene aufgrund ihres Expressionsmusters in IL-4-stimulierten BMM von TFEC^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen.

4.1.9 Überprüfung der Microarray-Ergebnisse durch Northern Blot-Analysen

Um die neun gefundenen Gene als IL-4-induzierbar bzw. als in IL-4-stimulierten 129/SvJ- und TFEC^{-/-}-BMM unterschiedlich exprimierte Gene zu bestätigen, wurden Northern Blot-Analysen mit 0, 2, 4, 8 oder 16 h IL-4-stimulierten BMM von 129/SvJ- und TFEC^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Die Hybridisierung mit Fragmenten der isolierten Klone war nicht eindeutig und bei vielen Hybridisierungen waren die Sonden nicht geeignet (nicht gezeigt). Eine andere Möglichkeit die neun Klone zu überprüfen, wäre eine semi-quantitative RT (Reverse Transkriptase)-PCR.

4.2 Charakterisierung des humanen TFEC-Homologen

Nach der Charakterisierung des murinen TFEC auf Protein- und mRNA-Ebene, der Analyse des murinen proximalen Promotors und nach dem Versuch, Zielgene von mTFEC zu identifizieren, wurde das humane TFEC untersucht. Die anfänglichen Fragen waren natürlich, ob IL-4 und LPS auch dessen Expression beeinflussen und vor allem, wo TFEC im Menschen exprimiert wird.

4.2.1 Expression von hTFEC in verschiedenen myeloischen und lymphatischen Zellen

Chung et al., 2001 fanden die Transkripte von hTFEC in der Milz, im Dickdarm und in Leukozyten. Daher stellte sich die Frage, ob hTFEC genauso wie die murine Isoform spezifisch in Makrophagen und DC oder zusätzlich noch in Lymphozyten exprimiert wird.

Im ersten Experiment wurde für die Northern Blot-Analyse RNA von humanen Monozyten, MNC (mononukleäre Zellen) und einer Mischpopulation von T- und B-Lymphozyten verwendet (siehe Abb. 31). Zur Hybridisierung wurde die vollständige CDR von hTFEC als Sonde benutzt, die bei einer Detektion des humanen TFEC zu vier unterschiedlich großen Banden (8,3; 7,2; 3,5 und 2 kb) führte, welche bereits von Chung et al., 2001 beschrieben worden waren. Bei diesem Versuch wurde hTFEC nicht in T- und B-Zellen, schwach in MNC und stärker in Monozyten detektiert. Die zweite Northern Blot-Analyse mit RNA von den myeloischen Zelllinien MM6, THP-1, U937 und HL-60 sowie von primären Monozyten, Makrophagen und DC zeigte, dass hTFEC in der Zelllinie THP-1 sehr stark und in den Linien U937 und MM6 schwach exprimiert wird. In der Zelllinie HL-60, die die undifferenzierteste Linie in dieser Reihe darstellt, konnte kein hTFEC detektiert werden. Innerhalb der Primärzellen wurde eine sehr starke Expression in Makrophagen und in DC und eine schwächere Expression in Monozyten nachgewiesen.

Die Ergebnisse aus diesen beiden Experimenten zeigen, dass das humane TFEC spezifisch in Monozyten, Makrophagen und DC, aber nicht in Lymphozyten exprimiert wird. Dabei wird hTFEC in Makrophagen und DC stärker exprimiert als in ihren Vorläuferzellen, den Monozyten.

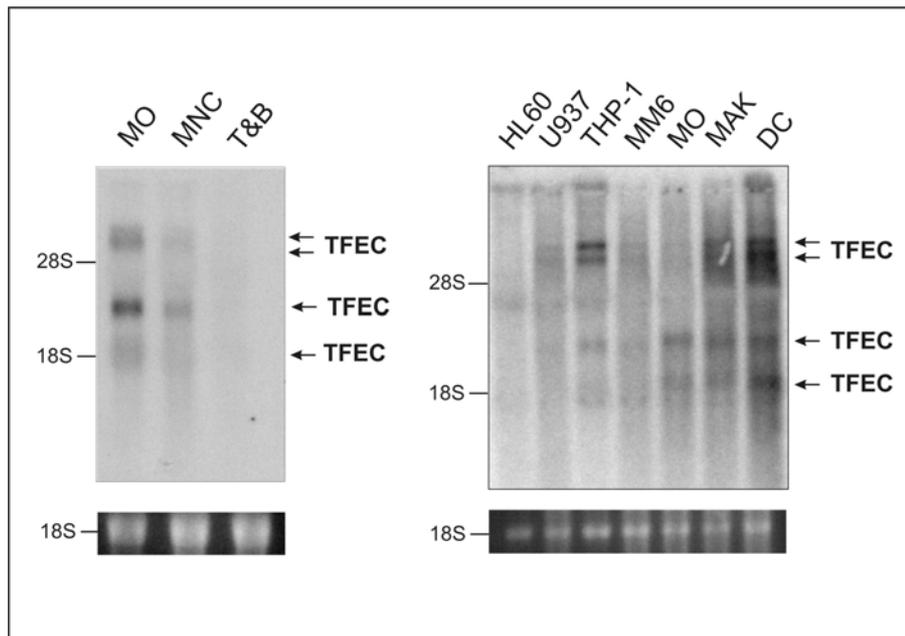


Abbildung 31: Expression von hTFEC-mRNA in verschiedenen Zelltypen. A. Northern Blot mit der RNA von Monozyten, MNC und einer Mischpopulation aus T- und B-Zellen. **B.** Northern Blot mit der RNA von den monozytären Zelllinien HL-60, U937, THP-1 und MM6 und primären Monozyten, Makrophagen und DC. Zur Hybridisierung wurde die hTFEC-cDNA als Sonde verwendet. Zur Kontrolle der Beladung ist die Ethidiumbromidfärbung der 18S-rRNA gezeigt.

4.2.2 Differenzierungsabhängige Expression von hTFEC

Zur Untersuchung der differenzierungsabhängigen Expression von hTFEC in monozytären Primärzellen wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von Monozyten und daraus differenzierten Makrophagen und DC durchgeführt (siehe Abb. 32). Die Primärzellen stammten von sechs verschiedenen Spendern. Von einem Spender wurden die Zellen aus zwei verschiedenen Elutriationen untersucht (1a+b), um eine eventuelle tagesabhängige Variation der hTFEC-Expression auszuschließen. Das Ergebnis zeigte, dass bei drei der Spender (1, 2 und 3) die Expression von hTFEC in den Makrophagen um das 2 bis 5,5-fache anstieg. In den entsprechenden DC kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der Expression, wobei diese etwas variierte. Teilweise war sie geringer (Spender 1), ungefähr gleich (Spender 2) oder höher (Spender 3) als in den Makrophagen. In allen Fällen war die Expression in den DC höher als in den Monozyten. Die Zellen von Spender 1 aus zwei Elutriation zeigten ein identisches Verhalten, es gab keine Variation. Bei zwei Spendern (5 und 6) war in Makrophagen nur eine sehr schwache und in DC keine Erhöhung der hTFEC-Expression nachweisbar. Die Makrophagen des Spenders 4 zeigten im Vergleich zu den Monozyten eine leichte erhöhte Expression, wobei hTFEC in DC schwächer als in Monozyten exprimiert war. Diese Daten deuten

darauf hin, dass die hTFEC Expression spenderabhängig ist, aber die Expression nicht innerhalb der einzelnen Spenderproben variieren.

Von allen Monozyten wurde die IL-6-Sekretion gemessen, um eine eventuelle Vorstimulierung der Zellen während der Elutriation festzustellen, die die Differenzierung der Zellen inhibieren würde (siehe Tabelle 2). Die erhöhte IL-6-Sekretion der Monozyten von den Spendern 5 und 6 zeigten eine Vorstimulierung der Zellen an. Da bei diesen Spendern keine erhöhte hTFEC-Expression in Makrophagen und DC beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass eine Vorstimulierung der Zellen und die damit einhergehende Differenzierungshemmung sich negativ auf die hTFEC-Expression auswirken. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es eine Tendenz zu einer differenzierungsabhängigen Expression von hTFEC gibt, aber diese stark vom Spender und vom Aktivierungszustand der Monozyten abhängig ist.

Um zu untersuchen, ob diese Spenderabhängigkeit mit Promotorpolymorphismen korreliert, wurde der proximale Promotor von 16 Spendern sequenziert. Die Promotorsequenzen wiesen jedoch keine Polymorphismen auf.

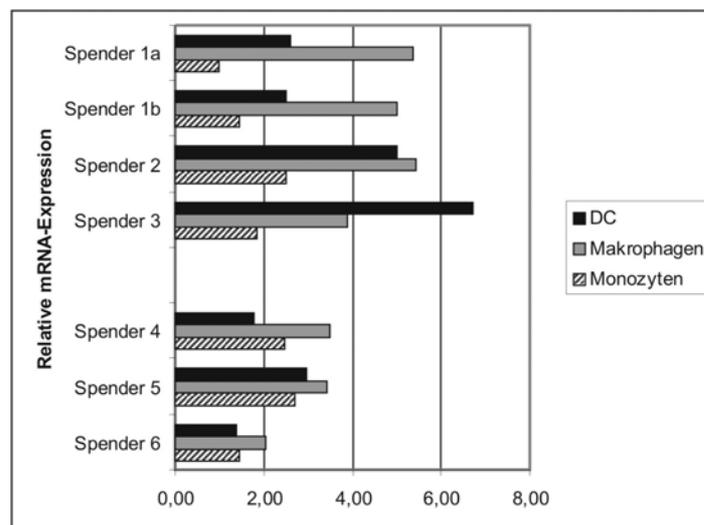


Abbildung 32: hTFEC-Expression in Monozyten, Makrophagen und DC von verschiedenen Spendern. Semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von Monozyten und daraus differenzierten Makrophagen und DC von sechs verschiedenen Spendern und aus zwei verschiedenen Elutriationen von einem Spender (Spender 1). Die Werte wurden auf β -Aktin normalisiert.

Spender	IL-6 (ng/ml)
1a	3
1b	4,1
2	42,6
3	2,6
4	1,2
5	> Nachweisgrenze
6	60

Tabelle 13: Auflistung der Spender, der Elutriationsdaten und der IL-6-Werte. Bei einer Vorstimulierung beträgt der IL-6-Wert ≥ 60 ng/ml.

4.2.3 Induktion in Monozyten und Makrophagen

Nach der Expression von hTFEC in Makrophagen und DC wurde die Regulation der hTFEC-Expression durch IL-4 und LPS untersucht.

4.2.3.1 hTFEC-Induktion durch LPS

Da der proximale humane Promotor wie der murine Promotor von TFEC eine NF- κ B-Bindungsstelle besitzt, war anzunehmen, dass hTFEC ebenfalls durch LPS reguliert werden kann. Um dies zu untersuchen, wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von 4 h oder 24 h mit LPS stimulierten Monozyten und Makrophagen und von unstimulierten Kontrollen durchgeführt (siehe Abb. 33). Die Monozyten und die daraus differenzierten Makrophagen wurden von drei verschiedenen Spendern gewonnen. In Monozyten konnte keine Erhöhung der hTFEC-Expression durch LPS erreicht werden, weder nach 4 h noch nach 24 h. In den für 4 h stimulierten Makrophagen war ebenfalls keine Veränderung zu beobachten. Jedoch zeigte sich eine 14-fache Erhöhung der hTFEC-Expression in für 24 h mit LPS stimulierten Makrophagen, was darauf hindeutet, dass LPS an der Regulation der murinen wie auch der humanen TFEC-Expression in Makrophagen beteiligt ist.

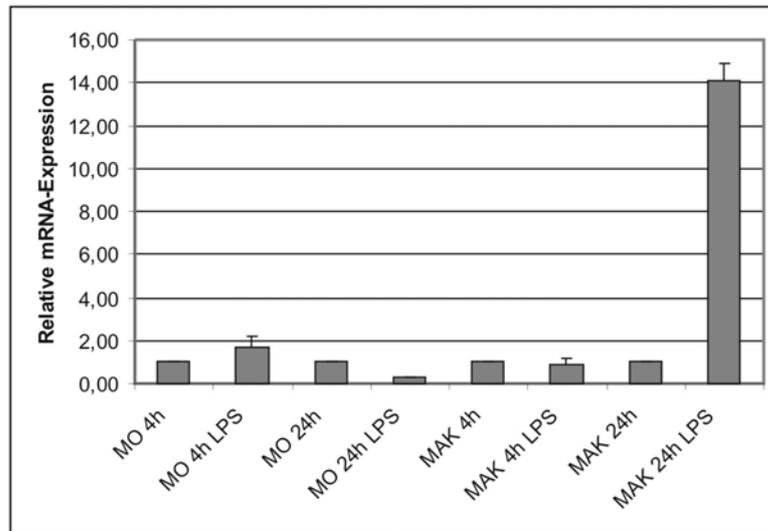


Abbildung 33: Semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von mit LPS stimulierten Monozyten und Makrophagen. Die Zellen wurden für 4 h oder 24 h mit 100 ng/ml LPS stimuliert und als Kontrolle nicht behandelt. Der Graph repräsentiert die Durchschnittswerte von drei Experimenten mit Zellen von unterschiedlichen Spendern. Die Werte wurden auf β -Aktin normalisiert (Mittelwert \pm SD).

4.2.3.2 hTFEC-Induktion durch IL-4

Bei der Regulation von hTFEC durch IL-4 könnte es einen Unterschied zwischen der murinen und humane Isoform geben, denn der humane proximale Promotor besitzt im Gegensatz zum murinen Promotor keine STAT6-Bindungsstellen. Das folgende Experiment sollte Aufschluß darüber geben, ob IL-4 die hTFEC Expression vielleicht noch über andere regulatorische Elemente beeinflussen kann oder ob IL-4 bei der Regulation der hTFEC-Expression keine Rolle spielt. Es wurde eine semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von Monozyten und daraus differenzierten Makrophagen, die für 4 h oder 24 h mit IL-4 stimuliert wurden, durchgeführt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet (siehe Abb. 34). Der Transkriptionsfaktor hTFEC wurde in Monozyten und Makrophagen nicht durch IL-4 reguliert, mit Ausnahme von für 4 h mit IL-4 stimulierten Monozyten, bei denen es zu einer sehr geringen Erhöhung der Expression (2,5-fach) kam. Hier gab es aber eine Variation zwischen den zwei untersuchten Spendern. Jedoch ist im allgemeinen die durch IL-4 induzierte Erhöhung der hTFEC-Expression im Vergleich zur durch LPS hervorgerufenen Induktion sehr gering.

i

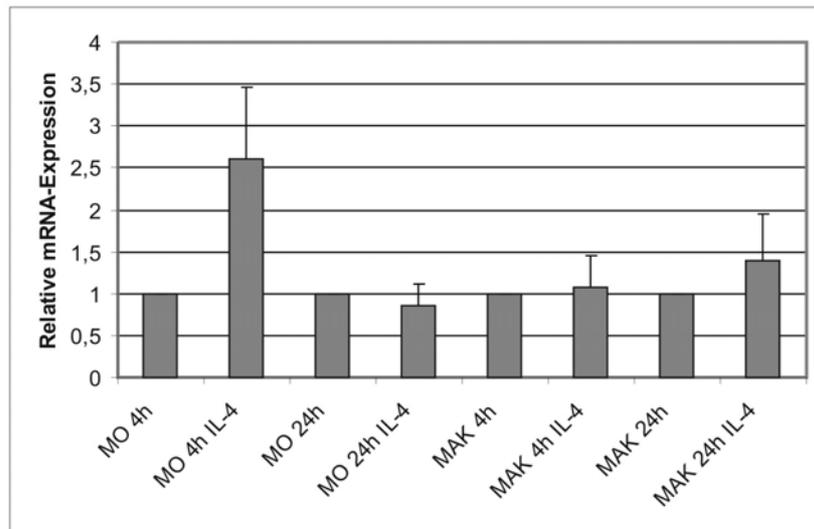


Abbildung 34: Semi-quantitative RT-PCR mit der RNA von mit IL-4-stimulierten Monozyten und Makrophagen. Die Zellen wurden für 4 und 24 h mit 500 U/ml IL-4 stimuliert und als Kontrolle nicht behandelt. Der Graph stellt die Durchschnittswerte von zwei Experimenten mit Zellen von unterschiedlichen Spendern dar. Die Werte wurden auf β -Aktin normalisiert (Mittelwert \pm SD).

5 Diskussion

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde mTFEC als Makrophagen- und Osteoklasten-spezifischer Transkriptionsfaktor identifiziert. Die Aufgabe dieser Doktorarbeit waren funktionelle Analysen und Untersuchungen über die Regulation von TFEC.

5.1 Wirkt das Maushomologe von TFEC als Aktivator oder Repressor?

Das TFEC-Homologe der Ratte wurde ursprünglich als Repressor der TFE3-abhängigen Transaktivierung des IgH-Enhancers identifiziert (Zhao *et al.*, 1993). Wie auch bei dem von unserer Arbeitsgruppe identifizierten Maushomologen fehlt bei rTFEC die N-terminale Aktivierungsdomäne (61-89; 29 AS), die im humanem TFEC vorhanden sein kann und diesem Faktor die Fähigkeit vermittelt, als transkriptioneller Aktivator wirken zu können (Yasumoto and Shibahara, 1997). Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass mTFEC als Repressor agiert.

In Yeast-One-Hybrid-Experimenten konnten wir jedoch feststellen, dass mTFEC als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne das lacZ-Reportergen aktivieren konnte. Mit Hilfe verschiedener Deletionskonstrukte konnten wir im C-Terminus von mTFEC eine Aktivierungsdomäne lokalisieren, welche für die transkriptionelle Aktivität verantwortlich war. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Ostrowsky wurde zusätzlich gezeigt, dass mTFEC mit einem weiteren MiT-Transkriptionsfaktor, mMif, Heterodimere bilden und in dieser Form oder als Homodimer den Osteoklasten- und Makrophagen-spezifischen Promotor des TRAP-Gens transaktivieren kann (Mansky *et al.*, 2002b).

Diese Daten deuten daraufhin, dass mTFEC abhängig vom Promotorkontext in Form eines Homodimers oder als Heterodimer mit anderen MiT-Familienmitgliedern als Aktivator oder als Repressor bei der Genregulation in Makrophagen, DC und Osteoklasten wirken kann. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Micorarray-Analysen unterstützt. Hier wurden in IL-4-stimulierten Makrophagen Gene identifiziert, deren Expression durch mTFEC positiv reguliert wird und andere Gene, deren Expression inhibiert wird. Welche zusätzlichen Faktoren für die eine oder die andere Wirkung verantwortlich sind, muß in weiteren Experimenten geklärt werden.

Um Anhaltspunkte auf die Funktion von TFEC zu erlangen, wurden von Steingrimsson *et al.*, 2002 histologische Untersuchungen von TFEC^{-/-}-Mäuse durchgeführt, die keinen veränderten Phänotyp im Vergleich zu Wildtypen aufdeckten. In Osteoklasten scheint TFEC eine redundante Funktion zu haben, da das Fehlen von mTFEC in diesen Zellen wahrscheinlich durch andere MiT-Familienmitglieder kompensiert werden kann. Allerdings scheint die Makrophagendifferenzierung normal abzulaufen. Weitere Hinweise auf die eigentliche Funktion von mTFEC wurden bis heute noch nicht gefunden.

Da die Untersuchungen der TFEC^{-/-}-Mäuse nur unter Standardbedingungen abliefen, könnten vielleicht Infektionsstudien einen zu Wildtypen unterschiedlichen Phänotyp aufzeigen und Hinweise auf die Funktion von mTFEC liefern. Um Anhaltspunkte auf das Expressionsverhalten von mTFEC zu bekommen, wurden BMM und BMDC mit Substanzen stimuliert, die auch bei Entzündungsprozessen auftauchen können.

5.2 Regulation und Funktion des Maushomologen von TFEC

Ein großer Teil der Doktorarbeit befaßte sich mit der Aufklärung der spezifischen Regulation von mTFEC. Die ersten Expressionsstudien zeigten, dass sowohl die pro-inflammatorischen Stimuli GM-CSF, LPS und sMALP-2 als auch die anti-inflammatorischen Interleukine IL-4 und IL-13 eine Erhöhung der mTFEC-Expression in BMM verursachten. Bei den weiteren Experimenten haben wir uns hauptsächlich auf die Untersuchung der Regulation durch LPS und IL-4 beschränkt.

Neben Makrophagen wurden auch *in-vitro* generierte DC auf mTFEC-Expression untersucht. Im Gegensatz zu Makrophagen war der Basallevel in unstimulierten DC sehr hoch, was sich wahrscheinlich auf das im Medium enthaltene IL-4 und GM-CSF zurückführen lässt. Diese beiden Zytokine scheinen schon während der Kultivierung eine Hochregulierung der mTFEC-Expression zu bewirken. Die Expression von mTFEC ließ sich unter DC-Kulturbedingungen weder durch IL-4 oder IL-13, noch durch LPS weiter erhöhen.

Eine Behandlung der unreifen DC mit LPS führt zu einer Aktivierung bzw. Reifung der DC, und dadurch zu einem ihrer neuen Funktionen entsprechend veränderten Expressionsmuster (Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Zhou and Tedder, 1996). Während der LPS-induzierten Reifung der DC kam es zu einer deutlichen

Verringerung der TFEC-Expression - hohe TFEC-Level sind *in-vitro* also auf unreife DC beschränkt.

5.2.1 Regulation der LPS-induzierten mTFEC-Expression

LPS, eine Komponente der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien, kann bereits in sehr geringen Dosen Makrophagen aktivieren. Dieser Vorgang beginnt mit der Bindung des LPS an das Serumprotein LBP (LPS bindendes Protein), welches das LPS zu dem Oberflächenmolekül CD14 transportiert. Dort interagiert LPS mit TLR4 („Toll-like receptor 4“) und dem sezernierten Protein MD2, und löst auf diesem Wege verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aus, die für die Antwort des angeborenen Immunsystems auf mikrobielle Infektionen notwendig sind (Guha and Mackman, 2001). Durch die Aktivierung des TLR4 kommt es zur Sekretion von Chemokinen (z.B. MCP-1), stimulierenden Zytokinen, wie TNF, IFN- β , IL-1, IL-8 und IL-12, und anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und IL-10. Diese Zytokine lösen nicht nur die Immunantwort der Zellen des adaptiven Immunsystems aus, sondern wirken auch als autokrine Stimuli auf die Makrophagen (Giacomini *et al.*, 2001; Sweet and Hume, 1996).

LPS kann über TLR4 vier verschiedene Signalwege aktivieren, die über die I κ B Kinase und drei verschiedene MAPKinasen (Ras-Raf, JNK und p38) gehen (Guha and Mackman, 2001). Die Signalkaskaden aktivieren direkt agierende Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, IRF-3 und NF- κ B), und sekundäre Transkriptionsfaktoren (z.B. Ets-2). Eine Aktivierung von IRF-3, NF- κ B und AP-1 führt auch zur Expression von IFN- β , das über die Transkriptionsfaktoren STAT1/2 und IRF-1 zur Aktivierung weiterer Gene führt (Doyle *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000; Takeda und Akira, 2000, Cuesta *et al.*, 2003). Auf diese Weise kann über LPS eine Vielzahl von Genen aktiviert werden, die den Entzündungsprozeß kontrollieren.

Da mTFEC stark durch LPS reguliert wird, war für uns von Interesse, über welche Transkriptionsfaktoren die LPS-Induktion der mTFEC-Expression vermittelt wird. Dafür wurden Promotoranalysen durchgeführt, die zeigten, dass LPS den proximalen Promotor von mTFEC, der putative Bindungsstellen für die LPS-induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B besitzt, aktivieren kann. Promotorstudien mit einer ortsspezifischen Mutation der putativen NF- κ B-Bindungsstelle und EMSA-Bindungsstudien identifizierten NF- κ B als essentiellen Transkriptionsfaktor für die LPS-induzierte Expression von mTFEC. Allerdings war dies nicht überraschend, da

NF- κ B an der Regulation der Expression sehr vieler Zielgene (z.B. LBP und IL-12), die größtenteils in der Immunantwort involviert sind, beteiligt ist (Liou, 2002; Pahl, 1999).

Neben den Expressionsstudien und den Promotoranalysen wurde versucht, auch das mTFEC-Protein in LPS-stimulierten Makrophagen nachzuweisen. Hierfür wurde ein polyklonaler Antikörper hergestellt, der nach der Aufreinigung auf Reinheit und Spezifität getestet und anschließend in Western Blot-Analysen eingesetzt wurde. Allerdings konnte das mTFEC-Protein nicht in LPS-stimulierten BMM nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte eine Instabilität des Proteins sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Chung *et al.*, 2001 unterstützt, die bei Immunfärbungen einen sehr niedrigen „steady state“-Level von hTFEC-S/L beobachten konnten. Außerdem fanden sie im C-Terminus von hTFEC zwei PEST-ähnliche Sequenzen, die Signale für eine regulierte und konstitutive Proteolyse darstellen (Rechsteiner and Rogers, 1996). Allerdings fanden wir unter Verwendung des Suchprogramms „PEST find Analysis“ von EMBnetAUSTRALIA im Protein von mTFEC und auch hTFEC nur Sequenzen, die eine sehr geringe Ähnlichkeit zu den PEST-Sequenzen besitzen.

Detailliertere Analysen der Proteinexpression sollten Aufschluß darüber geben, ob das Protein kurzfristig durch LPS induziert wird und an der weiteren LPS-Signaltransduktion in Makrophagen beteiligt ist. Falls es dann gelingen sollte, das LPS-stimulierte mTFEC in BMM nachzuweisen, wäre mTFEC ein sekundärer Transkriptionsfaktor in der NF- κ B-Signalkaskade und wäre in der LPS-vermittelten Immunantwort involviert. Weitere Experimente zur Identifizierung von mTFEC regulierten Genen in LPS-stimulierten Makrophagen würden anschließend anstehen. Dazu könnte eine Microarray-Analyse zum Vergleich von LPS-stimulierten BMM von TFEC^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verwendet werden.

5.2.2 Regulation der IL-4-induzierten mTFEC-Expression

Im Gegensatz zur transienten Hochregulation durch LPS wurde bei der Stimulierung von Makrophagen mit IL-4 eine lang andauernde und starke Induktion der TFEC-Expression, die wie bei LPS dosisabhängig ist, beobachtet. Da diese starke Induktion im direkten Zusammenhang mit der Funktion von TFEC in Makrophagen stehen könnte, wurde dieses Phänomen eingehend untersucht.

Eine Bindung von IL-4 oder IL-13 an ihre Rezeptoren aktivieren mehrere gemeinsame intrazelluläre Signalwege. Die Stimulierung kann über das IRS („Insulin receptor substrate“) zu Zellwachstum führen und durch die SHIP („SH2-containing inositol phosphatase“) vor Apoptose schützen und Zellproliferation einleiten. Außerdem wird der JAK/STAT6-Signalweg eingeleitet, der die Transkription von IL-4/IL-13-Zielgenen auslöst. IL-4 kann aber auch für ein negatives Feedback durch die Expression von SOCS-Proteinen verantwortlich sein, die die Aktivierung des IL-4/STAT6-Signalwegs durch eine Inhibierung der JAKs verhindern (Jiang *et al.*, 2000). Um die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die für die Regulation der IL-4-induzierten mTFEC-Expression verantwortlich sind, wurden unterschiedliche Promotoranalysen durchgeführt.

In initialen Experimenten war der mTFEC-Promotor weder in transienten noch in stabilen Transfektionen durch IL-4 induzierbar. Die fehlende Stimulierbarkeit ließ sich allerdings durch Cotransfektion eines STAT6-Expressionsplasmids wiederherstellen, wodurch eine Analyse der IL-4-abhängigen Reporteraktivität möglich wurde. Diese beeinträchtigte IL-4-Induzierbarkeit von Zielgenen in murinen Zelllinien scheint ein Defekt im IL-4/STAT6-Signalweg zu verursachen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des STAT6-abhängigen Ym1-Gens in RAW 264.7-Zellen gemacht (Welch *et al.*, 2002).

Der proximale Promotor von mTFEC besitzt drei putative STAT6-Erkennungssequenzen, welche für die IL-4-vermittelte Induktion der Promotoraktivität verantwortlich sein könnten und in Gelshift-Analysen STAT6-Bindung zeigten. In Promotoranalysen mit den mutierten STAT6-Bindungsstellen konnten wir beobachten, dass nur die mittlere und 3'-gelegene Erkennungssequenz an der IL-4-Antwort beteiligt sind. Auch scheinen die beiden funktionellen STAT6-Bindungsstellen kooperativ für die Transaktivierung des Promotors notwendig zu sein, da die Mutation einer der zwei Erkennungssequenzen ausreichte, die IL-4-induzierte Aktivierung des Promotors fast vollständig zu inhibieren. Ein weiteres Indiz für die STAT6-Abhängigkeit der IL-4-induzierten mTFEC-Expression war die fehlende IL-4-Induktion von TFEC in BMM von STAT6^{-/-}-Mäusen. Somit scheint die IL-4- (und vermutlich auch die IL-13-) induzierte mTFEC-Expression über den JAK/STAT6-Signalweg abzulaufen.

Neben der LPS-induzierten Proteinexpression wurde natürlich auch die IL-4-stimulierte mTFEC-Expression in Makrophagen untersucht. Trotz unspezifischer Hintergrundreaktivität des Antiserums konnten wir im Gegensatz zu den LPS-stimulierten BMM in IL-4-stimulierten Makrophagen spezifisch das mTFEC-Protein mit dem korrekten Molekulargewicht nachweisen. Im Vergleich zur mRNA, die bereits nach 2 h stark induziert war, ließ sich das Protein aber erst nach 12 h beobachten. Ein Problem bei den Proteinexpressionsstudien war die unregelmäßige Reproduzierbarkeit des Western Blot-Ergebnisses. Nur in zwei von sechs Wiederholungen mit neuen Gesamtzelllysaten konnte das mTFEC-Protein spezifisch detektiert werden. Der unregelmäßige und der im Vergleich zur mRNA-Expression verhältnismäßig späte Nachweis von mTFEC in IL-4-stimulierten BMM könnte den bereits erwähnten Verdacht auf Instabilität des Proteins stützen. Eine andere Ursache könnte eine geringe Affinität unseres anti-mTFEC-Antikörpers sein. Obwohl der selbstproduzierte Antikörper bei den Kontrolltests sehr spezifisch und affin war, schien sich die Affinität mit zunehmendem Alter des Antikörpers zu verringern, was die Charakterisierung des Proteins erschwerte. Eventuell detektiert das Serum nur noch sehr große Proteinmengen, die erst nach einer 12 h-igen IL-4 Stimulierung vorhanden sind. Für eine weitere Charakterisierung des mTFEC-Proteins ist es auf jeden Fall sinnvoll neue und bessere Antikörper herzustellen.

Trotzdem konnte eindeutig gezeigt werden, dass die mRNA und das Protein des Transkriptionsfaktors TFEC durch das T_H2-Zytokin induziert wurde.

5.2.3 Makrophagen und T_H1 / T_H2 dominierte Immunantwort – Rolle für TFEC in alternativ aktivierte Makrophagen der Maus?

Neben bakteriellen Produkten wie LPS, die stark aktivierend auf Makrophagen wirken, kontrollieren von T_H1- und T_H2-Zellen sezernierte Faktoren maßgeblich den Aktivierungszustand von Makrophagen. Beide T-Helferzelltypen unterscheiden sich dabei hinsichtlich der sezernierten Zytokine und fördern die Entwicklung unterschiedlicher Makrophagentypen. T_H1-Zellen sind für die pro-inflammatorische Immunantwort wichtig und sezernieren dafür IL-2, LT (Lymphotoxin) und INF- γ (Interferon- γ), die in der Entzündung und in der Organ-spezifischen Autoimmunität beteiligt sind. INF- γ ist der Hauptmediator der T_H1-Antwort und ist für die Aktivierung der Makrophagen und des Komplementsystems verantwortlich. Gegenspieler der T_H1-Zellen sind die T_H2-Zellen, die vor allem IL-4, IL-10, IL-13 und IL-5 sezernieren,

wobei IL-4 der Hauptmediator der T_H2-Antwort ist. IL-4 löst die Differenzierung von naiven CD4⁺T-Zellen in T_H2-Zellen aus und ist auch ein autokriner Wachstumsfaktor für T_H2-Zellen. Außerdem ist IL-4 noch ein Wachstumsfaktor für Mastzellen und stimuliert einen „Isotypenswitch“ der B-Zellen zu IgE, die für die Mastzelldegranulation verantwortlich sind. Eine andere wichtige Funktion von IL-4 ist die alternative Aktivierung von Makrophagen, die zu den klassisch aktivierten Makrophagen unterschiedliche Funktionen besitzen (Jankovic *et al.*, 2001; Reiner, 2001; Rengarajan *et al.*, 2000).

Alternativ aktivierte Makrophagen zeichnen sich durch eine verstärkte Fähigkeit zur Endozytose und Antigenpräsentation aus. Außerdem ist dieser Makrophagentyp durch die Expression von zellulären Matrixkomponenten wie Fibronectin beim Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt und unterstützt die Angiogenese des Heilungsprozesses durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF („vascular endothelial growth factor“) und bFGF („basic fibroblast growth factor“) (Sunderkotter *et al.*, 1991; Xiong *et al.*, 1998). Alternativ aktivierte Makrophagen sind vor allem während der Heilungsphase von akuten inflammatorischen Prozessen, in chronischen Entzündungen (z.B. Rheumatische Arthrose und Psoriasis) und im Wundheilungsprozeß wichtig (Djemadji-Oudjiel *et al.*, 1996; Kodelja *et al.*, 1997; Szekanecz *et al.*, 1994). Diese Makrophagen wurden aber auch in Tumoren gefunden. Diese Tumor-assoziierten Makrophagen fördern das Tumorstadium durch Wachstumsfaktoren (z.B. M-CSF) und lösen eine Toleranz gegenüber Tumoren aus (Mantovani *et al.*, 2002). Es wäre interessant einige Tumore auf mTFEC-Expression zu untersuchen, um einen Hinweis zu bekommen, ob mTFEC auch hier eine Rolle spielen könnte. Jedoch gibt es bereits ein Indiz, dass TFEC auch in den TAM exprimiert wird. Das Rattenhomolog von TFEC wurde aus einem Chondrosarkom isoliert, aber es war keine Expression in Chondrozyten nachweisbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass rTFEC von Makrophagen exprimiert wurde, die in den Tumor eingewandert waren.

Ein vor kurzem entdeckter Effekt von IL-4 ist die Inhibierung der TLR2- und TLR4-Expression. Der Mechanismus dieser Inhibierung ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Staege *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass IL-4 die NF-κB-Aktivierung in humanen vaskulären Endothelzellen durch STAT6, das mit NF-κB um dessen Bindungsstelle im Promotor von pro-inflammatorischen Zytokinen konkurriert, hemmt (Bennett *et al.*,

1997). Alternativ dazu, verstärkt IL-4 die mRNA-Degradation von pro-inflammatorischen Zytokinen in humanen Monozyten unabhängig von einer Interferenz mit NF- κ B (Wang *et al.*, 1995). Um zu untersuchen, ob TFEC bei der Inhibierung der TLR2- und TLR4-Expression beteiligt ist, könnten wieder die TFEC^{-/-}-Mäuse eingesetzt werden. Dabei könnte man die TLR2/4-Expression in IL-4-stimulierten Makrophagen von TFEC^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse vergleichen.

Um durch TFEC regulierte Gene in IL-4-stimulierten, alternativ aktivierten Makrophagen zu identifizieren, wurden die RNAs von IL-4-stimulierten BMM von TFEC^{-/-}-Mäusen und Wildtypmäusen mittels Microarray-Experimenten miteinander verglichen.

Da von den beiden Experimentansätzen jeweils nur ein verwertbares Ergebnis für die Auswertung benutzt werden konnte, wurden nur die Gene isoliert, bei denen eine stark signifikant unterschiedliche Expression festgestellt wurde. Von den neun isolierten Genen waren sechs unbekannt, die drei bekannten waren die Gene Fbxo6b (FbxW6), Csf3r (G-CSF-Rezeptor) und Mrps6 (ein ribosomales Protein der Mitochondrien). Unsere Experimente deuteten darauf hin, dass Fbxo6b und CSF3r bei einer IL-4-Stimulierung durch TFEC aktiviert und Mrps6 inhibiert wird.

Mrps6 ist ein ribosomales Protein in den ATP-produzierenden Mitochondrien (Reymond *et al.*, 2002). Durch eine Inhibierung der Mrps6-Expression könnte mTFEC die Translation in den Mitochondrien beeinträchtigen und auf diese Weise die ATP-Produktion der alternativ aktivierten Makrophagen stören.

FbxW6, ein F-box-Protein, ist eine variable Komponente des als Ubiquitin-Ligase agierenden SCF-Komplexes, der noch aus drei invariablen Komponenten (SKP1, CUL1 und RBX1) besteht. Bei dem Vorgang der Ubiquitinierung dient das F-box-Protein als Rezeptor für das Proteinsubstrat. FbxW6 ist ein Homolog des SEL-10 in *Caenorhabditis elegans* und reguliert anscheinend Notch und Presenilin (Maruyama *et al.*, 2001). Notch wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert und scheint hier eine bedeutende Rolle in der Differenzierung der Vorläuferzellen in T- und B-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und DC zu haben (Ohishi *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2003). Presenilin ist ein Transmembranprotein, das unter anderem die Abspaltung der Transmembrandomäne von anderen Proteinen wie „amyloid precursor protein“ (APP) und Notch reguliert und mit der vererbten Form der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht wird. Presenilin wurde auch in

Makrophagen bei Zerebralapoplexien nachgewiesen (De Strooper *et al.*, 1999; Tandon and Fraser, 2002; Yamada and Takashima, 1997). Falls mTFEC das FbxW6-Gen aktiviert, wäre es somit an der Proteindegradation beteiligt. So könnte TFEC zum Beispiel für die Degradation von Notch verantwortlich sein, das aufgrund seiner Differenzierungsfunktion nicht mehr in den ausdifferenzierten Makrophagen benötigt wird. Durch die Regulation der Ubiquitinierung vieler Proteine könnte mTFEC auf die Differenzierung und auf viele Funktionen der alternativ aktivierten Makrophagen Einfluß nehmen.

Csf3r ist der Rezeptor für den hämatopoetischen Wachstumsfaktor G-CSF, der hauptsächlich die Proliferation und Differenzierung von neutrophilen Vorläufern reguliert (Nomura *et al.*, 1986). G-CSF ist aber nicht nur auf die Granulopoese limitiert, sondern induziert auch die Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (Bolwell *et al.*, 1993; Tamura *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1996). G-CSF wurde auch durch seine hemmende Wirkung bei der allogenen Immunantwort bekannt. Es verhindert die Abstoßung des Transplantats und fördert sogar dessen Anwachsen (Kokai *et al.*, 1996; Ringden *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2002). Bemerkenswert ist der inhibitorische Effekt von G-CSF auf die inflammatorische Immunantwort von Makrophagen. Eine Vorstimulierung von Monozyten mit G-CSF vermindert die LPS-induzierte Sekretion von TNF, GM-CSF, IFN- γ und IL-12 und erhöht die Expression von IL-10 und MCP-1 (Saito *et al.*, 2002). Durch die Suppression von TNF kann G-CSF den Organismus vor den durch LPS hervorgerufenen septischen Komplikationen schützen (Gorgen *et al.*, 1992). Ebenso ist G-CSF durch die Inhibierung der IL-12-Sekretion fähig, die Balance zwischen T_H1 und T_H2-Zellen zu gunsten der T_H2-Zellen zu polarisieren (Pan *et al.*, 1995). Die von den T_H2-Zellen sezernierten Interleukine IL-4 und IL-10 lösen wiederum die alternative Aktivierung der Makrophagen aus, die eine Toleranz gegenüber Kontaktallergene und Tumore induzieren können und am Heilungsprozeß von Entzündungen beteiligt sind. Wenn in alternativ aktivierten Makrophagen mTFEC die Expression des G-CSF-Rezeptors erhöht, kommt es zu einem verstärkten G-CSF-„Signaling“, das die Monozyten bzw. Makrophagen zu einer Erniedrigung der IL-12- und Erhöhung der IL-10-Sekretion veranlaßt, die wiederum die T_H2-Antwort fördern. In diesem Fall würde mTFEC ein positives Feedback-Signal für die alternativ aktivierten Makrophagen sein. mTFEC könnte in diesem Zusammenhang aber auch vor einer GvHD schützen. GvHD wird durch T_H1-Zellen und ihre

proinflammatorischen Zytokine (TNF und IFN- γ) vermittelt. Dagegen scheinen T_H2-Zellen durch die Produktion von IL-4 und IL-10 einen schützenden Effekt gegen akute GvHD auszuüben. Wenn mTFEC über den G-CSF-Rezeptor die T_H2-Antwort fördert, könnte dieser Transkriptionsfaktor auch bei dem Schutz des Organismus vor einer akuten GvHD involviert sein (Krenger *et al.*, 1995). Um dies zu untersuchen könnte man IL-4-vorbehandelte TFEC^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse mit G-CSF behandeln und diese Tiere anschließend in einem GvHD-Modell einsetzen.

Zur Bestätigung dieser Gene als durch TFEC regulierte Gene wurden bei den Northern Blot-Analysen die 3'-Enden der cDNAs als Sonden verwendet. Meistens war der cDNA-Anteil der Sonde so gering, dass keine gute Hybridisierung möglich war und eine Bestätigung der Microarray-Analysen fehlschlug. Deshalb sollte zur Bestätigung eine semi-quantitative RT-PCR verwendet werden. Danach müsste die Regulation dieser Gene durch mTFEC in IL-4-stimulierten Makrophagen auch in Proteinexpressionsstudien nachgewiesen werden.

5.3 Regulation des humanen TFEC

Da das Mausehomolog von TFEC spezifisch in Makrophagen, DC und Osteoklasten exprimiert wird, war von Interesse, ob die in der Maus beobachtete Gewebespezifität auch im Menschen erhalten bleibt. TFEC wurde im Menschen ähnlich wie in der Ratte bis jetzt nur in der Niere, Milz und in Leukozyten nachgewiesen (Chung *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 1993). Obwohl nur zwei Isoformen von hTFEC bekannt sind (hTFEC-L und hTFEC-S), wurden vier spezifische mRNA-Spezies in Northern Blot-Analysen beobachtet (8,3; 7,2; 3,5 und 2,0 kb), im Gegensatz dazu hat mTFEC nur ein Transkript (Chung *et al.*, 2001). Die vier verschiedenen große Transkripte von hTFEC kommen wahrscheinlich durch die Nutzung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen zustande.

Eine Analyse der TFEC-Expression in peripheren Blutleukozyten ergab, dass hTFEC nicht in Lymphozyten, aber spezifisch in Monozyten, DC und Makrophagen exprimiert wird. Diese drei Zelltypen kommen auch in der Niere und Milz vor, wo ebenfalls eine hTFEC-Expression beobachtet wurde. Die geringe Expression von hTFEC in den MNC läßt sich wahrscheinlich auf die geringen Menge an Monozyten (15-20 %) in der MNC-Population zurückführen. Somit scheint TFEC im Menschen ebenso Zelltyp-spezifisch exprimiert zu sein wie das Mausehomologe von TFEC. Ob

hTFEC ebenfalls in menschlichen Osteoklasten exprimiert wird, ist noch nicht untersucht worden. Ein weiteres Indiz für die Konservierung der Makrophagen-spezifischen Expression von TFEC in Maus und Mensch ist die Tatsache, dass die Promotorsequenz beider Spezies weitgehend konserviert ist und die meisten putativen Bindungsstellen von Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren, wie PU.1 und C/EBP, erhalten geblieben sind. Eine Ausnahme bilden allerdings die drei Bindungsstellen für STAT6, die nur im murinen Promotor vorhanden sind.

Eine weitere Frage war, ob TFEC beim Menschen, wie in der Maus, im Laufe der monozytären Differenzierung hochreguliert wird. Ein Vergleich der mRNA-Expression in Monozyten, Makrophagen und DC ließ zumindest die Tendenz erkennen, dass TFEC während der Differenzierung zu Makrophagen und DC hochreguliert wird. Generell war die Expression von TFEC stark vom Spender und vom Aktivierungszustand der Monozyten abhängig. In den meisten untersuchten Fällen war jedoch ein differenzierungsabhängiger Anstieg der mRNA meßbar. Die inter-individuellen Unterschiede waren z.T. sehr deutlich. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung mit dem Vorhandensein von Promotorpolymorphismen korreliert, wurden von mehreren Spendern die proximalen TFEC-Promotoren sequenziert. Die Sequenzen waren identisch, was zwar nicht ausschließt, dass Polymorphismen im TFEC-Promotor in Einzelfällen für eine unterschiedliche Expression verantwortlich sein können. Aber als Hinweis dafür gesehen werden kann, dass es keine häufig vorkommenden, unterschiedlichen Allele des Promotors gibt. Eine andere Möglichkeit wäre ein Polymorphismus in einer noch nicht entdeckten Enhancer-Region von TFEC. Es könnte auch sein, dass die inter-individuellen Unterschiede unabhängig von den regulatorischen Bereichen sind und von spenderabhängig aktivierten Transkriptionsfaktoren weiter oberhalb des Signalweges abhängig sind. Hierzu müßten die für die Expression von TFEC wichtigen Transkriptionsfaktoren in den Spendern untersucht werden und nach Parallelen zu diesen inter-individuellen Unterschieden gesucht werden.

Wie in der Maus gezeigt, wurde hTFEC in Makrophagen durch LPS hochreguliert. Dagegen hatte das Interleukin IL-4 kaum einen Einfluß auf die Expression in Monozyten und Makrophagen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass TFEC im Menschen und in der Maus vor allem an der Funktion der klassischen Makrophagen

beteiligt sein könnte, aber nur in der Maus eine Funktion in der T_H2-Antwort bzw. in den alternativ aktivierten Makrophagen haben könnte.

Wie hTFEC in DC reguliert wird, wurde von uns nicht untersucht, aber Matsunaga *et al.*, 2002 erforschten die Genexpression während der Reifung von PBM-DC durch LPS und zeigten, dass hTFEC nach einer 4 h-igen LPS-Stimulierung exprimiert wird. Auch TNF scheint eine Induktion von hTFEC auszulösen.

Für funktionelle Analysen könnte die hTFEC-Expression in mononukleären Zellen durch eine Überexpression oder eine spezifische Suppression mittels siRNAs verändert werden, um Rückschlüsse auf eine Funktion im humanen System ziehen zu können. Außerdem sollte die TFEC-Expression auch noch auf der Proteinebene untersucht werden, wozu erst ein Antikörper gegen das humane TFEC produziert werden muß.

TFEC in der Maus und im Menschen unterscheiden sich in einigen Punkten. Zum einen gibt es von hTFEC zwei verschiedenen Spliceformen, eine lange Isoform (hTFEC-L), die im N- und C-Terminus eine Aktivierungsdomäne besitzt und eine kurze Isoform (hTFEC-S), die nur eine Aktivierungsdomäne im Carboxy-Ende des Gens enthält. Die lange und kurze Isoform von hTFEC besitzen die gleiche Bindungsaktivität, die transkriptionelle Aktivität von hTFEC-L ist jedoch um das dreifache höher als die von hTFEC-S (Chung *et al.*, 2001). Von TFEC in der Maus gibt es nur eine Isoform mit einer Aktivierungsdomäne im C-Terminus. Obwohl der proximale Promotor von TFEC in beiden Spezies stark konserviert ist, unterscheiden sie sich durch das Fehlen der drei putativen STAT6-Bindungsstellen im humanen Promotor. Unsere Ergebnisse deuten damit auf eine Veränderung der Funktion während der Evolution hin. In den Mäusen scheint TFEC sowohl in den Makrophagen der pro- als auch anti-inflammatorischen Immunantwort von Bedeutung zu sein, TFEC im Menschen scheint dagegen nur an der pro-inflammatorischen Antwort beteiligt zu sein. Die Regulation der TFEC-Expression scheint auch etwas in den DC zu variieren. Obwohl die murinen als auch die humanen DC mit IL-4 und GM-CSF generiert wurden, führte eine LPS-Stimulierung zu einer Verringerung der TFEC-Expression in murinen DC und zu einer Erhöhung der Expression in humanen DC. Somit könnte TFEC auch eine unterschiedlichen Funktion in murinen und humanen DC des Entzündungsprozesses haben.

6 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor TFEC ist ein Mitglied der MiT-Familie und wird spezifisch in Makrophagen und Osteoklasten exprimiert. Über die Regulation und Funktion von TFEC waren zu Beginn meiner Doktorarbeit noch keine Informationen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TFEC-Expression auf mRNA- und Proteinebene in unterschiedlich stimulierten murinen und humanen Makrophagen und DC und die Regulationsmechanismen der TFEC-Expression untersucht. Außerdem wurden von TFEC regulierte Gene in IL-4-stimulierten Knochenmarkszellen identifiziert, die jedoch noch bestätigt werden müssen.

Die Expressionsstudien von mTFEC in murinen Knochenmarksmakrophagen zeigten, dass mTFEC durch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, als auch durch die pro-inflammatorischen Stimuli GM-CSF, LPS und sMALP-2 reguliert wird, wobei die IL-4- und LPS-induzierte Expression von mTFEC dosisabhängig ist. In aus Knochenmarkszellen generierte DC wird die mTFEC-Expression durch LPS verringert. Ein Effekt von IL-4, IL-10 und IL-13 auf die mTFEC-Expression wurde wahrscheinlich durch die DC-Kulturbedingungen verhindert. Neben der Expression auf mRNA-Ebene wurde auch die Proteinexpression untersucht. Zur Charakterisierung des mTFEC-Proteins wurde ein polyklonaler Antikörper hergestellt, der gegen den C-Terminus von mTFEC gerichtet ist. Im Vergleich zur mRNA, die bereits nach 2 h stark induziert war, ließ sich das Protein erst nach 12 h beobachten. Jedoch konnte das LPS-induzierte mTFEC-Protein nicht detektiert werden. Mit Hilfe von Promotoranalysen und Bindungsstudien wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B als für die LPS-induzierte mTFEC-Expression essentieller Faktor identifiziert. Die IL-4-vermittelte Hochregulierung von mTFEC erfolgte über den STAT6-Transkriptionsfaktor, der zwei funktionelle Bindungsstellen im proximalen Promotor besitzt.

Bei funktionellen Analysen wurde eine serinreiche Aktivierungsdomäne im C-Terminus von mTFEC lokalisiert, die als Fusionsprodukt mit einer Gal4-DNA-Bindedomäne in einem Yeast-One-Hybrid-System das lacZ-Reportergen aktivieren konnte. Durch diese Aktivierungsdomäne ist mTFEC fähig, als aktivierender Transkriptionsfaktor bei der Genregulation zu agieren. Um Gene zu identifizieren, die in Makrophagen durch mTFEC reguliert werden, wurden mit Microarray-Analysen die

RNAs von IL-4-stimulierten Knochenmarksmakrophagen von TFEC^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verglichen. Dabei wurden neun Gene isoliert, die in IL-4-stimulierten Zellen durch mTFEC aktiviert bzw. reprimiert werden könnten. Falls die Ergebnisse der Analysen sich bestätigen, könnten die bekannten Gene einen Hinweis auf die Funktion von mTFEC geben.

Neben der TFEC-Expression in der Maus wurde auch die Expression im Menschen untersucht. Das humane TFEC wird ebenfalls nur in Monozyten, Makrophagen und DC, aber nicht in Lymphozyten exprimiert. Somit ist die Gewebespezifität sowohl in der Maus als auch im Menschen vorhanden. Hierbei scheint es eine Tendenz zu einer differenzierungsabhängigen Expression von hTFEC zu geben, die stark vom Spender und vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig ist. Die Sequenzierung des proximalen Promotors von mehreren Spendern zeigte jedoch keine Promotorpolymorphismen, die die inter-individuellen Unterschiede erklären könnten. Die Regulation von hTFEC wurde in Monozyten und Makrophagen untersucht. Mit Hilfe von semi-quantitativer RT-PCR wurde eine Induktion der hTFEC-Expression in für 12 h mit LPS behandelten Makrophagen beobachtet. Dagegen hatte IL-4 kaum einen Einfluß auf die Expression.

Diese Ergebnisse zeigen, dass TFEC in der Maus und im Menschen unterschiedlich reguliert wird. Das Maushomologe von TFEC wird in Makrophagen durch Substanzen der pro- und anti-inflammatorischen Immunantwort induziert. Dagegen ist TFEC im Menschen wahrscheinlich nur an der pro-inflammatorischen Antwort beteiligt. Hierbei scheint TFEC abhängig vom Promotorkontext als aktivierender oder als inhibierender Transkriptionsfaktor an der Genregulation beteiligt zu sein.

7 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pober, J. S. (1997). "Cellular and molecular immunology," W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.

Adcock, I. M. (1997). Transcription factors as activators of gene transcription: AP-1 and NF-kappa B. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **52**, 178-186.

Aliprantis, A. O., Diez-Roux, G., Mulder, L. C., Zychlinsky, A. and Lang, R. A. (1996). Do macrophages kill through apoptosis? *Immunol. Today* **17**, 573-576.

Anderson, K. L., Perkin, H., Surh, C. D., Venturini, S., Maki, R. A. and Torbett, B. E. (2000). Transcription factor PU.1 is necessary for development of thymic and myeloid progenitor-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 1855-1861.

Andreesen, R., Bross, K. J., Osterholz, J. and Emmrich, F. (1986). Human macrophage maturation and heterogeneity: analysis with a newly generated set of monoclonal antibodies to differentiation antigens. *Blood* **67**, 1257-1264.

Andreesen, R., Osterholz, J., Bross, K. J., Schulz, A., Luckenbach, G. A. and Lohr, G. W. (1983a). Cytotoxic effector cell function at different stages of human monocyte-macrophage maturation. *Cancer Res.* **43**, 5931-5936.

Andreesen, R., Picht, J. and Lohr, G. W. (1983b). Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J. Immunol. Methods* **56**, 295-304.

Artandi, S. E., Cooper, C., Shrivastava, A. and Calame, K. (1994). The basic helix-loop-helix-zipper domain of TFE3 mediates enhancer-promoter interaction. *Mol. Cell Biol.* **14**, 7704-7716.

Auger, M. J. and Ross, J. A. (1992). The biology of the macrophage. In "The Macrophage" IRL Press, Oxford.

Beckmann, H., Su, L. K. and Kadesch, T. (1990). TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* **4**, 167-179.

Behre, G., Whitmarsh, A. J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E., Davis, R. J. and Tenen, D. G. (1999). c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 4939-4946.

Bennett, B. L., Cruz, R., Lacson, R. G. and Manning, A. M. (1997). Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **272**, 10212-10219.

- Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* **238**, 1386-1392.
- Bolwell, B. J., Fishleder, A., Andresen, S. W., Lichtin, A. E., Koo, A., Yanssens, T., Burwell, R., Baucoco, P. and Green, R. (1993). G-CSF primed peripheral blood progenitor cells in autologous bone marrow transplantation: parameters affecting bone marrow engraftment. *Bone Marrow Transplant.* **12**, 609-614.
- Bonta, I. L. and Ben Efraim, S. (1993). Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. *J. Leukoc. Biol.* **54**, 613-626.
- Carr, C. S. (1990). A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins.
- Carr, C. S. and Sharp, P. A. (1990). A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **10**, 4384-4388.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752.
- Chen, H. M., Zhang, P., Voso, M. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Glass, C. K., Zhang, D. E. and Tenen, D. G. (1995). Neutrophils and monocytes express high levels of PU.1 (Spi-1) but not Spi-B. *Blood* **85**, 2918-2928.
- Chung, M. C., Kim, H. K. and Kawamoto, S. (2001). TFEC can function as a transcriptional activator of the nonmuscle myosin II heavy chain-A gene in transfected cells. *Biochemistry* **40**, 8887-8897.
- Clarke, S. and Gordon, S. (1998). Myeloid-specific gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 153-168.
- Clarkson, S. B. and Ory, P. A. (1988). CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J. Exp. Med.* **167**, 408-420.
- Cohn, Z. A. (1968). The structure and function of monocytes and macrophages.
- Dalpke, A. H., Oppen, S., Zimmermann, S. and Heeg, K. (2001). Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J. Immunol.* **166**, 7082-7089.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518-522.

Djemadji-Oudjil, N., Goerdts, S., Kodelja, V., Schmuth, M. and Orfanos, C. E. (1996). Immunohistochemical identification of type II alternatively activated dendritic macrophages (RM 3/1+3, MS-1+/-, 25F9-) in psoriatic dermis. *Arch. Dermatol. Res.* **288**, 757-764.

Downing, J. R. (1999). The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. *Br. J. Haematol.* **106**, 296-308.

Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A. and Springer, T. A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**, 245-254.

Era, T., Asou, N., Kunisada, T., Yamasaki, H., Asou, H., Kamada, N., Nishikawa, S., Yamaguchi, K. and Takatsuki, K. (1995). Identification of two transcripts of AML1/ETO-fused gene in t(8;21) leukemic cells and expression of wild-type ETO gene in hematopoietic cells. *Genes Chromosomes. Cancer* **13**, 25-33.

Ettensohn, D. B., Duncan, P. G. and Jankowski, M. J. (1989). The role of human alveolar macrophages in the allogeneic and autologous mixed leucocyte reactions. *Clin. Exp. Immunol.* **75**, 432-437.

Fahey, T. J., III, Tracey, K. J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L. S., Jones, W. G., Shires, G. T., Cerami, A. and Sherry, B. (1992). Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* **148**, 2764-2769.

Fanger, M. W., Shen, L., Graziano, R. F. and Guyre, P. M. (1989). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* **10**, 92-99.

Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S. W. and Nimer, S. D. (1995). The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* **11**, 2667-2674.

Frank, R. C., Sun, X., Berguido, F. J., Jakubowiak, A. and Nimer, S. D. (1999). The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene* **18**, 1701-1710.

Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C. and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 12355-12358.

Gaynor, R., Simon, K. and Koeffler, P. (1991). Expression of c-jun during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Blood* **77**, 2618-2623.

- Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I. and Coccia, E. M. (2001). Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol.* **166**, 7033-7041.
- Gorgen, I., Hartung, T., Leist, M., Niehorster, M., Tiegs, G., Uhlig, S., Weitzel, F. and Wendel, A. (1992). Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* **149**, 918-924.
- Grohmann, U., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity.* **9**, 315-323.
- Guerriero, A., Langmuir, P. B., Spain, L. M. and Scott, E. W. (2000). PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood* **95**, 879-885.
- Guha, M. and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**, 85-94.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. and Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301.
- Hemesath, T. J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Fisher, D. E. (1994). microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.* **8**, 2770-2780.
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* **74**, 395-404.
- Hohaus, S., Petrovick, M. S., Voso, M. T., Sun, Z., Zhang, D. E. and Tenen, D. G. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5830-5845.
- Hornyak, T. J., Hayes, D. J., Chiu, L. Y. and Ziff, E. B. (2001). Transcription factors in melanocyte development: distinct roles for Pax-3 and Mitf. *Mech. Dev.* **101**, 47-59.
- Ito, A., Kataoka, T. R., Kim, D. K., Koma, Y., Lee, Y. M. and Kitamura, Y. (2001). Inhibitory effect on natural killer activity of microphthalmia transcription factor encoded by the mutant mi allele of mice. *Blood* **97**, 2075-2083.
- Iwama, A., Osawa, M., Hirasawa, R., Uchiyama, N., Kaneko, S., Onodera, M., Shibuya, K., Shibuya, A., Vinson, C., Tenen, D. G. and Nakauchi, H. (2002).

Reciprocal roles for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) and PU.1 transcription factors in Langerhans cell commitment. *J. Exp. Med.* **195**, 547-558.

Janeway C.A. and Travers P. (1997). "Immunologie," Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.

Jankovic, D., Sher, A. and Yap, G. (2001). Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 403-409.

Jiang, H., Harris, M. B. and Rothman, P. (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 1063-1070.

Johnston, R. B. and Zucker-Franklin, D. (1988). The mononuclear phagocyte system. In "Atlas of Blood Cells: Function and pathology." (D. Zucker-Franklin, MF. Greaves, C. E. Gross, and A. M. Marmont, Eds.), G.Fischer Verlag, **Stuttgart**.

Jungi, T. W. and Hafner, S. (1986). Quantitative assessment of Fc receptor expression and function during in vitro differentiation of human monocytes to macrophages. *Immunology* **58**, 131-137.

Kirchner, H., Kruse, A., and Neustock, P. and Rinkl L. (1993). "Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems," Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Kitamura, Y., Morii, E., Jippo, T. and Ito, A. (2002). Effect of MITF on mast cell differentiation. *Mol. Immunol.* **38**, 1173-1176.

Klampfer, L., Zhang, J., Zelenetz, A. O., Uchida, H. and Nimer, S. D. (1996). The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14059-14064.

Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C. and Maki, R. A. (1990). The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* **61**, 113-124.

Kodelja, V., Muller, C., Tenorio, S., Schebesch, C., Orfanos, C. E. and Goerdts, S. (1997). Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology* **197**, 478-493.

Kokai, Y., Kaneko, H., Izuka, K., Matsuura, A. and Fujimoto, J. (1996). Inhibition of resistance to hemopoietic allo-grafts in granulocyte colony-stimulating factor transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* **26**, 115-119.

Kolb-Maurer, A., Kammerer, U., Maurer, M., Gentschev, I., Brocker, E. B., Rieckmann, P. and Kampgen, E. (2003). Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**, 255-262.

Krause, S. W., Kreutz, M., Zenke, G. and Andreesen, R. (1992). Developmental regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production during human monocyte-to-macrophage maturation. *Ann. Hematol.* **64**, 190-195.

Krause, S. W., Rehli, M., Heinz, S., Ebner, R. and Andreesen, R. (2000). Characterization of MAX.3 antigen, a glycoprotein expressed on mature macrophages, dendritic cells and blood platelets: identity with CD84. *Biochem. J.* **346 Pt 3**, 729-736.

Krenger, W., Snyder, K. M., Byon, J. C., Falzarano, G. and Ferrara, J. L. (1995). Polarized type 2 alloreactive CD4+ and CD8+ donor T cells fail to induce experimental acute graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **155**, 585-593.

Lamp, E. C. and Drexler, H. G. (2000). Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leuk. Lymphoma* **39**, 477-484.

Lee, M. E., Temizer, D. H., Clifford, J. A. and Quertermous, T. (1991). Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 16188-16192.

Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K. G. (1998). Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 28545-28548.

Liou, H. C. (2002). Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 537-546.

Lohmann-Matthes, M. L. (1981). The macrophage as a cytotoxic effector cell. *Haematol. Blood Transfus.* **27**, 49-57.

Lord, K. A., Abdollahi, A., Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D. A. (1993). Proto-oncogenes of the fos/jun family of transcription factors are positive regulators of myeloid differentiation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 841-851.

Lowenberg, B., Downing, J. R. and Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1051-1062.

Luchin, A., Purdom, G., Murphy, K., Clark, M. Y., Angel, N., Cassady, A. I., Hume, D. A. and Ostrowski, M. C. (2000). The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **15**, 451-460.

Luchin, A., Suchting, S., Merson, T., Rosol, T. J., Hume, D. A., Cassady, A. I. and Ostrowski, M. C. (2001). Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 36703-36710.

Mansky, K. C. (2002). The microphthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter.

Mansky, K. C., Marfatia, K., Purdom, G. H., Luchin, A., Hume, D. A. and Ostrowski, M. C. (2002a). The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 295-303.

Mansky, K. C., Sulzbacher, S., Purdom, G., Nelsen, L., Hume, D. A., Rehli, M. and Ostrowski, M. C. (2002b). The microphthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 304-310.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549-555.

Maruyama, S., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Ishida, N., Kawakami, K. and Nakayama, K. (2001). Characterization of a mouse gene (Fbxw6) that encodes a homologue of *Caenorhabditis elegans* SEL-10. *Genomics* **78**, 214-222.

Matsunaga, T., Ishida, T., Takekawa, M., Nishimura, S., Adachi, M. and Imai, K. (2002). Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand. J. Immunol.* **56**, 593-601.

McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., Lin, Y. L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H. F., Jordan, S. A., Jackson, I. J., Korsmeyer, S. J., Golub, T. R. and Fisher, D. E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **109**, 707-718.

McKenzie, J. L., Prickett, T. C. and Hart, D. N. (1989). Human dendritic cells stimulate allogeneic T cells in the absence of IL-1. *Immunology* **67**, 290-297.

McKercher, S. R., Torbett, B. E., Anderson, K. L., Henkel, G. W., Vestal, D. J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A. J., Wu, G. E., Paige, C. J. and Maki, R. A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* **15**, 5647-5658.

Merrell, K., Wells, S., Henderson, A., Gorman, J., Alt, F., Stall, A. and Calame, K. (1997). The absence of the transcription activator TFE3 impairs activation of B cells in vivo. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3335-3344.

Metchnikoff, E. (1905). "Immunity in Infective Disease.," Cambridge University Press.

Meuret, G. and Hoffmann, G. (1973). Monocyte kinetic studies in normal and disease states. *Br. J. Haematol.* **24**, 275-285.

Meyers, S., Lenny, N. and Hiebert, S. W. (1995). The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1974-1982.

Mollinedo, F., Gajate, C., Tugores, A., Flores, I. and Naranjo, J. R. (1993). Differences in expression of transcription factor AP-1 in human promyelocytic HL-60 cells during differentiation towards macrophages versus granulocytes. *Biochem. J.* **294 (Pt 1)**, 137-144.

Moore, K. J. (1995). Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet.* **11**, 442-448.

Morii, E., Ogihara, H., Kanno, T., Kim, D. K., Nomura, S., Ito, Y. and Kitamura, Y. (1999). Identification of the region of mi transcription factor which is responsible for the synergy with PEBP2/CBF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 53-57.

Motyckova, G., Weilbaecher, K. N., Horstmann, M., Rieman, D. J., Fisher, D. Z. and Fisher, D. E. (2001). Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 5798-5803.

Muller, R. (1995). Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends Genet.* **11**, 173-178.

Muller, W. A. and Randolph, G. J. (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 698-704.

Munn, D. H. and Cheung, N. K. (1989). Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J. Exp. Med.* **170**, 511-526.

Musson, R. A. (1983). Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity. *Am. J. Pathol.* **111**, 331-340.

Nathan, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest* **79**, 319-326.

Nathan, C. F., Murray, H. W. and Cohn, Z. A. (1980). The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* **303**, 622-626.

Nathan, C. F., Silverstein, S. C., Brukner, L. H. and Cohn, Z. A. (1979). Extracellular cytotoxicity by activated macrophages and granulocytes. II. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **149**, 100-113.

Nechushtan, H., Zhang, Z. and Razin, E. (1997). Microphthalmia (mi) in murine mast cells: regulation of its stimuli-mediated expression on the translational level. *Blood* **89**, 2999-3008.

Nomura, H., Imazeki, I., Oheda, M., Kubota, N., Tamura, M., Ono, M., Ueyama, Y. and Asano, S. (1986). Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *EMBO J.* **5**, 871-876.

Nuchprayoon, I., Meyers, S., Scott, L. M., Suzow, J., Hiebert, S. and Friedman, A. D. (1994). PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 5558-5568.

Ohishi, K., Katayama, N., Shiku, H., Varnum-Finney, B. and Bernstein, I. D. (2003). Notch signalling in hematopoiesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**, 143-150.

Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. and Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321-330.

Orkin, S. H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* **80**, 575-581.

Pabst, T., Mueller, B. U., Harakawa, N., Schoch, C., Haferlach, T., Behre, G., Hiddemann, W., Zhang, D. E. and Tenen, D. G. (2001). AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat. Med.* **7**, 444-451.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866.

Pahl, H. L., Scheibe, R. J., Zhang, D. E., Chen, H. M., Galson, D. L., Maki, R. A. and Tenen, D. G. (1993). The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J. Biol. Chem.* **268**, 5014-5020.

Pan, L., Delmonte, J., Jr., Jalonon, C. K. and Ferrara, J. L. (1995). Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* **86**, 4422-4429.

Peters, J. H., Gieseler, R., Thiele, B. and Steinbach, F. (1996). Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol. Today* **17**, 273-278.

Peters, J. H., Ruhl, S. and Friedrichs, D. (1987). Veiled accessory cells deduced from monocytes. *Immunobiology* **176**, 154-166.

Pevny, L., Lin, C. S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H. and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* **121**, 163-172.

Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C. and Knapp, W. (1996). Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14⁺ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **157**, 3850-3859.

Pozzi, L. A. and Weiser, W. Y. (1992). Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill tumor cells. *Cell Immunol.* **145**, 372-379.

Prieto, J., Eklund, A. and Patarroyo, M. (1994). Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol.* **156**, 191-211.

Pure, E., Inaba, K., Crowley, M. T., Tardelli, L., Witmer-Pack, M. D., Ruberti, G., Fathman, G. and Steinman, R. M. (1990). Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J. Exp. Med.* **172**, 1459-1469.

Radomska, H. S., Huettner, C. S., Zhang, P., Cheng, T., Scadden, D. T. and Tenen, D. G. (1998). CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4301-4314.

Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. and Muller, W. A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480-483.

Read, A. P. and Newton, V. E. (1997). Waardenburg syndrome. *J. Med. Genet.* **34**, 656-665.

Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271.

Reddy, V. A., Iwama, A., Iotzova, G., Schulz, M., Elsasser, A., Vangala, R. K., Tenen, D. G., Hiddemann, W. and Behre, G. (2002). Granulocyte inducer C/EBPalpha inactivates the myeloid master regulator PU.1: possible role in lineage commitment decisions. *Blood* **100**, 483-490.

Rehli, M., Lichanska, A., Cassady, A. I., Ostrowski, M. C. and Hume, D. A. (1999). TFEC is a macrophage-restricted member of the microphthalmia-TFE subfamily of basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factors. *J. Immunol.* **162**, 1559-1565.

- Reiner, S. L. (2001). Helper T cell differentiation, inside and out. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 351-355.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today* **21**, 479-483.
- Reymond, A., Camargo, A. A., Deutsch, S., Stevenson, B. J., Parmigiani, R. B., Ucla, C., Bettoni, F., Rossier, C., Lyle, R., Guipponi, M., de Souza, S., Iseli, C., Jongeneel, C. V., Bucher, P., Simpson, A. J. and Antonarakis, S. E. (2002). Nineteen additional unpredicted transcripts from human chromosome 21. *Genomics* **79**, 824-832.
- Rhoades, K. L., Hetherington, C. J., Rowley, J. D., Hiebert, S. W., Nucifora, G., Tenen, D. G. and Zhang, D. E. (1996). Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 11895-11900.
- Ringden, O., Remberger, M., Runde, V., Bornhauser, M., Blau, I. W., Basara, N., Holig, K., Beelen, D. W., Hagglund, H., Basu, O., Ehninger, G. and Fauser, A. A. (1999). Peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: a comparison with marrow transplantation. *Blood* **94**, 455-464.
- Riva, S., Nolli, M. L., Lutz, M. B., Citterio, S., Girolomoni, G., Winzler, C. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1996). Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. *J. Inflamm.* **46**, 98-105.
- Rohan, P. J., Stechschulte, D. J., Li, Y. and Dileepan, K. N. (1997). Macrophage function in mice with a mutation at the microphthalmia (mi) locus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **215**, 269-274.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* **180**, 83-93.
- Rosmarin, A. G., Caprio, D., Levy, R. and Simkevich, C. (1995). CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 801-805.
- Ross, I. L., Yue, X., Ostrowski, M. C. and Hume, D. A. (1998). Interaction between PU.1 and another Ets family transcription factor promotes macrophage-specific Basal transcription initiation. *J. Biol. Chem.* **273**, 6662-6669.
- Rothlein, R., Dustin, M. L., Marlin, S. D. and Springer, T. A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270-1274.
- Saito, M., Kiyokawa, N., Taguchi, T., Suzuki, K., Sekino, T., Mimori, K., Suzuki, T., Nakajima, H., Katagiri, Y. U., Fujimura, J., Fujita, H., Ishimoto, K., Yamashiro, Y. and

Fujimoto, J. (2002). Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion. *Exp. Hematol.* **30**, 1115-1123.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118.

Santiago-Schwarz, F., Belilos, E., Diamond, B. and Carsons, S. E. (1992). TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **52**, 274-281.

Sato, M., Morii, E., Takebayashi-Suzuki, K., Yasui, N., Ochi, T., Kitamura, Y. and Nomura, S. (1999). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with PU.1 and c-Fos: determination of their subcellular localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 384-387.

Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T. and Goding, C. R. (1997). CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene* **14**, 3083-3092.

Scheibenbogen, C. and Andreesen, R. (1991). Developmental regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF-alpha, and M-CSF. *J. Leukoc. Biol.* **50**, 35-42.

Schlesier, M., Krause, S., Drager, R., Wolff-Vorbeck, G., Kreutz, M., Andreesen, R. and Peter, H. H. (1994). Monocyte differentiation and accessory function: different effects on the proliferative responses of an autoreactive T cell clone as compared to alloreactive or antigen-specific T cell lines and primary mixed lymphocyte cultures. *Immunobiology* **190**, 164-174.

Schroeder, T., Kohlhof, H., Rieber, N. and Just, U. (2003). Notch signaling induces multilineage myeloid differentiation and up-regulates PU.1 expression. *J. Immunol.* **170**, 5538-5548.

Scott, E. W., Simon, M. C., Anastasi, J. and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**, 1573-1577.

Staege, H., Schaffner, A. and Schneemann, M. (2000). Human toll-like receptors 2 and 4 are targets for deactivation of mononuclear phagocytes by interleukin-4. *Immunol. Lett.* **71**, 1-3.

Steingrimsson, E., Moore, K. J., Lamoreux, M. L., Ferre-D'Amare, A. R., Burley, S. K., Zimring, D. C., Skow, L. C., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G. and . (1994). Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat. Genet.* **8**, 256-263.

Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Pathak, B., Hou, L., Arnheiter, H., Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. (2002). Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 4477-4482.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296.

Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. and Inaba, K. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411-416.

Sunderkotter, C., Goebeler, M., Schulze-Osthoff, K., Bhardwaj, R. and Sorg, C. (1991). Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol. Ther.* **51**, 195-216.

Sweet, M. J. and Hume, D. A. (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 8-26.

Szekanecz, Z., Haines, G. K., Lin, T. R., Harlow, L. A., Goerdts, S., Rayan, G. and Koch, A. E. (1994). Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **37**, 221-231.

Tachibana, M. (1999). A cascade of genes related to Waardenburg syndrome. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 126-129.

Tamura, M., Hattori, K., Nomura, H., Oheda, M., Kubota, N., Imazeki, I., Ono, M., Ueyama, Y., Nagata, S., Shirafuji, N. and . (1987). Induction of neutrophilic granulocytosis in mice by administration of purified human native granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 454-460.

Tamura, T. and Ozato, K. (2002). ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 145-152.

Tandon, A. and Fraser, P. (2002). The presenilins. *Genome Biol.* **3**, reviews3014.

Taniguchi, T., Tanaka, N., Ogasawara, K., Taki, S., Sato, M. and Takaoka, A. (1999). Transcription factor IRF-1 and its family members in the regulation of host defense. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 465-472.

- Tassabehji, M., Newton, V. E. and Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* **8**, 251-255.
- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D. and Zhang, D. E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**, 489-519.
- Tian, G., Erman, B., Ishii, H., Gangopadhyay, S. S. and Sen, R. (1999). Transcriptional activation by ETS and leucine zipper-containing basic helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2946-2957.
- Trinchieri, G. (1998). Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 365-396.
- Tsujimura, H., Tamura, T., Gongora, C., Aliberti, J., Reis e Sousa, Sher, A. and Ozato, K. (2003). ICSBP/IRF-8 retrovirus transduction rescues dendritic cell development in vitro. *Blood* **101**, 961-969.
- Vakkila, J., Sihvola, M. and Hurme, M. (1990). Human peripheral blood-derived dendritic cells do not produce interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, or interleukin 6. *Scand. J. Immunol.* **31**, 345-352.
- van Furth, R. (1982). Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* **161**, 178-185.
- van Furth, R. and Cohn, Z. A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415-435.
- van Schie, R. C., Verstraten, H. G., Tax, W. J., van den Berkortel, F. W., van de Winkel, J. G. and de Mulder, P. H. (1992). Effect of rIFN-gamma on antibody-mediated cytotoxicity via human monocyte IgG Fc receptor II (CD32). *Scand. J. Immunol.* **36**, 385-393.
- Vangala, R. K., Heiss-Neumann, M. S., Rangatia, J. S., Singh, S. M., Schoch, C., Tenen, D. G., Hiddemann, W. and Behre, G. (2003). The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood* **101**, 270-277.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Notebaert, S., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2002). Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor-kappaB p65 subunit. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 963-970.
- Vidalain, P. O., Azocar, O., Rabourdin-Combe, C. and Servet-Delprat, C. (2001). Measle virus-infected dendritic cells develop immunosuppressive and cytotoxic activities. *Immunobiology* **204**, 629-638.

- Voso, M. T., Burn, T. C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G. and Tenen, D. G. (1994). Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 7932-7936.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M. I., Egan, R. W. and Billah, M. M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 9558-9563.
- Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H. and Speck, N. A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 3444-3449.
- Weilbaecher, K. N., Hershey, C. L., Takemoto, C. M., Horstmann, M. A., Hemesath, T. J., Tashjian, A. H. and Fisher, D. E. (1998). Age-resolving osteopetrosis: a rat model implicating microphthalmia and the related transcription factor TFE3. *J. Exp. Med.* **187**, 775-785.
- Weilbaecher, K. N., Motyckova, G., Huber, W. E., Takemoto, C. M., Hemesath, T. J., Xu, Y., Hershey, C. L., Dowland, N. R., Wells, A. G. and Fisher, D. E. (2001). Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol. Cell* **8**, 749-758.
- Welch, J. S., Escoubet-Lozach, L., Sykes, D. B., Liddiard, K., Greaves, D. R. and Glass, C. K. (2002). TH2 cytokines and allergic challenge induce Ym1 expression in macrophages by a STAT6-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**, 42821-42829.
- Wewers, M. D. and Herzyk, D. J. (1989). Alveolar macrophages differ from blood monocytes in human IL-1 beta release. Quantitation by enzyme-linked immunoassay. *J. Immunol.* **143**, 1635-1641.
- Whitelaw, D. M. (1966). The intravascular lifespan of monocytes. *Blood* **28**, 455-464.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**, 589-607.
- Xiong, M., Elson, G., Legarda, D. and Leibovich, S. J. (1998). Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am. J. Pathol.* **153**, 587-598.
- Yamada, T., Kaneko, H., Iizuka, K., Matsubayashi, Y., Kokai, Y. and Fujimoto, J. (1996). Elevation of lymphocyte and hematopoietic stem cell numbers in mice transgenic for human granulocyte CSF. *Lab Invest* **74**, 384-394.
- Yamada, T. and Takashima, A. (1997). Presenilin 1 immunostaining using well-characterized antibodies in human tissues. *Exp. Neurol.* **148**, 10-12.

Yasumoto, K. and Shibahara, S. (1997). Molecular cloning of cDNA encoding a human TFEC isoform, a newly identified transcriptional regulator. *Biochim. Biophys. Acta* **1353**, 23-31.

Yergeau, D. A., Hetherington, C. J., Wang, Q., Zhang, P., Sharpe, A. H., Binder, M., Marin-Padilla, M., Tenen, D. G., Speck, N. A. and Zhang, D. E. (1997). Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat. Genet.* **15**, 303-306.

Young, J. W., Szabolcs, P. and Moore, M. A. (1995). Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **182**, 1111-1119.

Zhang, D. E., Fujioka, K., Hetherington, C. J., Shapiro, L. H., Chen, H. M., Look, A. T. and Tenen, D. G. (1994a). Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol. Cell Biol.* **14**, 8085-8095.

Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Chen, H. M. and Tenen, D. G. (1994b). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol. Cell Biol.* **14**, 373-381.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H. S., Auron, P. E., Tenen, D. G. and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8705-8710.

Zhao, G. Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M. G. and de Crombrughe, B. (1993). TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4505-4512.

Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2588-2592.

Zhu, X., Yeadon, J. E. and Burden, S. J. (1994). AML1 is expressed in skeletal muscle and is regulated by innervation. *Mol. Cell Biol.* **14**, 8051-8057.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Sabine Sulzbacher