

Molekulare Analyse der regulierten Genexpression
in NK/T-Zellen
am Beispiel des humanen Fc γ RIIIA Rezeptors

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

Genehmigte Dissertation
von
Diplom Biologe Frank Heusohn
geboren am 27. 04. 1964, in Walsrode

2001

Referent:

Prof. Dr. W. Müller

Abt. Physiol. Chemie

Med. Hochschule Hannover

Korreferent:

PD Dr. J. E. Gessner

Abt. Klin. Immunologie

Med. Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 11.07.2001

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis September 2000 in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. J. E. Gessner, Abteilung Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. R. E. Schmidt) mit Unterstützung der DFG, Projekt Ge 892/5-1 und Projekt Ge 892/4-2 durchgeführt.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Molekulare Analyse der regulierten Genexpression in NK/T-Zellen am Beispiel des humanen Fc γ RIIIA Rezeptors" selbständig verfasst sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, April 2001

SUMMARY

Keywords: NK cells / Fc receptor / gene regulation

Natural killer (NK) cells play an important role in innate immunity and tumor defence mechanisms. They are regulated by opposing signals from distinct receptor systems that either induce or inhibit natural killing activity. In addition, activation of NK cells can occur via Fc receptors for IgG (Fc γ R) leading to antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The most important Fc γ R on NK cells is the transmembrane-anchored Fc γ R1A isoform. Fc γ R1A expression on NK cells, macrophages and γ/δ T cells is under the control of alternative promoters (including Pprox and Pmed1) in the 5'-end flanking region of the Fc γ R1A gene.

The current work has identified the Pprox (-198/-10) promoter to regulate Fc γ R1A expression in both NK/T cells and macrophages, while the Pmed1 (-942/-850) promoter is more specific by conferring promoter activity on a Luciferase reporter gene exclusively in NK/T cell lines YT and Jurkat. Deletion of the first 21bp (-942/-921) of the Pmed1 results in strong decreased promoter activity in these NK/T cell lines. This may suggest that a NK/T cell-specific transcription factor interacts with the 21bp fragment. Alternatively, an ubiquitous transcription factor is involved and the subsequent cooperation with another factor bound to the -921/-850 portion of Pmed1 is responsible for expression of Fc γ R1A in NK/T cells. Further investigations demonstrate a critical requirement of a Sp1-recognition motif located to the 21bp fragment, as assessed by consecutive substitution mutants. The functional importance of Sp1 has been verified by cotransfection experiments in Sp1 deficient SL2 *Drosophila* cells using the pPac-Sp1 expression vector and the TK-promoter/Luciferase gene cassette under control of three copies of the 21bp fragment. Moreover, mobility shift assays show a single dominant DNA-protein complex which specifically disappears after treatment with a polyclonal anti-Sp1 antibody. These results, together with the observation that the active -921/-850 fragment but not the 3-fold 21bp sequence is able to confer NK/T cell specificity on both TATA-box and TK-promoter/Luciferase gene cassettes, provide evidence that the interaction of Sp1 with the 21bp fragment of Pmed1 is required for full transcription activity but not sufficient for cell-type specificity. Therefore, it has to be concluded that Sp1 needs cooperation with an unknown transcription factor to target cell type-specific expression of the Fc γ R1A gene in NK/T cells.

INHALTSVERZEICHNIS

SUMMARY

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Natürliche Killer (NK) Zellen.....	1
1.2	Fc-Rezeptoren.....	5
1.3	Fc γ -Rezeptoren	6
1.3.1	Fc γ RI (CD64).....	9
1.3.2	Fc γ RII (CD32).....	11
1.3.3	Fc γ RIII (CD16)	12
1.4	Transkription.....	15
1.4.1	Transkriptionsinitiation in eukaryontischen Zellen	16
1.4.2	Aktivierung der Transkription durch regulatorische Faktoren.....	17
1.4.3	Transkriptionelle Kontrolle in der Hämatopoese	18
1.5	Ziel der Arbeit.....	21
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Zelllinien	22
2.1.2	Bakterienstämme (<i>E. coli</i>).....	23
2.1.3	Plasmide und Vektoren	23
2.1.5	Antikörper	25
2.1.6	Chemikalien	26
2.1.7	Feinchemikalien	26
2.1.8	Enzyme	27
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.2	Lösungen und Medien.....	28
2.2.1	Lösungen und Medien für die Zellkultur	28
2.2.2	Medien für die Bakterienkultur	28
2.3	Zellbiologische Methoden	29
2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	29
2.3.2	Titerbestimmung.....	29
2.3.3	Auftauen von Zellen	29
2.3.4	Einfrieren von Zellen.....	29
2.3.5	Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) und polymorphkerniger, neutrophiler Zellen (PMN)	30
2.4	Molekularbiologische Methoden	31
2.4.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.4.2	Agarosegelelektrophorese	32
2.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
2.4.5	Restriktionsspaltung von DNA	34

2.4.6	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA	34
2.4.7	Ligation.....	34
2.4.8	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.4.9	Herstellung kompetenter Bakterien.....	36
2.4.10	Isolierung von Plasmid-DNA	37
2.4.11	DNA-Sequenzierung.....	39
2.5	Funktionelle Reporteranalyse.....	40
2.5.1	Transiente Transfektion.....	40
2.5.2	Lösungen für die Transfektionsmessung	41
2.5.3	Messung der Transaktivierung (Luciferase Assay)	41
2.6	DNA-Protein Bindungsanalysen.....	43
2.6.1	Isolierung von Kernproteinen.....	43
2.6.2	Radioaktivmarkierung von dsOligonukleotiden.....	44
2.6.3	Elektro-Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	44
2.7	Biochemische und funktionelle Identifizierung des Sp1 Transkriptionsfaktors.....	48
2.7.1	Biochemischer Nachweis (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Western-Blot)	48
2.7.2	Funktioneller Nachweis (Kotransfektion von SL2 <i>Drosophila</i> Zellen).....	51
3.	ERGEBNISSE.....	52
3.1	Strukturen und funktionelle Analyse der Zellspezifität der FcγRIIIA und FcγRIIIB Rezeptorgene.....	52
3.1.1	Nachweis alternativer Pmed1 und Pprox Promotoren.....	52
3.1.2	Der Pmed1 Kontrollbereich des FcγRIIIA ist ein NK/T-Zellspezifischer Promotor	55
3.2	Charakterisierung der 21bp-5'-Region des Pmed1 des FcγRIIIA Promotors	58
3.2.2	Mutationsdeletionsanalyse	61
3.2.3	DNA-Protein Bindungsanalyse	63
3.3	Effekt der 21bp 5'-Region im Kontext heterologer Promotorsysteme: Induktion der Transkriptionsaktivität, nicht aber der NK/T-Zellspezifität	67
3.3.1	Herstellung der Reportergenkonstrukte.....	67
3.3.2	Expressionsstudien mit den heterologen Luciferase-Vektoren.....	69
3.4	Sp1 nicht aber Ets bestimmt die Transkriptionsaktivität der 21bp 5'-Region des FcγRIIIA Pmed1 Promotors	72
3.4.1	DNA-Sp1 Bindungsanalysen.....	72
3.4.2	Sp1-Transkriptionsinduktion in SL2 <i>Drosophila</i> Zellen.....	74
3.5	Die 71bp 3'-Region des Pmed1 im FcγRIIIA Gen nicht aber im FcγRIIIB Gen vermittelt NK/T-Zellspezifität	77
3.5.1	Herstellung und Funktionsanalysen von Pmed1 3'-pTATA Vektorkonstrukten	77
3.5.2	Herstellung und Funktionsanalysen von Pmed1-3'-pTK Vektorkonstrukten	80
3.5.3	Kartierung von DNA-Protein-Bindungsdomänen in der 3'-Region des FcγRIIIA Pmed1 ..	82
3.6	Modell der Transkriptionsregulation des FcγRIIIA-Gens durch den Pmed1-Promotor.....	84
4.	DISKUSSION.....	86
4.1	Ausgangspunkt	86
4.2	Pmed1 NK/T-Zellrestriktion	88

4.3	Einfluss der 21bp-Region des Pmed1.....	89
4.4	Die 5´-71bp-Region vermittelt Zelltypspezifität.....	93
4.5	Sp1 und Genregulation	94
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATUR.....	98
7.	ABKÜRZUNGEN	111
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	113
	LEBENS LAUF	114
	DANKSAGUNG.....	115

1. EINLEITUNG

1.1 Natürliche Killer (NK) Zellen

NK-Zellen sind zytotoxische, aus dem Knochenmark stammende Lymphozyten, die aus einem gemeinsamen Vorläufer mit T-Zellen generiert werden (Spits et al., 1995). Sie sind ein Instrument der zellulären natürlichen Immunität. Die „Natürliche Zytotoxizität“ ist die Fähigkeit von NK-Zellen antivirale und gegen Tumorzellen gerichtete Immunität ohne vorherige Sensibilisierung und in Abwesenheit von Antikörpern zu vermitteln. NK-Zellen repräsentieren 5-14% der PBL (*Peripheral Blood Lymphocytes*) und eine Subpopulation von gewebsinfiltrierenden Lymphozyten. Humane NK-Zellen werden durch die Expression CD56 (NCAM/NKH-1) und CD16A (FcγRIIIA), sowie der gleichzeitigen Abwesenheit des T-Zellmarkers CD3 charakterisiert. Für murine NK-Zellen ist bei einigen Mausstämmen das NK1.1- und 2B4-Antigen als NK-Zellmarker etabliert. NK-Zellen können eine Vielzahl von Zytokinen, einschließlich IFN γ , TGF- β 1, TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, G-CSF, GM-CSF und CC-Chemokine, wie z.B. Rantes, Makrophagen-inflammatorisches Protein (MIP)-1 α und MIP-1 β , und α/β -Interferone synthetisieren. Diese biologischen Fähigkeiten ermöglichen es NK-Zellen Resistenzen gegenüber einigen bakteriellen, parasitären und vor allem viralen Infekten zu vermitteln, Tumorzellen zu lysieren, andere Zellen in ihrer Immunantwort zu modulieren und die hämatopoetische Zelldifferenzierung zu regulieren. Weiterhin wirken positive Signale um die NK-Zellmigration, Blastogenese und Effektorfunktionen wie Zytotoxizität und Zytokinproduktion zu aktivieren. Die NK-zellspezifische funktionelle Antwort wird durch die Übersetzung der extrazellulären Signale in intrazelluläre biochemische Ereignisse reguliert. Der gesamte Prozess der NK-Zellaktivierung wird durch die Balance von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren und Zytokine streng kontrolliert (Lanier, 1998a/b; Yokoyama, 1998; Trinchieri, 1989).

Die Modulation von negativen regulatorischen Ereignissen spielt eine wichtige, Rolle bei der Reaktivität von NK-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Rezeptor vermittelte Erkennung von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I Molekülen auf Zielzellen die NK-Zell-Zytotoxizität unterdrückt, d.h. NK-Zellen lysieren in der Regel die Zellen, denen MHC I fehlt (Theorie des *missing self*). Die auf humanen NK-

Zellen exprimierten inhibitorischen MHC Klasse I-erkennenden Rezeptoren werden als KIRs (Killerzell-inhibierende Rezeptoren) bezeichnet. Diese KIRs können aufgrund struktureller Unterschiede in drei Subtypen eingeteilt werden, mit unterschiedlicher HLA-Spezifität. Die KIRs gehören zum Typ I integraler Membranproteine und weisen zwei oder drei Immunglobulin-ähnliche Domänen in ihrer extrazellulären Region auf. Ebenfalls zur Gruppe der humanen inhibitorischen NK-Zellrezeptoren gehören CD94/NKG2A-Heterodimere mit einer C-Typ-Lectin-ähnlichen Struktur. Im murinen System werden die inhibitorischen NK-Zellrezeptoren der Ly49-Familie zugeordnet, die mittlerweile 16 Subtypen von Ly49A bis Ly49P umfasst. Die Ly49-Moleküle zählen zu den Typ II integralen Membranproteinen, die über Disulfidbrücken Dimere bilden und Homologien zu der C-Typ-Lectin Superfamilie des Menschen aufweisen (Lanier, 1998; Yokoyama, 1998; Brown et al., 1997; Colonna et al., 1997; Long et al., 1997).

Verschiedene MHC-erkennende Rezeptoren haben eine unterschiedliche Spezifität für die allelen Subklassen von MHC Klasse I Molekülen. Klonale Subpopulationen von NK-Zellen unterscheiden sich in ihrer Expression dieser spezifischen MHC-erkennenden Rezeptoren. Wenn Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen die Oberflächenexpression des MHC-I vermindert haben, erhöhen sie als Zielzellen potenziell die Möglichkeit der NK-Zell-vermittelten Lyse (Reyburn et al., 1997a/b). Trotzdem sind manche Zielzellen mit verminderter MHC-I Expression nicht sensitiv gegenüber NK-Zytotoxizität. Dies lässt vermuten, dass die Entfernung eines inhibitorischen Signals nicht immer ausreichend für die NK-Zellaktivierung ist. Andererseits gibt es auch starke Aktivatoren von NK-Zellen, bei denen die unveränderte MHC-Expression der Ziel-Zelle das *Natural-Killing* nicht verhindern kann (Lanier, 1998; Leibson, 1997).

Trotz der strukturellen Heterogenität in der extrazellulären, MHC-erkennenden Domäne der verschiedenen inhibitorischen Rezeptoren scheint es, dass ein allgemeiner inhibitorischer Mechanismus genutzt wird (Binstadt et al., 1997; Renard et al., 1997). Dieser Mechanismus beinhaltet die Tyrosinphosphorylierung einer ITIM (*immuno receptor tyrosine inhibitory motif*)-Sequenz im zytoplasmatischen Teil der verschiedenen Rezeptoren (Binstadt et al., 1996), Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP-1 und/oder SHP-2 und nachfolgend die SHP abhängige Inhibition von proximalen Tyrosinkinasen wie z.B. Syk oder ZAP-70 (Burshtyn et al., 1996; Vivier und Daeron, 1997). Die Kreuzvernetzung des MHC-erkennenden inhibitorischen Rezeptors induziert die Phosphorylierung des Tyrosinrestes im ITIM. Dies hat die Inhibition der NK-

zellvermittelten Zytotoxizität und der Zytokinexpression zur Folge (Campbell et al., 1996; Olcese et al., 1996; Houchins et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass humane KIRs und die murinen Ly49 auch auf einer Subpopulation von T-Zellen ($\text{NKR}^+/\text{CD8}^+$) in den jeweiligen Organismen exprimiert werden (Coles et al., 2000; Ugolini und Vivier, 2000).

Aktivierende zelluläre Rezeptoren beeinflussen die Fähigkeit von NK-Zellen auf andere Zellen und lösliche Mediatoren in ihrem *Microenvironment* zu reagieren (Houchins et al., 1997). Moleküle, die traditionell als Adhäsions- oder kostimulierende Rezeptoren auf anderen hämatopoetischen Zellen angesehen werden, können alleine oder zusammen mit anderen Zelloberflächenmolekülen auch die NK-Zellaktivierung verstärken. Diese umfassen eine Reihe von Integrinen (z.B. $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, LFA-1 und $\alpha_v\beta_3$), sowie CD2 und CD44.

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche neben den inhibierenden Rezeptoren auch aktivierende Rezeptoren wie die Killerzell-aktivierenden (Ig-ähnlichen) Rezeptoren (KARs) beim Menschen, CD94/NKG2 Heterodimere im humanen und murinen System, sowie Ly49D und Ly49H im murinen System. Diese aktivierenden Moleküle tragen in ihrem zytoplasmatischen Anteil kein ITIM, sondern exprimieren in ihrer transmembranen Domäne einen Lysinrest, der notwendig ist für die Bindung von ITAM (*immuno receptor tyrosine activating motif*) enthaltenden Untereinheiten. ITAM enthaltende Polypeptide, wie KARAP/DAP-12 Homodimere, die für die Signalweiterleitung verantwortlich sind, werden nicht-kovalent an die aktivierenden Rezeptoren gebunden (Perez-Villar et al., 1995; Mason et al., 1996; Carretero et al., 1997; Houchins et al., 1997; Tomasello et al., 1998; Campbell und Colonna, 1999). NKG2D ist ein weiterer kürzlich beschriebener aktivierender Rezeptor, der auf NK- und T-Zellen und aktivierten Makrophagen exprimiert wird. NKG2D bildet im Gegensatz zu den anderen NKG2-Isoformen Homodimere und ist mit der Signal-vermittelnden Untereinheit DAP10 assoziiert (Diefenbach et al., 2000). Die Interaktion von Ziel-Zellen mit diesen stimulierenden Rezeptoren scheint für die initiale Aktivierung der NK-Zellen wichtig zu sein, dabei ist die Rolle der Liganden vielfach noch ungeklärt. Das Ergebnis einer NK-Zell- Ziel-Zell-Interaktion wird aber wohl letztlich durch die Balance von inhibitorischen und stimulierenden Rezeptorsignalen entschieden.

Ein gut untersuchter membranständiger Rezeptor auf NK-Zellen ist der niedrig-affine Rezeptor für IgG, CD16 (Fc γ RIII). Lange Zeit wurde angenommen, dass der Fc γ RIII (CD16) der einzige auf NK-Zellen exprimierte Fc γ R ist, es konnte aber auf einigen NK-

Zellen auch der Fc γ RII (CD32) nachgewiesen werden (Metes et al., 1998; Morel et al., 1999). Der transmembrane CD16 wird auf fast allen humanen und murinen NK-Zellen exprimiert. Der Fc γ RIIIa auf humanen NK-Zellen ist ein multimerer Rezeptorkomplex, bestehend aus der Liganden bindenden α -Untereinheit (CD16), die nicht-kovalent mit Homodimeren oder Heterodimeren der γ - und ζ -Kette (Untereinheiten des Fc ϵ RI bzw. TCR) verbunden ist. Keine der Untereinheiten des Rezeptorkomplexes besitzt eine intrinsische Kinase Aktivität (Lanier et al., 1989a/b; Kurosaki et al., 1991). Konservierte Immunrezeptor tyrosinbasierende aktivierende Motive (ITAMs) in den γ - und ζ -Untereinheiten sind für die Rekrutierung der Kinasen und der Generierung von intrazellulären sekundären Botenstoffen verantwortlich (Cambier, 1995). Der murine Fc γ RIII enthält im Gegensatz zum humanen transmembranen Fc γ RIII keine ζ - ζ Homodimere (Kurosaki und Ravetch, 1989). So verlieren nur $\gamma^{-/-}$ -Mäuse, aber nicht $\zeta^{-/-}$ -Mäuse ihre Fähigkeit, ADCC (Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität) zu vermitteln (Liu et al., 1993). Weiterhin konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Fc γ RIII-*Knock-out*-Mäuse normale Mengen von NK-Zellen entwickeln. Diesen Zellen fehlt jedoch die Fähigkeit zur ADCC, während die natürliche Zytotoxizität unbeeinträchtigt ist (Hazenbos et al., 1996).

In den letzten Jahren konnte die klinische Bedeutung der NK-Zellen bei der Knochenmarktransplantation (KMT) nachgewiesen werden. Nach der Knochenmark-Transplantation sind die NK-Zellen die ersten sich rekonstituierenden lymphozytären Zellen und vermitteln den erwünschten GvL- (*Graft versus Leukemia*)-Effekt bei malignen hämatopoetischen Erkrankungen. Weiterhin wird diskutiert, welche Rolle NK-Zellen im Rahmen der GvHD (*Graft versus Host Disease*) spielen (Yu et al., 1992; George et al., 1997). Bei der Abstoßung von Knochenmarktransplantaten wurde beobachtet, dass NK-Zellen eine wichtige Effektorpopulation bei der Reaktion gegen das allogene Transplantat mit fremden MHC-I Allelen darstellen. Diese NK-abhängige Abstoßung wird bei Mäusen vor allem über die Ly49-Rezeptoren vermittelt. Im murinen Modell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich nach allogener KMT die Expression verschiedener Ly49-Rezeptoren verändert. Die NK-Zellen zeigen die Fähigkeit, ihr Expressionsmuster dem neuen Wirt mit entsprechenden neuen MHC I-Molekülen anzupassen. Die Anwesenheit eines passenden Liganden führt zu einer Herunterregulierung des entsprechenden Rezeptors (Korten et al., 1999).

1.2 Fc-Rezeptoren

Immunglobuline sind wichtig für das spezifische Immunsystem und bifunktionell. Die variable (Fab) Domäne des Antikörpers vermittelt die Antigen-Spezifität, während die Fc-(crystal)-Domäne durch Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen erkannt wird. Diese Rezeptoren spielen zusammen mit den Rezeptoren für die Komponenten des Komplementsystems eine zentrale Rolle in der Vermittlung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort (van de Winkel und Capel 1993; Hulett und Hogarth 1994; Gessner et al., 1998).

Spezifische Fc-Rezeptoren existieren für alle Klassen von Antikörpern, diese umfassen IgA (Fc α R), IgD (Fc δ R), IgE (Fc ϵ R), IgG (Fc γ R) und IgM (Fc μ R). Fc-Rezeptoren sind im allgemeinen Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie mit zwei, bzw. drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Es wurden aber bisher zwei Ausnahmen beschrieben, der niedrig affine Fc ϵ RII (CD23) (Bonney et al., 1997), der eine Lektin-ähnliche Struktur aufweist, und der neonatale Fc-Rezeptor, der MHC Klasse I Molekülen ähnelt (Burmeister et al., 1994).

Zu den vielfältigen Funktionen der Fc-Rezeptoren gehört die Aktivierung von Effektorzellen, die Vermittlung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), sowie die Phagozytose von pathogenen Keimen und die Clearance von Immunkomplexen. Weiterhin vermitteln einige Mitglieder (Fc ϵ RI, Fc γ RI, Fc γ RIII) die Freisetzung von entzündlichen Mediatoren und Zytokinen (Gessner et al., 1998; Hulett und Hogarth, 1994; van de Winkel und Capel, 1993; van de Winkel et al., 1991), während Fc γ RII unter anderem Einfluss auf die Regulation der Immunglobulin Synthese und die lymphozytäre Proliferation nimmt (van den Herik-Oudijk et al., 1994; Hulett und Hogarth, 1998).

Daneben sind Fc-Rezeptoren an zahlreichen pathogenen Reaktionen beteiligt. Bei den Autoimmunerkrankungen von Arteriosklerose, systemischen Lupus Erythematoses (SLE), Sjögrensen Syndrom, rheumatoide Arthritis, Vaskulitis und Glomerulonephritis ist ein Anstieg von IgG-Immunkomplexen zu beobachten. Durch Immunkomplexe können vermittelt durch Fc-Rezeptoren chronische Entzündungen ausgelöst werden. Die IgG-Antikörper-vermittelte Hypersensitivitätsreaktion (Typ III) wird durch die Interaktion zytotoxischer Antikörper mit zellulären Antigenen und Fc γ R und/oder Komplement-Komponenten ausgelöst. Dies führt zur Lyse von Thrombozyten bei der immunologischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) (Witte et al., 1993), oder kann durch anti-

erythrozytäre Autoantikörper zur Hämolyse bei der autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA) führen (Izui, 1994). In der ITP führt die Gabe von Immunglobulinen durch die unspezifische Blockade von Fc-Rezeptoren zu Erfolgen (Schmidt et al. 1984, Schmidt et al. 1981). Auch in der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) wurden erhöhte Immunkomplexspiegel gefunden. Bei der PNH ist durch genetische Defekte die Bildung des Glycosylphosphatidylinositols (GPI) gestört, was unter anderem dazu führt, dass der GPI-verankerte und für die Clearance von Immunkomplexen wichtige Fc γ RIIB nicht exprimiert werden kann (Schubert et al., 1990).

1.3 Fc γ -Rezeptoren

Die Fc γ -Rezeptoren sind membrangebundene Glykoproteine und werden in drei Hauptklassen unterteilt: Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII. Die Diversität wird durch die Existenz verschiedener Subklassen und alternativer Spleißprodukte erweitert. Fc γ RI mit drei extrazellulären Domänen ist bezüglich der IgG Bindung hoch-affin, während die beiden anderen Rezeptoren, die über zwei dieser Domänen verfügen, IgG niedrig-affin binden. Die größten genetischen Variationen zwischen den Fc γ -Rezeptoren liegen allerdings in den kodierenden Sequenzen für die zytoplasmatischen Bereiche und in den Promotorregionen. Diese Unterschiede haben eine große funktionelle Heterogenität der Fc γ -Rezeptoren zur Folge. Dies betrifft einerseits ihre gewebsspezifische Expression und andererseits Signaltransduktionskaskaden, die nach der Kreuzvernetzung der Rezeptoren ausgelöst werden (Gessner et al., 1998; van de Winkel und Capel, 1993). Die hFc γ R sind in Tabelle 1 charakterisiert und eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 1.

	hFcγRI (CD64)	hFcγRII (CD 32)	hFcγRIII (CD 16)
Molekül	72 kDa	40-43 kDa	50-80 kDa
Gene ^a	3 (A, B, C)	3 (A, B, C)	2 (A, B)
Allele	-	IIA: 2 (HR/LR)	IIIA: 3 (48 L/R/H) 2 (158 F/V) IIIB: 2 (NA1/NA2)
Transkripte ^b	a1, a2 b1, b2, b3 c	a1, a2 b1, b2, b3 c	a1-a6, ΔEC2 b
Isoformen ^c	hFcγRIa (hFcγRIb2)	hFcγRIIa1, a2 (S) hFcγRIIb1, b2 (hFcγRIIc)	hFcγRIIIa (hFcγRIaΔEC2) hFcγRIIIb (GPI)
Untereinheiten ^d	FcR γ Kette	-	FcR γ Kette, FcR β Kette, TCR/CD3 ζ Kette
Affinität zu hIgG (K _a)	10 ⁸ -10 ⁹ M ⁻¹	< 10 ⁷ M ⁻¹	IIIA: 3 x 10 ⁷ M ⁻¹ IIIB: < 10 ⁷ M ⁻¹
Spezifität für hIgG	3 = 1 > 4 >>> 2	IIa (HR): 3 > 1 >> 2 > 4 IIa (LR): 3 > 1 = 2 >>> 4 IIb1: 3 > 1 > 4 >> 2	IIIA/IIIB: 1 = 3 >>> 2, 4

Tabelle 1: Charakterisierung humaner Fcγ-Rezeptoren (nach Gessner et al., 1998). ^a Die Gene der drei Klassen humaner Fcγ-Rezeptoren sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert. ^b 6 verschiedene FcγRI Transkripte sind beschrieben. Die hFcγRIIIa Transkripte, denen die EC2 kodierende Sequenz fehlt, können durch Transfektion als FcγRIIIa Rezeptorvariante mit einer einzelnen extrazellulären Ig-Domäne exprimiert werden. ^c Klammern bezeichnen Proteinisoformen die nach Transfektion exprimiert werden, aber noch nicht *in vivo* verifiziert wurden. Alle Isoformen sind transmembrane Proteine, mit Ausnahme der mit S (lösliche) und GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker) bezeichneten Isoformen. ^d Die FcR β Kette kann mit dem hFcγRIIIa α2 Rezeptor-Komplex in transfizierten murinen P815 Mastocytoma Zelllinie exprimiert werden. Die TCR/CD3 ζ Kette ist als Homo- oder Heterodimer mit dem hFcγRIIIa assoziiert, dieser Rezeptor wird auf γδ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert.

Fc γ -Rezeptoren

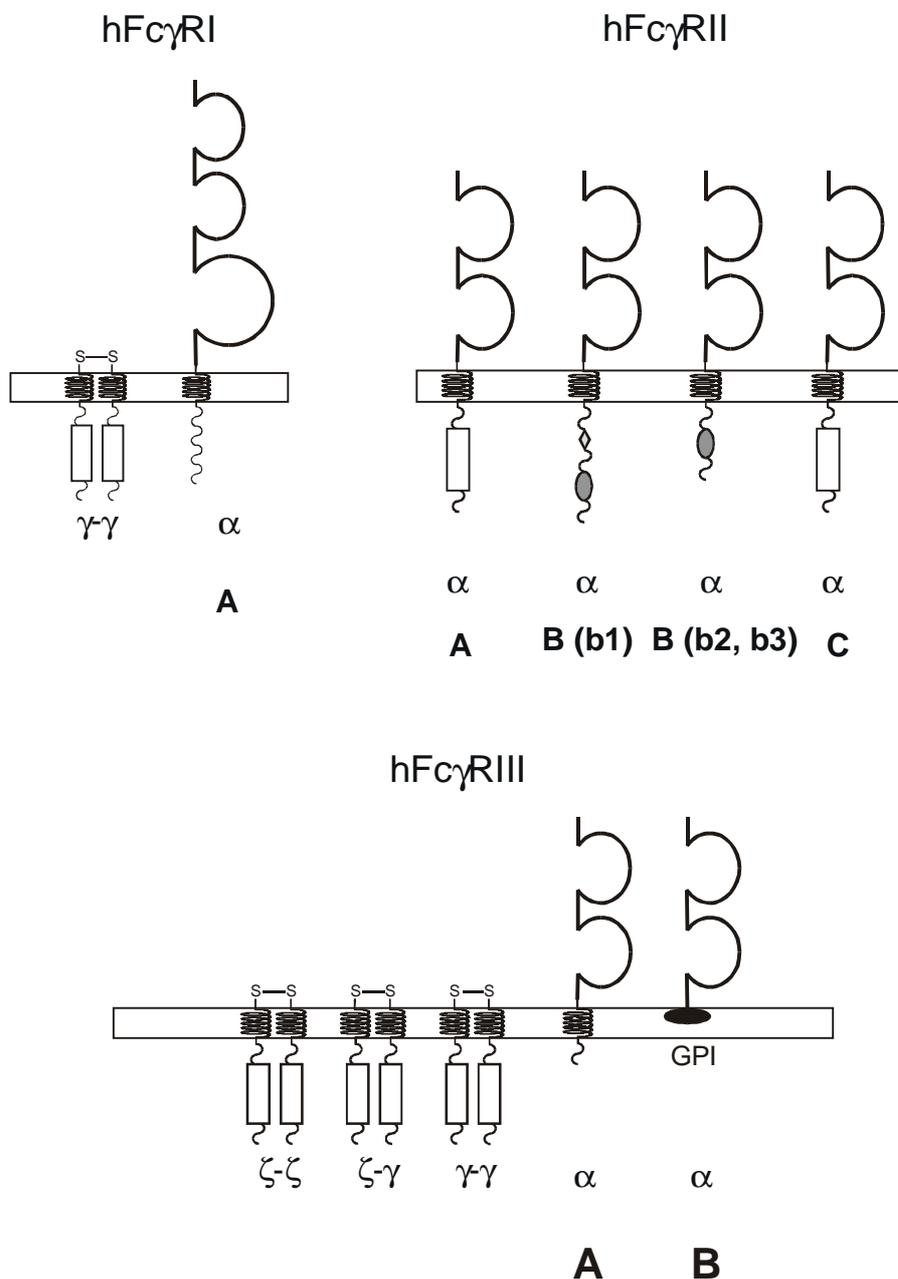


Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen IgG Fc-Rezeptor-Familie (Fc γ R). Alle humanen Fc γ R-Klassen I, II und III sind Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie und besitzen 2 oder 3 homologe extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen. Die membran-proximale Ig-Domäne ist an der Ligandbindung des IgG beteiligt. Mit Ausnahme des hFc γ R IIIb, welches ein GPI-verankertes Protein ist, sind alle Fc γ R transmembrane Moleküle. Verschiedene Gene in jeder Rezeptorklasse, ihre alternativen *Splice*-Produkte und ihre individuellen Untereinheiten werden bezeichnet als A, B und C; b1, b2 und b3; α , β , γ und ζ . Im zytosolysischen Teil befinden sich funktionelle Motive, die wichtig für die Signaltransduktion sind, die aktivatorischen ITAM (weiße Rechtecke) und inhibitorischen ITIM (dunkelgraue Ovale) Sequenzmotive. Weiterhin ist die Region, die verantwortlich ist für die Inhibition der Endozytose beim hFc γ R IIb1 als hellgraue Rombe dargestellt.

1.3.1 Fc γ RI (CD64)

Die humanen Fc γ RI-Rezeptoren, die hIgG mit hoher Affinität binden, werden von drei Genen kodiert, Fc γ RIA, -IB und -IC, von denen aber nur der Fc γ RIA Locus zur Expression des vollständigen Glykoproteins von 72 kDa führt. Die Fc γ RIB- und Fc γ RIC-Gene verwenden ein Translations-Terminationskodon in der dritten extrazellulären Domäne (Allen und Seed, 1989; van de Winkel et al., 1991; Ernst et al., 1992), so dass sie nur für lösliche Fc γ RIB- und Fc γ RIC-Rezeptoren kodieren können. Die Existenz solcher Rezeptoren konnte allerdings noch nicht nachgewiesen werden (Hulett und Hogarth, 1994). Der hFc γ RI wird konstitutiv auf Monozyten und Makrophagen in Komplexen mit dem Homodimer der γ -Ketten des Fc ϵ RI exprimiert und kann mit IFN γ auf Neutrophilen, Eosinophilen und glomerulären Mesangialzellen induziert werden. Die Fc γ RI Expression wird auch durch G-CSF auf Neutrophilen und IL-10 auf Mesangialzellen induziert (Uciechowski et al., 1998) und auf Monozyten hochreguliert (Pearse et al., 1993; Perez et al., 1993).

Die zellspezifische Expression des Fc γ RI-Gens benötigt ein myeloid-zellaktivierendes Transkriptionselement, welches den Ets-Familien Transkriptionsfaktor PU.1/Spi-1 bindet (Eichbaum et al., 1994; Perez et al., 1994). Das PU.1 Protein besitzt eine Ets-DNA-Bindungsdomäne (C-terminal), eine Glutamin-reiche Domäne mit sauren Aminosäureresten, die für die Transaktivierung (N-terminal) notwendig sind und eine zentrale PEST (Protein, Glutaminsäure, Serin und Threonin-reiche Region) Domäne, die für Protein-Protein Interaktionen wichtig ist (Lloberas et al., 1999). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Konzentration von PU.1 die Entwicklung von frühen Vorläuferzellen zu Makrophagen oder B-Zellen beeinflusst, da in diesen Zellen eine Reihe von zellspezifischen Genen durch PU.1 gesteuert werden. Bei einer hohen Konzentration von PU.1 entwickeln sich bevorzugt Makrophagen, bei einer niedrigen Konzentration werden überwiegend B-Zellen induziert (DeKoter und Singh, 2000).

Glucocorticoide modulieren das Wachstum, Differenzierung und Funktion von Lymphozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, Mastzellen, Endothelzellen und Monozyten durch die Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptors (GR). Der GR gehört zu der nukleären Hormonrezeptoren Superfamilie und fungiert als Liganden induzierter Transkriptionsfaktor. In unstimulierten Zellen befindet sich der GR im Zytoplasma, komplexiert mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen. Nach der Ligandenbindung

dissoziiert der Komplex und der GR wandert in den Kern. Im Kern binden GR-Homodimere an DNA-Motive, die als Glucocorticoid *Response* Elemente (GREs) beschrieben wurden. Der GR kann aktivierende und inhibierende Effekte auf die Transkription ausüben (Dennig et al., 1995; Collins et al., 1998).

IFN γ und der Glucocorticoid-Rezeptor (GR) führen synergistisch zu einer induzierbaren und erhöhten Fc γ RI-Expression auf Monozyten (Girard et al., 1987; Pan et al., 1990), wobei die Stimulation immer das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors PU.1 voraussetzt. GR kann nicht direkt im Promotorelement des Fc γ RI binden, da dieser keine GRE-*site* aufweist. Vielmehr scheint der GR einen Costimulator der Stat1 vermittelten erhöhten Transkription darzustellen (Aittomaki et al., 2000).

In monozytären Zellen, die mit IFN- γ stimuliert wurden, werden die zwei Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase Jak1 und Jak2, die zur Janus-Kinase (JAK) Familie zählen, aktiviert (Feldman et al., 1995). Diese Jaks phosphorylieren Tyrosinreste des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors Stat1. Aktivierte Stat1 Moleküle dimerisieren und wandern in den Kern. Dort binden sie unter anderem an die IFN- γ *response* Region (GRR), die im Fc γ RI-Promotor lokalisiert ist und die Transkription des Gens wird hochreguliert (Perez et al., 1994). Weiterhin kann die Fc γ RI-Expression in humanen Monozyten und murinen Makrophagen durch IL-10 hochreguliert werden. Es wurde nachgewiesen, dass IL-10 die GRR-Bindungsaktivität in mononukleären Phagozyten induziert, ähnlich der Induktion durch IFN- γ . IL-10 führt zur Aktivierung von Jak1 und Tyk2 Tyrosinkinase, die anschließende Phosphorylierung und Homo-/Heterodimerbildung von Stat1 und Stat3 resultiert in der Bindung dieser Dimere an die GAS-*site* (*Gamma-interferon activation site*) in der regulatorischen Region von Zielgenen (Schindler und Darnell, 1995; Ihle, 1995). Im Gegensatz dazu zeigen Neutrophile nach IL-10 Behandlung keine erhöhte Fc γ RI-Expression, obwohl Stat1 und Stat3 konstitutiv in diesen Zellen vorhanden ist. Eine Erklärung wäre, dass sich IL-10-Rezeptoren in PMN und Monozyten unterscheiden. Dem Rezeptor könnte eine assoziierte Polypeptidkette fehlen, die notwendig für die Signalweiterleitung ist, die zur Stat-Aktivierung führt. Eine andere Möglichkeit wäre der Verlust der Andockstelle für Jak/Stat Proteine in der intrazellulären Domäne des IL-10R bei PMN (Bovolenta et al., 1998).

1.3.2 Fc γ RII (CD32)

Der niedrig-affine Fc γ RII ist der am weitesten verbreitete Rezeptor für IgG und wird auf Eosinophilen, Basophilen und Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Thrombozyten, Langerhans-Zellen, Dendritischen Zellen, B-Zellen, diversen Subtypen von T-Zellen und einer kleinen Subpopulation von NK-Zellen exprimiert (Looney et al., 1986; Sandor et al., 1992; Thomas und Lipsky, 1994; Hulett und Hogarth 1994; Fanger et al., 1996; Metes et al., 1998). Es sind sechs verschiedene Transkripte des Fc γ RII bekannt, die durch drei Gene kodiert werden (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC) und zur Expression von Glykoproteinen von ca. 40 kDa führen. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihren zytoplasmatischen Bereichen. Dies weist daraufhin, dass die durch die verschiedenen Isoformen übertragenen Signale unterschiedliche zelluläre Reaktionen vermitteln (van de Winkel und Capel, 1993).

Der Fc γ RIIA wird auf Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert und kann diese Zellen aktivieren. Er vermittelt ADCC, Phagozytose sowie oxydativen Burst (Indik et al., 1995). Der Fc γ RIIA weist in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITAM (*Immunoreceptor tyrosine based activatory motif*) auf, das auch in der FcR γ -Kette, dem B-Zell- Rezeptor (BCR) und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) vorkommt. Es ist für den Ca²⁺-Flux und Phagozytoseprozesse verantwortlich (van den Herik-Oudijk et al., 1994). Von dem Fc γ RIIB-Gen werden drei verschiedene mRNAs transkribiert. Die Fc γ RIIB Isoform ist vor allem durch ein ITIM (*Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*) in seiner zytoplasmatischen Domäne charakterisiert. Die Kreuzvernetzung des Fc γ RIIB mit dem BCR auf B-Zellen führt zu einer Inhibition vorangegangener Aktivierungen (Amigorena et al., 1992; van den Herik-Oudijk et al., 1994). Diese Inhibition wird durch die Interaktion des ITIM mit SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) und/oder SHP-1 (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase*) verursacht, und stoppt letztlich den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ (Chacko et al., 1996; Ono et al., 1996). Ähnliche inhibitorische Motive wurden auch bei anderen Rezeptoren wie KIRs (*natural killer inhibitory receptor*) (Wagtmann et al., 1995) und CD22 (Tsubata, 1999) beschrieben.

1.3.3 Fc γ RIII (CD16)

Der humane Fc γ RIII (CD16) Rezeptor ist ein differenziell glykosyliertes Protein, was zu einer großen Heterogenität in seinem Molekulargewicht von 50 bis 80 kDa führt. Der hFc γ RIII bindet IgG in Form von Immunkomplexen mit einer hohen Spezifität für IgG1 und IgG3, während IgG4 und IgG2 nur schwache Bindung zeigen (Hulett und Hogarth, 1994; Gessner et al., 1998). Verschiedene Aminosäuren der membranproximalen Ig-Domäne (EC2) des hFc γ RIII (Gln 126, Arg 156, Lys 162, Val 164) sind maßgeblich an der Bindung von IgG beteiligt. Diese Bindungsstellen befinden sich in der EC2-Domäne auf zwei Loops (B/C loop und F/G loop) und dem F β -Faltblatt, wo sie eine diskontinuierliche Bindungsstelle bilden (Tamm et al., 1996; Tamm und Schmidt, 1997). Untersuchungen der Kristallstruktur eines gentechnisch hergestellten löslichen Fc γ RIII mit dem monoklonalen humanen Fc-Fragment des IgG1 (hFcI) in einem 1:1 Komplex haben jetzt gezeigt, dass Aminosäurereste der C γ 2-Domänen und der *hinge*-Region des hFcI mit dem B/C loop und F/G loop der EC2-Domäne des Rezeptors interagieren (Sondermann et al., 2000).

Der niedrig-affine Fc γ RIII wird beim Menschen durch zwei unabhängige Gene (Fc γ RIIIA und B) kodiert, die eine 97% Homologie zwischen den beiden kodierenden und flankierenden Regionen aufweisen, einzelne Nukleotidunterschiede in den kodierenden Sequenzen führen allerdings zu großen phänotypischen Konsequenzen (Simmons und Seed, 1988; Ravetch und Perussia, 1989). Die beiden Isoformen sind durch einen extrazellulären Teil von 191 Aminosäuren (AS) in Form zweier Ig-ähnlicher Domänen, eine 21 AS lange transmembrane Region und 25 intrazellulärer AS beim Fc γ RIIIA bzw. 4 AS beim Fc γ RIIIB charakterisiert. Weiterhin führen einzelne Aminosäure-Substitutionen des Rezeptors im extrazellulären Teil zu einem unterschiedlichen Glykosylierungsmuster (Ravetch und Perussia, 1989). Durch den Austausch von Phenylalanin an der Position 185 im Fc γ RIIIA durch Serin im Fc γ RIIIB entsteht ein Signal für die posttranskriptionelle Verknüpfung mit einem GPI-(Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-Anker (Hibbs et al., 1989; Kurosaki und Ravetch, 1989). Das Fehlen des GPI-Ankers hat nicht nur den Verlust des Fc γ RIIIB zur Folge, es wurden bis heute über 100 verschiedene GPI-verankerte Proteine (z.B. CD55, CD59) identifiziert. Die gestörte Biosynthese des GPI-Ankers manifestiert sich im Krankheitsbild der paroxymalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) (Young und Maciejewski, 2000).

Im murinen System wird der Fc γ RIII nur durch ein Gen kodiert, ein Analog zum GPI-verankerten hFc γ RIIIB gibt es hier nicht. Der Rezeptor wird in der Maus auf NK-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Mesangialzellen exprimiert (Gessner et al., 1998).

Fc γ RIII *knock-out* Mäuse, bei denen die ligandenbindende α -Kette genetisch deletiert wurde, sind durch den funktionellen Verlust in der Expression des Rezeptors charakterisiert. Dies hat unter anderem zur Folge, dass die ADCC bei NK-Zellen, die IgG1-vermittelte Phagozytose bei Makrophagen und Neutrophilen verloren geht (Hazenbos et al., 1996; Hazenbos et al., 1998). Weiterhin haben Studien mit IgE defizienten Mäusen gezeigt, dass im Zuge einer Anaphylaxie neben dem Fc ϵ RI auch der Fc γ RIII eine wichtige Rolle in der Mastzell-Aktivierung spielt (Oettgen et al., 1994). Auch in der reversen passiven Arthus Reaktion wird die Funktion des Fc γ RIII neben dem Komplementsystem kontrovers diskutiert (Sylvestre und Ravetch, 1994; Hazenbos et al., 1996; Höpken et al., 1997; Clynes et al., 1999; Köhl und Gessner, 1999; Baumann et al., 2000).

Der Fc γ RIIIA wird konstitutiv auf Makrophagen, NK-Zellen und Subpopulationen von Monozyten und T-Zellen exprimiert und kann durch IFN γ auf Mesangialzellen der Niere induziert werden (Radeke et al., 1994; Braakman et al., 1992). Er benötigt für die effiziente Oberflächenexpression zusätzliche Untereinheiten. Die α -Kette des Rezeptors ist mit Homo- oder Heterodimeren der γ -Ketten des Fc ϵ RI (Ra et al., 1989) und ζ -Ketten aus dem TCR/CD3 Komplex (Lanier und Phillips, 1989) assoziiert. Durch die Phosphorylierung der γ - oder ζ -Ketten werden Funktionen des Fc γ RIIIA wie Ca²⁺-Mobilisierung, Phagozytose und ADCC vermittelt (Park et al., 1995; Park et al., 1993; Masuda et al., 1993; Daeron, 1992). Der Fc γ RIIIA vermittelt auf NK-Zellen die ADCC (Werfel et al., 1989; Leibson, 1997).

Auf NK-Zellen und Monozyten wurden zwei Polymorphismen des Fc γ RIIIA nachgewiesen (Koene et al., 1997; Wu et al., 1997). Der erste wird durch drei Allele in der membrandistalen Ig-Domäne repräsentiert, dabei ist die Aminosäureposition 48 durch Leucin (L), Arginin (R) oder Histidin (H) besetzt. Der zweite ist in der membranproximalen Ig-Domäne lokalisiert durch Phenylalanin (F) oder Valin (V) an Position 158. Der 158VV homozygote Genotyp zeigt im Vergleich mit dem FF Homozygoten eine stärkere Bindung von IgG1 und IgG3 (de Haas et al., 1996; Koene et

al., 1997). Dieser Unterschied an Position 158 hat direkte klinische Konsequenzen. So wurde bei zwei Kindern, die eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen zeigten, das hoch affine 48HH-158VV Allel gefunden (de Vries und Yssel, 1996). Der niedrig affine 158FF Genotyp wurde mit erhöhter Frequenz bei Patienten mit SLE (Systemischer Lupus Erythematoses) gefunden und scheint mit der Ausbildung einer Nephritis zu korrelieren (Wu, et al. 1997).

Die molekularen Grundlagen für die differenzielle zelltypspezifische Expression des hFcγRIIIA versus hFcγRIIIB wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht (Gessner et al., 1996; Li et al., 1996). Rekonstitutionsstudien in transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die regulatorischen Gensequenzen, die für die NK-Zell- (FcγRIIIA) versus Neutrophilen- (FcγRIIIB) Restriktion verantwortlich sind, in der 5'-Region beider Gene zu finden sind. Es wurden Enhancer, Silencer und voneinander unabhängige Promotoren in der 5'-Region beschrieben (Gessner et al., 1995; 1996). So sind für FcγRIIIA mehrere gleichzeitig aktive Promotoren nachgewiesen worden. Diese führen zur Initiation von multiplen Transkripten (α1-α6) in NK-Zellen. Die alternativen FcγRIIIA Transkripte kodieren für identische FcγRIIIA Rezeptorisoformen in NK-Zellen (Gessner et al., 1996).

Funktionelle Analysen der 5'-Region des humanen FcγRIIIA- und der fast homologen 5'-Region des FcγRIIIB-Gens haben zur Identifizierung des Pprox-(-198/-10)-Promoter geführt, der eine unterschiedliche Gewebespezifität in NK-Zellen und Neutrophilen zeigt (Gessner et al., 1995). Es wurden weitere FcγRIIIA mRNA Startpunkte in NK-Zellen lokalisiert, die außerhalb der Pprox-Region liegen. Diese Startpunkte wurden für die *Splice*-Varianten α2/3 bei Position -860 und -849 lokalisiert. Weitere cDNA-Klone enthielten Sequenzen von noch weiter stromaufwärts gelegenen Regionen des FcγRIIIA-Gens und repräsentieren die Transkripte α5/6. Die alternativen Transkripte der FcγRIIIA α2/3 und α5/6 kodieren für die gleichen FcγRIIIA-Rezeptor Isoformen in NK-Zellen. Die Heterogenität und die unterschiedlichen Level der Transkriptionsraten der FcγRIIIA und FcγRIIIB mRNAs lassen vermuten, dass mehrere Transkriptionskontrollregionen für jedes FcγRIII-Gen in dem entsprechenden Zelltyp aktiv sind. *Splice*-Varianten in NK-Zellen liegen in der medialen -1817/-850 FcγRIIIA Kontrollregion. Zwei Promotoren, Pmed1 (-942/-850) und Pmed2 (-1376/-1123) befinden sich in dieser Region und kontrollieren die Initiation dieser Transkripte, die für den FcγRIIIA-Rezeptor kodieren (Gessner et al., 1996).

Die Expression des humanen Fc γ RIIIb ist auf Neutrophile Granulozyten beschränkt und kann durch IFN γ auf Eosinophilen Granulozyten induziert werden. Die Kreuzvernetzung des Fc γ RIIIb führt zur Aktivierung der Zellen (Hundt und Schmidt, 1992). Die Aktivierung erhöht den Ca²⁺-Flux und induziert den sogenannten *respiratory burst*, also die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen (Hundt und Schmidt, 1992). Die Regulation dieser intrazellulären Ereignisse erfolgt durch die Tyrosin-Phosphatase CD45 (Hoffmeyer et al., 1995). Der Fc γ RIIIb, der über keine intrazelluläre Domäne verfügt, ist für eine effiziente Phagozytose, ADCC und Degranulation auf die Interaktion mit dem Komplementrezeptor (CR) 3 oder dem Fc γ RIIa angewiesen (Stöckl et al., 1995; Jones und Brown, 1996). Auf Neutrophilen existiert ein kodominanter bialleler Polymorphismus des Fc γ RIIIB-Gens (NA-1 und NA-2), der durch den Austausch von vier Aminosäuren in der membrandistalen Ig-Domäne (EC1) entsteht (Laurence et al., 1990; Sanders et al., 1995). Dies führt zu einem veränderten Glykosylierungsmuster und Menschen mit einem homozygoten NA-2 Allel zeigen eine niedrigere Phagozytosekapazität im Vergleich zur NA-1 Rezeptorvariante (Salmon et al., 1990).

1.4 Transkription

Durch die Expression spezifischer Gene werden die Funktionen und die Morphologie von Zellen determiniert, daher ist die Regulation von Transkriptionsfaktoren für Differenzierungsprozesse und für die Kontrolle des Zellwachstums von zentraler Bedeutung. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren identifiziert worden. Es wird geschätzt, dass 10% der menschlichen Gene für Transkriptionsfaktoren kodieren, die zum Teil in der Entstehung von verschiedenen Krankheiten eine entscheidende Rolle spielen, so dass Transkriptionsfaktoren zu einem wichtigen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente geworden sind.

Um die Rolle einzelner Transkriptionsfaktoren in der Regulation von Zellwachstum und Differenzierungsprozessen verstehen zu können, müssen zum einen die Signale, die Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität regulieren, identifiziert werden. Zum anderen müssen die Mechanismen aufgeklärt werden durch die Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen kontrollieren.

1.4.1 Transkriptionsinitiation in eukaryontischen Zellen

In eukaryontischen Zellen werden drei Klassen von Genen unterschieden, die sich in ihrer Promotorstruktur unterscheiden und durch drei verschiedene RNA-Polymerasen transkribiert werden. RNA-Polymerase I transkribiert ausschließlich die Gene, welche für die großen ribosomalen Untereinheiten kodieren (28S, 18S, 5,8S). RNA-Polymerase II transkribiert die mRNA der Gene, deren Produkte in Proteine translatiert werden. Die dritte Genklasse wird von RNA-Polymerase III transkribiert und umfasst Gene für die tRNA-Moleküle, die 5S rRNA und die U6 RNA.

Die Transkription kann auf der Ebene der Initiation, Elongation und Termination reguliert werden, wobei die Regulation auf der Ebene der Initiation den wichtigsten Regulationsmechanismen unterliegt.

Die Initiation der Transkription kann in drei Phasen unterschieden werden. Zuerst binden die RNA-Polymerase und zusätzliche Proteine reversibel an den Promoter (Bildung des Initiationskomplexes). Anschließend wird ein kurzer DNA-Bereich zum Teil irreversibel aufgewunden und dient für die Synthese von kurzen Oligoribonukleoditen (Isomerisierung). Schließlich verlässt die RNA-Polymerase den Promoter und verlängert das Transkript (Promoter-Clearance).

RNA-Polymerase II (RNAP II) benötigt für die spezifische Initiation der Transkription die allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH und TFIIJ (GTFs, *general transcription factors*), die durch chromatographische Fraktionierung von Kernextrakten aufgetrennt wurden. Die meisten Untereinheiten von RNAP II und die GTFs sind inzwischen isoliert und charakterisiert worden. Eine zentrale Rolle kommt dabei TBP (TATA-Bindungsprotein) zu, das allein oder als TFIID-Untereinheit zusammen mit den TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) spezifisch an die TATA-Box bindet, ein Promotorelement, das sich in vielen RNAP II abhängigen Promotoren ungefähr bei Position -25 befindet. Durch die Interaktion mit anderen GTFs und RNAP II positioniert TBP den Initiationskomplex auf der DNA (Burley und Roeder, 1996; Tan und Richmond, 1998; Berk, 1999).

In *in vitro* Transkriptionsexperimenten konnte ein schrittweiser Aufbau des Initiationskomplexes an der DNA gezeigt werden. Dabei sollte zunächst TFIID oder TBP allein an der TATA-Box binden, dann TFIIB und TFIIA an diesen Protein-DNA-Komplex rekrutieren und dadurch den Preinitiationskomplex ausbilden. Dieser wird von RNAP II

mit Hilfe von TFIIF erkannt, und schließlich binden TFIIE, TFIIH und TFIIJ (Flores et al., 1992; Zawel und Reinberg, 1992). Die Transkriptionsinitiation kann nach diesem Modell durch die Kontrolle der einzelnen Schritte in der Ausbildung des Initiationskomplexes reguliert werden (Choy et al., 1993; Meyer und Young, 1998).

Mittlerweile wurden jedoch mit anderen Versuchsbedingungen aus Hefe und Säugetierzellen größere Komplexe isoliert, die je nach Präparationsbedingungen alle oder einen Großteil der nötigen Komponenten für die *in vitro* Transkription beinhalteten. Diese Komplexe wurden deshalb als Holoenzyme bezeichnet (Thompson et al., 1993; Kim und Burley, 1994; Koleske und Young, 1994; Ossipow et al., 1995). Die Entdeckung der Holoenzyme in Zellen steht damit im Gegensatz zu dem *in vitro* beschriebenen schrittweisen Aufbau des Initiationskomplexes. Einige der Holoenzyme benötigen für eine *in vitro* Transkription allerdings die Zugabe einzelner aufgereinigter GTFs (Kim und Roeder, 1994; Meyer und Young, 1998). Zum Teil konnte die *in vitro* Transkription mit Holoenzymen nicht durch regulatorische Transkriptionsfaktoren stimuliert werden (Ossipow et al., 1995).

1.4.2 Aktivierung der Transkription durch regulatorische Faktoren

Regulatorische Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Menge an mRNA, die von der RNAP II produziert wird. Diese Transkriptionsfaktoren binden an spezifische Promotor- oder Enhancer-Sequenzen und können somit die Transkription durch RNAP II regulieren. Stimulieren diese Faktoren die Transkription, werden sie auch als Transaktivatoren bezeichnet. Transaktivatoren binden typischerweise neben einer DNA-Bindungsdomäne an einer oder mehreren Transaktivierungsdomänen, die für die Stimulation der Transkription verantwortlich sind. Die Stimulation der Transkriptionsinitiation ist der wichtigste Mechanismus, durch den Transkriptionsfaktoren die Genexpression aktivieren. Dabei können diese Transkriptionsfaktoren entweder direkt mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren oder die Aktivierung wird durch die Wechselwirkung mit Koaktivatoren vermittelt.

Für viele Transaktivatoren ist eine direkte Interaktion mit TAFs (TBP assoziierte Faktoren) (Goodrich et al., 1993; Gill et al., 1994; Chiang und Roeder, 1995), TBP (TATA-Box bindendes Protein) (Stringer et al., 1990; Kerr et al., 1993; Ransone et al.,

1993; Truant et al., 1993), TFIIB (Kim und Roeder, 1994; Roberts und Green, 1994) und TFIIF (Drapkin und Reinberg, 1994; Xiao et al., 1994) beschrieben worden. Durch diese Interaktion werden einzelne GTFs oder ein Holoenzym an die DNA rekrutiert und so die Bildung eines funktionellen Initiationskomplexes an der DNA erleichtert (Roberts und Green, 1994; Tjian und Maniatis, 1994; Meyer und Young, 1998; Berk, 1999).

Bis jetzt wurden verschiedene Aktivator-TAF Interaktionen beschrieben. Die Aktivierungsdomäne von Sp1 kann an die glutaminreiche Domäne von TAFII110 binden (Hoey et al., 1993; Gill et al., 1994). Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion der Aktivierungsdomäne von VP16 mit TAFII40 (Goodrich et al., 1993). Diese Beispiele mögen verdeutlichen, dass verschiedene Klassen von Aktivatoren mit unterschiedlichen Untereinheiten des TBP-TAF Komplexes in Kontakt treten können und dass TAFs eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Aktivatoren spielen. Daneben unterstützen diese TFIID Komplexe die Transkription von TATA-losen Promotoren, da TBP nicht in der Lage ist an diese zu binden (Burley und Roeder, 1996; Burke und Kadonaga, 1997; Struhl und Moqtaderi, 1998).

Die Interaktion von Transaktivatoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie kann auch von sogenannten Koaktivatoren abhängen. Koaktivatoren sind für die Aktivierung der Transkription, nicht aber für die basale Transkription *in vitro* notwendig. TAFs wurden auch als Koaktivatoren beschrieben, da sie für die basale *in vitro* Transkription nicht absolut notwendig sind (Ge und Roeder, 1994; Guarente, 1995, Greenblatt, 1997).

1.4.3 Transkriptionelle Kontrolle in der Hämatopoese

Für das Verständnis der Entwicklungsbiologie stellt die Hämatopoese ein zentrales Ereignis dar. In der Hämatopoese unterwerfen sich pluripotente Stammzellen einer fortschreitenden Restriktion über linienspezifische zu charakteristischen, zelltypspezifischen und voll ausdifferenzierten Blutzellen. In diesem Prozess ist die Ausprägung eines definierten Phenotyps von Blutzellen das Resultat einer koordinierten, zellspezifischen Genexpression. Das Muster der Genexpression wird in einer Zelle durch ein komplexes Zusammenspiel von ubiquitären und zellspezifischen Transkriptionsfaktoren, die eine Vielzahl von verschiedenen Proliferations- und

Differenzierungssignalen vermitteln, etabliert (Orkin, 1995; Shivdasani und Orkin, 1996; Clarke und Gordon, 1998). Die Hypothese, dass Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung zukommt, wird durch eine Reihe von Klonierungen gestützt. Dabei wurden Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, identifiziert, die durch eine Translokation Leukämien zur Folge haben (Nichols und Nimer, 1992; Rabbitts, 1994; Pedersen-Bjergaard et al., 1994).

Promotoren von linien- oder zellspezifischen Genen in der Hämatopoese, wie z.B. M-CSF (Makrophagen Koloniestimulierender Faktor) (Zhang et al., 1994a) oder GM-CSF (Granulozyten Makrophagen Koloniestimulierender Faktor) Rezeptoren (Smith et al., 1996), haben oft keine TATA-Box oder keine definierten Initiator Sequenzen. Interessanterweise haben viele Promotoren myeloidspezifischer Gene eine PU.1 Bindungsstelle (Li et al., 1996; Hohaus et al., 1995; Eichbaum et al., 1994). PU.1 kann *in vitro* an TBP, die primäre Komponente des TFIID, binden und dadurch den Rest des generellen Transkriptionsapparates rekrutieren (Hohaus et al., 1995); Hagemeyer et al., 1993). Studien an Mutationen in der PU.1-*site* des FcγRI Promoters zeigen, dass diese zur Unterdrückung der myeloidspezifischen Expression führen. Ein Austausch dieser Mutationen durch eine TATA-Box, stellt die myeloide Expression wieder her (Eichbaum et al., 1994).

Andere Faktoren, die in der myeloiden und lymphoiden Genregulation involviert sind z.B. Sp1 (Emili et al., 1994), C/EBPα (Nerlov und Ziff, 1995) und Oct1 (Zwilling et al., 1994) können ebenfalls mit TBP interagieren. Auch diese Interaktionen können dazu beitragen die basale Transkriptionsmaschinerie zu rekrutieren.

Einige dieser TATA- und Initiatorlosen Promotoren haben mehrere Transkriptionsstartpunkte (Chen et al., 1995a; Kistler et al., 1995; Eichbaum et al., 1994; Emili et al., 1994; Nerlov und Ziff, 1995), andere haben eine einzige Startposition (Fleming et al., 1993; Ulgiati et al., 2000). Der Mechanismus, der für die Determinierung der Startposition in diesen Promotoren verantwortlich ist, ist noch unbekannt.

An dieser Stelle soll kurz auf das regulatorische Potential von Sp1, ein Zinkfingerprotein, und PU.1, ein ETS-verwandtes Protein, eingegangen werden.

Sp1 ist ein Mitglied der großen Sp/XKLF Transkriptionsfaktoren-Familie, die an eine GC-Box oder GT/CACC-Box in Zielgenen binden (Philipsen und Suske, 1999). Übereinstimmend mit dem Fehlen einer TATA-Box sind diese Promotoren häufig von einer funktionellen Sp1-*site* abhängig, an diese *site* gebundenes Sp1 kann nicht nur mit

TBP, sondern auch mit TAF 110 interagieren (Emili et al., 1994). Diese Sp1-*site* vermittelt Aktivität, aber auch Spezifität und ist mit der Differenzierung induzierbar (Scholz et al., 2000; Zhang et al., 1994b; Chen et al., 1993). Wie Sp1 diese Spezifität vermittelt ist noch nicht geklärt. Obwohl Sp1 ubiquitär ist, wird es vermehrt in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Saffer et al., 1991). Weiterhin kann Sp1 eine Antwort auf Retinoic acid, Thyroid Hormon und Retinoblastoma Protein (Rb) vermitteln, alle Signale die eine hämatopoetische Differenzierung beeinflussen können (Darrow et al., 1990; Kim et al., 1992; Udvadia et al., 1993; Chen et al., 1994).

Viele myeloische Promotoren besitzen eine funktionelle PU.1-*site* (Avalos, 1996; Chen et al., 1995b; Farokhzad et al., 1996; Reya und Grosschedl, 1998) oder eine PU.1 Bindungsstelle in einem weit entfernten Enhancer (Ahne und Stratling, 1994). PU.1 wird in hohem Maße in myeloischen und B-Zellen exprimiert aber nicht in T-Zellen (Klemsz et al., 1990; Zhang et al., 1996; Hallier et al., 1998). Trotzdem kommt es in B-Zellen nicht zur Expression der myeloiden Genen M-CSF-R (Reddy et al., 1994), GM-CSF-R (Hohaus et al., 1995), G-CSF-R (Smith et al., 1996). Dies ist durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und/oder Kofaktoren bedingt, die mit der transaktivierenden Domäne von PU.1 interagieren können (Pongubala et al., 1993; Eisenbeis et al., 1995; Nagulapalli et al., 1995; Hohaus et al., 1995; Smith et al., 1996).

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Aufklärung von linienspezifischer Entwicklung und Differenzierung gemacht. Es bleiben allerdings eine Reihe von offenen Fragen. Wie kommt es zur Kombination von spezifischen und unspezifischen Transkriptionsfaktoren, so dass eine linienspezifische Entwicklung eingeleitet wird? Was macht den Unterschied in der Entwicklung und Differenzierung von Subtypen aus? Und wie werden die regulatorischen Transkriptionsfaktoren selbst in Stammzellen, multipotenten Vorläuferzellen und dann ausdifferenzierten Zellen reguliert?

1.5 Ziel der Arbeit

Die Transkriptionsregulation des Fc γ RIII Gens und seiner beiden Isoformen ist immer noch nicht ganz aufgeklärt. Die Analyse der Struktur und transkriptionellen Aktivität der Fc γ RIIIA und Fc γ RIIIB Gene, sowie die Bestimmung unabhängiger Initiationsmuster der Transkription hat erste wichtige Hinweise zur regulierenden Zelltypspezifität der beiden strukturell und damit funktionell unterschiedlichen Rezeptoren geliefert.

Die Expression des Fc γ RIIIA Rezeptorgens wird durch alternative Promotoren reguliert. Von besonderem Interesse ist der sogenannte Pmed1-Promoter, der im Reporter-gen-Assay Luciferaseaktivität in YT(NK)-Zellen vermittelt, aber nicht in zu Granulozyten differenzierbaren HL60-Zellen aktiv ist. Die Deletion eines 21bp-Fragmentes in der 5'-Region des Pmed1-Promotors resultiert im Verlust der Fc γ RIIIA-Expression in NK-Zellen.. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich in diesem Sequenzabschnitt ein wichtiges Bindungsmotiv für einen Transkriptionsfaktor befindet, der für die zellspezifische Expression des Fc γ RIIIA-Gens verantwortlich ist.

Zuerst sollten in dieser Arbeit weitere Zelllinien zum Einsatz kommen, um die Bedeutung des Pmed1-Promotors für die zelltypspezifische Expression des Fc γ RIIIA-Gens zu untersuchen. Weiterhin sollten Deletions- und Substitutionsmutanten durch *in vitro* Mutagenese Experimente hergestellt werden, um ein Bindungsmotiv für einen Transkriptionsfaktor innerhalb des 21bp-Elements des Pmed1-Promotors eingrenzen zu können. Daneben sollten Bandshiftassays (EMSA) durchgeführt werden, um gebundene Transkriptionsfaktoren näher charakterisieren zu können. Ziel dieser Analyse ist die Identifikation transaktivierender Proteine und deren Bindungsstellen im Pmed1-Promotor, die maßgeblich an der zellspezifischen Expression des Fc γ RIIIA-Gens beteiligt sind. Heterologe Promotorkonstrukte sollten zum Einsatz kommen, um einerseits die 21bp-3'-Region und andererseits die 71bp-5'-Region unabhängig und in ihrer Bedeutung innerhalb des Pmed1-Promotors untersuchen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

YT (Yodoi et al., 1985)

NK-Zell-ähnliche Linie

Jurkat E.6-1 (ATCC-Nr.: TIP-152)

Humane akute T-Zell Leukämie Linie

HL60 (ATCC-Nr.: CCL-240)

Humane akute promyelozytäre Leukämie Linie

Daudi (ATCC-Nr.: CCL-213)

Humane B-Zell Burkitt Lymphom Zelllinie

U937.1 (ATCC-Nr.: CRL-1593)

Humane Monozyten ähnliche Zelllinie

THP-1 (ATCC-Nr.: TIP-202)

Humane akute monozytäre Leukämie Linie

RAW264.7 (ATCC-Nr.: TIP-71)

Murine Monozyten/Makrophagen Zelllinie

SL2 *Drosophila* Zellen (ATCC-Nr.: CRL-1963)

embryonale Insekten Zelllinie von *Drosophila melongaster*

1B3-Zellen – CD16A⁺ γ/δ T-Zellen im Labor von R.E. Schmidt 1989 isoliert (persönliche Mitteilung von R. Jacobs)

2.1.2 Bakterienstämme (*E. coli*)

XL1-Blue (Stratagene)

F'::Tn10proA⁺B⁺ lacI^q D(lacZ)m15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_K-m_K⁺) supE44 relA1 lac

NovaBlue (Novagen)

EndA1 hsdR17 (r_{K12}-m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA+B⁺ lacI^q ZΔM15::Tn10(tet^R)]

2.1.3 Plasmide und Vektoren

-pBluescript SK(+), Stratagene

-pGEM-T Vektor, Promega (#A3600); Klonierungsvektor mit überhängenden T, der zum Klonieren von PCR-Amplifikaten diene.

-pPac-Sp1 (Courey und Tjian, 1988) wurde zur Expression des Transkriptionsfaktors Sp1 in SL2-Zellen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors eingesetzt, der Vektor wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe R. Tjian überlassen.

-pαPro-Luc enthält die Luciferase-cDNA von *P.pyralis* (Wet et al., 1987) unter der Kontrolle des alfa-Prothymosingen Promotor der Ratte (Gaubatz et al., 1994). Der Vektor diene bei der transienten Transfektion als positiv Kontrolle, er wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe B. Lüscher (MHH) überlassen.

-pEQ176 (Firzlaff et al., 1991) wurde zur Standardisierung der transienten Transfektion benutzt. Der frühe IE (*Immediate Early*) Cytomegalusvirus (CMV)-Promotor exprimiert die β-Galaktosidase in eukaryontischen Zellen.

-pLuc ist durch die *multicloning site* von pKS⁺ (Stratagene) und die Luciferase-cDNA von *P.pyralis* (Wet et al., 1987) gekennzeichnet. Der Vektor enthält weiterhin „splice“- und polyA-Signale des β-Globingens, Kopien des PolyA-Signals von SV40, sowie das Amp^r-Gen und den Replikationsursprung des Plasmids pUC18. Die Plasmide pTK-Luc und pTATA-Luc und der FcγRIIIA- und FcγRIIIB-Gen-Promotoren wurden durch Klonierung der entsprechenden Elemente vor das Luciferasegen in den pLuc gewonnen.

2.1.4 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit für die gerichtete PCR-Mutagenese, Sequenzierungen, PCR-Analysen und EMSA eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden aus experimentell ermittelten oder publizierten DNA-Sequenzen abgeleitet und als Auftragssynthese von den Firmen Biometra oder MWG Biotech bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
Pmed1-S-WT	5'-CGGGATCCACAACCCTCCCACTTCCTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-WT	5'-CCAGGAAGTGGGAGGGTTGTGGATCCCG-3'	BamHI
Pmed1-S-M1	5'-CGGGATCCACCCACCTCCCACTTCCTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-M1	5'-CCAGGAAGTGGGAGGTGGGTGGATCCCG-3'	BamHI
Pmed1-S-M2	5'-CGGGATCCACAACAAGCCCACTTCCTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-M2	5'-CCAGGAAGTGGGCTTGTGTGGATCCCG-3'	BamHI
Pmed1-S-M3	5'-CGGGATCCACAACCCTTTTACTTCCTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-M3	5'-CCAGGAAGTAAAAGGGTTGTGGATCCCG-3'	BamHI
Pmed1-S-M4	5'-CGGGATCCACAACCCTCCCCTCCTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-M4	5'-CCAGGAGAGGGGAGGGTTGTGGATCCCG-3'	BamHI
Pmed1-S-M5	5'-CGGGATCCACAACCCTCCCACTAGTTGG-3'	BamHI
Pmed1-AS-M5	5'-CCAAGTAGTGGGAGGGTTGTGGATCCCG-3'	BamHI
Luci-0-XbaI	5'-GCTCTAGAGGATAGAATGGCGCC-3'	XbaI
S941-3x21	5'-CGGGATCCGTCGACAACCCTCCCACTTCCT GGACAACCCTCCCACTTCCTGGACAACCCTCC CACTTCCTCGATCCTCGAATTCGC-3'	BamHI EcoRI
AS941-3x21	5'-GCGAATTCGAGGATCGAGGAAGTGGGAGG GTTGTCCAGGAAGTGGGAGGGTTGTCCAGGAA GTGGGAGGGTTGTGACGGATCCCG-3'	EcoRI BamHI
LU941BamHI	5'-CTGCAGGTCGACTCTAGGATCCAC-3'	BamHI
LU941Ets-M	5'-TCTAGGATCCACAACCCTCCCACTGACTGG-3'	BamHI
LU850Sp1-M	5'-CTCGAGATCTGCTCTGGTCTGTCA-3'	BglII
LU935	5'-TCTAGGATCCCTCCCACTTCC-3'	BamHI
LU932	5'-TCTAGGATCCACTTCCTGGCC-3'	BamHI
LU927	5'-TCTAGGATCCTCCTGGCCACC-3'	BamHI
S-Sp1-M	5'-TGACAGACCAGAGCAGATCTCGAC-3'	BglII
AS-Sp1-M	5'-GTCGAGATCTGCTCTGGTCTGTCA-3'	BglII

Name	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
S-Sp1-C	5'-ATTTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'	
AS-Sp1-C	5'-GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT-3'	
Pmed1-850S-WT	5'-GACAGACCAGCCC <u>AGATCT</u> CGAC-3'	BglII
Pmed1-850AS-WT	5'-GTCG <u>AGATCT</u> GGGCTGGTCTGTC-3'	BglII
TK81-BamHI/EcoRI	5'-CGCGGATCCGAATTCGAACACGCAGATC-3'	BamHI-EcoRI
OL1-S	5'-AACAACCCTCCCCTTCTGGCCACCCCC-3'	
OL1-AS	5'-GGGGGGTGGCCAGGAAGTGGGAGGGTTGTT-3'	
OL2-S	5'-TCCTGGCCACCCCCCTCCACCTTTTCTGGT-3'	
OL2-AS	5'-ACCAGAAAAGGTGGAGGGGGTGGCCAGGA-3'	
OL3-S	5'-TCCACCTTTTCTGGTAAGGAGCCCTGGAGC-3'	
OL3-AS	5'-GCTCCAGGGCTCCTTACCAGAAAAGGTGGA-3'	
OL4-S	5'-AAGGAGCCCTGGAGCCCCGGCTCCTAGGCT-3'	
OL4-AS	5'-AGCCTAGGAGCCGGGGCTCCAGGGCTCCTT-3'	
OL5-S	5'-CCCGGCTCCTAGGCTGACAGACCAGCCAGATC-3'	
OL5-AS	5'-GATCTGGGCTGGTCTGTCAGCCTAGGAGCCGGG-3'	

2.1.5 Antikörper

- α Sp1 polyklonales Kaninchenserum gegen Aminosäuren von Sp1 des Menschen, auch reaktiv gegen Sp1 der Maus (#sc59X, Santa Cruz, CA)
- α Ets1/2 polyklonales Kaninchenserum gegen Aminosäuren von Ets1/2-Protein des Menschen, auch reaktiv gegen Ets-Proteine der Maus, kreuz-reaktiv mit vielen Mitgliedern der Ets-Familie (#sc112X, Santa Cruz, CA).
- α Ets1 12CA5mAb monoklonaler Antikörper gegen Ets1, eine freundliche Gabe von Jacques Ghysdael (Laboratoire d Oncologie Virale et Cellulaire, France) (JBC, 269, 45 (11) 28143-28151, 1994)

2.1.6 Chemikalien

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien und ihre Bezugsquellen aufgelistet:

Acrylamid	Roth
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Dithiothreitol	Gibco BRL
Harnstoff	AppliChem
LB-Agar	Gibco BRL
LB-Broth Base Medium	Gibco BRL
N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	BioRad
Phenol	Roth
DMSO	Roth

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien stammten in p.A. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.7 Feinchemikalien

Ampicillin	Serva
Desoxynucleosidtriphosphate	Promega
IPTG	Boehringer
Nucleosidtriphosphate	Promega
γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan	Sigma
Rinderserumalbumin	Serva
Salmon Sperm DNA	Serva
Sigmacote	Sigma
Tetracyclin	Boehringer
XGal	Boehringer
[γ^{32} P] ATP	Amersham

2.1.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas
E.coli DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Promega
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega
Restriktionsenzyme	Gibco, Sigma, Biolabs, MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Promega

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

3MM Filterpapier	Whatman
Nitrozellulose Membranen	Schleicher & Schuell
Nylon Membranen	Amersham
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak
90 mm Petrischalen	Greiner
15 ml und 50 ml Reaktionsröhrchen	Falcon
0,5ml und 1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
Einfriergefäße	Greiner, Nunc
Kanülen	B. Braun
Multiwell-Platten	Greiner, Nunc
Pipetten	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Spritzen	B. Braun
Zellkulturflaschen (10 ml 250 ml)	Greiner, Nunc
Zellkulturpetrischalen	Falcon
Zellschaber	Biochrom, Nunc

2.2 Lösungen und Medien

2.2.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), Apotheke MHH

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium, Gibco BRL (#14190)

RPMI 1690, Biochrom (#F1215)

Iscove Medium, Gibco BRL

Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml), Biochrom (#L6115)

L-Glutamin 200 mM, Biochrom (#K0282)

Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml), Biochrom (#A2213)

Trypsin/EDTA, PAA (#L11-004)

Seren Fötale Kälberserum (Standard-FCS), PAA (#15-773)

Fötale Kälberserum für Insektenzelllinien, Gibco BRL (#15-1024)

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium 20 g LB Broth Base in 1 L Aqua dest. auflösen und autoklavieren.

LB-Agar 32 g LB Agar in 1 L Aqua dest. auflösen und autoklavieren (Agarosegehalt 1,5%)

SOC-Medium LB-Medium mit 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ kultiviert. YT-Zellen wurden in Iscove Medium (15% FCS, 2 mM Glutamin), Daudi-Zellen in RPMI 1640 (20% FCS, 2 mM Glutamin) und die murine Zelllinie RAW264.7 wurde unter Zusatz von b-Mercapto-Ethanol (0,1 mM) kultiviert. Alle übrigen Zelllinien in RPMI 1640 (10% FCS, 2 mM Glutamin) kultiviert. Allen Medien wurde Penicillin (500 U/ml) und Streptomycin (500 µg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase passagiert. Das Ablösen adhärenter Zellen erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA oder mittels eines Zellschabers.

2.3.2 Titerbestimmung

Adhärenente Zellen wurden abtrypsinisiert; Suspensionszellen konnten direkt nach starkem Auf- und Niederpipettieren gezählt werden. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit einer 1:10 verdünnten Trypanblau-Lösung (Sigma, #T8154) gemischt und in der Neubauer-Zählkammer drei Felder ausgezählt.

2.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Tank mit flüssigem Stickstoff wurden die Zellen sofort in einem Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut (1-2 min) und anschließend mit 20 fachen Volumen des entsprechenden Mediums (10% FCS) verdünnt. Nach Zentrifugation (200 x g/5 min) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

2.3.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst (falls adhärenent) und durch Zentrifugation (200 x g/5 min) sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium (FCS und 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -70°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.3.5 Isolierung peripherer Blutlymphozyten (PBL) und polymorphkerniger, neutrophiler Zellen (PMN)

Heparinisiertes (250U/10ml) Vollblut (Buffys) wurde in einem 50ml Röhrchen (Falcons) mit Hanks-Lösung auf 40 ml 1:3 verdünnt. Die Suspension wurde mit 10 ml Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 (Biochrom, Berlin) mit einer Lumbalnadel unterschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 1000g wurde die Interphase, die die mononukleären Zellen (PBLs) als Ring über der Ficoll-Lösung enthält, abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt.

Im Pellet befanden sich die PMNs, der Überstand ohne PBLs wurde bis zum Sediment abgenommen. Das Pellet wurde mit Hanks-Lösung und Plasmasteril (1:1) versetzt und 30 Minuten stehen gelassen. Die Erythrozyten setzten sich in der unteren Phase ab, die PMNs fanden sich in der oberen Phasen. Die obere Phase mit den PMNs wurde abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und 10 Minuten bei 300g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 15 ml H₂O für 45 Sekunden inkubiert, danach mit 15 ml 1,8%-iger NaCl-Lösung durchmischt, mit PBS-Lösung aufgefüllt und bei 300g zentrifugiert. Zum Schluss wurden die PMNs in PBS-Lösung resuspendiert und entsprechend weiterverarbeitet (z.B. Kernextrakte hergestellt).

Die oben isolierte Interphase mit PBLs wurde mit Hanks-Lösung 1:2 verdünnt, danach bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet erneut mit Hanks-Lösung resuspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 10%-igem FCS-Medium gewaschen und bei 300g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml PBS resuspendiert und gezählt. Die mononukleären Zellen (PBLs) wurden entweder eingefroren oder weiter verarbeiten.

Material: Buffys (Blutkonserve)
Heparin
Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077
HANKS-Lösung
PBS-Lösung
1,8% NaCl-Lösung

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik, die es ermöglicht, aus geringsten DNA-Mengen definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen. DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigen als Startpunkt für die Synthese des zur Matrize komplementären Stranges kurze, doppelsträngige Sequenzbereiche. Solche doppelsträngigen Bereiche werden durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotide ("Primer") in einem DNA-Gemisch erzeugt. Für die PCR verwendet man zwei Primer, die jeweils zu einem der beiden Stränge der Matrizen-DNA komplementär sind und die gewünschte Sequenz (Amplikon) einschließen (Sense- und Antisenseprimer). Ein PCR-Zyklus beinhaltet die temperaturgesteuerte Reaktionsfolge von Denaturierung, Annealing und Extension. Während des Annealing bilden sich Hybride zwischen den denaturierten Einzelsträngen des Amplikons und den spezifischen Primern aus. Diese doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Startpunkte für die Synthese des komplementären Stranges (Extension).

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Protokolle wurden durch Variation der Primerkonzentration, der Annealingtemperatur und der Zykluszahlen optimiert. Alle Reaktionen wurden im Thermocycler Varius V der Firma Landgraf durchgeführt. Nachfolgend sind die Bedingungen einer Standard-PCR-Reaktion aufgeführt. Abweichungen von diesem Protokoll sind an den entsprechenden Stellen innerhalb dieser Arbeit gesondert vermerkt.

PCR-Standardansatz, 50 µl Reaktionsvolumen:

- 1-100 ng DNA-Probe
- 1,5 µl Primer 1 (10 µM)
- 1,5 µl Primer 2 (10 µM)
- 5 µl 10 x PCR-Puffer (MBI-Fermentas, enthält 15 mM MgCl₂)
- 5 µl 10 x Nukleotid-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,25 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
- H₂O ad 50 µl

Standard-Temperaturprofil:

1 Zyklus

- 94°C für 3 min

20-40 Zyklen:

- 94°C 60 sek

45-68°C 60 sek

- 72°C 60 sek

1 Zyklus:

- 94°C 60 sek

- 72°C 5 min

2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen linearisierten Bestandteile eines DNA-Gemischs ist umgekehrt proportional dem dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Je nach Fragmentgröße der zu trennenden DNA wurden die Trenneigenschaften des Gels über die Agarosekonzentration variiert. Die Proben wurden 1:0.16 in 6 x SB verdünnt und in horizontalen Gelen mit Agarosekonzentrationen zwischen 0.5% und 2.5% mit 1 xTAE (50x TAE Puffer pH 7,2 (1 L): 242 g Tris Base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm aufgetrennt. Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid (50 mg/ml) zugesetzt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch UV-Aktivierung (302 nm) des interkalierten Farbstoffs visualisiert und mit dem Analyse System und dem Dokumentationsprogramm DIANA der Firma Raytest/Fuji dokumentiert.

Elektrophorese-Standardpuffer

50x TAE Puffer pH 7,2 (1 L): 242 g Tris Base; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 1 Liter aufgefüllt.

10x TBE Puffer (1 L): 107,8 g Tris Base; 55 g Borsäure; 10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

TE: 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

0,5 M EDTA (1 L): Na₂EDTA x 2H₂O; 700 ml H₂O; 10 M NaOH bis pH 8,0. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

Ethidiumbromid: 10 mg/ml in H₂O

Größenstandards

1kb-DNA-Leiter (100 µg/ml in 1 x SB), Gibco BRL (#15615-024) mit Fragmentgrößen 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 bp.

100bp-DNA-Leiter (100 µg/ml in 1 x SB), Gibco BRL (#15628-019) mit Fragmentgrößen 2.072, 1.500, 1.400, 1.300, 1.200, 1.100, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400 300, 200, 100 bp.

2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung oder zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht visualisiert und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte unter Verwendung des QIAEX DNA-Extraktionskit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Aufnahme von UV-Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 230-320 nm in einer Quarzglaszuvette. Die Berechnung der Konzentration wurde nach folgenden, für eine Schichtdicke von 1 cm geltenden Richtwerten durchgeführt:

Doppelstrang-DNA: $c = E_{260} \text{ nm} \times 50 \text{ µg/ml}$

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde anhand des E₂₆₀/E₂₈₀-Quotienten ermittelt. Für reine Nukleinsäurelösungen sollte er zwischen 1.8 und 2.0 betragen.

2.4.5 Restriktionsspaltung von DNA

Die enzymatische Hydrolyse von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen, Plasmid- oder Phagen-DNA wurde routinemäßig in 10-100 µl-Reaktionsansätzen unter den vom Hersteller New England Biolabs für das jeweilige Restriktionsenzym empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Die Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte durch Inkubation des Ansatzes für 15 min bei 80°C.

2.4.6 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Zur CIP-Behandlung von Vektoren mit kohäsiven 5'-Enden wurde 1 U alkalische Phosphatase pro µg linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt und der Ansatz in dem vom Hersteller gelieferten Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Um das Insert in der nachfolgenden Ligation vor enzymatischer Restaktivität zu schützen wurde die alkalische Phosphatase durch Zugabe von 5 mM EDTA pH 8.0 und 0.5% SDS für 10 min bei 75°C inaktiviert. Abschließend wurde die DNA phenolisiert und mit Ethanol präzipitiert. Danach wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in TE aufgenommen.

2.4.7 Ligation

Unter ATP-Hydrolyse stellen Ligasen Phosphodiesterbindungen zwischen dsDNA-Fragmenten her. Voraussetzung hierfür sind überhängende, komplementäre Einzelstrangenden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*) der beteiligten dsDNA. Zusätzlich muss einer der beiden Reaktionspartner am 5'-Ende phosphoryliert sein. Für die Ligation wurden Passagier- und Vektor-DNA routinemäßig in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die DNA-Konzentrationen in den Ligationsreaktionen betragen zwischen 2-5 µg/ml und wurden in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt. Für die Ligation von DNA-Enden mit stumpfen oder überhängenden Enden wurde der „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Boehringer eingesetzt. Die TA-Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des pGEM .-T-Vector Systems der Firma Promega. Bei der Anwendung beider Ligationssysteme wurde exakt nach den Protokollvorgaben des jeweiligen Herstellers gearbeitet.

2.4.8 Transformation von *E. coli*-Zellen

2.4.8.1 Transformation mit „CaCl₂-kompetenten“ Zellen

Für jeden Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-10 ng DNA wurde kurz gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Zur erleichterten DNA-Aufnahme wurde für 1 min ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde den Zellen bei 37°C 30 min Zeit zur Ausprägung der Resistenz gegeben, bevor 10 und 100 µl Aliquots auf LB-Amp-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden.

2.4.8.2 Elektroporation

40 µl kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann in eine bei -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette (Eurogentec, 0.2 cm Elektrodenabstand) gegeben, die Küvette gründlich mit einem Kleenex getrocknet, in den Schlitten des Elektroporationsgerätes eingesetzt und der Spannungspuls ausgelöst. Die am „EasyJect“ (Eurogentec) eingestellten Parameter 2.5 kV, 25 µF, 200Ω waren dabei so gewählt, dass es bei korrektem Verlauf zu einer Pulslänge von ca. 4 msek kommen sollte. Die Probe wurde anschließend sofort mit 1 ml SOC-Medium (bei 37°C vorgewärmt) versetzt und zur Resistenzexpression 30 min bei 200 upm und 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 100 µl SOC-Medium aufgenommen und bei Verwendung eines geeigneten Vektors auf LB-Amp-IPTG-Xgal-Agar (ermöglicht Blau-Weiß-Selektion) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die rekombinanten Transformanden anhand ihrer weißen Farbe identifiziert und Einzelkolonien gepickt werden.

2.4.9 Herstellung kompetenter Bakterien

2.4.9.1 Kompetente Bakterien für die CaCl₂-Methode

Alle verwendeten Lösungen, Pipetten und Gefäße wurden auf Eis vorgekühlt. Aus einer 5 ml-Vorkultur (mit einer Einzelkolonie des Stammes XL1-blue oder NovaBlue beimpftes LB-Amp-Medium) wurden 100 ml LB-AMP-Bouillon 1%ig angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 upm bis zu einer OD600 = 0.4 inkubiert. Das Wachstum wurde auf Eis gestoppt, je 20 ml Suspension auf vier 30 ml Corex-Röhrchen verteilt und die Zellen 10 min bei 4°C und 12000 x g sedimentiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor JA 14). Nach Resuspension der Pellets in je 10 ml MgCl₂ wurde erneut zentrifugiert, die Sedimente wurden in je 10 ml 50 mM CaCl₂ gewaschen und in je 1 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die in einem Reagenzglas vereinigten Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert, mit 400 µl Glycerin 87% (v/v) versetzt und abschließend in 200 µl-Aliquots bei -70°C eingefroren.

2.4.9.2 Kompetente Bakterien für die Elektroporation

Die Kompetenzinduktion erfolgte über die Ankonzentrierung der Bakterien bei gleichzeitiger, schrittweiser Erniedrigung des Salzgehaltes des Mediums. Alle verwendeten Lösungen, Pipetten und Gefäße wurden auf Eis vorgekühlt. Aus einer 20 ml-Vorkultur (mit einer Einzelkolonie des Stammes XL1-blue oder NovaBlue beimpftes LB-Amp-Medium) wurden 1 L LB-AMP-Bouillon 1%ig angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 upm bis zu einer OD600 = 0.5 inkubiert. Das Wachstum wurde 10-15 min auf Eis gestoppt, je 350 ml Suspension auf zwei 500 ml Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen 15 min bei 4°C und 2800x g sedimentiert (Beckmann-Zentrifuge, Rotor JA 14). Nach Resuspension der Pellets in je 250 ml 1 mM Hepes pH 7.0 wurde erneut zentrifugiert, die Sedimente wurden in je 200 ml Hepes gewaschen und in je 20 ml 10%igem Glycerin (v/v) resuspendiert. Die vereinigten Bakterien wurden wiederum pelletiert und schließlich in 2.5 ml Glycerin aufgenommen. Zuletzt wurden die Zellen in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.4.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte aus kleinen (1,5 ml) und großen (100-300 ml) Bakterienkulturvolumina nach einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979). Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte bei 37°C.

Lösung 1	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 50 mM Glucose 2 mg/ml Lysozym
Lösung 2	0,2 N NaOH 1% SDS
Lösung 3	3 M K-Acetat, pH 4,8

2.4.10.1 Plasmid-Minipräparation

Einzelkolonien wurden in 3 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und durch die Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 und nachfolgender Inkubation auf Eis (10 min) wurden chromosomale DNA und Proteine 10 min bei 14.000 upm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit RNaseA (10 µg/ml) bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI; 25:24:1) Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde aus dem wässrigen Überstand mit 1,5-fachem Volumen Ethanol präzipitiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 µl TE-Puffer resuspendiert. Die so isolierte Plasmid-DNA eignete sich für Restriktionsanalysen, Klonierungen und Sequenzierungen.

2.4.10.2 Schnelle Plasmid-Minipräparation

Diese Methode wurde zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA angewandt, um eine größere Anzahl Plasmide zur Bestimmung der Inserts zu untersuchen.

1,5 ml einer ÜN-Kultur wurden für 10 sek bei 14.000 upm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Bakterien wurden in 300 µl TENS resuspendiert, danach wurden 150 µl 3 M K-Acetat, pH 4,8 dazugegeben und stark durchmischt. Die Suspension wurde bei 14.000 upm, 5 min, RT zentrifugiert, der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 900 µl eiskaltes Ethanol dazupipettiert und 20 min bei –80°C gelagert. Anschließend wurde bei 14.000 upm, 5 min, RT die Plasmid-DNA pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 20 µl TE mit RNase (100µg/ml) gelöst.

TENS	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA, pH 8,0
	0,1 N NaOH
	0,5% SDS

2.4.10.3 Plasmid-Maxipräparation

Große Mengen von Plasmid-DNA wurden von 300 ml Bakterienkultur isoliert. Für Klonierungsexperimente wurde die Plasmid-DNA mit dem „MAXI Plasmid Isolation Kit“ von QIAGEN gewonnen, nach Angabe des Herstellers.

Die Plasmid-DNA für die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde nach der CsCl₂-Methode isoliert. Dazu wurden die in 300 ml LB-Medium und 50 µg/ml Ampicillin logarithmisch wachsenden Bakterien sedimentiert in einer Beckman-Zentrifuge bei 6000 x g, 4°C, 15 min in einem JA 14 Rotor, und in 6 ml Lösung 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 12 ml Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 7,5 ml Lösung 3 vorsichtig geschüttelt und für 30 min auf Eis gesetzt. Das Lysat wurde in einer Beckman-Zentrifuge bei 12.000 x g, 4°C, 30 min in einem JA 14 Rotor zentrifugiert, der Überstand in einen frischen Zentrifugenbecher überführt und mit 20 ml Isopropanol 30 min bei RT präzipitiert, danach bei 12.000 x g, 4°C, 15 min im JA 25.5 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 8 ml TE pH 8,0 aufgenommen, dazu wurden 8 g CsCl₂ und 0,4 ml EtBr (10 mg/ml) gegeben, in Quickseal-Röhrchen überführt, mit Paraffin

überschichtet, austariert und zugeschweißt. Danach wurde der Ansatz bei 55.000 upm, 20°C, 20 h in einem Ti 70.1 Rotor in einer Beckman-Ultrazentrifuge ohne Bremse zur Einstellung eines CsCl₂-Gradienten zentrifugiert. Die Plasmidbande wurde mit einer Spritze mit einer G19-Kanüle abgezogen, das Ethidiumbromid wurde dreimal mit Butanol (Butanol auf NaCl) ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Suspension mit TE pH 8,0 auf 10 ml Volumen gebracht, mit Isopropanol die DNA gefällt, abzentrifugiert und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl 10mM Tris pH 8,0 aufgenommen, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt, die Konzentration auf 2 µg/µl eingestellt, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.4.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Strangabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Dabei wurde das „fmol DNA Sequencing System“ von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Die hier benutzte modifizierte Didesoxy-Sequenzierungsmethode beruht auf dem Prinzip der Anlagerung spezifischer Primer an DNA-Einzelstränge und deren Verlängerung durch die Taq-Polymerase in der PCR. Für die Amplifizierung werden 32P-endmarkierte Primer verwendet und der Einbau von nicht verlängerbaren Didesoxynukleotiden führt zum Kettenabbruch, der rein statistisch an jeder Base auftritt. Die Reaktionen wurden nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde etwa 0,5-1 µg Plasmid-DNA aus Minipräparationen eingesetzt, separate PCR-Reaktionen wurden für jedes ddNTP mit etwa 1,5 U „Sequencing-Grade“ Taq-Polymerase in einem Thermozykler (Landgraf) durchgeführt. Nach der anfänglichen Denaturierung von 2 min bei 95°C wurden 30 Zyklen durchlaufen: 30 s bei 95°C, 30 s bei 55°C, 60 s bei 72°C.

Die Auftrennung wurde in einem 6% denaturierendem Polyacrylamidgel mit TBE-Puffer durchgeführt, als Kathodenpuffer wurde 0,5x TBE und als Anodenpuffer 1x TBE eingesetzt, die Auftrennung erfolgte bei 80 W. Um eine bessere Trennung der Fragmente zu erreichen, wurde während des Laufes zum Anodenpuffer 3 M Na-Acetat bis zu einer Endkonzentration von 1 M hinzugefügt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf der haftenden Glasplatte in einem 10% Essigsäure/Methanol Bad 15 min fixiert, mit H₂O gespült und 60 min bei 80°C getrocknet, danach mit einem Kodak BioMax MR Film exponiert und ausgewertet.

2.5 Funktionelle Reporteranalyse

2.5.1 Transiente Transfektion

Die Zellen wurden für die transiente Transfektion mit Vollmedium auf die entsprechende Zellzahl eingestellt und 5 min bei Raumtemperatur mit der entsprechenden Menge des zu untersuchenden Promotorkonstruktes im Luciferasevektor in einer 0,4 cm Eurogentec-Küvette inkubiert. Dann wurden die Zellen mit einem Easyject Genpulser transfiziert und sofort in 10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen, mit Ausnahme der U937.1 Zellen, diese wurden nach Zugabe der Plasmid-DNA 5 min auf Eis gesetzt, gepulst und anschließend nochmals für 5 min auf Eis belassen, bevor sie in Medium aufgenommen wurden. Für die Transfektion wurden 10 Mio. YT Zellen mit 40 µg Plasmid-DNA in 600 µl Medium wurden mit 270 V und 900 µF elektroporiert. Desweiteren wurden 20 Mio. Jurkat Zellen mit 20 µg Plasmid-DNA in 500 µl Medium mit 350 V und 1050 µF elektroporiert. 20 Mio HL60 Zellen wurden mit 80 µg Plasmid-DNA in 800 µl Medium mit 270 V und 2400 µF elektroporiert. 10 Mio. THP-1 Zellen wurden mit 20 µg Plasmid-DNA in 700 µl Medium mit 400 V und 1050 µF elektroporiert. 40Mio. U937.1 Zellen wurden mit 25 µg Plasmid-DNA in 800 µl Medium mit 350 V und 2400 µF elektroporiert und RAW264.7 Zellen wurden mit 20 µg Plasmid-DNA in 600 µl Medium mit 350 V und 1050 µF elektroporiert.

Da die Transfektionseffizienz innerhalb einer Transfektionsserie variieren konnte, wurden immer 3 µg pEQ176 pro Elektroporationsansatz kotransfiziert. Die β -Galaktosidaseaktivität war damit ein Maß für die Transfektionseffizienz und wurde zur Standardisierung der Luciferaseaktivität benutzt. Die Kotransfektion pEQ176 bei transienten Transfektionen wird im Ergebnisteil nicht mehr extra aufgeführt, sondern als Teil der Methode angesehen.

2.5.2 Lösungen für die Transfektionsmessung

Extraktionspuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,8 2 mM EDTA 10 (v/v) Glycerin 1% (v/v) Triton X-100 2 mM DTT (frisch dazugeben)
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄
Messpuffer	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ 5 mM ATP, pH 7,0 (frisch angesetzt)
	1 M Na ₂ CO ₃ 25 mM Luziferinlösung (AppliChem) 4 mg/ml ONPG (AppliChem) in Z-Puffer

2.5.3 Messung der Transaktivierung (Luciferase Assay)

Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Elektroporation bei 1.200 upm sedimentiert, mit 10 ml PBS gewaschen, in 300 µl Extraktionspuffer lysiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zelltrümmer wurden 3 min, bei 14.000 upm, RT sedimentiert, der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die Luciferase- und β-Galaktosidasemessung verwendet.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 50 µl Lysat zu 300 µl Messpuffer gegeben und sofort in einem Bioluminaten (Berthold Lumat, LB1501) gestellt. Dieser injizierte automatisch 100 µl Luziferinlösung und bestimmte die Anzahl an Lichtblitzen, die innerhalb von 10 Sekunden auftraten. Jede Messung wurde zweimal durchgeführt und

der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichung der beiden Messungen war jeweils kleiner als 5%.

Alternativ wurde ein Luciferase Kit von Promega eingesetzt und nach Angabe des Herstellers verfahren. 20 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 200 μ l Lysispuffer (Promega) aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Zellrümmer wurde abzentrifugiert, 20 μ l des Überstandes wurden zur Luciferaseaktivitätsbestimmung im Berthold Bioluminator gemessen durch Zugabe einer Luciferin-ATP-Lösung (Promega).

Zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden 360 μ l Z-Puffer mit 50 μ l Lysat und 100 μ l ONPG-Lösung gemischt und für wenige Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt, wenn sich eine deutliche Gelbfärbung eingestellt hatte. Der Färbungsgrad wurde photometrisch bei 405 nm in einem ELISA-Reader von SLT bestimmt. Aus dem Quotienten der Luciferasemessung und der β -Galaktosidasemessung wurden die relativen Luciferaseaktivitäten errechnet.

2.6 DNA-Protein Bindungsanalysen

2.6.1 Isolierung von Kernproteinen

Die Zellextraktion wurde modifiziert nach der Methode von Dignam et al. (1983) unter Verwendung der folgenden Puffer durchgeführt.

Puffer A:	10 mM Hepes pH 7,8	Puffer C:	20 mM Hepes pH 7,8
	1,5 mM MgCl ₂		420 mM NaCl
	10 mM NaCl		1,5 mM MgCl ₂
	0,2 mM EDTA		25% Glycerin
	10 mM NaF		0,2 mM EDTA
			10 mM NaF

Proteaseinhibitoren:

0,3 mM PMSF	0,5 µg/ml Aprotinin
1 mM DTT	2,5 µg/ml Leupeptin
2 mM Na ₃ VO ₄	2,5 µg/ml Pepstatin
	5 µg/ml Soybean trypsin inhibitor

Zusatz unmittelbar vor Gebrauch zu Puffer A und C

Konfluente Zellen wurden in den Kulturflaschen zunächst mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, in 10 ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers von den Platten gekratzt und 5 min mit 1500 upm sedimentiert. Suspensionszellen wurden 5 min bei 1500 upm zentrifugiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Alle Schritte werden auf Eis oder 4°C durchgeführt. Je 1×10^7 Zellen wurden in 400 µl Puffer A resuspendiert in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die Zellen auf Eis für 10 min zum Schwellen gebracht. Diese Zellsuspension wurde dann zur Zerstörung der Zellmembran 8 mal mit einer 1 ml- Einwegspritze (Kanülenweite 0,45 mm) aufgezogen und der Zellaufschluss unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Kerne wurden bei 3000 upm, 3 min abzentrifugiert, das Kernpellet in 40 µl Puffer C je 1×10^7 Zellen durch Aufrühren gelöst, 30 min auf Eis gesetzt und 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde in 20 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der Proteingehalt wurde im Bradford Assay bestimmt.

2.6.2 Radioaktivmarkierung von dsOligonukleotiden

Die 5'-Enden von kurzen dsOligonukleotiden (20-36 Basenpaare) wurden mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase und $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (3000 Ci/mmol, Amersham, Braunschweig) radioaktiv markiert. Der Ansatz für die Markierung lautete:

- 1 µl Oligonukleotid (1-50 pmol)
- 5 µl 10 x PNK-Puffer
- 1 µl T4-Polynukleotidkinase (5 Units/µl)
- 2 µl $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (3000 Ci/mmol)
- ad 50 µl H_2O

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zusatz von 1 µl EDTA abgestoppt. Die nicht inkorporierte Radioaktivität wurde über eine NucTrap- Säule (Stratagene,) vom markierten Oligonukleotid abgetrennt. Dazu wurde die Säule mit 70 µl STE-Puffer äquilibriert, der Ansatz mit STE-Puffer auf 70 µl aufgefüllt, durch die Säule gedrückt und die Säule nochmals mit 70 µl STE-Puffer gespült, die markierten Oligonukleotide wurden in einem Eppendorfgefäß aufgefangen (ca. 120 µl), die freien Nukleotide verblieben auf der Säule. Das Markierungsergebnis wurde im β -Counter durch Messung eines Aliquots von 1 µl nach der Methode von Cerenkow überprüft (ca. 10^5 Counts/µl) und das Oligonukleotid bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.3 Elektro-Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Der EMSA ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe Komplexe aus Rezeptoren und Liganden (hier DNA-Protein-Komplexe) in ihrer nativen Form nachgewiesen werden können. DNA-bindende Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, erkennen spezifische Basensequenzen und binden an diese. Gibt man solche Proteine und ^{32}P -markierte Oligonukleotide mit Proteinbindungs-Sequenzen in einen Bindungsansatz zusammen, so wird die nach

Elektrophorese durch Radiographie detektierbare Bande der freien Oligonukleotide durch die Bindung des Proteins in Richtung geringer Mobilität verschoben (geschiftet). Auf diese Weise läßt sich auch in einer Proteinsuspension (Zellextrakt oder Kernextrakt) das Vorhandensein eines bestimmten Proteins spezifisch nachweisen. Um unspezifische DNA-bindende Proteine während der Bindungsreaktion zu eliminieren, werden zusätzlich unspezifische, meist synthetische DNA-Fragmente (z.B. Poly-Desoxyinositol-Desoxycytidin (Poly dI-dC)) oder Salmon Sperm DNA angeboten.

Während des gesamten Versuchs ist darauf zu achten, dass denaturierende Einflüsse, die zur Dissoziation des Protein-DNA-Komplexes führen können, unbedingt vermieden werden. Dazu zählen vor allem zu hohe Temperaturen beim Gellauf und zu hohe Salzkonzentrationen im Extrakt, dem Gel oder dem Laufpuffer.

2.6.3.1 Shiftgele

Für den EMSA wurden handelsübliche Gelapparaturen für die Vertikalelektrophorese mit einer Geldicke von 1 mm benutzt (Renner, Darmstadt). Die Glasplatten wurden vor dem Zusammenbauen mit 0,1% SDS und 70% Ethanol gereinigt, und anschließend mit einer Dichlordimethylsilan Lösung (Sigma) eingerieben, um das spätere Ablösen des Gels zu erleichtern.

Zur Herstellung der nicht-denaturierenden 4-5%igen Acrylamidgele wurden zwei Ansätze gewählt, der erste war auf der Basis eines Tris-Glycin Puffers, der zweite mit TBE-Puffer (s. Standardpuffer).

Beim ersten Ansatz wurde mit den aufgeführten Reagenzien eine Endkonzentration von 4-5% Gel 30 Lösung (Roth), 1x Tris-Glycin Puffer (10x Tris-Glycin Puffer: 0,25 M Tris Base, 1,9 M Glycine, 10 mM EDTA), 1,25% Glycerol mit H₂O eingestellt, der Laufpuffer war in diesem Fall 1x Tris-Glycin Puffer. Beim zweiten Ansatz wurde eine Gel 40 Lösung (Roth) mit 0,5x TBE-Puffer verdünnt, der ebenfalls als Laufpuffer eingesetzt wurde. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% TEMED und 0,1% Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (aus einer 30%igen Stammlösung) gestartet. Nach dem Einsetzen in die Gelkammer wurde das Gel durch einen Vorlauf bei 4°C mit einer Spannung von 300 Volt mit dem entsprechenden Laufpuffer für eine Stunde äquiliibriert.

2.6.3.2 Lösungen für den EMSA

Poly dI-dC 2 mg lyophilisiertes Poly dI-dC in 1 ml TE, pH 8,0
resuspendieren, 15 min auf 65°C erhitzen, auf RT abkühlen
lassen, in Aliquots von 100 µl aufteilen und bei -20°C lagern.

5 x BB 80 mM Hepes pH 7,9
 84 mM NaCl
 20 mM KCl
 10% (w/v) Glycerin
 0,5 mM EDTA

10 x HH 100 mM Tris-HCl, pH 7,4
 500 mM NaCl
 5% Magermilchpulver
 50% (w/v) Glycerin
 0,25% Bromphenolblau
 0,25% Xylencyanid

5 x BB (Bandshiftpuffer 5-fach konzentriert) und 10 x HH (Shiftpuffer 10-fach konzentriert) wurden unmittelbar vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugesetzt:

0,3 mM PMSF	0,5 µg/ml Aprotinin
1 mM DTT	2,5 µg/ml Leupeptin
2 mM Na ₃ VO ₄	2,5 µg/ml Pepstatin
	5 µg/ml Soybean trypsin inhibitor

2.6.3.3 Bindungsreaktion und Gellauf

In ein Eppendorfreaktionsgefäß wurden pipettiert:

- 4 µl 5 x BB-Puffer
- 1 µl Poly dI-dC (2 µg/µl)
- 1 µl BSA (6 mg/ml)
- 1 µl ³²P-markiertes Oligonukleotid
- 2 µl Kernextrakt (1-3 mg Protein/ml)
- ad 20 µl H₂O

Alternativ wurden in einem Eppendorfggefäß angesetzt:

- 1 µl 10 x HH-Puffer
- 1 µl Poly dI-dC (2 µg/µl)
- 1 µl ³²P-markiertes Oligonukleotid
- 2 µl Kernextrakt (1-3 mg Protein/ml)
- ad 10 µl H₂O

Der jeweilige Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 µl jeder Probe in eine Geltasche aufgetragen. Als Frontmarker und zur Sicherstellung eines gleichmäßigen Gellaufes wurden in alle freien Geltaschen je 5 µl 10 x Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanid, 30% Glycerin) einpipettiert. Der Gellauf wurde 4°C mit einer Spannung von 300 Volt durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Geldrittel erreichte (ca. 3 h). Anschließend wurde das Gel auf Chromatographiepapier übertragen, mit Klarsichtfolie abgedeckt, für 1 h bei 80°C im Vakuum getrocknet und für 1-4 h auf einer Phosphoimager-Platte (raytest/Fuji) exponiert und ausgewertet.

Für Kompetitionen wurden variierende Mengen an unmarkiertem Oligodesoxynukleotid der Bindungsreaktion zugesetzt, der Reaktionsansatz mit dem Kernextrakt 20 min inkubiert, bevor das markierte Oligodesoxynukleotid zugegeben wurde, und dann nochmals 20 min inkubiert wurde. Die Identität eines Protein-DNA-Komplexes wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörper nachgewiesen, die durch die Bindung an ihr Epitop, entweder eine weitere Mobilitätsänderung verursachen oder die Bindung des Proteins an das Oligodesoxynukleotid hemmen.

2.7 Biochemische und funktionelle Identifizierung des Sp1 Transkriptionsfaktors

2.7.1 Biochemischer Nachweis (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- PAGE) mit anschließendem Western-Blot)

2.7.1.1 SDS-Gel

Zur SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen für Vertikalelektrophorese verwendet, wobei die Gele Ausmaße von 10 x 10 x 0,1 cm (Höhe x Breite x Dicke) hatten, und 10 Taschen für ein Proteinvolumen von maximal 20µl besaßen. Die Proteine wurden zunächst in einem etwa 2cm langen, 3%-igem Sammelgelfokussiert und anschließend in einem 7,5%-igen Gel aufgetrennt.

Das Trenngel wurde nach Zusatz von APS und TEMED zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit 0,1% SDS überschichtet, um während der 20-minütigen Polymerisation bei RT eine gerade Kante zu erhalten. Danach wurde die SDS-Lösung abgegossen und verbleibende Reste mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel angesetzt, auf das feste Trenngel geschichtet, der 10-zählige Kamm eingesetzt und zur Polymerisation 5 min nach 37°C gestellt. Nach weiteren 5 min bei RT wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die beiden Pufferbecken mit Elektrophoresepuffer befüllt.

Nach dem Probenauftrag wurde die Elektrophorese im Sammelgel zunächst mit einer Stromstärke von 10 mA gestartet und bei Erreichen des Trenngels mit einer Stromstärke von 20 mA fortgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war.

Sammelgel (3%)	300 µl 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid
	750 µl Stacking-Buffer (0,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 6,8)
	1950 µl H ₂ O
	30 µl 10% Amoniumpersulfat (APS)
	3 µl TEMED

Trenngel (7,5%)	2,5 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid 2,5 ml Separation-Buffer (1,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 8,8) 5,0 ml H ₂ O 100 µl 10% APS 10 µl TEMED
SDS-Laufpuffer	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,05% SDS

2.7.1.2 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Die Proben (Zellysate bzw. Kernextrakte) wurden nach der Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.4.13) im Proteingehalt angeglichen und auf 10 µl Volumen mit Puffer C (siehe 2.4.14.1) eingestellt. Danach wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit dem 2x Probenpuffer (120 mM Tris/HCl, 20% Glycerin, 4% SDS, 10% β-Mercaptoethanol, 0,025% Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Die Proben wurden 5 min auf 100°C erhitzt, abgekühlt und anschließend 10 µl des Ansatzes in die Geltaschen gefüllt.

2.7.1.3 Western-Blot

Ein über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrenntes Proteingemisch wird auf Nitrocellulose transferiert und anschließend das gesuchte Protein mittels eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Der Protein-Antikörper-Komplex wird über einen zweiten anti-Antikörper mit einem kovalent gebundenem Enzym, das die Umsetzung eines Substratgemisches in eine farbige Substanz katalysiert, visualisiert.

2.7.1.4 Transfer auf Nitrozellulose

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte im sogenannten Semi-dry-Blotverfahren. Das Gel wurde nach Beendigung des Laufs aus der Gelkammer entnommen und 30 min bei RT in Kathodenpuffer inkubiert. Während der Inkubation wurden 18 Blätter Chromatografiepapier (3MM CHR, Whatman, England), sowie ein Blatt Nitrozellulosemembran (Hybond-N⁺, Amersham) auf die Größe des Gels

zurechtgeschnitten und vor dem Zusammenbau des „Blot-Sandwiches“ in den aufgeführten Puffern getränkt:

Anodenpuffer 1	300 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% Methanol
Anodenpuffer 2	2,5 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% Methanol
Kathodenpuffer	40 mM 6-Amino-Capronsäure 20% Methanol 0,01% SDS

Aufbau des „Blot-Sandwiches“

- *Anode (+)*
- 6x Chromatografiepapier in Anodenpuffer 1
- 3x Chromatografiepapier in Anodenpuffer 2
- Nitrozellulosemembran in H₂O
- Gel
- 9x Chromatografiepapier in Kathodenpuffer
- *Kathode (-)*

2.7.1.5 Antikörperfärbung

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgt im Allgemeinen mit einem antigenspezifischen Primärantikörper und einem gegen diesen Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, an den eine detektierbare Aktivität (Enzym) gekoppelt ist. In dieser Arbeit wurde zum Sichtbarmachen des Protein-Antikörper-Komplexes auf der Membran ein ECL-System-Kit (HRP-Luminol) von Amersham (RPN 2108) eingesetzt.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die NC-Membran 5min in TBS (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl) gewaschen, 1h (oder über Nacht) in TTBS (TBS + 0,05% Tween-20) + 0,5% Gelatine inkubiert, danach 2x 5 min in TTBS gewaschen und 1h mit dem Primärantikörper (1:250 bis 1:2500 verdünnt in TTBS + 0,25% Gelatine inkubiert.

Die Membran wieder 2x 5 min in TTBS waschen und 1h mit Sekundärantikörper in 20 ml TTBS + 0,25% Gelatine inkubieren und abschließend 2x 5 min in TTBS waschen.

Die folgende Detektion sollte möglichst schnell ablaufen. Lösung 1 und 2 des ECL-Kits (62,5 µl/cm² Membran) der Detektionlösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Waschlösung wurde von der Membran abgesaugt, ohne das dabei die Membran trocknet. Die Membran wurde in eine frische Schale gelegt, die angesetzte Detektionlösung dazugegeben, exakt 1 min inkubiert und die Lösung wieder entfernt. Die Membran wurde anschließend sauber in Plastikfolie eingeschlagen und zuerst 1 min auf Hyerfilm ECL (Amersham) exponiert und ausgewertet.

2.7.2 Funktioneller Nachweis (Kotransfektion von SL2 *Drosophila* Zellen)

Die SL2 *Drosophila* Zellen wurden für die transiente Transfektion bzw. Kotransfektion auf 20 Mio. Zellen in 400 µl Medium eingestellt und mit 80 µg Plasmid DNA des entsprechenden Pmed1-Promotorkonstruktes (Luciferasevektor) versetzt. Bei den Kotransfektionen wurde neben den zu untersuchenden Promotorkonstrukten 5 µg pPac-Sp1 (Sp1 exprimierender Vektor) zugesetzt und mit 270 V und 1500 µF elektroporiert. Die Kontroll-Transfektionen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt ohne Zugabe des Sp1 exprimierenden Vektors. Die Ansätze wurde in eine 0,4 Eurogentec-Küvette 5 min bei RT inkubiert Danach wurden die Zellen mit dem Easyject Genpulser transfiziert und sofort in 10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen. Die Auswertung der Transfektions-/Kotransfektion-Experimente erfolgte wie im Abschnitt 2.5.3 (Luciferase Assay) beschrieben.

3. ERGEBNISSE

3.1 Strukturen und funktionelle Analyse der Zellspezifität der FcγRIIIA und FcγRIIIB Rezeptorgene

3.1.1 Nachweis alternativer Pmed1 und Pprox Promotoren

Erste Anhaltspunkte für Unterschiede in der zelltypspezifischen Genregulation der FcγRIIIA und FcγRIIIB Rezeptoren lieferten die mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden ermittelten Promotorbereiche. In den Veröffentlichungen von J.E. Gessner (1995a,b; 1996) waren mit Hilfe von Primer Extension, RNase Protektion, RACE-PCR und Reportergenanalysen verschiedene Promotorbereiche näher eingegrenzt worden. Dazu zählte der proximale Promotorbereich von Position -198 bis -10 (Pprox), der sich in den FcγRIIIA und FcγRIIIB Genen in zehn Nukleotiden unterscheidet (Abbildung 2).

Pprox-Sequenz (-198/-10) des FcγRIIIA bzw. FcγRIIIB

IIIA	TTCTGTCT	ATGGTGGGGC	TCCCTTGCCA	GACTTCAGAC	TGAGAAGTCA
IIIB	-----	-----	--- A --- G ---	----- T -----	----- A ---
	-198		-174 -169	-158	-151
IIIA	GATGAAGTTT	CAAGAAAAGG	AAAT TGGTGG	GTGACAGAGA	TGGGTGGAGG
IIIB	-----	-----	--- C --- CA ---	-----	-----
			-124 -120/-119		-96
IIIA	GG CTGGGGAA	AGGCTGTTTA	CT T CCTCCTT	GTCTAGTCGG	T TTGGTCCCT
IIIB	- A -----	-----	--- C -----	-----	C -----
			-75		-58
IIIA	TTAGGGCTCC	GGATATCTTT	GGTGACTTGT	CCACTCCAG	
IIIB	-----	-----	-----	-----	
					-10

Abbildung 2: Die Sequenzen der Pprox-Promotorregion sind jeweils vom FcγRIIIA und FcγRIIIB Gen von Position -198 bis -10 dargestellt ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt +1. Der Pprox-IIIB unterscheidet sich vom Pprox-IIIA durch 10 Basensubstitutionen (**fett**) bei den angegebenen Positionen.

Weiterhin war ein medialer Promotorbereich für das FcγRIIIA Gen charakterisiert worden. Innerhalb dieses Promotorbereiches befinden sich zwei separate Promotoren, der Promotor Pmed1 von Position –942 bis –850 und der Promotor Pmed2 von Position –1376 bis –1123 für das FcγRIIIA-Gen, die beide eine NK/T Zellspezifität aufweisen. Beim Pmed1 Sequenzvergleich der FcγRIIIA- und FcγRIIIB-Gene zeigte sich eine C/T Basensubstitution (fett) mit sich anschließender 8 Basen Deletion, wodurch das dreifach-Repeat-Element des Pmed1-B (Pfeile in Abbildung 3) im Pmed1-A entfernt ist (Abbildung 3).

Pmed1-Sequenz des FcγRIIIA bzw. FcγRIIIB

```

    IIIA (-942/-850) 5-AACAACCCTC CCACTTCCTG GCCACCCCCC TCCACCTTTT
                    CTGGTAAGGA GCCCTGGAGC CCCGGCTCCT AGGCTGACAG
                    ACCAGCCCAG ATC-3

    IIB (-946/-846) 5-AACAACCCTC CCACTTCCTG GCCACCCCCC TCCACCTTTT
                    CTGGTAAGGA GCCCTGGAGC CCTGGAGCCC TGGCTCCTAG
                    GCTGACAGAC CAGCCCAGAT C-3
  
```

Abbildung 3: Sequenzen des Pmed1-Promotors des FcγRIIIA (-942/-850) und FcγRIIIB (-946/-846) (Positionsangabe ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt +1). Der Pmed1-IIB unterscheidet sich durch ein dreifach Repeat von 8 Basen (→) vom Pmed1-IIIA.

Für erste Experimente mit dem Reportergenvektor pLuc, der die Luciferase unter der Kontrolle eines eingeführten Promotorelementes exprimiert, lagen vier Vektorkonstrukte vor (Abbildung 4A). Diese Konstrukte enthielten die proximalen Promotorregionen Pprox der FcγRIIIA und FcγRIIIB Gene (von Position –198 bis –10) und ihre jeweiligen Intron-Enhancer. Die Pmed1-Promotorregionen der FcγRIIIA und FcγRIIIB Gene wurden ohne Enhancer in den Luciferasereporter gen Vektor pLuc kloniert.

Die Auswertung des Reportergenassays in Abbildung 4B ergab, dass die Pprox- und Pmed1-Promotoren die differentielle Expression der FcγRIIIA und FcγRIIIB Gene bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Pprox- und Pmed1-Promotoren des FcγRIIIA Gens in NK-Zellen (YT) aktiv sind, während die Promotoren des FcγRIIIB-Gens in der NK-Zelllinie YT nur eine basale, sehr geringe Expression aufweisen. Im Gegensatz hierzu ist ausschließlich der Pprox-Promotor des FcγRIIIB Gens in HL60-Zellen aktiv. Erste Versuche mit der 5' flankierenden Region (von Position –946/-846) des IIB-Gens,

die der Pmed1-Region des IIIA-Gens homolog ist, verliefen negativ. Die Vermutung war, dass die HL60-Zellen zu unreif waren. Daher wurden die HL60-Zellen durch die Behandlung mit DMSO zur Granulozytendifferenzierung angeregt, danach zeigte auch der Pmed1 des IIIB-Gens in HL60-Zellen Aktivität.

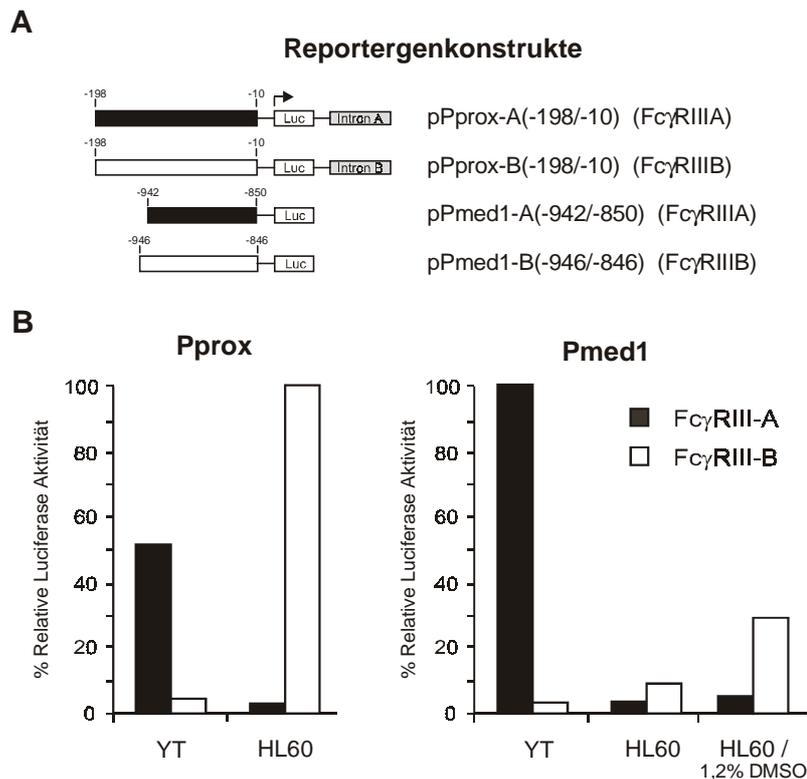


Abbildung 4: Vergleich der Expressionsaktivität der proximalen und medialen Promotorbereiche der Fc γ RIIIA- und Fc γ RIIIB-Gene in YT und HL60-Zellen. (A) YT und HL60-Zellen wurden mit den proximalen Promotorfragmenten in Gegenwart des ersten Introns des Fc γ RIIIA bzw. Fc γ RIIIB (Pprox-A(-198/-10), Pprox-B(-198/-10)) und den medialen Promotorfragmenten (Pmed1-A(-942/-850), Pmed1-B(-946/-846)) des Fc γ RIIIA- und Fc γ RIIIB-Gens transfiziert. (B) Im Luciferaseassay zeigten die Promotorfragmente des A-Gens in YT und die Promotorfragmente des B-Gens in HL60-Zellen spezifische Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alternative Promotorelemente die differentielle Zellspezifität der beiden Fc γ RIII Rezeptorgene bestimmen können, wobei Pmed1 und Pprox des Fc γ RIIIA vornehmlich in NK-Zellen (YT) und die des Fc γ RIIIB Gens in den zu Granulozyten differenzierbaren HL60-Zellen aktiv sind. Der relative Anteil der Promotoren zur Gesamtaktivität ergibt in den Zellkulturanalysen für beide Gene eine unterschiedliche Rangfolge mit Pmed1 > Pprox für Fc γ RIIIA in YT-Zellen und Pprox >> Pmed1 für Fc γ RIIIB in HL60-Zellen.

3.1.2 Der Pmed1 Kontrollbereich des Fc γ R11A ist ein NK/T-Zellspezifischer Promotor

Da der Pmed1-Promotor des Fc γ R11A von seiner Gesamtaktivität her gesehen den dominanten Promotor darstellte, wurde in den folgenden Experimenten durch Einsatz weiterer Zelllinien, die Zellspezifität des Pmed1 im Vergleich zum Pprox näher charakterisiert. Hierzu war es zunächst notwendig, die optimalen Transfektionsbedingungen für die einzelnen Zelllinien empirisch zu ermitteln. Es hatte sich in der Arbeitsgruppe von B. Lüscher gezeigt, dass nach erfolgreicher Transfektion mit dem Luciferasevektor pLuc- α Pro (α Pro = α -Prothymosin-Promotor) in fast jeder Zelllinie eine gute Expressionsaktivität zu beobachten ist (persönliche Mitteilung). Daher wurden verschiedene Zelllinien mit dem pLuc- α Pro als Kontrollvektor mittels Elektroporation transient transfiziert, und im Luciferase Assay ausgewertet, um die optimalen Versuchsbedingungen für jede einzelne Zelllinie zu ermitteln. Es wurde auch versucht, die Zelllinie CNK6 als weitere NK-Zelllinie und die Zelllinie 1B3 als eine $\gamma\delta$ T-Zelle zu transfizieren, dies ist innerhalb dieser Versuchsreihen jedoch nicht gelungen.

Für die anschließenden Expressionstudien wurden die humanen Zelllinien Jurkat (T-Zelllinie), THP-1 (promyeloische Zelllinie), U937.1 (myeloische Zelllinie), Daudi (humane B-Zelllinie) und die murine Makrophagen-Zelllinie RAW267.4 unter den in Tabelle 2 aufgeführten Bedingungen eingesetzt. Die erzielten Expressionsraten sind im Luciferase Assay in Abbildung 5 gezeigt.

Zelllinie	Zellzahl (Mio.)	Volumen (μ l)	DNA (μ g)	Spannung (V)	Kapazität (μ F)	Temp.
YT	10	600	40	270	900	RT
Jurkat	20	500	20	350	1050	RT
HL60	20	800	80	270	2400	RT
THP-1	10	700	20	400	1050	RT
U937.1	40	800	20	350	2400	4°C
RAW267.4	10	600	20	350	1050	RT
Daudi	20	800	80	350	900	RT

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt die empirisch erhobenen, optimalen Transfektionsbedingungen für die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

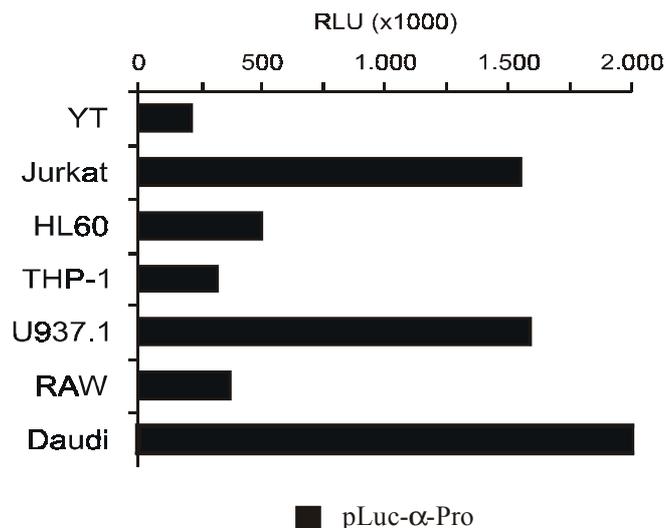


Abbildung 5: Die Zelllinien YT, Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi, wurden mit dem Vektor pLuc- α -Prothymosin (pLuc- α -Pro) unter den in Tabelle 1 aufgelisteten optimalen Bedingungen transfiziert und im Luciferase Assay ausgewertet. Der pLuc- α -Pro wurde in den folgenden Expressionsstudien neben dem pLuc- β -Gal (Galaktosidase) als Kontrollvektor eingesetzt. Die gemessene pLuc- α -Pro Luciferaseaktivität stellte in den Versuchen einen Referenzwert und einen Parameter für die Transfektionseffizienz dar.

In der eigentlichen Reporteranalyse kamen die oben getesteten Zellen YT, Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi zum Einsatz. Es zeigte sich, dass der Pprox-Promotor des IIIA-Gens sowohl in YT-NK-Zellen und Jurkat-T-Zellen, als auch in der myeloischen U937.1 Zelllinie und der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 aktiv war (Abbildung 6A). Der Pmed1-Promotor des IIIA-Gens zeigte hingegen eine spezifische auf NK-(YT) und T-(Jurkat) Zellen beschränkte Expressionsaktivität (Abbildung 6B).

Die gemessene Aktivität des Pprox-Promotors des IIIA-Gens in den Makrophagen-Zelllinien U937.1 und RAW264.7 neben den NK/T-Zellen YT und Jurkat korreliert mit den in der Arbeit von J.E. Gessner (1995) beschriebenen Fc γ RIIIa-a1-Transkripten. Des weiteren korrelieren die Reporteranalysedaten des Pmed1-Promotors des IIIA-Gens mit den in der oben genannten Arbeit beschriebenen Fc γ RIIIa-a2/3-Transkripten in NK und γ/δ T-Zellen, die aber nicht in Makrophagen zu beobachten waren.

Diese Daten bestätigen die Möglichkeit, dass die Expression des Fc γ RIIIa in Makrophagen vornehmlich über den Pprox-Promotor reguliert werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt der Pmed1-Promotor eine ausgeprägte Zelltypspezifität für NK- und T-Zellen, wobei in den NK-Zellen die höchsten Expressionsraten nachzuweisen sind. Dieses

zelltypspezifische Expressionsmuster lässt vermuten, dass im Bereich des Pmed1 ein möglicher NK/T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor binden kann.

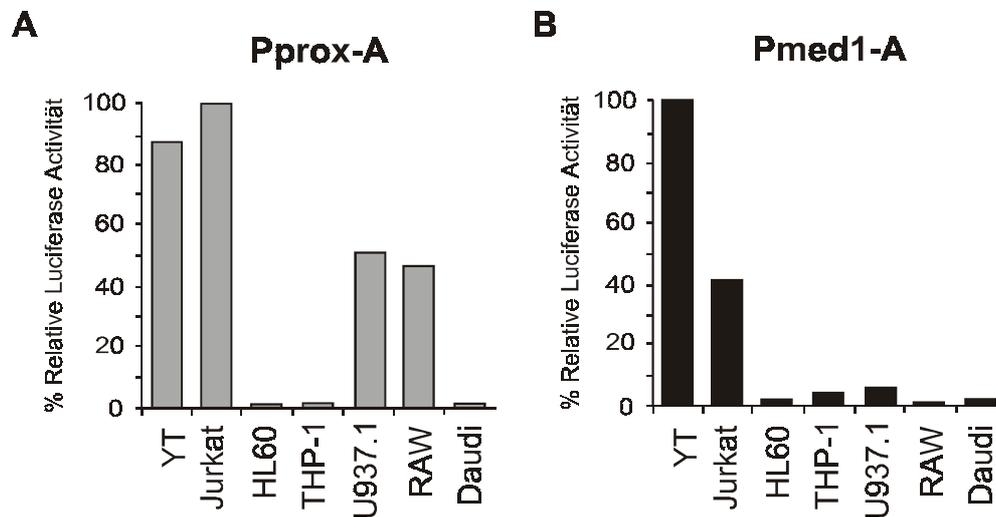


Abbildung 6: Luciferase Assay mit den Pprox und Pmed1-Reportergenkonstrukten in den Zelllinien YT, Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi. Die Genreporteranalysen der Promotoren Pprox und Pmed1 des Fc γ RIIIA erfolgen vergleichend zu der höchsten gemessenen Aktivität des jeweiligen Promotors (100% Relative Luciferase Aktivität = RLU der Luciferase). (A) Der Pprox zeigt neben seiner Aktivität in der NK-Zelllinie YT und T-Zelllinie Jurkat auch Promotoraktivität in den beiden myeloischen Zelllinien U937.1 und RAW264.7. (B) Der Pmed1 zeigt eine zellspezifische Promotoraktivität in der NK-Zelllinie YT und der T-Zelllinie Jurkat.

3.2 Charakterisierung der 21bp-5'-Region des Pmed1 des FcγRIIIA

Promotors

Das 5'-Ende des FcγRIIIA Pmed1 Gens enthält in einer 21bp-Region ein sich überlappendes Bindungsmotiv für Ets (GGAA/T) und Sp1 (GA-Box) Transkriptionsfaktoren (Abbildung 7A). Darüberhinaus befindet sich in diesem Bereich potentielle Bindungsstellen für noch nicht näher definierte, möglicherweise neue Transkriptionsfaktoren NF-P1/2, das sogenannte NKE-Motiv (CACTTCCTGGCCA). Dieses Bindungsmotiv und eine korrespondierende Protein-Doppelbande in einem *mobility shift assay* wurde erstmals 1993 von der Arbeitsgruppe C.C. Liu beschrieben. Das NKE-Motiv ist mit einem Basenaustausch auch im Pmed1 zu sehen. Das Bindungsverhalten der potentiellen Transkriptionsfaktoren NF-P1/2 wird spezifisch in zytotoxischen T-Zellen, LAK-Zellen und NK-Zellen beobachtet und soll in die auf diese Zellen restringierte Expression des Perforingens verantwortlich sein. Die Koexpression von Perforin und FcγRIIIA in γ/δ T-Zellen und NK-Zellen ließ daher vermuten, dass eine Interaktion von NF-P1/2 oder verwandter Proteine für die NK/T-Spezifität des FcγRIIIA Pmed1 verantwortlich sein könnte. Die initial erhobenen Daten und die möglichen Bindungsstellen für zellspezifische Transkriptionsfaktoren ließen es daher interessant erscheinen, die 21bp Region des Pmed1 näher zu untersuchen. Um nachzuweisen, ob es sich bei der 21bp-Region des humanen FcγRIIIA-Gens um ein NK/T-zelltypspezifisches Element handelt, das die Transkription beeinflusst, wurden Expressionsstudien in den Zelllinien YT und Jurkat durchgeführt.

Der Pmed1-Promotor wurde um das 21bp Fragment von Position -942 bis -921 verkürzt (Pmed1Δ21bp) und in den Luciferasevektor pLuc kloniert. Die Darstellung der Reporteranalysen erfolgte vergleichend zum unveränderten Pmed1, dabei wurde die Pmed1 Luciferaseaktivität (RLU) gleich 100% Prozent gesetzt. Es zeigte sich, dass der Promotor Pmed1Δ21bp einen Aktivitätsverlust von ca. 80% in YT-Zellen und von ca. 90% in Jurkat Zellen aufwies. Eine erneute Fusion des 21bp-Fragments in inverser Orientierung vor den 71bp-Restpromotor (Pmed1inv21bp) führte zu keiner Erholung der Expressionsrate in YT und Jurkat (Abbildung 7C). Daraus kann geschlossen werden, dass nicht nur das Vorhandensein des 21bp-Fragments von Position -942 bis -921 für die volle Transkriptionsaktivität entscheidend ist, sondern auch seine Orientierung zum Rest des Promotors.

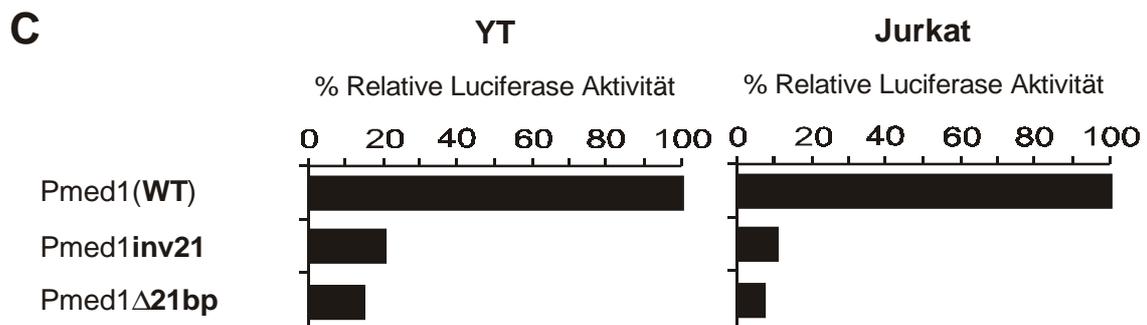
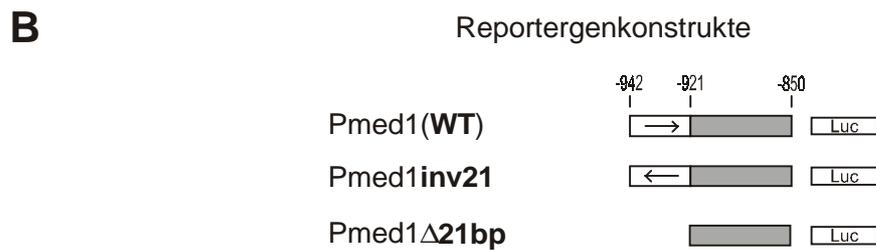
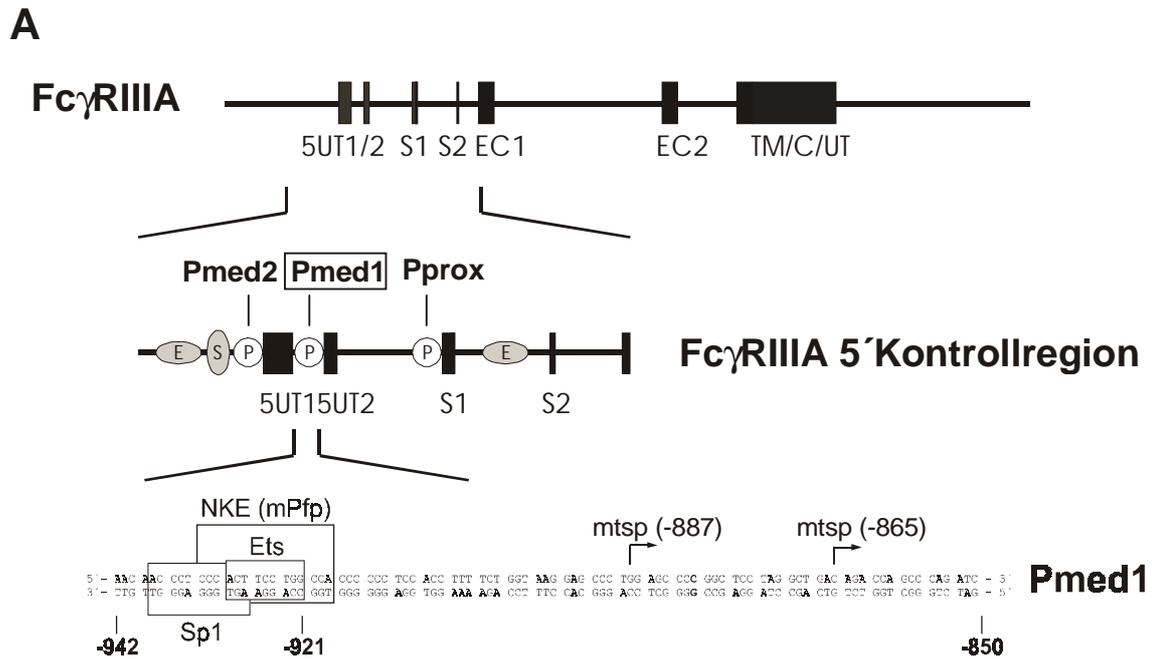


Abbildung 7: Die Integrität der überlappenden Sp1/Ets Konsensussequenz der cis-aktiven 21 bp Region ist notwendig für die maximale Fc γ RIIIA Pmed1 Promotoraktivität. (A) Die Genstruktur des Fc γ RIIIA ist schematisch dargestellt mit seiner 5'Kontrollregion, bestehend aus 3 alternativen Promotoren, 2 Enhancern und einer Silencerstruktur und der Sequenz des Pmed1. Die Transkriptionsstartpunkte (mtsp) und putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der 21bp Region sind in der Sequenz markiert. (B) Dargestellt sind die Reportergenkonstrukte, die aus dem Pmed1 generiert wurden. (C) Im Luciferase Assay wurden die beiden Konstrukte Pmed1inv21 und Pmed1 Δ 21bp vergleichend gegen den Pmed1 (WT) (=100%) in YT NK-Zellen und Jurkat T-Zellen eingesetzt.

3.2.1 Mutationssubstitutionsanalyse

Um weitere Hinweise auf die Bedeutung der einzelnen Bindungsmotive (NKE, Ets, Sp1) zu erhalten, wurde der 92bp Pmed1-Promotor des IIIA Gens innerhalb seiner 21bp-5'-Region mutiert. Für die gerichtete Mutagenese wurden fünf durch die Firma MWG-Biotech synthetisierte Oligonukleotide (bezeichnet M1-M5) gewählt, die eine *BamHI*-Schnittstelle (5'-Ende) und jeweils drei Basenpaar Mutationen enthielten, sowie ein weiteres Oligonukleotid (Luci-0-*XbaI*) mit einer *XbaI*-Schnittstelle (3'-Ende). Die M1-M5 Oligonukleotide wurden gemeinsam mit Luci-0-*XbaI* in einer PCR eingesetzt, die jeweiligen PCR-Produkte analysiert und über die *BamHI/XbaI*-Schnittstellen in den Luciferasevektor pLuc kloniert. Die Integrität der generierten Pmed1-Promotormutanten M1 bis M5 wurde durch Sequenzanalyse sichergestellt.

YT und Jurkat-T-Zellen wurden transient mit den fünf Promotormutanten Pmed1-M1 (-939/-937), Pmed1-M2 (-936/-934), Pmed1-M3 (-933/-931), Pmed1-M4 (-930/-928), Pmed1-M5 (-927/-925) transfiziert (Abbildung 8A). Die Darstellung der Reporteranalysen erfolgte vergleichend zum unveränderten Pmed1 (Luciferaseaktivität (RLU) des Pmed1 = 100%). Die Auswertung in Abbildung 8B zeigte in beiden getesteten Zelllinien bei der Mutante M1 eine leichte Abnahme der Aktivität. Weiterhin war eine Abnahme der Luciferaseaktivität bei der Mutante M2 zu beobachten. Eine Restaktivität von 10% bis 20% war bei den Mutanten M3 und M4 zu beobachten im Verhältnis zum Wildtyp Pmed1. Bei der letzten Promotormutante M5 war bei YT-Zellen ein deutlicher Anstieg der Expressionsaktivität zu verzeichnen, bei Jurkat-T-Zellen lag die Aktivität sogar bei 100%.

Die entscheidende Region für die maximale FcγRIIIA Pmed1-Promotoraktivität scheint danach die überlappende Sp1/Ets Konsensussequenz oder das ebenfalls enthaltene NKE-Motiv der *cis*-aktiven 21bp-Region zu sein, die in den Mutanten M3 und M4 verändert wurde. Die Mutante M5 hatte einen geringen oder keinen Effekt auf die Transkriptionsregulation im Pmed1, so dass eine Beteiligung von NKE eher unwahrscheinlich ist.

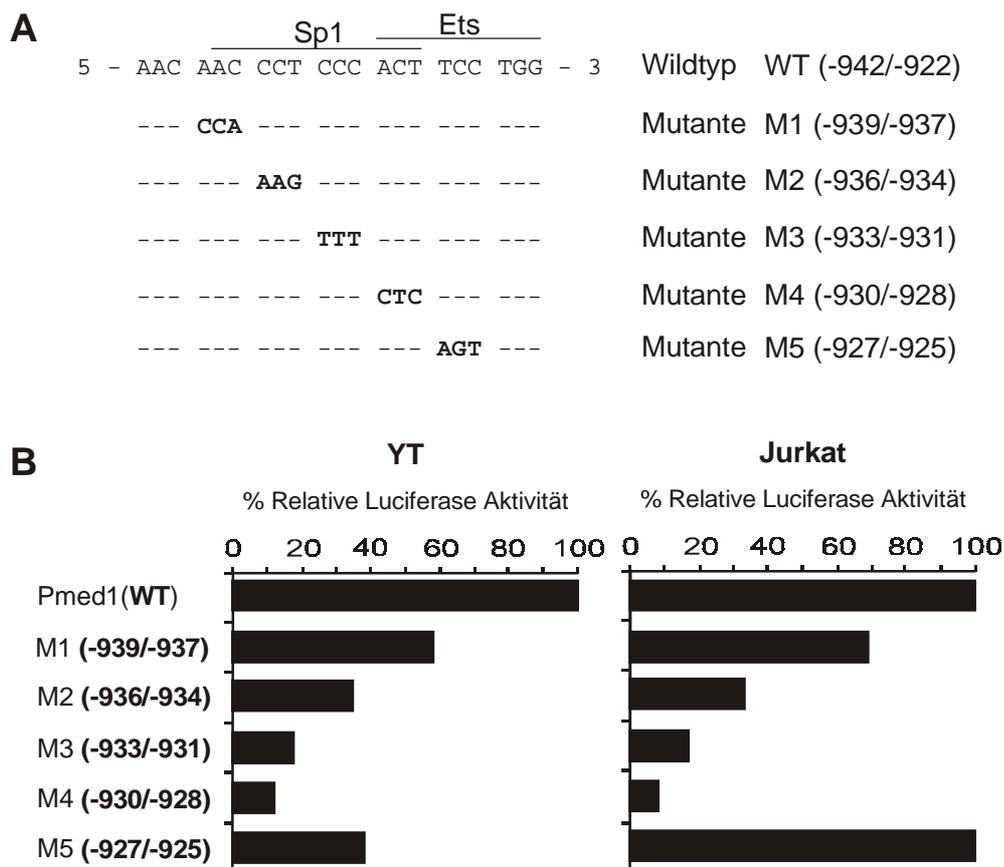


Abbildung 8: Substitutionsmutanten des Pmed1 zeigen, dass die Integrität des proximalen 21bp-Fragments entscheidend ist für die maximale Promotoraktivität. (A) Es wurden mittels PCR Triplet-Basen-Mutanten in das 21bp-Fragment des Pmed1 eingeführt. Die Pmed1-Mutanten M1 bis M5 wurden in den pLuc-Vektor kloniert. (B) Die Reporteranalyse der Promotormutanten M1 bis M5 erfolgte vergleichend zum unveränderten Pmed1 (=100%) in YT-NK-Zellen und Jurkat-T-Zellen.

3.2.2 Mutationsdeletionsanalyse

Um den Sp1/Ets Bindungsbereich des FcγRIIIA Pmed1 weiter zu charakterisieren und auch auf andere Weise einzugrenzen und um die oben gezeigten Ergebnisse zu bestätigen wurden drei Deletionsmutanten mittels PCR generiert. Bei diesen Deletionsmutanten wurde der Pmed1-Promotor vom 5'-Ende anfangend verkürzt. So entstanden die Luciferasevektorkonstrukte Pmed1 (-936/-850), Pmed1 (-932/-850) und Pmed1 (-927/-850) (Abbildung 9A). Die Vektorkonstrukte wurden in YT und Jurkat-T-Zellen getestet. Ausgangspunkt der Untersuchung war der Wildtyp Pmed1, der als Referenzwert der Luciferaseaktivität (RLU) 100% gesetzt wurde.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 9B dargestellt, bei der Deletion der ersten fünf Nukleotide im Reporterengenkonstrukt Pmed1(-932/-850) eine geringfügige Abnahme der Aktivität um 25% im Vergleich zum Wildtyp. Bei den beiden Deletionsmutanten Pmed1 (-932/-850) und Pmed1 (-927/-850) war nur noch eine 10% bis 25% Restaktivität zu beobachten. Auch der Vergleich mit dem vollständig deletiertem 21bp-Fragment des Pmed1 (Pmed1 Δ 21bp) im Luciferaseassay zeigte keinen weiteren Verlust der Transkriptionsaktivität. Diese Daten stützen die Vermutung, dass im 21bp-Fragment des Pmed1-Promotors ein entscheidendes *cis*-Element zwischen Position -936 und -932 lokalisiert ist, dieses Element ist an der Aktivierung der Expression in YT und Jurkat-T-Zellen beteiligt. Dies schließt weiterhin die Beteiligung von Ets-Transkriptionsfaktoren aus.

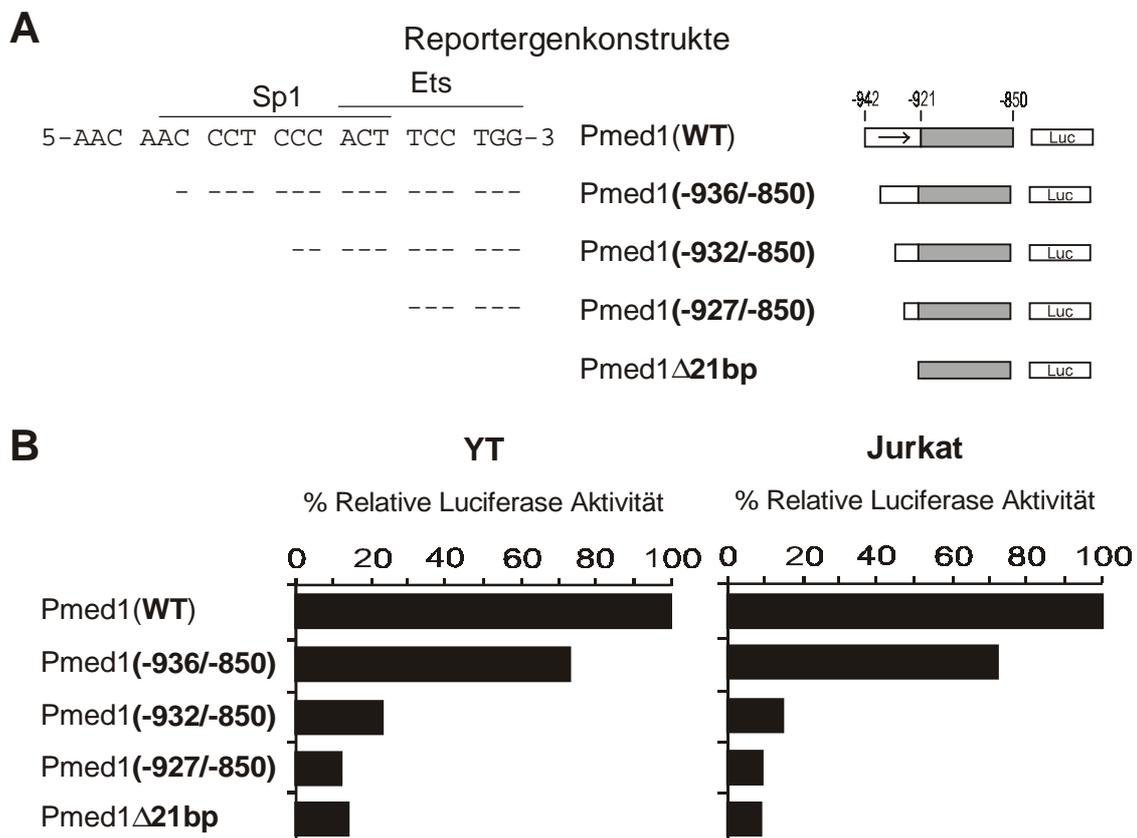


Abbildung 9: Deletionsmutanten des Pmed1 zeigen, dass schon eine Verkürzung des Pmed1-Promotors um neun Basenpaare zu einer deutlichen Reduktion der Promotor-Aktivität führt. (A) Dargestellt sind die mittels PCR generierten Deletionsmutanten des Pmed1 (mit der Sequenz des 21bp-Fragments), die in den pLuc-Vektor kloniert wurden. (B) Die Deletionsmutanten wurden vergleichend zum Wildtyp Pmed1 (=100%) in YT NK-Zellen und Jurkat-T-Zellen getestet.

3.2.3 DNA-Protein Bindungsanalyse

Die Charakterisierung der Proteinbindung an die 21bp-5'-Region des FcγRIIIA Pmed1 erfolgte durch Elektrophoretic-Mobility-Shift-Analysen (EMSA). Eingesetzt wurden [³²P]-endmarkierte 21bp-Fragmente. Es handelte sich dabei um das 21 bp Wildtypfragment von Position -942 bis -921 und um fünf synthetisierte dsOligonukleotide mit den Triplet-Mutationen M1 bis M5 (siehe 3.2.1 u. 2.1.4), ebenfalls von Position -942 bis -921. Die Bandshift-Experimente wurden wie in Abschnitt 2.4.14 beschrieben durchgeführt.

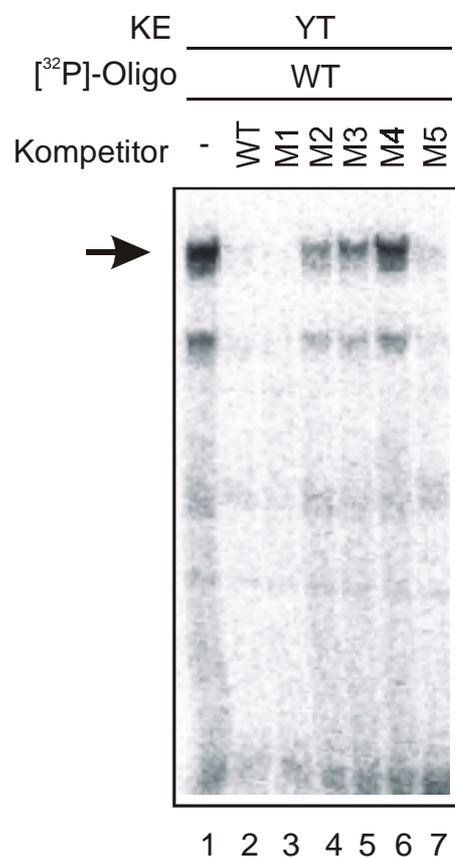


Abbildung 10: Bandshift mit YT-Kernextrakten (KE) und dem 21bp-Fragment des Pmed1 (WT). Das WT-Oligonukleotid wurde radioaktiv markiert und mit 3µg YT-Kernextrakten inkubiert. In den Lanes 2 bis 7 wurden nicht markierte (kalte) dsOligonukleotide als Kompetitor zugesetzt. Dabei handelte es sich um das 21bp-Fragment (Lane 2) und dessen Substitutionsmutanten M1 bis M5 (Lane 3-7), die unter 3.2.1 beschrieben wurden.

Der Bandshift in Abbildung 10 zeigt mit YT-Kernextrakten eine hochmolekulare Bande (Lane 1), die durch die Zugabe eines Überschusses an kalten (nicht markierten) Wildtyp (WT) dsOligonukleotiden verdrängt wurde (Lane 2). In den folgenden Lanes (3 bis 7) wurden die Mutanten M1 bis M5 als Kompetitoren eingesetzt. Die Mutanten M1 und M5 waren ebenfalls in der Lage die hochmolekulare Bande zu unterdrücken, während die Mutante M2 nur noch eine schwache Konkurrenz zeigte. Die Mutanten M3 und M4 waren nicht in der Lage die Bande zu unterdrücken. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den im Luciferaseassay erhobenen Daten, dass die Mutanten M3 und M4 eine Region repräsentieren, in der ein entscheidender Faktor bindet, der die Transkription antreibt.

Es sollte in weiteren Bandshift Experimenten verifiziert werden, ob sich eine spezifische Bande herauskristallisiert, die für einen zelltypspezifischen Faktor steht. Der EMSA wurde mit einem radioaktiv markierten Wildtyp 21bp-Fragment (WT) und den ebenfalls gelabelten Mutanten M1 bis M5 durchgeführt (Abbildung 11). Die [³²P]-dsOligonukleotide wurden mit Kernextrakten von YT-Zellen, Jurkat-T-Zellen und HL60-Zellen inkubiert und im Gel aufgetrennt. Bei allen eingesetzten Kernextrakten ist ein vergleichbares Bandenmuster zu sehen. Die hochmolekulare Bande die auch mit dem YT-Kernextrakt sichtbar wurde, zeigt sich auch beim Bandshift von Jurkat- und HL60-Kernextrakten mit dem Wildtyp (WT) Oligonukleotid sowie den Mutanten M1 und M5 und abgeschwächt bei der Mutante M2. Diese Bande ist bei allen drei Ansätzen mit den Mutanten M3 und M4 nicht zu beobachten.

Da in dem vorangegangenen Experiment keine erkennbaren Unterschiede im Bandshiftmuster zwischen NK/T-Zellen und der myeloiden Zelllinie HL60 zu erkennen waren, wie sie sich aber im Luciferaseassay deutlich manifestierten, wurden Bandshifts mit aufgearbeiteten Kernextrakten aus Vollblut durchgeführt. Aus den Buffy's (Plasmafreie Blutkonserven) wurden, nachdem die Erythrozyten lysiert waren, die polymorphkernigen Zellen (PNM) abgetrennt und die PBLs isoliert. Von beiden Fraktionen wurden Kernextrakte hergestellt und im Bandshift neben YT- und HL60-Kernextrakten eingesetzt (Abbildung 12A). Es war kein wesentlicher Unterschied im Bandenmuster der einzelnen Kernextrakte zu erkennen, auch konnte durch Zugabe von kalten WT-Oligonukleotiden die hochmolekulare Bande in allen Ansätzen verdrängt werden.

Für den folgenden Bandshift wurde die T-Zelllinie 1B3, die NK-Zelllinie CNK6 und die myeloide Zelllinie U937.1 kultiviert um aus diesen Zellen Kernextrakte zu isolieren. Weiterhin kamen die YT-, Jurkat- und HL60-Kernextrakte und die aus Buffy's isolierten

PMN- und PBL-Kernextrakte zum Einsatz. Die Kernextrakte wurden mit dem radioaktiv markierten 21bp-Wildtyp-Fragment (WT) inkubiert. Ein Ansatz wurde ohne Kompetitor, ein zweiter Ansatz mit einem Überschuss an unmarkiertem Wildtyp Fragment versetzt und im Gel aufgetrennt (Abbildung 12B). Es zeigte sich im Bandshift für alle Kernextrakte ein vergleichbares Bild, die schon beschriebene hochmolekulare Bande wurde durch die Zugabe des kalten 21bp-Fragments unterdrückt. Diese Versuchsreihe mit den unterschiedlichen Zellkernextrakten, die im EMSA getestet wurden, läßt eher einen ubiquitären Transkriptionsfaktor wie Sp1 als einen zellspezifischen Ets-Transkriptionsfaktor vermuten, der im 21bp-Fragment des Pmed1 bindet.

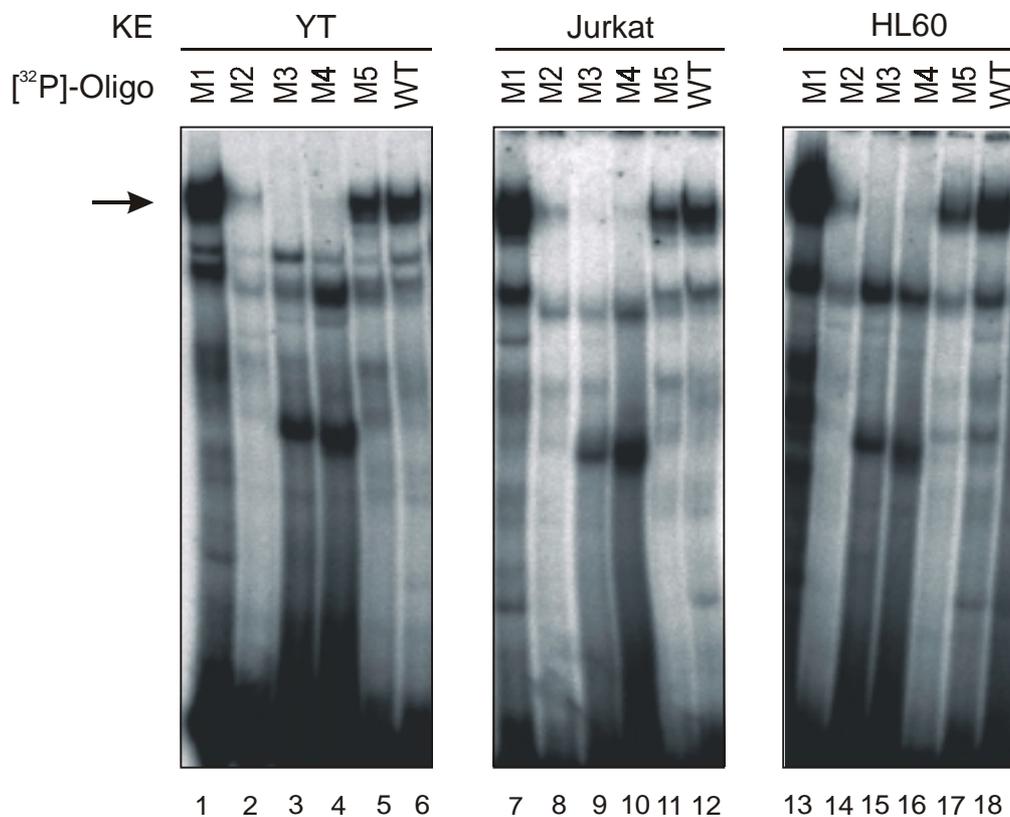


Abbildung 11: Proteinbindungsstudie mit dem 21bp-Promotorelement des Pmed1 des Fc γ RIIIA-Gens. Es wurden das 21bp-Fragment (WT) des Pmed1 (Lane 6, 12 u. 18) und die daraus abgeleiteten Mutanten M1 bis M5 (Lane 1-5, 7-11 u. 13-17) radioaktiv markiert und jeweils mit 3 μ g Kernextrakt (KE) von YT, Jurkat und HL60 Zellen inkubiert und im Gel aufgetrennt.

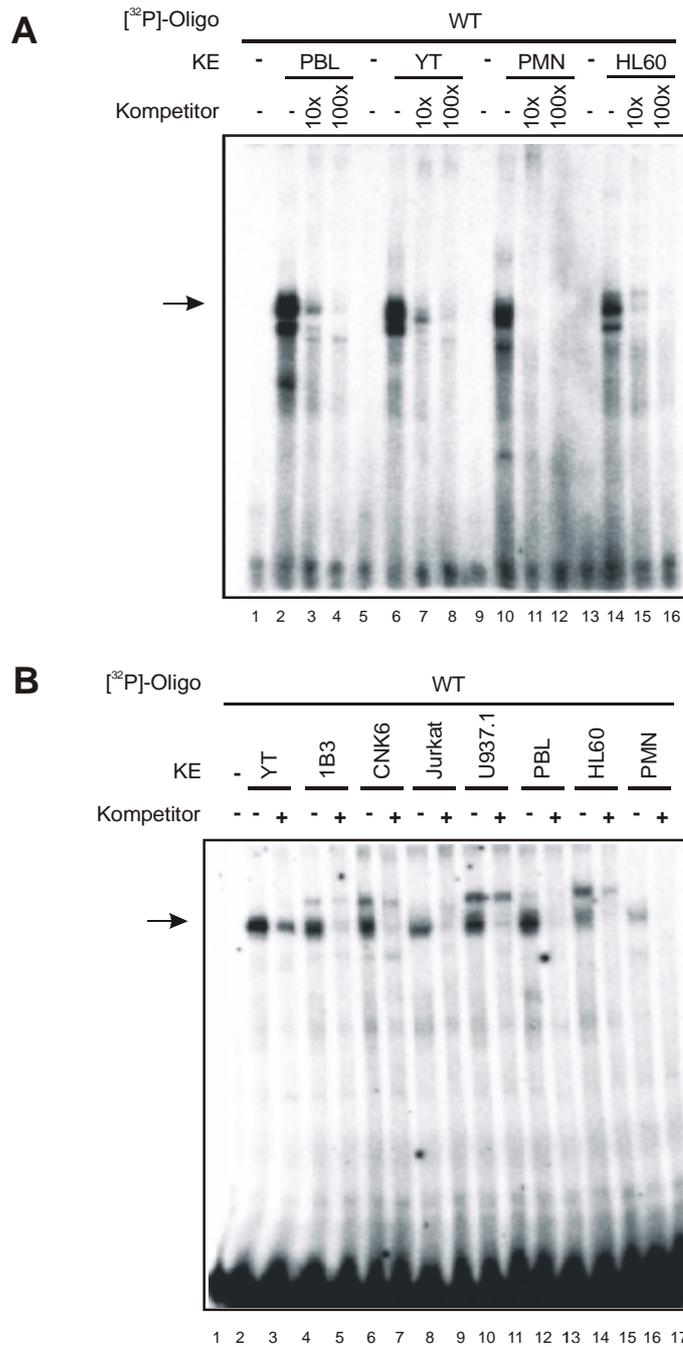


Abbildung 12: Proteinbindung an das 21bp-Promotorfragment des FcγRIIIA-Gens. (A) Das radioaktiv markierte 21bp-Fragment des Pmed1 (WT) wurde mit den Kernextrakten (KE, 3 µg) von PBLs, YT Zellen, PMNs und HL60 Zellen mit und ohne Kompetitor inkubiert. Als Kompetitor wurde das nicht markierte WT-Oligonukleotid in einem 10- bzw. 100-fachen Überschuss im Verhältnis zum markierten Oligonukleotid zu den Proben gegeben. (B) Das radioaktiv markierte 21bp-Fragment (WT) wurde in zwei Ansätzen mit Kernextrakten (KE, 3 µg) aus den NK-Zellen YT und CNK6, aus den T-Zellen Jurkat und 1B3, aus den promyeloischen Zelllinien U937.1 und HL60 und den aus Blutkonserven aufgereinigten und isolierten Kernproteinen von PBLs und PMNs inkubiert. Dabei wurde jeweils in einem Ansatz das WT-Oligonukleotid als Kompetitor zugesetzt.

3.3 Effekt der 21bp 5'-Region im Kontext heterologer Promotorsysteme: Induktion der Transkriptionsaktivität, nicht aber der NK/T-Zellspezifität

3.3.1 Herstellung der Reportergenkonstrukte

Die durchgeführten DNA-Protein-Bindungsstudien zeigten erste Hinweise über die Beteiligung eines ubiquitären Kernproteins anstelle eines möglichen zelltypspezifischen Transkriptionsfaktor, der durch eine spezifische Bande nur in den NK/T Zellkernextrakten im EMSA sichtbar geworden wäre. Es ergab sich vielmehr ein homogenes Bild bei allen getesteten Kernextrakten, unabhängig vom Phänotyp der Zellen. Um das 21bp-Fragment des Pmed1-Promotors unabhängig vom 71bp-Restpromotor im Luciferaseassay auf Zelltypspezifität untersuchen zu können, wurden heterologe Promotorkonstrukte generiert. Der heterologe Promotor setzt sich zusammen aus dem zu untersuchenden Promotorfragment und im günstigsten Fall einem zweiten Promotorfragment, an das der generelle Transkriptionskomplex binden kann. Dieses führt alleine zu keiner Genexpression, erst durch die Fusion des zu untersuchenden Promotorfragments soll es zur spezifischen Genexpression kommen.

In einem ersten Ansatz wurde das 21bp-Fragment des Pmed1 als Triplet in beiden Orientierungen vor ein TATA-Box Element in den Luciferasevektor pTATA-Luc kloniert. Das 21bp-Fragment des Pmed1-Promotor (-942/-921) wurde von MWG-Biotech als Oligonukleotid mit dreifacher Sequenzwiederholung (3x21bp) synthetisiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Restriktionsanalysen und durch Ansequenzieren der Plasmide 3x21bp-pTATA-Luc und inv.3x21bp-pTATA-Luc überprüft.

Im zweiten Ansatz wurde der minimale *Herpes Simplex Virus* Thymidinkinase-(TK)-Promotor gewählt. Der TK-Promotor wurde mittels PCR amplifiziert. Das 5'-Ende stellte die *EcoRI*-Schnittstelle des TK-Promotors dar, mit dem verwendeten Primer wurde daneben eine *BamHI*-Site eingeführt. Der verkürzte TK-Promotor wurde dann über die *BamHI*- und *XbaI*-Site in den Luciferasevektor pLuc eingeführt. Anschließend wurde das von MWG-Biotech synthetisierte 21bp-Triplett-Oligonukleotid (dsOligo 941-3x21) in sense und inverser Orientierung vor den TK-Promotor kloniert und die erhaltenen Klone durch Sequenzierung analysiert. So entstanden die Luciferasevektoren 3x21bp-pTK-Luc, inv.3x21bp-pTK-Luc und pTK-Luc (Abbildung 13).

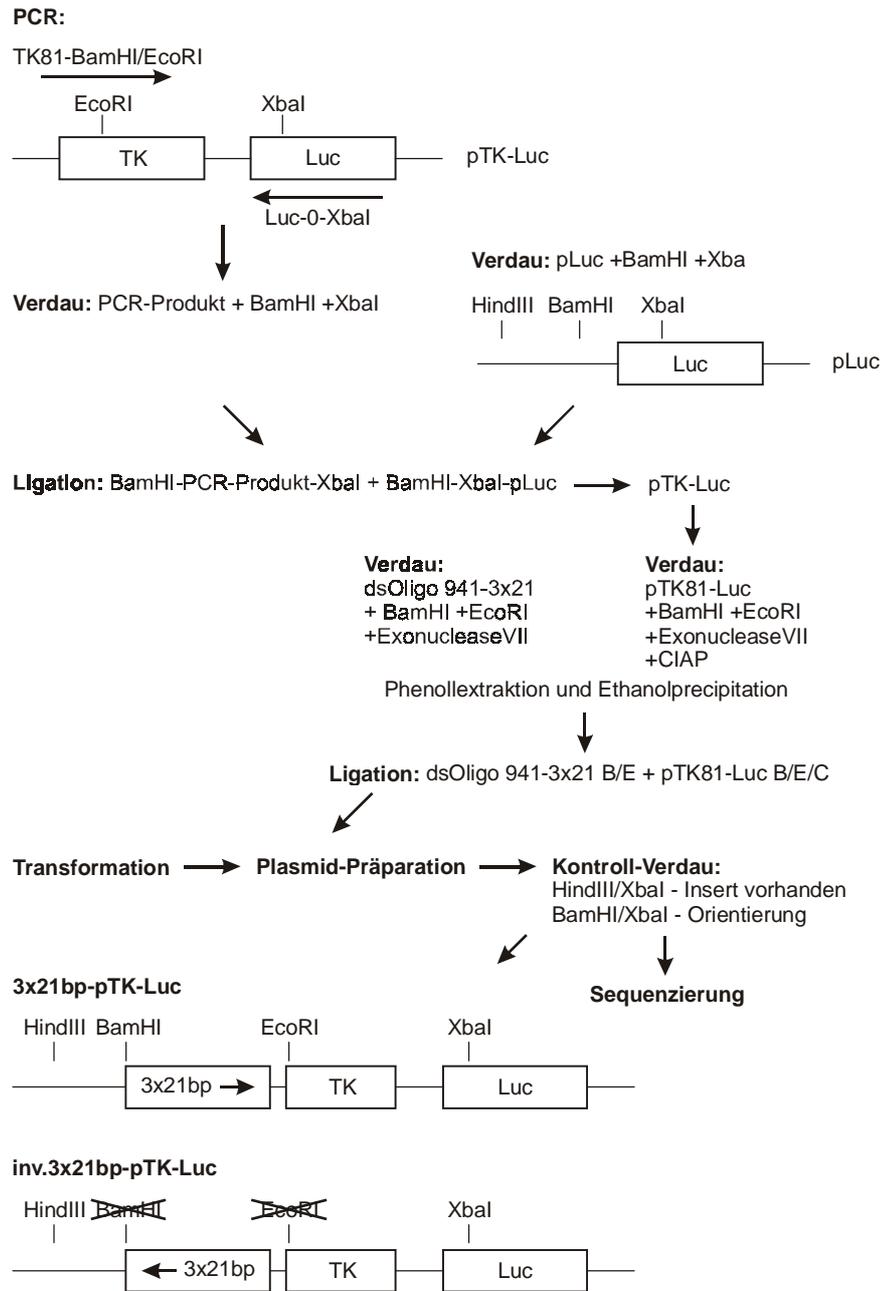


Abbildung 13: Klonierung der Luciferasevektoren 3x21bp-pTK-Luc und inv.3x21bp-pTK-Luc. Zuerst wurde ein 81bp-Fragment des TK-Promotors mittels PCR amplifiziert und über eine BamHI und XbaI Schnittstelle in den pLuc-Vektor kloniert. Im nächsten Schritt wurde jeweils das ds Oligo941-3x21 und der pTK81-Luc mit BamHI und EcoRI verdaut und die Basenüberhänge mit Exonuclease VII abverdaut. Der Vektor wurde mit CIAP dephosphoryliert. Die beiden Produkte dsOligo941-3x21B/E und pTK81-Luc B/E/C (B=BamHI, E=EcoRI, C=CIAP) ligiert. Die generierten Endprodukte 3x21bp-pTK-Luc und inv.3x21bp-pTK-Luc enthalten ein HindIII-XbaI Insert (~300bp). Im 3x21bp-pTK-Luc wurde die Schnittstellen BamHI und EcoRI erneut eingeführt. Die in weiterführenden Experimenten verwendete Vektoren wurden ansequenziert.

3.3.2 Expressionsstudien mit den heterologen Luciferase-Vektoren

Die generierten Plasmide 3x21bp-pTATA-Luc, inv.3x21bp-pTATA-Luc und der Ausgangsvektor pTATA-Luc wurden transient transfiziert. Die durchgeführten Luciferaseassays in Abbildung 14 zeigten, dass zwar eine Transkriptionsinduktion mit den hier eingesetzten TATA-Promotorkonstrukten in YT und Jurkat Zellen zu beobachten war, aber auch in den beiden myeloiden Zelllinien U937.1 und RAW264.7 zeigte sich eine sehr gute Induktion der Expressionsaktivität mit den TATA-Box-Konstrukten im Vergleich zum Ausgangsvektor pTATA-Luc (Abbildung 14). Diese Ergebnisse belegen, dass das 21bp-Fragment eine allgemein aktivierende Funktion besitzt, nicht jedoch in der Lage ist eine NK/T-Zellrestriktion zu vermitteln.

Analoge Experimente wurden mit in dem zweiten heterologen Promotorsystem durchgeführt. Die Vektoren 3x21bp-pTK-Luc, inv.3x21bp-pTK-Luc und pTK-Luc wurden durch Elektroporation in die einzelnen Zelllinien gebracht und deren Aktivität im Luciferaseassay ausgewertet (Abbildung 15). Die ersten Ergebnisse mit den TK-Promotorkonstrukten zeigten in YT und Jurkat T Zellen eine gute Induktion der Promotoraktivität durch den eingeführten dreifach Repeat des 21bp-Fragments vor den TK-Promotor, im Vergleich zur basalen Aktivität des minimalen TK-Promotors. Die relative Luciferaseaktivität (RLU) des TK-Promotors wurde gleich eins gesetzt und die vielfache Induktion des Fusionspromotors auf dieser Grundlage berechnet. So war eine 10-fache Zunahme der Transkriptionsrate in YT Zellen zu beobachten und in Jurkat eine 60-fache Zunahme der Luciferaseaktivität. Allerdings war auch eine drastische Zunahme der Luciferaseexpression in der humanen myeloiden Zelllinie U937.1 und der murinen myeloiden Zelllinie RAW264.7 zu sehen, wie schon in vorangegangenen Versuchen mit den TATA-Box-Promotorkonstrukten. Eine über 400-fache Steigerung der Transkriptionsrate durch die Einführung des dreifach-Repeats des 21bp-Fragments in den pTK-Luc war in RAW264.7-Zellen zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse bestätigten die schon im EMSA mit den verschiedenen Kernextrakten der Zellen gemachten Beobachtungen. Es war nicht nur keine zelltypspezifische Bande zu detektieren, sondern das 21bp-Fragment kann in einem heterologen Kontext in einem Reporterassay keine NK/T-Zellrestriktion vermitteln, was wiederum für einen ubiquitären Faktor spricht.

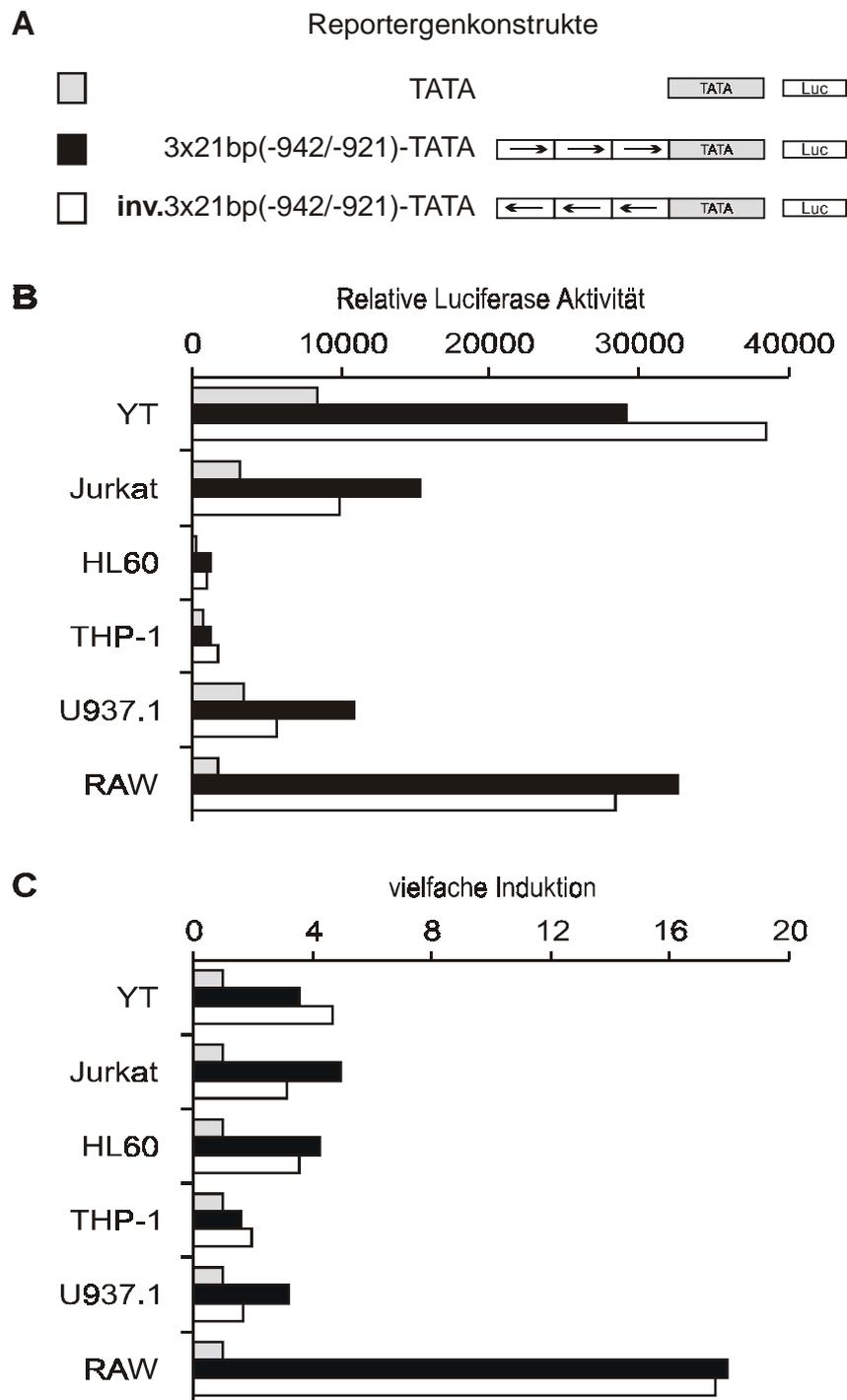


Abbildung 14: Luciferase Assay mit heterologen TATA-Box-Promotorkonstrukten. (A) Vor die TATA-Box des pTATA-Luc wurde ein dreifach-Repeat des 21bp-Fragments des Pmed1 (3x21bp) in sense und inverser Orientierung kloniert. (B) Es zeigte sich in YT, Jurkat, U937.1 und RAW264.7 Zellen eine Zunahme der Expression durch das eingesetzte 21 bp Triplet im Vergleich zum Ausgangsvektor pTATA-Luc (TATA), auch in den HL60 und THP-1 Zellen war ausgehend von einem niedrigen Expressionsniveau eine Steigerung der Expressionsrate zu beobachten. (C) Die Steigerung der Expressionsrate wurde ausgehend vom pTATA-Luc (=1) für die einzelnen Zellen als das Vielfache der Expressionsaktivität dargestellt.

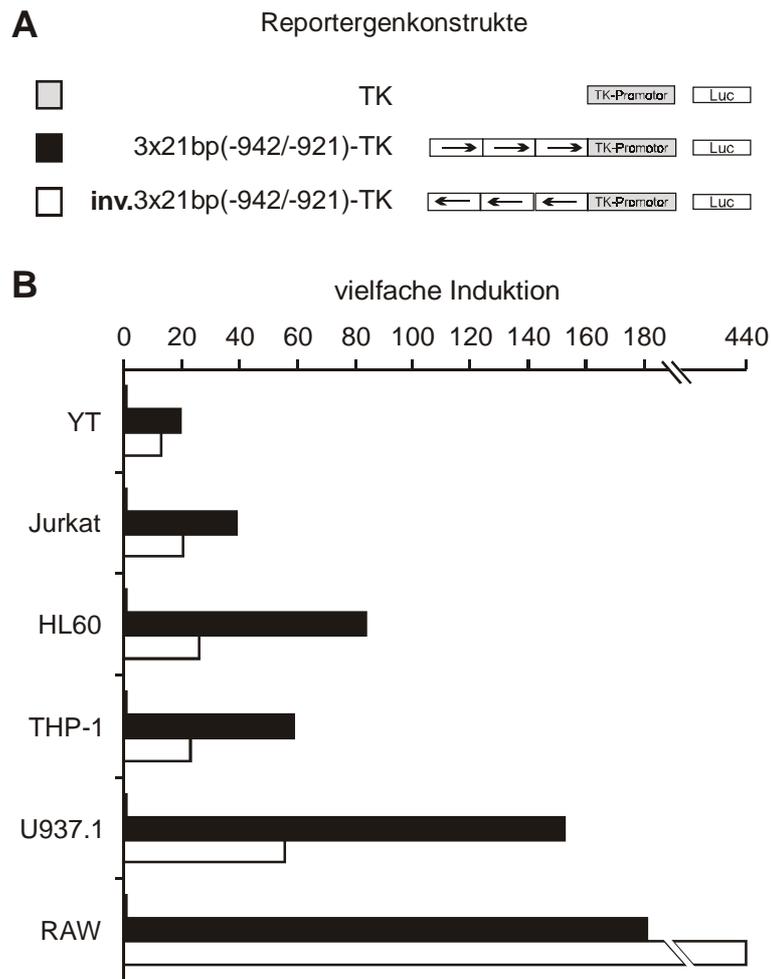


Abbildung 15: Luciferase Assay mit heterologen Thymidinkinase-(TK)-Promotor-Konstrukten. (A) Ein dreifach-Repeat des 21bp-Fragments des Pmed1 (3x21bp) wurde in sense und inverser Orientierung vor den minimalen TK-Promotor im pLuc-Vektor kloniert. (B) Es zeigte sich in allen getesteten Zellen eine Zunahme der Expressionsrate durch das eingesetzte 21bp-Triplett im Vergleich zum Ausgangsvektor pTK-Luc (TK). Die Steigerung der Expressionsrate wurde ausgehend vom pTK-Luc (=1) für die einzelnen Zellen als das Vielfache der Expressionsaktivität dargestellt.

3.4 Sp1 nicht aber Ets bestimmt die Transkriptionsaktivität der 21bp 5'-Region des FcγRIIIA Pmed1 Promotors

3.4.1 DNA-Sp1 Bindungsanalysen

Die bisherigen Daten zeigen sehr klar, dass die 21bp-5'-Region maßgeblich für die Gesamtaktivität nicht aber für die NK/T-Spezifität des FcγRIIIA Pmed1 verantwortlich ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die 21bp Region einen ubiquitären Faktor bindet, der erst im Zusammenspiel mit Elementen im 71bp-Fragment zur zelltypspezifischen Expression in NK/T-Zellen führt. Die Mutationsanalysen hatten zudem den Bereich des 21bp Fragments auf die überlappende Sp1/Ets Bindungssequenz eingegrenzt. So lag es nahe durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen Sp1 und Ets-Transkriptionsfaktoren in einem sogenannten EMSA-Supershift zu überprüfen, inwieweit beide Faktoren tatsächlich an die 21bp-Sequenz des Pmed1 binden. Hierzu wurden Kernextrakte von YT Zellen mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor Sp1 und in einem zweiten Ansatz mit einem Antikörper gegen Ets Transkriptionsfaktoren 20 min preinkubiert. Danach wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde dazupipettiert, für weitere 20 min inkubiert und anschließend auf einem nativen PAGE-Gel aufgetrennt. Daneben wurden Kompetitionen in einem 50- und 100-fachem Überschuss von Sp1-Konsensussequenz (Sp1), Wildtypfragment (WT) und Mutanten (M1 bis M5) eingesetzt.

Der EMSA (Abbildung 16A) zeigte, dass sich, wie schon in vorangegangenen Experimenten, ein Hauptretardationskomplex ausbildete. Die Ausbildung dieses Komplexes wurde durch die Zugabe der kalten Oligonukleotide Sp1, WT, M1 und M5 inhibiert. Die Komplexbildung konnte weiterhin durch die Zugabe des spezifischen Antikörpers gegen Sp1 unterdrückt werden. Der eingesetzte anti-Sp1-Antikörper (Santa Cruz) bindet an die DNA-Bindende Domäne (DBD) des Transkriptionsfaktors und verhindert somit die Interaktion von Sp1 mit seiner Konsensussequenz. Dadurch ist der spezifische DNA-Sp1 Komplex im Gel nicht mehr zu detektieren. Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe des anti-Ets Antikörpers keine Veränderung im Bandenmuster des Gels. Ein weiterer EMSA in Abbildung 16B mit der Sp1-Konsensussequenz als radioaktive DNA-Sonde und YT-Kernextrakt war ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei dem Faktor, der an das 21bp-Fragment bindet, um den Transkriptionsfaktor Sp1 handelt. Hierbei wurden neben der Sp1-Konsensussequenz das 21bp-Pmed1-Wildtyp-Fragment und die Mutanten M1 bis M5 als Kompetitoren eingesetzt.

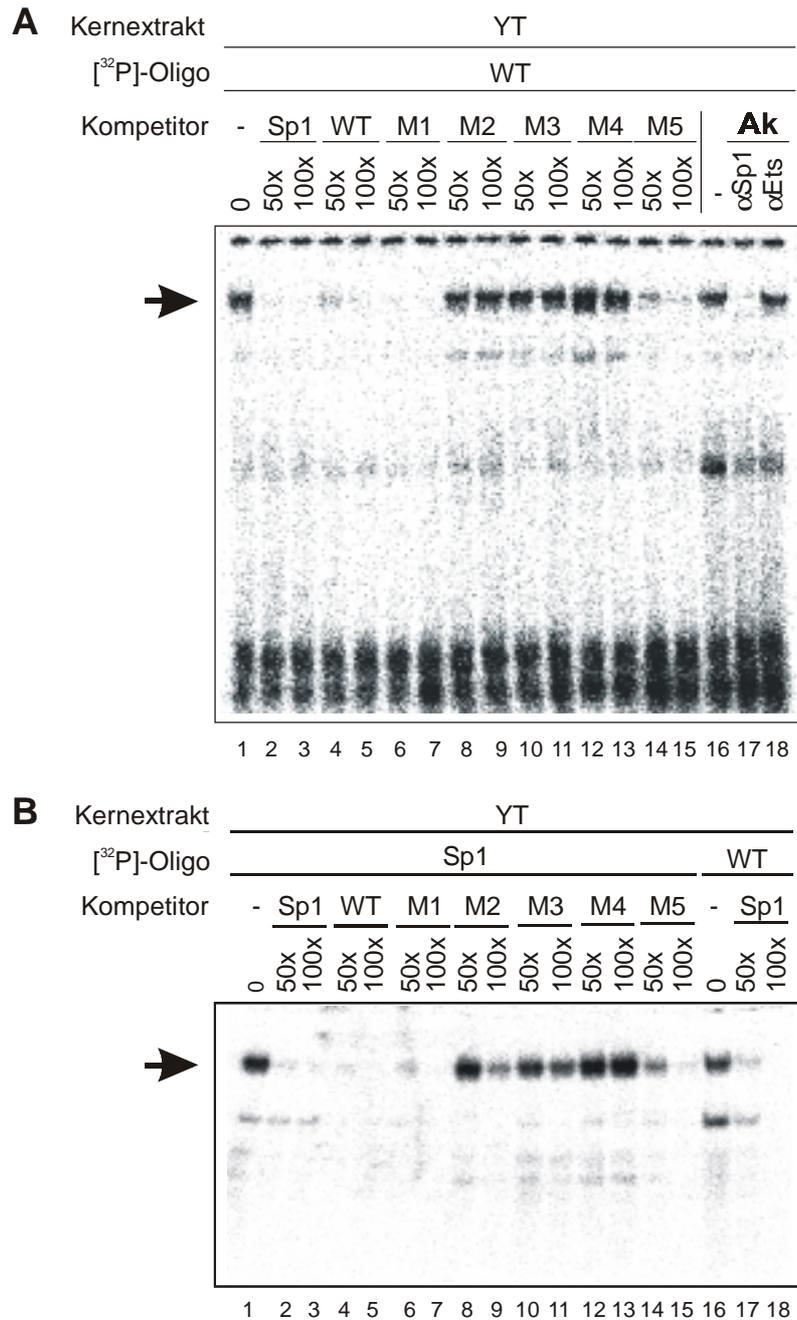


Abbildung 16: DNA-Bindung von Sp1 mit YT-Kernextrakten. (A) Zum Nachweis der Affinität des Sp1 Transkriptionsfaktors an das 21bp-Fragment des Pmed1 wurden YT-Kernextrakte mit dem radioaktiv markierten WT-Oligonukleotid (21bp-Fragment) inkubiert (Lane 1). Den weiteren Proben wurde ein 50- bzw. 100-facher Überschuss an kaltem Kompetitor zugesetzt (Lane 2-15). In Lane 2 und 3 wurde ein Sp1-Consensus-Oligonukleotid dazugegeben, nachfolgend das WT-Oligonukleotid (21bp-Fragment) (Lane 4 und 5), dann die unter 3.2.1 beschriebenen Mutanten M1 bis M5 (Lane 6 bis 15). Des weiteren wurden Antikörper (AK) gegen Transkriptionsfaktoren Sp1 (Lane 17) und Ets (Lane 18) eingesetzt. (B) Zum Nachweis der Bindung von Sp1 an das 21bp-Fragment des Fc γ RIIIA wurde zum einen eine Sp1-Konsensussequenz (Sp1) radioaktiv markiert (Lane 1-15), parallel wurde das markierte 21bp-Fragment (WT) (Lane 16-18) eingesetzt. Beide Ansätze wurden mit YT-Kernextrakten und mit (Lane 2-15, 17-18) oder ohne (Lane 1 und 16) Kompetitor inkubiert. Die Kompetitoren wurden in 50-100fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum markierten Oligo eingesetzt, es handelte sich bei den Kompetitoren um die Sp1-Konsensussequenz, das 21bp-Fragment (WT) und die Mutanten M1 bis M5 des 21bp-Fragments.

3.4.2 Sp1-Transkriptionsinduktion in SL2 *Drosophila* Zellen

Eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob es sich bei dem ubiquitären Faktor tatsächlich um Sp1 handelt, ist der Einsatz der heterologen SL2 *Drosophila* Schneider Zelllinie und Kotransfektion mit dem Expressionsvektor pPac-Sp1 in einem Reporterassay.

SL2 *Drosophila* Schneider Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie generell kein Sp1 exprimieren und somit über einen Sp1 abhängigen Promotor keine autologe Genexpression induzieren können. Das Plasmid pPac-Sp1 (der Vektor wurde uns freundlicherweise von R. Tjian zur Verfügung gestellt) exprimiert Sp1 unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven viralen CMV-Promotors. Nach Kotransfektion dieses Plasmids mit einem spezifischen Luciferasevektor in die SL2 Zellen, kann das synthetisierte Sp1 an eine Promotorsequenz binden, wenn diese eine Sp1-Bindungsstelle enthält und zur Transkription des nachgeschalteten Luciferasegens führt (Abbildung 17).

Die SL2 Zellen wurden mit den unter 3.3.1 beschriebenen heterologen Promotorkonstrukten 3x21bp-pTK-Luc und inv.3x21bp-pTK-Luc sowie als Kontrolle mit dem pTK-Luc Vektor elektroporiert. In drei weiteren parallelen Ansätzen wurden die SL2 Zellen mit den drei pTK-Luc Vektorkonstrukten inkubiert. Zu jedem Ansatz wurde das Sp1 exprimierende pPac-Sp1 Plasmid dazupipettiert. Alle Ansätze wurden mittels Elektroporation transient transfiziert und die Zellen nach 20 Stunden geerntet, aufgeschlossen und die Luciferaseaktivität gemessen.

Es zeigte sich für die beiden heterologen Promotorkonstrukte des 21bp-Fragments in Abhängigkeit von der Kotransfektion mit dem pPac-Sp1 Plasmid eine bis zu 20-fache Induktion der Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zugabe des pPac-Sp1. Bei den Kontrollansätzen mit dem Thymidinkinase-(TK)-Promotor mit und ohne Zugabe des pPac-Sp1 zeigte sich keine signifikante Zunahme der Promotoraktivität durch die Sp1-Expression (Abbildung 18B). Als Positivkontrolle wurde der pLuc-SV40 eingesetzt, der insgesamt fünf Bindungsstellen für Sp1 trägt. Nach der Kotransfektion von pLuc-SV40 mit pPac-Sp1 zeigte sich eine drastische Zunahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zu jenem Ansatz ohne pPac-Sp1 (Abbildung 18C).

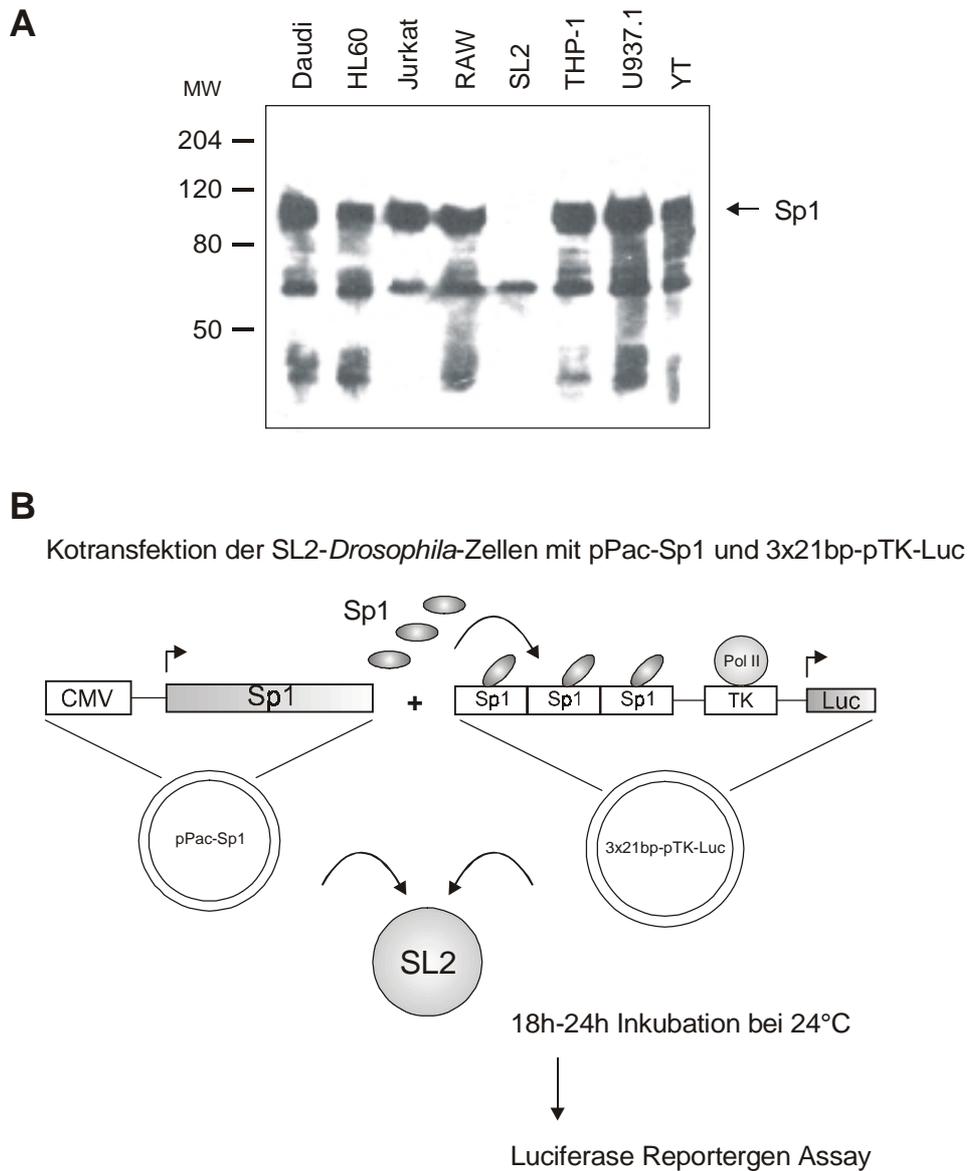


Abbildung 17: SL2-*Drosophila*-Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie den Transkriptionsfaktor Sp1 nicht synthetisieren können. Erst durch die Transfektion eines Sp1 exprimierenden Vektors (pPac-Sp1) sind SL2-Zellen in der Lage Sp1 abhängige Gene zu exprimieren. (A) Von den in dieser Arbeit eingesetzten Zellen wurden Proteinextrakte im Western-Blot eingesetzt und mit einem anti-Sp1 Antikörper inkubiert, mit Ausnahme der SL2-Zellen ist bei allen Zellen das Sp1-Protein nachweisbar. (B) Schematische Darstellung der Kotransfektion von SL2-*Drosophila*-Zellen mit dem pPac-Sp1 und dem 3x21bp-pTK-Luc, der in jedem 21bp-Fragment eine Sp1-Bindungsstelle enthält.

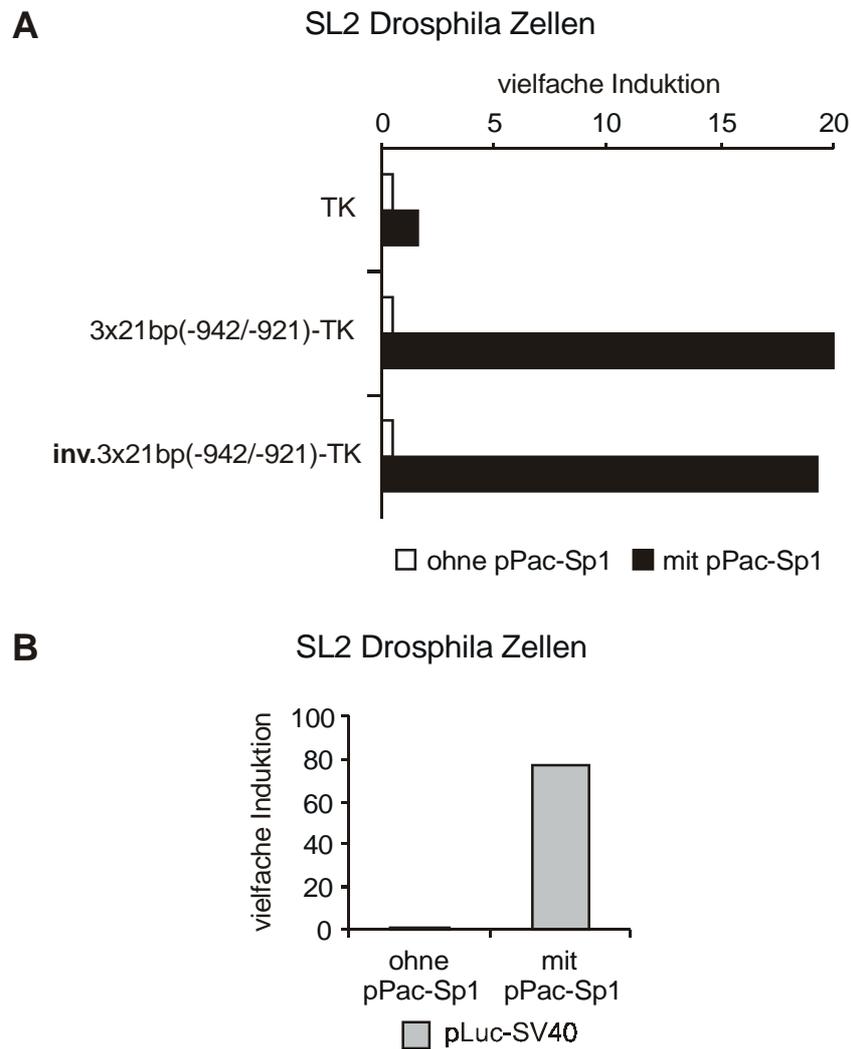


Abbildung 18: Kotransfektion von pTK-Luc Vektorkonstrukten und dem Sp1-Expressionsvektor pPac-Sp1 in SL2 *Drosophila* Zellen. (A) Die SL2 *Drosophila* Zellen wurden mit den pTK-Vektorkonstrukten 3x21bp(-942/-921)-TK und inv.3x21bp(-942/-921)-TK transfiziert. In einem zweiten, parallelen Ansatz erfolgte die Kotransfektion mit dem Sp1-Expressionsvektor pPac-Sp1. Die Darstellung der Transfektionseffizienz erfolgte im Vergleich zu der Transkriptionsrate ohne pPac-Sp1. (B) Als Kontrolle diente der pLuc-SV40 Vektor. Die SL2 Zellen wurden mit dem pLuc-SV40, mit und ohne Zugabe des pPac-Sp1 transfiziert.

3.5 Die 71bp 3'-Region des Pmed1 im FcγRIIIA Gen nicht aber im FcγRIIIB Gen vermittelt NK/T-Zellspezifität

In den oben ausgeführten Experimenten wurde deutlich, dass das 21bp-Fragment des Pmed1-Promotors nicht eine *cis*-Region darstellt, an dem ein für NK/T-Zellen spezifischer Faktor bindet, sondern das 21bp-Fragment ist vielmehr ein Element, an das das ubiquitär exprimierte Sp1 Protein bindet. Es kann vermutet werden, dass durch die Bindung von Sp1 andere spezifische Transkriptionsfaktoren und/oder Kofaktoren aktiviert werden und dadurch die Zelltypspezifität ermöglichen.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein weiterer Ansatz gewählt, der die verbleibende 71bp 3'-Region des Pmed1 näher beleuchten sollte. Dazu wurden neue Reportergenkonstrukte generiert. Grundlage für diese Konstrukte waren die beiden oben beschriebenen Luciferasevektoren, zum einen mit dem minimalen *HSV-TK*-Promotor und zum anderen mit einer TATA-Box vor dem Luciferasegen.

3.5.1 Herstellung und Funktionsanalysen von Pmed1 3'-pTATA Vektorkonstrukten

Der vollständige FcγRIIIA Pmed1 wurde in inverser Orientierung vor die TATA-Box kloniert (inv.92A-TATA), weiterhin das um die ersten 21bp verkürzte 71bp-Fragment (inv.71A-TATA), sowie das dem 71bp-Fragment des Pmed1 homologe 79bp-Fragment des inaktiven FcγRIIIB Pmed1 (inv.79B-TATA), beide ebenfalls in inverser Orientierung (Abbildung 19A). Aus der inversen Orientierung der Promotorfragmente in einem heterologen Promotorsystem mit einer TATA-Box oder einem verkürzten TK-Promotor ergibt sich die Möglichkeit Transkriptionsinitiation unabhängig von der intrinsischen Transkriptionsinstitutionsstelle zu untersuchen, daneben kann es ein Indiz dafür sein, ob die Ausrichtung des Promotors eine Rolle spielt. Der Einsatz der TATA-Box ist desweiteren vorteilhaft bei der Untersuchung von inkompletten Promotorfragmenten wie in diesem Fall der Pmed1-Fragmente des IIIA- und IIIB-Gens. Diese drei Konstrukte wurden in den Zelllinien YT, Jurkat, U937.1 und RAW264.7 getestet.

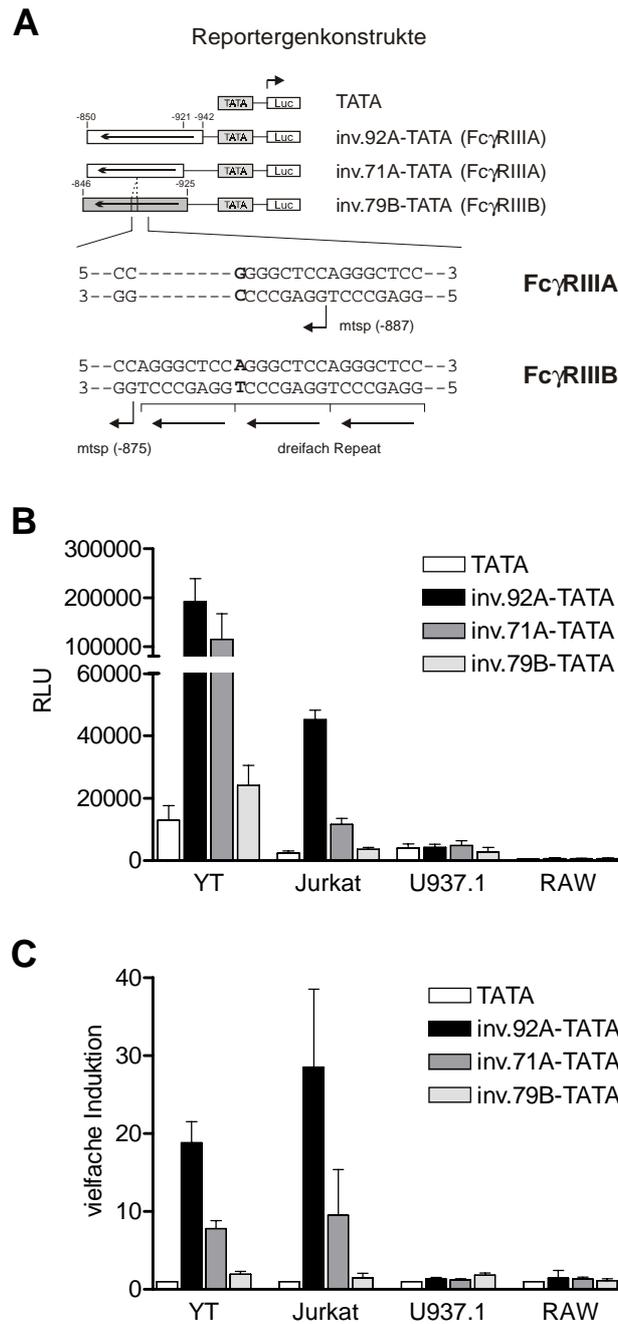


Abbildung 19: Zellspezifische Expression des Fc γ RIIIA-Gens wird durch die 71bp-3'-Region des Pmed1-Promotors vermittelt. (A) Dargestellt sind die heterologen Promotorkonstrukte mit einer TATA-Box und dem jeweiligen Pmed1-Fragment, der Sequenzausschnitt zeigt die Basenunterschiede zwischen dem Fc γ RIIIA- und Fc γ RIIIB-Gen in diesem Bereich. (B) Es wurden die pTATA-Luc-Vektorkonstrukte mit den inversen Promotorelementen des Fc γ RIIIA-Gens (inv.92A und inv.71A) und des Fc γ RIIIB-Gens (inv.79B) in YT, Jurkat, U937.1 und RAW264.7 Zellen getestet. Die Expressionsaktivität wurde in relativen Luciferaseeinheiten (RLU) gemessen. In (C) wurde auf Grundlage der Expressionsrate des Basisvektors pTATA-Luc (=1) für jede Zelllinie die vielfache Induktion durch den Einsatz des zusätzlichen Promotorelements inv.92A, inv.71A und inv.79B berechnet.

Die Auswertung der Luciferaseaktivität (Abbildung 19B) zeigte, dass die Konstrukte inv.92A-TATA und inv.71A-TATA sowohl in YT-Zellen als auch in Jurkat aktiv waren. Dabei war die Luciferaseaktivität des 71bp-Fragments im Vergleich zum vollständigen Pmed1 (92bp) vor der TATA-Box um die Hälfte vermindert (~100.000 RLU zu ~200.000 RLU). In Jurkat fiel die Abnahme der Luciferaseaktivität im Vergleich von inv.92A-TATA (~45.000 RLU) zu inv.71A-TATA (~17.000 RLU) etwas stärker aus. Der Ausgangsvektor pTATA-Luc und das Konstrukt inv.79B-TATA zeigte in Jurkat nur eine basale Aktivität, in YT-Zellen waren die Luciferasewerte dieser Konstrukte leicht erhöht. Im Gegensatz dazu konnten für alle Konstrukte in den humanen bzw. murinen myeloischen Zelllinien U937.1 und RAW267.4 keine Aktivität über die basale Transkriptionsrate hinaus nachgewiesen werden.

In Abbildung 19C wurde die vielfache Induktion durch die vorgeschalteten Promotorelemente vor die TATA-Box berechnet und dargestellt. Da die basale Transkriptionsrate des pTATA-Luc in YT-Zellen etwas höher ausfiel, schlug sich dies auf die Induktionsrate der abgeleiteten Vektorkonstrukte inv.92A.TATA und inv.71A-TATA nieder. Damit wurde in YT-Zellen eine ~20 fache Induktion durch den Pmed1 und eine ~10 fache Induktion durch das 71bp-Fragment des Pmed1 des IIIA-Gens ermittelt. Die Induktionsrate für die Jurkat-Zellen lagen im Vergleich zum Ausgangsvektor pTATA-Luc für den Pmed1 bei 30 bis 40 facher Induktion und für das 71bp-Fragment zwischen 10 und 15 facher Induktion. Der Vektor inv.79B-TATA zeigte auch in dieser Darstellung der Luciferasedaten in beiden Zellen keinen Effekt. In den U937.1 und RAW264.7-Zellen führte keines der heterologen Vektorkonstrukte im Vergleich zum pTATA-Luc zur Induktion der Transkription. Diese Ergebnisse waren ein Indiz dafür, dass die 71bp-3'-Region des Pmed1 des FcγRIIIA-Gens zellspezifische Expression in NK/T-Zellen vermittelt.

3.5.2 Herstellung und Funktionsanalysen von Pmed1-3'-pTK

Vektorkonstrukten

In dem zweiten Ansatz mit heterologen Promotorkonstrukten diente der pTK-Luc als Ausgangsvektor. Hier wurde wie schon zuvor bei den pTATA-Luc-Konstrukten, der vollständige Bereich sowie die 71bp 3'-Region des FcγRIIIA Pmed1 und das 79bp 3'-Fragment des FcγRIIIB Pmed1 vor den TK-Promotor in inverser Orientierung kloniert (inv.92A-TK, inv.71A-TK und inv.79B-TK). YT, Jurkat, U937.1 und RAW264.7-Zellen wurden mit diesen Konstrukten transient transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität gemessen.

Die Auswertung in Abbildung 20 ergab eine deutliche Steigerung der TK-Promotoraktivität durch die vorgeschalteten 92bp- bzw. 71bp-Fragmente von FcγRIIIA Pmed1 in YT-NK-Zellen. Die in RLU gemessene Luciferaseaktivität fiel in Jurkat-T-Zellen für die beiden Konstrukte, inv.92A-TK und inv.71A-TK, niedriger aus als in YT-Zellen. Wurde die Luciferaseaktivität der heterologen Konstrukte im Vergleich zum pTK-Luc betrachtet und wie in Abbildung 20B als vielfache Induktion dargestellt, war die Expressionsinduktion, sowohl in YT als auch in Jurkat-Zellen gleichermaßen eindeutig, wobei die Induktionsrate des 71bp-Fragments geringer ausfiel. In den myeloischen Zelllinien U937.1 und RAW264.7 zeigten diese Vektorkonstrukte keine Aktivität. Das dritte Konstrukt inv.79B-TK zeigte in keiner Zelllinie eine Zunahme der Transkriptionsrate im Vergleich zum Ursprungsvektor pTK-Luc. In einem parallelen Kontrollexperiment (Abbildung 20C) wurden die Zellen mit den drei pLuc-Vektoren pLuc-92A, pLuc-71A und pLuc-79B transfiziert. Die Luciferaseaktivität war wie zu erwarten für den pLuc-79B negativ, während für pLuc-92A und pLuc-71A in YT-Zellen und auf niedrigerem Niveau in Jurkat-Zellen Promotoraktivität nachweisbar war.

Stellt man die Daten mit den verschiedenen heterologen Promotorkonstrukten gegenüber, so wird deutlich, dass das 71bp-Fragment des IIIA-Gens Zellspezifität für NK- und T-Zellen aufweist, wenn auch im Vergleich zum kompletten Pmed1 des IIIA-Gens bei geringerer Gesamtaktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das homologe 79bp-Fragment des IIIB-Gens in den heterologen Konstrukten in allen Zellen komplett negativ ist. Diese Ergebnisse können auf den bestehenden Sequenzunterschied einer 8bp-Deletion zwischen dem Pmed1 des IIIA- und IIIB-Gens zurückgeführt werden.

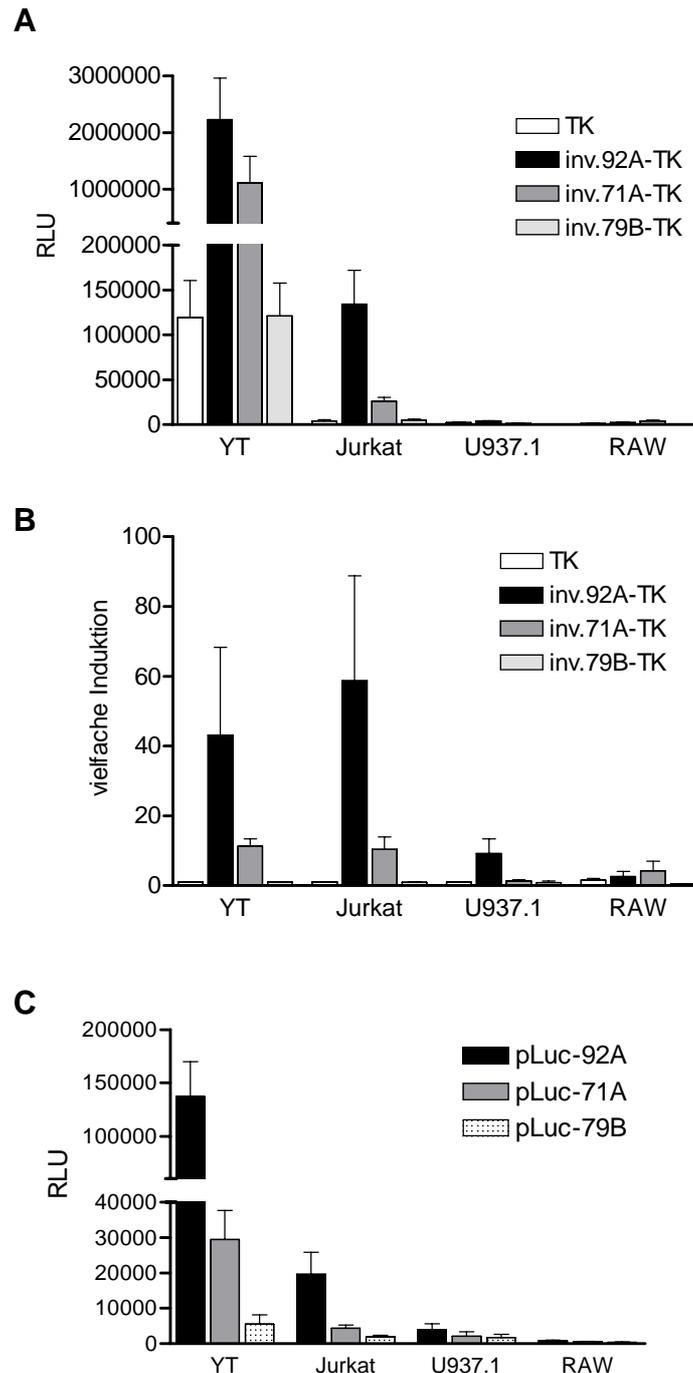


Abbildung 20: Luciferase Assay mit heterologen TK-Promotorkonstrukten. (A) YT, Jurkat, U937.1 und RAW264.7 Zellen wurden mit den pTK-Luc-Vektorkonstrukten transfiziert, diese Konstrukte enthielten vor dem minimalen TK-Promotor die Promotorelemente des Pmed1 des IIIA-Gens in inverser Orientierung (inv.92A und inv.71A) und ein Promotorelement des IIIB-Gens (inv.79B). (B) Die Expressionsaktivität wurde auf Grundlage des Basisvektors pTK-Luc (=1) als vielfache Induktion für die einzelnen Zelllinien berechnet. (C) Zum Vergleich wurden die Zellen in einem parallelen Ansatz mit den pLuc-Vektorkonstrukten des Pmed1, des Fc γ RIIIA-Gens und dem 79bp-Fragment des Fc γ RIIIB-Gens transfiziert.

3.5.3 Kartierung von DNA-Protein-Bindungsdomänen in der 3'-Region des FcγRIIIA Pmed1

Da das 71bp-Fragment des Pmed1 spezifische Expression in NK- und T-Zellen vermitteln kann, war die nächste Frage nach unterschiedlichen Bindungen von Transkriptionsfaktoren in den untersuchten Zellen. Um neben Sp1 weitere Transkriptionsbindungsstellen lokalisieren zu können, wurde über den gesamten FcγRIIIA Pmed1 von Position -942 bis -850 überlappende Oligonukleotide konzipiert. Dabei wurden fünf Oligonukleotide synthetisiert OL1 bis OL5 (Abbildung 21A). Das Oligonukleotid OL1 beinhaltet das 21bp-Fragment des Pmed1 mit seiner Sp1-Bindungsdomäne. Der Pmed1-Promotor weist nach einer Computeranalyse (MatInspector 2.2) zwei weitere putative Bindungsdomänen für Sp1 auf. Diese waren in der Sequenz der Oligonukleotide OL2 und OL5 enthalten.

Die Bandshifts in Abbildung 21B zeigten mit den Kernextrakten der NK/YT-Zellen, der Jurkat-T-Zellen und den myeloiden humanen U937.1- und den murinen RAW264.7-Extrakten nach Inkubation mit den markierten Oligonukleotiden (OL1-OL5) und der Auftrennung im Gel ein vergleichbares Bandenmuster. Dabei ist eine starke konstitutive Bande mit den Oligonukleotiden OL1 und OL2 zu sehen. Die Banden korrespondieren mit den Sp1-Bindungsstellen Sp1-I und Sp1-II. Unterhalb des Sp1-DNA Komplexes bei OL1 ist eine Doppelbande zu beobachten, die möglicherweise die Bindung von NF-P1/2 an das NKE-Motiv darstellt, welche ursprünglich ebenfalls als Doppelbande beschrieben wurde (Liu et al., 1993). Weiterhin ist in der Spur mit dem Oligo OL4 teilweise eine starke Bandenanhäufung oder ein prominenter Schmier zu beobachten. Das Oligo OL4 korreliert mit den mRNA *start sites*, somit könnten diese Banden die RNA-Polymerase II und ihre Cofaktoren darstellen. Eine weitere Bande ist mit dem Oligonukleotid OL5 zu beobachten, die eine dritte Sp1-*site* markiert (Sp1-III). Diese fällt im EMSA etwas schwächer aus als jene mit den Oligos OL1 und OL2. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Computeranalyse, die den beiden ersten Bindungsstellen eine höhere Affinität für Sp1 zuweisen und der proximal gelegenen Sp1-III-*site* eine geringere Bindungsfähigkeit. Darüberhinaus konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Mutation der Sp1-III-*site* im Pmed1 zu einer Verminderung der Expression im Luciferaseassay führt, wenn, wie im EMSA nachgewiesen, Sp1 nicht mehr binden kann (Abbildung 22).

Abschließend bleibt es schwierig einen zellspezifischen Faktor zu benennen, der im 71bp-Anteil des Pmed1 bindet und für die im Luciferaseassay beobachtete zellspezifische Expression in den Zelllinien YT und Jurkat verantwortlich ist.

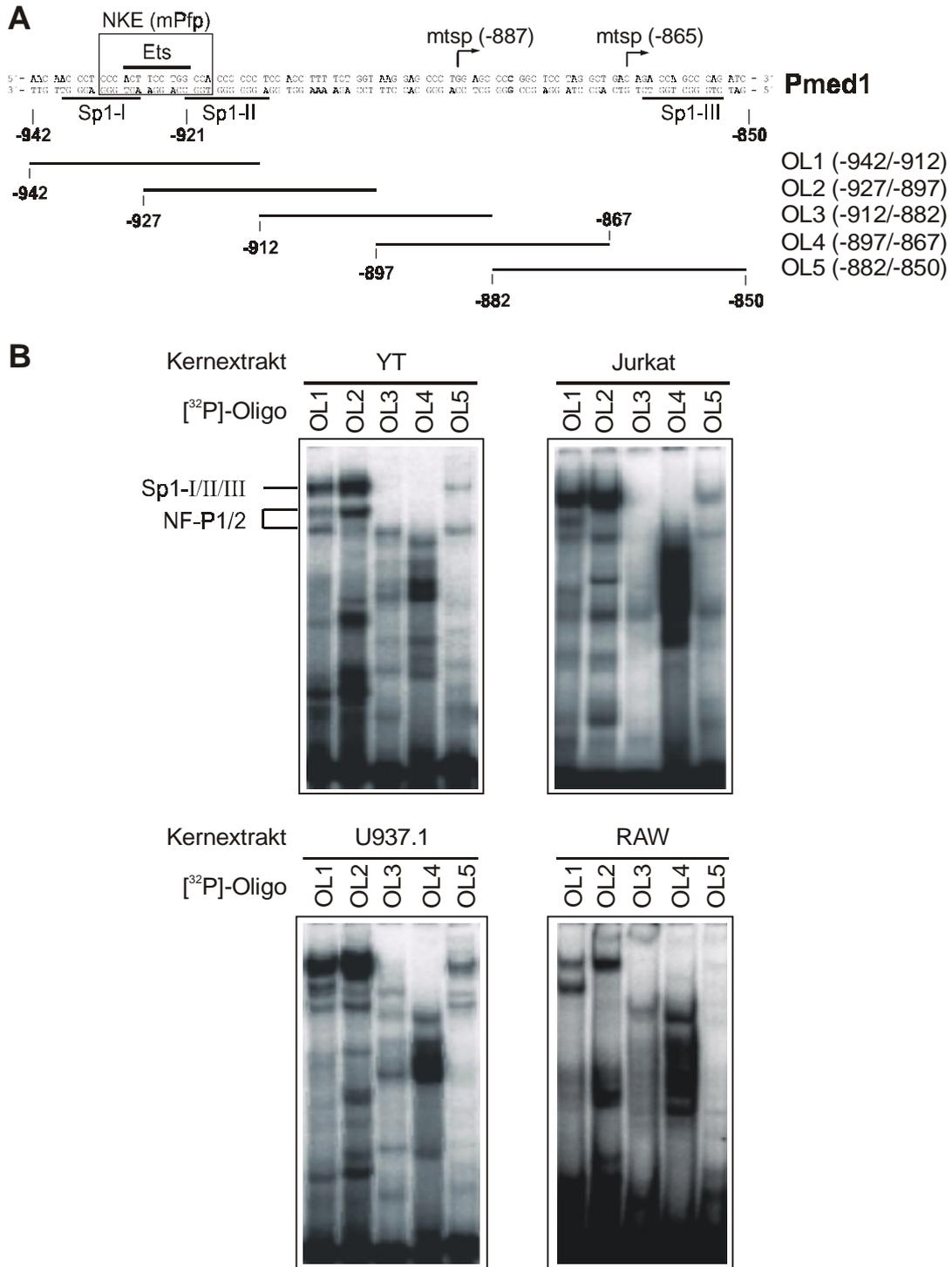


Abbildung 21: Überlappende Oligonukleotide des Pmed1 des FcγRIIIA-Gens zeigen die 3 Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1, sowie weitere DNA-Proteinkomplexe. (A) Die DNA-Sequenz des Pmed1 zeigt die möglichen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren Sp1, Ets und das NKE-Motiv, des weiteren sind die am häufigsten genutzten Transkriptionsstartpunkte (mstsp) verzeichnet. Unter der DNA-Sequenz sind die im Bandshift verwendeten Oligonukleotide OL1 bis OL5 schematisch dargestellt. (B) Die Bandshifts wurden mit den radioaktiv markierten, überlappenden Oligonukleotiden (OL1-OL5) und den Kernextrakten aus YT-, Jurkat-, U937.1- und RAW264.7-Zellen durchgeführt.

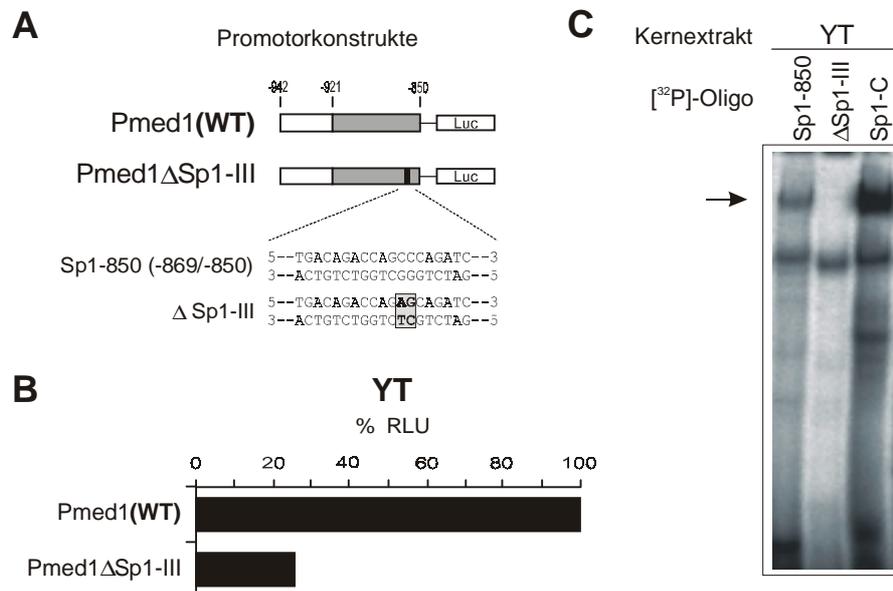


Abbildung 22: Eine Mutation der Sp1-III Bindungsdomäne des Pmed1 führt zu einer Aktivitätsminderung des Promotors in YT-Zellen. (A) Die Sp1-III-site des Pmed1 wurde bei der Position $-843/-844$ mutiert und das entsprechende Promotorkonstrukt generiert und in den Luciferasevektor kloniert. (B) Der entstandene Vektor Pmed1 Δ Sp1-III wurde in YT-Zellen getestet und im Luciferaseassay ausgewertet. (C) YT-Kernextrakte wurden mit den radioaktivmarkierten Oligonukleotiden Sp1-850 ($-869/-850$), Δ Sp1-III und Sp1-C (Sp1-Consensus-Oligonukleotid) inkubiert und im EMSA aufgetrennt. Das Oligo Δ Sp1-III war nicht in der Lage Sp1-Protein zu binden.

3.6 Modell der Transkriptionsregulation des Fc γ RIII A-Gens durch den Pmed1-Promotor

Der Fc γ RIII A-Pmed1-Promotor ist in der Lage im Reporterassay in NK/YT-Zellen und T/Jurkat-Zellen zellspezifische Expression zu vermitteln. Im Pmed1 des Fc γ RIII A-Gens konnten 3 Sp1-sites (GC/GA-Boxen) lokalisiert werden, von denen 2 funktionell im Reporterassay überprüft werden konnten. Der Transkriptionsfaktor Sp1 kann in diesen Regionen binden und rekrutiert dadurch die RNA-PolymeraseII mit ihren Untereinheiten (GTF). Dabei scheint der Abstand der Sp1-Bindungsstellen genauso eine wichtige Rolle zu spielen, wie das Vorhandensein der 3 Sp1-sites im Pmed1-Promotor.

Die Reporteranalysen lassen vermuten, dass nachdem die Sp1-Proteine gebunden wurde die DNA in eine andere räumliche Position gebracht wird und dadurch nicht nur die Möglichkeit besteht den RNA-PolymeraseII-Komplex zu rekrutieren, sondern auch einen noch nicht definierten Cofaktor. Dieser Cofaktor könnte die Transaktivierung zwischen dem Sp1-Protein und dem Generellen Transkriptionsfaktor Komplex (GTF) vermitteln (Abbildung 23). Desweiteren ist die Position der Sp1-sites entscheidend für die Funktionalität des Pmed1-FcγRIIIA-Genpromotors (-942/-850) und die mögliche Interaktion von Transkriptionsfaktoren und Cofaktor, da ein vergleichbarer Sequenzabschnitt im FcγRIIIB-Gen in NK/T-Zellen keine Expressionsaktivität vermitteln kann. Das FcγRIIIB-Gen unterscheidet sich in diesem Bereich (-946/-846) durch eine Basensubstitution und nachfolgend durch zusätzliche 8 Basen.

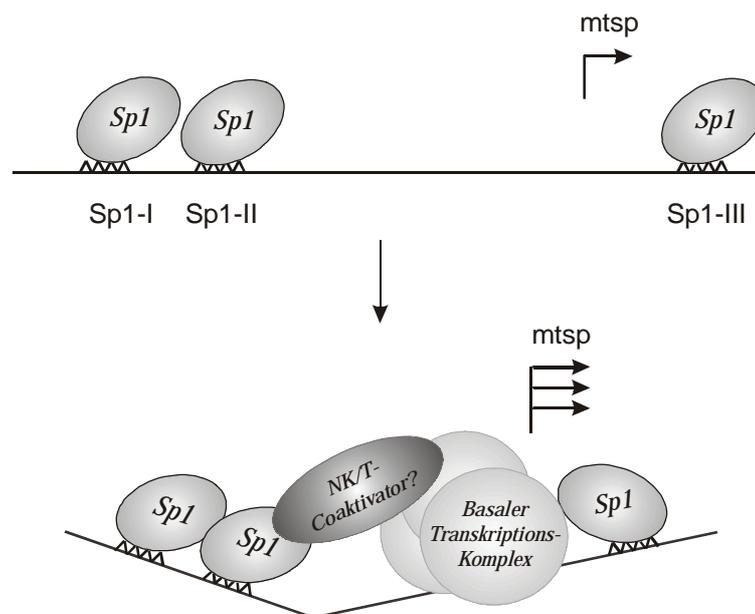


Abbildung 23: Hypothetisches Modell der zellspezifischen Transkription des FcγRIIIA-Gens durch den Pmed1 Promotor in NK/T-Zellen. Zuerst binden Sp1-Proteine an GC/GA-Bindungsmotiv und rekrutieren dadurch die RNA-PolymeraseII und einen möglicherweise NK/T-Zell-spezifischen Cofaktor, der mit den gebundenen Transkriptionsfaktoren interagieren kann.

4. DISKUSSION

Mittlerweile konnten die strukturellen Voraussetzungen der Bindung zwischen dem Fc γ RIII und seines Liganden IgG1 definiert werden (Sondermann et al., 2000). Hingegen ist aber die Transkriptionsregulation des Fc γ RIII und seiner beiden Isoformen immer noch nicht ganz verstanden. In dieser Arbeit wurde die Beteiligung der Pmed1-Promotor-Kontrollregion in der zelltypspezifischen Expression des Fc γ RIII A-Gens untersucht. Dazu wurden in Reportergermanalysen verschiedene Zellen myeloiden und lymphoiden Ursprungs getestet. Es zeigte sich, dass der Fc γ RIII A-Pmed1-Promotor eine eindeutige NK/T-Zellspezifität aufweist. In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an die 5'-21bp-Region des Pmed1 für die hohe Transkriptionsaktivität des Pmed1-Promotors verantwortlich ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass die NK-Zellspezifität primär von Sequenzbereichen der 3'-71bp-Region im Pmed1 abhängig ist. Die DNA-Protein-Bindungsanalysen ergaben hingegen keinen eindeutigen Hinweis auf die Existenz eines für NK-Zellen spezifischen Transkriptionsfaktors. Durch die Bindung von Sp1-Proteinen an die drei Sp1-Bindungsstellen innerhalb des Fc γ RIII A-Pmed1-Promotors, können diese die Rekrutierung der RNA-PolymeraseII und weiterer Cofaktoren ermöglichen. Dabei scheint die Entfernung und Anordnung der Sp1-sites innerhalb des Pmed1-Promotors wichtig zu sein. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass der Fc γ RIII B-Pmed1-Promotor, der sich durch eine 8 Basen-Insertion von der Sequenz des Fc γ RIII A-Pmed1-Promotor unterscheidet, keine Spezifität für NK-Zellen aufweist.

4.1 Ausgangspunkt

Der humane Fc γ RIII wird von zwei unabhängigen Genen kodiert, die zu einer differenziellen, zelltypspezifischen Expression der beiden Rezeptorisoformen (Fc γ RIII A und Fc γ RIII B) führen. Der Fc γ RIII A verfügt über eine transmembrane und zytoplasmatische Domäne und wird auf NK-Zellen, γ δ T-Zellen und Makrophagen konstitutiv exprimiert. Der Fc γ RIII B ist über eine GPI-Struktur an der Oberfläche der Plasmamembran verankert und findet sich ausschließlich auf Granulozyten. Die

Sequenzhomologie der beiden Gene beträgt 97% für die kodierende Region (Ravetch und Perussia, 1989) und flankierende Region (Gessner, 1995). Rekonstitutionsstudien des Fc γ RIII in transgenen Mäusen haben gezeigt, dass bestimmte *cis*-Elemente für die NK-Zellen bzw. PMN Restriktion verantwortlich sind. Diese *cis*-Elemente sind in einem 5,8-Kilobasen-umfassenden Fragment der 5'-flankierenden Region und Anfangsbereiche der kodierenden Region beider Gene enthalten (Li et al., 1996).

In vitro Transfektionsanalysen haben gezeigt, dass die ersten 0,2 kb (von Position –198 bis –10 vom Transkriptionsstartpunkt +1 gezählt) der 5'-flankierenden Region der Fc γ RIII A- und der Fc γ RIII B-Gensequenzen, dem sogenannten Pprox-Promotor, im Kontext mit den jeweiligen Intron-Enhancerstrukturen die differenzielle Expression eines Luciferase-Reportergen in YT/NK-Zellen bzw. HL60/Granulozyten bewirkt. Der Pprox-Promotor (–198/–10) des IIIA-Gens ist im Vergleich zum IIIB-Gen durch zehn Basensubstitutionen gekennzeichnet. Diese Basensubstitutionen haben zur Folge, dass sich an acht dieser Stellen unterschiedliche, putative Konsensusbindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ergeben, die möglicherweise zur zellspezifischen Expression der Fc γ RIII A/B Rezeptorisoformen in ihren jeweiligen Zellen beitragen. Hybridpromotoren die mittels PCR mit überlappenden Sequenzabschnitten des Pprox des IIIA-Gens und des Pprox des IIIB-Gens generiert wurden, haben hier erste Hinweise gegeben, die diese These stützen (Gessner 1995b; und nicht gezeigte Daten).

Neben den im Pprox-Promotor (–198/–10) lokalisierten Transkriptionsinitiationsstellen wurden stromaufwärts weitere Startpunkte vor allem für Fc γ RIII A Gentranskripte in NK-Zellen definiert. Dies erfolgte durch zusätzliche alternative Promotoren, wie Studien mit den 5'-flankierenden Regionen bis zur Position –1821 (IIIA-Gen) bzw. –1817 (IIIB-Gen) in Reportergenassays belegen konnten. Insgesamt erscheint die NK-zellspezifische Expression des Fc γ RIII A abhängig von mehreren transkriptionsregulierenden Regionen zu sein, wie einem putativen Enhancer (–181/–1579), einem Suppressor (–1579/–1376), so wie von zwei weiteren Promotorelementen dem Pmed1 (–942/–850) und dem Pmed2 (–1376/–1123) (Gessner et al., 1996).

4.2 Pmed1 NK/T-Zellrestriktion

In den ersten eigenen Expressionsstudien konnte bestätigt werden, dass die Promotoren (Pmed1 und Pprox) des Fc γ RIIIA-Gens zellspezifische Luciferaseaktivität in NK-Zellen vermitteln und die Promotoren des Fc γ RIIIB-Gens nur in Granulozyten aktiv sind (siehe Abb. 4). Der Pprox-Promotor des Fc γ RIIIB-Gens dominierte in seiner Expressionsaktivität über den Pmed1-Promotor (-946/-846) des Fc γ RIIIB-Gens in HL60-Zellen, dabei war die Aktivität des Pmed1-B erst nach Behandlung mit 1,2% DMSO in zu Granulozyten ausdifferenzierten HL60-Zellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde eine wesentlich höhere Promotoraktivität des Pmed1-Promotors (-942/-850) gegenüber dem Pprox-Promotor des Fc γ RIIIA-Gens in NK-Zellen beobachtet.

Es war weiterhin von Bedeutung, ob sich diese Ergebnisse mit weiteren Zellen myeloiden und lymphoiden Ursprungs bestätigen ließen. Dabei war es wichtig Zelllinien zu wählen, die ein weites Spektrum an Zelltypen abdecken und andererseits sich mit Reporter-genkonstrukten transfizieren lassen. Es sollten eine weitere humane NK-Zelllinie CNK6, die humane γ/δ T-Zelllinie 1B3, die humane Jurkat T-Zelllinie, die humane B-Zelllinie Daudi, die humane myeloische Zelllinie THP-1, die humane promyeloische Zelllinie U937.1 und die murine monozytäre Zelllinie RAW264.7 eingesetzt werden. Als Transfektionsmethode wurde die Elektroporation gewählt. Die Transfektionsbedingungen wie Temperatur, Transfektionsvolumen, Zellzahl, Vektor-DNA-Menge, Gerätespannung und Kapazität mussten für jede einzelne Zelllinie empirisch erarbeitet werden. Der Vektor pLuc- α -Pro mit dem Luciferasegen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven α -Prothymosin-Promotors kam als Positivkontrolle zum Einsatz. Es konnten nach langen Versuchsreihen die optimalen Elektroporationsbedingungen für fast alle Zellen ermittelt werden (siehe Tab. 2 und Abb. 5). Nur für die NK-Zelllinie CNK6 und die γ/δ T-Zelllinie 1B3 war das Ergebnis nicht zufriedenstellend, so dass sie in den folgenden Expressionsstudien keine Verwendung fanden.

In den Zelllinien Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi wurden die Pprox- und Pmed1-Reporter-genkonstrukte des Fc γ RIIIA-Gens vergleichend zu den YT-Zellen getestet. Der Pprox-Promotor zeigte neben der NK/YT- und T-Zell/Jurkat-Aktivität auch Expressionsaktivität in den Makrophagenzelllinien U937.1 und RAW264.7. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass der Pprox-Promotor bei der Transkriptionsregulation des Fc γ RIIIA-Gens in Makrophagen beteiligt ist. Die Auswertung des Luciferaseassays mit

dem Pmed1-Promotorkonstrukt zeigte neben der Transkriptionsaktivität in NK/YT-Zellen auch Genexpression in Jurkat-T-Zellen, in den anderen getesteten Zellen wurde nur eine sehr geringe basale Aktivität gemessen. Im direkten Vergleich zu den NK/YT-Zellen war die Transkriptionrate in Jurkat-T-Zellen um 50% vermindert (siehe Abb. 6).

4.3 Einfluss der 21bp-Region des Pmed1

Dieses Ergebnis wurde als ein Indiz dafür gewertet, dass im Pmed1-Promotobereich ein NK/T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor binden kann. Dieser These sollte nachgegangen werden. Aus diesem Grund wurden die weiteren Untersuchungen auf den Pmed1-Promotor des FcγRIIIA-Gens fokussiert. Es wurden daher zwei weitere Pmed1-Konstrukte generiert, zum einen wurde der Pmed1-Promotor um ein 21bp-Fragment verkürzt (Pmed1Δ21bp) und zum anderen wurde dieses 21bp-Fragment in inverser Orientierung vor den auf 71bp verkürzten Promotor gesetzt (Pmed1inv.21). Die beiden Konstrukte wurden im Luciferaseassay in YT- und Jurkat-Zellen getestet (siehe Abb. 7). Die Verkürzung des Pmed1-Promotors um 21 Basenpaare hatte einen dramatischen Aktivitätsverlust im Luciferaseassay zur Folge sowohl in YT- als auch in Jurkat-Zellen. Weiterhin war auch durch das Einsetzen des 21bp-Fragments in umgekehrter Ausrichtung in den Promotor, keine Restauration der Promotoraktivität zu beobachten. Dies legte den Gedanken nahe, dass in der 5'-21bp-Region des Pmed1-Promotors möglicherweise ein NK/T-spezifischer Transaktivator binden kann, der in Kooperation mit weiteren Kernproteinen, die YT/Jurkat-spezifische Aktivität des FcγRIIIA Pmed1-Promotors bestimmt.

Die Computeranalyse des Pmed1-Promotors ergab nun für diesen distalen 21bp-Bereich des Promotors eine überlappende Sp1- und Ets-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle (siehe Abb. 7). Sp1 gehört als ubiquitärer Transkriptionsfaktor zu einer ständig wachsenden Familie von Transkriptionsfaktoren, die in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen die Genexpression aktivieren (Philipsen und Suske, 1999). Ets-Proteine sind hingegen zellspezifische Transkriptionsaktivatoren. Verschiedene Ets-Familienmitglieder sind beschrieben, die alle eine wichtige Rolle bei der zellspezifischen Genexpression spielen, so zum Beispiel bei der T-Zellrezeptor- und IL-2-Expression (Ho et al., 1990; Leiden, 1992). Ets-1 defiziente Mäuse sind u.a. dadurch gekennzeichnet, dass die Entwicklung von NK- und NKT-Zellen gestört ist (Baron et al., 1998; Walunas et al.,

2000). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich das Repertoire an Ets-Transkriptionsfaktoren wie z.B. Ets-1, Ets-2, Fli-1, Elf-1 während der Ausdifferenzierung von NK/T-Zellen ändert (Anderson et al., 1999). Das lässt vermuten, dass Ets-Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle in der Entwicklung von T-Zellen und NK-Zellen zu kommt und möglicherweise bei der Expressionsregulation des Fc γ RIII A-Gens in diesen Zellen wichtig sein könnte.

Die Arbeitsgruppe von C.C. Liu hat ein weiteres interessantes Sequenzmotiv bei der Analyse der 5'-flankierenden Region des Perforingens beschrieben. Das sogenannte NKE-Motiv umfasst 9 Basen Core-Sequenz (5'-ACAGGAAGT-3'). Im EMSA wurde die Sequenz als Probe eingesetzt und es zeigte sich eine Doppelbande von DNA-Protein-Komplexen, die als NF-P1 und NF-P2 bezeichnet wurden, es handelt sich dabei möglicherweise um Ets-verwandte Proteine (Koizumi et al., 1993). Perforin wird in NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und γ/δ T-Zellen exprimiert, zusammen mit anderen Effektormolekülen spielt es eine wichtige Rolle in der Lymphozyten vermittelten Zytotoxizität durch die Bildung von transmembranen Poren, die zur Lyse der Zielzelle führen. Die beschriebene Core-Sequenz des NKE-Motivs findet sich mit einem Basenaustausch im Pmed1-Promotor wieder. Somit waren die NF-P1 und NF-P2 Proteine ebenfalls potenzielle Kandidaten, die an der Expression des Fc γ RIII A-Gens beteiligt sein könnten.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden zunächst die entscheidenden Sequenzmotive charakterisiert und weiter eingegrenzt, die innerhalb des 5'-21bp-Region für die Bindung von Sp1, Ets, NF-P1 und NF-P2 essentiell sind. Zu diesem Zweck waren fünf Mutanten des Pmed1 generiert worden, mit einem Austausch von jeweils drei Basenpaaren innerhalb des 21bp-Fragments (Substitutionsmutanten). Es zeigte sich in Transkriptionsstudien in YT und Jurkat (siehe Abb. 8), dass die Veränderung der Basen in den Mutanten M2 (-936/-934), M3 (-933/-931) und M4 (-930/-928) zu einer fortschreitenden Verminderung der Transkriptionsrate führte. Die Mutation des Ets-Faktoren Core-Bindungsmotivs GGAA in Mutante M5 (-927/-925) hatte in Jurkat keinen Effekt, in YT-Zellen kam es zu einer 50%igen Reduktion der Transkriptionsaktivität im Vergleich zum Wildtyp WT, aber ebenso war in YT eine Zunahme der Aktivität mit der Mutante M5 im Vergleich zu Mutante M4 zu beobachten. Nach diesen Resultaten war es wenig wahrscheinlich, dass ausschließlich Ets oder Ets-verwandte Faktoren wie NF-P1/2 für die Genaktivierung des Fc γ RIII A Pmed1 verantwortlich sind.

Die anschließend generierten Deletionsmutanten zeigten, dass eine Verkürzung des Pmed1 um 6 Basenpaare (Pmed1 (-936/-850)) einen ähnlich geringfügigen Effekt auf die Effizienz des Promotors hatte wie die Substitutionsmutante M2 (-936/-934). Die zusätzliche Verkürzung des Promotors um weitere 4 Basenpaare (Pmed1 (-932/-850)) führte hingegen zu einer Verminderung der Gesamtpromotoraktivität um über 80% in YT und Jurkat (siehe Abb. 9). Dieses Ergebnis war vergleichbar mit den zuvor im Luciferaseassay erhobenen Daten der Substitutionsmutanten M3 (-933/-931) und M4 (-930/-928), in denen ebenfalls nur eine 20% Restaktivität in Bezug zum Pmed1-Wildtyp nachzuweisen war (vgl. Abb. 8 u. 9). Diese Daten verdeutlichten, dass vor allem der Sequenzbereich von Position -936 bis -928 (5'-CCTCCCACT-3') ein dominantes *cis*-aktives Element darstellt. An dieses Element muss ein Transkriptionsfaktor binden, der für die optimale Transkriptionsaktivität des Pmed1-Promotors in YT- und Jurkat-Zellen verantwortlich ist.

In den ersten Bandshift Experimenten wurde das radioaktiv markierte 21bp-Fragment des Pmed1 (WT) eingesetzt, mit Kernextrakten von YT-, Jurkat- und HL60-Zellen inkubiert und im Gel aufgetrennt (siehe Abb. 10 u. 11). Es zeigte sich eine dominante, hochmolekulare Bande. Diese Bande konnte einerseits durch den Zusatz der ‚kalten‘ Oligo-Mutanten des 21bp-Fragment M2, M3 und M4 als Kompetitoren nicht verdrängt werden, andererseits waren die gleichen, radioaktivmarkierten Oligo-Mutanten M2, M3 und M4 nicht in der Lage mit den Kernextrakten einen hochmolekularen DNA-Protein-Komplex zu bilden. Es war überraschend, dass die gleiche hochmolekulare Bande mit dem 21bp-Fragment des Pmed1 (WT) im Bandshiftassay mit HL60-Extrakt wie mit den NK(YT)- und T(Jurkat)-Extrakten zu detektieren war. Die Daten der Reporteranalysen hatten zu der Vermutung Anlass gegeben, dass sich in dem 21bp-Fragment des Pmed1 ein *cis*-aktives Element befindet, an das NK/T-Zell-spezifisches ein *trans*-aktives Element binden könnte. Diese These konnte in den Bandshift Experimenten nicht bestätigt werden. Auch weitere Mobility-Shift-Assays mit verschiedenen Zellen lymphoiden und myeloiden Ursprungs zeigten bei allen eingesetzten Extrakten ein vergleichbares Bild, eine hochmolekulare Bande, die spezifisch durch die Zugabe des ‚kalten‘ 21bp-Fragments des Pmed1 (WT) kompetitierbar war (siehe Abb. 12A u. 12B, vgl. Abb. 10 u. 11). Stellt man die Ergebnisse der Reporter- und Band-Shift-Analysen gegenüber, so muss man zu der Überlegung kommen, dass es sich bei dem 21bp-Fragment des Pmed1 auf der einen Seite um ein *cis*-Element handelt, ohne das die Genexpression des

Fc γ R11A nicht möglich ist. Und gleichzeitig um ein *cis*-Element in dem ein ubiquitärer Faktor bindet und dann in Kooperation mit weiteren Elementen zur zellspezifischen Fc γ R11A-Gen-Transkription führt.

Heterologe Promotorkonstrukte mit der 3'-21bp-Region des Pmed1 konnten darüber Aufschluss geben, ob der im EMSA dargestellte DNA-Protein-Komplex einen eher ubiquitären Transkriptionsfaktor enthält, der für die Promotoraktivität des Pmed1 verantwortlich ist. Die generierten TATA-Box- und TK-Promotorkonstrukte mit dem als dreifach Repeat vorgeschalteten 21bp-Fragment des Pmed1 zeigten eine generelle Aktivität in allen getesteten Zelllinien (siehe Abb. 14 u. 15). Alle Konstrukte der TATA-Box- und TK-Promotoren mit der 21bp-Fragment waren in der Lage in NK- und T-Zellen, sowie in Zellen myeloiden Ursprungs (HL60, THP-1, U937.1 und RAW264.7) Luciferase-Aktivität zu vermitteln.

Ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor ist unter anderem Sp1, für den die GA-Box im 21bp-Fragment eine mögliche Bindungsstelle darstellt. Die Bindung von Sp1 wurde in einem sogenannten ‚Supershift‘ gezeigt. Dabei wurde ein anti-Sp1-Antikörper eingesetzt, der an die DNA-Bindende-Domäne (DBD) des Transkriptionsfaktors Sp1 bindet und damit die Interaktion des Faktors mit der DNA verhindert (siehe Abb. 16A). Bei einem weiteren Bandshift, bei dem zuvor YT-Kernextrakte mit einer Sp1-Consensussequenz und parallel mit dem WT-Oligo (21bp-Fragment) als DNA-Sonde inkubiert wurden, zeigte sich in beiden Fällen die gleiche hochmolekulare Bande. Diese Bande war einerseits mit der Sp1-Consensussequenz und andererseits auch mit dem 21bp-Fragment kompetitierbar (siehe Abb. 16A u. 16B).

In dem anschließenden Experiment mit *Drosophila*-SL2-Zellen konnte die Funktionalität der Sp1-Bindung in der 3'-21bp-Region des Pmed1 eindeutig gezeigt werden. Die SL2-Zellen wurden mit den heterologen TK-Promotoren transient transfiziert, und wahlweise mit dem Sp1 kodierenden Vektor pPac-Sp1 cotransfiziert.

Mit Hilfe der Cotransfektion von *Drosophila*-SL2-Zellen mit Sp1 kodierenden Vektor pPac-Sp1 und einem zu untersuchendem Promotor-Reportergenkonstrukt konnte schon in anderen Arbeiten die Interaktion von Sp1 mit Promotorelementen von ubiquitär und zellspezifisch, exprimierten Genen aufgeklärt werden, da die SL2-Zellen kein funktionelles Sp1-Protein besitzen. So wurde die Rolle des Sp1 bei der Expression des humanen Alkohol-Dehydrogenase 5 (ADH5) Gens aufgeklärt, ADH5 wird ubiquitär, aber in unterschiedlichen Konzentrationen in den verschiedenen Zellen exprimiert (Kwon et al.,

1999). Desweiteren zeigte sich, dass Sp1 bei der Expression des Kaninchen Uteroglobulin Gen notwendig ist, das Uteroglobulin Gen ist in weiblichen Tieren während der Präimplantationsphase der Schwangerschaft in Epithelzellen des Endometiums transkriptionell aktiv (Scholz et al., 1998).

Durch die Cotransfektion der beiden 3x21bp-pTK-Luc-Konstrukte (3x21bp(-942/-921)-TK, inv.3x21bp(-942/-921)-TK) mit dem pPac-Sp1 konnte eine Induktion der Transkription in *Drosophila*-SL2-Zellen erreicht werden. Transkriptionsexperimente ohne die Cotransfektion des pPac-Sp1 zeigten keine nennenswerte Expression (siehe Abb.18). Dies war ein weiterer Beleg dafür, dass im 21bp-Promotorsegment des Pmed1 der Transkriptionsfaktor Sp1 bindet und die Expression moderiert.

4.4 Die 5'-71bp-Region vermittelt Zelltypspezifität

In den Transkriptionsstudien mit dem Pmed1-Gesamtpromotor war allerdings eine zelltypspezifische Expression zu beobachten. Damit blieb nur die 5'-71bp-Region des Pmed1, der eine 20% Restaktivität in den Luciferaseassays mit YT und Jurkat gezeigt hatte, als eine mögliche Bindungsstelle für einen zellspezifischen Transkriptionsfaktor. Für die Untersuchung dieses Promotorfragments wurden neue heterologe Promotorkonstrukte generiert. Dabei wurden wie schon zuvor auf die pTK-Luc und pTATA-Luc Vektoren zurückgegriffen. Diesmal wurde der FcγRIIIA-Pmed1 in seiner Gesamtheit und das 71bp-Fragment in diese Vektoren kloniert. Als weitere Kontrollplasmide neben den Ursprungsvektoren wurde ein dem 71bp-Fragment des IIIA-Gens vergleichbarer Sequenzbereich des IIIB-Gens ein 79bp-Fragment in die genannten Vektoren gesetzt. Die Vektorkonstrukte mit dem 79bp-Fragment des IIIB-Gens waren in Luciferaseassays in allen getesteten Zellen negativ. Transkriptionsaktivität zeigte sich für die Konstrukte mit dem Gesamtpromotor und dem 71bp-Fragment des Pmed1 des IIIA-Gens nur in YT und Jurkat, in den myeloiden Zelllinien U937.1 und RAW267.4 zeigten diese Konstrukte keine Aktivität (siehe Abb. 19 u. 20).

Aus den vorgelegten Daten kann geschlossen werden, dass die 5'-21bp-Region mit der Sp1-Bindungsstelle bei der Vermittlung der hohen gemessenen Transkriptionsrate die entscheidende Rolle spielt. Und weiterhin ein Sequenzbereich innerhalb der 3'-71bp-Region des Pmed1-Promotors für die Vermittlung der NK/T-Zell-spezifischen FcγRIIIA-Genexpression verantwortlich ist. Erst die Gesamtheit des Promotors und das

Zusammenspiel des in der GA-Box bindenden Sp1-Proteins mit einem oder mehreren Transkriptionsfaktor/en bzw. Cofaktor/en sorgen für die hohe Transkriptionsraten und die zellspezifische Expression in den NK/YT- und T/Jurkat-Zellen.

4.5 Sp1 und Genregulation

Der Pmed1-Promotor des FcγRIIIA-Gens enthält 3 Sp1-Bindungsstellen Sp1-I/II/III (siehe Abb. 21). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sp1-I-Bindungsstelle im 21bp-Fragment des Pmed1 eine wichtige Rolle für die hohe Transkriptionsaktivität des Promotors spielt (vgl. Abb. 7-9, 14, 15). Daneben zeigte sich, dass eine Mutation in der Sp1-III-Bindungsstelle ebenfalls zu einem Verlust der Expressionsaktivität des Promotors in NK/T-Zellen führt (siehe Abb. 22).

Das Sp1-Protein kann mit vielen Transkriptionsfaktoren interagieren (Philipsen und Suske, 1999; Clarke und Gordon, 1998). Sp1 spielt oft eine wichtige Rolle in Promotoren ohne TATA-Box oder *Inr*-Element. Sp1 kann hier mit den generellen Transkriptionsfaktoren (GTF) in Wechselwirkung treten, damit die Bindung des GTFs an den Promotor vermitteln und desweiteren die Gentranskription ermöglichen. Die Analyse des C4 (vierte Komponente des humanen Komplements) Gens zeigte, dass eine Sp1-*site*, die als TATA-Box fungiert, und eine E-box-*site*, wichtige Regionen für die basale Transkription sind. Durch Mutationsanalysen wurde ein weiter *upstream* gelegenes regulierendes, eine CACC-Box, beschrieben, in dieser Region binden Sp1 und Sp3 spezifisch und sind für die volle C4-Gen-Transkription verantwortlich (Ulgiati et al., 2000). Es konnte auch gezeigt werden dass Sp1 eine prominente Rolle bei der Lipopolysacchrid (LPS)-vermittelten Induktion der IL10 Genexpression in Makrophagen spielt (Brightbill et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsregulation ist die Histon-Acetylierung und Deacetylierung (Grunstein, 1997). Eine Arbeit, die sich mit dem Verständnis zwischen Histon-Acetylierung und Sp1-vermittelter Transkription beschäftigte, konnte zeigen das p300, ein Transkriptionsfaktor mit Acetyltransferase-Aktivität, notwendig ist für die Trichostatin A (TSA) induzierte, Sp1-vermittelte p21^{waf1/cip1}-Transkription (Xiao et al., 2000). Das p21-Gen fungiert als Zellzyklus-Blocker, es wurde zu erst kloniert und charakterisiert als ein wichtiger Effektor, der die Cyclin-abhängige Kinase-Aktivität inhibiert in der p53-vermittelter Zellzyklus-Arretierung, induziert durch geschädigte DNA (el-Deiry et al., 1993, Dulic et al., 1994). Sp1 führt in

bestimmten Zellen in Kooperation mit anderen Faktoren zu einer zelltypspezifischen Expression. So sind Mutationen in der Sp1-Bindungsstelle im LDL-Rezeptor-Gen und Collagen Typ I α 1-Gen mit einer Hypocholesterolanemie und Osteoporosis im Menschen assoziiert (Grant et al., 1996; Koivito et al., 1994; Sun et al., 1995). Diese Beispiele verdeutlichen, dass Sp1 zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren in Promotoren zellrestringierter Gene eine wichtige Rolle spielt.

Eine andere Möglichkeit, die Spezifität eines Transkriptionsfaktors zu generieren, ist durch die Proteinmodifikation die Interaktion mit der DNA oder anderen Faktoren zu regulieren. Sp1 kann phosphoryliert und glykosyliert werden (Clarke und Gordon, 1998). Weiterhin variiert der Expressionslevel von Sp1 in den unterschiedlichen Zelltypen (Philipsen und Suske, 1999). Ein Beispiel für die Abhängigkeit vom Expressionslevels eines Transkriptionsfaktors ist die Entwicklung und Differenzierung von Vorläuferzellen in Monozyten oder B-Zellen, dies wird durch die Menge von PU.1, ein myeloid- und B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, in den Vorläuferzellen in die eine oder andere Richtung beeinflusst (DeKoter und Singh, 2000). Als ein Beispiel für die Komplexität der Genregulation kann das Fc γ RI-Gen dienen. Für die basale Expression des Fc γ RI-Gens in myeloiden Zellen ist PU.1 verantwortlich. IFN γ induziert über den Jak/Stat-Pathway die Hochregulierung des Rezeptors, einen ebenfalls positiven Effekt auf die Expression des Rezeptors hat der Glukocorticoid-Rezeptor ohne direkt an den Promotor des Fc γ RI-Gens zu binden, hier wird ein Effekt auf die Expression von Jak oder Stat vermutet (Aittomäki et al., 2000). IL-10 ist ebenfalls in der Lage die Transkriptionsrate des Fc γ RI-Gens positiv auf Makrophagen zu beeinflussen, allerdings hat IL-10 auf die Expression des Rezeptors auf Neutrophilen keinen Einfluss (Bovolenta et al., 1998).

In der Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass das 71bp-3'-Fragment für die Vermittlung der Zellspezifität notwendig ist. Der Oktamer-Repeat im 71bp-3'-Fragment des Pmed1 könnte dabei für die Transkriptionsinitiation des Fc γ RIIIA-Gens wichtig sein. Die Oktamersequenz ist in dem vergleichbaren Sequenzbereich des Fc γ RIIIB-Gens als Tripletten enthalten. Dieses Tripletten kann dafür verantwortlich sein, dass der Pmed1 des Fc γ RIIIB-Gens in Granulozyten nur eine sehr geringe Aktivität und in NK/T-Zellen keine Aktivität zeigt. Ein Beleg für diese These können die Versuche mit den heterologen Promotorkonstrukten inv.79B-TK bzw. inv.79B-TATA und inv.71A-TK bzw. inv.71A-TATA sein (siehe Abb. 19 u. 20). Die Sequenz des A-Gens im heterologen Kontext war in

der Lage Transkriptionsaktivität zu vermitteln, die Sequenz des B-Gens war hierzu nicht fähig. Der Abstand zwischen den Sp1-Bindungsstellen kann dabei eine entscheidende Rolle spielen. Die richtige Positionierung der Sp1-*sites* könnte dafür verantwortlich sein, dass ein noch näher zu beschreibender Cofaktor an den Transkriptionskomplex aus Sp1 und GTFs rekrutiert wird und damit zur zellspezifischen Expression des FcγRIIIA-Gens in NK/T-Zellen führt (siehe Abb. 23).

Im Labor von R. Tjian wurde ein Cofaktor-Komplex, der mit Sp1 interagiert, charakterisiert (Ryu et al., 1999). Es handelt sich um den humanen Cofaktor-Komplex, CRSP (*Cofactor required for Sp1 activation*), der zusammen mit Sp1 und den GTFs zur transkriptionellen Genaktivierung führt. Der CRSP-Komplex ist aus 9 Untereinheiten zusammengesetzt. Die Klonierung dieser Untereinheiten haben teilweise Homologien zu bekannten Mediatoruntereinheiten offengelegt, wie CRSP33 zu Med7 (Myers et al., 1998), CRSP150 zu Rgr1 (Sun et al., 1995), CRSP200 zu TRIP2/PBP (Zhu et al., 1997), CRSP70 zu TFIIS (Sekimizu et al., 1986). Bei den weiteren 5 Untereinheiten des Komplexes handelt es sich um neue Proteine. Diese Arbeiten legen den Gedanken nahe, dass die Präsenz von allgemeinen Untereinheiten in einem bestimmten Cofaktor-Komplex, die während der Transkriptionsaktivierung arrangiert werden, zu einer spezifischen Genaktivierung führen. Damit besteht auch die Möglichkeit, dass die Transkription des FcγRIIIA-Gens mittels Pmed1 über Sp1 und der Interaktion mit einem noch zu definierenden Coaktivator reguliert wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Schlüsselwörter: NK-Zellen / Fc-Rezeptoren / Genregulation

Natürliche Killer (NK) Zellen spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität und der Bekämpfung von Tumoren. Ihre Aktivität wird reguliert durch die Balance von Signalen eines Rezeptorsystems, die einerseits das natürliche *Killing* aktivieren, andererseits inhibieren. Daneben führt die Aktivierung von NK-Zellen über die Fc-Rezeptoren für IgG (Fc γ R) zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC). Der wichtigste Fc γ R auf NK-Zellen ist die transmembran-verankerte Fc γ RIIIa Isoform. Die Fc γ RIIIa Expression auf NK-Zellen, Makrophagen und γ/δ T-Zellen wird kontrolliert durch alternative Promotoren (einschließlich Pprox, Pmed1) in der 5'-flankierenden Region des Fc γ RIIIa-Gens.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Pprox (-198/-10) Promotor die Expression des Fc γ RIIIa sowohl in NK/T-Zellen als auch in Makrophagen reguliert, der Pmed1 (-942/-850) Promotor hingegen vermittelt spezifische Aktivität im Luciferasereporter-Gen-Assay in den NK/T-Zell-Linien YT und Jurkat. Eine Deletion der ersten 21bp (-942/-921) des Pmed1 resultiert in einer starken Abnahme der Promotoraktivität in diesen NK/T-Zell-Linien. Dies lässt vermuten, dass ein NK/T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor mit dem 21bp-Fragment interagiert. Alternativ wäre denkbar, dass ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor beteiligt ist in Kooperation mit einem weiteren Faktor, der in dem Abschnitt von -921 bis -850 bindet, somit für die Expression des Fc γ RIIIa auf NK/T-Zellen verantwortlich ist. In weiteren Untersuchungen mit Substitutionsmutanten wurde beobachtet, dass ein Sp1-Erkennungssequenz, lokalisiert im 21bp-Fragment, benötigt wird. Sp1 defizienten SL2 *Drosophila* Zellen wurden mit dem pPac-Sp1 (Sp1 exprimierender Vektor) und einem Luciferasevektor unter der Kontrolle eines Promotors bestehend aus einem dreifach Repeat des 21bp-Fragments und dem TK-Promotor kotransfiziert. Damit konnte gezeigt werden, dass Sp1 notwendig ist für die Transkriptionsinitiation im Pmed1. Weiterhin zeigten Bandshift-Assays einen dominanten DNA-Protein-Komplex, der durch die Zugabe eines polyklonalen anti-Sp1 Antikörpers spezifisch unterdrückt wurde. Diese Ergebnisse sind ein Beleg dafür, dass die Interaktion von Sp1 mit dem 21bp-Fragment des Pmed1 notwendig ist für die volle Transkriptionsaktivität, aber nicht entscheidend für die NK/T-Spezifität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das inaktive -921/-850 Fragment, aber nicht die 3-fache 21bp-Sequenz, in der Lage ist NK/T-Zell-Spezifität in TATA-Box als auch in TK-Promotor/Luciferasegenkassetten Vektoren zu vermitteln. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Sp1 die Kooperation mit einem unbekanntem Transkriptionsfaktor benötigt, um die zelltypspezifische Expression des Fc γ RIIIa-Gens in NK/T-Zellen zu gewährleisten.

6. LITERATUR

Ahne,B. and Stratling,W.H. (1994). Characterization of a myeloid-specific enhancer of the chicken lysozyme gene. Major role for an Ets transcription factor-binding site. *J Biol Chem* 269, 17794-17801.

Aittomaki,S., Pesu,M., Groner,B., Janne,O.A., Palvimo,J.J., and Silvennoinen,O. (2000). Cooperation among Stat1, glucocorticoid receptor, and PU.1 in transcriptional activation of the high-affinity Fc gamma receptor I in monocytes. *J Immunol* 164, 5689-5697.

Allen,J.M. and Seed,B. (1989). Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* 243, 378-381.

Amigorena,S., Bonnerot,C., Drake,J.R., Choquet,D., Hunziker,W., Guillet,J.G., Webster,P., Sautes,C., Mellman,I., and Fridman,W.H. (1992). Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256, 1808-1812.

Aramburu,J., Azzoni,L., Rao,A., and Perussia,B. (1995). Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med* 182, 801-810.

Avalos,B.R. (1996). Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 88, 761-777.

Berk,A.J. (1999). Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol* 11, 330-335.

Binstadt,B.A., Brumbaugh,K.M., Dick,C.J., Scharenberg,A.M., Williams,B.L., Colonna,M., Lanier,L.L., Kinet,J.P., Abraham,R.T., and Leibson,P.J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* 5, 629-638.

Binstadt,B.A., Brumbaugh,K.M., and Leibson,P.J. (1997). Signal transduction by human NK cell MHC-recognizing receptors. *Immunol Rev* 155, 197-203.

Bonnefoy,J.Y., Lecoanet-Henchoz,S., Gauchat,J.F., Graber,P., Aubry,J.P., Jeannin,P., Plater-Zyberk,C. (1997). Structure and functions of CD23. *Int Rev Immunol* 16, 113-128.

Boros,P., Odin,J.A., Muryoi,T., Masur,S.K., Bona,C., and Unkeless,J.C. (1991). IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J Exp Med* 173, 1473-1482.

Bovolenta,C., Testolin,L., Benussi,L., Lievens,P.M., and Liboi,E. (1998). Positive selection of apoptosis-resistant cells correlates with activation of dominant-negative STAT5. *J Biol Chem* 273, 20779-20784.

Bovolenta,C., Gasperini,S., McDonald,P.P., and Cassatella,M.A. (1998). High affinity receptor for IgG (Fc gamma RI/CD64) gene and STAT protein binding to the IFN-gamma response region (GRR) are regulated differentially in human neutrophils and monocytes by IL-10. *J Immunol* 160, 911-919.

Braakman,E., van de Winkel,J.G., van Krimpen,B.A., Jansze,M., and Bolhuis,R.L. (1992). CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. *Cell Immunol* 143, 97-107.

Brightbill,H.D., Plevy,S.E., Modlin,R.L., and Smale,S.T. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol* 164, 1940-1951.

Brown,M.G., Scalzo,A.A., Matsumoto,K., and Yokoyama,W.M. (1997). The natural killer gene complex: a genetic basis for understanding natural killer cell function and innate immunity. *Immunol Rev* 155, 53-65.

- Burke,T.W. and Kadonaga,J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev* *11*, 3020-3031.
- Burley,S.K. and Roeder,R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev Biochem* *65*, 769-799.
- Burmeister,W.P., Huber,A.H., and Bjorkman,P.J. (1994). Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc [see comments]. *Nature* *372*, 379-383.
- Burshtyn,D.N., Scharenberg,A.M., Wagtmann,N., Rajagopalan,S., Berrada,K., Yi,T., Kinet,J.P., and Long,E.O. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* *4*, 77-85.
- Cambier,J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* *155*, 3281-3285.
- Cambier,J.C. and Johnson,S.A. (1995). Differential binding activity of ARH1/TAM motifs. *Immunol Lett* *44*, 77-80.
- Campbell,K.S. and Colonna,M. (1999). DAP12: a key accessory protein for relaying signals by natural killer cell receptors. *Int J Biochem Cell Biol* *31*, 631-636.
- Campbell,K.S., Dessing,M., Lopez-Botet,M., Cella,M., and Colonna,M. (1996). Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* *184*, 93-100.
- Carretero,M., Cantoni,C., Bellon,T., Bottino,C., Biassoni,R., Rodriguez,A., Perez-Villar,J.J., Moretta,L., Moretta,A., and Lopez-Botet,M. (1997). The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* *27*, 563-567.
- Chacko,G.W., Brandt,J.T., Coggeshall,K.M., and Anderson,C.L. (1996). Phosphoinositide 3-kinase and p72syk noncovalently associate with the low affinity Fc gamma receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. Reconstitution with synthetic phosphopeptides. *J Biol Chem* *271*, 10775-10781.
- Chen,H., Ray-Gallet,D., Zhang,P., Hetherington,C.J., Gonzalez,D.A., Zhang,D.E., Moreau-Gachelin,F., and Tenen,D.G. (1995). PU.1 (Spi-1) autoregulates its expression in myeloid cells. *Oncogene* *11*, 1549-1560.
- Chen,H.M., Pahl,H.L., Scheibe,R.J., Zhang,D.E., and Tenen,D.G. (1993). The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity. *J Biol Chem* *268*, 8230-8239.
- Chen,L.I., Nishinaka,T., Kwan,K., Kitabayashi,I., Yokoyama,K., Fu,Y.H., Grunwald,S., and Chiu,R. (1994). The retinoblastoma gene product RB stimulates Sp1-mediated transcription by liberating Sp1 from a negative regulator. *Mol Cell Biol* *14*, 4380-4389.
- Chiang,C.M. and Roeder,R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* *267*, 531-536.
- Choy,B., Roberts,S.G., Griffin,L.A., and Green,M.R. (1993). How eukaryotic transcription activators increase assembly of preinitiation complexes. *Cold Spring Harb. Symp Quant. Biol* *58*, 199-203.
- Clarke,S. and Gordon,S. (1998). Myeloid-specific gene expression. *J Leukoc Biol* *63*, 153-168.
- Clynes,R., Maizes,J.S., Guinamard,R., Ono,M., Takai,T., and Ravetch,J.V. (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* *189*, 179-185.

Coles,M.C., McMahon,C.W., Takizawa,H., and Raulet,D.H. (2000). Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-specific Ly49 receptors. *Eur J Immunol* 30, 236-244.

Collins,M., Rojnuckarin,P., Zhu,Y.H., and Bornstein,P. (1998). A far upstream, cell type-specific enhancer of the mouse thrombospondin 3 gene is located within intron 6 of the adjacent metaxin gene. *J Biol Chem* 273, 21816-21824.

Colonna,M., Navarro,F., Bellon,T., Llano,M., Garcia,P., Samaridis,J., Angman,L., Cella,M., and Lopez-Botet,M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells [see comments]. *J Exp Med* 186, 1809-1818.

Courey,A.J. and Tjian,R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55, 887-898.

Daeron,M. (1992). [The Fc portion of antibodies]. *Rev Prat.* 42, 204-211.

Darrow,A.L., Rickles,R.J., Pecorino,L.T., and Strickland,S. (1990). Transcription factor Sp1 is important for retinoic acid-induced expression of the tissue plasminogen activator gene during F9 teratocarcinoma cell differentiation. *Mol Cell Biol* 10, 5883-5893.

de Haas,M., Koene,H.R., Kleijer,M., de Vries,E., Simsek,S., van Tol,M.J., Roos,D., and de Borne,A.E. (1996). A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J Immunol* 156, 3948-3955.

DeKoter,R.P. and Singh,H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

de Vries,J.E. and Yssel,H. (1996). Modulation of the human IgE response. *Eur Respir J Suppl* 22, 58s-58s.

de Wet,J.R., Wood,K.V., DeLuca,M., Helinski,D.R., and Subramani,S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-737.

de Wit,T.P., Suijkerbuijk,R.F., Capel,P.J., van Kessel,A.G., and van de Winkel,J.G. (1993). Assignment of three human high-affinity Fc gamma receptor I genes to chromosome 1, band q21.1. *Immunogenetics* 38, 57-59.

Dennig,J., Hagen,G., Beato,M., and Suske,G. (1995). Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* 270, 12737-12744.

Diefenbach,A., Jamieson,A.M., Liu,S.D., Shastri,N., and Raulet,D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunology* 1, 119-126.

Dignam,J.D., Lebovitz,R.M., and Roeder,R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-1489.

Dombrowicz,D., Flamand,V., Miyajima,I., Ravetch,J.V., Galli,S.J., and Kinet,J.P. (1997). Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 99, 915-925.

Drapkin,R. and Reinberg,D. (1994). The multifunctional TFIID complex and transcriptional control. *Trends Biochem Sci* 19, 504-508.

Eichbaum,Q.G., Iyer,R., Raveh,D.P., Mathieu,C., and Ezekowitz,R.A. (1994). Restriction of interferon gamma responsiveness and basal expression of the myeloid human Fc gamma R1b gene is mediated by a functional PU.1 site and a transcription initiator consensus. *J Exp Med* 179, 1985-1996.

Eisenbeis,C.F., Singh,H., and Storb,U. (1995). Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* 9, 1377-1387.

Emili,A., Greenblatt,J., and Ingles,C.J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14, 1582-1593.

Ernst,L.K., van de Winkel,J.G., Chiu,I.M., and Anderson,C.L. (1992). Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 267, 15692-15700.

Exley,M., Varticovski,L., Peter,M., Sancho,J., and Terhorst,C. (1994). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 269, 15140-15146.

Fanger,N.A., Wardwell,K., Shen,L., Tedder,T.F., and Guyre,P.M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157, 541-548.

Farokhzad,O.C., Shelley,C.S., and Arnaout,M.A. (1996). Induction of the CD11b gene during activation of the monocytic cell line U937 requires a novel nuclear factor MS-2 [published erratum appears in *J Immunol* 1999 Jul 15;163(2):1091]. *J Immunol* 157, 5597-5605.

Feldman,G.M., Chuang,E.J., and Finbloom,D.S. (1995). IgG immune complexes inhibit IFN-gamma-induced transcription of the Fc gamma RI gene in human monocytes by preventing the tyrosine phosphorylation of the p91 (Stat1) transcription factor. *J Immunol* 154, 318-325.

Firzlaff,J.M., Luscher,B., and Eisenman,R.N. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5187-5191.

Fleming,S.B., Blok,J., Fraser,K.M., Mercer,A.A., and Robinson,A.J. (1993). Conservation of gene structure and arrangement between vaccinia virus and orf virus. *Virology* 195, 175-184.

Flores,O., Lu,H., and Reinberg,D. (1992). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Identification and characterization of factor IIIH. *J Biol Chem* 267, 2786-2793.

Gaubatz,S., Meichle,A., and Eilers,M. (1994). An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Mol Cell Biol* 14(6), 3853-3862.

Ge,H. and Roeder,R.G. (1994). Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78, 513-523.

George,T., Yu,Y.Y., Liu,J., Davenport,C., Lemieux,S., Stoneman,E., Mathew,P.A., Kumar,V., and Bennett,M. (1997). Allorecognition by murine natural killer cells: lysis of T-lymphoblasts and rejection of bone-marrow grafts. *Immunol Rev* 155, 29-40.

Gessner,J.E., Grussenmeyer,T., Dumbsky,M., and Schmidt,R.E. (1996). Separate promoters from proximal and medial control regions contribute to the natural killer cell-specific transcription of the human Fc gamma RIII-A (CD16-A) receptor gene. *J Biol Chem* 271, 30755-30764.

Gessner,J.E., Grussenmeyer,T., Kolanus,W., and Schmidt,R.E. (1995). The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and IIIB genes. Molecular characterization of the promoter regions. *J Biol Chem* 270, 1350-1361.

Gessner,J.E., Grussenmeyer,T. and Schmidt,R.E. (1995). Differentially regulated expression of human IgG Fc receptor class III genes. *Immunobiol* 193, 341-355.

Gessner,J.E., Heiken,H., Tamm,A., and Schmidt,R.E. (1998). The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 76, 231-248.

- Gill,G., Pascal,E., Tseng,Z.H., and Tjian,R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 192-196.
- Girard,M.T., Hjaltadottir,S., Fejes-Toth,A.N., and Guyre,P.M. (1987). Glucocorticoids enhance the gamma-interferon augmentation of human monocyte immunoglobulin G Fc receptor expression. *J Immunol* *138*, 3235-3241.
- Goodrich,J.A., Hoey,T., Thut,C.J., Admon,A., and Tjian,R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* *75*, 519-530.
- Grant,S.F., Reid,D.M., Blake,G., Herd,R., Fogelman,I., and Ralston,S.H. (1996). Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat. Genet* *14*, 203-205.
- Greenblatt,J. (1997). RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 310-319.
- Grunstein,M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* *389*, 349-352.
- Guarente,L. (1995). Transcriptional coactivators in yeast and beyond. *Trends Biochem Sci* *20*, 517-521.
- Hagemeier,C., Bannister,A.J., Cook,A., and Kouzarides,T. (1993). The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 1580-1584.
- Hagen,G., Muller,S., Beato,M., and Suske,G. (1994). Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* *13*, 3843-3851.
- Hallier,M., Lerga,A., Barnache,S., Tavitian,A., and Moreau-Gachelin,F. (1998). The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* *273*, 4838-4842.
- Hazenbos,W.L., Gessner,J.E., Hofhuis,F.M., Kuipers,H., Meyer,D., Heijnen,I.A., Schmidt,R.E., Sandor,M., Capel,P.J., Daeron,M., van de Winkel,J.G., and Verbeek,J.S. (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* *5*, 181-188.
- Hazenbos,W.L., Heijnen,I.A., Meyer,D., Hofhuis,F.M., Renardel de Lavalette,C.R., Schmidt,R.E., Capel,P.J., van de Winkel,J.G., Gessner,J.E., van den Berg,T.K., and Verbeek,J.S. (1998). Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol* *161*, 3026-3032.
- Hibbs,M.L., Selvaraj,P., Carpen,O., Springer,T.A., Kuster,H., Jouvin,M.H., and Kinet,J.P. (1989). Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16). *Science* *246*, 1608-1611.
- Hoey,T., Weinzierl,R.O., Gill,G., Chen,J.L., Dynlacht,B.D., and Tjian,R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* *72*, 247-260.
- Hoffmeyer,F., Witte,K., Gebhardt,U., and Schmidt,R.E. (1995). The low affinity Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIIb on polymorphonuclear neutrophils are differentially regulated by CD45 phosphatase. *J Immunol* *155*, 4016-4023.
- 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.
- Houchins,J.P., Lanier,L.L., Niemi,E.C., Phillips,J.H., and Ryan,J.C. (1997). Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. *J Immunol* *158*, 3603-3609.

- Höpken,U.E., Lu,B., Gerard,N.P., and Gerard,C. (1997). Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 186, 749-756.
- Hulett,M.D. and Hogarth,P.M. (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 57, 1-127.
- Hulett,M.D. and Hogarth,P.M. (1998). The second and third extracellular domains of FcγRI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* 35, 989-996.
- Hundt,M. and Schmidt,R.E. (1992). The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur J Immunol* 22, 811-816.
- Ihle,J.N. (1995). The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* 60, 1-35.
- Indik,Z.K., Park,J.G., Hunter,S., and Schreiber,A.D. (1995). Structure/function relationships of Fc gamma receptors in phagocytosis. *Semin. Immunol* 7, 45-54.
- Isakov,N., Wange,R.L., Burgess,W.H., Watts,J.D., Aebersold,R., and Samelson,L.E. (1995). ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 181, 375-380.
- Izui,S. (1994). Autoimmune hemolytic anemia. *Curr. Opin. Immunol* 6, 926-930.
- Jones,S.L. and Brown,E.J. (1996). FcγRII-mediated adhesion and phagocytosis induce L-plastin phosphorylation in human neutrophils. *J Biol Chem* 271, 14623-14630.
- Kerr,L.D., Ransone,L.J., Wamsley,P., Schmitt,M.J., Boyer,T.G., Zhou,Q., Berk,A.J., and Verma,I.M. (1993). Association between proto-oncogene Rel and TATA-binding protein mediates transcriptional activation by NF-κB. *Nature* 365, 412-419.
- Kim,J.L. and Burley,S.K. (1994). 1.9 Å resolution refined structure of TBP recognizing the minor groove of TATAAAAG. *Nat. Struct Biol* 1, 638-653.
- Kim,S.J., Onwuta,U.S., Lee,Y.I., Li,R., Botchan,M.R., and Robbins,P.D. (1992). The retinoblastoma gene product regulates Sp1-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 12, 2455-2463.
- Kim,T.K. and Roeder,R.G. (1994). Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4170-4174.
- Kistler,B., Pfisterer,P., and Wirth,T. (1995). Lymphoid- and myeloid-specific activity of the PU.1 promoter is determined by the combinatorial action of octamer and ets transcription factors. *Oncogene* 11, 1095-1106.
- 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 [see comments]. *Cell* 61, 113-124.
- Koene,H.R., Kleijer,M., Algra,J., Roos,D., de Borne,A.E., and de Haas,M. (1997). Fc γRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γRIIIa, independently of the Fc γRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109-1114.
- Koleske,A.J. and Young,R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators [see comments]. *Nature* 368, 466-469.
- Koleske,A.J. and Young,R.A. (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem Sci* 20, 113-116.

- Korten,S., Wilk,E., Gessner,J.E., Meyer,D., and Schmidt,R.E. (1999). Altered donor and recipient Ly49+ NK cell subsets in allogeneic H-2d -- > H-2b and H-2b --> H-2d bone marrow chimeras. *J Immunol* *163*, 5896-5905.
- Kurosaki,T., Gander,I., and Ravetch,J.V. (1991). A subunit common to an IgG Fc receptor and the T-cell receptor mediates assembly through different interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 3837-3841.
- Kurosaki,T., Gander,I., Wirthmueller,U., and Ravetch,J.V. (1992). The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J Exp Med* *175*, 447-451.
- Kurosaki,T. and Ravetch,J.V. (1989). A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII [published erratum appears in *Nature* 1990 Jan 25;343(6256):390]. *Nature* *342*, 805-807.
- Lanier,L.L. (1998a). Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* *452*, 13-18.
- Lanier,L.L. (1998b). Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. *Cell* *92*, 705-707.
- Lanier,L.L., Corliss,B., Wu,J., and Phillips,J.H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* *8*, 693-701.
- Lanier,L.L., Yu,G., and Phillips,J.H. (1989a). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* *342*, 803-805.
- Lanier,L.L., Cwirla,S., Yu,G., Testi,R., and Phillips,J.H. (1989b). Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. *Science* *246*, 1611-1613.
- Laurence,J., Saunders,A., Early,E., and Salmon,J.E. (1990). Human immunodeficiency virus infection of monocytes: relationship to Fc- gamma receptors and antibody-dependent viral enhancement. *Immunology* *70*, 338-343.
- Leibson,P.J. (1997). Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* *6*, 655-661.
- Li,M., Wirthmueller,U., and Ravetch,J.V. (1996). Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp Med* *183*, 1259-1263.
- Lin,S., Cicala,C., Scharenberg,A.M., and Kinet,J.P. (1996). The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. *Cell* *85*, 985-995.
- Liu,C.P., Ueda,R., She,J., Sancho,J., Wang,B., Weddell,G., Loring,J., Kurahara,C., Dudley,E.C., and Hayday,A. (1993). Abnormal T cell development in CD3-zeta-/- mutant mice and identification of a novel T cell population in the intestine. *EMBO J* *12*, 4863-4875.
- Lloberas,J., Soler,C., and Celada,A. (1999). The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today* *20*, 184-189.
- Long,E.O., Burshtyn,D.N., Clark,W.P., Peruzzi,M., Rajagopalan,S., Rojo,S., Wagtmann,N., and Winter,C.C. (1997). Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev* *155*, 135-144.
- Looney,R.J., Abraham,G.N., and Anderson,C.L. (1986). Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J Immunol* *136*, 1641-1647.
- Luckow,B. and Schutz,G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res* *15*, 5490.

- Mason,L.H., Anderson,S.K., Yokoyama,W.M., Smith,H.R., Winkler-Pickett,R., and Ortaldo,J.R. (1996). The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *J Exp Med* 184, 2119-2128.
- Masuda,M., Verhoeven,A.J., and Roos,D. (1993). Tyrosine phosphorylation of a gamma-chain homodimer associated with Fc gamma RIII (CD16) in cultured human monocytes. *J Immunol* 151, 6382-6388.
- Metes,D., Ernst,L.K., Chambers,W.H., Sulica,A., Herberman,R.B., and Morel,P.A. (1998). Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood* 91, 2369-2380.
- Meyer,V.E., and Young,R.A. (1998). RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem* 273, 27757-27760
- Morel,P.A., Ernst,L.K., and Metes,D. (1999). Functional CD32 molecules on human NK cells. *Leuk. Lymphoma* 35, 47-56.
- Myers,L.C., Gustafsson,C.M., Bushnell,D.A., Lui,M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Kornberg,R.D. (1998). The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 12, 45-54.
- Nagulapalli,S., Pongubala,J.M., and Atchison,M.L. (1995). Multiple proteins physically interact with PU.1. Transcriptional synergy with NF-IL6 beta (C/EBP delta, CRP3). *J Immunol* 155, 4330-4338.
- Nakamura,M.C., Niemi,E.C., Fisher,M.J., Shultz,L.D., Seaman,W.E., and Ryan,J.C. (1997). Mouse Ly-49A interrupts early signaling events in natural killer cell cytotoxicity and functionally associates with the SHP-1 tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 185, 673-684.
- Nerlov,C. and Ziff,E.B. (1995). CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *EMBO J* 14, 4318-4328.
- Nichols,J. and Nimer,S.D. (1992). Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood* 80, 2953-2963.
- Oettgen,H.C., Martin,T.R., Wynshaw-Boris,A., Deng,C., Drazen,J.M., and Leder,P. (1994). Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370, 367-370.
- Olcese,L., Lang,P., Vely,F., Cambiaggi,A., Marguet,D., Blery,M., Hippen,K.L., Biassoni,R., Moretta,A., Moretta,L., Cambier,J.C., and Vivier,E. (1996). Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 156, 4531-4534.
- Ono,M., Tucker,P.W., and Capra,J.D. (1996). Ku is a general inhibitor of DNA-protein complex formation and transcription. *Mol Immunol* 33, 787-796.
- Orkin,S.H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* 270, 4955-4958.
- Ossipow,V., Tassan,J.P., Nigg,E.A., and Schibler,U. (1995). A mammalian RNA polymerase II holoenzyme containing all components required for promoter-specific transcription initiation. *Cell* 83, 137-146.
- Pan,L.Y., Mendel,D.B., Zurlo,J., and Guyre,P.M. (1990). Regulation of the steady state level of Fc gamma RI mRNA by IFN-gamma and dexamethasone in human monocytes, neutrophils, and U-937 cells. *J Immunol* 145, 267-275.
- Pao,L.I. and Cambier,J.C. (1997). Syk, but not Lyn, recruitment to B cell antigen receptor and activation following stimulation of. *J Immunol* 158, 2663-2669.
- Park,J.G., Isaacs,R.E., Chien,P., and Schreiber,A.D. (1993). In the absence of other Fc receptors, Fc gamma RIIIA transmits a phagocytic signal that requires the cytoplasmic domain of its gamma subunit. *J Clin Invest* 92, 1967-1973.

- Park,S.Y., Arase,H., Wakizaka,K., Hirayama,N., Masaki,S., Sato,S., Ravetch,J.V., and Saito,T. (1995). Differential contribution of the FcR gamma chain to the surface expression of the T cell receptor among T cells localized in epithelia: analysis of FcR gamma-deficient mice. *Eur J Immunol* 25, 2107-2110.
- Pearse,R.N., Feinman,R., Shuai,K., Darnell,J.E., Jr., and Ravetch,J.V. (1993). Interferon gamma-induced transcription of the high-affinity Fc receptor for IgG requires assembly of a complex that includes the 91-kDa subunit of transcription factor ISGF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4314-4318.
- Pedersen-Bjergaard,J., Johansson,B., and Philip,P. (1994). Translocation (3;21)(q26;q22) in therapy-related myelodysplasia following drugs targeting DNA-topoisomerase II combined with alkylating agents, and in myeloproliferative disorders undergoing spontaneous leukemic transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 76, 50-55.
- Perez-Villar,J.J., Melero,I., Rodriguez,A., Carretero,M., Aramburu,J., Sivori,S., Orengo,A.M., Moretta,A., and Lopez-Botet,M. (1995). Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J Immunol* 154, 5779-5788.
- Perez,C., Wietzerbin,J., and Benech,P.D. (1993). Two cis-DNA elements involved in myeloid-cell-specific expression and gamma interferon (IFN-gamma) activation of the human high-affinity Fc gamma receptor gene: a novel IFN regulatory mechanism. *Mol Cell Biol* 13, 2182-2192.
- Perez,J.R., Li,Y., Stein,C.A., Majumder,S., van Oorschot,A., and Narayanan,R. (1994). Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5957-5961.
- Pongubala,J.M., Van Beveren,C., Nagulapalli,S., Klemsz,M.J., McKercher,S.R., Maki,R.A., and Atchison,M.L. (1993). Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science* 259, 1622-1625.
- Pugh,B.F. and Tjian,R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.
- Qiu,W.Q., de Bruin,D., Brownstein,B.H., Pearse,R., and Ravetch,J.V. (1990). Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* 248, 732-735.
- Ra,C., Jouvin,M.H., Blank,U., and Kinet,J.P. (1989). A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature* 341, 752-754.
- Rabbitts,T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149.
- Radeke,H.H., Gessner,J.E., Uciechowski,P., Magert,H.J., Schmidt,R.E., and Resch,K. (1994). Intrinsic human glomerular mesangial cells can express receptors for IgG complexes (hFc gamma RIIIA) and the associated Fc epsilon RI gamma-chain. *J Immunol* 153, 1281-1292.
- Ransone,L.J., Kerr,L.D., Schmitt,M.J., Wamsley,P., and Verma,I.M. (1993). The bZIP domains of Fos and Jun mediate a physical association with the TATA box-binding protein. *Gene Expr* 3, 37-48.
- Ravetch,J.V. and Perussia,B. (1989). Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 170, 481-497.
- Reddy,M.A., Yang,B.S., Yue,X., Barnett,C.J., Ross,I.L., Sweet,M.J., Hume,D.A., and Ostrowski,M.C. (1994). Opposing actions of c-ets/PU.1 and c-myb protooncogene products in regulating the macrophage-specific promoters of the human and mouse colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms) genes. *J Exp Med* 180, 2309-2319.

- Renard,V., Cambiaggi,A., Vely,F., Blery,M., Olcese,L., Olivero,S., Bouchet,M., and Vivier,E. (1997). Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev* 155, 205-221.
- Reya,T. and Grosschedl,R. (1998). Transcriptional regulation of B-cell differentiation [see comments]. *Curr. Opin. Immunol* 10, 158-165.
- Reyburn,H., Mandelboim,O., Vales-Gomez,M., Sheu,E.G., Pazmany,L., Davis,D.M., and Strominger,J.L. (1997). Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev* 155, 119-125.
- Reyburn,H.T., Mandelboim,O., Vales-Gomez,M., Davis,D.M., Pazmany,L., and Strominger,J.L. (1997a). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells [see comments]. *Nature* 386, 514-517.
- Roberts,S.G. and Green,M.R. (1994). Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature* 371, 717-720.
- Ryu,S., Zhou,S., Ladurner,A.G., and Tjian,R. (1999). The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 397, 446-450.
- Saffer,J.D., Jackson,S.P., and Annarella,M.B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 11, 2189-2199.
- Salmon,J.E., Edberg,J.C., and Kimberly,R.P. (1990). Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* 85, 1287-1295.
- Sanders,L.A., Feldman,R.G., Voorhorst-Ogink,M.M., de Haas,M., Rijkers,G.T., Capel,P.J., Zegers,B.J., and van de Winkel,J.G. (1995). Human immunoglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. *Infect Immun.* 63, 73-81.
- Sandor,M., Houlden,B., Bluestone,J., Hedrick,S.M., Weinstock,J., and Lynch,R.G. (1992). In vitro and in vivo activation of murine gamma/delta T cells induces the expression of IgA, IgM, and IgG Fc receptors. *J Immunol* 148, 2363-2369.
- Schindler,C. and Darnell,J.E.J. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.
- Schmidt, R. E., U. Budde, C. Bröschen-Zywietz, G. Schäfer, and C. Mueller-Eckhardt. (1984). High dose gammaglobulin therapy in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Clinical effects. *Blut* 48: 19-25
- Schmidt, R. E., U. Budde, G. Schäfer, and I. Stroehmann. 1981. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura [letter]. *Lancet* 2, 475-476
- Schubert, J., P. Uciechowski, P. Delany, H. J. Tischler, W. Kolanus, and R. E. Schmidt. 1990. The PIG-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood* 76, 1181-1187
- Shivdasani,R.A. and Orkin,S.H. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis [see comments]. *Blood* 87, 4025-4039.
- Simmons,D. and Seed,B. (1988). The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein [published erratum appears in *Nature* 1989 Aug 24;340(6235):662]. *Nature* 333, 568-570.
- Smith,L.T., Hohaus,S., Gonzalez,D.A., Dziennis,S.E., and Tenen,D.G. (1996). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood* 88, 1234-1247.
- Sondermann,P., Huber,R., Oosthuizen,V., and Jacob,U. (2000). The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 406, 267-273.

- Spits,H., Lanier,L.L., and Phillips,J.H. (1995). Development of human T and natural killer cells. *Blood* 85, 2654-2670.
- Stahls,A., Liwyszyc,G.E., Couture,C., Mustelin,T., and Andersson,L.C. (1994). Triggering of human natural killer cells through CD16 induces tyrosine phosphorylation of the p72syk kinase. *Eur J Immunol* 24, 2491-2496.
- Stöckl,J., Majdic,O., Pickl,W.F., Rosenkranz,A., Prager,E., Gschwantler,E., and Knapp,W. (1995). Granulocyte activation via a binding site near the C-terminal region of complement receptor type 3 alpha-chain (CD11b) potentially involved in intramembrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored Fc gamma RIIIB (CD16) molecules. *J Immunol* 154, 5452-5463.
- Stringer,K.F., Ingles,C.J., and Greenblatt,J. (1990). Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345, 783-786.
- Struhl,K. and Moqtaderi,Z. (1998). The TAFs in the HAT [comment]. *Cell* 94, 1-4.
- Sun,X.M., Neuwirth,C., Wade,D.P., Knight,B.L., and Soutar,A.K. (1995). A mutation (T-45C) in the promoter region of the low-density- lipoprotein (LDL)-receptor gene is associated with a mild clinical phenotype in a patient with heterozygous familial hypercholesterolaemia (FH). *Hum Mol Genet* 4, 2125-2129.
- Sylvestre,D.L. and Ravetch,J.V. (1994). Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* 265, 1095-1098.
- Tamm,A., Kister,A., Nolte,K.U., Gessner,J.E., and Schmidt,R.E. (1996). The IgG binding site of human Fc gamma RIIIB receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J Biol Chem* 271, 3659-3666.
- Tamm,A. and Schmidt,R.E. (1997). IgG binding sites on human Fc gamma receptors. *Int Rev Immunol* 16, 57-85.
- Thomas,R. and Lipsky,P.E. (1994). Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* 153, 4016-4028.
- Thompson,C.M., Koleske,A.J., Chao,D.M., and Young,R.A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73, 1361-1375.
- Ting,A.T., Karnitz,L.M., Schoon,R.A., Abraham,R.T., and Leibson,P.J. (1992). Fc gamma receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both phospholipase C (PLC)-gamma 1 and PLC-gamma 2 in natural killer cells. *J Exp Med* 176, 1751-1755.
- Tjian,R. and Maniatis,T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77, 5-8.
- Tomasello,E., Olcese,L., Vely,F., Geourgeon,C., Blery,M., Moqrich,A., Gautheret,D., Djabali,M., Mattei,M.G., and Vivier,E. (1998). Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem* 273, 34115-34119.
- Trinchieri,G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47, 187-376.
- Trotta,R., Kanakaraj,P., and Perussia,B. (1996). Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes. *J Exp Med* 184, 1027-1035.
- Truant,R., Xiao,H., Ingles,C.J., and Greenblatt,J. (1993). Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *J Biol Chem* 268, 2284-2287.

- Tsubata, T. (1999). Co-receptors on B lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* 11, 249-255.
- Uciechowski, P., J. E. Gessner, R. Schindler, and R. E. Schmidt. (1992). FcγRIII activation is different in CD16⁺ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Eur J Immunol* 22, 1635-1638
- Uciechowski, P., Schwarz, M., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Resch, K., and Radeke, H.H. (1998). IFN-γ induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol* 28, 2928-2935.
- Udvardi, A.J., Rogers, K.T., Higgins, P.D., Murata, Y., Martin, K.H., Humphrey, P.A., and Horowitz, J.M. (1993). Sp-1 binds promoter elements regulated by the RB protein and Sp-1-mediated transcription is stimulated by RB coexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3265-3269.
- Ugolini, S. and Vivier, E. (2000). Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 12, 295-300.
- Ulgiate, D., Subrata, L.S., and Abraham, L.J. (2000). The role of Sp family members, basic Kruppel-like factor, and E box factors in the basal and IFN-γ regulated expression of the human complement C4 promoter. *J Immunol* 164, 300-307.
- van de Winkel, J.G. and Capel, P.J. (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14, 215-221.
- van de Winkel, J.G., Ernst, L.K., Anderson, C.L., and Chiu, I.M. (1991). Gene organization of the human high affinity receptor for IgG, Fc γRI (CD64). Characterization and evidence for a second gene. *J Biol Chem* 266, 13449-13455.
- Vega, G.L. and Grundy, S.M. (1989). Estimation of turnover of low density lipoproteins by simplified methods. *Atherosclerosis* 76, 139-148.
- Vivier, E., da Silva, A.J., Ackerly, M., Levine, H., Rudd, C.E., and Anderson, P. (1993). Association of a 70-kDa tyrosine phosphoprotein with the CD16: zeta: γ complex expressed in human natural killer cells. *Eur J Immunol* 23, 1872-1876.
- Vivier, E. and Daeron, M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today* 18, 286-291.
- Wagtmann, N., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Malnati, M.S., Vitale, M., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., and Long, E.O. (1995). Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity* 2, 439-449.
- Werfel, T., Uciechowski, P., Tetteroo, P.A., Kurrle, R., Deicher, H., and Schmidt, R.E. (1989). Activation of cloned human natural killer cells via Fc γRIII. *J Immunol* 142, 1102-1106.
- Witte, T., F. M. Bode, M. Hammer, H. Deicher, and R. E. Schmidt. 1996. Autoantibody against a 58 kD molecule in a patient with neutropenia and NK cell deficiency. *Br J Haematol* 92, 565-570
- Witte, T., D. Schaumann, R. Hein, U. Helmchen, K. H. Neumann, K. M. Koch, H. Deicher, and R. E. Schmidt. 1993. [Cyclophosphamide bolus therapy in lupus nephritis]. *Dtsch Med Wochenschr* 118, 1005-1010
- Wu, J., Edberg, J.C., Redecha, P.B., Bansal, V., Guyre, P.M., Coleman, K., Salmon, J.E., and Kimberly, R.P. (1997). A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100, 1059-1070.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., and Ingles, C.J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-7024.

- Yokoyama,W.M. (1998). Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol* 10, 298-305.
- Young, N.S., and Maciejewski, P. (2000). Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: this little *PIG-A* goes „Why? Why? Why?“. *J Clin Invest* 106, 637-641.
- Yu,Y.Y., Kumar,V., and Bennett,M. (1992). Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annu. Rev Immunol* 10, 189-213.
- Zawel,L. and Reinberg,D. (1992). Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol* 4, 488-495.
- 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., Tan,S., Dziennis,S.E., Gonzalez,D.A., Chen,H.M., and Tenen,D.G. (1994b). Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14. *J Biol Chem* 269, 11425-11434.
- Zhang,D.E., Hetherington,C.J., Chen,H.M., and Tenen,D.G. (1994c). The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol* 14, 373-381.
- Zhang,D.E., Hohaus,S., Voso,M.T., Chen,H.M., Smith,L.T., Hetherington,C.J., and Tenen,D.G. (1996). Function of PU.1 (Spi-1), C/EBP, and AML1 in early myelopoiesis: regulation of multiple myeloid CSF receptor promoters. *Curr Top Microbiol Immunol* 211, 137-147.
- Zhu,Y., Qi,C., Jain,S., Rao,M.S., and Reddy,J.K. (1997). Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 272, 25500-25506.
- Zoller,K.E., MacNeil,I.A., and Brugge,J.S. (1997). Protein tyrosine kinases Syk and ZAP-70 display distinct requirements for Src family kinases in immune response receptor signal transduction. *J Immunol* 158, 1650-1659.
- Zwilling,S., Annweiler,A., and Wirth,T. (1994). The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucleic Acids Res* 22, 1655-1662.
- Xiao,H., Hasegawa,T., and Isobe,K. (2000). p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem* 275, 1371-1376.

7. ABKÜRZUNGEN

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
AHIA	Autoimmune hämatolytische Anämie
Amp	Ampicillin
Ak	Antikörper
AS	Aminisäure
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bideest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Fab	<i>fragment antigen binding</i> eines Antikörpers
Fc	<i>fragment crystallizable</i> eines Antikörpers
FCS	Fetales Kälberserum
FcγR	Fc-Rezeptor für IgG (Fc-Teil)
g	Gramm
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
h	Human
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>immuno receptor tyrosine activating motif</i>
ITIM	<i>immuno receptor tyrosine inhibitory motif</i>
KAR	<i>killer cell activation receptor</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIR	<i>killer cell inhibitory receptor</i>
KMT	Knochenmarktransplantation
KO	<i>knock out</i>
LB	Luria / Bertani (Medium)
Luc	Luciferase
μ	Mikro
M	Molar
mA	Milliamper

mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute(n)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	messenger-RNA
m	Murin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonident P-40
OD	Optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
Sp1	über <u>S</u> ephacryl und <u>P</u> hosphocellulose Säulen aufgereinigtes Protein
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ün	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WT	Wildtyp
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid
μ	Mikro
μ F	μ Farad

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der humanen IgG Fc-Rezeptor-Familie (<i>FcγR</i>).....	8
Abbildung 2: Die Sequenzen der Pprox-Promotorregion sind jeweils vom <i>FcγRIIA</i> und <i>FcγRIIB</i> Gen von Position -198 bis -10 dargestellt.....	52
Abbildung 3: Sequenzen des <i>Pmed1</i> -Promotors des <i>FcγRIIA</i> (-942/-850) und <i>FcγRIIB</i> (-946/-846).....	53
Abbildung 4: Vergleich der Expressionsaktivität der proximalen und medialen Promotorbereiche der <i>FcγRIIA</i> - und <i>FcγRIIB</i> -Gene in YT und HL60-Zellen.....	54
Abbildung 5: Die Zelllinien YT, Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi, wurden mit dem Vektor pLuc- α -Prothymosin (pLuc- α -Pro) unter den in Tabelle 1 aufgelisteten optimalen Bedingungen transfiziert und im Luciferase Assay ausgewertet.....	56
Abbildung 6: Luciferase Assay mit den Pprox und <i>Pmed1</i> -Reportergenkonstrukten in den Zelllinien YT, Jurkat, HL60, THP-1, U937.1, RAW264.7 und Daudi.....	57
Abbildung 7: Die Integrität der überlappenden Sp1/Ets Konsensussequenz der cis-aktiven 21 bp Region ist notwendig für die maximale <i>FcγRIIA</i> <i>Pmed1</i> Promotoraktivität.....	59
Abbildung 8: Substitutionsmutanten des <i>Pmed1</i> zeigen, dass die Integrität des proximalen 21bp-Fragments entscheidend ist für die maximale Promotoraktivität.....	61
Abbildung 9: Deletionsmutanten des <i>Pmed1</i> zeigen, dass schon eine Verkürzung des <i>Pmed1</i> -Promotors um neun Basenpaare zu einer deutlichen Reduktion der Promotor-Aktivität führt.....	62
Abbildung 10: Bandshift mit YT-Kernextrakten (KE) und dem 21bp-Fragment des <i>Pmed1</i> (WT).....	63
Abbildung 11: Proteinbindungsstudie mit dem 21bp-Promotorelement des <i>Pmed1</i> des <i>FcγRIIA</i> -Gens.....	65
Abbildung 12: Proteinbindung an das 21bp-Promotorfragment des <i>FcγRIIA</i> -Gens.....	66
Abbildung 13: Klonierung der Luciferasevektoren 3x21bp-pTK-Luc und inv.3x21bp-pTK-Luc.....	68
Abbildung 14: Luciferase Assay mit heterologen TATA-Box-Promotorkonstrukten.....	70
Abbildung 15: Luciferase Assay mit heterologen Thymidinkinase-(TK)-Promotor-Konstrukten.....	71
Abbildung 16: DNA-Bindung von Sp1 mit YT-Kernextrakten.....	73
Abbildung 17: SL2- <i>Drosophila</i> -Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie den Transkriptionsfaktor Sp1 nicht synthetisieren können. Erst durch die Transfektion eines Sp1 exprimierenden Vektors (pPac-Sp1) sind SL2-Zellen in der Lage Sp1 abhängige Gene zu exprimieren.....	75
Abbildung 18: Kotransfektion von pTK-Luc Vektorkonstrukten und dem Sp1-Expressionsvektor pPac-Sp1 in SL2 <i>Drosophila</i> Zellen.....	76
Abbildung 19: Zellspezifische Expression des <i>FcγRIIA</i> -Gens wird durch die 71bp-3'-Region des <i>Pmed1</i> -Promotors vermittelt.....	78
Abbildung 20: Luciferase Assay mit heterologen TK-Promotorkonstrukten.....	81
Abbildung 21: Überlappende Oligonukleotide des <i>Pmed1</i> des <i>FcγRIIA</i> -Gens zeigen die 3 Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1, sowie weitere DNA-Proteinkomplexe.....	83
Abbildung 22: Eine Mutation der Sp1-III Bindungsdomäne des <i>Pmed1</i> führt zu einer Aktivitätsminderung des Promotors in YT-Zellen.....	84
Abbildung 23: Hypothetisches Modell der zellspezifischen Transkription des <i>FcγRIIA</i> -Gens durch den <i>Pmed1</i> Promotor in NK/T-Zellen.....	85

Lebenslauf

Frank Heusohn

geboren am 27. April 1964 in Walsrode

verheiratet, drei Kinder

- 1972 bis 1974 Grundschule in Rethem an der Aller
- 1974 bis 1983 Gymnasium in Walsrode
- 1984 bis 1985 Zivildienst
- 1986 bis 1993 Studium der Biologie an der Universität Hannover
- 1993 Diplomarbeit über die GM-CSF induzierte Makrophagen
Differenzierung durch die Regulation des CSF-1 und CSF-1
Rezeptor Gens im Labor von Prof. Dr. M. Baccharini im Fraunhofer-
Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Hannover.
- 1996 bis 2000 Beschäftigung an der Medizinischen Hochschule Hannover in der
Abteilung Klinische Immunologie unter Leitung von Prof. Dr. R.E.
Schmidt in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. J.E. Gessner und Beginn
der Doktorarbeit.
- Seit 2000 Beschäftigt bei der Cassella-med GmbH, Köln.

Hannover, April 2001

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere:

PD Dr. J. Engelbert Gessner für die Betreuung der Arbeit und dem Team aus unserer Filiale, Britta, Julia, Nelli und Uli, für die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. R.E. Schmidt für die Überlassung des Themas.

Prof. Dr. W. Müller für die Übernahme des 1. Referates.

Prof. Dr. Bernhard Lüscher und Hanelore Burkhardt, dass es möglich war die Luciferase-Aktivitätsmessungen an ihrem Bioluminaten durchzuführen.

Allen Mitarbeitern, ehemaligen und jetzigen, der Abteilung Klinische Immunologie, besonders Claudia, Esther, Gabi, Ingo, Margot und Roland, für die nette Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft.

Gundi für ihre Hilfe bei der Planung und Durchführung der Experimente und manche interessante Diskussion.

Mein ganz besonderer Dank gilt Carsten und Iska, Georg und Helli, Lilli und Volker, Michael und Oliver.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie, Jutta, Frederik, Annika und Greta, und meinen Eltern bedanken, die mich jederzeit liebevoll unterstützt haben.

