

**Untersuchungen zur
Genregulation von eosinophil-chemotaktisch
wirkenden Chemokinen in Zellen der
menschlichen Haut**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Herbert Hein

Kiel 2003

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 9 |
| 1.1 | Haut | 9 |
| 1.2 | CC Chemokine und Chemokin-Rezeptoren | 12 |
| 1.3 | Eosinophilen-chemotaktisch wirkende CC Chemokine | 15 |
| 1.4 | Th1 und TH2 vermittelte Immunantwort | 18 |
| 1.5 | Der Jak/Stat Signaltransduktionsweg des aktivierten IL-4-Rezeptors | 20 |
| 1.6 | Ziel der Arbeit | 24 |
| 2 | Material und Methoden | 25 |
| 2.1 | Verwendete Chemikalien | 25 |
| 2.1.2 | Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien | 25 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen | 26 |
| 2.2 | Nährmedien | 28 |
| 2.2.1 | Oligonukleotide (Primer) | 28 |
| 2.3 | Zellkultur | 31 |
| 2.3.1 | Kultur von Kerationzyten | 31 |
| 2.3.2 | Kultur von Fibroblasten | 32 |
| 2.3.3 | Kultur von HaCaT-Zellen | 33 |
| 2.3.4 | Kultur von A549-Zellen | 33 |
| 2.3.5 | Stimulation der Zellen | 33 |
| 2.3.6 | Einfrieren und Auftauen adhärend wachsender Zellen | 34 |
| 2.3.7 | Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmiden | 35 |
| 2.3.8 | Lysieren von Zellen für eine Luciferasemessung | 35 |
| 2.3.9 | Überprüfung von Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen | 36 |
| 2.4 | Semi-quantitative RT-PCR | 37 |
| 2.4.1 | RNA-Isolierung | 37 |
| 2.4.2 | Reverse Transkription | 38 |
| 2.4.3 | Semiquantitative Multiplex-PCR | 39 |
| 2.5 | Klonierung von PCR-Produkten | 41 |
| 2.5.1 | Generieren von PCR-Produkten | 41 |
| 2.5.2 | Extraktion von DNA Banden | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.5.3 | Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase | 42 |
| 2.5.4 | Transfektion von Bakterien | 43 |
| 2.5.5 | Kolonie-PCR..... | 43 |
| 2.5.6 | Plasmidisolierung..... | 45 |
| 2.6 | Nukleinsäuresequenzierung | 45 |
| 2.6.1 | Zyklische Sequenzierung..... | 45 |
| 2.7 | Techniken zur Amplifikation von unbekanntem Nukleotidabschnitten..... | 47 |
| 2.7.1 | RACE-PCR..... | 47 |
| 2.7.2 | Amplifikation der Promoterregionen neuer eosinophil chemotaktischer Chemokine..... | 49 |
| 2.7.3 | Analyse der Promoterregion | 52 |
| 2.8 | Reporterassays..... | 52 |
| 2.8.1 | Luciferase-Expressionsvektoren..... | 52 |
| 2.8.2 | Klonierung von Promotorabschnitten..... | 53 |
| 2.8.3 | Sequenzspezifische Mutagenese mit Hilfe der PCR..... | 55 |
| 2.8.4 | Transiente Transfektion | 59 |
| 2.8.5 | Messung der Luciferaseaktivität | 59 |
| 2.9 | Nachweis von Transkriptionsfaktoren | 60 |
| 2.9.1 | Bindung von Doppelstrang-Oligonukleotiden an Magnetobeads | 60 |
| 2.9.2 | Zellkernextrakte | 62 |
| 2.9.3 | Isolierung von Transkriptionsfaktoren mit Magnetobeads..... | 62 |
| 2.9.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 63 |
| 2.9.5 | Nachweis von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen..... | 65 |
| 2.9.6 | Protein Grössenstandards | 67 |
| 3 | Ergebnisse..... | 68 |
| 3.1 | Isolierung und Charakterisierung des Eotaxin-1-Gens..... | 68 |
| 3.1.1 | Genomische Organisation des Eotaxin-1-Gens..... | 68 |
| 3.1.2 | Sequenz und Analyse des Eotaxin-1-Promoters | 69 |
| 3.2 | Isolierung und Charakterisierung des MCP-4 Gens..... | 71 |
| 3.2.1 | Genomische Organisation des MCP-4 Gens | 71 |
| 3.2.2 | Sequenz und Analyse des MCP-4 Promoters..... | 72 |
| 3.3 | mRNA-Expression von eosinophil chemotaktisch wirkenden Chemokinen in Zellen der Haut | 74 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.3.1 | Die Eotaxin-1 mRNA-Expression ist in Fibroblasten induzierbar. | 74 |
| 3.3.2 | Eotaxin-1 mRNA-Expression in humanen dermalen Fibroblasten | 75 |
| 3.3.3 | MCP-4 mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten | 76 |
| 3.3.4 | MCP-3 mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten | 77 |
| 3.3.5 | RANTES mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten..... | 78 |
| 3.3.6 | Eotaxin-3 mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten | 79 |
| 3.3.7 | Eotaxin-3 mRNA-Expression in Keratinozyten..... | 80 |
| 3.4 | Regulierung des Eotaxin-1-Promotors | 81 |
| 3.4.1 | Stat6 und NF κ B-p65 binden an den Eotaxin-1Promoter | 82 |
| 3.4.2 | Eotaxin-1Promoter-Reportergergen-Analysen | 83 |
| 3.4.3 | Interleukin-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promoter in A549-Zellen | 84 |
| 3.4.4 | IL-13 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1Promoter in A549-Zellen | 86 |
| 3.4.5 | IL-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promoter in primären dermalen Fibroblasten | 87 |
| 3.4.6 | Mutagenese der Konsensussequenzen..... | 87 |
| 3.4.7 | Mutagenese der Konsensussequenzen zerstört den Eotaxin-1-Promotor . | 88 |
| 3.5 | Regulierung des MCP-4-Promotors | 92 |
| 3.5.1 | Interferon- γ aktiviert den MCP-4-Promoter in A549-Zellen | 92 |
| 3.5.2 | IL-4 aktiviert den MCP-4-Promotor in A549-Zellen nicht..... | 93 |
| 4 | Diskussion | 94 |
| 4.1 | Expression eosinophilen-chemotaktischer CC Chemokine..... | 94 |
| 4.1.1 | Expression von Eotaxin-1 mRNA..... | 94 |
| 4.1.2 | Expression von Eotaxin 1 mRNA im Vergleich zur mRNA-Expression anderer eosinophil-chemotaktischer Chemokine | 96 |
| 4.1.3 | Expression von Eotaxin-3 mRNA..... | 96 |
| 4.1.4 | Vergleich der mRNA-Expression eosinophilen-chemotaktischer CC Chemokine in dermalen Fibroblasten | 99 |
| 4.1.5 | Gewebe und Zellspezifität der Expression eosinophilen-chemotaktischer CC Chemokine..... | 100 |
| 4.1.6 | Funktionsanalyse regulatorischer Genregionen..... | 102 |
| 4.2 | Eigenschaften des Eotaxin-1-Promoters..... | 102 |

| | | |
|---|---------------------------|-----|
| 5 | Zusammenfassung | 112 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 114 |
| | Lebenslauf..... | 126 |
| | Danksagung | 128 |
| | Erklärung | 129 |

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| α | alpha |
| Ak | <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper |
| APS | Amoniumperoxosulfat |
| aqua dest. | destilliertes Wasser |
| β | beta |
| Basophile | Basophile Granulozyten |
| bp | <u>B</u> asen <u>p</u> aare |
| BSA | „bovine serum albumin“ = Rinderserumalbumin |
| cDNA | mRNA <u>c</u> omplementary <u>D</u> NA = komplementäre DNA |
| DEPC | <u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat |
| DIG | <u>D</u> igoxigenin |
| DMEM | <u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edium |
| DMSO | <u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid |
| DNA | <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure |
| dNTP | <u>D</u> esoxy <u>n</u> ukleosid- <u>t</u> riphosphat |
| DTT | <u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>E</i> sch <u>e</u> rischia <i>c</i> oli |
| EDTA | <u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>e</u> ssigsäure |
| EGF | <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor = epidermaler Wachstumsfaktor |
| ELISA | „enzyme-linked immunosorbent assay“ = Enzymgebundener Immunoassay |
| Eosinophile | Eosinophile Granulozyten |
| et al. | <u>e</u> t <u>a</u> lii |
| EtBr | <u>E</u> thidiumbromid |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum = fetales Kälberserum |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| γ | gamma |
| GAPDH | <u>G</u> lycerinaldehyd-3- <u>p</u> hosphat- <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase |
| GAS | „gamma activated sequence“ = γ -Interferon activation site |
| GRE | „glucocorticoid response element“ |
| h | Stunden |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | <u>I</u> nter <u>l</u> eukin |
| Jak | Janus Kinase |
| κ | kappa |
| kbp | <u>K</u> ilobasenpaare |
| KBM | <u>K</u> eratinocyte <u>B</u> asal <u>M</u> edium |
| KGM | <u>K</u> eratinocyte <u>G</u> rowth <u>M</u> edium |
| kDa | <u>K</u> ilo- <u>D</u> alton (Molekularmasse) |
| MCP | „ <u>m</u> onocyte <u>c</u> hemoattractant <u>p</u> rotein“ |
| MIP | „ <u>m</u> acrophage inflammatory protein“ |
| M | <u>m</u> olar (mol/l) |
| min | <u>M</u> inute |
| N | Basen Adenin oder Cytosin oder Guanin oder Thymin |
| nm | <u>N</u> an <u>o</u> meter |
| Neutrophile | neutrophile Granulozyten |

| | |
|----------|---|
| NF | <u>n</u> uclear <u>f</u> actor |
| PAA | P <u>o</u> ly <u>a</u> crylamid |
| PBS | <u>p</u> hosphat <u>b</u> uffered <u>s</u> aline |
| PCR | <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction = Polymerase-Kettenreaktion |
| R | <u>R</u> ezeptor |
| RLA | Relative Luciferase Aktivität |
| RNA | <u>R</u> ibon <u>u</u> kleins <u>ä</u> ure |
| mRNA | <u>m</u> essenger <u>R</u> NA |
| rRNA | <u>r</u> ibosomale <u>R</u> NA |
| RT | <u>R</u> everse <u>T</u> ranskription |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | <u>S</u> odium (Natrium) - <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat |
| Stat | <u>S</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription = Signalvermittler und Aktivator von Transkription |
| TB | Terrific Broth |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| Tm | spezifische Schmelztemperatur |
| Tris | <u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | <u>u</u> nit, Einheit der Enzymaktivität |
| UV | <u>u</u> ltraviolett |
| V | <u>V</u> olt |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- <u>g</u> alactopyranosid |
| W | Watt |
| Y | Basen Cytosin oder Thymin |
| ∞ | unendlich |

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Diese den gesamten Organismus umschließende Hülle hat eine Gesamtfläche von 1,5-2 m², die von Körpergröße und Gewicht des einzelnen Individuums abhängt.

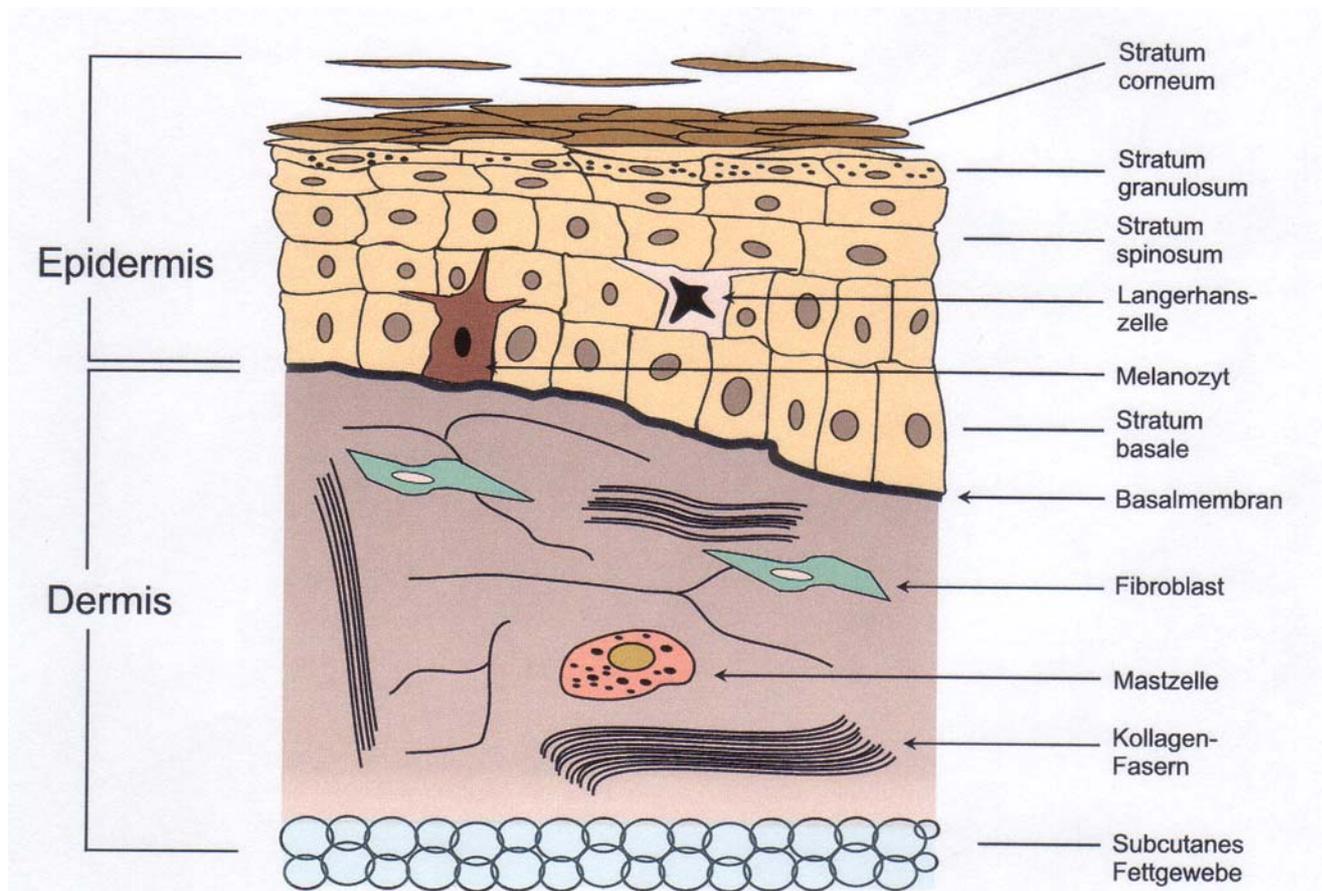


Abbildung 1.1 Die menschliche Haut.

Die Haut des Menschen wird in Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) unterteilt. Die Epidermis ist ein verhornendes Plattenepithel ektodermaler Abkunft, das zu 90% aus Keratinozyten besteht. Sie ist aus vier Zellschichten aufgebaut und enthält neben den Keratinozyten auch die symbiontischen Melanozyten und Langerhanszellen. Die Epidermis ist einem ständigen Erneuerungsprozess unterworfen. Die Keratinozyten stammen aus der Basalschicht. Mit Verlassen dieser Schicht beginnen die Zellen irreversibel mit der terminalen Differenzierung. Die Zellen des Stratum spinosum sind größer und stoffwechselaktiver, verlieren dann im Stratum granulosum ihre Organellen und sterben ab. Die Dermis ist eine vorwiegend aus Kollagenfasern bestehende Bindegewebsschicht. Der vorherrschende Zelltyp ist der Fibroblast. Fibroblasten sind spindelförmige Zellen mit langen Fortsätzen, die die Fasern und die Matrix der Dermis synthetisieren.

Die Haut dient der Kommunikation mit der Umgebung, steht im engen Kontakt mit dem Immunsystem und dient dem Schutz vor physikalischen, chemischen und biologischen Schädigungen. Sie ist an wichtigen Prozessen wie zum Beispiel der Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes, der Thermoregulation, der Aufnahme von Sauerstoff und der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten beteiligt.

Histologisch betrachtet unterteilt sich die Haut in Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut), die durch die Basallamina voneinander getrennt werden und die dritte und tiefste Schicht, die Subkutis. Sie besteht hauptsächlich aus Fettgewebe in variabler Menge. Die Haut differenziert sich aus dem äußeren (Ektoderm) und dem mittleren Keimblatt (Mesoderm). Dabei entwickeln sich die epithelialen Strukturen der Haut (Epidermis, Haare und Nägel) vorwiegend aus dem Ektoderm. Aus dem Mesoderm entwickelt sich die Dermis mit den Gefäßen.

Die Epidermis ist histologisch betrachtet ein 4-schichtiges verhorntes Plattenepithel. Die unterste Schicht ist das Stratum basale. Diese Schicht ist aus proliferierenden Keratinozyten mit eingestreuten Langerhans-Zellen und den pigmentbildenden Melanozyten aufgebaut. Darüber befindet sich das vielschichtige Stratum spinosum (Stachelzellenschicht), in dem die Keratinozyten größer und polygonal werden. Diese Keratinozyten befinden sich bereits in der terminalen Differenzierung und zeichnen sich durch eine erhöhte Stoffwechselaktivität aus. Untereinander sind diese Zellen durch stachelartige Interzellularbrücken verbunden, die als Desmosomen bezeichnet werden.

Das Stratum granulosum (Körnerschicht) mit seinen Körnerzellen bildet eine bis mehrere Schichten aus. Merkmale dieser Zellen sind die Keratohyalingranula, dichte Makrofibrillen aus Keratinbündeln, eine reduzierte metabolische Aktivität und den Verlust der Organellen aus.

Im Stratum corneum (Hornschicht), der äußersten Schicht der Epidermis, befinden sich 10-20 Zellschichten fest kohärenter, plättchenartiger kernloser hexagonaler Korneozyten, die aus einer amorphen Proteinmatrix, umhüllt von einem starren „cornified Envelope“ bestehen. Die Hornzellen sind die Zellen des Körpers mit dem größten Durchmesser (ca. 30 µm). Da das Stratum corneum kontinuierlich durch die Proliferation der basalen Keratinozyten gebildet wird, kann dessen Dicke nur durch stetiges Abschuppen an der Hautoberfläche konstant gehalten werden.

Die Epidermis ist ein Proliferationsgewebe, unterliegt also einer dauerhaften Erneuerung. Unter gesetzmäßiger Veränderung ihrer Struktur durchwandern die

Keratinocyten die suprabasalen Schichten bis zum Stratum corneum. Dieser Vorgang wird als terminale Differenzierung bezeichnet.

Die Dermis ist das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe, das sich in der Tiefe bis zum subkutanen Fettgewebe erstreckt. Es handelt sich um ein fibroelastisches Gewebe von hoher Reißfestigkeit und ist der Träger der die Haut versorgenden Nerven und Gefäße. Ihre Hauptkomponenten sind Fibroblasten, Mastzellen und andere Gewebezellen, die in eine gelartige Grundsubstanz aus Proteoglykanen eingebettet sind. Für die Summe aller extrazellulären, fibrillären Strukturen und löslicher Substanzen wird der Begriff „extrazelluläre Matrix“ verwendet.

Die dominierenden Zellen der Dermis sind die kollagensezernierenden Fibroblasten, deren inaktive Form nach Beendigung der Kollagensynthese Fibrozyt genannt wird. Fibroblasten sind spindelförmige Zellen mit langen Zellfortsätzen, die ein Netzwerk bilden. Diese wenig spezialisierten Bindegewebszellen, die überall im Körper in Bindegeweben vorkommen, besitzen ein ausgeprägtes endoplasmatisches Reticulum und einen gut entwickelten Golgiapparat, was für eine hohe Syntheseaktivität dieser Zellen spricht. Nach vollständiger Differenzierung können aus den wenig spezialisierten Fibroblasten Fettzellen, glatte Muskelzellen, Chondrozyten u.a. entstehen. Ihre solitäre Lebensweise und ihr geringer Differenzierungsgrad sind wahrscheinlich ein Grund dafür, dass sie sich relativ einfach in Kultur halten lassen. Recht zahlreich in der Dermis sind auch die Histiozyten (Makrophagen). Ihre Vorläufer, die Monozyten wandern vom Knochenmark über die Blutbahn in das Gewebe ein und differenzieren am Ende in der Dermis. Sie phagozytieren abgestorbene Zellen, speichern Antigene, produzieren Interferone und nehmen an immunologischen Reaktionen teil.

Mastzellen sind Effektorzellen, die ubiquitär in der Dermis vorkommen. Sie sind immobil, langlebig und im Verhältnis zu anderen Zellen sehr groß. Sie besitzen hochaffine IgE-Rezeptoren an der Zellmembran. Die Mastzellen produzieren ein breites Spektrum von Mediatoren, mit denen sie allergische und entzündliche Reaktionen vermitteln können.

1.2 CC-Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

Die Pathogenese von Entzündungsreaktionen ist ein sehr komplexes Geschehen, bei dem eine Vielzahl von Mediatoren eine Rolle spielen. Zytokine bilden eine Gruppe biologisch hoch aktiver Glycoproteine, die Wachstum, Funktion und Differenzierung von Immunzellen, aber auch anderer Zellen wie Fibroblasten und Keratinozyten modulieren können (Braun-Falco, 1996). Diese chemischen Mediatoren sind bereits in nano- bis picomolaren Konzentrationen wirksam. Daher ist ihre Konzentration in der Zelle auch nicht sehr hoch (10-10.000 Moleküle pro Zelle). Sie regulieren die Stärke und Dauer der Immunantwort, indem sie Einfluss auf das Überleben, die Proliferation, Reifung, Form, Phagozytose-Aktivität und Differenzierung von Zellen sowie auf die Syntheserate biologisch aktiver Moleküle nehmen. Ihre Bindung an die Zielzellen erfolgt über spezifische Rezeptoren. Durch die Einflussnahme auf die DNA, RNA und Proteinbiosynthese wird das Verhalten der Zelle verändert. Zytokine wirken unterschiedlich auf verschiedene Zellen und zeigen pleiotrophe Effekte. Viele Zytokine wirken gleichzeitig auf gemeinsame Zielzellen, entweder synergistisch oder antagonistisch, oder regulieren die Synthese und Freisetzung anderer Zytokine. Zu den Zytokinen zählen die von Lymphozyten gebildeten Lymphokine, die von Monozyten produzierten Monokine, die Interleukine (IL-1 bis IL18), die Interferone (IFN- α , - β , - γ) und die „colony stimulating factors“ (CSF).

Eine besondere Untergruppe der Zytokine sind die Chemokine (Chemoattractant cytokines). Auf dem International Symposium on Chemotactic Cytokines (1992) einigte man sich, diese Gruppe „Chemokine“ zu nennen, um damit die beiden Eigenschaften **chemotaktisch** wirkender **Zytokine** zu kombinieren. Definiert wird diese Untergruppe der Zytokine durch strukturelle Homologien ihrer Mitglieder. Alle Chemokine zeigen in vitro neben anderen für Zytokine typischen Eigenschaften die Fähigkeit zur Chemotaxis auf eine oder mehrere Arten von Blutzellen. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Chemokine nach intradermaler Applikation die Bildung von zellulären Entzündungsinfiltraten hervorrufen können (Meurer et al., 1993). Die Produktion und Sekretion von Chemokinen kann durch proinflammatorische Faktoren wie z.B. Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder Interleukin 1 (IL-1) induziert werden (Murphy, 1994).

Bei den Chemokinen handelt sich um basische Heparin-bindende Proteine mit einer Länge von 70-80 Aminosäuren und einem Molekulargewicht zwischen 7 und 16 kDa.

Sie werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems produziert und können über die Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten die Migration von Zellen des Immunsystems auslösen und kontrollieren. Alle CC- und CXC-Chemokine besitzen vier hoch konservierte Cysteinreste, über die zwei Disulfidbrücken gebildet werden, wodurch das Protein eine hohe Stabilität erhält.



Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines CC-Chemokins.

Die Abbildung zeigt die Verteilung von 4 konservierten Cysteinresten und die Ausbildung der Disulfidbrücken am Beispiel eines CC-Chemokins. Dabei steht C in der Abbildung für Cystein und X für eine beliebige Anzahl anderer Aminosäuren.

Aufgrund von Sequenzhomologien und der Sequenz in der Umgebung der ersten beiden Cysteine werden die Chemokine in vier Untergruppen unterteilt.

Bei den CXC-Chemokinen sind die ersten beiden N-terminalen Cysteine durch eine nicht konservierte Aminosäure voneinander getrennt. Alle Gene dieser Unterfamilie der Chemokine sind auf Chromosom 4 lokalisiert. Diese Chemokine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Lymphozyten (Baggiolini and Clarklewis, 1992). Mitglieder der CXC-Familie sind z.B. IL-8, „growth-related oncogene“ (Gro), „platelet factor-4“ (PF-4) und „interferon gamma inducible Protein-10“ (IP-10).

Die Gruppe der CC-Chemokine ist durch die direkte Nachbarschaft der ersten beiden Cysteine gekennzeichnet. Die meisten Gene dieser Chemokin-Unterfamilie sind auf Chromosom 17 lokalisiert. Einige vor kurzer Zeit entdeckte CC-Chemokine (Eotaxin-1,-2,-3) finden sich auf Chromosom 7. CC-Chemokine wirken chemotaktisch auf Monozyten (Schall, 1991), Lymphozyten (Bischoff et al., 1992), eosinophile und basophile Granulozyten (Alam et al., 1994). Im Gegensatz zu CXC-Chemokinen wirken sie nicht auf neutrophile Granulozyten. Zu der CC-Familie zählen unter anderem „monocyte chemotactic protein-1 bis 4“ (MCP-1 bis 4), „macrophage inflammatory protein-1“ (MIP-1), die Eotaxine 1 bis 3 und „regulated on activation normal T-Cell expressed and secreted“ (RANTES).

| Gensymbol | Gename | Alte Bezeichnung |
|----------------|--------|-------------------------|
| <u>SCYA 5</u> | CCL5 | RANTES, CCL5 |
| <u>SCYA 7</u> | CCL7 | MCP-3, NC28, FIC, MARC |
| <u>SCYA 11</u> | CCL8 | Eotaxin-1 |
| <u>SCYA 13</u> | CCL13 | MCP-4, NCC-1, CKb10 |
| <u>SCYA 24</u> | CCL24 | Eotaxin-2, MPIF-2, CKb6 |
| <u>SCYA 25</u> | CCL26 | Eotaxin-3 |

Tabelle 1.1 Nomenklatur der Eosinophil-chemotaktisch wirkenden CC-Chemokine (Zlotnik and Yoshie, 2000)

Die C-Chemokine, von denen bislang nur zwei Vertreter, das Lymphotaktin CL-1 und CL-2 bekannt sind (Kelner et al., 1994), sind durch nur ein einzelnes Cystein im N-terminalen Bereich des Proteins gekennzeichnet und auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Sie wirken chemotaktisch auf CD8⁺-exprimierende Lymphozyten.

Die CX₃C-Chemokine bilden die vierte Gruppe der Chemokine, denen bis heute nur das Fractalkin zugeordnet werden konnte (Bazan et al., 1997). Bei diesem Chemokin sind die ersten beiden N-terminalen Cysteine durch drei nicht konservierte Aminosäuren voneinander getrennt. Fractalkin unterscheidet sich in mehreren Eigenschaften von den übrigen Chemokinen. Mit 397 Aminosäuren ist es viel größer als die anderen Chemokine und besitzt einen Transmembran-Anker.

Die Leukozyten erkennen die Chemokine durch Rezeptoren, von denen bis heute 16 verschiedene bekannt sind. Die Chemokin-Rezeptoren stellen eine Unterfamilie der 7 Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar. Der C-Terminus dieser Rezeptoren ragt ins Zytoplasma hinein, wohingegen sich der N-terminale Teil im extrazellulären Raum befindet und dort für die Bindung der Chemokine verantwortlich ist. Die intrazellulären Loops und der C-Terminus sind wichtig für die Signalübertragung.

| Klasse von Chemokinen | Chemokine | Rezeptoren | Bemerkungen |
|-----------------------|---------------------------------------|------------|-----------------|
| CXC | IL-8 | CXCR1 | |
| | IL-8, NAP-2, u.a. | CXCR2 | |
| | IP-10, Mig | CXCR3 | |
| | SDF-1 | CXCR4 | HIV KO-Rezeptor |
| CC | RANTES, MIP-1 α , MCP-2, MCP-3 | CCR1 | |
| | MCP-1 bis 4, Eotaxin-1, RANTES | CCR2 | |
| | MCP-1, MCP-4 | CCR3 | |

Tabelle 1.2 Chemokine und Chemokin-Rezeptoren

Die Chemokin-Rezeptoren werden aufgrund ihrer Bindungseigenschaften in CXCR- und CCR-Rezeptoren unterteilt. Gewisse Rezeptoren binden nur einzelne Chemokine, andere hingegen mehrere. Entsprechend weisen die Chemokine unterschiedliche Selektivitäten für die verschiedenen Rezeptoren auf.

Alle Rezeptoren sind das Produkt jeweils eines einzelnen Gens und redundant an G-Proteine gekoppelt.

1.3 Eosinophil-chemotaktisch wirkende CC-Chemokine

Untersucht man die betroffene Haut von Patienten, die an atopischer Dermatitis leiden, findet man als Charakteristikum oft Überreste degranulierter eosinophiler Granulozyten und manchmal sogar noch intakte eosinophile Granulozyten in der Dermis. Ähnliches gilt auch für von allergischen Reaktionen und parasitären Infektionen betroffene Haut. Die Funktion der Eosinophilen bei diesen Hauterkrankungen ist bis zum heutigen Tage nur unvollständig verstanden. Die Degranulation von Eosinophilen kann zu einer schweren Gewebeschädigung führen und spielt daher eine wichtige Rolle im entzündlichen Geschehen dieser Hauterkrankungen.

Eosinophile Granulozyten (Eos) sind polymorphkernige Granulozyten, die unter „gesunden“ Bedingungen nur etwa 2,5-3% der im Blut befindlichen Leukozyten ausmachen. Eos werden vom Knochenmark unter dem Einfluss der Zytokine IL-5, IL-3 und GM-CSF gebildet. Es handelt sich um vollständig differenzierte Zellen, die man beim Menschen hauptsächlich in Geweben findet, die in Kontakt zur Außenwelt

stehen, wie z.B. Haut, Gastrointestinaltrakt und respiratorischer Trakt (Behm and Ovington, 2000). Es wird vermutet, dass die Eos neben der Abwehr von Mikroorganismen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Wurminfektionen spielen (Rankin et al., 1990). Neben dieser primären Funktion wird vermutet, dass sie mit zur Wundheilung beitragen und als Antigen präsentierende Zellen agieren (Behm and Ovington, 2000).

Typisch für diese Zellen sind Vesikel mit kristallinen Bereichen, die zum Teil dem endosomal/lysosomalen System angehören oder Exocytosevesikel darstellen. Diese Vesikel enthalten mehrere toxische Proteine wie z.B. das major basic protein (MBP) oder das eosinophile kationische Protein, das gegen Mikroorganismen oder größere Parasiten eingesetzt wird. Das MBP dient der Abwehr von Würmern, in deren Oberfläche es sich einlagert. Diese nicht endocytierbaren Parasiten werden von den Eosinophilen regelrecht belagert, besonders wenn Antikörper an deren Oberfläche gebunden haben. An die Parasiten geheftet schütten sie die Inhalte ihrer Vesikel aus, um sie abzutöten. Weiterhin sind diese Granulozyten in der Lage, nach Aktivierung Zytokine und weitere Botenstoffe zu produzieren.

Während man unter normalen Bedingungen nur eine geringe Anzahl von Eos im Blut und im Gewebe anfindet, können Eos im akuten Fall einer Entzündung in praktisch jedem Gewebe selektiv angereichert vorgefunden werden. Als chemotaktische Mitverursacher dieser Infiltration kommen eosinophil spezifische Chemokine in Betracht, zu denen Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, MCP-2, MCP-3, MCP-4 und RANTES zählen.

Das CC-Chemokin RANTES (CCL 5) war das erste entdeckte Chemokin, das eine chemotaktische Wirkung auf Eosinophile zeigte (Kameyoshi et al., 1994). RANTES wird außer von T-Lymphozyten und von Thrombin aktivierten Blutplättchen (Moritani et al., 1998), auch von Epithelzellen, des Bronchialtraktes und von Eosinophilen selbst gebildet (Berkman et al., 1996). Neben der chemotaktischen Wirkung auf Eosinophile hat es ebenfalls Wirkung auf Monozyten, CD4+ und CD45RO+ Memory-T-Zellen. RANTES bindet an die Rezeptoren CCR-1, CCR-3, CCR-4 und CCR-5. Das Gen, das für das RANTES-Protein kodiert, ist auf Chromosom 17 lokalisiert.

Wie RANTES gehören auch die „Monocyte chemoattractant proteins“ (MCP's) zur Gruppe der CC-Chemokine. Sie haben, wie der Name schon verrät, eine ausgeprägte chemotaktische Wirkung auf Monozyten. Darüber hinaus haben MCP-2 (YA 8), MCP-3 (CCL 7) und MCP-4 (CCL 13) eine chemotaktische Wirkung auf

Eosinophile und Basophile. MCP-1 (CCL 2) dagegen wirkt chemotaktisch auf Basophile und zeigt keinerlei Wirkung auf Eosinophile.

MCP-1 bindet an den Rezeptor CCR-2, MCP-2 an CCR-2 und CCR-3, MCP-3 an CCR-1, CCR-2 und CCR-3 und MCP-4 an den Rezeptor CCR-2 und CCR-3. Die Gene der MCP's sind alle auf dem Chromosom 17 in einem Cluster lokalisiert.

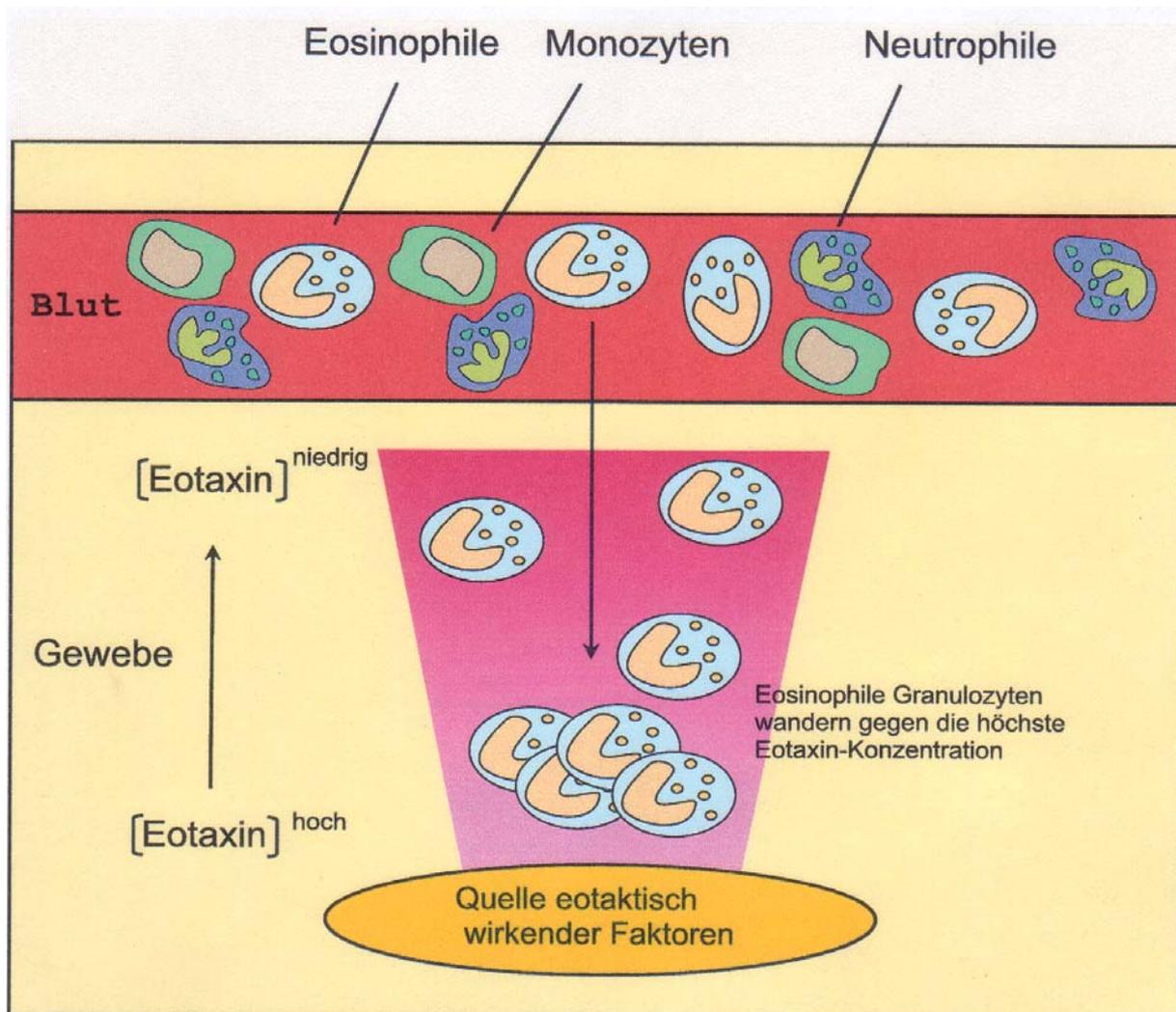


Abbildung 1.3 Infiltration von eosinophilen Granulozyten in ein Gewebe.

Eosinophilen-spezifische Chemokine wie Eotaxin-1 und MCP-4 und RANTES sind Auslöser für eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten aus dem Blut in das Gewebe. Chemotaxis ist die Migration von Zellen (hier Leukozyten) in Richtung auf eine ansteigende Konzentration von chemotaktisch wirkenden Faktoren. Eotaktisch wirkende Chemokine wirken selektiv auf eosinophile Granulozyten, nicht aber auf neutrophile Granulozyten oder Monozyten. Infiltration von eosinophilen Granulozyten in Gewebe ist charakteristisch für entzündliche Krankheiten wie atopische Dermatitis und Asthma.

Die Eotaxine (Eotaxin-1, Eotaxin-2 und Eotaxin-3) gehören ebenfalls zur Gruppe der CC-Chemokine und wirken selektiv auf Eosinophile. Eotaxin-1, Eotaxin-2 und Eotaxin-3 binden ausschließlich an den CCR-3-Rezeptor. Das Eotaxin-1-Gen ist in

dem gleichen Cluster auf Chromosom 17 lokalisiert wie die MCPs. Die Gene, die für Eotaxin-2 und Eotaxin-3 kodieren, sind dagegen auf Chromosom 7 lokalisiert.

1.4 TH1 und TH2 vermittelte Immunantwort

Die allergischen Erkrankungen Asthma, Heuschnupfen und atopische Dermatitis gehören zu den atopischen Erkrankungen. Atopische Erkrankungen werden durch einen erhöhten IgE-Spiegel im Serum definiert. Nachdem 1967 Johansen in Schweden und Ishizakas in den Vereinigten Staaten unabhängig voneinander den IgE- Antikörpertyp entdeckten, sind große Fortschritte im Verständnis der zellulären und molekularen Mechanismen von atopischen Erkrankungen gemacht worden. Gleichzeitig ist mit dieser Entwicklung eine ständige Zunahme des Auftretens dieser Erkrankungen weltweit zu verzeichnen.

Allergische Erkrankungen wie das allergische Kontaktekzem verlaufen ohne eine Erhöhung des IgE-Spiegels und reagieren mit anderen spezifischen Komponenten des Immunsystems. Im Zentrum der Entscheidung, ob der Körper ein fremdes Protein als Allergen erkennt und dementsprechend darauf reagiert, steht die Richtung, in die die CD4-T-Helfer-Zellen polarisiert werden. Ein Allergen, das in den Körper gelangt ist, sei es durch einen Insektenstich in die Haut oder durch Einatmen über die Schleimhautoberflächen der Lunge, wird von Antigen-präsentierenden-Zellen (antigen presenting cells, APCs) wie dendritischen Zellen oder Makrophagen aufgenommen und in die Lymphorgane transportiert. Dort, im Allgemeinen in den Lymphknoten oder der Milz, werden einzelne Peptide, in die das Allergen zerlegt wurde, von den APCs auf MHC-II-Komplexen der zellulären Umgebung präsentiert. Mit den auf MHC-II-Komplexen präsentierten Peptiden in Wechselwirkung stehenden CD4+-THelfer-Zellen, die zu den T-Lymphozyten gehören.

T-Lymphozyten entstehen aus Abkömmlingen von Zellen im Knochenmark, die in den Thymus wandern. Im Thymus können sie zu mehreren Typen differenzieren. Linien, deren Rezeptoren mit MHC-II-Rezeptoren in Wechselwirkung stehen, werden zu Helferzellen und Linien, die mit MHC-I-Rezeptoren in Wechselwirkung stehen, werden zu Killerzellen. Außerdem werden im Thymus Zellen aussortiert, deren T-Zell-Rezeptoren auf körpereigene Antigene reagieren. So steht der Immunabwehr eine Vielzahl von CD4+-Zellen zur Verfügung, wovon jede auf ein spezifisches, aber noch unbekanntes Antigen, reagieren kann. Diese Zellen halten sich vorrangig im

lymphatischen System auf (Robey and Fowlkes, 1994).

Die meisten Immunantworten, die durch CD4⁺-T-Zellen gesteuert werden, können nach den mit ihnen verknüpften Immunreaktionen in zwei polarisierte Typen unterschieden werden. Man kann den einen Typ in erster Näherung als zellvermittelte Immunantwort und den anderen als Antikörper-vermittelte oder humorale Immunantwort bezeichnen. Die zellvermittelte Immunantwort ist durch Makrophagen, zytotoxische T-Zellen, Produktion von opsonierenden und Komplement aktivierenden Antikörpern sowie eine von Phagozyten dominierten Entzündungsreaktion gekennzeichnet (Romagnani, 1997). Bei der humoralen Immunantwort ist im Gegensatz dazu eine Inhibierung der Phagozyten zu beobachten, bei der es sich um eine starke Antikörperantwort handelt, wobei die IgE-Antikörper eingeschlossen sind, sowie eine Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen (Romagnani, 1997). Für den Verlauf einer Erkrankung ist von entscheidender Bedeutung, mit welchen Mitteln der Körper auf die Krankheitserreger reagiert. Betrachtet man zum Beispiel den Verlauf von Lepra, einer durch *Mycobacterium leprae* verursachten Infektionskrankheit der Haut, so bedeutet die Entscheidung für die zellvermittelte Immunantwort die Ausprägung einer abheilenden tuberkuloiden Form, wohingegen die Entscheidung für die antikörpervermittelte Immunantwort zur unkontrollierten Form mit schweren Verstümmelungen führt (Turk and Bryceson, 1971).

Die Polarisierung zur TH1- oder TH2-Zelle findet zusammen mit der Aktivierung in den lymphatischen Organen statt. Eine aktivierte APC präsentiert auf dem MHC-II-Komplex einer naiven sogenannten Th0-Zelle ein Antigen. Passt dieses Antigen zum T-Zellrezeptor (T cell receptor; TCR), wird diese T-Zelle aktiviert. Welcher TH-Typ sich ausbildet, ist offensichtlich von mehreren Faktoren abhängig. Die Interpretationen gehen von einer Vielzahl von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren aus, die bei der Antigenpräsentation zum Tragen kommen. Umweltfaktoren sind die Art, wie das Antigen aufgenommen oder appliziert wurde, die physikalische Form und auch die Dosis des Immunogens.

Klassische TH1 auslösende Immunogene sind die meisten Mikroben, wie zum Beispiel *Listeria*. TH2-Immunogene sind Helminthen (Würmer) und unter bestimmten Umständen Allergene. Die genetischen Faktoren wirken auf verschiedene, an der Entstehung des Phänotyps beteiligte Komponenten. Wichtig ist die Gruppe von Rezeptoren, die die Interaktion mit der APC-CD4⁺-Zelle herstellt, wie

zum Beispiel der T-Zell-Rezeptor und auch Korezeptoren.

Korezeptoren der APC wie B7-1(CD80) und B7-2(CD86) stehen in Wechselwirkung mit entsprechenden Rezeptoren der T-Zelle wie CD28. Eine die Th2-Polarisierung unterstützende Wechselwirkung ist zum Beispiel die Interaktion von B7-2 und CD28 (Lenschow et al., 1996).

Der zweite wichtige, durch den Genotyp beeinflusste und für die Spezifität der Polarisierung maßgebliche Einfluss ist die Dominanz bestimmter Zytokine bei der Antigenpräsentation.

TH1-Zellen entstehen erstens bei IL-12-Stimulation, zweitens bei IL-18- oder IFN- γ -Stimulation und drittens bei Abwesenheit früher IL-4-Stimulation (Hsieh et al., 1993; Manetti et al., 1993; Novick et al., 1999). *In vivo* werden IL-12, IFN- γ und IL-18 durch die APC bereitgestellt. Es ist erwähnenswert, dass durch IL-12 auch NK-Zellen aktiviert werden, die wiederum die Wirkung der von der APC ausgeschütteten Zytokine durch Ausschüttung von IFN- γ unterstützen.

TH2-Zellen entstehen durch IL-4-Stimulierung. IL-4 kann in geringen Mengen durch die TH-Zelle selbst sezerniert werden, wenn der Rezeptor CD28 entsprechend stimuliert wurde. In einem autokrinen Mechanismus steigert sich diese IL-4-Synthese dann.

1.5 Der Jak/Stat-Signaltransduktionsweg des aktivierten IL-4-Rezeptors

Die Signaltransduktion von Interleukin 4 (IL-4) wird durch Oligomerisierung von membrangebundenen Rezeptorproteinen eingeleitet. Dies geschieht in einem zweistufigen Vorgang über zwei separate Bindungsepitope auf dem IL-4-Molekül. Das reife humane IL-4 ist ein monomeres Protein, das aus 129 Aminosäuren besteht und zwei potenzielle Glykosilierungsstellen besitzt. Es zeigt nach Expression in eukaryotischen Zellen ein vom Glykosilierungsgrad abhängiges Molekulargewicht von 15 bis 20 kDa.

Im ersten Schritt bindet IL-4 mit hoher Affinität an die α -Kette des Rezeptors. Dieser präformierte 1:1-Komplex, der allein nicht in der Lage ist, ein zelluläres Signal zu vermitteln, bindet im zweiten Schritt (Aktivierungsschritt) an die zweite Rezeptoruntereinheit γ c. Dieser heterodimere Rezeptorkomplex führt schließlich zur Signalauslösung.

Die Signaltransduktion der Zytokinrezeptoren ist durch ein dynamisches Gleichgewicht von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zellulärer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Kinasen und den entsprechenden Phosphatasen gekennzeichnet. Der IL-4-Rezeptor weist wie viele andere Zytokinrezeptoren auch keine interne enzymatische Aktivität auf und ist bei der Signalweiterleitung in das Innere der Zelle auf eine Reihe von assoziierten cytoplasmatischen Proteinen angewiesen. Nach Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung werden Kinasen aktiviert, die sich gegenseitig phosphorylieren. Diese cytoplasmatischen Kinasen gehören zur Janus-Familie der Kinasen, die aus einer Gruppe naher verwandter Enzyme besteht, die man als Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 bezeichnet. Die aktivierten Kinasen wiederum phosphorylieren und aktivieren Mitglieder einer Proteinfamilie, die man Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Signal Transducers and Activators of Transkription, STATs) nennt. STATs gehören zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren, die spezifisch an DNA-Abschnitte binden und so der Genregulation dienen.

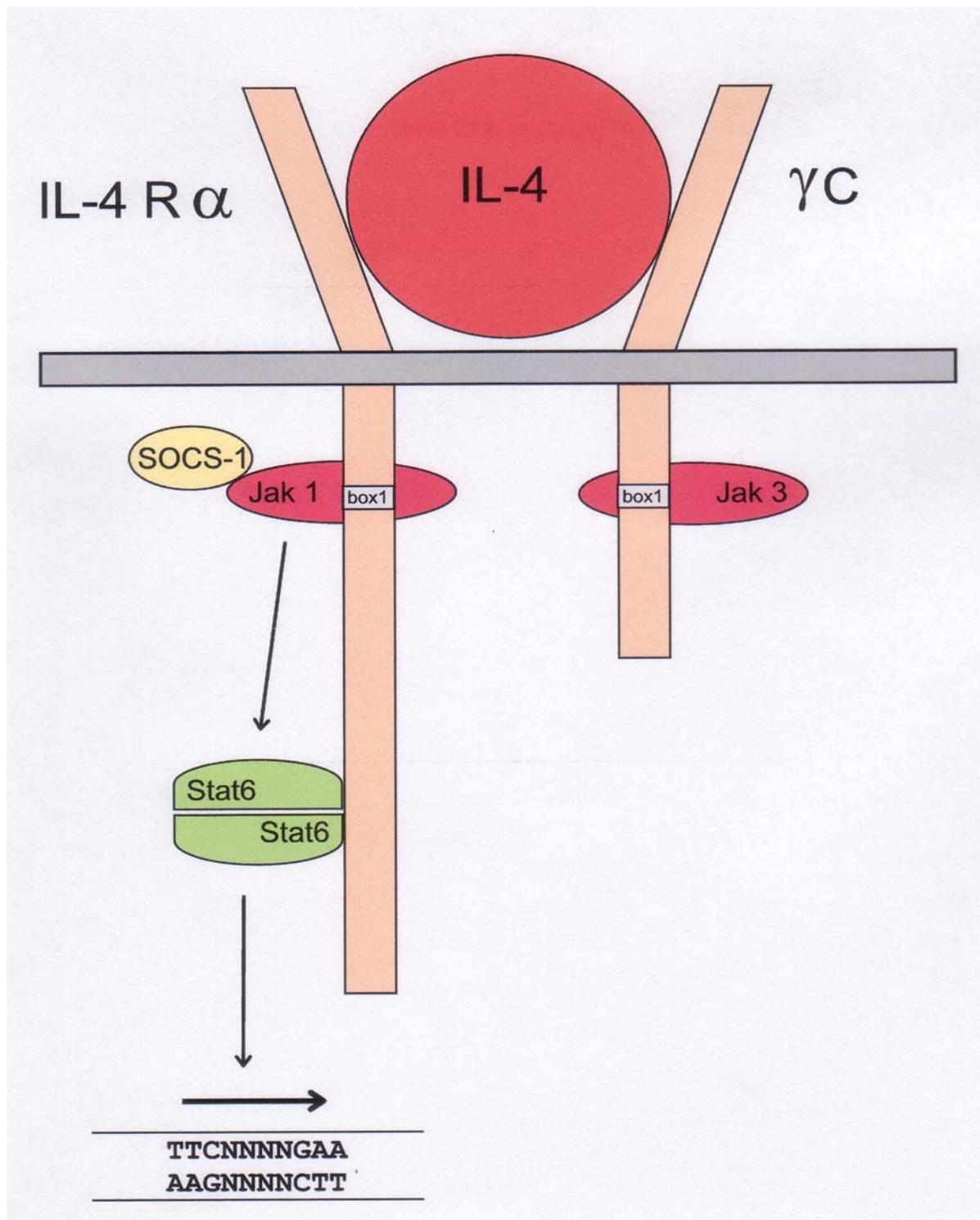


Abbildung 1.4 Modell des aktivierten IL-4-Rezeptors mit den assoziierten Signalmolekülen des Jak/Stat-Signalwegs.

Nachdem die $\text{IL-4R-}\alpha$ -Kette durch die Jak-Kinasen phosphoryliert wurde, assoziieren Stat6 -Moleküle über ihre SH2-Domäne und werden anschließend phosphoryliert. Diese Phosphorylierung verursacht die Bildung von dimeren Stat6 -Komplexen, die in den Kern wandern. Im Kern bindet Stat6 an responsive Elemente im Promotorbereich verschiedener Gene.

Der einzige Signaltransduktionsweg des IL-4-Rezeptors, dessen Weiterleitung detailliert verstanden ist, beginnt mit der Aktivierung der Jak-Tyrosinkinasen. Im Falle des IL-4-Rezeptors ist Jak1 an IL-4R α und Jak3 an γ c gebunden. Durch die Dimerisierung von IL-4R α und γ c kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von Jak1 und Jak3. Das zelluläre Signal wird nun durch spezifische Phosphorylierung von Stat6-Molekülen weitergeleitet. Stat6 ist verantwortlich für die Expression von zahlreichen mit der T_H2 Differenzierung verbundenen Proteinen, wie z.B. CD23, MHC-Klasse II und der IL-4R α -Kette. Die Aktivierung von Stat6 ist auch die Voraussetzung für den Klassenwechsel zu IgE im Menschen. Stat6 gehört zur Familie der Stat-Proteine, von der gegenwärtig sieben Vertreter bekannt sind.

Werden Stat6-Moleküle phosphoryliert und damit aktiviert, dann lagern sie sich zu Homodimeren zusammen und wandern in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen binden.

Neben der Aktivierung von Signalwegen ist physiologisch auch deren Abschaltung sehr wichtig. So wird der Jak/Stat-Signalweg durch die Expression von SOCS (suppressor of cytokine signalling), SSI-1 (Stat induced Stat inhibitor) oder JAB (Jak binding) gehemmt. JAB beispielsweise kann einerseits direkt an die Jak-Kinasen binden und so die Rezeptorphosphorylierung und damit die Aktivierung von Stat Faktoren verhindern, andererseits bindet JAB auch an Stat-Bindestellen, an Rezeptoren sowie an Stat-DNA-Elemente und hemmt die Stat Aktivität somit auch kompetitiv.

1.6 Ziel der Arbeit

In entzündlicher Haut finden sich charakteristische Gewebsinfiltrate unterschiedlicher Leukozytenformen. Je nach Krankheitsbild und –stadium überwiegt dabei eine bestimmte leukozytäre Zellpopulation. Diese Leukozyten können Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen oder T-Lymphozyten sein. Für die unterschiedliche Infiltratzusammensetzung wird die krankheitsabhängige Expression von auf bestimmte Leukozyten präferenziell oder selektiv wirkende chemotaktische Faktoren, den Chemokinen, verantwortlich gemacht. Das Ziel der Arbeit war es, die Bedingungen und die Regulation der Genexpression einzelner eosinophilen-chemotaktisch wirkenden Chemokinen zu untersuchen.

Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung der Chemokine Eotaxin-1, Eotaxin-3, MCP-3, MCP-4 und RANTES, die alle eosinophilen-chemotaktische Eigenschaften aufweisen. Um die Stimuli, die an der Regulierung der Genexpression dieser Chemokine und damit an der Regulierung der Gewebe-Eosinophilie beteiligt sind, zu identifizieren, wurden semi-quantitative RT-PCR-Studien zur stimulusabhängigen Chemokin mRNA-Expression durchgeführt.

Um die Regulation der mRNA-Expression von Chemokinen auf Transkriptionsebene zu verstehen, sollten im Rahmen einer Funktionsanalyse regulatorische Regionen der ausgesuchten Gene amplifiziert, kloniert und sequenziert und auf die Gegenwart potenzieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren hin untersucht werden. Funktionelle Studien der Promotoren einzelner Chemokine mittels Reportergen-Assays wurden durchgeführt, um Bereiche eines Promoters selektiv auf gezielte Aktivierung hin zu studieren.

Die Analyse der Promoterregionen von einzelnen CC-Chemokinen ist von hohem Interesse, da Transkriptionsfaktoren ein mögliches Ziel für potenzielle pharmakologische Eingriffe bei der Behandlung von Haut- und weiteren entzündlichen Erkrankungen darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

2.1.2 Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien

| | |
|--|---|
| 1 kb-DNA-Leiter | Gibco, Eggenstein |
| 1,4-Dithio-DL-threitol | Sigma, Deisenhofen |
| 100 bp-DNA-Leiter | Gibco, Eggenstein |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma, Deisenhofen |
| Agar, Select | Sigma, Deisenhofen |
| Agarose (Normal für analytische Gele) | Gibco, Eggenstein |
| Agarose (NuSieve für präparative Gele) | Biozym, Hess. Oldendorf |
| Ampicillin | Sigma, Deisenhofen |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma, Deisenhofen |
| Aqua dest. (steril, pyrogenfrei) | Braun, Melsungen |
| Bacto-Hefeextrakt | Gibco, Eggenstein |
| Bacto-Trypton | Gibco, Eggenstein |
| Borsäure | USB, Cleveland |
| Bromphenolblau | Sigma, Deisenhofen |
| CaCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| Chill-out 14™ Wachs | MJ Research Inc., Watertown, MA, USA |
| Chloroform | Sigma, Deisenhofen |
| DEPC | Sigma, Deisenhofen |
| Dithiothreitol | Gibco, Eggenstein |
| DMEM | Gibco, Eggenstein |
| EDTA | Gibco, Eggenstein |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| Formamid | Sigma, Deisenhofen |
| FCS | Bioconcept, Umkirch |
| Glycerol | Amersham, Cleveland |
| Glykogen | Roche, Mannheim |
| Harnstoff | Amersham, Cleveland |
| HPLC-Wasser | Promochem, Wesel |
| Interleukine (IL-1β, IL-4, IL13) | PeptoTech, Rocky Hill, USA |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kanamycin | Sigma, Deisenhofen |
| Kompetente Bakterien (E.coli-TOP10 F') | Invitrogen, Groningen |
| Long Ranger™ | Biozym, Hess. Oldendorf |
| L-Glutamin | Gibco, Eggenstein |
| MEM | Gibco, Eggenstein |

| | |
|---|---------------------------|
| β-Mercaptoethanol | Sigma, Deisenhofen |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| MgCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| NaOH | Merck, Darmstadt |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| NaHCO ₃ | Merck, Darmstadt |
| NTPs | Pharmacia, Freiburg |
| PBS | Bioconcept, Umkirch |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Biochrom, Berlin |
| Primer | Pharmacia, Freiburg |
| Restriktionsenzyme und Puffer | Roche, Mannheim |
| Reverse Transcriptase Superscript™II | Gibco, Eggenstein |
| Reverse Transcriptase Superscript™II-Puffer | Gibco, Eggenstein |
| Rnaseinhibitor RNasin | Gibco, Eggenstein |
| SOC-Medium | Invitrogen |
| T4-DNA-Ligase | Gibco, Eggenstein |
| T4-DNA-Ligase-Puffer | Gibco, Eggenstein |
| Taq-Polymerase | Gibco, Eggenstein |
| N,N,N',N'- Tetramethyl-etylendiamin (TEMED) | Sigma, Deisenhofen |
| TNF-α | PeprTech, Rocky Hill, USA |
| Trizol-Puffer | Gibco, Eggenstein |
| Trypsin-EDTA-Lösung | Gibco, Eggenstein |
| TSB-Medium | Oxoid |
| Xylenecyanol | Sigma, Deisenhofen |
| UV-SAFE-TAE (50 x) | MWG-Biotech, |

Alle übrigen Reagenzien ohne Angabe der Bezugsquelle sind bei der Firma Sigma-Chemie (Deisenhofen) erworben worden.

2.1.3 Puffer und Lösungen

| | |
|-------------------------------------|---|
| Auftragspuffer für Agarosegele: | 50 % (v/v) Glycerol 1 % (w/v) Bromphenolblau 1 % (w/v) Xylenecyanol 0,1 M EDTA 0,1 % (w/v) SDS in TAE-Puffer (1 ×) |
| Natrium-Phosphatpuffer, 1M, pH 7,2: | 68,4 % (v/v) Na ₂ HPO ₄ (1 M) 31,6 % (v/v) NaH ₂ PO ₄ (1 M) |
| TBE-Puffer (10-fach): | 108 g Tris 55 g Borat EDTA (0,5 M; pH 8,0) ad H ₂ O auf 1000 ml |
| TBE-Puffer (0,5-fach): | 50 ml TBE-Puffer (10-fach) 950 ml H ₂ O |
| TE-Puffer: | 10 mM Tris 0,1 mM EDTA |

| | |
|---|---|
| Tris-Puffer | pH 8,0 mit HCl 10 mM Tris |
| TAE-Puffer (50-fach): | pH 8,0 mit HCl 40 mM Tris/HCl 40 mM Essigsäure 1 mM Na ₂ EDTA |
| Tricin-Puffer (10-fach), pH 8,5: | 300 mM Tricin pH 8,5 20 mM MgCl ₂ 50 mM Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Gelatine 1 % (w/v) Thesit |
| Puffer für die Bindung an Magnetobeads: | |
| Puffer A | 50 mM NaOAc pH 7,5 1 M NaCl |
| Puffer B | 50 mM NaOAc pH 7,5 50 mM NaCl |
| Puffer für die Zellkernextrakte | |
| Puffer A | 10 mM HEPES-KOH (pH 7,6) 0,42 M NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 15% Glycerin Immer frisch dazugeben: 1:25 Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) 1:100 Na ₃ VO ₄ |
| Lyse-Puffer | 20 mM HEPES-KOH (pH 7,9) 50 mM KCl 0,1 mM EDTA 20% Glycerin 1 mM DTT 100 mM NaCl Immer frisch dazugeben: 1:25 Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) |
| Elektroporationspuffer | Medium für Fibroblasten 5% FCS |

2.2 Nährmedien

Keratinocyten-Medium

Fibroblasten-Medium(DMEM, komplett) 500 ml D-MEM (Gibco)
50 ml FCS (30 min bei 56°C in
Wasserbad inaktiviert)
5 ml-L-Glutamin (Gibco)
5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco)

Luria-Broth (LB)-Agar:

10 g Bacto Trypton
5 g Bacto Hefeextrakt
5 g NaCl
15 g Agar
ad 1000 ml H₂O,
pH 7,4 mit HCl, autoklavieren

Luria-Broth (LB)-Medium:

10 g Bacto Trypton
5 g Bacto Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1000 ml H₂O,
pH 7,4 mit HCl, autoklavieren

2.2.1 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) synthetisiert. Das Lyophilisat wurde in Aqua dest. in einer Konzentration von 200 µM gelöst und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierprimer besaßen eine 5'-Cy5-Markierung.

| Primer | Sequenz (5'→3') | Verwendung |
|----------------|--|--|
| Oligo-dT | TTTTTTTTTTTTTTTTTT | Reverse Transkription |
| Puc F Puc B | CACAGGAAACAGCTATGACC CGGGCCTCTTCGCTATTAC | Kolonie-PCR, indirekte Sequenzierung |
| T3 T7 | AATTAACCCTCACTAAAGAG CTCTAATCAGACTCACTATAGGGC | Primer für die Sequenzierung und Promoteramplifikation |

Tabelle 2.1 Oligonukleotide für reverse Transkription, Kolonie-PCR und indirekte Sequenzierung

| Spezifisches Gen | Primer | Sequenzen (5'→3') | Annealing-temperatur | Zyklenzahl |
|------------------|----------------------------------|--|----------------------|------------|
| GAPDH | GA 1 GA 2 | CCAGCCGAGCCACATCGCTC ATGAGCCCCAGCCTTCTCCA | variabel | variabel |
| Eotaxin-1 | EO-SQF EO-SQB | CCCAACCACCTGCTGCTTTAACCTG TGGCTTTGGAGTTGGAGAGATTTTTG G | 60 °C | 20 |
| MCP-4 | MCP-4- SQF MCP-4- SQB | CTTGCAGAGGCTGAAGAGCTATG CTCAACCCCTGGAACCGA | 60 °C | 30 |
| MCP-3 | MCP-3- SQF MCP-3- SQB | ACCAAACCAGAAACCTCCAATTC AGGTAGAGAAGGGAGCAT | 60 °C | 30 |
| RANTES | RANTES- SQF RANTES- SQB | CATCCTCATTGCTACTGCCCTCTG CGGGTTCACGCCATTCTCCT | 60°C | 30 |
| Eotaxin-3 | ETX-3SQF ETX-3SQB | CCTGGCCTCCCTCCTGAGTCT ACAGACTTTCTTGCCTCTTTTGGTAG | 60 °C | 35 |

Tabelle 2.2 In der semiquantitativen RT-PCR verwendete Oligonukleotide

| Primer | Sequenzen (5'→3') | Sequenzierungsrichtung (5'→3) |
|--------|----------------------------|-------------------------------|
| Eo1F | CCCAACCACCTGCTGCTTTAACCTG | → |
| Eo1B | TGGCTTTGGAGTTGGAGAGATTTTTG | ← |
| EoP1B | GTAGTCTCAGCTACTCAGGAAG | ← |
| EoP1F | CGGTAGCATATCTTTACTTGG | → |
| EoP2B | TCTGTGACTGACTAGCTGTG | ← |
| EoP2F | CTTCCTGAGTAGCTGAGACTAC | → |
| EoP3B | GAATACTGGTGTGGAGGTAC | ← |
| EoP3F | CACAGCTAGTCAGTCACAGA | → |
| EoP4B | TGTTCCACATGGTGGTCTTGAG | ← |
| EoP4F | GTACCTCCACACCAGTATTC | ← |
| EoP5B | TCTGGAGGTGGTTACCTTAC | ← |
| EoP5F | CTCAAGACCACCATGTGAACA | → |
| EoI1F1 | GTAAGGTAACCACCTCCAGA | → |
| EoI1B1 | CCTGTGCACTGAGGACTCATC | ← |
| EoI1F2 | CAGAACTAGAAAGCTCCCGA | → |
| EoI1B2 | ATGCAAGACTCCTGAGAGCT | ← |
| EoI1F3 | CTGAGCCAGTGCATAGCATG | → |
| EoI1B3 | CATGCTATGCACTGGCTCAG | ← |
| EoI2F1 | GAGAGCTACAGGAGAATCAC | → |
| EoI2B1 | TAGGCAACACTCAGGCTCT | ← |
| EoI2F2 | CTGGGAGATTGCTGTAGTCA | → |
| EoI2B2 | TGACTACAGCAATCACCCAG | ← |

Tabelle 2.3 Für die Sequenzierung des Eotaxin-1Gens verwendete Oligonukleotide

| Primer | Sequenzen (5'→3') | Sequenzierungsrichtung (5'→3) |
|--------|-------------------------|-------------------------------|
| M41F | CTTGCAGAGGCTGAAGAGCTATG | → |
| M41B | CTCAACCCCTGGAACCGA | ← |
| M4P1B | AAAGCTGCTGTCATGAGCAG | ← |
| M4P1F | CTCCCATCAACAGCTCTAGA | → |
| M4P2B | TAGAGACAGAGTGCTGTGCT | ← |
| M4P2F | AGCACAGCACTCTGTCTCTA | → |
| M4I1F1 | CTGCTCATGACAGCAGCTTT | → |
| M4I1B1 | CATAGCTCTTCAGCCTGTGCTAG | ← |
| M4I1F2 | GCCTTCTGAGTAGCCTGTGAT | → |
| M4I1B2 | GACATGTCACAGCCATCTAG | ← |
| M4I2F1 | CTTGCAGAGGCTGAAGAGCTATG | → |
| M4I2B1 | GAGGAGGCCAGAGGAGAATGGAA | ← |
| M4I2F2 | TCTAGCCAGACTGTGTGATG | → |
| M4I2B2 | ACAGGAAGTAGGAGGTGTGT | ← |

Tabelle 2.4 Für die Sequenzierung des MCP-4-Gens verwendete Oligonukleotide

| | |
|--------------------------|---|
| DNA-Sequenzierautomat | Alf-Express DNA Sequenzer™ Pharmacia, Freiburg |
| Densitometer: | CD 60, Desaga, Heidelberg |
| Gelelektrophoresekammer: | Horizon 11.14, Life Technologies GmbH, Eggenstein |
| Kamera | IBI, New Haven, USA |
| Photometer: | Zweistrahlspektralphotometer HITACHI Modell 150-20, Colora Messtechnik, Lorch |
| Spannungsquelle: | Modell 200/20 Power Supply, BioRad, München |
| Thermocycler: | Trio Version 2.51BB, Biometra, Göttingen |
| | PTC-200, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA |
| Thermomixer: | Modell 5436, Eppendorf, Hamburg |
| Transilluminator: | Chroma 42, Vetter GmbH, Wiesloch |
| UV-Detektor: | Modell Spektroflow 783, Kratos |
| UV-Detektor: | Focus, Spectra Physics, Hamburg |
| Zentrifugen: | Megafuge 1.0 R, Minifuge RF, Biofuge fresco, Heraeus, Osterode; J2/21 ME, Beckmann, München |

Tabelle 2.5 Verwendete Geräte

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultur von Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden aus Vorhäuten isoliert, die bei Vorhautbeschneidungen anfallen. Die Vorhäute wurden mit einer Schere und einer chirurgischen Pinzette vom umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit und in kleine Streifen (1-2 cm lang, 3-5 mm breit) geschnitten. Diese Streifen wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend in einer 0,25%igen Trypsinlösung (Gibco) über Nacht bei 4°C zur Ablösung der Epidermis inkubiert. Nach Stoppen der Trypsinierung durch Zugabe von FCS-haltigem Medium (siehe 2.1.3) und Abziehen der Epidermis, wurden die Epidermiszellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspendiert und anschließend 5 min bei 600 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in KGM-Medium (Clonetics, San Diego) + 10% FCS resuspendiert und anschließend je 10 ml in Kulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche ausgesät. Die Zellkultur wurde dann bei 37°C im Brutschrank für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch serumfreies KGM-Medium ersetzt. Nach 4 Tagen, kurz vor Erreichen der Konfluenz, wurden die Zellen auf weitere Zellkulturflaschen verteilt. Um die adhärenente Zellkultur

wieder in eine Zellsuspension zu überführen, wurden die adhärenenten Zellen einmal mit PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+} - frei; Gibco) gewaschen und 10-20 min in 5 ml Dissoziationslösung (0,1% Trypsin + 0,02% EDTA, Gibco) bei 37°C inkubiert, abzentrifugiert und in neue Kulturflaschen mit frischem KGM-Medium ausgesät. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten beschränkte sich auf ca. 4-5 Dissoziationspassagen, wobei die Zellen schon bei niedriger Konfluenz passagiert wurden, um eine zu schnelle Ausdifferenzierung zu verhindern.

2.3.2 Kultur von Fibroblasten

Humane dermale Fibroblasten werden aus kleingeschnittenen Bindegewebsstücken (überbleibend aus Vorhaut-Präparation, siehe Punkt 2.3.1) isoliert. Die Gewebestücken wurden auf den Boden einer Kulturflasche gebracht, die vorher mit 5 ml Fibroblastenmedium befüllt wurde. Die Kulturflasche wurde dann für 3-4 Stunden oder über Nacht aufrecht in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Kulturflasche in eine waagrechte Position gebracht. Aus den Bindegewebsstücken wuchsen Fibroblasten, die nach etwa 10 Tagen mit einer Dissoziationslösung (0,1% Trypsin + 0,02% EDTA, Gibco) abgelöst und auf Zellkulturflaschen verteilt wurden. Der Zeitpunkt der Passage kann variieren und hängt von dem Fibroblastenwachstum ab, das täglich mit dem Mikroskop beobachtet wurde.

Die Fibroblasten wurden in 10 ml DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Eggenstein) mit 10% fötalem Kälberserum angezüchtet. Vor der Anwendung wurde das fötale Kälberserum bei 56° C für 30 Minuten inaktiviert. Das DMEM-Medium (500 ml) wurde mit 6 ml Penicillin (5000E/ml)/Streptomycin (5mg/ml)-Stammlösung (Gibco) und 6 ml Glutamin-Stammlösung (Gibco) versetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37° C wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit CO_2 -Begasung in 75 cm^2 Kulturgefäßen (Sarstedt, Newton). Das Medium wurde etwa alle 3 Tage durch 37°C vorgewärmtes, frisches Medium ersetzt. Durch diese Behandlung konnten gleichzeitig tote bzw. nicht adhärenente Zellen entfernt werden. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz waren die Zellen zur Subkultivierung bereit. Um die adhärenent wachsenden Zellen vom Kulturgefäßboden abzulösen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,1% Trypsin-0,02%-EDTA-Lösung (Gibco) inkubiert. Nach ca. 10-15 min Inkubation bei 37° C

wurde mikroskopisch die Ablösung der Zellen überprüft. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe gleicher Mengen des FCS-haltigen Mediums gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 600 x g für 10 min abzentrifugiert, einmal mit DMEM-Medium gewaschen und in neue Kulturgefäße ausgesät.

2.3.3 Kultur von HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zelllinie ist eine humane immortalisierte, nicht tumorigene Keratinozytenzelllinie. Diese Zelllinie entstand spontan aus adulten humanen Keratinozyten durch die Kultur bei erhöhter Temperatur und geringer Kalziumkonzentration. Die Differenzierung der HaCaT-Zellen ähnelt den primären humanen Keratinozyten (Boukamp et al., 1988).

HaCaT-Zellen wurden wie die Fibroblasten (siehe Punkt 2.3.2) und im gleichen Medium (DMEM) kultiviert und nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

2.3.4 Kultur von A549-Zellen

Die A549-Zelllinie wurde aus einem Lungentumor gewonnen, der einem 58-jährigen Patienten 1972 entfernt wurde. Diese epithelialen Zellen wachsen adhärent (Giard et al. 1973). Die A549-Zellen werden wie Fibroblasten und HaCaT-Zellen kultiviert. Anstelle des DMEM-Mediums wurde bei den A549-Zellen jedoch das MEM-Medium (Modified Eagle Medium, Gibco) verwendet. Das MEM-Medium wurde wie das DMEM-Medium mit 6 ml Penicillin (5000E/ml)/Streptomycin (5mg/ml)-Stammlösung (Gibco, Eggenstein) und 6 ml Glutamin-Stammlösung (Gibco, Eggenstein) versetzt.

2.3.5 Stimulation der Zellen

Für die Durchführung der Stimulationsexperimente, wurden die jeweils zu stimulierenden Zellen 48 Stunden vor Beginn der Experimente in 6-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 2 ml Medium/Loch überführt und bis zum

Erreichen von ca. 60-80% Konfluenz kultiviert. Um eine zu starke Differenzierung der Zellen und damit unreproduzierbare Stimulationseffekte zu vermeiden, befanden sich die Zellen vor der Stimulation in nicht mehr als der 4. Passage.

Das Nährmedium wurde 12 Stunden vor dem Versuch nach zweimaligem Waschen mit PBS durch FCS-freies Medium ersetzt, um ausschließen zu können, dass im FCS enthaltene Faktoren die Stimulierung der Zellen beeinflussen.

Der Stimulus wurde dann in der gewünschten Konzentration in serumfreiem Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben, die vorher noch mit PBS gewaschen wurden. Durch kurzes Umschwenken des Kulturgefäßes wurde eine schnelle gleichmäßige Verteilung des Stimulus im Medium gewährleistet.

Für die Stimulation wurden verschiedene rekombinante proinflammatorische Zytokine (Pepro Tech, Rocky Hill, USA) eingesetzt. Dabei wurden die Zellen jeweils 0, 6, 24 und 48 Stunden mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert und anschließend sofort einer RNA-Isolierung unterzogen.

2.3.6 Einfrieren und Auftauen adhärend wachsender Zellen

Um ständig auf Zellen zurückgreifen zu können, wurden einzelne Passagen adhärend wachsender Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst (siehe Punkt 2.3.2). Nach dem Ablösen wurden die Zellen für 5 Minuten bei 600 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 2 ml eiskaltem Medium, das 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, vorsichtig resuspendiert. Jeweils 500 µl Zellsuspension wurden vorsichtig in 2 ml Einfrierröhrchen („Kryoröhrchen“ Biozym, Hess. Oldendorf) pipettiert. Die Zellen wurden sofort bei -70°C eingefroren und nach einem Tag in Flüssigstickstoff überführt. Diese schonende Methode sollte verhindern, dass sich durch zu schnelles Einfrieren Eiskristalle in der Zelle bilden und somit Organellen und die Cytoplasmamembran zerstören. Umgekehrt kann zu langsames Einfrieren zum Zelltod durch Dehydration führen.

Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen aus dem Flüssigstickstoff genommen und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um das zelltoxische DMSO möglichst schnell zu entfernen, wurde die 10-fache Menge an auf 37°C vorgewärmtem FCS-haltigem Medium zu den Zellen gegeben und anschließend für 5 min bei 600 x g

zentrifugiert (Lindel und Bauer, 1994). Das so entstandene Zellpellet wurde in ebenfalls FCS-haltigem Medium vorsichtig resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

2.3.7 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmiden

Die Zellen wurden durch Elektroporation mit einem Easyject-TM-Elektroporator der Firma Eurogentech mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Um die Aktivität der DNA-Konstrukte zu vergleichen, wurden die Experimente wie folgt angesetzt:

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion unter optimalen Kulturbedingungen gehalten, so dass sie sich kurz vor der Transfektion noch vermehren. Zur Transfektion werden die Zellen nach Ablösung durch Trypsinierung direkt vereinigt und einmal mit RPMI 1640 gewaschen und in RPMI mit 5 % FCS auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^7$ / ml gebracht. 350 μ l dieser Zellsuspension werden dann mit 30 μ g des zu transfizierenden Plasmids gemischt und in Elektroporationsküvetten (4 mm) 10 min inkubiert. Die Parameter für die Elektroporation waren von der jeweiligen Zellsorte abhängig, die elektroporiert wurde. Für Fibroblasten wurde ein Widerstand von 1200 μ F und eine Spannung von 190 V, bei A549-Zellen der gleiche Widerstand und eine Spannung von 210 V verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen sehr zügig mit RFP aus der Küvette gewaschen und in ein 50 ml Propylen-Röhrchen mit Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die frisch transfizierten Zellen für 20 min im Brutschrank inkubiert, anschließend abzentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und auf die Kulturgefäße verteilt, in denen sie stimuliert wurden. Fibroblasten und A549-Zellen wurden in 6-Loch-Platten überführt. Nachdem die Zellen über Nacht in einem Brutschrank kultiviert wurden, waren sie für die Stimulation mit Zytokinen vorbereitet.

2.3.8 Lysieren der Zellen für eine Luciferasemessung

Mit Luciferasereporterplasmiden transfizierte adhärente Zellen wurden nach der Stimulation mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Luciferaselysinpuffer (25 mM Tris-Phosphat, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N', N'-tetraessigsäure, 10% Glycerin, 1% Triton X-100; Promega), Einfrieren bei -20°C und anschließendem

Wippen für 15 min bei RT lysiert (200 µl für ein well einer 6-Loch- Platte). Die Lysate wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Transfizierte Suspensionszellen wurden abzentrifugiert und mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert, in Lysinpuffer aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden stark geschüttelt (Vortex), bei -20°C eingefroren, aufgetaut und 15 min bei RT geschüttelt.

Die Lysate wurden durch Zentrifugation von den Zelltrümmern und der DNA befreit. Aus dem Überstand wurde von jedem Lysat eine in einem Vorversuch aus einem einzelnen Lysat zu ermittelnde Menge in Messplatten für die Luciferasemessung übertragen (ca. 5-50 µl). Bei der Messung in einem Luminometer der Firma Berthold wurden automatisch 200 µl LUC-Assay-Substrat-Mix (20 mM Tricine-KOH, 0,1 mM EDTA, 8 mM MgCl_2 , 33,3 mM DTT, 270 µM ATP, 400 µM Luciferin; Promega Luciferase Assay Substrate) in die Probe injiziert. Das Firefly-Luciferase-Enzym katalysiert eine Reaktion, bei der in Gegenwart von Sauerstoff und Magnesiumionen unter Verbrauch von d-Luciferin und ATP Licht emittiert wird. Die Gesamtmenge an Licht in einem bestimmten Zeitintervall ist proportional der Luciferase-Aktivität in der Probe. In einigen Fällen ist es sinnvoll, die Proben auf ein konstitutiv aktives Renilla-Reporterplasmid zu normieren. Hierbei wird zusätzlich ein zweites ähnliches Enzym, die Renilla-Luciferase, mit einem spezifischen Substrat verwendet, das vor der Firefly-Luciferase-Messung deaktiviert wird (Promega, Dual Luciferase System).

2.3.9 Überprüfung der Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen

Zelllinien in Kultur wurden regelmässig unter Verwendung des Mycoplasma PCR ELISA Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers auf Kontamination mit Mykoplasmen überprüft.

2.4 Semi-quantitative RT-PCR

2.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten primären humanen Fibroblasten und Keratinozyten erfolgte mit dem "TRIzol™"-Reagenz (Gibco, Eggenstein). Die Methode basierte auf der sauren Guanidinisothiozyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Der Vorteil dieses Reagenzes ist die schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus den Zellen.

Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers wie folgt:

Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch die direkte Zugabe von 1 ml "TRIzol™"-Reagenz je Vertiefung einer 6-Loch-Platte bzw. 5 ml "TRIzol™"-Reagenz je 75 cm² (200 ml) Zellkulturflasche wurden nach wiederholtem Mischen durch Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette die Zellen gelöst und lysiert. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur, nach der zu je 1 ml Zell-Lysat 200 µl Chloroform gegeben und gemischt wurde. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 11500 × g für 15 min bei 4° C. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA bei 11500 × g für 10 min bei 4°C präzipitiert, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen (7500 × g für 5 min bei 4°C) und in 25 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀), wobei eine OD₂₆₀ von 1 einer RNA-Konzentration von 42,1 µg/ml entspricht vgl. (Sambrook et al., 1989). Gelöste RNA, die nicht sofort weiter verwendet wurde, konnte bei – 20°C gelagert werden.

Zur Qualitätsbestimmung der isolierten RNA und zur Feststellung ihrer möglichen Degradierung durch Anwesenheit von RNAsen, wurden 4 µl der gelösten RNA mit 1µl RNA-Auftragspuffer vermengt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

Bei intakter, sauberer RNA sollten sich zwei deutliche Banden im Bereich von ca. 5 Kb Größe (= 28S-rRNA) und ca. 2 Kb Größe (= 18S-rRNA) und eine niedermolekulare Bande im Bereich von 100-200 bp Größe(tRNAs, 5S-rRNA) im Agarosegel zeigen.

2.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription nutzt man die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase aus, welche anhand einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren vermag.

Die Reverse Transkriptase benötigt für ihre in 5'-3'-Richtung verlaufende cDNA-Synthese ein kurzes DNA-Oligonukleotid als Startermolekül, einen so genannten Primer, welcher ein freies 3'-Ende besitzt und komplementär zur RNA sein muss.

Hier bietet die Tatsache, dass die meisten eukaryotischen mRNAs am 3'-Ende polyadenyliert sind (Poly(A⁺)-RNAs) eine große Hilfe. Man benutzt als Primer Oligonukleotide aus Thymin-Basen, so genannte Oligo(dT)-Primer. Diese üblicherweise 15-20 Nukleotide langen Oligo(dT)-Primer binden an die Poly-(A)-Enden der mRNAs, so dass von dort aus die Reverse Transkriptase mit der Synthese der cDNA beginnen kann. Als Enzym wurde die 'Superscript™ II Reverse Transcriptase' (Gibco; Eggenstein) verwendet.

Um nach der cDNA-Synthese noch genspezifische Amplifizierungen zur Charakterisierung des 3'-Endes durchführen zu können (siehe Punkt 2.7.1), wurde in Anlehnung an (Frohman et al., 1988) an das 5'-Ende des Oligo(dT)-Primer eine Adaptorsequenz (5'-CCTGTCGACGGTACCAAGC -3') angefügt.

Pro Ansatz wurden auf Eis zusammengegeben:

- 1 µg Gesamt-RNA
- 2,5 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer (20 µM)
- 7,5 µl DEPC-H₂O

Dieser Ansatz wurde für 10 min auf 70° C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt.

Hinzugefügt wurden:

- 4 µl 5×Reverse Transkriptase Puffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl dNTPs (10mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der Ansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert, 5 min auf 90° C zur Inaktivierung des Enzyms erhitzt, mit 180 µl H₂O auf 200 µl Gesamtvolumen gebracht und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert. Für die RT-PCR wurden jeweils 5 µl von dieser Lösung verwendet.

2.4.3 Semi-quantitative Multiplex-PCR

Reverse Transkriptase (RT- oder RNA-PCR) ist eine Methode, mit deren Hilfe man die Genexpression auf der Ebene der mRNA untersuchen kann. Diese sensible Methode eignet sich zur relativen Abschätzung der mRNA-Expression spezifischer Gene. Bei der hier verwendeten semiquantitativen RT-PCR wurden in einem Reaktionsansatz jeweils ein spezifisches Gen und das in jeder Zelle konstitutiv exprimierte Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zusammen amplifiziert. Die Intensität der GAPDH-Produktbande fungierte als interner Standard. Durch Vergleich der Bandenintensitäten zwischen spezifischem Amplifikat und GAPDH-Produkt konnte eine relative Aussage über die mRNA-Expression getroffen werden. Für die PCR wurden ausschließlich Intron-überspannende Primer verwandt.

Für die RT-PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwandt:

- 5,0 µl Tricine-Puffer
- 5,0 µl dNTPs (2mM)
- 2,5 µl genspezifischer Primer 1
- 2,5 µl genspezifischer Primer 2
- 0,25 µl GAPDH-Primer 1
- 0,25 µl GAPDH-Primer 2
- 5,0 µl cDNA-Vorlage (siehe
- 19,5 µl H₂O

- 25 µl Wachs (Chill-out 14™)

- 0,4 µl *Taq*-Polymerase (5U/µl) in 9,25 µl H₂O
- Zugabe erst bei 85° C

Folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler (Trio-Block, Biometra) wurde verwendet:

95° C - 1 min

85° C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

94° C - 1 min

X° C - 30 s

Y-Zyklen

72° C - 1 min

(abhängig von der Insertlänge)

72° C - 15 min

4° C - ∞

Dieses Programm enthält zwei Variablen, die Annealingtemperatur und die Anzahl der Zyklen. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Struktur der Primer und ist unten aufgelistet. Die Anzahl der Zyklen wurde für jede cDNA ermittelt und ist ebenfalls in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Nach Beendigung der PCR wurden 9 µl der PCR-Produkte mit 1 µl DNA-Auftragspuffer vermischt und in einem 2%igen Agarosegel in einer horizontalen Gelapparatur (Horizon 11•14; Gibco, Eggenstein) elektrophoretisch aufgetrennt (100 V, ca. 90 min).

Herstellung eines 2%igen Agarosegels (100 ml) :

-100 ml TAE-Puffer

- 2 g Agarose

-
- Die Agarose wurde durch wiederholtes Aufkochen im TAE-Puffer gelöst.
 - Nach kurzem Abkühlen Zugabe von 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml).
 - Gießen des Gels nach Abkühlung auf ca. 60°C .

Als Größenstandard wurden 3 µl der „Ready-Load™“-100 bp-Leiter (Gibco, Eggenstein) aufgetragen.

Die Dokumentation der Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte mit Hilfe der BioDoc-Foto-Dokumentationsanlage (Biometra, Göttingen). Dabei wurden die Banden durch Fluoreszenz bei 366 nm auf einem UV-Transilluminator (Chroma 42; Vetter GMBH, Wiesloch) sichtbar gemacht. Das auf diese Weise generierte Gelfoto wurde digital abgespeichert und auf einem Thermosublimationsdrucker (Hitachi) ausgedruckt.

2.5 Klonierung der PCR-Produkte

2.5.1 Generieren der PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden mit der *Taq* DNA Polymerase (Gibco, Eggenstein), Expand Polymerase (Roche, Mannheim) oder mit Elongase (Gibco, Eggenstein) generiert. Für kurze PCR-Fragmente (bis 1000 bp) wurde die *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Da *Taq* DNA Polymerase statistisch betrachtet alle 1000 bp ein falsches Nukleotid in ein PCR-Produkt einbaut, wurde für längere PCR-Fragmente (größer 1000 bp), Expand-Polymerase oder Elongase eingesetzt. Diese Amplifikationssysteme enthalten zusätzlich eine Polymerase, die falsch eingebaute Nukleotide durch die richtigen ersetzt.

Taq DNA Polymerase erzeugt 3′-„überhängende“ dATP Enden. Diese Fragmente wurden in den Vektor pCRII des ‘TA-Cloning-Kits’ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisungen des Herstellers kloniert. Die DNA-Polymerasen Elongase und Expand generieren überwiegend so genannte „glatte Enden“. Diese PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des „Blunt end kloning Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers in den Vektor „pZero-blunt“ (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

2.5.2 Extraktion der DNA Banden

Nach Amplifikation der für die Klonierung vorgesehenen Genbereiche wurden die PCR-Produkte in einem horizontalen, 1 %igen Agarosegel (Gibco, Eggenstein)

elektrophoretisch aufgetrennt. Um die PCR-Produkte so gut wie möglich vor dem UV Licht zu schützen, wurde UV-SAFE-TAE (50 x, MWG Biotech, Ebersberg) anstelle von einfachem TAE-Puffer für die Herstellung des Agarosegels und des Elektrophorese-Puffers verwendet. Die entsprechenden Banden wurden dann unter UV-Licht mit jeweils einem neuen sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente aus den Gelstücken erfolgte mit dem 'Qiaex II Gel Extraction Kit' (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Das gereinigte Produkt wurde zur Ligation eingesetzt.

2.5.3 Ligation der DNA-Fragmente mittels T4-Ligase

Die T4-Ligase ist für die Ligation der DNA-Fragmenten besonders geeignet, da sowohl komplementäre „sticky ends“ als auch „blunt ends“ ligiert werden können. Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA sollte das molare Verhältnis 1 : 3 betragen.

Für die Ligation von „sticky ends“ wurde das „TA-Cloning-Kits“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, das den pCRII-Vektor verwendet. Ligation von „blunt ends“ wurde mit dem „Zero Blunt PCR Cloning Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dieses Kit verwendet den pCR-Blunt Vektor. Die Ligationen erfolgten nach Angaben des Herstellers.

In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurden angesetzt:

- 3,0 µl PCR-Produkt
- 1,0 µl Vektor-DNA (pCR-Blunt bzw pCRII-Vektor)
- 2,0 µl Ligationspuffer (5x)
- 3,0 µl H₂O
- 1,0 µl T4 DNA-Ligase (1 Einheit/µl)

Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

2.5.4 Transfektion der Bakterien

50 µl einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen Top 10 F' (Invitrogen, Karlsruhe) wurde nach Zugabe von 5 µl des Ligationsansatzes und 1 µl 2-Mercaptoetanol (0,5 M) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42° C für exakt 45 Sekunden unterzogen, 2 Minuten auf Eis und nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium für eine Stunde bei 37° C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf Agarplatten, die 50 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Ampicillin enthielten.

Die Anwesenheit eines Inserts wurde anhand der Koloniefarbe durch Zugabe von 1,6 µg/Agarplatte X-Gal (Roche, Mannheim) angezeigt. Bakterien, deren Vektoren Inserts enthielten, bildeten weiße Kolonien im Gegensatz zu Insert-freien Vektoren in Transformanten, die blaue Kolonien zeigten.

2.5.5 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle des Erfolgs der Klonierung und zur Bestimmung der Insertgröße wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurden Insert-positive Transformanten (weiße Bakterienkolonien) direkt als Template in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze in eine Bakterienkolonie gestochen und diese dann in dem PCR-Ansatz gespült. So gelangen die Bakterien direkt in den Ansatz, wo sie durch den Denaturierungsschritt (5 min 95°C) aufgeschlossen wurden und die DNA frei zugänglich für die *Taq* DNA Polymerase wurde.

Die hier eingesetzten universellen pUC-Primer binden neben den hier verwendeten Vektoren auch bei einer Vielzahl verschiedener anderer Vektoren an die Flanken der Klonierungsstellen. Vektoren ohne Insert konnten mit diesen Primern durch die Bildung eines Amplifikates von 322 bp detektiert werden.

Für die Kolonie-PCR wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

5,0 μ l Tricine-Puffer (10x)
1,0 μ l dNTPs (10 mM)
2,0 μ l Primer Puc F (20 μ M)
2,0 μ l Primer Puc B (20 μ M)
10 μ l H₂O

- 25 μ l Wachs (Chill-out 14™)

-0,25 μ l *Taq*-Polymerase (5U/ μ l) in 9,5 μ l H₂O

-Zugabe erst bei 85°C

Folgendes Programm wurde für den Thermocycler (Trio-Block, Biometra, Göttingen) verwendet:

95°C - 5 min

85°C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

94°C - 1 min

58°C - 20 s 30 Zyklen

72°C - 30 s bis zu 5 min

(abhängig von der Insertlänge)

72°C - 15 min

4°C - ∞

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation der nach Elektrophorese unter UV-Licht sichtbaren Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden fand mit Hilfe der BioDoc-Foto-Dokumentationsanlage (Biometra, Göttingen) bei einer Wellenlänge von 366 nm statt.

2.5.6 Plasmidisolierung

1,5 ml einer über Nacht bei 37 °C und 250 Upm geschüttelten Bakterienkultur (One Shot Top 10 Chemically Competent *E. Coli*, Invitrogen, Karlsruhe) wurden für die Plasmidpräparation mit dem 'Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit' (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Anschließend wurden die nicht sofort benötigten Plasmide bei –20 °C gelagert. Die Selektion von positiven Transformanten erfolgte durch den Zusatz von 50 µg/ml Kanamycin bzw. 50 µg/ml Ampicyclin im Medium.

2.6 Nukleinsäuresequenzierung

2.6.1 Zyklische Sequenzierung

Als Matrize (Template) für die zyklische Sequenzierung dienten entweder Plasmide oder PCR-Produkte, die direkt sequenziert wurden. Die Sequenzierreaktion folgte der Methode der zyklischen Sequenzierung (Innis et al., 1988). Dabei wird die Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1992) mit dem zyklischen Ablauf einer PCR verbunden. Diese Methode ermöglicht die Sequenzierung geringer Template-Mengen und die Durchführbarkeit der Reaktion bei hohen Temperaturen. Letztere erleichtert die Sequenzierung sekundärstrukturreicher Matrizen.

Zur Sequenzierung von genomischer und cDNA wurde das „SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA Sequencing Kit-1f (Epicentre Technologies, Madison) verwendet. Die Reaktionen erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers wie folgt:

Premix:

- 7,2 µl „Sequi Therm Excel II“-Puffer
- 7,8 µl DNA-Template (50-250 fmol)
- 1,0 µl „ALF-labeled“ Primer (2 pmol)
- 1,0 µl „Sequi Therm Excel II“ DNA Polymerase

Zu je 4 µl des Premix wurden 2 µl des entsprechenden „Terminations-Mix“ (Mix -A, -C, -G und T) gegeben, vermischt und mit 25 µl Wachs (Chill-out 14™) überschichtet.

Für die Sequenzierreaktion wurde folgendes Programm gewählt:

95°C - 5 min

95°C - 30 s

50°C - 15 s

70°C - 1min

30 Zyklen

Nach Beendigung der Sequenzierreaktion wurden 3 µl des Stopp-Puffers zu jedem Ansatz gegeben. Die Auftrennung der Proben erfolgte im ALF-Express DNA Sequenzer™ (Pharmacia, Freiburg). Die Erfassung der Sequenzdaten erfolgte mit einer Fluoreszenzdetektion, für die Cy5-markierter Sequenzprimer (Pharmacia, Freiburg) verwendet wurden.

Das Sequenzierungsgel wurde folgendermaßen hergestellt:

| | |
|--------|------------------------------|
| 21,7 g | Harnstoff |
| 6,6 ml | Long Ranger™ (50%) Acrylamid |
| 9,0 ml | TBE (10 x) |

Der Ansatz wurde durch Zugabe von Aqua dest. auf ein Volumen von 60 ml gebracht und durch einen 0,2 µm Sterilfilter (Schleicher und Schüll, Dassel) gefiltert, um größere Partikel zu entfernen.

Nach der Zugabe von

| | | |
|-----|----|-----------|
| 30 | µl | TEMED |
| 300 | µl | APS (10%) |

wurde das Gel gegossen und nach einer Polymerisationszeit von ca. einer Stunde in den Sequenzer eingesetzt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die vollständige Auftrennung der Fragmente dauerte bis zu 1.000 Minuten bei 25 Watt und 800 Volt.

Die digitalisierten Daten wurden mit dem Software-Programm ALFwin Evaluation (Pharmacia, Freiburg) ausgewertet und gespeichert. Ausgewertete Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programms Husar GCG, Version 4.0 (Genetics Computer Group, Inc., Wisconsin, USA) ausgewertet.

2.7 Techniken zur Amplifikation von unbekanntem Nukleotidabschnitten

2.7.1 RACE-PCR

Die Technik der RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) ermöglicht die Amplifikation von 5'- und 3'- cDNA-Enden. Die Methode wurde eingesetzt, um die 5'- und 3'-Enden der in Fibroblasten vorhandenen MCP-4 cDNAs zu identifizieren. Die 5'- und 3'-RACE-PCR mit Eotaxin-1-cDNA wurde von Bartels et al., 1996 beschrieben.

Für die 3'-RACE-PCR wurde mRNA aus Fibroblasten eingesetzt, die wie unter Punkt 2.4.2 beschrieben in cDNA umgeschrieben wurde. Im Gegensatz zur dort beschriebenen RT wurde bei der 3'RACE ein „Frohmann-Primer“ verwendet. Dieser Primer bindet, wie der Oligo-dT-Primer an das 3'-Poly(A)-Ende der mRNA. Zusätzlich findet sich am 5'-Terminus eine Ankersequenz. Nach Abschluss der reversen Transkription wurde eine PCR mit einem genspezifischen (5'-CGTCCCATCTACTTGCTGCT-3') und einem zur Ankersequenz komplementären Ankerprimer (5'-CCTGTGCGACGGTACCAAGC-3') durchgeführt.

Die 3'-RACE wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 5,0 μ l Tricine-Puffer (10x)
 - 1,0 μ l dNTPs (10 mM)
 - 2,0 μ l genspezifischer Primer (20 μ M)
 - 2,0 μ l Anker-Primer (20 μ M)
 - 5,0 μ l cDNA (aus 25 ng RNA)
 - 25 μ l H₂O
-
- 25 μ l Wachs (Chill-out 14™)
 - 0,4 μ l *Taq*-Polymerase (5U/ μ l) in 9,6 μ l H₂O
 - Zugabe erst bei 85°C

Folgendes Programm wurde für den Thermocycler (Trio-Block, Biometra, Göttingen) verwendet:

- 95°C - 5 min
- 85°C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

- 94°C - 1 min**
- 45°C - 30 s** **35 Zyklen**
- 72°C - 3 min**

- 72°C - 15 min
- 4°C - ∞

In einer 5'-RACE wurde das 5' Ende der MCP-4 cDNA bestimmt. Dazu wurde das „5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 2.0, Gibco, Eggenstein) verwendet. Die Durchführung der 5'-RACE richtete sich nach dem Handbuch des Herstellers, wobei der für MCP-4 genspezifische Primer (5'-TGTCAGCAGTCCTACTATTGCATTCAT-3') eingesetzt wurde.

Die PCR-Produkte wurden in einem horizontalen 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 2.5).

2.7.2 Amplifikation der Promoterregionen neuer eosinophil chemotaktischer Chemokine

Die Promoterregionen der Gene von Eotaxin-1 und MCP-4 wurden mittels einer speziellen PCR-Reaktion amplifiziert. Als Template für die PCR-Reaktion diente dabei eine humane genomische DNA-Bibliothek, die in einen Lambda Fix II Vektor (Stratagene, La Jolla, USA) ligiert war.

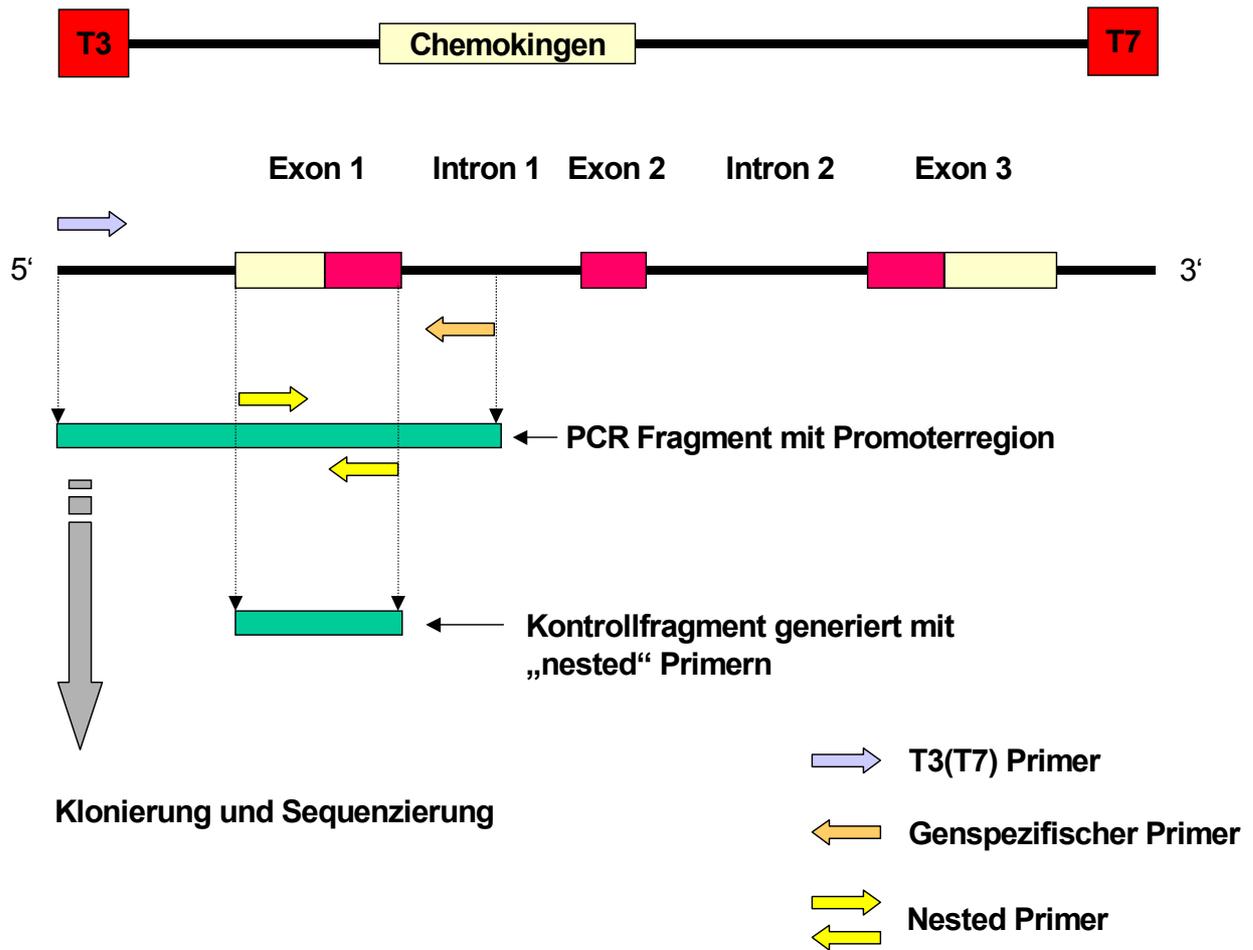


Abbildung 2.1 Angewendete Strategie zur Isolierung und Vervielfältigung von Promoter-Regionen mittels einer PCR-Reaktion unter Verwendung eines für das Zielgen spezifischen Primers und einem Vektor-spezifischen Primer ausgehend von einer genomischen DNA-Bibliothek.

Die Abbildung zeigt schematisch die genomische Struktur eines CC-Chemokins. Der genspezifische Primer wurde von der Sequenz des ersten Chemokin-Introns abgeleitet. Der vektorspezifische Primer bindet an das T3-Ende des Vektors (genomische DNA-Bibliothek). Es entstehen meist mehrere Fragmente, die nicht alle spezifisch sind, da nur ein genspezifischer Primer eingesetzt wurde. Die Fragmente, die genügend groß sind, wurden in einer zweiten PCR auf ihre Spezifität hin untersucht. Dazu wurden Primer ausgesucht, die beide entgegengesetzt an das Exon 1 binden. Nur bei positiven PCR-Fragmenten kann nun in der zweiten PCR-Reaktion ein Fragment mit definierter Größe entstehen. Diese positiv detektierten Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Die klonierte Sequenz muß am 3'-Ende zwingend die Sequenz des ersten Introns beinhalten, um als spezifisch eingestuft zu werden.

Für die PCR wurden genspezifische Primer, die von Sequenzen aus dem ersten Intron abgeleitet wurden und ein Vektor-Primer eingesetzt.

Spezifische Primer für das Eotaxin-1-Gen:

EOPRO1 5'-TGAGGTTGAGGCATTTCTTG-3'

EOPRO2N 5'-TGTGAGCTTTGGCGTGAG-3'

Spezifische Primer für das MCP-4-Gen:

M4PRO1 5'-CAGAGTAATACAACGGGTCC-3'

M4PRO2N 5'-CATAGCTCTTCAGCCTCTGCAAG-3'

Vektor-Primer:

T3moda 5'-CTCTAATCAGACTCACTATAGGGC-3'

Für die PCR wurde das „Expand High Fidelity PCR System“ (Boehringer, Ingelheim) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet:

- 5,0 µl „Expand“ PCR-Puffer (10x)
- 5,0 µl dNTPs (10 mM)
- 2,5 µl genspezifischer Primer (20 µM)
- 2,5 µl Vektor-Primer (20 µM)
- 10 µl genomische DNA (50 ng/µl)
- 15 µl H₂O

- 25 µl Wachs (Chill-out 14™)

- -0,75 µl „Expand“-Polymerase in 9,25 µl H₂O
- -Zugabe erst bei 85°C

Die PCR erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm im Thermocycler (Trio-Block, Biometra).

95°C - 5 min

85°C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

94°C - 1 min

60°C - 20 s **35 Zyklen**

68°C - 5 min

68°C - 8 min

4°C - ∞

PCR-Fragmente wurden gelelektrophoretisch in einem horizontalen, 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Fragmente, die größer als 1000 bp waren, wurden dann unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpel aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter Punkt 2.5.2 beschrieben eluiert. Die eluierten Banden wurden als Template für eine anschließende „nested-PCR“ eingesetzt.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

- 5,0 µl „Expand“-PCR-Puffer (10x)
- 5,0 µl dNTPs (10 mM)
- 2,5 µl genspezifischer Primer (20 µM)
- 2,5 µl Vektor-Primer (20 µM)
- 10 µl genomische DNA (50 ng/µl)
- 15 µl H₂O

- 25 µl Wachs (Chill-out 14™)

- -0,75 µl „Expand“-Polymerase in 9,25 µl H₂O
- -Zugabe erst bei 85°C

Die PCR-Reaktion wurde mit dem gleichen Temperaturprogramm wie in der oben ausgeführten PCR-Reaktion durchgeführt.

Die auf diese Weise generierten PCR-Produkte wurden in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die in der zweiten „nested“-PCR positiv detektierten Banden wurden mit einem sterilen Skalpell eluiert (siehe Punkt 2.5.2), kloniert (siehe Punkt 2.5) und sequenziert (siehe Punkt 2.6.) Die ermittelten Sequenzen wurden mit den bereits bekannten c-DNAs verglichen. Da der genspezifische Primer von der Sequenz des ersten Introns abgeleitet wurde, mussten die PCR-Produkte, die die Promotorregion enthalten, unbedingt die Sequenz des ersten Exons beinhalten.

2.7.3 Analyse der Promoterregion

Die sequenzierten Promoterregionen wurden mit Hilfe des HUSAR Programmes (DFKZ, Heidelberg) mit bereits bekannten Sequenzen verglichen. Die Promoterregionen wurden zusätzlich mit dem Programm FAC (DFKZ, Heidelberg) und der „Transfac“ (transcription factor database) der Universität Braunschweig ausgewertet.

2.8 Reporterassays

2.8.1 Luciferase-Expressionsvektoren

Für die Untersuchung der Aktivität einzelner Promoterregionen gibt es unterschiedliche Assays. Dabei werden verschiedene Reporterprodukte gemessen. Diese können Chloramphenicol-Acetyltransferase, β -Galactosidase und Luciferase sein. Für die Untersuchungen der Eotaxin-1- und MCP-4-Promotoren wurde der Luciferase-Assay gewählt, da er etwa 10-100mal sensitiver ist als der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Assay, obwohl die CAT-mRNA stabiler ist als das Luciferasetranskript. Die Leuchtkäfer-Luciferase (*Photinus pyralis*) hat eine Größe von 61 kDa und katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons. Die Messung der „Lichtblitze“ erfolgt in einem Spectralphotometer (Luminometer) bei einer Wellenlänge von 560 nm.

Als Plasmid für die Untersuchungen der Promoteraktivitäten wurde der Vektor ptkLUC+ (Altschmied et al. 1996) verwendet, der uns von Dr. Altschmied (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Plasmid enthält ein Luciferase (LUC)-Gen, das unter der Kontrolle des Herpes simplex Virus Thymidin Kinase (tk) Promotors steht. Zusätzlich findet sich eine Region mit geeigneten Schnittstellen für Restriktionsenzyme im Bereich vor dem Promoter/Gen Komplex.

Da für die Untersuchungen der Promoteraktivitäten das „Dual-Luciferase™ Reporter Assay System“ (Promega, Mannheim) verwendet wurde, musste ein zusätzliches Plasmid eingesetzt werden. Für die Kotransfektion wurde das Plasmid pRL-TK (Promega, Mannheim) benutzt. Dieses Plasmid beinhaltet neben einer Herpes simplex Virus Thymidin Kinase (tk) Promotorregion ein Gen, das für die *Renilla* Luciferase (*Rluc*) codiert. Diese Luciferase wurde aus dem Organismus *Renilla reniformis* isoliert und bildet ein 36 kDa großes Protein, das bei der Oxidation von Coelenterazine ebenfalls eine Lichtreaktion hervorruft, die dann von einem Luminometer gemessen werden kann.

2.8.2 Klonierung der Promotorabschnitte

Zur Untersuchung der spezifischen Aktivität des Eotaxin-1-Promotors wurden drei unterschiedlich große Promoterabschnitte in die Luciferase-Expressionsvektoren ptkLUC+ kloniert (Altschmied et al. 1996). Dabei wurden folgende Primer für die Amplifikation von Promoterabschnitten des Eotaxin-1 Promotors verwendet:

LUCEOF1 GCG**AAGCTT**GCCTCACATGTTCTTTCCTG (-125)

LUCEOB GCG**GGATCC**CTCAGCCTCTCTGCTCCTC (-1)

Zur Amplifikation wurden die Primer LUCEOF1,2,3 jeweils in Kombination mit dem Primer LUCEOB verwendet und der dazwischen liegende Promoterabschnitt amplifiziert.

Die folgenden Primer wurden zur Amplifikation eines Promoterabschnitts des MCP-4 Gens verwendet:

LUCM4F1 GCG**AAGCTT**GTTTCAGCCCTCAGCTTCC (-187)

LUCM4B GCG**GGATCC** GTTTCTTTGCCTCTCGCTC (+11)

Die hervorgehobenen Sequenzabschnitte beinhalten die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Hind III (LUCEOF1-3 und LUCM4F1) und Bam H I (LUCEOB und LUCM4B). Die Zahlen in Klammern hinter den Primern kennzeichnen die Position des 5' Endes des Primers im Promoter. Als Template für die PCR diente der unter Punkt 2.5 beschriebene Promoterabschnitt.

Vor der Ligation wurden die PCR-Fragmente mit den Restriktionsendonukleasen BamH I und Hind III nach folgendem Protokoll geschnitten:

Die mit den oben beschriebenen Primern amplifizierten Promotorbereiche wurden in den Vektor ptkLUC+ wie folgt kloniert:

- 8,0 µl „Sure cut“-Puffer (10x)
- 2,0 µl Hind III (40 Einheiten/µl)
- 2,0 µl BamH I(40 Einheiten/µl)
- 68 µl PCR-Produkt

Die Ansätze wurden für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Ansätze anschließend für 20 min auf 65°C erhitzt, da beide Enzyme durch Hitze inaktiviert werden können.

Für die Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

- 0,5 µl Luciferase-Expressionsvektor (0.1 µg/µl)
- 3,0 µl PCR-Produkt
- 2,0 µl Ligase-Puffer (5x)
- 3,0 µl H₂O
- 1,0 µl Ligase (1 Einheit/µl)

Die Ligation erfolgte bei 26°C für 30 Minuten und anschließend bei 22°C für 30 Minuten.

2.8.3 Sequenzspezifische Mutagenese mit Hilfe der PCR

Die Abbildung 2.2 zeigt eine Möglichkeit, die PCR-Methode für die Einführung von sequenzspezifischen Mutationen in eine Zielsequenz zu nutzen. Als Matrize für die PCR diente ein rekombinantes Plasmid, das ein DNA-Fragment des zu untersuchenden Promoters enthielt, in das die Mutation eingeführt werden sollte. Es wurden zwei Primerpaare ausgewählt, die beide Fragmente einrahmten, die amplifiziert werden sollten. Das erste Paar bestand aus dem Rückstrangprimer P1-3', der die gewünschte Mutation trägt, und dem Hinstrangprimer P1-5'. Dieser Primer enthielt eine Restriktionsschnittstelle, die im Vektor nur einmal in der Klonierungszielsequenz vorhanden war. Das zweite Paar bestand aus dem Hinstrangprimer P2-5', der komplementär zu dem Primer P1-3' war und ebenfalls die Mutation enthielt, sowie dem Rückstrangprimer P2-3', der wie der Primer P1-5' eine Restriktionsschnittstelle enthielt.

Mit Hilfe der beiden Primerpaare wurde die Zielregion in Form von N1/N2 und C1/C2 Fragmenten amplifiziert, die beide durch die Primer P1-3' und P2-5' die Mutation enthielten.

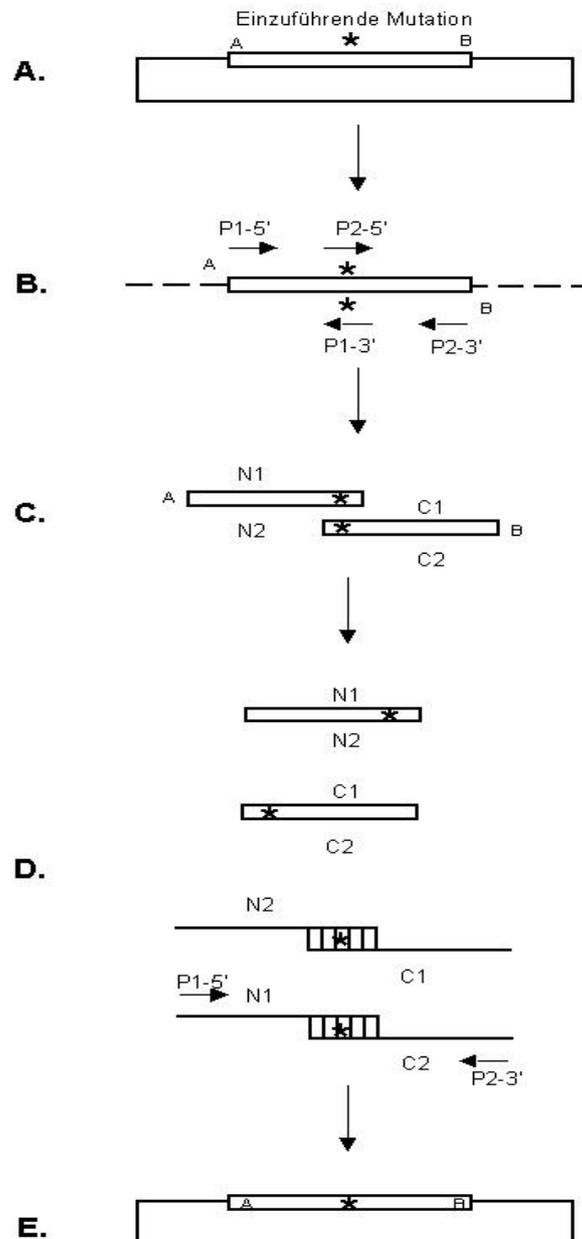


Abbildung 2.2 Sequenzspezifische Mutagenese mittels PCR.

- Zeigt den Vektor mit dem DNA-Fragment des zu untersuchenden Promoters, dass zwischen die Restriktionsschnittstellen des Vektors kloniert wurde. Der Stern kennzeichnet die Stelle, an der die Mutation eingeführt wurde.
- PCR-Amplifikation mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren.
- Aus der Amplifikation der Region gehen zwei verschiedene Fragmente hervor, die beide die gewünschte Mutation tragen.
- Mischen und Denaturieren der zwei Fragmente. Reamplifizierung mit den Primern P1-5' und P2-3'. Es kann nur das Paar N₁-C₂ amplifiziert werden.
- Klonierung der Fragmente in einen für die nachfolgenden Untersuchungen geeigneten Vektor.

Die erste PCR-Reaktion wurde dann wie folgt angesetzt:

- 10,0 μ l „Expand“ PCR-Puffer (10x)
- 2,0 μ l dNTPs (10 mM)
- 4,0 μ l Primer A P1-5' oder p 2-5' (20 μ M)
- 4,0 μ l Primer B P1-3' oder p 2-3' (20 μ M)
- 1,0 μ l Plasmid DNA (100 ng/ μ l)
- 68,0 μ l H₂O

- 25 μ l Wachs (Chill-out 14™)

- 1,0 μ l „Expand“-Polymerase (3,5 Einheiten/ μ l) in 9,0 μ l H₂O
- Zugabe erst bei 85°C

Die PCR erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm im Thermocycler (Trio-Block, Biometra):

- 95°C - 5 min
- 85°C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

- 94°C - 1 min
- 60°C - 20 s 35 Zyklen
- 68°C - 5 min

- 68°C - 8 min
- 4°C - ∞

Die so generierten PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die spezifischen PCR-Produkte mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und eluiert (siehe Punkt 2.5.2). Die eluierten PCR-Fragmente wurden dann in einem äquimolaren Verhältnis vermischt, denaturiert und einer weiteren PCR mit den Primern P1-3' und P2-5' unterzogen.

Für die zweite PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

10,0 μl „Expand“ PCR-Puffer (10x)
2,0 μl dNTPs (10 mM)
4,0 μl Primer P1-5' (20 μM)
4,0 μl Primer P2-3' (20 μM)
5,0 μl PCR-Fragment N₁N₂ aus der ersten PCR (10-20 ng)
5,0 μl PCR-Fragment C₁C₂ aus der ersten PCR (10-20 ng)
59,0 μl H₂O

- 25 μl Wachs (Chill-out 14™)

- 1,0 μl „Expand“-Polymerase in 9,0 μl H₂O

-Zugabe erst bei 85°C

Die PCR-Zyklen wurden wie folgt eingestellt:

95°C - 5 min

85°C - 1 min - Zugabe der *Taq*-Polymerase

94°C - 1 min

60°C - 20 s 35 Zyklen

68°C - 5 min

68°C - 8 min

4°C - ∞

Nach der zweiten PCR-Reaktion wurde das entstandene PCR-Produkt genau wie nach der ersten PCR-Reaktion im Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Der Restriktionsverdau, die Ligation und die Kolonie-PCR erfolgen wie unter Punkt 2.8.2 beschrieben. Klone, die PCR-Fragmente mit der richtigen Länge enthielten, wurden anschließend sequenziert. Durch die Sequenzierung wurden die Plasmide mit der gewünschten Mutation eindeutig identifiziert und unerwünschte Mutationen an anderen Stellen innerhalb des amplifizierten Bereichs ausgeschlossen.

2.8.4 Transiente Transfektion

Als Transfektionsmethode wurde die Elektroporation gewählt, bei der eine Suspension aus Zellen und DNA einem elektrischen Hochspannungsschock ausgesetzt wird. Dabei entstehen Poren in der Plasmamembran der Zellen, durch die die DNA ins Zytoplasma der Zelle bis in den Zellkern gelangen kann.

Fibroblasten wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion maximal proliferiert waren.

Die Zellen wurde am nächsten Tag trypsiniert, abzentrifugiert und in „Elektroporationspuffer“ (Medium + 5% FCS) in einer Konzentration von $1,5 \times 10^7 \text{ ml}$ aufgenommen. In 50 ml Röhren wurden je 40 ml Vollmedium und in den Elektroporationsküvetten jeweils 350 μl Zellsuspension vorgelegt. Zu der Zellsuspension wurden je 30 μg Plasmid (siehe Punkt 2.8.1) gegeben, vorsichtig gemischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der „Equibio Easyjec T Plus“-Elektroporator wurde in den „Low-Voltage-Modus“ eingestellt. Die Elektroporation fand bei 210 Volt und 1200 μF statt.

Nach der Elektroporation wurden 700 ml Medium aus dem 50 ml Röhren direkt in die Elektroporationsküvetten gegeben, die Zellsuspension darin aufgenommen und in die 50 ml Röhren überführt. Die Röhren mit den elektroporierten Zellen wurden für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 24 ml Medium resuspendiert. Die 24 ml Ansätze wurden auf 24-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 1ml frisches Medium bzw. Medium mit der gewünschten Zytokinkonzentration getauscht und nach 6 Stunden geerntet.

2.8.5 Messung der Luciferaseaktivität

Die Reporterassays wurden mit dem „Dual-Luciferase™ Assay system“ (Promega, Mannheim) durchgeführt.

2.9 Nachweis von Transkriptionsfaktoren

2.9.1 Bindung von Doppelstrang-Oligonukleotiden an Magnetobeads

Für den Nachweis von Transkriptionsfaktoren wurden kürzere doppelsträngige DNA Abschnitte aus dem Bereich des Promoters zu Kassetten verbunden und an Magnetobeads (Dynabeads™ M-280 Streptavidin) gekoppelt. Dazu wurden zu erst die ausgesuchten Oligonukleotide (Biometra, Göttingen) wie folgt phosphoryliert:

- 3,6 µl Polynukleotid-Kinase-Puffer (10x)
- 2,0 µl ATP (10 mM)
- 2,0 µl Polynukleotid-Kinase (10 Einheiten/µl)
- 3,5 µl H₂O

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz von dem Hinstrang- und dem Rückstrang-Oligo zusammen gegeben, miteinander gemischt und für 5 Minuten bei 95°C in einem Heizblock denaturiert. Nach der Denaturierung wurde der Heizblock ausgeschaltet und der Ansatz im Block auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Um die doppelsträngige DNA von den eingesetzten Agentien zu befreien, wurde der Ansatz mit dem „PCR-Purifikation Kit“ (Roche, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Um ein DNA-Fragment zu generieren, das mehrere Sequenzabschnitte des zu untersuchenden Promoters enthält, wurden die phosphorylierten doppelsträngigen Oligonukleotide zu einer bis zu 1 Kilobasen-Kassette verbunden.

Die Ligation wurde folgend durchgeführt

- 76,0 µl phosphorylierte Doppelstrang-Oligonukleotide
- 9,0 µl Ligase-Puffer (10x)
- 5,0 µl Ligase (1 Einheiten/µl)

Die Ligation erfolgte in einem Heizblock, der den Ansatz in einem Zeitraum von 8 Stunden gleichmäßig von 12°C bis auf 17°C erwärmte. Die auf diese Weise generierten DNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch

Reaktionsgefäß in das MPC-Rack gestellt und von dem Überstand befreit und anschließend wie oben beschrieben zweimal mit 200 µl Puffer A (50 mM NaOAc pH 7,5, 1 M NaCl) gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Magnetobeads mit 200 µl Puffer B (50 mM NaOAc pH 7,5, 50 mM NaCl) resuspendiert. Nach dem Resuspendieren wurde der Puffer mit Hilfe des MPC-Racks gegen eine Mischung aus 700 µl Puffer B (50 mM NaOAc pH 7,5, 50 mM NaCl) und 8mg BSA getauscht. Der Puffer mit dem BSA wurde anschließend wieder gegen 500 µl Puffer (50 mM NaOAc pH 7,5, 50 mM NaCl) ausgetauscht. Diese Suspension wurde über Nacht vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Magnetobeads mit den gebundenen „Bio-multi-ds-Oligos“ zweimal mit 500 µl Puffer (50 mM NaOAc pH 7,5, 50 mM NaCl) gewaschen. Die Magnetobeads wurden in einem Volumen von je 250 µl auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und bei 4°C gelagert.

2.9.2 Zellkernextrakte

Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben kultiviert. $1,5-3 \times 10^7$ Zellen wurden in einer Zentrifuge bei 600 x g abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden bei -20°C eingefroren. Das Zellsediment wurde in 40 ml Puffer A aufgetaut, gründlich gemischt und 10-20 Sekunden auf Eis inkubiert und erneut gründlich gemischt. Die Zellsuspension wurde bei 4°C zentrifugiert (15 min, 10000 x g). Der Überstand wurde vorsichtig vom Sediment entfernt und mit 70 µl Lyse-Puffer gemischt.

2.9.3 Isolierung von Transkriptionsfaktoren mit Magnetobeads

Zur Isolierung von Transkriptionsfaktoren aus dermalen Fibroblasten wurden 200 µl der „Oligo-Magneteobeads“ an die wie unter Punkt 2.9.1 beschriebenen Promoterabschnitte zu Kassetten verbunden und an die Magnetobeads gekoppelt, vorsichtig resuspendiert und in ein MPC-Rack gestellt. Nach dem Sammeln der Magnetobeads an der Gefäßwand wurden sie vom Überstand befreit, aus dem MPC-Rack genommen und mit 70 µl des Zellkernextrakts (siehe Punkt 2.9.2) vermischt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 15 Minuten vorsichtig gemischt, um ein Sedimentieren der gelösten Produkte zu

verhindern und eine gleichmäßige Verteilung des Zellextraktes zu gewährleisten. Während der Inkubation konnten die Transkriptionsfaktoren an die gekoppelten aufliierten Promoterabschnitte binden.

Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß in das MPC-Rack gestellt, der Überstand vorsichtig entfernt und die Magnetobeads mit 70 µl Puffer A (50 mM NaOAc pH 7,5, 1 M NaCl) resuspendiert. Die resuspendierten Magnetobeads wurden erneut in das MPC-Rack gestellt, und nach dem Sammeln der Magnetobeads an der Gefäßwand wurde der Überstand entfernt. Das Waschen der Magnetobeads wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Magnetobeads mit 10 µl Puffer B (50 mM NaOAc pH 7,5, 50 mM NaCl) resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 15 Minuten vorsichtig gemischt, um ein Sedimentieren der gelösten Produkte zu verhindern. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß in das MPC-Rack gestellt und der Überstand vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem isolierten Überstand wurden 10 µl „Protein-Gel-Proben-Puffer“ (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 25 % Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau) gegeben. Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein SDS-Gel (siehe Punkt 2.9.4) aufgetragen.

2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenden Proteine. SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine. Die Ladung der Proteine wird so durch die stark negative Ladung des SDS nivelliert, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind.

In denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt ein dem Vertikal-Gelelektrophorese SystemMini-V 8.10 (Gibco BRL). Für ein SDS-Gel (Schichtdicke 0.75 mm) wurden folgende Lösungen benötigt:

| | |
|--------------------------------|---|
| AA/BAA: | 30 % Acrylamid 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung nach Filtration bei 4 °C lagern |
| 4 × Lower-Tris: | 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.4 % SDS |
| 4 × Upper-Tris: | 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.4 % SDS |
| TEMED, 40 % APS, 87 % Glycerin | |
| SDS-Probenpuffer: | 62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 2 % SDS 20 % Glycerin (87 %) 1 ‰ BPB (Für reduzierenden Probenpuffer wird 5 ‰ β -Mercaptoethanol zugegeben.); (kann aus 2-4x verdünnten Stammlösungen verdünnt werden) |

Das folgende Pipettierschema wurde nach einem Protokoll von Laemmli (1970) erstellt.

| | Sammelgel | 7,5% Trenngel | 9% Trenngel |
|------------------|------------|---------------|-------------|
| AA/BAA | 0,5 ml | 1,25 ml | 1,5 ml |
| 4 x Lower Tris | | 1,25 ml | 1,25 ml |
| 4 x Upper Tris | 1,25 ml | | |
| H ₂ O | 3,2 ml | 1,5 ml | 1,25 ml |
| 87% Glycerin | | 1 ml | 1 ml |
| TEMED | 12 μ l | 4,5 μ l | 5,5 μ l |
| 40% APS | 12 μ l | 4,5 μ l | 5,5 μ l |

Tabelle 2.6 Pipettierschema für denaturierende SDS-Polyacrylamidgele

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in einem geeigneten Verhältnis mit SDS-Probenpuffer gemischt und zur vollständigen Denaturierung und Reduktion der Proteine 5 min bei 95°C inkubiert. Zur Fokussierung der Banden lässt man die Proteine bei 100 V ins Sammelgel einlaufen und erhöht, nachdem die Proteine ins Trenngel eingelaufen sind, die Spannung auf 150 V.

Nach Abschluss des Laufs wurde das Gel mit Coomassie oder Silber gefärbt oder die

Proteine wurden zur Immundetektion auf Nitrocellulosemembran geblottet.

2.9.5 Nachweis von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können direkt im Gel angefärbt werden. Es wurde Coomassie- und Silberfärbung verwendet.

Coomassie-Färbelösung: 0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in

Entfärbelösung

Entfärbelösung: 1 Vol. Essigsäure (100 %)

1 Vol. Methanol

8 Vol. H₂O

Die Coomassie-Färbung ist ein sehr einfaches und schnelles Verfahren zur Detektion von Proteinen bis zu einer Konzentration von 100 ng bis 1 µg. Nach Abschluss des Laufs wird das Gel 30 min in Coomassie Färbelösung geschwenkt und anschließend der überschüssige Farbstoff mit Entfärbelösung entfernt.

Ein sensitiveres, aber aufwendigeres Verfahren ist die Silberfärbung. Diese Methode beruht nicht auf der Bindung eines Farbstoffes, sondern auf der Initiierung einer RedOx-Reaktion. Einige Silberionen werden von den Proteinen gebunden und durch Reduktion in Silberkeimlinge umgewandelt, initiiert von den funktionellen Gruppen und den Peptidbindungen. Anschließend werden durch ein starkes Reduktionsmittel alle Silberionen in metallisches Silber umgewandelt. Da die Reduktion an den Silberkeimlingen am schnellsten abläuft, kann durch rechtzeitigen Abbruch der Reaktion eine selektive Ablagerung von Silber an den Stellen erreicht werden, an denen sich Proteine im Gel befinden. Mit der Silberfärbung können bis zu 50 ng Protein nachgewiesen werden.

| | |
|-----------|--|
| 50% (v/v) | Aceton in Wasser |
| 50% (w/v) | Trichloressigsäure in Wasser (im Glasgefäß aufbewahren) |
| 20% (w/v) | Silbernitrat in Wasser (dunkel aufbewahren, nicht zu lange verwenden) |
| 10% (w/v) | Natriumthiosulfatpentahydrat in Wasser |
| 1% (w/v) | Essigsäure |
| 37% (w/w) | Formaldehyd |
| Lsg 1: | 30 ml 50% Aceton, 0,75 ml 50% Trichloressigsäure, 12,5 µl Formaldehyd |
| Lsg 2: | 50% Aceton |
| Lsg 3: | 100 µl 10% Natriumthiosulfat in 30 ml Wasser |
| Lsg 4: | 0,4 ml Silbernitrat, 0,3 ml Formaldehyd, 30 ml Wasser |
| Lsg 5: | 0,6 g Natriumcarbonat, 12,5 µl Formaldehyd, 25 µl Natriumthiosulfat, 60ml Wasser |
| Lsg 6: | 1% Essigsäure |

Das Gel wird nach dem Lauf 5 min in Lsg 1 gewippt. Anschließend wird es 3 x 5 s , 1 x 5 min und noch einmal 3 x 5 s mit Wasser gewaschen. Nach 5 min Wippen in Lsg 2 wird das Gel 1 min in Lösung 3 geschwenkt, 3 x 5 s mit Wasser gewaschen und 8 min in Lösung 4 auf der Wippe inkubiert. Nachdem 5 x 5 s mit Wasser gewaschen wurde, wird Lösung 5 zugegeben, und sobald Banden bräunlich erscheinen, die Reaktion mit Lsg 6 gestoppt. Es muss beachtet werden, dass die Reaktion auch nach Zugabe von Lsg 6 noch kurze Zeit weiterläuft und das Gel noch nachdunkelt.

Mit Coomassie oder Silber angefärbte Gele werden zur Aufbewahrung getrocknet, d.h., das Gel wird 1 h in einer 30 %igen Methanol-Lösung geschüttelt und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien in einem Spannrahmen getrocknet.

2.9.6 Protein Größenstandards

| Protein | Molekulargewicht | | |
|----------------------------|------------------|-------------|----------------|
| | LM-Standard | HM-Standard | SDS7B-Standard |
| Myosin | | 200 000 Da | |
| α_2 -Macroglobulin | | | 180 000 Da |
| β -Galactosidase | | 116 000 Da | 116 000 Da |
| Phosphorylase B | 94 000 Da | 94 000 Da | |
| Fructose-6-Phosphat-Kinase | | | 84 000 Da |
| Ovotransferrin | | 78 000 Da | |
| Albumin | 67 000 Da | | |
| Pyruvat-Kinase | | | 58 000 Da |
| Glutamat Dehydrogenase | | 56 000 Da | |
| Fumarase | | | 48 000 Da |
| Ovalbumin | 43 000 Da | 43 000 Da | |
| Lactat Dehydrogenase | | | 36 500 Da |
| Carboanhydrase | 30 000 Da | | |
| Triosephosphat-Isomerase | | | 26 600 Da |
| Trypsininhibitor | 20 100 Da | | |
| Lactalbumin | 14 400 Da | | |

Tabelle 2.7 Größenstandards für Proteingele

Es wurde ein Westernblot zum Nachweis der Transkriptionsfaktoren Stat6 und NF κ B (p65) verwendet. Die Proteine wurden zunächst elektrophoretisch in einer Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Punkt 2.9.4). Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines „Sartoblot“-Apparates (Sartorius, Göttingen) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Transferzeit betrug 2 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² Gelfläche. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h in 1% Gelatine (w/v) in PBS inkubiert. Dann wurde 1 μ g/ml primärer Anti-Stat6 bzw. p65 Maus-IgG-Antikörper (Santa Cruz, USA) zugefügt und die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Membran einmal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg; 1:400 in PBS verdünnt) für 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Membran einmal in PBS gewaschen und mit Peroxidase-Substratlösung (0,01 M o-Phenylendiamin-dihydrochlorid in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,0 + 0,001% H₂O₂) inkubiert. Die abschließende enzymatische Färbereaktion wurde durch Inkubation der Membran in aqua dest. beendet.

aufgetrennt, um den Erfolg der Ligation zu prüfen. Anschließend wurde der Ansatz wie oben beschrieben aufgereinigt.

Um die gereinigten DNA-Fragmente an die Magnetobeads zu binden, wurden sie in einem 100 µl Ansatz wie folgt mit Biotin markiert:

- 20 µl Bio-dATP (0,4 mM, Gibco)
- 20 µl dNTP's ohne ATP (1 mM)
- 16 µl Klenow-Fragment (1 Einheiten/µl, Roche)
- 10 µl Puffer M (Roche)
- 24 µl H₂O

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend wie bereits beschrieben aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde der Ansatz in einer Vakuumzentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und anschließend in Puffer A (50 mM NaOAc pH 7,5, 1 M NaCl) resuspendiert. Eine Messung mit dem Photometer ergab eine Konzentration der Biotin markierten Doppelstrang-Oligonukleotide („Bio-multi-ds-Oligo“) von 800 pmol in 100 µl Puffer.

Um die „Bio-multi-ds-Oligos“ an die Magnetobeads zu binden, wurden 200 µl der Magnetobeads M-280 Suspension (10 mg/ml) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und in den „Magnetic Particle Concentrator“ (MPC-Rack) gestellt. Nachdem die Partikel an die Gefäßwand gebunden hatten, wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Die Magnetobeads wurden aus dem MPC-Rack genommen und in 200 µl Puffer A (50 mM NaOAc pH 7,5, 1 M NaCl) resuspendiert. Die resuspendierten Magnetobeads wurden erneut in das MPC-Rack gestellt und nach dem Sammeln der Magnetobeads an der Gefäßwand vom Überstand befreit. Das Waschen der Magnetobeads wurde einmal wiederholt.

Nach dem Waschen wurden die Magnetobeads mit 400 µl Puffer A (50 mM NaOAc pH 7,5, 1 M NaCl) resuspendiert und mit 100 µl „Bio-multi-ds-Oligos“, die in dem gleichen Puffer gelöst waren, vermischt. Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dabei alle 15 Minuten vorsichtig gemischt, um ein Sedimentieren der gelösten Produkte zu verhindern. Nach der Inkubation wurde das

Dieses PCR-Fragment enthielt drei Exons, die von zwei Introns (Intron I 1211 bp; Intron II 378 bp) unterbrochen wurden. Das erste Exon hat eine Länge von 132 Nukleotiden und enthält die 5'-UTR (5' untranslatierte Region) und Nukleotide, die für das Signal-Peptid codieren. Das zweite Exon hat eine Länge von 112 Nukleotiden, die für die aminoterminalen Hälfte des nativen Eotaxin-1-Proteins codiert. Exon drei besteht aus 542 Nukleotiden, die für den carboxyterminalen Teil des nativen Proteins und den 3'-UTR (3'-untranslatierte Region) codieren.

Die komplette Nukleotidsequenz des Eotaxin-1-Gens, das auch einen großen Teil der Promoterregion enthält, wurde in die DDBJ/Genbank/EMBL eingereicht und erhielt die Identifizierungsnummer (Accession number) Z92709.

Vergleichende Sequenzanalyse der genomischen Eotaxin-1-DNA mit der von anderen bereits bekannten CC-Chemokinen konnte zeigen, dass sowohl die 2-Intron/3-Exon Struktur wie auch die Intron-/Exon-Übergänge stark konserviert sind.

3.1.2 Sequenz und Analyse des Eotaxin-1-Promoters

Mit der unter Punkt 2.7.2 beschriebenen Methode wurde ein 2500 bp großes PCR-Fragment amplifiziert, welches die Eotaxin-1-Promoterregion enthielt. Die Sequenzierung dieses Abschnitts der Eotaxin-1-Promoterregion ermöglichte die Identifizierung von zahlreichen potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Promoter-Region. Der Eotaxin-1-Promoter enthält eine TATA-Box an der Position -43 und eine potenzielle Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B (nuklear faktor κ B) an Position -68. An der Position -74 findet sich eine potenzielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor STAT6 und an Position -156 ein GRE-Element (glucocorticoid response element-binding protein). Die Abbildung (siehe Abbildung 3.2 In der Promoterregion des Eotaxin-1-Gens finden sich zahlreiche potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zeigt die Promotersequenz des Eotaxin-1-Gens und alle weiteren potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die mit Hilfe des HUSAR/GCG Programms (<http://genome.dkfz-heidelberg.de/biounit/>) identifiziert wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Charakterisierung des Eotaxin-1-Gens

3.1.1 Genomische Organisation des Eotaxin-1-Gens

Um die genomische Organisation des Eotaxin-1-Gens zu analysieren, wurden spezifische Primer von der Eotaxin-1 cDNA Sequenz (Bartels et al., 1996) abgeleitet. Als Matrize für die Amplifikation der genomischen Eotaxin-1-DNA diente humane genomische DNA, die mit DNazol aus primären humanen Fibroblasten isoliert wurde. Zusammen mit den spezifischen Intron überspannenden Primern konnte ein 2868 bp großes PCR-Fragment amplifiziert werden.

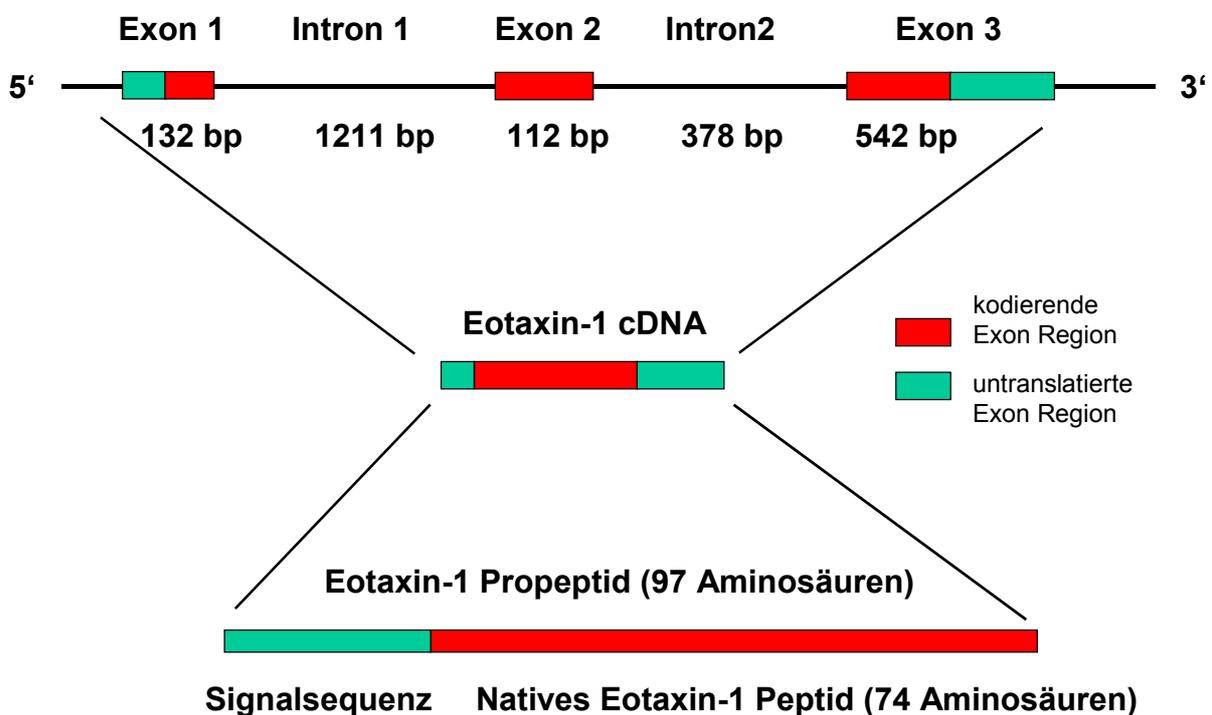


Abbildung 3.1 Das Eotaxin-1-Gen hat die für CC-Chemokine typische 3 Exons und 2 Introns Struktur.

In dieser Abbildung wird ein schematischer Überblick über die Organisation des Eotaxin-1-Gens, die Eotaxin-1-cDNA und das Peptid dargestellt. Die Introns sind als Linien, die Exons als Rechteck dargestellt. Die Länge der einzelnen Abschnitte verhält sich nicht proportional zur Größe in bp.

| | | |
|-------|---|-------|
| -3000 | CGGGGCCCTTTTATAGGGTGCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGCCTCACATGTTCTTCCCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT | -2900 |
| -2900 | TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCC | -2800 |
| -2800 | GCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGACACGACAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGTCACTCAT | -2700 |
| -2700 | AGGCAAGCCAGGCCTTTACACTTTATGCTTCCGCCCGTATGTTGTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAAACAGCTATGACCATGATTA | -2600 |
| -2600 | CGCCAAGCTAATTTAGGTGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCAGGCTCGGATCCACTAGTAAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAAAT | -2500 |
| -2500 | CAGGCTCTAATACGACTCACTATAGGGCGTCACTCGATCAAGGCCCTCATTTCATCAGGCACCAATCACAGGCAAGAAATTGGTCTACTCTACTTCAT | -2400 |
| -2400 | TGCTGAAAAGAAAGCCTCCAAGAAAGAAAGAGAAAAGCCCTTGAAGCTGCCCTGCTTGTAGGGATGGCCAGTGAGCTGGATGAAACAGCTGCAGAGC | -2300 |
| -2300 | TTGGATACTAAAGATTGATTTTATTTTATTTCCACTGAGCCACTGAGGTTTTTCAGGCGTAGAGTAAATCCAAAGCCATTAACTCCAAAGCCATTTTCC | -2200 |
| -2200 | AAGGAAAACACAAAATGAATAATCGCTTGTGATAATTCCTTTAATTCGCCGACAGTTTATGAAATTTACTTACTACAGAAACAATCATTAACCCAGC | -2100 |
| -2100 | TCAGACAAACACCTCTGAGGACAATAATTTCCCAAATTTATTTCTGCCGAGAATTTTTTAAACTTCGTATCTGCCACATGTGCAACTCAGGCATTCTTG | -2000 |
| -2000 | GAAACCATCCCTGCGGTAGCATATCTTTACTTGAAGCAGTGGGAAAACCTGGAAGAATATTTGGAGAAATATCCAGACTCTGAGGCTTTTCCAACATTC | -1900 |
| -1900 | CCAATCTGCCCTCTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGACACAGTCTCACTCTGTGGCCAGGTTGGAGTGCAGTGGCATGATCTGCCCATTGCAACCTTTGTG | -1800 |
| -1800 | CCCTGTGTCAAGCAATTTCTCATGCCTCAGCTTCTCTGAGTAGCTGAGACTACAAACACCATCCACCATGGCTGGCTAAATTTTTTGTATTTTGTAGTAAAGA | -1700 |
| -1700 | CAGGTTTTACCATGTTGCCCAGGCTGGCTTGAAGCTCCTGACCTCGAGTGATCTGCCCTGCCTCAGTCTCCCAAAGTGTGGGATTACAAGTGTGAGCCA | -1600 |
| -1600 | CTGTACCCGCGCCTATTCCCTAATAATAAAAAACAGTAACTTCTACTCACTGAGTATCTACAGTATTAGTCACTTCTTAAGCAGTTTGTAGTACATGA | -1500 |
| -1500 | ACTCATTTAAATTCACAGACAATTCCTTAAAGTACACATGATTAGTATCTGCTCTTACCCTAGCAGAGAGTGGTTAAGTAAAGTTGTCCATGGTATCACA | -1400 |
| -1400 | GCTAGTCAGTACAGAGCCATCATCCAAATGCAGATATCCTGAATTCAGGTTCTACATTAGACTAACCCACCGGGAATGGAGCAGGAAAGAACAGGGAAG | -1300 |
| -1300 | ACTCCACATTTTGGCCTCTATTGGTAAATATAGTAACTTTTTAGGTAATATAGACCAATATCTCTAGATGGSCACTTAGAGACTTTGCAGGACAGC | -1200 |
| -1200 | AAGAGCTGTCTAATCTGTGCCCATGACAGACATCACCAGTCAACCACAAACACAGTATTTAATAACGCAAGTCAACTCTCAGAATCTTTAACATAC | -1100 |
| -1100 | CTTGTTTGTGCTACTGTACCAATCAATCAATTTGATATGAGAGTGTGCGAGAAAACAGGAAACAGGTTTGCAGTACCTCCACACCAGTATTTCAATGCT | -1000 |
| -1000 | GTAATCGCTGCAGTGACTCCATTAATACTTTGCCTCCCTTATACCCTCTCCAAGTGGTGCCTAGTGTATGAAACAAAGGGATATGTATAGGTTCTT | -900 |
| -900 | GTGTTGCCCTCTCTTTGATATTTTGTAGCCATCAGATACCTTGTCTGCAATGTGTCTCAGAGAGTGAGGGGGAACAGATGATTGATTTTCCAAAATG | -800 |
| -800 | TGTCCTAAACGTGCTCCCTGGGGAATAAGGGACAGAGGCTGCCTATTCTATTTCAAACAAATCCCTTCACTACAGTGTATTTGATGAGTTGGGGTT | -700 |
| -700 | TGTTTTAATTCATTTGAAAAGGGCTTTAGCAGTAAGCAATGGTTTTAAAGTGCCTCAGAAGTCAAGATTAATAGAACTATCCAGTCTGATGCTCC | -600 |
| -600 | TATCATGCTAAAATTCAGGACTAAGATTCTGTGATCATTACATGAAAACACAGCAGCAAAGCTGTGGTGTGTGTCTCTCCCTGGTTCAGAGATGCAAC | -500 |
| -500 | TATGTGACGGGCTGCTGAGCTCTCTGTCATCTGGTGGGAGCCTAATGGAAGTTTTGGGGCTCCTTACTGGTCTCCAAAATCCTCAAGACCACCATGTG | -400 |
| -400 | AACACAGGAATCAAGGAAGGTTCTTAGACTCATCCCCAGGCTTTGGTTTCCCTGCTCCTTTCCCGACTACAGGTGTTTCAATTCATCTCC | -300 |
| -300 | CCTAGGCTTGGTTTTCTGTCTCTTCCCCACTACAGATTTTAACTTCAATTCATAACCACATATTTCCCTCCTTTTCCAAGGCAAGATCCAGATG | -200 |
| -200 | GATTAATAATGTACCAAGTCCCTCTACTAGTCTTGCCTCTCTCTGTCTCTCTCTGTTCTCTCTGACTTCTTAGGATCTGGAATCTGGTTCAGCAATCAGGAATCCTT | -100 |
| -100 | CATCGTGACCCGATGGCAAAGGCTTCCCTGGAATCTCCACACTGTCTGCTCCTATAAAAAGCAGGAGTGGCCAGAGGAGCAGAGAGGCTGAG | -1 |
| +1 | ACCAACCCAGAAACACCACCTTCTCACGCCAAGCTCACACCTTCAGCCTCCAACATG | |

Abbildung 3.2 In der Promoterregion des Eotaxin-1-Gens finden sich zahlreiche potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (siehe Seite 69).

Darstellung der Nukleinsäuresequenz des Eotaxin-1-Promoters und der potenziellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte entsprechen Konsensus-Sequenzen von bereits bekannten Transkriptionsfaktoren. Der doppelt unterstrichene Sequenzbereich markiert den Transkriptionsstart und das 5'-untranslatierte Ende der Eotaxin-1-cDNA. Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels 5' PCR ermittelt (Bartels et al., 1996).

3.2 Isolierung und Charakterisierung des MCP-4-Gens

3.2.1 Genomische Organisation des MCP-4-Gens

Ein 1911 bp großes PCR-Fragment wurde mit humaner genomischer DNA, die mit DNAzol aus primären humanen Fibroblasten isoliert wurde, generiert. Die Primer für die Amplifikation waren Intron-überspannenden und wurden von MCP-4-cDNA abgeleitet. Die Analyse des klonierten PCR-Produkts zeigte eine Intron-/Exon-Struktur, die für CC-Chemokine typisch ist. Die genomischen Sequenzdaten des MCP-4-Gens zeigten eine Gliederung in drei Exons, die von zwei Introns mit einer Größe von 867 und 437 bp unterbrochen wurden. Das erste Exon hat eine Länge von 138 Nukleotiden und enthält die 5'-UTR (5' untranslatierte Region) und Nukleotide, die für das Signal-Peptid codieren. Das zweite Exon hat eine Länge von 115 Nukleotiden, die für die aminoternale Hälfte des nativen Eotaxin-1-Proteins codiert. Exon drei besteht aus 578 Nukleotiden, die für den carboxyterminalen Teil des nativen Proteins und den 3'-UTR (3'-untranslatierte Region) codieren.

Die komplette Nukleotidsequenz des MCP-4-Gens, das auch die unter Punkt 3.4 beschriebene Promoterregion enthält, wurde in die DDBJ/Genbank/EMBL eingereicht und erhielt die Identifizierungsnummer (Accession number) AJ000979.

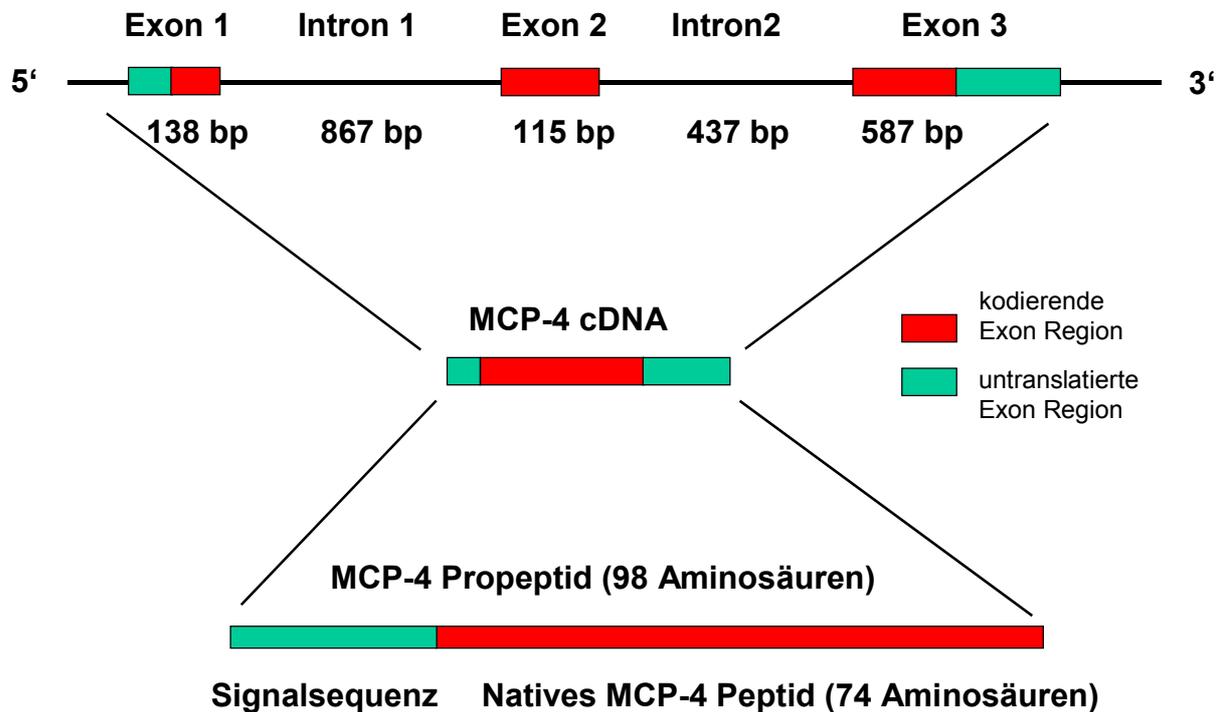


Abbildung 3.3 Das MCP-4-Gen hat wie das Eotaxin-1-Gen die für CC-Chemokine typische 3-Exon und 2- Intron Struktur.

In dieser Abbildung wird ein schematischer Überblick über die Organisation des MCP-4-Gens, die MCP-4-cDNA und das Peptid dargestellt. Die Introns sind als Linien, die Exons als Rechteck dargestellt. Die Länge der einzelnen Abschnitte verhält sich nicht proportional zur Größe in bp.

3.2.2 Sequenz und Analyse des MCP-4-Promoters

Ein 1435 bp großes PCR-Fragment, welches die Promoterregion des MCP-4-Gens enthielt, wurde wie beim Eotaxin-1-Gen beschrieben amplifiziert. Die Sequenzierung dieses Abschnitts der MCP-4-Promoterregion ermöglichte die Identifizierung von zahlreichen potenziellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Promoter-Region. Der MCP-4-Promoter enthält eine TATA-Box an der Position -36 und eine potentielle Bindestelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B (nuklear faktor κ B) an Position -114. An den Positionen -160, -491, -745, -961 und -1043 finden sich potenzielle Bindungsstellen für GAS-Elemente (gamma activated sequence), die auch Stat1/5 genannt werden.

| | | |
|-------|--|------|
| -1000 | TGGGCTTATTTTGGCTATAGTGGAATGCAGAGGGATGAGTAT <u>TTCCAGGAAG</u> <u>GAS PEA3</u> | -951 |
| -950 | GCACAAAAA [·] CTGTGCCAAGTCTTGGAGCTAGGGATGAGTGGAAAGGGAC [·] | -901 |
| -900 | ATGTTCAAC [·] <u>CATTT</u> TAGGCCATTCCTCCCCACCTCCCAGCTCCCAGATA [·] <u>GM-CSF</u> | -851 |
| -850 | TGTG <u>CCCCTCGC</u> AGGAGGAGCCCAGGAATGGGCCAAACACCTCACTTCTT [·] <u>AP-2</u> | -801 |
| -800 | TGCTCTGAGGGCC <u>CCCCAGCCC</u> TCCCATC <u>AACAG</u> CTCTAGAAACCCAAT [·] <u>AP-2</u> <u>TCF-1</u> | -751 |
| -750 | GGTC <u>TTCCCTGGAA</u> ACACGGGGCCTGCATCAATCAGAGGTGTTTGAACCA [·] <u>GAS</u> | -701 |
| -700 | TGT <u>CCCTC</u> TGGGCCTGAGGGGCAGAAGGGGACACAATATGTAATGTAAGG [·] <u>CTCF</u> | -651 |
| -650 | AGCCCCTGTCATCAGAAATCTGACTTAAT <u>CTGTTTTTCAGAT</u> ATTAGACTT [·] <u>GRE</u> <u>NFGMB</u> | -601 |
| -600 | CCACAT <u>AAAAG</u> TTGACTTGGA <u>AAAAG</u> ACTTCTGCTGCTAAAC <u>AAAAG</u> TTG [·] <u>TCF-1</u> <u>TCF-1</u> <u>TCF-1</u> | -551 |
| -550 | AAACTGCCTTGGT <u>GATAA</u> AATATAAGCAGACCAGCTTTCTCTTCTAGCTT [·] <u>GATA</u> | -501 |
| -500 | TCCCTCT <u>CATTTCCATAA</u> GATTTTGGTCAAGTTATTTAATCTCTCTGC [·] <u>GM-CSF</u> <u>GAS</u> | -451 |
| -450 | TCCGTTTCTCTTCTATG <u>AAATGG</u> GCAT <u>GATAA</u> TAATGGTATATACCTCC [·] <u>CF-1</u> <u>GATA</u> | -401 |
| -400 | TCAAGGGGGGTATAACGTG <u>AACAG</u> AGTCCTTAG <u>CACAG</u> C [·] ACTCTGTCTCT [·] <u>TCF-1</u> <u>TCF-1</u> | -351 |
| -350 | AC <u>GGGAGTGA</u> ATTTTTCATTGTTTTTCTCTTTCCCTGT <u>TGGAGAAAG</u> TAAGA [·] <u>P300</u> <u>NF-IL6</u> | -301 |
| -300 | AGAA <u>AACAG</u> CGCCTTTATGGCTTCCCATGGTGAATGGCTGGGGCGCGTCT [·] <u>TCF-1</u> | -251 |
| -250 | GTGTCCCTGTCTCCTCTCTGGCTCCTTGTGGCCT <u>GAACAG</u> CCAGA <u>AGGAA</u> [·] <u>TCF-1</u> <u>PEA3</u> | -201 |
| -200 | GCCATGCCATGCTGTTTCAGCCCTCAGCTT <u>CCCTC</u> TTGC <u>TTTCCTAGAA</u> [·] <u>CTCF</u> <u>GAS</u> | -151 |
| -150 | <u>AAG</u> TCTTTGGTGCCAGCTCCAGCTCAGCAGATT <u>CAGGATCCCCC</u> TTTCA [·] T <u>TCF-1</u> <u>NF-kB</u> | -101 |
| -100 | <u>CATGACTT</u> GGTCAACGCCCTGCTCAGGCCAAGGTCTCTGAGAGTTCCAA [·] <u>γIRE</u> | -51 |
| -50 | GCTTCTCCA [·] CTCC <u>TATAA</u> AAGGCCGGCGG <u>AACAG</u> CCAGAGGAGCAGAGA [·] <u>TATA-box</u> <u>TCF-1</u> | -1 |
| | <u>GGCAAAGAAACATTGTGAAATCTCCAACCTTTAACCTTCAACATG</u> <u>=====</u> | |

Abbildung 3.4 In der Promoterregion des MCP-4-Gens finden sich zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (siehe Seite 72).

Darstellung der Nukleinsäuresequenz des MCP-4-Promoters und der potenziellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte entsprechen Konsensus-Sequenzen von bereits bekannten Transkriptionsfaktoren. Der doppelt unterstrichene Sequenzbereich markiert den Transkriptionsstart und das 5'-untranslatierte Ende der MCP-4-cDNA. Der Transkriptionsstartpunkt wurde mittels 5' PCR ermittelt.

3.3 mRNA-Expression von eosinophil chemotaktisch wirkenden Chemokinen in Zellen der Haut

3.3.1 Die Eotaxin-1 mRNA-Expression ist in Fibroblasten induzierbar

Um zu untersuchen, ob die Induktion von Eotaxin-1-mRNA durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ vermittelt sein könnte, wurden wie unter Punkt 2.3 beschrieben, kultivierte humane dermale Fibroblasten, kultivierte humane Keratinozyten und die Keratinozytenzelllinie HaCaT mit dem Zytokin TNF- α für 24 und 48 Stunden stimuliert. Weiterhin wurde eine Kostimulation mit TNF- α und IFN- γ für 24 Stunden durchgeführt.

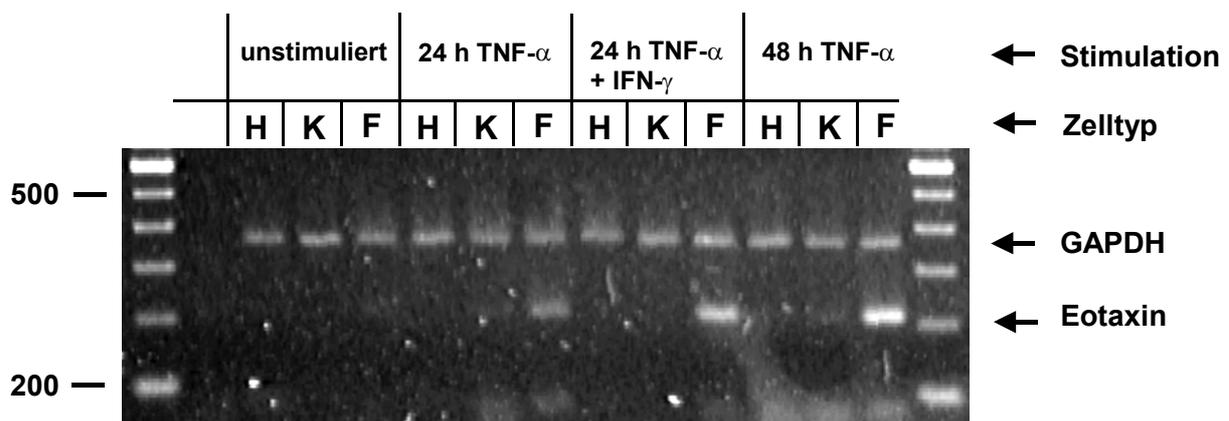


Abbildung 3.5 mRNA-Expression von Eotaxin-1 relativ zu der von GAPDH in kultivierten humanen primären Fibroblasten, Keratinozyten und HaCaT-Zellen.

Kultivierte humane dermale Fibroblasten (F), kultivierte humane Keratinozyten (K) und die Keratinozytenzelllinie HaCaT (H) wurden mit den Zytokinen TNF- α für 24 und 48 Stunden stimuliert. Die Fibroblasten wurden dabei mit einer Konzentration von 30 ng/ml, die Keratinozyten und HaCaT-Zellen mit 100 ng/ml stimuliert. Die Stimulation der Fibroblasten mit IFN- γ erfolgte mit 20 ng/ml und bei den Keratinozyten und HaCaT-Zellen mit 100 ng/ml. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Dreifachbestimmung.

Wie in Abbildung 3.5 mRNA-Expression von Eotaxin-1 relativ zu der von GAPDH in kultivierten humanen primären Fibroblasten, Keratinozyten und HaCaT-Zellen gezeigt, konnte TNF- α allein eine Induktion der Expression von Eotaxin-1 mRNA nur in Fibroblasten zeigen. Diese war nach 24 Stunden deutlich höher als bei unstimulierten Fibroblasten und konnte nach 48 Stunden sogar noch gesteigert werden. Die Kostimulation mit TNF- α und IFN- γ ergab einen synergistischen Effekt. Die Expression von Eotaxin-1-mRNA war nach 24 Stunden 6 mal höher als in unstimulierten Fibroblasten und 1,5 mal höher als in Fibroblasten, die nur mit TNF- α stimuliert waren.

3.3.2 Eotaxin-1-mRNA-Expression in humanen dermalen Fibroblasten

Da die Promoterregion des Eotaxin-1-Gens potenzielle Bindungsstellen für Zytokin-assoziierte Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Stat6 und AP-1 enthält (siehe Abbildung 3.2), wurde untersucht, ob sich die Eotaxin-1-mRNA-Expression in primären humanen dermalen Fibroblasten durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α , sowie Kostimulationen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ und IL-1 α und IL-4 induzieren lässt. Die Zellen wurden 0, 6, 24 und 48 Stunden mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert.

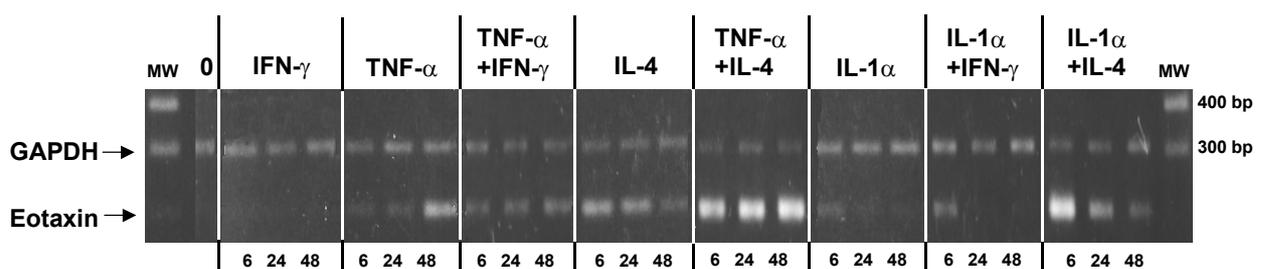


Abbildung 3.6 Die Stimulierung mit TNF- α und IL-4 zeigt bei der Induktion der Eotaxin-1-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten synergistische Effekte.

Eotaxin-1 mRNA-Expression in kultivierten dermalen Fibroblasten nach der Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen für 0, 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR. Stimuli: TNF- α : 30 ng/ml, IL-1 α : 3 ng/ml, IFN- γ : 20 ng/ml, IL-4: 5 ng/ml. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Dreifachbestimmung.

Die Stimulierung mit $\text{TNF-}\alpha$, IL-4 und $\text{IL-1}\alpha$ führte zu einer Induktion der Eotaxin-1-mRNA-Expression in den Fibroblasten. Die mRNA-Expression nach der Stimulierung mit $\text{TNF-}\alpha$ konnte erst nach 48-stündiger Stimulation gezeigt werden. Induktion mit IL-4 konnte nur eine unmittelbare kurze (transiente) Heraufregung der mRNA-Expression bewirken, die im Laufe der Zeit deutlich schwächer wurde. Die Stimulierung mit $\text{IFN-}\gamma$ ergab auch nach 48 Stunden keine signifikante Expression der Eotaxin-1-mRNA.

Die Kostimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und IL-4 zeigte, verglichen mit den einzelnen Stimulierungen, eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression. Außerdem war der Effekt sofort zu beobachten und lange anhaltend.

3.3.3 MCP-4-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten

Die Promoterregion des MCP-4-Gens enthält potenzielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren $\text{NF-}\kappa\text{B}$, Stat5 , AP-2 und GAS -Elemente. Auch beim MCP-4 wurde untersucht, ob sich die mRNA-Expression mit den proinflammatorischen Zytokinen $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 und $\text{IL-1}\alpha$ sowie Kostimulationen mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und IL-4 , $\text{IL-1}\alpha$ und $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IL-1}\alpha$ und IL-4 nach 6-, 24- oder 48-stündiger Stimulierung induzieren lässt.

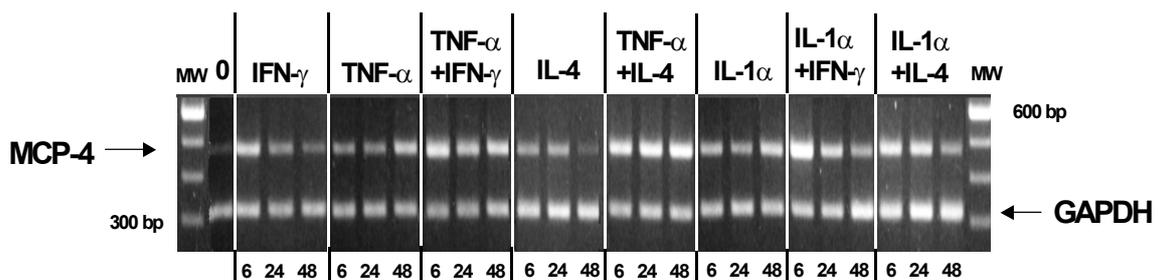


Abbildung 3.7 Kostimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und IL-4 zeigt bei der Induktion der MCP-4 mRNA-Expression wie bei Eotaxin-1 einen synergistischen Effekt.

MCP-4-mRNA-Expression in kultivierten dermalen Fibroblasten nach der Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen für 0, 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR. Stimuli: $\text{TNF-}\alpha$: 30 ng/ml, $\text{IL-1}\alpha$: 3 ng/ml, $\text{IFN-}\gamma$: 20 ng/ml, IL-4 : 5 ng/ml. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment einer Dreifachbestimmung.

Die Stimulierung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α sowie die Kostimulierungen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ und IL-1 α und IL-4 führten schon nach 6 Stunden zu einer Induktion der MCP-4-mRNA Expression in den Fibroblasten. Die Induktion der MCP-4-mRNA-Expression mit TNF- α und IL-1 α war lang anhaltend (bis zu 48 Stunden), während die Induktion mit IFN- γ und IL-4 nur eine unmittelbare kurze (transiente) Herausregung der mRNA-Expression bewirkte, die im Laufe der Zeit deutlich schwächer wurde.

3.3.4 MCP-3-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten

Der MCP-3-Promotor weist potenzielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF κ B, Stat6, AP-1, AP-2 und GAS-Elemente auf. Um die mRNA-Expression des MCP-3-Gens zu untersuchen, wurden dermale Fibroblasten mit den Zytokinen TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α , sowie den Kombinationen von TNF- α mit IFN- γ , TNF- α mit IL-4, IL-1 α mit TNF- α und IFN- γ mit IL-1 α für 0, 6, 24 und 48 Stunden stimuliert.

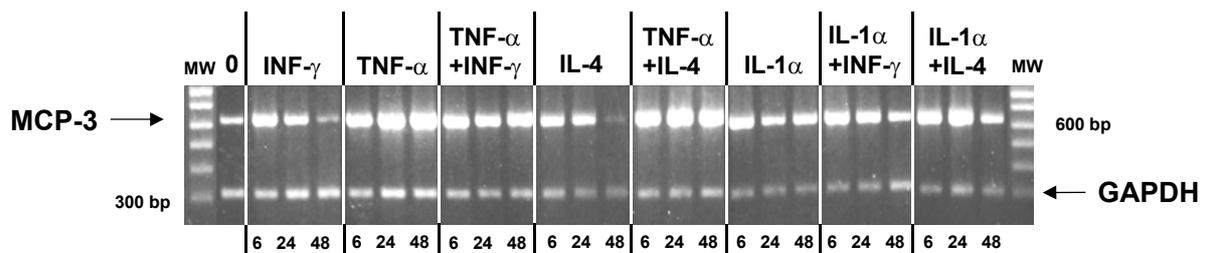


Abbildung 3.8 Die MCP-3 mRNA-Expression lässt sich mit TNF- α oder IL-4 induzieren, während der synergistische Effekt fehlt.

Die MCP-3-mRNA-Expression in kultivierten dermalen Fibroblasten nach der Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen für 0,6,24 und 48 Stunden im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR. Stimuli: TNF- α : 30 ng/ml, IL1- α :3 ng/ml, IFN- γ :20 ng/ml, IL-4: 5 ng/ml.

Die Stimulierung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α , sowie die Kostimulierungen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ , IL-1 α sowie IL-4 führten schon nach 6 Stunden zu einer Induktion der MCP-3-mRNA Expression in dermalen Fibroblasten. Die Induktion der mRNA-Expression mit TNF- α und IL-1 α war lang anhaltend (bis zu 48 Stunden), während die Induktion mit IFN- γ und IL-4 nur eine unmittelbare kurze (transiente) Heraufregung der mRNA-Expression bewirkte, die im Laufe der Zeit schwächer wurde.

3.3.5 RANTES-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten

Wenn man die Promoterregion des RANTES-Gens analysiert, findet man potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie NF κ B, AP-1 und GAS-Elemente. Auch bei RANTES wurde untersucht, ob sich die mRNA-Expression mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α sowie Kostimulierungen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ und IL-1 α und IL-4 nach 0-, 6-, 24- oder 48-stündiger Stimulierung induzieren lässt.

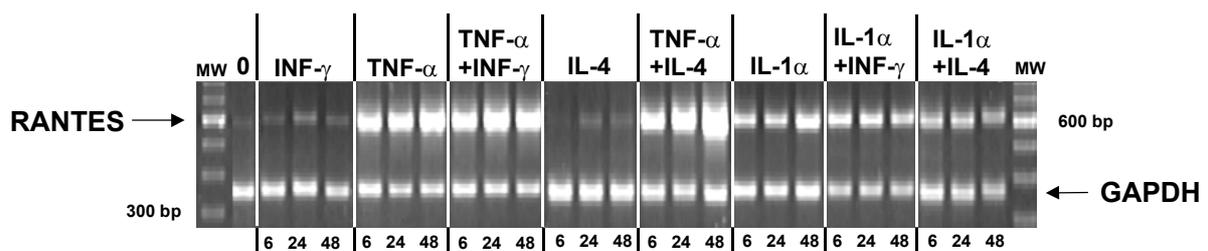


Abbildung 3.9 Die RANTES-mRNA-Expression lässt sich nicht mit IL-4 oder IFN- γ induzieren, TNF- α und IL-1 α dagegen induzieren die RANTES mRNA-Expression.

RANTES-mRNA-Expression in kultivierten dermalen Fibroblasten nach der Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen für 0, 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH, dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR. Stimuli: TNF- α : 30 ng/ml, IL-1 α : 3 ng/ml, IFN- γ : 20 ng/ml, IL-4: 5 ng/ml.

Die Stimulierung mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 α sowie die Kostimulierungen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ

und IL-1 α und IL-4 führten schon nach 6 Stunden zu einer Induktion der RANTES-mRNA in den Fibroblasten, die auch über einen Zeitraum von 48 Stunden stabil war. Die Induktion mit IFN- γ und IL-4 konnte in beiden Fällen nach 24 Stunden nur eine sehr schwache mRNA-Expression hervorrufen. Die Kostimulation mit TNF- α und IL-4 zeigte eine Steigerung der mRNA-Expression, verglichen mit der Induktion mit TNF- α allein. Außerdem war der Effekt schon nach kurzer Zeit (6 h) zu beobachten und verstärkte sich mit zunehmender Zeit.

3.3.6 Eotaxin-3-mRNA wird in dermalen Fibroblasten exprimiert

Die Promoterregion des Eotaxin-3-Gens enthält eine potenzielle Bindungsstelle für den Zytokin-assoziierten Transkriptionsfaktor Stat6 und keine Bindestelle für NF κ B oder GAS-Elemente (Shinkai, Yoshisue, et al. 1999). Dieser Befund und die Ergebnisse der Eotaxin-1 mRNA-Expression (siehe Punkt 3.3.2) gab Anlass zur Frage, ob die Eotaxin-3-mRNA-Expression in primären humanen dermalen Fibroblasten durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-4 und IL-1 α sowie Kostimulationen mit TNF- α und IFN- γ , TNF- α und IL-4, IL-1 α und TNF- α , IFN- γ und IL-1 α und IL-4 induzieren lässt. Es wurden daher dermale Fibroblasten 0, 6, 24 und 48 Stunden mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert.

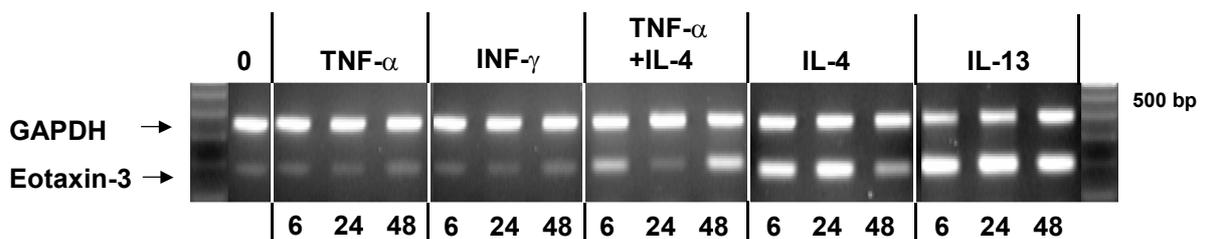


Abbildung 3.10 Die Stimulierung mit TNF- α und IL-4 zeigt bei der Induktion der Eotaxin-3-mRNA-Expression keinen synergistischen Effekt.

Eotaxin-3 mRNA-Expression in kultivierten dermalen Fibroblasten nach der Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen für 0, 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH, dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR. Stimuli: TNF- α : 30 ng/ml, IL-1 α : 3 ng/ml, IFN- γ : 20 ng/ml, IL-4: 5 ng/ml.

Nach einer 6-stündigen Stimulation mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 konnte eine verstärkte mRNA-Expression von Eotaxin-3 in primären dermalen Fibroblasten gezeigt werden. Eine gleichzeitige Stimulierung durch die Kombination von TNF- α und IFN- γ konnte die mRNA-Expression von Eotaxin-3 nur sehr schwach induzieren. Kostimulation mit TNF- α und IL-4 konnte die mRNA-Expression von Eotaxin-3 nicht stärker induzieren als die Stimulierung mit IL-4 allein. Weiterhin war zu beobachten, dass die mRNA-Expression nach der Stimulierung mit IL-4 und mit IL-13 nach 24 Stunden, verglichen mit der Expression nach 6 und 48 Stunden, am größten war.

3.3.7 Eotaxin-3-mRNA-Expression in Keratinozyten

Nach einer mindestens 6-stündigen Stimulation mit den proinflammatorischen TH2-Zytokinen IL-4 und IL-13 konnte wie in Fibroblasten (siehe Abbildung 3.10) eine verstärkte mRNA-Expression von Eotaxin-3 in Keratinozyten gezeigt werden. Die Stimulierung durch eine Kombination von TNF- α und IFN- γ konnte ebenfalls die mRNA-Expression von Eotaxin-3 in beiden Zelltypen nur sehr schwach induzieren.

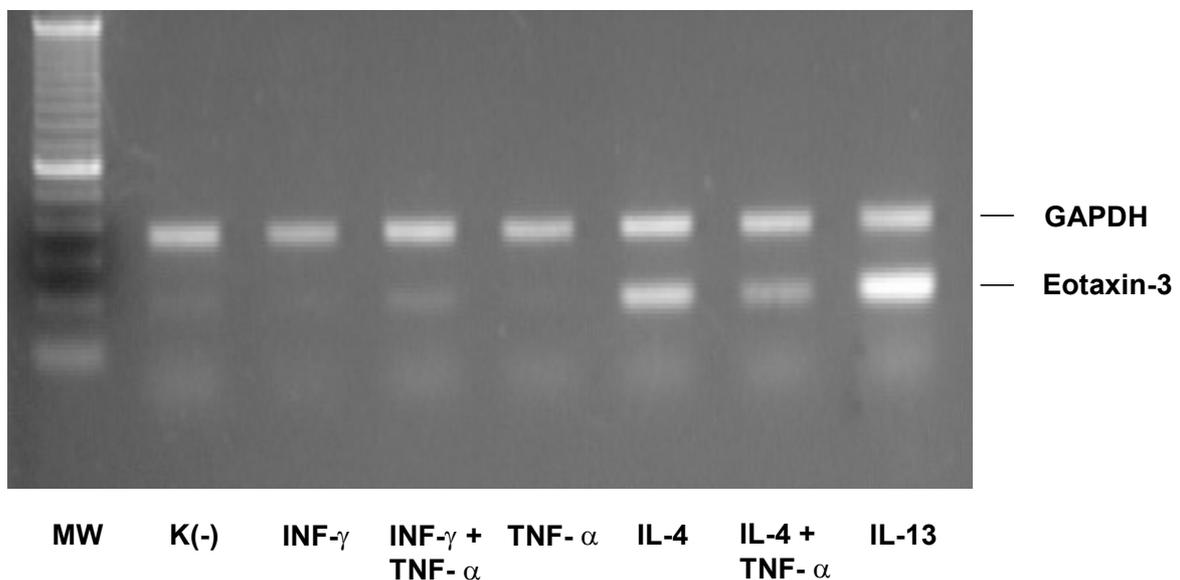


Abbildung 3.11 Expression von Eotaxin-3 mRNA relativ zu GAPDH in kultivierten primären menschlichen Keratinozyten.

Eotaxin-3 mRNA-Expression in kultivierten Keratinozyten nach Behandlung der Zellen mit Zytokinen wie angezeigt für 24 Stunden (TNF- α 30 ng/ml; IFN- γ 20ng/ml; IL-4 und IL-13 5ng/m), im Vergleich zur mRNA-Expression von GAPDH dargestellt mittels semi-quantitativer RT-PCR.

Die Kostimulation mit TNF- α und IFN- γ lieferte das gleiche Ergebnis. Eine

Kostimulation mit TNF- α und IL-4 konnte ebenfalls die mRNA-Expression von Eotaxin-3 nicht stärker induzieren als die Stimulation mit IL-4 allein. Die Kostimulation hat im Gegenteil zu Eotaxin-1 eher einen negativen Einfluss auf die mRNA-Expression von Eotaxin-3.

3.4 Regulierung des Eotaxin-1-Promotors

Eosinophile spielen eine zentrale Rolle bei der Immunpathologie allergischer Erkrankungen. Eine der stärksten IL-4 regulierten Rekrutierungsfaktoren für Eosinophile ist das CC-Chemokin Eotaxin-1. IL-4 führt in kultivierten dermalen Fibroblasten dosisabhängig zu einer Hochregulierung der Eotaxin-1-mRNA Expression innerhalb von einer Stunde, die sich über einen Zeitraum von 48 Stunden stabil zeigte {Mochizuki, Bartels, et al. 1997 4602 /id}. TNF- α und IL-4 zusammen stimulieren synergistisch die Eotaxin-1-mRNA-Expression. Dieser Befund war auch auf Proteinebene deutlich nachzuweisen {Mochizuki, Bartels, et al. 1998 6651 /id} und führte zu einer Ausbeute von bis zu 40 μ g reinem Eotaxin-1 aus Überständen von 10^8 Fibroblasten.

Betrachtet man die Sequenz des Eotaxin-1-Promotors {Hein, Schlüter, et al. 1997 5761 /id}, so fällt in der Nähe des Transkriptionsstarts eine Stat6-Konsensussequenz auf, die mit einer NF κ B-Konsensussequenz überlappt (siehe Abbildung 3.12). Dieser Teil des Promotors sollte näher untersucht werden.

```

2101 CAGGAATCAA GGAAGGTTCT TAGATCGACT CATCCCCCAG GCCTTTGGTT TCCTTGCTCC
2161 TTTCCCCGAC TACAGGTGTT TCATTTCAAC TCATCCCCTA GGGCCTTGGT TTTCTTGCTC
2221 TCTTCCCCCA CTACAGATGT TTAAC TTCAT TTAAC TTCATAACCA CATATTCCCC TCCTTTTCCA
2281 AGGCAAGATC CAGATGGATT AAAAAATTGTA CCAAGTCCCT CCTACTAGTC TTGCCTCTCT
2341 TCTGTTCTGC TTGACTTCCT AGGATCTGGA ATCTGGTCAG CAATCAGGAA TCCCTTCATC
2401 GTGACCCCGC ATGGGCAAAG GCTTCCCTGG AATCTCCAC ACTGTCTGCT CCCTATAAAA
                               Stat6   NFκB
2461 GGCAGGCAGA TGGGCCAGAG GAGCAGAGAG GCTGAGACCA ACCCAGAAAC CACCACCTTC

```

Abbildung 3.12 Ausschnitt aus der Sequenz des Eotaxin-1-Promoters.

Der Teil, der für die Reporterexperimente verwendet wurde, ist grau unterlegt. Die Konsensussequenzen für Stat6 und NFκB sind durch Einrahmung markiert. Kursiv dargestellte Nukleotide kennzeichnen den 3'untranslatierten Teil des Exon 1, der sich unmittelbar an die Promoterregion anschließt. Dunkelgrau unterlegt erkennt man die TATA-Box des Eotaxin-1-Promoters.

Die Experimente wurden mit dermalen Fibroblasten und A549-Zellen durchgeführt. Die Experimente wurden in dermalen Fibroblasten und A549-Zellen durchgeführt. Die beiden Zelltypen sind erstens beispielhaft aus einem Gewebe, das bei allergischen Erkrankungen unterschiedlicher Ausprägung betroffen ist. A549-Zellen sind Epithelzellen aus der Lunge (Asthma) und dermale Fibroblasten stammen aus dem Gewebe der Haut (atopische Dermatitis). Zweitens handelt es sich bei den Fibroblasten im Gegensatz zu A549-Zellen um eine Primärzelllinie, so dass durch die Transformation bei Zelllinien möglicherweise entstandene Effekte in diesem Fall ausgeschlossen werden können. Außerdem ist bekannt, dass sowohl Lungenepithelzellen als auch Fibroblasten Eotaxin-1 segregieren.

3.4.1 Die Bindung von Stat6 und NFκB-p65 an den Eotaxin-1-Promoter

Für den Nachweis, ob durch IL-4 aktiviertes Stat6 und durch TNF-α aktivierte NFκB-Faktoren (p50/p65) an den Eotaxin-1-Promoter binden können, wurden Experimente mit an Magnetkügelchen gekoppelter Eotaxin-1-Promoter-DNA durchgeführt.

Die Kügelchen wurden mit verschiedenen Kernextrakten aus Fibroblasten oder A549-Zellen inkubiert. Die Zellen waren vor der Extraktpräparation entweder unstimuliert, mit IL-4, TNF-α oder beiden Faktoren stimuliert worden. Nachdem durch mehrere Waschschrte unspezifisch gebundene Proteine entfernt worden waren,

wurden die noch gebundenen Proteine, potenzielle Transkriptionsfaktoren, durch Elution mit einem Hochsalzpuffer eluiert. Die Eluate wurden mit Hilfe der SDS-PAGE/Immunoblot-Analyse auf Stat6, NF κ B-p50 und NF κ B-p65 untersucht. Die Funktion der Antikörper wurde an Zellextrakten überprüft (nicht gezeigtes Experiment).

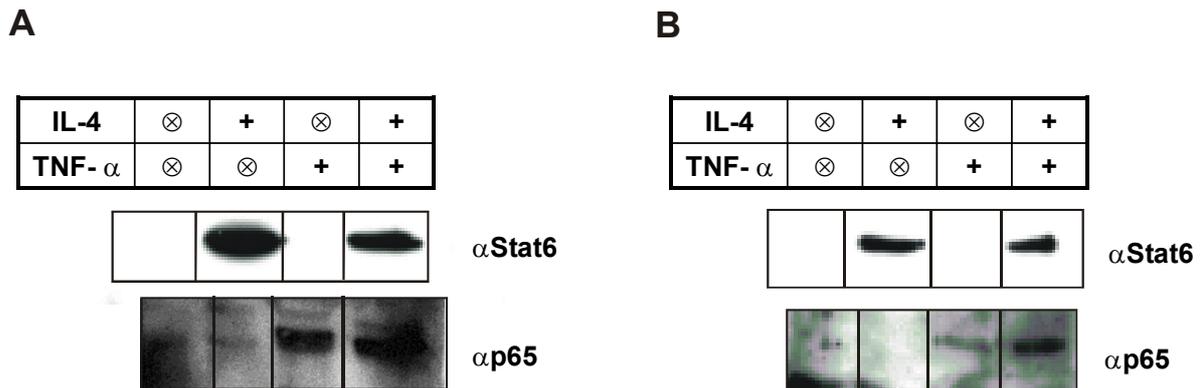


Abbildung 3.13 Bindung von Stat6 und NF κ B-p65 an den Eotaxin-1-Promoter.

Bindende Proteine wurden mit Hilfe von Eotaxin-1-Promotor-DNA-Magnetkugeln aus Kernextrakten isoliert. Die Kernextrakte wurden aus (A) A549 und (B) dermalen Fibroblasten gewonnen. Die Zellen waren 30 min mit oder ohne IL-4 und/oder TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/ml inkubiert worden. Die Proteine wurden mit SDS/PAGE-Immunoblot-Analyse nachgewiesen.

In unstimulierten Kernextrakten von A549-Zellen oder dermalen Fibroblasten konnte keine Wechselwirkung der untersuchten Faktoren mit der Eotaxin-1-Promotor-DNA festgestellt werden. Aus mit IL-4 stimulierten Kernextrakten band Stat6 an die Promotor-DNA. Die Bindung von NF κ B-p65, nicht aber von NF κ B-p50, konnte aus TNF- α stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Wurden die Zellen mit beiden Zytokinen stimuliert, konnten Stat6 und NF κ B-p65 detektiert werden.

3.4.2 Eotaxin-1-Promoter-Reportergen-Analysen

Da IL-4 aktiviertes Stat6 und TNF- α aktiviertes p65 an die Eotaxin-1-Promotor-DNA binden, war die nächste Fragestellung, ob sie auch eine Genregulation ermöglichen. Die faktorabhängige Genregulation wurde mit Reportergenassays untersucht. Ein 125 bp Element (siehe Abbildung 3.12) aus dem Eotaxin-1-Promoter wurde in zwei

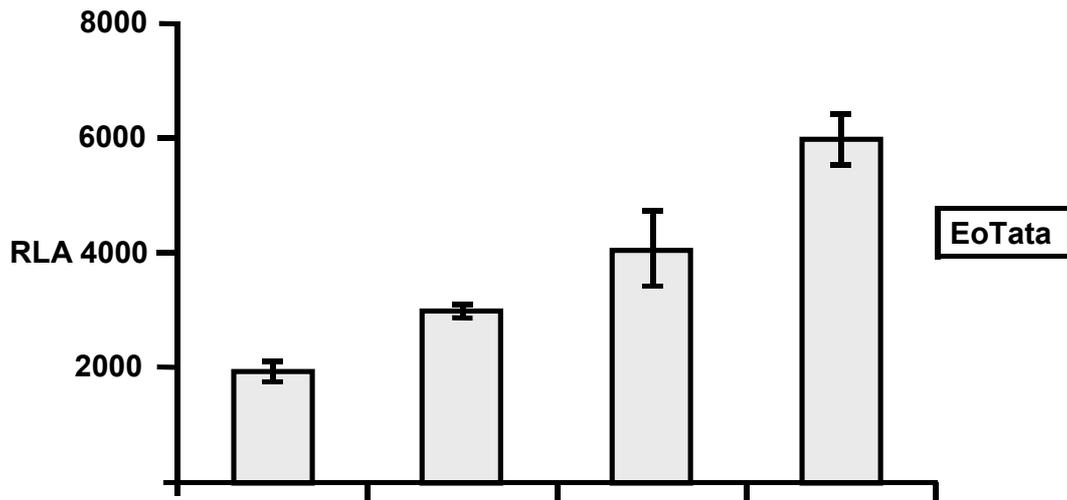
unterschiedliche Reporterplasmide kloniert. EoTATALuc+ enthält einen TATAbox-Minimalpromoter, während es sich bei EoLuc+ um das entsprechende promoterlose Reporterplasmid handelt.

3.4.3 Interleukin-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promoter in A549-Zellen

Durch Elektroporation wurden die Plasmide in A549-Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h ohne oder mit 10 ng/ml Konzentration IL-4 und/oder TNF- α für 6 h stimuliert. Die Reporterogenaktivität wurde in einem Luminometer gemessen und ist als Relative Luciferase Aktivität (RLA) angegeben.

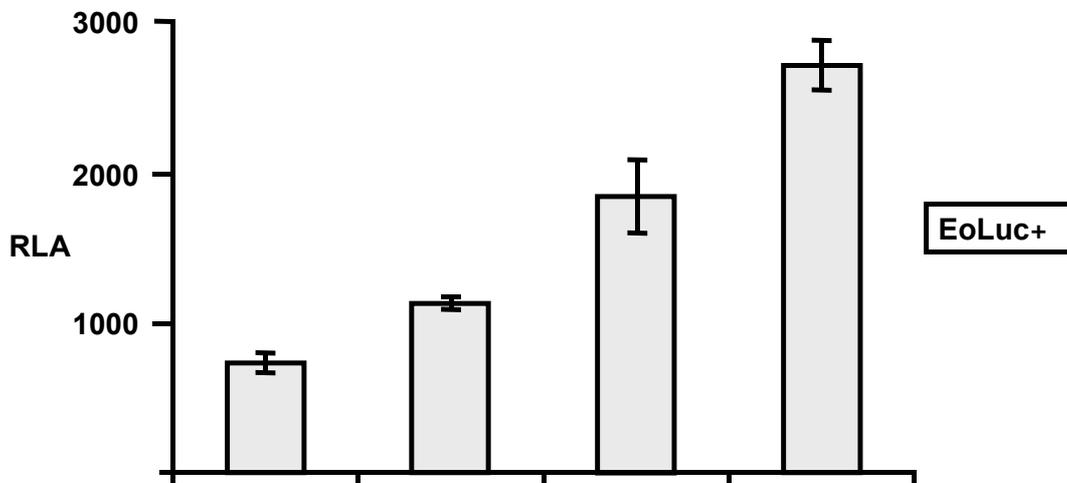
Die Insertion des Eotaxin-1Promotorabschnitts in die Vektoren EoTata und EoLuc+ vermittelte eine von IL-4 und TNF- α abhängige Stimulierbarkeit der Plasmide. Der promoterlose Vektor EoLuc+ zeigte eine stärkere Aktivierung und etwas bessere, aber vergleichbare Induktion. Interleukin-4 vermittelte eine etwa 1,5-fache und TNF- α eine 2,5-fache Induktion. IL-4 und TNF- α zusammen konnten eine 3,5-fache Induktion vermitteln.

A



| | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| IL-4 | - | - | + | + |
| TNF-α | - | + | - | + |

B



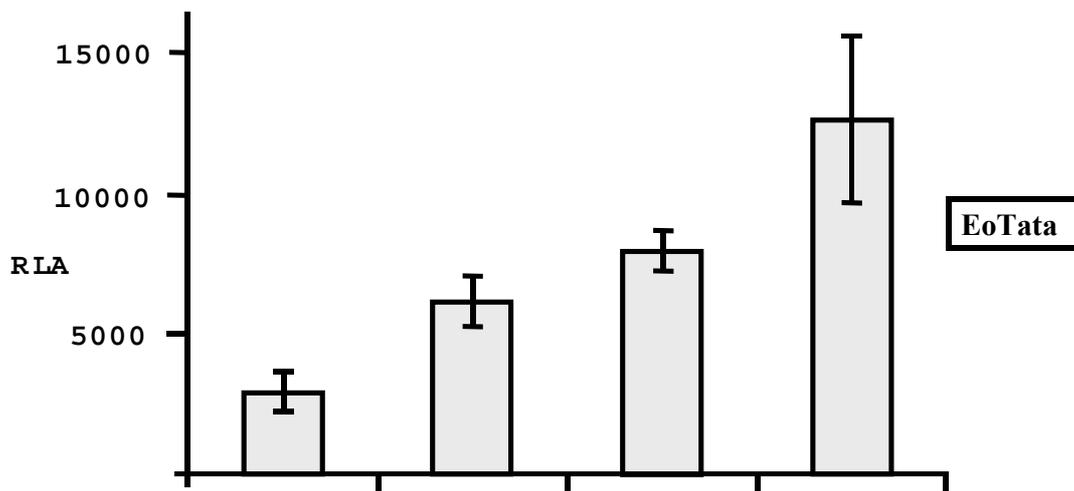
| | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| IL-4 | - | - | + | + |
| TNF-α | - | + | - | + |

Abbildung 3.14 Reporterassays mit den Plasmiden EoTata (A) und EoLuc+ (B) in A549-Zellen.

Die Zellen wurden mit dem angegebenen Eotaxin-1-Promoterkonstrukt transient transfiziert und nach 12 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6 h inkubiert. Gezeigt sind zwei repräsentative Experimente. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

3.4.4 IL-13 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promoter in A549-Zellen

Es ist bekannt, dass Interleukin-13, wie Interleukin-4, Stat6 aktiviert und bei der Pathologie von Asthma eine besondere Rolle spielt. Ob IL-13 auch den Eotaxin-1-Promoter aktiviert, wurde mit Reportergergenassays in A549-Zellen untersucht.



| | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| IL-13 | - | - | + | + |
| TNF-α | - | + | - | + |

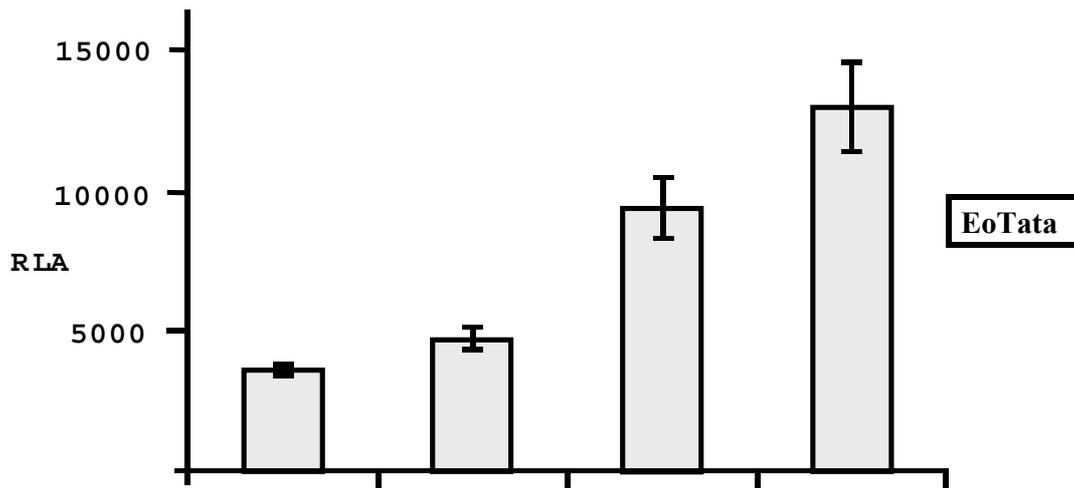
Abbildung 3.15 Reportergergenassay von EoTata in A549-Zellen.

Die Zellen wurden mit EoTata transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-13 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

IL-13 aktivierte den Eotaxin-1-Promotor des Reportergergenplasmids EoTata in einer IL-4 vergleichbaren Weise mit einer 2-fachen und in der Kostimulation mit TNF- α einer 4-fachen Induktion.

3.4.5 IL-4 und TNF- α aktivieren den Eotaxin-1-Promoter in primären dermalen Fibroblasten

Auch Versuche, bei denen die Reporterplasmide in dermale Fibroblasten transfiziert wurden, zeigten ein ähnliches Ergebnis.



| | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|---|
| IL-4 | - | - | + | + |
| TNF-α | - | + | - | + |

Abbildung 3.16 Reporteragenassay von EoTata in dermalen Fibroblasten.

Die Zellen wurden mit EoTata transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Wie in Abbildung 3.1.7 gezeigt, aktivieren sowohl IL-4 als auch TNF- α den Eotaxin-1-Promotor. IL-4 erhöhte die Luciferaseexpression um den Faktor 1,4 - 3, TNF- α um das 1,5 - 2,5 und beide Zytokine um das 3-4-Fache.

3.4.6 Mutagenese der Konsensussequenzen

Um die spezifische Aktivierung von Stat6 bzw. NF κ B-p65 des Eotaxin-1-Promoters zu verifizieren, wurde die Konsensussequenz in den Reporterplasmiden mittels

Mutation zerstört (siehe Punkt 2.8.3) und eine vermutete Änderung der Promoteraktivität näher untersucht. Die Mutationen wurden so gewählt, dass eine selektive Störung der Konsensussequenzen gewährleistet war.

WT



EoST6

GGC**AAG**CCTGGAATCTCCCACA

EoNFκB

GGCTTCCCTGGAAT**GGAA**CACA

EoM1

GGC**AG**CCCTGGAATCTCCCACA

EoM2

GGCTTCCCTGGAATCT**GGG**ACA

Abbildung 3.17 Mutierte Eotaxin-1-Promotorfragmente.

Zur Klärung der Rolle der NFκB- und Stat6-Bindungsstellen wurden diese durch Mutationen gezielt verändert. EoTata=EoLuc+=wt, EoSt6, EoNFκB, EoM1 und EoM2. Mutationen in den mutierten Konsensussequenzen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Zur Zerstörung der Stat6-Konsensussequenz wurde die Basenfolge TTC in TAG (M1) oder AAG (St6) mutiert. Die NFκB-Konsensussequenz wurde durch Austausch des Motivs CCC gegen GGG (M2) oder des Motivs CTCC gegen GGAA (NFκB) verändert.

3.4.7 Mutagenese der Konsensussequenzen zerstört den Eotaxin-1-Promotor

Mit den Plasmiden EoSt6 und EoNFκB, bei denen der EoTata-Vektor die in Abbildung 3.17 beschriebenen Mutationen enthält, wurden Reporteranalysen in A549-Zellen durchgeführt.

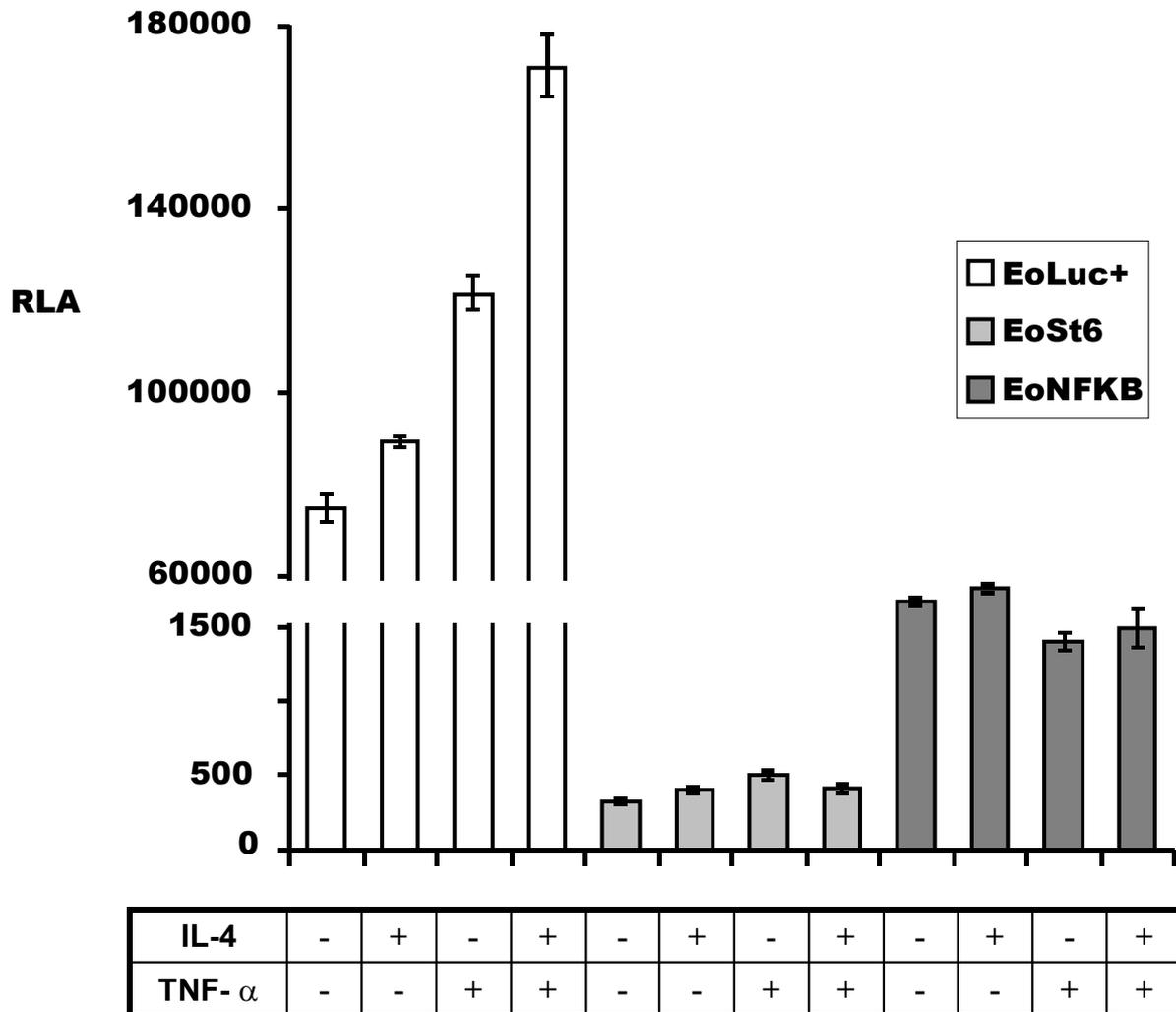


Abbildung 3.18 Reporteragenassay von EoLuc+, EoSt6 und EoNFkB in A549.

Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6 h inkubiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

In dem Experiment konnte keine IL-4- oder TNF- α -abhängige Induzierbarkeit mehr nachgewiesen werden. Außerdem war die Luciferaseexpression in den Plasmiden, die Mutationen im Eotaxin-1-Promotorfragment enthielten (EoST6, EoNFkB), durch die Zerstörung des Promotors stark herabgesetzt.

Da Matsukura et al. (1999) bei gezielter Mutagenese des Eotaxin-1-Promotors in BEAS-2B-Zellen eine selektive Zerstörung der IL-4 oder TNF- α abhängigen Induzierbarkeit beobachteten, wurden die nach ihrer Vorgabe entsprechend mutierten Reporterplasmide EoM1 und EoM2 (Abb. 3.16) hergestellt. Die Reporterplasmide wurden in A549-Zellen (Abb. 3.19) und dermale Fibroblasten (Abb.

3.20) transient transfiziert und die IL-4/TNF- α abhängige Luciferaseexpression untersucht.

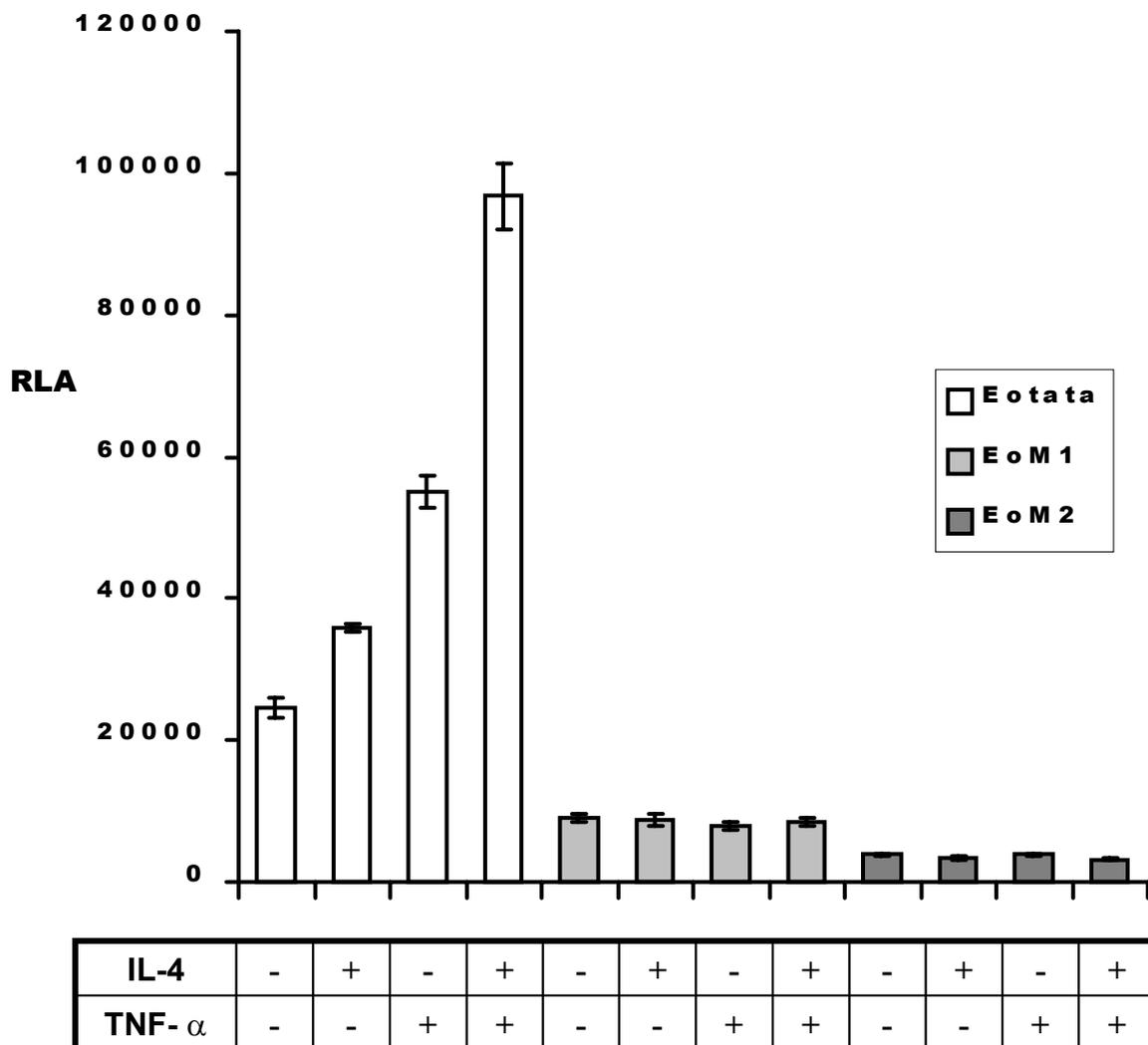


Abbildung 3.19 Reporteragenassay von EoTata, EoM1 und EoM2 in A549-Zellen.

Die A549-Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

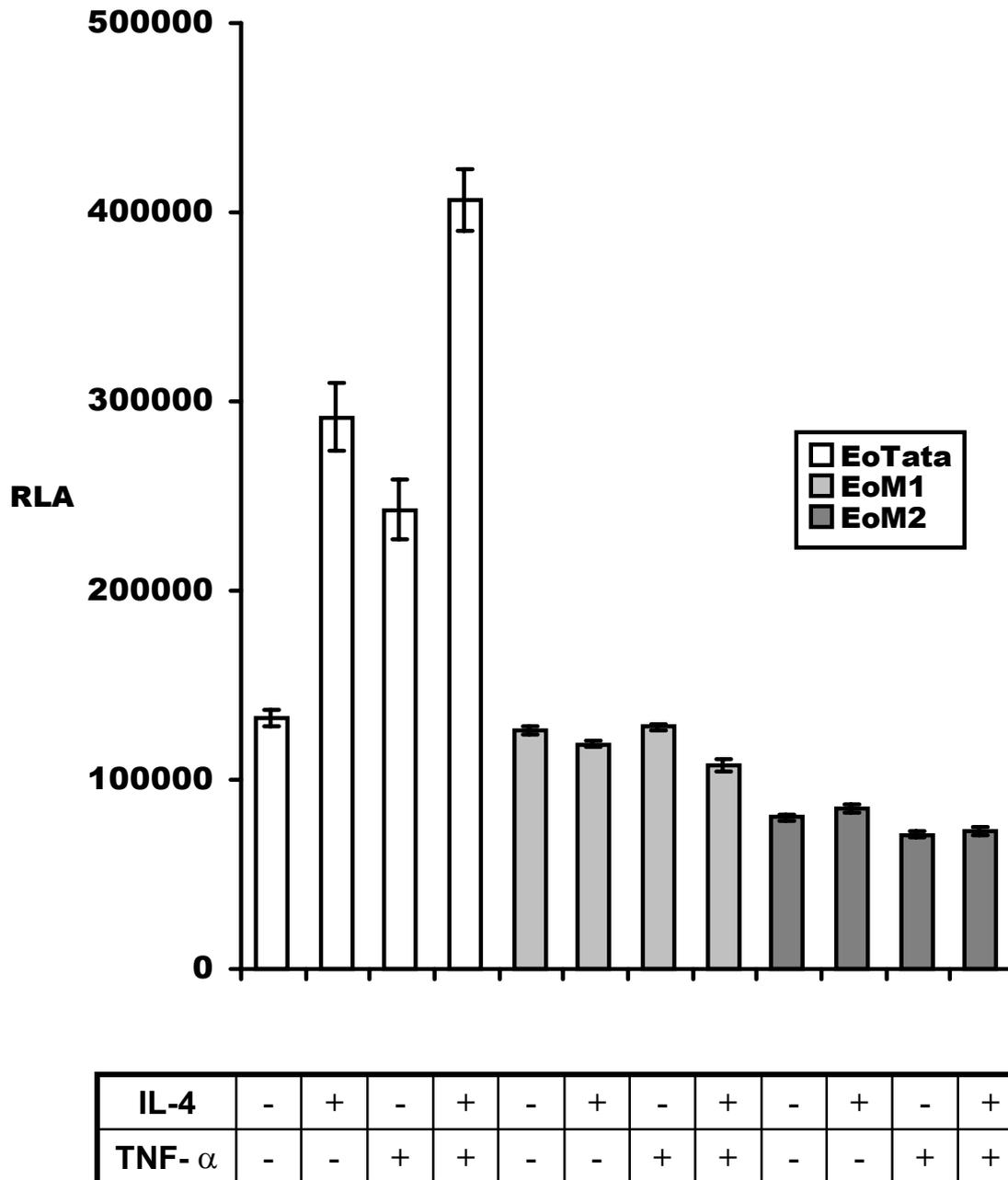


Abbildung 3.20 Reporter genassay von EoTata, EoM1 und EoM2 in Fibroblasten.

Die Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert und nach 24 h mit oder ohne IL-4 (10 ng/ml) und/oder TNF- α (10 ng/ml) für 6h inkubiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Auch diese Mutationen zerstörten die IL-4 oder TNF- α abhängige Induktion unselektiv in A549-Zellen und Fibroblasten. Das Ergebnis unterscheidet sich von dem nach Matsukura et al., die eine selektive Ausschaltung der IL-4- bzw. TNF- α -Induktion beobachteten (Matsukura et al., 1999).

3.5 Regulation des MCP-4-Promotors

Der neben den Eotaxinen wirkungsvollste Rekrutierungsfaktor für Eosinophile ist das MCP-4. Dieses CC-Chemokin aktiviert wie die Eotaxine den Chemokinrezeptor CCR-3. Die Expression von MCP-4 wird im Gegensatz zu Eotaxin-1 durch das Th1-Zytokin IFN- γ hochreguliert. Im Gegensatz zu dem Eotaxin-1-Promoter weist der MCP-4-Promoter kein Stat6-Respons-Element (TTCNNNGAA) auf, sondern ein Stat1/5-Response Element (auch GAS-Element genannt), bei dem das TTC-GAA-Motiv durch drei beliebige Basen getrennt ist. Es ist anzunehmen, dass es sich hier um ein regulatorisches Element handelt, das durch Bindung von IFN- γ aktiviertem Stat1 gesteuert wird.

```

841  TCTGTCTCTA CGGGAGTGAA TTTTCATTGT TTTTCTCTTT CCTGTTGGAG AAAGTAAGAA
901  GAAAACAGCG CCTTTATGGC TTCCCATGGT GAATGGCTGG GGCGCGTCTG TGTCCTGTGC
961  TCCTCTCTGG CTCCTTGTGG CCTGAACAGC CAGAAGGAAG CCATGCCATG CTGTTTCAGC
1021 CCTCAGCTTC CCTCTTGCAT TTCCTAGAAA AGTCTTTGGT GCCCAGCTCC AGCTCAGCAG
      Stat1/5
1081 ATTCAGGATC CCCCTTCATC ATGACTTGGT CAACGCCCTG CTCAGGCCAA GGTCTCTGA
      NFkB
1141 GAGTTCCAAG CTTCTCCACT CCCATATAAAA GGCCGGCGGA ACAGCCAGAG GAGCAGAGAG
1201 GCAAAGAAAC ATTGTGAAAT CTCCAACCTCT TAACCTTCAA CATGAAAGTC TCTGCAGTGC

```

Abbildung 3.21 Ausschnitt aus der Sequenz des MCP-4-Promotors.

Der Teil, der für die Reporterexperimente verwendet wurde, ist grau unterlegt. Die Konsensussequenzen für Stat1/5 und NF κ B sind durch Einrahmung markiert. Kursiv dargestellte Nukleotide kennzeichnen den 3' untranslatierten Teil des Exon 1, der sich unmittelbar an die Promoterregion anschließt. Dunkelgrau unterlegt erkennt man die TATA-Box des MCP-4-Promotors.

3.5.1 Interferon- γ aktiviert den MCP-4-Promoter in A549-Zellen

Für eine Untersuchung der Regulation des MCP-4-Promotors zu studieren, wurde ein 198 bp langes Fragment aus dem MCP-4-Promoter in den TATALuc+ Vektor kloniert (siehe Punkt 2.8.2). Der so entstandene Vektor MCP4TATALuc+ enthielt zusätzlich zu dem MCP-4-Promoterfragment noch einen TATA-Box-Minimalpromoter. Durch Elektroporation wurden die Plasmide in A549-Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h ohne oder mit 10, 50 oder 100 ng/ml Konzentrationen IFN- γ für 6 h stimuliert.

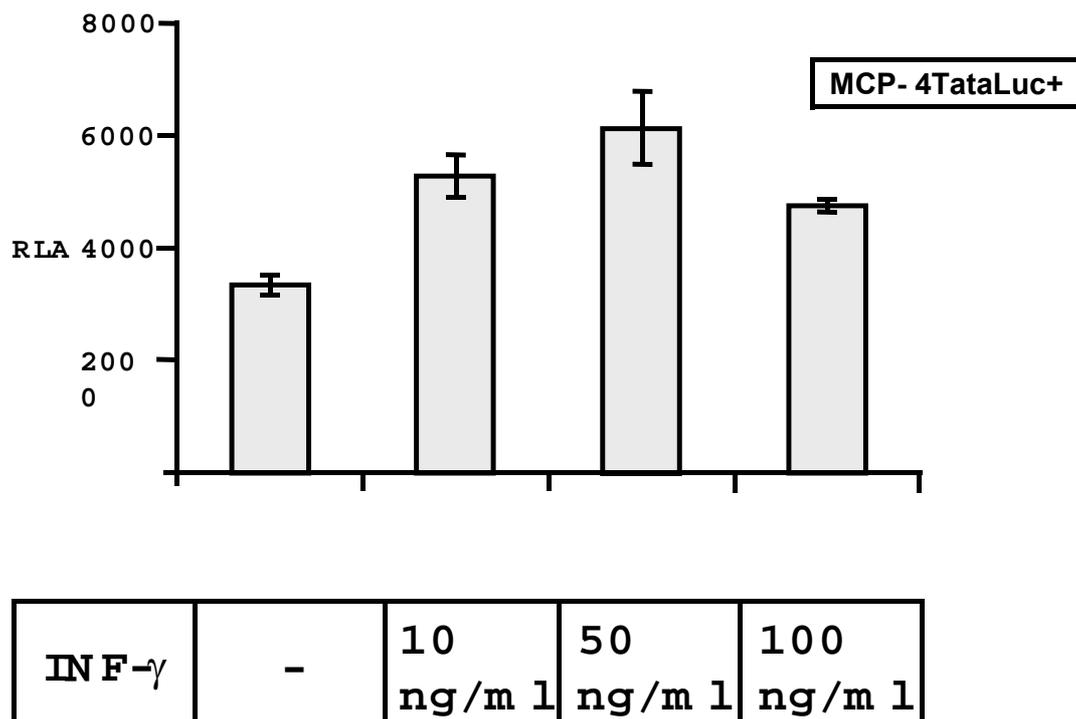


Abbildung 3.22 Reporterassays von MCP-4sfTata in A549-Zellen.

Die Zellen wurden mit dem angegebenen Promotorkonstrukt transfiziert und nach 12 h mit IFN-g in den angegebenen Konzentrationen für 6 h inkubiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment. Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung wieder.

Das MCP-4-Promoterfragment vermittelte eine etwa zweifache Induzierbarkeit durch IFN- γ .

3.5.2 IL-4 aktiviert den MCP-4-Promotor in A549-Zellen nicht

Durch Elektroporation wurde das Plasmid MCP-4sfTata in A549-Zellen transfiziert und die Zellen nach 12 h mit steigenden Konzentrationen von IL-4 stimuliert. IL-4 hatte in den Experimenten keinen Einfluss auf die Promoteraktivität.

4 Diskussion

4.1 Expression eosinophil-chemotaktischer CC-Chemokine

4.1.1 Untersuchung der Eotaxin-1-mRNA-Expression

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Ergebnissen, die mittels Amplifikation von Eotaxin-1-mRNA, verglichen mit der von GAPDH-mRNA ermittelt wurden, und dem Vorkommen von potenziellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Eine konstitutive Eotaxin-1-Genexpression wurde in Geweben aus Uterus, Luftröhre, Dünndarm, Niere, Bauchspeicheldrüse, Dickdarm, Herz und Milz nachgewiesen, im Gegensatz zu Geweben aus Lunge, Muskel, Gehirn, Schilddrüse und Speicheldrüse (Garcia-Zepeda et al., 1996; Kitaura et al., 1996; Ponath et al., 1996). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Eotaxin-1-mRNA-Expression anscheinend gewebe-spezifische eigenschaften aufweist.

Während in unbehandelter Haut keine Eotaxin-1-mRNA-Expression und in unstimulierten wie in stimulierten Keratinozyten (Zellkultur primärer humaner Keratinozyten) nur eine schwache Expression nachzuweisen war, konnte eine deutliche Eotaxin-1-Expression bei der Keratinozyten Zelllinie HaCaT (siehe Abbildung 3.5) (Boukamp et al., 1988) und in dermalen Fibroblasten (siehe Abbildung 3.5) (Bartels et al., 1996) nach Stimulierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Expression von Eotaxin-1 von der Art des Stimulus und der Art des Gewebes abhängig ist, einschließlich einer unterschiedlichen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Koyama et al., 1998).

Mit Hilfe der SQRT-PCR konnte eine geringfügige Expression von Eotaxin-1-mRNA in dermalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Diese mRNA-Expression wurde durch die Stimulation durch TNF- α und IL-1 α innerhalb von 6 Stunden hochreguliert (Bartels et al., 1996). Eine Langzeitstimulation mit TNF- α von 48h führte zu einem weiteren Anstieg der Eotaxin-1-mRNA-Expression, wohingegen die IL-1 α induzierte Eotaxin-1 mRNA Akkumulation transient erscheint. Der Befund, dass der Nachweis

von Eotaxin-1 auf Proteinebene erst nach relativ langer Zeit der Stimulierung (48-72 Std.) mit TNF- α in Überständen humaner dermaler Fibroblasten nachweisbar war (Noso et al., 1996), korreliert eindeutig mit den oben beschriebenen Ergebnissen der SQRT-PCR-Experimente. Dabei bleibt unklar, welche Mechanismen für den Anstieg der Eotaxin-1-mRNA-Expression bei längerer Stimulation mit TNF- α verantwortlich sind.

Es konnte bereits bei IL-8 (Mukaida et al., 1990; Yasumoto et al., 1992) und weiteren Chemokinen (Anisowicz et al., 1991; Ueda et al., 1994; Wu et al., 1994) gezeigt werden, dass die entsprechende Genexpression nach Stimulierung mit TNF- α über den Transkriptionsfaktor NF κ B vermittelt wurde.

In der Promoterregion des Eotaxin-1-Gens wurde an der Position -68, ausgehend vom Startpunkt der Transkription, eine potenzielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B mit der Sequenz (GGAATCTCCC) entdeckt, der um eine Base von der Konsensussequenz (GGGRRTYYC) abweicht, jedoch identisch mit der NF κ B-Bindestelle im IL-8 Promoter ist, dessen Funktion nachgewiesen wurde (Mukaida and Matsushima, 1992).

Während IFN- γ alleine nicht in der Lage war, die Eotaxin-1-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten zu stimulieren, konnte durch die Kombination mit TNF- α die Expression von mRNA synergistisch verstärkt werden. Dieser synergistische Effekt konnte dabei sowohl in dermalen Fibroblasten (Bartels et al., 1996) als auch in Lungen-Epithelzellen (Lilly et al., 1997) und in Endothelzellen (Garcia-Zepeda et al., 1996) beobachtet werden. Diese Beobachtungen decken sich mit Beschreibungen über Versuche mit weiteren Zytokinen. So führt eine gleichzeitige Stimulation mit TNF- α und IFN- γ zur Produktion von IL-8, vermittelt über Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B (Yasumoto et al., 1992), die sich ebenfalls beide im Promoter des Eotaxin-1-Gens befinden.

Allergische und atopische Hauterkrankungen sowie Infektionen, die durch Parasiten hervorgerufen werden, haben das Auftreten von Th2-Lymphozyten und Eosinophilen in der Haut gemeinsam. Da Th2-Lymphozyten anscheinend keine Wirkstoffe produzieren, die auf Eosinophile chemotaktisch wirken, ergab sich die Frage, ob das TH2 Zytokin IL-4 für die Induktion von dermalen Fibroblasten in Frage kommt.

In kultivierten dermalen Fibroblasten konnte eine dosisabhängige Hochregulierung der Eotaxin-1-mRNA-Expression innerhalb von einer Stunde nachgewiesen werden, die über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden anhielt (Mochizuki et

al., 1998). An mehreren Beispielen wurde gezeigt, dass die Induktion von mRNA-Expression nach Stimulierung mit IL-4, durch den Transkriptionsfaktor Stat6 vermittelt wurde (Curiel et al., 1997); (Linehan et al., 1998); (Ohmori et al., 1996).

TNF- α und IL-4 zusammen stimulieren synergistisch die Expression vom Eotaxin-1 mRNA. Dieser Befund war auch auf Proteinebene deutlich nachzuweisen (Mochizuki et al., 1998). Durchaus vergleichbare Ergebnisse wurden für ein weiteres TH2-Zytokin IL-13 beschrieben (Mochizuki et al., 1997). Die Kooperation von Transkriptionsfaktoren aus der Stat-Familie (Stat1, Stat6) und der NF κ B-Familie (p50, p65) ist bekannt und beschrieben (Stutz and Woisetschlager, 1999); (Shen and Stavnezer, 1998). Die direkte Wechselwirkung konnte dabei nur für Stat6 gezeigt werden (Shen and Stavnezer, 2001). Im Promoter des Eotaxin-1-Gens wurde eine sich überlappende Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren NF κ B und Stat6 an der Stelle -74 ausgehend vom Startpunkt der Transkription entdeckt (siehe Abbildung 3.2) (Hein et al., 1997), die eine mögliche Erklärung für die Stimulation durch IL-4 und TNF- α sowie ihren synergistischen Effekt auf die Eotaxin-1-Genexpression liefert.

Diese hier aufgeführten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine gezielte Infiltration eosinophiler Granulozyten bei TH2 vermittelten Hauterkrankungen wie atopische Dermatitis, allergische Reaktionen oder Infektionen der Haut, hervorgerufen durch Parasiten, auf eine Produktion von Chemoattraktantien, die spezifisch auf Eosinophile wirken, durch dermale Fibroblasten zurückzuführen sein könnte.

Die Tatsache, dass Mastzellen und Basophile sowohl IL-4 als auch IL-13 in der Haut freisetzen (Knol et al., 1996); (Leung, 1995), lässt die Vermutung zu, dass eine Infiltration von Eosinophilen in die Haut nach Aktivierung dieser Zellen auf eine IL-4 bzw. IL-13 bedingte Eotaxin-1-Ausschüttung von dermalen Fibroblasten beruht.

4.1.2 Untersuchung der Eotaxin-3-mRNA Expression

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in Zellen, die mit TNF- α stimuliert werden, die Induktion von mRNA induziert (McDonald et al., 1997) (Mukaida et al., 1990). Die CC-Chemokine Eotaxin-1 und MCP-4 besitzen je eine NF κ B-Bindestelle in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box. Beide Chemokine sind mit TNF- α gut induzierbar. Eotaxin-3 dagegen wird nur sehr schwach induziert (siehe Abbildung 3.10).

Der IFN- γ Signalweg wird unter anderem über GAS-Elemente vermittelt (Yamada et

al., 1997), die in den Promotoren von Eotaxin-1 und MCP-4 zu finden sind. Eotaxin ist mit IFN- γ nur schwach induzierbar, MCP-4 (4 GAS-Elemente im Promoterbereich bis 1000 bp) dagegen ist induzierbar, was auch in Reporter-gen-Assays gezeigt werden konnten (siehe Abbildung 3.22).

Die Tatsache, dass weder TNF- α noch IFN- γ eine Induktion von Eotaxin-3-mRNA hervorrufen konnten, hängt möglicherweise damit zusammen, dass es im Bereich der ersten 1000 bp vom Startpunkt der Transkription des Eotaxin-3 Gens keine potenziellen Bindungsstellen für NF κ B- und GAS-Elemente gibt.

Beim Vergleich der Genexpression der Eosinophil0-chemotaktischen CC-Chemokine Eotaxin-3, Eotaxin-1 und MCP-4 stellte sich heraus, dass die mRNA-Expression von Eotaxin-3, im Unterschied zu den anderen genannten Chemokinen, nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in Keratinozyten von IL-4 und IL-13 signifikant induzierbar ist. Der IL-4-/IL-13-Signalweg wird über den Transkriptionsfaktor Stat6 vermittelt (Curiel et al., 1997). Der Eotaxin-3-Promoter besitzt an der Stelle -62/-71 eine potentielle Bindestelle für Stat6. Diese potentielle Bindestelle lässt auf die Induktion durch IL-4/IL-13 schließen. Die Tatsache, dass Eotaxin-3-mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-4 auch in Keratinozyten induzierbar ist, wirft die Frage auf, warum Eotaxin-1 unter gleichen Bedingungen in Keratinozyten nicht induzierbar ist.

Zu den hier dargestellten Ergebnissen kommt auch die Arbeitsgruppe Hoeck und Woisetschlager, die ebenfalls RT-PCR-Experimente mit stimulierten primären dermalen Fibroblasten durchgeführt haben (Hoeck and Woisetschlager, 2001). Die Stimulation mit den TH2-Zytokinen IL-4 und IL-13 führten auch hier dosis- und zeitabhängig zu einer signifikanten Induktion der Eotaxin-3-mRNA-Expression. Zusätzlich konnten sie diesen Befund auch auf Proteinebene zeigen.

Induktion mit TNF- α führte auch hier nicht zu einer signifikanten Induktion. Ein synergistischer Effekt bei der gleichzeitigen Stimulierung mit TNF- α und IL-4, konnte auch in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Mit ihrer Arbeit konnten Hoeck und Woisetschlager auch die Stat6 vermittelte Aktivierung des Eotaxin-3-Promoters durch Stimulierung mit IL-4/IL-13 mittels Reporter-genanalysen und durch den Nachweis des Transkriptionsfaktors im Immunoblot klar aufzeigen.

4.1.3 Untersuchung der MCP-4 mRNA Expression

Im Gegensatz zu Eotaxin-1 ist die Rolle, die MCP-4 bei Erkrankungen der Haut und der Atemwegsorgane spielt, bis heute weniger genau definiert. Wegen seiner eosinophil-chemotaktischen Eigenschaften (Berkhout et al., 1997); (Garcia-Zepeda et al., 1996); (Mochizuki et al., 1998); (Uguccioni et al., 1996) ist das β -Chemokin MCP-4 ein weiterer Kandidat, welcher neben Eotaxin-1 möglicherweise an der Akkumulation von Eosinophilen beteiligt ist. Diese Überlegung war der Grund dafür, MCP-4 genauer zu studieren (Hein et al., 1999) und seine Genexpression im Vergleich mit der Genexpression von Eotaxin-1 zu untersuchen.

Die Stimulierung mit $\text{TNF-}\alpha$ führte zu einer Induktion der MCP-4-mRNA in den dermalen Fibroblasten (siehe Punkt 3.3.3). Untersuchungen mit der Lungen-Epithelzelllinie A549 lieferten das gleiche Ergebnis (Lamkhioued et al., 2000). Auch hier führte eine Stimulierung mit $\text{TNF-}\alpha$ zu einer Induktion der MCP-4-mRNA-Expression. In einer humanen Monozytenzelllinie konnte ebenfalls eine Induktion der MCP-4 mRNA-Expression nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ nachgewiesen werden (Nakamura et al., 1998). Diese Beobachtungen zeigen, dass die Expression von MCP-4 nicht nur in der Haut, sondern auch in anderen Geweben (Lunge, Blut) auftritt.

MCP-4 wird in dermalen Fibroblasten durch IL-4 alleine transkriptionell hochreguliert. Wie schon unter Punkt 4.1.1 aufgeführt, wird die Induktion von mRNA-Expression nach Stimulierung mit IL-4 durch den Transkriptionsfaktor Stat6 vermittelt (Ohmori et al., 1996), der auch im distalen Bereich des Eotaxin-1 und des MCP-3- Promoters zu finden ist (Opdenakker et al., 1994). Da MCP-4 keine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Stat6 aufweist, aber trotzdem durch IL-4 induzierbar ist, gibt es beim MCP-4 möglicherweise einen anderen Weg der Induktion, der bisher nicht beschrieben wurde.

Bei allen genannten eosinophil-chemotaktischen Chemokinen führt eine Kombination aus $\text{TNF-}\alpha$ und IL-4 auch bei MCP-4 zu einer starken Hochregulierung der mRNA-Expression. Die Tatsache, dass MCP-4 eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ im distalen Bereich der Promotorregion aufweist, erklärt die Induktion mit $\text{TNF-}\alpha$. Das Fehlen einer Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Stat6 (anders als bei Eotaxin-1) in diesem Bereich des Promoters gibt dagegen keinen Hinweis auf eine mögliche synergistische Induktion mit IL-4.

4.1.4 Vergleich der mRNA-Expression eosinophil-chemotaktischer CC-Chemokine in dermalen Fibroblasten

In der eosinophil-chemotaktischen Fraktion aus Überständen stimulierter dermalen Fibroblasten wurden auf Proteinebene neben Eotaxin-1 (Noso et al., 1996) auch RANTES und GM-CSF (Noso et al., 1996) nachgewiesen. Der Ansatz, cDNA von eosinophil-chemotaktischen Proteinen mittels degenerierter Primer und der RNA stimulierter Fibroblasten zu klonieren, führte neben der Klonierung von Eotaxin-1 auch zur Klonierung von MCP-1, MCP-3 und MCP-4. Diese Befunde sind ein Beleg dafür, dass dermale Fibroblasten eine reichhaltige Quelle von Zytokinen und entzündlichen Mediatoren sind (Gonzalo et al., 1998); (Luster and Rothenberg, 1997) und eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Eosinophilen in entzündete Hautbereiche spielen.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Eotaxin-1-Genexpression mit der Genexpression anderer eosinophil-chemotaktischer Mediatoren wie MCP-4, MCP-3 und RANTES, auch im Hinblick auf die Frage nach dem relativen Beitrag der Eotaxin-1-Expression in verschiedenen, durch Akkumulation von eosinophilen Leukozyten gekennzeichneten Erkrankungen.

Fibroblasten sind eine reichhaltige Quelle von Zytokinen und entzündlichen Mediatoren, die eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Eosinophilen in entzündetes Hautgewebe spielen. Diese Aussage konnte durch den Nachweis von Eotaxin-1 (Bartels et al., 1996; Noso et al., 1996) RANTES und GM-CSF (Noso et al., 1996) in der eosinophil-chemotaktischen Fraktion aus Überständen stimulierter dermalen Fibroblasten auf Proteinebene gemacht werden.

Der Vergleich stimulusabhängiger mRNA-Expression eosinophil-chemotaktischer Chemokine in dermalen Fibroblasten ergaben erste deutliche Anzeichen für den Beitrag einzelner Chemokine bei der Akkumulation von eosinophilen Leukozyten bei Hauterkrankungen (Hein et al., 1999). Dabei ist IL-4 alleine für die Hochregulierung der CC-Chemokine Eotaxin-1, MCP-4 und MCP-3 auf transkriptioneller Ebene verantwortlich. Die Produktion von RANTES-mRNA dagegen wird durch Stimulation mit IL-4 nicht hochreguliert. Im Gegensatz zu den anderen genannten Chemokinen wird Eotaxin-1 durch kurzzeitige Stimulation (6 Stunden) mit TNF- α nicht signifikant hochreguliert.

Bei allen genannten eosinophil-chemotaktischen Chemokinen führt eine Kombination aus TNF- α und IL-4 zu einer starken Hochregulierung der mRNA-Expression.

Eotaxin-1 und RANTES unterscheiden sich von MCP-3 und MCP-4 dadurch, dass ihre Genexpression durch IFN- γ alleine nicht hochreguliert wird. Untersuchungen des mRNA-Expressionsmusters des erst später entdeckten Eotaxin-3-Chemokins in dermalen Fibroblasten (siehe Punkt 3.3.6) zeigte eine große Übereinstimmung zur Eotaxin-1-mRNA-Genexpression. Während eine Kombination aus TNF- α und IL-4 zu einer verstärkten Hochregulierung der Eotaxin-1-Expression führt, ist dies bei der Eotaxin-3-Genexpression nicht der Fall. Zusammen mit der im Vergleich zu Eotaxin-1 geringeren eosinophil-chemotaktischen Aktivität (ca. Faktor 10) von Eotaxin-3 (Shinkai et al., 1999) deutet auf eine sich von Eotaxin-1 abweichende, noch unklare Rolle des Eotaxin-3 im Entzündungsgeschehen hin. Im Gegensatz zu Eotaxin-2, MCP-3 und MCP-4 konnte Eotaxin-3 (Hoeck and Woisetschlager, 2001) wie Eotaxin-1 (Mochizuki et al., 1998) als Protein isoliert werden.

Wenn man davon ausgeht, dass Muster lokal produzierter Zytokine die Eigenschaften einer Entzündungsreaktion bestimmen, so kann man aus diesen an kultivierten dermalen Fibroblasten gewonnenen Beobachtungen schließen, dass die Eotaxin-1- und Eotaxin-3-Expression für TH2 vermittelte Entzündungsreaktionen wie der Atopischen Dermatitis oder auch Asthma charakteristisch sind, während die Genexpression von MCP-3 und MCP-4 potenziell auch bei TH1 vermittelten Entzündungen eine Rolle spielen könnte.

4.1.5 Gewebe und Zellspezifität der Expression eosinophil-chemotaktischer CC-Chemokine

In unbehandelter Haut sowie in unstimulierten und stimulierten Keratinozyten des Menschen (kultivierte primäre Keratinozyten, Kulturen der Keratinozytenellinie (HaCaT) wurde keine bzw. kaum Eotaxin-1-mRNA-Expression nachgewiesen, (siehe Punkt 3.3.1) und (Hein et al., 1997)). Dagegen zeigen dermale Fibroblasten stimulusabhängige Eotaxin-1-mRNA-Expression (siehe Punkt 3.3.2). Auch Fibroblastenzellkulturen aus Lungengewebe zeigten eine stimulusabhängige Eotaxin-1 mRNA-Expression (Teran et al., 1997). Weiterhin konnte eine konstitutive Eotaxin-1-mRNA-Expression in verschiedenen Geweben wie Uterus, Trachea, Dünndarm, Niere, Pankreas, Dickdarm, Herz, Prostata und Niere, nicht aber in Speicheldrüse, Lunge, Thymus, Muskelgewebe und Hirn nachgewiesen werden. Für diese

Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche RNA-Präparationen verwendet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Eotaxin-1-Genexpression sowohl Stimulus als auch zell- und Gewebespezifisch ist. Die Tatsache, dass dermale Fibroblasten im Gegensatz zu Keratinozyten Eotaxin-1 exprimieren (Mochizuki et al., 1997), korreliert mit dem Befund, dass Eosinophile bzw. Überreste eosinophiler Zellen in der Dermis, nicht aber in der Epidermis entzündeter Haut nachgewiesen werden konnte. Die Produktion von Eotaxin-1 durch dermale Fibroblasten und andere epitheliale Zellen (Mochizuki et al., 1998); (Maune et al., 1999) könnte einen wesentlichen Anteil daran haben, dass eosinophile Granulozyten aus dem Blut in das Gewebe rekrutiert werden.

Wie unter Punkt 3.3.1 gezeigt, wurde eine geringfügige konstitutive Eotaxin-1-mRNA-Expression in humanen dermalen Fibroblasten beobachtet, die durch TNF- α und IL-1 α innerhalb von 6 Stunden induziert und durch IFN- γ moduliert wurde. Während die durch IL-1 α induzierte Eotaxin-1-mRNA-Expression transient erscheint, führt eine Langzeitstimulation (48 Stunden) mit TNF- α zu einem weiteren Anstieg der gemessenen Eotaxin-1-mRNA-Expression. Diese Beobachtung der Eotaxin-1-mRNA-Expression korreliert mit dem Befund, dass das Eotaxin-1-Protein erst nach relativ langen Stimulierungszeiten mit TNF- α in Überständen humaner dermalen Fibroblasten nachweisbar war (Noso et al., 1996).

Während IFN- γ alleine die Eotaxin-1-mRNA-Expression nicht stimuliert, wird diese in Kombination mit TNF- α oder IL-1 α synergistisch verstärkt. Dieser synergistische Effekt ist bei kurzen (6-24 Stunden), nicht aber bei längeren (48 Stunden) Koinkubationszeiten beobachtbar. Dieser Synergismus, an dem IFN- γ beteiligt ist, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen (Garcia-Zepeda et al., 1996) für die mRNA-Expression in Endothelzellen und Zellen des respiratorischen Epithels gezeigt.

Um die transkriptionelle Kontrolle der Expression des Eotaxin-1-Gens zu studieren, wurde die Genstruktur und der Promoter des Eotaxin-1-Gens untersucht. Das Eotaxin-1 Gen zeigt die für CC-Chemokine typische 3-Exon, 2-Intron Struktur (siehe 3.1.1) und stark konservierte Intron-/Exon-Übergänge, für die eine Konsensussequenz beschrieben wurde, die auch andere CC-Chemokinen aufweisen. Der hohe Grad an konservierter genomischer Struktur, zusammen mit hoher Homologie auf Proteinsequenzebene (Hein et al., 1999) deuten darauf hin, dass CC-Chemokine aus Genduplikationen hervorgegangen sind.

4.1.6 Funktionsanalyse regulatorischer Genregionen

Um die transkriptionelle Kontrolle der Eotaxin-1- und MCP-4-Genexpression zu untersuchen, wurden wie unter den Punkten 3.1 und 3.2 beschrieben, die genomische Organisation sowie potenzielle regulatorische Sequenzen der Promoterregionen dieser beiden Gene bestimmt und analysiert (Hein et al., 1997; Hein et al., 1999). Wie die anderen Mitglieder der β -Chemokin-Familie sind beide Gene aus 3 Exons und 2 Introns mit konservierten Exon-/Intron-Grenzen aufgebaut. Der hohe Grad an konservierter genomischer Struktur zusammen mit hoher Homologie auf Proteinsequenzebene (Hein et al., 1997) deuten darauf hin, dass sich CC-Chemokine durch Genduplikation mit sich anschließender Auseinanderentwicklung zu den gegenwärtigen Formen entwickelt haben (Widmer et al., 1991).

Die klonierten Promoterabschnitte des Eotaxin-1- bzw. MCP-4-Gens wiesen Konsensussequenzmotive für IFN- γ , Glucocorticoid-Response-Elemente und Stat6 sowie nukleäre Faktoren wie NF-IL-6, AP-1 und NF κ B auf. Funktionelle Promoteranalysen anderer Chemokingene (Mukaida et al., 1990; Murakami et al., 1997; Nelson et al., 1993) lassen vermuten, dass die ersten 100 bis 200 bp der Promoterregion, an die sich die Transkriptions-Initiationsstelle unmittelbar anschließt, von besonderer Bedeutung für die Promoteraktivität sind. In den entsprechenden Regionen der Eotaxin-1- und MCP-4-Gene finden wir jeweils eine TATA-Box, eine NF κ B-Erkennungssequenz sowie IFN- γ -Response-Elemente. Der Eotaxin-1-Promoter enthält zusätzlich Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren Stat6, E2A und GRE. Im MCP-4-Promoter wurden zusätzlich Bindungsstellen für Ap-1, NF-IL6, GAS- und GRE-Elemente gefunden.

4.2 Eigenschaften des Eotaxin-1-Promoters

In der Zwischenzeit sind ähnliche Studien zum Eotaxin-1-Promotor veröffentlicht worden (Hoeck and Woisetschlager, 2001). Die Ergebnisse und Interpretationen der verschiedenen Arbeiten stimmen zum Teil überein. Die Unterschiede und ein neues auf den zusammengefassten Erkenntnissen basierendes Modell sollen hier vorgestellt werden.

Die Kooperation von Transkriptionsfaktoren aus der Stat-Familie (Stat1, Stat6) und

der NF κ B-Familie (p50, p65) in verschiedenen Promotoren ist bekannt und beschrieben wurden (Stutz and Woisetschlager, 1999). Die direkte Wechselwirkung wurde nur für Stat6 gezeigt (Shen and Stavnezer, 1998).

Der Abstand zwischen den Stat- und NF κ B-Konsensuselement-Bindestellen kann von 10 bis 60 bp betragen, wobei er in Stat6 regulierten Promotoren geringer als bei den Stat1 abhängigen Promotoren ist (siehe Tabelle 4.1 Promotoren mit Stat-Response-Elementen (SRE) und benachbarten NF κ B-Response-Elementen).

| Promotor | SRE | NF κ B-RE | Abstand |
|--------------|---------------|------------------|---------|
| IRF-1 | -123 bis -113 | -48 bis -39 | 64 bp |
| IP-10 | -224 bis -212 | -169 bis -160 | 43 bp |
| C γ 3 | -86 bis -77 | -48 bis -40 | 28 bp |
| C ϵ | -82 bis -52 | -61 bis -52 | 11 bp |

Tabelle 4.1 Promotoren mit Stat-Response-Elementen (SRE) und benachbarten NF κ B-Response-Elementen

Außer dem Eotaxin-1 ist mit dem E-Selectin auch ein weiterer Promotor mit Überlappung beider Elemente bekannt (Bennett et al., 1997). Im E-Selektin-Promotor überlappen allerdings zwei NF κ B-Konsensuselemente mit einem Stat6-Konsensuselement (siehe Tabelle 4.1). Außerdem ist der Promotor nur durch ein TNF- α aktiviertes NF κ B p50/p65 induzierbar, das in einem kompetitiven Mechanismus durch IL-4 aktiviertes Stat6 inhibiert werden kann (Bennett et al., 1997). In den übrigen Promotoren verstärken sich die Wirkungen von dem für die Konsensussequenz spezifischen Stat- und den NF κ B-Transkriptionsfaktoren teilweise in einem synergistischen Effekt.

In dieser Arbeit wurde in dermalen Fibroblasten und der Lungenepithelzelllinie A549 gezeigt, dass durch IL-4 (IL-13) aktiviertes Stat6 an den Eotaxin-1-Promotor bindet und die Transkription aktiviert. Eine entsprechende Wirkung konnte auch bei TNF- α aktiviertem NF κ B-Faktor p65 beobachtet werden.

TNF- α , LPS, IL-1 β und CD40L aktivieren NF κ B-Faktoren, die im Zytoplasma in inaktiver Form, gebunden an ein Inhibitorprotein, vorliegen. Durch die Stimulierung werden die inhibierenden Proteine phosphoryliert, dann ubiquitinyliert und schließlich degradiert. Der Abbau des Inhibitors legt ein zuvor maskiertes

Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal) frei und die NF κ B-Faktoren wandern in den Kern und binden an NF κ B-Responsive-Elemente in verschiedenen Promotoren. NF κ BA (p65) und NF κ B1 (p50) sind die beiden häufigsten Faktoren dieser Familie. p65 enthält im Gegensatz zu p50 eine Transaktivierungsdomäne. Homodimere aus p65 oder Heterodimere aus p50/p65 sind transkriptionell aktiv, während Homodimere aus p50 hierfür mit anderen Faktoren kooperieren (Shen and Stavnezer, 1998); (Ghosh et al., 1998); (Sheppard et al., 1998).

Hoeck und Woisetschläger kamen in Fibroblasten und mit einem Stat6-Expressionsplasmid transfizierten Hek293-Zellen zu demselben Ergebnis. Ein zusätzlich durchgeführtes Reporterexperiment mit einem anderen NF κ B-Aktivator (CD40-Antikörper) führte im Gegensatz zu Experimenten mit TNF α und Experimenten mit CD40-Antikörpern und dem I ϵ -Promotor nicht zu einer Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors (Hoeck and Woisetschläger, 2001). Das deutet auf eine unterschiedliche Zusammensetzung der aktivierten NF κ B-Faktoren hin, wie sie schon für CD40 und LPS beschrieben wurde (Lin et al., 1998).

In BEAS-2B-Zellen wiesen Matsukura et al. (1999) neben p65 auch p50 als TNF- α induzierten Eotaxin-1bindenden Faktor nach (Matsukura et al., 1999) und in A549-Zellen selbst wurde durch Gelschiff-Experimente die Bindung von IL-1 β aktivierten p65 und p50 an den Promotor gezeigt (Jedrzkiwicz et al., 2000).

I ϵ Promotor

5'-CCCGCTGTTGCTCAATCGACTTCCCAAGAACAGAGAGAAAA**GGGA**ACTTCC-3'
Stat6 *NF κ B*

E-Selectin Promotor

5'-AATTTTAAGCATCGT**GGATATTCCC****GGGAAAGTTT**TTGGATGCCATTGGGC-3'
NF κ B *Stat6* *NF κ B*

Eotaxin-1 Promotor

5'-GACCCCGCATGGGCAAAGGCTTCC**CTGGAATCTCCC**ACACTGTCTGCTCCC-3'
Stat6 *NF κ B*

Abbildung 4.1 Stat6/NF κ B regulierte Promotoren.

Farbig unterlegt die Konsensussequenzen bzw. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Stat6 und NF κ B. Im Eotaxin-1-Promoter sind potenzielle Basen, die potenziell an der Bindung weiterer Faktoren beteiligt sind, mit weißer Farbe gekennzeichnet.

An den Eotaxin-1-Promotor können nach derzeitigem Kenntnisstand also p50 und p65 binden. In Fibroblasten bindet nur p65. Außerdem scheint die Art des Stimulus wichtig zu sein, da CD40 aktivierte NF κ B-Faktoren zwar für die Aktivierung des I ϵ -Promotors ausreichen, nicht aber für die Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors. Möglicherweise ist das der Grund, warum in A549 nach Aktivierung durch IL-1 α eine p50 Bindung nachgewiesen wurde (Jedrzkiwicz et al., 2000), in Experimenten in dieser Arbeit in A549-Zellen nach TNF α -Stimulierung jedoch nicht. Interessant ist auch, dass die unterschiedlichen Ergebnisse in Zelllinien auftreten, während in den aus Patienten entnommenen Fibroblasten (Primärzellen) nur eine p65-Aktivierung, sowohl in der Hoeck/Woisetschläger-Untersuchung als auch in dieser Arbeit, gefunden wurde.

Der Eotaxin-1-Promotor war in der Lage, eine IL-4, IL-13 und TNF- α abhängige Transkription in Reporterexperimenten zu vermitteln. Es zeigte sich, dass dazu kein Minimalpromotor notwendig ist. Bei dem Fragment, das eine TATA-Box enthält, handelt es sich also um einen vollwertigen Promotor. Die Aktivierung durch TNF- α

war stärker als die durch IL-4 bzw. IL-13. Die Stimulierung mit beiden Faktoren führte zu einer Verstärkung, aber nicht zu einem additiven oder synergistischen Verhalten. Hoeck und Woisetschläger konnten einen synergistischen Effekt auf der Stufe der Proteinexpression nachweisen (Hoeck and Woisetschläger, 2001), aber nicht, entsprechend den vorgestellten Ergebnissen bei der transkriptionellen Regulierung, wohingegen Matsukura et al. (1999) in BEAS-2B-Zellen einen leichten Synergismus feststellten. Möglicherweise ist dieser Effekt durch die Limitierung des von beiden Transkriptionsfaktoren genutzten Cofaktors CBP/p300 zu erklären (Ohmori and Hamilton, 2000). In weiteren Reporterexperimenten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Konsensuselemente intakt sein müssen, um eine Aktivierung der Transkription zu vermitteln. Durch gezielte Mutation wurden die Konsensus-Elemente zerstört (siehe Abbildung 3.17) und die Wirkung auf die Regulierbarkeit untersucht.

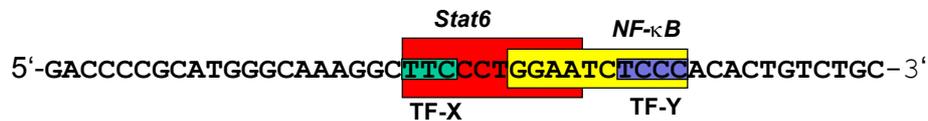
Die Mutationen in den Reporterplasmiden EoST6 und EoNFkB zerstörten jeweils sowohl die IL-4-abhängige als auch die TNF- α -abhängige Stimulierbarkeit des Eotaxin-1-Promotors. Das deutet auf eine Funktion als positiv *cis*-regulierendes Element des Fragmentes im Eotaxin-1-Promotor hin. Wider Erwarten konnte bei EoSt6, bei dem nur das Stat6-Konsensuselement nicht aber das NF κ B-Konsensuselement zerstört ist, keine TNF- α abhängige Induktion gemessen werden. Ebenso war keine IL-4-abhängige Induktion in EoNFkB nachzuweisen.

Dieser Effekt ließe sich durch Bindung weiterer, nicht identifizierter Transkriptionsfaktoren erklären, die durch die Mutationen an der Bindung gehindert werden, worauf später eingegangen wird. Da Matsukura et al. (1999) in BEAS-2B-Zellen die erwartete selektive Zerstörung der Konsenssequenzen mit anderen Mutationen zeigen konnten, wurden die entsprechenden Plasmide hergestellt (EoM1, EoM2) (Matsukura et al., 1999). Allerdings war auch mit diesen neuen Mutationen kein selektiver Effekt in A549-Epithelzellen und Fibroblasten zu messen. In den Experimenten von Hoeck und Woisetschläger führte die Zerstörung der Stat6-Konsensussequenz in Fibroblasten, entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen, zum Verlust der Promotoraktivität. Bei der Mutation des NF κ B Elementes wurde der Promotor allerdings weder vollständig noch selektiv zerstört. Bei verringerter Basalexpression war das Plasmid mit zerstörter NF κ B Konsensussequenz sowohl IL-4 als auch TNF- α induzierbar, wobei die TNF- α -abhängige Induzierbarkeit stärker beeinträchtigt war (Hoeck and Woisetschläger, 2001). Aus diesem Ergebnis ziehen Hoeck et al. (2001) den Schluss, dass die

Aktivierung des Eotaxin-1-Promotors in jedem Fall, also auch bei einer TNF- α -Aktivierung, Stat6 abhängig ist. Zur Überprüfung führten sie Experimente in Stat6-defizienten Hek293-Zellen durch, in denen eine TNF- α -abhängige Stimulierung des Eotaxin-1-Promotors und auch Eotaxin-1 Proteinsegregation nur bei Kotransfektion eines Stat6-Expressionsplasmides möglich war. Außerdem hemmte ein transdominant negatives Stat6-Protein, dem die Carboxyterminale-Transaktivierungsdomäne fehlt, sowohl die IL-4 als auch die TNF- α -abhängige Eotaxin-1-Expression. Allerdings konnten sie weder eine von TNF- α -abhängige Aktivierung des Stat6 noch eine TNF- α -abhängige DNA-Bindung von Stat6 nachweisen. Man kann diese Ergebnisse erklären, wenn man die Bindung eines oder mehrerer Kofaktoren annimmt, die für eine Aktivierung notwendig sind. Die Bindung könnte direkt für die Wirkung von Stat6 bzw. p65 oder/und für die Funktion als positiv regulierendes *cis*-Element notwendig sein. Die Expression eines oder mehrerer Kofaktoren ist möglicherweise durch Stat6 induzierbar und vom zellulären Hintergrund abhängig. Möglicherweise kann auch p50 die Rolle eines solchen Faktors übernehmen. Es wird beschrieben, dass das Stat6-Konsensusmotiv aus dem I ϵ -Promotor allein nicht ausreicht, um eine IL-4-abhängige Induzierbarkeit in einem Reporterplasmid zu vermitteln (Albrecht et al., 1994); (Delphin and Stavnezer, 1995); (Mikita et al., 1998). Wahrscheinlich ist nicht die Bindung oder Wechselwirkung des für den I ϵ -Promotor spezifischen Transkriptionsfaktor C/EBP β ausschlaggebend.

Der Eotaxin-1-Promotor unterscheidet sich sowohl 5' als auch 3' von der Stat6-Konsensussequenz des I ϵ -Promotors. Trotzdem deuten die Ergebnisse aus diesem sehr ähnlichen Promotor darauf hin, dass andere Faktoren wichtig sein könnten. Ein Faktor, der sowohl mit IL-4-aktiviertem Stat6 (Gingras et al., 1999) als auch mit TNF- α -aktiviertem p65 (Sheppard et al., 1999); (Hottiger et al., 1998) in Wechselwirkung steht, ist zum Beispiel CBP/p300 (Vo and Goodman, 2001). Ohmori und Hamilton erklären die Inhibition der NF κ B-abhängigen Transkription im IRF-1-Promotor durch Konkurrenz um diesen Faktor (Ohmori and Hamilton, 2000). Auch andere bekannte und unbekannte Wechselwirkungen von Stat6 und p65 sind in Betracht zu ziehen. Wenn man berücksichtigt, dass die Mutationen die Bindung solcher Faktoren unabhängig von der Bindung eines der beiden identifizierten Faktoren, also Stat6 oder NF κ B, beeinträchtigen, muss außerdem von einer Wechselwirkung mit der DNA ausgegangen werden. Ein Beispiel für einen solchen Faktor in einem anderen Kontext ist der Kofaktor TFII-I. TFII-I bindet im c-Fos-Promotor an ein Element aus 7

Basen, wobei 4 Basen gleichzeitig zum Konsenselement von Stat1/Stat3 gehören (Kim et al., 1998).



| Promoter | IL-4 | TNF- α | Stat6 | NF- κ B (p65) | TF-X | TF-Y | Aktivität |
|----------|------|---------------|-------|----------------------|------|------|-----------|
| Wt | + | + | - | - | + | + | + |
| Wt | - | - | + | + | + | + | + |
| Wt | + | + | + | + | + | + | + |
| Mut TF-x | + | - | + | + | - | + | - |
| Mut TF-Y | - | + | - | - | + | - | - |

Abbildung 4.2 Modell des Eotaxin-1-Promoters unter der Annahme der Beteiligung von zwei Kofaktoren TF-X und TF-Y bei der Initiation der Transkription

Die Transkriptionsfaktoren Stat6 oder NF κ B (p 65) sind nur in der Lage, die Transkription zu induzieren, wenn beide Faktoren sowohl TF-X als auch TF-Y an die DNA binden.

In dem Modell in Abbildung 4.2 Modell des Eotaxin-1-Promoters unter der Annahme der Beteiligung von zwei Kofaktoren TF-X und TF-Y bei der Initiation der Transkription sind die äußeren Basen der Konsensussequenzen von Stat6 und NF κ B nicht allein für die Bindung von Stat6 und p65 (p50) essentiell, sondern auch für die Bindung eines oder mehrerer Kofaktoren. Durch die Mutation des Stat6-Elementes wird verhindert, dass ein Faktor bindet, der zusammen mit p65 für eine TNF- α -induzierte Aktivierung notwendig ist. Dieser Faktor kann wahrscheinlich Stat6-abhängig hochreguliert werden, bindet aber IL-4 unabhängig. Möglicherweise ist dieser Faktor in anderen Zellsystemen und/oder bei Aktivierung von p65/p50-Komplexen nicht essentiell oder so stark exprimiert, dass die durch die Mutationen verringerte Affinität der Bindestelle kompensiert werden kann. Ein entsprechendes Modell könnte auch die Zerstörung der Promotoraktivität durch Mutationen im NF κ B-Element erklären. Auch die von Hoeck/Woisetschläger beobachtete, auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinende Inhibierung der TNF- α -abhängigen Induktion durch ein dominant-negatives Stat6 lässt sich erklären. Das verwendete Stat6 ohne

Transaktivierungsdomäne wandert *in vivo* nicht in den Kern, selbst wenn es *in vitro* an die DNA bindet (Mikita et al., 1998). Ein überexprimiertes Stat6 könnte über eine Wechselwirkung mit dem Kofaktor die Kerntranslokation verhindern. Das deutet auf eine Lokalisierung des Kofaktors im Zytoplasma hin. Dass der Faktor durch TNF- α aktiviert werden muss und zum Beispiel nicht CD40 abhängig aktivierbar ist (Hoeck and Woisetschlager, 2001), beweist diese These zwar nicht, kann aber als unterstützender Hinweis interpretiert werden.

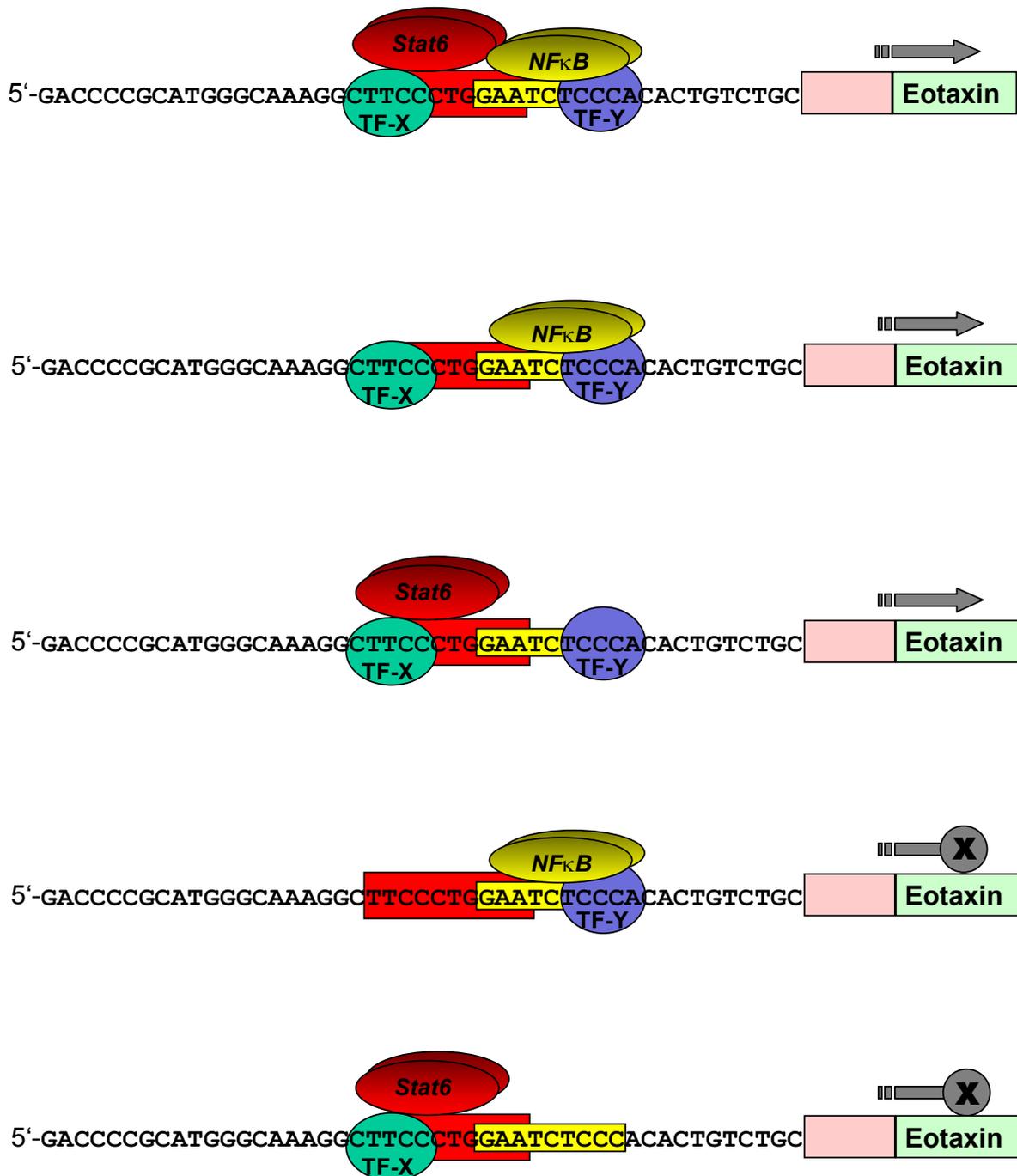


Abbildung 4.3 Aktivierungsschema zum Eotaxin-1-Promoter-Modell

Dargestellt sind unterschiedliche Möglichkeiten der Bindung von Transkriptionsfaktoren, die in Kombination zur Aktivierung bzw. Nichtaktivierung des Eotaxin-1-Promoters führen. Die Aktivierung des Promoters ist durch einen Pfeil gekennzeichnet, Nichtaktivierung durch ein Kreuz in einem Kreis anstelle einer Pfeilspitze.

Auch wenn die Grundprinzipien der Regulation des Eotaxin-1-Promotors mit Hilfe der zusammengefassten Ergebnisse zu erklären sind, bleiben einige Fragen offen. In allen bisher untersuchten Zellen, die den Eotaxin-1-Promotor aktivieren, ist bei der IL-4-Aktivierung Stat6 und bei der TNF- α Aktivierung p65 beteiligt. Möglicherweise bindet in manchen Zellen oder unter bestimmten Bedingungen auch p50. Wichtig ist, dass die durch CD40-Stimulation (Hoeck and Woisetschlager, 2001) im Gegensatz zu den durch IL-1 β -Stimulation (Jedrkiewicz et al., 2000) freigesetzten NF κ B-Faktoren nicht in der Lage sind, den Promotor zu aktivieren. Interessant und offen bleibt die Frage, wie TNF- α mit Hilfe von Stat6 eine Aktivierung vermittelt, ohne dass eine Stat6-Aktivierung und eine induzierte Stat6-DNA-Bindung gemessen werden. Eine Möglichkeit ist die Existenz vermittelnder Faktoren, für die vor allem auch die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen, wobei erst die Identifizierung dieser Proteine genauere Untersuchungen ermöglichen würde. Eine Nachweismethode, wäre die Durchführung eines Singh-Screening einer Expressionsbibliothek. Weitere Hinweise auf ihr Vorliegen könnte eine UV-Quervernetzung von den potenziellen Faktoren mit radioaktiver Promotor-DNA und eine anschließende gelelektrophoretische Analyse ergeben. Alternativ könnten auch Southwestern-Blot-Experimente durchgeführt werden, um das Molekulargewicht dieser Proteine zu bestimmen. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Faktoren über Affinitätschromatographie (oder auch Magnetkügelchen-Technik) zu isolieren und weiter zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Pathologische Prozesse der Haut sind von einer Vielfalt von Veränderungen gekennzeichnet. In entzündlich erkrankter Haut finden sich charakteristische Gewebsinfiltrate unterschiedlicher Leukozytenformen. Je nach dem Krankheitsbild und –stadium überwiegen dabei bestimmte leukozytäre Zellpopulationen (Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und T-Lymphozyten-Subpopulationen). Für die unterschiedliche Infiltratzusammensetzung wird die krankheitsabhängige Expression von auf bestimmte Leukozyten präferentiell oder selektiv wirkende chemotaktische Faktoren, den Chemokinen, verantwortlich gemacht. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Bedingungen der Regulation der Genexpression einzelner Faktoren in der Haut zu erkunden.

Dazu wurden mit molekularbiologischen Methoden genomische Sequenzen neuer eosinophil-chemotaktischer Chemokine (Eotaxin-1 und MCP-4) charakterisiert sowie die Regulation der Genexpression in kultivierten dermalen Fibroblasten und Keratinozyten untersucht und mit der anderer eosinophil-chemotaktischer Chemokine (RANTES, MCP-3, Eotaxin-3) verglichen. In Übereinstimmung mit anderen Mitgliedern der β -Chemokin-Familie sind die Gene von Eotaxin-1 und MCP-4 aus drei Exons und zwei Introns mit konservierten Exon-/Intron-Grenzen aufgebaut.

Während die Eotaxin-1- und MCP-4-mRNA in Keratinozytenzellkulturen mittels RT-PCR nicht bzw. nur schwach nachweisbar ist, ist die Genexpression dieser Chemokine in kultivierten Fibroblasten deutlich induzierbar. Eotaxin-1 wird wie MCP-4, MCP-3 und Eotaxin-3 aber im Gegensatz zu RANTES durch die TH2-Zytokine IL-4 bzw. IL-13 alleine transkriptionell hochreguliert. Eine Kombination aus TNF- α und IL-4 führt bei allen genannten eosinophil-chemotaktischen Chemokinen (außer Eotaxin-3) zu einer verstärkten Hochregulierung der mRNA Expression. MCP-3 und MCP-4 unterscheiden sich von Eotaxin-1, Eotaxin-3 und RANTES dadurch, dass ihre Genexpression auch durch das TH1-Zytokin INF- γ alleine hochreguliert wird. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Eotaxin-1- und Eotaxin-3-mRNA-Expression in dermalen Fibroblasten charakteristisch für TH2 vermittelte Entzündungsreaktionen wie der Atopischen Dermatitis sind, während die Genexpression von MCP-3 und MCP-4 potenziell auch bei TH-1 vermittelten Entzündungen eine Rolle spielen können.

Luziferase-Reporter-Gen-Assays zeigten, dass ein kurzes, dem Transkriptionsstart des Eotaxin-1-Gens direkt vorgelagertes Promoterfragment sowohl die IL-4-stimulierte mRNA-Expression als auch die synergistische Wirkung von TNF- α und IL-4 auf die Hochregulierung der Eotaxin-1-Genexpression vermittelt. In diesem Promoterfragment überlappen sich Erkennungssequenzen für NF κ B- und Stat6-Transkriptionsfaktoren. Experimente mit einem aus dem MCP-4-Gen abgeleiteten Reporter-Genkonstrukt unterstützen die Vermutung, dass das unweit des MCP-4-Transkriptionsstarts gelegene GAS-Element für die Induktion von MCP-4-mRNA durch INF- γ verantwortlich ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Meurer,R., Van Riper,G., Feeney,W., Cunningham,P., Hora,D., Jr., Springer,M.S., Macintyre,D.E., and Rosen,H. (1993). Formation of eosinophilic and monocytic intradermal inflammatory sites in the dog by injection of human RANTES but not human monocyte chemoattractant protein 1, human macrophage inflammatory protein 1 alpha, or human interleukin 8. *J. Exp. Med.* *178*, 1913-1921.
2. Murphy,P.M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 593-633.
3. Baggiolini,M. and Clarklewis,I. (1992). Interleukin-8, a Chemotactic and Inflammatory Cytokine. *FEBS Lett.* *307*, 97-101.
4. Schall,T.J. (1991). Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine.* *3*, 165-183.
5. Bischoff,S.C., Krieger,M., Brunner,T., and Dahinden,C.A. (1992). Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med.* *175*, 1271-1275.
6. Alam,R., Forsythe,P., Stafford,S., Heinrich,J., Bravo,R., Proost,P., and Van Damme,J. (1994). Monocyte chemotactic protein-2, monocyte chemotactic protein- 3, and fibroblast-induced cytokine: Three new chemokines induce chemotaxis and activation of basophils. *J. Immunol.* *153*, 3155-3159.
7. Zlotnik,A. and Yoshie,O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* *12*, 121-127.
8. Kelner,G.S., Kennedy,J., Bacon,K.B., Kleyensteuber,S., Largaespada,D.A., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Bazan,J.F., Moore,K.W., Schall,T.J., and Zlotnik,A. (1994). Lymphotactin: A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* *266*, 1395-1399.

9. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* **385**, 640-644.
10. Behm, C.A. and Ovington, K.S. (2000). The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today* **16**, 202-209.
11. Rankin, J.A., Sylvester, I., Smith, S., Yoshimura, T., and Leonard, E.J. (1990). Macrophages cultured in vitro release leukotriene B₄ and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J. Clin. Invest.* **86**, 1556-1564.
12. Kameyoshi, Y., Schröder, J.-M., Christophers, E., and Yamamoto, S. (1994). Identification of the cytokine RANTES released from platelets as an eosinophil chemotactic factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **104 Suppl. 1**, 49-51.
13. Moritani, C., Ishioka, S., Haruta, Y., Kambe, M., and Yamakido, M. (1998). Activation of platelets in bronchial asthma. *Chest* **113**, 452-458.
14. Berkman, N., Krishnan, V.L., Gilbey, T., Newton, R., O'Connor, B., Barnes, P.J., and Chung, K.F. (1996). Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 1804-1811.
15. Robey, E. and Fowlkes, B.J. (1994). Selective events in T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 675-705.
16. Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* **18**, 263-266.
17. Turk, J.L. and Bryceson, A.D. (1971). Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.* **13**, 209-266.
18. Lenschow, D.J., Herold, K.C., Rhee, L., Patel, B., Koons, A., Qin, H.Y., Fuchs, E., Singh, B., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*. **5**, 285-293.

19. Manetti,R., Parronchi,P., Giudizi,M.G., Piccinni,M.P., Maggi,E., Trinchieri,G., and Romagnani,S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1199-1204.
20. Hsieh,C.S., Macatonia,S.E., Tripp,C.S., Wolf,S.F., O'Garra,A., and Murphy,K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages. *Science* *260*, 547-549.
21. Novick,D., Kim,S.H., Fantuzzi,G., Reznikov,L.L., Dinarello,C.A., and Rubinstein,M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*. *10*, 127-136.
22. Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* *106*, 761-771.
23. Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.*, N.Ford, C.Nolan, and M.Ferguson, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
24. Frohman,M.A., Dush,M.K., and Martin,G.R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 8998-9002.
25. Bartels,J., Schlüter,C., Richter,E., Noso,N., Kulke,R., Christophers,E., and Schröder,J.-M. (1996). Human dermal fibroblasts express eotaxin: Molecular cloning, mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *225*, 1045-1051.
26. Shinkai,A., Yoshisue,H., Koike,M., Shoji,E., Nakagawa,S., Saito,A., Takeda,T., Imabeppu,S., Kato,Y., Hanai,N., Anazawa,H., Kuga,T., and Nishi,T. (1999). A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4- stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils [In Process Citation]. *J. Immunol.* *163*, 1602-1610.
27. Noso, N., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. Isolation and characterization of a human eotaxin produced by dermal fibroblasts. *Journal of*

Investigative Dermatology 107[3], 478. 1996.

Ref Type: Abstract

28. Matsukura,S., Stellato,C., Plitt,J.R., Bickel,C., Miura,K., Georas,S.N., Casolaro,V., and Schleimer,R.P. (1999). Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT6 in human airway epithelial cells. *J. Immunol.* 163, 6876-6883.
29. Garcia-Zepeda,E.A., Rothenberg,M.E., Ownbey,R.T., Celestin,J., Leder,P., and Luster,A.D. (1996). Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Med.* 2, 449-456.
30. Kitaura,M., Nakajima,T., Imai,T., Harada,S., Combadiere,C., Tiffany,H.L., Murphy,P.M., and Yoshie,O. (1996). Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *J. Biol. Chem.* 271, 7725-7730.
31. Ponath,P.D., Qin,S.X., Ringler,D.J., Clark-Lewis,I., Wang,J., Kassam,N., Smith,H., Shi,X.J., Gonzalo,J.A., Newman,W., Gutierrez-Ramos,J.C., and Mackay,C.R. (1996). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin - Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* 97, 604-612.
32. Koyama,S., Sato,E., Masubuchi,T., Takamizawa,A., Nomura,H., Kubo,K., Nagai,S., and Izumi,T. (1998). Human lung fibroblasts release chemokinetic activity for monocytes constitutively. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 275, L223-L230.
33. Bartels, J., Schlüter, C., Richter, E., Noso, N., Kulke, R., Christophers, E., and Schröder, J.-M. Human dermal fibroblasts express eotaxin: molecular cloning, and mRNA-expression. *Journal of Investigative Dermatology* 107[3], 478. 1996.

Ref Type: Abstract

34. Noso, N., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. Identification of a novel eosinophil-specific chemokine. *Arch.Dermatol.Res.* 288, 326. 1996.
Ref Type: Abstract
35. Mukaida,N., Mahe,Y., and Matsushima,K. (1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis- regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265, 21128-21133.
36. Yasumoto,K., Okamoto,S., Mukaida,N., Murakami,S., Mai,M., and Matsushima,K. (1992). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.* 267, 22506-22511.
37. Anisowicz,A., Messineo,M., Lee,S.W., and Sager,R. (1991). An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. *J. Immunol.* 147, 520-527.
38. Ueda,A., Okuda,K., Ohno,S., Shirai,A., Igarashi,T., Matsunaga,K., Fukushima,J., Kawamoto,S., Ishigatsubo,Y., and Okubo,T. (1994). NF-kappaB and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J. Immunol.* 153, 2052-2063.
39. Wu,C., Ohmori,Y., Bandyopadhyay,S., Sen,G., and Hamilton,T. (1994). Interferon-stimulated response element and NFkappaB sites cooperate to regulate double-stranded RNA-induced transcription of the IP-10 gene. *J. Interferon Res.* 14, 357-363.
40. Mukaida,N. and Matsushima,K. (1992). Regulation of IL-8 production and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines.* 4, 41-53.
41. Lilly,C.M., Nakamura,H., Kesselman,H., Nagler-Anderson,C., Asano,K., Garcia-Zepeda,E.A., Rothenberg,M.E., Drazen,J.M., and Luster,A.D. (1997). Expression of eotaxin by human lung epithelial cells - Induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 99, 1767-1773.

42. Mochizuki, M., Bartels, J., Mallet, A.I., Christophers, E., and Schröder, J.-M. (1998). IL-4 induces eotaxin: A possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. *J. Immunol.* *160*, 60-68.
43. Curiel, R.E., Lahesmaa, R., Subleski, J., Cippitelli, M., Kirken, R.A., Young, H.A., and Ghosh, P. (1997). Identification of a Stat-6-responsive element in the promoter of the human interleukin-4 gene. *Eur. J. Immunol.* *27*, 1982-1987.
44. Linehan, L.A., Warren, W.D., Thompson, P.A., Grusby, M.J., and Berton, M.T. (1998). STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J. Immunol.* *161*, 302-310.
45. Ohmori, Y., Smith, M.F., Jr., and Hamilton, T.A. (1996). IL-4-induced expression of the IL-1 receptor antagonist gene is mediated by STAT6. *J. Immunol.* *157*, 2058-2065.
46. Mochizuki, M., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.-M. IL-13 is a potent inducer of eotaxin in dermal fibroblasts. *109* (3). 1997.
J. Invest. Dermatol., 27th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research - Rome, October 4-7, 1997.
Ref Type: Pamphlet
47. Stutz, A.M. and Woisetschlager, M. (1999). Functional synergism of STAT6 with either NF-kappa B or PU.1 to mediate IL-4-induced activation of IgE germline gene transcription. *J. Immunol.* *163*, 4383-4391.
48. Shen, C.H. and Stavnezer, J. (1998). Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3395-3404.
49. Shen, C.H. and Stavnezer, J. (2001). Activation of the mouse Ig germline epsilon promoter by IL-4 is dependent on AP-1 transcription factors. *J. Immunol.* *166*, 411-423.
50. Hein, H., Schluter, C., Kulke, R., Christophers, E., Schroder, J.M., and Bartels, J. (1997). Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *237*, 537-542.

51. Knol,E.F., Mul,F.P., Lie,W.J., Verhoeven,A.J., and Roos,D. (1996). The role of basophils in allergic disease. *Eur. Respir. J. Suppl.* 22:126s-131s, 126s-131s.
52. Leung,D.Y. (1995). Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96, 302-318.
53. McDonald,P.P., Bald,A., and Cassatella,M.A. (1997). Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood.* 89, 3421-3433.
54. Yamada,H., Matsukura,M., Yudate,T., Chihara,J., Stingl,G., and Tezuka,T. (1997). Enhanced production of RANTES, an eosinophil chemoattractant factor, by cytokine-stimulated epidermal keratinocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114, 28-32.
55. Hoeck,J. and Woisetschlager,M. (2001). Activation of eotaxin-3/CCL126 gene expression in human dermal fibroblasts is mediated by STAT6. *J. Immunol.* 167, 3216-3222.
56. Berkhout,T.A., Sarau,H.M., Moores,K., White,J.R., Elshourbagy,N., Appelbaum,E., Reape,T.J., Brawner,M., Makwana,J., Foley,J.J., Schmidt,D.B., Imburgia,C., McNulty,D., Matthews,J., O'Donnell,K., O'Shannessy,D., Scott,M., Groot,P.H., and Macphee,C. (1997). Cloning, *in vitro* expression, and functional characterization of a novel human CC chemokine of the monocyte chemotactic protein (MCP) family (MCP-4) that binds and signals through the CC chemokine receptor 2B. *J. Biol. Chem.* 272, 16404-16413.
57. Garcia-Zepeda,E.A., Combadiere,C., Rothenberg,M.E., Sarafi,M.N., Lavigne,F., Hamid,Q., Murphy,P.M., and Luster,A.D. (1996). Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J. Immunol.* 157, 5613-5626.

58. Ugucconi,M., Loetscher,P., Forssmann,U., Dewald,B., Li,H.D., Lima,S.H., Li,Y.L., Kreider,B., Garotta,G., Thelen,M., and Baggiolini,M. (1996). Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med.* *183*, 2379-2384.
59. Hein,H., Schlüter,C., Kulke,R., Christophers,E., Schröder,J.-M., and Bartels,J. (1999). Genomic organization, sequence analysis and transcriptional regulation of the human MCP-4 chemokine gene (SCYA13) in dermal fibroblasts: A comparison to other eosinophilic beta-chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *255*, 470-476.
60. Lamkhioued,B., Garcia-Zepeda,E.A., Abi-Younes,S., Nakamura,H., Jedrzkiewicz,S., Wagner,L., Renzi,P.M., Allakhverdi,Z., Lilly,C., Hamid,Q., and Luster,A.D. (2000). Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* *162*, 723-732.
61. Nakamura,H., Haley,K.J., Nakamura,T., Luster,A.D., and Lilly,C.M. (1998). Differential regulation of eotaxin expression by TNF- α and PMA in human monocytic U-937 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *275*, L601-L610.
62. Opdenakker,G., Fiten,P., Nys,G., Froyen,G., Van Roy,N., Speleman,F., Laureys,G., and Van Damme,J. (1994). The human MCP-3 gene (SCYA7): Cloning, sequence analysis, and assignment to the C-C chemokine gene cluster on chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* *21*, 403-408.
63. Noso,N., Sticherling,M., Bartels,J., Mallet,A.I., Christophers,E., and Schröder,J.-M. (1996). Identification of an N-terminally truncated form of the chemokine RANTES and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as major eosinophil attractants released by cytokine- stimulated dermal fibroblasts. *J. Immunol.* *156*, 1946-1953.
64. Gonzalo,J.A., Lloyd,C.M., Wen,D.Y., Albar,J.P., Wells,T.N., Proudfoot,A., Martinez,C., Dorf,M., Bjerke,T., Coyle,A.J., and Gutierrez-Ramos,J.C. (1998).

The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 188, 157-167.

65. Luster, A.D. and Rothenberg, M.E. (1997). Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J. Leukocyte Biol.* 62, 620-633.
66. Teran, L. M., Mochizuki, M., Bartels, J., and Schröder, J.-M. Eotaxin and RANTES production by TNF- α stimulated human lung fibroblasts. Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology "The role of chemokines in leukocyte trafficking and disease", Copper Mountain, Colorado; March 31-April 5. 1997.
Ref Type: Abstract
67. Mochizuki, M., Bartels, J., Mallet, A. I., Christophers, E., and Schröder, J.-M. Interleukin 4 selectively induces eotaxin in dermal fibroblasts: a possible mechanism of eosinophil-recruitment in parasite defense, allergic and atopic skin disease. 1997.
Ref Type: Unpublished Work
68. Maune, S., Pods, R., Bartels, J., and Schröder, J.-M. (1999). Nasale Fibroblasten sind eine Quelle für Eotaxin-mRNA-Genexpression. *Allergologie* 22, 477-480.
69. Hein, H., Schlüter, C., Kulke, R., Christophers, E., Schröder, J.-M., and Bartels, J. (1997). Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 537-542.
70. Widmer, U., Yang, Z., van-Deventer, S., Manogue, K.R., Sherry, B., and Cerami, A. (1991). Genomic structure of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha and conservation of potential regulatory sequences with a human homolog, LD78. *J. Immunol.* 146, 4031-4040.
71. Murakami, K., Nomiyama, H., Miura, R., Follens, A., Fiten, P., Van Coillie, E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1997). Structural and functional analysis of the promoter region of the human MCP-3 gene: Transactivation of expression

by novel recognition sequences adjacent to the transcription initiation site. *DNA Cell Biol.* 16, 173-183.

72. Nelson,P.J., Kim,H.T., Manning,W.C., Goralski,T.J., and Krensky,A.M. (1993). Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J. Immunol.* 151, 2601-2612.
73. Hoeck,J. and Woisetschlager,M. (2001). STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts. *J. Immunol.* 166, 4507-4515.
74. Bennett,B.L., Cruz,R., Lacson,R.G., and Manning,A.M. (1997). Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E- selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF- kappaB. *J. Biol. Chem.* 272, 10212-10219.
75. Ghosh,S., May,M.J., and Kopp,E.B. (1998). NF-kappaB and rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-260.
76. Sheppard,K.A., Phelps,K.M., Williams,A.J., Thanos,D., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G., Gerritsen,M.E., and Collins,T. (1998). Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry* 273, 29291-29294.
77. Lin,S.C., Wortis,H.H., and Stavnezer,J. (1998). The ability of CD40L, but not lipopolysaccharide, to initiate immunoglobulin switching to immunoglobulin G1 is explained by differential induction of NF-kappaB/Rel proteins. *Mol. Cell Biol.* 18, 5523-5532.
78. Jedrzkiewicz,S., Nakamura,H., Silverman,E.S., Luster,A.D., Mansharamani,N., In,K.H., Tamura,G., and Lilly,C.M. (2000). IL-1beta induces eotaxin gene transcription in A549 airway epithelial cells through NF-kappaB. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 279, L1058-L1065.

79. Ohmori, Y. and Hamilton, T.A. (2000). Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* *275*, 38095-38103.
80. Albrecht, B., Peiritsch, S., and Woisetschlager, M. (1994). A bifunctional control element in the human IgE germline promoter involved in repression and IL-4 activation. *Int. Immunol.* *6*, 1143-1151.
81. Delphin, S. and Stavnezer, J. (1995). Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J. Exp. Med.* *181*, 181-192.
82. Mikita, T., Kurama, M., and Schindler, U. (1998). Synergistic activation of the germline epsilon promoter mediated by Stat6 and C/EBP beta. *J. Immunol.* *161*, 1822-1828.
83. Gingras, S., Simard, J., Groner, B., and Pfitzner, E. (1999). p300/CBP is required for transcriptional induction by interleukin-4 and interacts with Stat6. *Nucleic Acids Res.* *27*, 2722-2729.
84. Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., and Collins, T. (1999). Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6367-6378.
85. Hottiger, M.O., Felzien, L.K., and Nabel, G.J. (1998). Modulation of cytokine-induced HIV gene expression by competitive binding of transcription factors to the coactivator p300. *EMBO J.* *17*, 3124-3134.
86. Vo, N. and Goodman, R.H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* *276*, 13505-13508.
87. Kim, D.W., Cheriya, V., Roy, A.L., and Cochran, B.H. (1998). TFII-I enhances activation of the c-fos promoter through interactions with upstream elements. *Mol. Cell Biol.* *18*, 3310-3320.

-
88. Mikita, T., Daniel, C., Wu, P., and Schindler, U. (1998). Mutational analysis of the STAT6 SH2 domain. *J. Biol. Chem.* 273, 17634-17642.
 89. Altschmied, J. and Duschl, J., Set of optimized luciferase gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques*, 1997. 23 3: 436-438.

Lebenslauf

Name Herbert Hein

Adresse Tannenweg 1
25541 Brunsbüttel

Telefon 04852/4675 (privat)

geboren am 17.05.66 in Bramsche/Kreis
Osnabrück

Eltern Emil Hein, Kapitän – Seelotse am
NOK1
Renate Hein, geb. Schulz

Staatsangehörigkeit Deutsch

Familienstand Ledig

72/76 Grundschule Nord, Brunsbüttel

76/85 Gymnasium Brunsbüttel

09/85 Grundwehrdienst bei der Marine,
7. Schnellbootgeschwader in Kiel

86/88 Grundstudium Biologie an der C.A.U
Kiel Abschluß des
Vordiploms

88/92 Hauptstudium mit Hauptfach
Mikrobiologie

06/92 Diplomprüfung in den Fächern
Mikrobiologie, Biochemie und
Zoologie

- 92/93**.....Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der C.A.U. Kiel bei Prof. Schauer mit dem Thema „Vergleich der Sialidasen von Prokaryonten mit der von *Asterias Rubens*“.
- 02/94**..... Arbeiten zur Isolierung des Sialidasegens aus dem Seestern *Asterias Rubens* im Institut für Biochemie in Kiel. Aus finanziellen Gründen konnte das Projekt nicht zu Ende gebracht werden.
- 08/95**..... Beginn der Arbeit als wissenschaftlicher Assistent unter der Leitung von Prof.Schröder in der Hautklinik Kiel zum Thema : „Genregulation von eosinophil chemotaktisch wirkenden Chemokinen in Zellen der menschlichen Haut“.
- 05/00**..... Anstellung bei der Firma Biozym Diagnostik GmbH als Produktspezialist im Bereich Genomic Service / DNA-Sequenzierung.
- 05/01**..... Wiederaufnahme der Doktorarbeit bei Prof. Schröder in Kiel.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. E. Christophers und Herrn Prof. Dr. J.-M. Schröder für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. A. Dushl und Herrn Dr. M. Haake gilt mein Dank für Ihr Interesse an meiner Arbeit.

Für den Spaß bei der Laborarbeit, die entspannte Atmosphäre und die vielen Tipps und Hilfeleistungen möchte ich mich ganz herzlich bei Nils, Robert, Judith, Jürgen, Jackson, Claire, Jutta, Marlies, Claudia, Birgit, Carsten, Oliver, Claus, Lars, Ulf, Stefan und Gisa bedanken.

Außerdem möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik für die freundliche Unterstützung danken.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern bedanken, welche mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie ist nicht veröffentlicht, noch ist sie zur Veröffentlichung eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Abstract:

Eosinophils in addition to being important effector cells against helminths are involved in tissue damage characteristic for allergic and atopic skin diseases. Eosinophil-specific chemoattractants like eotaxin-1-3 but also MCP-3, MCP-4 and RANTES are believed to be responsible for tissue-accumulation of eosinophils. To understand the unique regulation of eotaxin-1 gene expression we investigated the activation of this gene in cultured human dermal fibroblasts and A549 lung epithelial cells by analysing nuclear extracts of dermal fibroblast and A549 cells for NF κ B and Stat6 binding to the overlapping Stat6/NF κ B region of the eotaxin-1 promoter and performed luciferase reporter gene assays using eotaxin-1 promoter reporter constructs. Reporter gene assays showed that the selected 125 bp eotaxin promoter region containing the NF κ B/Stat-6 recognition site was sufficient to mediate IL-4, IL-13 or TNF- α -induced transcription as well as enhanced transcription upon Stimulation with a combination of TNF- α and IL-4. Nuclear extracts of IL-4, TNF- α or IL-4+TNF- α treated cells showed Stat6, NF κ B-p65 (but not NF κ B-p50) or Stat 6 + NF κ B-p65 binding respectively to eotaxin-1 promoter DNA. Reporter constructs defective in one of the 2 recognition sites did not mediate IL-4 or TNF- α induced transcription. These results underscore that the combination of either IL4 or IL13 with TNF- α is the major stimulus for eotaxin-1 dependent eosinophil accumulation and may point to the involvement of additional nuclear factors interacting with the STAT6/NF κ B recognition site.