

Funktionelle Charakterisierung und *in silico*-  
Modellierung LPS-induzierbarer Elemente  
des RANTES-Promotors in humanen Monocyten

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde einer Doktorin der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
**Sabine Fessele**  
aus Tübingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Mitberichter: PD Dr. Harald Wajant

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2001

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Dr. Peter J. Nelson (Ph.D.) im Forschungslabor der Medizinischen Poliklinik (Direktor Prof. Dr. Detlef Schlöndorff) der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 464 - „Pathogenese HIV-induzierter Erkrankungen“ - gefördert.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der ausdrücklich bezeichneten Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

München, den 16. Januar 2001

**MEINEN ELTERN**



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>15</b>
2.1	ABSTRACT	15
2.2	INTRODUCTION	15
2.3	RESULTS	17
2.3.1	TRANSIENT TRANSFECTION AND DNASE I FOOTPRINTING IDENTIFIED POTENTIAL LPS RESPONSIVE TRANSCRIPTIONAL CONTROL ELEMENTS WITHIN THE CCL5/RANTES PROMOTER	17
2.3.2	A SP1-REL P50/P50 COMPOSITE ELEMENT (PROMOTER MODULE) MEDIATES LPS RESPONSIVENESS IN MONOCYTIC CELLS	18
2.3.3	FUNCTIONAL ROLES OF SP1, P50/P65 AND P50/P50	18
2.3.4	CONSTITUTIVE C/EBP BINDING TO R(E) IS IMPORTANT IN LPS CONTROL OF CCL5/RANTES EXPRESSION	19
2.3.5	COMPUTER MODELING OF THE ORGANIZATION OF FUNCTIONAL ELEMENTS	19
2.4	CONCLUSIONS	20
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>25</b>
4.1	CHEMOKINE	25
4.2	CHEMOKIN-REZEPTOREN	26
4.3	CHEMOKINE, CHEMOKIN-REZEPTOREN UND HIV-1	26
4.4	CHEMOTAXIS UND LEUKOCYTEN-REKRUTIERUNG	28
4.5	ZELLAKTIVIERUNG DURCH RANTES	30
4.5.1	AKTIVIERUNG VON T-ZELLEN UND NK-ZELLEN	30
4.5.2	AKTIVIERUNG VON GRANULOCYTEN	31
4.6	BEDEUTUNG VON RANTES FÜR DIE ENTSTEHUNG VON KRANKHEITEN	31
4.6.1	TRANSPLANTAT-ABSTOßUNG	31
4.6.2	ARTERIOSKLEROSE	32

4.6.3	RHEUMATOIDE ARTHRITIS	32
4.6.4	ALLERGISCHE REAKTIONEN	32
4.6.5	SEPTISCHER SCHOCK	33
<b>4.7</b>	<b>BIOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON RANTES</b>	<b>33</b>
<b>4.8</b>	<b>GENOMISCHE ORGANISATION DES RANTES-GENS</b>	<b>35</b>
<b>4.9</b>	<b>RANTES-EXPRESSION VERSCHIEDENER GEWEBE</b>	<b>35</b>
<b>4.10</b>	<b>REGULATION DER RANTES-EXPRESSION</b>	<b>36</b>
<b>4.11</b>	<b>MONOCYTEN UND LPS</b>	<b>37</b>
<b>4.12</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>39</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b>		<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>VORBEMERKUNG</b>	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>CHEMIKALIEN, ENZYME UND RADIOAKTIVITÄT</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER</b>	<b>41</b>
5.3.1	KULTURMEDIEN	42
5.3.1.1	LB-Medium für die Kultur von <i>E. coli</i>	42
5.3.1.2	LB-Agarplatten für die Kultur von <i>E. coli</i>	42
5.3.1.3	Ampicillinhaltige Medien und Agarplatten für die Kultur von <i>E. coli</i>	42
5.3.1.4	MM6-Medium	42
5.3.1.5	THP-1-Medium	42
5.3.1.6	Medium für primäre Monocyten	42
5.3.2	ALLGEMEIN VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER	43
5.3.2.1	10 x PBS	43
5.3.2.2	TE-Puffer	43
5.3.2.3	10 x TBE-Puffer	43
5.3.2.4	6 x DNA-Ladepuffer	43
5.3.2.5	Gellösung für 5 %ige nicht denaturierende Polyacrylamidgele	43
5.3.3	LÖSUNGEN FÜR DIE ANALYSE VON RNA	43
5.3.3.1	Lösung D	43
5.3.3.2	10 x MOPS-Puffer	44
5.3.3.3	Ladepuffer für analytische RNA-Agarosegele	44
5.3.3.4	Ladepuffer für denaturierende RNA-Agarosegele	44
5.3.3.5	20 x SSC-Puffer	44
5.3.3.6	100 x Denhardt-Lösung	44
5.3.3.7	Hybridisierungsmix	44
5.3.3.8	Waschpuffer 1	44

5.3.3.9	Waschpuffer 2	45
5.3.4	LÖSUNGEN FÜR DIE HERSTELLUNG VON KERNEXTRAKTEN	45
5.3.4.1	Puffer A	45
5.3.4.2	Puffer C	45
5.3.5	LÖSUNGEN FÜR <i>DNASE I FOOTPRINTING</i> -EXPERIMENTE	45
5.3.5.1	10 x Bindungspuffer	45
5.3.5.2	MgCl <sub>2</sub> /CaCl <sub>2</sub> -Mix	45
5.3.5.3	Stop-Puffer	46
5.3.5.4	Formamid-Ladepuffer	46
5.3.5.5	Saurer Formamid-Ladepuffer	46
5.3.6	LÖSUNGEN FÜR DEN RANTES-ELISA	46
5.3.6.1	Beschichtungspuffer	46
5.3.6.2	Blockierungspuffer	46
5.3.6.3	Waschpuffer	46
5.3.6.4	Verdünnungspuffer	46
5.3.6.5	Substratlösung	46
<b>5.4</b>	<b>PLASMIDE</b>	<b>47</b>
5.4.1	LUCIFERASE-REPORTERKONSTRUKTE	47
5.4.2	DAS KONSTRUKT pGL3/-974/RANTES	48
5.4.3	DERIVATE DES KONSTRUKTS pGL3/-974/RANTES	50
5.4.3.1	Die Konstrukte der 5'-3'-Deletionsserie	50
5.4.3.2	Die Konstrukte pGL3/-194/A-del, pGL3/-194/B-del und pGL3/-194/AB-del	50
5.4.3.3	Konstrukte, die durch positionsgerichtete Mutagenese hergestellt wurden	51
5.4.4	KONSTRUKTE MIT HETEROLOGEM PROMOTOR	52
5.4.5	SONSTIGE PLASMIDE	54
5.4.6	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	54
<b>5.5</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>54</b>
5.5.1	KULTUR DER MONOCYTEN-ZELLINIEN	54
5.5.2	ISOLIERUNG PRIMÄRER MONOCYTEN	55
<b>5.6</b>	<b>TRANSFEKTION UND LUCIFERASE-REPORTER-ASSAYS</b>	<b>55</b>
5.6.1	PRINZIP	55
5.6.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON MM6- UND THP-1-ZELLEN	56
5.6.3	GEWINNUNG VON ZELLYSATEN UND BESTIMMUNG DER REPORTERAKTIVITÄT	56
5.6.4	STABILE TRANSFEKTION VON THP-1-ZELLEN	57
<b>5.7</b>	<b>RNA-ANALYSEN</b>	<b>58</b>
5.7.1	ISOLIERUNG VON RNA AUS MM6- UND THP-1-ZELLEN	58
5.7.2	ANALYTISCHE RNA-GELELEKTROPHORESE	59

5.7.3	DENATURIERENDE RNA-GELELEKTROPHORESE	59
5.7.4	TRANSFER DER RNA (NORTHERN-BLOT)	59
5.7.5	HERSTELLUNG RADIOAKTIV MARKIERTER SONDEN	60
5.7.6	PEI-CHROMATOGRAPHIE	60
5.7.7	HYBRIDISIERUNG [CHURCH AND GILBERT, 1984]	60
5.7.8	WASCHEN DER MEMBRAN UND EXPOSITION	61
5.7.9	ENTFERNEN HYBRIDISierter SONDEN	61
<b>5.8</b>	<b>PRÄPARATION VON KERNEXTRAKTEN AUS MONOCYTEN</b>	<b>62</b>
<b>5.9</b>	<b><i>DNASE I FOOTPRINTING</i></b>	<b>63</b>
5.9.1	PRINZIP	63
5.9.2	MARKIERUNG DER SONDE	64
5.9.2.1	Erster Restriktionsverdau	64
5.9.2.2	Zweiter Restriktionsverdau	65
5.9.2.3	Reinigung der Sonde durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Isotachophorese	65
5.9.3	DNA-BINDUNGSREAKTION	66
5.9.4	VERDAU MIT DNASE I UND ANALYSE DER SPALTPRODUKTE	67
5.9.5	HERSTELLUNG EINER A/G-LEITER	68
<b>5.10</b>	<b><i>ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)</i></b>	<b>68</b>
5.10.1	PRINZIP	68
5.10.2	HYBRIDISIERUNG VON EINZELSTRANG-OLIGONUCLEOTIDEN ZU DOPPELSTRÄNGEN	70
5.10.3	MARKIERUNG VON OLIGONUCLEOTID-SONDEN DURCH KINASIERUNG	70
5.10.4	HERSTELLUNG EINER MARKIERTEN SONDE, DIE DEN BEREICH VON -125 BIS -18 ENTHÄLT	71
5.10.5	BINDUNGSREAKTION	72
5.10.6	AUFTRENNUNG DER EMSA-KOMPLEXE	73
<b>5.11</b>	<b>SONSTIGE METHODEN</b>	<b>73</b>
5.11.1	DURCHFLUSSCYTOMETRIE	73
5.11.2	RANTES-ELISA	73
5.11.3	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	74
<b>5.12</b>	<b>SOFTWARE FÜR SEQUENZANALYSE UND MODELLIERUNG</b>	<b>74</b>



<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
<b>6.1</b>	<b>RANTES-EXPRESSION IN MONOCYTEN</b>	<b>77</b>
6.1.1	MONOCYTEN-ZELLINIEN UND -STIMULI	77
6.1.2	KINETIK DER LPS-INDUZIERTEN RANTES-EXPRESSION IN MM6-ZELLEN	78
6.1.3	KINETIK DER LPS-INDUZIERTEN RANTES-EXPRESSION IN THP-1-ZELLEN	80
6.1.4	STABIL TRANSFIZIERTE THP-1-LINIEN	82
<b>6.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG POTENTIELLER KONTROLLREGIONEN IM RANTES-PROMOTOR</b>	<b>84</b>
6.2.1	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG DER PROMOTORREGION VON -194 BIS +54 IN TRANSIENTEN TRANSFEKTIONEN	84
6.2.2	<i>DNASE I FOOTPRINTING</i> -ANALYSE DER PROMOTORREGION VON -230 BIS +54 IN THP-1-ZELLEN	84
<b>6.3</b>	<b><i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IM RANTES-PROMOTOR</i></b>	<b>88</b>
<b>6.4</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DES PROMOTORELEMENTS R(E)</b>	<b>90</b>
6.4.1	SEQUENZANALYSE DER REGION R(E)	90
6.4.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DER REGION R(E) MIT PUNKTMUTATIONEN	91
6.4.3	R(E) BINDET IN MM6-ZELLEN MITGLIEDER DER C/EBP-FAMILIE	92
6.4.4	R(E) IN ANDEREN MONOCYTEN-ZELLEN	94
6.4.5	R(E) IN EINEM HETEROLOGEN PROMOTOR	96
<b>6.5</b>	<b>UNTERSUCHUNG DER PROMOTORREGION R(AB)</b>	<b>98</b>
6.5.1	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG VON R(AB) IN TRANSIENTEN TRANSFEKTIONEN	98
6.5.2	R(A) BINDET SP1 UND NF- $\kappa$ B, WÄHREND R(B) BEVORZUGT P50/P50 BINDET	99
6.5.3	REGION R(AB) IN EINEM HETEROLOGEN PROMOTOR	102
6.5.4	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON P50/P65, SP1 UND P50/P50 FÜR DIE STIMULATION DURCH LPS	103
<b>6.6</b>	<b>ÜBERGEORDNETE STRUKTUR DES RANTES-PROMOTORS</b>	<b>105</b>
6.6.1	LAGE VON R(E) UND R(AB)	105
6.6.2	EINE SONDE, DIE DEN BEREICH VON -125 BIS -18 ENTHÄLT, BILDET MIT MM6-KERNPROTEINEN EINEN GROßEN EMSA-KOMPLEX	107
6.6.3	<i>IN SILICO</i> -ANALYSE DER PROMOTORELEMENTE R(E) UND R(AB)	108
6.6.4	MODELLIERUNG DER -228-REGION DES RANTES-PROMOTORS	114

<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>117</b>
<b>7.1</b>	<b>REGULATION DER RANTES-EXPRESSION IN MONOCYTEN</b>	<b>117</b>
7.1.1	STIMULATION DURCH LPS	117
7.1.2	ANDERE MONOCYTEN-STIMULI	118
<b>7.2</b>	<b>POLYMORPHISMUS IM RANTES-PROMOTOR</b>	<b>119</b>
<b>7.3</b>	<b>LPS-INDUZIERBARE ELEMENTE DES RANTES-PROMOTORS</b>	<b>121</b>
7.3.1	BEDEUTUNG VON SP1, P50/P65 UND P50/P50	121
7.3.2	DAS C/EBP-BINDENDE ELEMENT R(E)	122
7.3.3	ÜBERGEORDNETE STRUKTUR DES RANTES-PROMOTORS	123
7.3.4	<i>IN SILICO</i> -MODELLIERUNG DES RANTES-PROMOTORS	125
<b>7.4</b>	<b>RANTES-REGULATION IN ANDEREN ZELLTYPEN</b>	<b>127</b>
<b>7.5</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>145</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>147</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>148</b>

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin und Ampère
AP	<i>activator protein</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CCR	<i>CC chemokine receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD40-L	CD40-Ligand (CD154)
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CS	<i>core similarity</i>
DEAE	Diethylaminoethyl-
dIdC	Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	<i>fluorescein(isothiocyanate)</i>
g	Gramm und Erdbeschleunigung (etwa 9,81 m/s <sup>2</sup> )

G	Guanin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMG	<i>high mobility group protein</i>
I	Inosin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
kb	Kilobase(n)
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar (mol/l)
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MM6	Mono Mac 6
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	<i>matrix similarity</i>
NCS	<i>newborn calf serum</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PHA	Phytohämagglutinin
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
RLE	relative Lichteinheiten

RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
Sp1	<i>stimulating protein 1</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i> und Uracil
ÜN	über Nacht
unstim.	unstimuliert
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen



---

## 2 SUMMARY

### 2.1 Abstract

The chemokine CCL5/RANTES is a proinflammatory agent produced by a variety of tissues in response to specific stimuli. The tissue-specific transcription of CCL5/RANTES is regulated in part by the spatial organization of different *cis*-acting elements within its promoter and select induced and constitutive transcription factors. In human monocytes, CCL5/RANTES transcription is rapidly and transiently upregulated in response to LPS. In this work two regions are described that help control LPS driven transcription from the human CCL5/RANTES promoter in monocytic cells. These sites were analyzed using DNase I footprinting, transient transfection assays, site-directed mutagenesis and EMSA. RANTES site E (R(E), -125/-99) constitutively binds C/EBP proteins in monocytic Mono Mac 6 and THP-1 cells. Mutation of region R(E) led to a significant (40-50 %) reduction in LPS induced promoter reporter activity. Region R(AB) is composed of tandem  $\kappa$ B-like elements R(A) and R(B) (-73/-34). These sites working in concert act as an LPS responsive promoter module. R(A) constitutively binds Sp1, and Rel p50/p65 following LPS stimulation. Either factor can mediate transcriptional effects at R(A). Induced Rel p50/p50 binding to site R(B) is required for LPS regulation of CCL5/RANTES transcription. A series of computer models based upon the CCL5/RANTES promoter were generated to represent the organization of these functional elements. The models were able to identify LPS regulated promoters in human, other vertebrate and viral sequences in various databases.

### 2.2 Introduction

The CCL5/RANTES protein is a member of the chemokine family of immunoregulatory cytokines. Chemokines act as chemotactic agents, induce changes in integrins, and can activate select effector leukocyte subpopulations [Baggiolini *et al.*, 1997]. CCL5/RANTES belongs to the CC or beta chemokine subfamily, and has been implicated as an important mediator of diverse inflammatory processes [Nelson *et al.*, 1998]. CCL5/RANTES induces chemotaxis of basophils, eosinophils, monocyte/macrophage cells, natural killer cells and T lymphocytes. This proinflammatory factor is expressed by select tissue types in response to

specific stimuli and is thought to contribute to the pathology of a variety of inflammatory diseases that are characterized by a mononuclear cell infiltrate including renal allograft rejection, delayed-type hypersensitivity, kidney glomerular disease and inflammatory lung disease [Devergne *et al.*, 1994; Gröne *et al.*, 1999; Nelson and Krensky, 2001; Segerer *et al.*, 2000].

Monocyte/macrophage cells help control the initiation and propagation of immune processes [Ziegler-Heitbrock, 1989]. In addition, the cells of this lineage are important targets of HIV-1 infection [Zybarth *et al.*, 1999]. The chemokine receptor CCR5 acts as the major co-receptor for HIV-1 entry into this cell type [Alkhatib *et al.*, 1996]. Upon activation, monocytes can be protected from HIV-1 infection *in vitro* through the increased expression of chemokine ligands for CCR5 including CCL5/RANTES [Verani *et al.*, 1997]. Thus, while monocytes represent a reservoir for the virus, they may also contribute to the control of HIV-1 infection *in vivo* by the local production of specific chemokines such as CCL5/RANTES.

Lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram-negative bacteria [Rietschel *et al.*, 1994], can induce a vigorous inflammatory response *in vivo* that is characterized by an influx of immune effector cells into the infected tissue. Stimulation with LPS leads to high localized production of select cytokines by monocyte/macrophage cells that can, in some cases, lead to septic shock, a major cause of morbidity and mortality [Ulevitch and Tobias, 1999]. CCL5/RANTES may contribute to this process through its recruitment and activation of T cells, monocytes, basophils and eosinophils.

The major cell surface receptor for LPS is the GPI-anchored glycoprotein CD14 [Ulevitch and Tobias, 1999]. The Toll-like receptor 4 (TLR4) forms a complex with CD14 molecules that have bound LPS and mediates signal transduction across the cell membrane through its oligomerization and concomitant recruitment of Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) to the signaling complex. TLR4 shares a common signaling pathway with IL-1R leading to activation of the NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) and subsequently to mobilization of NF- $\kappa$ B [Aderem and Ulevitch, 2000; Brightbill and Modlin, 2000].

Linking the results of functional analysis of promoter regulation to bioinformatic tools now allows the rapid identification of potential co-regulated genes [Klingenhoff *et al.*, 1999]. The specificity of promoter control of transcription is located not in individual transcription factor binding sites, but in the higher order organization of individual elements. A "composite element" or "promoter module" represents a specific combination of individual control



elements that exhibit qualitatively new properties, such as a novel pattern of gene regulation [Kel *et al.*, 1995]. The components may act antagonistically or synergistically and the constituent DNA elements may be overlapping, adjacent or separated by a stretch of less defined base pairs. However, they act jointly as one functional unit [Kel *et al.*, 1995].

The expression of RANTES/CCL5 *in vivo* appears to be diverse and selective, depending on cell type and stimulus [Lin *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1998]. Therefore, the CCL5/RANTES gene was used as a molecular probe to explore biological mechanisms involved in the control of tissue-specific gene expression. The goal of this work was to characterize transcriptional events responsible for LPS induced upregulation of the CCL5/RANTES gene in monocytic cells. The experimental data was then used to model the higher order organization of functional elements applying novel bioinformatic tools. Following a database search, the models were able to specifically identify human, other vertebrate, and viral promoters that show LPS regulation, and in addition, to identify candidate genes that may show LPS co-regulation.

## 2.3 Results

### 2.3.1 Transient transfection and DNase I footprinting identified potential LPS responsive transcriptional control elements within the CCL5/RANTES promoter

In monocytes CCL5/RANTES mRNA is transcriptionally upregulated following stimulation with LPS. Transient transfection of MM6 cells with 5' to 3' CCL5/RANTES promoter deletion constructs demonstrated that regions within the -194 to +54 region contribute to constitutive and LPS mediated reporter gene activity. A prominent LPS inducible footprint was identified between the CAAT and TATA boxes of the CCL5/RANTES promoter. This footprint consists of two portions spanning positions -73 to -61 and -57 to -34 and generally corresponds to the  $\kappa$ B-like regions R(A) and R(B) previously identified in T cells [Nelson *et al.*, 1996]. A DNase I footprint corresponding to positions -137 to -104 contains a region called R(E), according to the nomenclature that has been established for RANTES regulation in T cells [Ortiz *et al.*, 1996].

### 2.3.2 A Sp1-Rel p50/p50 composite element (promoter module) mediates LPS responsiveness in monocytic cells

Heterologous promoter reporter gene assays were performed to assess the functionality of region R(AB), the tandem  $\kappa$ B elements, that were identified as an LPS inducible region in DNase I footprinting. Transient transfection of MM6 cells with luciferase constructs containing dimers of R(AB) demonstrated that the R(AB) region can efficiently confer LPS inducibility. However, the selective mutation of either R(A) or R(B) in the context of the dimer resulted in loss of LPS inducibility. As both elements are required to transfer LPS inducibility to a second promoter, region R(AB) meets the criteria for a promoter module [Kel *et al.*, 1995]. In subsequent mutation/transient transfection experiments within the context of the CCL5/RANTES promoter, R(A) was found to be required for both constitutive and LPS induced activity of the CCL5/RANTES promoter in monocytic MM6 cells. In contrast, region R(B) did not appear to affect constitutive promoter reporter gene expression, but was required for LPS inducibility.

In EMSA experiments using unstimulated MM6 nuclear extracts Sp1 and a slight amount of Rel p50 and p52 proteins were found to bind to R(A). Slight Rel p50 and p52 binding was seen at R(B). Following LPS stimulation pronounced binding of Rel p50/p65 to site R(A) and an induced binding of Rel p50/p50 to site R(B) was found.

### 2.3.3 Functional roles of Sp1, p50/p65 and p50/p50

The functional roles of Sp1 and p50/p65 in transcriptional control through region R(A), and of Rel protein interaction at R(B), were investigated by directed modification of sites R(A) and R(B) in the context of the -194/RANTES promoter. MatInspector was used to design mutants of site R(A) that resulted in a DNA sequence that would bind either p50/p65 or Sp1 but not both. A modification of site R(B) was identified that would test the relative importance of Rel p50/p50 versus p50/p65 binding by selectively mutating R(B) to preferentially bind p50/p65 heterodimers. The mutations confirmed by EMSA analysis, were then introduced into the -194/RANTES promoter reporter gene construct, and tested in transient transfection of MM6 cells. The results showed that both Sp1 and NF- $\kappa$ B can activate transcription at site R(A). When region R(B) was altered to preferentially bind p50/p65 a complete loss of LPS induced reporter gene expression was seen, again suggesting that LPS effects mediated through R(B) depend upon the induced binding of Rel p50/p50.

### 2.3.4 Constitutive C/EBP binding to R(E) is important in LPS control of CCL5/RANTES expression

R(E) forms part of a large complex identified by DNase I footprinting (-137/-104). EMSA oligonucleotide competition and supershift analysis showed that in monocytes region R(E) constitutively binds C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  and - $\epsilon$ . No obvious change in the composition of the various complexes was seen after LPS stimulation. Mutation of the C/EBP consensus caused a reduction of between 40 and 50 % of LPS stimulated CCL5/RANTES promoter reporter gene activity and approximately 15 % reduction in constitutive activity.

### 2.3.5 Computer modeling of the organization of functional elements

Using FastM, a software tool shaped to design models based upon weight matrix, orientation and distance parameters [Klingenhoff *et al.*, 1999], a series of promoter models for the R(E) and R(AB) elements were developed. ModelInspector was used to search for promoters showing similar organization [Frech *et al.*, 1996; Frech *et al.*, 1997] (<http://genomatix.gsf.de>).

R(AB) represents a composite element or promoter module. Together with the TATA box, R(A) and R(B) were used as the basic elements for the models. The CCL5/RANTES promoter contains consensus sequences with defined core and matrix parameters for p50/p65 and Sp1 in region R(A), and p50/p65 and p50/p50 in region R(B) [Quandt *et al.*, 1995]. Three possible combinations of factors binding at R(A) and R(B), were chosen to generate models 1, 2 and 3. Models 2 and 3 represent combinations that were found to be functional in LPS induced CCL5/RANTES promoter reporter activity in MM6 cells. Model 1 was tested as both R(A) and R(B) can bind Rel p50/p65 heterodimers. Models 4, 5 and 6 were derived from models 1, 2 and 3 by adding a weight matrix for C/EBP. ModelInspector was applied to search the human, rodent, other mammalian, other vertebrate, and viral sections of EMBL database (release 63) and Philipp Bucher's Eukaryotic Promoter Database (EPD) for the six models. The output was filtered for sequences with promoter annotation.

## 2.4 Conclusions

The CCL5/RANTES gene is an excellent example of the flexibility and selectivity that underlie the tissue/signal-specific regulation of gene expression. Diverse cell types express the CCL5/RANTES gene [Nelson *et al.*, 1998; von Luetichau *et al.*, 1996]. It is constitutively expressed by some cells (e.g. megakaryocytes) and is upregulated by other cells in response to specific stimuli. The molecular mechanisms involved in the upregulation of CCL5/RANTES expression can vary significantly between the various tissues that express the gene. This is seen in the kinetics, duration and stimulus-specific control of its expression.

Much has been learned about the transcriptional regulation of CCL5/RANTES expression in effector T lymphocytes and inflamed astrocytes [Miyamoto *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 1997]. Human monocytic cells upregulate CCL5/RANTES mRNA rapidly and transiently in response to LPS. In this work transcriptional elements within the CCL5/RANTES promoter responsible for the upregulation of CCL5/RANTES following LPS stimulation of monocytic cells were characterized. Based upon these experimental results, computer models were generated and used to search databases for promoter sequences that show a similar higher order organization of transcriptional control elements. Using this approach a series of promoters reported as regulated by LPS were identified, as well as promoters that represent new "targets" for LPS regulation.

Within the CCL5/RANTES promoter two LPS control elements located proximal to the CAAT (RANTES site E (R(E))) and TATA boxes (RANTES site AB (R(AB))) were characterized. R(AB) (-73/-34), tandem  $\kappa$ B elements, acts as a promoter module, i.e. a specific combination of individual control elements that exhibit qualitatively new properties, such as a novel pattern of gene regulation [Kel *et al.*, 1995]. RANTES site A, found to be crucial for general CCL5/RANTES promoter function, binds Sp1 in unstimulated MM6 cells, and Rel p50/p65 following LPS stimulation. Either factor can functionally mediate transcriptional effects within the context of the CCL5/RANTES promoter. Region R(B) shows increased binding of Rel p50/p50 in response to LPS stimulation. Rel p50/p50 is classically thought to function as a suppressor of NF- $\kappa$ B [Siebenlist *et al.*, 1994], however, in monocytes, p50/p50 binding to site R(B) mediates the LPS induction of CCL5/RANTES expression. R(E) (-125/-99) constitutively binds C/EBP proteins in MM6 cells and is important for efficient LPS induction of CCL5/RANTES promoter reporter constructs. The

C/EBP factors that constitutively bind R(E) may interact with other, LPS inducible components, e.g. Rel proteins binding to R(AB).

Functionally related promoters often exhibit a defined core organization of binding sites conserved both in orientation and distance. This is true even when the promoter sequences do not show significant overall sequence similarity [Lavorigna *et al.*, 1998]. Individual models, similar to promoter modules (i.e. using distance parameters and optimized transcription factor matrices), can specifically detect the organization of promoters. The analysis tool ModelInspector utilizes models generated by the FastM program to scan database sequences for potential regulatory units matching the model [Frech *et al.*, 1997; Klingenhoff *et al.*, 1999] (<http://genomatix.gsf.de>).

FastM computer models based upon the functional data described here were generated to search various database sections for promoter regions that show a similar organization and therefore potential co-regulation. Three models of the R(AB) promoter module linked to the TATA box were used for the initial search. Three additional models that included the R(E) element were used to study higher level organization of the elements. Model 1, tandem NF- $\kappa$ B (p50/p65) elements, identified the promoter for the murine chemokine MIP-2 [Widmer *et al.*, 1993]. Models 1 and 4 were found in regulatory sequences of murine CMV immediate early genes [Dorsch-Hasler *et al.*, 1985]. Model 3 contained the Sp1-p50/p50 promoter module functionally described here. This model identified a series of promoters within the human and vertebrate (rodent/other mammalian/other vertebrate) database sections including genes described as transcriptionally regulated by LPS, for example, the high mobility group protein-I (HMG-I) and immunoglobulin heavy chains [Wang *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1992]. A second group of promoters identified by the model represent promoters for gene products known to be involved in the biology of LPS, and are therefore excellent candidates for regulation by LPS, for example, the human phospholipid transferase protein (PLTP) which will complex and neutralize LPS [Hailman *et al.*, 1996].

Model 6, an extension of model 3, that included a matrix for a C/EBP element, identified a subset of the promoters found for model 3. Among these are the promoters for human and porcine beta-myosin heavy chains, rat GTP cyclohydrolase I, human and sea urchin metallothioneins 1B and snake phospholipase A2 [Burgermeister *et al.*, 1999; Dulak *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Macallan and Griffin, 1994]. All of these genes are described as upregulated by LPS suggesting that model 6 can describe the higher level organization of a class of LPS responsive genes.

The kinetics and molecular control mechanisms involved in CCL5/RANTES transcription/expression vary among cell types [Lin *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 1997]. The modeling approach described here may be used to predict genes that are co-regulated with CCL5/RANTES in other tissue types in response to other signals.

Regions R(E) and R(AB) are important to CCL5/RANTES expression in T cells [Ortiz *et al.*, 1997]. T cells upregulate CCL5/RANTES "late" (3 to 5 days) after mitogenic activation of resting peripheral blood T cells. In T cells Rel p50/p50 constitutively binds R(B). A novel transcription factor called RFLAT-1 (RANTES factor of late activated T cells-1) is induced late after T cell activation and mediates transcription through R(A) [Nelson *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1999]. In addition, an as of yet unidentified factor upregulated late in T cell activation (R(E)FLAT) binds to R(E) and regulates transcription late after activation [Ortiz *et al.*, 1996]. In astrocytes, CCL5/RANTES induction by IL-1 $\beta$  involves Rel p50/p65 binding to both R(A) and R(B) but no C/EBP interaction at site R(E) [Miyamoto *et al.*, 2000]. However, other elements proximal to the R(E) site, and further upstream in the promoter sequence, were found to play important roles.

The organization of factor interaction on the CCL5/RANTES promoter may help characterize the mechanisms used for tissue-specific control of expression. The integration of functional biology with computer modeling of promoter organization will provide an invaluable tool to the study of transcriptional regulation in the approaching post human genome project era. The approaches used here demonstrate the efficacy of using computer models to predict potential co-regulated genes. These techniques can be applied to diverse questions in biology including the engineering of synthetic promoters, the higher order analysis of clustered genes from micro array analysis, and the identification of additional target genes.

### 3 ZUSAMMENFASSUNG

Das proinflammatorische CC-Chemokin RANTES kann von einer Vielzahl von Geweben als Reaktion auf entsprechende Stimuli produziert werden. Die gewebespezifische Transkription ergibt sich aus der räumlichen Anordnung verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente in der Promotorsequenz und der Anwesenheit von bestimmten Transkriptionsfaktoren. Humane Monocyten produzieren RANTES konstitutiv in geringen Mengen. Stimulation mit LPS führte in diesem Zelltyp zu einer schnellen und transienten Verstärkung der RANTES-Transkription. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Regionen untersucht, die an dieser Transkriptionsaktivierung beteiligt sind. Die Elemente wurden mit Hilfe von *DNase I footprinting*-Analysen und EMSA-Experimenten, sowie der transienten Transfektion von Reportergenkonstrukten charakterisiert.

Die Region E des RANTES-Promotors (R(E), -125/-99) zeigte in den Monocyten-Zelllinien MM6 und THP-1 konstitutive Bindung von Mitgliedern der C/EBP-Familie. Die Mutation der C/EBP-Bindungssequenz in R(E) führte in beiden Zelltypen zu einer um 40-50 % verminderten LPS-induzierten Reporteraktivität.

Die Region R(AB) (-73/-34) besteht aus den NF- $\kappa$ B-ähnlichen Elementen R(A) und R(B). Diese beiden Elemente bilden zusammen ein LPS-induzierbares Promotor-Modul. R(A) bindet konstitutiv Sp1 und, nach Stimulation mit LPS, Rel-p50/p65-Heterodimere (NF- $\kappa$ B). Beide Faktoren können an R(A) transkriptionsaktivierend wirken. Für die Stimulation der RANTES-Transkription durch LPS ist zusätzlich das induzierte Binden von Rel-p50/p65-Homodimeren an R(B) erforderlich.

Die experimentell gewonnenen Daten wurden verwendet, um eine Reihe von Computermodellen zu erstellen. Diese Modelle sollten die Grundstruktur einer durch LPS regulierbaren Promotorsequenz beschreiben. Mit Hilfe dieser Modelle konnten in Datenbanksequenzen andere Promotorbereiche gefunden werden, die ebenfalls durch LPS reguliert werden können. Ferner wurden Kandidatengene für eine transkriptionelle Regulation durch LPS identifiziert.





## 4 EINLEITUNG

RANTES ist ein Mitglied der Familie der chemotaktischen Cytokine, kurz Chemokine genannt. Die Bezeichnung RANTES ist ein Akronym für *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*. Nach der neuen Nomenklatur für Chemokine und Chemokin-Rezeptoren wird es mit CCL5 (*CC chemokine ligand-5*) bezeichnet [Murphy *et al.*, 2000].

### 4.1 Chemokine

Chemokine können von einer Vielzahl von Geweben als Reaktion auf proinflammatorische Signale gebildet werden [Taub, 1996; von Luetichau *et al.*, 1996]. Sie wirken chemotaktisch auf bestimmte Leukocyten-Subpopulationen und vermitteln deren Auswanderung aus dem Blutstrom ins Gewebe [Springer, 1994]. Chemokine und ihre Rezeptoren sind desweiteren an der Kontrolle der Hämatopoese beteiligt und sie vermitteln das *homing* von Lymphocyten in lymphatische Organe [Baggiolini *et al.*, 1997; Taub, 1996; Zlotnik and Yoshie, 2000]. Schließlich spielen sie eine Rolle bei der Angiogenese und der Embryonalentwicklung [Nelson and Krensky, 2001; Rossi and Zlotnik, 2000].

Zu den gemeinsamen Strukturmerkmalen der Chemokine gehören vier konservierte Cysteinreste, deren Position im Protein zur Unterteilung in die funktionellen Subklassen der CC-, CXC-, C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine benutzt wird [Murphy *et al.*, 2000]. X steht dabei für eine beliebige Aminosäure zwischen den ersten beiden N-terminalen Cysteinen der Primärstruktur dieser Proteine. Die CC-Chemokine, die auch  $\beta$ -Chemokine genannt werden, wirken chemattraktiv auf Monocyten und T-Lymphocyten. Bekannte Vertreter dieser Familie sind RANTES und MCP-1. Die CXC-Chemokine wirken hauptsächlich chemoattraktiv auf neutrophile Granulocyten und werden auch als  $\alpha$ -Chemokine bezeichnet. Das erste als Chemokin identifizierte Cytokin, IL-8 [Baggiolini and Clark-Lewis, 1992], und SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) sind Mitglieder dieser Familie. Lymphotactin- $\alpha$  und - $\beta$  besitzen nur zwei Cysteine und werden dementsprechend als C-Chemokine bezeichnet [Kelner *et al.*, 1994]. Sie werden von NK-Zellen produziert und wirken auf NK- und T-Zellen [Hedrick *et al.*, 1997]. Der bislang einzige Vertreter der CX<sub>3</sub>C-Chemokine, Fractalkine, wirkt chemotaktisch auf T-Lymphocyten und Monocyten und zeichnet sich dadurch aus, daß er sowohl in löslicher Form als auch membranständig vorkommt [Bazan *et al.*, 1997].

## 4.2 Chemokin-Rezeptoren

Die Wirkungen der Chemokine werden über die Interaktion mit Chemokin-Rezeptoren vermittelt. Diese gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen [Baggiolini *et al.*, 1997]. Sie werden entsprechend als CC-, CXC-, C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokin-Rezeptoren bezeichnet. Die Spezifität der Chemokin-Wirkung wird über die Expression von Rezeptoren auf den jeweiligen Zielzellen erreicht. Für den Menschen sind inzwischen 45 Chemokine und 18 Chemokin-Rezeptoren bekannt [Murphy *et al.*, 2000]. Da sowohl mehrere Chemokine an den gleichen Rezeptor binden, als auch verschiedene Rezeptoren von dem gleichen Chemokin benutzt werden, ergibt sich daraus ein komplexes, teilweise redundantes Netzwerk [Mantovani, 1999].

Chemokine können auch von Chemokin-bindenden Proteinen, die kein Signal in die Zelle leiten, gebunden werden. Zu diesen gehört DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*), der Erythrocyten-Rezeptor für den Malaria-Erreger *Plasmodium vivax*. DARC bindet zahlreiche Chemokine unterschiedlicher Subklassen [Murphy *et al.*, 2000]. Seine Funktion könnte darin bestehen, Chemokine aus dem Blutkreislauf zu entfernen [Horuk *et al.*, 1993]. Schließlich gibt es mehrere viruscodierte Chemokin-Rezeptoren, die das Virus dazu befähigen könnten, das Immunsystem zu untergraben oder das Zellwachstum fehlzusteuern [Pease and Murphy, 1998].

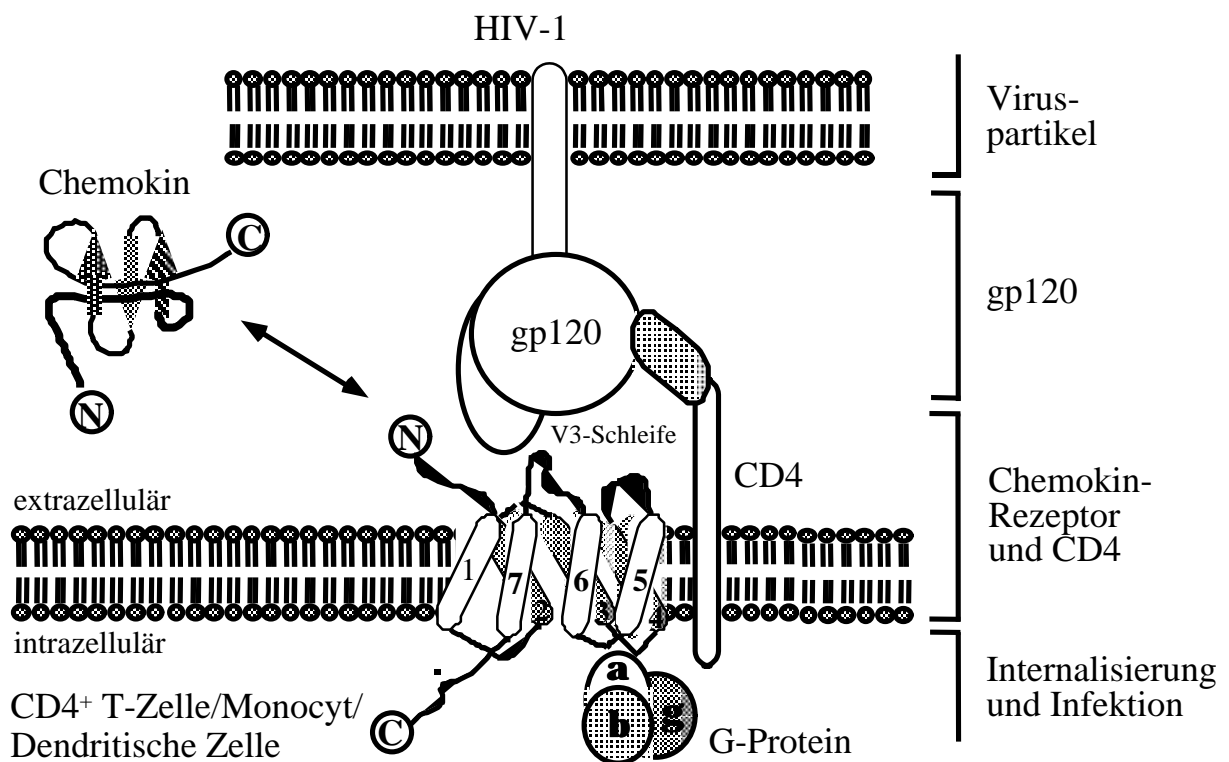
Für RANTES wurde bisher kein spezifischer Rezeptor identifiziert. Es bindet an CCR1, CCR3, CCR5 und DARC. Durch diese breite Spezifität kann RANTES an NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, unreife und reife Dendritische Zellen, Makrophagen, basophile, eosinophile und neutrophile Granulocyten und Erythrocyten binden [Murphy *et al.*, 2000].

## 4.3 Chemokine, Chemokin-Rezeptoren und HIV-1

Im Dezember 1995 wurde bekannt, daß die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  und RANTES die Infektion CD4-positiver Zellen mit HIV-1 inhibieren können [Cocchi *et al.*, 1995]. Bald darauf wurde der von diesen Chemokinen gemeinsam benutzte Rezeptor CCR5 als HIV-1-Corezeptor identifiziert [Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996]. Homozygote Träger einer 32 bp-Deletion im CCR5-Gen (*ccr5* $\Delta$ 32) sind vor einer Infektion mit monocytropen (M-tropen) Stämmen von HIV-1

geschützt [Samson *et al.*, 1996]. Sie können jedoch mit T-Zell-tropen HIV-1-Stämmen infiziert werden. T-trope Stämme benutzen CXCR4, den Rezeptor für das Chemokin SDF-1 als Corezeptor [Amara *et al.*, 1997]. In Anlehnung an die Benutzung der verschiedenen Corezeptoren werden M-trope Stämme neuerdings als R5-Stämme bezeichnet, während T-trope Stämme entsprechend X4-Stämme genannt werden [Murphy *et al.*, 2000]. Eine Funktion von CCR2b und CCR3 als HIV-1-Corezeptoren wurde bisher nur *in vitro* gezeigt [Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996]. Abbildung 1 zeigt die Interaktion zwischen dem gp120-Protein des Virus und den CD4- und Chemokin-Rezeptor-Proteinen auf der Zelloberfläche, die es dem Virus erlaubt, die Zelle zu infizieren. Chemokine können als natürliche Liganden der Chemokin-Rezeptoren diese Interaktion blockieren.

Unabhängig von der Funktion der Chemokin-Rezeptoren als Corezeptoren für HIV-1, können Chemokine *in vitro* auch die Replikation des Virus inhibieren. Dies wurde für Derivate des RANTES-Proteins mit einer aminoterminalen Modifikation gezeigt [Arenzana-Seisdedos *et al.*, 1996; Simmons *et al.*, 1997].



**Abbildung 1: Chemokine können die Infektion CD4-positiver Zellen durch HIV-1 blockieren.** HIV-1 benutzt Chemokin-Rezeptoren als Corezeptoren, um CD4-positive Zellen zu infizieren. Für den Eintritt in die Zelle ist die Interaktion von gp120 sowohl mit CD4 als auch mit dem Corezeptor erforderlich. Chemokin-Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen.

## 4.4 Chemotaxis und Leukocyten-Rekrutierung

Die herausragende Eigenschaft der Chemokine ist die Fähigkeit, Chemotaxis auszulösen, d. h. eine gerichtete Bewegung von Zellen in Richtung der höchsten Konzentration des chemotaktischen Agens in Gang zu bringen. Leukocyten können dabei noch einen Konzentrationsunterschied von 1 % (entlang ihres Durchmessers) wahrnehmen [Springer, 1994].

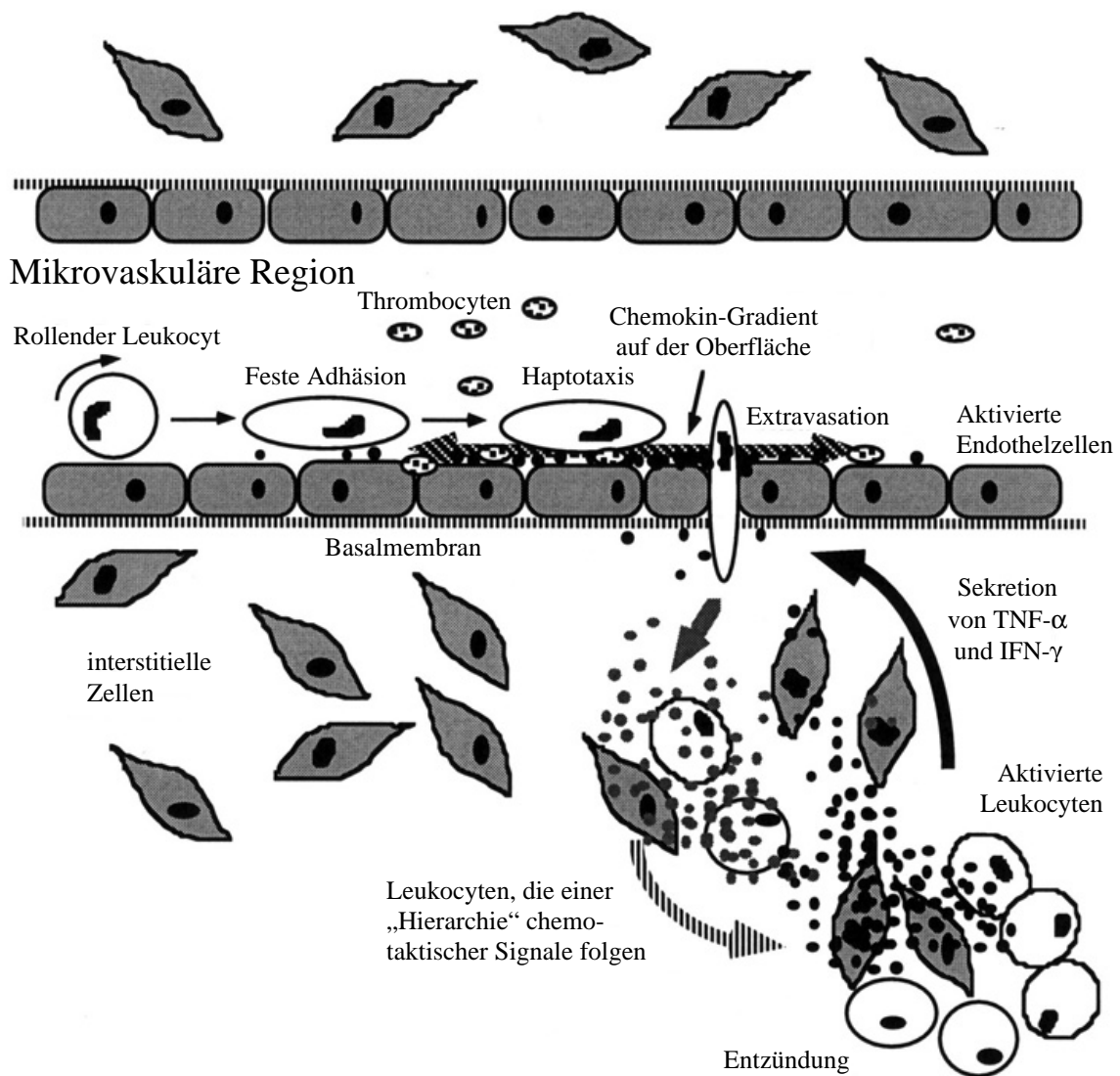
RANTES wirkt stark chemotaktisch auf T-Zellen, vor allem CD45RO<sup>+</sup>-Gedächtnis-T-Zellen, und Monocyten [Schall *et al.*, 1990; Taub *et al.*, 1993]. Desweiteren werden NK-Zellen, Eosinophile und Basophile rekrutiert [Alam *et al.*, 1993; Kameyoshi *et al.*, 1992; Maghazachi *et al.*, 1994; Taub *et al.*, 1995].

Die Auswanderung von Leukocyten aus dem Blutstrom ins Gewebe läuft über eine Abfolge von Interaktionen zwischen löslichen Mediatoren und Oberflächenmolekülen, die vom Gefäßendothel und den Leukocyten exprimiert werden, und schließlich über die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix [Springer, 1994]. Die Stimulation der Endothelzellen und der Leukocyten induziert die Expression von Selektinen und mucinähnlichen vaskulären Adressinen auf deren Oberfläche. Dies ermöglicht eine lockere Interaktion zwischen den beiden Zelltypen, wodurch es den Leukocyten ermöglicht wird, am Endothel entlangzurollen [Schall and Bacon, 1994]. Kommt es zur Interaktion rollender Leukocyten mit Chemokinen, die auf Endothelzellen präsentiert werden, erfolgt die Aktivierung von Integrinen. Dadurch wird die feste Adhäsion der Leukocyten am Endothel und die nachfolgende Transmigration ermöglicht [Schall and Bacon, 1994].

Chemokine greifen in diesen Prozeß auf mehreren Stufen ein [Butcher and Picker, 1996; Weber *et al.*, 1996]. Sie werden durch Thrombocyten-Aktivierung freigesetzt oder durch Endothelzellen oder subendotheliale Gewebe produziert und binden wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen mit spezifischen Glucosaminoglycanen an die Endotheloberfläche [Witt and Lander, 1994]. Auf diese Weise entsteht ein Oberflächen-gebundener Gradient. Die Migration von Zellen entlang eines Oberflächen-gebundenen Gradienten chemotaktischer Substanzen wird als Haptotaxis bezeichnet [Rot, 1993]. Abhängig vom präsentierten Chemokin und dessen Konzentration werden unterschiedliche Zellpopulationen adhären und in das umliegende Gewebe auswandern.

RANTES zum Beispiel führt zur selektiven Adhäsion von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen an das aktivierte Endothel [Taub *et al.*, 1993]. Aus Versuchen mit monoklonalen Antikörpern geht

hervor, daß diese Interaktion durch VLA-4 auf den T-Zellen und VCAM-1 auf den Endothelzellen vermittelt wird [Tanaka *et al.*, 1993]. Außerdem wurde gezeigt, daß RANTES (und auch andere Chemokine) die Adhäsion von T-Zellen an rekombinantes ICAM-1 und VCAM-1 stark erhöht. Der Vorgang wird offenbar durch  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine vermittelt und RANTES könnte dabei die Entstehung der hochaffinen Konfiguration der Integrine begünstigen [Lloyd *et al.*, 1997]. Desweiteren bewirkt RANTES die Adhäsion von Monocyten an aktivierte Endothelzellen [Vaddi and Newton, 1994]. Aus der erwähnten Arbeit geht auch hervor, daß RANTES die Expression der Integrine CD11b und CD11c auf der Oberfläche der Monocyten induziert.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Vorgangs der Rekrutierung von Leukocyten aus dem Blutstrom ins Gewebe.** Chemokine (schwarze und graue Punkte) bewirken die Adhäsion der Leukocyten an das Gefäßendothel. Nach der transendothelialen Migration erreichen die Leukocyten den Entzündungsherd dadurch, daß sie einer „Hierarchie“ chemotaktischer Signale folgen. Die Abbildung ist entnommen aus Nelson and Krensky, 1998.

Ein beträchtliches Hindernis auf dem Weg der Leukocyten ins Gewebe stellt die Basalmembran dar, die in gesunden Geweben von Zellen nur schwer zu durchdringen ist. Eine Gruppe von Proteinen, die diesen Weg erleichtern, sind die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). MMPs sind proteolytische Enzyme, die Kollagen und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren [Leppert *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1996]. In infiltrierenden T-Zellen [Xia *et al.*, 1996] und Monocyten [Klier and Nelson, 1999] stimuliert RANTES die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 und erhöht deren Aktivität. Dadurch wird der Weg dieser Zellen ins Gewebe erleichtert. Da in entzündeten Geweben verschiedene chemotaktische Agenzien anwesend sind und eine „Hierarchie“ chemotaktischer Signale bilden, muß der einwandernde Leukocyt entlang mehrerer Gradienten wandern, um schließlich den Entzündungsherd zu erreichen [Campbell *et al.*, 1997; Nelson and Krensky, 1998].

## 4.5 Zellaktivierung durch RANTES

### 4.5.1 Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen

Neben der Chemotaxis bewirkt RANTES auch eine direkte Aktivierung von Zellen. Über den Mechanismus der T-Zell-Aktivierung durch RANTES gibt es teilweise widersprüchliche Berichte. Eine Gruppe beobachtete typische Merkmale einer CD3-vermittelten Aktivierung mit Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels [Bacon *et al.*, 1995], während eine andere Gruppe feststellte, daß zwar ein Antikörper gegen CD3, nicht aber RANTES Calcium-Fluß induzieren kann [Turner *et al.*, 1995]. Ihre Daten zeigen, daß RANTES eher einen Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert.

RANTES verstärkt die Effektorfunktionen von cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen [Taub *et al.*, 1995]. Es wurde ein Einfluß von RANTES auf die Antigen-induzierte Proliferation von T-Zellen und deren Lymphokin-Produktion festgestellt. Allgemein kann gesagt werden, daß RANTES sowohl bei der polyklonalen als auch bei der Antigen-spezifischen Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielt [Nelson *et al.*, 1998].

## 4.5.2 Aktivierung von Granulocyten

In Eosinophilen führt RANTES zur Freisetzung von *eosinophil cationic protein* und induziert den *respiratory burst*, der zur Sekretion toxischer Sauerstoffradikale führt [Chihara *et al.*, 1994; Kapp *et al.*, 1994]. Desweiteren induziert RANTES die Adhäsion von Basophilen an aktivierte Endothelzellen aus humaner Nabelschnur [Bacon *et al.*, 1994]. Die Adhäsion kann durch Vorstimulierung der Zellen mit IL-5 erhöht und durch Zugabe eines Antikörpers gegen  $\beta_2$ -Integrine blockiert werden.

## 4.6 Bedeutung von RANTES für die Entstehung von Krankheiten

Man geht davon aus, daß RANTES an der Ausprägung verschiedener Krankheitsbilder beteiligt ist, die durch infiltrierende mononucleäre Zellen charakterisiert werden. Wie in Abschnitt 4.4 erläutert wurde, wird die Aktivierung und Rekrutierung von Leukocyten maßgeblich durch Chemokine gesteuert. Kommt es zu einer Fehlsteuerung, so führt dies zu chronischen Entzündungen oder zu allergischen Reaktionen. Das Krankheitsbild ist davon abhängig, welche Leukocyten-Populationen fehlgeleitet werden.

### 4.6.1 Transplantat-Abstoßung

Die akute Abstoßung eines Nierentransplantats wird durch Alloantigen-abhängige und -unabhängige Faktoren ausgelöst und ist durch eine starke Infiltration des Transplantats durch mononucleäre Zellen (Monocyten/Makrophagen, T-Zellen und gelegentlich Eosinophile) gekennzeichnet [Nelson and Krensky, 2001; Valente and Alexander, 1998]. Da RANTES-mRNA und -Protein während einer Transplantatabstoßung in großen Mengen nachweisbar sind [Pattison *et al.*, 1994], galt RANTES als potentieller Faktor für die Entstehung einer Abstoßungsreaktion. Diese Hypothese konnte in einem Ratten-Tiermodell zur Transplantat-Abstoßung bestätigt werden [Gröne *et al.*, 1999]. In der betreffenden Arbeit wurde die Wirksamkeit des RANTES-Derivats Met-RANTES untersucht. Met-RANTES trägt am Amino-Terminus ein zusätzliches Methionin und ist ein potenter RANTES-Antagonist [Proudfoot *et al.*, 1996]. Met-RANTES konnte die Anzeichen einer Transplantat-Abstoßung deutlich reduzieren und in Kombination mit immunsuppressiven Substanzen nahezu vollständig unterdrücken. Es wurde gezeigt, daß dieser Effekt dadurch zustande kommt, daß

Met-RANTES die Adhäsion von Monocyten an aktivierte Endothelien blockieren kann und somit die Einwanderung der Monocyten ins Gewebe unterbindet [Gröne *et al.*, 1999]. Von diesen Ergebnissen könnten neue Therapieansätze abgeleitet werden, mit denen das Auftreten von Komplikationen nach Transplantationen durch präventive Behandlung stark reduziert werden könnte.

#### 4.6.2 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist unter anderem durch eine verstärkte Einwanderung von Monocyten und CD4+ T-Zellen in die arterielle Intima gekennzeichnet [Ross, 1993; van der Wal *et al.*, 1994]. In Koronararterien von Patienten mit Transplantations-assoziiertes beschleunigter Arteriosklerose wurden RANTES-mRNA und -Protein in den eingewanderten Monocyten und Lymphocyten, sowie in Myofibroblasten und Endothelzellen nachgewiesen [Pattison *et al.*, 1996]. Diese Beobachtung legt nahe, daß RANTES und andere Chemokine eine Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose spielen könnten [Nelson *et al.*, 1998].

#### 4.6.3 Rheumatoide Arthritis

Auch die Rheumatoide Arthritis ist eine Krankheit, für die eine chronische Entzündung mit einer Anhäufung mononucleärer Zellen charakteristisch ist. RANTES wird *in vitro* nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  von rheumatoiden Synovialfibroblasten in großen Mengen exprimiert [Rathanswami *et al.*, 1993]. Da die dadurch angelockten mononucleären Zellen ihrerseits Chemokine und Cytokine (vor allem IL-8, IL-1 und TNF- $\alpha$ ) exprimieren, kommt es zu einer Verstärkungsschleife [Koch *et al.*, 1995]. Dauert der Zustand an, kommt es zur Zerstörung von Knorpel- und Knochengewebe im betreffenden Gelenk [Koch *et al.*, 1995].

#### 4.6.4 Allergische Reaktionen

Da RANTES ein wichtiger chemotaktischer Faktor für Eosinophile und Basophile ist und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren hervorruft, ist von einer Beteiligung von RANTES bei der Entstehung allergischer Erkrankungen auszugehen [Lloyd *et al.*, 1997; Schall and Bacon, 1994]. Bei Patienten und Patientinnen mit Asthma findet man eine starke Invasion von aktivierten T-Zellen und Eosinophilen in die Mukosa der Bronchien. Eosinophile setzen dort toxische Proteine und vasokonstriktorische Mediatoren frei. In der Bronchial-Lavage von



Asthmatikern und Asthmatikerinnen wurde deutlich mehr RANTES nachgewiesen als in gesunden Personen [Alam *et al.*, 1996]. RANTES ist der stärkste bisher bekannte Faktor für die Eosinophilen-Chemotaxis [Ebisawa *et al.*, 1994] und könnte daher für die Rekrutierung von Eosinophilen bei asthmatischen Erkrankungen entscheidend sein.

Man geht davon aus, daß T-Gedächtniszellen eine besondere Rolle bei DTH-Reaktionen (*delayed type hypersensitivity*) spielen. Die dabei auftretenden Granulome enthalten hauptsächlich CD45RO-positive T-Zellen und Monocyten. Bei der Untersuchung von 15 Lymphknoten mit typischen DTH-Läsionen wurde eine starke RANTES-Expression in Makrophagen und Endothelzellen beobachtet [Devergne *et al.*, 1994]. RANTES könnte für die Akkumulation der T-Gedächtniszellen in den Läsionen verantwortlich sein.

#### 4.6.5 Septischer Schock

Sepsis ist eine akute systemische Erkrankung, die durch Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien ausgelöst wird. LPS bewirkt eine heftige Immunreaktion, die in manchen Fällen zu Schock, Multi-Organ-Versagen und schließlich zum Tod führen kann [Rietschel *et al.*, 1994]. Während einer Sepsis kommt es in verschiedenen Geweben zur Schädigung von Endothelzellen, zur Ödem-Bildung sowie zur Einwanderung und Aktivierung von Effektorzellen des Immunsystems. Speziell die Funktion der Lunge wird dabei stark beeinträchtigt. Neben der zentralen Bedeutung von TNF- $\alpha$  und IL-1 [Mathison *et al.*, 1988], wurde in einem Sepsis-Modell der Maus gezeigt, daß RANTES zur Entstehung kritischer Zustände im Verlauf einer Sepsis beitragen kann. Mäuse, die neben LPS zusätzlich mit einem RANTES-spezifischen Antikörper behandelt wurden, zeigten eine deutlich schwächere Einwanderung von Makrophagen in die Lunge als Tiere, die nur LPS erhalten hatten [VanOtteren *et al.*, 1995]. Die Rolle von RANTES könnte auch bei diesem Krankheitsbild die Rekrutierung und Aktivierung von T-Zellen, Monocyten und Granulocyten sein.

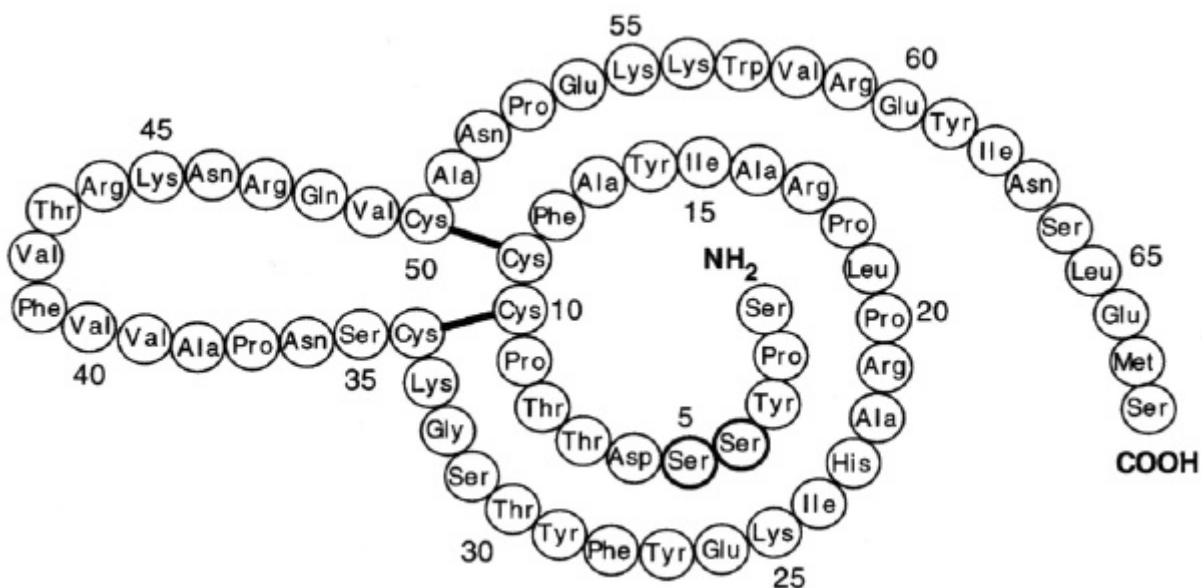
### 4.7 Biochemische Eigenschaften von RANTES

RANTES wird als Protein mit 91 Aminosäuren synthetisiert. Im endoplasmatischen Retikulum wird eine Leadersequenz aus 23 Aminosäuren abgespalten. Das reife Protein ist stark basisch mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 9,5 und hat ein Molekulargewicht von 7.847 Dalton [Nelson *et al.*, 1998]. Zwei Disulfidbrücken zwischen den vier konservierten

Cysteinreste verleihen dem Protein die für die Chemokine typische Sekundärstruktur, die in Abbildung 3 dargestellt ist.

Für die biologische Funktion ist der Amino-Terminus von großer Bedeutung. Eine N-terminal um zwei Aminosäuren verkürzte Form (RANTES 3-68) kann nach Bindung an die Rezeptoren CCR1 und CCR3 keine intrazelluläre Calcium-Mobilisierung mehr auslösen und zeigt eine stark reduzierte chemotaktische Wirkung gegenüber Monocyten [Proost *et al.*, 1998]. Ein ebenfalls sehr wirkungsvoller Rezeptor-Antagonist ist Met-RANTES, ein Derivat, das durch das Anfügen eines Methionins am N-Terminus des Wildtyp-Proteins entstanden ist [Proudfoot *et al.*, 1996].

Die RANTES-Quartärstruktur wurde über *nuclear magnetic resonance* aufgeklärt [Skelton *et al.*, 1995]. Das Protein neigt in Lösung bei pH 4,0 und darüber zur Aggregation und liegt bei pH 3,7 hauptsächlich als Dimer vor. RANTES zeigt eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Chemokin MIP-1 $\beta$ , für welches gezeigt wurde, daß Monomere und Dimere *in vitro* gleichermaßen aktiv sind [Lodi *et al.*, 1994].



**Abbildung 3: Aminosäure-Sequenz und Sekundärstruktur des RANTES-Proteins.** Die Sekundärstruktur entsteht durch Disulfidbrücken zwischen den vier konservierten Cysteinresten der CC-Chemokine. Cys 10 ist mit Cys 34, und Cys 11 ist mit Cys 50 verknüpft. Ser 4 und Ser 5 können glykosyliert werden. Die Abbildung ist dem Buchkapitel „The Chemokine RANTES“ in „Cytokines“, Academic Press, 1998 entnommen [Nelson *et al.*, 1998].

## 4.8 Genomische Organisation des RANTES-Gens

RANTES wurde ursprünglich als cDNA isoliert, als man gezielt nach Genen suchte, die in reifen cytotoxischen Zellen, nicht aber in B-Zellen exprimiert werden [Schall *et al.*, 1988]. Diese cDNA wurde zur Hybridisierung einer genomischen Genbank aus humaner Plazenta eingesetzt, wodurch ein Großteil der genomischen Sequenz von RANTES isoliert werden konnte. Fehlende Bereiche der 3'-nichttranslatierten Region wurden unter Verwendung einer cDNA-Bank aus T-Zellen ergänzt [Nelson *et al.*, 1993].

Der RANTES-Locus umfaßt 7,1 kb und weist die für Chemokin-Gene typische 3-Exon-2-Intron-Struktur auf. Die Länge der Exons beträgt 133, 112 und 1075 bp, die der Introns circa 1,4 und 4,4 kb [Nelson *et al.*, 1993]. Von der genomischen Sequenz wird eine 1,3 kb lange mRNA transkribiert, die eine kurze 5'-nichttranslatierte Region enthält. Der codierende Bereich umfaßt 273 Basen und wird von einer langen 3'-nichttranslatierten Region von circa 850 Basen Länge gefolgt [Nelson *et al.*, 1993]. Diese Region enthält eine Serie von Alu-Sequenzen, deren Bedeutung bisher nicht geklärt ist. Denkbar wäre ein Einfluß auf die Stabilität der mRNA.

Die Mitglieder der CC-Chemokin-Familie sind im menschlichen Genom in einem *cluster* auf Chromosom 17 angeordnet [Schall, 1991]. Die genaue Lokalisation wurde durch *in situ*-Hybridisierung als 17q11.2-q12 ermittelt [Donlon *et al.*, 1990].

## 4.9 RANTES-Expression verschiedener Gewebe

Immunhistologische Untersuchungen und *in situ*-Hybridisierung verschiedener Gewebe haben gezeigt, daß RANTES in gesunden adulten Geweben nur sehr schwach exprimiert wird. Der Anteil der RANTES-positiven Zellen steigt jedoch dramatisch an, sobald es im Gewebe zu entzündlichen Reaktionen kommt. *In vitro* führen vor allem die proinflammatorischen Cytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zur Expression von RANTES in verschiedenen Geweben [Nelson *et al.*, 1998; von Luettichau *et al.*, 1996]. Nach spezifischer Stimulation können zum Beispiel T-Zellen, Monocyten, Basophile, Mesangialzellen, Fibroblasten, Astrocyten, Epitel- und Endothelzellen RANTES exprimieren [Nelson *et al.*, 1996; Schall, 1991]. Dagegen wird RANTES von Megakaryocyten konstitutiv produziert. Auch die sich daraus ableitenden Thrombocyten enthalten RANTES in großen Mengen [Kameyoshi *et al.*, 1992].

Das Expressionsmuster von RANTES kann abhängig von Zelltyp und Stimulus beträchtlich variieren. Epithel- und Endothelzellen exprimieren RANTES innerhalb von Stunden nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  [Marfaing-Koka *et al.*, 1995; Stellato *et al.*, 1995]. Dagegen scheint die RANTES-Expression in T-Zellen ein Ereignis zu sein, das mit der Differenzierung der Zellen gekoppelt ist. RANTES wird nach der Stimulierung ruhender Zellen nur schwach induziert. Die eigentliche Aktivierung des Gens erfolgt nach 3-5 Tagen, zeitgleich mit der Ausbildung der Effektorfunktionen [Nelson *et al.*, 1993; Schall *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1995].

## 4.10 Regulation der RANTES-Expression

RANTES greift auf mehreren Stufen in Immunreaktionen ein und ist damit an der Bekämpfung von Infektionen oder pathologischer Zustände maßgeblich beteiligt. Dazu muß die RANTES-Expression zahlreicher Zelltypen koordiniert reguliert werden. Einerseits ist RANTES an der Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems beteiligt und andererseits wird die RANTES-Produktion durch Mediatoren, die von diesen Zellen am Entzündungsherd freigesetzt werden, induziert. Deshalb führt eine Fehlregulation der RANTES-Expression meist zu einem sich selbst verstärkenden Effekt, der für den Körper kritische Zustände herbeiführen kann.

Die Kontrolle der RANTES-Transkription in T-Zellen wurde ausführlich untersucht [Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1997]. In Fibroblasten erfolgt die Regulation der Transkription teilweise über die gleichen Promotorregionen wie in T-Zellen [Nelson *et al.*, 1996]. Zusätzlich unterliegt die RANTES-Expression in Fibroblasten einer posttranskriptionellen Kontrolle. Stimulation mit IFN- $\gamma$  erhöht die Stabilität der RANTES-mRNA [Rathanswami *et al.*, 1993]. Auch über die Regulationsmechanismen in Astrocyten ist einiges bekannt [Miyamoto *et al.*, 2000] und die Bedeutung unterschiedlicher Regionen des RANTES-Promotors für die Aktivität in Mesangialzellen wird zur Zeit untersucht (C. Zischek, persönliche Mitteilung).

Die Aufklärung regulatorischer Mechanismen in Zellen der Monocyten/Makrophagen-Linie erschien besonders interessant, da dieser Zelltyp sowohl bei der frühen angeborenen Immunantwort als auch bei der T-Zell-abhängigen Immunität mitwirkt. In Abhängigkeit von der Art der Aktivierung, z. B. durch bakterielle oder virale Pathogene, können Makrophagen die induzierte adaptive Immunantwort polarisieren, indem sie spezifische immu-

modulatorische Cytokine und costimulatorische Moleküle exprimieren [Medzhitov and Janeway, 1997; Medzhitov *et al.*, 1997; Romagnani, 1992]. Außerdem üben Monocyten/Makrophagen entgegengesetzte Funktionen bei einer Infektion mit HIV-1 aus, indem sie einerseits durch das Virus infizierbar sind, aber gleichzeitig durch die Produktion spezifischer Chemokine eine Rolle bei der Eindämmung der Infektion spielen (vgl. 4.3).

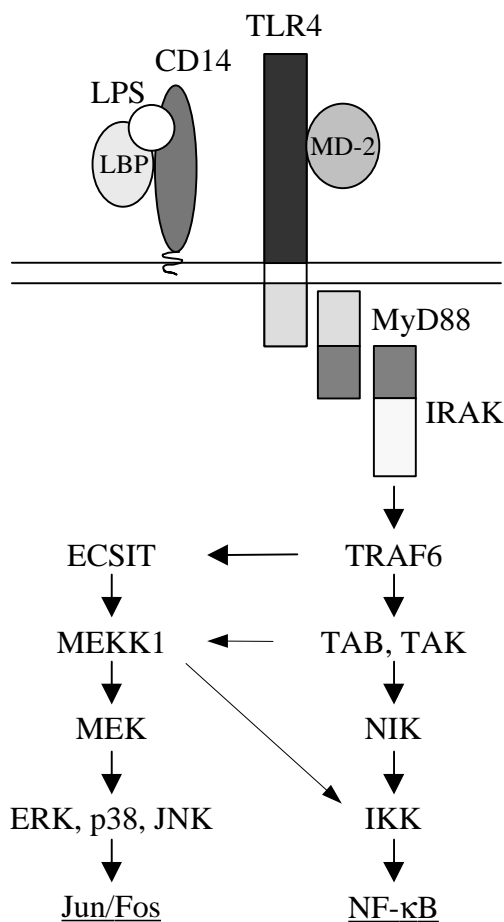
## 4.11 Monocyten und LPS

Phagocytierende Zellen wie Makrophagen und Neutrophile haben Rezeptoren für Motive, die in Pathogenen konserviert sind, in höheren Eukaryoten dagegen nicht vorkommen. Diese Motive werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und ihre Bindungspartner auf den Phagocyten entsprechend als *pattern-recognition receptors* bezeichnet [Janeway and Medzhitov, 1998]. Zu den PAMPs gehören Mannose-Reste der Hefe-Zellwand, formylierte Peptide und bakterielle Zellwandkomponenten wie Lipopolysaccharide, Lipopeptide, Peptidoglycane und Teichonsäuren. Der in dieser Arbeit untersuchte Stimulus LPS ist ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien. Die stimulierende Struktur im Molekül wird als Lipid A bezeichnet. Sie besteht aus einem Diglucosamin-Rückgrat, an welches langkettige Fettsäuren über Ester- und Amid-Bindungen gekoppelt sind [Darveau, 1998].

LPS bindet an CD14-Moleküle, die über einen Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-)Anker an die Makrophagen-Zellmembran gebunden sind. Die Serumkomponente LBP (*LPS binding protein*) opsonisiert LPS und erleichtert damit die Bindung an CD14 [Wright *et al.*, 1990]. Da CD14 die Zellmembran nicht durchspannt, kann es kein Signal in das Zellinnere leiten [Perera *et al.*, 1997]. Statt dessen aktiviert der Komplex aus LPS, LBP und CD14 den *Toll-like receptor 4* (TLR4) [Wright, 1999]. TLRs besitzen eine intrazelluläre Toll/IL-1R-Domäne (TIR) [Kopp and Medzhitov, 1999], über die sie an das Adapterprotein MyD88 binden [Medzhitov *et al.*, 1998]. MyD88 aktiviert über eine sogenannte *death domain*-Interaktion die *IL-1-receptor associated kinase* (IRAK) [Medzhitov *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1998]. Autophosphorylierte IRAK komplexiert mit TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), was eine TRAF6-Oligomerisierung zur Folge hat. Dadurch werden MAP-3-Kinasen (NIK - *NF- $\kappa$ B-inducing kinase* [Song *et al.*, 1997], TAK1 [Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999]) aktiviert, was schließlich zur Aktivierung der I- $\kappa$ B-Kinasen- $\alpha$  und - $\beta$  (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ ) führt. Diese sind

für die Phosphorylierung von I- $\kappa$ B verantwortlich, welches daraufhin Ubiquitin-markiert und degradiert wird. NF- $\kappa$ B wird freigesetzt und in den Kern transloziert, wo es die Genexpression aktiviert [DiDonato *et al.*, 1997]. Zu den über diesen Signaltransduktionsweg aktivierten Genen gehören Cytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-12-p40 und die costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 [Baeuerle and Baltimore, 1996; Cao *et al.*, 1996; Malinin *et al.*, 1997].

TRAF6 aktiviert auch andere MAP-3-Kinasen, wie zum Beispiel MEKK1. Diese führt über ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), p38-MAP-Kinase und JNK (*Jun N-terminal kinase*) zur Aktivierung der AP-1-Proteine Jun und Fos, die ebenfalls für die Cytokinproduktion benötigt werden [Aderem and Ulevitch, 2000]. Man geht davon aus, daß mikrobielle Liganden auch einen Signaltransduktionsweg in Gang setzen, der zur Aktivierung von C/EBP-Proteinen führt, da zum Beispiel das IL-12-p40-Gen durch Mitglieder der NF- $\kappa$ B- und C/EBP-Familien reguliert wird [Murphy *et al.*, 1995; Plevy *et al.*, 1997].



**Abbildung 4: Überblick über die Signaltransduktionswege, die durch LPS ausgelöst werden.** Sie werden im Text erläutert. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren, die am Ende der Kaskaden liegen, sind unterstrichen. Die Darstellung wurde in Anlehnung an Aderem and Ulevitch, 2000 erstellt.

Abkürzungen (Beschreibungen):

- LBP *LPS binding protein*
- TLR4 *Toll-like receptor 4*
- MD-2 (sekretiertes Protein, das wahrscheinlich mit TLR4 assoziiert)
- MyD88 (Adapterprotein)
- IRAK *IL-1-receptor-associated kinase*
- TRAF6 *TNF-receptor-associated factor 6*
- TAB (Adapterprotein)
- TAK (MAP-3-Kinase)
- NIK *NF- $\kappa$ B-inducing kinase*
- IKK I- $\kappa$ B-Kinase
- ECSIT *evolutionarily conserved intermediate in Toll pathways*
- MEKK1 (MAP-3-Kinase)
- MEK (MAP-2-Kinase)
- ERK *extracellular signal-regulated kinase*
- p38 (MAP-Kinase)
- JNK *Jun N-terminal kinase*

Bisher wurden 9 Mitglieder der humanen TLR-Familie beschrieben [Rock *et al.*, 1998] und ihr Homologes Toll setzt in *Drosophila* eine ähnliche Signaltransduktionskaskade in Gang, und führt dadurch zur Produktion antimikrobieller Peptide [Lemaitre *et al.*, 1996]. Anfangs wurde angenommen, daß TLR2 der entscheidende Rezeptor für die LPS-Aktivierung in Makrophagen sei [Kirschning *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998]. Diese Annahme basierte jedoch auf *in vitro*-Studien. Genetische Studien mit Mausstämmen, die eine angeborene Hyporeaktivität gegen LPS zeigen, haben TLR4 als den entscheidenden LPS-Rezeptor identifiziert [Poltorak *et al.*, 1998]. Darüber hinaus zeigte ein TLR2-spezifischer Antikörper keinen Einfluß auf die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion in humanen Monocyten [Flo *et al.*, 2000].

Ein hypothetischer CD14-unabhängiger Weg der Aktivierung von Monocyten durch LPS geht von einer Beteiligung der GTPase Ran aus. Ran assoziiert mit c-Abl und könnte die Expression LPS-induzierter Gene dadurch aktivieren, daß sie den energieabhängigen Transport von c-Abl in den Zellkern vermittelt [Wong *et al.*, 2000].

## 4.12 Fragestellung

Eine unkontrollierte oder übermäßige RANTES-Expression wird als Ursache für die Entstehung unterschiedlicher Krankheitsbilder betrachtet. Abhängig von der Population der chemotaktisch angelockten und aktivierten Leukocyten treten akute oder chronische Entzündungen oder allergische Reaktionen auf. Die Entwicklung präventiver oder therapeutischer Behandlungsansätze setzt die genaue Kenntnis der Zelltyp- und Stimulus-spezifischen RANTES-Expression voraus.

Über die Regulation des RANTES-Gens in T-Zellen lagen zum Teil schon detaillierte Ergebnisse vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Mechanismen, die die RANTES-Transkription in Monocyten kontrollieren, aufgeklärt werden, da dieser Zelltyp für die Initiierung einer Immunantwort entscheidend ist und diese polarisieren kann. Ein weiterer Grund für die Wahl dieses Zelltyps war die duale Rolle, die Monocyten bei einer Infektion mit HIV-1 spielen.

LPS ist einerseits ein wichtiger Stimulus, der dem Immunsystem hilft, bakterielle Infektionen schnell einzudämmen. Andererseits kann LPS Schockzustände mit teilweise tödlichem

Ausgang auslösen. Nach LPS-Stimulation werden in Monocyten mehrere Signaltransduktionswege ausgelöst, die zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren führen.

Die transkriptionelle Aktivität eines Gens ergibt sich aus der Anordnung von Kontrollelementen auf dem Promotor und der Anwesenheit von konstitutiven und induzierten Transkriptionsfaktoren im Zellkern des jeweiligen Zelltyps. Dabei sind die Kontrollelemente meist nicht isoliert aktiv, sondern stellen eine Komponente einer übergeordneten Anordnung dar. In jüngerer Zeit wurden in Promotoren unterschiedlicher Gene sogenannte „*composite elements*“ oder „*promoter modules*“ identifiziert. Sie stellen eine spezifische Anordnung individueller Kontrollelemente dar, die zusammen eine neue funktionelle Einheit bilden [Kel *et al.*, 1995]. In der Sequenz des humanen RANTES-Promotors wurde nach Regionen gesucht, die solche „Promotor-Module“ darstellen.

Mit Hilfe von neueren Entwicklungen der Bioinformatik sollten die Ergebnisse aus der funktionellen Charakterisierung des RANTES-Promotors in LPS-stimulierten Monocyten in Modelle gefaßt werden, um in Datenbanksequenzen Promotoren zu identifizieren, die möglicherweise coreguliert sind.



## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Vorbemerkung

Materialien und Methoden werden hier nur beschrieben, wenn sie für die Durchführung der Arbeit von besonderer Bedeutung waren. Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden, z. B. die Präzipitation und Quantifizierung von Nucleinsäuren, die Agarose-Gelelektrophorese oder die Behandlung von DNA zu Klonierungszwecken, wurden aus den Standardwerken „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ [Sambrook *et al.*, 1989] und „Current Protocols in Molecular Biology“ [Ausubel *et al.*, 1994] entnommen.

### 5.2 Chemikalien, Enzyme und Radioaktivität

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth und Merck bezogen.

Enzyme wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Roche und New England Biolabs (NEB) bezogen. Puffer, Inkubationsbedingungen und Restriktionsschnittstellen können den entsprechenden Katalogen entnommen werden.

Synthetische DNA-Oligonucleotide wurden von den Firmen Life Technologies und Eurogentec bezogen.

Radioaktive Nucleotide wurden von der Firma NEN bezogen.

$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dATP (3.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)	$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dGTP (6.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)	$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dTTP (3.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)
$\alpha$ - <sup>32</sup> P-dGTP (3.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)	$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (6.000 Ci/mmol, 10 Ci/ml)

### 5.3 Medien, Lösungen und Puffer

Lösungen wurden mit Wasser hergestellt, das durch eine Milli-Q<sup>UF Plus</sup>-Anlage der Firma Millipore deionisiert worden war (H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup>). Medien und Lösungen für die Kultur von Monocyten wurden mit Injektionswasser (Ampuwa, Fresenius) hergestellt. Medien und

Lösungen wurden autoklaviert (20 min, 121 °C). Wenn dies nicht möglich war, wurde sterilfiltriert (0,2 µm-Filter).

### 5.3.1 Kulturmedien

#### 5.3.1.1 LB-Medium für die Kultur von *E. coli*

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
	H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> ad 1 l

#### 5.3.1.2 LB-Agarplatten für die Kultur von *E. coli*

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Bactoagar	15 g
	H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> ad 1 l

#### 5.3.1.3 Ampicillinhaltige Medien und Agarplatten für die Kultur von *E. coli*

Ampicillin (Roche) wurde als Stammlösung mit 50 mg/ml in 70 % Ethanol bei -20 °C aufbewahrt. Die verwendete Endkonzentration war 100 µg/ml.

#### 5.3.1.4 MM6-Medium

Nicht-essentielle Aminosäuren, MEM (Life Technologies)	1 x
Oxalessigsäure (Fluka)	1 mM
Pyruvat (Fluka)	1 mM
Insulin, human (Roche)	9 µg/ml
FCS (BioWhittaker)	10 %
in RPMI 1640 mit Glutamax (Life Technologies)	

#### 5.3.1.5 THP-1-Medium

RPMI 1640 mit Glutamax (Life Technologies) mit 5 % NCS (BioWhittaker, hitzeinaktiviert)

#### 5.3.1.6 Medium für primäre Monocyten

RPMI 1640 mit Glutamax (Life Technologies) mit 15 % FCS (BioWhittaker, hitzeinaktiviert)

## 5.3.2 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

### 5.3.2.1 10 x PBS

NaCl	80 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	11,5 g
KCl	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
	H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> ad 1 l

### 5.3.2.2 TE-Puffer

Tris-HCl, pH 8 oder 7,4	10 mM
EDTA, pH 8	1 mM

### 5.3.2.3 10 x TBE-Puffer

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA, pH 8, 0,5 M	40 ml
	H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> ad 1 l

### 5.3.2.4 6 x DNA-Ladepuffer

Ficoll 400 (Pharmacia)	15 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)

### 5.3.2.5 Gellösung für 5 %ige nicht denaturierende Polyacrylamidgele

Acrylamid-Lösung, 30 % (rotiphorese Gel30, Roth)	10 ml
TBE-Puffer, 10 x (5.3.2.3)	3 ml
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	47 ml
APS (Ammoniumpersulfat), 10 % (w/v) (Bio-Rad)	500 µl
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin, Bio-Rad)	50 µl

## 5.3.3 Lösungen für die Analyse von RNA

### 5.3.3.1 Lösung D

Guanidiniumthiocyanat	4 M
Na-Citrat, pH 7	25 mM
N-Lauroylsarcosin	0,5 % (v/v)

Diese Lösung ist bei RT 3 Monate haltbar. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 360 µl 2-Mercaptoethanol pro 50 ml zugegeben (Endkonzentration: 0,1 M).

**5.3.3.2 10 x MOPS-Puffer**

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA, pH 8	10 mM

**5.3.3.3 Ladepuffer für analytische RNA-Agarosegele**

je Probe (20 µl Gesamtvolumen):

Formamid	10 µl
MOPS-Puffer, 10 x (5.3.3.2)	2 µl
Ethidiumbromid, 1 mg/ml	1 µl
Bromphenolblau-Lösung, 5 % (w/v)	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	6,7 µl

**5.3.3.4 Ladepuffer für denaturierende RNA-Agarosegele**

je Probe (20 µl Gesamtvolumen):

Formamid	10 µl
Formaldehyd, 37 %	3,25 µl
MOPS-Puffer, 10 x	2 µl
Bromphenolblau-Lösung, 5 % (w/v)	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	4,45 µl

**5.3.3.5 20 x SSC-Puffer**

NaCl	175 g/l
Na <sub>3</sub> -Citrat * 2 H <sub>2</sub> O	88 g/l
	HCl ad pH 7

**5.3.3.6 100 x Denhardt-Lösung**

Ficoll, Typ 400 (Pharmacia)	20 g/l
Polyvinylpyrrolidon K90, 360.000 (Fluka)	20 g/l
BSA, Fraktion V (Roche)	20 g/l

**5.3.3.7 Hybridisierungsmix**

Denhardt-Lösung	5 x
SSC-Puffer	5 x
SDS	1 %
Fischsperma-DNA (Roche)	0,1 mg/ml

**5.3.3.8 Waschpuffer 1**

SSC-Puffer (5.3.3.5)	1 x
SDS	0,2 %

**5.3.3.9 Waschpuffer 2**

SSC-Puffer (5.3.3.5)	0,2 x
SDS	0,2 %

**5.3.4 Lösungen für die Herstellung von Kernextrakten****5.3.4.1 Puffer A**

Hepes, pH 7,6	10 mM
KCl	15 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
EDTA, pH 8	0,1 mM
Pefabloc SC (Roche)	1 mM
DTT	1 mM
Aprotinin (Roche)	15 µg/ml
Leupeptin (Sigma)	0,5 µg/ml

Die Protease-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugegeben.

**5.3.4.2 Puffer C**

Hepes, pH 7,6	25 mM
KCl	50 mM
EDTA, pH 8	0,1 mM
Glycerin	10 % (v/v)
Pefabloc SC (Roche)	1 mM
DTT	1 mM
Aprotinin (Roche)	15 µg/ml
Leupeptin (Sigma)	0,5 µg/ml

Die Protease-Inhibitoren wurden kurz vor Gebrauch zugegeben.

**5.3.5 Lösungen für *DNase I footprinting*-Experimente****5.3.5.1 10 x Bindungspuffer**

Tris-HCl, pH 7,5	100 mM
EDTA, pH 8	10 mM
DTT	10 mM
Glycerin	50 % (v/v)

**5.3.5.2 MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>-Mix**

MgCl <sub>2</sub>	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	5 mM

**5.3.5.3 Stop-Puffer**

EDTA	20 mM
SDS	1 %
NaCl	200 mM

**5.3.5.4 Formamid-Ladepuffer**

Formamid	94 % (v/v)
EDTA, pH 8	10 mM
Xylencyanol	0,05 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

**5.3.5.5 Saurer Formamid-Ladepuffer**

Formamid	80 % (v/v)
TBE	1 x
Xylencyanol	0,05 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)

Der Puffer wird mit gesättigter Borsäure-Lösung oder 2 M Essigsäure auf pH 5 eingestellt.

**5.3.6 Lösungen für den RANTES-ELISA****5.3.6.1 Beschichtungspuffer**

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2 (HCl)

**5.3.6.2 Blockierungspuffer**

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	5,72 g
NaCl	7,01 g
Tween 20	500 µl
BSA, Fraktion V (Roche)	2,5 g
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	ad 1 l

**5.3.6.3 Waschpuffer**

PBS mit 0,05 % Tween 20

**5.3.6.4 Verdünnungspuffer**

PBS mit 0,01 % Tween 20

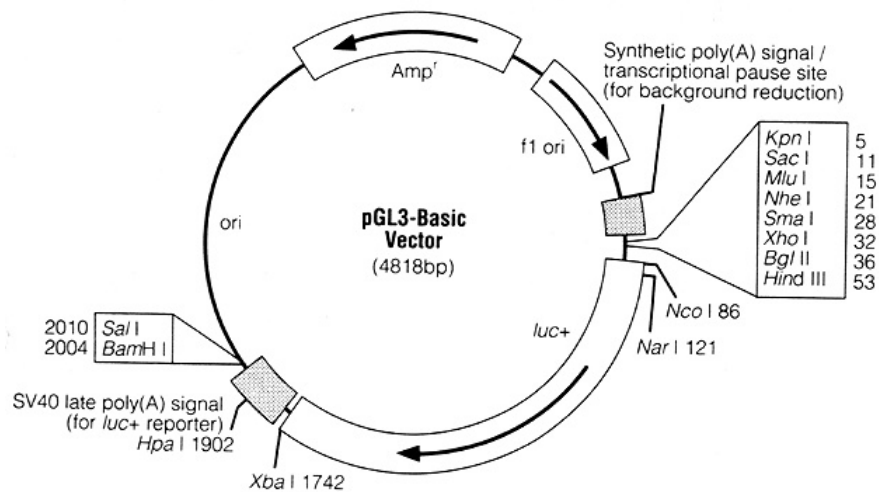
**5.3.6.5 Substratlösung**

ABTS-Puffer (Roche)	0,83 g
H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>	50 ml
ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure, Tablette, Roche)	50 mg

## 5.4 Plasmide

### 5.4.1 Luciferase-Reporterkonstrukte

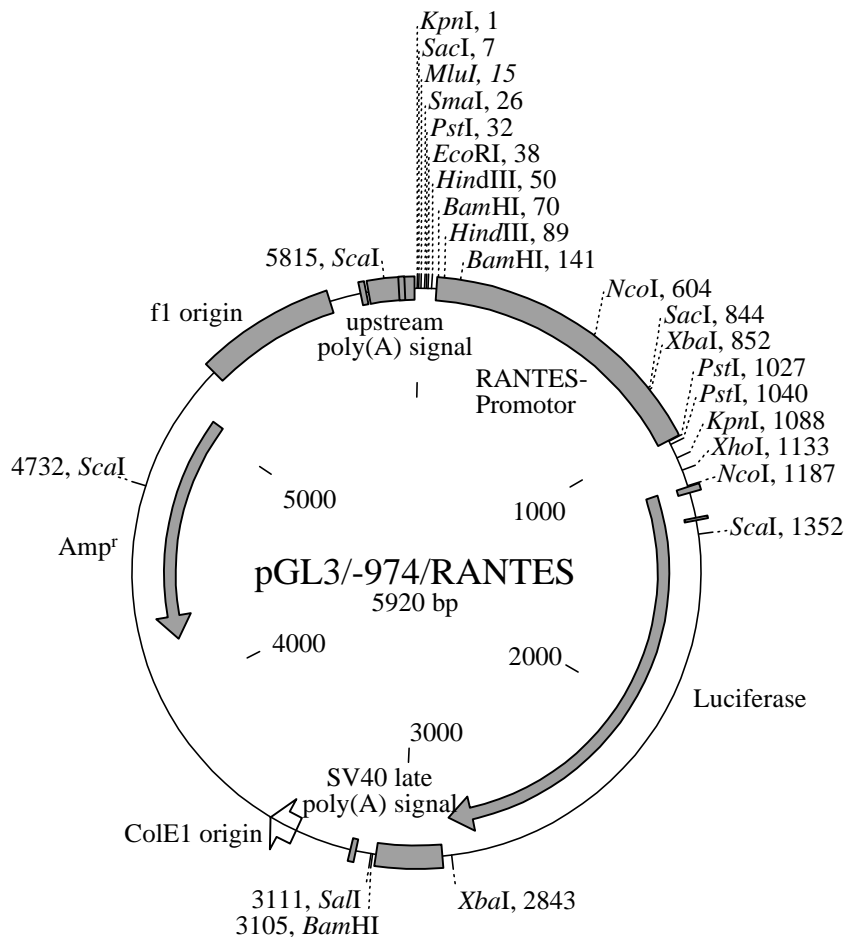
Mit Hilfe von Reporter-genkonstrukten kann die Aktivität von Promotor- oder Enhancer-Elementen ermittelt werden. Dazu wird die potentielle Kontrollsequenz an das 5'-Ende der Reporter-gensequenz kloniert. In der vorliegenden Arbeit wurden Konstrukte verwendet, die auf der pGL3-Serie der Firma Promega basieren (Abbildung 5). Neben dem Luciferase-Gen des Glühwürmchens *Photinus pyralis* als Reporter enthalten diese Konstrukte das  $\beta$ -Lactamase-Gen, das Resistenz gegen Ampicillin vermittelt, einen *high copy number* Replikationsursprung für die Vermehrung in *E. coli* und den Replikationsursprung eines filamentösen Phagen für die Synthese von Einzelstrang-DNA. Das Konstrukt pGL3-Basic enthält keine eukaryotischen Promotor- oder Enhancer-Elemente, während das Konstrukt pGL3-Promoter den enhancerlosen SV40-Promotor enthält.



**Abbildung 5: Luciferase-Reportervektoren der pGL3-Serie (Promega).** Als Beispiel ist das Plasmid pGL3-Basic dargestellt. Es enthält keine eukaryotischen Promotor- oder Enhancer-Elemente. Neben pGL3-Basic wurde in dieser Arbeit der Vektor pGL3-Promoter verwendet. Er enthält zwischen der MCS und dem Luciferase-Gen (zwischen *Bgl*II, 36 und *Hind*III, 53) den SV40-Minimalpromotor (192 bp). Die Plasmidkarte ist dem Katalog der Firma Promega entnommen.

### 5.4.2 Das Konstrukt pGL3/-974/RANTES

Das Konstrukt pGL3/-974/RANTES nimmt in dieser Arbeit eine zentrale Rolle ein. Es entstand in mehreren Schritten aus Klonen, die durch Hybridisierung einer genomischen Genbank aus humaner Plazenta mit einer RANTES-cDNA isoliert worden waren [Nelson *et al.*, 1993]. Zunächst wurde ein circa 1 kb langes *XhoI/KpnI*-Fragment mit der Promotorsequenz von -974 bis +54 (relativ zum Transkriptionsstart +1) (Abbildung 7) in den Vektor pBluescript II SK (Stratagene) kloniert. Das Fragment wurde durch Restriktionsverdau mit *Bss*HIII wieder entnommen und in die *MluI*-Schnittstelle des Vektors pGL2-Basic (Promega) kloniert. Über *SmaI*- und *XhoI*-Schnittstellen wurde die Promotorsequenz schließlich in den Nachfolgevektor pGL3-Basic subkloniert. Das Konstrukt pGL3/-974/RANTES ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Plasmidkarte des Konstrukts pGL3/-974/RANTES.** Das Plasmid enthält circa 1 kb des humanen RANTES-Promotors (Abbildung 7) und basiert auf dem Vektor pGL3-Basic (Promega) (Abbildung 5). Die Vielzahl von Restriktionsschnittstellen entstand durch die diversen Klonierungsschritte, die zu diesem Konstrukt geführt haben.



	RV Primer 3 →					
-1100	ACTAGCAAAA	TAGGCTGTCC	CCAGTGCAAG	TGCAGGTGCC	AGAACATTTTC	-1051
-1050	TCTATCGATA	<u>GGTACCGAGC</u>	<u>TCTTACGCGT</u>	<u>GCTAGCCCGG</u>	<u>GCTGCAGGAA</u>	-1001
		<i>KpnI</i>	<i>SacI</i>	<i>MluI</i>	<i>SmaI</i>	
-1000	TTCGATATCA	<u>AGCTTATCGA</u>	<u>TACCGTCGAG</u>	GATCCCTAAA	GTCCTTTGAA	-951
		<i>HindIII</i>	<i>(XhoI)</i>			
-950	<u>GCTTTCATAT</u>	TCTGTAACCTT	TTGTGCCCAA	GAAGGCCTTA	CAGTGAGATG	-901
	<i>HindIII</i>					
-900	GGATCCCAGT	ATTTATTGAG	TTTCCTCATT	CATAAAATGG	GGATAATAAT	-851
-850	AGTAAATGAG	TTGACACGCG	CTAAGACAGT	GGAATAGTGG	CTGGCACAGA	-801
-800	TAAGCCCTCG	GTAAATGGTA	GCCAATAATG	ATAGAGTATG	CTGTAAGATA	-751
-750	TCTTTCTCTC	CCTCTGCTTC	TCAACAAGTC	TCTAATCAAT	TATTCCACTT	-701
-700	TATAACAAG	GAAATAGAAC	TCAAAGACAT	TAAGCACTTT	TCCCAAAGGT	-651
-650	CGCTTAGCAA	GTAAATGGGA	GAGACCCTAT	GACCAGGATG	AAAGCAAGAA	-601
-600	ATTCCCACAA	GAGGACTCAT	TCCAATCAT	ATCTTGTGAA	AAGGTTCCCA	-551
-550	ATGCCCAGCT	CAGATCAACT	GCCTCAATTT	ACAGTGTGAG	TGTGCTCACC	-501
-500	TCCTTTGGGG	ACTGTATATC	CAGAGGACCC	TCCTCAATAA	AACACTTTAT	-451
-450	AAATAACATC	<u>CTTCCATGGA</u>	TGAGGGAAAG	GAGTAAGAT	CTGTAATGAA	-401
		<i>NcoI</i>				
-400	TAAGCAGGAA	CTTTGAAGAC	TCAGTGACTC	AGTGAGTAAT	AAAGACTCAG	-351
-350	TGACTTCTGA	TCCTGTCCTA	ACTGCCACTC	CTTGTTGTCC	CCAAGAAAGC	-301
-300	GGCTTCCTGC	TCTCTGAGGA	GGACCCCTTC	CCTGGAAGGT	AAAAC TAAGG	-251
-250	ATGTCAGCAG	AGAAATTTT	CCACCATTGG	TGCTTGGTCA	AAGAGGAAAC	-201
-200	TGATGAGCTC	ACTCTAGATG	AGAGAGCAGT	GAGGGAGAGA	CAGAGACTCG	-151
	<i>SacI</i>					
-150	AATTTCCGGA	GGCTATTTCA	GTTTTCTTTT	CCGTTTTGTG	CAATTTCACT	-101
-100	TATGATACCG	<u>GCCAATGCTT</u>	GGTTGCTATT	TTGGAAACTC	CCCTTAGGGG	-51
-50	ATGCCCTCA	ACTGGCCCTA	TAAAGGGCCA	GCCTGAGCTG	<u>CAGAGGATTC</u>	-1
				<i>PstI</i>		
+1	<u>CTGCAGAGGA</u>	TCAAGACAGC	ACGTGGACCT	CGCACAGCCT	CTCCCACAGG	+50
	<i>PstI</i>				<i>KpnI</i>	
+51	<u>TACCCAATTC</u>	GCCCTATAGT	GAGTCGTATT	ACGCGCGTGC	<u>TAGCTCGAGA</u>	+100
					<i>XhoI</i>	<i>luc</i>
+101	TCTGCGATCT	AAGTAAGCTT	GGCATTCGGG	TACTGTTGGT	<u>AAAGCCACCA</u>	+150
		<i>HindIII</i>			<i>NcoI</i>	
+151	<u>TGGAAGACGC</u>	<u>CAAAAACATA</u>	<u>AAG</u>			
		← GL Primer 2				

**Abbildung 7: Sequenz des humanen RANTES-Promotors**, wie er im Konstrukt pGL3/-974/RANTES (Abbildung 6) enthalten ist. Die Basen sind relativ zum Transkriptionsstart (+1) numeriert. Die flankierenden Vektorsequenzen sind grau gedruckt. Die Erkennungssequenzen für einige Restriktionsenzyme, die für die Klonierung wichtig waren oder im Ergebnisteil erwähnt werden, sind eingezeichnet. CAAT- und TATA-Box sind grau hinterlegt. Polymorphe Positionen (vgl. 6.3) sind eingerahmt. Das Startcodon des Luciferase-Gens ist markiert (luc). Die Bindungsstellen für die verwendeten Sequenzier-Primer sind durch einen Pfeil dargestellt.

### 5.4.3 Derivate des Konstrukts pGL3/-974/RANTES

#### 5.4.3.1 Die Konstrukte der 5'-3'-Deletionsserie

Die Konstrukte pGL3/-194/RANTES, pGL3/-146/RANTES und pGL3/-120/RANTES wurden durch Subklonieren von *SmaI/XhoI*-Fragmenten aus den entsprechenden pGL2-Konstrukten in pGL3-Basic hergestellt [Boehlk *et al.*, 2000]. Diese pGL2-Konstrukte waren durch Deletion entsprechender Restriktionsfragmente aus pGL2/-974/RANTES generiert worden [Nelson *et al.*, 1993].

Die Konstrukte pGL3/-168/RANTES und pGL3/-104/RANTES wurden mit Hilfe einer PCR-Strategie hergestellt. Die gewünschte Promotorsequenz wurde mit Primern, die 5'-Überhänge mit einer *SalI*-Restriktionsschnittstelle enthielten, aus dem Konstrukt pGL3/-974/RANTES amplifiziert. Als *reverse primer* wurde jeweils GL Primer 2 (Promega) eingesetzt (vgl. Abbildung 7).

Primer für pGL3/-168/RANTES: 5'-CGGCGTCGACGGGAGAGACAGAGACTCG-3'

Primer für pGL3/-104/RANTES: 5'-CGGCGTCGACACTTATGATACCGGCC-3'

GL Primer 2: 5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3'

PCR-Ansatz:

1 µl	pGL3/-974/RANTES (100 ng/µl)
2,5 µl	10 x <i>Pfu</i> -Puffer (Stratagene)
1 µl	<i>forward primer</i> (10 pmol/µl)
1 µl	<i>reverse primer</i> (10 pmol/µl)
8 µl	dNTP-Mix (1,25 mM, Pharmacia)
0,5 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene)
11 µl	H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup>
25 µl	Gesamtvolumen

Temperaturprofil:

1 x	5:00 min	94 °C	(GeneAmp 9700, Perkin Elmer)
20 x	0:20 min	94 °C	
	0:30 min	54 °C	
	0:45 min	72 °C	
1 x	7:00 min	72 °C	

Die PCR-Produkte wurden mit *SalI* und *HindIII* verdaut. Der Vektor pGL3-Basic (Promega) wurde mit *XhoI* und *HindIII* verdaut. Da *SalI* und *XhoI* kompatible Überhänge erzeugen, konnte das Fragment auf diese Weise in den geschnittenen Vektor kloniert werden.

#### 5.4.3.2 Die Konstrukte pGL3/-194/A-del, pGL3/-194/B-del und pGL3/-194/AB-del

Für die entsprechenden pGL2-Vorgängerplasmide wurden die Sequenzen der Regionen R(A), R(B) oder R(AB) im Konstrukt pGL2/-194/RANTES mit einer PCR-Strategie durch eine

ähnliche Anzahl Basen der MCS des Vektors pBluescript II SK (Stratagene) ersetzt [Nelson *et al.*, 1996]. Die substituierten Basen sind in Abbildung 28a im Detail angegeben. Um die stärkere Reporterexpression der pGL3-Vektoren nutzen zu können, wurden die mutierten RANTES-Promotor-Sequenzen von N. G. Miyamoto über *Sma*I- und *Xho*I-Schnittstellen in pGL3-Basic subkloniert [Miyamoto *et al.*, 2000] und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### 5.4.3.3 Konstrukte, die durch positionsgerichtete Mutagenese hergestellt wurden

Mußten für eine Mutation nur wenige Basen verändert werden, so wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ verwendet. Es wurden die Anweisungen der Firma Stratagene befolgt. Das Ausgangskonstrukt wurde in einer PCR-Reaktion als *template* eingesetzt. Unter Verwendung von Primern, die die gewünschte Mutation trugen, wurden durch die *Pfu*-DNA-Polymerase *open circle*-Kopien des Ausgangskonstrukts mit der entsprechenden Mutation synthetisiert. Da zwar die parentale DNA, nicht aber die neu synthetisierte DNA methyliert war, konnte die parentale DNA durch einen *Dpn*I-Verdau selektiv degradiert werden.

Die mutierte DNA wurde entweder durch Hitzeschock in die im *kit* enthaltenen kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Bakterien transformiert oder in einem Elektroporationsgerät der Firma Bio-Rad (*E. coli* Pulser) in elektrokompente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Positive Klone wurden über Restriktionsverdau identifiziert, sofern die Mutation so gewählt worden war, daß eine Restriktionsschnittstelle zerstört oder geschaffen wurde. Die Sequenzierung der Klone erfolgte unter Verwendung der in Abbildung 7 dargestellten Sequenzier-Primer mit dem „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“-*kit* der Firma PE Applied Biosystems und einem ABI 377 Sequenziergerät.

Im Folgenden sind die Sequenzen der Mutageneseprimer, die für die Herstellung der diversen Konstrukte verwendet wurden, zusammengestellt. Die veränderten Basen sind fett gedruckt.

Konstrukte: pGL3/-974/RANTES/-42G, pGL3/-974/RANTES/-417A (6.3)

*template*: pGL3/-974/RANTES

-42G      5'-GGGGATGCCCCT**G**AACTGGCCC-3'  
          5'-GGGCCAGTTCAGGGGCATCCCC-3'

-417A     5'-GAGGGAAAGGAGATAAGATCTGTAATG-3'  
          5'-CATTACAGATCTTATCTCCTTCCCTC-3'

Konstrukte: pGL3/-974/RANTES/C/EBP-mut, pGL3/-974/RANTES/Oct-mut (6.4.2)

*template*: pGL3/-974/RANTES

C/EBP-mut: 5'-CTTTTCCGTTTTCTCCAATTTCACTTATG-3'  
5'-CATAAGTGAAATTGGAGAAAACGGAAAAG-3'

Oct-mut: 5'-CCGTTTTGTGCAATGGCACTTATGATACCGGC-3'  
5'-GCCGGTATCATAAGTGCCATTGCACAAAACGG-5'

Konstrukte: pGL3/-194/RANTES/A→κB, pGL3/-194/RANTES/A→Sp1,  
pGL3/-194/RANTES/B→κB (6.5.4)

*template*: pGL3/-194/RANTES

A→κB: 5'-GGTTGCTATTTTCGGGAACTTCCCTTAGGGG-3'  
5'-CCCCTAAGGGAAGTTCCCGAAATAGCAACC-3'

A→Sp1: 5'-GGTTGCTATTTTGGCCCCGCCCTTAGGGG-3'  
5'-CCCCTAAGGGGCGGGGCCAAAATAGCAACC-5'

B→κB: 5'-GGAAACTCCCCTTAATGGGATGTTCTCAACTGCC-3'  
5'-GGCAGAAGAGGAACATCCCATAAGGGGAGTGGCC-5'

Konstrukte: pGL3/-974/RANTES/R(A)-I5-R(B), pGL3/-974/RANTES/R(E)-I5-R(A)  
pGL3/-974/RANTES/R(E)-I5-R(A)-I5-R(B) (6.6.1)

*template*: pGL3/-974/RANTES

R(A)-I5-R(B): 5'-CTATTTTGGAAACTCCCCGTCGACTAGGGGATGCCCTC-3'  
5'-GAGGGGCATCCCCTAGTTCGACGGGGAGTTTCCAAAATAG-3'

R(E)-I5-R(A): 5'-GCAATTTCACTTATGACTAGTTACCGGCCAATGCTTGG-3'  
5'-CCAAGCATTGGCCGGTAACTAGTCATAAGTGAAATTGC-5'

Das Konstrukt pGL3/-974/RANTES/R(E)-I5-R(A)-I5-R(B) wurde hergestellt, indem ein Konstrukt, das schon eine Insertion enthielt, als *template* für eine PCR mit den entsprechend anderen Primern verwendet wurde.

#### 5.4.4 Konstrukte mit heterologem Promotor

Um die Funktionalität der Regionen R(E) und R(AB) außerhalb des Kontexts des RANTES-Promotors zu testen, wurden Dimere der entsprechenden Regionen vor den Minimalpromotor des SV40-Virus im Konstrukt pGL3-Promoter (Promega) kloniert. Dafür wurden freundlicherweise von U. Linzner (AG-BIODV, GSF, Neuherberg) DNA-Oligomere synthetisiert, die die betreffenden Regionen zweimal enthielten (Abbildung 8). Für die Region R(AB) wurden neben der Wildtyp-Sequenz auch Sequenzen mit Mutationen in R(A) oder R(B) untersucht.

## R(E)-Dimer / WT

TCGATATTTTCCGTTTTGTGCAATTTCACTTATGACTAGTCTTTTTCCGTTTTGTGCAATTTCACTTATG  
 GAAAAGGCCAAAACACGTTAAAGTGAATACTGATCAGAAAAGGCCAAAACACGTTAAAGTGAATACAGCT

XhoI                      R(E)                      SpeI                      R(E)                      XhoI

## R(AB)-Dimer / WT

TCGATATTTTGGAAACTCCCCTTAGGGGATGCCCTCAACTAGTATTTTGGAAACTCCCCTTAGGGGATGCCCTCAA  
 ATAAAACCTTTGAGGGGAATCCCCTACGGGGAGTTGATCATAAAAACCTTTGAGGGGAATCCCCTACGGGGAGTTAGCT

## R(AB)-Dimer / A-mut

TCGATATTTTGGAAACAGGGCTTAGGGGATGCCCTCAACTAGTATTTTGGAAACAGGGCTTAGGGGATGCCCTCAA  
 ATAAAACCTTTGTCCCGAATCCCCTACGGGGAGTTGATCATAAAAACCTTTGTCCCGAATCCCCTACGGGGAGTTAGCT

## R(AB)-Dimer / B-mut

TCGATATTTTGGAAACTCCCCTTAGACTATGAGACTCAACTAGTATTTTGGAAACTCCCCTTAGACTATGAGACTCAA  
 ATAAAACCTTTGAGGGGAATCTGATACTCTGAGTTGATCATAAAAACCTTTGAGGGGAATCTGATACTCTGAGTTAGCT

XhoI      R(A)                      R(B)                      SpeI      R(A)                      R(B)                      XhoI

**Abbildung 8: Sequenzen der für die Herstellung der pGL3/SV40-Dimerkonstrukte verwendeten DNA-Oligomere.** Darin sind R(E) bzw. R(AB) jeweils zweimal enthalten. Die Oligomere wurden so entworfen, daß nach dem *annealing* der entsprechenden Einzelstränge zu Doppelsträngen *XhoI*-Überhänge entstehen. Die Restriktionsschnittstelle für *SpeI* wurde eingefügt, um später die gesuchten Klone durch Restriktionsanalyse identifizieren zu können.

Um unvollständig synthetisierte Produkte zu entfernen, wurden die Oligomere zunächst über eine denaturierende PAGE (8 % Polyacrylamid, 8 M Harnstoff, rotiphorese Sequenziergel-Lösungen, Roth) gereinigt. Das Gel hatte die Abmessungen 40 cm x 20 cm x 1,5 mm. Es wurde durch einen 30minütigen Vorlauf bei 500 V vorgewärmt. Jeweils 100 µl eines jeden Oligomers (1 µg/µl) wurden mit 100 µl Formamid und 1 µl Bromphenolblau-Lösung (0,6 %, w/v)) versetzt, 3 min bei 90 °C denaturiert und in eine etwa 2 cm breite Geltasche geladen. Die Auftrennung erfolgte für 4,5 h bei 700 V mit 1 x TBE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel auf eine Haushaltsfolie transferiert und auf eine Silicagel-DC-Platte gelegt. Unter UV-Bestrahlung (254 nm) konnte die DNA als Schatten wahrgenommen werden. Die Vollänge-Produkte wurden ausgeschnitten, durch Isotachophorese (5.9.2.3) aus dem Gelstück eluiert, gefällt und in 50 µl TE gelöst. Die erreichte Ausbeute lag zwischen 10 und 20 %.

Jeweils 120 pmol der beiden komplementären Oligomere wurden in Anwesenheit von 0,4 M NaCl in einem Volumen von 50 µl hybridisiert (vgl. *annealing*-Ansatz, 5.10.2). Die doppelsträngigen Oligomere wurden kinasiert und mit einem mit *XhoI* verdauten, dephosphorylierten pGL3-Promoter-Vektor (Promega) ligiert. Die Oligomere wurden in einem circa 1.000fachen Überschuß gegenüber dem Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz

wurde vor der Transformation in *E. coli* mit *XhoI* nachverdaut, um den Anteil der religierten Vektormoleküle zu reduzieren.

### 5.4.5 Sonstige Plasmide

Das Plasmid pGEM/RANTES FI enthält die cDNA des humanen RANTES-Gens. Es wurde von P. J. Nelson zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid phcGAP2 enthält die cDNA des humanen GAP-DH-Gens. Es wurde freundlicherweise von C. Graßl zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide pGL2/-900/RANTES und pGL3/-642/RANTES wurden zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für *DNase I footprinting*-Experimente eingesetzt. Sie wurden freundlicherweise von P. J. Nelson überlassen.

### 5.4.6 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA, die in Transfektionsexperimenten verwendet werden sollte, wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  vermehrt (Medium und Agarplatten vgl. 5.3.1). Die Präparation erfolgte anfangs durch alkalische Lyse oder Kochen in Anwesenheit von Lysozym (Roche) mit anschließender CsCl-Dichtegradientenzentrifugation [Luckow and Schütz, 1991]. Der Großteil der Plasmidserien wurde jedoch unter Verwendung des „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben der Firma Qiagen präpariert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdau kontrolliert und auch unverdaut auf einem 0,6 %igen Agarosegel überprüft.

## 5.5 Zellkultur

### 5.5.1 Kultur der Monocyten-Zelllinien

MM6-Zellen [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1987] wurden in MM6-Medium (5.3.1.4) in 24 *well*-Zellkulturplatten (Costar) kultiviert. Sie wurden mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^6$  oder  $3 \cdot 10^6$  Zellen/Platte ausgesät und nach drei bzw. vier Tagen wieder umgesetzt. Dabei wurde stets ein Teil des konditionierten Mediums weiterverwendet. Die Verdopplungszeit betrug unter diesen Bedingungen etwa zwei Tage. THP-1-Zellen [Tsuchiya *et al.*, 1980] wurden in THP-1-Medium (5.3.1.5) in Zellkulturflaschen bei einer Dichte bis zu  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml kultiviert.

Es wurden nur Reagenzien mit niedrigem Endotoxin-Gehalt verwendet. Die Zellen wurden in 4-Wochen-Abständen auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet (Ridascreen Mycoplasma IFA, r-biopharm).

### 5.5.2 Isolierung primärer Monocyten

Primäre Monocyten wurden freundlicherweise von E. L. Nelson (NIH-FCRDC, Frederick, USA) isoliert und zur Verfügung gestellt. Aus Leukocyten-Konzentraten von gesunden Menschen wurden zunächst über einen Ficoll-Gradienten mononucleäre Zellen isoliert. Aus diesem Gemisch von Monocyten und Lymphocyten wurden die Monocyten durch Elutriation (J6M, Beckman) weiter aufgereinigt [Nelson *et al.*, 1999].

## 5.6 Transfektion und Luciferase-Reporter-*assays*

### 5.6.1 Prinzip

Um die Funktion von Promotorelementen in Monocyten zu untersuchen, wurden pGL3-Konstrukte, die Teile der Sequenz des RANTES-Promotors enthalten (5.4), in MM6- oder THP-1-Zellen transfiziert. Als interne Kontrolle wurde ein für die Luciferase aus *Renilla reniformis* codierendes Plasmid (pRL-TK, Promega) cotransfiziert. Der darin enthaltene Tymidin-Kinase-Promotor wurde durch die untersuchten Stimuli nicht beeinflusst. Somit war es möglich, die Aktivitäten der Luciferase aus *Photinus pyralis* auf die entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten zu beziehen. Beide Enzymaktivitäten konnten im gleichen Ansatz bestimmt werden, da die beiden Enzyme unterschiedliche Substrate verwenden. Die ersten im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurden ohne Cotransfektion erzeugt. Hier wurde statt der zweiten Luciferase-Aktivität die Proteinkonzentration im Zellysat (5.11.3) zur Normalisierung herangezogen.

Da bekannt war, daß Transfektionen mit unterschiedlichen Plasmidpräparationen teilweise deutlich voneinander abweichende Resultate liefern können, wurde jedes der Experimente mit 2 bis 4 verschiedenen Plasmidserien durchgeführt.

### 5.6.2 Transiente Transfektion von MM6- und THP-1-Zellen

Da sich die Zellen für die Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden mußten, wurden sie am Tag zuvor 1:1,5 umgesetzt. Am Tag der Transfektion wurden sie geerntet und einmal in RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 110 g, Minifuge T, Heraeus). Pro Testplasmid wurden  $3,6\text{-}6\cdot 10^7$  Zellen in 6 ml RPMI 1640 resuspendiert. Es wurden 60 µl DEAE-Dextran (10 mg/ml, Pharmacia), 1,2 µg pRL-TK (Promega) und 15,2 µg pGL3-Testplasmid zugegeben und gemischt. Es folgte eine 90minütige Inkubation im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Dabei banden Komplexe aus DEAE-Dextran und Plasmid-DNA an die Zelloberfläche. Durch den sich anschließenden DMSO-Schock (10 % DMSO, 3 min) konnten diese Komplexe in das Zellinnere gelangen. Es wurde zweimal mit RPMI 1640 gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in 48 ml Medium (5.3.1.4 bzw. 5.3.1.5) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in eine 24-*well*-Zellkulturplatte gegeben (2 ml/*well*).

Jeweils drei *wells* wurden zu einem Datenpunkt zusammengefaßt ( $4,5\text{-}7,5\cdot 10^6$  Zellen, 1,9 µg pGL3-Testplasmid, 0,15 µg pRL-TK). Damit war pro Testplasmid eine Platte mit 8 Datenpunkten vorhanden, von denen nach ÜN-Inkubation (16 h) im Brutschrank zwei für die Bestimmung der basalen Luciferase-Aktivitäten abgeerntet wurden. Drei der verbliebenen sechs Datenpunkte wurden mit LPS stimuliert, während die anderen drei unstimuliert blieben.

LPS (aus *Salmonella minnesota*, Sigma) wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in RPMI 1640 gelöst. Pro *well* wurden 20 µl zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 1 µg/ml erreicht wurde.

### 5.6.3 Gewinnung von Zellysaten und Bestimmung der Reporteraktivität

Die Zellen wurden 9 h stimuliert. Anschließend wurde der Inhalt der drei *wells* eines Datenpunktes in einem 13 ml-Rundbodenröhrchen (TPP) vereinigt und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 110 g, Minifuge T, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 600 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Es wurden weitere 600 µl PBS zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (6 min, 300 g, Centrifuge 5415D, Eppendorf) wurde der Überstand gründlich entfernt und das Pellet wurde in 50 µl Lyse-Puffer (vgl. unten) resuspendiert. Nach 15 min wurde 8 min bei 20.800 g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße transferiert und entweder direkt gemessen oder bei -80 °C gelagert.



Bei Experimenten ohne Cotransfektion wurde als Lyse-Puffer „Reporter Lysis Buffer“ (Promega) verwendet und die Luciferase-Aktivität wurde mit dem „Luciferase Assay System“ (Promega) bestimmt. Sollte auch die Aktivität der *Renilla*-Luciferase bestimmt werden, so wurden die Zellen in „Passive Lysis Buffer“ (Promega) lysiert und die Aktivitäten der beiden Luciferasen wurde mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega) bestimmt. Die Messung erfolgte in einem Luminometer mit zwei Injektoren (Lumat 9507, Berthold). Es wurden 20 µl Lysat in einem 5 ml-Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt. Vom Gerät wurden jeweils 100 µl der beiden Substratlösungen zudosiert. Die Meßdauer für die Enzymaktivitäten betrug jeweils 10 s.

Die Werte für die Photinus-Luciferase wurden durch die Renilla-Luciferase-Werte dividiert. Die Zellen, die zum Zeitpunkt der Stimulation geerntet worden waren, lieferten die Basalwerte. Die Aktivitäten der *Photinus*- und der *Renilla*-Luciferase haben beide die Einheit RLE (relative Lichteinheiten). Das Verhältnis ist folglich dimensionslos.

#### 5.6.4 Stabile Transfektion von THP-1-Zellen

Die Transfektion mit DEAE-Dextran ist zwar eine sehr schonende Methode, bei der die Zellen nur schwach stimuliert werden, sie ist aber für die stabile Transfektion von Zellen weniger geeignet. Es wurde statt dessen versucht, THP-1-Zellen mittels Elektroporation zu transfizieren. Dazu wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen, die am Vortag 1:1,5 umgesetzt worden waren, gewaschen und in 250 µl THP-1-Medium (5.3.1.5) resuspendiert. Danach wurden 5 µg des pGL3-Testkonstrukts und 1 µg pRc/CMV (Invitrogen) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Plasmide waren vorher linearisiert (pGL3 mit *SalI*, pRc/CMV mit *SpeI*), Phenol-extrahiert und mit Ethanol gefällt worden. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit 4 mm Elektrodenabstand (ECU-104, Equibio) bei 960 µFarad, 250 V und RT in einem Gerät der Firma Bio-Rad (Gene Pulser mit Capacitance Extender). Die Zellen wurden mit 2 ml THP-1-Medium aus der Küvette gespült und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt.

Das cotransfizierte Plasmid pRc/CMV (Invitrogen) codiert für das bakterielle Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen und verleiht solchen Zellen, die es stabil integriert haben, Resistenz gegen G418 [Southern and Berg, 1982]. Es war in Vorversuchen gefunden worden, daß nicht transfizierte THP-1-Zellen bei einer G418-Konzentration von 400 µg/ml innerhalb von 14 Tagen sterben (Geneticin, Life Technologies, in 0,1 M Hepes, pH 7,4 gelöst). Da im Labor vorangegangene Versuche, Suspensionszellen stabil zu transfizieren, fehlgeschlagen waren,

wurde ein ungewöhnliches Selektionsprotokoll gewählt. Um zu verhindern, daß bei dem Einsetzen der vollen Selektion auf Grund des unwirtlichen Milieus auch resistente Zellen sterben, wurde die G418-Konzentration schrittweise erhöht. 24 h nach der Transfektion wurde mit 200 µg/ml G418 begonnen. Nach 14 Tagen bei dieser Konzentration wurde auf 400 µg/ml erhöht. Weitere 14 Tage später wurde schließlich sogar auf 800 µg/ml G418 erhöht. Nach insgesamt 43 Tagen wurde die Selektion bei einem Teil der Ansätze eingestellt.

Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurden  $2-5 \cdot 10^6$  Zellen entnommen, gewaschen und in „Reporter Lysis Buffer“ (Promega) lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem „Luciferase Assay System“ (Promega) bestimmt (vgl. 5.6.3).

## 5.7 RNA-Analysen

### 5.7.1 Isolierung von RNA aus MM6- und THP-1-Zellen

RNA wurde nach der Ein-Schritt-Methode durch saure Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert [Chomczynski and Sacchi, 1987]. Die Zellen wurden am Tag vor einem geplanten Experiment 1:1,5 umgesetzt. Pro Datenpunkt wurden  $5-8 \cdot 10^6$  Zellen für den entsprechenden Zeitraum stimuliert. Dazu wurde LPS (aus *Salmonella minnesota*, Sigma, in RPMI 1640 gelöst) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben. Bei Experimenten, die den Einfluß von Actinomycin D testen sollten, wurde 15 min nach der Zugabe des LPS Actinomycin D in einer Endkonzentration von 3 µg/ml zugegeben. Das verwendete Actinomycin D (Sigma) war zu 3 mg/ml in DMSO gelöst.

Die Zellen wurden geerntet, zweimal in PBS gewaschen und in 800 µl Lösung D (5.3.3.1) lysiert. In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zum Lysat 80 µl 2 M Natriumacetat, pH 4 zugegeben und gründlich, aber ohne zu vortexen, gemischt. Zur Extraktion der RNA wurden zunächst 800 µl wassergesättigtes Phenol zugegeben, erneut gemischt und nach Zugabe von 160 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1, v/v) für 10-20 s gevortext, bis sich eine Emulsion bildete. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (13.000 upm, 4 °C, 15 min, Centrifuge 5417, Eppendorf), um die Phasen zu trennen. Die obere, RNA-haltige Phase wurde mit 800 µl Isopropanol versetzt und zur Fällung der RNA 30 min bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (vgl. oben), in 300 µl Lösung D gelöst und erneut durch Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol

gewaschen, luftgetrocknet und durch intensives Pipettieren und z. T. durch eine 30minütige Inkubation bei 65 °C in 100 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser vollständig gelöst.

### 5.7.2 Analytische RNA-Gelelektrophorese

Die Qualität einer RNA-Präparation wurde durch Auftrennung auf einem 1 %igen Agarosegel in 1 x MOPS-Laufpuffer (5.3.3.2) beurteilt. Dazu wurden 1-3 µg der Gesamt-RNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 20 µl Ladepuffer für analytische RNA-Agarosegele (5.3.3.3) aufgenommen. Die RNA wurde 15 min bei 65 °C denaturiert und im Gel bei einer elektrischen Feldstärke von 7 V/cm für 1 h aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator (254 nm) fotografiert. Das Vorhandensein intakter 28S-, 18S- und 5S rRNA wurde als Kriterium für eine gute RNA-Qualität herangezogen.

### 5.7.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNA erfolgte auf einem Gel mit 1 % Agarose und 6 % Formaldehyd in 1 x MOPS-Laufpuffer. Für ein Gel (14,5 cm x 14,0 cm x 0,5 cm) wurde 1 g Agarose in 74 ml H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> und 10 ml 10 x MOPS-Puffer durch Aufkochen vollständig gelöst, im Wasserbad auf 60 °C äquilibriert und nach Zugabe von 16 ml 37 %igem Formaldehyd in die Gelkammer gegossen. Zur Vorbereitung der Proben wurden jeweils 0,5-10 µg der Gesamt-RNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 20 µl Ladepuffer für denaturierende RNA-Agarosegele (5.3.3.4) aufgenommen und für 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte für 1,5 h bei 120 V.

### 5.7.4 Transfer der RNA (Northern-Blot)

Um die elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch Hybridisierung mit einer Sonde analysieren zu können, wurde sie mit Hilfe eines Kapillarblots auf eine Nylonmembran transferiert. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC (5.3.3.5) verwendet. Nylonmembran (GeneScreen, DuPont), RNA-Agarosegel und Chromatographie-Papier (Whatman 3MM) wurden für einige Minuten in 10 x SSC äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in „Current Protocols in Molecular Biology“ [Ausubel *et al.*, 1994] beschrieben. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nylonmembran für 5 min in 10 x SSC geschwenkt, 1 h luftgetrocknet und 1 h bei 80 °C gebacken. Die RNA wurde durch *UV crosslinking* auf der Membran fixiert (50 mJoule, GS GeneLinker, Bio-Rad).

### 5.7.5 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Radioaktiv markierte Sonden wurden nach der *random oligonucleotide priming*-Methode [Feinberg and Vogelstein, 1983] hergestellt. Sie ermöglicht eine einfache und schnelle Markierung beliebiger DNA-Sequenzen. Dazu werden Hexanucleotide (*random primers*) an denaturierte DNA hybridisiert, und durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase-I werden in Gegenwart radioaktiver Nucleotide neue DNA-Stränge synthetisiert. Es wurden die Reagenzien des „Prime It II Random Primer Labeling Kit“ verwendet. Die Markierungsreaktion erfolgte nach den Angaben der Firma Stratagene und wurde durch PEI-Chromatographie überprüft (5.7.6).

Zur Herstellung einer RANTES-spezifischen Sonde wurde ein circa 450 bp langes *ApaI/EcoRI*-Fragment der humanen RANTES-cDNA aus dem Plasmid pGEM/RANTES FI als *template* verwendet. Zur Herstellung einer GAP-DH-spezifischen Sonde wurde ein circa 800 bp langes *XbaI/KpnI*-Fragment des Plasmids phcGAP2 benutzt (vgl. 5.4.5). Die Fragmente wurden durch Auftrennung in einem präparativen *low melting point*-Agarosegel gereinigt. Eine Extraktion der DNA aus dem Gelstück war nicht notwendig.

### 5.7.6 PEI-Chromatographie

Die PEI-Chromatographie ermöglicht eine schnelle Überprüfung des Einbaus von radioaktiv markierten Nucleotiden bei der Sondensynthese [Miller and Kirkpatrick, 1969; Reyes, 1972]. Freies Phosphat sowie Mono-, Di- und Triphosphate wandern mit dem sauren Laufpuffer, während höhermolekulare Nucleinsäuren am Auftragsort liegen bleiben. Dem zu untersuchenden Reaktionsansatz wurden circa 0,5 µl entnommen und auf einen Streifen PEI-Zellulose (POLYGRAM CEL 300 PEI, Macherey-Nagel) aufgetragen. Nach Antrocknen der Lösung fand die Chromatographie mit 0,75 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,5 als Laufmittel statt. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie.

### 5.7.7 Hybridisierung [Church and Gilbert, 1984]

Die Membran wurde mit der „RNA-Seite“ nach innen in eine mit Wasser gefüllte Hybridisierungsröhre (15 cm Länge, 4 cm Durchmesser) überführt und luftblasenfrei an die Wand der Röhre angelegt. Das Wasser wurde durch 35 ml Hybridisierungsmix (70 °C)

(5.3.3.7) ersetzt und die Membran wurde unter Rotation in einem Hybridisierungssofen bei 65 °C für mindestens 1 h prähybridisiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

Die Sonde (5.7.5) wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und in 15 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung (70 °C) überführt. Die Prähybridisierungs-Lösung wurde abgegossen und zügig durch die Sonden-haltige Hybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation bei 65 °C für mindestens 8 h.

## 5.7.8 Waschen der Membran und Exposition

Unspezifisch gebundene Sonden-Moleküle wurden nach der Hybridisierung durch mehrere Waschschrte entfernt. Die Hybridisierungslösung wurde abgekippt und die Membran wurde in der Röhre zweimal mit je 200 ml Waschpuffer 1 (70 °C, vgl. 5.3.3.8) gewaschen. Anschließend wurde die Membran aus der Röhre entnommen und zweimal in einem Schüttelwasserbad bei 65 °C in 300 ml Waschpuffer 1 für 30 min gewaschen. Waren danach mit einem Geiger-Müller-Zählrohr noch starke Hintergrundsignale meßbar, so wurde die Membran noch zweimal für 30 min bei 65 °C in 300 ml Waschpuffer 2 (5.3.3.9) gewaschen.

Die Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschlagen und je nach Stärke der Signale für 1 h bis mehrere Tage exponiert. Für die Autoradiographie wurden Kodak X-OMAT-Röntgenfilme in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolien (DuPont) bei -80 °C exponiert. Für die spätere Digitalisierung (ScannerControl V4.1) und Quantifizierung (ImageQuant V1.2) erfolgte die Exposition in Kassetten eines Phosphorimagers (Storm 840, Molecular Dynamics).

## 5.7.9 Entfernen hybridisierter Sonden

Sollte eine bereits hybridisierte Membran mit einer weiteren Sonde analysiert werden, so mußten die gebundenen Sonden-Moleküle zuvor wieder abgelöst werden. Dazu wurde die Membran für 15 min in TE-Puffer mit 4 % SDS gekocht und anschließend in Haushaltsfolie verpackt. Durch eine lange Exposition wurde sichergestellt, daß keine Signale mehr nachweisbar waren. Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung in feuchtem Zustand bei 4 °C aufbewahrt.

## 5.8 Präparation von Kernextrakten aus Monocyten

Die Präparation von Kernextrakten erfolgte nach dem Prinzip der Hochsalz-Extraktion [Schreiber *et al.*, 1989]. MM6- oder THP-1-Zellen wurden einen Tag vor der Gewinnung der Kernextrakte 1:1,5 umgesetzt. Am folgenden Tag wurden pro Stimulationsbedingung  $0,5 \cdot 10^8$  Zellen für 1 h 45 min stimuliert. Für die weitere Präparation wurden nur vorgekühlte Reagenzien verwendet, es wurde auf Eis gearbeitet und alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C.

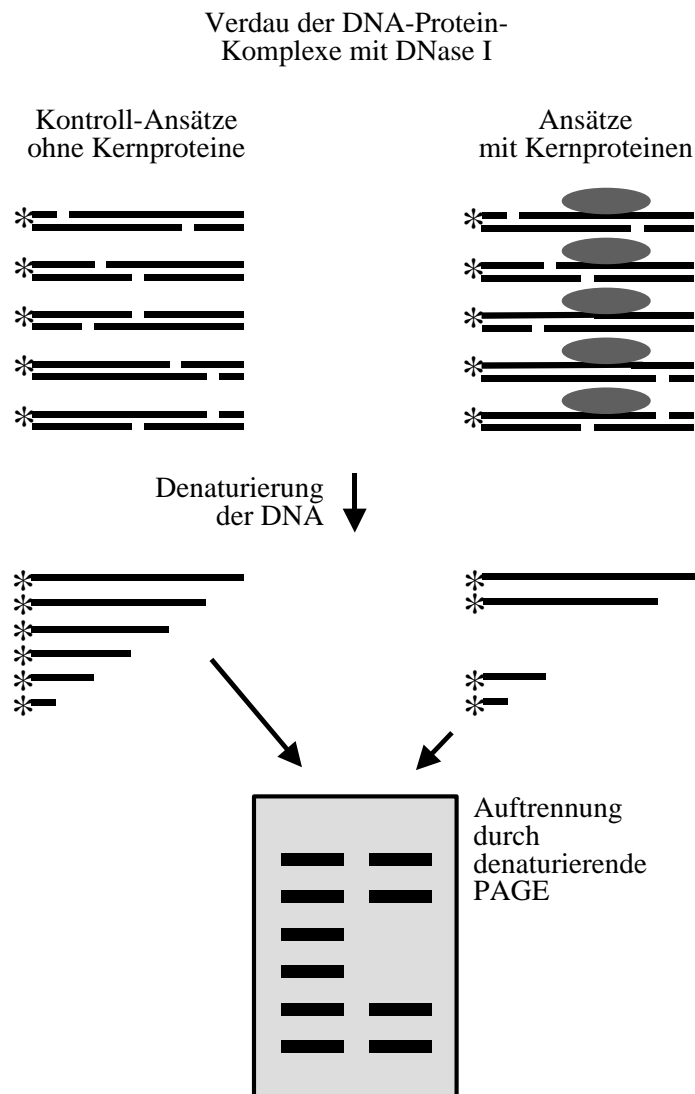
Die Zellen wurden in 50 ml-Röhrchen geerntet, mit PBS gewaschen und in 15 ml-Röhrchen überführt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Puffer A (5.3.4.1) resuspendiert und 5 min inkubiert. Durch die hypotone Salzkonzentration des Puffers kam es zum Anschwellen der Zellen. Es folgte eine schonende 3minütige Zentrifugation bei 750 upm (96 g in Minifuge T, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 1 ml Puffer A mit 0,2 % Nonidet-P-40 (NP-40) aufgenommen und erneut für 5 min inkubiert. Das NP-40 führt zum Aufplatzen der Zellmembran. Freigewordene Organellen, Zellkerne und Membranstücke wurden in einer etwas stärkeren Zentrifugation pelletiert (1.800 upm, 557 g, 3 min). Der trübe Überstand mit den cytoplasmatischen Proteinen wurde verworfen. Das Pellet wurde durch Zugabe von 1 ml Puffer C (5.3.4.2) oberflächlich gewaschen (Pellet wurde nicht resuspendiert). Nach Bedarf wurde ein zweites Mal bei 1.800 upm für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 100-400 µl Puffer C mit 0,4 M NaCl aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Während einer 60minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proteine aus dem Zellkern extrahiert. Die Ansätze wurden anschließend 10 min bei 14.000 upm (20.800 g) in einer Centrifuge 5417 R der Firma Eppendorf zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 15 µl-Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (5.11.3).

Um Kernextrakte aus primären Monocyten zu gewinnen, wurden die eingefrorenen Zellen zunächst in Kultur genommen (Medium vgl. 5.3.1.6). Am nächsten Tag wurden die Zellen für 1 h 45 min stimuliert. Die Präparation der Kernextrakte erfolgte gleich wie für die MM6- und THP-1-Zellen beschrieben, jedoch mit entsprechend kleineren Volumen, da primäre Zellen deutlich kleiner sind als die transformierten Monocyten. Den Puffern wurden weitere Protease-Inhibitoren zugesetzt (1 µg/ml Antipain, 1 µg/ml Pepstatin A, 0,1 µg/ml Chymostatin).

## 5.9 DNase I footprinting

### 5.9.1 Prinzip

Mit Hilfe der *DNase I footprinting*-Analyse [Galas and Schmitz, 1978] können spezifische Bindungsstellen für Proteine auf DNA-Fragmenten identifiziert werden. Die Methode beruht darauf, daß gebundene Proteine die DNA vor der Hydrolyse durch DNase I schützen. Durch Vergleich der Spaltprodukte, die in An- oder Abwesenheit von Kernproteinen entstehen, kann abgelesen werden, welche DNA-Bereiche mit Proteinen besetzt sind. Es können relativ große DNA-Abschnitte und verschiedene Stimulationsbedingungen gleichzeitig untersucht werden.



**Abbildung 9: Prinzip der *DNase I footprinting*-Analyse.** Der zu untersuchende DNA-Abschnitt wird an einem Strang radioaktiv markiert und in An- und Abwesenheit von Kernproteinen mit DNase I verdaut. Sequenzen, die mit Kernproteinen besetzt sind, sind vor dem Verdau geschützt. Die Spaltprodukte werden durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert.

## 5.9.2 Markierung der Sonde

Das verwendete Protokoll wurde aus „Current Protocols in Molecular Biology“ [Ausubel *et al.*, 1994] entnommen und leicht abgewandelt. Zunächst wurde ein geeignetes Plasmid durch Restriktionsverdau linearisiert. Die entstandenen 5'-Überhänge wurden mit radioaktiv markierten Nucleotiden aufgefüllt. Durch Verdau mit einem zweiten Restriktionsenzym wurde ein einsträngig markiertes Fragment erzeugt, welches durch nicht denaturierende PAGE gereinigt wurde.

Zur Untersuchung des *sense*-Stranges wurde das Plasmid pGL3/-642/RANTES (5.4.5) mit *Hind*III verdaut, durch Einbau von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dGTP markiert und anschließend mit *Nco*I verdaut. Die so hergestellte Sonde enthielt die RANTES-Promotorsequenz von Position -434 bis +54.

Um eine auf dem *antisense*-Strang markierte Sonde herzustellen, wurde das Plasmid pGL2/-900//RANTES (5.4.5) mit *Nco*I linearisiert, durch Einbau von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP markiert und schließlich mit *Pst*I verdaut. Diese Sonde enthielt die Promotorsequenz von Position -434 bis -12.

### 5.9.2.1 Erster Restriktionsverdau

Gereinigte Plasmid-DNA (5 µg) wurde mit 50 U des gewählten Enzyms in einem 50 µl-Reaktionsansatz für 2,5 h verdaut. Es wurde ein Restriktionspuffer gewählt, der auch für die Markierungsreaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase-I und für den Verdau mit dem zweiten Restriktionsenzym geeignet war. Anschließend wurden 0,5 µl aus dem Ansatz entnommen und auf einem 0,6 %igen Agarosegel aufgetrennt, um zu überprüfen, ob die DNA vollständig verdaut war. Abhängig von dem zu markierenden Strang wurden an den 5'-überhängenden Enden unterschiedliche Radionucleotide eingebaut.

Markierungs-Ansatz: 49,5 µl Restriktionsverdau  
 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP  
 5 µl  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP oder  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dGTP  
 3,75 µl dGTP oder dCTP (10 mM)  
 3,75 µl dTTP (10 mM)  
 0,75 µl BSA (10 mg/ml, NEB)  
 2,5 µl 10 x Restriktionspuffer  
 2 µl Klenow-DNA-Polymerase (2 U/µl)  
 2,75 µl  $\text{H}_2\text{O}^{\text{MP}}$   
 75 µl Gesamtvolumen



Es wurde 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l dNTP-Mix (2 mM je Nucleotid, Pharmacia) wurde für weitere 5 min bei RT inkubiert, um sicherzustellen, daß die Überhänge vollständig aufgefüllt wurden. Das Klenow-Enzym wurde durch eine 15minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

### 5.9.2.2 Zweiter Restriktionsverdau

Durch Verdau mit einem weiteren Restriktionsenzym wurde ein einzelsträngig markiertes Fragment des RANTES-Promotors erzeugt.

Restriktionsansatz:    77  $\mu$ l Markierungsansatz  
                          1  $\mu$ l 10 x Restriktionspuffer  
                          4  $\mu$ l Restriktionsenzym (10 U/ $\mu$ l)  
                          5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup>  
                          87  $\mu$ l Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Ein 2  $\mu$ l-Aliquot wurde auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Autoradiographie des Gels konnte beurteilt werden, wie effizient die Markierungsreaktion und der zweite Restriktionsverdau verlaufen waren. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> auf ein Volumen von 200  $\mu$ l gebracht und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1, v/v/v) extrahiert. Die DNA wurde anschließend mit Natriumacetat und Ethanol gefällt, pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50  $\mu$ l TE-Puffer gelöst.

### 5.9.2.3 Reinigung der Sonde durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Isotachophorese

Es wurde ein 5 %iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel (5.3.2.5) mit den Abmessungen 20 cm x 20 cm x 1,5 mm in einer Protean II-Gelapparatur (Bio-Rad) vorbereitet. Der Sondenlösung (50  $\mu$ l) wurden 10  $\mu$ l 6 x DNA-Ladepuffer (5.3.2.4) zugefügt. Diese Lösung wurde auf zwei 1,7 cm breite Geltaschen verteilt. In einer separaten Tasche wurden 2  $\mu$ g DNA-Längenstandard (Life Technologies) geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h 45 min bei 220 V mit 0,5 x TBE als Laufpuffer. Der Teil des Gels, auf dem der Längenstandard aufgetrennt worden war, wurde abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Beleuchtung (254 nm) wurden die Banden des Längenstandards auf Papier übertragen. Der Teil des Gels, der die Sonde enthielt, wurde feucht eingewickelt. Ein Röntgenfilm wurde exponiert. Die Größenordnung der Banden erfolgte mit Hilfe des Längenstandards und die passende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten.

Die DNA wurde durch Isotachophorese aus dem Gel isoliert. Dazu wurde eine Säule von 9 cm Länge und 1,1 cm Durchmesser 5 cm hoch mit Sephadex G-50 (Pharmacia, in 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 autoklaviert) befüllt und mehrmals mit 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 gespült. Die Säule wurde am unteren Ende mit einem Stück Dialysemembran (Serva) verschlossen. Der über dem Säulenbett stehende Tris-Puffer wurde abpipettiert und durch 100 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure ersetzt. Das Gelstück, das die Sonde enthielt, wurde auf das Säulenbett gelegt und 25  $\mu$ l einer 0,1 %igen (w/v) Phenolrot-Lösung wurden in das obere Pufferreservoir pipettiert. Die Kathode wurde in das obere Pufferreservoir getaucht, während das untere Ende der Säule und die Anode in ein mit 40 mM Tris-Puffer gefülltes Becherglas getaucht wurden. Die DNA wurde bei einer konstanten Stromstärke von 5 mA aus dem Gelstück eluiert. Das Phenolrot bildete dabei eine klar definierte Lauffront und zeigte die Wanderung der DNA an. Hatte der Ring das untere Ende der Säule bis auf einen Abstand von 5 mm erreicht, wurde der Stromkreis unterbrochen. Die Dialysemembran wurde entfernt und es wurden 10-15 Tropfen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Die darin enthaltene DNA wurde gefällt und anschließend in 100  $\mu$ l TE-Puffer, pH 8 gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### 5.9.3 DNA-Bindungsreaktion

Für die Inkubation von Kernextrakt und Sonde müssen die Proteine im Überschuß eingesetzt werden, um sicherzustellen, daß alle Sondenmoleküle mit Proteinen assoziiert sind. Wäre dies nicht gewährleistet, so wäre ein *footprint* nicht deutlich zu erkennen. Die Bedingungen der Bindungsreaktion entsprachen im wesentlichen den EMSA-Inkubationsbedingungen für R(AB) (5.10.5), es wurden jedoch 70  $\mu$ g Kernextrakt, 8  $\mu$ g dIdC und 20 kcpm markierte Sonde eingesetzt. Das Volumen des Reaktionsansatzes war 50  $\mu$ l.

Es wurden ein „Sonden-Mix“ und ein „Kernextrakt-Mix“ (oder auch mehrere) hergestellt. Der „Kernextrakt-Mix“ wurde gekühlt, um die darin enthaltenen Proteine vor einem Verdau durch Proteasen zu schützen. Er enthielt je Ansatz ein konstantes Volumen von 20  $\mu$ l Puffer C, in dem sich auch die Kernproteine befanden. 14  $\mu$ l „Sonden-Mix“ wurden mit 36  $\mu$ l „Kernextrakt-Mix“ vereint, für 45-60 min auf Eis inkubiert und anschließend sofort mit DNase I verdaut.

„Sonden-Mix“:	5 $\mu$ l	10 x Bindungspuffer (5.3.5.1)
	8 $\mu$ l	dIdC (1 mg/ml in 0,1 M NaCl, Pharmacia)
	1 $\mu$ l	Sonde (20 kcpm/ $\mu$ l, in H <sub>2</sub> O <sup>MP</sup> verdünnt)
	14 $\mu$ l	Gesamtvolumen
„Kernextrakt-Mix“:	x $\mu$ l	Kernextrakt (entsprechend 70 $\mu$ g, in Puffer C mit 0,4 M NaCl)
	(20-x) $\mu$ l	Puffer C
	(2-0,2x) $\mu$ l	NaCl (2M)
	36 $\mu$ l	Gesamtvolumen

## 5.9.4 Verdau mit DNase I und Analyse der Spaltprodukte

Für jede Sonde mußte die optimale DNase I-Menge ermittelt werden. Sie lag bei den hier beschriebenen Experimenten in Ansätzen mit Kernextrakt zwischen 50 und 120 ng und in Kontrollansätzen zwischen 5 und 15 ng. Die Bindungsreaktionen wurden auf 25 °C äquilibriert und je Ansatz wurden 50  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>-Mix (5.3.5.2) zugegeben. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l einer geeigneten DNase I-Verdünnung (Worthington) wurde für genau 2 min bei 25 °C inkubiert. Der DNase I-Verdau wurde durch Zugabe von 90  $\mu$ l Stop-Puffer (5.3.5.3) beendet.

Zur Aufreinigung der Spaltprodukte wurden je Ansatz 1-2  $\mu$ l Hefe-tRNA (10 mg/ml, Sigma) zugegeben, die DNA wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) extrahiert und anschließend mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Die DNA wurde pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 4  $\mu$ l Formamid-Ladepuffer (5.3.5.4) gelöst. Dies geschah durch 5minütiges Zentrifugieren.

Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte durch Auftrennung in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 % Polyacrylamid, 8 M Harnstoff). Dabei wurden Sequenziergel-Lösungen der Firma Roth (rotiphorese) und 1 x TBE als Laufpuffer verwendet. Das Gel hatte die Abmessungen 40 cm x 20 cm x 0,4 mm und eine der beiden Glasplatten war mit Dimethyldichlorsilan behandelt, um das spätere Ablösen des Gels zu erleichtern. Es wurde ein 30minütiger Vorlauf bei 40 mA durchgeführt. Die Proben wurden für 3-5 min bei 90 °C denaturiert, vollständig auf das Gel geladen und entsprechend der jeweiligen Fragestellung unterschiedlich lange bei circa 32 mA aufgetrennt. Das Gel wurde auf Chromatographie-Papier (Whatman 3MM) transferiert und 2 h bei 80 °C auf einem Vakuum-Geltrockner (Gel Dryer 583, Bio-Rad) getrocknet. Es wurden Röntgenfilme und Phosphorimagerplatten, wie unter 5.7.8 beschrieben, exponiert.

### 5.9.5 Herstellung einer A/G-Leiter

Für die Zuordnung der *footprints* zur RANTES-Promotorsequenz wurde eine sogenannte A/G-Leiter hergestellt. Dazu wurden 20 kcpm der Sonde (5.9.2) in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 4 µl saurem Formamid-Ladepuffer (5.3.5.5) aufgenommen. Während einer 10minütigen Inkubation im kochenden Wasserbad wurde die DNA an allen Adenin- und Guanin-Basen gespalten. Die A/G-Leiter wurde zusammen mit den DNase I-Spaltprodukten im Gel aufgetrennt.

## 5.10 *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

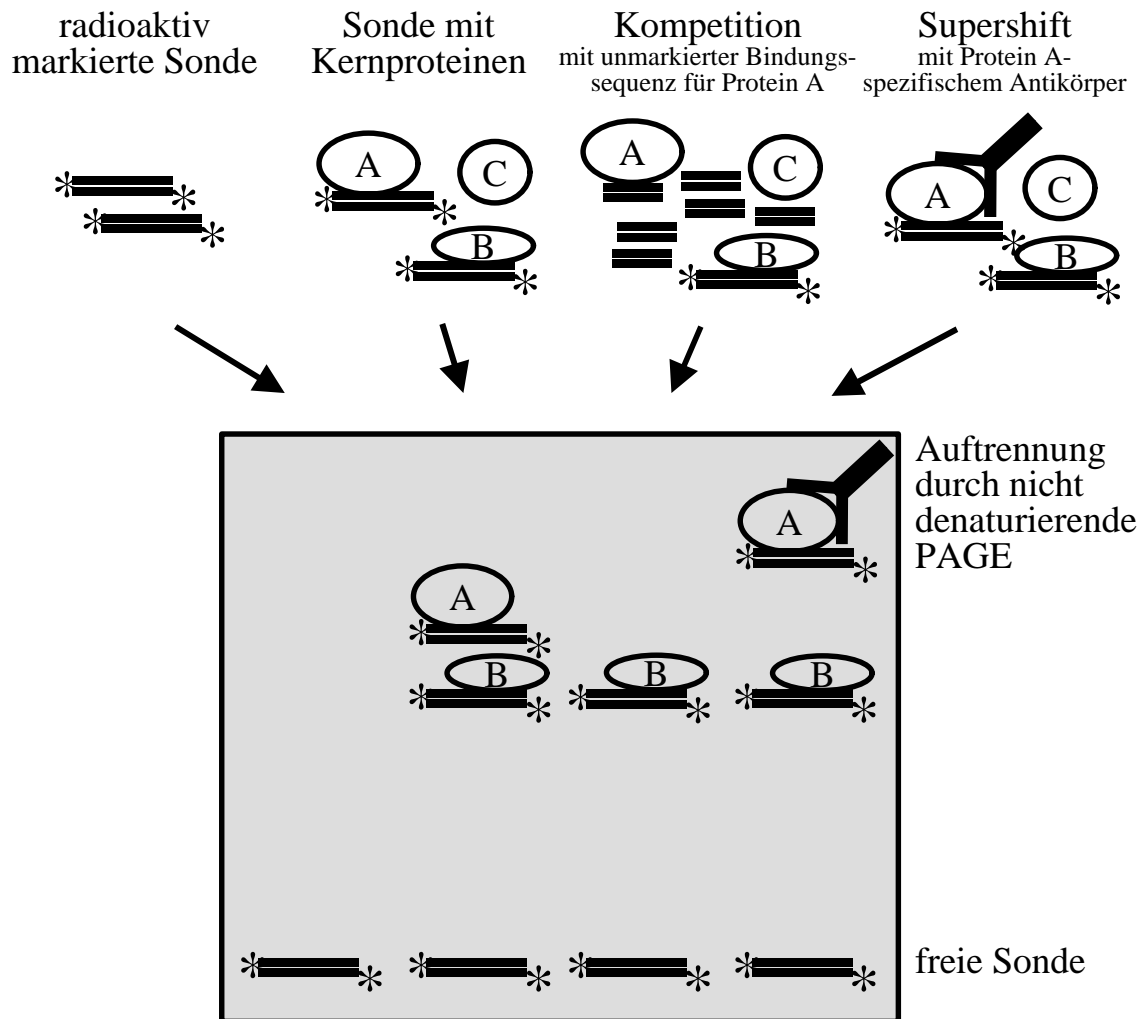
### 5.10.1 Prinzip

Der *electrophoretic mobility shift assay*, kurz EMSA, ist eine einfache und schnelle Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen DNA-Sequenzen und Kernproteinen. Die Methode gibt Auskunft darüber, welche Proteine *in vitro* mit der DNA interagieren können.

Als Sonde wurden synthetische Oligonucleotide mit der zu untersuchenden DNA-Sequenz verwendet. Die einzelsträngigen Oligomere wurden zu Doppelsträngen hybridisiert und radioaktiv markiert. Während der Bindungsreaktion wurde die Sonde gemeinsam mit Kernextrakt inkubiert. Der Ansatz wurde schließlich auf einem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Besitzt die Sonde Bindungsstellen für im Kernextrakt enthaltene Proteine, so können diese an die DNA binden. Dabei entstehen DNA-Protein-Komplexe, die auf Grund des höheren Molekulargewichts im Gel langsamer wandern als die freie Sonde (Abbildung 10).

Für Wettbewerbs-Ansätze wurden Oligonucleotide, welche die Consensus-Sequenz eines bestimmten Transkriptionsfaktors enthalten, im molaren Überschuß gegenüber der Sonde zum Bindungsansatz gegeben. Können die Proteine eines Komplexes den Kompetitor binden, so wird die Sonde durch die nicht markierten Oligomere verdrängt, und die entsprechende Bande wird schwächer oder verschwindet völlig. Um auszuschließen, daß es sich um eine unspezifische Konkurrenz handelt, muß der Effekt eines Kompetitors mit einer mutierten Consensus-Sequenz überprüft werden. Während sich durch den Einsatz von Kompetitoren

ermitteln läßt, an welche Sequenz ein Protein bindet, kann mit Hilfe von Antikörpern das Protein selbst identifiziert werden. Erkennt ein Antikörper DNA-gebundene Proteine, so bindet er zusätzlich am DNA-Protein-Komplex und führt zu einer weiteren Erhöhung des Molekulargewichts (Supershift). Antikörper, die an die DNA-bindende Domäne eines Transkriptionsfaktors binden, verhindern die Bindung des Faktors an die Sonde (*blocking*).



**Abbildung 10: Prinzip des *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA).** Die radioaktiv markierte DNA wird mit Kernextrakt inkubiert. Einige der im Extrakt enthaltenen Proteine erkennen Bindungsstellen auf der DNA. Es bilden sich unterschiedliche DNA-Protein-Komplexe, die im Polyacrylamidgel langsamer wandern als die freie Sonde. In Anwesenheit eines Überschusses von unmarkierten Bindungsstellen binden die Proteine vor allem an diese und stehen für eine Bindung an die Sondenmoleküle nicht mehr zur Verfügung. Die Bindung eines Antikörpers in Supershift-Ansätzen führt zu einer weiteren Verminderung der Mobilität des DNA-Protein-Komplexes. Das Wanderungsverhalten eines Komplexes wird hauptsächlich von den Eigenschaften der gebundenen Proteine bestimmt.

### 5.10.2 Hybridisierung von Einzelstrang-Oligonucleotiden zu Doppelsträngen

Oligomere mit komplementärer Sequenz wurden in einer Konzentration von 100 pmol/μl in H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> rekonstituiert. Die Hybridisierung der Einzelstränge zu Doppelsträngen (*annealing*) fand bei einer Salzkonzentration von 0,4 M NaCl statt.

*Annealing*-Ansatz:

6 μl	Oligomer 1 (100 pmol/μl)
6 μl	Oligomer 2 (100 pmol/μl)
1,6 μl	NaCl (5M)
<u>6,4 μl</u>	<u>H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup></u>
20 μl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Die Temperatur wurde daraufhin in 5 °C-Schritten (jew. circa 15 min) auf 40 °C reduziert. Nach einer ÜN-Inkubation bei 37 °C wurden zum Ansatz 180 μl H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> zugegeben, um eine Konzentration von 3 pmol/μl Doppelstrang-DNA einzustellen.

### 5.10.3 Markierung von Oligonucleotid-Sonden durch Kinasierung

Es wurden Oligomere verwendet, die nach der Hybridisierung glatte Enden (*blunt ends*) bildeten. Sie wurden durch Übertragung radioaktiver Phosphat-Gruppen durch die Polynucleotid-Kinase des Phagen T4 (T4-PNK) markiert.

Kinase-Ansatz:

2 μl	doppelsträngiges Oligomer (3 pmol/μl)
3 μl	10 x PNK-Puffer (NEB)
4 μl	γ- <sup>32</sup> P-ATP
2 μl	T4-PNK (10 U/μl, NEB)
<u>19 μl</u>	<u>H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup></u>
30 μl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Adenosin-Di- und Triphosphate mit einer „NucTrap Probe Purification Column“ in Kombination mit einer „Push Column Beta Shield Device“ (Stratagene) abgetrennt. Die Sonde befand sich schließlich in circa 100 μl STE (TE mit 0,1 M NaCl). Die Effizienz der Reinigung wurde mittels PEI-Chromatographie (5.7.6) überprüft.

#### 5.10.4 Herstellung einer markierten Sonde, die den Bereich von -125 bis -18 enthält

Es wurde eine Sonde benötigt, die die Regionen R(E), R(AB) und die TATA-Box enthält. Diese Sonde sollte eine hohe spezifische Aktivität haben, da in den in Abschnitt 6.6.2 beschriebenen Experimenten relativ wenig Sondenmoleküle eingesetzt werden sollten. Anfangs wurde ein PCR-basiertes Markierungsprotokoll verwendet. Da es auf diese Weise nicht gelang, eine ausreichend markierte Sonde zu synthetisieren, wurde ein alternativer Weg gewählt. Hierbei wurde zunächst die entsprechende PCR-Reaktion in Abwesenheit von radioaktiven Nucleotiden durchgeführt.

PCR-Ansatz:

2 µl	pGL3/-228/RANTES (80 ng/µl)
10 µl	10 x <i>Pfu</i> -Puffer (Stratagene)
5 µl	R(E) <i>forward primer</i> (10 pmol/µl)
5 µl	R(AB) <i>reverse primer</i> (10 pmol/µl)
20 µl	dNTP-Mix (1,25 mM, Pharmacia)
2 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl, Stratagene)
56 µl	<u>H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup></u>
100 µl	Gesamtvolumen

Temperaturprofil:

1 x	5:00 min	94 °C	(GeneAmp 9700, Perkin Elmer)
30 x	0:30 min	94 °C	
	0:45 min	64 °C	
	0:30 min	72 °C	
1 x	7:00 min	72 °C	

R(E) *forward primer*: 5'-CTTTTCCGTTTTGTGCAATTTC-3'

R(AB) *reverse primer*: 5'-GCTGGCCCTTTATAGGGCC-3'

Das PCR-Produkt wurde nach den Anweisungen der Firma Stratagene in die *SrfI*-Schnittstelle des Vektors pPCR-Script kloniert („PCR-Script Amp Cloning Kit“). Die Sondensequenz wurde zusammen mit 23 bp aus der MCS in einem *Bam*HI/*Not*I-Verdau aus dem Konstrukt ausgeschnitten. Nach Auftrennung in einem 2,5 %igen Agarosegel wurde die gesuchte Bande ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) extrahiert. Die überhängenden 5'-Enden wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Dabei wurden radioaktive dGTPs eingebaut.

*Fill in*-Ansatz:

20 µl	Restriktionsfragment (7,5 ng/µl)
5 µl	10 x Puffer 2 (NEB)
0,5 µl	BSA (10 mg/ml, NEB)
10 µl	α- <sup>32</sup> P-dGTP (6.000 Ci/mmol)
1 µl	Exo(-)Klenow (5 U/µl, Stratagene)
13,5 µl	<u>H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup></u>
50 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert. Nachdem 4 µl dNTP-Mix (2 mM, Pharmacia) zugegeben worden waren, wurde weitere 15 min bei RT inkubiert. Das Enzym wurde durch eine 5minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die DNA wurde mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt, in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend kinasiert (Kinase-Ansatz vgl. 5.10.3). Dadurch sollte eine hohe spezifische Aktivität der Sonde erzielt werden. Ein Vergleich der direkt durch PCR markierten Sonde mit dieser Sonde im EMSA zeigte, daß die 23 Basen aus der pPCR-Script-MCS keinen Einfluß auf die Komplexbildung hatten.

### 5.10.5 Bindungsreaktion

Während der Bindungsreaktion erfolgt die Komplexbildung zwischen der radioaktiv markierten Sonde und den Kernproteinen, die Bindungsstellen auf der DNA erkennen. Da die Reaktionsbedingungen die Komplexbildung beeinflussen können, wurden diese für die unterschiedlichen Regionen optimiert. Die Bedingungen für R(E) stellen eine Kombination der R(AB)-Bedingungen [Nelson *et al.*, 1996] mit den von Hu *et al.* [Hu *et al.*, 1998] für den Nachweis von C/EBP-Proteinen verwendeten Bedingungen dar.

<b>R(E):</b>	5 µg Kernextrakt	<b>R(AB):</b>	5 µg Kernextrakt
	32 % (v/v) Puffer C (5.3.4.2)		40 % (v/v) Puffer C (5.3.4.2)
	87 mM NaCl		93 mM NaCl
	30-50 kcpm Sonde		30-50 kcpm Sonde
	1 µg dIdC (Pharmacia)		2 µg dIdC (Pharmacia)
	5 mM Tris-HCl, pH 7,5		10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	0,5 mM EDTA, pH 8		1 mM EDTA, pH 8
	5,5 % (v/v) Glycerin		5 % (v/v) Glycerin
	5,5 mM DTT		1 mM DTT
	5 mM Hepes, pH 7,9		1 mM Pefabloc SC (Roche)
	2 % (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia)		
	5 µg/ml BSA (Roche)		
	0,03 % (w/v) Bromphenolblau		

Das Gesamtvolumen betrug 15 µl. Die NaCl-Menge, die dem Ansatz zugefügt werden mußte, ergab sich aus den enthaltenen Volumen an Kernextrakt (0,4 M NaCl) und dIdC (0,1 M NaCl). Es wurde jeweils ein konstanter Volumenanteil Puffer C (5.3.4.2) eingesetzt, da das Kernextraktvolumen (Kernproteine in Puffer C) nicht immer gleich war. Die meisten Komponenten wurden in Form eines höher konzentrierten Prämixes eingesetzt. DTT wurde immer frisch zugegeben. Die R(AB)-Ansätze wurden 45 min auf Eis inkubiert, die R(E)-Ansätze 45 min bei RT.



In Kompetitions- und Supershift-Ansätzen wurden zusätzlich 20-40 ng unmarkierte Oligonucleotide (Santa Cruz Biotechnology) mit intakten oder mutierten Consensus-Sequenzen oder 1-2 µl Antikörper-Reagenz eingesetzt. Es wurden Antiseren oder gereinigte polyklonale Antikörper mit einer Konzentration von 1-2 µg/µl (Santa Cruz Biotechnology, Upstate Biotechnology) verwendet. Kompetitoren und Antikörper wurden vor Zugabe der Sonde zum Ansatz gegeben und 20 min vorinkubiert. Es folgte eine 25minütige Inkubation in Anwesenheit der Sonde.

### 5.10.6 Auftrennung der EMSA-Komplexe

Die Komplexe wurden in einem 5 %igen nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (5.3.2.5) mit 0,5 x TBE als Laufpuffer für 1 h 40 min bei 220 V aufgetrennt. Es wurde eine Protean II-Gelapparatur (Bio-Rad) mit 1,5 mm-*spacern* und 20 Taschen verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM-Papier transferiert und für mindestens 40 min bei 80 °C auf einem Vakuumgeltrockner (Gel Dryer 583, Bio-Rad) getrocknet. Die Exposition von Röntgenfilmen und Phosphorimagerplatten erfolgte wie unter 5.7.8 beschrieben.

## 5.11 Sonstige Methoden

### 5.11.1 Durchflußcytometrie

Jeweils  $2 \cdot 10^6$  MM6- und THP-1-Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert. Zu jeweils 100 µl Zellsuspension wurden entweder 10 µl <hCD14>-FITC (UCHM-1, Sigma) oder <hCD8>-FITC (Leu-2a, Becton-Dickinson) zugegeben. Es wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen eines Ansatzes wurden in 200 µl PBS resuspendiert und in einem Durchflußcytometer (FACScan, Becton-Dickinson) mit Hilfe der Software CellQuest analysiert.

### 5.11.2 RANTES-ELISA

Zum Nachweis von RANTES in Zellkulturüberständen wurde ein *sandwich*-ELISA durchgeführt. Die verwendeten Antikörper (VL3, VL1) wurden von P. J. Nelson zur Verfügung gestellt [von Luettichau *et al.*, 1996]. Eine 96-well-Mikrotiterplatte (Maxisorp,

Nunc) wurde mit VL3 (10 µg/ml in Beschichtungspuffer (5.3.6.1), 50 µl/well) beschichtet (16 h bei 4 °C oder 1 h 30 min bei 37 °C) und mit Blockierungspuffer (5.3.6.2) blockiert (1 h, RT). Als Standard wurde rekombinantes humanes RANTES (Serono) in Konzentrationen zwischen 30 und 2.000 pg/ml verwendet. Proben und Standards wurden in Waschpuffer (5.3.6.3) verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden 100 µl/well pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Der Meerrettichperoxidase-gekoppelte (EZ-Link-Peroxidase, Pierce) VL1-Antikörper wurde in Verdünnungspuffer (5.3.6.4) auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Pro well wurden 100 µl dieser Verdünnung eingesetzt und 2 h bei RT inkubiert. Es wurden 100 µl Substratlösung (5.3.6.5) pro well pipettiert und 30 min im Dunkeln inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal mit Waschpuffer (5.3.6.3) gewaschen. Die Messung erfolgte in einem Platten-Photometer (Molecular Devices) bei 405 nm.

### 5.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzelllysaten und Kernextrakten erfolgte nach der Bradford-Methode [Bradford, 1976] mit dem „Protein Assay“ der Firma Bio-Rad. Die zu testenden Proben wurden mit H<sub>2</sub>O<sup>MP</sup> auf eine geeignete Konzentration verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (Fraktion V, Roche) angesetzt. In den wells einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte wurden 200 µl Probenverdünnung zu 50 µl „Protein Assay“-Lösung zugegeben und gemischt. Es folgte eine photometrische Auswertung bei 600 nm (Biomek 1000, Beckman).

## 5.12 Software für Sequenzanalyse und Modellierung

Potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen wurden mit Hilfe von MatInspector Professional [Quandt *et al.*, 1995] identifiziert. Das Programm verwendet Matrixbeschreibungen, die auf den Einträgen der TRANSFAC-Datenbank (<http://www.biobase.de>) [Heinemeyer *et al.*, 1999] basieren. Eine Transkriptionsfaktor-Matrix wird durch *alignment* mehrerer bekannter funktioneller Bindungsstellen errechnet. Die (meist vier) am höchsten konservierten Basen einer Matrix werden als *core sequence* bezeichnet. Beim Vergleich einer zu untersuchenden DNA-Sequenz mit den Matrizen wird eine *core similarity* (CS) von 1 zugewiesen, wenn die Basen der *core sequence* genau übereinstimmen.

Der Wert für die *matrix similarity* (MS) ist ein Maß für die Übereinstimmung auf der gesamten Länge der Matrix. Sie ist bei „guten“ Treffern meist größer als 0,8.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen der RANTES-Promotor-Sequenz wurden mit Hilfe von MatInspector jeweils so gewählt, daß keine zusätzlichen potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen geschaffen wurden.

Das Computerprogramm FastM [Klingenhoff *et al.*, 1999] wurde benutzt, um Promotor-Modelle zu entwerfen. Dabei wurden die experimentell gewonnenen Informationen verarbeitet. FastM-Modelle beschreiben eine Kombination von mindestens zwei Kontrollelementen, ihre Ausrichtung auf dem DNA-Doppelstrang, ihre Abfolge und die Entfernung zwischen den Elementen.

Das Computerprogramm ModelInspector [Frech *et al.*, 1996; Frech *et al.*, 1997] wurde benutzt, um in der EMBL-Datenbank (*release* 63) und der EPD (Philipp Bucher's Eukaryotic Promoter Database) [Perier *et al.*, 2000] nach Sequenzen zu suchen, die durch die Modelle beschrieben werden können.

Die Programme MatInspector Professional, FastM und ModelInspector sind Komponenten des GEMS-Launcher-Pakets der Firma Genomatix (<http://www.genomatix.de>).



## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 RANTES-Expression in Monocyten

#### 6.1.1 Monocyten-Zelllinien und -Stimuli

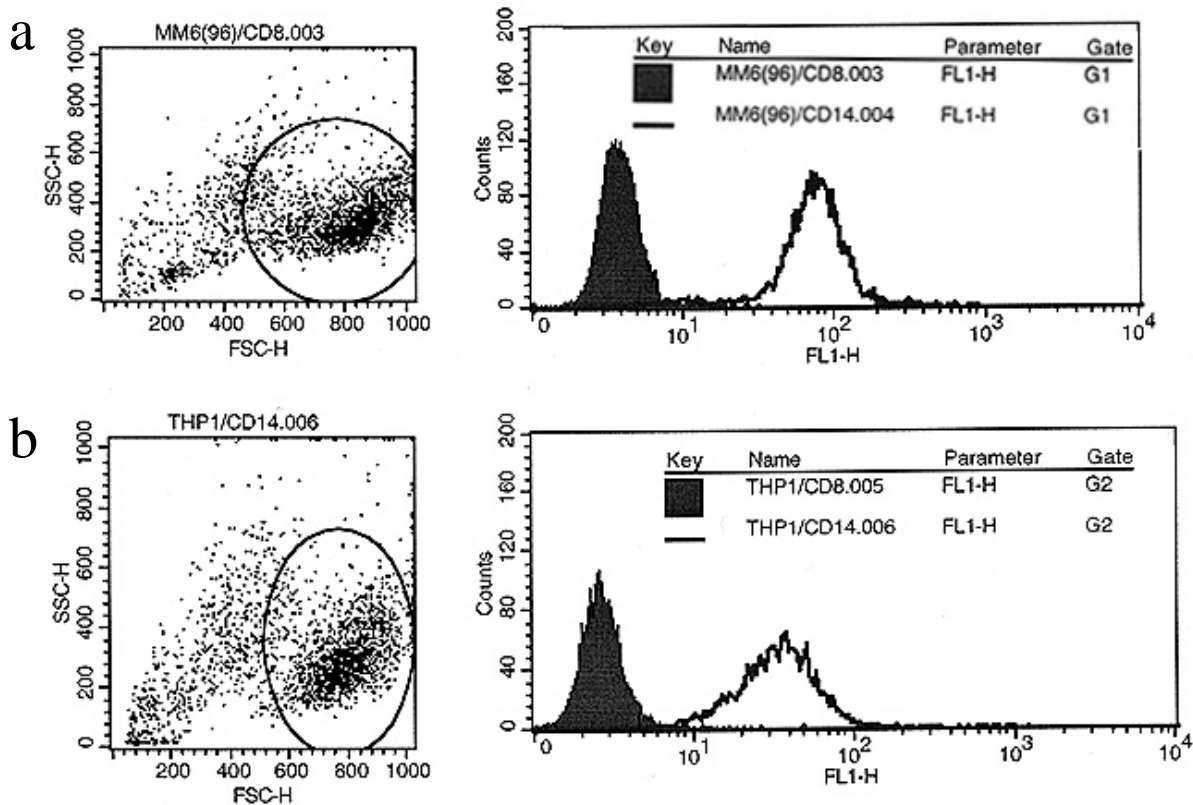
Die Zelllinie Mono Mac 6 wurde aus dem Blut eines Patienten mit monoblastischer Leukämie etabliert und zeigt die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften reifer Monocyten [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1987]. Dazu gehören die Expression der NaF-empfindlichen unspezifischen Esterase, die Produktion reaktiver Sauerstoff-Verbindungen und die Fähigkeit zur Phagocytose. MM6-Zellen zeigen konstitutive Expression einiger Oberflächenmarker reifer Monocyten (M42, LeuM3, 63D3, Mo2, UCHM-1) [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1987].

Die Zelllinie THP-1 [Tsuchiya *et al.*, 1980] stellt ein früheres Stadium der Monocyten/Makrophagen-Reifung dar. Sie wird als monoblastische Zelllinie betrachtet. Laut Untersuchungen von Ziegler-Heitbrock *et al.* kann eine teilweise Differenzierung von THP-1-Zellen durch IFN- $\gamma$  induziert werden [Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1987].

Die Isolierung primärer humaner Monocyten in einem Maßstab, wie er für die geplanten Experimente erforderlich gewesen wäre, war im Labor nicht möglich. Frühere Versuche, primäre Monocyten zu transfizieren, waren - wahrscheinlich auf Grund der hohen DNase-Aktivität der Zellen - fehlgeschlagen (P. J. Nelson, H. W. L. Ziegler-Heitbrock, persönliche Mitteilung).

Die hier beschriebenen Experimente konzentrieren sich auf die durch LPS-Induktion hervorgerufenen Prozesse. Teilweise wurden zum Vergleich auch andere Stimuli untersucht. Dazu gehörten proinflammatorische Cytokine und niedermolekulare Hyaluronsäure. Letztere entsteht in entzündeten Geweben durch Degradation der extrazellulären Matrix [Hodge-Dufour *et al.*, 1997].

Die Expression des LPS-Rezeptors CD14 auf MM6- und THP-1-Zellen wurde durch Durchflußcytometrie untersucht. MM6-Zellen zeigten eine etwas stärkere Expression als THP-1-Zellen (Abbildung 11).

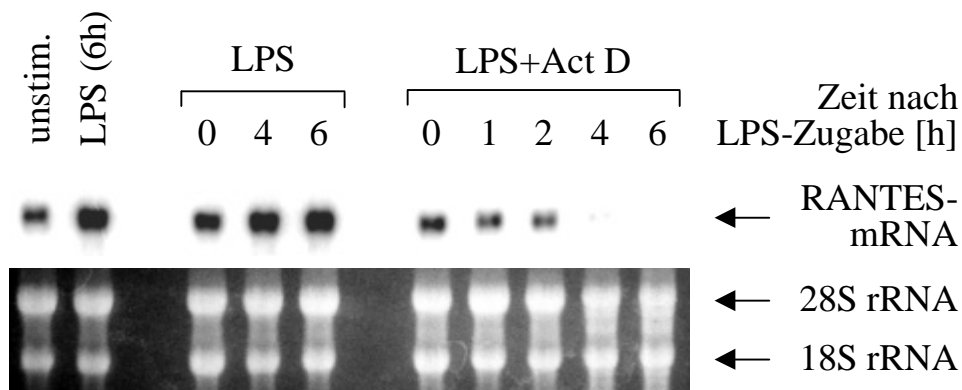


**Abbildung 11: MM6- und THP-1-Zellen exprimieren CD14 auf ihrer Oberfläche.** MM6- (a) und THP-1-Zellen (b) wurden mit dem FITC-konjugierten CD14-spezifischen Antikörper UCHM-1 [Hogg *et al.*, 1984] gefärbt. Als Kontrollantikörper (Negativkontrolle) wurde der CD8-spezifische Antikörper Leu-2a verwendet (5.11.1). Die linke Graphik zeigt jeweils den „Dot-Plot“ mit *forward scatter* (FSC-H) und *side scatter* (SSC-H). Für die Zellen im *gate* ist auf der rechten Seite der „Histogram-Plot“ mit der in Kanal 1 gemessenen Fluoreszenz auf der Abszisse (FL1-H) und der Zellzahl (Counts) auf der Ordinate abgebildet. Die Negativkontrolle ist durch die ausgefüllte Kurve dargestellt und die nicht ausgefüllte Kurve steht für CD14-Ansätze.

### 6.1.2 Kinetik der LPS-induzierten RANTES-Expression in MM6-Zellen

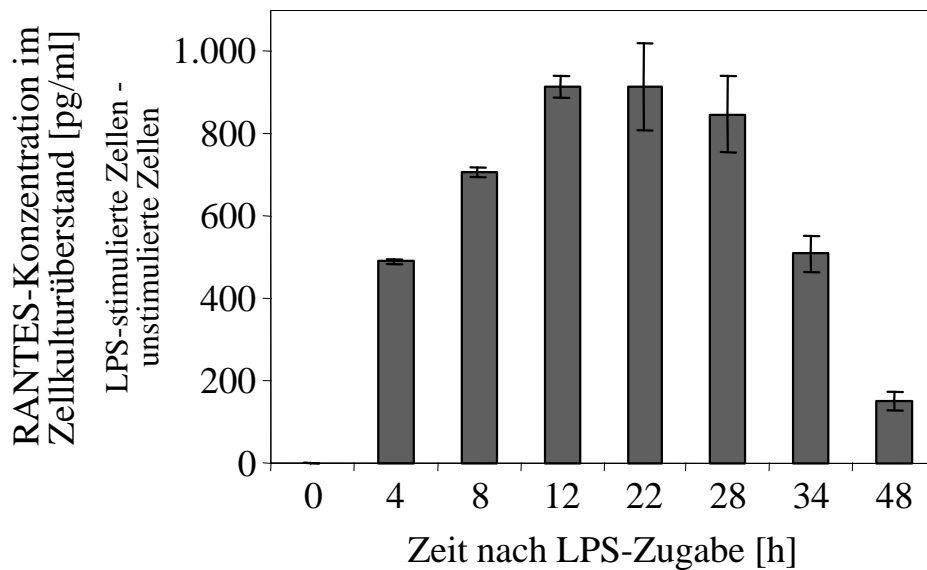
Frühere Untersuchungen [Boehlk *et al.*, 2000] haben gezeigt, daß sowohl primäre humane Monocyten als auch MM6-Zellen konstitutiv geringe Mengen von RANTES-mRNA produzieren. Die RANTES-mRNA-Spiegel werden in beiden Zelltypen nach LPS-Stimulation schnell und transient erhöht. Maximale Spiegel werden sechs bis neun Stunden nach Zugabe von LPS erreicht. Die Frage, ob die beobachtete Erhöhung der RANTES-mRNA-Spiegel durch LPS-Stimulation auf verstärkter Transkription oder auf Stabilisierung der mRNA beruht, sollte durch Stimulation in Anwesenheit des RNA-Polymerase-II-Inhibitors Actinomycin D beantwortet werden. Dazu wurde den Zellen 15 min nach Zugabe des LPS 3 µg/ml Actinomycin D zugesetzt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen

lysiert. Die RANTES-mRNA wurde im Northern-Blot nachgewiesen. In Abbildung 12 ist zu sehen, daß Actinomycin D die RANTES-Transkription hemmt. Die RANTES-mRNA-Mengen wurden mit Hilfe von ImageQuant quantifiziert (vgl. 5.7.8) und auf die Mengen an 28S- und 18S rRNA bezogen. Aus den Werten wurde für RANTES-mRNA in LPS-stimulierten MM6-Zellen eine Halbwertszeit von circa 60 min ermittelt.



**Abbildung 12: Die Erhöhung des RANTES-mRNA-Spiegels durch LPS-Stimulation kann durch den RNA-Polymerase-II-Inhibitor Actinomycin D blockiert werden.** Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA von MM6-Zellen. Pro Datenpunkt wurden  $8 \cdot 10^6$  MM6-Zellen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert. 15 min später wurde einem Teil der Zellen  $3 \mu\text{g/ml}$  Actinomycin D (Act D) zugesetzt. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen und LPS-stimulierte Zellen, die an Stelle von Actinomycin D mit 0,1 % DMSO behandelt wurden (nicht gezeigt). Die Gesamt-RNA wurde nach Lyse der Zellen in einem Guanidiniumthiocyanat-haltigen Puffer durch saure Phenol-Extraktion isoliert. Jeweils  $4 \mu\text{g}$  der Gesamt-RNA wurden in einem 1 %igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Zum späteren Abgleich auf die geladene RNA-Menge wurde die mit Ethidiumbromid gefärbte rRNA auf einem UV-Transilluminator (302 nm) kurz fotografiert. Die RNA wurde dann auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten RANTES-cDNA hybridisiert. Das Experiment wurde insgesamt zweimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

Um zu klären, ob die erhöhten mRNA-Spiegel mit einer verstärkten Produktion von RANTES-Protein korrelieren, wurde die RANTES-Konzentration im Zellkulturüberstand von MM6-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Stimulation mittels ELISA (5.11.2) bestimmt. Da auch unstimulierte MM6-Zellen RANTES produzieren und darüber hinaus RANTES-Moleküle wegen ihrer längeren Halbwertszeit im Zellkulturüberstand akkumulieren, ist in Abbildung 13 für jeden Zeitpunkt die Differenz zwischen der RANTES-Konzentration LPS-induzierter Zellen und jener von unstimulierten Zellen aufgetragen. Wie erwartet, ist das Maximum hier gegenüber dem Maximum des mRNA-Spiegels nach hinten verschoben (12-28 h gegenüber 6-9 h). Bei unstimulierten Zellen betrug der 22-Stunden-Wert 58 % des entsprechenden LPS-Wertes.



**Abbildung 13: Zeit-Kinetik der RANTES-Expression in MM6-Zellen.** Die verwendeten MM6-Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase und wurden zu Beginn des Experiments zweimal in PBS gewaschen. Pro Datenpunkt wurden  $8 \cdot 10^5$  Zellen für die angegebene Zeitdauer mit LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die RANTES-Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt (5.11.2). Es ist die Differenz zwischen den Werten LPS-stimulierter und unstimulierter Zellen aufgetragen. Nach 12 h bzw. 22 h betrug die RANTES-Konzentration im Kulturüberstand unstimulierter Zellen 53 % bzw. 58 % der entsprechenden Werte LPS-stimulierter Zellen.

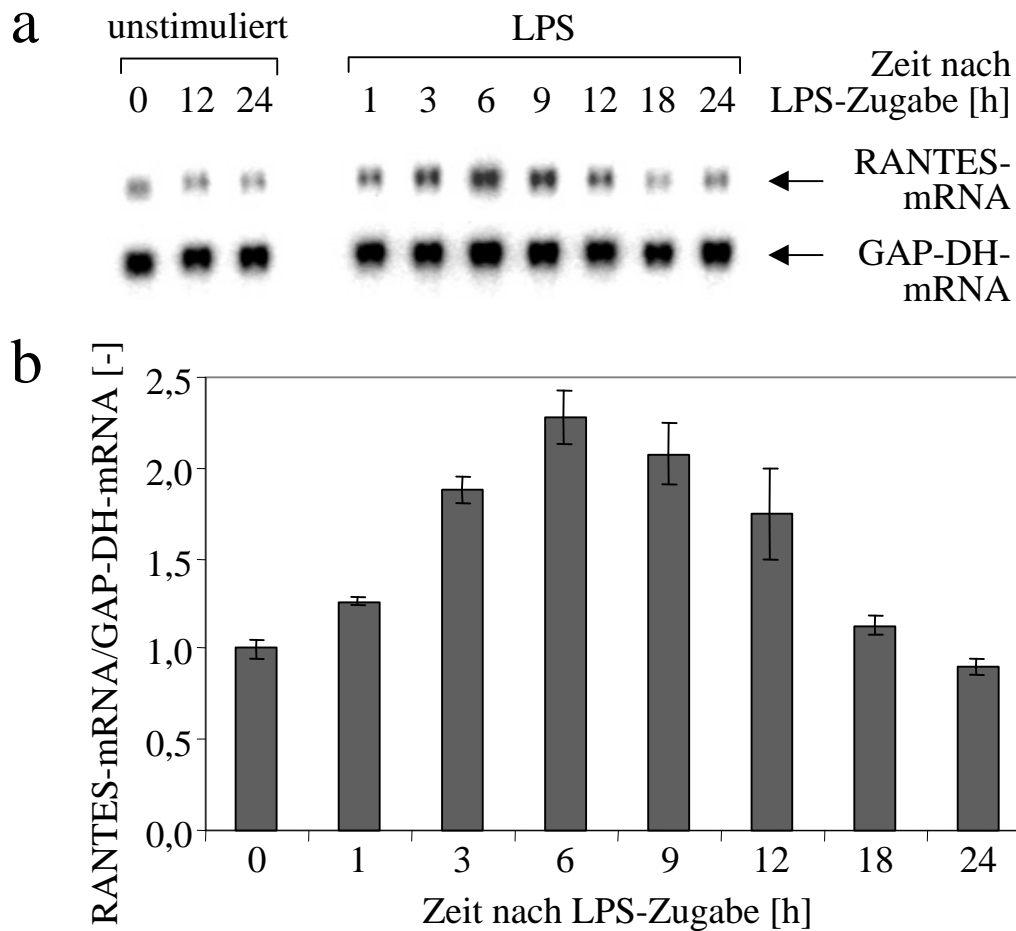
### 6.1.3 Kinetik der LPS-induzierten RANTES-Expression in THP-1-Zellen

In ähnlicher Weise wie für MM6-Zellen durchgeführt, wurde die Kinetik der RANTES-Expression auch in THP-1-Zellen studiert. Dieser Zelltyp repräsentiert ein weniger differenziertes Stadium der Monocyten/Makrophagen-Entwicklung. Abbildung 14a zeigt eine Northern-Blot-Analyse der Gesamt-RNA unstimulierter und LPS-stimulierter THP-1-Zellen. Die RANTES-mRNA-Menge wurde mit Hilfe der Software ImageQuant (vgl. 5.7.8) quantifiziert und auf die Menge des *housekeepers* GAP-DH bezogen. Die Werte sind in Abbildung 14b gezeigt. Das Maximum der mRNA-Menge wird auch in diesem Zelltyp nach 6-9 h erreicht.

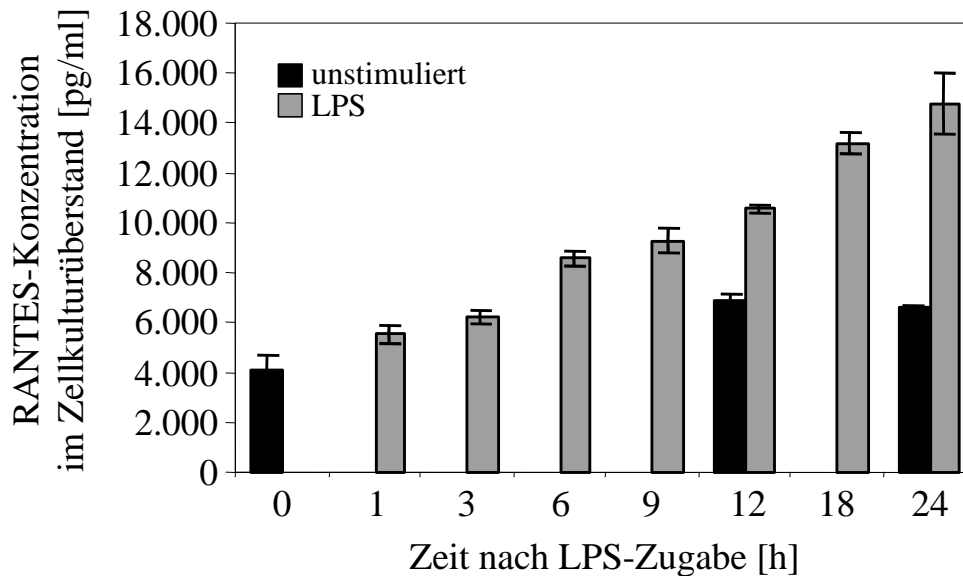
Bevor die Zellen für die in Abbildung 14 gezeigte Northern-Blot-Analyse lysiert wurden, wurden Zellkulturüberstände abgenommen und eingefroren. Die RANTES-Konzentrationen in diesen Überständen wurden mittels ELISA bestimmt (5.11.2). Sie sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Obwohl in diesem Experiment ein kürzerer Zeitraum untersucht wurde als im entsprechenden MM6-Experiment (Abbildung 13), ist zu sehen, daß sich die beiden



Monocyten/Makrophagen-Zelllinien MM6 und THP-1 auch auf der Ebene der LPS-induzierten RANTES-Proteinexpression ähnlich verhalten. Die Beobachtung, daß der Stimulationsfaktor (RANTES-Produktion stimulierter Zellen / RANTES-Produktion unstimulierter Zellen) mit etwa 2 im Bereich des Stimulationsfaktors für die mRNA liegt, legt nahe, daß die Regulation der RANTES-Expression in LPS-stimulierten Monocyten vor allem auf transkriptioneller Ebene erfolgt.



**Abbildung 14: RANTES-mRNA-Kinetik in THP-1-Zellen.** Pro Datenpunkt wurden  $8 \cdot 10^6$  THP-1-Zellen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für die angegebene Dauer stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Gesamt-RNA wurde nach Lyse der Zellen in einem Guanidiniumthiocyanat-haltigen Puffer durch saure Phenol-Extraktion isoliert.  $6 \mu\text{g}$  der Gesamt-RNA wurden in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde nacheinander mit radioaktiv markierten cDNAs für RANTES und GAP-DH hybridisiert (a). Die Signale für RANTES- und GAP-DH-mRNA wurden quantifiziert. Die daraus berechneten dimensionslosen Quotienten sind in (b) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von zwei Auftragungen der gleichen RNA-Proben an unterschiedlichen Positionen auf dem gleichen Gel dar. Das Experiment wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Man sieht, daß es in THP-1-Zellen nach LPS-Induktion zu einer etwa 2fachen Erhöhung des RANTES-mRNA-Spiegels mit einem Maximum nach 6-9 h kommt.



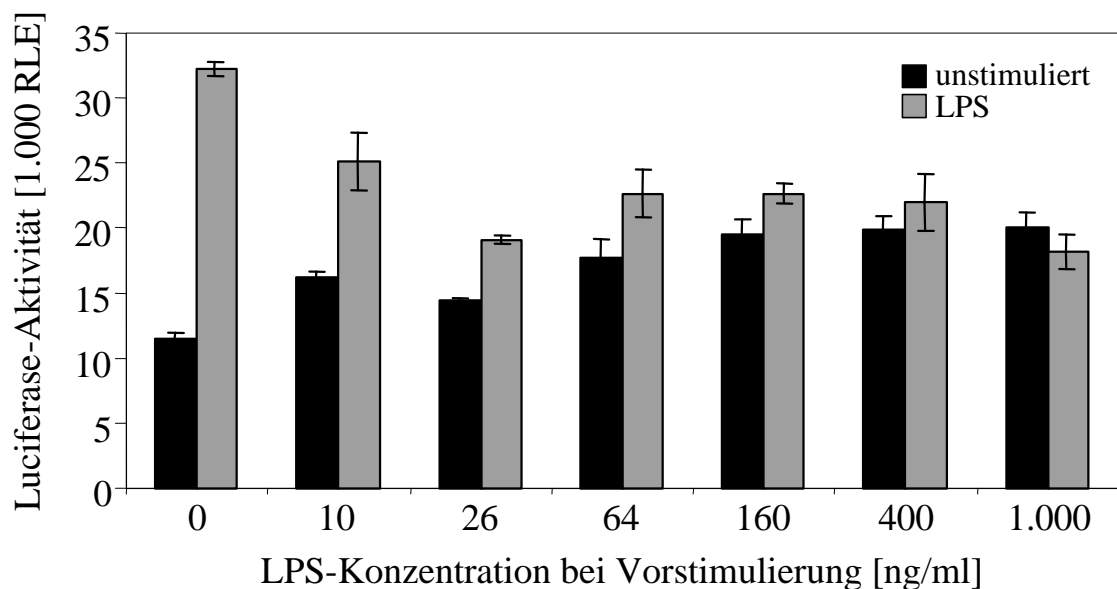
**Abbildung 15: Zeit-Kinetik der RANTES-Expression in THP-1-Zellen.** Vor der Lyse der Zellen für die in Abbildung 14 gezeigte mRNA-Kinetik wurden Zellkulturüberstände abgenommen und im RANTES-ELISA analysiert (5.11.2). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Doppelbestimmung eines Zellkulturüberstandes im ELISA dar. THP-1-Zellen produzieren RANTES konstitutiv. Nach LPS-Stimulation kommt es zu einer verstärkten Expression.

#### 6.1.4 Stabil transfizierte THP-1-Linien

Es wurde versucht, Monocyten stabil mit RANTES-Promotor-Reporterkonstrukten zu transfizieren. Um zu vermeiden, daß die später gemessene Reporteraktivität (Luciferase) durch die Nähe eines starken viralen Promotors, wie er in Selektionskassetten verwendet wird, verfälscht wird, wurde das für die Aminoglycosid-Phosphotransferase codierende Plasmid pRc/CMV (Invitrogen) cotransfiziert. Es wurde über 42 Tage mit G418 selektioniert. Zunächst wurde das Reporterkonstrukt, das die -974-Region des RANTES-Promotors enthielt getestet (5.4.2). In den stabilen THP-1-Linien war Luciferase-Aktivität meßbar und LPS bewirkte eine 2-3fache Stimulation. Es ist nicht gelungen, MM6-Zellen in gleicher Weise stabil zu transfizieren.

Nach längerer Kultur wurde die Expression des Reportergens in den THP-1-Zellen zunehmend schwächer. Da die Selektions- und die Reporter cassette nicht gekoppelt waren, geschah dies auch bei kontinuierlich aufrechterhaltener G418-Selektion. Es wäre erforderlich gewesen, die Zellen zu klonieren. Da für die Arbeit geplant war, sehr viele Reporterkonstrukte zu vergleichen, erhielt die Methode der transienten Transfektion den Vorzug. Die stabile Transfektion stellt zwar eine Methode dar, mit der transkriptionelle Effekte unabhängig von Transfektionsartefakten, wie zum Beispiel der Aktivierung der Zellen

durch CpG-Motive bakterieller DNA, untersucht werden können, sie ist jedoch nicht geeignet für das Vergleichen unterschiedlicher Reporterkonstrukte, da die Aktivität des Testpromotors von den umgebenden Sequenzen beeinflusst werden kann. Da keine homologe Rekombination stattfindet, ist der Integrationsort zufällig. Die Linien wurden im Labor hin und wieder für das Testen von Substanzen auf ihren möglichen Einfluß auf die RANTES-Transkription verwendet. Auch für die anfängliche Optimierung der Kultur- und Stimulationsbedingungen wurden sie eingesetzt. So konnte zum Beispiel sehr einfach veranschaulicht werden, daß schon geringe Mengen LPS die Monocyten gegenüber diesem Stimulus desensibilisieren. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem mit pGL3/-974/RANTES „stabil“ transfizierte THP-1-Zellen mit LPS vorstimuliert worden waren. Schon ab einer Konzentration von 10 ng/ml LPS im Medium nahm die Stimulierbarkeit der Zellen drastisch ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Medien, Medienzusätze, Stimulanzen und Plasmidpräparationen wurden streng kontrolliert, um jegliche LPS-Kontamination zu vermeiden.



**Abbildung 16: In vorstimulierten Zellen kann die Aktivität des RANTES-Promotors durch LPS nicht effizient induziert werden.** Stabil mit pGL3/-974/RANTES transfizierte THP-1-Zellen wurden 24 h mit den angegebenen LPS-Konzentrationen vorstimuliert und dann für 9 h mit 1 µg/ml LPS stimuliert oder unstimuliert belassen. Pro Datenpunkt wurden  $3,8 \cdot 10^6$  Zellen lysiert. Jeder Datenpunkt wurde doppelt angesetzt. Es sind die in 20 µl Gesamtzelleextrakt gemessenen Luciferase-Aktivitäten in relativen Lichteinheiten (RLE) angegeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Duplikate an.

## 6.2 Identifizierung potentieller Kontrollregionen im RANTES-Promotor

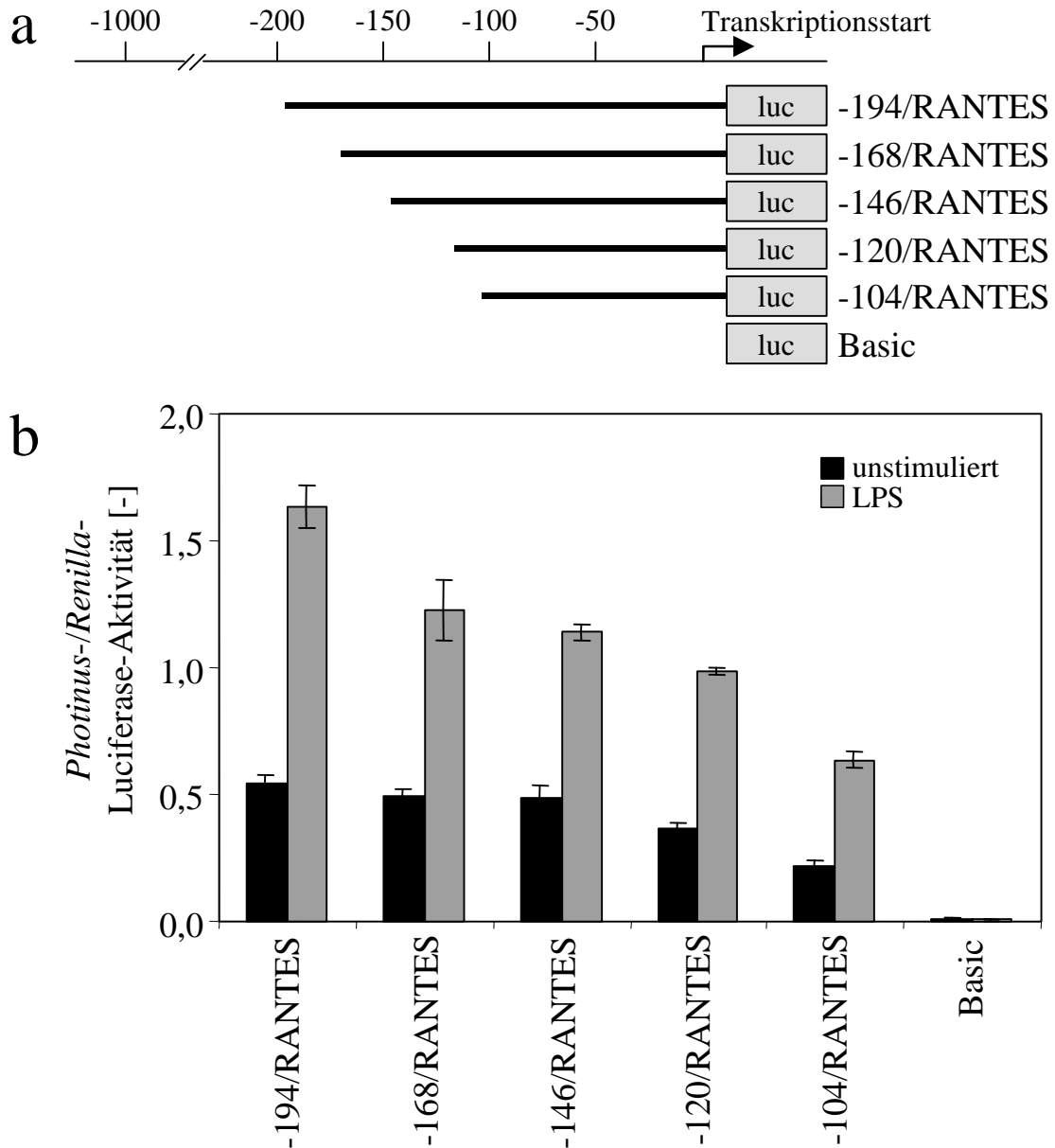
### 6.2.1 Funktionelle Untersuchung der Promotorregion von -194 bis +54 in transienten Transfektionen

Es wurde gezeigt, daß in MM6-Zellen die dem Transkriptionsstart unmittelbar benachbarte Sequenz des RANTES-Promotors von -228 bis +54 für eine optimale RANTES-Expression ausreicht [Boehlk *et al.*, 2000]. Die Charakterisierung potentieller Kontrollelemente innerhalb dieser Region identifizierte ein mit RANTES *site G* (R(G)) bezeichnetes Promotor-Modul im Bereich zwischen -211 und -187, das an der Reaktion der MM6-Zellen auf LPS-Stimulation beteiligt ist [Boehlk *et al.*, 2000]. Es wurden weitere 5'-3'-RANTES-Promotor-Konstrukte hergestellt, um den Bereich zwischen -194 und +54 zu analysieren. Transiente Transfektionen dieser Deletionskonstrukte zeigten, daß die zunehmende Verkürzung der RANTES-Promotor-Sequenz in einer kontinuierlichen Abnahme sowohl der konstitutiven als auch der LPS-induzierten Reporteraktivität resultiert. Im Gegensatz dazu blieb die Reporteraktivität bei Verkürzungen bis -228 konstant [Boehlk *et al.*, 2000]. Deshalb wurde vermutet, daß sich im Bereich zwischen -194 und +54 weitere Regionen befinden, die ebenfalls zur konstitutiven und LPS-induzierten Reporteraktivität beitragen (Abbildung 17).

### 6.2.2 *DNase I footprinting*-Analyse der Promotorregion von -230 bis +54 in THP-1-Zellen

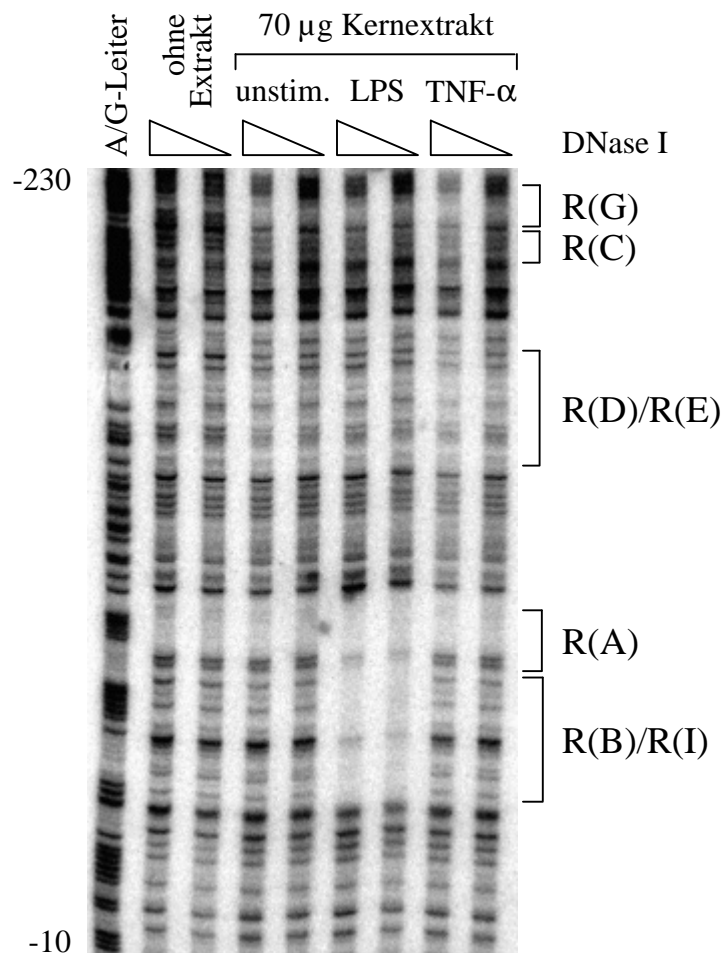
In *DNase I footprinting*-Experimenten wurde für MM6-Zellen die Lage potentieller transkriptioneller Kontrollelemente aufgeklärt [Boehlk *et al.*, 2000; Fessele *et al.*, 2001]. Die Regionen decken sich größtenteils mit den schon für T-Zellen beschriebenen Elementen [Ortiz *et al.*, 1997]. Um wiederum die Ergebnisse durch die Untersuchung einer zweiten Monocyten-Zelllinie abzusichern, und gleichzeitig alternative Stimuli zu testen, wurden *DNase I footprinting*-Experimente mit Kernextrakten aus unstimulierten, LPS-, TNF- $\alpha$  und Hyaluronsäure-stimulierten THP-1-Zellen durchgeführt.

Für die Untersuchung des *sense*-Stranges wurde eine Sonde verwendet, die die Promotorsequenz von -434 bis +54 enthielt. Eine Sonde mit der Promotorsequenz von -434 bis -12 wurde zur Analyse des *antisense*-Stranges eingesetzt. In den Kontrollansätzen wurde die Sonde in Abwesenheit von Kernproteinen mit DNase I verdaut.



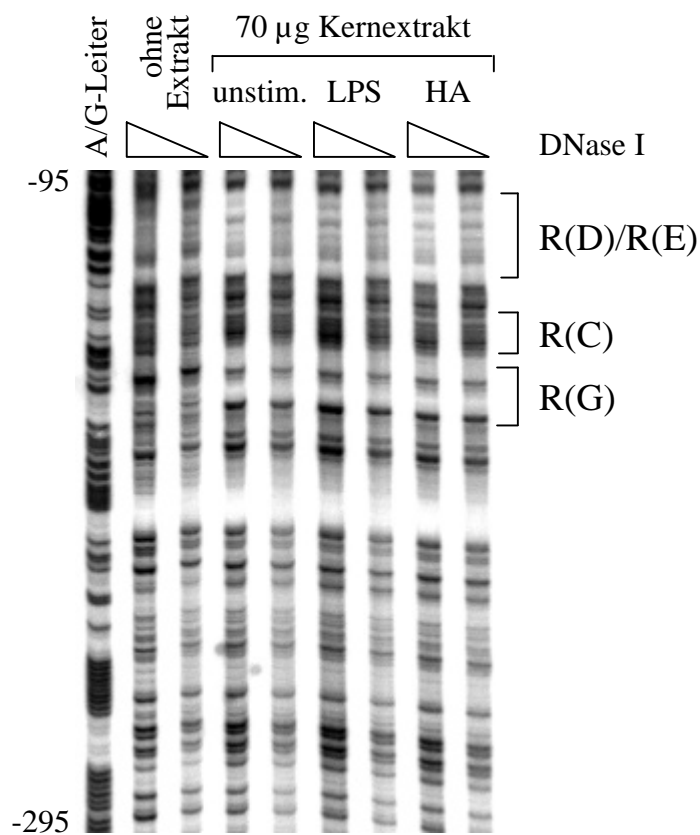
**Abbildung 17: Funktionelle Untersuchung des Bereiches zwischen -194 und +54 mit Deletionskonstrukten.** a) Schematische Darstellung der verwendeten Luciferase-Reporterkonstrukte. Die durch die Linien dargestellten Bereiche des RANTES-Promotors wurden in pGL3-Basic-Vektoren (Promega) kloniert. b) Die Konstrukte wurden zusammen mit einem Kontrollplasmid (pRL-TK) transient in MM6-Zellen transfiziert. Nach 16 h wurde ein Teil der Zellen für die Ermittlung der basalen Luciferase-Aktivitäten geerntet. Jeweils die Hälfte der verbliebenen Zellen wurde mit 1 µg/ml LPS stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach weiteren 9 h wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Enzymaktivitäten der *Photinus*- und der *Renilla*-Luciferase im Gesamtzellextrakt wurden bestimmt. Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde insgesamt sechsmal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Es ist zu sehen, daß die zunehmende Verkürzung der RANTES-Promotor-Sequenz in einer kontinuierlichen Abnahme sowohl der konstitutiven als auch der LPS-induzierten Reporteraktivität resultiert.

Zwischen der CAAT- und der TATA-Box des RANTES-Promotors zeigt sich auf dem *sense*-Strang ein starker LPS-induzierbarer *footprint* (Abbildung 18). Er besteht aus zwei Anteilen (-73/-61 und -57/-34) und stimmt mit den beiden  $\kappa$ B-ähnlichen Regionen R(A) und R(B) überein, die in T-Zellen funktionell sind [Nelson *et al.*, 1996]. In Monocyten erstreckt sich der R(B)-*footprint* vom R(B)- $\kappa$ B-Element noch weiter in 3'-Richtung. Diese Region (-43/-34) wurde als R(I) bezeichnet und stellt möglicherweise ein weiteres regulatorisches Element dar, das in aktivierten Monocyten eine Rolle spielt (vgl. 6.3).



**Abbildung 18: DNase I footprinting-Analyse des *sense*-Stranges des RANTES-Promotors.** Die Sonde enthielt die Promotorsequenz von -434 bis +54 und war am 3'-Ende des *sense*-Stranges markiert. Sie wurde mit 70 µg Kernextrakten aus unstimulierten, LPS-stimulierten (1 µg/ml) oder TNF- $\alpha$ -stimulierten (10 ng/ml) THP-1-Zellen inkubiert und anschließend mit 100 ng oder 50 ng DNase I verdaut. Die Kontrollansätze enthielten keine Kernproteine und wurden nur mit 10 ng oder 5 ng DNase I behandelt. Die Spaltprodukte wurden auf einem 6 %igen Sequenziergel mit 1 x TBE-Laufpuffer für 3 h aufgetrennt. Die Zuordnung der *footprints* erfolgte durch die gleichzeitige Auftrennung einer A/G-Leiter. Man erkennt einen *footprint* im Bereich R(AB), der durch LPS – nicht aber durch TNF- $\alpha$  – induzierbar ist. Die *footprints* an R(G), R(C) und R(DE) werden durch die beiden Stimuli nicht beeinflusst.

Auch zwischen -199 und -104 fanden sich vor einem Verdau geschützte Regionen (Abbildung 18). Der *footprint* im Bereich von -137 bis -104 enthält zwei Regionen, die als R(D) und R(E) bezeichnet werden. Die geschützte Region zwischen -184 und -172 überlappt mit einem R(C) genannten Kontrollelement. R(D) spielt eine Rolle bei der IRF-3-vermittelten Aktivierung der RANTES-Transkription nach Infektion mit Paramyxoviren [Lin *et al.*, 1999]. Sowohl R(E) als auch R(C) sind an der RANTES-Regulation in T-Zellen beteiligt [Ortiz *et al.*, 1996]. Der *footprint*, der sich von -199 bis -187 erstreckt, stellt einen Teil des schon erwähnten Promotor-Moduls R(G) dar [Boehlk *et al.*, 2000]. R(G) ist die einzige Region, in der in Anwesenheit von Monocyten-Kernproteinen auch auf dem *antisense*-Strang Basen geschützt sind (-211/-200) (Abbildung 19).



**Abbildung 19: DNase I footprinting-Analyse des *antisense*-Stranges des RANTES-Promotors.** Die Sonde enthielt die Promotorsequenz von -434 bis -12 und war am 3'-Ende des *antisense*-Stranges markiert. Sie wurde mit 70 µg Kernextrakten aus unstimulierten, LPS-stimulierten (1 µg/ml) oder Hyaluronsäure-stimulierten (HA, 100 µg/ml) THP-1-Zellen inkubiert und anschließend mit 120 ng oder 60 ng DNase I verdaut. Die Kontrollansätze enthielten keine Kernproteine und wurden nur mit 15 ng oder 7,5 ng DNase I behandelt. Die Spaltprodukte wurden auf einem 6 %igen Sequenziergel mit 1 x TBE-Laufpuffer für 3 h aufgetrennt. Die Zuordnung der *footprints* erfolgte durch die gleichzeitige Auftrennung einer A/G-Leiter.

Das für THP-1-Zellen gefundene *footprinting*-Muster stimmt mit den MM6-Ergebnissen überein [Boehlk *et al.*, 2000; Fessele *et al.*, 2001]. R(AB) ist in beiden Zelltypen die einzige Region die einen durch LPS induzierbaren *footprint* zeigt. Die an R(AB) bindenden Faktoren können nicht durch TNF- $\alpha$  induziert werden (Abbildung 18). Kernextrakte von Zellen, die mit Hyaluronsäure stimuliert wurden, liefern bei der Analyse des *antisense*-Stranges das gleiche Ergebnis wie Kernextrakte von unstimulierten oder LPS-stimulierten Zellen (Abbildung 19).

### 6.3 *Single nucleotide polymorphism* (SNP) im RANTES-Promotor

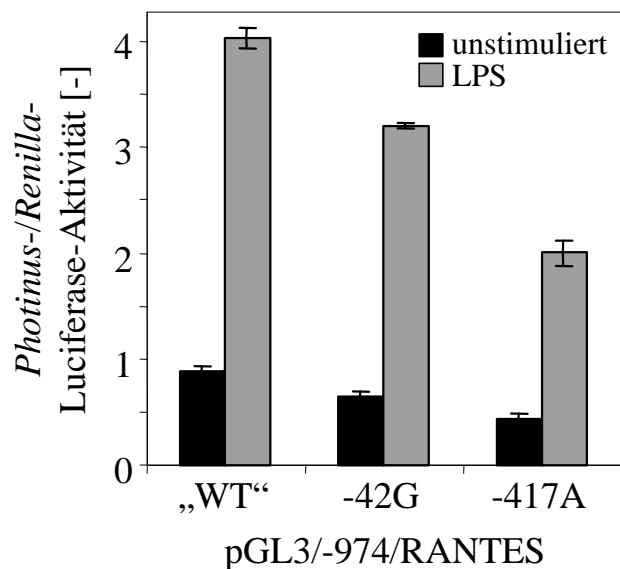
Unabhängig von den in den Abschnitten 6.2.1 und 6.2.2 identifizierten potentiellen Kontrollregionen wurden zwei SNP-Positionen des RANTES-Promotors auf ihre funktionelle Bedeutung in MM6-Zellen untersucht. SNPs bezeichnen Positionen im Genom, an denen alternativ zwei verschiedene Basen mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population auftauchen. Sie unterscheiden sich von Punktmutationen durch diese Häufigkeit und dadurch, daß sie stabil sind und sich über mehrere Generationen kaum ändern [Kwok and Gu, 1999]. Beim Menschen beträgt die Sequenzähnlichkeit zwischen unterschiedlichen Individuen etwa 99,7 %. Die wenigen variablen Positionen (0,3 %) - größtenteils SNPs - sind für das große Spektrum von phänotypischen Ausprägungen verantwortlich [Bentley, 2000]. Die meisten SNPs sind keinem offensichtlichen Phänotyp zuzuordnen, einige jedoch haben biologische Relevanz gezeigt (vgl. 7.2). Die am besten charakterisierten funktionellen SNPs liegen in codierenden Bereichen und führen zu veränderten Proteinprodukten. Andere SNPs, zum Beispiel solche, die in Promotorregionen liegen, können die Genregulation beeinflussen.

In einer 1999 veröffentlichten Studie mit 90 Testpersonen wurde für die Position -42 des RANTES-Promotors eine Allelhäufigkeit von 0,956 für Cytosin und von 0,044 für Guanin gefunden [al Sharif *et al.*, 1999]. Für die Position -417 wurde eine Allelhäufigkeit von 0,839 für Guanin und von 0,161 für Adenin gefunden. Dabei gab es keinen Hinweis auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen diesen beiden SNPs [Hajeer *et al.*, 1999]. In der Studie wurden die Basen anders numeriert, als es hier für sinnvoll gehalten wurde (vgl. Abbildung 7). Die in dieser Arbeit verwendete RANTES-Promotorsequenz enthält an den SNP-Positionen jeweils die häufiger vorkommende Base (-42C, -417G). Diese Kombination wird hier als „WT“ bezeichnet. Die „Mutationen“, die durch positionsgerichtete Mutagenese



in das Konstrukt pGL3/-974RANTES eingeführt wurden, werden als -42G und -417A bezeichnet. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der transienten Transfektion dieser Konstrukte in MM6-Zellen. Das Konstrukt pGL3/-974/RANTES/-42G zeigte in unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen eine gegenüber dem „WT“-Konstrukt leicht reduzierte Reporteraktivität. Die G-A-Transition an Position -417 führte zu einer 35-45 %igen Reduktion der unstimulierten und LPS-stimulierten Reporteraktivitäten.

Position -42 liegt im Bereich des erweiterten R(B)-*footprints* in der als R(I) bezeichneten Region (vgl. Abbildung 18). Mit Hilfe von MatInspector wurde in R(I) eine potentielle Bindungsstelle für c-Myb identifiziert [Nakagoshi *et al.*, 1990; Quandt *et al.*, 1995], in EMSA-Experimenten konnte jedoch keine Komplexbildung an R(I) nachgewiesen werden. Obwohl die Basen, die an Position -417 des RANTES-Promotors vorkommen, die Aktivität des RANTES-Promotors in MM6-Zellen beeinflussen, wurde diese Region vorerst nicht genauer untersucht. Die folgenden Experimente beschränken sich auf die Analyse potentieller Kontrollregionen in der „WT“-Sequenz des RANTES-Promotors.

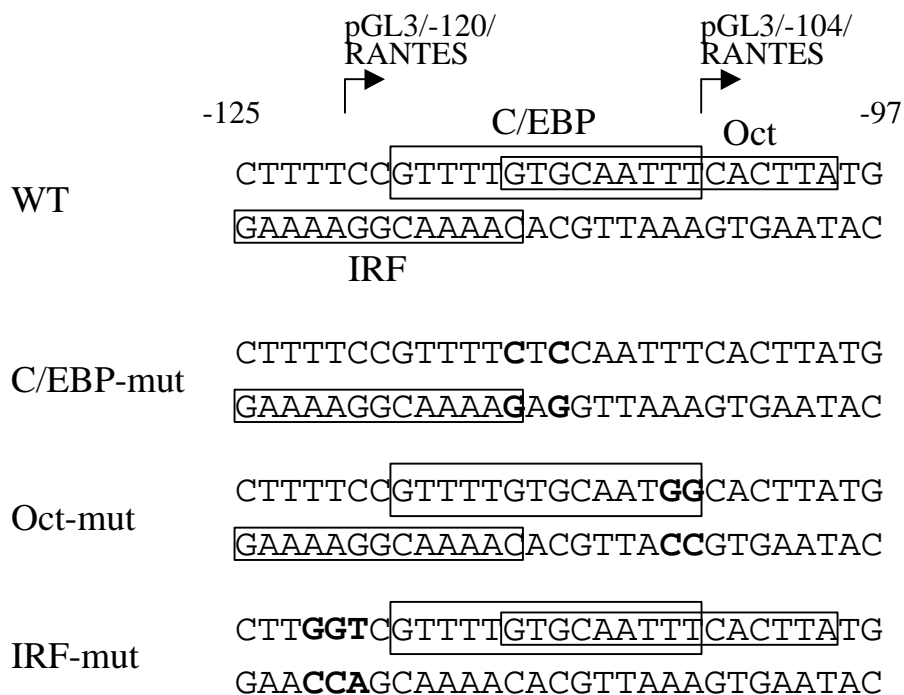


**Abbildung 20: Verschiedene natürlich vorkommende RANTES-Promotor-Sequenzen führen in MM6-Zellen zu unterschiedlich hohen Reporteraktivitäten.** Mittels positionsgerichteter Mutagenese wurden pGL3/-974/RANTES-Konstrukte hergestellt, die abweichend von der in dieser Arbeit als „WT“ bezeichneten Sequenz an Position -42 ein G bzw. an Position -417 ein A trugen. Die Konstrukte wurden zusammen mit einem Kontrollplasmid (pRL-TK) transient in MM6-Zellen transfiziert. Nach 16 h wurde ein Teil der Zellen für die Ermittlung der basalen Luciferase-Aktivitäten geerntet. Jeweils die Hälfte der verbliebenen Zellen wurde mit 1 µg/ml LPS stimuliert oder unstimuliert belassen. (vgl. 5.6.2) Nach weiteren 9 h wurden die Zellen geerntet, gewaschen und lysiert. Die Enzymaktivitäten der *Photinus*- und der *Renilla*-Luciferase im Gesamtzellextrakt wurden bestimmt. Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen (vgl. 5.6.3). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde viermal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

## 6.4 Charakterisierung des Promotorelements R(E)

### 6.4.1 Sequenzanalyse der Region R(E)

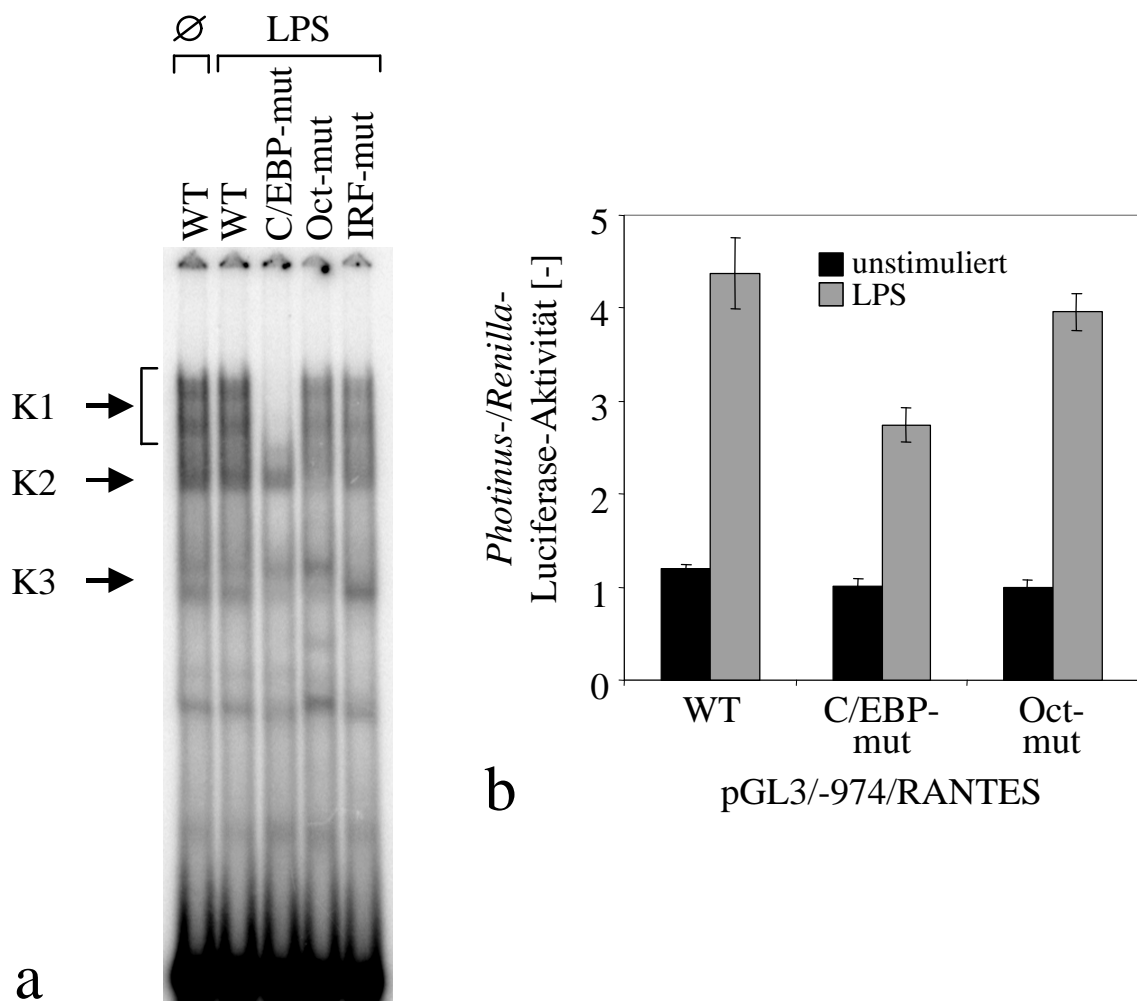
Es war bekannt, daß in T-Zellen die Bindung eines C/EBP-ähnlichen Faktors an eine R(E) genannte Region an der RANTES-Transkriptionsaktivierung beteiligt ist [Ortiz *et al.*, 1996]. Durch *DNase I footprinting*-Analysen wurde gefunden, daß an diesen Bereich auch Kernproteine aus MM6- und THP-1-Zellen binden (*footprint* -137/-104, Abbildung 18). Transiente Transfektionen mit Deletionskonstrukten (Abbildung 17) haben gezeigt, daß es unter anderem im Bereich zwischen -120 und -104 zu einem Abfall der Reporteraktivität kommt. Um die Suche nach Transkriptionsfaktoren, die in Monocyten an R(E) binden, einzugrenzen, wurde die Sequenz zunächst mit Hilfe von MatInspector nach potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen abgesucht [Quandt *et al.*, 1995]. Dabei wurden Consensus-Sequenzen für C/EBP- $\beta$ , Oct-6 und IRF-1 gefunden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Sequenz der R(E)-Oligonucleotide**, die als Sonden für EMSA-Experimente verwendet wurden. Die mit Hilfe von MatInspector identifizierten potentiellen Bindungsstellen für C/EBP, Oct und IRF sind eingerahmt. Die fett gedruckten Mutationen wurden durch positionsgerichtete Mutagenese in das RANTES-Promotor-„Vollänge“-Konstrukt pGL3/-974/RANTES eingeführt.

## 6.4.2 Funktionelle Analyse der Region R(E) mit Punktmutationen

Es wurden DNA-Oligomere synthetisiert, die Punktmutationen in den Consensus-Sequenzen für C/EBP, Oct oder IRF enthielten (Abbildung 21). Die Mutationen wurden mit Hilfe von MatInspector [Quandt *et al.*, 1995] so gewählt, daß keine neuen potentiellen Bindungsstellen erzeugt wurden. Die Inkubation von MM6-Kernextrakten mit dem Wildtyp-Oligomer führte zur Bildung dreier EMSA-Komplexe (K1-K3 in Abbildung 22a). Kernextrakte aus unstimulierten und LPS-stimulierten MM6-Zellen lieferten das gleiche Muster.



**Abbildung 22: Funktionelle Untersuchung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in R(E) durch EMSAs und transiente Transfektionen.** a) Die in Abbildung 21 gezeigten Oligomere wurden durch Kinasierung radioaktiv markiert und in EMSA-Experimenten mit Kernextrakten aus unstimulierten und LPS-stimulierten MM6-Zellen inkubiert. Es wurden die unter 5.10.5 beschriebenen Bedingungen gewählt. b) Die pGL3/-974/RANTES-Reportergenkonstrukte, die die in Abbildung 21 dargestellten Mutationen enthielten, wurden zusammen mit einem Kontrollplasmid (pRL-TK) transient in MM6-Zellen transfiziert (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde achtmal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Die Mutation der C/EBP-Consensus-Sequenz (C/EBP-mut) führte zum Verschwinden des EMSA-Komplexes 1 (Abbildung 22a). In einem Ansatz mit der mutierten Oct-Consensus-Sequenz (Oct-mut) war Komplex 2 schwächer ausgeprägt als im Wildtyp. Die Mutation der potentiellen IRF-Bindungsstelle führte zu keiner Veränderung der Komplexbildung.

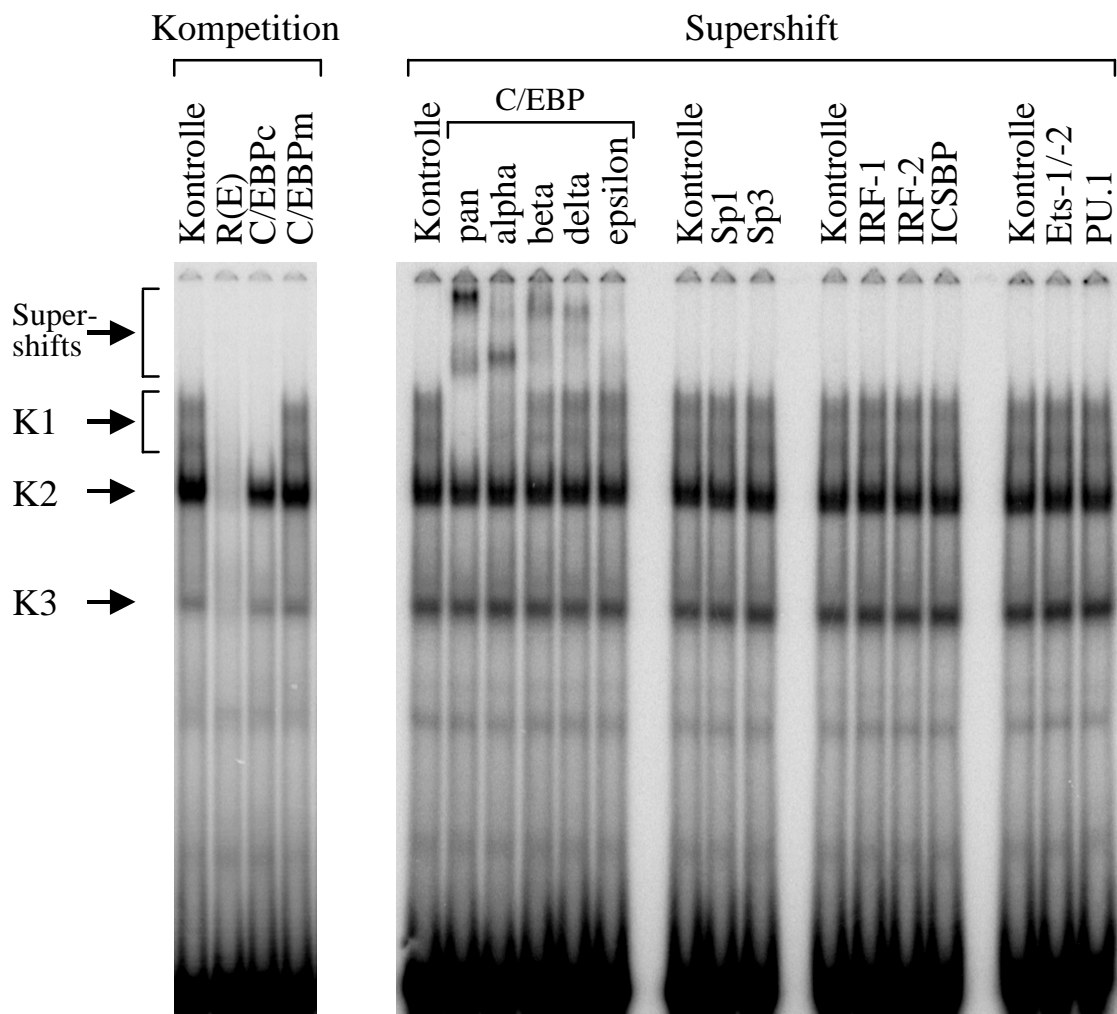
Um zu prüfen, ob die Komplexe 1 und 2 eine funktionelle Rolle spielen, wurden die C/EBP- und die Oct-Mutation durch positionsgerichtete Mutagenese in das Konstrukt pGL3/-974/RANTES eingeführt. Die Konstrukte wurden transient in MM6-Zellen transfiziert. Die Mutation der C/EBP-Bindungsstelle führte zu einer 40-50 %igen Reduktion der LPS-stimulierten RANTES-Promotor-Reporteraktivität und zu einer etwa 15 %igen Reduktion der konstitutiven Reporteraktivität. Die Mutation der Oct-Consensus-Sequenz führte sowohl in unstimulierten als auch in LPS-induzierten Zellen zu einer um circa 20 % reduzierten Reporteraktivität (Abbildung 22b). Bei Betrachtung der 8 durchgeführten Wiederholungen des Experiments wurden alle Effekte durch einen Studentischen t-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 als signifikant eingestuft. Da die transiente Transfektion von Reporterkonstrukten keine sehr genaue Methode darstellt, werden leichte Veränderungen jedoch meist nicht als relevant angesehen. Legt man ein Signifikanzniveau von 0,01 fest, dann können nur der durch die C/EBP-Mutation in stimulierten Zellen bedingte Effekt und die Verminderung der Reporteraktivität durch die Oct-Mutation in unstimulierten Zellen als statistisch signifikant betrachtet werden.

### 6.4.3 R(E) bindet in MM6-Zellen Mitglieder der C/EBP-Familie

Durch Konkurrenz mit einem Überschuß an unmarkiertem Wildtyp-Oligomer wurde gezeigt, daß es sich bei den Komplexen 1 bis 3 um spezifische EMSA-Komplexe handelt. Komplex 1 setzt sich aus mehreren etwas unscharfen Banden zusammen, die mit einem Überschuß an unmarkierten C/EBP-Consensus-Oligonucleotiden kompetiert werden können (Abbildung 23). Es wurden verschiedene Consensus-Oligonucleotid-Kompetitoren getestet. Dabei konnten Komplex 2 mit Sp1-Consensus-Oligonucleotiden und Komplex 3 mit IRF-1-Consensus-Oligonucleotiden jeweils teilweise kompetiert werden. Consensus-Oligonucleotide für Oct-1, c-Myb, GAS/ISRE, Ets, GATA, AP-1, CREB und NF- $\kappa$ B hatten keinen Einfluß auf die Komplexbildung an R(E) (nicht gezeigt).

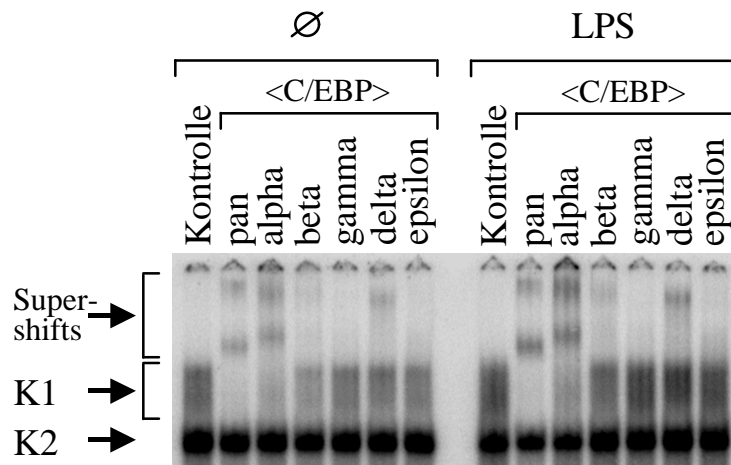
Um die an R(E) bindenden Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, wurden EMSA-Supershift-Experimente durchgeführt (Abbildung 23). Ein Antikörper, der alle Mitglieder der

C/EBP-Familie binden kann, führte zu einem vollständigen Supershift des Komplexes 1. Antikörper, die für C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  und - $\epsilon$  spezifisch sind, beeinflussten verschiedene Bereiche des breiten Komplexes. Der C/EBP- $\alpha$ -Supershift war am stärksten, während der C/EBP- $\epsilon$ -spezifische Antikörper einen reproduzierbaren, aber sehr schwachen Supershift hervorrief. Die Anwesenheit von vier Mitgliedern der C/EBP-Familie, die Homo- und Heterodimere bilden können, kann erklären, warum Komplex 1 so ausgedehnt erscheint. Antikörper, die für Mitglieder der Sp1-, IRF- und Ets-Familien spezifisch sind, hatten keinen Einfluß auf das EMSA-Muster.



**Abbildung 23: Charakterisierung der an R(E) bindenden Transkriptionsfaktoren durch EMSA-Kompetition und -Supershift.** Das in Abbildung 21 gezeigte R(E)-Wildtyp-Oligomer wurde durch Kinasierung radioaktiv markiert und mit Kernextrakten LPS-stimulierter MM6-Zellen inkubiert. Es wurden die unter 5.10.5 beschriebenen Inkubationsbedingungen gewählt. Für Kompetition-Ansätze wurden 40 ng unmarkiertes Kompetition-Oligonucleotid eingesetzt, für Supershift-Ansätze wurden 1,5-3  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers eingesetzt. Verschiedene Mitglieder der C/EBP-Familie binden in unterschiedlichem Ausmaß an das R(E)-Oligomer und bilden dadurch den diffus erscheinenden Komplex 1. Mitglieder der Sp1-, IRF- und Ets-Familien scheinen nicht an R(E) zu binden. ICSBP: *interferon consensus sequence-binding protein*.

Wie oben angesprochen, wird das EMSA-Muster durch LPS-Stimulation der MM6-Zellen nicht verändert (Abbildung 22). Abbildung 24 zeigt, daß auch das C/EBP-Supershift-Profil durch LPS-Stimulation nicht verändert wird.

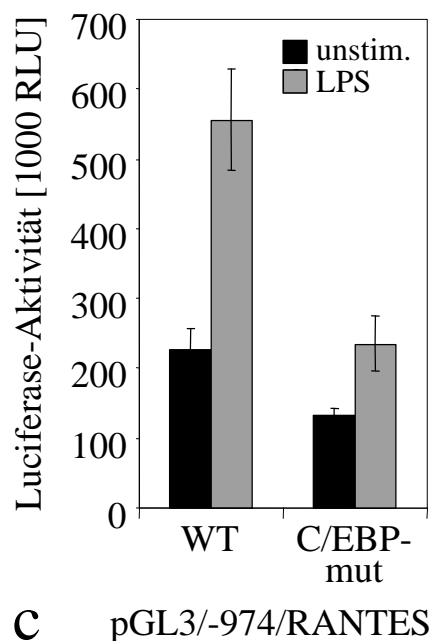
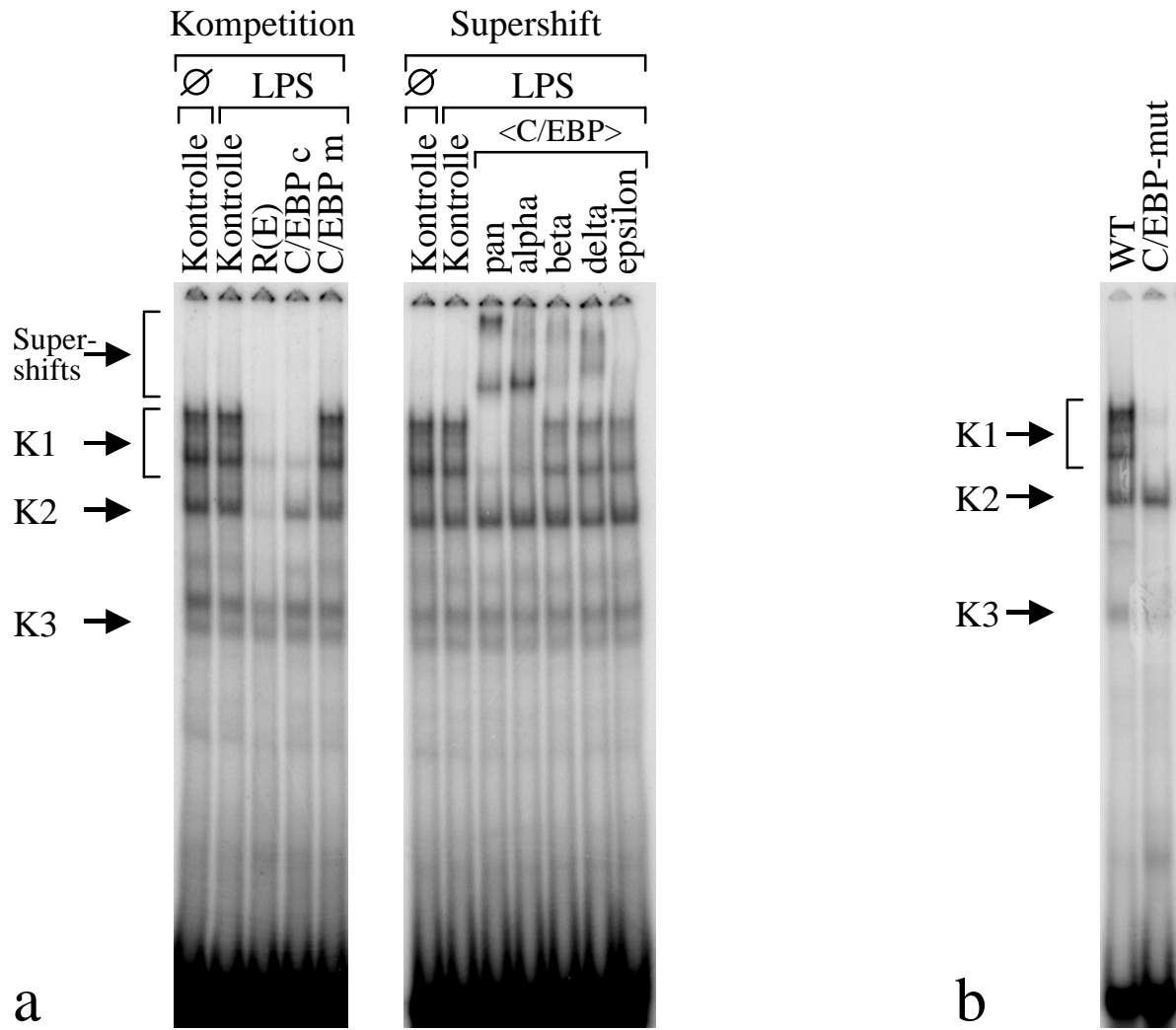


**Abbildung 24: C/EBP-Supershift-Profile unstimulierter und LPS-stimulierter MM6-Zellen.** Ein R(E)-Oligomer, das nur die Sequenz von -119 bis -102 enthielt, wurde durch Kinasierung radioaktiv markiert und mit Kernextrakten unstimulierter und LPS-stimulierter MM6-Zellen inkubiert. Es wurden die unter 5.10.5 beschriebenen Inkubationsbedingungen gewählt. Es wurden 1-2 µg des jeweiligen Antikörpers eingesetzt. Man sieht, daß sich die Supershift-Profile des C/EBP-Komplexes (Komplex 1) von Kernproteinen aus unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen nicht unterscheiden.

#### 6.4.4 R(E) in anderen Monocyten-Zellen

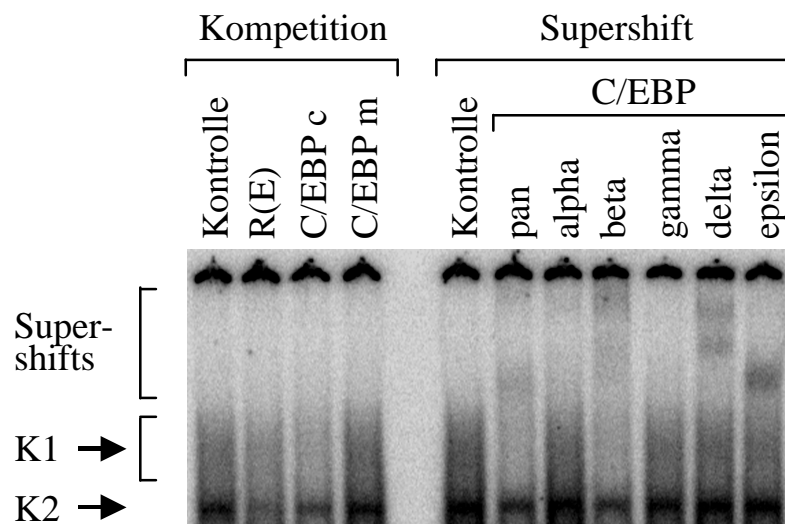
Um wiederum zu prüfen, ob die Schlußfolgerungen, die aus der Untersuchung der MM6-Zellen gezogen wurden, nicht nur speziell für diesen Zelltyp, sondern allgemein für Monocyten gültig sind, wurde die Rolle der C/EBP-Bindung an R(E) auch für THP-1-Zellen analysiert.

Durch EMSA-Kompetitions- und -Supershift-Experimente wurde gezeigt, daß in THP-1-Zellen C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  und - $\epsilon$  mit ähnlichen Anteilen wie in MM6-Zellen an R(E) binden (Abbildung 25a). Die Mutation der C/EBP-Consensus-Sequenz im R(E)-Oligomer führt auch bei Inkubation mit THP-1-Kernextrakten zum Verlust von Komplex 1 (Abbildung 25b). Schließlich führt dieser Verlust der C/EBP-Bindung auch in transienten Transfektionen von THP-1-Zellen zu einer verminderten Reporteraktivität (Abbildung 25c).



**Abbildung 25: Die Bindung von C/EBP-Proteinen an R(E) ist für die volle Aktivität des RANTES-Promotors in THP-1-Zellen wichtig.** a) EMSA-Kompetition und -Supershift mit der in Abbildung 21 gezeigten R(E)-Wildtyp-Sonde und Kernextrakten aus unstimulierten und LPS-stimulierten THP-1-Zellen. Es wurden die in Abbildung 23 beschriebenen Bedingungen gewählt. b) Die in Abbildung 21 gezeigten WT- und C/EBP-mut-Sonden wurden mit Kernextrakten aus LPS-stimulierten THP-1-Zellen inkubiert. c) Das pGL3/-974/RANTES-Konstrukt, das die C/EBP-Mutation enthielt, und das WT-Konstrukt wurden transient in THP-1-Zellen transfiziert (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Da in diesem Experiment kein Kontrollplasmid cotransfiziert wurde, sind die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten in RLE angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Es wurde auch versucht, EMSA-Kompetitions- und Supershift-Experimente mit Kernextrakten aus primären Monocyten durchzuführen. Auf Grund der Schwierigkeit, primäre Monocyten in großer Zahl zu isolieren, konnten nur Kernextrakte mit sehr geringer Proteinkonzentration gewonnen werden. Dementsprechend mußte ein großes Volumen Kernextrakt eingesetzt werden, was zur Folge hatte, daß die Salzkonzentration im Ansatz nicht mehr gering gehalten werden konnte. Dies wiederum hatte - neben einer Veränderung der Inkubationsbedingungen - ein ungewöhnliches Verhalten der Ansätze bei der Auftrennung auf dem Gel zur Folge. In Abbildung 26 ist jedoch trotzdem zu erkennen, daß auch in primären Monocyten C/EBP-Proteine an R(E) binden. Hier ist der C/EBP- $\alpha$ -Supershift jedoch schwächer als in den beiden Tumorzelllinien, während der C/EBP- $\epsilon$ -Supershift stärker ist.



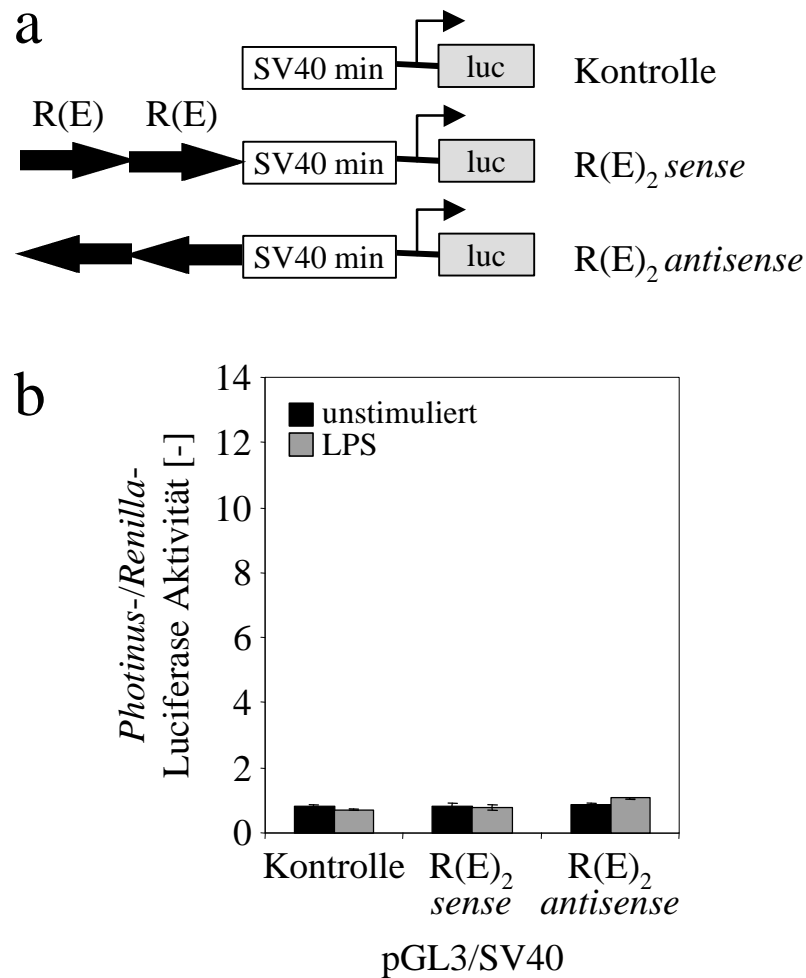
**Abbildung 26: Charakterisierung der C/EBP-Bindung in primären Monocyten mittels EMSA-Kompetition und -Supershift.** Ein R(E)-Oligomer, das nur die Sequenz von -119 bis -102 enthielt, wurde durch Kinasierung radioaktiv markiert und mit Kernextrakten LPS-stimulierter primärer Monocyten inkubiert. Es wurden die unter 5.10.5 beschriebenen Inkubationsbedingungen gewählt. Die Proteinmenge in den Ansätzen war jedoch 10  $\mu$ g statt 5  $\mu$ g. Für Kompetition-Ansätze wurden 20 ng unmarkiertes Kompetitor-Oligonukleotid eingesetzt, für Supershift-Ansätze wurden 1-2  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers eingesetzt. Es ist zu erkennen, daß in LPS-stimulierten primären Monocyten C/EBP-Proteine an R(E) binden. Die Anteile der unterschiedlichen Familienmitglieder unterscheiden sich von denen, die für die Tumorzelllinien MM6 und THP-1-gefunden wurden.

#### 6.4.5 R(E) in einem heterologen Promotor

Es wurde gezeigt, daß die Bindung von C/EBP-Proteinen an R(E) für die volle LPS-Induktion der RANTES-Promotor-Reporteraktivität in MM6- und THP-1-Zellen wichtig ist. Jedoch konnten Dimere der Region R(E) (-125/-96), die in einen heterologen Promotor kloniert



worden waren, weder die Stimulierbarkeit durch LPS übertragen, noch die Expression des Reportergens verstärken (Abbildung 27). Diese Tatsache und die Beobachtung, daß die Komplexbildung an R(E) durch LPS-Stimulation nicht verändert wird, läßt vermuten, daß die C/EBP-Proteine, die R(E) konstitutiv binden, mit anderen, durch LPS induzierbaren Faktoren interagieren, um die LPS-induzierte Aktivität des RANTES-Promotors zu beeinflussen.



**Abbildung 27: R(E) ist in einem heterologen Promotor nicht aktiv.** a) Schematische Darstellung der pGL3/SV40/R(E)<sub>2</sub>-Konstrukte. Die Sequenz von -125 bis -96 (dargestellt durch einen Pfeil) wurde als Dimer vor den SV40-Minimalpromotor des Vektors pGL3-Promoter (Promega) kloniert (5.4.4). b) Die in (a) dargestellten Reportergenkonstrukte wurden in transienten Transfektionen in MM6-Zellen getestet (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Das Ausgangskonstrukt (pGL3-Promoter) diente als Kontrolle. Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde fünfmal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Die Skalierung der Ordinate wurde gleich gewählt wie in Abbildung 30, in der die Aktivität einer Region dargestellt ist, die in einem heterologen Promotor funktionell ist.

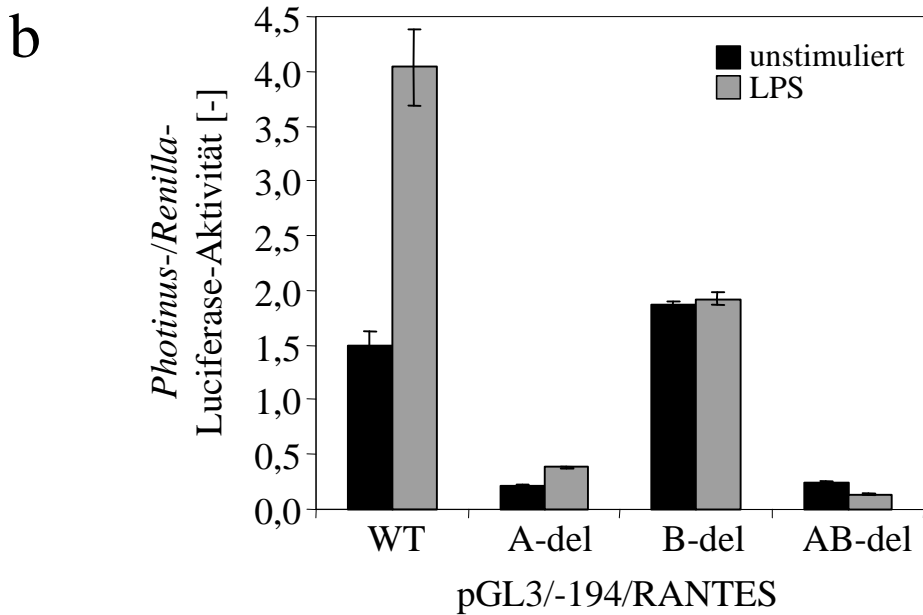
## 6.5 Untersuchung der Promotorregion R(AB)

### 6.5.1 Funktionelle Untersuchung von R(AB) in transienten Transfektionen

Im Folgenden wurde die Region, die in der *DNase I footprinting*-Analyse einen induzierbaren *footprint* gezeigt hatte (6.2.2), charakterisiert. Zunächst wurde die Rolle der beiden in T-Zellen und Astrocyten funktionellen NF- $\kappa$ B-Elemente R(A) und R(B) [Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1996] im Kontext des RANTES-Promotors für MM6-Zellen bestimmt. Hierfür wurden pGL3/-194/RANTES-Reporterkonstrukte verwendet, in denen R(A), R(B) oder die gesamte Region R(AB) deletiert waren [Nelson *et al.*, 1996]. In diesen Konstrukten ist die Region R(G) (-211/-187), die für einen Teil der LPS-induzierten Aktivierung des RANTES-Promotors verantwortlich ist, nicht enthalten.

Durch transiente Transfektion dieser Konstrukte wurde deutlich, daß R(A) sowohl für die konstitutive als auch für die LPS-induzierte Aktivität des RANTES-Promotors unverzichtbar ist. Im Gegensatz dazu hatte die Deletion der Region R(B) keinen Einfluß auf die konstitutive Promotor-Reporteraktivität, führte aber zu einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit durch LPS (Abbildung 28).

a	R(A)	R(B)
WT	GCT <b>A</b> TTTTGGAA <b>A</b> CTCC <b>C</b> TTAGGGGATG <b>C</b> CCCTCAACTG CGATAAAACCTTTGAGGGGAATCCCCTACGGGGAGTTGAC	
A-del	GCTgcgggccgctctagaactaAGGGGATGCCCCCTCAACTG CGAcgcccggcgagatcttgatTCCCCTACGGGGAGTTGAC	
B-del	GCTA <b>A</b> TTTTGGAA <b>A</b> CTCC <b>C</b> TTgcgggccgctctagaactaG CGATAAAACCTTTGAGGGGA <b>A</b> cgcccggcgagatcttgatC	
AB-del	GCTAgcgggccgcccggcgggtggcggccgggctctagaactagG CGATcgcccggcggcggccaccgcccggccgagatcttgatcC	



**Abbildung 28: R(A) ist für die generelle Aktivität des RANTES-Promotors erforderlich, während R(B) speziell für die Aktivität in LPS-induzierten MM6-Zellen benötigt wird.** a) Darstellung der Region R(AB) in den pGL3/-194/RANTES-Deletionskonstrukten. Die substituierten Basen sind in Kleinbuchstaben gedruckt. Fett gedruckte Basen in der WT-Sequenz entsprechen dem *footprint* an R(A) und R(B). b) Die in (a) beschriebenen Konstrukte wurden zusammen mit einem Kontrollplasmid (pRL-TK) transient in MM6-Zellen transfiziert (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde viermal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

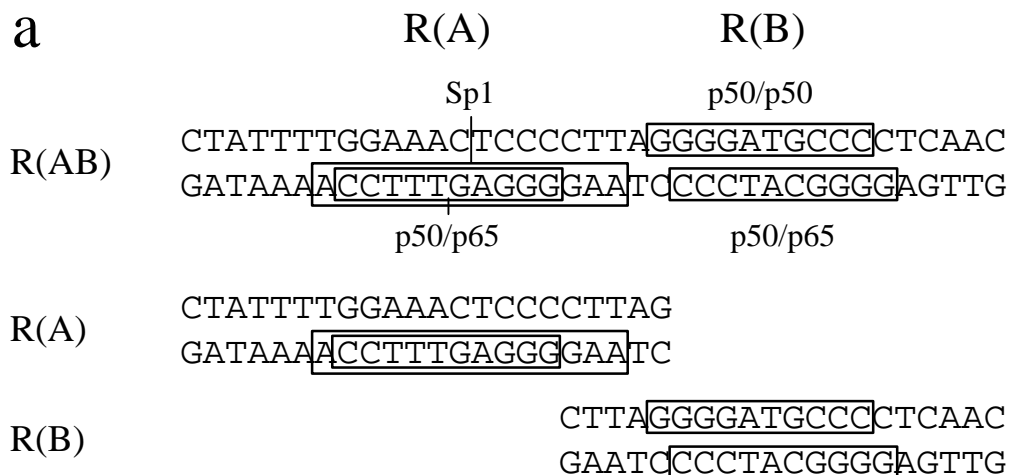
### 6.5.2 R(A) bindet Sp1 und NF- $\kappa$ B, während R(B) bevorzugt p50/p50 bindet

Für eine Reihe von NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen wurde in jüngerer Zeit gefunden, daß sie auch den Transkriptionsfaktor Sp1 binden können [Hirano *et al.*, 1998]. Durch EMSA-Kompetitions-Experimente wurde gezeigt, daß R(AB) in MM6-Zellen konstitutiv Sp1 bindet. In Ansätzen mit LPS-stimulierten Extrakten waren zwei weitere Komplexe vorhanden, die mit der NF- $\kappa$ B-Consensus-Sequenz des Ig- $\kappa$ -Promotors spezifisch kompetierbar waren. Der kleinere der beiden Komplexe war in schwacher Ausprägung auch in Ansätzen mit Kernextrakten unstimulierter MM6-Zellen vorhanden (S. Böhlk, persönliche Mitteilung).

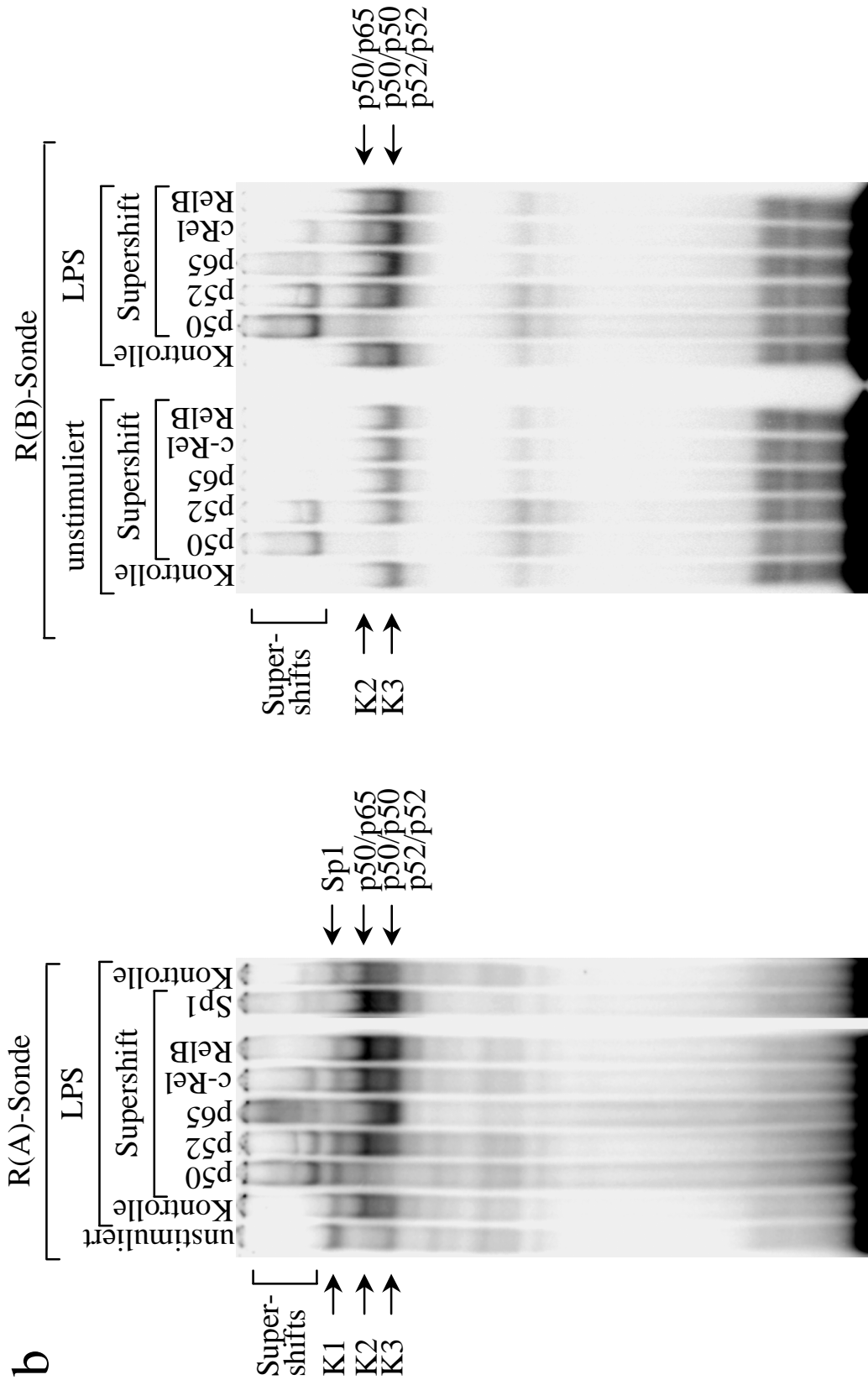
Abbildung 29 zeigt EMSA-Supershift-Experimente mit getrennten Sonden für R(A) und R(B). Bei Inkubation mit Kernextrakten aus unstimulierten MM6-Zellen band die R(A)-Sonde Sp1 (Komplex 1) und die Rel-Proteine p50 und p52 (Komplex 3). Die Spezifitäten des

verwendeten anti-p50-Antikörpers und des anti-p52-Antiserums wurden mit rekombinant hergestellten p50- und p52-Proteinen (Promega) getestet. Dabei zeigte sich, daß der anti-p50-Antikörper auch schwach an p52 bindet (nicht gezeigt). Dieser Befund könnte erklären, daß der anti-p50-Antikörper zu einem vollständigen Supershift von Komplex 3 führt. Die schwache Komplex-3-Bande, die in Ansätzen mit Kernextrakten unstimulierter Zellen zu sehen ist, besteht aus p50/p50- und p52/p52-Homodimeren und vielleicht p50/p52-Heterodimeren. LPS-Stimulation induziert die Bindung von p50/p65 (NF- $\kappa$ B) an R(A). Die Abschwächung der Sp1-Bindung durch LPS-Stimulation, die in Abbildung 29b zu sehen ist, war nicht reproduzierbar.

Die R(B)-Sonde zeigte in Ansätzen mit unstimulierten Extrakten eine bevorzugte Bindung von p50/p50- und p52/p52-Homodimeren und vielleicht von p50/p52-Heterodimeren (Komplex 3). LPS-Induktion führte zu einer verstärkten Bindung von p50 an die R(B)-Sonde. Es wurde auch eine schwache Bindung von p65 und c-Rel beobachtet (Abbildung 29b).

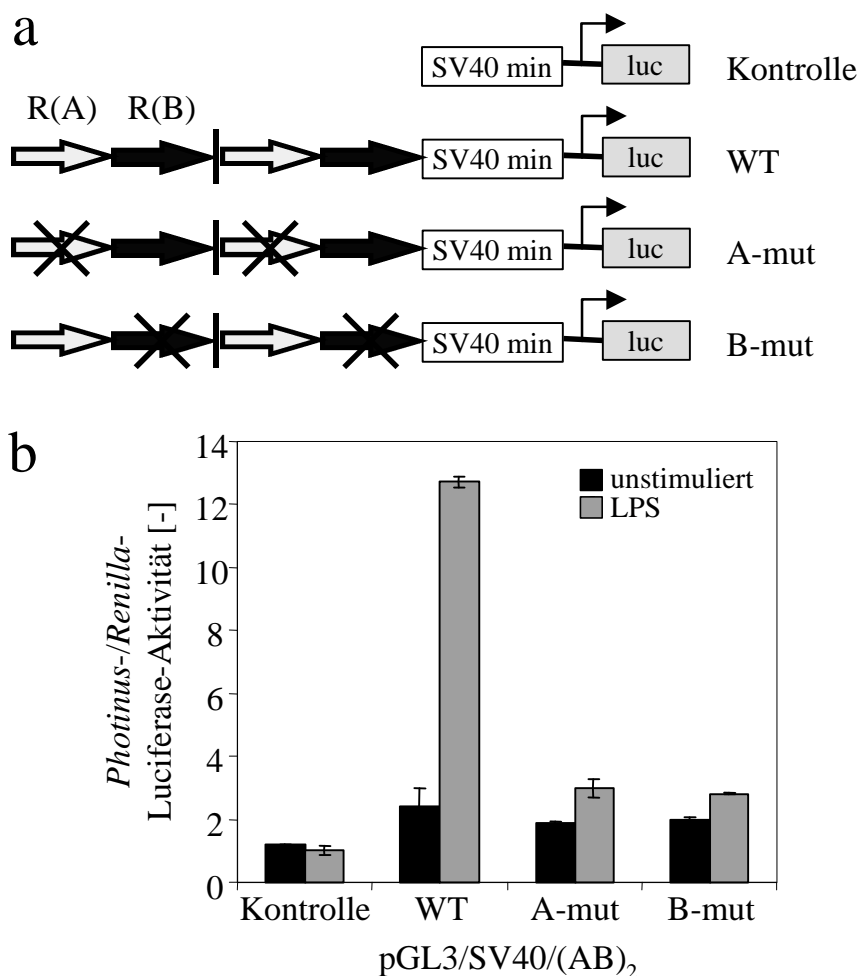


**Abbildung 29: R(A) bindet Sp1 und, nach LPS-Stimulation, p50/p65. R(B) bindet nach LPS-Stimulation vor allem Komplexe aus p50 und p52.** a) Darstellung der Sonden, die durch Kinasierung radioaktiv markiert wurden. b) Für EMSA-Supershift-Experimente wurden sie mit Extrakten unstimulierter und LPS-stimulierter MM6-Zellen wie unter 5.10.5 beschrieben inkubiert. Es wurden 2-4  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers oder 2  $\mu$ l Antiserum eingesetzt. (Teilabbildung (b) folgt auf der nächsten Seite.)



### 6.5.3 Region R(AB) in einem heterologen Promotor

Da bekannt war, daß für die Induzierbarkeit des RANTES-Promotors durch LPS sowohl R(A) als auch R(B) erforderlich sind (6.5.1), und da diese beiden Elemente unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden, stellte sich die Frage, ob die Anordnung aus R(A) und R(B) eine funktionelle Einheit darstellt, die auch außerhalb des Kontexts des RANTES-Promotors in gleicher Weise verwendet werden kann. Deshalb wurden heterologe Promotor-Reporterkonstrukte hergestellt, indem Dimere der Region R(AB) vor den SV40-Minimalpromotor kloniert wurden. Es wurde entweder die R(AB)-Wildtyp-Sequenz oder eine R(AB)-Sequenz, in der entweder R(A) oder R(B) mutiert waren, verwendet (Abbildung 30a).



**Abbildung 30: Die Region R(AB) kann die Induzierbarkeit durch LPS auf einen heterologen Promotor übertragen. Dafür sind beide Elemente erforderlich.** a) Schematische Darstellung der pGL3/SV40/R(AB)<sub>2</sub>-Konstrukte. Die Sequenz von -74 bis -40 (dargestellt durch einen Pfeil) wurde als Dimer vor den SV40-Minimalpromotor des Vektors pGL3-Promoter (Promega) kloniert (5.4.4). b) Die in (a) dargestellten Reportergenkonstrukte wurden in transienten Transfektionen in MM6-Zellen getestet (vg. 5.6.2 und 5.6.3). Das Ausgangskonstrukt (pGL3-Promoter) diente als Kontrolle. Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde viermal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

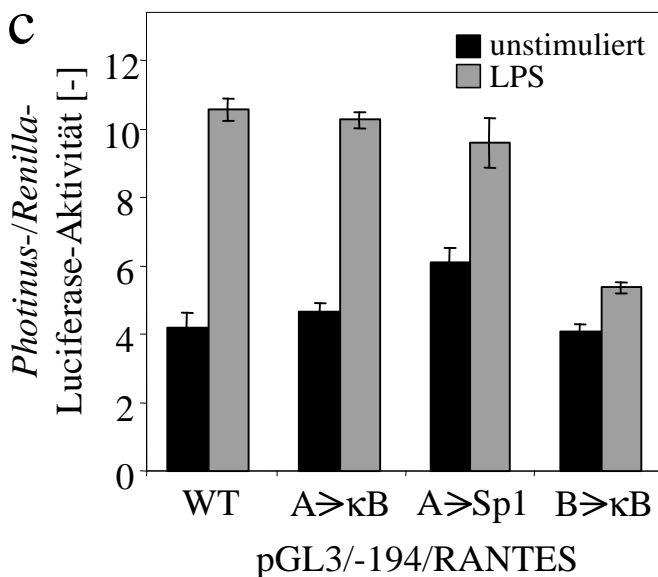
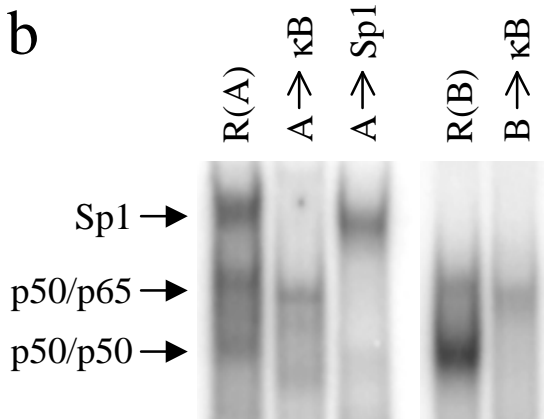
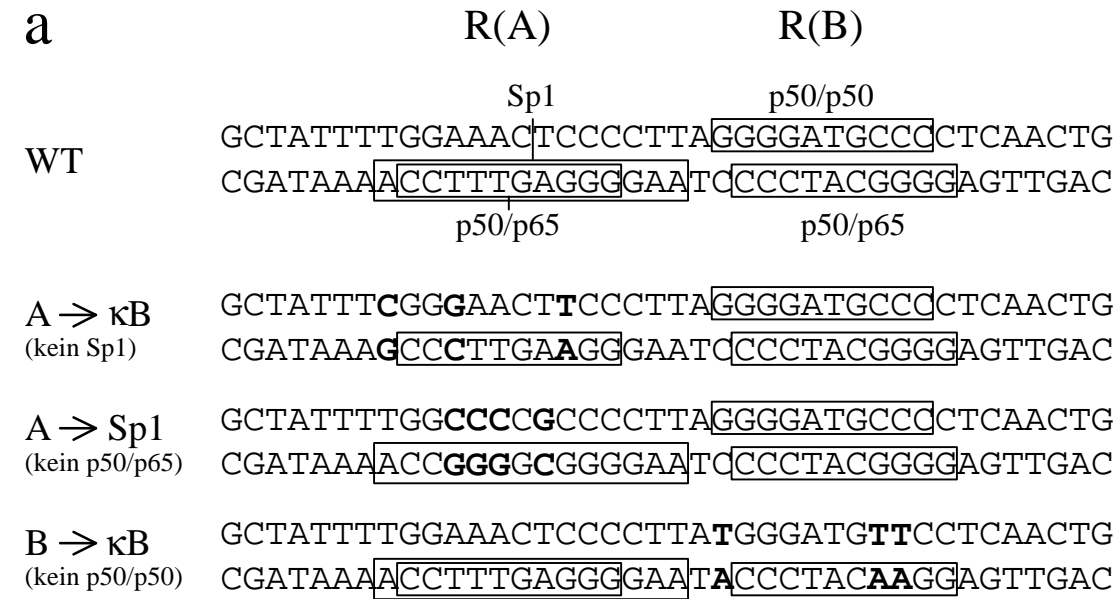
Durch transiente Transfektion dieser Konstrukte in MM6-Zellen wurde gezeigt, daß die R(AB)-Region die Induzierbarkeit durch LPS effizient auf einen heterologen Promotor übertragen kann (Abbildung 30b). Die selektive Mutation von R(A) oder R(B) im Kontext des Dimers führte zu einem dramatischen Verlust der Induzierbarkeit durch LPS. Da beide Elemente benötigt werden, um die Induzierbarkeit durch LPS auf einen anderen Promotor zu übertragen, erfüllt R(AB) die Voraussetzungen für ein Promotor-Modul [Kel *et al.*, 1995].

#### 6.5.4 Funktionelle Bedeutung von p50/p65, Sp1 und p50/p50 für die Stimulation durch LPS

Es sollten die Bedeutung von Sp1 und p50/p65 für die über die Region R(A) vermittelte Regulation des RANTES-Gens und die Rolle der Bindung von Rel-Proteinen an R(B) untersucht werden. Dazu wurden mit Hilfe von MatInspector [Quandt *et al.*, 1995] Mutationen der R(A)-Sequenz gewählt, die entweder p50/p65 (A→ $\kappa$ B) oder Sp1 (A→Sp1), nicht aber beide Faktoren binden können. In gleicher Weise wurde eine veränderte R(B)-Sequenz identifiziert, die bevorzugt p50/p65-Heterodimere binden sollte (Abbildung 31a). Durch EMSA-Experimente wurde gezeigt, daß die Mutationen die gewünschten Auswirkungen auf die Komplexbildung an R(A) und R(B) hatten (Abbildung 31b).

Die Mutationen wurden dann durch positionsgerichtete Mutagenese in das Konstrukt pGL3/-194/RANTES eingeführt und die Plasmide wurden transient in MM6-Zellen transfiziert (Abbildung 31c). Der Wildtyp und die A→ $\kappa$ B-Mutation zeigten im wesentlichen gleiche konstitutive und LPS-stimulierte Reporteraktivität. Die Änderung von R(A) zu einer Sequenz, die nur Sp1 und nicht NF- $\kappa$ B binden kann (A→Sp1) führte zu einem mäßigen Anstieg der konstitutiven Aktivität und einer leichten Abnahme der Induzierbarkeit durch LPS. Dies legt den Schluß nahe, daß sowohl Sp1 als auch p50/p65 durch Bindung an R(A) die RANTES-Transkription aktivieren können.

Die Mutation der R(B)-Sequenz zu einer p50/p65-Bindungsstelle (B→ $\kappa$ B) führte zu einem vollständigen Verlust der Induzierbarkeit durch LPS. Deshalb wird davon ausgegangen, daß die Prozesse, die in LPS-stimulierten Zellen an R(B) ablaufen, auf der verstärkten Bindung von p50/p50-Homodimeren basieren.



**Abbildung 31:** An R(A) können sowohl Sp1 als auch p50/p65 transkriptionsaktivierend wirken, während die über R(B) vermittelte LPS-Induktion des RANTES-Promotors nicht durch p50/p65 übernommen werden kann. a) Im Reporterkonstrukt pGL3/-194/RANTES wurden die fett gedruckten Basen mutiert. Dadurch wurden Bindungsstellen hergestellt, die nur p50/p65 (A→κB, B→κB) oder nur Sp1 (A→Sp1) binden können. b) EMSA-Experiment mit den unter (a) dargestellten Sonden und Extrakten LPS-stimulierter MM6-Zellen. Es wurden die unter 5.10.5 beschriebenen Inkubationsbedingungen gewählt. c) Die unter (a) beschriebenen Konstrukte wurden zusammen mit einem Kontrollplasmid (pRL-TK) transient in MM6-Zellen trans-fiziert (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde sechsmal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.



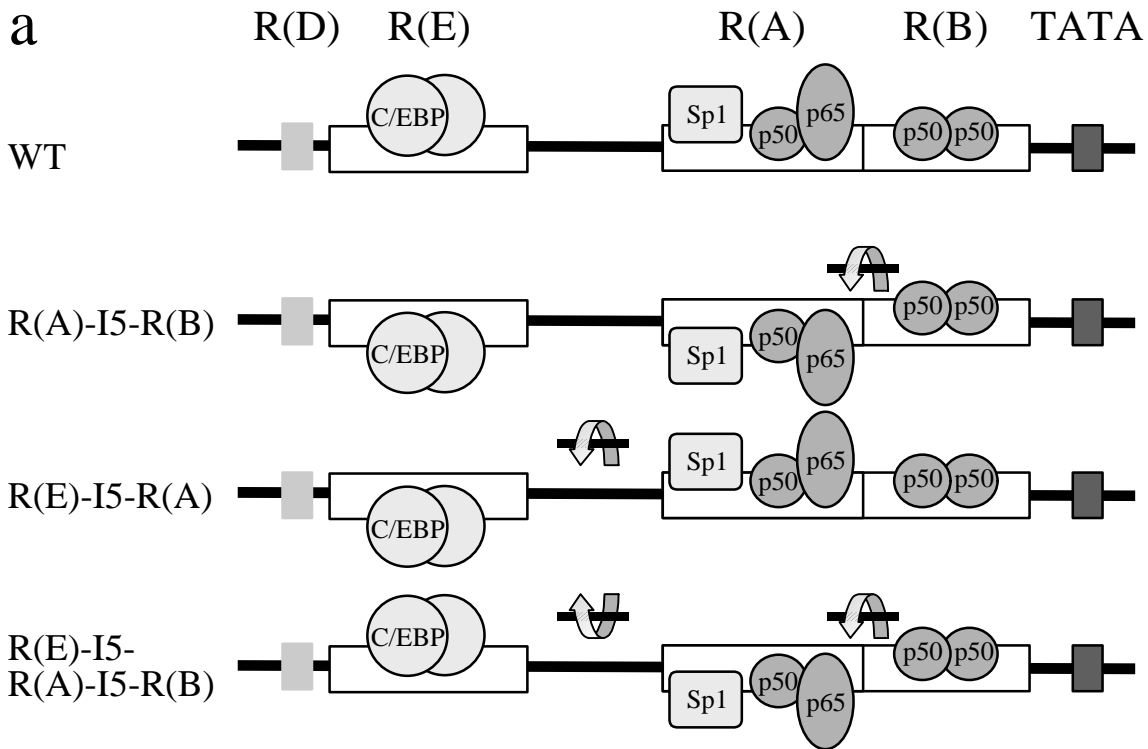
## 6.6 Übergeordnete Struktur des RANTES-Promotors


### 6.6.1 Lage von R(E) und R(AB)

In Abschnitt 6.4.5 wurde die Vermutung aufgestellt, daß das R(E)-Element für die LPS-induzierte Aktivität des RANTES-Promotors zwar wichtig ist, daß der Einfluß der konstitutiv an R(E) bindenden C/EBP-Proteine jedoch über eine Interaktion mit anderen, durch LPS induzierbaren Faktoren vermittelt wird. Als Interaktionspartner kämen die nach LPS-Stimulation verstärkt an das R(AB)-Element bindenden Rel-Komplexe in Frage (6.5.2).

Um zu prüfen, ob die relative Lage von R(E) zu R(A) und von R(E) zu R(B) für die Aktivität des RANTES-Promotors von Bedeutung ist, wurden an Stellen zwischen den betreffenden Elementen im pGL3/-974/RANTES-Konstrukt 5 bp-Abschnitte eingefügt. Dadurch sollte erreicht werden, daß die jeweils nachfolgenden Regionen auf die andere Seite der DNA-Helix verschoben werden. Dabei war nicht klar, ob die betreffenden Transkriptionsfaktorbindungsstellen vorher auf der gleichen Seite der DNA lagen und durch die Insertion voneinander entfernt wurden, oder ob sie vorher getrennt waren und nach der Insertion auf der gleichen Seite zu liegen kamen. Es wurde auch ein Konstrukt hergestellt, bei dem die Insertion zwischen R(A) und R(B) erfolgte, um zu klären, ob die relative Lage von R(A) und R(B) für die Aktivität des RANTES-Promotors von Bedeutung ist (Abbildung 32a).

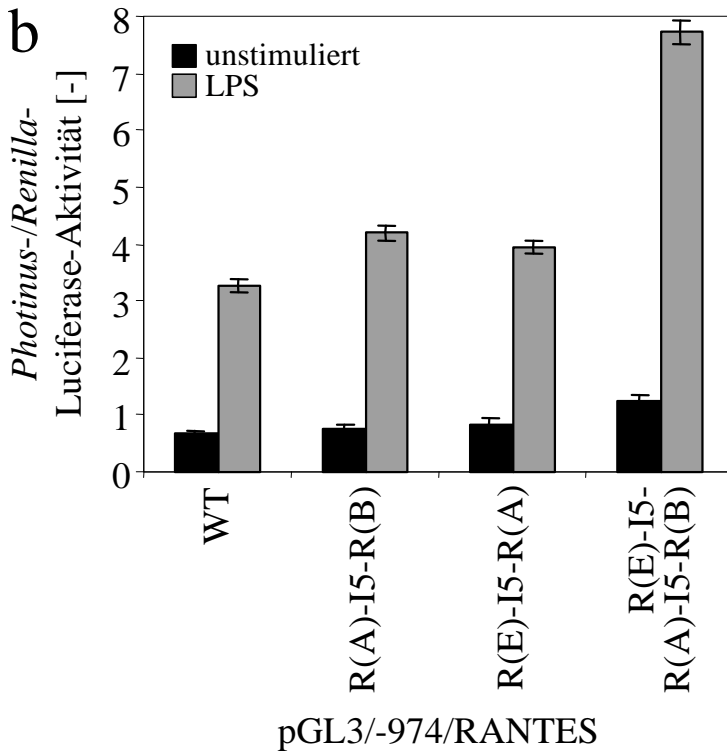
Abbildung 32b zeigt das Ergebnis der transienten Transfektion der beschriebenen Konstrukte in MM6-Zellen. Die Konstrukte mit jeweils einer 5 bp-Insertion (pGL3/-974/RANTES/R(A)-I5-R(B) und pGL3/-974/RANTES/R(E)-I5-R(A)) zeigten eine gegenüber dem Wildtyp leicht erhöhte LPS-induzierte Promotor-Reporteraktivität, aber keine Veränderung der konstitutiven Aktivität. Mit dem Konstrukt, das Insertionen sowohl zwischen R(E) und R(A) als auch zwischen R(A) und R(B) trug (pGL3/-974/RANTES/R(E)-I5-R(A)-I5-R(B)), wurde eine gegenüber der Aktivität des Wildtypkonstrukts fast verdoppelte LPS-induzierte Reporteraktivität gemessen.



○ konstitutiver Faktor  
 ● induzierter Faktor  
 Einschub von 5 bp, entsprechend einer halben Drehung der Helix

**Abbildung 32: Einfluß der Lage der Elemente R(E), R(A) und R(B) auf die RANTES-Promotor-Reporteraktivität** a)

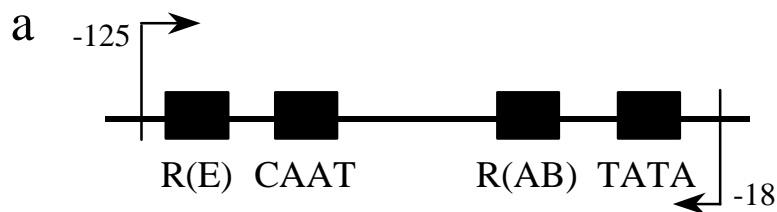
Wie in Abschnitt 5.4.3.3 beschrieben, wurden im Konstrukt pGL3/-974/RANTES zwischen R(A) und R(B) und zwischen R(E) und R(A) 5 bp-Insertionen vorgenommen. Dadurch sollten Elemente in der DNA-Helix auf die andere Seite gedreht werden und damit gegenüber dem benachbarten Element anders ausgerichtet werden. Die R(D)-Region wurde für Monocyten bisher noch nicht untersucht. Sie ist dargestellt, da der an R(E) beobachtete *footprint* sich bis in die R(D)-Region erstreckt (6.2.2). b) Die in (a) dargestellten Konstrukte wurden in transienten Transfektionen in MM6-Zellen getestet (vgl. 5.6.2 und 5.6.3). Die *Photinus*-Luciferase-Aktivitäten wurden auf die *Renilla*-Luciferase-Aktivitäten bezogen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar. Das Experiment wurde fünfmal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

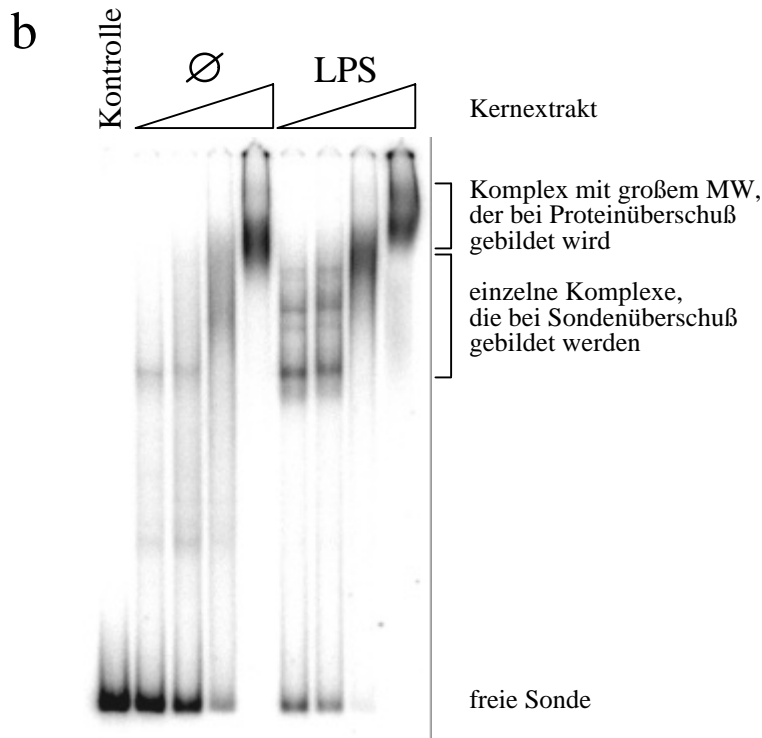


### 6.6.2 Eine Sonde, die den Bereich von -125 bis -18 enthält, bildet mit MM6-Kernproteinen einen großen EMSA-Komplex

Um in der Frage der Bindung von Transkriptionsfaktoren an R(E), R(A) und R(B) der *in vivo*-Situation etwas näher zu kommen, wurde eine EMSA-Sonde verwendet, die alle drei interessierenden Regionen sowie die CAAT- und TATA-Boxen enthielt (Abbildung 33a). Im Gegensatz zum klassischen EMSA, bei dem isolierte Bindungsstellen im Überschuß gegenüber den Kernproteinen eingesetzt werden, wurden hier solche Situationen untersucht, bei denen die Menge der Sondenmoleküle limitierend war. Somit konnte es zu einer Konkurrenz zwischen den im Kernextrakt vorhandenen Transkriptionsfaktoren um Bindungsstellen auf der DNA kommen. Da die Menge an Kernproteinen im Ansatz nicht beliebig gesteigert werden konnte, mußte eine Sonde mit hoher spezifischer Aktivität synthetisiert werden.

In Abbildung 33b ist zu sehen, daß das EMSA-Muster sich mit steigender Menge an Kernproteinen von mehreren Banden mit kleinem Molekulargewicht hin zu einer einzigen Bande mit hohem Molekulargewicht verschiebt. Leider war die Analyse der Bestandteile dieses Komplexes mit Supershift- und Kompetitions-Experimenten auf Grund der Mengen- und Größenverhältnisse nicht möglich. Bei Verwendung gleicher Proteinmengen war der von Kernproteinen aus unstimulierten Zellen gebildete Komplex im Gel mobiler als der von Kernproteinen LPS-stimulierter MM6-Zellen gebildete Komplex.





**Abbildung 33: Ein Überschuß von Kernproteinen bildet mit einer Sonde, die R(E) und R(AB) enthält, einen einzigen großen Komplex.** a) Die dargestellte Sonde wurde wie unter 5.10.4 beschrieben markiert. b) Pro Spur wurden 2.000 cpm Sonde mit 2,5, 5, 10 oder 20  $\mu\text{g}$  Kernextrakt aus unstimulierten oder LPS-stimulierten MM6-Zellen unter den R(AB)-Bedingungen (5.10.5) inkubiert. Ein Ansatz ohne Kernextrakt diente als Kontrolle. Da die hier verwendete Sonde länger war als die sonst im EMSA verwendeten, wurde der Gellauf erst nach 2 h 10 min beendet.

### 6.6.3 *In silico*-Analyse der Promotorelemente R(E) und R(AB)

Funktionell verwandte Promotoren weisen oft eine bestimmte Anordnung von gemeinsamen Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf. Dabei sind die Orientierung dieser Grundelemente zueinander und deren Entfernung voneinander konserviert. Dies ist der Fall, obwohl die Promotorsequenzen keine allgemeine Sequenzhomologie zeigen [Lavorgna *et al.*, 1998]. Die Fortschritte, die auf dem Gebiet der Analyse von Promotorstrukturen *in silico* erzielt worden sind, haben es ermöglicht, diesen übergeordneten Aufbau zu beschreiben und nach Genen zu suchen, die möglicherweise ähnlich reguliert sind. Mit Hilfe des Computerprogramms FastM [Lavorgna *et al.*, 1998] wurden mehrere Promotormodelle entworfen, welche die Regionen R(E) und R(AB) des RANTES-Promotors beschreiben sollten. Die Software ModelInspector [Frech *et al.*, 1997] wurde benutzt, um nach Promotorsequenzen zu suchen, für die diese Modelle ebenfalls zutreffen, die also folglich eine ähnliche Grundstruktur aufweisen wie der RANTES-Promotor und eventuell ähnlich reguliert sind.

In Abschnitt 6.5.3 wurde gezeigt, daß  $R(AB)$  als *composite element* (Promotor-Modul) funktioniert [Kel *et al.*, 1995].  $R(A)$  und  $R(B)$  wurden mit der TATA-Box als Grundeinheiten für die sechs Modelle, die in Tabelle 1 aufgelistet sind, verwendet. Wie Abbildung 34a zeigt, enthält der RANTES-Promotor Consensus-Sequenzen mit bestimmten *core*- und *matrix similarity*-Parametern für p50/p65 und Sp1 in der Region  $R(A)$  und für p50/p50 und p50/p65 in der Region  $R(B)$  (MatInspector, [Quandt *et al.*, 1995]). Die Sp1-Consensus-Sequenz wurde erst gefunden, als die Stringenz der MatInspector-Suche unter den Wert der Grundeinstellung für die *matrix similarity* abgesenkt wurde. Drei Modelle mit unterschiedlichen Kombinationen von Faktoren, die an  $R(A)$ ,  $R(B)$  und das TATA-Element binden können, wurden definiert. Die Modelle 2 und 3 stehen für Konstellationen, die die RANTES-Transkription in LPS-stimulierten Monocyten aktivieren können (vgl. 6.5.4). Modell 1 wurde gewählt, weil sowohl  $R(A)$  als auch  $R(B)$  p50/p65-Heterodimere binden können [Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1996]. Durch Hinzufügen eines C/EBP-*weight matrix*-Elements wurden aus den Modellen 1-3 die Modelle 4-6 abgeleitet.

Die *core similarity*- und *matrix similarity*-Werte [Quandt *et al.*, 1995] für die betreffenden Transkriptionsfaktor-*weight matrices* für den RANTES-Promotor sind der Abbildung 34a zu entnehmen. Für die Definition der Modelle wurden für die *weight matrices* die MatInspector-Grundeinstellungen als untere Grenzen für *core similarity* und *matrix similarity* verwendet (Abbildung 34b). Diese war für die *core similarity* 0,75 und für die *matrix similarity* der optimierte Wert, der für jede individuelle Matrix einer Matrixfamilie so definiert wird, daß höchstens drei (falsch positive) Treffer in 10.000 bp nicht regulatorischer Testsequenzen gefunden werden. Wie schon weiter oben in diesem Kapitel angedeutet, liegt der für die Sp1-Consensus-Sequenz in der Region  $R(A)$  des RANTES-Promotors erzielte Wert für die *matrix similarity* mit 0,772 unter dem für diese Matrix optimierten Wert von 0,88. Deshalb wurde in den Modellen für diesen Wert 0,75 als untere Grenze festgelegt.

Es wurden jeweils Treffer auf beiden DNA-Strängen zugelassen. Basierend auf den unter 6.6.1 beschriebenen Experimenten und um die Modelle anfangs nicht zu stringent zu wählen, wurden für die Entfernungen zwischen  $R(A)$  und  $R(B)$  und zwischen  $R(B)$  und dem TATA-Element 20 bp-Intervalle und zwischen  $R(E)$  und  $R(A)$  ein 100 bp-Intervall vorgegeben.

Das Computerprogramm ModelInspector wurde benutzt, um in den Einträgen der EMBL-Datenbank (*release* 63) für Menschen, Nagetiere, „andere Säugertiere“, „andere Wirbeltiere“ und Viren und der EPD (Philipp Bucher's Eukaryotic Promoter Database) [Perier *et al.*, 2000] nach Sequenzen zu suchen, die durch die Modelle beschrieben werden können.

**a**

**R(E)** ————— 50bp ————— **R(A)** — 15bp — **R(B)** ————— 20bp ————— **TATA**  
 C/EBP  
 CS = 1,000/MS = 0,967  
 Sp1  
 CS = 0,876/MS = 0,772 CS = 1,000/MS = 0,969 CS = 1,000/MS = 0,952  
 p50/p50  
 TATA  
 TTTCCGTTTTGTGCAATTTTCACTTTATGATACCGGCCAAATGGCTTTGGTTTGCTATTTTGGAAAACCTCCCTTAGGGGATGCCCTCAAACTGGCCCTATAAAAAGGGCCAGCCTGA  
 AAGGCAAAACACGTTAAAGTGAATACTATGGCCGGTTACGAAACCAACGATAAAAACCTTTTGAGGGGAAATCCCTACGGGGAGTTGACCCGGGATATTTCCCGGTCGGACT  
 p50/p65  
 CS = 1,000/MS = 0,972 CS = 0,904/MS = 0,912  
 p50/p65

**b**

**R(E)** ————— 0-100bp ————— **R(A)** — 5-25bp — **R(B)** ————— 10-30bp ————— **TATA**  
 C/EBP  
 CS ≥ 0,75/MS ≥ opt  
 Sp1  
 CS ≥ 0,75/MS ≥ 0,75 CS ≥ 0,75/MS ≥ opt CS ≥ 0,75/MS ≥ opt  
 p50/p50  
 TATA  
 p50/p65  
 CS ≥ 0,75/MS ≥ opt  
 CS ≥ 0,75/MS ≥ opt

**Abbildung 34: Aufbau der FastM-Computermodelle.** a) Sequenz des RANTES-Promotors. Die mit Hilfe von MatInspector identifizierten Transkriptionsfaktor-Consensus-Sequenzen sind eingerahmt. Die Werte für die *core similarity* (CS) und *matrix similarity* (MS) geben den Grad der Ähnlichkeit zwischen dem Bereich der RANTES-Promotor-Sequenz und der *weight matrix* an. Bei vollständiger Übereinstimmung würden beide Parameter den Wert 1 annehmen. In (b) sind die Matrix- und Entfernungsparameter der Elemente, die R(E), R(A), R(B) und die TATA-Box in den Modellen vertreten, dargestellt. Die Elemente sind kursiv gedruckt, da sie *in silico*-Beschreibungen der experimentell untersuchten RANTES-Promotor-Regionen sind. Für die Entfernungen zwischen den Elementen wurden Intervalle vorgegeben und Treffer auf beiden Strängen der DNA wurden zugelassen. Nach einem ersten ModelInspector-Lauf wurden die Parameter in den Modellen 3 und 6 verändert zu:  $CS_{C/EBP} \geq 0.985$ ,  $MS_{C/EBP} \geq 0.853$ ,  $CS_{Sp1} \geq 0.819$ ,  $MS_{Sp1} \geq 0.75$ ,  $CS_{NF-\kappa B} \geq 0.771$ ,  $MS_{NF-\kappa B} \geq 0.830$ ,  $CS_{TATA} \geq 0.880$ ,  $MS_{TATA} \geq 0.850$ , Entfernung $_{C/EBP-Sp1} = 5-60$  bp. Die Abkürzung „opt“ steht für „optimiert“.

Tabelle 1 stellt eine Liste aller Treffer dar, die in der Datenbank als Promotorregion annotiert sind. Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren kommen zwar sowohl in Promotor-Bereichen als auch in nicht regulatorischen Sequenzen vor, sie sind jedoch nur im Kontext einer Promotorstruktur funktionell.

Der Anteil der Promotor-Treffer an der Gesamtzahl der Treffer (Promotor, Exon, Intron, *repeat*) ist ein Maß für die Spezifität eines FastM-Modells. In einem ersten Suchlauf war der Anteil der Promotor-Treffer 5,8 % für Modell 3 und 2,2 % für Modell 6 (alle Datenbankbereiche außer dem viralen zusammengenommen). Die Sequenzen, die als „echte“ Treffer eingestuft werden konnten, wurden als *training set* [Klingenhoff *et al.*, 1999] benutzt, um die Modelle spezifischer zu machen. Dies wurde dadurch erreicht, daß die Vorgaben in folgender Weise verändert wurden:  $CS_{C/EBP} \geq 0.985$ ,  $MS_{C/EBP} \geq 0.853$ ,  $CS_{Sp1} \geq 0.819$ ,  $MS_{Sp1} \geq 0.75$ ,  $CS_{NF-\kappa B} \geq 0.771$ ,  $MS_{NF-\kappa B} \geq 0.830$ ,  $CS_{TATA} \geq 0.880$ ,  $MS_{TATA} \geq 0.850$ , Entfernung $_{C/EBP-Sp1} = 5-60$  bp. Mit den neuen Parametern lag der Anteil der Promotor-Treffer für Modell 6 bei 5,6 % und für Modell 3 nur wenig verändert bei 5,4 %.

Die durch das Modell 3 beschriebene Anordnung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen ist in vielen humanen und Vertebraten-Sequenzen (Nagetiere, „andere Säugtiere“, „andere Wirbeltiere“) zu finden. Es wurden zum Beispiel Promotorsequenzen von Muskel-, Lymphocyten- oder Zellkern-spezifisch exprimierten Genen identifiziert. Ein Teil der Promotoren, die durch Modell 3 beschrieben werden können, wurden zusätzlich durch Modell 6 identifiziert.

**Tabelle 1: Ergebnis der ModelInspector-Suche mit den sechs FastM-Modellen, die anhand der funktionellen Daten des RANTES-Promotors erzeugt wurden** (Abbildung 34). Alle Modelle enthielten ein TATA-Element. Es sind nur solche Treffer aufgeführt, die in der Datenbank als Promotorregion annotiert sind. Es sind jeweils die Abkürzung für die Spezies (nicht bei den humanen Sequenzen), die Bezeichnung der Sequenz/des Gens (wie in der Datenbank angegeben) und in Klammern die *accession number* und der *model score* (in %) angegeben. Der maximale *model score* 100 % würde erreicht werden, wenn alle enthaltenen Elemente genau mit der entsprechenden *weight matrix* übereinstimmen. Die Spezies-Namen sind folgendermaßen abgekürzt: *Bt/Bos taurus*/Rind, *Mm/Mus musculus*/Maus, *Rn/Rattus norvegicus*/Ratte, *Ss/Sus scrofa*/Schwein, *Sp/Strongylocentrotus purpuratus*/Seeigel, *Tf/Trimeresurus flavoviridis,okinavensis*/*Va/Vipera ammodytes*/Schlange. Promotoren von denen bekannt ist, daß sie durch LPS stimulierbar sind, sind durch zwei Sterne (\*\*) gekennzeichnet. Genprodukte die mit LPS in einer Beziehung stehen, sind durch einen Stern (\*) markiert. Es wäre denkbar, daß sie ebenfalls auf transkriptioneller Ebene durch LPS reguliert werden.

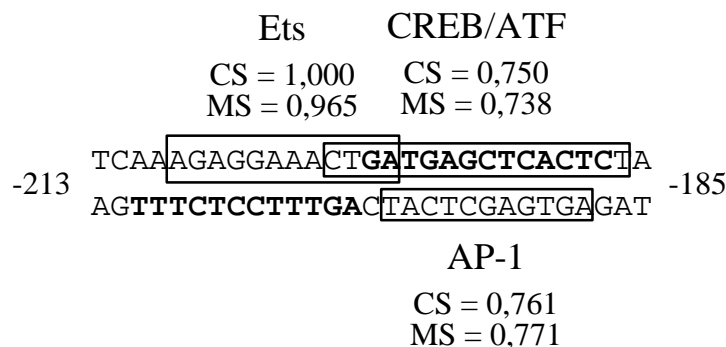
Modell	Mensch	Nager/Säuger/Vertebraten
<u>Modell 1</u> <i>R(A)</i> : p50/p65 <i>R(B)</i> : p50/p65	** RANTES (aj007462/94.5)	** <i>Mm</i> MIP-2 chemokine homolog (s61346/93.7)
<u>Modell 2</u> <i>R(A)</i> : p50/p65 <i>R(B)</i> : p50/p50	** RANTES (aj007462/96.4)	<i>Mm</i> steroid/thyroid hormone orphan nuclear receptor (Nurr1) (u86783/88.3)
<u>Modell 3</u> <i>R(A)</i> : Sp1 <i>R(B)</i> : p50/p50	** beta-myosin heavy chain (MYH7) (m57965/90.8) ** RANTES (aj007462/89.8) ** immunoglobulin (ab019439/87.5) ** HMG-I(C) (x92518/87.4) * phospholipid transferase protein (PLTP) (u38950/90.3) * cystatin D (x59964/86.6) * metallothionein 1B (ep25036/86.2) * c-myb (u22376/86.2) * inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (IPFK2) (af110958/85.3) myosin binding protein H (MyBP-H) (u27266/93.8) Na,K-ATPase beta 2 (af007876/92.3) hepatocyte nuclear factor-3 gamma (af176113/91.6) skeletal muscle alpha-actin (ACTA1) (af182035/91.3) 14-3-3 sigma protein (af029081/88.9)	** <i>Ss</i> slow myosin heavy chain-beta (110130/90.5) ** <i>Rn</i> GTP cyclohydrolase I (af131210/87.7) ** <i>To</i> phospholipase A2 (d49392/86.8) ** <i>Mm</i> HMG-I(C) (l41617/85.7) * <i>Mm</i> histone H1t (ep49013/92.9) * <i>Sp</i> metallothionein (MTB_1) (ep33014/89.8) * <i>Mm/Rn</i> muscle creatine kinase (m13642, m27092/87.6) * <i>Mm</i> norepinephrine transporter (u92654/87.4) * <i>Mm</i> Hox b-4 (x71912/87.3) * <i>Mm/Bt</i> protamine 2 (x07626/86.6,x60353/82.2) * <i>Mm</i> CBFA1 (Runx2) (af15536/85.9) * <i>Rn</i> carnitine palmitoyl-transferase I (af020776/82.0) <i>Tf</i> phospholipase A2 inhibitor (ab003473/91.2) <i>Bt</i> alpha skeletal actin precursor (u02285/90.4)



	<p>parvalbumin (x51678/87.9)  kallikrein (m18157/86.0)  NeuroD (ab028145/84.7)  gas-1 (z22667/83.4)</p>	<p><i>Mm</i> hsp25 (l07577/90.1)  <i>Mm</i> Are1 and Rps18 (aj224960/89.7)  <i>Mm</i> Na,K-ATPase beta 2 (m60897/89.7)  <i>Mm</i> N10 gene (x16995/86.8)  <i>Mm</i> gas-1 (z22668/86.5)  <i>Va</i> ammodytoxin/ammodytin (x76731/86.1)  <i>Mm</i> mdr3 (s81971/85.6)  <i>Mm</i> insulin receptor (m28869/84.7)  <i>Mm</i> orphan receptor Tr2 (Tr2-11) (u96095/84.7)  <i>Mm</i> uroporphyrinogen III synthase (af133257/84.6)  <i>Mm</i> 24p3 (X81627/84.4)</p>
<p><u>Modell 4</u>  <i>R(E)</i>: C/EBP  <i>R(A)</i>: p50/p65  <i>R(B)</i>: p50/p65</p>	** RANTES (aj007462/95.1)	<i>keine Treffer</i>
<p><u>Modell 5</u>  <i>R(E)</i>: C/EBP  <i>R(A)</i>: p50/p65  <i>R(B)</i>: p50/p50</p>	** RANTES (aj007462/96.5)	<i>keine Treffer</i>
<p><u>Modell 6</u>  <i>R(E)</i>: C/EBP  <i>R(A)</i>: Sp1  <i>R(B)</i>: p50/p50</p>	<p>** beta-myosin heavy chain (MYH7) (m57965/92.1)  ** RANTES (aj007462/91.5)  * metallothionein 1B (ep25036/87.1)</p>	<p>** <i>Ss</i> slow myosin heavy chain-beta (l10130/91.7)  ** <i>To</i> phospholipase A2 (d49392/88.0)  ** <i>Rn</i> GTP cyclohydrolase I (af131210/87.9)  * <i>Sp</i> metallothionein (MTB_1) (ep33014/91.3)  * <i>Mm</i> Hox b-4 (x71912/88.3)  * <i>Mm</i> CBFA1 (Runx2) (af15536/87.2)  <i>Mm</i> Are1 and Rps18 (aj224960/88.8)  <i>Va</i> ammodytoxin/ammodytin (x76731/87.7)  <i>Mm</i> orphan receptor Tr2 (Tr2-11) (u96095/86.9)  <i>Mm</i> insulin receptor (m28869/85.5)</p>

### 6.6.4 Modellierung der -228-Region des RANTES-Promotors

In einer früheren Arbeit wurde der Bereich des RANTES-Promotors zwischen den Positionen -228 und +54 als „minimaler optimaler Promotor“ für Monocyten definiert [Boehlk *et al.*, 2000]. Er enthält neben den hier untersuchten Regionen R(E) und R(AB) ein als R(G) bezeichnetes Element (-211/-187), das ebenfalls durch LPS induzierbar ist und als Promotor-Modul funktioniert. Der Ets-Transkriptionsfaktor PU.1 bindet an R(G) konstitutiv, während die Bindung von Mitgliedern der CREB/ATF- und AP-1-Familien durch LPS induziert werden kann. In MM6-Zellen sind dies c-Jun, JunD und ATF-3, in primären Monocyten nur JunD und ATF-3 [Boehlk *et al.*, 2000]. Positionsgerichtete Mutagenese der Ets-Bindungsstelle führte zu einer 15 %igen Reduktion der LPS-induzierten Promotoraktivität, während eine Mutation, die die CRE/AP-1-Sequenz veränderte, diese Aktivität um 40 % verminderte. Es werden beide Anteile benötigt, um die Funktion auf einen heterologen Promotor zu übertragen [Boehlk *et al.*, 2000].



**Abbildung 35: Sequenzanalyse der Region G des RANTES-Promotors (-211/-187).** Die mit Hilfe von MatInspector identifizierten Transkriptionsfaktor-Consensus-Sequenzen sind eingerahmt. Die Werte für die *core similarity* (CS) und *matrix similarity* (MS) geben den Grad der Ähnlichkeit zwischen dem Bereich der RANTES-Promotor-Sequenz und der *weight matrix* an. Bei vollständiger Übereinstimmung würden beide Parameter den Wert 1 annehmen. Alle drei Bindungsstellen sind für die Funktion der Region R(G) im Kontext des RANTES-Promotors und als Promotor-Modul essentiell. Die fett gedruckten Positionen sind in Anwesenheit von Kernextrakten aus unstimulierten oder LPS-stimulierten MM6-Zellen vor einem Verdau durch DNase I geschützt [Boehlk *et al.*, 2000].

Es wurde versucht, ein FastM-Modell zu erzeugen, das alle bisher bekannten Elemente des „minimalen optimalen Promotors“, die für die LPS-stimulierte RANTES-Transkription in Monocyten wichtig sind, enthält. Dazu wurden die schon in Modell 3 verwendeten Matrix-Beschreibungen für Mitglieder der C/EBP- und Sp1-Familien und eine Matrix für Rel p50-Homodimere verwendet und um *weight matrices* für Mitglieder der Ets, CREB/ATF- und AP-1-Familien erweitert. Die MatInspector-Parameter für die RANTES-Sequenz sind für die

drei erstgenannten Matrizen der Abbildung 34 zu entnehmen. Die R(G)-Parameter sind in Abbildung 35 angegeben. Das in Tabelle 2 beschriebene Modell wurde benutzt, um in Datenbanksequenzen nach Promotorsequenzen zu suchen, die ebenfalls diese komplexe Anordnung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthalten.

**Tabelle 2: FastM-Parameter des Modells, das die -228-Region des RANTES-Promotors repräsentieren soll.** Das Modell wurde analog zu den in Tabelle 1 beschriebenen Modellen, jedoch ohne TATA-Element, erzeugt und die Parameter wurden unter Verwendung eines *training set* angepaßt [Klingenhoff *et al.*, 1999]. Die Regionen des RANTES-Promotors werden durch *weight matrices* für Transkriptionsfaktoren beschrieben. Für jede Matrix sind die unteren Grenzen für die *core similarity* und die *matrix similarity*, sowie die Orientierung auf der DNA und die Entfernung zu der jeweils nächsten Matrix definiert. Die Matrix-Parameter für die Region R(G) des RANTES-Promotors sind der Abbildung 35 zu entnehmen.

Matrix	Region des RANTES-Promotors	<i>core similarity</i>	<i>matrix similarity</i>	Orientierung	Entfernung zum nächsten Element
Ets-Familie	R(G)	$\geq 0,851$	$\geq 0,733$	+/-	6-18 bp
ATF-Familie	R(G)	$\geq 0,750$	$\geq 0,738$	+/-	1-3 bp
AP-1-Familie	R(G)	$\geq 0,761$	$\geq 0,745$	-	71-80 bp
C/EBP-Familie	R(E)	$\geq 0,873$	$\geq 0,721$	+	39-49 bp
Sp1-Familie	R(A)	$\geq 0,844$	$\geq 0,752$	-	15-27 bp
p50/p50	R(B)	$\geq 1,000$	$\geq 0,737$	+/-	

Die Sequenz des humanen RANTES-Promotors erzielt für das Modell der -228-Region einen *element score* von 84,5 %. Unter den als Promotorregionen annotierten Datenbanksequenzen erfüllen nur wenige zusätzliche Einträge alle Modellvorgaben. Dies sind das humane Phospholipid-Transferase-Protein, die humane Na-K-ATPase und das Maus-Chemokin MIP-2 mit *element scores* von 79,7 %, 83,8 % bzw. 80,7 %. Die MIP-2-Sequenz wurde in der Analyse der Region R(AB) durch Modell 1, nicht aber durch Modell 3, auf welchem das erweiterte Modell basiert, identifiziert. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Parameter für das erweiterte Modell neu angepaßt wurden, und daß in einem Modell mit vielen Elementen die einzelnen Elemente weniger ins Gewicht fallen. Es wäre wahrscheinlich nicht sinnvoll, Modelle mit noch höherer Komplexität aufzustellen, da sie ja nur eine von unterschiedlichen Promotoren gemeinsam verwendete Grundorganisation beschreiben sollen. Durch die Kombination mit unterschiedlichen zusätzlichen Elementen können die individuellen Gene ein Zelltyp- und Stimulus-spezifisches Expressionsmuster verwirklichen.



## 7 DISKUSSION

### 7.1 Regulation der RANTES-Expression in Monocyten

RANTES wirkt chemotaktisch auf T-Lymphocyten, NK-Zellen, Monocyten/Makrophagen, Basophile und Eosinophile und ist damit an mehreren Punkten in die Steuerung des Immunsystems verweben. Die Dysregulation der RANTES-Expression führt zu sich selbst verstärkenden Effekten und kann zur Entstehung von chronisch entzündlichen und allergischen Reaktionen beitragen (vgl. 4.6). RANTES kann in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und unterliegt dabei einer Zelltyp- und Stimulus-spezifischen Kontrolle.

Da Monocyten/Makrophagen sowohl an der Auslösung als auch an der Aufrechterhaltung der Immunantwort beteiligt sind und bei der HIV-1-Infektion eine duale Rolle spielen (vgl. 4.10), könnte die Kenntnis der Vorgänge, welche die RANTES-Expression in diesem Zelltyp steuern, von großem therapeutischen Nutzen sein. Dabei sind solche Mechanismen, in denen sich die Regulation in den diversen Zelltypen unterscheidet, von besonderer Bedeutung. Sie könnten einen Ansatzpunkt für eine Zelltyp-spezifische Intervention darstellen.

Die Untersuchung des RANTES-Promotors ist auch unter dem Gesichtspunkt allgemeiner Mechanismen der Promotorfunktion interessant. Die im Rahmen dieser Arbeit über die LPS-induzierte RANTES-Transkription in Monocyten gewonnenen Daten wurden benutzt, um die übergeordnete Anordnung LPS-induzierbarer Elemente des RANTES-Promotors in Form von Computermodellen zu beschreiben und damit potentiell coregulierte Gene zu identifizieren.

#### 7.1.1 Stimulation durch LPS

Im Gegensatz zu T-Zellen, die RANTES 3-5 Tage nach der Aktivierung - gleichzeitig mit der Differenzierung zu Effektorzellen - hochregulieren, exprimieren Monocyten RANTES als *immediate early*-Gen. Sowohl in primären Monocyten als auch in den unterschiedlich differenzierten Tumorzelllinien MM6 und THP-1 kommt es nach LPS-Stimulation zu einer schnellen und transienten Erhöhung des RANTES-mRNA-Spiegels mit einem Maximum zwischen 6 und 9 Stunden [Boehlk *et al.*, 2000]. Diese Erhöhung wird durch verstärkte Transkription erreicht, nicht durch Stabilisierung der mRNA.

Auch Makrophagen der Maus können RANTES exprimieren. Dabei wird der maximale mRNA-Spiegel 6 h nach der Stimulation mit LPS erreicht [Shin *et al.*, 1994].

Der Großteil der in dieser Arbeit gewonnenen funktionellen Daten wurde mit Hilfe von transienten Transfektionen gewonnen. Die Stimulierbarkeit des RANTES-Promotors konnte jedoch auch in stabil transfizierten THP-1-Zellen nachgewiesen werden und stellt somit keinen Transfektionsartefakt dar. Mit den stabil transfizierten THP-1-Zellen wurde auch gezeigt, daß durch LPS-Kontamination vorstimulierte Zellen nicht mehr effizient durch LPS stimuliert werden können. Es gibt Arbeiten, die die molekulare Grundlage der Induktion einer Toleranz gegen LPS untersucht haben. Dabei wurde ebenfalls beobachtet, daß Zellen, die gegenüber LPS exponiert waren, eine abgeschwächte zweite Reaktion zeigen. Dies wird über ein Herunterregulieren von TLR4 und nicht - wie ursprünglich angenommen - über CD14-Herunterregulierung erreicht [Nomura *et al.*, 2000]. Eine andere Gruppe zeigte, daß bei einer Endotoxintoleranz TLR2-mRNA hochreguliert wird und daß die Phosphorylierung von MAP-Kinasen und die I- $\kappa$ B- $\alpha$ -Degradation gehemmt sind [Medvedev *et al.*, 2000]. Von dieser Gruppe wurde ebenfalls eine veränderte Cytokin- und Chemokin-Expression beobachtet.

Durch LPS-Stimulation werden in Monocyten eine ganze Reihe von Signaltransduktionswegen in Gang gesetzt. Dies hat für die Untersuchung der Transkriptionsregulation den Vorteil, daß sehr viele Faktoren induziert werden, die potentiell an den RANTES-Promotor binden können. Die RANTES-Regulation als Antwort auf ein sehr spezifisches Signal wird mit hoher Wahrscheinlichkeit anders ablaufen. Es wäre interessant, alternative Stimuli zu vergleichen.

### 7.1.2 Andere Monocyten-Stimuli

In MM6-Zellen beeinflussen die Cytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  den RANTES-mRNA-Spiegel nicht, während es in primären Monocyten durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu einer leichten Erhöhung des RANTES-mRNA-Spiegels kommt [Boehlk *et al.*, 2000]. In Stimulationsexperimenten mit THP-1-Zellen wurde eine mäßige Induktion der RANTES-Expression durch TNF- $\alpha$  beobachtet. Die RANTES-Expression wird in anderen Zelltypen durch diese Cytokine deutlich verstärkt [Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1998].

Ein alternativer physiologischer Stimulus ist die Interaktion zwischen dem CD40-Protein auf der Monocyten-Oberfläche und dessen Liganden CD154. Es wurde gezeigt, daß in Makrophagen durch CD154-Stimulation die Produktion der Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES und MCP-1 induziert werden kann [Kornbluth *et al.*, 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurden erste Experimente durchgeführt, die den Einfluß der Stimulation durch CD40-spezifische Antikörper, lösliche CD40-L-Trimere und stabil mit CD40-L-transfizierten BHK-Zellen (*baby hamster kidney*) untersuchen sollten. Der Effekt war weniger deutlich als bei LPS-Induktion. Bisher wurden keine detaillierten Analysen durchgeführt.

Ein weiteres Stimulans für Monocyten ist Hyaluronsäure mit niedrigem Molekulargewicht, die bei Entzündungsprozessen durch Degradation der extrazellulären Matrix entsteht. Diese Polysaccharid-Fragmente können durch Interaktion mit dem Matrix-Rezeptor CD44 Monocyten aktivieren [McKee *et al.*, 1996]. Mit stabil und transient transfizierten THP-1-Zellen wurde gezeigt, daß Hyaluronsäure das R(AB)-Element des RANTES-Promotors im Kontext des SV40-Minimalpromotors stimulieren kann. Eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Hyaluronsäure wurde schon früher beschrieben [Noble *et al.*, 1996]. Daß die Aktivierung des R(AB)-Elements jedoch nicht mit einer verstärkten RANTES-Expression einherging, legt nahe, daß für die Synthese des RANTES-Proteins zusätzliche Signale erforderlich sind.

Das Diacylglycerin-Analogon Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) führte zu einer starken Induktion der RANTES-Produktion in THP-1-Zellen. Auf transkriptioneller Ebene war es jedoch weniger effektiv als LPS und es konnten keine synergistischen Effekte zwischen den beiden Stimuli festgestellt werden.

## 7.2 Polymorphismus im RANTES-Promotor

Es wird davon ausgegangen, daß *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) etwa 90 % der genetischen Diversität der Menschheit ausmachen und damit für die individuellen phänotypischen Variationen von großer Bedeutung sind. So werden manche SNPs mit der Prädisposition für gewisse Krankheiten oder mit der Reaktion auf die Gabe bestimmter Therapeutika in Verbindung gebracht. Für die in Abschnitt 6.3 untersuchten polymorphen Positionen des RANTES-Promotors (-42G/-417A) wurde eine biologische Relevanz beschrieben [Liu *et al.*, 1999; Nickel *et al.*, 2000].

Der SNP an Position -417 des RANTES-Promotors wurde zusammen mit einem Polymorphismus in der 3'-AU-reichen untranslatierten Region des Eotaxin-Gens im Rahmen einer Suche nach Genorten, die mit der Anfälligkeit für allergische Erkrankungen assoziiert sind, identifiziert [Nickel *et al.*, 1999]. RANTES und Eotaxin wirken auf Eosinophile aktivierend und chemoattraktiv und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen [Baggiolini *et al.*, 1997]. In einer weiterführenden Studie wurde gezeigt, daß die „Mutation“ an Position -417 des RANTES-Promotors, durch die eine zusätzliche Bindungsstelle für Mitglieder der GATA-Familie entsteht, mit einer erhöhten Anfälligkeit für Neurodermitis assoziiert ist [Nickel *et al.*, 2000]. In transienten Transfektionen mit Reportervektoren wurde darüber hinaus gezeigt, daß der „mutierte“ Promotor in einer humanen Mastzelllinie und in Jurkat-T-Zellen eine deutlich erhöhte konstitutive Aktivität aufweist. Die Promotoraktivität in einer Bronchienepithel-Zelllinie wurde durch die „Mutation“ nicht beeinflußt, was im Einklang damit steht, daß in der Studie keine Assoziation mit Asthma gefunden wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die „Mutation“ -417A zu einer um 35-45 % reduzierten konstitutiven und LPS-induzierten Reporteraktivität in MM6-Zellen führt. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, daß der RANTES-Promotor in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich reguliert wird. Der Befund zeigt außerdem, daß auch Bereiche außerhalb der -228/+54-Region die Aktivität des RANTES-Promotors in Monocyten beeinflussen können.

In einer japanischen Studie wurde gezeigt, daß die -42G-„Mutation“ bei HIV-1-infizierten Menschen zu einer verstärkten RANTES-Expression führt, wodurch die Geschwindigkeit der Depletion CD4-positiver Zellen reduziert wird, was wiederum ein verlangsamtes Fortschreiten der Krankheit zur Folge hat [Liu *et al.*, 1999]. Es gab jedoch keine Unterschiede in der Häufigkeit der Allele (-42C, -42G) zwischen infizierten und nicht infizierten Personen, was nahelegt, daß die -42G-„Mutation“ vor einer HIV-1-Übertragung nicht schützen kann. In der erwähnten Arbeit führte die -42G-„Mutation“ in transient transfizierten U937-Monocyten zu einer gegenüber dem „Wildtyp“ leicht erhöhten konstitutiven Promotor-Reporteraktivität. Das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment (vgl. Abbildung 20) zeigte eine leicht reduzierte konstitutive und LPS-induzierte Reporteraktivität.



## 7.3 LPS-induzierbare Elemente des RANTES-Promotors

In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, daß die Promotorsequenz von -228 bis +54 für die volle Reporterexpression in LPS-stimulierten Monocyten ausreicht [Boehlke *et al.*, 2000]. In der erwähnten Arbeit wurde ein Promotor-Modul beschrieben, das an der Transkriptionsaktivierung des RANTES-Gens in LPS-induzierten Monocyten beteiligt ist. Das Element wird als RANTES Region G (R(G), -211/-187) bezeichnet. R(G) bindet den Ets-Transkriptionsfaktor PU.1 konstitutiv. Durch LPS wird die Bindung von Mitgliedern der ATF- und Jun-Familien an eine benachbarte CRE/AP-1-Consensus-Sequenz induziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere LPS-induzierbare Elemente in der Nähe der CAAT- und TATA-Boxen des RANTES-Promotors charakterisiert. R(E) (-125/-99) bindet in MM6- und THP-1-Zellen C/EBP-Proteine. R(AB) (-73/-34) bindet Sp1 und verschiedene Rel-Homo- und Heterodimere und erfüllt die Bedingungen für ein Promotor-Modul [Klinghoff *et al.*, 1999].

### 7.3.1 Bedeutung von Sp1, p50/p65 und p50/p50

Rel-Proteine, vor allem p50/p65 (NF- $\kappa$ B), sind als starke Transkriptionsaktivatoren bekannt [Baeuerle, 1998]. Die Rel-Familie besteht aus den strukturell verwandten Proteinen p50, p52, p65, c-Rel und RelB. Es kommen fast alle Dimerkombinationen vor, aber nicht alle Komplexe sind transkriptionell aktiv. Da p50 und p52 keine Transaktivierungsdomäne besitzen, können Homo- oder Heterodimere dieser beiden Moleküle nicht direkt aktivierend wirken. Sie sind eher dafür bekannt, die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription zu unterdrücken [Siebenlist *et al.*, 1994].

Sp1 ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der ursprünglich als GC- oder GT-Box-bindendes Protein beschrieben wurde [Berg, 1992]. Inzwischen wurden viele alternative Bindungssequenzen identifiziert, so daß es schwierig geworden ist, eine Consensus-Sequenz für Sp1 abzuleiten [Philipsen and Suske, 1999].

Kooperative Effekte zwischen Sp1 und NF- $\kappa$ B sind für die Aktivierung der HIV-LTR-Region beschrieben worden [Perkins *et al.*, 1993] und auch die Expression des MCP-1-Gens wird maßgeblich durch NF- $\kappa$ B und Sp1 gesteuert [Ueda *et al.*, 1994]. Während die beiden Faktoren in diesen Promotoren an getrennte Erkennungssequenzen binden, binden Sp1 und

NF- $\kappa$ B in den Promotoren der P-Selectin- und I- $\kappa$ B-Gene an ein und dieselbe Bindungsstelle [Hirano *et al.*, 1998]. Hirano *et al.* haben eine Reihe von NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen identifiziert, die auch Sp1 binden können. Sie demonstrierten, daß die beiden Faktoren sich dabei gegenseitig ausschließen.

Die beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß R(A) für die allgemeine Aktivität des RANTES-Promotors wichtig ist. Diese Region bindet Sp1 konstitutiv und p50/p65 nach LPS-Stimulation. Da in EMSA-Experimenten mit einem Sondenüberschuß gearbeitet wird, konnte auf diese Weise nicht geklärt werden, welcher Faktor *in vivo* bindet. Die in Abschnitt 6.6.2 geschilderten modifizierten EMSA-Experimente sollten unter anderem dieser Frage nachgehen. Es konnte zwar gezeigt werden, daß bei Sondenlimitierung an der Promotorsequenz von Position -125 bis -18 ein einziger großer Komplex gebildet wird, die Zusammensetzung dieses Komplexes konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht aufgeklärt werden. In Transfektionsexperimenten mit spezifisch mutierten Reportergenkonstrukten wurde jedoch deutlich, daß an R(A) sowohl Sp1 als auch NF- $\kappa$ B die Transkription des RANTES-Gens aktivieren können.

Die Region R(B) ist für die Aktivität des RANTES-Promotors in unstimulierten Zellen nicht wichtig, sehr wohl aber für die LPS-induzierte RANTES-Transkription. R(B) bindet vor allem Komplexe aus p50 und p52. LPS-Stimulation führt zu einer deutlich verstärkten p50-Bindung. Diese Befunde lassen vermuten, daß p50/p50-Homodimere bei der RANTES-Transkription in Monocyten aktivierend wirken. Da p50 keine Transaktivierungsdomäne besitzt [Siebenlist *et al.*, 1994], könnten seine positiven Effekte auf Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Coaktivatoren beruhen. Das Genprodukt des Protooncogens bcl-3 kann mit „inaktiven“ Rel-Homodimeren assoziieren und damit eine Transaktivierungsdomäne bereitstellen [Bours *et al.*, 1993; Fujita *et al.*, 1993]. Auch der Steroidrezeptor-Coaktivator-1 (SRC-1) kann durch Interaktion mit p50 die Rel-vermittelte Transkription aktivieren [Na *et al.*, 1998].

### 7.3.2 Das C/EBP-bindende Element R(E)

Der entscheidende Abschnitt der Region R(E) ist eine funktionelle C/EBP-Bindungsstelle, die mit einer Consensus-Sequenz für Oct-Transkriptionsfaktoren überlappt. Eine ähnliche Anordnung findet sich im IL-8-Promotor. Oct-1, ein Mitglied der *POU homeodomain family*, wirkt als Repressor der IL-8-Transkription [Wu *et al.*, 1997]. Obwohl die Komplexbildung an

der Region E des RANTES-Promotors im EMSA durch Konkurrenz mit DNA-Oligomeren, die das Octamer-Motiv enthalten, beeinflusst wird, scheinen Oct-Proteine in Monocyten nicht an der über R(E) vermittelten Regulation des RANTES-Gens beteiligt zu sein.

Die *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs) bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem für die Differenzierung und Funktion myeloider Zellen von Bedeutung sind [Yamanaka *et al.*, 1998]. Bisher wurden C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$  und - $\zeta$  beschrieben. Alle Proteine besitzen eine bZIP-Region (*basic zipper*), die für die Dimerisierung und die Bindung an DNA benötigt wird. C/EBP- $\gamma$  ist das einzige Familienmitglied, das keine Transaktivierungsdomäne besitzt [Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998]. Während C/EBP- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\delta$  und - $\epsilon$  starke Aktivatoren sind, werden C/EBP- $\gamma$  und - $\zeta$  als dominant negative Repressoren betrachtet [Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998]. Die Anwesenheit verschiedener C/EBP-Dimer-Kombinationen ist für die gewebespezifische Regulation bestimmter Gene entscheidend. C/EBP-Proteine können auch mit anderen Transkriptionsfaktoren dimerisieren. Als Beispiele seien Mitglieder der Rel- und Fos/Jun-Familien genannt [Vinson *et al.*, 1993].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß C/EBP-Proteine für die volle LPS-induzierte Aktivität des RANTES-Promotors wichtig sind. Die Transkriptionsfaktor-Bindung an R(E) wurde jedoch durch LPS-Stimulation nicht beeinflusst. Zusammen mit der Tatsache, daß R(E) in einem heterologen Promotor nicht funktionell ist, legt dies den Schluß nahe, daß die über R(E) vermittelte Transkriptionsaktivierung auf Interaktionen mit anderen Promotor-gebundenen Faktoren beruht.

### 7.3.3 Übergeordnete Struktur des RANTES-Promotors

Wechselwirkungen zwischen Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation. Durch das Netzwerk von Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen kann es zur Bildung eines übergeordneten Nucleoproteinkomplexes kommen. Diese Anordnung stellt eine Konformation dar, die die Transkription begünstigt, und wird manchmal als „Enhanceosome“ bezeichnet [Carey, 1998]. Ein „Enhanceosome“ bildet Oberflächen, die zu Coaktivatoren und zur basalen Transkriptionsmaschinerie der RNA-Polymerase II komplementär sind [Kim and Maniatis, 1997; Merika *et al.*, 1998]. Man geht davon aus, daß die diversen komplementären Interaktionen additiv wirken, was aus energetischer Sicht zu einer exponentiellen Zunahme der Affinität der Transkriptions-

maschinerie gegenüber dem „Enhanceosome“ im Vergleich zu jedem der einzelnen Aktivatoren führen sollte. Diese exponentielle Aktivitätszunahme wird als Grundlage für die synergistischen Effekte multipler Aktivatoren bei der Transkription betrachtet [Carey, 1998; Kim and Maniatis, 1997; Merika *et al.*, 1998].

Da „Enhanceosomes“ auf kurzen DNA-Abschnitten gebildet werden, muß die DNA verbogen und verdreht werden. Dies wird durch die Strukturproteine der *high mobility group* (HMG) erreicht. Die HMG-Proteine HMG-I und LEF-1 (*lymphoid enhancer factor-1*) binden in der kleinen Furche der DNA und entwinden und drehen dadurch die Helix [Grosschedl, 1995]. Zwei prototypische „Enhanceosomes“ wurden für die IFN- $\beta$  und TCR- $\alpha$ -Promotoren beschrieben. Die p50- und p65-Untereinheiten von NF- $\kappa$ B, IRF-1, ATF-2, c-Jun und HMG-I binden den IFN- $\beta$ -Promotor [Kim and Maniatis, 1997; Merika *et al.*, 1998], während die sequenzspezifischen Regulatorproteine Ets-1, AML-1, LEF-1 und ATF/CREB das TCR- $\alpha$ -„Enhanceosome“ bilden [Giese *et al.*, 1995; Mayall *et al.*, 1997].

Auch die Funktion des RANTES-Promotors könnte über die Bildung eines „Enhanceosomes“ erklärt werden. Der Promotor bindet in unstimulierten Monocyten den Ets-Faktor PU.1 an R(G), mehrere Mitglieder der C/EBP-Familie an R(E) und Sp1 an R(A). Durch LPS wird die Bindung von ATF-Jun-Komplexen an R(G), p50/p65 an R(A) und p50/p50 an R(B) induziert. Die Bindung dieser Faktoren könnte eine die Transkription begünstigende Konformation induzieren und die Wechselwirkung mit Coaktivatoren ermöglichen. Das unter 6.6.1 beschriebene Experiment sollte klären, ob die Ausrichtung der Bindungsstellen für die an R(E), R(A) und R(B) bindenden Faktoren für die Funktion des RANTES-Promotors entscheidend ist, indem zwischen den Regionen Insertionen eingefügt wurden, die einer halben Helixdrehung entsprechen. Für das IFN- $\beta$ -„Enhanceosome“ wurde gezeigt, daß die Insertion einer halben Helixdrehung zum Verlust der Promotoraktivität führt, während ein Einschub, der einer kompletten Helixwindung entspricht, keinen Einfluß auf die Bildung des „Enhanceosomes“ hatte [Kim and Maniatis, 1997]. Abbildung 32 zeigt, daß der RANTES-Promotor in LPS-induzierten Monocyten anscheinend nicht über die Bildung eines „Enhanceosomes“ funktioniert, da die genaue Positionierung der beteiligten Elemente gegeneinander keinen entscheidenden Einfluß zeigte. Dies schließt aber nicht aus, daß sich am RANTES-Promotor in anderen Zelltypen oder mit anderen Stimuli durch die in diesen Zellen vorherrschenden Kernfaktoren ein „Enhanceosome“ bildet, das dann zu einer deutlich stärkeren RANTES-Transkription führt.

Wenn auch in LPS-stimulierten Monocyten kein hochgeordnetes RANTES-„Enhanceosome“ gebildet zu werden scheint, so ist dennoch davon auszugehen, daß es zu Interaktionen zwischen den gebundenen konstitutiven und induzierbaren Transkriptionsfaktoren untereinander und mit Coaktivatoren kommt. So wurde zum Beispiel für den konstitutiv an R(G) bindenden Faktor PU.1 beschrieben, daß er die Bindung von Transkriptionsfaktoren an benachbarte Erkennungssequenzen in kooperativer Weise unterstützt [Pongubala *et al.*, 1992]. Für den TNF- $\alpha$ -Promotor wurde gezeigt, daß die C/EBP-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch c-Jun verstärkt wird [Zagariya *et al.*, 1998]. Eine funktionelle und physische Interaktion zwischen C/EBP- $\beta$  und Rel-Proteinen wurde mehrfach beschrieben [Grove and Plumb, 1993; LeClair *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1993]. Die durch LPS und IFN- $\gamma$  stimulierte Superoxid-Dismutase-Transkription wird durch die kooperative Interaktion zwischen NF- $\kappa$ B und C/EBP vermittelt [Maehara *et al.*, 1999]. Das IL-8-Gen wird in Jurkat-T-Zellen in synergistischer Weise durch NF- $\kappa$ B p65 und C/EBP- $\beta$  reguliert [Kunsch *et al.*, 1994]. Für die durch das Invasin-Protein aus *Yersinia enterocolitica* induzierte IL-8-Expression in Endothelzellen ist hingegen die Bindung von Rel-Proteinen ausreichend [Schulte *et al.*, 2000]. Eine Wechselwirkung zwischen konstitutiv an R(E) gebundenen C/EBP-Proteinen mit dem anderen an R(A) bindenden Faktor, Sp1, ist auch vorstellbar. In einem Zelltyp-spezifischen *composite element* (COMPEL) des CD11c-Integrin-Promotors modulieren Sp1-Faktoren die transaktivierende Wirkung von C/EBP- $\alpha$  [Lopez-Rodriguez *et al.*, 1997].

#### 7.3.4 *In silico*-Modellierung des RANTES-Promotors

Promotorsequenzen können durch *alignment*-Methoden nicht zuverlässig identifiziert werden. Es gibt jedoch Werkzeuge, mit denen Promotoren als eine Kombination aus individuellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen oder anderen regulatorischen Sequenzen beschrieben werden können. In dieser Arbeit wurden aus den experimentell gewonnenen Daten mit Hilfe des Computerprogramms FastM [Klingenhoff *et al.*, 1999] Modelle erzeugt. Sie sollten die für die LPS-induzierte RANTES-Transkription in Monocyten verwendeten Elemente beschreiben. Die Modelle wurden in einer ModelInspector-Analyse [Frech *et al.*, 1997] mit Datenbanksequenzen verglichen, um ähnlich strukturierte regulatorische Sequenzen zu identifizieren. Es wäre naheliegend, daß solche Sequenzen eine ähnliche Funktion haben, also zum Beispiel auch durch LPS induzierbar sind oder zu mit RANTES coregulierten Genen gehören.

Die drei Grundmodelle (M1-M3) enthielten das R(AB)-Promotor-Modul und ein TATA-Element. Diese Modelle wurden um ein C/EBP-Element erweitert, um die übergeordnete Anordnung im RANTES-Promotor zu beschreiben (M4-M6). Modell 1, das aus zwei p50/p65-Elementen bestand, identifizierte eine Sequenz im Promotor des Maus-Chemokins MIP-2 [Widmer *et al.*, 1993]. Daß der murine RANTES-Promotor durch keines der Modelle identifiziert werden konnte, ist dadurch zu erklären daß im Maus-Promotor die Elemente R(E) und R(B) fehlen, weshalb das murine Gegenstück wahrscheinlich anders reguliert ist als humanes RANTES [Danoff *et al.*, 1994].

Die durch die Modelle 1 und 4 beschriebene Anordnung fand sich in *immediate early*-Genen des Maus-Cytomegalievirus (CMV) [Dorsch-Hasler *et al.*, 1985]. Weil es schwierig ist, virale Sequenzen als Promotorsequenzen zu annotieren, waren diese beiden CMV-Treffer zusammen mit einer adenoviralen Sequenz, die durch Modell 3 beschrieben werden konnte, die einzigen viralen „Promotor-Treffer“. Eine ModellInspector-Suche ohne Filterung nach Promotor-Annotation ergab sehr viele virale Treffer. Zum Beispiel wurde die HIV-LTR-Region, von der bekannt ist, daß zwei NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen für die Aktivität wichtig sind [Al-Harhi and Roebuck, 1998], durch Modell 1 identifiziert.

Modell 3 enthielt das für die RANTES-Promotor-Aktivität in Monocyten wichtige Sp1-p50/p50-Promotor-Modul. Dieses Modell konnte eine Reihe von humanen und Vertebraten-Promotoren (Nagetiere, „andere Säugertiere“, „andere Wirbeltiere“) beschreiben. Darunter waren Gene, von denen bekannt ist, daß sie durch LPS auf transkriptioneller Ebene beeinflußt werden, wie zum Beispiel das *high mobility group protein-1* (HMG-I) und die schweren Ketten der Immunglobuline (Ig-H). Sie sind in Tabelle 1 mit zwei Sternen gekennzeichnet (\*\*). HMG-I wird in Makrophagen mit einer ähnlichen Kinetik wie RANTES durch LPS induziert und wird als späte Stufe der Kaskade, die von der LPS-Gabe zum Tod von Mäusen führt, gesehen [Wang *et al.*, 1999]. LPS induziert B-Zell-Proliferation und -Differenzierung und verstärkt die Transkription der Ig-H-Ketten [Yuan *et al.*, 1992].

Für eine zweite Klasse von Treffern ist es sehr gut vorstellbar, daß sie durch LPS reguliert werden, da sie Promotoren von Genprodukten sind, die mit LPS in einer physiologischen Verbindung stehen. Solche Treffer sind in Tabelle 1 mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Ein Beispiel ist das Gen für das Phospholipid-Transferase-Protein (PLTP), da PLTP LPS komplexieren und neutralisieren kann [Hailman *et al.*, 1996]. Für Histone und Protamine wurde gezeigt, daß sie LPS binden können [Bolton and Perry, 1997; Helander and Vaara, 1987]. Schließlich wird es interessant sein, zu klären, ob die identifizierten Promotoren/Gene,

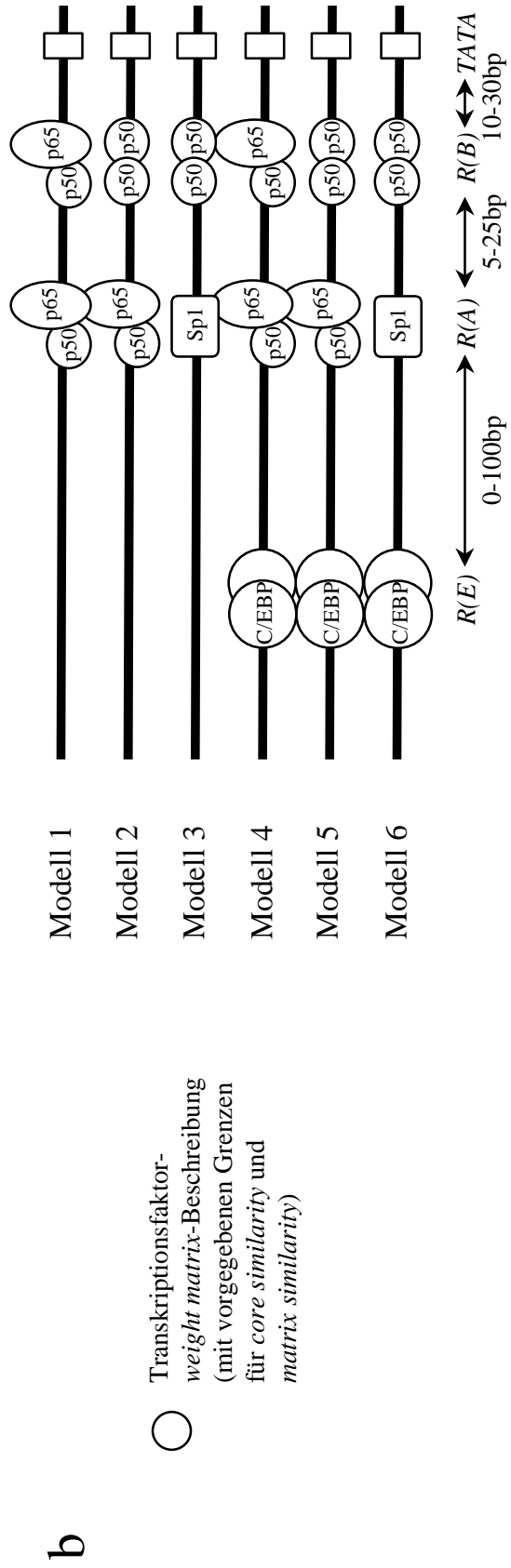
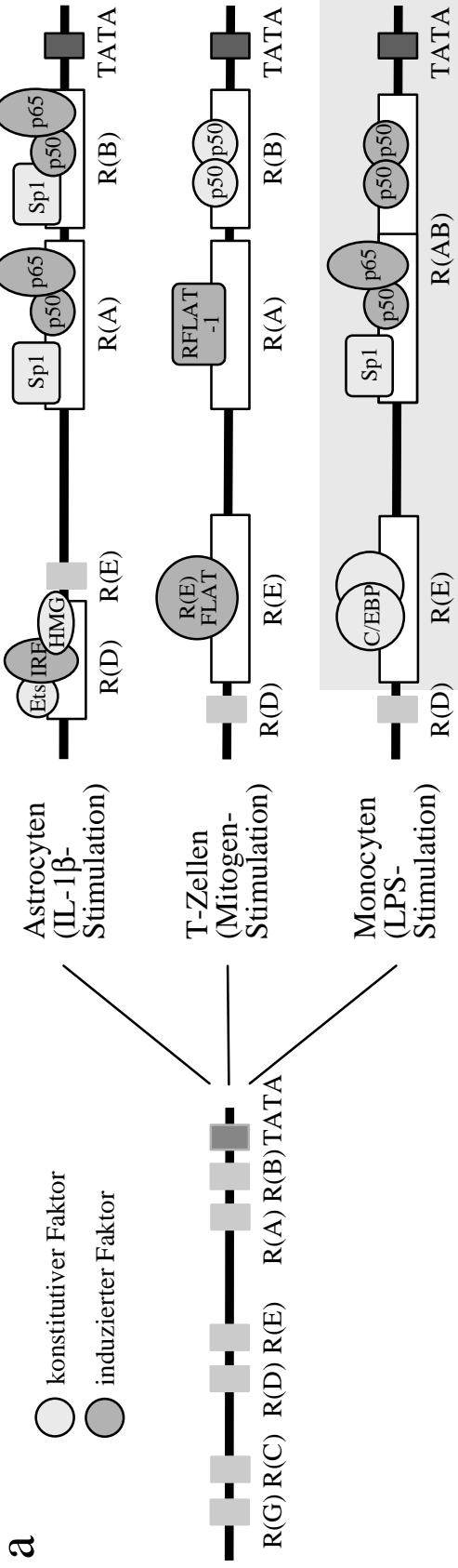
die bisher nicht mit LPS in Zusammenhang gebracht wurden, teilweise auch durch LPS beeinflusst werden können. Es ist geplant, den Einfluß einer Stimulation durch LPS auf die mRNA-Transkription dieser Kandidatengene mittels quantitativer PCR (TaqMan) zu untersuchen.

Die Tatsache, daß die Promotoren für  $\alpha$ -Actin, Myosin, HMG-I, Metallothionein, die Na-K-ATPase und *growth arrest specific-1* (*gas-1*) für mehr als eine Spezies gefunden wurden, ist ein Hinweis auf eine Konservierung regulatorischer Kontrollelemente im Verlauf der Evolution.

Ein Teil der Treffer für Modell 3 kann auch durch das um ein C/EBP-Element erweiterte Modell (M6), beschrieben werden. Es sind dies die schweren  $\beta$ -Myosin-Ketten des Menschen und des Schweins [Macallan and Griffin, 1994], die GTP-Cyclohydrolase I der Ratte [Dulak *et al.*, 1999], die Metallothioneine 1B des Menschen und des Seeigels [Lee *et al.*, 1999] und die Schlangen-Phospholipase A2 [Burgermeister *et al.*, 1999]. Alle diese Gene können durch LPS induziert werden. Modell 6 liefert also eine gute Näherung für die Anordnung individueller Bindungsstellen in einer durch LPS regulierbaren Promotorsequenz.

## 7.4 RANTES-Regulation in anderen Zelltypen

RANTES wird von einer großen Zahl von Zelltypen exprimiert. Dies geschieht jeweils mit unterschiedlicher Kinetik und unter Verwendung verschiedener Kontrollmechanismen [Lin *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 1997]. Die in der vorliegenden Arbeit für LPS-stimulierte Monocyten charakterisierten Regionen R(E) und R(AB) spielen auch bei der Kontrolle der RANTES-Expression in T-Zellen eine entscheidende Rolle. Die RANTES-Expression wird „spät“ (3-5 Tage) nach der Mitogen-Aktivierung ruhender T-Zellen des peripheren Blutes verstärkt [Ortiz *et al.*, 1997]. Auch in T-Zellen bindet die Region R(B) Rel p50-Homodimere. In diesem Zelltyp ist die Bindung jedoch konstitutiv. „Spät“ nach der Aktivierung wird ein Faktor, der als RFLAT-1 (*RANTES factor of late activated T cells-1*) bezeichnet wird, induziert und bindet an R(A) [Nelson *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1999]. Gleichzeitig wird das Binden eines noch nicht identifizierten Mitglieds der C/EBP-Familie an R(E) induziert. Dieser Faktor wurde als R(E)FLAT bezeichnet (*R(E) factor of late activated T cells*) [Ortiz *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1997].





**Abbildung 36: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktorbindung an den RANTES-Promotor in verschiedenen Zelltypen und abgeleitete Computermodelle.** a) Bindung von Transkriptionsfaktoren an den RANTES-Promotor in IL-1 $\beta$ -stimulierten Astrocyten, Mitogen-aktivierten T-Zellen und LPS-induzierten Monocyten. Die in dieser Arbeit untersuchten Ereignisse an R(E) und R(AB), die die RANTES-Transkription in Monocyten kontrollieren (durch Kasten hinterlegt) wurden modelliert, um nach potentiell coregulierten Genen zu suchen. b) Die dargestellten Modelle wurden mit Hilfe von FastM erzeugt und in einer ModelInspector-Analyse mit Datenbanksequenzen verglichen, um andere Promotorsequenzen zu identifizieren, die eine ähnliche übergeordnete Anordnung von funktionellen Elementen aufweisen.

Die Aktivierung der RANTES-Transkription in IL-1 $\beta$ -stimulierten Astrocyten wird durch das Binden von NF- $\kappa$ B (p50/p65) sowohl an R(A) als auch R(B) vermittelt. In unstimulierten Zellen sind diese beiden Regionen von Sp1 besetzt. Es wurde keine C/EBP-Bindung an R(E) beobachtet, jedoch scheint die direkt benachbarte Region R(D) benutzt zu werden. Sie bindet konstitutiv Mitglieder der Ets- und HMG-Familien. Nach Stimulation bindet R(D) ein noch nicht identifiziertes Mitglied der IRF-Familie, das wahrscheinlich als Repressor der Transkription wirkt [Miyamoto *et al.*, 2000].

In humanen Mesangialzellen wird die RANTES-Transkription durch die gleichzeitige Gabe von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  aktiviert. Auch in diesem Zelltyp binden nach der Stimulation sowohl R(A) als auch R(B) p50/p65-Heterodimere. In diesem Kontext funktioniert die Region R(AB) jedoch nicht als Promotor-Modul, da die Induzierbarkeit in diesem Kontext nicht auf einen heterologen Promotor übertragen werden kann. R(E) spielt offensichtlich keine Rolle. Statt dessen werden Regionen verwendet, die in Monocyten und T-Zellen nicht funktionell sind (C. Zischek, persönliche Mitteilung).

Die Vorgänge an R(DE) und R(AB), die die Transkription des RANTES-Gens in IL-1 $\beta$ -stimulierten Astrocyten, Mitogen-aktivierten T-Zellen und LPS-induzierten Monocyten kontrollieren, sind in Abbildung 36 schematisch dargestellt. Die Abbildung zeigt auch eine Übersicht über die abgeleiteten Computermodelle. Das LPS-induzierbare Element R(G), das weiter vom Transkriptionsstart entfernt liegt, wurde an anderer Stelle ausführlich charakterisiert [Boehlk *et al.*, 2000]. In Astrocyten ist die konstitutive Bindung von Fra-1, Fra-2 und JunD an R(G) an der Aktivierung durch IL-1 $\beta$  beteiligt [Miyamoto *et al.*, 2000], während ein Teil der RANTES-Transkriptionsaktivierung in Mesangialzellen durch die konstitutive Bindung von Fra-1, FosB, JunD und ATF-2 an R(G) vermittelt wird (C. Zischek, persönliche Mitteilung). An den Prozessen, die bei der „späten“ Aktivierung der RANTES-Expression in Mitogen-aktivierten T-Zellen ablaufen, ist R(G) nicht beteiligt [Nelson *et al.*, 1993].

## 7.5 Ausblick

Die Aufklärung des komplexen Systems, das die Expression des RANTES-Gens in verschiedenen Zelltypen als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli mit „früher“ oder „später“ Kinetik kontrolliert, liefert wichtige Erkenntnisse über allgemeine Mechanismen der transkriptionellen Regulation. Die genaue Kenntnis der Vorgänge könnte eine Gewebespezifische Modulation der RANTES-Expression durch spezifische Therapeutika ermöglichen.

Die Kombination der funktionellen Promotoranalyse mit der Modellierung der Promotororganisation mit Werkzeugen der Bioinformatik könnte nun, da die Daten aus den diversen Genomsequenzierungsprojekten zugänglich sind, das Verständnis der Genregulation entscheidend voranbringen. Mit Hilfe des hier verwendeten Modellierungsansatzes können Kandidatengene für gemeinsame Regulationsmuster identifiziert werden. Eine Übertragung auf Bereiche wie die Entwicklung synthetischer Zelltyp-spezifischer Promotoren für die Gentherapie oder die Analyse von Gengruppen, die durch *microarray*-Analysen identifiziert wurden, erscheint vielversprechend.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aderem A. and Ulevitch R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- al Sharif F., Ollier W. E. and Hajeer A. H. (1999) A rare polymorphism at position -28 in the human RANTES promoter. *Eur J Immunogenet* **26**, 373-374.
- Alam R., Stafford S., Forsythe P., Harrison R., Faubion D., Lett-Brown M. A. and Grant J. A. (1993) RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* **150**, 3442-3448.
- Alam R., York J., Boyars M., Stafford S., Grant J. A., Lee J., Forsythe P., Sim T. and Ida N. (1996) Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* **153**, 1398-1404.
- Al-Harathi L. and Roebuck K. A. (1998) Human immunodeficiency virus type-1 transcription: role of the 5'-untranslated leader region. *Int J Mol Med* **1**, 875-881.
- Alkhatib G., Combadiere C., Broder C. C., Feng Y., Kennedy P. E., Murphy P. M. and Berger E. A. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.
- Amara A., Gall S. L., Schwartz O., Salamero J., Montes M., Loetscher P., Baggiolini M., Virelizier J. L. and Arenzana-Seisdedos F. (1997) HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* **186**, 139-146.
- Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J. L., Rousset D., Clark-Lewis I., Loetscher P., Moser B. and Baggiolini M. (1996) HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* **383**, 400.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bacon K. B., Flores-Romo L., Aubry J. P., Wells T. N. and Power C. A. (1994) Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers. *Immunology* **82**, 473-481.
- Bacon K. B., Premack B. A., Gardner P. and Schall T. J. (1995) Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* **269**, 1727-1730.
- Baeuerle P. A. (1998) I-kappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* **95**, 729-731.
- Baeuerle P. A. and Baltimore D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.
- Baggiolini M. and Clark-Lewis I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* **307**, 97-101.
- Baggiolini M., Dewald B. and Moser B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* **15**, 675-705.

- 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.
- Bentley D. R. (2000) The Human Genome Project--an overview. *Med Res Rev* **20**, 189-196.
- Berg J. M. (1992) Sp1 and the subfamily of zinc finger proteins with guanine-rich binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11109-11110.
- Boehlk S., Fessele S., Mojaat A., Miyamoto N. G., Werner T., Nelson E. L., Schlöndorff D. and Nelson P. J. (2000) ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol* **30**, 1102-1112.
- Bolton S. J. and Perry V. H. (1997) Histone H1; a neuronal protein that binds bacterial lipopolysaccharide. *J Neurocytol* **26**, 823-831.
- Bours V., Franzoso G., Azarenko V., Park S., Kanno T., Brown K. and Siebenlist U. (1993) The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* **72**, 729-739.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brightbill H. D. and Modlin R. L. (2000) Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology* **101**, 1-10.
- Burgermeister E., Tibes U., Stockinger H. and Scheuer W. V. (1999) Activation of nuclear factor-kappaB by lipopolysaccharide in mononuclear leukocytes is prevented by inhibitors of cytosolic phospholipase A2. *Eur J Pharmacol* **369**, 373-386.
- Butcher E. C. and Picker L. J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66.
- Campbell J. J., Foxman E. F. and Butcher E. C. (1997) Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *Eur J Immunol* **27**, 2571-2578.
- Cao Z., Xiong J., Takeuchi M., Kurama T. and Goeddel D. V. (1996) TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443-446.
- Carey M. (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**, 5-8.
- Chihara J., Hayashi N., Kakazu T., Yamamoto T., Kurachi D. and Nakajima S. (1994) RANTES augments radical oxygen products from eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* **104**, 52-53.
- Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Ponath P. D., Wu L., Mackay C. R., LaRosa G., Newman W., Gerard N., Gerard C. and Sodroski J. (1996) The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.

- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Church G. M. and Gilbert W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1991-1995.
- Cocchi F., DeVico A. L., Garzino-Demo A., Arya S. K., Gallo R. C. and Lusso P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815.
- Danoff T. M., Lalley P. A., Chang Y. S., Heeger P. S. and Neilson E. G. (1994) Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of the Scya5 gene encoding the murine chemokine RANTES. *J Immunol* **152**, 1182-1189.
- Darveau R. P. (1998) Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol* **1**, 36-42.
- Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R. E., Hill C. M., Davis C. B., Peiper S. C., Schall T. J., Littman D. R. and Landau N. R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.
- Devergne O., Marfaing-Koka A., Schall T. J., Leger-Ravet M. B., Sadick M., Peuchmaur M., Crevon M. C., Kim K. J., Schall T. T., Kim T. and et al. (1994) Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med* **179**, 1689-1694.
- DiDonato J. A., Hayakawa M., Rothwarf D. M., Zandi E. and Karin M. (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**, 548-554.
- Donlon T. A., Krensky A. M., Wallace M. R., Collins F. S., Lovett M. and Clayberger C. (1990) Localization of a human T-cell-specific gene, RANTES (D17S136E), to chromosome 17q11.2-q12. *Genomics* **6**, 548-553.
- Doranz B. J., Rucker J., Yi Y., Smyth R. J., Samson M., Peiper S. C., Parmentier M., Collman R. G. and Doms R. W. (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158.
- Dorsch-Hasler K., Keil G. M., Weber F., Jasin M., Schaffner W. and Koszinowski U. H. (1985) A long and complex enhancer activates transcription of the gene coding for the highly abundant immediate early mRNA in murine cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8325-8329.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G. P., Martin S. R., Huang Y., Nagashima K. A., Cayanan C., Maddon P. J., Koup R. A., Moore J. P. and Paxton W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Dulak J., Polus M., Guevara I., Hartwich J., Wybranska I., Krzesz R. and Dembinska-Kiec A. (1999) Oxidized low density lipoprotein inhibits inducible nitric oxide synthase, GTP cyclohydrolase I and transforming growth factor beta gene expression in rat macrophages. *J Physiol Pharmacol* **50**, 429-441.

- Ebisawa M., Yamada T., Bickel C., Klunk D. and Schleimer R. P. (1994) Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol* **153**, 2153-2160.
- Feinberg A. P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**, 6-13.
- Fessele S., Boehlk S., Mojaat A., Miyamoto N. G., Werner T., Nelson E. L., Schlöndorff D. and Nelson P. J. (2001) Molecular and in silico characterization of a promoter module and C/EBP element that mediate LPS induced RANTES/CCL5 expression in monocytic cells. *Faseb J* published online Jan 5.
- Flo T. H., Halaas O., Lien E., Ryan L., Teti G., Golenbock D. T., Sundan A. and Espevik T. (2000) Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* **164**, 2064-2069.
- Frech K., Brack-Werner R. and Werner T. (1996) Common modular structure of lentivirus LTRs. *Virology* **224**, 256-267.
- Frech K., Danescu-Mayer J. and Werner T. (1997) A novel method to develop highly specific models for regulatory units detects a new LTR in GenBank which contains a functional promoter. *J Mol Biol* **270**, 674-687.
- Fujita T., Nolan G. P., Liou H. C., Scott M. L. and Baltimore D. (1993) The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* **7**, 1354-1363.
- Galas D. J. and Schmitz A. (1978) DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **5**, 3157-3170.
- Giese K., Kingsley C., Kirshner J. R. and Grosschedl R. (1995) Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* **9**, 995-1008.
- Gröne H. J., Weber C., Weber K. S. C., Gröne E. F., Rabelink T., Klier C. M., Wells T. N. C., Proudfoot A. E., Schlöndorff D. and Nelson P. J. (1999) Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *Faseb J* **13**, 1371-1383.
- Grosschedl R. (1995) Higher-order nucleoprotein complexes in transcription: analogies with site-specific recombination. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 362-370.
- Grove M. and Plumb M. (1993) C/EBP, NF-kappa B, and c-Ets family members and transcriptional regulation of the cell-specific and inducible macrophage inflammatory protein 1 alpha immediate-early gene. *Mol Cell Biol* **13**, 5276-5289.
- Hailman E., Albers J. J., Wolfbauer G., Tu A. Y. and Wright S. D. (1996) Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* **271**, 12172-12178.
- Hajeer A. H., al Sharif F. and Ollier W. E. (1999) A polymorphism at position -403 in the human RANTES promoter. *Eur J Immunogenet* **26**, 375-376.

- Hedrick J. A., Saylor V., Figueroa D., Mizoue L., Xu Y., Menon S., Abrams J., Handel T. and Zlotnik A. (1997) Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**, 1533-1540.
- Heinemeyer T., Chen X., Karas H., Kel A. E., Kel O. V., Liebich I., Meinhardt T., Reuter I., Schacherer F. and Wingender E. (1999) Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res* **27**, 318-322.
- Helander I. M. and Vaara M. (1987) Reversible binding of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharides by immobilized protamine. *Eur J Biochem* **163**, 51-55.
- Hirano F., Tanaka H., Hirano Y., Hiramoto M., Handa H., Makino I. and Scheidereit C. (1998) Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* **18**, 1266-1274.
- Hodge-Dufour J., Noble P. W., Horton M. R., Bao C., Wysoka M., Burdick M. D., Strieter R. M., Trinchieri G. and Pure E. (1997) Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol* **159**, 2492-2500.
- Hogg N., MacDonald S., Slusarenko M. and Beverley P. C. (1984) Monoclonal antibodies specific for human monocytes, granulocytes and endothelium. *Immunology* **53**, 753-767.
- Horuk R., Chitnis C. E., Darbonne W. C., Colby T. J., Rybicki A., Hadley T. J. and Miller L. H. (1993) A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* **261**, 1182-1184.
- Hu H. M., Baer M., Williams S. C., Johnson P. F. and Schwartz R. C. (1998) Redundancy of C/EBP alpha, -beta, and -delta in supporting the lipopolysaccharide-induced transcription of IL-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol* **160**, 2334-2342.
- Janeway C. A., Jr. and Medzhitov R. (1998) Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* **10**, 349-350.
- Kameyoshi Y., Dorschner A., Mallet A. I., Christophers E. and Schroder J. M. (1992) Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* **176**, 587-592.
- Kapp A., Zeck-Kapp G., Czech W. and Schopf E. (1994) The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *J Invest Dermatol* **102**, 906-914.
- Kel O. V., Romaschenko A. G., Kel A. E., Wingender E. and Kolchanov N. A. (1995) A compilation of composite regulatory elements affecting gene transcription in vertebrates. *Nucleic Acids Res* **23**, 4097-4103.
- 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 et al. (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-1399.
- Kim T. K. and Maniatis T. (1997) The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol Cell* **1**, 119-129.

- Kirschning C. J., Wesche H., Merrill Ayres T. and Rothe M. (1998) Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* **188**, 2091-2097.
- Klier C. M. and Nelson P. J. (1999) Chemokine-induced extravasation of MonoMac 6 cells: chemotaxis and MMP activity. *Ann N Y Acad Sci* **878**, 575-577.
- Klingenhoff A., Frech K., Quandt K. and Werner T. (1999) Functional promoter modules can be detected by formal models independent of overall nucleotide sequence similarity. *Bioinformatics* **15**, 180-186.
- Koch A. E., Kunkel S. L. and Strieter R. M. (1995) Cytokines in rheumatoid arthritis. *J Investig Med* **43**, 28-38.
- Kopp E. B. and Medzhitov R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **11**, 13-18.
- Kornbluth R. S., Kee K. and Richman D. D. (1998) CD40 ligand (CD154) stimulation of macrophages to produce HIV-1-suppressive beta-chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5205-5210.
- Kunsch C., Lang R. K., Rosen C. A. and Shannon M. F. (1994) Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* **153**, 153-164.
- Kwok P. Y. and Gu Z. (1999) Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today* **5**, 538-543.
- Lavorgna G., Boncinelli E., Wagner A. and Werner T. (1998) Detection of potential target genes in silico? *Trends Genet* **14**, 375-376.
- LeClair K. P., Blonar M. A. and Sharp P. A. (1992) The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8145-8149.
- Lee D. K., Carrasco J., Hidalgo J. and Andrews G. K. (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* **337**, 59-65.
- Lekstrom-Himes J. and Xanthopoulos K. G. (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 28545-28548.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M. and Hoffmann J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Leppert D., Waubant E., Galaray R., Bunnett N. W. and Hauser S. L. (1995) T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* **154**, 4379-4389.
- Lin R., Heylbroeck C., Genin P., Pitha P. M. and Hiscott J. (1999) Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol* **19**, 959-966.
- Liu H., Chao D., Nakayama E. E., Taguchi H., Goto M., Xin X., Takamatsu J. K., Saito H., Ishikawa Y., Akaza T., Juji T., Takebe Y., Ohishi T., Fukutake K., Maruyama Y., Yashiki



- S., Sonoda S., Nakamura T., Nagai Y., Iwamoto A. and Shioda T. (1999) Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4581-4585.
- Lloyd C. M., Gonzalo J. A., Salant D. J., Just J. and Gutierrez-Ramos J. C. (1997) Intercellular adhesion molecule-1 deficiency prolongs survival and protects against the development of pulmonary inflammation during murine lupus. *J Clin Invest* **100**, 963-971.
- Lodi P. J., Garrett D. S., Kuszewski J., Tsang M. L., Weatherbee J. A., Leonard W. J., Gronenborn A. M. and Clore G. M. (1994) High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* **263**, 1762-1767.
- Lopez-Rodriguez C., Botella L. and Corbi A. L. (1997) CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. *J Biol Chem* **272**, 29120-29126.
- Luckow B. and Schütz G. (1991) Linker scanning mutagenesis. *Mutagenesis: A Practical Approach*. M. McPherson, ed. IRL Press, Oxford, Washington DC, p. 101 - 133.
- Macallan D. C. and Griffin G. E. (1994) Cardiac muscle protein gene expression in the endotoxin-treated rat. *Clin Sci (Colch)* **87**, 539-546.
- Maehara K., Hasegawa T., Xiao H., Takeuchi A., Abe R. and Isobe K. (1999) Cooperative interaction of NF-kappaB and C/EBP binding sites is necessary for manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *FEBS Lett* **449**, 115-119.
- Maghazachi A. A., al-Aoukaty A. and Schall T. J. (1994) C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* **153**, 4969-4977.
- Malinin N. L., Boldin M. P., Kovalenko A. V. and Wallach D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* **385**, 540-544.
- Mantovani A. (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* **20**, 254-257.
- Marfaing-Koka A., Devergne O., Gorgone G., Portier A., Schall T. J., Galanaud P. and Emilie D. (1995) Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol* **154**, 1870-1878.
- Mathison J. C., Wolfson E. and Ulevitch R. J. (1988) Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* **81**, 1925-1937.
- Mayall T. P., Sheridan P. L., Montminy M. R. and Jones K. A. (1997) Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR alpha enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev* **11**, 887-899.
- McKee C. M., Penno M. B., Cowman M., Burdick M. D., Strieter R. M., Bao C. and Noble P. W. (1996) Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest* **98**, 2403-2413.

- Medvedev A. E., Kopydlowski K. M. and Vogel S. N. (2000) Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* **164**, 5564-5574.
- Medzhitov R. and Janeway C. A., Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. and Janeway C. A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S. and Janeway C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* **2**, 253-258.
- Merika M., Williams A. J., Chen G., Collins T. and Thanos D. (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* **1**, 277-287.
- Miller R. A. and Kirkpatrick J. W. (1969) Column chromatography of phosphorylated nucleosides and deoxynucleosides on PEI-cellulose. *Anal Biochem* **27**, 306-310.
- Miyamoto N. G., Medberry P. S., Hesselgesser J., Boehlk S., Nelson P. J., Krensky A. M. and Perez H. D. (2000) Interleukin-1beta induction of the chemokine RANTES promoter in the human astrocytoma line CH235 requires both constitutive and inducible transcription factors. *J Neuroimmunol* **105**, 78-90.
- Murphy P. M., Baggiolini M., Charo I. F., Hebert C. A., Horuk R., Matsushima I., Miller L. H., Oppenheim J. J. and Power C. A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 145-176.
- Murphy T. L., Cleveland M. G., Kulesza P., Magram J. and Murphy K. M. (1995) Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* **15**, 5258-5267.
- Muzio M., Natoli G., Saccani S., Levrero M. and Mantovani A. (1998) The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* **187**, 2097-2101.
- Na S. Y., Lee S. K., Han S. J., Choi H. S., Im S. Y. and Lee J. W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem* **273**, 10831-10834.
- Nakagoshi H., Nagase T., Kanei-Ishii C., Ueno Y. and Ishii S. (1990) Binding of the c-myc proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J Biol Chem* **265**, 3479-3483.
- Nelson E. L., Strobl S., Subleski J., Prieto D., Kopp W. C. and Nelson P. J. (1999) Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF- alpha: modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation. *Faseb J* **13**, 2021-2030.

- 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.
- Nelson P. J. and Krensky A. M. (1998) Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr Opin Immunol* **10**, 265-270.
- Nelson P. J. and Krensky A. M. (2001) Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. *Immunity* **in press**.
- Nelson P. J., Ortiz B. D., Pattison J. M. and Krensky A. M. (1996) Identification of a novel regulatory region critical for expression of the RANTES chemokine in activated T lymphocytes. *J Immunol* **157**, 1139-1148.
- Nelson P. J., Pattison J. M. and Krensky A. M. (1998) RANTES. In *Cytokines* (Edited by Mire-Sluis A. and Thorpe R.), p. 433-448. Academic Press, San Diego, CA.
- Nickel R. G., Casolaro V., Wahn U., Beyer K., Barnes K. C., Plunkett B. S., Freidhoff L. R., Sengler C., Plitt J. R., Schleimer R. P., Caraballo L., Naidu R. P., Levett P. N., Beaty T. H. and Huang S. K. (2000) Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol* **164**, 1612-1616.
- Nickel R. G., Saitta F. P., Freidhoff L. R., Yu X. Y., Ehrlich E., Barnes K. C., Beaty T. and Huang S. K. (1999) Positional candidate gene approach and functional genomics strategy in atopy gene discovery. *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 282-284.
- Ninomiya-Tsuji J., Kishimoto K., Hiyama A., Inoue J., Cao Z. and Matsumoto K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* **398**, 252-256.
- Noble P. W., McKee C. M., Cowman M. and Shin H. S. (1996) Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med* **183**, 2373-2378.
- Nomura F., Akashi S., Sakao Y., Sato S., Kawai T., Matsumoto M., Nakanishi K., Kimoto M., Miyake K., Takeda K. and Akira S. (2000) Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* **164**, 3476-3479.
- Ortiz B. D., Krensky A. M. and Nelson P. J. (1996) Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation. *Mol Cell Biol* **16**, 202-210.
- Ortiz B. D., Nelson P. J. and Krensky A. M. (1997) Switching gears during T-cell maturation: RANTES and late transcription. *Immunol Today* **18**, 468-471.
- Pattison J., Nelson P. J., Huie P., von Leuttichau I., Farshid G., Sibley R. K. and Krensky A. M. (1994) RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* **343**, 209-211.
- Pattison J. M., Nelson P. J., Huie P., Sibley R. K. and Krensky A. M. (1996) RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. *J Heart Lung Transplant* **15**, 1194-1199.

- Pease J. E. and Murphy P. M. (1998) Microbial corruption of the chemokine system: an expanding paradigm. *Semin Immunol* **10**, 169-178.
- Perera P. Y., Vogel S. N., Detore G. R., Haziot A. and Goyert S. M. (1997) CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J Immunol* **158**, 4422-4429.
- Perier R. C., Praz V., Junier T., Bonnard C. and Bucher P. (2000) The eukaryotic promoter database (EPD). *Nucleic Acids Res* **28**, 302-303.
- Perkins N. D., Edwards N. L., Duckett C. S., Agranoff A. B., Schmid R. M. and Nabel G. J. (1993) A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *Embo J* **12**, 3551-3558.
- Philipsen S. and Suske G. (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* **27**, 2991-3000.
- Plevy S. E., Gemberling J. H., Hsu S., Dorner A. J. and Smale S. T. (1997) Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 4572-4588.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M. Y., Huffel C. V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B. and Beutler B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
- Pongubala J. M., Nagulapalli S., Klemsz M. J., McKercher S. R., Maki R. A. and Atchison M. L. (1992) PU.1 recruits a second nuclear factor to a site important for immunoglobulin kappa 3' enhancer activity. *Mol Cell Biol* **12**, 368-378.
- Proost P., De Meester I., Schols D., Struyf S., Lambeir A. M., Wuyts A., Opdenakker G., De Clercq E., Scharpe S. and Van Damme J. (1998) Amino-terminal truncation of chemokines by CD26/dipeptidyl-peptidase IV. Conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem* **273**, 7222-7227.
- Proudfoot A. E., Power C. A., Hoogewerf A. J., Montjovent M. O., Borlat F., Offord R. E. and Wells T. N. (1996) Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* **271**, 2599-2603.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E. and Werner T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**, 4878-4884.
- Rathanswami P., Hachicha M., Sadick M., Schall T. J. and McColl S. R. (1993) Expression of the cytokine rantes in human rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 5834-5839.
- Reyes P. (1972) PEI-cellulose thin-layer chromatography: a highly versatile system for separating purine and pyrimidine nucleotides from nucleosides and free bases. *Anal Biochem* **50**, 35-39.

- Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. and et al. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb J* **8**, 217-225.
- Rock F. L., Hardiman G., Timans J. C., Kastelein R. A. and Bazan J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-593.
- Romagnani S. (1992) Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response?. *Immunol Today* **13**, 379-381.
- Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Rossi D. and Zlotnik A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242.
- Rot A. (1993) Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* **23**, 303-306.
- Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual (2nd edition). *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York*.
- Samson M., Libert F., Doranz B. J., Rucker J., Liesnard C., Farber C. M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R. J., Collman R. G., Doms R. W., Vassart G. and Parmentier M. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725.
- Schall T. J. (1991) Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* **3**, 165-183.
- Schall T. J., Bacon K., Toy K. J. and Goeddel D. V. (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669-671.
- Schall T. J. and Bacon K. B. (1994) Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* **6**, 865-873.
- Schall T. J., Jongstra J., Dyer B. J., Jorgensen J., Clayberger C., Davis M. M. and Krensky A. M. (1988) A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* **141**, 1018-1025.
- Schreiber E., Matthias P., Muller M. M. and Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419.
- Schulte R., Grassl G. A., Preger S., Fessele S., Jacobi C. A., Schaller M., Nelson P. J. and Autenrieth I. B. (2000) Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *Faseb J* **14**, 1471-1484.
- Segerer S., Nelson P. J. and Schlöndorff D. (2000) Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* **11**, 152-176.

- Shin H. S., Drysdale B. E., Shin M. L., Noble P. W., Fisher S. N. and Paznekas W. A. (1994) Definition of a Lipopolysaccharide-Responsive Element in the 5'-Flanking Regions of MuRANTES and *crg-2*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2914-2925.
- Siebenlist U., Franzoso G. and Brown K. (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 405-455.
- Simmons G., Clapham P. R., Picard L., Offord R. E., Rosenkilde M. M., Schwartz T. W., Buser R., Wells T. N. C. and Proudfoot A. E. (1997) Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* **276**, 276-279.
- Skelton N. J., Aspiras F., Ogez J. and Schall T. J. (1995) Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry* **34**, 5329-5342.
- Song A., Chen Y. F., Thamatrakoln K., Storm T. A. and Krensky A. M. (1999) RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity* **10**, 93-103.
- Song H. Y., Regnier C. H., Kirschning C. J., Goeddel D. V. and Rothe M. (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9792-9796.
- Southern P. J. and Berg P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* **1**, 327-341.
- Springer T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Stein B., Cogswell P. C. and Baldwin A. S., Jr. (1993) Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* **13**, 3964-3974.
- Stellato C., Beck L. A., Gorgone G. A., Proud D., Schall T. J., Ono S. J., Lichtenstein L. M. and Schleimer R. P. (1995) Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. *J Immunol* **155**, 410-418.
- Tanaka Y., Adams D. H., Hubscher S., Hirano H., Siebenlist U. and Shaw S. (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**, 79-82.
- Taub D. D. (1996) Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 355-376.
- Taub D. D., Lloyd A. R., Wang J. M., Oppenheim J. J. and Kelvin D. J. (1993) The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol* **351**, 139-146.
- Taub D. D., Sayers T. J., Carter C. R. and Ortaldo J. R. (1995) Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **155**, 3877-3888.

- Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T. and Tada K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171-176.
- Turner L., Ward S. G. and Westwick J. (1995) RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol* **155**, 2437-2444.
- Ueda A., Okuda K., Ohno S., Shirai A., Igarashi T., Matsunaga K., Fukushima J., Kawamoto S., Ishigatsubo Y. and Okubo T. (1994) NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* **153**, 2052-2063.
- Ulevitch R. J. and Tobias P. S. (1999) Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **11**, 19-22.
- Vaddi K. and Newton R. C. (1994) Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* **153**, 4721-4732.
- Valente J. F. and Alexander J. W. (1998) Immunobiology of renal transplantation. *Surg Clin North Am* **78**, 1-26.
- van der Wal A. C., Becker A. E., van der Loos C. M. and Das P. K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **89**, 36-44.
- VanOtteren G. M., Strieter R. M., Kunkel S. L., Paine R., 3rd, Greenberger M. J., Danforth J. M., Burdick M. D. and Standiford T. J. (1995) Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J Immunol* **154**, 1900-1908.
- Verani A., Scarlatti G., Comar M., Tresoldi E., Polo S., Giacca M., Lusso P., Siccardi A. G. and Vercelli D. (1997) C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J Exp Med* **185**, 805-816.
- Vinson C. R., Hai T. and Boyd S. M. (1993) Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev* **7**, 1047-1058.
- von Luetlichau I., Nelson P. J., Pattison J. M., van de Rijn M., Huie P., Warnke R., Wiedermann C. J., Stahl R. A., Sibley R. K. and Krensky A. M. (1996) RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. *Cytokine* **8**, 89-98.
- Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J. M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., Manogue K. R., Faist E., Abraham E., Andersson J., Andersson U., Molina P. E., Abumrad N. N., Sama A. and Tracey K. J. (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248-251.
- Weber C., Alon R., Moser B. and Springer T. A. (1996) Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol* **134**, 1063-1073.
- Widmer U., Manogue K. R., Cerami A. and Sherry B. (1993) Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta,

- members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* **150**, 4996-5012.
- Witt D. P. and Lander A. D. (1994) Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol* **4**, 394-400.
- Wong P. M., Chugn S. W. and Sultzer B. M. (2000) Genes, receptors, signals and responses to lipopolysaccharide endotoxin. *Scand J Immunol* **51**, 123-127.
- Wright S. D. (1999) Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med* **189**, 605-609.
- Wright S. D., Ramos R. A., Tobias P. S., Ulevitch R. J. and Mathison J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.
- Wu G. D., Lai E. J., Huang N. and Wen X. (1997) Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* **272**, 2396-2403.
- Xia M., Leppert D., Hauser S. L., Sreedharan S. P., Nelson P. J., Krensky A. M. and Goetzl E. J. (1996) Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* **156**, 160-167.
- Yamanaka R., Lekstrom-Himes J., Barlow C., Wynshaw-Boris A. and Xanthopoulos K. G. (1998) CCAAT/enhancer binding proteins are critical components of the transcriptional regulation of hematopoiesis. *Int J Mol Med* **1**, 213-221.
- Yang R. B., Mark M. R., Gray A., Huang A., Xie M. H., Zhang M., Goddard A., Wood W. I., Gurney A. L. and Godowski P. J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.
- Yuan D., Wilder J. A., Moore B. B. and Dang T. (1992) Mechanism of lipopolysaccharide-mediated transcriptional enhancement of the mu gene. *J Immunol* **148**, 3652-3657.
- Zagariya A., Mungre S., Lovis R., Birrer M., Ness S., Thimmapaya B. and Pope R. (1998) Tumor necrosis factor alpha gene regulation: enhancement of C/EBPbeta-induced activation by c-Jun. *Mol Cell Biol* **18**, 2815-2824.
- Ziegler-Heitbrock H. W. (1989) The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* **49**, 1-12.
- Ziegler-Heitbrock H. W. L., Thiel E., Fütterer A., Herzog V., Wirtz A. and Riethmüller G. (1987) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* **41**, 456-461.
- Zlotnik A. and Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-127.
- Zybarth G., Reiling N., Schmidtmayerova H., Sherry B. and Bukrinsky M. (1999) Activation-induced resistance of human macrophages to HIV-1 infection in vitro. *J Immunol* **162**, 400-406.



## 9 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

**Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden im *FASEB Journal* unter der Rubrik *FJ Express* veröffentlicht:**

Fessele S., Boehlk S., Mojaat A., Miyamoto N. G., Werner T., Nelson E. L., Schlöndorff D. and Nelson P. J. (2001) Molecular and in silico characterization of a promoter module and C/EBP element that mediate LPS induced RANTES/CCL5 expression in monocytic cells. *Faseb J* (January 5, 2001) 10.1096/fj.00-0459fje.

### **Weitere Publikationen:**

Boehlk S., Fessele S., Mojaat A., Miyamoto N. G., Werner T., Nelson E. L., Schlöndorff D. and Nelson P. J. (2000) ATF and Jun transcription factors, acting through an Ets/CRE promoter module, mediate lipopolysaccharide inducibility of the chemokine RANTES in monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur J Immunol* **30**, 1102-1112.

Schulte R., Grassl G. A., Preger S., Fessele S., Jacobi C. A., Schaller M., Nelson P. J. and Autenrieth I. B. (2000) Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *Faseb J* **14**, 1471-1484.

### **In Bearbeitung:**

Fessele S., Maier H., Zischek C., Nelson P. J. and Werner T.: In silico analysis and modeling of the tissue specific control of the RANTES/CCL5 promoter demonstrates a molecular basis for co-regulated genes.

Zischek C., Fessele S., Banas B., Mojaat A., Maier H., Boehlk S., Schlöndorff D. and Nelson P. J.: Transcriptional regulation and in silico modeling of the chemokine RANTES/CCL5 promoter in a human mesangial cell line: response to TNF-alpha and gamma-IFN.

Grassl G. A., Fessele S., Merfort I., Klaas C. A., Castro V., Murillo R., Nelson P. J. and Autenrieth I. B.: Differential effects of sesquiterpene lactones on Yersinia enterocolitica-triggered transcription of IL-8 and MCP-1.

### **Posterpräsentationen:**

Fessele S., Boehlk S., Miyamoto N. G., Schlöndorff D. and Nelson P. J.: LPS induction of RANTES expression in monocytic cells: Role of ATF-4, Jun and C/EBP. *Experimental Biology '99 Meeting, April 1999, Washington, DC.*

Fessele S., Boehlk S., Mojaat A., Werner T., Schlöndorff D. and Nelson P. J.: LPS control of RANTES transcription in monocytic cells. *European Life Science Organisation, September 2000, Geneva, Switzerland.*

Grassl G. A., Fessele S., Merfort I., Klaas C. A., Castro V., Murillo R., Nelson P. J. and Autenrieth I. B.: Differential effects of sesquiterpene lactones on Yersinia enterocolitica-triggered transcription of IL-8 and MCP-1. *European Life Science Organisation, September 2000, Geneva, Switzerland.*



---

## 10 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt

Prof. Dr. D. Schlöndorff für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor durchführen zu können.

Prof. Dr. P. Scheurich für das Vertreten der Arbeit vor der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart, für die sehr gute Betreuung und für die Lehrveranstaltungen während des Studiums. PD Dr. H. Wajant danke ich dafür, daß er die Aufgabe des Mitberichters übernommen hat.

Dr. P. J. Nelson für das interessante Thema, die hervorragende Anleitung, seine positive Einstellung und für die Freiheit, die er mir gelassen hat.

der Firma Genomatix für die Benutzung der GEMS-Software. Mein besonderer Dank gilt Kornelie Frech.

Dr. B. Luckow für die technischen Ratschläge und für seine große Hilfsbereitschaft.

Dr. Sabine Böhlk und Anke Mojaat für die sehr gute Zusammenarbeit und für die dieser Arbeit vorangegangenen Untersuchungen zum Thema.

Anke Mojaat, Dr. Sabine Böhlk, Dr. Christiane Klier, Christian Zischek, Ana Belén Vicente Arroyo und den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme Laborklima.

Holger Maier und den Tieren für Ratschläge, Diskussionen und Unterstützung.

# 11 LEBENS LAUF

## Persönliche Daten:

Name: Sabine Fessele  
 Anschrift: Normannenstr. 6, 81925 München  
 Geburt: 08.09.1971 in Tübingen  
 Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1978-1982 Lembergschule Nagold GHS  
 1982-1991 Otto-Hahn-Gymnasium Nagold, Abschluß: Abitur (Note: 1.2)

## Studium:

10/91-03/97 Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart  
 Schwerpunkte: Immunologie, Bioverfahrenstechnik  
 Abschluß: Diplom (Gesamturteil: „Mit Auszeichnung bestanden“)

01/95-04/95 Studienarbeit am Biologischen Institut, Abteilung Bioenergetik:  
 „Die H<sup>+</sup>-ATPase aus *E. coli*. Untersuchungen zur Aktivierungsenergie der  
 ATP-Synthese und -Hydrolyse an rekonstituierten Proteoliposomen“

05/96-03/97 Diplomarbeit: Boehringer Mannheim GmbH, Penzberg und  
 Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart  
 „Modulation der Stimulierung humaner T-Zell-Linien durch  
 Komplexe aus humanen monoklonalen Antikörpern und Antigen“

05/94-02/95 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Systemdynamik und  
 Regelungstechnik: „Modellierung des Glucose-Katabolismus bei *E. coli*“

10/95-02/96 Wissenschaftliche Hilfskraft am Biologischen Institut, Abt. Pflanzen-  
 physiologie: Praktikum „Biochemie und Physiologie der Pflanzen“

## Promotion:

seit 04/97 Medizinische Poliklinik , Klinikum Innenstadt der LMU München und  
 Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart:  
 „Funktionelle Charakterisierung und *in silico*-Modellierung LPS-  
 induzierbarer Elemente des RANTES-Promotors in humanen Monocyten“

München, den 16. Januar 2001