

**Die Regulation der Expression des
humanen Interleukin-5 Gens**

D I S S E R T A T I O N

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2001

vorgelegt von

SIBYLLE G. BLUMENTHAL

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2001

Dekan: Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nordheim
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Danksagung

Bei Herrn Prof. Nordheim bedanke ich mich für die Möglichkeit, an diesem sehr interessanten Projekt unter optimalen Arbeitsbedingungen arbeiten zu können.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Rammensee für seine Bereitschaft und sein Engagement, die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen.

Weiterhin danke ich Dr. Jutta Bachmann sehr herzlich für ihre fachliche und persönliche Unterstützung innerhalb und außerhalb des Graduiertenkollegs.

Der überragenden FETS-Gruppe ein besonderes Dankeschön.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. Jürgen Dittmer für die hervorragende fachliche Betreuung, die vielen hilfreichen Diskussionen und seine immer motivierende und aufmunternde Art.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Gaby Aichele für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfe im Labor und die vielen netten Worte, die zu der guten Atmosphäre bei der Arbeit beigetragen haben.

Ganz speziell danke ich Ralph K. Lindemann, durch dessen unermüdlichen Witz und Humor die Frustrationen der Forschung fast schon wieder Spass gemacht haben. Darüber hinaus stand er mir mit wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik jederzeit fachlich zur Seite.

Außerdem bedanke ich mich bei Meli Braig, dem jüngsten Mitglied der FETS-Gruppe, die mir in der letzten Phase meiner Arbeit im Labor sehr zur Seite stand und mich während des Schreibens immer wieder aufmunterte.

Bei den Leuten von der anderen Laborseite, Dominik Boos, Dr. Olaf Heidenreich, Heidemarie Riehle, Dr. Mara Szyrach, Daniela Werth, bedanke ich mich für das freundliche Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Für die überaus kompetente und bereitwillige computertechnische Unterstützung, Verpflegung, und ein immer offenes Ohr möchte ich mich bei Herrn Dr. Winfried Kammer bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die hilfsbereite Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Als Ansprechpartner bei allen Problemen und Anliegen stand mir immer jemand zur Seite. Deshalb möchte ich mich bei folgenden Leuten, die mich in vielerlei Hinsicht immer unterstützt haben, bedanken: Dr. Siggi Alberti, Meike Angstenberger, Anke Biedermann, Dr. Francesca Cesari Weimar, Dirk Hockemeyer, Robert Lukowski, Oli Nentwich, Ulrike Philippar, Martin Priemer, Verena Rennekampff, Dr. Markus Schirle, Dr. Gerhard Schratt, Daniela Später, Lam Vuong und Stefanie Weiß.

Herzlichen Dank den unentbehrlichen Sekretärinnen Brigitte Hoffmann und Lisa Neumann, die in jeder Situation immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Desweiteren möchte ich Elena Kullmann danken, deren Arbeit vieles erleichtert hat.

Auch danke ich unserem guten Geist des Hauses, Schorsch Tiedemann, der immer da war, wenn man ihn brauchte und stets freundlich und hilfsbereit war.

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die ich hier nicht erwähnen konnte, die mir aber in den letzten Jahren nicht nur fachlich zur Seite standen, sondern auch für ein angenehmes Umfeld sorgten.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Ursula Hepp (Frau Finkelstein) für jegliche Art der Unterstützung in wirklich allen Lebenslagen.

Auch Monreals - Irene, Ruth, Almuth, Hannah, Agnes und Peter - danke ich, dass sie meine "Ersatzfamilie" hier in Tübingen geworden sind.

Meiner gesamten Familie, insbesondere meinen Eltern, Andrea, Steve, Jan, Tanja, Leonard und Ralf, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen, gebührt das größte Dankeschön von allen. Ohne sie wäre alles nicht möglich gewesen.

Diese Arbeit möchte ich meiner Tante Christa widmen, die den Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	4
2.1	Transkription	4
2.2	Interleukin-5	5
2.2.1	Expression von IL-5	5
2.2.2	Wirkung von IL-5	6
2.3	Asthma	8
2.3.1	Die Beteiligung von IL-5 an Asthma bzw. Eosinophilie	8
2.3.2	Therapien gegen Asthma bzw. Eosinophilie-assoziierte Erkrankungen	9
2.4	Das Interleukin-5 Gen	10
2.4.1	Die Regulation des IL-5 Gens	10
2.4.2	Der humane IL-5 Promotor	11
2.5	Ets Proteine	13
2.5.1	Ets1	15
2.5.2	Ets2	17
2.5.3	Elf1	17
2.5.4	Spezifische Aktivität der Faktoren Ets1, Ets2 und Elf1	18
2.5.5	Bedeutung der Ets-Faktoren für die Cle0-abhängige Transkription	19
2.6	Tax	20
2.7	Zielsetzung dieser Arbeit	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Chemikalien	22
3.2	Radiochemikalien	22
3.3	Bakterien und Medium	22
3.4	Zellen und Medium	23
3.5	Lösungen, Reagenzien und Material für molekularbiologische Methoden	24
3.6	Lösungen, Reagenzien und Material für zellbiologische Methoden	28
3.7	Lösungen, Reagenzien und Material für biochemische Methoden	29
3.8	Antikörper	31
3.8.1	Primäre Antikörper	31
3.8.2	Sekundäre Antikörper	32
3.9	Plasmide	32
3.9.1	Reporterplasmide	32
3.9.2	Expressionsvektoren	32
3.10	PCR-Primer	32
3.10.1	RT-PCR	32
3.10.2	Taqman-PCR	33
3.11	Northern Sonden	34
3.12	Oligonukleotide	34
3.13	Molekularbiologische Methoden	35
3.13.1	Transformation von <i>E.coli</i>	35
3.13.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	35

3.13.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
3.13.4	Restriktionsverdau für die Analyse von DNA-Fragmenten	36
3.13.5	Agarose Gelelektrophorese	37
3.13.6	RNA-Isolierung	37
3.13.6.1	nach Birnboim (Birnboim, 1988)	37
3.13.6.2	Qiagen QIAshredder™, Cat. No. 79656, und RNeasy Mini Kit®, Cat. No. 74106	38
3.13.7	mRNA-Isolierung	38
3.13.8	Entfernung von DNA-Kontamination aus RNA-Isolaten	39
3.13.9	Northern Blot	39
3.13.10	Reverse Transkription (RNA --> cDNA)	41
3.13.11	PCR	42
3.13.12	Taqman-PCR	42
3.13.13	ds-Oligonukleotid-Hybridisierung	44
3.13.14	Radioaktive Endmarkierung von doppelsträngigen Oligos mit 5'-überhängenden Enden	44
3.13.15	5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden	45
3.14	Zellbiologische Methoden	45
3.14.1	Allgemeine Zellkultur eukaryontischer Zelllinien	45
3.14.2	Einfrieren von Zellen	46
3.14.3	Transfektion von Zellen mittels Elektroporation	46
3.14.4	Isolierung von primären Lymphozyten aus menschlichem Blut (Abb. 10)	46
3.14.5	Intrazelluläre Zytokinfärbung	48
3.14.6	Antikörper-Färbung für FACS-Analyse	48
3.14.7	FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)	48
3.14.8	MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)	49
3.14.9	H2k ^k -Transfektion	49
3.15	Biochemische Methoden	50
3.15.1	Herstellung eines Gesamtzellextrakts	50
3.15.2	Herstellung eines Kernextrakts	50
3.15.3	Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)	50
3.15.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.15.5	Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	51
3.15.6	Trocknen von SDS-PAGE-Gelen	51
3.15.7	Western Blot	52
3.15.8	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	52
3.15.9	Luciferase Assay	53
3.15.10	FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Die Ets-Bindungsstelle GGAA im Cle0-Element ist notwendig für die Aktivierung des humanen IL-5 Promotors durch Ets1 und Tax	54
4.2	Ets1 ist nicht das einzige Ets-Protein, das den IL-5 Promotor aktivieren kann	56
4.3	Der selektiv in Th2-Zellen exprimierte Transkriptionsfaktor Gata3 kooperiert mit Ets1 und Ets2 am IL-5 Promotor	57
4.4	Gata3 aktiviert den IL-5-Promotor auch in Jurkat und HSB-2 T-Zellen	60
4.5	Inhibition der der Ets1/Ets2-vermittelten Aktivierung des IL-5 Promotors mit Tax durch Elf1 und die Ets-Mutante ΔPointed-Domäne-Ets1	62
4.6	Ets1 und Gata3 binden an den IL-5 Promotor	66
4.6.1	Die Bindung von Ets1 an die Cle0-Sequenz des IL-5 Promotors	66
4.6.2	Die Bindung von Gata3 an die IL-5 Promotorsequenz	68
4.7	PMA/Ionomycin-Behandlung von HSB-2-Zellen verändert das Bandenmuster mit der IL-5 spezifischen Sonde im EMSA	70
4.8	Untersuchung der Regulation der endogenen IL-5-Expression von HSB-2 T-Zellen	73

4.9	Trennung transfizierter Zellen von nicht-transfizierten Zellen, um den Effekt überexprimierter Faktoren auf den endogenen IL-5 Promotor zu untersuchen	75
4.10	Endogene mRNA Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in HSB-2-Zellen	79
4.10.1	Ets2 und Gata3	79
4.10.2	Untersuchungen weiterer Transkriptionsfaktoren, die an der IL-5-Expression beteiligt sein könnten	81
4.11	Versuche mit primären Th2-Zellen	82
4.11.1	Endogene IL-5 Expression	82
4.11.2	GAPDH kann als Kontrolle verwendet werden	84
4.11.3	Das Th2/Th1-Verhältnis der aktivierten T-Zellen anhand der Expressionen von IFN γ (Th1) und IL-13 (Th2)	84
4.11.4	Die Expression weiterer Th1-spezifischer (T-bet) und Th2-spezifischer (IL-5, Gata3, c-Maf, JunB) Faktoren	87
4.11.5	Endogene mRNA Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren	89
4.11.6	Der Effekt von PHA auf die Expression von Th1- und Th2- spezifischen Genen	91
5	<i>Diskussion</i>	93
5.1	IL-5 ist durch Ets-Proteine aktivierbar	93
5.2	Gata3 und Ets-Proteine kooperieren bei der Aktivierung des IL-5 Promotors	94
5.3	Tax unterstützt die Aktivierung des IL-5 Promotors	95
5.4	Elf1 kann den IL-5 Promotor nicht aktivieren	96
5.5	Stimulierung mit PMA und Ionomycin ist Voraussetzung für die Aktivierbarkeit des IL-5-Promotors	98
5.6	Expression verschiedener Faktoren in IL-5-produzierenden HSB-2 und aktivierten primären T-Zellen	100
5.7	Der IL-5 Promotor im Vergleich zum GM-CSF Promotor	102
5.8	Der murine IL-5-Promotor im Vergleich zum humanen IL-5-Promotor	102
6	<i>Zusammenfassung</i>	104
7	<i>Plasmidkarten</i>	105
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	106
9	<i>Publikation</i>	122
10	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer</i>	123
11	<i>Lebenslauf</i>	124

1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AML	<i>Acute Myeloid Leukemia</i>
APS	Ammoniumpersulfat
aq. dest.	destilliertes Wasser
AP1	<i>Activated Protein 1</i>
ATL	adulte T-Zell Leukämie
ATP	Adenosine 5'-triphosphat
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca	Calcium
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	<i>Cluster Designation (Cluster of Differentiation)</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
c-Fos	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
Cle0	<i>Conserved lymphokine element 0</i>
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>counts per minute</i>
CREB	<i>cAMP Responsive Element Binding protein</i>
C-terminal	carboxy-terminal
dCTP	Deoxycytidin-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDF	<i>Eosinophil Differentiation Factor</i>
EGTA	Ethylen glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EM	Ets-Bindungsstelle Mutante
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
ERM	<i>Ets Related Molecule PEA3-like</i>
Ets	<i>E26-transformation specific</i>
F	Farad
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FEV	<i>Fifth Ewing Variant</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Gravitationskonstante
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat

GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTC	Guanidinium Thiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hIL-5	humanes Interleukin-5
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLH	Helix Loop Helix
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTLV-I	humaner T-Zell Leukämie Virus Typ I
IFN γ	Interferon- γ
IgE/G	Immunglobulin E/G
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mA	Milliamper
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NERF	<i>New Ets-Related Factor</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NP-40	Nonidet P-40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol))
N-terminal	aminoterminal
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEA	<i>Polyomavirus Enhancer A-binding protein</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PHA	Phytohaemagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTHrP P2	<i>Parathyroid Hormone related Peptide Promoter 2</i>
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
Raf	<i>v-raf murine leukemia viral oncogene homolog</i>
Ras	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>
RSV	<i>Rous Sarcoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	<i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>
S	Svedberg
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
Shc	<i>Src homology 2 domain-containing</i>
SHP	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6</i>
Sos	<i>Son of sevenless homolog</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SV	<i>Simian Virus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-bet	<i>T-box expressed in T-cells</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TES	Tris-EDTA-Sucrose
Th1/2	T-Helfer 1/2
TRE	<i>TPA-response element</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglykol-p- isooctylphenoether
U	<i>Unit</i>
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight / volume</i>

2 Einleitung

2.1 *Transkription*

Die Transkription von Genen wird durch den Einfluss vieler extrazellulärer Stimuli in positiver wie auch negativer Weise reguliert. Dadurch ergibt sich eine auf das Genaueste abgestimmte Regulation der Genexpression. Für die Gentranskription ist es notwendig, dass z.B. RNA Polymerase II mit einem Multiprotein-Prä-Initiations-Komplex vor der Transkriptionsstartsequenz in Kontakt tritt. Dieser Multiprotein-Prä-Initiations-Komplex besteht aus allgemeinen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel TFIID, der wiederum aus dem TATA-Bindeprotein (TBP) und mehreren TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammengesetzt ist. Diese allgemeinen Transkriptionsfaktoren interagieren mit bestimmten DNA-Sequenzen eines Genpromotors, wie etwa TBP mit der TATA-Box. Eine DNA-Bindungsdomäne vermittelt die Bindung des Proteins an die DNA, wohingegen andere Teile des Proteins mit den TAFs oder auch anderen Faktoren wechselwirken können. Diese vielseitig variablen Wechselwirkungen mit den unterschiedlichsten Faktoren bewirken eine genau regulierbare Aktivierung oder Inhibierung der Transkription eines spezifischen Gens.

Die Interaktion von allgemeinen Transkriptionsfaktoren mit basalen Promotorelementen ist essentiell für die basale Transkription. Diese Wechselwirkung reicht alleine nicht aus, um Transkriptionsraten zu erhöhen oder zu senken. Die Aktivierung bzw. Inhibierung der Gentranskription hängt von der Bindung zusätzlicher Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Konsensussequenzen (*cis*-Elemente) ab. Diese Transkriptionsfaktoren enthalten meist eine DNA-Bindungsdomäne und eine Funktionsdomäne, die aktivierende bzw. reprimierende Interaktionen vermittelt. Die Bindung dieser Faktoren an ihre Ziel-Promotorelemente ermöglicht die Stimulierung oder Inhibition der Transkription durch positiv oder negativ regulatorische Protein-Protein Wechselwirkungen mit anderen Faktoren und der basalen Transkriptionsmaschinerie (Goodrich et al., 1996).

2.2 Interleukin-5

Interleukin-5 (IL-5) gehört zu den Zytokinen, einer Gruppe von sezernierten Glykoproteinen, die immunologische Prozesse regulieren können. Sie üben ihre Wirkung über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche aus. IL-5 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert. Der IL-5 Rezeptor wird beim Menschen meist auf der Zelloberfläche von Eosinophilen exprimiert. Die Interaktion von IL-5 mit dem Rezeptor führt zur Aktivierung des JAK-STAT (Janus Kinase - Signal Transducer and Activator of Transcription) Systems (Weltman and Karim, 2000). Eine Funktionsanalyse des humanen IL-5 Proteins ergab, dass IL-5 hauptsächlich für die Aktivierung von Eosinophilen benötigt wird. Außerdem kann es, wie in Mäusen beobachtet, auch B-Zellen aktivieren (Lopez et al., 1988; Yamaguchi et al., 1988). Beim Menschen hat IL-5 keine Wirkung auf B-Zellen, da diese im Menschen keinen IL-5 Rezeptor exprimieren (Karlen et al., 1998).

2.2.1 Expression von IL-5

Interleukin-5 wird bei einer Immunantwort hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ Th2-Zellen (T-Helfer 2) produziert (Bohjanen et al., 1990; Warren and Sanderson, 1985). Th2-Zellen unterscheiden sich von Th1-Zellen in den Zytokinen, die sie produzieren. Aufgrund der unterschiedlichen produzierten Zytokine ergeben sich unterschiedliche biologische Funktionen der Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen exprimieren beispielsweise IL-2, IL-12 und IFN γ . Th2-Zellen produzieren außer IL-5 auch IL-4 und IL-13, wobei IL-4 und IL-5 nicht immer koexprimiert werden (Mori et al., 2001; Schwenger et al., 2001), weil sie vermutlich

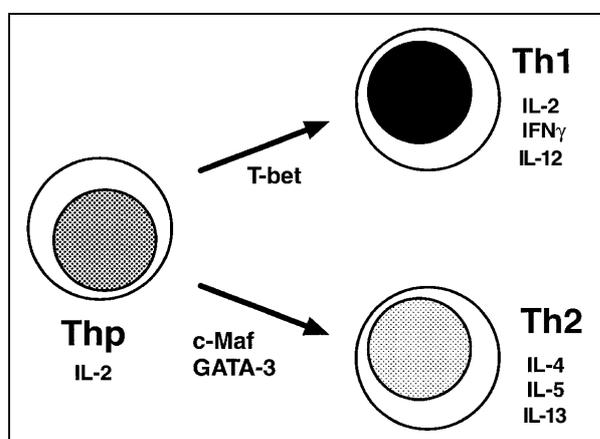


Abb. 1: Zelltyp-spezifische Faktoren, welche die CD4-T-Helfer-Zell-Differenzierung regulieren. T-bet ist ursächlich an der Th1 Differenzierung beteiligt, wohingegen c-Maf und Gata3 zu einer Th2 Differenzierung führen (nach Glimcher and Murphy, 2000).

unterschiedlich reguliert werden (Zhang et al., 1998). Zusätzlich zu den T-Zellen als Hauptquelle für IL-5 konnten natürliche Killerzellen, Mastzellen, B-Zellen und Eosinophile als IL-5 produzierende Zellen identifiziert werden (Desreumaux et al., 1992; Mori et al., 1995; Plaut et al., 1989). In der Maus wurde eine dritte Untergruppe von Zellen identifiziert: Th0. Diese Zellen exprimieren sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine (Firestein et al., 1989). Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen kann für die jeweilige Entwicklung einer Entzündung oder asthmatischen Erkrankung ausschlaggebend sein (Ray and Cohn, 1999).

Th2-Zellen unterscheiden sich von Th1-Zellen auch in den spezifischen Transkriptionsfaktoren, die sie produzieren (Abb. 1). Faktoren wie Gata3 (Ho et al., 1991), c-Maf (Ho et al., 1996) und der AP1 Faktor JunB (Rincon and Flavell, 1997) werden selektiv in Th2-Zellen exprimiert. Gata3 wird sonst nur noch in unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen gefunden (Hendriks et al., 1999). In der späteren T-Zellentwicklung ist Gata3 ausschlaggebend für die Entwicklung von Th2-Zellen (Ray and Cohn, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression von Gata3 in Th1-Zellen die Synthese von Th2-Zytokinen induzieren kann. In diesen Zellen inhibiert Gata3 die Produktion des Th1-spezifischen IFN γ und fördert gleichzeitig die Expression von IL-4 und IL-5 (Ferber et al., 1999). Umgekehrt kann der Th1-spezifische Faktor T-bet in Th2-Zellen die Expression Th2-spezifischer Zytokine (IL-4, IL-5) inhibieren, die Produktion des Th1-spezifischen Zytokins IFN γ stimulieren und dadurch und die Zellen in die Th1-Richtung steuern (Szabo et al., 2000).

2.2.2 Wirkung von IL-5

Von den Th2-Zytokinen ist IL-5 als einziges an der Entstehung einer eosinophilen Entzündung beteiligt (Foster et al., 1996). Die Aktivierung von Eosinophilen hat eine Degranulation, eine Ausschüttung von zytotoxischen granulären Proteinen, zur Folge, die zu Entzündungen führen können (Abb. 2A). Zusätzlich zur Aktivierung von Eosinophilen erhöht IL-5 auch die Adhäsionsfähigkeit der Eosinophilen an Endothelzellen und kann dadurch eine Akkumulierung von Eosinophilen in z.B. den Atemwegen bewirken (Sanmugalingham et al., 2000). Auf diese Weise spielt IL-5 eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Eosinophilie, die mit einer Reihe von Erkrankungen assoziiert ist, zu denen sowohl parasitische Infektionen als auch allergische Krankheiten und zum Beispiel die HTLV-I-induzierte adulte T-Zell Leukämie (ATLL) zählen. IL-5 ist so an der Pathogenese vieler Krankheiten, insbesondere

Asthma, beteiligt (Corrigan and Kay, 1992; Limaye et al., 1990; Lopez et al., 1988; Sanderson, 1992).

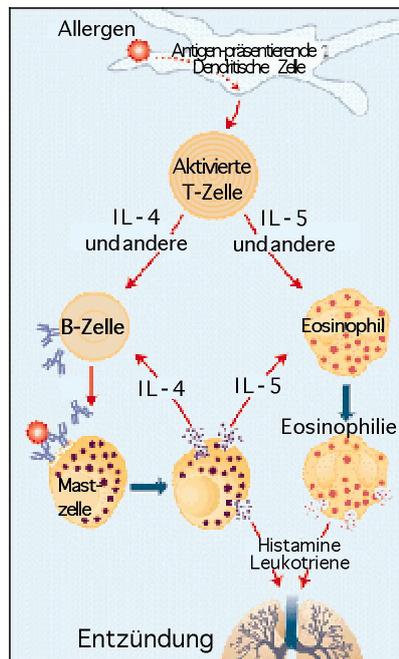


Abb. 2A: Schematische Darstellung einer Immunantwort. IL-5 wird von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet. Dadurch wird das Wachstum und die Differenzierung von Eosinophilen angeregt. Die Eosinophilen führen dann zu der Entstehung einer Entzündung (nach Vogel, 1997).

Die genaue Wirkungsweise von IL-5, welches als Homodimer an den IL-5-Rezeptor bindet, sieht wie folgt aus (Abb. 2B). Der heterodimere IL-5-Rezeptor besteht aus einer IL-5-spezifischen α -Untereinheit und einer β c-Untereinheit, die auch Teil der IL-3- und GM-CSF-Rezeptoren bildet. Die Bindung von IL-5 an die Rezeptor-Untereinheiten führt zu deren Heterodimerisierung. Kinasen, wie zum Beispiel Jak2, können an beide Untereinheiten binden. Dadurch kommt es zu einer über-Kreuz-Phosphorylierung der beiden Untereinheiten (Adachi and Alam, 1998).

Die Tyrosin-Phosphorylierung der β c-Untereinheit durch Jak2 führt zu einer Weiterleitung des Signals via STAT5 (Ogata et al., 1997). STAT5 wandert in den Kern, um dort seine Funktion als Transkriptionsaktivator zu erfüllen.

Gleichzeitig werden Lyn und andere Tyrosinkinase aktiviert, die dann über Adapterproteine Ras und Raf aktivieren. Das Adapterprotein Shc bindet an den Rezeptor, wird phosphoryliert und leitet das Signale über die Adapterproteine Grb2 und Sos-1 an Ras weiter (Bates et al., 1998). Über Raf findet dann eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs statt, der dann zu einer Aktivierung verschiedener Zielgene führt.

Als Beispiel eines Zielgens der IL-5-Signalkaskade sei hier der Cysteinyl Leukotrien-1-Rezeptor genannt, der durch IL-5 in seiner Expression hochreguliert wird. Der Rezeptor ist

wichtig für die Vermittlung von akuter Bronchokonstriktion und chronischen Atemwegs-Entzündungen in Asthma (Thivierge et al., 2000).

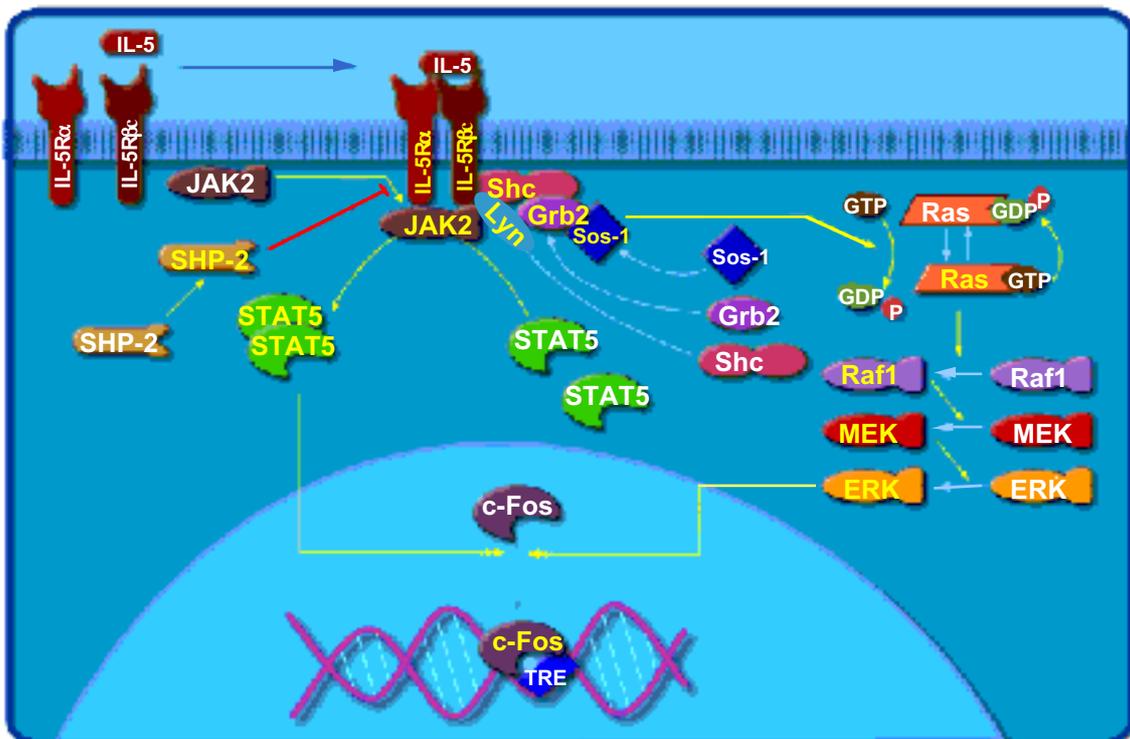


Abb. 2B: Schematische Darstellung der Signalübertragung nach Bindung von IL-5 an den IL-5-Rezeptor. Die intrazellulären Faktoren, die an der Signalübertragung beteiligt sind, sind im inaktiven Zustand weiß und im aktiven Zustand gelb beschriftet. Blaue Pfeile deuten den Übergang in den aktivierten Zustand an, gelbe Pfeile bedeuten eine Aktivierung. Die gelben Pfeile, die von STAT5 und ERK in den Kern leiten, zeigen die Translokation dieser Faktoren in den Kern an (modifiziert nach BioCarta).

2.3 Asthma

2.3.1 Die Beteiligung von IL-5 an Asthma bzw. Eosinophilie

Asthma ist ein komplexes Syndrom mit vielen klinischen Krankheitsbildern in Erwachsenen und Kindern (Busse and Lemanske, 2001; Salter, 1967). Als Ursache werden genetische und umweltbedingte Faktoren diskutiert (Cookson, 1999). Ein Hauptmerkmal von Asthma ist eine entzündungsbedingte Anschwellung der Atemwege (Hogg, 1997), die unter anderem durch die Infiltration von Lymphozyten und Eosinophilen in die Atemwege gekennzeichnet ist. In den Atemwegen bzw. der bronchoalveolaren Flüssigkeit von Asthmatikern können verstärkt

Th2-Zytokine und besonders eine erhöhte IL-5 Expression gemessen werden. Diese korreliert mit der Stärke der asthmatischen Erkrankung, dem Ausmaß der T-Zellaktivierung, der Anzahl von Eosinophilen, der Eosinophil-Aktivierung und dem verlängerten Überleben der Eosinophilen (Ohnishi et al., 1993; Robinson et al., 1993). Mit Hilfe von IL-5 spezifischen Antikörpern konnte eine solche eosinophile Entzündung unterdrückt werden, was für die maßgebliche Beteiligung von IL-5 an der Auslösung dieser Entzündung spricht (Kaminuma et al., 1997). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Antigen-Stimulierung der Atemwege zu einer Erhöhung der lokalen IL-5 Konzentration führt (Sedgwick et al., 1991), und dass die direkte Inhalation von IL-5 die Ausbildung einer Eosinophilie zur Folge hat (Shi et al., 1998). In IL-5 defizienten Mäusen konnte keine eosinophile Reaktion auf Antigen-Stimulierung beobachtet werden (Foster et al., 1996). Zusätzlich ist die Gata3 Expression in den inflammatorischen Zellen in den Atemwegen asthmatischer Patienten deutlich erhöht, was wiederum für eine Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichts in Richtung Th2-Zellen spricht. Interessanterweise exprimieren 76% der Gata3-mRNA positiven Zellen auch IL-5. Umgekehrt exprimieren 91% der IL-5-mRNA positiven Zellen auch Gata3 (Nakamura et al., 1999). Lokale Antisense-Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden für Gata3 resultierte in einer Verminderung der Th2-induzierten Atemwegs-Entzündung (Finotto et al., 2001). In Mäusen kann eine dominant-negative Version von Gata3 die Th2-vermittelte allergische Entzündung der Atemwege verhindern (Zhang et al., 1999).

2.3.2 Therapien gegen Asthma bzw. Eosinophilie-assoziierte Erkrankungen

Es ist von großem Interesse, die Regulation der Expression des IL-5 Gens aufzuklären, um gezielte Therapien gegen Asthma bzw. Eosinophilie-assoziierte Erkrankungen einsetzen zu können. Bis jetzt konnte die IL-5 Synthese bei Asthma und anderen allergischen Krankheiten erfolgreich mit Glucocorticoiden unterdrückt werden, die jedoch in der Therapie insbesondere bei Kindern erhebliche Nebenwirkungen haben können. Auch die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 sind in der Lage, die IL-5 Gentranskription zu inhibieren (Mori et al., 1995). Zusätzlich werden immunotherapeutische Ansätze (Rolland et al., 2000), DNA-Vakzinierung, Antisense-Technologie (Weltman and Karim, 1998), Antikörper-Therapien gegen IL-5 und IgE (Barnes, 2001; Egan et al., 1995; Lotvall and Pullerits, 1999) und andere molekulare Methoden, um Antigen-spezifische Th2-vermittelte Reaktionen zu unterdrücken, untersucht (Barnes, 1996). Eine weitere Möglichkeit wäre, das Th1/Th2 Ungleichgewicht, das

auch ursächlich für die Entstehung verschiedener asthmatischer Krankheitsbilder diskutiert wird, so zu modulieren, dass die Produktion von Th2-Zytokinen ausreichend unterdrückt wird (Ray and Cohn, 2000). Im Fall des neuen, oral aktiven Inhibitors der IL-5 Biosynthese, R146225, wird die IFN γ Expression erhöht, wobei die Expression von IL-2 und IL-4 unverändert bleibt (Van Wauwe et al., 2000). Dadurch wird das Ungleichgewicht zwischen Th1 und Th2 Zytokinen annäherungsweise behoben und die Entzündung so gehemmt. Auch wird nach an Asthma beteiligten Genen gesucht. In epidemiologischen Studien an Familien, isoliert lebenden Völkergruppen und von Inselfpopulationen, die sich durch einen hohen Grad an Inzucht auszeichnen, konnten mehrere so genannte Asthma-assoziierte Gene bzw. Genmarker auf Chromosomen identifiziert werden (Zamel et al., 1996).

2.4 Das Interleukin-5 Gen

Das humane IL-5 Gen wurde 1987 als *eosinophil differentiation factor* (EDF) kloniert. Das Gen enthält drei Introns und vier Exons, die mRNA ist 0,9kb lang und kodiert für ein 134 Aminosäuren großes Protein (Campbell et al., 1987). Auf Grund der ähnlichen strukturellen Organisation ist IL-5 phylogenetisch mit den Genen des GM-CSF, IL-4 und IL-2 verwandt (Tanabe et al., 1987). Außerdem ist beim Menschen IL-5 mit IL-4, IL-3 und GM-CSF als Teile eines Zytokin-Genclusters auf dem langen Arm von Chromosom 5 lokalisiert (van Leeuwen et al., 1989). Eine weitere Verbindung zwischen IL-5, IL-3 und GM-CSF besteht darin, dass sie eine Rezeptor-Untereinheit gemeinsam haben (Goodall et al., 1993; Lopez et al., 1992). Im Gegensatz zu IL-3 und GM-CSF, die eine Wirkung auf viele hämopoetische Zellen ausüben, sind die Effekte von IL-5 hauptsächlich auf Eosinophile begrenzt.

2.4.1 Die Regulation des IL-5 Gens

Die Regulation des IL-5 Gens kann sowohl über Calcium-abhängige Signalwege als auch über Protein Kinase C (PKC)-abhängige Signalwege erfolgen. Es wurde experimentell gezeigt, dass ein Calcium-Ionophor und PKC-aktivierender Phorbolster synergistisch die IL-5 Expression und die IL-5 Promotoraktivität erhöhen können (Gruart-Gouilleux et al., 1995). Eine Aktivierung von Th2-Zellen, die IL-5 exprimieren, geht mit einer erhöhten Aktivität zweier Transkriptionsfaktoren, dem Phorbolster-responsiven AP1 und dem Calcium-

responsiven NFAT einher. Zusätzlich kann man eine erhöhte Gata3-Expression beobachten (Rincon and Flavell, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass jeder dieser drei Transkriptionsfaktoren den IL-5 Promotor aktivieren kann (Stranick et al., 1997; Yamagata et al., 1997; Yamagata et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass diese Faktoren eine wichtige Rolle bei der *in vivo* Aktivierung der IL-5-Expression spielen könnten.

2.4.2 Der humane IL-5 Promotor

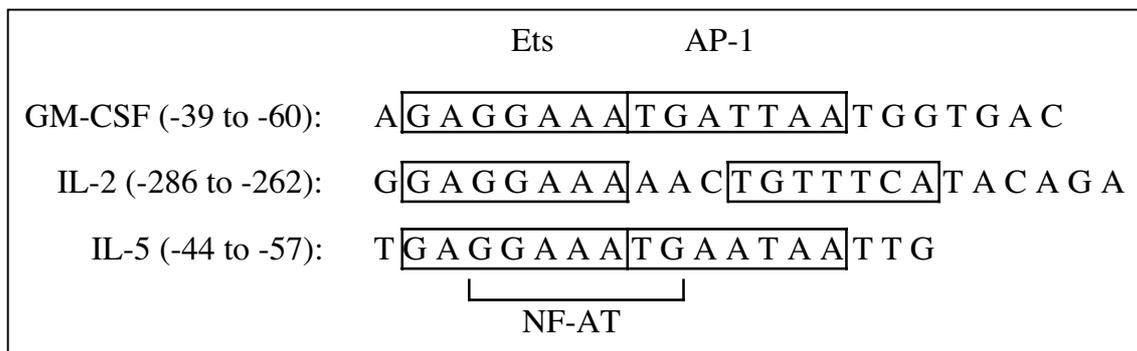


Abb. 3: Die Cle0 Sequenz in verschiedenen Promotoren. Die potentiellen Ets-, NF-AT und AP1 Bindungsstellen sind eingerahmt (nach Wang et al., 1994).

Die Regulation der meisten Zytokingene, wie auch die des IL-5 Gens, erfolgt auf transkriptioneller Ebene (Rolfe and Sewell, 1997). Im humanen IL-5 Promotor sind mehrere regulatorische Elemente zu finden, von denen das Cle0 Element (*conserved lymphokine element*) von großer Bedeutung ist (Stranick et al., 1997). Es ist an der Regulation der IL-5-Promotor-Aktivität maßgeblich beteiligt (Karlen et al., 1996).

Das Cle0 Motiv wird auch in anderen Zytokin-Promotoren, zum Beispiel in denen von IL-2, IL-4 und GM-CSF (Miyatake et al., 1991), gefunden (Abb. 3). Es enthält eine AP1, eine NF-AT und eine Ets-Bindungsstelle (Masuda et al., 1993). Das Cle0-Element des GM-CSF Promotors ermöglicht die Kooperation von Ets-Proteinen mit AP1 (Thomas et al., 1995). Für den IL-5 Promotor konnte die Bindung eines AP1 Proteins und NF-AT an die Cle0 Sequenz gezeigt werden (Karlen et al., 1996; Mori et al., 1999).

Aufwärts (upstream) des Cle0 Elements konnten in Zelllinien (z.B. HSB-2-Zellen, die induzierbar IL-5 exprimieren) und in primären humanen T-Zellen mehrere weiter entfernte positive und negative regulatorische Regionen identifiziert werden. Die meist induzierbare Bindung von verschiedenen Faktoren an diese DNA-Regionen führte zu einer aktivierenden

oder inhibierenden Wirkung auf die Expression des IL-5 Gens (Cousins et al., 2000; Gruart-Guilleux et al., 1995; Stranick et al., 1997; Valentine and Sewell, 1998).

AP1 Proteine sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die aus einem Fos- (z.B. c-Fos) und einem Jun-Protein (z.B. c-Jun, JunD, JunB) bestehen (Angel and Karin, 1991). Sie werden in aktivierten T-Zellen induziert und sind an der Aktivierung vieler Gene beteiligt (Ullman et al., 1990). Die DNA-Bindungsaktivität von AP1 wird durch Phorbolester (PMA) induziert (Angel et al., 1987). In aktivierten T-Zellen ist die Bindung von AP1 entscheidend für die IL-5 Promotor-Aktivität. Als möglicher Bestandteil des AP1 Proteins wurden im Fall des IL-5 Promotors in Jurkat-Zellen c-Jun, JunD oder das in Th2-Zellen spezifisch überexprimierte JunB identifiziert (Karlen et al., 1996; Li et al., 1999; Yamagata et al., 1997).

In der humanen HTLV-I-infizierten Zelllinie ATL-16 wurde gezeigt, daß Gata4, welches primär in Herzmuskelzellen exprimiert wird (Arceci et al., 1993), und PMA Stimulierung notwendig für die Aktivierung des IL-5 Promotors sind (Yamagata et al., 1995). Im IL-5 Promotor sind einige GATA-core Bindungsmotive, WGATAR (Ko and Engel, 1993; Merika and Orkin, 1993), zu finden, an die GATA-bindende Proteine binden können (Orkin, 1992).

Gata4 bindet selektiv an die Gata-Bindungsstelle, die sich in der Position -75/-71 relativ zur Transkriptionsstartstelle befindet, und hat eine positiv regulatorische Wirkung auf die Aktivität des Promotors (Yamagata et al., 1995). PMA ist notwendig für die Induktion der AP1 Proteine, die durch ihre Bindung an das Cle0 Element zur Aktivierung des Promotors beitragen (Abb. 4).

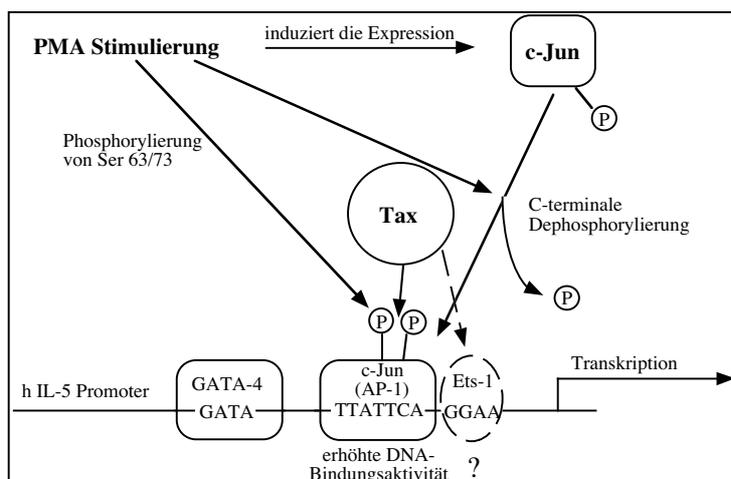


Abb. 4: Ein Modell des Synergismus von Tax, AP1 und Gata4 bei der Transaktivierung des IL-5 Promotors, modifiziert nach Yamagata (Yamagata et al., 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass die DNA-Bindung von Ets-1 für die maximale Aktivierung des IL-5 Promotors mit und ohne Tax zusätzlich notwendig ist.

Mit Hilfe eines Inhibitors der p38-MAP-Kinase konnte außerdem gezeigt werden, dass IL-5 über den p38-MAPK Weg reguliert wird. So wurde festgestellt, dass sich die Regulation des IL-5 Promotors von der Regulation anderer Zytokin-Promotoren (IL-2, IL-4, IFN γ) zu unterscheiden scheint (Mori et al., 1999).

2.5 *Ets Proteine*

Das *ets* Onkogen (*v-ets*) wurde in dem Retrovirus E26 (E-twentysix-specific = Ets) avian leukosis virus (ALV) zusammen mit *gag* und *myb* entdeckt (LePrince et al., 1983; Nunn et al., 1983). Die daraufhin in den verschiedenen Spezies von *Drosophila* bis Mensch identifizierten Ets-Proteine (Crepieux et al., 1994; Dittmer and Nordheim, 1998; Janknecht and Nordheim, 1993; Moreau-Gachelin, 1994; Wasylyk et al., 1993; Wasylyk and Nordheim, 1997) zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine aus 85 Aminosäuren bestehende DNA-Bindungsdomäne, die Ets-Domäne, gemeinsam haben (Karim et al., 1990; Watson et al., 1988). Diese Domäne bildet ein Helix-turn-Helix Motiv (Karim et al., 1990), mit dem eine purinreiche DNA-Kernsequenz, die 10bp lange Erkennungssequenz mit dem zentralen GGAA/T Motiv, erkannt werden kann (Liang et al., 1994; Nye et al., 1992; Petersen et al., 1995; Pio et al., 1996; Wasylyk et al., 1992; Werner et al., 1995). Die Ets-DNA-Bindungsdomäne interagiert mit GGA in der großen Furche der DNA-Doppelhelix und mit den flankierenden Sequenzen in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix (Nye et al., 1992).

Die Ets-Proteine werden aufgrund von Homologien in ihren Ets-Domänen in mehrere Subfamilien unterteilt (Abb. 5). Zusätzlich unterscheiden sie sich zum Teil auch sehr in ihren transaktivierenden und regulierenden Domänen (Laget et al., 1993). In den meisten Ets-Proteinen ist die DNA-Bindungsdomäne am Carboxy-Terminus des Proteins lokalisiert. Bei einigen Proteinen jedoch, wie bei Elk1, SAP1 und Net1, ist sie am N-Terminus zu finden (Wasylyk et al., 1993).

Ets Proteine spielen bei der Differenzierung, Entwicklung und Tumorentstehung eine Rolle (Wasylyk and Nordheim, 1997). Sie üben ihre transkriptionsregulatorische Funktion meist in Reaktion auf verschiedene entwicklungsassoziierte und mitogene Signale aus (Muthusamy et al., 1995) und werden in den unterschiedlichsten Zelltypen exprimiert. Die Expression der Ets-Proteine kann auf den Ebenen der Transkription (Mavrothalassitis and Papas, 1991), post-

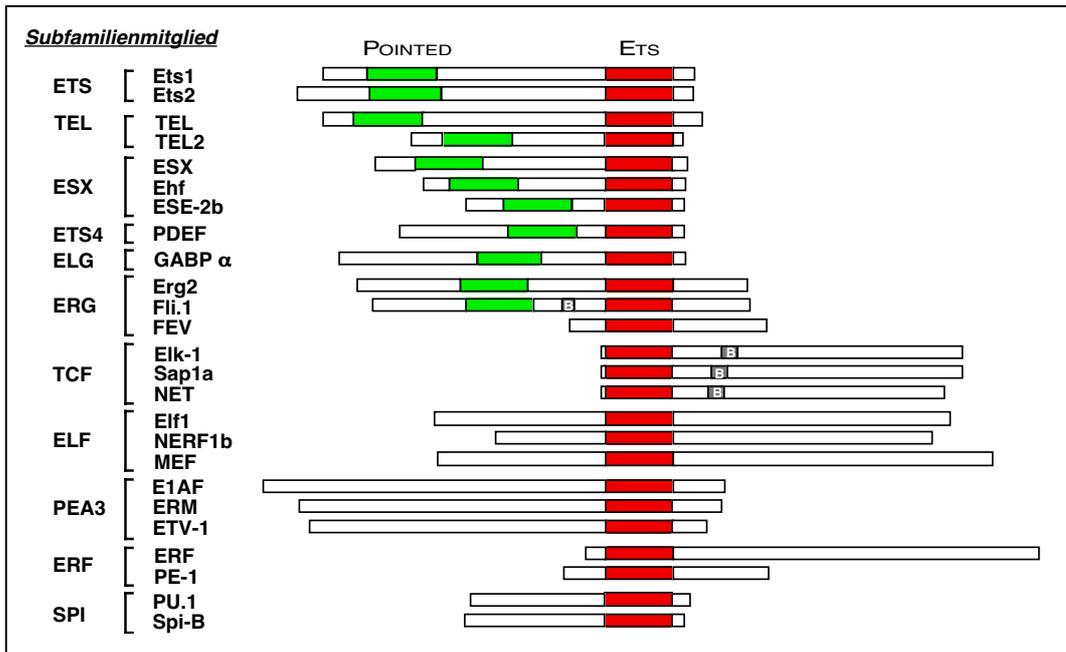


Abb. 5: Die Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren. Die Mitglieder der Ets-Familie werden aufgrund von Homologien in ihren Ets-Domänen in mehrere Subfamilien unterteilt. Die Ets-Domäne und die Pointed-Domäne, welche nur in einem Teil der Ets-Proteine gefunden werden kann, sind gekennzeichnet (Dittmer and Nordheim, 2001).

translationaler Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung und durch Veränderungen der Proteinstabilität (Pognonec et al., 1989; Rabault and Ghysdael, 1994) reguliert werden. Von der Familie der Ets-Proteine soll hier im Folgenden auf die drei für diese Arbeit relevanten Ets-Proteine, Ets1, Ets2 und Elf1, genauer eingegangen werden (Abb. 6).

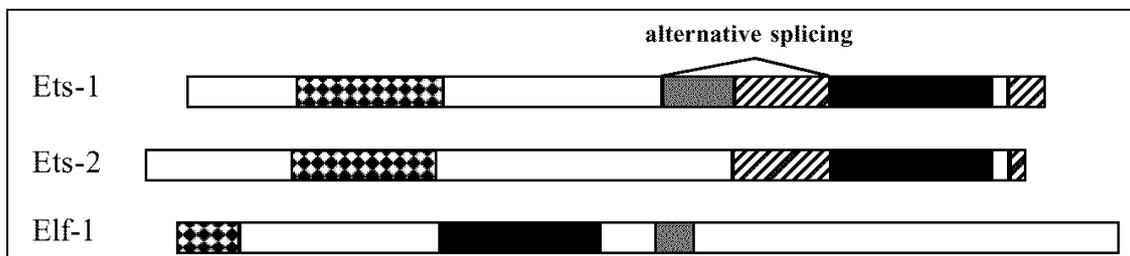


Abb. 6: Darstellung der Genstrukturen von Ets1, Ets2 und Elf1. Schwarz, die Ets-Domäne. Gestreift, inhibitorische Domänen. Kariert, transaktivierende Domäne. Grau, Serin oder Serine/Threonin-reiche Domäne (modifiziert nach Anderson et al., 1999).

2.5.1 Ets1

Ets1 wird hauptsächlich in T- und B-lymphoiden Zellen exprimiert. Es spielt vor allem eine wichtige Rolle bei der T-Zellentwicklung und Differenzierung, und ist auch mit proliferierenden T-Zellen assoziiert (Bhat et al., 1989), wo es dazu beiträgt, die Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus zu halten (Bories et al., 1995; Muthusamy et al., 1995). Außerdem konnte Ets1-Expression in Makrophagen und Monoblasten gezeigt werden (Sieweke et al., 1996). Im Laufe der T-Zellentwicklung ist die Ets1-Expression auch mit Endothelzellen, die an der Vaskularisierung und Angiogenese beteiligt sind, assoziiert. Zusätzlich zu der Rolle von Ets1 bei der Angiogenese wird eine Rolle von Ets1 bei der Tumordinvasivität diskutiert (Wasylyk and Nordheim, 1997).

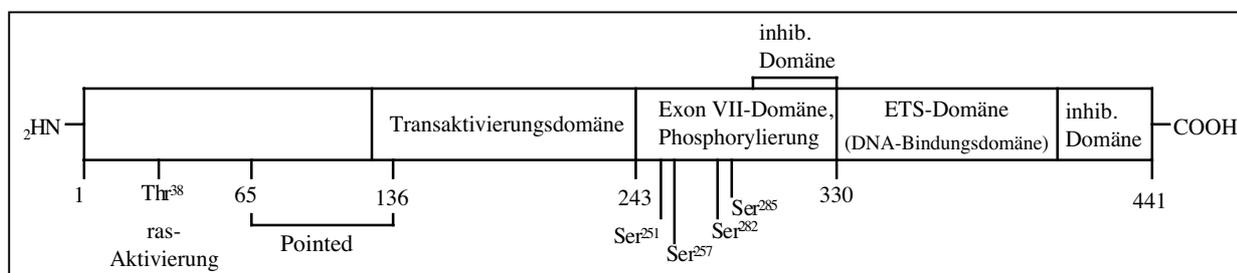


Abb. 7: Das humane Ets1 Protein. Das Ets1 Protein besteht aus mehreren Domänen. Pointed, eine N-terminal konservierte Region, auch NCR- oder HLH-Domäne genannt, ist außer bei Ets1 auch bei anderen Ets-Proteinen zu finden. Markiert sind auch die Phosphorylierungsstellen.

Das Ets1 Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 11q23-24 und kodiert für eine 6,8kb mRNA. Das Protein hat eine Größe von 54kD (p54) und besteht aus mehreren Domänen. Hervorzuheben und in Abb. 7 dargestellt sind die DNA-Bindungsdomäne (Ets-Domäne) am C-Terminus (Macleod et al., 1992), die aktivierende Domäne, und die intramolekular inhibitorisch wirkenden Domänen (Wasylyk et al., 1993). Es gibt weitere Regionen des Proteins, deren Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind. Die Pointed-Domäne an der amino-terminalen Seite von Ets1 vermittelt vermutlich Protein-Protein Interaktionen und wird von ras-abhängigen Signalen durch eine benachbarte MAPK-Phosphorylierungsstelle reguliert (Graves et al., 1998).

Die Ets-Domäne wird von den direkt flankierenden inhibitorischen Domänen an der DNA-Bindung gehindert (Jonsen et al., 1996), indem die inhibitorischen Domänen Strukturveränderungen der DNA-Bindungsdomäne bewirken können bevor diese mit der DNA interagiert (Wasylyk et al., 1992). Die Ca²⁺-induzierte Phosphorylierung von Ets1 in der

Exon VII-Domäne, einer der inhibitorischen Domänen, inhibiert die DNA-Bindungsaktivität des Proteins (Rabault and Ghysdael, 1994). Es befindet sich in dieser Domäne eine Erkennungssequenz für die Calmodulin-abhängige-Protein-Kinase II. Durch Mutationsanalysen (Ser → Ala) konnte festgestellt werden, daß Ca²⁺-abhängige Phosphorylierung zwar die DNA-Bindungsspezifität senkt, aber die Fähigkeit im Kern zu akkumulieren, nicht beeinträchtigt (Rabault and Ghysdael, 1994). Phosphorylierung verstärkt diesen autoinhibitorischen Mechanismus der Ets1-DNA-Bindung, indem die Phosphorylierung die inhibitorische Konformation stabilisiert (Cowley and Graves, 2000). Mitogene Signale können den Phosphorylierungsstatus von Ets1 Calcium-abhängig modulieren. Die Ets1-Protein-DNA-Bindungsaktivität könnte von einem auch zellzyklus-regulierten Gleichgewicht zwischen der nicht-phosphorylierten, der phosphorylierten, und der hyperphosphorylierten Form abhängen (Crepieux et al., 1994).

Einer Variante von Ets1, Δ VII Ets1 (p42), die durch alternatives Splicing der mRNA entsteht, fehlt eine der intramolekularen inhibitorischen Domänen, die Exon VII-Domäne (Jorcyk et al., 1991; Reddy and Rao, 1988). Da die Exon VII-Domäne in Δ VII Ets1 nicht vorhanden ist, kann diese Form des Proteins auch nicht Ca²⁺-abhängig phosphoryliert werden (Papas, 1992). Δ VII Ets1 hat daher im Vergleich zu Ets1 eine höhere Bindungsaktivität, da es dem regulatorischen Mechanismus, der durch die inhibitorischen Domänen stattfindet, nicht unterliegt (Jonsen et al., 1996; Koizumi et al., 1990; Wasylyk et al., 1992).

Da Ets1 eine zentrale Rolle für das Überleben und die Funktion von T-Zellen hat, wurden verschiedene T-Zell Populationen genauer untersucht. In ruhenden CD4⁺ T-Zellen konnte eine erhöhte Ets1 Expression beobachtet werden, die nach T-Zell Aktivierung drastisch reduziert wird. Zusätzlich zu den verringerten Mengen an Ets1-Transkription findet eine Erhöhung der Ets1-Phosphorylierung statt, aus der sich eine reduzierte DNA-Bindungsaktivität ergibt. Ets1 wird in diesem Fall effizient inaktiviert und auch degradiert (Bhat et al., 1989; Bhat et al., 1990; Pognonec et al., 1989).

In Ets1^{-/-} Mäusen waren weniger reife Thymozyten und periphere T-Zellen vorhanden. Als Reaktion auf verschiedene aktivierende Signale konnte ein schwerer proliferativer Defekt beobachtet werden. Außerdem wurde *in vitro* eine erhöhte Apoptoserate bei diesen Zellen festgestellt, die womöglich auf eine abnormale Zellzyklus-Progression zurückzuführen ist (Muthusamy et al., 1995).

2.5.2 Ets2

Einer dem Ets1 verwandter Ets-Faktor ist Ets2 (56kd), dessen Gen beim Menschen auf dem Chromosom 21 liegt (Boulukos et al., 1988; Ghysdael et al., 1986; Watson et al., 1985). Das Ets2-Protein besteht wie Ets1 aus mehreren Domänen. Der inhibitorische Mechanismus, der für Ets1 beschrieben wurde, ist auf Ets2 übertragbar (Wasylyk et al., 1993). Ets2 kann durch Aktivierung des T-Zell Rezeptors oder durch Calcium-Ionophore wie Ionomycin phosphoryliert werden (Fujiwara et al., 1990).

Im Gegensatz zu Ets1 wird Ets2 ubiquitär exprimiert. Wie Ets1 spielt Ets2 eine wichtige Rolle in der T-Zell-Entwicklung und Differenzierung (Bhat et al., 1989) und wird stark in CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Es scheint, dass die beiden Proteine einer reziproken Regulation unterliegen. Ets2 hat in ruhenden T-Zellen eine Halbwertszeit von ca. 20min. In aktivierten T-Zellen nimmt die exprimierte Menge an Ets2 deutlich zu, und die Halbwertszeit steigt auf über 2h, während sich die mRNA Menge nicht signifikant erhöht (Bhat et al., 1990). Durch Inaktivierung der PKC kann diese Erhöhung der Ets2-Menge durch Stabilisierung verhindert werden. Zugabe von Proteinsynthesehemmern führen andererseits zu einer weiteren Erhöhung der Halbwertszeit (Fujiwara et al., 1988).

Ets2-knockout Mäuse sind nicht lebensfähig. Die homozygoten Embryonen sterben vor dem Tag 8.5 der embryonalen Entwicklung. Es konnte festgestellt werden, dass Ets2 ein kritischer Regulator plazentaler Funktion, extraembryonaler Gewebefunktion und der Haarbildung ist. Hingegen hatte die Ets2-Defizienz keinen großen Einfluss auf Lymphozyten oder Makrophagen. Im Gegensatz zu den Schlüsselrollen, die PU.1 und Ets1 im Immunsystem zukommen, scheint Ets2 nicht für lymphoide Zellen notwendig zu sein (Yamamoto et al., 1998).

2.5.3 Elf1

Elf1 (68kd) ist ein weiteres Mitglied der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren. Wegen der sehr hohen Homologie zu dem Drosophila Protein E74 wurde es **E74-like-factor** genannt (Thompson et al., 1992). Es ist beteiligt an Entwicklungsprozessen (Burtis et al., 1990; Janknecht et al., 1989), Onkogenese (Moreau-Gachelin et al., 1988; Seth et al., 1989) und viraler Genaktivierung (Wasylyk et al., 1990). Elf1 ist ein lymphoid-spezifisches Gen (Thompson et al., 1992) und scheint die Expression mehrerer T-Zell-Gene, wie GM-CSF, IL-

3, CD4, IL-2 Enhancer und IL-2R α regulieren zu können (Bassuk et al., 1998; Gottschalk et al., 1993; John et al., 1996; John et al., 1996; Sarafova and Siu, 1999; Thompson et al., 1992; Wang et al., 1994). Elf1 unterscheidet sich von Ets1 und Ets2, indem es nicht zu derselben Subfamilie gehört, und die Ets-Domäne sich am aminoterminalen Ende des Proteins befindet. Auch N-terminal befindet sich die transaktivierende Domäne, deren transaktivierendes Potential von einer C-terminalen Domäne, die aus ca. 60 Aminosäuren besteht, verringert werden kann.

2.5.4 Spezifische Aktivität der Faktoren Ets1, Ets2 und Elf1

Es sind mehrere Möglichkeiten bekannt, wie die spezifische DNA-Bindungsaktivität der einzelnen Ets-Faktoren gesteuert wird. Durch zelltyp- bzw. gewebetyp-spezifische Expression eines Ets-Faktors z.B. kann der spezifische Einsatz dieses Ets-Proteins reguliert werden. Außerdem spielen die oben erwähnten Arten der Regulation von Ets-Faktoren, wie zum Beispiel Phosphorylierung, eine entscheidende Rolle. Weiterhin können die Sequenzen, die an das GGA-Motiv angrenzen (Abb. 8), die DNA-Bindungsaktivität bestimmter Ets-Proteine mitbestimmen (Janknecht and Nordheim, 1993; Wasylyk et al., 1992). Die Bindungs- und Transaktivierungs-Aktivitäten vieler Ets Proteine sind auch abhängig von ihren Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren, die so modulierende Einflüsse auf die Ets-vermittelte

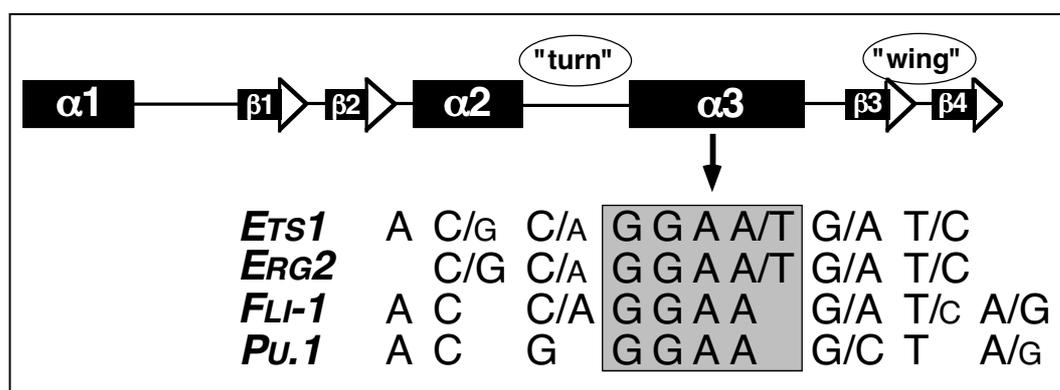


Abb. 8: Beispiele unterschiedlicher Ets-Bindungsstellen. Durch die verschiedenen flankierenden Sequenzen um die zentrale GGAA/T-Sequenz ergeben sich unterschiedliche Ets-Protein Bindungs-Spezifitäten (Dittmer and Nordheim, 2001).

Genexpression ausüben können. AML1, z.B., interagiert mit einer inhibitorischen Domäne von Ets1 (Exon VII) und ermöglicht dadurch eine kooperative Aktivierung des T-Zell-Rezeptor beta-Ketten Enhancers durch diese beiden Faktoren (Kim et al., 1999). Neben aktivierenden können bestimmte Faktoren auch inhibierende Wirkungen haben. Das mit AP1 verwandte Protein MafB (Sieweke et al., 1996) inhibiert Ets1, indem es die Bindung der Ets-Domäne mit der DNA blockiert.

Eine zusätzliche Variante ist im Fall von Elf1 beobachtet worden. Elf1 ist in der Lage an viele Bindungsstellen zu binden, für die andere Ets-Proteine eine geringere Affinität aufweisen. Dadurch kann Elf1 selektiv das einzige Protein in der Zelle sein, das dann an diese Stellen binden kann, weil andere Ets-Proteine die Bindung an Stellen, die sie mit höherer Affinität anziehen, bevorzugen. So lässt sich auch das Fehlen optimaler Elf1-Bindungsstellen in den bekannten Elf1-regulierten Genen erklären (John et al., 1996).

2.5.5 Bedeutung der Ets-Faktoren für die Cle0-abhängige Transkription

Ets Proteine spielen bei der Regulation vieler Promotoren eine Rolle. Um z.B. den NF- κ B-1 Promotor durch PMA und Ionomycin zu aktivieren, ist ein Ets-Protein (z.B. Ets1, Elf1) absolut notwendig (Lambert et al., 1997). Ein weiteres Beispiel für einen Promotor, an dessen PMA-und-Ionomycin-abhängiger Regulation ein Ets-Protein beteiligt zu sein scheint, ist der GM-CSF Promotor (Thomas et al., 1997; Thomas et al., 1995). Diese Promotoren enthalten beide als wichtiges regulatorisches Element das Cle0 Element. Es wurde für den GM-CSF Promotor auch gezeigt, dass Elf1 und Ets1 an das Cle0 Element binden können und Ets1 dadurch die Aktivierung des Promotors unterstützt (Thomas et al., 1995; Wang et al., 1994). Mit Hilfe einer GGAA zu GGAT Mutation, die die Bindung von Elf1, aber nicht die von Ets1 an Cle0 inhibiert, konnte zusätzlich bestätigt werden, daß Ets1, und nicht Elf1, eine zentrale Rolle für die Regulation des GM-CSF Promotors unter PMA/Ionomycin Bedingungen zukommt. Ets1 kann den GM-CSF Promotor auch transaktivieren, wenn AP1 oder NF- κ B anwesend sind, ohne daß die Zellen mit PMA und Ionomycin stimuliert worden sind. Diese Faktoren werden von PMA und Ionomycin induziert. Bei der Zusammenwirkung von Ets1 mit AP1 und NF- κ B ist ein synergistischer Effekt zu beobachten (Thomas et al., 1997).

2.6 Tax

Tax ist ein virales 40kD Protein des humanen T-Zell Leukämie Virus Typ I (HTLV-I) und ist an der Entstehung der adulten T-Zell Leukämie (ATL) beteiligt (Beimling and Moelling, 1989). Tax reguliert HTLV-I Replikation auf transkriptioneller Ebene (Fujisawa et al., 1985) und spielt eine Rolle bei der virus-induzierten Deregulation der Expression von zellulären Genen, wie solchen, die für Zytokine und deren Rezeptoren kodieren (Inoue et al., 1986; Kim et al., 1990; Tatewaki et al., 1995; Tschachler et al., 1993). Tax kann nicht direkt an DNA binden (Fujisawa et al., 1991), sondern bindet und aktiviert Transkriptionsfaktoren. Es ist in der Lage z.B. mit CREB (Bex et al., 1998; Giebler et al., 1997) und den basalen Transkriptionsfaktoren, wie TFIIA, zu interagieren und dadurch die Initiation der Transkription zu erleichtern (Clemens et al., 1996). Permanente Tax-Expression verursacht abnormale Proliferation (S-Phase) von T-Zellen. Eine Unterdrückung der Tax- Expression in primären T-Lymphozyten stoppt das Wachstum und hält den Zellzyklus in der G₁-Phase (Schmitt et al., 1998).

Mehrere Zytokine können durch Tax reguliert werden, darunter IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6 und GM-CSF (Gitlin et al., 1993; Yamagata et al., 1997). Die konservierten lymphokinen Elemente (z.B. Cle0), welche in allen von diesen Promotoren zu finden sind, sind vermutlich dazu da, um koordinierte Expressionsmechanismen der lymphokinen Gene zu ermöglichen (Koyano-Nakagawa et al., 1993). Die Cle0 Elemente in dem GM-CSF und IL-5 Promotor sind essentiell für die Aktivierung dieser Promotoren durch Tax (Nimer, 1991; Yamagata et al., 1997).

Anhand der Ets1-regulierten PTHrP P3 und HTLV-I Promotoren wurde gezeigt, daß Tax und Ets1 kooperieren können (Dittmer et al., 1993; Gitlin et al., 1993). Die Tax-Aktivierung des PTHrP P3 Promotors war sogar abhängig von Ets1. Ets1, oder vielleicht auch andere Ets-Faktoren wie zum Beispiel Ets2, könnten daher auch eine Bedeutung für die Tax Aktivierung von Promotoren durch das Cle0 Element besitzen. Auf der anderen Seite erhöht Tax die Bindungsaktivität von NF-AT (Good et al., 1997), einem weiteren Faktor, der potentiell an die Cle0 Sequenz binden kann.

Versuche mit dem IL-5 Promotor zeigten, daß Tax, Gata4 und ein AP1 Protein (c-Jun oder JunD) kooperieren, um den Promotor in Jurkat T-Zellen zu aktivieren. PMA Stimulierung ist notwendig, um AP1 zu stimulieren. Die Ionomycin-Stimulierung verstärkt den aktivierenden Effekt zusätzlich. Die AP1 Proteine c-Jun und JunD können an Cle0 binden. Deren DNA-

Bindungsaktivität wird durch Tax erhöht. Gata4 und Tax können nur in Anwesenheit von AP1 kooperieren. Obwohl sich im Cle0 Element eine NF-AT Bindungsstelle befindet, konnte bislang keine Beteiligung von NF-AT an der Aktivierung des IL-5 Promotors gezeigt werden (Yamagata et al., 1997).

2.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In meiner Diplomarbeit zeigte ich, dass Ets1 in der Lage ist, den humanen IL-5 Promotor in Zellen, die mit PMA und Ionomycin stimuliert worden sind, zu aktivieren. Außerdem führte eine Kotransfektion von Ets1 mit Tax in Zellen, die mit PMA stimuliert wurden, zu einer weiteren Aktivierung des IL-5 Promotors. In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Ets-Faktoren Ets1, Ets2 und Elf1 für die Transkription des humanen Interleukin-5 Gens studiert werden. Zusätzlich wurde die Beteiligung des Th2-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors Gata3 an der Aktivierung des IL-5 Promotors in Verbindung mit diesen Ets-Faktoren untersucht. Die Bedeutung von Gata3 für den humanen IL-5 Promotor wurde bisher noch nicht gezeigt. Als Systeme wurden verschiedene T-Zelllinien und primäre T-Zellen verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 *Chemikalien*

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, im Reinheitsgrad p.a. von folgenden Firmen bezogen: Applichem, Fluka, Merck, Amersham Pharmacia, Sigma.

3.2 *Radiochemikalien*

$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	370 kBq/ μl , 110 TBq/mmol, Hartmann, Braunschweig
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	370 kBq/ μl , 110 TBq/mmol, Hartmann, Braunschweig

3.3 *Bakterien und Medium*

<i>Escherichia coli</i>	HB101 (Max. efficiency competent bacteria) Gibco BRL
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g Bactotrypton 5 g Bacto Hefe Extrakt 10 g NaCl pH 7,2 -7,5 1 L mit aq. dest.
LB-Medium + Ampicillin	50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin in LB (flüssig) 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin in LB (Platten)
NZYDT-Medium	10 g NZ-amin 5 g Hefe Extrakt 5 g NaCl 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg Thymidin 0,1 g DAPA pH 7 1 L mit aq. dest. Gibco BRL

SOC Medium	20 g Bactotrypton 5 g Bacto Hefe Extrakt 0,58 g NaCl 0,189 g KCl 2,03 g MgCl ₂ 2,46 g MgSO ₄ 20 ml Glucose (20% stock solution) Gibco BRL
------------	--

3.4 Zellen und Medium

HSB-2	Akute lymphoblastische Leukämie-Zellen, human, induzierbare Expression von IL-5
Jurkat	Akute T-Zell Leukämie-Zellen, human
RPMI 1640 Medium	mit Glutamax-1 (L-Ala-L-Gln) 25 mM HEPES Gibco BRL
RPMI 1640 Medium	ohne Glutamin, Gibco BRL
Natriumpyruvat	100 mM, Gibco BRL Cat. No. 11360-039, Lot No. 3044925
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml Penicillin G Natrium 10000 µg/ml Streptomycin-sulfat in 0,85% Saline Gibco BRL Cat. No. 15140-122, Lot No. 1074527
Glutamin	200 mM, Gibco BRL
FCS	Foetal Bovine Serum Lot: 40Q6991K Origin: South American Mycoplasma and Virus Screened Performance tested Cat. No. 10270-106 Gibco BRL / Life Technologies
Humanes Serum (HS)	Q-Sera, Group AB Serum Lot: GRAB-118 Steril, hitze-inaktiviert obtained from a male non-transfused donor Product code ABIOOQ

Medium + Serum (Zelllinien)	Medium + 10% FCS
Medium + Serum (primäre Zellen)	Medium + 5% HS 1mM Natriumpyruvat 2mM Glutamin 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium	9 : 1 RPMI + 10% FCS : 10% DMSO

3.5 Lösungen, Reagenzien und Material für molekularbiologische Methoden

DNA-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenzanol FF 20mM EDTA
Agarose Gel (1,2%) mit Formaldehyd	1,2g Agarose 85ml H ₂ O 10ml 10 X MOPS nach Abkühlen: 5,1ml Formaldehyd (Endkonzentration 0,66 M)
10 X MOPS	0,2M 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure 50mM Natrium-acetat 10mM EDTA pH 7,0
20x SSC	3 M NaCl 0.3 M Natrium-citrat pH 7,0
Nylon Membran	Hybond TM -N Amersham LIFE SCIENCE
Kanülen	Braun Sterican [®] , 20G x 1 1/2", Ø 0,90 x 40mm BL/LB
Filterpapier	Gel-Blotting-Papier GB002 Schleicher & Schuell
Ionenaustauscher (für Formamid)	AG [®] 501-X8 (D) Resin Bio-Rad
100 X Denhardt's Lösung	10g Ficoll 400 10g Polyvinylpyrrolidon 10g BSA (Fraktion V) 500ml mit aq. dest., steril filtrieren, -20°C

Prä-Hybridisierungslösung	12ml deionisiertes Formamid 4,8ml 20 X SSC 1,2ml 100 X Denhardt's 2,4ml 10% SDS 4,8ml H ₂ O einige Minuten bei 65°C inkubieren 0,5ml Heringsperma-DNA (vor der Zugabe 5min bei 95°C erhitzen)
Hybridisierungslösung	3ml deionisiertes Formamid 1,5ml 20 X SSC 60µl 100 X Denhardt's 90µl 10% SDS 1,5ml H ₂ O einige Minuten bei 65°C inkubieren 60µl Heringsperma-DNA (vor der Zugabe 5min bei 95°C erhitzen) 20ng markiertes Oligonukleotid (meist 20µl) dazugeben, 1min bei 65°C
Stripping-Lösung	1ml 1M Tris/HCl, pH 7,5 0,4ml 0,5M EDTA 5ml 10% SDS 100ml mit aq. dest.
Oligo-dT Säulenmaterial	Oligo-(dT)-Cellulose (Typ 2) Collaborative Research, Inc.
10 X DNase Puffer	400mM Tris 100mM NaCl 60mM MgCl ₂ in H ₂ O pH 7,5
DNase	DNase I, RNase-frei 10U/µl Roche Diagnostics GmbH
Oligo-dT primer	15 T, 500 ng/ml MWG Biotech
5x First Strand Puffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂ Gibco BRL
1 X Adsorptionspuffer	4ml 1 M Tris/HCl pH 7,5 20ml 5 M NaCl 400µl 0,5 M EDTA pH 8,0 1ml 10% SDS ad 200ml H ₂ O

1 X 0,1M NaCl-Puffer	200µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 200µl 5 M NaCl 20µl 0,5 M EDTA pH 8,0 50µl 10% SDS ad 10ml H ₂ O
Elutionspuffer	100µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 20µl 0,5 M EDTA pH 8,0 50µl 10% SDS ad 10ml H ₂ O
dNTPs	jeweils 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM Stammlösung, pH 7,0, Promega) in H ₂ O
10x PCR-Reaktionspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,3 500 mM KCl 0,01% (w/v) Gelatine Perkin Elmer
10x Klenowpuffer (Eco/Pol Puffer)	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM MgCl ₂ 75 mM DTT New England Biolabs
DTT	1M, 0,1M
2 X Sybr Green Mix	2 X Real-time Sybr Green I Mix Eurogentec, Cat. No. ME-SN2X-03
GTC	28,22g GTC in 25ml H ₂ O auflösen (bei 60°C) 1,5ml 20% Sarcosyl 1,2ml 0,5M EDTA, pH 8 1,5ml 1M Natrium-citrat 3ml Mercaptoethanol 60ml mit aq. dest., pH 7
LiCl/EtOH	5M LiCl in 100%EtOH (3Vol.LiCl+2Vol.EtOH)
RES	5ml 10M Harnstoff 5ml 5M LiCl 1,25ml 10% SDS 1ml 1M Natrium-citrat 2,5ml 0,5M EDTA, pH 8 50ml mit aq. dest., pH 6,8
TES	2,5 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 µM EDTA 25% Sucrose steril filtriert

Triton-X Lösung	2,5 mM Tris/HCl, pH 7,5 3 mM EDTA 0,1% Triton X-100
CsCl/Tris-Lösung	165g Cäsiumchlorid 10ml 1M Tris/HCl, pH 7,2 200ml mit aq. dest.
TBE	10,8 g Tris 5,5 g Borsäure 0,74 g Na ₂ EDTA pH 8, 1 L mit aq. dest.
TE	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 7,2
Fisher (4x)	8 μ l EDTA 28 μ l 1M DTT 40 μ l 1M Tris/HCl, pH 7,2 20 μ l 1M KCl 40 μ l 5% NP-40 182 μ l Glycerol 400 μ l NEB-BSA (10 μ g/ml) 282 μ l H ₂ O
Größenstandard: 1kb ladder	DNA-Fragmentlängen (in bp) von oben nach unten auf einem Agarose-Gel: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 Gibco BRL
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, 200 U/ μ l
5x Reverse Transcriptase buffer	250 mM Tris/HCl 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂ pH 8.3
T4 Polynukleotidkinase	10000U/ml New England Biolabs
T4 Polynukleotidkinase-Puffer	10 X New England Biolabs

3.6 Lösungen, Reagenzien und Material für zellbiologische Methoden

CytoFix/CytoPerm™ Plus Kit CytoFix/CytoPerm™ 10 X PermWash™ GolgiStop™	Pharmingen, Cat. No. 2076KK enthält Formaldehyd (4%), Saponin (0,1%) enthält Natriumazid (0,09%), Saponin (1%) enthält Monensin
Bindungspuffer	1% BSA in PBS, pH 7,4
FACS-Puffer	1% FCS in PBS, pH 7,4 0,09% (w/v) Natriumazid
Propidium Iodid	1mg/ml
MACS-Säulen	MiniMACS Separation Columns MS Miltenyi Biotec GmbH
Magnetischer Ständer	MACS Multi Stand Miltenyi Biotec GmbH
PBE-Puffer	0,5% BSA 5mM EDTA in PBS, pH 7,4
PE-Puffer	5mM EDTA in PBS, pH 7,4
Lymphoprep™ tubes	Natriumdiatrizoat (9,1%), Polysaccharid (5,7%) Nycomed, Prod. No. 1019818
IL-4	Rekombinantes Interleukin-4 Pharmingen, Cat. No. 554605 Lot No. M055143
PHA	Phytohämagglutinin-M, <i>Phaseolus vulgaris</i> Calbiochem, Cat. No. 526511
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (DC) Fluka, Cat. No. 79346
Ionomycin	Free Acid, <i>Streptomyces conglobatus</i> Calbiochem, Cat. No. 407950

3.7 Lösungen, Reagenzien und Material für biochemische Methoden

Bradford Reagens	Bio-Rad Protein Assay
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ 800 ml dest. H ₂ O pH 7,4 mit HCl 1 L mit aq. dest.
Ladepuffer	0,0625 M Tris/HCl, pH 6,8 2% SDS 10% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 0,001% Bromphenol blau
30% Acrylamid (29:1)	29% (w/v) Acrylamid 1% (w/v) Bisacrylamid
40% Acrylamid (19:1)	38% (w/v) Acrylamid 2% (w/v) Bisacrylamid
Trenngel 12% (10%)	4,5 ml (5,0ml) aq. dest. 2,5 ml 4 X Trenngel-Puffer 3 ml (2,5ml) 40% Acrylamid (19:1) 100 μl 10% SDS mischen, dann: 50 μl 10% APS 7,5 μl TEMED
Sammelgel	3,9 ml aq. dest. 5 ml 2 X Sammelgel-Puffer 1 ml 40% Acrylamid (19:1) 100 μl 10% SDS mischen, dann: 50 μl 10% APS 10 μl TEMED
4 X Trenngel-Puffer	1,5M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% SDS
2 X Sammelgel-Puffer	0,25M Tris/HCl, pH 6,8 0,2% SDS
Elektrodenpuffer	14,4 g Glycin 3 g Tris, pH 8,3 900 ml mit aq. dest.

Laufpuffer	990 ml Elektrodenpuffer, pH 8,3 10 ml 10% SDS
Rainbow Marker	Rainbow TM colored protein molecular weight markers, high molecular weight range (14300-220000) Amersham Life Science, code RPN 756 Größenstandards: MW 220000 (blue), MW 97400 (brown), MW 66000 (red), MW 46000 (yellow), MW 30000 (orange), MW 21500 (blue), MW 14300 (magenta)
Entfärbelösung	40% MeOH 10% HOAc 50% H ₂ O
Coomassie Lösung	0,1% Coomassie R250 brilliant-blau in Entfärbelösung
Blotting Puffer	800 ml Elektrodenpuffer, pH 8,3 200 ml MeOH
Blocking Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,2 100 mM NaCl 2 mM EDTA 0,5% Tween-20
PVDF Membran (Millipore)	Immobilon-P 0,45 μ m Millipore
ECL Plus	Western blotting detection reagents Amersham Pharmacia Biotech, RPN 2132
Puffer A (Kernextraktion)	10 mM Hepes, pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Puffer C (Kernextraktion)	20 mM Hepes, pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM PMSF

Lyse Puffer (für Luciferase Assay)	25 mM Tris-PO ₄ , pH 7,8 2 mM EDTA 10% Glycerin 1% Triton X-100 2 mM DTT (frisch zugeben)
Meßpuffer (für Luciferase Assay)	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ 5 mM ATP (frisch zugeben) pH 7,8
Luciferin	250 µM Luciferin 250 µM NaOH
5% Acrylamid-Gel (EMSA)	11,7 ml aq. dest. 4,7 ml TBE (1x) 3,4 ml 30% Acrylamid (29:1) mischen, dann: 200 µl 10% APS 20 µl TEMED

3.8 Antikörper

3.8.1 Primäre Antikörper

α-CD3	UCHT1, IgG2a, erhalten von Dr. Gundram Jung
α-Elf1	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-Elk1	Santa Cruz, I-20, rabbit polyclonal IgG
α-Erg1/2	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-ERM	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-Ets1	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-Ets1	Santa Cruz, N-276, rabbit polyclonal IgG
α-Ets1/2	Santa Cruz, C-275, rabbit polyclonal IgG
α-Ets2	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-FEV	Santa Cruz, C-18, rabbit polyclonal IgG
α-Fli1	Santa Cruz, C-19, rabbit polyclonal IgG
α-Gata3	Santa Cruz, HG3-35, rabbit polyclonal IgG
α-IgG ₁ -FITC	Fluorescein Isothiocyanat-konjugiertes Ratten IgG ₁ Isotypenkontrollimmunoglobulin Pharmingen, Cat. No. 20614A, R3-34 Klon
α-IL-5-FITC	Fluorescein Isothiocyanat-konjugierter Ratten anti-Maus/Mensch IL-5 monoklonaler Antikörper Pharmingen, Cat. No. 18054A, TRFK5 Klon
α-NERF	Santa Cruz, C-20, rabbit polyclonal IgG
α-PEA3	Santa Cruz, 16, rabbit polyclonal IgG
α-Tax	erhalten von Dr. Jürgen Dittmer, mouse monoclonal

3.8.2 Sekundäre Antikörper

α -Mouse	HRP-gekoppelt, Amersham Life Science
α -Rabbit	HRP-gekoppelt, Amersham Life Science

3.9 *Plasmide*

3.9.1 Reporterplasmide

pIL-5P.Luc (-494/+44, -106/+44)	} erhalten von Dr. T. Wirth
pIL-5P.Luc (EM)	
PTHrPWT.Luc	erhalten von Dr. J. Dittmer

3.9.2 Expressionsvektoren

pcTax	}	erhalten von Dr. W. C. Greene (Smith and Greene, 1990)
pcTax-M5		
pcTax-M7		
pKCR3/ets1 (SV40)	}	erhalten von Dr. J. Ghysdael (Boulukos et al., 1989; Gegonne et al., 1992)
pKCR3/ Δ VIIets1 (SV40)		
Δ EBEts2 (SV40)		
Δ EBE1f1 (SV40)		
pcDNA3Ets1 (CMV)	}	erhalten von Dr. J. Dittmer
pcDNA3(Δ -77-123)Ets1 (CMV)		
RSV.GATA3		erhalten von Dr. J. D. Engel(Yamamoto et al., 1990)

3.10 *PCR-Primer*

3.10.1 RT-PCR

IL-5	vorwärts	5'-GAGGATGCTTCTGCATTTGAGTTTG-3'
	rückwärts	5'-GTCAATGTATTTCTTTATTAAGGACAAG-3'
GAPDH	vorwärts	5'-CACTGACACGTTGGCAGTGG-3'
	rückwärts	5'-CATGGAGAAGGCTGGGGCTC-3'

3.10.2 Taqman-PCR

IL-5	vorwärts rückwärts	5'-AGCTGCCTACGTGTATGCCA-3' 5'-GTGCCAAGGTCTCTTTCACCA-3'
GAPDH	vorwärts rückwärts	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3' 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'
Ets1	vorwärts rückwärts	5'-CGTACGTCCCCCACTCCTG-3' 5'-TTGATGATGGTGAGAGTCGGC-3'
Ets2	vorwärts rückwärts	5'-TTTCTCATGACTCCGCCAACT-3' 5'-GGCTTGACTCATCACAGCCTT-3'
Gata3	vorwärts rückwärts	5'-AAATGAACGGACAGAACCGG-3' 5'-TGCTCTCCTGGCTGCAGAC-3'
Oct1	vorwärts rückwärts	5'-CTAAACCCAAGCCTGATGGC-3' 5'-GGGTCCCTGGATTCAGACTGA-3'
Oct2	vorwärts rückwärts	5'-GCAAGCTCTACGGCAACGAC-3' 5'-TGTTCTTGAAGCTCAGGTTGAGG-3'
NF-AT	vorwärts rückwärts	5'-GACGACCTGTGTCCGCAGT-3' 5'-GAGGTGACATTATTGGCGAGG-3'
Fra2	vorwärts rückwärts	5'-AGGCAGTGCATTCATCCCC-3' 5'-CACCATCCACTGCAGGTCCT-3'
JunB	vorwärts rückwärts	5'-GCAAAGCAGGGTCAATAGGG-3' 5'-GATCTTCCACGACTGCTGCTC-3'
IL-13	vorwärts rückwärts	5'-CCTGGAATCCCTGATCAACG-3' 5'-AGAATCCGCTCAGCATCCTCT-3'
IFN γ	vorwärts rückwärts	5'-CCAACGCAAAGCAATACATGA-3' 5'-TTCGCTTCCCTGTTTTAGCTG-3'
c-Maf	vorwärts rückwärts	5'-AAGAGGCGGACCCTGAAAA-3' 5'-GACTCCAGGACGTGTCTCTGC-3'
T-bet	vorwärts rückwärts	5'-GATGCGCCAGGAAGTTTCA-3' 5'-GGGTCACATTGTTGGACGC-3'
18S rRNA	vorwärts rückwärts	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

3.11 Northern Sonden

Ets1

5'-AAGGGCACCTTCAAGGACTATGTTTCGAGATCGGGCTGACATGAACAAGGA-3'

chEts2

5'-TTGCTCTACAGGATCGCTTCGATCTTGAATATAGTCTTTGAAAGACATCGT-3'

Gata3

Der RSV.Gata3-Vector wurde mit dem Restriktionsenzym MboII verdaut, und danach die dadurch entstandenen Fragmente mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP 5'-terminal radioaktiv markiert.

Actin

interne 40-bp Sonde, siehe (Tendler et al., 1990)

3.12 Oligonukleotide

Ets Konsensus

sense 5'-GAGATAAACAGGAAGTGGTC-3'

antisense 5'-GACCACTTCCTGTTTATCTC-3'

IL-5 WT (-81/-38)

sense 5'-GGCATTCTCTATCTGATTGTTAGAAATTATTCATTTCCCTCAAAG-3'

antisense 5'-CTTTGAGGAAATGAATAATTTCTAACAATCAGATAGAGAATG-3'

IL-5 WT (-63/-37)

sense 5'-GTTAGAAATTATTCATTTCCCTCAAAGA-3'

antisense 5'-TCTTTGAGGAAATGAATAATTTCTAA-3'

IL-5 EM (-63/-37)

sense 5'-GTTAGAAATTATTCATTTCTCAAAGA-3'

antisense 5'-TCTTTGATGAAATGAATAATTTCTAA-3'

IL-5 EM2 (-63/-37)

sense 5'-GTTAGAAATTATTCATATCCTCAAAGA -3'

antisense 5'-TCTTTGAGGAAATGAATAATTTCTAA-3'

Sp1

sense 5'-GATCCCTTGGTGGGGCGGGCCTAAGCTGCGCAT-3'

antisense 5'-ATGCGCAGCTTAGGCCCGCCCCACCAAGGATC-3'

3.13 Molekularbiologische Methoden

3.13.1 Transformation von *E.coli*

Zehn Mikroliter einer Suspension kompetenter Bakterien (HB101, Gibco BRL) werden mit 10-50 ng Plasmid-DNA 10min bei 4°C inkubiert. Danach wird der Ansatz 45 sec. auf 42°C erwärmt, 4+1 mit SOC-Medium (Gibco BRL) versetzt und 5min bei 37° inkubiert. Schließlich werden die Bakterien auf LB-Amp Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.13.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

100 ml LB-Amp Medium werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 50 ml dieser Über-Nacht-Kultur wird 1 L LB-Amp Medium angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach 9h wird Chloramphenicol (170 µg/ml) zugegeben und die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert und geschüttelt. Dann werden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus benchtop, 0,5 L Flaschen, 4000rpm, 30min, RT) und die Pellets mit je 1 ml Tris/HCl (10 mM, pH 8) gewaschen. Jedes Pellet wird dann in 3 ml TES resuspendiert und die Zellsuspensionen zusammengefügt. Zu diesen 6 ml werden 0,5 ml Lysozym (100 mg/ml) zugegeben und durch Rollen des Gefäßes vorsichtig gemischt. Nach 20-30min bei RT werden zuerst 1,2 ml 0,5 M EDTA zugegeben, um DNasen zu inhibieren, und dann 9,6 ml Triton-X Lösung, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wird zentrifugiert (30min, 35000rpm, 70Ti Rotor, 4°C), und der Überstand in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 g CsCl und 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wird der Überstand auf Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckmann, 5 ml) verteilt und ultrazentrifugiert (4h, 78000rpm, (oder über Nacht, 70000rpm) NVT90 Rotor, 18°C).

Die Banden werden mit Kanülen (20G x 1 1/2", Ø 0,90 x 40mm BL/LB) abgenommen und in ein neues Ultrazentrifugationsröhrchen überführt, welches dann mit CsCl/Tris-Lösung aufgefüllt wird. Es wird über Nacht ultrazentrifugiert (70000rpm, NVT90 Rotor, 18°C) und die Bande am nächsten Tag wieder mit einer Kanüle (20G x 1 1/2", Ø 0,90 x 40mm BL/LB) abgenommen. Diese Bande wird 1:1 mit aq. dest. verdünnt und 3-4 Mal mit Butanol 1:1 extrahiert. (Falls die wässrige Phase während einer dieser Extraktionsschritte trüb aussieht,

wird aq. dest. zugegeben.) Die wässrige Phase wird entfernt, bis auf 8 ml mit aq. dest. aufgefüllt, 400 μ l 5M NaCl und 19 ml EtOH zugegeben, um die DNA auszufällen.

3.13.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Absorption von DNA- und RNA-Lösungen werden in einem UV Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} gibt eine Aussage über die Reinheit der Probe (260 nm = Absorptionsmaximum von DNA und RNA; 280 nm = Absorptionsmaximum von Proteinen). Bei DNA-Messungen entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ μ l, wobei bei einer RNA-Messung eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 40 μ g/ μ l entspricht. Bei Oligonukleotiden entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 33 μ g/ μ l.

3.13.4 Restriktionsverdau für die Analyse von DNA-Fragmenten

Die DNA wird mit passenden Restriktionsendonukleasen, welche doppelsträngige DNA an definierten Stellen schneiden können, verdaut, um anhand der erhaltenen Fragmente die Identität der DNA zu überprüfen, oder die entsprechenden Fragmente für weitere Versuche (z.B. als Northern Sonde) zu verwenden.

Restriktionsansatz:

- 0,5 μ g DNA
- 0,7 μ l Puffer (10x)
- 0,7 μ l BSA (10x)
- 0,4 μ l Enzym 1
- 0,4 μ l Enzym 2
- mit aq. dest. auf 7 μ l

Je nach verwendetem Enzym werden die vom Hersteller empfohlenen Inkubationszeiten, Puffer- und Temperaturbedingungen gewählt. Zu Beachten ist dabei, dass die Enzymlösung nicht mehr als 1/10 des Volumen ausmacht, damit das dem Enzym beigefügte Glycerin ausreichend verdünnt ist, da es sonst die Reaktion beeinträchtigen kann. Bei Verdau mit mehreren Enzymen werden die Pufferbedingungen so gewählt, dass beide Enzyme nach Herstellerangaben eine Aktivität von mindestens 75% zeigen. Der Ansatz wird bei der den verschiedenen Enzymen entsprechenden Temperatur 45-60min im Wasserbad inkubiert.

3.13.5 Agarose Gelelektrophorese

Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure kann in Agarose-Horizontalgelen nach Größe und Ladung in einem elektrischen Feld (Sambrook et al., 1989) aufgetrennt werden. Restriktionsansätze (7 μ l) bzw. PCR Produkte werden mit 3 μ l Ficoll (40%) und 0,5 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt und auf ein Agarosegel (1-2,5% Agarose in TBE) aufgetragen, um die vorhandenen Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Das Gel wird mit 50-100 V ca. 15min laufengelassen und unter UV-Licht (254 nm) betrachtet. Als Laufpuffer wird 1 X TBE eingesetzt. Als Größenvergleich werden je nach Größe des Gels 1-3 μ l einer "1kb ladder DNA" (1 μ g/ μ l) aufgetragen, die durch Zugabe der entsprechenden Menge Verdaupuffer den Salzbedingungen angepasst wird.

3.13.6 RNA-Isolierung

3.13.6.1 nach Birnboim (Birnboim, 1988)

Zellen werden mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wird in GTC aufgenommen, und die Zellen mit Ultraschall behandelt (3 x 10s, Branson Sonifier 250). Dann werden 0,015 Vol. HAc (1M) und 1 Vol. LiCl/EtOH dazugegeben und der Ansatz wird 45min auf Eis inkubiert (oder bei -20°C eingefroren). Es folgt eine Zentrifugation (10min, 13000rpm, 4°C). Das Pellet wird dann mit 80% EtOH/20% 0,1M NaCl gewaschen und in H₂O aufgenommen. 4 Vol. RES werden zugegeben und mit 0,5 Vol. Phenol/CHCl₃ extrahiert. Dann wird der Ansatz kräftig geschüttelt (Vortex) und abzentrifugiert (5min, 13000rpm, RT). Der Überstand wird in eine neues Eppendorf Gefäß überführt und mit CHCl₃ extrahiert. Dafür wird der Ansatz wiederum kräftig geschüttelt (Vortex) und abzentrifugiert (1min, 13000rpm, RT). Der Überstand wird in eine neues Eppendorf Gefäß überführt, mit 0,015 Vol. HAc (1M) und 1 Vol. EtOH ausgefällt und bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10min, 13000rpm, 4°C) wird das Pellet mit 80% EtOH/20% 0,1M NaCl gewaschen und danach in H₂O aufgenommen. Um die RNA vollständig zu lösen, kann man den Ansatz bei 65°C inkubieren. Die Konzentration wird mittels UV-Absorption im Photometer bestimmt. Die Güte der RNA kann durch Auftragen (5 μ g RNA in 5 μ l, 0,7 μ l 10 X NEB-Puffer, 3 μ l 40% Ficoll, 1 μ l 1 μ g/ μ l EtBr) auf ein 1,3%iges Agarose Gel überprüft werden. Die RNA wird kurzzeitig bei -20°C und langfristig bei -80°C aufbewahrt.

3.13.6.2 Qiagen QIAshredder™, Cat. No. 79656, und RNeasy Mini Kit®, Cat. No. 74106

Zellen werden mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wird in einem GTC-haltigem Lysis-Puffer aufgenommen, auf die Shredder-Säule geladen, und abzentrifugiert, wobei die Zelllysate homogenisiert werden. Zu dem Lysat werden 70% EtOH gegeben und dieses auf eine RNeasy-Säule geladen, an deren Matrixpartikeln die zu isolierende RNA bindet. Es folgen mehrere Waschschrte bevor die RNA mit H₂O von der Säule eluiert wird (siehe Anleitung). Die Konzentration wird mittels UV-Absorption im Photometer bestimmt. Die Güte der RNA kann durch Auftragen (5µg RNA in 5µl, 0,7µl 10 X NEB-Puffer, 3µl 40% Ficoll, 1µl 1µg/µl EtBr) auf ein 1,3%iges Agarose Gel überprüft werden. Die RNA wird kurzzeitig bei -20°C und langfristig bei -80°C aufbewahrt.

3.13.7 mRNA-Isolierung

Oligo-dT in 1 X Adsorptionspuffer quellen lassen (mind. 15min). Ca. 0,4ml davon in 1ml Spritzen, die mit RNase-freier silanisierter Glaswolle unten ausgelegt sind, füllen. Die Säulen werden mit 10 Vol. 1 X Adsorptionspuffer gespült. Die Gesamt-RNA wird auf ein Volumen von 500µl aufgefüllt, 5min bei 65°C inkubiert, mit 500µl 2 X Adsorptionspuffer versetzt und auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wird aufgefangen und nochmals über die Säule gegeben. Die Säule wird dann zuerst mit insgesamt 5ml (5 x 1ml) 1 X Adsorptionspuffer und dann mit 1,4ml (2 x 0,7ml) 0,1M NaCl-Puffer gewaschen. Zum Eluieren werden Eppendorf Gefäße unter die Säulen gestellt und die RNA mit 1,2ml (3 x 0,4ml) Elutionspuffer von der Säule gespült. Zu diesen insgesamt 1,2ml Eluat werden 30µl NaCl (5M) gegeben, und der Ansatz auf 3 Gefäße verteilt (je 410µl). Die Ansätze werden mit je 1000µl EtOH versetzt und zum Ausfällen über Nacht bei -20°C inkubiert.

Nach einer Zentrifugation (mind. 1h, 13000rpm, 4°C) wird der Überstand sehr vorsichtig abgesaugt, das Pellet mit ca. 100µl 80% EtOH gewaschen und danach sehr trocken gesaugt und in H₂O aufgenommen. Nachdem sich die RNA gelöst hat, kann man die Lösung zentrifugieren (5-10min, 13000rpm, 4°C), um etwaige Oligo-dT Reste zu entfernen. Die Konzentration wird mittels UV-Absorption im Photometer bestimmt. Die Güte der mRNA kann durch Auftragen (5µg RNA in 5µl H₂O, 0,7µl 10 X NEB-Puffer, 3µl 40% Ficoll, 1µl

1µg/µl EtBr) auf ein 1,3%iges Agarose Gel überprüft werden. Die mRNA wird kurzzeitig bei -20°C und langfristig bei -80°C aufbewahrt.

3.13.8 Entfernung von DNA-Kontamination aus RNA-Isolaten

Eventuell extrahierte DNA-Kontaminationen in den RNA-Präparationen werden mit *DNase* verdaut.

Der folgende Ansatz wird dazu 15min bei 37°C inkubiert:

1µg RNA
1µl 10 X DNase Puffer
1µl DNase
ad 10µl H₂O

Zum Abstoppen der Reaktion wird der Ansatz 15min bei 65°C inkubiert.

3.13.9 Northern Blot

10µg RNA werden mit 0,038 Vol. NaCl (5M) und 3 Vol. EtOH über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach einer Zentrifugation (1h, 13000rpm, 4°C) wird das Pellet mit 80% EtOH gewaschen, getrocknet und in 2µl H₂O aufgenommen. Es werden 8µl Sample Buffer zugegeben, der Ansatz bei 65°C 15min inkubiert, und mit 1µl EtBr (1µg/µl) versetzt. Die Auftrennung von RNA erfolgt in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel. Das Gel wird unter dem Abzug in die Gelapparatur gegossen, die RNase frei sein muss (mit SDS gereinigt). Das Gel wird in der Apparatur so mit 1 X MOPS-Puffer umgeben, dass keine Flüssigkeit in die Taschen gerät. Das Gel bei 50V laufen lassen. Sobald die Proben ins Gel eingelaufen sind, wird die Kammer mit 1 X MOPS-Puffer komplett aufgefüllt. Das Gel wird so lange laufen gelassen, bis der Farbstoff ca. 2/3 des Gels durchwandert haben. In einer Geldokumentationsanlage (UV) wird ein Bild des Gels angefertigt. Das Gel ca. 2-3min mit H₂O waschen (2x), zur Fragmentierung der RNA 10min mit 0,05N NaOH/1 X SSC waschen, wieder 2-3min mit H₂O waschen (2x), 15min in 20 X SSC und 15min in 10 X SSC waschen und dann in 10 X SSC lassen.

Zum Blotting wird die Apparatur wie folgt aufgebaut (Abb. 9): Das Gel wird so zurechtgeschnitten, dass nur die Spuren mit RNA bleiben. Es wird mit der Oberseite auf 6-10 Lagen Filterpapier aufgelegt, welche auf einem Sockel in einer Glasschale angefüllt mit 10 X SSC liegen. Die überhängenden Enden des Filterpapiers sorgen für stetiges Ansaugen an Puffer für den Blot-Vorgang. Auf das Gel werden eine auf die Größe des Gels ausgeschnittene Nylon Membran, darüber mehrere Lagen auf die Größe des Gels ausgeschnittenes Filterpapier (in 10 X SSC getränkt), ein Stapel gefaltetes Kleenex, und darauf ein kleines Gewicht in Form von einem Plastikschälchen, zum Beispiel, gelegt. Durch die Kapillarsogwirkung des trockenen Kleenex-Papiers findet das Blotting von dem Gel auf die Membran über Nacht bei RT statt.

Von der Membran wird in der Geldokumentationsanlage (UV) mit angelegtem Lineal ein Bild angefertigt. Ein Bild des Gels dient zur Kontrolle, dass die RNA komplett auf die Membran transferiert wurde.

Die Membran wird auf einem Filterpapier in einem UV Crosslinker (UV Stratalinker® 2400, Stratagene, Autocrosslink) bestrahlt und dann für 15min zwischen 2 Filterpapieren bei 80°C gebacken, um die RNA zu immobilisieren.

Prä-Hybridisierung: Zur Prä-Hybridisierung wird die Membran mit Prä-Hybridisierungslösung in einen Müllbeutel eingeschweißt (Folienschweißgerät) und mind. 3h bei 44°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zur Aufbewahrung kurz mit 2 X SSC waschen, zwischen 2 Filterpapieren trocknen und in Frischhaltefolie einschlagen. Die Membran muss sauber und RNase-frei bleiben!
Vorbereitung zur Hybridisierung: Rehydratisieren mit 2 X SSC, in 50ml Falcon tube nochmal 1-2h mit ursprünglicher Prä-Hybridisierungslösung (Aufbewahrung bei -20°C, vor Benutzung bei 65°C erwärmen) inkubieren.

Hybridisierung: Für die Hybridisierung wird die Membran in einer Rollflasche (Falcon, 50ml) mit der auf 65°C erhitzten Hybridisierungslösung über Nacht bei 40°C unter Rotation im Hybridisierungsofen inkubiert.

Waschen nach der Hybridisierung: Die Membran wird bei RT je 5min in 2 X SSC, 0,2 X SSC, vorgewärmtem 0,1 X SSC und wieder 2 X SSC gewaschen. Dann wird sie kurz

zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und zwischen zwei Haushaltsfolien gelegt. Die Banden werden autoradiographisch detektiert.

Strippen: Die Stripping-Lösung wird auf 75°C erhitzt, und die Membran 10min bei 75°C unter Schütteln inkubiert.

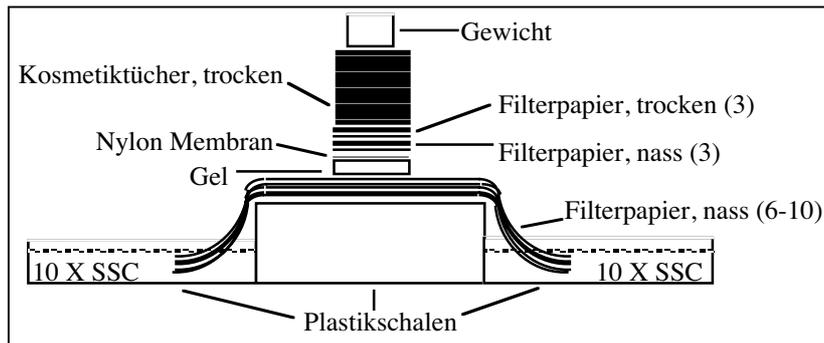


Abb. 9: Aufbau der Northern-Blot-Apparatur

3.13.10 Reverse Transkription (RNA --> cDNA)

Um die Menge exprimierter mRNA eines Gens quantifizieren zu können, wird eine sogenannte RT-PCR durchgeführt. Im ersten Teil, der reversen Transkription, wird zunächst die isolierte RNA (in 2.13.6 beschrieben) mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Der folgende Ansatz wird 10min bei 70°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt:

1µg RNA (nach DNase Behandlung, siehe 2.13.8)
 ad 11µl H₂O
 1µl OligoT (500ng/µl)

Es werden wie folgt zugegeben:

4µl 5 X first strand buffer
 2µl DTT (0,1 M)
 1µl dNTPs (10mM)

Nach 2min bei 42°C wird der Ansatz in 2 Eppendorf Gefäße verteilt (je 9,5µl). Zu einem werden 0,5µl Reverse Transkriptase, zum anderen als Kontrolle 0,5µl H₂O gegeben und beide Ansätze werden 50min bei 42°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird der Ansatz 15min bei 70°C inkubiert. Die erhaltene cDNA kann nun für eine PCR-Reaktion verwendet werden.

3.13.11 PCR

Im zweiten Teil der RT-PCR wird ein Abschnitt eines bestimmten Gens aus der gesamten cDNA, die aus der isolierten RNA synthetisiert wurde, nun über eine PCR-Reaktion spezifisch amplifiziert. Der folgende Ansatz wird für die PCR-Reaktion eingesetzt:

2,5µl 10 X PCR-Puffer (ohne MgCl₂)
1,5µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
0,5µl 10 mM dNTPs (Endkonzentration 200µM)
1,25µl 10 µM fwd Primer (Endkonzentration 0,5µM)
1,25µl 10 µM rev Primer (Endkonzentration 0,5µM)
0,2µl AmpliTaq (1U)
16,8µl H₂O

1µl cDNA (revers transkribiert aus isolierter RNA)

Für die GAPDH- und IL-5-Primer sind die PCR-Temperaturen bei 35 Zyklen wie folgt:

30s 94°C Denaturierung
30s 55°C Annealing
1min 72°C Elongation

3.13.12 Taqman-PCR

Die Taqman-PCR bietet eine Möglichkeit zur quantitativen Analyse von PCR-Produkten. Hier wurde die SYBR Green PCR Technologie (Perkin Elmer) benutzt. Spezielle Taqman-Primer werden mit Hilfe des Programmes PrimerExpressTM 1.0 von AbiPrism entworfen. Dabei beträgt die optimale Länge der Primer 20 Basenpaare, die Annealingtemperatur 58 bis 60°C, der GC-Gehalt liegt zwischen 20 und 80% und die Grösse des PCR-Produktes zwischen 50 und 150 Basenpaaren.

Um die beste Kombination der Primer-Konzentrationen zu ermitteln, wird eine Primer-Matrix erstellt. Dabei werden alle Kombinationen der folgenden Primer-Endkonzentrationen getestet:

sense: 50nM, 300nM, 900nM

antisense: 50nM, 300nM, 900nM

Um die Amplifikation eines spezifischen PCR-Produktes zu überprüfen, werden die PCR-Ansätze einer Primer-Matrix auf einem 2,5%-Agarosegel aufgetrennt. Es wird die Kombination an Primer-Konzentrationen gewählt, bei der die größte Menge an PCR-Produkt entsteht, und gleichzeitig der Ansatz ohne Reverse Transkriptase kein Produkt liefert. In der Regel war dies bei einer Endkonzentration jedes Primers von 300 nM der Fall.

Der folgende Ansatz wird für die Taqman-PCR eingesetzt:

5µl 5 X SYBR Green Buffer

2µl fwd Primer (Stamm-Konzentration 1,5mM)

2µl rev Primer (Stamm-Konzentration 1,5mM)

1µl cDNA (ca. 10ng, revers transkribiert aus isolierter RNA)

Die Ansätze werden in MicroAmp® Optical 96-Well Platten (Applied Biosystems, Part No. N801-0560) pipettiert, mit Deckel (Applied Biosystems, Part No. N8010935) versehen, abzentrifugiert und die PCR in dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector durchgeführt.

Die Resultate werden mit Hilfe des Sequence Detector v1.7 Programms ausgewertet. Mit Hilfe dieses Computerprogrammes kann der Verlauf der PCR graphisch als Kurve mit $x =$ Zyklenzahl und $y =$ relative Fluoreszenzintensität dargestellt werden. Die Fluoreszenz spiegelt die Bindung von SYBR Green an doppelsträngige DNA wider. Es ergibt sich in der Regel ein exponentieller Verlauf der Kurve, wobei zum Ende hin ein Plateau erreicht wird. Für die Quantifizierung ermittelt das Computerprogramm einen Schwellenwert. Der C_t Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Kurve mit diesem Schwellenwert. C_t ist ein Maß für die Menge an cDNA in der Startreaktion und spiegelt den Zyklus wider, bei dem statistisch ein signifikanter Anstieg in der Fluoreszenz auftritt. Um einen Effekt unterschiedlicher Gesamtmengen an cDNA auszuschließen, wird der C_t -Wert einer endogenen Kontrolle von den C_t -Werten der jeweiligen Proben abgezogen, wodurch man ΔC_t erhält. Als endogene Kontrolle dient in der Regel GAPDH. Die relative Menge an vorhandener cDNA wird als $2^{-\Delta C_t}$ ausgedrückt.

3.13.13 ds-Oligonukleotid-Hybridisierung

Gleiche Mengen von sense und antisense Oligonukleotid werden zusammen 5min bei 95°C inkubiert. Nach langsamer Abkühlung auf RT wird KCl zugegeben, so dass die Endkonzentration 50mM beträgt.

3.13.14 Radioaktive Endmarkierung von doppelsträngigen Oligos mit 5'-überhängenden Enden

IL-5 WT (63/-37)

5' – GTTAGAAATTATTCATTTCTCAAAGA - 3'

5' – CAATCTTTAATAAGTAAAGGAGTTTCT - 3'

Um das Stück doppelsträngige DNA durch eine Fill-in Reaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I am markierten 5'-terminalen C (C) aufzufüllen und dabei radioaktiv zu markieren, wird folgender Ansatz 30min bei RT inkubiert:

Ansatz: 0,2 µl (200 ng) IL-5 WT (ds DNA)
 5 µl Klenow Puffer (10x)
 10 µl (50 µCi) α-³²P-dCTP (Amersham)
 2 µl Klenow-Fragment
 33 µl aq. dest.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 µl EDTA beendet. Um nicht-inkorporierte Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dCTP) zu entfernen, wird das markierte Oligo mittels einer Gelfiltrationssäule (G-50 Micro-Column, Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Zunächst wird das Harz der Säule durch kräftiges Schütteln (Vortex) resuspendiert und der Äquilibriumspuffer abzentrifugiert (1min, 2000rpm). Nach Zugabe des markierten Oligos wird für 2min bei 2000rpm zentrifugiert, wodurch die Oligos eluiert werden und sämtliche nicht-inkorporierte dNTPs im Harz hängen bleiben. Nach Wiederholung dieser Prozedur mit einer weiteren Säule wird die Aktivität des Eluats nach der Methode von Cerenkov im Szintillationszähler gemessen.

3.13.15 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Um Oligonukleotide 5'-terminal radioaktiv zu markieren, führt man eine Phosphorylierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP durch. Folgender Ansatz wird 20min bei 37°C inkubiert:

0,4µl antisense-Oligonukleotid (40ng)
5 µl T4-Polynukleotidkinasepuffer
2 µl T4-Polynukleotidkinase
0,7 µl 1M DTT
10 µl [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP, 100 µCi
37 µl H₂O

Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 µl EDTA beendet. Das markierte Oligonukleotid wird mittels einer Gelfiltrationssäule (G-50 Micro-Column, Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Zunächst wird das Harz der Säule durch kräftiges Schütteln (Vortex) resuspendiert und der Äquilibriumspuffer abzentrifugiert (1min, 2000rpm). Nach Zugabe des markierten Oligos wird für 2min bei 2000rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung dieser Prozedur mit einer weiteren Säule wird die Aktivität des Eluats nach der Methode von Cerenkov im Szintillationszähler gemessen.

3.14 Zellbiologische Methoden

3.14.1 Allgemeine Zellkultur eukaryontischer Zelllinien

Die Inkubation der oben genannten Zelllinien erfolgt im Brutschrank bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 92% und einer CO₂-Konzentration von 5%. Den Zellen wurde alle 3-5 Tage frisches Medium zugefüttert. Als Kultivierungsmedium wurde RPMI-Medium mit 10%FCS verwendet.

3.14.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren werden die Pellets (ca. $2,5 \times 10^7$ Zellen) in 1,5 ml auf Eis gekühltem Einfriermedium aufgenommen und langsam bei -80°C eingefroren (in einem mit Alufolie bedeckten Styroporständer).

3.14.3 Transfektion von Zellen mittels Elektroporation

Am Tag vor der Transfektion werden die Zellen 1:1 mit frisch angesetztem Medium + Serum gefüttert.

Für 20 Transfektionsansätze werden 300-400 ml Zellen (ca. 1×10^6 Zellen/ml) abzentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge, 1500rpm, 10min, RT), und die Pellets erst mit insgesamt 50 ml Medium ohne Serum gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit insgesamt 25 ml Medium ohne Serum gewaschen. Bei diesen Schritten werden die Pellets so zusammengefügt, daß nach dem letzten Schritt ein Pellet übrigbleibt. Dieses Pellet wird in ca. 5 ml Medium ohne Serum resuspendiert. Pro Transfektionsansatz werden 250 μl Zellen in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die DNA wird dazu pipettiert, die Suspension wird vorsichtig geschüttelt, und die Zellen werden mit einem BIO-RAD Gene Pulser bei 250 V und 800 μF (ca. 40 msec) elektroporiert und auf Eis gestellt. Nach 30min werden die Transfektionsansätze in 6 ml Medium + Serum überführt (in Zellkulturflaschen) und bei 37°C inkubiert. Nach weiteren 60min werden DMSO, PMA (10 ng/ml) und Ionomycin (2 μM) in je 2 ml Medium + Serum zu den Zellen gegeben und die Zellen bis zur Zellernte bei 37°C inkubiert.

Wenn ein Luciferase-Assay durchgeführt werden soll, werden die Zellen 7h nach der Elektroporation geerntet.

3.14.4 Isolierung von primären Lymphozyten aus menschlichem Blut (Abb. 10)

70ml Frischblut eines freiwilligen Spenders werden 1:1 mit PBS verdünnt und in 4 Lymphoprep-Gefäße (Nycomed Pharma) gefüllt. Nach einer Zentrifugation (10min, 2300rpm, RT) wird der Überstand 1:1 mit PBS verdünnt, die Lymphozyten abzentrifugiert (15min,

1500rpm, RT) und das Pellet 1 x mit PBS und 1x mit Medium ohne Serum gewaschen. Die Zellen werden in Medium mit Serum aufgenommen (ca. 1×10^6 Zellen/ml), mit 10ng/ml IL-4 und 10ng/ml α -CD3 stimuliert und bei 37°C inkubiert (5%CO₂, 92%Luftfeuchtigkeit). Nach 3 Tagen werden die Zellen abzentrifugiert (10min, 1500rpm, RT), in frischem Medium plus Serum aufgenommen und mit IL-4 stimuliert. Nach weiteren 4 Tagen werden die Zellen wie folgt behandelt und geerntet.

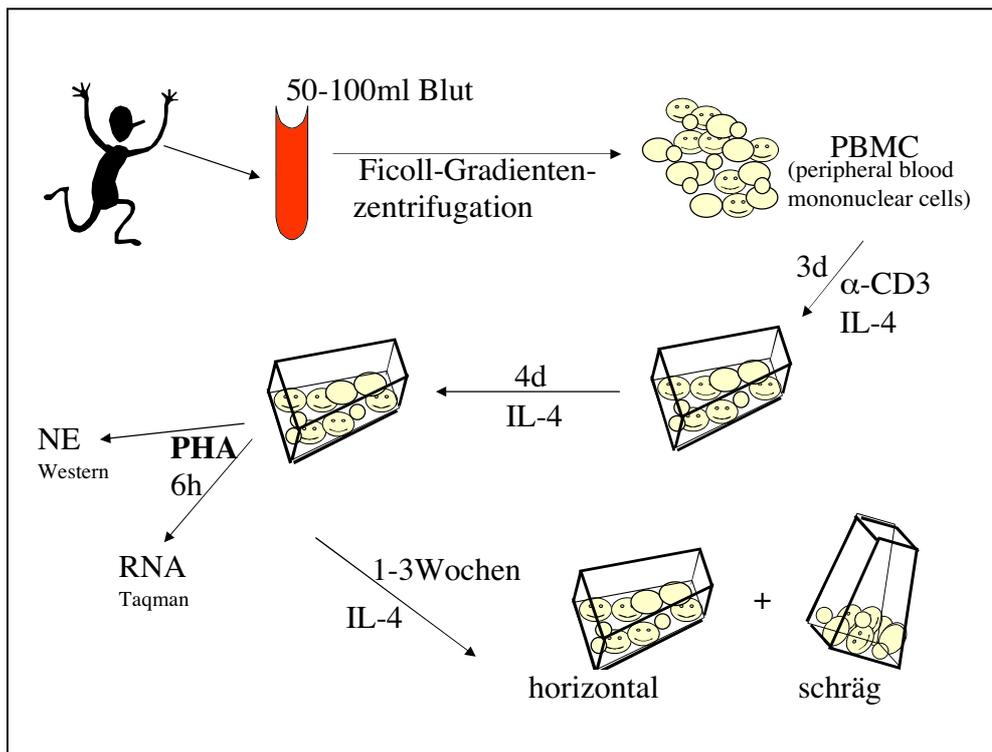


Abb. 10: Isolierung und Kultivierung von Lymphozyten (Th2) aus Frischblut.

Die Zellen werden 1x mit Medium ohne Serum gewaschen und in 3 getrennte Populationen aufgeteilt. Teil 1 wird in Medium plus Serum aufgenommen (ca. 1×10^6 Zellen/ml), mit IL-4 versetzt und flach in den Inkubator gestellt. Teil 2 wird genauso behandelt, jedoch schräg in den Inkubator gestellt, um eine höhere Zelldichte zu erreichen. Teil 3 wird in 2 Fraktionen geteilt, in Medium plus Serum aufgenommen, und die eine Fraktion mit IL-4 und 1 μ g/ml PHA restimuliert, die andere Fraktion mit IL-4 und DMSO als Kontrolle stimuliert. Nach 5h werden aus jeder Fraktion Kernextrakte und RNA isoliert.

Von beiden Fraktionen werden ca. $1,8 \times 10^6$ Zellen für eine intrazelluläre Zytokinfärbung abgenommen. Nach 2 bzw. 3 Wochen wird diese Prozedur wiederholt.

3.14.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung

1,8x10⁶ Zellen werden mit 0,9µl Golgistop (6x200µl in 96-well Platte) inkubiert, um den intrazellulären Proteintransport zu unterbinden. Nach 5h wird der Ansatz in FACS-Röhrchen überführt, abzentrifugiert und 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Nach kurzem Schütteln (Vortex) werden jedem Ansatz 250µl CytoFix/CytoPermTM Lösung zugegeben, um die Membran permeabel zu machen und die Zellen zu fixieren, und die Ansätze 20min bei 4°C inkubiert. Die Zellen werden 2x mit 1 X PermWashTM (1ml) gewaschen, das Pellet in 50µl 1 X PermWashTM aufgenommen und mit entweder dem α-IL-5-FITC Antikörper oder einem α-IgG1-FITC Kontrollantikörper 30min bei 4°C inkubiert. Nach 2x Waschen mit 1 X PermWashTM (1ml) werden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und im FACS analysiert.

3.14.6 Antikörper-Färbung für FACS-Analyse

Die Zellen werden in FACS-tubes 2x mit PBS gewaschen, das Pellet geschüttelt (Vortex), in 100µl Bindungspuffer aufgenommen, und mit der in der jeweiligen Anleitung empfohlenen Menge von Antikörper 30min bei 4°C inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit FACS-Puffer werden die Zellen in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und mit 1µl Propidium Iodid (1mg/ml) angefärbt, welches in Nukleinsäuren (DNA und RNA) interkaliert, aber membranundurchgängig ist. Dadurch können die toten und zerstörten Zellen von den lebenden unterschieden werden.

3.14.7 FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)

Zellen werden mit einem Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC, PE,...) markiert ist, angefärbt und im FACSCalibur von Beckton Dickinson detektiert. Tote Zellen besitzen einen geringen "*Forward Scatter*" und werden durch Festlegen eines Rahmens von der Analyse ausgeschlossen. Pro Probe werden 10⁴ Zellen gezählt. Die Analyse der Daten erfolgt mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson).

3.14.8 MACS (Magnetic Activated Cell Sorting)

Zellen werden mit einem oberflächenmolekül-spezifischen Antikörper, der an ein magnetisches Kügelchen gebunden ist, inkubiert und die magnetisch markierten Zellen über eine Magnetsäule von den nicht-markierten Zellen getrennt. (nach Miltenyi Biotec)

3.14.9 H2K^k-Transfektion

Zellen werden mit einem Expressionsplasmid (Abb. 11), welches das trunkierte (ohne zytoplasmatische Domäne) Oberflächenmolekül H2K^k von Maus enthält kotransfiziert. Durch die Koexpression des gewünschten Plasmids und dieses Oberflächenmoleküls können die transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen durch magnet-gekoppelte Antikörper über magnetische Säulen getrennt werden.

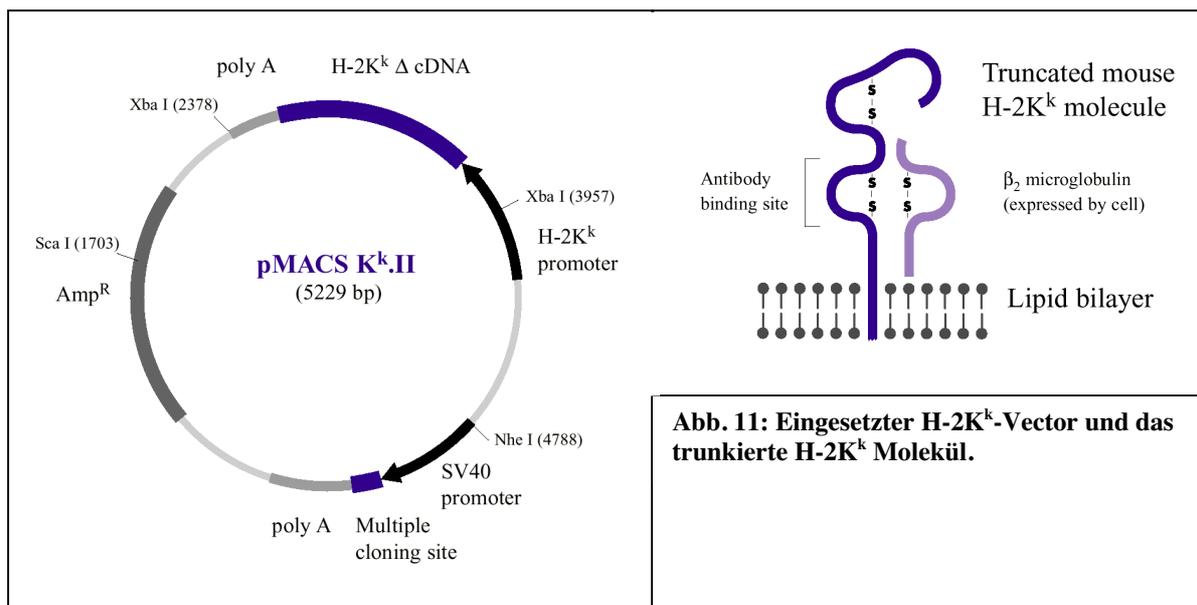


Abb. 11: Eingesetzter H-2K^k-Vector und das trunkierte H-2K^k Molekül.

3.15 Biochemische Methoden

3.15.1 Herstellung eines Gesamtzellextrakts

8ml einer Zellsuspension (ca. 1×10^6 Zellen/ml) werden abzentrifugiert (1500rpm, 10min, RT), und das Pellet zwei mal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in $150 \mu\text{l}$ 250mM Tris/HCl, pH 7,2 resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Auftauen bei 37°C lysiert. Nach einer Zentrifugation (13000rpm, 10min, 4°C) wird die Proteinkonzentration des Überstandes gemessen und der Extrakt bei -80°C aufbewahrt. Zum Auftauen auf Eis stellen.

3.15.2 Herstellung eines Kernextrakts

500 ml einer dicht gewachsenen Zellsuspension (ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml) werden abzentrifugiert (1500rpm, 10min, RT), und die Pellets zwei mal mit PBS gewaschen. Die Pellets werden in insgesamt 6 ml eiskaltem Puffer A vorsichtig resuspendiert und in 6 Eppendorfgefäße verteilt. Nach einer Inkubation auf Eis (15min) werden je $120 \mu\text{l}$ 5% NP40 zugegeben und kräftig geschüttelt (10 sec. Vortex). Die Ansätze werden 30 sec. bei 13000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände werden die Pellets in insgesamt 2 ml eiskaltem Puffer C aufgenommen und 5-10min auf Eis gestellt. Gelegentlich wird geschüttelt. Dann wird zentrifugiert (13000rpm, 5min, 4°C), der Überstand abgenommen, in neue Eppendorfgefäße überführt, und die Proteinkonzentration bestimmt.

3.15.3 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinextrakten wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dafür wird das Bradford-Reagenz 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu 1 ml dieses Ansatzes werden in der Regel $5 \mu\text{l}$ des Zellextraktes gegeben und nach wenigen Minuten Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Referenz dient das Reagenz ohne Protein. Zur Ermittlung absoluter Proteinkonzentrationen wird eine Eichkurve herangezogen, die mit bekannten BSA-Konzentrationen ermittelt wurde.

3.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophorese von Proteinen erfolgt mit 10%igen Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (Laemmli, 1970). Hierzu wird das Trenngel bis zur gewünschten Höhe zwischen zwei saubere, fett-freie Glasplatten der Biorad-Minigel-Apparatur gegossen und mit Butanol überschichtet. Nach Aushärten wird das Butanol abgegossen und darauf das Sammelgel gegossen. In dieses wird sofort nach dem Gießen ein Kamm mit 10 bzw. 15 Zähnen eingesetzt. Nach Aushärten des Sammelgels wird der Kamm herausgezogen und die Probenaschen mit einer Spritze gespült. Entweder ein oder zwei Gele werden in die Biorad-Apparatur eingespannt und diese dann mit 1 x Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Probenaschen werden nochmals mit dem Puffer gespült.

Die Proteinkonzentration der einzusetzenden Proben wird mit Hilfe eines Bradford-Kits (Bio-Rad) bei 595 nm bestimmt. 15 μ g Protein werden mit Protein-Ladepuffer versetzt, 5min bei 95°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als Größenvergleich wird ein Rainbow Marker eingesetzt. Nach Absinken der Probenlösungen in die Geltaschen wird eine Spannung von 50 V angelegt bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben, dann wird die Spannung auf 200 V erhöht. Nach erfolgter Auftrennung wird das Gel entweder mit Coomassie angefärbt und getrocknet oder für einen Western Blot verwendet.

3.15.5 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese werden die Gele für ca. 2h in Coomassie-Brillant Blue Färbelösung inkubiert. Entfärbung erfolgt in Coomassie-Entfärberlösung über Nacht.

3.15.6 Trocknen von SDS-PAGE-Gelen

Die Gele werden in Wasser gewaschen und mind. 20min in 22% EtOH geschwenkt. Zum Trocknen wird das Gel über Nacht in eine Mini-Gel-Dry-Ease-Vorrichtung (Novex) zwischen zwei Cellophan-Folien gespannt.

3.15.7 Western Blot

Im Western Blot werden Proteinbanden von einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Ein spezifischer primärer Antikörper bindet an das gesuchte Protein und wird dann mit Hilfe eines sekundären enzymgekoppelten Anti-Immunglobulins und einer darauffolgenden Farbreaktion nachgewiesen.

Für die Übertragung der Proteine von dem Gel auf die Membran wird eine Western Blot Apparatur (Bio-Rad) benutzt. Zur Größe des SDS-Gels zugeschnittene Filterpapiere (2) werden in eiskaltem Blotting Puffer eingeweicht. Die ebenso große Membran wird kurz in 100% Methanol eingeweicht, und dann auch in den Blotting Puffer gelegt. Die Apparatur wird zusammengebaut und ca. 45min bei 150 V geblottet. Die Seite der Membran, auf die die Proteine transferiert wurden, wird mit Kugelschreiber markiert.

Danach wird die Membran ca. 20min in Blocking Puffer (ohne Tween) + 2% Milchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einmaligem Waschen mit Blocking Puffer wird die Membran in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gelegt, 5 - 7,5 ml des primären Antikörpers (je nach Antikörper 1:2000 - 1:8000 verdünnt) daraufgegeben und 25min rotiert. Dann wird die Membran 15min mit Blocking Puffer gewaschen (Puffer wird 3x gewechselt) und 25min in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 7,5 ml des sekundären Antikörpers (1:5000) rotiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 20min) werden die Lösungen eines ECL-Kits (Amersham Life Science) auf den Blot gegeben, und die Chemilumineszenz entweder mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektors oder durch Auflegen und Entwickeln eines Films detektiert.

3.15.8 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

In einem EMSA lassen sich die Bindungseigenschaften von Proteinen an radioaktiv-markierte DNA-Zielsequenzen untersuchen. Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Ansatz: 5 μ l 5% CHAPS
 1 μ l Fisher (1x)
 2 μ l 1. Kompetitor (nicht markiertes Oligonukleotid, 100 ng/ μ l)
 1 μ l 2. Kompetitor (200-facher Überschuß, optional)
 2 μ l markierte Sonde
 3 μ l Proteinprobe
 0,1 μ l Antikörper (optional)

Der 1. Kompetitor dient dazu, unspezifische Bindungen von Proteinen an DNA abzufangen. Anhand der Bindungsmuster des 2. Kompetitors, dessen Sequenzen bekannt sind, können weitere Aussagen über die Bindungsspezifitäten der Proteine gemacht werden. Durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers (α -Ets1 oder α -Elf1), der dann an das Protein bindet, wird der Antikörper-Protein-DNA Komplex in seiner Mobilität in dem Gel verlangsamt ("Supershift") oder zerstört und ist dadurch eindeutig erkennbar.

Die Ansätze werden auf ein 5%iges Acrylamidgel aufgetragen, welches 3h bei 250V (für Minigel: 1h bei 100 V) vorgelaufen ist. Als Laufpuffer wird 0,25 X TBE benutzt. Nach ca. 90min bei 250V (für Minigel: 45min bei 120 V) wird das Gel auf einem Vacuumgeltrockner getrocknet, und die Banden dann entweder mit einem Phosphorimager oder durch Autoradiographie detektiert.

3.15.9 Luciferase Assay

Transfizierte eukaryontische Zellen (4 ml) werden in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1500rpm, 10min, 4°C). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Es wird einige Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, und das Pellet in 200 μ l Lyse-Puffer aufgenommen. Es wird kräftig geschüttelt (Vortex) und dann zentrifugiert (13000rpm, 4min, RT). Für eine Messung an einem Luminometer (Werte in RLU = relative light units) werden 50 μ l des Überstandes zu 300 μ l Meßpuffer und 100 μ l Luciferin (250 μ M Luciferin in 250 μ M NaOH) gegeben. Außerdem wird die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford bestimmt. Zur Normierung der Daten werden die RLUs durch die eingesetzte Proteinmenge geteilt.

3.15.10 FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

Mit Hilfe der FPLC können die Proteine eines Zellextrakts voneinander chromatographisch getrennt werden. In diesem Fall wurde als Anionen-Austauscher eine Mono-Q Säule (Pharmacia Biotech) eingesetzt. Der Kernextrakt wird mit 10 mM Tris/HCl pH 7,9 auf 50 ml verdünnt mit Hilfe eines Superloops auf die Säule geladen. Der Gradient geht von 0-100% 1M NaCl, die Flußgeschwindigkeit ist 1 ml/min. Es werden 0,5 ml Fraktionen gesammelt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Ets-Bindungsstelle GGAA im Cle0-Element ist notwendig für die Aktivierung des humanen IL-5 Promotors durch Ets1 und Tax

Das Cle0-Element des IL-5 Promotors ist ein für die Steuerung der IL-5 Synthese essentielles regulatorisches DNA-Segment. Es enthält eine bisher nicht untersuchte, potentielle Ets-Bindungsstelle (Abb. 12A). Um die Bedeutung dieser Ets-Bindungsstelle aufzuklären, wurden Promotorstudien mittels transienter Transfektion an Jurkat T-Zellen durchgeführt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass ein -494/+44 IL-5 Promotorfragment durch das Ets-Protein Ets1 aktiviert werden kann (Blumenthal, 1998). Dieses Fragment enthält mehrere potentielle Ets-Bindungsstellen (Abb. 12A). Um zu zeigen, dass die potentielle Ets-Bindungsstelle des Cle0-Motivs für die Ets1-induzierte Aktivierung verantwortlich ist, wurde ein Luciferase-Reportergenkonstrukt mit einem kürzeren Promotorfragment (-106/+44) für diese Experimente benutzt (a in Abb. 12A). Dieses Fragment enthält nur die potentielle Ets-Bindungsstelle des Cle0-Elementes. Neben diesem Konstrukt wurde ein Konstrukt (b in Abb. 12A) verwendet, in dem das Kernmotiv (GGAA) der potentiellen Ets-Bindungsstelle in AGAA mutiert wurde. Eine solche Mutation in dem Kernmotiv inhibiert die spezifische Bindung von Ets-Proteinen an DNA (siehe Abb. 18). Die Aktivitäten der beiden Versionen des (-106/+44)-IL-5-Promotors wurden mit Hilfe des Luciferase-Assays gemessen. Die Verkürzung des Promotors von -494 auf -106 hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Ets1-bedingte Aktivierung (Blumenthal, 1998), was vermuten lässt, dass die Ets-Bindungsstelle in der Cle0-Sequenz für die Ets1-Aktivierung wichtig ist. Eine Mutation in dem GGAA-Kernmotiv der Ets-Bindungsstelle zeigte eine drastische Reduzierung der Ets1-vermittelten Aktivierung des Promotors. In Abb. 1B wird deutlich, dass die Aktivierung des -106/+44 EM Promotors durch Ets1 auch bei Koaktivierung mit PMA plus Ionomycin und/oder PMA plus HTLV-I-Tax nicht mehr möglich ist.

Die Mutation in der Cle0-Ets-Bindungsstelle inhibierte auch die Aktivierung des -106/+44 IL-5 Promotors durch Tax. Das deutet darauf hin, dass der stimulatorische Effekt von Tax auch in Abwesenheit von ektopisch exprimiertem Ets1 auf die Mithilfe eines Ets-Proteins angewiesen ist. Da Jurkat-Zellen endogen Ets1 exprimieren (Blumenthal, 1998), könnte das endogene Ets1 die Tax-Aktivierung unterstützt haben. Diese Hypothese wird durch die

Beobachtung gestützt, dass Ets1 und Tax miteinander interagieren und zum Beispiel den PTHrP-Promotor kooperativ aktivieren können (Dittmer et al., 1997).

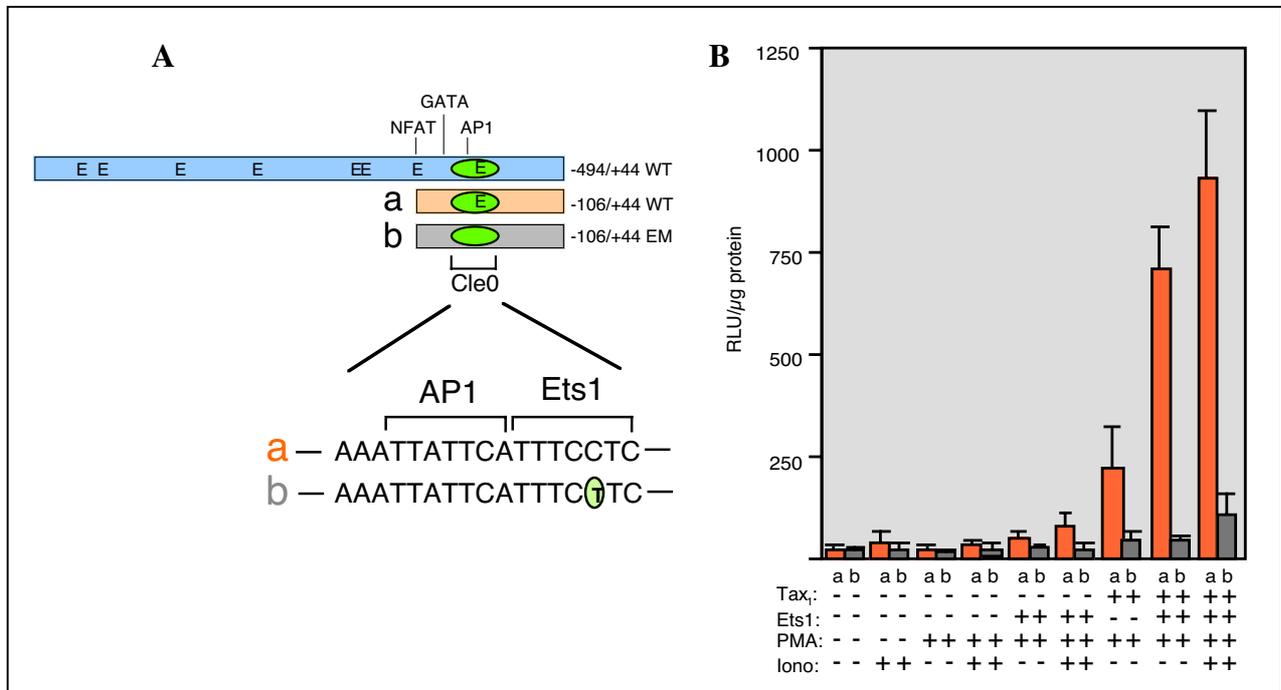


Abb. 12: Das GGAA-Motiv im Cle0-Element ist für die Ets1-vermittelte Transaktivierung des IL-5 Promotors notwendig. A. Schematische Darstellung der drei in dieser Arbeit verwendeten IL-5 Promotorfragmente. Potentielle Ets-Bindungsstellen (E), das Cle0-Element und die Bindungsstellen für NFAT, GATA und AP1 sind gekennzeichnet. Die Sequenzen (Sense-Strang) des Wildtyp (a) und des Ets-Bindungsstellen-mutierten Cle0-Elements (b) in dem Promotorfragment -106/-44 sind gezeigt. B. Die Aktivitäten des -106/-44 WT Promotors (orange) im Vergleich mit der Aktivität des -106/-44 EM Promotors (grau) unter verschiedenen Bedingungen. Die Balken stellen die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die eingesetzten Mengen der Plasmide und stimulierenden Substanzen waren wie folgt: IL-5 5µg, Tax 8µg, Ets1 6µg, PMA 10ng/ml, Ionomycin 2µM.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Einzelbasensubstitution von GGAA zu AGAA im Cle0-Element die Aktivierbarkeit des IL-5-Promotors durch Ets1 und Tax hemmt. Da eine solche Mutation spezifisch die Ets-Bindung an das GGAA Motiv unterbindet (Abb. 18B), ist es wahrscheinlich, dass Ets1 den IL-5-Promotor durch direkte Interaktion mit dem Cle0-Element aktiviert (siehe oben).

4.2 *Ets1* ist nicht das einzige *Ets*-Protein, das den *IL-5* Promotor aktivieren kann

Jurkat-Zellen exprimieren endogen neben *Ets1* auch andere *Ets*-Proteine, wie *Ets2* und *Elf1* (Blumenthal et al., 1999). Um zu testen, ob diese *Ets*-Proteine die Stelle von *Ets1* bei der Tax- und PMA/Ionomycin-vermittelten Aktivierung des Promotors übernehmen können, wurden in Jurkat-Zellen *Ets2* und *Elf1* überexprimiert, und die Aktivität des Promotors über die Luciferase-Aktivität gemessen (Abb. 13). *Ets2* aktivierte den *IL-5* Promotor zweimal so stark wie *Ets1*, was unter PMA/Ionomycin eine 6-fache Promotoraktivierung (Abb. 13A) und unter PMA/Tax Bedingungen (Abb. 13B) eine 10-fache zur Folge hatte. Bemerkenswert war, dass der kooperative Effekt von *Ets2* mit Tax stärker war als der von *Ets1* mit Tax.

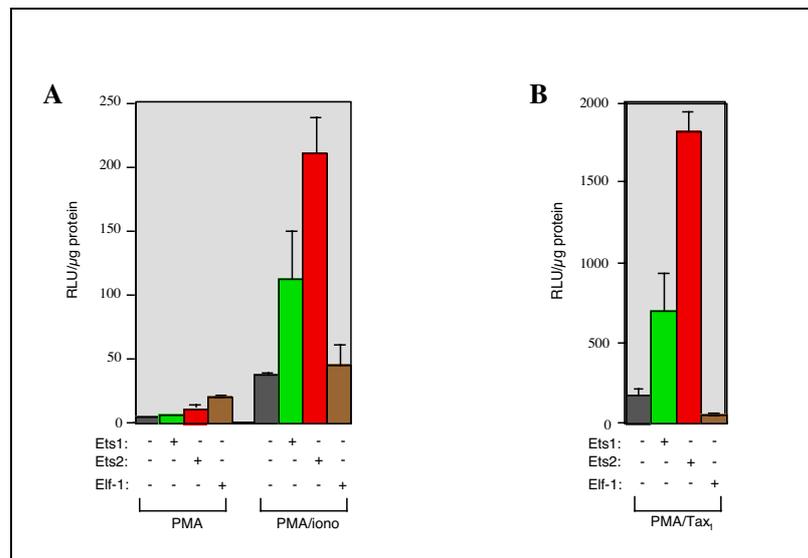


Abb. 13: Die *Ets*-Faktoren *Ets1* und *Ets2*, aber nicht *Elf1*, können den *IL-5* Promotor aktivieren. Transiente Transfektionen in Jurkat Zellen wurden unter PMA oder PMA/Ionomycin Bedingungen (A) und mit kotransfiziertem Tax unter PMA Bedingungen (B) durchgeführt. Die Balken stellen die Durchschnittswerte aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen dar. Die eingesetzten Mengen der Plasmide und stimulierenden Substanzen waren wie folgt: *IL-5* 5µg, Tax 8µg, *Ets1* 6µg, *Ets2* 6µg, *Elf1* 6µg, PMA 10ng/ml, Ionomycin 2µM.

Elf1 war zwar in der Lage den Promotor unter PMA-Bedingungen zu aktivieren (Abb. 13A), zeigte jedoch keinerlei aktivierende Wirkung in Anwesenheit von PMA/Ionomycin oder PMA/Tax (Abb. 13B). Interessanterweise konnte die PMA/Tax-vermittelte Aktivierung sogar durch *Elf1* inhibiert werden.

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass nicht nur Ets1 sondern auch Ets2 den IL-5 Promotor aktivieren kann, während Elf1 eine eher reprimierende Wirkung auf den IL-5-Promotor ausübt.

4.3 Der selektiv in Th2-Zellen exprimierte Transkriptionsfaktor Gata3 kooperiert mit Ets1 und Ets2 am IL-5 Promotor

Gata3, in aktivierten T-Zellen selektiv in Th2-Zellen exprimiert (im Weiteren auch als Th2-spezifischer Faktor bezeichnet), ist ein essentieller Faktor für die IL-5 Expression (Zhang et al., 1997). Die Gata3-Bindungsstelle im IL-5 Promotor ist nur wenige Nukleotide von der Cle0-Ets-Bindungsstelle entfernt (Abb. 12A). Da Jurkat-Zellen Gata3 exprimieren (Abb. 20C und Ho et al., 1991), könnte Gata3 an der gezeigten Ets1/2-vermittelten Aktivierung von IL-5 beteiligt gewesen sein. Um dies zu testen, wurden die Versuche mit der myeloiden Zelllinie Kasumi-1 wiederholt. Es ist zu vermuten, dass in Kasumi-1-Zellen keine signifikante Gata3-Expression zu finden ist, da Gata3 ausschließlich in T-Zellen der hämatopoietischen Abstammung gefunden wird (Minegishi et al., 1997).

Wie Abb. 14A zeigt, kann Ets1 in Kasumi-Zellen den IL-5 Promotor unter PMA/Ionomycin-Bedingungen nicht aktivieren. Bei Koexpression mit Tax aktiviert Ets1 den Promotor hingegen um das 3-fache. Auch Ets2 vermag unter PMA/Ionomycin Bedingungen den IL-5 Promotor nicht zu stimulieren. Jedoch ist in der Anwesenheit von Tax ein 8-facher Anstieg der Promotoraktivität zu beobachten. Aus diesen Daten lässt sich erkennen, dass in Kasumi-Zellen Ets1 und Ets2 zwar nicht in der Lage sind, unter PMA/Ionomycin-Bedingungen den IL-5 Promotor zu aktivieren, jedoch unter PMA/Tax-Bedingungen diesen Promotor in ähnlicher Weise stimulieren können wie in Jurkat-Zellen. Wie bereits in Jurkat-Zellen beobachtet, ist auch in Kasumi-Zellen Ets2 ein stärkerer Aktivator des IL-5 Promotors als Ets1. Überraschenderweise führte auch die Überexpression von Elf1 zu einer Stimulierung des IL-5 Promotors sowohl unter PMA/Ionomycin-Bedingungen (2-fach) als auch unter PMA/Tax-Bedingungen (3-fach).

Interessanterweise war Tax allein nicht in der Lage, den IL-5 Promotor in Kasumi-Zellen zu aktivieren. Es ist möglich, dass Gata3 für die Tax-Aktivierung von Bedeutung ist. Dafür sprechen die Ergebnisse von Yamagata et al. (1995), die zeigen, dass die Gata-Bindungsstelle für die Tax-Aktivierung des IL-5 Promotors essentiell ist und Tax mit dem Gata3-verwandten

Faktor Gata4 kooperieren kann (Yamagata et al., 1995).

Um zu testen, ob in Gegenwart von Gata3 die Aktivierbarkeit des IL-5 Promotors in Kasumi-Zellen durch Ets1, Ets2 und Tax beeinflusst wird, wurde Gata3 koexprimiert.

In Abb. 14A lässt sich erkennen, dass bereits Gata3 alleine unter PMA/Ionomycin- und PMA/Tax-Bedingungen einen aktivierenden Effekt auf den IL-5 Promotor ausüben kann. Bei einer Koexpression von Gata3 mit Ets1 ist auch unter PMA-Bedingungen schon ein weiterer

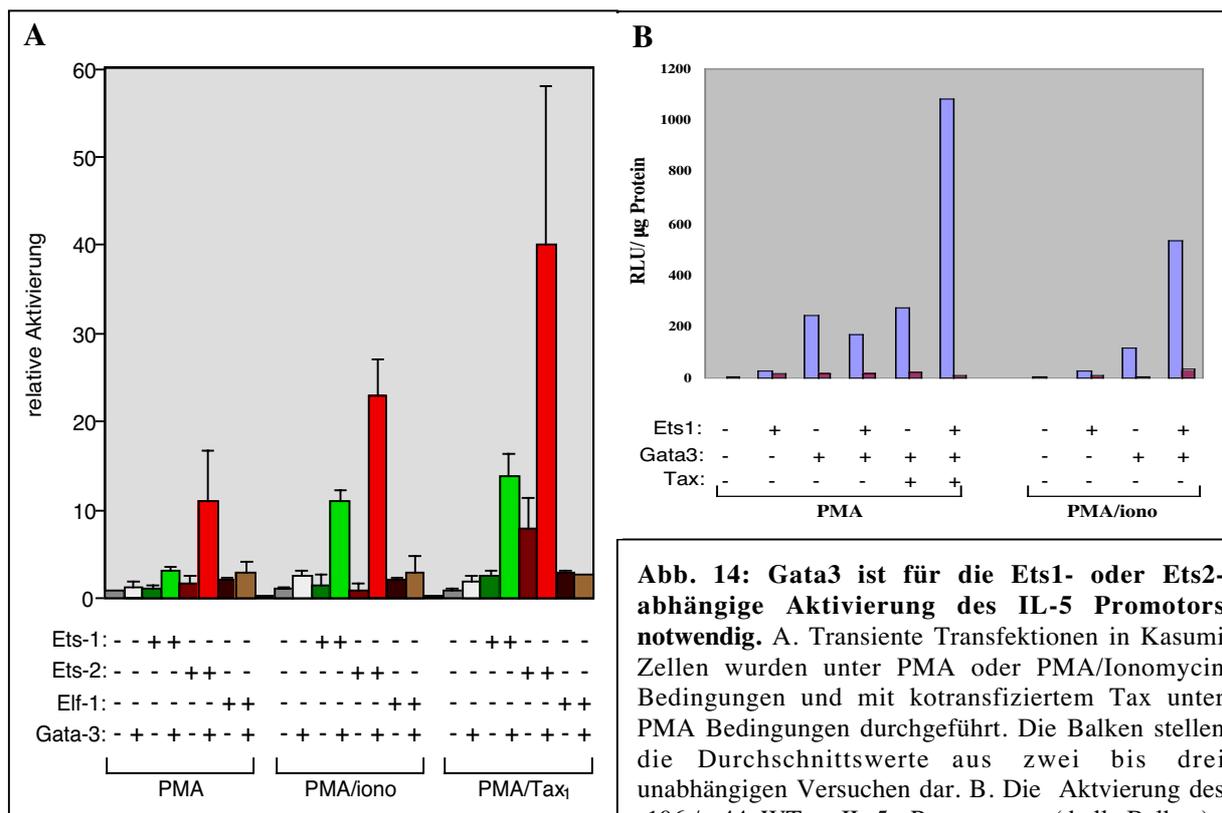


Abb. 14: Gata3 ist für die Ets1- oder Ets2-abhängige Aktivierung des IL-5 Promotors notwendig. A. Transiente Transfektionen in Kasumi Zellen wurden unter PMA oder PMA/Ionomycin Bedingungen und mit kotransfiziertem Tax unter PMA Bedingungen durchgeführt. Die Balken stellen die Durchschnittswerte aus zwei bis drei unabhängigen Versuchen dar. B. Die Aktivierung des -106 / +44 WT IL-5 - Promotors (helle Balken)

verglichen mit der Aktivierung des -106/+44 EM IL-5-Promotors (dunkle Balken) unter verschiedenen Bedingungen. Die eingesetzten Mengen der Plasmide und stimulierenden Substanzen waren wie folgt: IL-5 5µg, Tax 8µg, Ets1 6µg, Ets2 6µg, Elf1 6µg, Gata3 2µg, PMA 10ng/ml, Ionomycin 2µM.

Anstieg der Aktivität des Promotors zu beobachten, der durch die Stimulierung der Zellen mit PMA plus Ionomycin weiterhin verstärkt wird. In Gegenwart von Gata3 kann auch Tax den Promotor leicht aktivieren. Die Zugabe von Ets1 führt zu einer zusätzlichen Aktivierung des Promotors.

Die Ets2-vermittelte Aktivierung wird in Gegenwart von Gata3 in viel stärkerem Maße erhöht als die von Ets1. Unter PMA-Bedingungen führt eine Koexpression von Gata3 und Ets2 zu einer höheren Aktivierung des Promotors als die Koexpression von Gata3 und Ets1. Die

zusätzliche Stimulierung der Zellen mit Ionomycin oder die Koexpression von Tax steigert die Aktivierung des Promotors weiterhin. Da unter Gata3-Bedingungen Ets2 doppelt so aktiv ist wie Ets1 bei der Stimulierung des IL-5 Promotors, lässt sich vermuten, dass die Interaktionen von Ets2 mit Gata3 und Tax stärker sind als die von Ets1 mit diesen Proteinen. Unter keiner der drei Bedingungen - PMA, PMA/Ionomycin und PMA/Tax - führte die Überexpression von Gata3 bei Kotransfektion mit Elf1 zu einer weiteren Aktivierung des Promotors, woraus sich ableiten lässt, dass Elf1 nicht in der Lage ist, mit Gata3 funktionell zu interagieren.

Um eventuelle Kooperativität zwischen den verschiedenen Faktoren zu bestimmen, muss die Höhe der Aktivierung des Promotors bei Überexpression der Faktoren einzeln betrachtet werden. Nach PMA Stimulierung ist eine klare Kooperativität zwischen Gata3 und Ets2 zu erkennen, da Gata3 zu einer 1,5-fachen und Ets2 zu einer 2-fachen Erhöhung der Promotoraktivität führen und die Koexpression beider Faktoren eine ca. 11-fache Aktivierung zur Folge hat. Durch die zusätzliche Stimulierung mit Ionomycin erhöht sich der kooperative Effekt von Gata3 (alleine ca. 2-fach) und Ets2 (alleine ca. 1-fach) auf die Aktivität des Promotors auf das ca. 23-fache, was eindeutig auf einen Synergismus deutet. Auch eine Koexpression mit Tax erlaubt diese Kooperativität, da Gata3 einen 2-fachen, Ets2 einen 8-fachen, und beide gemeinsam einen ca. 40-fachen Effekt auf die Aktivität des Promotors haben.

Mit Ets1 ist auch ein synergistischer Effekt mit Gata3 zu beobachten. Unter PMA Bedingungen aktivieren Ets1 und Gata3 beide getrennt den Promotor gar nicht, zusammen bewirken sie jedoch eine ca. 3-fache Aktivierung. Die Stimulierung mit PMA und Ionomycin führt zu einer 10-fachen Aktivierung des Promotors durch Ets1 und Gata3 zusammen, wobei die einzelnen Aktivierungen (Ets1: 1-fach, Gata3: 2-fach) deutlich geringer sind. Durch die Koexpression von Tax bleibt der synergistische Effekt erhalten. Die höchste Aktivität (14-fach) wird durch die Überexpression von Ets1 und Gata3 erreicht. Einzeln liegen die Werte bei 3-fach für Ets1 und 2-fach für Gata3.

Nur im Fall von Elf1 ist kein Synergismus zu beobachten.

Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn statt des -494/+44 WT Promotorfragments das -106/+44 WT Fragment eingesetzt wurde (Abb. 14B). Versuche mit dem -106/+44 EM Fragment ergaben, dass die synergistische Wirkung von Ets1 und Ets2 mit Gata3 und/oder Tax von der Ets-Bindungsstelle des Cle0-Elements abhängig war. Dies zeigt, dass auch für die Aktivierung durch Gata3 die Ets-Bindungsstelle essentiell ist.

4.4 Gata3 aktiviert den IL-5-Promotor auch in Jurkat und HSB-2 T-Zellen

Um die Bedeutung von Gata3 für die IL-5 Promotoraktivierung weiter zu untersuchen, wurde Gata3 auch in Jurkat und einer weiteren T-Zelllinie, den HSB-2-Zellen, ektopisch exprimiert. HSB-2-Zellen sind in der Lage, IL-5 induzierbar zu exprimieren (Dr. Barbara Kistler, persönliche Mitteilung). Im Folgenden wurde die Aktivierung des IL-5 Promotors durch Ets1 bzw. Ets2 und Gata3 verglichen (Abb. 15A).

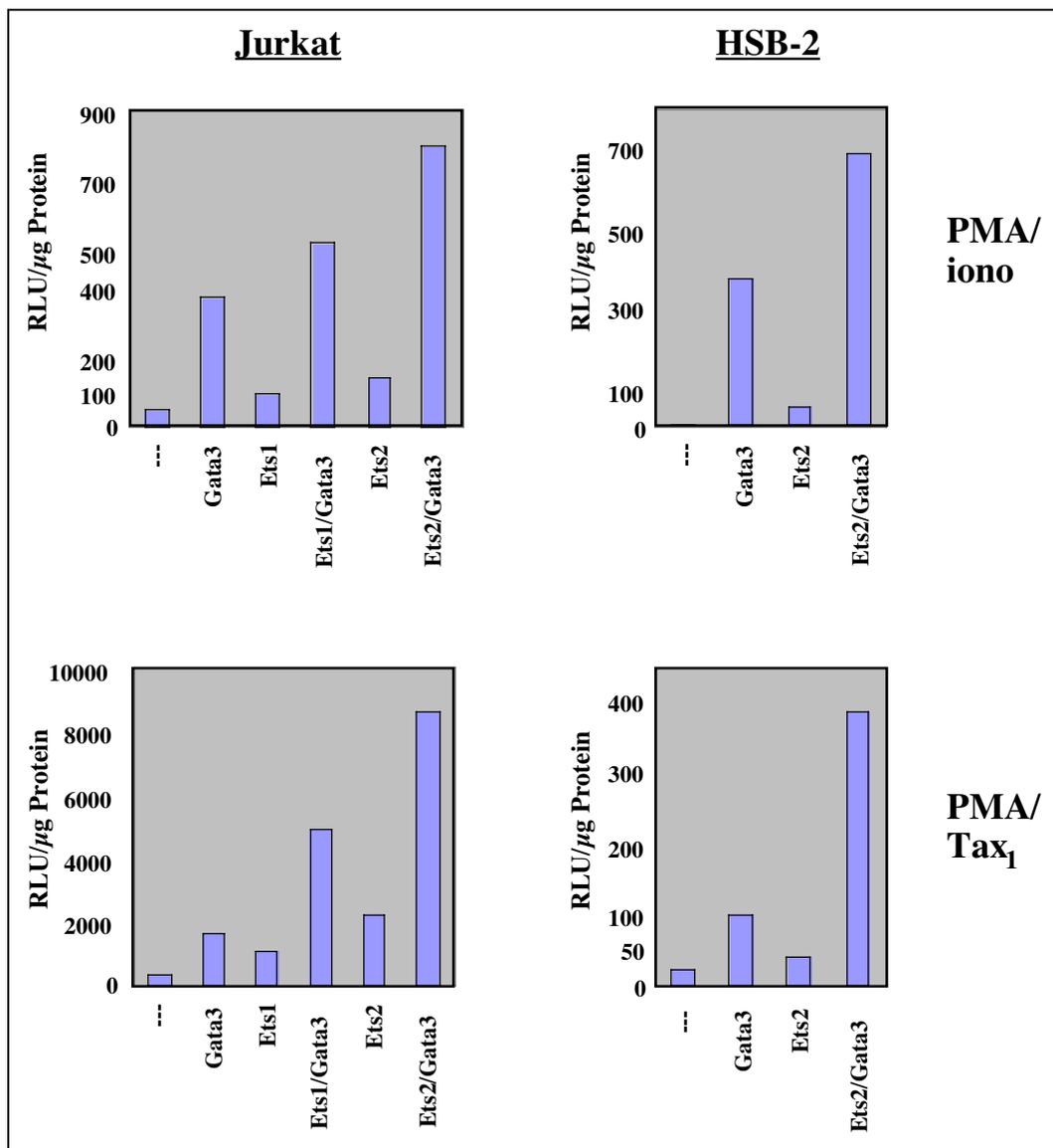


Abb. 15A: Die Aktivierung des IL-5 Promotors in Jurkat und HSB-2 Zellen. Die Zellen wurden mit dem -106 IL-5-Luciferase-Reportergenkonstrukt transient transfiziert. Zum Teil wurden sie mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren kotransfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit PMA oder mit PMA plus Ionomycin stimuliert. Die Zellen im unteren Teil der Abbildung wurden zusätzlich mit Tax kotransfiziert. Die eingesetzten Mengen der Plasmide und stimulierenden Substanzen waren wie folgt: IL-5 5µg, Tax 8µg, Ets1 6µg, Ets2 6µg, Gata3 2µg, PMA 10ng/ml, Ionomycin 2µM.

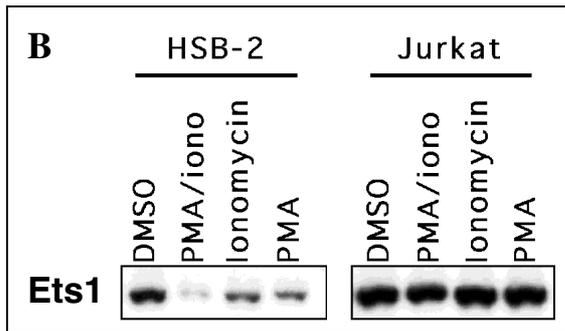


Abb. 15B: Ets1-Proteinexpression in HSB-2 und Jurkat Zellen. Kernextrakte von Zellen, die mit PMA und/oder Ionomycin stimuliert worden sind, wurden im Western Blot auf Ets1-Expression untersucht. Als Kontrolle dienten Extrakte von Zellen, die mit DMSO behandelt worden sind. Es wurden 10ng/ml PMA und 2 μ M Ionomycin verwendet.

Bei PMA/Ionomycin-Stimulierung führt die Überexpression von Gata3 in beiden Zelllinien zu einer starken Aktivierung des IL-5 Promotors, in Jurkat-Zellen zu einer 8-fachen, in HSB-2-Zellen wegen der sehr geringen Basalaktivität sogar zu einer 93-fachen. Zugabe von Ets2 verdoppelt etwa den Gata3-Effekt in beiden Zelllinien. Ets1 hat wiederum einen geringeren Effekt. Die Ets-Faktoren Ets1 und Ets2 (Abb. 15C) haben einzeln überexprimiert in beiden Zelllinien einen aktivierenden Effekt auf den IL-5 Promotor. In Übereinstimmung mit den Daten in Abb. 13 aktiviert Ets1 in dieser Versuchsreihe in Jurkat-Zellen den IL-5 Promotor unter PMA/Ionomycin-Bedingungen 2-fach, während Ets2 eine 3-fache Aktivierung bewirkt. In HSB-2-Zellen übt Ets2 eine 12-fach aktivierende Wirkung auf den Promotor aus.

Ähnliche Effekte von Gata3 mit Ets1 oder Ets2 werden auch in Jurkat-Zellen unter PMA/Tax-Bedingungen beobachtet. Gata3 erhöht die Promotoraktivität um ein 5-faches, Ets1 um ein 3-faches und Ets2 um ein 6-faches. Zusammen bewirken Gata3 und Ets1 eine 13-fache Aktivierung und Gata3 und Ets2 eine 23-fache Aktivierung. In HSB-2-Zellen findet unter den gleichen Bedingungen bei Überexpression von Ets2 mit Gata3 eine ca. 17-fache Aktivierung des Promotors statt. Gata3 kann den Promotor 4-fach, Ets2 2-fach aktivieren.

Die Daten zeigen, dass der IL-5 Promotor auch in den T-Zelllinien Jurkat und HSB-2 auf Gata3 reagiert. Es fällt auf, dass die Aktivierung durch Gata3 in diesen Zellen stärker ist als in Kasumi-Zellen. Zugleich führt eine Koexpression mit Ets1 und Ets2 mit Gata3 nur zu einer additiven, und nicht, wie in Kasumi-Zellen, zu einer synergistischen Aktivierung des IL-5 Promotors. Der Grund könnte sein, dass Jurkat- und HSB-2-Zellen im Gegensatz zu Kasumi-Zellen Ets1 endogen exprimieren (Abb. 15B und Blumenthal, 1998). Die Menge an endogenem Ets1 könnte ausreichen, um die Gata3-Aktivierung in Jurkat- und HSB-2-Zellen zu unterstützen.

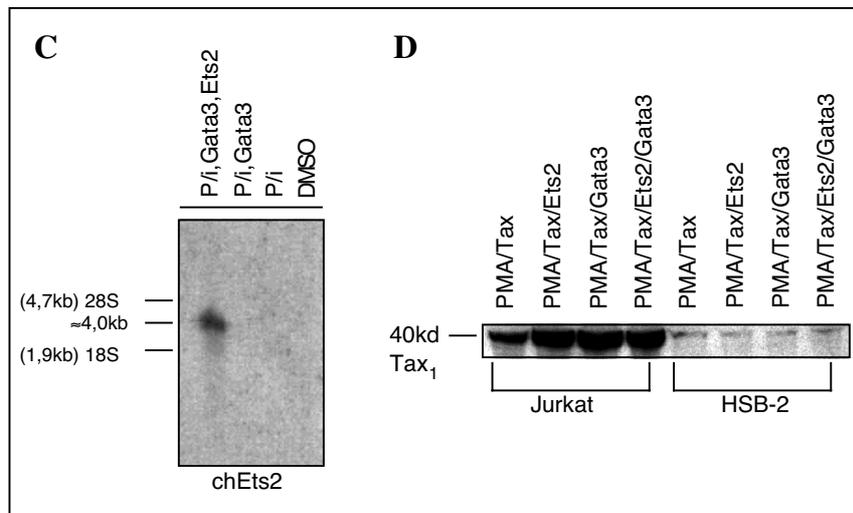


Abb. 15C und 15D: C. Die Überexpression von Ets2 konnte im Northern Blot nachgewiesen werden. Da das überexprimierte Ets2 ein chicken-Ets2 ist, lässt es sich gut von dem endogenen Ets2 unterscheiden. Ein Western Blot war außerdem aufgrund der mangelhaften verfügbaren Ets2 Antikörper unmöglich. **D. Die Expression von Tax in Jurkat und HSB-2 Zellen im Vergleich.** Extrakte von den Zellen aus 4B wurden im Western Blot untersucht (α -Tax).

Die viel stärkere Aktivierung durch Ets2 und Gata3 in HSB-2-Zellen gegenüber Jurkat-Zellen ergibt sich durch die viel geringere Basalaktivität des IL-5 Promotors in HSB-2-Zellen. Es könnte sein, dass einige Faktoren, die für die Basalaktivität verantwortlich sind, in HSB-2-Zellen in einem geringeren Maße zur Verfügung stehen. Beispielsweise nimmt die endogene Ets1-Expression unter PMA/Ionomycin-Bedingungen bei HSB-2-Zellen ab, während sie bei Jurkat-Zellen unverändert bleibt (Abb. 15B). Interessanterweise wird unter gleichen Transfektionsbedingungen weit weniger Tax in HSB-2-Zellen im Vergleich zu Jurkat-Zellen exprimiert (Abb. 15D). Dennoch ist die Aktivierung des IL-5 Promotors durch Ets2 und Gata3 in beiden Zelllinien vergleichbar. Es könnte sein, dass selbst geringe Mengen an Tax ausreichen, um den Gata3- und Ets2-Effekt auf den IL-5 Promotor zu unterstützen.

4.5 Inhibition der der Ets1/Ets2-vermittelten Aktivierung des IL-5 Promotors mit Tax durch Elf1 und die Ets-Mutante Δ Pointed-Domäne-Ets1

Der Faktor Elf1 zeigte in vorherigen Versuchen keine Wirkung auf den IL-5 Promotor unter PMA/Ionomycin-Bedingungen (Abb. 13A), jedoch eine reprimierende Wirkung auf den Promotor unter PMA/Tax-Bedingungen (Abb. 13B). Um zu testen, ob Elf1 einen Einfluss auf die Ets1/2-vermittelte Aktivierung des Promotors hat, wurden in Jurkat-Zellen Ets2 und Elf1

zusammen überexprimiert, und die Wirkung auf die Aktivität des IL-5 Promotors unter PMA/Ionomycin-Bedingungen und unter PMA/Tax-Bedingungen untersucht.

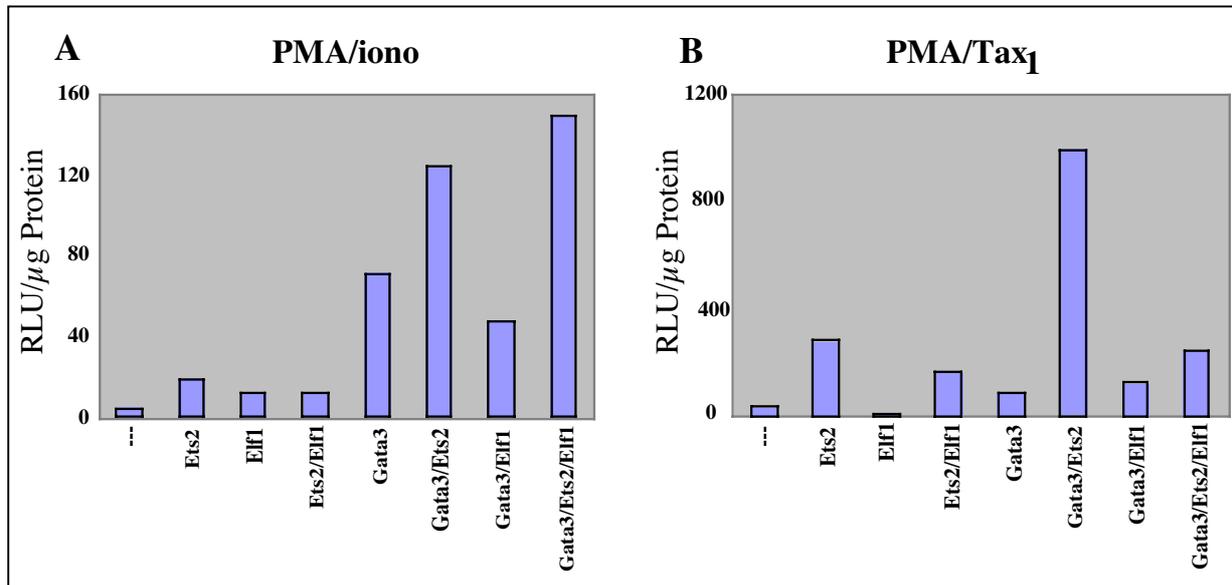


Abb. 16A und 16B: Elf1 kann die Ets2/Gata3-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors unter PMA/Tax-Bedingungen inhibieren. Jurkat Zellen wurden transient mit den angegebenen Faktoren transfiziert und mit PMA stimuliert. A. Die Zellen wurden zusätzlich mit Ionomycin stimuliert. B. In den Zellen wurde gleichzeitig auch Tax koexprimiert. Die eingesetzten Mengen der Plasmide und stimulierenden Substanzen waren wie folgt: IL-5 5μg, Tax 8μg, Ets2 6μg, Elf1 6μg, Gata3 2μg, PMA 10ng/ml, Ionomycin 2μM.

Nach PMA/Ionomycin-Stimulierung können Ets2 und Elf1 beide einzeln den Promotor aktivieren. Diese Aktivierung nimmt durch die simultane Überexpression beider Faktoren zusammen leicht ab. Die sehr viel höhere Gata3-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors wird auch unter PMA/Ionomycin-Bedingungen durch Elf1 gering reduziert. Aber interessanterweise hat Elf1 keinen Effekt auf die Gata3/Ets2-vermittelte Aktivierung des Promotors. Anders ist die Lage unter PMA/Tax-Bedingungen. Wie zuvor beobachtet führt die Überexpression von Ets2 zu einer 8-fachen Aktivierung des Promotors und die von Elf1 zu einer Reduktion der Promotoraktivität. Die Kombination aus Ets2 und Elf1 ergibt eine etwa um die Hälfte geringere Aktivierung als mit Ets2 alleine. Das heisst, dass Elf1 die Wirkung von Ets2 reduzieren kann. Wenn die Zellen außerdem mit dem Gata3-Expressionsplasmid transfiziert wurden, wobei Gata3 die Aktivierung des Promotors um das 3-fache steigert, kann Ets2 die Aktivität um das 9-fache auf ein fast 30-faches erhöhen. Die Zugabe von Elf1 hat kaum einen Einfluss auf die Gata3-vermittelte Aktivierung des Promotors. Aber Elf1 ist hier in der Lage, die Gata3/Ets2-vermittelte Aktivierung des Promotors drastisch zu inhibieren. Die Gegenwart von Tax muss die inhibierende Fähigkeit von Elf1 auf den IL-5 Promotor in

irgendeiner Art unterstützen. Diese Daten lassen vermuten, dass in Anwesenheit von Tax Elf1 einen Gegenspieler zu Ets2 darstellt, der in der Lage ist, gezielt die Ets2-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors zu inhibieren.

Eine künstliche Mutante von Ets1, der die Pointed Domäne fehlt, ist auch in der Lage, die Ets1/Gata3-vermittelte Aktivierung unter PMA/Tax-Bedingungen zu inhibieren. Viele Ets-Proteine besitzen die sogenannte Pointed-Domäne (Abb. 17B), so genannt wegen ihrer Homologie zu dem Ets-Protein Pointed in *Drosophila*. Die Funktion der Domäne ist bisher wenig geklärt. Es wird vermutet, dass sie für Interaktionen von Ets-Proteinen mit anderen Proteinen von Bedeutung ist (Graves and Petersen, 1998). Zum Beispiel vermittelt die Pointed-Domäne von Tel dessen Multimerisierung (Jousset et al., 1997), die von Ets2 scheint für die Interaktion mit Cdk10, einer Cdc2-ähnlichen Kinase, wichtig zu sein (Kasten and Giordano, 2001). Um die Rolle der Pointed-Domäne für die Ets-vermittelte Aktivierung zu untersuchen, wurde diese in Ets1 deletiert, und dann diese Ets-Mutante getestet. Da Tax auf die aktivierende Wirkung von Ets1 und Gata3 einen positiven, kooperativen Effekt hat, sollte untersucht werden, ob die Pointed-Domäne von Ets1 eine Rolle bei der Tax/Gata3-vermittelten Aktivierung des IL-5 Promotors spielt.

Alle bisherigen Versuche, in denen die Zellen mit Tax, Gata3 und Ets1 kotransfiziert wurden und mit PMA stimuliert wurden, wurden mit einem Ets1-Expressionsplasmid (SV40-Ets1) durchgeführt. Dieses Plasmid enthält die cDNA von Ets1 unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Für die Versuche in Abb. 17 wurde zum Vergleich auch ein CMV-Ets1 Konstrukt, durch welches der stärkere CMV-Promotor eine höhere Expression von Ets1 ermöglichen sollte, eingesetzt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass mit 1 μ g CMV-Ets1 Plasmid-DNA schon mehr Ets1 als mit 6 μ g SV40-Ets1 Plasmid-DNA in Jurkat-Zellen produziert wird (Abb. 17C). Dementsprechend war der Einsatz von 1 μ g CMV-Ets1 Plasmid-DNA schon ausreichend für eine volle Aktivierung des Promotors, welche auch durch Transfektion mit 2 μ g CMV-Ets1 Plasmid-DNA nicht wesentlich zu erhöhen war (Abb. 17A). Mit 8 μ g CMV-Ets1 Plasmid-DNA war die IL-5 Promotoraktivierung im Vergleich zu 1 oder 2 μ g dieses Plasmids stark reduziert. Bei Transfektion von 8 μ g des Ets1-Plasmids konnte eine Aktivierung des IL-5 Promotors nicht beobachtet werden. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die Überladung der Zelle mit Ets1-Protein zurückzuführen.

Wenn statt WT-Ets1 eine Form von Ets1 (Ets1 Δ -77-123, Abb. 17B), die keine Pointed Domäne enthält, durch den CMV-Promotor exprimiert wurde, konnte keine Kooperativität mehr zwischen Ets1 und Gata3 beobachtet werden. Stattdessen wurde die Gata3-bedingte Aktivität des IL-5 Promotors bei gleicher Proteinexpression im Vergleich zu WT-Ets1 durch

das deletionsmutierte Ets1 Protein sogar gehemmt. 1 μ g CMV-Ets1 Δ (-77-123) Plasmid-DNA hat eine leicht aktivierende Wirkung auf den Promotor, während bei Transfektion von 2 μ g und 8 μ g die Ets1-Mutante reprimierend wirkt (Abb. 17A). Im Westernblot ist zu erkennen, dass die Proteinexpression von 8 μ g CMV-Ets1 Δ (-77-123) Plasmid-DNA ungefähr so hoch ist wie die Ets1 Expression von 1 μ g CMV-Ets1 Plasmid-DNA (Abb. 17C). Da in diesem Fall das Proteinprodukt eine inhibierende Wirkung auf die Promotoraktivität hat, lässt sich daraus schließen, dass die intakte Pointed Domäne für eine Interaktion oder Kooperation mit Tax zur Aktivierung des IL-5 Promotors notwendig ist.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass CMV-Ets1 Δ (-77-123) eine inhibierende Wirkung auf die Gata3-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors hat. Die inhibierende Wirkung von CMV-Ets1 Δ (-77-123) könnte dadurch erklärt werden, dass es die Aktivität endogener Ets-Faktoren, wie zum Beispiel Ets1, in einer transdominant-negativen Wirkungsweise unterdrückt.

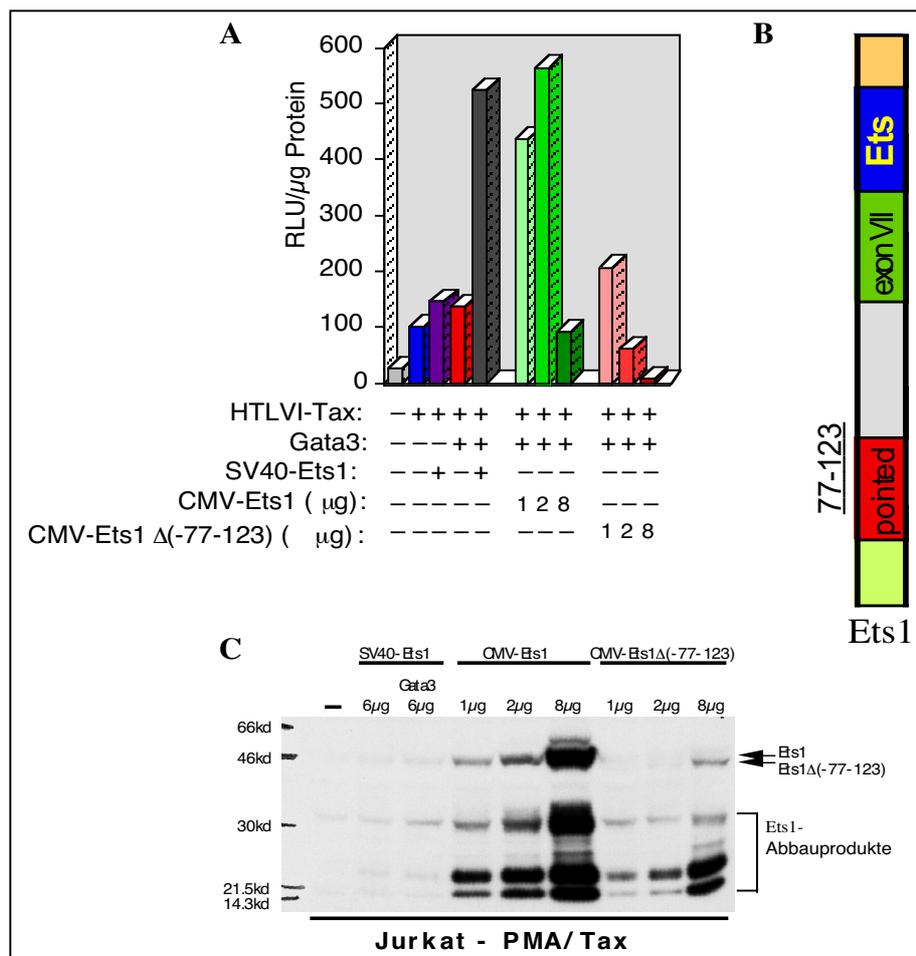


Abb. 17: Untersuchungen mit dem Ets1 Konstrukt Ets1 Δ (-77-123), dem die Pointed Domäne fehlt. A. Transiente Transfektionen wurden mit verschiedenen Ets1-Konstrukten in Jurkat Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden zusätzlich mit Tax kotransfiziert. B. Schematische Darstellung des Ets1 Proteins. Die Ets-DNA-Bindungsdomäne, Exon VII und die Pointed Domäne sowie die Sequenz, die in dem Ets1 Δ (-77-123) Konstrukt deletiert ist, sind gekennzeichnet. C. Western Blot Analyse der Transfektionen in 17A mit α -Ets1 (C-20).

4.6 *Ets1* und *Gata3* binden an den *IL-5* Promotor

4.6.1 Die Bindung von *Ets1* an die Cle0-Sequenz des *IL-5* Promotors

Um zu zeigen, dass *Ets*-Proteine an die Cle0-Sequenz binden können, wurden EMSAs durchgeführt, in denen ein ³²P-markiertes Oligonukleotid, welches der *IL-5* Promotorsequenz zwischen -63 und -37 entspricht, eingesetzt wurde (Abb. 18A). Beispielhaft wurde p54-*ets1*-angereicherter Baculovirusextrakt (erhalten von Dr. Jürgen Dittmer) benutzt. Wie in Abb. 18B dargestellt, kann *Ets1* an die GGAA-Sequenz des Cle0-Motivs binden (Spur 2). Die Bindung an die Sonde konnte durch Zugabe von nicht radioaktiv-markierter Sonde (*IL-5* WT) im Überschuss unterbunden werden (Spur 3), jedoch nicht durch Zugabe von nicht radioaktiv-markierter mutierter Version dieser Sequenz (*IL-5* EM), in der GGAA zu AGAA verändert wurde, in gleicher Menge (Spur 4). Daraus kann geschlossen werden, dass *Ets1* mit dem Cle0-Element durch Kontakt mit dem GGAA-Motiv interagiert.

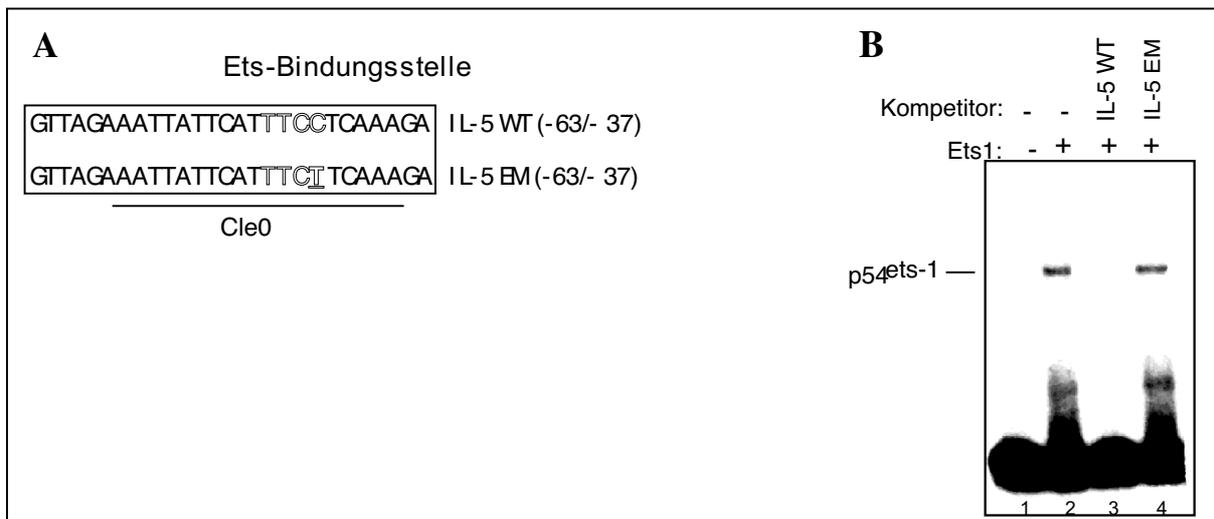
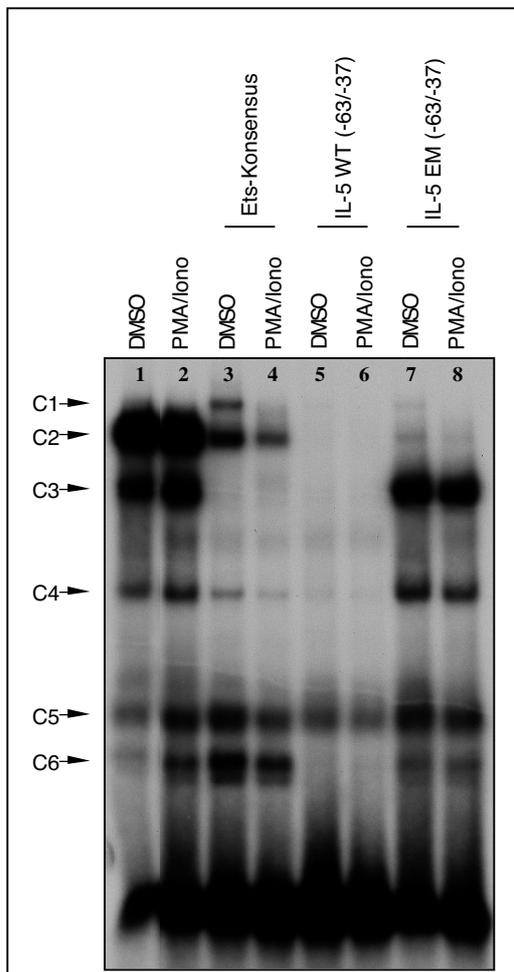


Abb. 18: Die Bindung von *Ets1* an die Cle0-Sequenz. A. Sequenzen der beiden eingesetzten Oligonukleotide, *IL-5* WT und *IL-5* EM. Die *Ets*-Bindungsstelle und die Cle0-Sequenz sind gekennzeichnet. B. EMSA mit ³²P-markierter *IL-5* WT Sonde. Kompetitoren wurden in 200-fachem Überschuss eingesetzt. Kernextrakte stammen von Jurkat Zellen, die zum Teil mit *Ets1* transfiziert worden sind. (durchgeführt von Dr. Jürgen Dittmer)

In Abbildung 19 wurden Kernextrakte aus Jurkat-Zellen, die mit PMA plus Ionomycin stimuliert wurden, eingesetzt. Als Kontrolle dienten Extrakte von Zellen, die mit DMSO behandelt wurden. Durch die Bindung mehrerer Proteine aus den entsprechenden Kernextrakten an die ^{32}P -markierte IL-5 WT (-63/-37) Sonde ergibt sich ein komplexes Bandenmuster. Zugabe einer nicht-markierten Ets-Konsensus Sequenz im Überschuss in Spuren 3 und 4 verhindert die Bindung des Komplexes C3 an das Oligonukleotid und reduziert die Bildung der Komplexe C2 und C4. Daraus kann man schließen, dass die Komplexe C3, C2 und C4 Ets-Proteine enthalten. Interessanterweise erscheint durch Zugabe der Ets-Konsensus Sequenz eine neue Bande, C1, die nur in den Kernextrakten der DMSO-Kontrollzellen zu sehen ist (Spur 3). In Spuren 5 und 6 ist durch die Zugabe des nicht radioaktiv-markierten Oligonukleotids IL-5 WT (-63/-37) im Überschuss deutlich zu erkennen, dass Komplex C5 die einzige nicht-spezifische Bindung eines Proteins an die Sonde darstellt. Alle anderen Komplexe lassen sich durch den Überschuss des kalten Oligonukleotids zerstören. Die Zugabe des Oligonukleotids mit mutierter Ets-Bindungsstelle, IL-5 EM (-63/-37), im Überschuss in den Spuren 7 und 8 führt dazu, dass die Komplexe C1 und C2 kaum noch gebildet werden.



enthält (Spuren 3 und 4), dieses jedoch nur schwach bindet oder von der Erkennung der flankierenden Sequenzen an der GGAA-Stelle in seiner Bindung abhängig ist. Die Stärke der Bindung des C3-Komplexes bleibt unverändert im Vergleich zu den Kontrollspuren 1 und 2. Diese Resultate deuten darauf hin, dass C3 aus einem Ets-Protein besteht, da es nicht in der Lage ist, an die mutierte Ets-Bindungsstelle im IL-5 EM (-63/-37) Oligonukleotid zu binden. Auch C4 zeigt eine ähnlich starke Bindung wie in Spuren 1 und 2, was dafür spricht, dass der Komplex ein Ets-Protein enthält. Es gibt Hinweise darauf, dass C3 Elf1 enthält (siehe Abb. 22A).

Abb. 19: Die Bindung verschiedener Komplexe an die IL-5 WT (-63/-37)-Sonde. Jurkat Zellen wurden mit DMSO oder PMA plus Ionomycin stimuliert. Die daraus isolierten Kernextrakte wurden mit ^{32}P -markiertem Oligonukleotid inkubiert und im EMSA aufgetrennt. Die Kompetitoren wurden in 200-fachem Überschuss zugegeben.

4.6.2 Die Bindung von Gata3 an die IL-5 Promotorsequenz

Um zu testen, ob Gata3 an die Gata-Bindungsstelle in der Nähe des Cle0-Elements binden kann, wurden EMSAs mit einem längeren Fragment des IL-5 Promotors, der IL-5 Promotorsequenz zwischen -81 und -38 (Abb. 20A), welches das Cle0-Element und die Gata-Bindungsstelle enthält, durchgeführt. In diesen Versuchen konnte die Bindung von überexprimiertem Gata3 in Jurkat-Zellen (Abb. 20B) und die Bindung von endogenem Gata3 in HSB-2-Zellen (Abb. 20D) an das ³²P-markierte Oligonukleotid gezeigt werden.

Um die Proteine des Gata-Bindungsstellen-abhängigen Proteinkomplexes zu identifizieren, wurden zwei verschieden lange nicht radioaktiv-markierte Oligonukleotide im Überschuss zu Kernextrakten, die mit der ³²P-markierten (-81/-38)-Sonde inkubiert wurden, gegeben. Beide Oligonukleotide enthalten das Cle0-Element samt Ets-Bindungsstelle (Abb. 20A). IL-5 WT (-81/-38) enthält außerdem noch upstream vom Cle0-Element eine Gata-Bindungsstelle, die in dem verkürzten IL-5 WT (-63/-37)-Oligonukleotid nicht mehr vorhanden ist. In Abb. 20B wurden Kernextrakte von Jurkat-Zellen benutzt, in denen Gata3 überexprimiert wurde. Beide Banden, C7 und C8, verschwinden durch Zugabe des IL-5 WT (-81/-38)-Oligonukleotids im Überschuss. Jedoch nach Zugabe von IL-5 EM (-63/-37) im Überschuss bleibt die obere Bande sichtbar. Hieraus kann man schließen, dass der schneller laufende Komplex Proteine enthält, die mit dem Cle0-Element interagieren, während der langsamer laufende Komplex C7 Gata3 zu enthalten scheint und deshalb nicht von der kurzen IL-5 WT (-63/-37)-Sonde kompetitiv verdrängt werden kann, da diese keine Gata-Bindungsstelle enthält.

Um zu zeigen, dass die Bildung des α -Gata3/Gata3 Komplexes für den Gata3-Antikörper spezifisch ist, wurden verschiedene Antikörper zu Kernextrakten, die mit der ³²P-markierten (-81/-38)-Sonde inkubiert wurden, hinzugegeben. Wie deutlich in Abb. 20C zu erkennen ist, hat nur α -Gata3 die Fähigkeit den Hauptkomplex C7* zu verlangsamen, während andere Antikörper die Mobilität von C7* nicht beeinflussen. Dies zeigt, dass C7* Gata3 enthält. Der neu entstandene α -Gata3/Gata3 Komplex ist als C9 bezeichnet.

In Kernextrakten aus HSB-2-Zellen konnte ein Gata3-spezifischer Komplex im EMSA mit der IL-5 -81/-38 spezifischen Sonde auch ohne Überexpression von Gata3 nachgewiesen werden (C7**, Abb. 20D). Dieser kann ebenso mit einem Gata3-Antikörper interagieren (Spur 2).

Die vermeintlich Gata3-enthaltenden Komplexe sind mit C7, C7* und C7** gekennzeichnet.

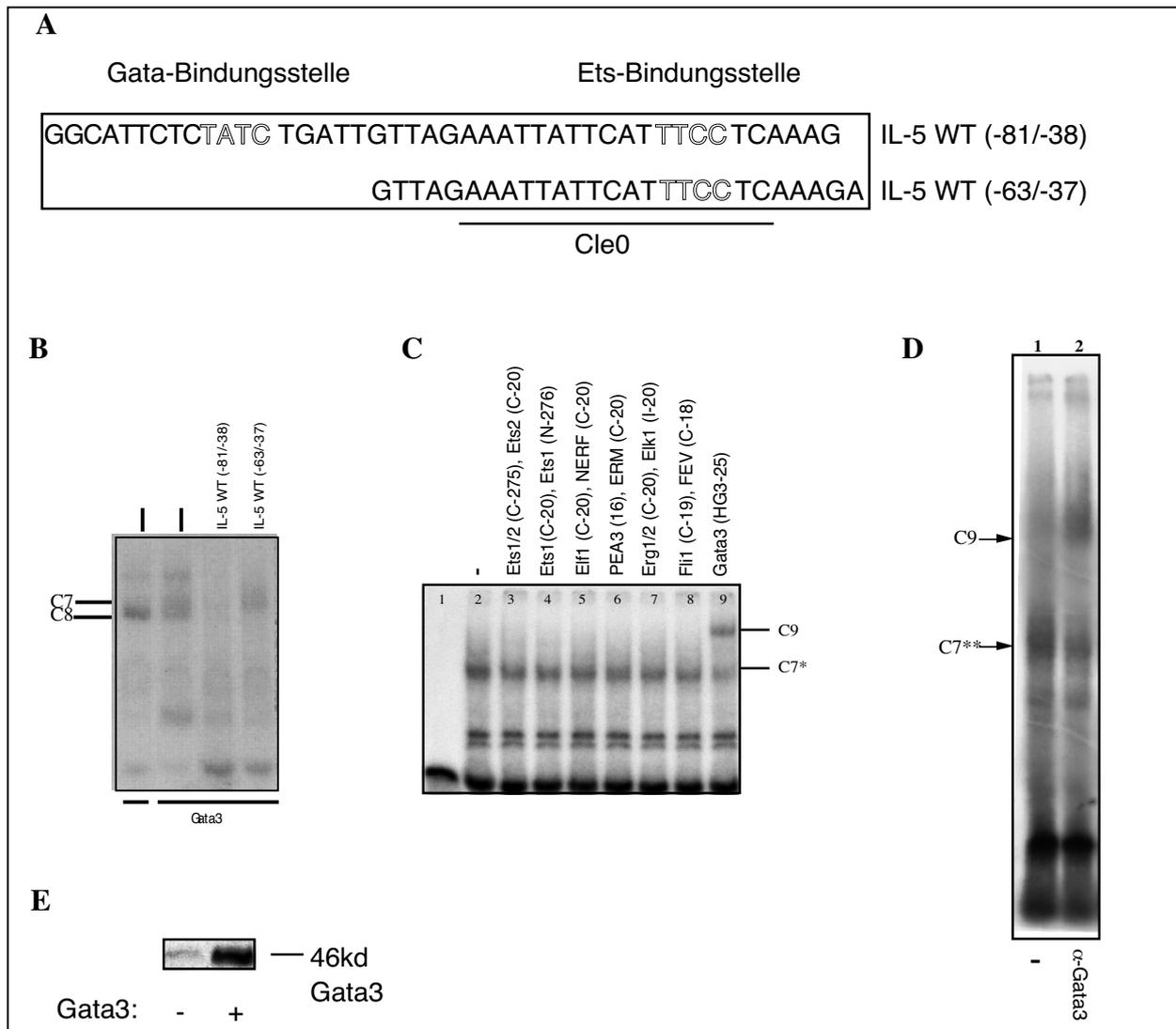


Abb. 20: Die Bindung von Gata3 an die Gata-Bindungsstelle im humanen IL-5 Promotor. A. Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind abgebildet. B. Gata3 bindet an die Gata-Bindungsstelle in der Sequenz IL-5 WT (-81/-38). Für den EMSA wurden Kernextrakte aus Jurkat Zellen mit überexprimiertem Gata3 eingesetzt. Als Kontrolle dienen nicht-transfizierte Zellen. C. Der Gata3 Antikörper ist spezifisch für die Gata3-Bande. Verschiedene Antikörper wurden mit den Kernextrakten von Jurkat Zellen und der 32 P-markierten Sonde, IL-5 WT -81/-38 (siehe Abb.20D), inkubiert. In den Zellen wurde Gata3 überexprimiert, und sie wurden nach der Transfektion mit PMA und Ionomycin stimuliert. D. Die Bindung von endogenem Gata3 an eine 32 P-markierte Sonde, IL-5 WT -81/-38 (siehe Abb.20E). Kernextrakte von HSB-2 Zellen wurden in diesem EMSA eingesetzt. E. Western Blot von Jurkat Kernextrakten. Die Zellen wurden mit PMA und Ionomycin stimuliert, in der rechten Spur mit Gata3 transfiziert und Kernextrakte hergestellt.

Außerdem konnte in Kernextrakten von Jurkat-Zellen die Gata3 Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 20E). Der Blot zeigt auch, dass die Gata3 Expression durch Transfektion mit einem Gata3-Plasmid erhöht wird.

4.7 PMA/Ionomycin-Behandlung von HSB-2-Zellen verändert das Bandenmuster mit der IL-5 spezifischen Sonde im EMSA

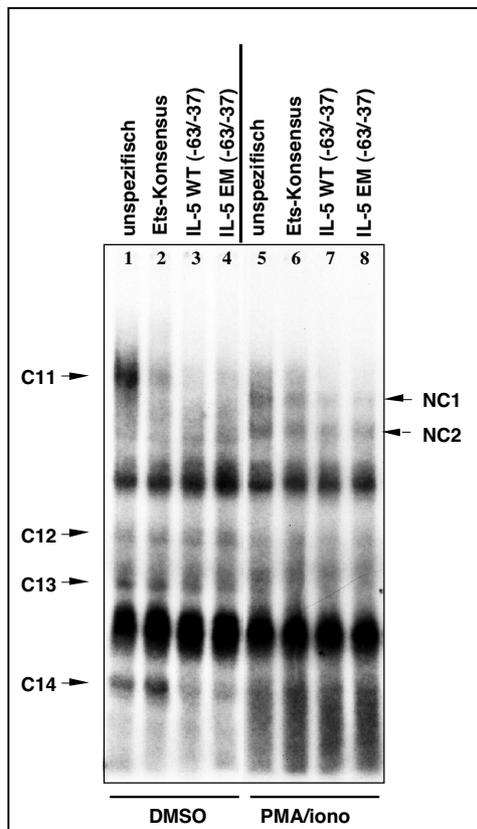


Abb. 21: Die Bindung verschiedener Komplexe an die IL-5 WT (-81/-38)-Sonde. HSB-2- Zellen wurden mit DMSO oder PMA plus Ionomycin stimuliert. Die daraus isolierten Kernextrakte wurden mit ³²P-markiertem Oligonukleotid inkubiert und im EMSA aufgetrennt. Die Kompetitoren wurden im ca. 200-fachen Überschuss zugegeben.

Kostimulation von HSB-2-Zellen mit PMA und Ionomycin führt zur Induktion der endogenen IL-5 Expression (siehe Abb. 23A). Um zu testen, ob diese Aktivierung mit Veränderung von Bindungsaktivitäten an die Cle0-Sequenz einhergeht, wurden EMSAs mit der -63/-37 und der -81/-38 IL-5 Sonde durchgeführt. Die Bandenmuster, die sich mit dieser Methode aus DMSO- und PMA/Ionomycin-behandelten Zellen ergaben, wurden verglichen. Wenn die Untersuchung mit der -81/-38 Sonde durchgeführt wurde, fällt auf, dass durch PMA/Ionomycin-Behandlung mindestens ein Komplex (C11) verloren geht, während zwei neue (NC1 und NC2) entstehen (Abb. 21). Die Bindung der Proteine aus Komplex C11 an die markierte Sonde lässt sich durch Zugabe eines Ets-Konsensus Oligonukleotids, nicht aber eines unspezifischen Oligonukleotids, im Überschuss fast ganz verhindern (vgl. Spur 1 und 2). Das deutet darauf hin, dass der Komplex Proteine enthält, die spezifisch an eine Ets-Bindungsstelle

binden können. Auch lassen sich die Komplexe durch ein kürzeres IL-5-Fragment (-63/-37), welches nur das Cle0-Element, nicht jedoch die Gata-Bindungsstelle, enthält, kompetitieren. Allerdings macht es dabei keinen Unterschied, ob die Ets-Bindungsstelle mutiert (Spur 4) oder nicht mutiert (Spur 3) vorliegt. Es könnte darauf hindeuten, dass der C11 Komplex neben einem Ets-Protein auch ein weiteres Cle0-bindendes Protein, wie AP1, enthält. Die Banden der Komplexe C12 und C13 scheinen in den stimulierten Zellen nicht so intensiv zu sein wie in den unstimulierten Zellen. Die Bildung des Komplexes C14, der wiederum nur mit Kernextrakten der unstimulierten Zellen zu sehen ist, kann durch die Ets-Konsensus

Sequenz nicht verhindert werden (Spur 6), wohl aber durch Zugabe des IL-5 WT (-63/-37)-Oligonukleotids (Spur 7) und des IL-5 EM (-63/-37)-Oligonukleotids mit mutierter Ets-Bindungsstelle (Spur 8). Die Bindung der Komplexe NC1 und NC2 (Spuren 5-8) wird durch Zugabe der Ets-Konsensus Sequenz nur unwesentlich inhibiert (Spur 6). NC2 ist auch nach Zugabe der WT- oder Ets-mutierten Form des Cle0-Elements nur unwesentlich verändert, während die Bildung von NC1 durch diese Oligonukleotide signifikant unterdrückt werden kann (Spuren 7/8).

Wenn man diesen Vergleich zwischen den Kernextrakten unstimulierter Zellen und den Kernextrakten PMA/Ionomycin-stimulierter Zellen in EMSAs mit der IL-5 WT (-63/-37)-Sonde durchführt, erhält man ein anderes Bandenmuster (Abb. 22A). Bei diesen EMSAs wurde nicht radioaktiv-markiertes IL-5 EM (-63/-37) - Oligonukleotid, bei dem die Ets-Bindungsstelle von GGAA zu AGAA mutiert ist, im Überschuss zur Reaktion dazugegeben. So konnte erreicht werden, dass in erster Linie Ets-Proteine an die radioaktiv-markierte Sonde binden, weil alle Faktoren, die an Stellen außerhalb der Ets-Bindungsstelle binden, von dem „kalten“ IL-5 EM (-63/-37)-Oligonukleotid abgefangen werden sollten. Im EMSA-Gel konnten mehrere Banden unterschieden werden. Die Bildung der Komplexe A, B und C konnte durch Zugabe des nicht radioaktiv-markierten IL-5 WT (-63/-37)-Oligonukleotids (Spur 5), einer Ets-Konsensus-Sequenz (Spur 6) und eines Oligonukleotids mit alternativer Ets-Bindungsstelle IL-5 EM2 (-63/-37), das statt GGAA die Ets-Bindungsstelle GGAT enthält (Spur 7), alle im Überschuss, inhibiert werden. Hingegen hatte die Zugabe des unspezifischen Oligonukleotids Sp1 keinen Einfluss auf die Bildung dieser Komplexe. Diese Daten deuten darauf hin, dass alle drei Komplexe Ets-Proteine enthielten. Durch Zugabe von α -Elf1- und α -Ets1-Antikörpern konnte Komplex A als Elf1-enthaltender Komplex identifiziert werden. Besondere Aufmerksamkeit richtete ich auf Komplex C, da dieser unter DMSO-Bedingungen nicht vorhanden war. Um diesen unbekanntem Proteinkomplex näher analysieren zu können, wurden größere Mengen an Kernextrakten von HSB-2-Zellen isoliert. Nach einer FPLC-Aufreinigung über einen Anionenaustauscher wurden verschiedene Fraktionen im EMSA mit radioaktiv markierter IL-5 WT (-63/-37)-Sonde getestet (Abb. 22B). Die Bande konnte in einem Mini-Gel in Fraktionen 31-42 nachgewiesen werden. Wegen der, trotz Anreicherns, zu geringen Mengen an bindungsaktivem Protein konnten jedoch keine weiteren Aufreinigungsversuche erfolgreich durchgeführt werden. Ein zusätzliches Problem stellten die HSB-2-Zellen selbst dar. Es war nicht möglich, sie in größeren Volumina zu kultivieren, um dadurch ausreichende Mengen an Kernextrakten für

eine weitere Aufreinigung zu gewinnen. Um das eben genannte Problem zu umgehen, wurde untersucht, ob die leicht und in großen Mengen kultivierbare murine T-Zelllinie EL-4, die Th2-artige Eigenschaften besitzt und IL-5 konstitutiv produziert, die Proteine zur Bildung dieses Komplexes exprimiert. Obwohl EL-4-Zellen mit verschiedenen Substanzen stimuliert wurden, konnte Komplex C im EMSA nicht nachgewiesen werden (Abb. 22C). Es sei darauf hingewiesen, dass die IL-5 Expression in Maus und Mensch wahrscheinlich unterschiedlich reguliert wird (Cousins et al., 2000).

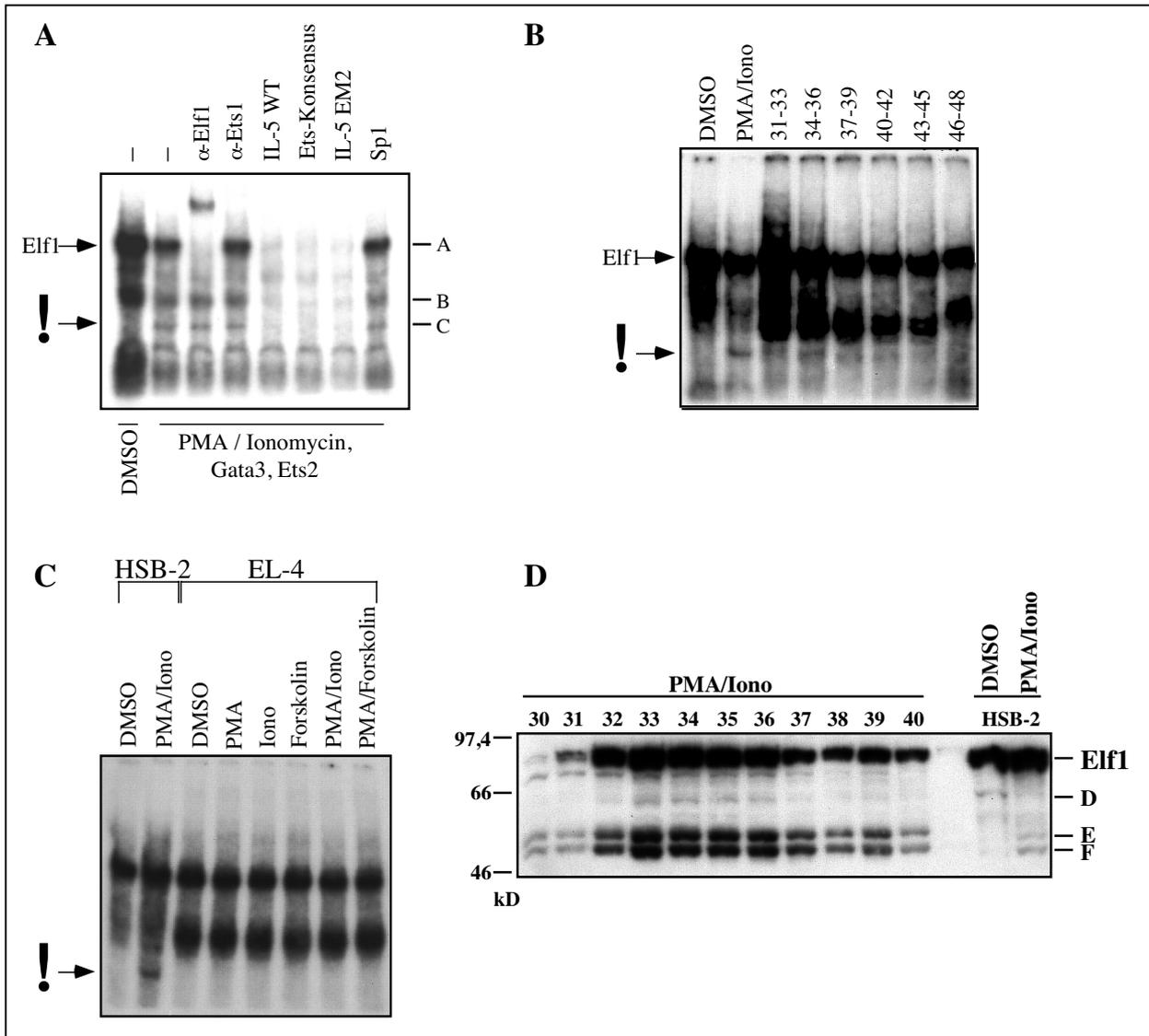


Abb. 22: Die Bindung mehrerer Proteine aus Kernextrakten an die ³²P-markierte IL-5 WT (-63/-27) Sonde. A. Die Kernextrakte stammen aus HSB-2 Zellen, die mit Gata3 und Ets2 kotransfiziert und dann mit PMA und Ionomycin stimuliert worden sind. Als Kontrolle dienen Zellen, die mit DMSO behandelt worden sind. Die Kompetitoren wurden im ca. 200-fachen Überschuss zugegeben. Die noch nicht identifizierte, aber sehr interessante Bande ist mit einem Ausrufezeichen markiert (!). **B.** Ein Versuch, den HSB-2 Kernextrakt über FPLC (Anionen-Austauscher, MonoQ) aufzureinigen, um die markierte Bande zu isolieren. Die Zahlen über den Spuren geben die Fraktionen an, die jeweils in den verschiedenen Spuren aufgetragen wurden. **C.** Kernextrakte aus murinen EL-4 T-Zellen, die mit verschiedenen Substanzen stimuliert wurden. Als Kontrolle wurden Kernextrakte aus HSB-2 Zellen eingesetzt. Die Bande, die von Interesse ist, wurde markiert. **D.** Western Blot der FPLC-Fractionen aus (B) mit dem α-Elf1 Antikörper.

Es fällt auf, dass das im Komplex C enthaltene vermeintliche Ets-Protein zusammen mit Elf1 in der FPLC-Separation eluiert wurde. Es könnte sein, dass es sich um ein Abbauprodukt von Elf1 handelt, daher wurden Extrakte aus DMSO- und PMA/Ionomycin-behandelten Zellen im Western auf Elf1-Degradation hin getestet (Abb. 22D). In den ursprünglichen Kernextrakten unstimulierter und stimulierter HSB-2-Zellen fällt auf, dass eine Degradation von Elf1 in den mit PMA plus Ionomycin stimulierten Zellen in einem größeren Maße stattfindet als in den unstimulierten Zellen. Auch in den eluierten Fraktionen sind die zwei Abbauprodukte verstärkt vorhanden. Es wäre durchaus möglich, dass die zusätzliche Bande im EMSA aus einem dieser Elf1-Degradationsprodukt besteht, welches zusätzlich zur Ets-DNA-Bindungsdomäne auch noch die Sequenz enthält, die vom Antikörper erkannt wird. In Anbetracht der Elf1-Struktur wäre ein kleineres Fragment von Elf1, was dennoch diese beiden Sequenzen beinhaltet, denkbar (siehe Abb. 6).

4.8 Untersuchung der Regulation der endogenen IL-5-Expression von HSB-2 T-Zellen

HSB-2-Zellen produzieren unstimuliert kaum detektierbare Mengen an IL-5. Durch Zugabe von PMA und Ionomycin kommt es jedoch zu einem starken Anstieg der IL-5-Expression (Abb. 23A). Um die Induktion zu quantifizieren, wurde quantitative RT-PCR durchgeführt (Taqman-PCR).

Bei der Taqman-PCR wird ein interkalierendes fluoreszierendes Reagenz (SYBR Green) zu der PCR-Reaktion hinzugegeben, welches nach jedem PCR-Zyklus mit der vorhandenen cDNA reagieren kann. Die jeweils gemessene Fluoreszenz nimmt bei Amplifikation des gewünschten cDNA-Abschnitts nach jedem Zyklus exponentiell zu und kann deshalb für die Quantifizierung des entstandenen PCR-Produkts verwendet werden. Durch die

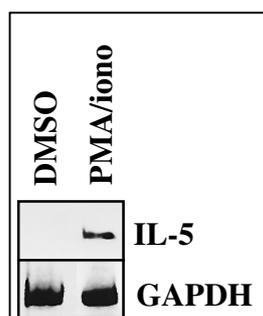
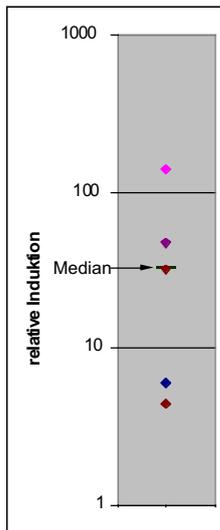


Abb. 23A: Die endogene IL-5 Expression in HSB-2 Zellen. Zellen wurden mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (2 μ l) stimuliert. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden. Die IL-5 Expression wurde mittels RT-PCR untersucht. (6% Acrylamidgel)

Quantifizierung kann man deutlich erkennen (Tab. 1), dass es in allen Versuchen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen einen signifikanten, aber sehr variablen Anstieg an IL-5 mRNA in den mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen gab.

Abb. 23B: Graphische Darstellung der relativen Induktionen aus Tabelle 1.



<u>DMSO</u>	<u>PMA/Ionomycin</u>	<u>relative Induktion</u>
2.91E-04	1.73E-03	6
5.54E-04	7.79E-02	141
3.75E-03	1.65E-02	4
1.15E-04	3.68E-03	32
7.77E-07	3.67E-05	47
Median		32

Tabelle 1: Taqman-mRNA-Werte aus fünf unabhängigen Versuchen von HSB-2 Zellen, die entweder mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (2µM) stimuliert wurden oder mit DMSO behandelt wurden. Der Median ergibt sich aus den relativen Induktionen der verschiedenen Versuche.

Die Variation in der Höhe des relativen Anstiegs an IL-5 mRNA ist möglicherweise auf Schwankungen in der Vitalität der schwer zu kultivierenden HSB-2-Zellen zurückzuführen. Dafür spricht auch, dass eine schwankende Basalaktivität in den unstimulierten Zellen beobachtet wurde. Dennoch kann in allen Fällen ein Anstieg der IL-5 Expression beobachtet werden (Abb. 23B).

Da ein positiver Effekt der Ets-Faktoren Ets1 und Ets2 zusammen mit Gata3 auf den Luciferase-Reporter-gen-gekoppelten IL-5 Promotor beobachtet worden war, sollte der Einfluss dieser Faktoren auf den endogenen IL-5 Promotor in HSB-2-Zellen untersucht werden. Dafür wurden die Faktoren Ets1, Ets2, Elf1 und Gata3 in den Zellen überexprimiert, und die mRNA isoliert. Die Ergebnisse einer konventionellen RT-PCR, deren Produkte auf ein Agarosegel geladen wurden, sind in Abb. 23C dargestellt. In der ersten Spur ist zu erkennen, dass in zwei unabhängigen Versuchen IL-5 Expression in PMA/Ionomycin stimulierten Zellen detektierbar war. Auch in den Zellen, die mit Gata3 und/oder einem Ets-Faktor kotransfiziert wurden, war auf dem Agarosegel eine IL-5-Bande zu sehen. Jedoch ist es mit dieser Methode nicht möglich, die Mengen zu quantifizieren. FACS Daten deuten auf

eine Transfektionseffizienz von ca. 13% hin. Aufgrund dieser geringen Transfektionseffizienz ist es außerdem schwer, signifikante Unterschiede zu bestimmen.

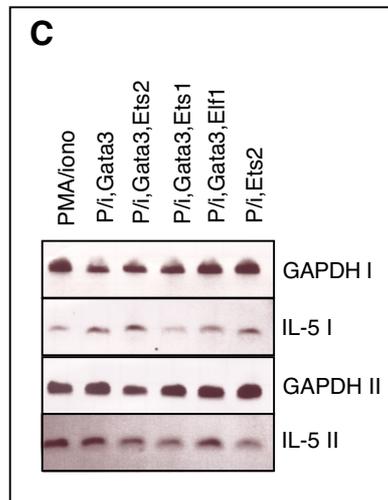


Abb. 23C: Agarosegele der RT-PCR Produkte der mRNA aus HSB-2 Zellen. Die Zellen wurden mit Gata3 (2 μ g) und/oder einem Ets-Faktor (6 μ g) transfiziert und mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (2 μ M) stimuliert.

4.9 Trennung transfizierter Zellen von nicht-transfizierten Zellen, um den Effekt überexprimierter Faktoren auf den endogenen IL-5 Promotor zu untersuchen

Eine Trennung der transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen würde die genauere Betrachtung der Beteiligung von Gata3 und den Ets-Faktoren an der Aktivität des endogenen IL-5 Promotors in den transfizierten Zellen erlauben. Dieses ist möglich mit Hilfe der MACS Methode, bei der Zellen mit dem Expressionsplasmid für ein trunkiertes murines Oberflächenmolekül H2K^k transfiziert werden, und dieses dann auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ein magnetisch markierter Antikörper gegen das H2K^k Molekül kann an die transfizierten Zellen binden. Diese nun magnetisch markierten Zellen können dann über eine Magnetsäule von den nicht-markierten Zellen getrennt werden. Im FACS konnte nachgewiesen werden, dass die transfizierten Zellen das H2K^k Molekül exprimieren und dass die Trennung erfolgreich gewesen ist. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr hoch, dass die Zellen, die dieses Molekül dann auf ihrer Oberfläche exprimieren, gleichzeitig auch andere mit H2K^k kotransfizierte Faktoren überexprimieren. Deshalb kann man davon ausgehen, dass man die

transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen trennen kann, wenn man die Zellen anhand ihrer Expression dieses Oberflächenmoleküls sortiert.

Die Methode wurde zuerst an Jurkat-Zellen ausprobiert, da sich Jurkat-Zellen problemlos durch Elektroporation transfizieren lassen als HSB-2-Zellen. Zur Kontrolle wurde zunächst der Luciferase-gekoppelte IL-5 Promotor eingesetzt, um durch einfache Luciferase-Messungen die Effekte der überexprimierten Faktoren bestimmen zu können. Außerdem wurde Ets1 anstelle von Ets2 eingesetzt, da die Expression des Proteins im Western Blot

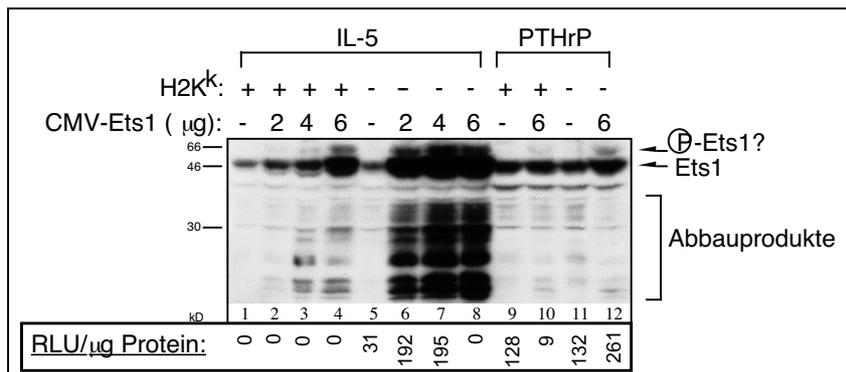


Abb. 24: Western Blot der Kernextrakte H2K^k-transfizierter Jurkat Zellen. Die Zellen wurden mit IL-5 (5µg, Spuren 1-8) oder PTHrP.Luc (5µg, Spuren 9-12) und Gata3 (2µg) kotransfiziert. Die Promotoraktivitäten der Reporter-genkonstrukte sind als RLU/µg Protein angegeben.

überprüft werden sollte, und Ets1 im Western Blot besser detektierbar ist. Die Zellen wurden mit dem pIL-5P.Luc Reporterplasmid, Gata3 und/oder Ets1 Plasmid-DNA und dem Expressionsplasmid für H2K^k kotransfiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass in Gegenwart von H2K^k keine Luciferase Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 24, als RLU/µg Protein angegeben). Außerdem war die Ets1-Expression in den Zellen, die mit dem H2K^k-Expressionsplasmid kotransfiziert wurden, sehr viel niedriger als in den Zellen ohne überexprimiertes H2K^k (Abb. 24, vgl. Spuren 1-4 und Spuren 5-8). Wenn anstatt des pIL-5P.Luc Reportergens ein anderes Promotor-Reporter-genkonstrukt (PTHrP.Luc von Dr. Jürgen Dittmer) eingesetzt wurde (Spuren 9-12), konnte hingegen Luciferase Aktivität gemessen werden. Auch die Ets1-Expression war durch die Zugabe von H2K^k unverändert. Es scheint, als würde aus unbekanntem Gründen die Expression von H2K^k spezifisch die Aktivierung des IL-5 Promotors vollständig unterdrücken. Es könnte sein, dass H2K^k mit dem Ionomycin-induzierten Signalweg interferiert. Um das zu testen, wurde anstatt mit PMA/Ionomycin mit PMA/Tax stimuliert. Aber auch unter diesen Bedingungen konnte der IL-5 Promotor nicht aktiviert werden (Abb. 25, vgl. Spuren 1 und 6).

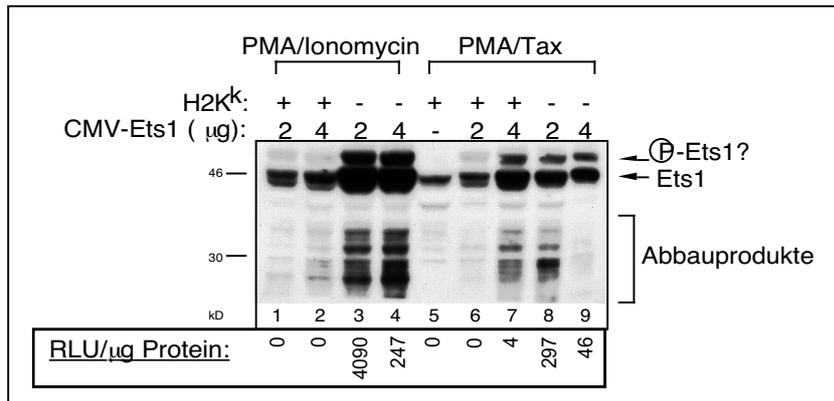


Abb. 25: Western Blot der Kernextrakte mit und ohne Tax und H2K^k-transfizierter Jurkat Zellen. Die Zellen wurden außerdem mit IL-5 (5μg) und Gata3 (2μg) kotransfiziert. In Spuren 1-4 wurden die Zellen mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (2μM) stimuliert, in Spuren 6-9 mit PMA. Die Promotoraktivität des Reporter-genkonstrukts ist als RLU/μg Protein angegeben.

Wurde der Versuch mit HSB-2-Zellen wiederholt, zeigten sich ähnliche Resultate. Es konnte keine Luciferase Aktivität gemessen werden. Auch eine signifikante Ets1-Expression war in HSB-2-Zellen, die mit oder ohne H2K^k transfiziert wurden, nicht nachzuweisen (Abb. 26, Spuren 6-9).

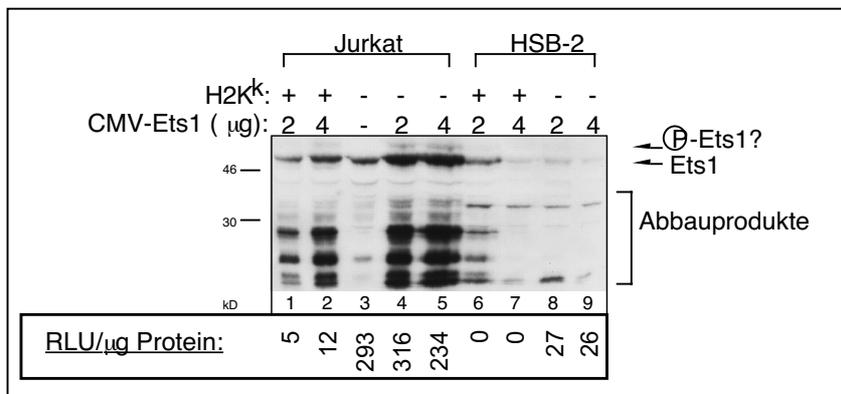
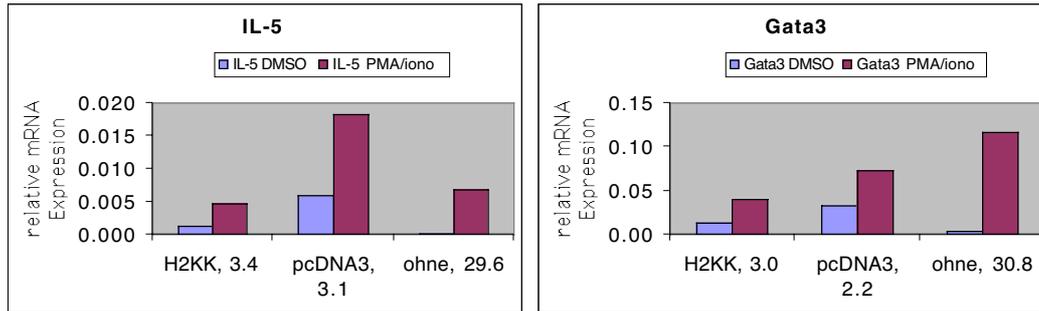


Abb. 26: Western Blot der Kernextrakte mit Tax (4μg) und H2K^k-transfizierter Jurkat und HSB-2 Zellen. Die Zellen wurden außerdem mit IL-5 (5μg) und Gata3 (2μg) kotransfiziert und mit PMA (10ng/ml) stimuliert. Die Promotoraktivität des Reporter-genkonstrukts ist als RLU/μg Protein angegeben.

Aufgrund des negativen Effektes von H2K^k auf die pIL-5P.Luc-Aktivität wurde getestet, ob H2K^k auch die endogene IL-5-Expression in HSB-2-Zellen beeinträchtigt. In einer Taqman-Analyse der mRNA von HSB-2-Zellen, die mit H2K^k transfiziert wurden, und über MACS die transfizierten von den nicht-transfizierten Zellen getrennt wurden, ließen sich folgende Induktionen (durch PMA/Ionomycin Stimulierung) von IL-5 und Gata3 berechnen:



Faktoren	nicht sortiert, nicht transfiziert	nicht sortiert, transfiziert (pcDNA3)	H2K^k - sortiert
IL-5	29,6	3,1	3,4
Gata3	30,7	2,3	3,0

Abb. 27: Graphische und tabellarische Darstellung der IL-5- und Gata3-Expressionen bzw. relativen Induktionen der IL-5- und Gata3-Expression in mit PMA/Ionomycin-stimulierten HSB-2-Zellen im Vergleich zu unstimulierten HSB-2-Zellen. Die Zellen wurden mit der Plasmid-DNA von H2K^k oder dem leeren Plasmid (pcDNA3) transfiziert und mit PMA (10ng/ml) plus Ionomycin (2µM) stimuliert bzw. mit DMSO zur Kontrolle behandelt. Die H2K^k-exprimierenden Zellen wurden über MACS sortiert. Eine weitere Kontrolle stellen Zellen dar, die nicht transfiziert wurden, aber mit PMA plus Ionomycin bzw. DMSO behandelt wurden. Von den Zellen wurde RNA isoliert, cDNAsynthetisiert und diese in einer Taqman-PCR eingesetzt.

In den Zellen, die nicht elektroporiert wurden, aber mit PMA plus Ionomycin stimuliert wurden, ist eine ca. 30-fache Induktion der IL-5 Expression zu beobachten. Diese hohe Induzierbarkeit ist sowohl in mit H2K^k-transfizierten Zellen als auch in Zellen, die mit dem leeren Vektor (pcDNA3) als Kontrolle transfiziert wurden, um ein 10-faches reduziert. Ähnliche Werte sind auch bei einem weiteren Faktor, Gata3, zu beobachten. Offenbar erhöht die Elektroporation die basale IL-5- bzw. Gata3-Expression. Deshalb und auch wegen der sehr geringen Transfektionseffizienz und den daraus resultierenden geringen Mengen an Zellen, musste diese Methode als ungeeignet verworfen werden.

4.10 Endogene mRNA Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in HSB-2-Zellen

Wenn Ets-Faktoren und Gata3 an der Induzierung der IL-5 Expression durch PMA/Ionomycin beteiligt sind, sollte eine Aktivierung dieser Faktoren der Stimulation der IL-5 Synthese voraus gehen. Eine solche Aktivierung könnte in Form einer erhöhten Expression dieser Faktoren, einer post-translationellen Modifikation z.B. durch Phosphorylierung und/oder durch Rekrutierung eines Kooperationspartners erfolgen. Um zu testen, ob PMA/Ionomycin die Expression von Gata3, Ets1 und Ets2 beeinflusst, wurde die endogene Expression dieser Faktoren auf mRNA-Ebene analysiert.

4.10.1 Ets2 und Gata3

In Tabelle 2 sind Ergebnisse von ein bis drei Versuchen dargestellt, in denen zusätzlich zu der IL-5 mRNA-Expression sowohl in einer Taqman-PCR als auch im Northern Blot die mRNA-Expressionen von Ets1, Ets2 und Gata3 in HSB-2-Zellen gemessen wurden. Obwohl die relativen Induktionen durch Stimulierung der Zellen mit PMA und Ionomycin unterschiedlich hoch sind, ist deutlich zu erkennen, dass ein Anstieg der Gata3-Expression mit dem Anstieg der IL-5-Expression einhergeht. Bei den Ets1- und Ets2-Expressionen sind auf mRNA-Ebene keine Anstiege zu beobachten.

In Abb. 28 wurden die Ergebnisse von HSB-2-Zellen und Jurkat-Zellen im Northern Blot unter verschiedenen stimulierten Bedingungen gegenübergestellt. In beiden Zelllinien bleibt die Ets1-Expression in den mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit DMSO behandelten ungefähr gleich. Interessanterweise nimmt in HSB-2-Zellen die mRNA-Menge von Ets1 durch Stimulierung mit PMA deutlich ab, wohingegen sie nach PMA Stimulierung in Jurkat-Zellen unverändert bleibt. Auch die Ets2 Expression bleibt in den HSB-2-Zellen nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin ungefähr konstant. In den Jurkat-Zellen ist jedoch eine Abnahme der Ets2 Expression zu beobachten. Ein auffälliger Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist in der Expression von Gata3 zu sehen. In HSB-2-Zellen nimmt die Gata3-Expression nach Stimulierung mit PMA oder mit PMA/Ionomycin deutlich zu. In Jurkat-Zellen nimmt die Gata3-Expression auch nach PMA Stimulierung zu, jedoch nach PMA/Ionomycin Stimulierung wieder ab.

Über die Beteiligung der untersuchten Faktoren kann aufgrund dieser Daten spekuliert werden. Die mRNA-Expression von beiden Ets-Faktoren, Ets1 und Ets2, nach Stimulierung der Zellen deutet darauf hin, dass beide Faktoren anwesend sind und so potentiell auch für die Aktivierung des IL-5 Promotors von Bedeutung sein könnten. Auf Proteinebene kann man bei der Expression von Ets1 in mit PMA plus Ionomycin stimulierten HSB-2-Zellen eine Abnahme im Vergleich zu der Proteinmenge in den Kontrollzellen (DMSO) beobachten (Abb. 15B). Mögliche Expressionsunterschiede auf Protein-Ebene bei Ets2 müssten auch untersucht werden, was hier leider wegen Mangel an geeignetem Antikörper nicht möglich war.

HSB-2			
relative Induktion			
	Taqman		Northern Blot
	Einzelwerte	Median	Einzelwerte
IL-5	32 4.4 47	32	**
Ets1	0.2	0.2	0.8
Ets2	2.6 1.2 0.3	1.2	1.1
Gata3	6.6 3.1 2.2	3.1	3.6

Tabelle 2: Auflistung der mRNA-Expression von IL-5 und der Faktoren Ets1, Ets2 und Gata3 in HSB-2 Zellen, die mit PMA (10ng/ml) und Ionomycin (2µM) stimuliert wurden im Vergleich zu der mRNA-Expression von Zellen, die mit DMSO behandelt wurden. Der Median gibt den Mittelwert aus ein bis drei unabhängigen Taqman-Versuchen an. Die Werte des Northern Blots stammen aus Abb. 16.

** : konnte nicht ausgewertet werden, da Sensitivität der Northernblothybridisierungstechnik nicht ausreichte

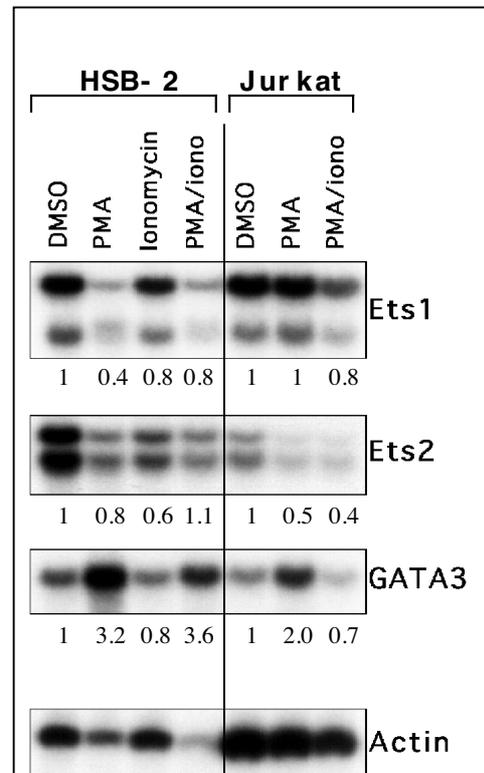


Abb. 28: mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren Ets1, Ets2 und Gata3. Die mRNA Expression von Actin dient als Kontrolle. Die Werte unterhalb der Banden sind die quantifizierten relativen Intensitäten der Banden normiert auf die mRNA Expression von Actin. Die Zellen, HSB-2 und Jurkat, wurden mit PMA (10ng/ml) und/oder Ionomycin (2µM) stimuliert oder zur Kontrolle mit DMSO behandelt.

Die mRNA Expression von Gata3 nimmt in den aktivierten Zellen signifikant zu, was auf die Möglichkeit einer Beteiligung von Gata3 an der Aktivierung des Promotors in HSB-2-Zellen deuten könnte. Auch hier war es nicht möglich, die Expression von Gata3 auf Proteinebene festzustellen. Der Gata3-Antikörper, der für den Westernblot in Abb. 20E erfolgreich eingesetzt wurde, gab in späteren Blots keine Signale mehr. Drei weitere Gata3-Antikörper gaben ebenfalls keine spezifischen Signale.

4.10.2 Untersuchungen weiterer Transkriptionsfaktoren, die an der IL-5-Expression beteiligt sein könnten

Zusätzlich zu den Faktoren Gata3 und Ets2 wurden weitere Transkriptionsfaktoren, die in der Literatur auch im Zusammenhang mit der Aktivierung des IL-5 Promotors erwähnt wurden, mit Hilfe der Taqman-PCR auf mRNA-Ebene untersucht. Es wurde ein Versuch durchgeführt, in dem die mRNA-Mengen der Faktoren Oct1, Oct2, Fra2 (Thomas et al., 1999), NF-AT (Lee et al., 1995), JunB (Karlen et al., 1996), in mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen gemessen wurden. Da dieses Experiment nur einmal durchgeführt wurde, ist in Tabelle 3 anstelle der relativen Induktion ein Anstieg, eine Abnahme oder keine Veränderung der mRNA-Expression für jeden dieser Faktoren vermerkt.

Von den Oct-Faktoren nimmt die Expression des induzierbaren Lymphozyten-spezifischen Faktors Oct2 zu, was mit der Erhöhung der IL-5 Expression einhergeht. Das deutet auf eine Aktivierung dieser beiden Gene unter ähnlichen Bedingungen hin. Von NF-AT, einem nukleären Faktor aktivierter T-Zellen, wäre zu erwarten gewesen, dass er in den aktivierten HSB-2 T-Zellen induziert wird. Tatsächlich jedoch nimmt er in seiner Expression ab. JunB ist ein AP1-Faktor, dessen Expression in Th2-Zellen erhöht ist und deshalb ein weiterer Kandidat für eine Beteiligung an der Aktivierung des IL-5 Promotors sein könnte. Ähnlich wie Ets2 wird JunB posttranskriptionell reguliert (Flavell et al., 1999), weshalb man keine Aussage aufgrund der unveränderten mRNA-Expression treffen kann. Ein weiterer AP1-Faktor ist Fra2, der möglicherweise an der Hochregulierung von IL-5 beteiligt ist (Thomas et al., 1999). Er ist in aktivierten HSB-2-Zellen in seiner Expression erhöht zu beobachten.

Faktor	mRNA- Expression	Beschreibung der Faktoren
Oct1	↓	Ubiquitär exprimiert, konstitutiv aktiv
Oct2	↑	Lymphozyten-spezifisch, induzierbar aktiv
NF-AT	↓	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
JunB	↔	AP1 Faktor, in Th2-Zellen exprimiert
Fra2	↑	AP1 Faktor, möglicherweise an IL-5 Hochregulierung beteiligt

Tabelle 3: Beschreibung einiger möglicherweise an der Aktivierung des IL-5 Promotors beteiligter Transkriptionsfaktoren. Die Pfeile geben Zunahme, Abnahme oder keine Veränderung der mRNA Expression nach Stimulierung der Zellen mit PMA und Ionomycin im Vergleich zu Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, an. Es wurde ein einzelner Versuch durchgeführt, deshalb sind keine absoluten Werte angegeben.

4.11 Versuche mit primären Th2-Zellen

Nach den Versuchen in HSB-2-Zellen sollte überprüft werden, ob und unter welchen Bedingungen die im Modellsystem (HSB-2) untersuchten Faktoren auch in primären humanen Lymphozyten nachgewiesen werden konnten. Die isolierten Lymphozyten (siehe 2.14.4) wurden mit α -CD3 und IL-4 stimuliert und kultiviert, um eine Anreicherung von aktivierten Th2-Zellen zu bewirken (Asselin et al., 1998). Durch eine fünfstündige PHA-Stimulierung kurz vor der RNA-Isolierung sollte eine zusätzlich verstärkte Expression der Th2-Zytokine induziert werden. Die RNA wurde revers transkribiert, und die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Zytokine mittels Taqman-PCR gemessen. Es ist zu beachten, dass durch die Behandlung erst mit α -CD3 und dann mit PHA eine undefinierbare Mischung aus aktivierten T-Zellen, sowohl Th1-Zellen als auch Th2-Zellen (und womöglich auch noch anderen), resultiert. Alleine die IL-4 Behandlung ist an der Th2-spezifischen Entwicklung der Zellen ursächlich beteiligt. Der Anteil der Th2-Zellen unter den gesamten aktivierten T-Zellen sollte mit Hilfe einer intrazellulären IL-5 Zytokinfärbung überprüft werden.

4.11.1 Endogene IL-5 Expression

Wichtig war zunächst festzustellen, wie sich die IL-5 Expression in den T-Zellen aufgrund der Behandlung mit α -CD3 , IL-4 und auch zusätzlich mit PHA verändert. Dafür wurde RNA

von diesen aktivierten primären T-Zellen nach je einer, zwei und drei Wochen isoliert, und in einer Taqman-PCR die Expression von IL-5 bestimmt. In der ersten Woche, in der die Zellen drei Tage mit α -CD3 und IL-4 inkubiert wurden, und danach nur noch mit IL-4, wurden die Zellen in Flaschen horizontal in den Inkubator gestellt. Nach dieser Woche wurden die Zellen in zwei Flaschen aufgeteilt, wobei eine weiterhin horizontal und die andere schräg, um dadurch eine höhere Zelldichte zu erreichen, in den Inkubator gestellt wurde. Die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Versuchen (JD1 und JD2) sind in Abb. 29 dargestellt.

In Balkenform ist die Expression von IL-5 mit oder ohne PHA-Induktion dargestellt. Die Werte über den Balken geben die relative Induktion der IL-5 Expression durch PHA an. Wie anhand der Balken zu erkennen ist, ist ein klarer IL-5 Anstieg in der Zellpopulation (in Abwesenheit von PHA) nur bei den horizontal-gestellten Zellen aus Versuch JD1 zu erkennen. Jedoch die absolute Höhe und Induzierbarkeit der IL-5 Expression durch PHA ist in der schräg-gestellten Zellpopulation in JD1 nach drei Wochen am höchsten. In JD2 nimmt sowohl die IL-5 Expression als auch die Induzierbarkeit der IL-5 Expression durch PHA über drei Wochen ab.

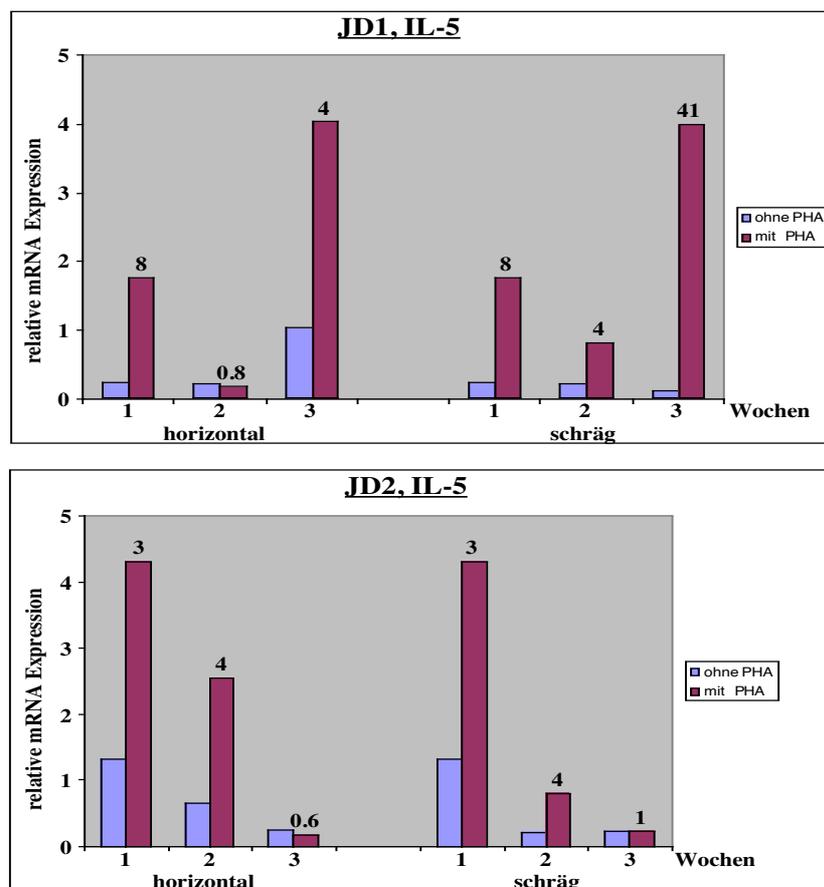


Abb. 29: IL-5 Expression in primären T-Zellen. Die IL-5 Expression wurde auf RNA-Ebene nach ein, zwei und drei Wochen gemessen (Taqman). Außerdem wurden die Zellen nach ein, zwei und drei Wochen vor der RNA-Isolierung 5h mit PHA (1 μ g/ml) stimuliert. Die Werte über den Balken drücken die relative Induktion der IL-5 Expression durch PHA aus. Die Ergebnisse sind aus Daten von ein bis zwei unabhängigen cDNA-Präparationen zusammengestellt.

4.11.2 GAPDH kann als Kontrolle verwendet werden

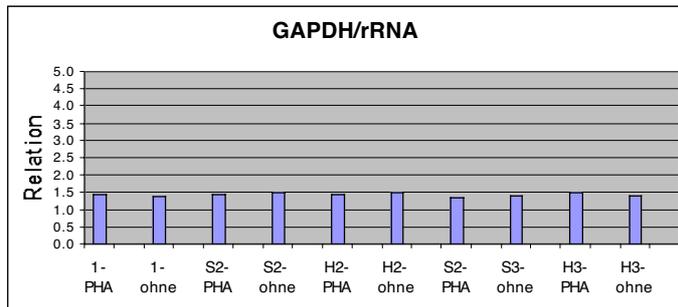


Abb. 30: Das Verhältnis der Expression von GAPDH zu rRNA unter den verschiedenen Bedingungen (S-schräg, H-horizontal) nach ein, zwei und drei Wochen mit oder ohne PHA-Stimulierung.

Um ausschließen zu können, dass die GAPDH-Expression durch die Behandlung der Zellen mit α -CD3, IL-4 und PHA positiv oder negativ beeinflusst wird und dadurch als Kontrolle ungeeignet ist, wurde als weitere Kontrolle die rRNA gemessen. Da es unwahrscheinlich ist, dass sich beide RNAs in ihrer Expression durch die äußeren Einflüsse in gleicher Weise verhalten, bedeutet ein gleichbleibendes Verhältnis der Expression von GAPDH zu rRNA unter den verschiedenen Bedingungen, dass beide als Kontrolle eingesetzt werden können. In Abb. 30 ist graphisch dargestellt, dass sich das Verhältnis der beiden RNAs zueinander nicht signifikant verändert.

4.11.3 Das Th2/Th1-Verhältnis der aktivierten T-Zellen anhand der Expressionen von $IFN\gamma$ (Th1) und IL-13 (Th2)

	Th1	Th2
Zytokine	$IFN\gamma$	IL-5 IL-13
Transkriptionsfaktoren	T-bet	Gata3 c-Maf JunB

Tabelle 4: Ein Überblick über die hier untersuchten Th1- und Th2-spezifischen Faktoren.

Um eine Aussage über die Expressionsprofile der verschiedenen gemessenen Zytokine und Transkriptionsfaktoren im Hinblick auf Th2-Spezifität machen zu können, ist es wichtig zu wissen, wieviele der T-Zellen einen Th1- bzw. Th2-Phänotyp ausgebildet haben. Eine

Möglichkeit hierfür bietet die intrazelluläre Zytokinfärbung, die aber in diesem Fall nicht funktionierte. Daher wurde die Expression eines typischen Th1-Zytokins, $\text{IFN}\gamma$, und eines zweiten typischen Th2-Zytokins, IL-13, an den verschiedenen Messpunkten bestimmt und verglichen (Abb. 31).

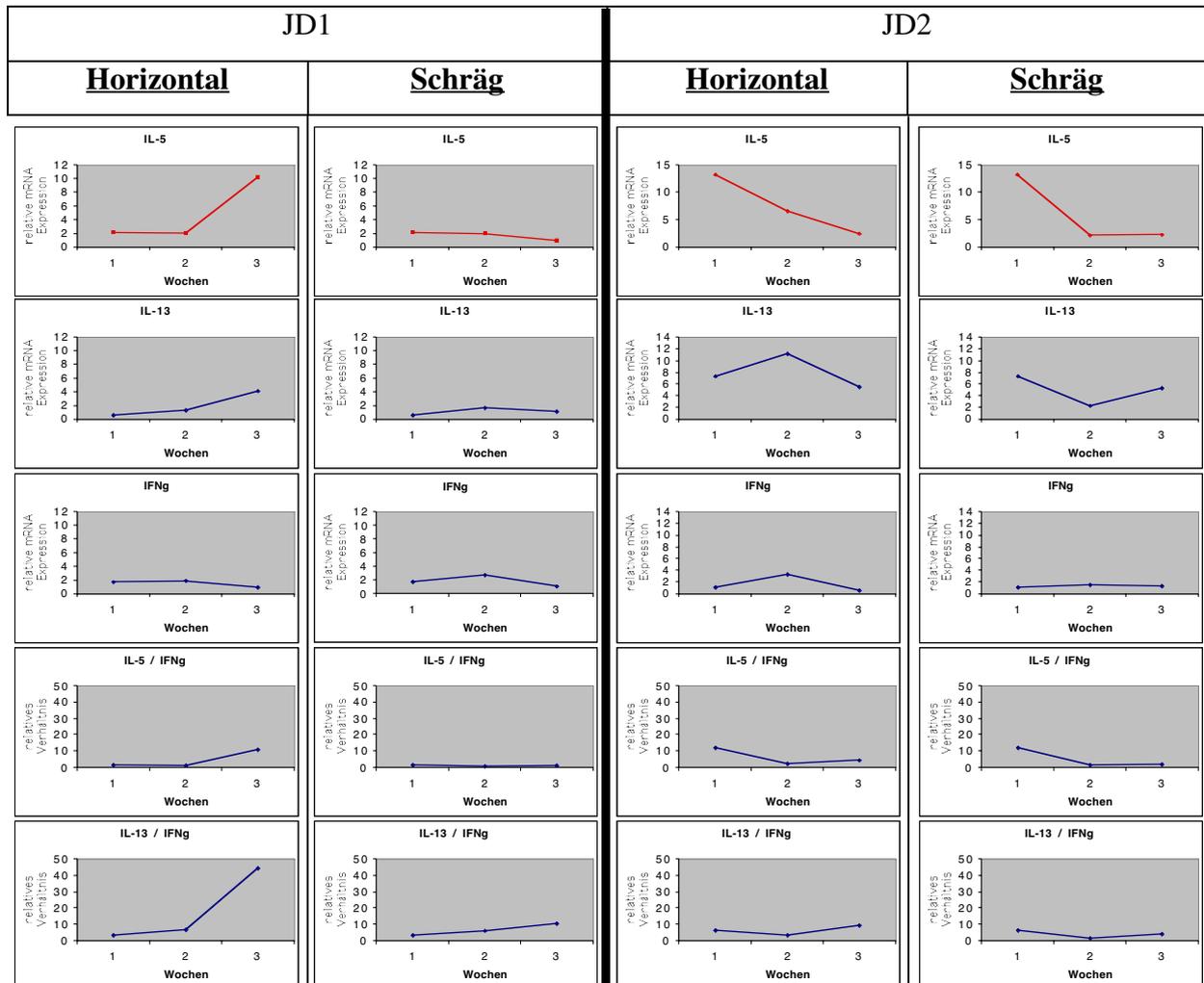


Abb. 31: Die Expression des Th1-spezifischen Zytokins $\text{IFN}\gamma$ und der Th2-spezifischen Zytokine IL-5 und IL-13 im Verlauf der drei Wochen. Außerdem wird die Veränderung des Verhältnisses von Th2- zu Th1-Zellen, basierend auf dem Vergleich der RNA-Expressionen von $\text{IFN}\gamma$ und IL-5 bzw. IL-13, graphisch dargestellt. JD1 und JD2 entsprechen zwei unabhängigen Versuchen.

Wie schon in Abb. 29 gezeigt, nimmt (in Abwesenheit von PHA) in Versuch JD1 die IL-5 Expression nur in den Zellen zu, die horizontal im Inkubator standen. In der gleichen Zellpopulation ist ein ähnlicher Verlauf in der Th2-spezifischen IL-13 Expression zu beobachten. Die Th1-spezifische $\text{IFN}\gamma$ Expression bleibt fast unverändert und nimmt in der dritten Woche minimal ab. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass sich die Anzahl der Th2-Zellen insgesamt und proportional zu Th1-Zellen ($\text{IL-5}/\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-13}/\text{IFN}\gamma$) in dem

JD1/horizontal-Versuch vor allem innerhalb der letzten der drei Wochen erhöht. Dies spiegelt sich auch im erst langsam und dann steiler ansteigenden Verhältnis von IL-5 bzw. IL-13 zu IFN γ wieder.

Bei den schräggestellten Zellen in JD1 ist eine geringe Abnahme der IL-5 Expression festzustellen. Jedoch nehmen IL-13 und IFN γ beide bis zur zweiten Woche erst zu, und in der dritten Woche dann ab. Es ist deshalb in diesem Fall keine eindeutige Aussage über Veränderungen der relativen Mengen an Th2- und Th1-Zellen möglich, da sich die beiden Th2-Zytokine unterschiedlich verhalten. Aber im Vergleich zu den Veränderungen in der Expression von IL-5 und IL-13 in der horizontal-gestellten Zellpopulation, sind die gemessenen Expressionsveränderungen in der schräg-gestellten Zellpopulation sehr gering. Dadurch entstehen auch unterschiedliche Kurven bei der Errechnung des Th2 zu Th1 Verhältnisses anhand von IL-5 zu IFN γ und IL-13 zu IFN γ , deren Steigung deutlich geringer ausfällt als die in der horizontal-gestellten Zellpopulation.

In Versuch JD2 nimmt in allen Zellen die IL-5 Expression im Laufe der drei Wochen ab. Die IL-13 Expression zeigt kein ähnliches Verhaltensmuster, sondern nimmt in der horizontal-gestellten Zellpopulation nach zwei Wochen erst zu und nach drei Wochen wieder ab. In der schräg-gestellten Zellpopulation nimmt die Expression erst ab, und nach drei Wochen dann wieder zu. Die IFN γ Expression steigt in der horizontal-gestellten Zellpopulation bis zur zweiten Woche an, fällt aber dann bis zur dritten Woche wieder ab. In der schräg-gestellten Zellpopulation bleibt die IFN γ Expression fast unverändert. Aus diesen Daten ergibt sich keine klare Tendenz, in wieweit sich die aktivierten Zellen vermehrt in die Th1- oder Th2-phänotypische Richtung entwickelt haben. Anhand der Verhältnisse der Expression von IL-5 zu IFN γ bzw. IL-13 zu IFN γ kann man jedoch ableiten, dass das Th2/Th1 Verhältnis in beiden Zellpopulationen in der zweiten Woche abnimmt und dann in der dritten Woche wieder ein wenig ansteigt.

Diese Daten liefern einen guten Anhaltspunkt dafür, dass die Th2-Zellentwicklung, gemessen an der Zunahme des Th2/Th1-Verhältnisses, innerhalb der dritten Woche der Kultivierung vor allem in JD1 erfolgreich war. Bei der Auswertung der folgenden Daten (Expression mehrerer Transkriptions- bzw. Th2-spezifischer Faktoren) wird weiterhin nur noch auf die Resultate aus Versuch JD1 eingegangen. Im folgenden wird untersucht, wie die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren sich bei zunehmender IL-5 Expression verändert.

4.11.4 Die Expression weiterer Th1-spezifischer (T-bet) und Th2-spezifischer (IL-5, Gata3, c-Maf, JunB) Faktoren

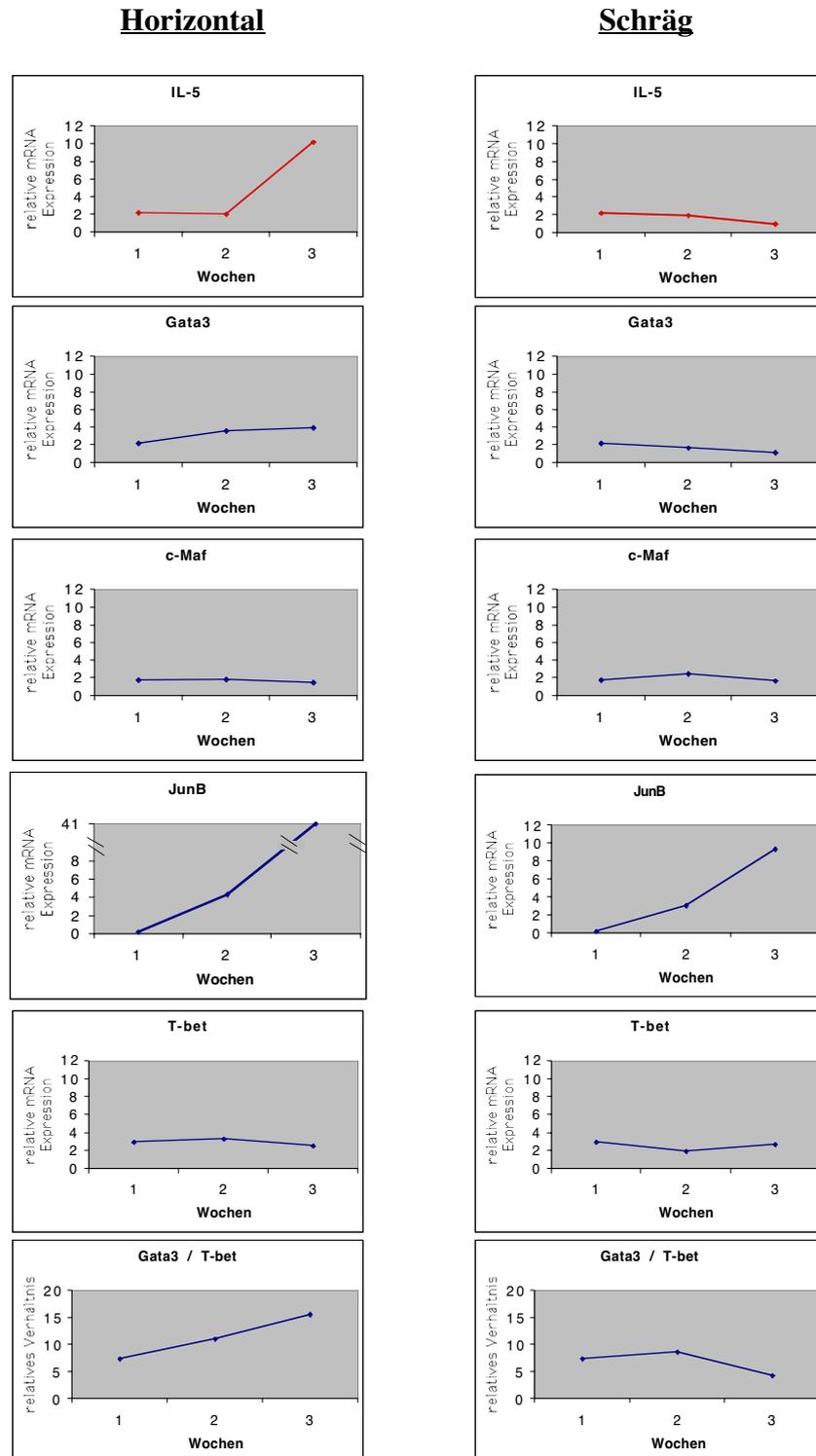


Abb. 32: Die Expression des Th1-spezifischen Faktors T-bet und der Th2-spezifischen Faktoren IL-5, Gata3, c-Maf und JunB im Verlauf der drei Wochen. Außerdem ist das Verhältnis von Gata3 zu T-bet Expression als Hinweis auf das Th2/Th1-Verhältnis dargestellt.

In Abb. 32 wurde die IL-5 Expression in den Zellen von JD1 der Expression weiterer Th1- bzw. Th2-Faktoren gegenübergestellt. Der Th2-spezifische Transkriptionsfaktor Gata3 nimmt parallel zur Zunahme der IL-5 Expression in den horizontal-gestellten Zellen auch zu, und in den schräg-gestellten Zellen wie IL-5 auch ab. Anders verlaufen die Expressionskurven von c-Maf und JunB, zwei weiteren Th2-spezifischen Faktoren. c-Maf zeigt keine eindeutige Zunahme bzw. Abnahme in seiner Expression. JunB nimmt jedoch in allen Zellpopulationen, aber besonders stark in der horizontal-gestellten Zellpopulation, zu. Es ist gezeigt worden, dass sich der mRNA-Level von JunB in Th1- und Th2-Zellen nicht unterscheidet, das JunB-Protein jedoch nur in Th2-Zellen akkumuliert (Flavell et al., 1999). Das heisst, die Zunahme der JunB Expression könnte die Kombination der JunB Expression aus vorhandenen Th1- und Th2-Zellen darstellen. Dass definitiv Th1-Zellen anwesend sind, wurde in Abb. 31 durch die vorhandene IFN γ Expression gezeigt.

Als Gegenspieler von Gata3 wird der Th1-spezifische Faktor T-bet bezeichnet (Szabo et al., 2000). Dessen Expression ist in allen Zellen fast unverändert, nimmt aber in den Zellen (horizontal), in denen IL-5 und Gata3 zunehmen, tendenziell etwas ab. In den Zellen (schräg), in denen IL-5 und Gata3 abnehmen, verhält sich die Expression von T-bet umgekehrt.

Um einen weiteren Hinweis auf die Th2/Th1-Zellverteilung zu bekommen, wurde das Verhältnis von Gata3-produzierenden Zellen (Th2) zu den T-bet-produzierenden Zellen (Th1) dargestellt. In den horizontal-gestellten Zellen zeigt das Gata3/T-bet Verhältnis einen klaren Anstieg, der mit der ansteigenden IL-5 Expression und auch mit den vorher gezeigten Th2/Th1-Verhältnissen (Abb. 31, IL-5/IFN γ bzw. IL-13/IFN γ) korreliert. Ein wenig komplizierter gestaltet sich das Gata3/T-bet Verhältnis in der schräg-gestellten Zellpopulation. Bis zur zweiten Woche ist ein Anstieg zu beobachten. In der dritten Woche ist dann jedoch ein stärkerer Abfall in der Expression zu sehen, der dann auch mit der abnehmenden IL-5 Expression einhergeht.

Es kann vermutet werden, dass durch die dreitägige Stimulierung mit α -CD3 Th1- und Th2-Zellen aktiviert werden, und dass diese Aktivierung sich zunächst fortsetzt, bis die Zellen dann länger ohne α -CD3 im Medium und nur mit IL-4, das nur die Th2-phänotypische Entwicklung begünstigt, inkubiert wurden. Deshalb kann zunächst auch eine Zunahme der Th1-phänotypischen Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Die Resultate deuten darauf hin, dass die Dichte des Zellwachstums einen Einfluss auf die Ausbildung von Th1- bzw. Th2-Zellen gehabt haben könnte. In der horizontal-gestellten Zellpopulation wachsen die Zellen nicht so dicht wie in der schräg-gestellten. In diesem Fall

scheint die Entwicklung der aktivierten T-Zellen zum Th2-Phänotyp bevorzugt bzw. früher stattzufinden als in den dichter gewachsenen Zellen.

4.11.5 Endogene mRNA Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren

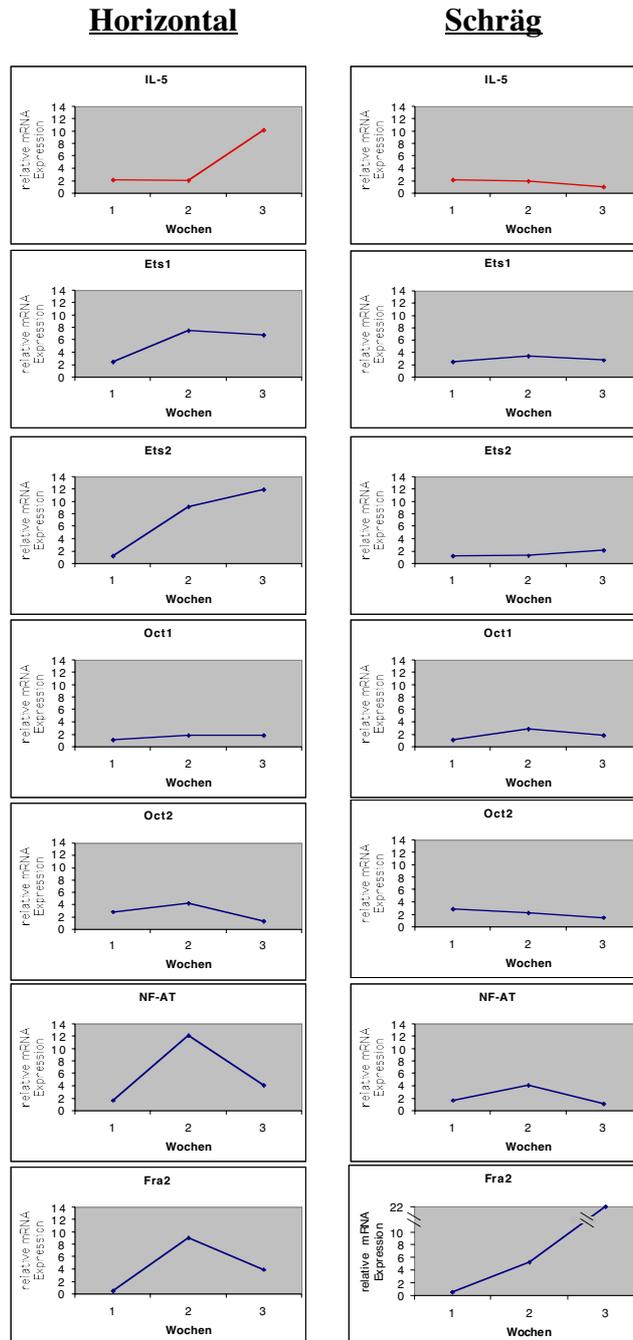


Abb. 33: Die endogene mRNA Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren wurden in der Literatur im Zusammenhang mit der Aktivierung von IL-5 erwähnt.

Um das Expressionsmuster in Zellpopulationen, deren IL-5 Expression über Zeit ansteigt, näher zu untersuchen, wurde die Expression von weiteren Faktoren, die in der Literatur im Zusammenhang mit dem IL-5 Promotor diskutiert werden, untersucht. Dabei wurde die Expression von Ets1, Ets2, Oct1, Oct2, NF-AT, JunB und Fra-2 untersucht. In Abb. 33 sind die Ergebnisse dieser Studien graphisch dargestellt.

Bei kaum ansteigender IL-5-Expression in der horizontal-gestellten Zellpopulation in der zweiten Woche ist bei der Expression aller anderen gemessenen Faktoren ein Anstieg zu beobachten. Erst in der dritten Woche bilden sich Unterschiede aus. Mit der ansteigenden IL-5 Expression steigt als einzige auch die Expression von Ets2 an. Die Expression von Ets1 und Oct1 bleibt in diesem Zeitraum fast unverändert, und die Expression von Oct2, NF-AT und Fra2 nimmt deutlich ab. In der schräg-gestellten Zellpopulation bleibt die IL-5 Expression fast unverändert, mit einer sehr leicht abnehmenden Tendenz. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt nur Oct2. Die Expression von Ets1, Ets2 und Oct1 steigt kaum merkbar an. NF-AT zeigt in der zweiten Woche eine Zunahme in der Expression, die in der dritten Woche jedoch wieder abfällt. Als einzige steigt die Fra2 Expression sehr stark an.

Interessanterweise steigt die Ets1 Expression in beiden Fällen, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt, nach zwei Wochen an, und fällt dann auch in beiden Fällen nach drei Wochen wieder ab. Die Ets2 Expression nimmt in beiden Fällen im Laufe der drei Wochen zu. Ein gravierender Unterschied zu der schräg-gestellten Zellpopulation ist der steile Anstieg der Ets2-Expression in der horizontal-gestellten Zellpopulation, wo auch die IL-5-Expression sehr stark zunimmt.

Die Expression von Oct1 steigt sowohl in der horizontal-gestellten Zellpopulation von Versuch JD1 als auch in der schräg-gestellten Zellpopulation während der drei Wochen kaum an. Oct2 nimmt in seiner Expression in beiden Zellpopulationen während der drei Wochen ab. Die Expression von NF-AT verhält sich in allen Zellen tendenziell gleich, die Unterschiede sind in der horizontal-gestellten Zellpopulation jedoch ausgeprägter. Nach zwei Wochen steigt die Expression an, um dann in der dritten Woche wieder abzunehmen.

Die Expression des AP1 Faktors Fra2 steigt in der schräg-gestellten Zellpopulation stark an. Auch in der horizontal-gestellten Zellpopulation steigt sie erst an, nimmt aber nach drei Wochen wieder ab.

Insgesamt kann beobachtet werden, dass einzig die Expression von Ets2 in den drei Wochen mit dem Anstieg der IL-5 Expression korreliert. Dass die Expression von IL-5 und Ets2 in derselben Zellpopulation zunimmt, könnte für eine mögliche Beteiligung von Ets2 bei der Aktivierung des IL-5 Promotors sprechen.

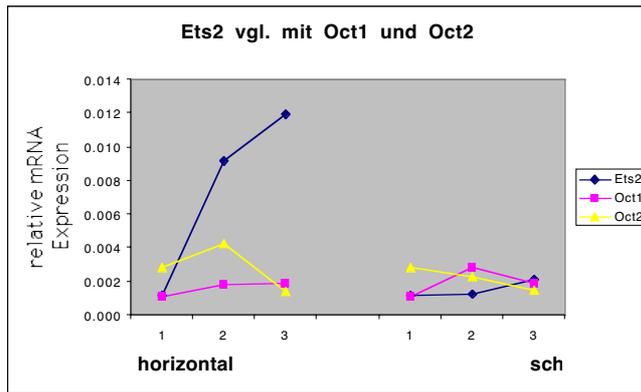


Abb. 34: Die absoluten mRNA-Werte der Faktoren Ets2, Oct1 und Oct2 im Vergleich. Der Verlauf der Expression dieser Faktoren ist für die horizontal-gestellte und die schräg-gestellte Zellpopulation von JD1 dargestellt.

Auch wenn man die absoluten mRNA-Werte von Ets2, Oct1 und Oct2 in beiden Zellpopulationen vergleicht (Abb. 34), fällt auf, dass nur die Expression von Ets2 signifikant ansteigt.

4.11.6 Der Effekt von PHA auf die Expression von Th1- und Th2- spezifischen Genen

An den verschiedenen Zeitpunkten kann die endogene mRNA Expression von IL-5 zusätzlich durch Stimulierung der Zellen mit PHA erhöht werden. Für diesen Fall der IL-5 Aktivierung sollte untersucht werden, ob gleichzeitig auch die Expression von Th1- und Th2-spezifischen Faktoren durch Stimulierung mit PHA erhöht werden kann. Deshalb wurde die Expression von den Th2-spezifischen Genen Gata3, IL-13, c-Maf und JunB gemessen. In Versuch JD1, dessen Resultate in Abb. 35 dargestellt sind, ist die Expression nach PHA-Stimulierung nur nach ein bzw. drei Wochen angegeben. Es gab Probleme bei der Messung der mRNA nach PHA-Stimulierung nach zwei Wochen. Deshalb wurden diese Messdaten weggelassen.

An den Punkten, wo die IL-5 Expression am stärksten durch PHA ansteigt, kann außer in der dritten Woche in den horizontal-gestellten Zellen auch eine erhöhte IL-13 Expression gemessen werden. Der einzige andere Wert der Th2-spezifischen Gene, der gleichzeitig mit dem IL-5 Anstieg auch erhöht wird, ist JunB in den schräg-gestellten Zellen nach drei Wochen. Auffällig ist, dass die Expression der gemessenen Th1-spezifischen Faktoren zu jedem Zeitpunkt und unter beiden Bedingungen erhöht wird. Diese Beobachtung macht es unmöglich, etwaige Zunahmen oder Abnahmen der anderen Transkriptionsfaktoren durch die Stimulierung der Zellen mit PHA einer Th1- oder Th2-spezifischen und dadurch auch IL-5 relevanten Expression zuzuordnen.

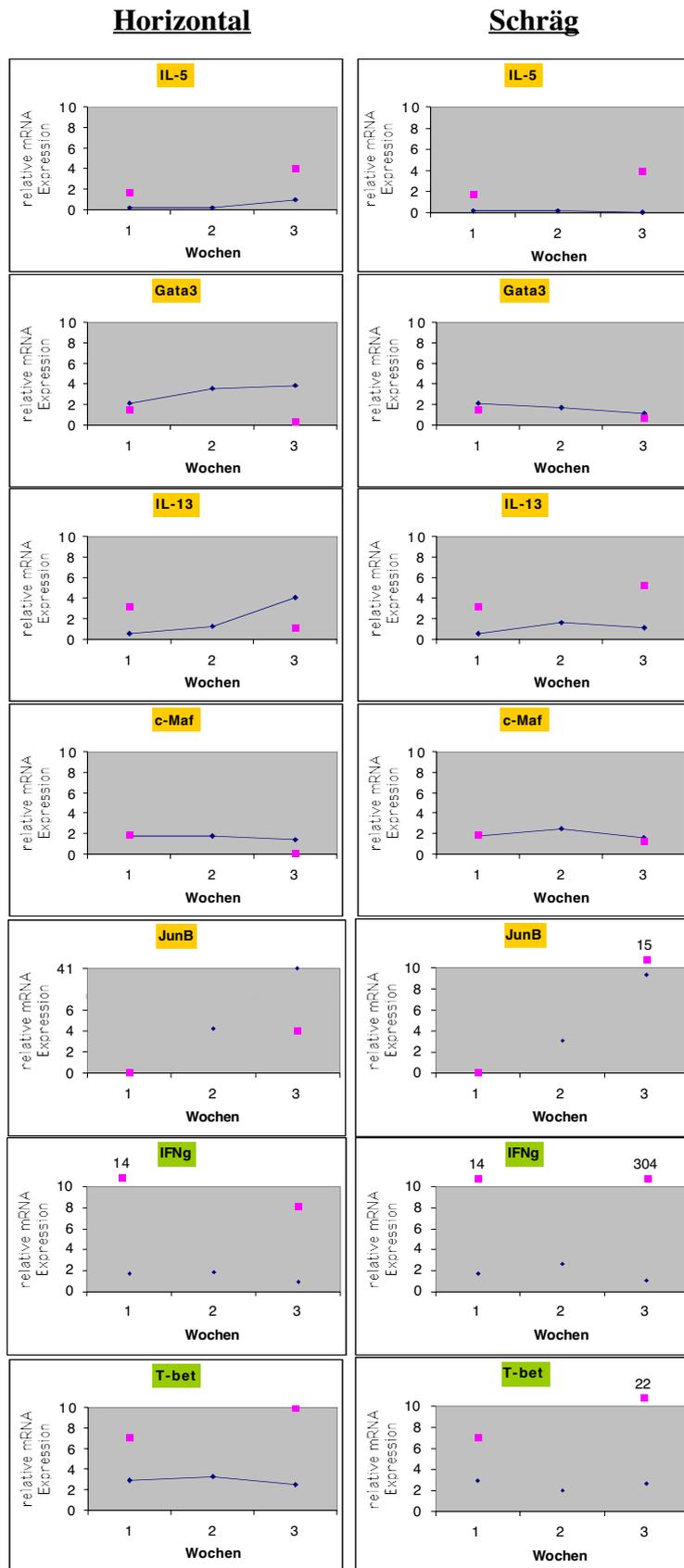


Abb. 35: Die endogene mRNA Expression der verschiedenen Faktoren mit und ohne PHA-Stimulierung. Die Zellen wurden nach ein, zwei und drei Wochen jeweils fünf Stunden lang mit PHA stimuliert. Die mRNA Expression wurde vor und nach der Stimulierung gemessen. In orange sind die Th2-spezifischen Faktoren und in grün die Th1-spezifischen Faktoren gekennzeichnet.

5 Diskussion

Der humane IL-5 Promotor ist durch verschiedene Transkriptionsfaktoren regulierbar. Er enthält mindestens zwei essentielle regulatorische Elemente, die Gata-Bindungsstelle und das Cle0-Element. Cle0 enthält Bindungsstellen für Ets-Proteine und AP1-Proteine. Eines der Gata-Proteine, die potentiell an die Gata-Bindungsstelle binden können, ist das T-Zell-spezifische Protein Gata3. Abbildung 36 soll einen Überblick über das Fragment des humanen IL-5 Promotors, welches die Gata-Bindungsstelle und das Cle0-Element enthält, geben. Aufgeführt sind die potentiellen Bindungsstellen, die Faktoren, deren Bindung gezeigt werden konnte, und die Faktoren, die den Promotor aktivieren können.

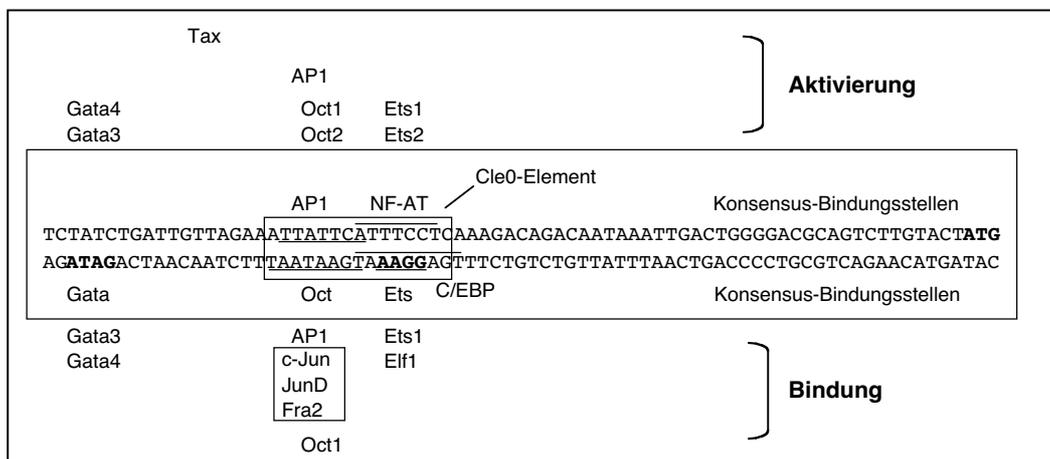


Abb. 36: Fragment (-74+3) des humanen IL-5 Promotors. Markiert sind die Konsensus-Bindungsstellen, Faktoren, die an der Aktivierung des Promotors beteiligt sind, und Faktoren, die an den Promotor binden können.

5.1 IL-5 ist durch Ets-Proteine aktivierbar

Meine Vorarbeiten zeigten, dass der humane IL-5 Promotor auch von Ets1 aktiviert werden kann (Blumenthal, 1998; Blumenthal et al., 1999). Hier wird nun zum ersten Mal gezeigt, dass Ets2 den IL-5 Promotor auch und sogar stärker als Ets1 aktivieren kann. Vermutlich wirken diese beiden Ets-Proteine über eine Bindung an die Ets-Bindungsstelle im Cle0-Element des Promotors. Diese These wird dadurch unterstützt, dass gezeigt werden konnte, dass ein IL-5 Promotorfragment, das die Ets-Bindungsstelle im Cle0 Element als einzige Ets-

Bindungsstelle enthielt (siehe Abb.12), auch durch Ets1 und Ets2 aktivierbar ist. Außerdem kann Ets1 an diese Ets-Bindungsstelle binden (Abb. 18B).

Ferner konnte diese Vermutung durch eine Mutationsanalyse bestätigt werden. Eine Mutation in der Ets-Bindungsstelle im Cle0-Element inhibiert die Aktivierung des IL-5 Promotors durch Ets1. Die Kotransfektion mit Tax hat wie erwartet auch keine Aktivierung des mutierten Promotors zur Folge, da Tax seine transaktivierende Wirkung auf den Promotor durch die Interaktion mit Ets1 ausüben kann. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transaktivierung durch Tax Ets-abhängig ist, und dass deshalb auch in diesem Fall die Bindung von einem Ets-Protein an die Ets-Bindungsstelle im Cle0-Element für die Aktivierung des IL-5 Promotors notwendig ist.

5.2 Gata3 und Ets-Proteine kooperieren bei der Aktivierung des IL-5 Promotors

Ein weiterer Faktor, für den gezeigt werden konnte, dass er für die Aktivierung des humanen IL-5 Promotors essentiell ist, ist der in aktivierten T-Zellen selektiv exprimierte Transkriptionsfaktor Gata3 (Zhang et al., 1997). Hingegen ist dieser Faktor nicht in der Lage, den IL-4 Promotor zu aktivieren, wodurch sich die unterschiedlich regulierte Expression dieser beiden Zytokine in Th2-Zellen erklären lassen könnte (Zhang et al., 1998). Durch Versuche in Kasumi-Zellen konnte gezeigt werden, dass Ets1 und Ets2, jedoch nicht Elf1, mit koexprimiertem Gata3 kooperieren können, um den humanen IL-5 Promotor in mit PMA stimulierten T-Zelllinien synergistisch zu aktivieren. Außerdem konnte beobachtet werden, dass Ionomycin oder kotransfiziertes Tax diesen synergistischen Effekt von Ets1/2 und Gata3 zusätzlich verstärken.

Diese Aktivierung des Promotors durch Ets1/2 und Gata3 konnte auch in Jurkat- und HSB-2 Zellen beobachtet werden. Da Jurkat-Zellen endogenes Ets1 exprimieren, ist es möglich, dass deshalb auch ohne Überexpression von Ets1 die Aktivierung des Promotors durch Gata3 nach Stimulierung der Zellen mit PMA plus Ionomycin zu erkennen ist. Es wurde gezeigt, dass Jurkat-Zellen auch endogen Ets2 exprimieren, welches zusätzlich zu der Gata3-vermittelten Aktivierung des Promotors beitragen könnte. Da beispielsweise Ets1 in Kasumi-Zellen nicht exprimiert wird, ist auch eine Aktivierung des Promotors durch Überexpression von Gata3 alleine nicht zu erwarten. Die beobachtete Aktivierung des Promotors durch Gata3 in HSB-2-

Zellen könnte auf die endogene Expression bestimmter Ets-Faktoren schließen lassen. Im umgekehrten Fall, bei der Überexpression von Ets1 bzw. Ets2, ist nur in den Zelllinien mit Gata3 Expression eine Aktivierung des Promotors zu beobachten. Die Unterschiede in der Basalaktivität des IL-5 Promotors in den beiden Zelllinien (Jurkat und HSB-2) könnten auch auf die unterschiedlich hohen endogenen Mengen an Ets1/2 bzw. Gata3 zurückzuführen sein. Diese höhere basale Aktivierung könnte auch die Erklärung dafür sein, dass es in Jurkat- und HSB-2-Zellen durch Überexpression von Ets1/2 und Gata3 zu einer additiven und keiner synergistischen Aktivierung des Promotors kommt.

Interessanterweise konnte in IL-5 produzierenden humanen ATL-16T-Zellen gezeigt werden, dass in diesen Zellen nur Gata4 den IL-5 Promotor aktivieren kann (Yamagata et al., 1995). Auch in diesen Zellen wurde eine synergistische Transaktivierung von Tax, Gata4 und AP1 beobachtet (Yamagata et al., 1997).

5.3 Tax unterstützt die Aktivierung des IL-5 Promotors

In dieser Arbeit konnte eine Kooperation zwischen Ets2 und Tax gezeigt werden, wie sie bisher nur für Ets1 und Tax beobachtet werden konnte (Dittmer et al., 1993; Dittmer et al., 1997). Interessanterweise ist die funktionelle Interaktion von Tax mit Ets2 sogar stärker als die mit Ets1. Möglicherweise kann Ets2 effektiver an die Cle0-Ets-Bindungsstelle binden und auch effektiver mit Tax interagieren bzw. kooperieren. Es ist gezeigt worden, dass Tax direkt an Ets1 binden kann. Auch scheint Tax den proteolytischen Abbau von Ets1 zu unterbinden (Blumenthal et al., 1999). Die Proteolyse ist möglicherweise Folge einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylierung der Exon VII-Domäne. Eine Phosphorylierung der Exon VII Domäne führt auch zu einer Abnahme der Bindungsaktivität von Ets1 (Rabault and Ghysdael, 1994).

Zudem gibt es Hinweise, dass Tax die Bindungsaktivität von Ets1 erhöht (Dr. Jürgen Dittmer, persönliche Mitteilung). Ets1 besitzt ein inhibitorisches Modul, dass durch Interaktion mit anderen Proteinen, wie AML1, aufgehoben werden kann (Kim et al., 1999). Möglicherweise ist Tax in der Lage, mit den inhibitorischen Domänen von Ets1 so zu interagieren, dass die Autoinhibition von Ets1 aufgehoben wird. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Tax auch mit Ets2 interagiert und wie es die Ets2-Aktivität moduliert. Tax könnte zudem die Kooperation von Ets1 bzw. Ets2 mit anderen Faktoren fördern.

5.4 *Elf1* kann den *IL-5* Promotor nicht aktivieren

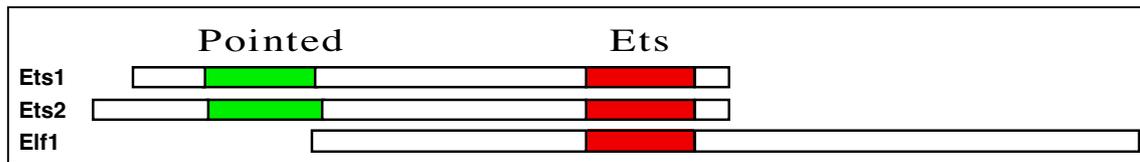


Abb. 37: Die Strukturen von Ets1, Ets2 und Elf1 mit den Pointed- und Ets-Domänen. Siehe auch Abb. 6.

Ein weiteres Ets-Protein, Elf1, das auch endogen in Jurkat-Zellen exprimiert wird, unterscheidet sich in seiner Struktur jedoch wesentlich von Ets1 und Ets2, die sich strukturell sehr ähnlich sind (Abb. 37, siehe auch Abb. 6). Elf1 ist zwar auch in der Lage, an die Ets-Bindungsstelle im Cle0-Element zu binden, kann aber den Promotor nicht aktivieren. Aus dieser Beobachtung kann man schliessen, dass die Beteiligung eines Ets-Proteins an der Aktivierung des Promotors spezifisch ist, und nicht von jedem Ets-Protein übernommen werden kann. Hervorzuheben ist, dass Elf1 keine Pointed Domäne besitzt, die vermutlich für viele Protein-Protein Interaktionen wichtig ist (Graves and Petersen, 1998). Transfektionsversuche mit einer Mutante von Ets1, der die Pointed Domäne fehlt, lassen vermuten, dass diese Domäne essentiell für die Ets1/Tax-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors ist. In Anwesenheit dieser Mutante wurde die Aktivität des Promotors auf einen basalen Level reduziert.

Obwohl bekannt ist, dass Elf1 zusammen mit AP1 den IL-3 Promotor (Gottschalk et al., 1993) und mit Stat5, HMG-I(Y) und Gata-Proteinen den humanen IL-2 Rezeptor alpha Promotor aktivieren kann (John et al., 1996), konnte Elf1 in Jurkat-Zellen den IL-5 Promotor nicht aktivieren. Auch war Elf1 in Kasumi-Zellen nicht in der Lage, mit Gata3 zu kooperieren, um den IL-5 Promotor zu aktivieren. In Jurkat-Zellen konnte Elf1 unter PMA/Tax-Bedingungen sogar die Ets2-vermittelte Aktivierung des Promotors in An- und Abwesenheit von überexprimiertem Gata3 unterdrücken. Diese Daten deuten daraufhin, dass Elf1 in Anwesenheit von Tax einen Gegenspieler zu Ets2 darstellt, der gezielt die Ets2-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors inhibieren kann. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass Elf1 auch den Cle0-regulierten GM-CSF Promotor nicht aktivieren kann (Thomas et al., 1995). Das könnte bedeuten, dass Elf1 als Repressor bei der Cle0-abhängigen Transkription fungiert, indem er zum Beispiel mit stimulierenden Faktoren wie Ets1 und Ets2 um die Bindungsstelle im Cle0-Element kompetitiert. Das könnte auch die Erklärung dafür

sein, dass Elf1 die Aktivierung des IL-5 Promotors durch Tax, welche Cle0-abhängig ist, inhibiert hat. Es ist gezeigt worden, dass der IL-5 Promotor durch einen an das Cle0-Element konstitutiv bindenden Faktor negativ und durch einen auch an das Cle0-Element aber induzierbar bindenden Faktor positiv reguliert werden kann, siehe auch Abb. 38 (Mori et al., 1999). Man könnte postulieren, dass die Elf1-Bindung diese negativ regulierende Wirkung hat, die dann durch die induzierbare Bindung eines anderen Ets-Faktors, beispielsweise Ets2, aufgehoben wird und zu einer positiven Regulation des Promotors führt.

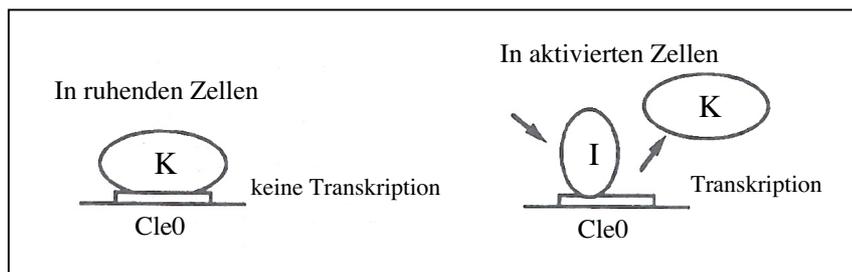


Abb. 38: Modellvorschlag für die Bindung induzierbarer und konstitutiver Faktoren. Die Bindung des konstitutiven Faktors (K) inhibiert die Transkription, wohingegen die Bindung des induzierbaren Faktors (I) an das Cle0-Element die Transkription fördert. (nach Mori et al., 1999)

Einen weiteren Hinweis für dieses Modell lieferten EMSAs. An die Sonde, die nur das Cle0-Element enthält, bindet ein neuer Komplex in den mit PMA plus Ionomycin-stimulierten HSB-2-Zellen, der in den Kontrollzellen nicht zu sehen ist. In einem Aufreinigungsversuch mit Hilfe eines Anionenaustauschers ergaben die untersuchten Fraktionen eine interessante Parallele. In den Fraktionen, die im EMSA diese zusätzliche Bande enthielten, konnte im Westernblot die Expression von Elf1 bzw. vermeintlichen Elf1-Abbauprodukten nachgewiesen werden. Es könnte also sein, dass der zusätzliche Komplex in den stimulierten Zellen aus einem Elf1-Degradationsprodukt besteht. Aufgrund der Struktur von Elf1 ist es durchaus möglich, dass dieses postulierte Degradationsprodukt die DNA-bindende Domäne und die Sequenz, die vom Antikörper erkannt wird, enthält. Die Beobachtung dieses zusätzlichen Komplexes in den stimulierten Zellen unterstützt die These, dass Elf1 in Kontrollzellen konstitutiv an den Promotor binden kann, und in aktivierten Zellen degradiert wird, um so die Möglichkeit der induzierbaren Bindung eines anderen Faktors, wie Ets2, zu schaffen.

5.5 Stimulierung mit PMA und Ionomycin ist Voraussetzung für die Aktivierbarkeit des IL-5-Promotors

In vivo wird IL-5 nicht konstitutiv exprimiert, stattdessen wird die Expression durch die Auswirkungen verschiedener externer Stimuli, die zu einer Aktivierung der T-Zellen und der Ausbildung des Th2-Phänotyps führen, induziert. In den induzierbar IL-5-produzierenden HSB-2-Zellen kann dieser Effekt durch die Stimulierung der Zellen mit PMA und Ionomycin hervorgerufen werden (Abb. 23A). PMA aktiviert Protein Kinase C, und Ionomycin verursacht einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration, beides Signalwege, die sonst durch die Stimulierung des T-Zellrezeptors und eines weiteren Signals aktiviert werden (Crabtree, 1989).

Es konnte gezeigt werden, dass PMA für die Aktivierung des IL-5 Promotors absolut essentiell ist (Blumenthal, 1998). Es wird benötigt, um über die Aktivierung der PKCs AP1-Proteine an die Cle0-Stelle zu rekrutieren. In Jurkat-Zellen, zum Beispiel, ist PMA in der Lage, die mRNA Mengen von *c-jun* und *c-fos* zu erhöhen, worauf eine Akkumulierung von c-Fos und c-Jun Proteinen folgt (Kvanta et al., 1992; Makover et al., 1991). Außerdem wurde für den GM-CSF Promotor in Jurkat-Zellen gezeigt, dass die Überexpression von c-Fos und c-Jun eine PMA-Stimulierung der Zellen für die Cle0-vermittelte Ets1-Aktivierung überflüssig machte (Thomas et al., 1997). Daraus lässt sich schließen, dass PMA in Jurkat-Zellen die Aktivierung von AP1-Proteinen veranlassen kann, die ihre Wirkung dann über das Cle0-Element ausüben können. Weiterhin ist bekannt, dass Ets1 und Ets2 beide mit AP1 kooperieren können, um eine Reihe von Promotoren zu aktivieren und PMA-abhängige Aktivierung zu vermitteln (Bassuk and Leiden, 1995; Bergelson and Daniel, 1994; Logan et al., 1996; Majerus et al., 1992; Thomas et al., 1997; Wasylyk et al., 1990).

Auch Tax könnte an der Aktivierung von AP1 beteiligt sein, da es in der Lage ist, die *c-fos* und *c-jun* Expression hochzuregulieren (Alexandre and Verrier, 1991; Fujii et al., 2000; Makover et al., 1991), und die AP1 Bindungsaktivität zu erhöhen (Armstrong et al., 1993; Baranger et al., 1995; Iwai et al., 2001). So wäre es möglich, dass Tax durch die Interaktion mit Ets1/2 und AP1 die Bindungsaktivität dieses Komplexes an die Cle0 Region so erhöht, dass andere inhibitorische Faktoren dort nicht an die DNA binden können.

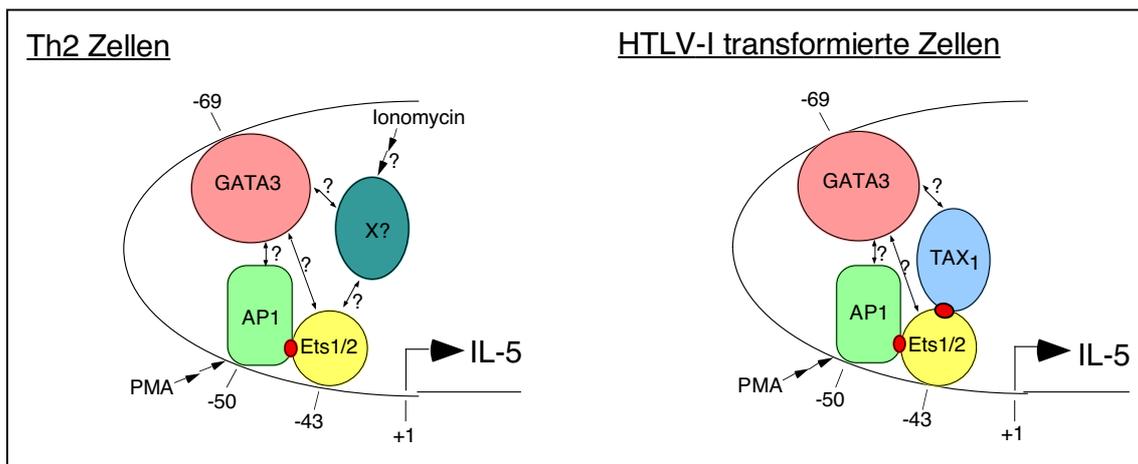


Abb. 39: Modell des vermuteten Mechanismus, über den Tax bzw. Ionomycin an der Aktivierung des IL-5 Promotors beteiligt sind. Durch die Interaktion von Tax bzw. Ionomycin mit Ets1/2 und Gata3 könnte der kooperative Effekt von Ets1 und Gata3 bzw. Ets2 und Gata3 verstärkt werden. Ets1 und Ets2 können mit AP1 und Tax interagieren (kleine Kreise). Mögliche Interaktionen zwischen den verschiedenen Faktoren sind durch doppelseitige Pfeile gekennzeichnet. X könnte ein Faktor sein, der durch die Stimulierung der Zellen mit Ionomycin aktiviert wird und möglicherweise so an der Aktivierung des Promotors beteiligt ist.

Eine zusätzliche Stimulierung mit Ionomycin hatte eine erhöhte Aktivität des Promotors, gemessen an der Luciferase-Aktivität, zur Folge. Ionomycin als Ionophor verursacht eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, welche zu einer Phosphorylierung von Ets1 und auch Ets2 führen kann (Patton et al., 1998; Rabault and Ghysdael, 1994). Da diese Phosphorylierung zu einer Abnahme der DNA-Bindungsaktivität von Ets1 führt (Rabault and Ghysdael, 1994), scheint die erhöhte Promotor-Aktivität in Gegenwart von Ionomycin zunächst widersprüchlich. Man kann sich jedoch vorstellen, dass nach Ionomycin-Stimulation, vergleichbar mit dem Tax-Mechanismus, einen Faktor (wie z.B. NF- κ B bei GM-CSF Promotor) rekrutiert wird, der ähnliche Funktionen wie Tax ausüben kann und für die Ets1 bzw. Ets2 Aktivität notwendig ist. Andererseits könnte Ionomycin die Ets-abhängige Aktivierung des IL-5 Promotors durch die Aktivierung von Ras stimuliert haben (Farnsworth et al., 1995). Es ist bekannt, dass Ras-abhängige Signale Ets1 und Ets2 super-aktivieren (Graves et al., 1998) und die Transkription über AP1/Ets Elemente induzieren können (Patton et al., 1998; Wasyluk and Nordheim, 1997; Yang et al., 1996).

Interessanterweise unterschied sich im EMSA mit der Sonde, die die Gata-Bindungsstelle und das Cle0-Element enthielt, das Bandenmuster der mit PMA plus Ionomycin stimulierten HSB-2-Zellen von dem der Kontrollzellen (DMSO). Ein größerer Komplex, der sich in den Extrakten der Kontrollzellen ausgebildet hat, ist in den Extrakten der stimulierten Zellen nicht

wiederzufinden. Eine Erklärung wäre, dass durch die Stimulierung mit PMA und Ionomycin ein zusätzlicher Faktor rekrutiert wird, der die Bildung dieses Komplexes verhindert. Es wäre entweder möglich, dass er selbst mit höherer Bindungsaffinität an die DNA bindet und den ursprünglichen Faktor verdrängt, oder dass er an den Komplex bindet und dadurch dessen Bindungsaktivität senkt. Andererseits wäre es auch denkbar, dass eines oder mehrere der Proteine in diesem Komplex durch die Stimulierung in irgendeiner Art modifiziert werden, z.B. phosphoryliert, und dadurch an Bindungsaktivität verlieren, oder der Komplex destabilisiert wird. In den stimulierten Zellen entstehen zwei neue Komplexe, die sich möglicherweise aus Proteinen aus dem ursprünglichen Komplex zusammensetzen.

5.6 Expression verschiedener Faktoren in IL-5-produzierenden HSB-2 und aktivierten primären T-Zellen

In aktivierten HSB-2-Zellen wurde untersucht, ob Faktoren, die zur Aktivierung des IL-5 Promotors beitragen könnten, auch in ihrer mRNA Expression erhöht sind. Gata3 wird in verstärktem Maße in IL-5 produzierenden Zellen exprimiert, was die Möglichkeit einer Beteiligung von Gata3 an der Aktivierung des IL-5 Promotors plausibel erscheinen lässt. Interessanterweise bleibt die Ets2-Expression in den IL-5 produzierenden HSB-2-Zellen unverändert, nimmt jedoch in stimulierten, nicht IL-5 produzierenden Jurkat-Zellen ab. Dieser Unterschied könnte im Zusammenhang mit der IL-5-Expression gesehen werden, besonders da bekannt ist, dass PMA nicht zu einer Erhöhung der Ets2-mRNA führt, sondern zu einer Akkumulierung des Ets2-Proteins (Fujiwara et al., 1988). Das heisst, in den Zellen, die IL-5 produzieren, bleibt die Menge an IL-5 mRNA konstant und es nimmt nur die Proteinmenge durch Akkumulation zu. Und in den Zellen, die kein IL-5 produzieren, wird die mRNA zum Teil destabilisiert bzw. gar nicht erst synthetisiert.

Die AP1-Komponente Fra2 wurde, wie vorher schon für AP1 Faktoren allgemein erwähnt, durch PMA/Ionomycin Stimulierung in seiner mRNA-Expression induziert, was ein Zeichen dafür sein könnte, dass dieser Faktor an der Aktivierung des IL-5 Promotors beteiligt sein könnte. Die mRNA Expression einer anderen AP1-Komponente, JunB, blieb unverändert, aber in diesem Fall ist gezeigt worden, dass JunB auf Proteinebene reguliert wird (Flavell et al., 1999).

Die Expression des konstitutiv aktiven Transkriptionsfaktors Oct1 wird in aktivierten HSB-2-Zellen reduziert, wohingegen die Expression des induzierbar aktiven Oct2 ansteigt. Eine Gruppe hat in ihrer IL-5 produzierenden Zelllinie PER-117 zeigen können, dass Oct1 und Oct2 an das Cle0-Element des IL-5 Promotors binden können und somit an der Regulation beteiligt sind. In diesem Fall lag für Oct1 eine konstitutive Bindung vor, wobei Oct2 zusammen mit AP1 induzierbar eine Bindung mit der DNA eingehen konnte (Thomas et al., 1999). Es wurde allerdings auch festgestellt, dass die Bindung von Oct2 an das Cle0-Element für die Transkription von IL-5 nicht notwendig ist (Schwenger et al., 2001). Andererseits ist in einem DNase I Footprint auch eine weitere Oct-Bindungsstelle identifiziert worden, die weiter "upstream" liegt (Cousins et al., 2000).

In den aktivierten HSB-2-Zellen nimmt bei erhöhter IL-5 Expression die NF-AT Expression ab, was folgendermaßen erklärt werden könnte: Es ist gezeigt worden, dass NF-AT zusammen mit einem weiteren Faktor, YY1, in der Lage ist, die IL-5 Expression zu unterdrücken (Schwenger et al., 1999). In NF-AT^{-/-} Mäusen wurden erhöhte IL-5 Mengen gemessen (Viola et al., 1998).

Anders als in den HSB-2-Zellen ist in primären T-Zellen eine starke Zunahme der Expression des Transkriptionsfaktors Ets2 zu beobachten. Dieser wurde als einziger der von mir untersuchten Faktoren in der Zellpopulation, in der die Expression von IL-5 anstieg, in seiner Expression erhöht. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen, die in den humanen Zelllinien mit dem IL-5 Reportergenkonstrukt in transienten Transfektionen erzielt wurden. Diese zeigten, dass Ets2 in der Lage ist, den IL-5 Promotor am stärksten zu aktivieren. Dass die Ets2-Expression am höchsten ist in den Zellen, die auch die höchste IL-5 Expression zeigen, legt die Möglichkeit einer Beteiligung von Ets2 an der Aktivierung des IL-5 Promotors in primären T-Zellen nahe. Man kann spekulieren, dass die mRNA Expression von Ets2 unter den gleichen Bedingungen stimuliert wird wie die von IL-5. Dieser Fall lässt eine Beteiligung von Ets2 an der Aktivierung des IL-5 Promotors als wahrscheinlich erscheinen.

Als weitere Faktoren, die an der Aktivierung des Promotors beteiligt sein könnten, wurden Oct1 und Oct2 untersucht. Für den murinen IL-5 Promotor konnte die Bindung von Oct1 und Oct2 als Faktoren, die auch an der positiven Regulation des Promotors beteiligt sind, gezeigt werden (Salerno et al., 2001). Auch in einer humanen IL-5 produzierenden Zelllinie PER-117 wurde die Aktivierung des IL-5 Promotors durch Oct1 und Oct2 beobachtet (Thomas et al., 1999). In den hier untersuchten aktivierten primären humanen T-Zellen konnte jedoch in den IL-5 produzierenden Zellpopulationen keine signifikante Erhöhung der Oct1 oder Oct2

Expression im Vergleich zu der in den weniger IL-5 produzierenden Zellpopulationen gemessen werden. Das könnte darauf hindeuten, dass die Expression dieser Faktoren für die Aktivierung des IL-5 Promotors nicht unbedingt entscheidend ist.

5.7 Der IL-5 Promotor im Vergleich zum GM-CSF Promotor

Der Promotor des humanen GM-CSF Gens zeigt viele Ähnlichkeiten zum humanen IL-5 Promotor mit dem Unterschied, dass der GM-CSF-Promotor keine Gata3-Bindungsstelle besitzt. Stattdessen wird der GM-CSF Promotor in aktivierten T-Zellen von dem induzierbaren Faktor NF- κ B aktiviert (Thomas et al., 1997), für den der humane IL-5 Promotors keine Bindungsstelle enthält.

Die Sequenzen der Cle0-Elemente dieser beiden Promotoren unterscheiden sich in einer Base. Die Regulation von GM-CSF und IL-5 durch diese Elemente ist daher sehr ähnlich. Es konnte gezeigt werden, dass die intakten Ets- und AP1-Bindungsstellen im Cle0-Element des GM-CSF Promotors für die Aktivierung notwendig sind (Wang et al., 1994), und der GM-CSF Promotor durch Ets1 (jedoch nicht durch Elf1) und AP1 unter PMA/Ionomycin Bedingungen aktiviert werden kann (Thomas et al., 1995). Außerdem lässt sich der GM-CSF Promotor auch durch Tax transaktivieren (Nimer et al., 1989).

Diese Parallelen lassen eine ähnliche Regulation vermuten, die jedoch durch die Aktivierung der Promotor, im Fall von GM-CSF durch NF- κ B und im Fall von IL-5 durch Gata3 wiederum sehr spezifisch gesteuert werden kann.

5.8 Der murine IL-5-Promotor im Vergleich zum humanen IL-5-Promotor

Bei Untersuchungen des murinen IL-5 Promotors konnten mehrere Regionen im Promotor identifiziert werden, die durch Bindung von verschiedenen konstitutiv oder induzierbar aktiven Faktoren die Transkription des IL-5 Gens regulieren können (Lee et al., 1995; Schwenger et al., 1998; Stranick et al., 1998). Die Regulation durch diese Faktoren weist einige Ähnlichkeiten zu der Regulation des humanen Promotors auf. Zum Beispiel enthält der murine Promotor auch ein Cle0-Element, an das die Bindung der AP1-Proteine c-Fos und

JunB ausschlaggebend für die Aktivierung des Promotors ist (Karlen et al., 1996). In Transfektionsexperimenten (Siegel et al., 1995) und mit Hilfe einer dominant negativen Form von Gata3 (Zhang et al., 1999) konnte gezeigt werden, dass Gata3 essentiell für die Aktivierung des Promotors ist. Außerdem wurden jedoch noch weitere regulatorische Elemente gefunden, deren Funktionen weiterhin aufgeklärt werden müssen und in denen sich der murine von dem humanen Promotor unterscheidet (Cousins et al., 2000). Für den murinen Promotor konnte im Gegensatz zum humanen Promotor die Beteiligung eines NF-AT Proteins an der Aktivierung beobachtet werden (Lee et al., 1995). Ein 3'-positiv regulatorisches Element mit einer Oct-Bindungsstelle konnte bis jetzt auch nur im murinen Gen entdeckt werden (Salerno et al., 2000). In Abbildung 40 sind die verschiedenen bis jetzt bekannten regulatorischen Elemente des murinen und des humanen IL-5 Promotors abgebildet. Es ist klar zu erkennen, dass sich die beiden Promotoren in einigen Elementen, wie zum Beispiel dem Cle0-Element ähneln, in anderen Regionen sich zum Teil jedoch stark unterscheiden (Schwenger and Sanderson, 1998).

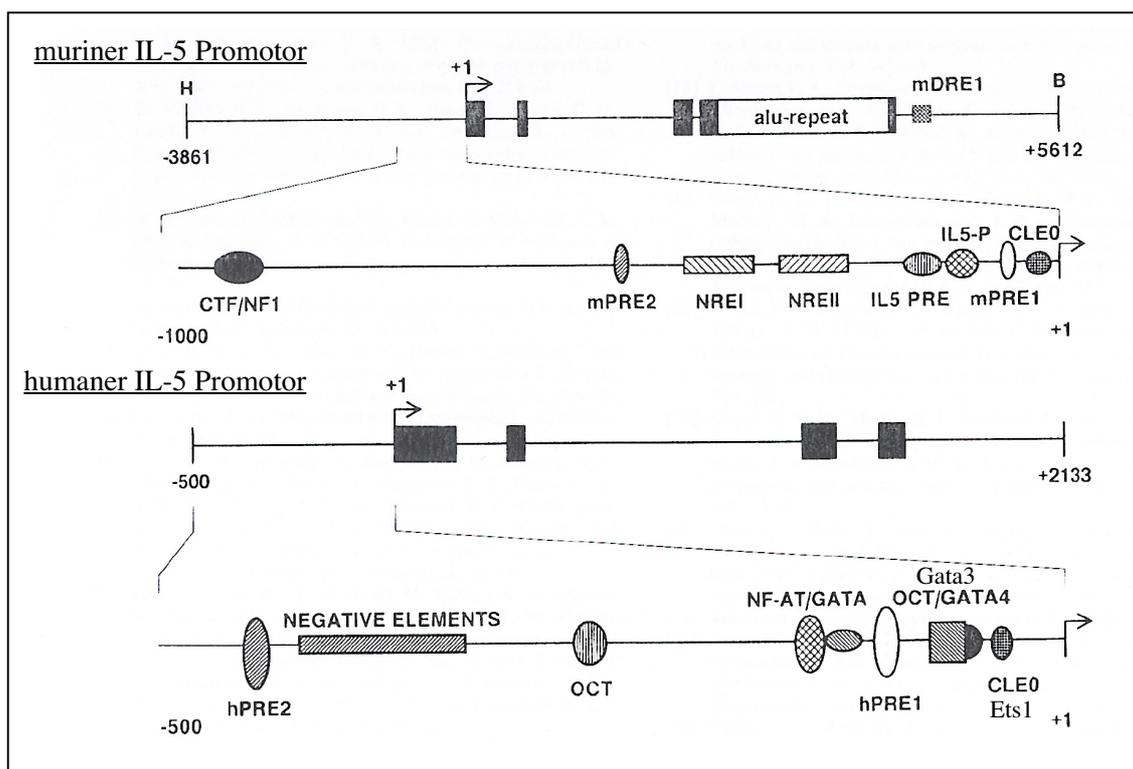


Abb. 40: Die bis jetzt bekannten regulatorischen Regionen des murinen und des humanen IL-5 Promotors. mDRE - murine downstream regulatory element, CTF/NF - CCAAT-box binding transcription factor/nuclear factor, mPRE - murine palindromic regulatory element, NRE - negative regulatory element, IL-5P - weiteres regulatorisches Element. (nach Schwenger and Sanderson, 1998)

6 Zusammenfassung

Die Interleukin-5-Synthese in Th2-Zellen wird auf der Transkriptionsebene reguliert. Als wichtige regulatorische Elemente in dem humanen IL-5 Promotor wurden eine Gata-Bindungsstelle und das Cle0-Element identifiziert. Das Cle0-Element enthält eine potentielle Ets-Bindungsstelle, dessen Bedeutung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass die Ets-Proteine Ets1 und Ets2, aber nicht Elf1, in T-Zelllinien den IL-5 Promotor aktivieren können. Dazu war eine simultane Stimulierung der Zellen mit PMA und Ionomycin oder PMA und HTLV-I-Tax nötig.

Eine Einzelbasenmutation in dem Kernmotiv der potentiellen Ets-Bindungsstelle verhinderte die Ets1/2-vermittelte aktivierende Wirkung auf den Promotor. DNA-Bindungsstudien zeigten, dass Ets-Proteine, wie Ets1 und Elf1 an das Cle0-Element binden können.

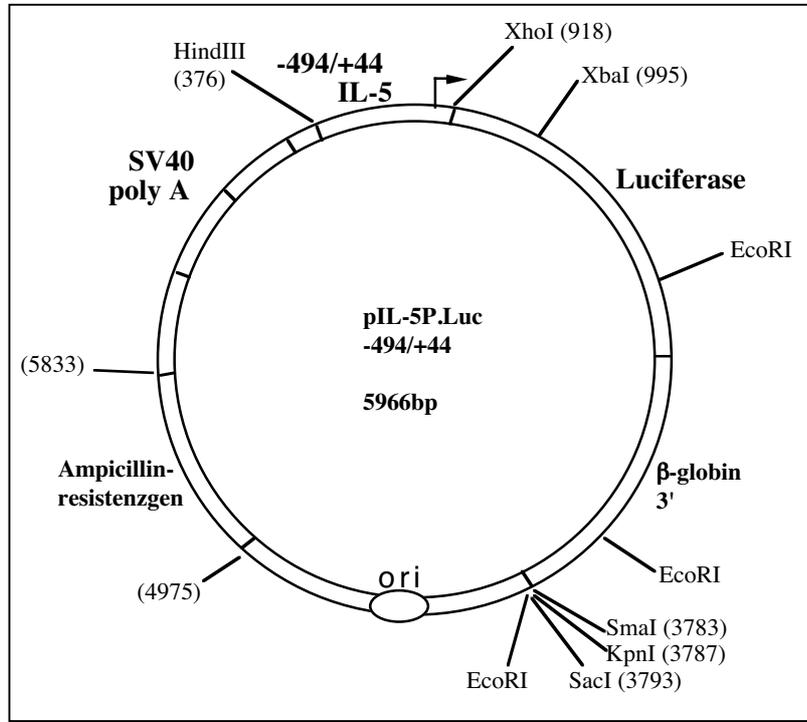
In der myeloiden Zelllinie Kasumi-1 war eine Ets-vermittelte Aktivierung des Promotors nur in Gegenwart von Gata3 möglich. Ein synergistischer Effekt von Ets1 und Ets2, jedoch nicht Elf1, mit Gata3 war zu beobachten.

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Ets-Proteinen an der Regulation der IL-5 Expression ergaben Untersuchungen in HSB-2-Zellen, die induzierbar IL-5 produzieren können. In HSB-2-Zellen und in primären T-Zellkulturen wurde spezifisch nach Stimulierung mit PMA und Ionomycin ein Ets-enthaltender Komplex induziert, der an das Cle0-Element binden kann. In aktivierten primären Th1-/Th2-Mischpopulationen steigt die Expression von Ets2 parallel zur IL-5-Produktion, nicht jedoch zur Th1-spezifischen IFN γ -Produktion, an. Ets1 und Ets2 erwiesen sich auch für die Tax-vermittelte Aktivierung des IL-5 Promotors in HTLV-I transformierten leukämischen Zellen von großer Bedeutung. Der Verlust der Aktivität des mutierten -106/+44 IL-5 EM Promotors in Kasumi-Zellen bestätigt, dass die intakte Ets-Bindungsstelle für die Gata3- und/oder Ets1-vermittelte Aktivierung des Promotors durch Tax essentiell ist.

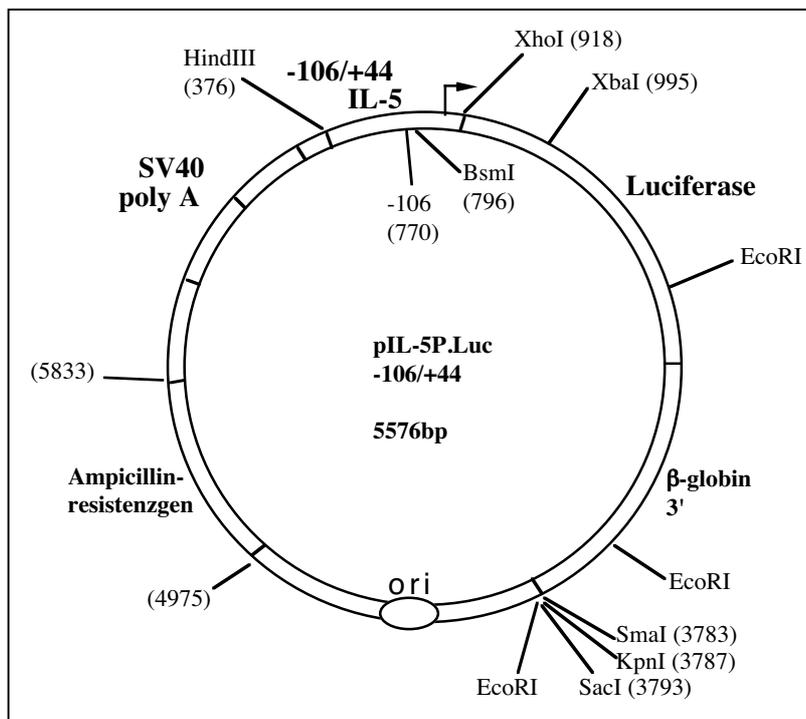
Um weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Ets-Proteine bei der Regulation der IL-5-Synthese zu erhalten, wäre es notwendig, Untersuchungen an reinen humanen Th2-Zellen oder Th2-Zellklonen in Kultur durchzuführen

7 Plasmidkarten

pIL-5P.Luc -494/+44



pIL-5P.Luc -106/+44



8 Literaturverzeichnis

Adachi, T., and Alam, R. (1998). The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol* 275, C623-33.

Alexandre, C., and Verrier, B. (1991). Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* 6, 543-51.

Anderson, M. K., Hernandez-Hoyos, G., Diamond, R. A., and Rothenberg, E. V. (1999). Precise developmental regulation of Ets family transcription factors during specification and commitment to the T cell lineage. *Development* 126, 3131-48.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-39.

Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 129-57.

Arceci, R. J., King, A. A., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Wilson, D. B. (1993). Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235-46.

Armstrong, A. P., Franklin, A. A., Uittenbogaard, M. N., Giebler, H. A., and Nyborg, J. K. (1993). Pleiotropic effect of the human T-cell leukemia virus Tax protein on the DNA binding activity of eukaryotic transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7303-7.

Asselin, S., Conjeaud, H., Minty, A., Fradelizi, D., and Breban, M. (1998). Stable polarization of peripheral blood T cells towards type 1 or type 2 phenotype after polyclonal activation. *Eur J Immunol* 28, 532-9.

Baranger, A. M., Palmer, C. R., Hamm, M. K., Giebler, H. A., Brauweiler, A., Nyborg, J. K., and Schepartz, A. (1995). Mechanism of DNA-binding enhancement by the human T-cell leukaemia virus transactivator Tax. *Nature* 376, 606-8.

Barnes, P. J. (2001). Cytokine-directed therapies for asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, S72-6.

Barnes, P. J. (1996). Immunomodulation as asthma therapy: where do we stand? *Eur Respir J Suppl* 22, 154s-159s.

Bassuk, A. G., Barton, K. P., Anandappa, R. T., Lu, M. M., and Leiden, J. M. (1998). Expression pattern of the Ets-related transcription factor Elf-1. *Mol Med* 4, 392-401.

Bassuk, A. G., and Leiden, J. M. (1995). A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* 3, 223-37.

- Bates, M. E., Busse, W. W., and Bertics, P. J. (1998). Interleukin 5 signals through Shc and Grb2 in human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 75-83.
- Beimling, P., and Moelling, K. (1989). Isolation and characterization of the tax protein of HTLV-I. *Oncogene* 4, 511-6.
- Bergelson, S., and Daniel, V. (1994). Cooperative interaction between Ets and AP-1 transcription factors regulates induction of glutathione S-transferase Ya gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 290-7.
- Bex, F., Yin, M. J., Burny, A., and Gaynor, R. B. (1998). Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol* 18, 2392-405.
- Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R. J., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K., and Papas, T. S. (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J Immunol* 142, 672-8.
- Bhat, N. K., Thompson, C. B., Lindsten, T., June, C. H., Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., and Papas, T. S. (1990). Reciprocal expression of human ETS1 and ETS2 genes during T-cell activation: regulatory role for the protooncogene ETS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3723-7.
- BioCarta. BioCarta Pathways. www.biocarta.com
- Birnboim, H. C. (1988). Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and granulocytes for Northern analysis. *Nucleic Acids Res* 16, 1487-97.
- Blumenthal, S. (1998). Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Ets-1 für die Regulation des humanen IL-5 Promotors (Diplomarbeit). In Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie (Tübingen: Universität Tübingen).
- Blumenthal, S. G., Aichele, G., Wirth, T., Czernilofsky, A. P., Nordheim, A., and Dittmer, J. (1999). Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. *J Biol Chem* 274, 12910-6.
- Bohjanen, P. R., Okajima, M., and Hodes, R. J. (1990). Differential regulation of interleukin 4 and interleukin 5 gene expression: a comparison of T-cell gene induction by anti-CD3 antibody or by exogenous lymphokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5283-7.
- Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D., and Alt, F. W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* 377, 635-8.
- Boulukos, K. E., Pognonec, P., Begue, A., Galibert, F., Gesquiere, J. C., Stehelin, D., and Ghysdael, J. (1988). Identification in chickens of an evolutionarily conserved cellular ets-2 gene (c-ets-2) encoding nuclear proteins related to the products of the c-ets proto-oncogene. *Embo J* 7, 697-705.

- Boulukos, K. E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A., and Ghysdael, J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 5718-21.
- 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, 248-54.
- Burtis, K. C., Thummel, C. S., Jones, C. W., Karim, F. D., and Hogness, D. S. (1990). The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell* 61, 85-99.
- Busse, W. W., and Lemanske, R. F., Jr. (2001). Asthma. *N Engl J Med* 344, 350-62.
- Campbell, H. D., Tucker, W. Q., Hort, Y., Martinson, M. E., Mayo, G., Clutterbuck, E. J., Sanderson, C. J., and Young, I. G. (1987). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6629-33.
- Clemens, K. E., Piras, G., Radonovich, M. F., Choi, K. S., Duvall, J. F., DeJong, J., Roeder, R., and Brady, J. N. (1996). Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol Cell Biol* 16, 4656-64.
- Cookson, W. (1999). The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402, B5-11.
- Corrigan, C. J., and Kay, A. B. (1992). T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 13, 501-7.
- Cousins, D. J., Richards, D., Kemeny, D. M., Romagnani, S., Lee, T. H., and Staynov, D. Z. (2000). DNase I footprinting of the human interleukin-5 gene promoter. *Immunology* 99, 101-8.
- Cowley, D. O., and Graves, B. J. (2000). Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* 14, 366-76.
- Crabtree, G. R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-61.
- Crepieux, P., Coll, J., and Stehelin, D. (1994). The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit Rev Oncog* 5, 615-38.
- Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J. F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A., and Capron, M. (1992). Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med* 175, 293-6.
- Dittmer, J., Gitlin, S. D., Reid, R. L., and Brady, J. N. (1993). Transactivation of the P2 promoter of parathyroid hormone-related protein by human T-cell lymphotropic virus type I Tax1: evidence for the involvement of transcription factor Ets1. *J Virol* 67, 6087-95.

- Dittmer, J., and Nordheim, A. (2001). Ets. In *Encyclopedic Reference of Cancer*, M. Schwab, ed. (Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag), pp. 309-312.
- Dittmer, J., and Nordheim, A. (1998). Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* *1377*, F1-11.
- Dittmer, J., Pise-Masison, C. A., Clemens, K. E., Choi, K. S., and Brady, J. N. (1997). Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHrP P2 promoter. *J Biol Chem* *272*, 4953-8.
- Egan, R. W., Athwahl, D., Chou, C. C., Emtage, S., Jehn, C. H., Kung, T. T., Mauser, P. J., Murgolo, N. J., and Bodmer, M. W. (1995). Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. *Int Arch Allergy Immunol* *107*, 321-2.
- Farnsworth, C. L., Freshney, N. W., Rosen, L. B., Ghosh, A., Greenberg, M. E., and Feig, L. A. (1995). Calcium activation of Ras mediated by neuronal exchange factor Ras-GRF. *Nature* *376*, 524-7.
- Ferber, I. A., Lee, H. J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N., and O'Garra, A. (1999). GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol* *91*, 134-44.
- Finotto, S., De Sanctis, G. T., Lehr, H. A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P. R., Renz, H., and Neurath, M. F. (2001). Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* *193*, 1247-60.
- Firestein, G. S., Roeder, W. D., Laxer, J. A., Townsend, K. S., Weaver, C. T., Hom, J. T., Linton, J., Torbett, B. E., and Glasebrook, A. L. (1989). A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* *143*, 518-25.
- Flavell, R. A., Li, B., Dong, C., Lu, H. T., Yang, D. D., Enslin, H., Tournier, C., Whitmarsh, A., Wysk, M., Conze, D., Rincon, M., and Davis, R. J. (1999). Molecular basis of T-cell differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *64*, 563-71.
- Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. (1996). Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model [see comments]. *J Exp Med* *183*, 195-201.
- Fujii, M., Iwai, K., Oie, M., Fukushi, M., Yamamoto, N., Kannagi, M., and Mori, N. (2000). Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* *16*, 1603-6.
- Fujisawa, J., Seiki, M., Kiyokawa, T., and Yoshida, M. (1985). Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 2277-81.
- Fujisawa, J., Toita, M., Yoshimura, T., and Yoshida, M. (1991). The indirect association of human T-cell leukemia virus tax protein with DNA results in transcriptional activation. *J Virol* *65*, 4525-8.

- Fujiwara, S., Fisher, R. J., Bhat, N. K., Diaz de la Espina, S. M., and Papas, T. S. (1988). A short-lived nuclear phosphoprotein encoded by the human *ets-2* proto-oncogene is stabilized by activation of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 8, 4700-6.
- Fujiwara, S., Koizumi, S., Fisher, R. J., Bhat, N. K., and Papas, T. S. (1990). Phosphorylation of the ETS-2 protein: regulation by the T-cell antigen receptor-CD3 complex. *Mol Cell Biol* 10, 1249-53.
- Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M., and Ghysdael, J. (1992). Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein. *New Biol* 4, 512-9.
- Ghysdael, J., Gegonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stehelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets* oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1714-8.
- Giebler, H. A., Loring, J. E., van Orden, K., Colgin, M. A., Garrus, J. E., Escudero, K. W., Brauweiler, A., and Nyborg, J. K. (1997). Anchoring of CREB binding protein to the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: a molecular mechanism of Tax transactivation. *Mol Cell Biol* 17, 5156-64.
- Gitlin, S. D., Dittmer, J., Shin, R. C., and Brady, J. N. (1993). Transcriptional activation of the human T-lymphotropic virus type I long terminal repeat by functional interaction of Tax1 and Ets1. *J Virol* 67, 7307-16.
- Glimcher, L. H., and Murphy, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 14, 1693-711.
- Good, L., Maggirwar, S. B., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. (1997). Constitutive dephosphorylation and activation of a member of the nuclear factor of activated T cells, NF-AT1, in Tax-expressing and type I human T-cell leukemia virus-infected human T cells. *J Biol Chem* 272, 1425-8.
- Goodall, G. J., Bagley, C. J., Vadas, M. A., and Lopez, A. F. (1993). A model for the interaction of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors with their ligands. *Growth Factors* 8, 87-97.
- Goodrich, J. A., Cutler, G., and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-30.
- Gottschalk, L. R., Giannola, D. M., and Emerson, S. G. (1993). Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J Exp Med* 178, 1681-92.
- Graves, B. J., Cowley, D. O., Goetz, T. L., Petersen, J. M., Jonsen, M. D., and Gillespie, M. E. (1998). Autoinhibition as a transcriptional regulatory mechanism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63, 621-9.
- Graves, B. J., and Petersen, J. M. (1998). Specificity within the *ets* family of transcription factors. In *Adv Cancer Res*, pp. 1-55.

- Graves, J. D., Draves, K. E., Craxton, A., Krebs, E. G., and Clark, E. A. (1998). A comparison of signaling requirements for apoptosis of human B lymphocytes induced by the B cell receptor and CD95/Fas. *J Immunol* *161*, 168-74.
- Gruart-Gouilleux, V., Engels, P., and Sullivan, M. (1995). Characterization of the human interleukin-5 gene promoter: involvement of octamer binding sites in the gene promoter activity. *Eur J Immunol* *25*, 1431-5.
- Hendriks, R. W., Nawijn, M. C., Engel, J. D., van Doorninck, H., Grosveld, F., and Karis, A. (1999). Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. *Eur J Immunol* *29*, 1912-8.
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W., and Glimcher, L. H. (1996). The proto-oncogene *c-maf* is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* *85*, 973-83.
- Ho, I. C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B. K., Tsai, S. F., Orkin, S. H., and Leiden, J. M. (1991). Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. *Embo J* *10*, 1187-92.
- Hogg, J. C. (1997). The pathology of asthma. *Apmis* *105*, 735-45.
- Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S., and Yoshida, M. (1986). Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *Embo J* *5*, 2883-8.
- Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* *279*, 38-46.
- Janknecht, R., and Nordheim, A. (1993). Gene regulation by Ets proteins. *Biochim Biophys Acta* *1155*, 346-56.
- Janknecht, R., Taube, W., Ludecke, H. J., and Pongs, O. (1989). Characterization of a putative transcription factor gene expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 74EF in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* *17*, 4455-64.
- John, S., Marais, R., Child, R., Light, Y., and Leonard, W. J. (1996). Importance of low affinity Elf-1 sites in the regulation of lymphoid-specific inducible gene expression. *J Exp Med* *183*, 743-50.
- John, S., Robbins, C. M., and Leonard, W. J. (1996). An IL-2 response element in the human IL-2 receptor alpha chain promoter is a composite element that binds Stat5, Elf-1, HMG-I(Y) and a GATA family protein. *Embo J* *15*, 5627-35.
- Jonsen, M. D., Petersen, J. M., Xu, Q. P., and Graves, B. J. (1996). Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Mol Cell Biol* *16*, 2065-73.

- Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J., and Papas, T. S. (1991). The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* 6, 523-32.
- Jousset, C., Carron, C., Boureux, A., Quang, C. T., Oury, C., Dusanter-Fourt, I., Charon, M., Levin, J., Bernard, O., and Ghysdael, J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* 16, 69-82.
- Kaminuma, O., Mori, A., Suko, M., Kikkawa, H., Naito, K., and Okudaira, H. (1997). Development of lung eosinophilic inflammation by the infusion of IL-5- producing T cell clones. *Int Arch Allergy Immunol* 114 Suppl 1, 10-3.
- Karim, F. D., Urness, L. D., Thummel, C. S., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R. A., Gunther, C. V., Nye, J. A., and et al. (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence [letter]. *Genes Dev* 4, 1451-3.
- Karlen, S., D'Ercole, M., and Sanderson, C. J. (1996). Two pathways can activate the interleukin-5 gene and induce binding to the conserved lymphokine element 0. *Blood* 88, 211-21.
- Karlen, S., De Boer, M. L., Lipscombe, R. J., Lutz, W., Mordvinov, V. A., and Sanderson, C. J. (1998). Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor. *Int Rev Immunol* 16, 227-47.
- Kasten, M., and Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* 20, 1832-8.
- Kim, S. J., Kehrl, J. H., Burton, J., Tendler, C. L., Jeang, K. T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K. Y., Sporn, M. B., and Roberts, A. B. (1990). Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *J Exp Med* 172, 121-9.
- Kim, W. Y., Sieweke, M., Ogawa, E., Wee, H. J., Englmeier, U., Graf, T., and Ito, Y. (1999). Mutual activation of Ets-1 and AML1 DNA binding by direct interaction of their autoinhibitory domains. *Embo J* 18, 1609-20.
- Ko, L. J., and Engel, J. D. (1993). DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 13, 4011-22.
- Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., and Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5, 675-81.
- Koyano-Nakagawa, N., Nishida, J., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1993). Reconstitution of the functional granulocyte macrophage colony stimulating factor promoter: evidence for distinct activation mechanisms that mediate the response to phorbol ester/calcium and human T cell leukemia virus type I Tax signals. *Int Immunol* 5, 345-52.

- Kvanta, A., Kontny, E., Jondal, M., Okret, S., and Fredholm, B. B. (1992). Mitogen stimulation of T-cells increases c-Fos and c-Jun protein levels, AP-1 binding and AP-1 transcriptional activity. *Cell Signal* 4, 275-86.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Laget, M. P., Callebaut, I., de Launoit, Y., Stehelin, D., and Mornon, J. P. (1993). Predicted common structural features of DNA-binding domains from Ets, Myb and HMG transcription factors. *Nucleic Acids Res* 21, 5987-96.
- Lambert, P. F., Ludford-Menting, M. J., Deacon, N. J., Kola, I., and Doherty, R. R. (1997). The nfkb1 promoter is controlled by proteins of the Ets family. *Mol Biol Cell* 8, 313-23.
- Lee, H. J., Masuda, E. S., Arai, N., Arai, K., and Yokota, T. (1995). Definition of cis-regulatory elements of the mouse interleukin-5 gene promoter. Involvement of nuclear factor of activated T cell-related factors in interleukin-5 expression. *J Biol Chem* 270, 17541-50.
- Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-7.
- Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo J* 18, 420-32.
- Liang, H., Olejniczak, E. T., Mao, X., Nettesheim, D. G., Yu, L., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (1994). The secondary structure of the ets domain of human Fli-1 resembles that of the helix-turn-helix DNA-binding motif of the Escherichia coli catabolite gene activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11655-9.
- Limaye, A. P., Abrams, J. S., Silver, J. E., Ottesen, E. A., and Nutman, T. B. (1990). Regulation of parasite-induced eosinophilia: selectively increased interleukin 5 production in helminth-infected patients. *J Exp Med* 172, 399-402.
- Logan, S. K., Garabedian, M. J., Campbell, C. E., and Werb, Z. (1996). Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J Biol Chem* 271, 774-82.
- Lopez, A. F., Elliott, M. J., Woodcock, J., and Vadas, M. A. (1992). GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross-competition on human haemopoietic cells. *Immunol Today* 13, 495-500.
- Lopez, A. F., Sanderson, C. J., Gamble, J. R., Campbell, H. D., Young, I. G., and Vadas, M. A. (1988). Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med* 167, 219-24.
- Lotvall, J., and Pullerits, T. (1999). Treating asthma with anti-IgE or anti-IL5. *Curr Pharm Des* 5, 757-70.
- Macleod, K., Leprince, D., and Stehelin, D. (1992). The ets gene family. *Trends Biochem Sci* 17, 251-6.

- Majerus, M. A., Bibollet-Ruche, F., Telliez, J. B., Wasylyk, B., and Bailleul, B. (1992). Serum, AP-1 and Ets-1 stimulate the human ets-1 promoter. *Nucleic Acids Res* 20, 2699-703.
- Makover, D., Cuddy, M., Yum, S., Bradley, K., Alpers, J., Sukhatme, V., and Reed, J. C. (1991). Phorbol ester-mediated inhibition of growth and regulation of proto-oncogene expression in the human T cell leukemia line JURKAT. *Oncogene* 6, 455-60.
- Masuda, E. S., Tokumitsu, H., Tsuboi, A., Shlomai, J., Hung, P., Arai, K., and Arai, N. (1993). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter cis-acting element CLE0 mediates induction signals in T cells and is recognized by factors related to AP1 and NFAT. *Mol Cell Biol* 13, 7399-407.
- Mavrothalassitis, G. J., and Papas, T. S. (1991). Positive and negative factors regulate the transcription of the ETS2 gene via an oncogene-responsive-like unit within the ETS2 promoter region. *Cell Growth Differ* 2, 215-24.
- Merika, M., and Orkin, S. H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 3999-4010.
- Minegishi, N., Morita, S., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Konno, T., Hayashi, N., and Yamamoto, M. (1997). Expression of GATA transcription factors in myelogenous and lymphoblastic leukemia cells. *Int J Hematol* 65, 239-49.
- Miyatake, S., Shlomai, J., Arai, K., and Arai, N. (1991). Characterization of the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene promoter: nuclear factors that interact with an element shared by three lymphokine genes--those for GM-CSF, interleukin-4 (IL-4), and IL-5. *Mol Cell Biol* 11, 5894-901.
- Moreau-Gachelin, F. (1994). Spi-1/PU.1: an oncogene of the Ets family. *Biochim Biophys Acta* 1198, 149-63.
- Moreau-Gachelin, F., Tavittian, A., and Tambourin, P. (1988). Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331, 277-80.
- Mori, A., Inoue, S., Mikami, T., Kaminuma, O., Ohmura, T., Nishizaki, Y., Asakura, Y., Suko, M., Ito, K., and Okudaira, H. (1995). Analysis of human interleukin-5 gene transcription by T cell clones and hybridomas. *Int Arch Allergy Immunol* 107, 366-7.
- Mori, A., Kaminuma, O., Mikami, T., Inoue, S., Okumura, Y., Akiyama, K., and Okudaira, H. (1999). Transcriptional control of the IL-5 gene by human helper T cells: IL-5 synthesis is regulated independently from IL-2 or IL-4 synthesis. *J Allergy Clin Immunol* 103, S429-36.
- Mori, A., Kaminuma, O., Miyazawa, K., Ogawa, K., Okudaira, H., and Akiyama, K. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase regulates human T cell IL-5 synthesis. *J Immunol* 163, 4763-71.
- Mori, A., Kaminuma, O., Ogawa, K., Kobayashi, N., Akiyama, K., and Okudaira, H. (1999). Regulatory mechanisms of human T cell IL-5 synthesis: differential roles of the proximal promoter-binding proteins in IL-5 gene transcription. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 271-4.

- Mori, A., Okudaira, H., Kobayashi, N., and Akiyama, K. (2001). Selective regulation of T cell IL-5 synthesis by OM-01, JTE-711 and p38 MAP kinase inhibitor: independent control of Th2 cytokines, IL-4 and IL-5. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 172-5.
- Mori, A., Suko, M., Nishizaki, Y., Kaminuma, O., Kobayashi, S., Matsuzaki, G., Yamamoto, K., Ito, K., Tsuruoka, N., and Okudaira, H. (1995). IL-5 production by CD4+ T cells of asthmatic patients is suppressed by glucocorticoids and the immunosuppressants FK506 and cyclosporin A. *Int Immunol* 7, 449-57.
- Muthusamy, N., Barton, K., and Leiden, J. M. (1995). Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* 377, 639-42.
- Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D. H., Ray, A., and Hamid, Q. (1999). Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103, 215-22.
- Nimer, S. (1991). Tax responsiveness of the GM-CSF promoter is mediated by mitogen-inducible sequences other than kappa B. *New Biol* 3, 997-1004.
- Nimer, S. D., Gasson, J. C., Hu, K., Smalberg, I., Williams, J. L., Chen, I. S., and Rosenblatt, J. D. (1989). Activation of the GM-CSF promoter by HTLV-I and -II tax proteins. *Oncogene* 4, 671-6.
- Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-5.
- Nye, J. A., Petersen, J. M., Gunther, C. V., Jonsen, M. D., and Graves, B. J. (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 6, 975-90.
- Ogata, N., Kikuchi, Y., Kouro, T., Tomonaga, M., and Takatsu, K. (1997). The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. *Int Arch Allergy Immunol* 114 Suppl 1, 24-7.
- Ohnishi, T., Kita, H., Weiler, D., Sur, S., Sedgwick, J. B., Calhoun, W. J., Busse, W. W., Abrams, J. S., and Gleich, G. J. (1993). IL-5 is the predominant eosinophil-active cytokine in the antigen-induced pulmonary late-phase reaction. *Am Rev Respir Dis* 147, 901-7.
- Orkin, S. H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 80, 575-81.
- Papas, T. S. (1992). "Oncogenes as probes for cellular signal processes: the family of ETS genes". *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 824-33.
- Patton, S. E., Martin, M. L., Nelsen, L. L., Fang, X., Mills, G. B., Bast, R. C., Jr., and Ostrowski, M. C. (1998). Activation of the ras-mitogen-activated protein kinase pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 58, 2253-9.

- Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T., and Graves, B. J. (1995). Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* 269, 1866-9.
- Pio, F., Kodandapani, R., Ni, C. Z., Shepard, W., Klemsz, M., McKercher, S. R., Maki, R. A., and Ely, K. R. (1996). New insights on DNA recognition by ets proteins from the crystal structure of the PU.1 ETS domain-DNA complex [published erratum appears in *J Biol Chem* 1996 Dec 20;271(51):33156]. *J Biol Chem* 271, 23329-37.
- Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C. J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R. P., and Paul, W. E. (1989). Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 339, 64-7.
- Pognonec, P., Boulukos, K. E., and Ghysdael, J. (1989). The c-ets-1 protein is chromatin associated and binds to DNA in vitro. *Oncogene* 4, 691-7.
- Rabault, B., and Ghysdael, J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem* 269, 28143-51.
- Ray, A., and Cohn, L. (2000). Altering the Th1/Th2 balance as a therapeutic strategy in asthmatic diseases. *Curr Opin Investig Drugs* 1, 442-8.
- Ray, A., and Cohn, L. (1999). Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest* 104, 985-93.
- Reddy, E. S., and Rao, V. N. (1988). Structure, expression and alternative splicing of the human c-ets-1 proto-oncogene. *Oncogene Res* 3, 239-46.
- Rincon, M., and Flavell, R. A. (1997). T-cell subsets: transcriptional control in the Th1/Th2 decision. *Curr Biol* 7, R729-32.
- Robinson, D. S., Ying, S., Bentley, A. M., Meng, Q., North, J., Durham, S. R., Kay, A. B., and Hamid, Q. (1993). Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92, 397-403.
- Rolfe, F. G., and Sewell, W. A. (1997). Analysis of human interleukin-5 gene transcription by a novel nuclear run on method based on the polymerase chain reaction. *J Immunol Methods* 202, 143-51.
- Rolland, J. M., Douglass, J., and O'Hehir, R. E. (2000). Allergen immunotherapy: current and new therapeutic strategies. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 515-27.
- Salerno, M. S., Mordvinov, V. A., and Sanderson, C. J. (2000). Binding of octamer factors to a novel 3'-positive regulatory element in the mouse interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 275, 4525-31.
- Salerno, M. S., Schwenger, G. T., Sanderson, C. J., and Mordvinov, V. A. (2001). Binding of octamer factors to the murine il-5 cle0 in primary t-cells and a t-cell line. *Cytokine* 15, 4-9.

- Salter, R. H. (1967). The management of severe bronchial asthma. *Br J Clin Pract* 21, 443-6.
- Sanderson, C. J. (1992). Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79, 3101-9.
- Sanmugalingham, D., De Vries, E., Gauntlett, R., Symon, F. A., Bradding, P., and Wardlaw, A. J. (2000). Interleukin-5 enhances eosinophil adhesion to bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 30, 255-63.
- Sarafova, S., and Siu, G. (1999). A potential role for Elf-1 in CD4 promoter function. *J Biol Chem* 274, 16126-34.
- Schmitt, I., Rosin, O., Rohwer, P., Gossen, M., and Grassmann, R. (1998). Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J Virol* 72, 633-40.
- Schwenger, G. T., Fournier, R., Hall, L. M., Sanderson, C. J., and Mordvinov, V. A. (1999). Nuclear factor of activated T cells and YY1 combine to repress IL-5 expression in a human T-cell line. *J Allergy Clin Immunol* 104, 820-7.
- Schwenger, G. T., Fournier, R., Kok, C. C., Mordvinov, V. A., Yeoman, D., and Sanderson, C. J. (2001). GATA-3 has dual regulatory functions in human IL-5 transcription. *J Biol Chem*.
- Schwenger, G. T., Mordvinov, V. A., Karlen, S., D'Ercole, M., and Sanderson, C. J. (1998). Identification of two novel palindromic regulatory elements in the murine interleukin-5 promoter. *Mol Immunol* 35, 149-58.
- Schwenger, G. T., and Sanderson, C. J. (1998). New directions in understanding interleukin-5 gene expression. *Leuk Lymphoma* 28, 443-50.
- Sedgwick, J. B., Calhoun, W. J., Gleich, G. J., Kita, H., Abrams, J. S., Schwartz, L. B., Volovitz, B., Ben-Yaakov, M., and Busse, W. W. (1991). Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis* 144, 1274-81.
- Seth, A., Watson, D. K., Blair, D. G., and Papas, T. S. (1989). c-ets-2 protooncogene has mitogenic and oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7833-7.
- Shi, H. Z., Xiao, C. Q., Zhong, D., Qin, S. M., Liu, Y., Liang, G. R., Xu, H., Chen, Y. Q., Long, X. M., and Xie, Z. F. (1998). Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 204-9.
- Siegel, M. D., Zhang, D. H., Ray, P., and Ray, A. (1995). Activation of the interleukin-5 promoter by cAMP in murine EL-4 cells requires the GATA-3 and CLE0 elements. *J Biol Chem* 270, 24548-55.
- Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T. (1996). MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85, 49-60.

- Smith, M. R., and Greene, W. C. (1990). Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* 4, 1875-85.
- Stranick, K. S., Uss, A. S., Zambas, D. N., Egan, R. W., Billah, M. M., and Umland, S. P. (1998). Characterization of the mouse interleukin-5 promoter in a mouse TH2 T cell clone. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 56-62.
- Stranick, K. S., Zambas, D. N., Uss, A. S., Egan, R. W., Billah, M. M., and Umland, S. P. (1997). Identification of transcription factor binding sites important in the regulation of the human interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272, 16453-65.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., and Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-69.
- Tanabe, T., Konishi, M., Mizuta, T., Noma, T., and Honjo, T. (1987). Molecular cloning and structure of the human interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 262, 16580-4.
- Tatewaki, M., Yamaguchi, K., Matsuoka, M., Ishii, T., Miyasaka, M., Mori, S., Takatsuki, K., and Watanabe, T. (1995). Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Blood* 86, 3109-17.
- Tendler, C. L., Greenberg, S. J., Blattner, W. A., Manns, A., Murphy, E., Fleisher, T., Hanchard, B., Morgan, O., Burton, J. D., Nelson, D. L., and et al. (1990). Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5218-22.
- Thivierge, M., Doty, M., Johnson, J., Stankova, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2000). IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol* 165, 5221-6.
- Thomas, M. A., Mordvinov, V. A., and Sanderson, C. J. (1999). The activity of the human interleukin-5 conserved lymphokine element 0 is regulated by octamer factors in human cells. *Eur J Biochem* 265, 300-7.
- Thomas, R. S., Tymms, M. J., McKinlay, L. H., Shannon, M. F., Seth, A., and Kola, I. (1997). ETS1, NFkappaB and AP1 synergistically transactivate the human GM-CSF promoter. *Oncogene* 14, 2845-55.
- Thomas, R. S., Tymms, M. J., Seth, A., Shannon, M. F., and Kola, I. (1995). ETS1 transactivates the human GM-CSF promoter in Jurkat T cells stimulated with PMA and ionomycin. *Oncogene* 11, 2135-43.
- Thompson, C. B., Wang, C. Y., Ho, I. C., Bohjanen, P. R., Petryniak, B., June, C. H., Miesfeldt, S., Zhang, L., Nabel, G. J., Karpinski, B., and et al. (1992). cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol Cell Biol* 12, 1043-53.

- Tschachler, E., Bohnlein, E., Felzmann, S., and Reitz, M. S., Jr. (1993). Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. *Blood* 81, 95-100.
- Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L., and Crabtree, G. R. (1990). Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8, 421-52.
- Valentine, J. E., and Sewell, W. A. (1998). Characterisation of inducible DNase I hypersensitive sites flanking the human interleukin-5 gene. *Biochim Biophys Acta* 1442, 218-29.
- van Leeuwen, B. H., Martinson, M. E., Webb, G. C., and Young, I. G. (1989). Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5. *Blood* 73, 1142-8.
- Van Wauwe, J., Aerts, F., Cools, M., Deroose, F., Freyne, E., Goossens, J., Hermans, B., Lacrampe, J., Van Genechten, H., Van Gerven, F., and Van Nyen, G. (2000). Identification of R146225 as a novel, orally active inhibitor of interleukin-5 biosynthesis. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 655-61.
- Viola, J. P., Kiani, A., Bozza, P. T., and Rao, A. (1998). Regulation of allergic inflammation and eosinophil recruitment in mice lacking the transcription factor NFAT1: role of interleukin-4 (IL-4) and IL-5. *Blood* 91, 2223-30.
- Vogel, G. (1997). New clues to asthma therapies [news] [see comments]. *Science* 276, 1643-6.
- Wang, C. Y., Bassuk, A. G., Boise, L. H., Thompson, C. B., Bravo, R., and Leiden, J. M. (1994). Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol Cell Biol* 14, 1153-9.
- Warren, D. J., and Sanderson, C. J. (1985). Production of a T-cell hybrid producing a lymphokine stimulating eosinophil differentiation. *Immunology* 54, 615-23.
- Wasylyk, B., Hahn, S. L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors [published erratum appears in *Eur J Biochem* 1993 Aug 1;215(3):907]. *Eur J Biochem* 211, 7-18.
- Wasylyk, B., and Nordheim, A. (1997). Ets Transcription Factors: Partners in the Integration of Signal Responses. In *Transcription Factors in Eukaryotes*, A. G. Papavassiliou, ed.: Landes Bioscience), pp. 251-284.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D., and Stehelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* 346, 191-3.
- Wasylyk, C., Kerckaert, J. P., and Wasylyk, B. (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes Dev* 6, 965-74.

- Watson, D. K., McWilliams, M. J., Lapis, P., Lautenberger, J. A., Schweinfest, C. W., and Papas, T. S. (1988). Mammalian ets-1 and ets-2 genes encode highly conserved proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7862-6.
- Watson, D. K., McWilliams-Smith, M. J., Nunn, M. F., Duesberg, P. H., O'Brien, S. J., and Papas, T. S. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7294-8.
- Weltman, J. K., and Karim, A. S. (2000). IL-5: biology and potential therapeutic applications [In Process Citation]. *Expert Opin Investig Drugs* 9, 491-6.
- Weltman, J. K., and Karim, A. S. (1998). Interleukin-5: a proeosinophil cytokine mediator of inflammation in asthma and a target for antisense therapy. *Allergy Asthma Proc* 19, 257-61.
- Werner, M. H., Clore, M., Fisher, C. L., Fisher, R. J., Trinh, L., Shiloach, J., and Gronenborn, A. M. (1995). The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation [published erratum appears in *Cell* 1996 Oct 18;87(2):following 355]. *Cell* 83, 761-71.
- Yamagata, T., Mitani, K., Ueno, H., Kanda, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1997). Triple synergism of human T-lymphotropic virus type 1-encoded tax, GATA-binding protein, and AP-1 is required for constitutive expression of the interleukin-5 gene in adult T-cell leukemia cells. *Mol Cell Biol* 17, 4272-81.
- Yamagata, T., Nishida, J., Sakai, R., Tanaka, T., Honda, H., Hirano, N., Mano, H., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1995). Of the GATA-binding proteins, only GATA-4 selectively regulates the human interleukin-5 gene promoter in interleukin-5-producing cells which express multiple GATA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15, 3830-9.
- Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., Torisu, M., Mita, S., Tominaga, A., and Takatsu, K. (1988). Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *J Exp Med* 167, 1737-42.
- Yamamoto, H., Flannery, M. L., Kupriyanov, S., Pearce, J., McKercher, S. R., Henkel, G. W., Maki, R. A., Werb, Z., and Oshima, R. G. (1998). Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev* 12, 1315-26.
- Yamamoto, M., Ko, L. J., Leonard, M. W., Beug, H., Orkin, S. H., and Engel, J. D. (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev* 4, 1650-62.
- Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Van Beveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., and Ostrowski, M. C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* 16, 538-47.

Zamel, N., McClean, P. A., Sandell, P. R., Siminovitch, K. A., and Slutsky, A. S. (1996). Asthma on Tristan da Cunha: looking for the genetic link. The University of Toronto Genetics of Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* *153*, 1902-6.

Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. (1997). Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* *272*, 21597-603.

Zhang, D. H., Yang, L., Cohn, L., Parkyn, L., Homer, R., Ray, P., and Ray, A. (1999). Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* *11*, 473-82.

Zhang, D. H., Yang, L., and Ray, A. (1998). Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. *J Immunol* *161*, 3817-21.

9 Publikation

Teile dieser Doktorarbeit finden sich in folgender Publikation:

Blumenthal SG, Aichele G, Wirth T, Czernilofsky AP, Nordheim A, Dittmer J. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. J Biol Chem., 1999 Apr 30; **274** (18):12910-6.

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Bayer, Bisswanger, Bock, Bohley, Breyer-Pfaff, Fröhlich, Gebhardt, Günzl, Hamprecht, Huber (München), Kaiser, Mecke, Nordheim, Oesterhelt (München), Pfaff, Pfeiffer, Probst, Rammensee, Reutter, Schnabel (München), Schwarz, Ullrich (München), Voelter, Wegmann, Wekerle (München), Werner (München), Werringloer, Weser.

11 Lebenslauf

von Sibylle Blumenthal, geb. am 29.1.1971 in Saarbrücken

1980-1984	Marie-Therese-Gymnasium, Erlangen
1984-1988	Dunwoody High School, Atlanta, USA
06/1988	Advanced Academic Diploma with Excellence
1990	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
1988-1992	Studium der Chemie an der University of California, Berkeley, USA
12/1992	Bachelor of Science in Chemistry
04/1993-09/1994	Wissenschaftliche Angestellte in der Biotech-Firma ESCAgenetics Corp., San Francisco, USA
1994-1998	Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Diplomstudiengang
06-08/1995	Praktikum an der University of Karachi, Pakistan (Prof. Atta-ur-Rahman, H.E.J. Research Institute of Chemistry)
04/1996-03/1997	Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Abteilungen für Entwicklungsbiologie, Molekularbiologie, Strukturforschung, Membranbiochemie, Virusforschung, Neuroimmunologie)
11/1997-07/1998	Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Nordheim am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie, Uni Tübingen mit dem Titel: "Bedeutung des Transkriptionsfaktors Ets-1 für die Regulation des humanen IL-5 Promotors"
10/1998-09/2001	Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs "Zellbiologie in der Medizin"
10/1998-11/2001	Doktorarbeit bei Prof. Dr. A. Nordheim am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie, Uni Tübingen mit dem Titel: "Die Regulation der Expression des humanen Interleukin-Gens"