

Aus der Abteilung  
für Hämatologie und Internistische Onkologie  
Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen

Der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

**Die reifungsassoziierte Genexpression der Krüppel-like  
Transkriptionsfaktoren im Mononukleären Phagozyten  
System**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der  
Universität Regensburg

Vorgelegt von  
Jochen Spieß

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber  
1. Berichterstatter: PD Dr. Michael Rehli  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Kölbl  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.3.2009

# Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2004 bis Dezember 2007 unter Anleitung von Hr. PD Dr. Michael Rehli in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Herzlichen Dank dem Leiter der Klinik Prof. Dr. Reinhard Andreesen, dass ich diese Arbeit in seinem Institut erstellen durfte.

Vielen Dank dem Leiter der Arbeitsgruppe PD. Dr. Michael Rehli für seine hervorragende Betreuung und seinem Verständnis dafür, dass Mediziner keine Biochemiker sind.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich an dieser Stelle danken. Besonderer Dank geht an Dr. Achim Ehrnberger für seine Zusammenarbeit während der Transfektionsversuche, Dr. Monika Lichtinger, Dr. Carol El Chartouni und PhD Thu Hang Pham dafür, dass sie an einem Tag auch nach der 10. Frage alles andere haben stehen lassen, um mir weiter zu helfen. Dr. Krishna Mondal für die Einführung in die Welt des Western Blots. Sabine Pape und Lucia Schwarzfischer dafür, dass sie mich in die Geheimnisse des Labors eingeweiht haben. Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima, ich habe mich bei Euch sehr wohl gefühlt.

Nicht vergessen möchte ich, mich bei meiner Familie zu bedanken. Es ist ein schönes Gefühl zu wissen, dass ich mich immer auf sie verlassen kann. Der größte Dank gilt meiner großen Liebe, Daniela, die immer an meiner Seite steht, und mit der ich gemeinsam unsere Träume verwirklichen kann.

# Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
adMO	Adhärente Monozyten
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C2H2	2 Cystein- und 2 Histidinreste
CtBP	C-terminal binding protein
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetales Kälberserum
GC	Guanin-Cytosin
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GT	Guanin-Thymin
h	Stunden
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
iDC	Unstimmulierte Dendritische Zellen
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
KLF	Krüppel-like-Faktor
LB-Medium	lysogeny broth Nährmedium
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAK	Makrophagen
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
mDC	Stimmulierte Dendritische Zellen

min	Minuten
mM	Milli-Mol
MO	frisch elutrierte Monozyten
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
NTP	Nukleosidtriphosphate
P	Puffer
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	am Roswell Park Memorial Institute entwickeltes Nährmedium
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase- Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sp	Spezifisches Protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
ü.N.	über Nacht
Upm	Units per minute
ZNS	Zentralnervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	
<b>1.1 Allgemeine Bedeutung von Sp1-like/Krüppel-like Transkriptionsfaktoren</b>	9
<b>1.2 Die Familie der Sp1/KLF Transkriptionsfaktoren</b>	9
1.2.1 Geschichtliches	9
1.2.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten	10
1.2.3 Einteilung der Familie	11
<b>1.3 Das Mononukleäre Phagozytensystem</b>	14
1.3.1 Ontogenese der Makrophagen	14
1.3.2 Ontogenese der dendritischen Zellen	16
<b>2. Zielsetzung</b>	18
<b>3. Material</b>	19
<b>3.1 Geräte</b>	19
<b>3.2 Verbrauchsmaterial und Plastikartikel</b>	20
<b>3.3 Chemikalien</b>	20
<b>3.4 Antikörper</b>	20
<b>3.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits</b>	20
<b>3.6 Molekulargewichtsstandards</b>	21
<b>3.7 Vektoren</b>	21
<b>3.8 Primersequenzen</b>	21
<b>3.9 Zelllinien und Bakterien</b>	23
<b>4. Methoden</b>	
<b>4.1 Zellbiologische Methoden</b>	24
4.1.1 Kultivierung von Bakterien	24
4.1.2 Kultur eukaryontischer Zellen	25
4.1.3 Gewinnung und Kultur primärer Zellen	26
4.1.3.1 <i>Elutriation von Monozyten</i>	26
4.1.3.2 <i>Kultivierung von Makrophagen</i>	27
4.1.3.3 <i>Kultivierung dendritischer Zellen</i>	27

4.1.4 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effektene (Qiagen)	28
4.1.5 Luciferase Assay (Promega)	28
<b>4.2 Proteinchemische Methoden</b>	29
4.2.1 Zellkernextraktion durch hypotonische/Nonidet P-40 Lyse (Roche) von Makrophagen und dendritischen Zellen	29
4.2.2 Zellkernextraktion durch hypotonische/mechanische Lyse von Monozyten	31
4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	32
4.2.4 Western Blot (semi-dry-Technik)	34
4.2.5 Nachweis von Proteinen	35
4.2.5.2 Immunofärbung von Proteinblots	35
4.2.5.3 ECL-Färbung von Proteinen	36
<b>4.3 Molekularbiologische Methoden</b>	37
4.3.1 Präparation und Analyse von DNA	37
4.3.1.1 Transformation von Bakterien mit Plasmiden	37
4.3.1.2 Midi-Plasmid-DNA-Präparation	37
4.3.1.3 DNA-Gelelektrophorese	38
4.3.1.4 Restriktionsverdau von DNA	39
4.3.2 Präparation und Analyse von RNA	39
4.3.2.1 RNA-Extraktion mit Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform	39
4.3.2.2 RNA-Gelelektrophorese mit 1% igem Agarosegel	41
4.3.2.3 Reverse Transkription (RT)	42
4.3.2.4 Real-time PCR	43
<b>5. Ergebnisse</b>	44
<b>5.1 Relative RNA-Expressionslevel der KLF in mononukleären Zellen</b>	44
5.1.1 KLF 1	46
5.1.2 KLF 2	46
5.1.3 KLF 4	47
5.1.4 KLF 5	47
5.1.5 KLF 6	48
5.1.6 KLF 7	48
5.1.7 KLF 8	49

5.1.8 KLF 9	50
5.1.9 KLF 10	50
5.1.10 KLF 11	51
5.1.11 KLF12	51
5.1.12 KLF 13	53
5.1.13 KLF3, KLF 14, KLF 15, KLF 16	53
<b>5.2. Proteinchemischer Nachweis von KLF in Kernlysaten</b>	<b>53</b>
5.2.1 KLF 6	54
5.2.2 KLF 8	55
5.2.3 KLF 12	56
<b>5.3 KLF als Aktivatoren und Repressoren des MADDAM-Promotors</b>	<b>57</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>8. Referenzen</b>	<b>77</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>80</b>
<b>10. Erklärung</b>	<b>81</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Bedeutung von Sp1-like/Krüppel-like Transkriptionsfaktoren

Sp1-like und Krüppel-like Transkriptionsfaktoren sind sehr nah verwandte Proteine, die eine wichtige Komponente des eukaryontischen Transkriptionsapparates darstellen. Durch ihr allgegenwärtiges Vorkommen und ihre vielfältigen Funktionen im menschlichen Organismus sind Sp1/KLF Transkriptionsfaktoren mittlerweile Gegenstand intensiver molekularbiologischer Forschung. Sp1/KLF Transkriptionsfaktoren haben einen bedeutenden Einfluss in der Entstehung unterschiedlichster Erkrankungen, angefangen von embryonalen Entwicklungsstörungen, über vaso-okklusive Krankheiten wie Atherosklerose, Myokardinfarkt, Schlaganfälle und PAVK (1), in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen (2), in der Entwicklung der Adipositas (3) und des Typ 2 Diabetes (4) bis hin zu hämatologisch/onkologischen Erkrankungen. Viele weitere Erkrankungen scheinen pathogenetisch durch Sp1/KLF-like Transkriptionsfaktoren beeinflusst zu werden, was die Vielfalt aktueller Arbeiten über Sp1/KLF-like Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichsten medizinischen Teilbereichen belegt.

## 1.2 Die Familie der Sp1/KLF Transkriptionsfaktoren

### 1.2.1 Geschichtliches

GC und GT Boxen (5'-GGGGCGGGG-3' und 5'-GGTGTGGGG-3') sind sehr häufig vorkommende Motive in GC-reichen Promotoren, Enhancern und Lokuskontrollregionen in der DNA von Säugetieren. Ein Protein das mit GC-Boxen interagiert, wurde erstmals in den frühen achtziger Jahren für einen 21-bp Abschnitt des SV40 early promotor gefunden und als Sp1 bezeichnet. Sp1 stand dabei für „spezifisches Protein 1“ (5). Als Ergebnis intensiver Forschung stellt Sp1 mittlerweile den am genauesten charakterisierten Transkriptionsaktivator in Säugetierzellen dar (2). Einige Zeit ging man davon aus, dass es sich bei Sp1 um den einzig wichtigen Faktor handeln würde, der durch Bindung an GC/GT Boxen agiert. Mit dem Beginn des Klonierungszeitalters wurden aber immer neue GC/GT-bindenden Proteine entdeckt, deren DNA-Bindungsdomänen der von Sp1 sehr ähnlich waren, und die in allen Fällen aus 3 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingern bestanden. Diese in allen Fällen 81 Aminosäuren umfassende DNA-Bindungsdomäne, die am C-Terminus aller bisher entdeckter Faktoren gefunden wurde, definiert die Zugehörigkeit zur Sp/KLF-Familie (6).

## 1.2.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich alle Mitglieder der Sp/KLF Familie durch ihre konsistente C-terminale DNA-Bindungsdomäne aus, in der, wie Abbildung 1 zeigt, eine Identität der AS-Sequenz von mehr als 65% vorliegt. Der erste und zweite Zinkfinger besteht übereinstimmend aus 23 AS, während der dritte immer nur 21 AS enthält.

		Sequenzübereinstimmung in %
Sp1	CHIQCCKVYVKtSHLrAHlRWHTGErPfMcnWSYCGKlFTRsDELQRHkRtHTGEKkFACPECPkRfMRSdHLSKHlK	
Sp2	CHlPDCGkTfRkTSLlRAHvRLHTGErPfvCNWFFCGKlFTRsDELQRHARtHTGDKRfECAQCQkRfMRSdHLTKHYKtH	84,0
Sp3	CHlGGCGkVYVKtSHLrAHlRWHTGErPfMcnWSYCGKlFTRsDELQRHkRtHTGEKkFVCEPCKRfMRSdHLAKHlKtH	95,1
Sp4	CHlEGCGkVYVKtSHLrAHlRWHTGErPfICNWMFCGKlFTRsDELQRHRRtHTGEKkFECPECKRfMRSdHLSKHVKtH	95,1
mSp5	CHVPGCGkVYVKtSHLKAHlRWHTGErPfvCNWLFcGkSPTRsDELQRHLRtHTGEKkFACPECGkRfMRSdHLAKHVKtH	92,6
Sp6	CHlPGCGkAYAKtSHLKAHlRWHsgdRfvCNWLFcGkRfTRsDELQRHLQTHtGtKkFPCAVCSrVfMRSdHLAKHMKtH	85,2
KLF1	CGHEGCGkSYSKSSHLKAHlRtHTGEkPyACSWDGCdWRfARSDELTRHYRkHTGHrPfCCGLCPrAFSRdHLALHMKRH	67,9
KLF2	CSyTNCGkTYTKSSHLKAHlRtHTGEkPyHCNwEGCGWkFARSDELTRHYRkHTGHrPfQCChLcDrAFSRdHLALHMKRH	67,9
KLF3	CdYdGCNKVYTKSSHLKAHRRtHTGEkPyKCTWEGCTWkFARSDELTRHFRkHTGikPpQCPCDcDrSfSRdHLALHRRKH	66,7
KLF4	CdYAGCGkTYTKSSHLKAHlRtHTGEkPyHCDWDGCgWkFARSDELTRHYRkHTGHrPfQCQKCDrAFSRdHLALHMKRH	67,9
KLF5	CdYpGCTkVYTKSSHLKAHlRtHTGEkPyKCTWEGCDWRfARSDELTRHYRkHTGAKPpCCGVCNRSfSRdHLALHMKRH	66,7
KLF6	CHfNGCRkVYTKSSHLKAHQRTHTGEkPyRCSWEGCEWRfARSDELTRHFRkHTGAKPpKCSHCDrCFSRdHLALHMKRH	67,9
KLF7	CQfNGCRkVYTKSSHLKAHQRTHTGEkPyKCSWEGCEWRfARSDELTRHYRkHTGAKPpKCNHCDrCFSRdHLALHMKRH	66,7
KLF8	CdfAGCSkVYTKSSHLKAHRRlHTGEkPyKCTWDGCsWkFARSDELTRHFRkHTGikPpRCTDCNRSfSRdHLSLHRrRH	66,7
KLF9	CPySGCGkVYVKSSHLKAHYRVHTGErPfpCTWpDCLkKfARSDELTRHYRtHTGEKQfRCPkRfMRSdHLTKHArRH	77,8
KLF10	CShPGCGkTYFKSSHLKAHvRtHTGEkPfsCSWKGCErFARSDELsRHRtHTGEKkFACPMCDrRfMRSdHLTKHArRH	79,0
KLF11	CsfPGCRkTYFKSSHLKAHlRtHTGEkPfnCSWDGCdKkFARSDELsRHRtHTGEKkFVCPVCDrRfMRSdHLTKHArRH	76,5
KLF12	CdfEGCNkVYTKSSHLKAHRRtHTGEkPyKCTWEGCTWkFARSDELTRHYRkHTGVkPpKACDcDrRfSRdHLALHArRH	66,7
KLF13	CHyAGCEkVYVKSSHLKAHlRtHTGErPfAcSWQDCNkKfARSDELARHYRtHTGEKkFSCPICEkRfMRSdHLTKHArRH	76,5
KLF15	CTfPGCSkMYTKSSHLKAHlRRtHTGEkPfACTWpGCGWRfARSDELsRHRSHsgVkpPyQCPVCEkKfARSdHLSKHlKVH	76,5
KLF16	CPfPDCAkAYYKSSHLKsHlRtHTGErPfAcDWQCGdKkFARSDELARHRRtHTGEKkRfSCPLCSkRfTRSDHLAKHArRH	76,5
BTEB5	CPfPGCTkAYYKSSHLKsHQRTHTGErPfsCDWLDcDKkFTRsDELARHYRtHTGEKkRfSCPLCPkQfSRdHLTKHArRH	76,5
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <span>ZF1</span> <span>ZF2</span> <span>ZF3</span> </div>	

Abb.1) Vergleich der Aminosäuresequenz der Zinkfinger Domäne der Sp1/KLF-Proteinfamilie. Der Sequenzumfang der 3 Zinkfinger ist unterhalb gekennzeichnet. Die Aminosäurereste, die mit der DNA interagieren sind mit Pfeilen oberhalb markiert, sie sind nahezu in allen Transkriptionsfaktoren identisch. Rechts ist die relative Übereinstimmung der Sequenzfolge der Transkriptionsfaktoren in Bezug auf Sp1 angegeben. Nach Kaczynski et al. (7)

Die größte Ähnlichkeit weisen dabei die Reste innerhalb der Zinkfinger auf, welche die DNA binden (8). Diese Tatsache dürfte dafür verantwortlich sein, dass die meisten Sp/KLF-Proteine an ähnliche DNA-Sequenzen, beispielsweise GC-Boxen oder CACCC Elemente, binden (1).

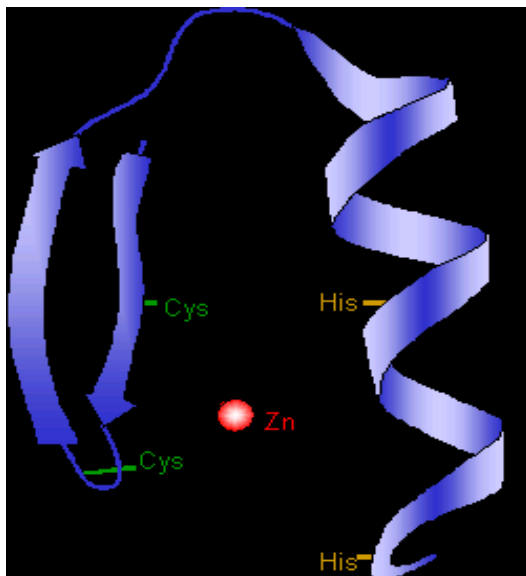


Abb.2) Das Zinkfingermotiv: Das  $\beta$ -Faltblatt und die  $\alpha$ -Helix werden durch ein Zinkion zusammengehalten. Das Zinkion wird koordiniert durch 2 Cysteinreste des  $\beta$ -Faltblattes und 2 Histidinreste der  $\alpha$ -Helix. (Abbildung entnommen aus: wikipedia.de Zinkfinger)

Wie in Abb.2) zu erkennen ist, besteht jeder Finger aus einem kurzen antiparallelen beta-Faltblatt und einer alpha-Helix, welche durch einen hydrophoben Kern und ein Zinkion zusammen gehalten werden. Das Zinkion wird koordiniert durch 2 Cysteinreste des beta-Faltblattes und 2 Histidinresten der alpha-Helix. Die DNA-Bindung der Zinkfinger erfolgt über den amino-terminalen Bereich der alpha-Helix, der sich in die große Grube der DNA einlagert und einen Kontakt zu guaninreichen Basenabschnitten herstellt (9).

Kristallographische Analysen legen den Schluss nahe, dass die Zinkfinger mit den G-reichen Stücken der 9-bp Erkennungssequenz in 3'-5' Richtung interagieren, beispielsweise Finger 3 mit den ersten 3 Nucleotiden, Finger 2 mit den mittleren und Finger 1 mit denen am 3'Ende (8).

In der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne sind auch die AS-Sequenzen zwischen den Fingern sehr ähnlich, immer aus 7 AS bestehend und dem Muster TGE(R/K) (P/k/r)(F/y)X entsprechend.

Während man also von einer weitestgehenden Konsistenz der „Sp1-ähnlichen Domäne“ bei allen Familienmitgliedern sprechen kann, ist die Struktur und Funktion der N-terminalen Domäne, die die Transkription reguliert, sehr variabel (2). Verschiedenste Motive erkennen unterschiedlichste Kofaktoren und wirken dabei als Transkriptionsaktivatoren oder Repressoren. In vielen Fällen können sie auch beides, aktivieren oder deaktivieren, je nach nukleärem Umfeld, in dem sie wirken.

### **1.2.3 Einteilung der Familie**

Wie bereits erwähnt, wurden in den letzten 15 Jahren immer neue Transkriptionsfaktoren entdeckt, die dem strukturellen Muster der Sp/Klf-Familie entsprechen. Neue Gene mit den dazugehörigen Proteinen wurden im menschlichen Genom beschrieben und die neu entdeckten Proteine wurden entsprechend dem Gewebe benannt, in dem man sie als erstes aufgefunden hatte. EKLF (Erythroid Krüppel-like factor) war der erste Faktor, den man zunächst in einer erythrozytären Mäusezelllinie gefunden hatte (10), LKLF (Lung Krüppel-Like factor (11), GKLF (Gut-enriched factor) (12) und IKLF (Intestinal-enriched factor) folgten. Weitere Forscher entdeckten bereits beschriebene Faktoren in anderem Zusammenhang, sowie anderem Gewebe, und benannten sie entsprechend der vermuteten Funktion. So entstand im Laufe der Zeit eine beinahe unüberschaubare Anzahl von Transkriptionsfaktoren, oft von verschiedenen Forschergruppen unterschiedlich benannt, die wenig Aufschluss über die strukturelle Ähnlichkeit dieser Transkriptionsfaktoren gab. In einer Richtlinie des HGNC (Human Gene Nomenclature Committee) wurde vorgeschlagen, im Sinne

einer größeren Systematik und Einheitlichkeit, neben der Sp-Proteinfamilie, alle Krüppel-like Faktoren vereinfachend mit einer Nummer zu benennen (13). Der Name Krüppel basiert dabei auf der Homology der DNA-Bindungsdomäne dieser Transkriptionsfaktoren zum Protein „Krüppel“, welches man in Drosophila gefunden hatte. Embryos der Taufliege, die homozygot für mutiertes Krüppel sind, sterben aufgrund veränderten thorakalen und abdominalen Körperbaus (14).

Protein	KLF number	Species	Chromosomal Localization	Transcriptional activity (and functional domains)	Expression pattern	Interacting coactivator and/or corepressor	Cellular functions
EKLF	KLF1	Human and mouse	19p13	Activator (acidic domain)	Erythroid and mast cells	P300/CBP, PCAF, SWI/SNF and mSin3A	Erythropoiesis
LKLF	KLF2	Human and mouse	19p13	Activator (acidic domain)	Lung, blood vessels, lymphocytes	Unknown	Blood vessel, lung development, T-cell survival
GKLF	KLF4	Human, mouse, rat and zebrafish	9q31	Activator and/or repressor (acidic domain)	Gut-enriched	p300/CBP	Anti-proliferation, survival
IKLF	KLF5	Human, mouse and rat	13q21	Activator	Gut and epithelial tissues	Unknown	Cell growth
CPBP	KLF6	Human and mouse	10p15	Activator	Ubiquitous	Unknown	Putative tumor suppressor
UKLF	KLF7	Human and mouse	2q32	Activator	Ubiquitous	Unknown	Cell-cycle arrest
BKLF3	KLF8	Human	Xp11	Repressor (PVDLS/T motif)	Ubiquitous	CtBP2	Unknown
BTEB1	KLF9	Human, mouse and rat	9q13	Activator/repressor (SID)	Ubiquitous	mSin3A	Neurite outgrowth and carcinogen metabolism
TIEG 1	KLF10	Human	8q22	Repressor (SID, R2, R3)	Ubiquitous	mSin3A	Apoptosis, anti-proliferation
TIEG2/ FKLF	KLF11	Human	2p25	Activator and/or repressor (SID, R2, R3)	Ubiquitous	mSin3A	Anti-proliferation
AP-2rep	KLF12	Human, mouse, rat and zebrafish	13q21	Repressor (PVDL S/T motif)	Brain, kidney, liver and lung	CtBP1	Unknown
BTEB3/ RFLAT-1/ FKLF-2	KLF13	Human, mouse and rat	15q12	Activator/repressor (SID, R2 and R3)	Ubiquitous	mSin3A, p300/CBP and PCAF	Anti-proliferation and carcinogen metabolism

Tabelle1) Von links nach rechts zeigt die Tabelle die KLF1-13 mit deren ursprünglichen Bezeichnungen. Daneben die Spezies in denen die Faktoren bisher isoliert werden konnten und die chromosomale Lokalisation im Genom. In der 5. Spalte ist der Einfluss des jeweiligen Faktors auf die Transkription zu sehen, daneben ihr Vorkommen im Gewebe. Cofaktoren, die essentiell für die Wirkung der KLF sind, werden in Spalte 7 erwähnt, ganz rechts die Bedeutung, die man dem jeweiligen Faktor auf zellulärer Ebene zuschreibt.

Die Familie menschlicher Sp/KLF Faktors umfasst aktuell 9 Sp-Proteine und 16 KLF. Für die KLF1-13 zeigt Tabelle 1 u.a. die Spezies, in denen die Faktoren isoliert werden konnten und ihre chromosomale Lokalisation.

Die Unterscheidung in Sp-Proteine und KLFs mag willkürlich erscheinen, doch bleibt sie dahingehend gerechtfertigt, als Sp-Proteine untereinander eine höhere Verwandtschaft besitzen, die sich durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten auszeichnet. Sp1-Sp4 bilden eine Untergruppe, in der jeder Transkriptionsfaktor neben der Aktivierungs- und/oder Inhibierungsdomäne, typische funktionelle Sequenzen, die man als Btd Box und Sp-Box bezeichnet hat, enthält. Sp5-Sp8 sind strukturell sehr ähnlich und unterscheiden sich nur dadurch, dass das N-terminale Ende verkürzt vorliegt (15,16). Wie in Abb.1) ersichtlich, beträgt die Ähnlichkeit der AS-Sequenz in der Zinkfingerregion, im Vergleich zur Sequenz von Sp1, innerhalb der Sp-Familie mindestens 84%. Die Sequenzübereinstimmung der KLF-Proteine mit Sp1 ist weitaus geringer.

All die erwähnten Gemeinsamkeiten rechtfertigen die Existenz der Sp-Subgruppe, die aber, wie weiter oben erläutert, als sehr nah verwandt zu den KLF gesehen wird.

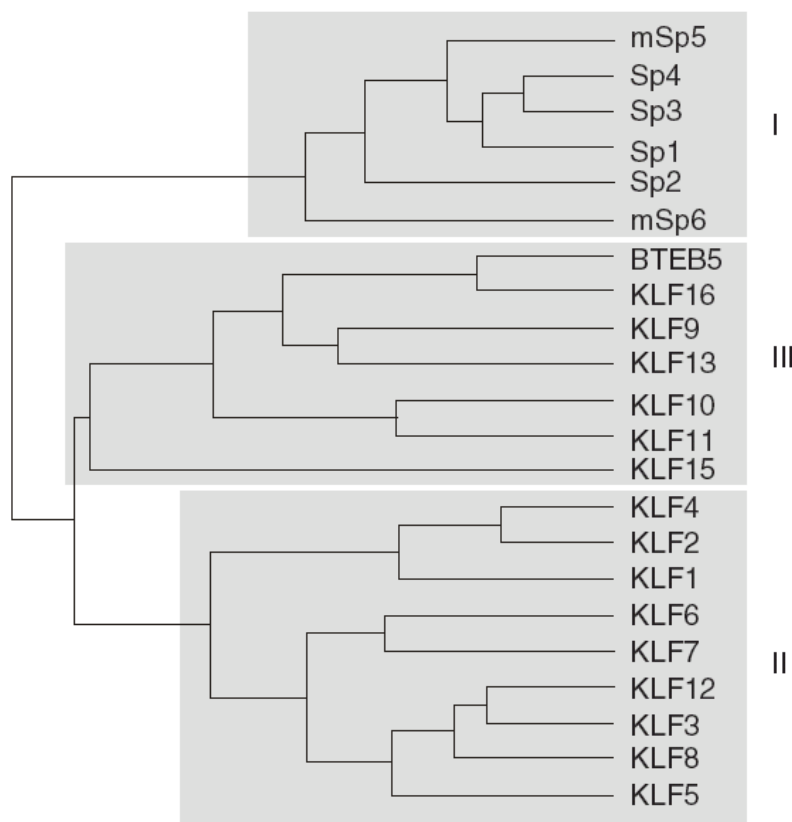


Abb.3) Phylogenetische Verwandtschaft der menschlichen Sp1-like/KLF Proteine und des murinen Sp5 und Sp6. Es konnten 3 Subgruppen identifiziert werden. Die 1.Untergruppe (Sp1-Sp6) enthält die Proteine, die Sp1 am ähnlichsten sind. Die KLF werden in zwei weitere Untergruppen eingeordnet. Die Einteilung erfolgte durch spezielle Gensequenz Analyse-Software. Nach Kaczynski et al. (7)

Auch innerhalb der Familie der KLF scheint es Untergruppen zu geben. Durch Vergleich der Zinkfingersequenzen aller bekannter KLF gelang es, ein Cladogram zu erzeugen (siehe Abb. 3), welches die phylogenetische Verwandtschaft der SP/KLF-Faktoren zeigt. Neben den Sp-Proteinen bilden die KLF9, 10, 11, 13, 15, 16 die zweite Subgruppe, die restlichen KLF die dritte (7).

### **1.3 Das Mononukleäre Phagozytensystem**

Unter dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) werden die Monozytenvorläufer im Knochenmark, die Monozyten im Blut, die Makrophagen im Gewebe und weitere von Monozyten abstammende Zellen zusammengefasst (17), zum Beispiel antigenpräsentierende dendritische Zellen. Zellen des MPS übernehmen im Organismus zahlreiche physiologische und pathophysiologische Aufgaben. Sie spielen eine wichtige Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems, sind aber auch zum spezifischen Immunsystem vernetzt. Die Monozyten entwickeln sich aus einer myeloischen Stammzelle über Zwischenstufen und gehen dabei vom Knochenmark aus ins Blut über. Sie zirkulieren in der Blutbahn des Menschen mit einer Halbwertszeit von 1-3 Tagen bevor sie ins Gewebe eintreten und dort zu ortsständigen Makrophagen werden (18). Sie weisen eine hohe strukturelle und funktionelle Heterogenität auf. Man findet sie in lymphoiden Organen, in der Leber als so genannte Kupffer'sche Sternzellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, im Gastrointestinaltrakt als intestinale Makrophagen, im ZNS als Mikroglia, im Knochen als mehrkernige Osteoklasten und in der Haut als Langerhans-Zellen (20).

Neben der beschriebenen Entwicklung zum Makrophagen können sich Monozyten auch in sog. dendritische Zellen (DC), ausdifferenzieren. Diese DCs unterscheiden sich von den Makrophagen strukturell und funktionell. Sie besitzen gegenüber Makrophagen eine tausendfach erhöhte Fähigkeit zur Antigenpräsentation, sind aber nur eingeschränkt zur Phagozytose fähig. Sie können aus Monozyten in einer Kultur durch Behandlung mit GM-CSF und IL-4 entstehen (21). Die genaue Ontogenese der DCs und ihre Stellung innerhalb des MPS ist nach wie vor nicht abschliessend geklärt. (vgl. hierzu 1.3.2)

#### **1.3.1 Ontogenese der Makrophagen**

Im hämatopoetischen System existieren selbsterneuernde totipotente Stammzellen, die sich zu allen Blutzellen weiterentwickeln können. Die linienspezifische Differenzierung findet unter

bestimmten Bedingungen statt, bei denen Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eine große Rolle spielen (22). Eine ineinandergreifende Kaskade von Genaktivierung und Genunterdrückung führt letztlich zur Differenzierung in die jeweilige Blutzelle. Im Knochenmark ist der Einfluß der Interleukine IL-1, IL-3 und IL-6 für die Differenzierung der totipotenten Stammzelle zur GEMM-CFU (granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony forming unit) verantwortlich, woraus sich unter Einfluss von IL-1 und IL-3 die GM-CFU (granulocyte-macrophage colony forming unit) bildet (23). Eine besondere Rolle dürfte hier PU.1 zukommen, einem Transkriptionsfaktor der Ets-Familie. Es hat sich gezeigt, dass die PU.1 Expression während der frühen gemeinsamen granulozytären und monozytären Differenzierung stark hochreguliert wird, während PU.1 bei der weiteren erythrozytären Entwicklung unverändert exprimiert wird (24). Unter dem Einfluß des PU.1 Transkriptionsfaktors kommt es zur verstärkten Expression des M-CSF-Rezeptors auf der Oberfläche der gemeinsamen Vorläuferzellen und somit zur Weiterdifferenzierung in der myelomonozytären Linie (23). Entscheidend verantwortlich dafür, ob nun eine Weiterentwicklung innerhalb der monozytären oder myeloischen Linie stattfindet, dürften die Vertreter der C/EBP Familie von Transkriptionsfaktoren sein. C/EBP $\alpha$  bindet an den G-CSF-Promotor-Rezeptor (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) und induziert so dessen Expression (24) und fördert damit die Ausreifung der granulozytären Linie. Durch Hochregulation von PU.1 dagegen schlägt die Stammzelle für Granulozyten und Monozyten den Weg in die monozytäre Differenzierung ein, was seine Ursache unter anderem an der durch PU.1 verstärkten Expression des M-CSF-Rezeptors hat (22). PU.1 und C/EBP $\alpha$  sind zwar in der monozytären und granulozytären Linie vorhanden, allerdings zeigen Makrophagen hohe PU.1 und niedrige C/EBP $\alpha$  Expressionslevel und im Falle von Neutrophilen ist dieses Verhältnis umgekehrt (25).

Der Einfluß von Interleukin-3 und M-CSF/ GM-CSF führt schließlich zur Ausreifung der Monozyten (17). Sie verlassen das Knochenmark und werden durch die peripheren Blutgefäße in das jeweilige Gewebe transportiert, in dem sie sich zu den gewebetypischen Makrophagen entwickeln. Die Differenzierung zu Makrophagen beinhaltet Wachstum auf der einen Seite, sowie steigende lysosomale Aktivität auf der anderen Seite; ausserdem enthalten Makrophagen eine höhere Konzentration hydrolytischer Enzyme (22). Obwohl die Gewebemakrophagen ursprünglich aus den zirkulierenden Monozyten entstehen, haben sie ihre Fähigkeit zur Proliferation nicht verloren und sind in ihrem Fortbestand nicht vollständig von den Knochenmarksmonozyten abhängig (26).

### 1.3.2 Ontogenese der dendritischen Zellen

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Biologie von dendritischen Zellen ist deren Ontogenese nicht endgültig geklärt und stellt weiterhin ein sehr umstrittenes Feld in der Immunologie da (27). Die morphologische und funktionelle Ähnlichkeit der dendritischen Zellen mit Monozyten und Makrophagen führte zunächst zu der Annahme, dass DCs von myeloischen Zellen abstammen würden (28). Erst die Entdeckung, dass sich eine Subgruppe von DCs auch aus einer CD4 negativen Vorläuferzelle bilden konnte, aus der T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen hervorgehen, aber niemals myeloische Zellen, machte die Existenz lymphozytär abstammender DCs wahrscheinlich (29). Trotz intensiver Forschung bleibt der genaue Ablauf der physiologischen Differenzierung der DCs weiter unklar, da vermutet werden muss, dass die in vivo Differenzierung anders verläuft als unter experimentellen Bedingungen. In einem Review zeigt Ardavin et al. (29) zwei grundsätzlich unterschiedliche Modelle zur Abstammung und Entwicklung der DCs.

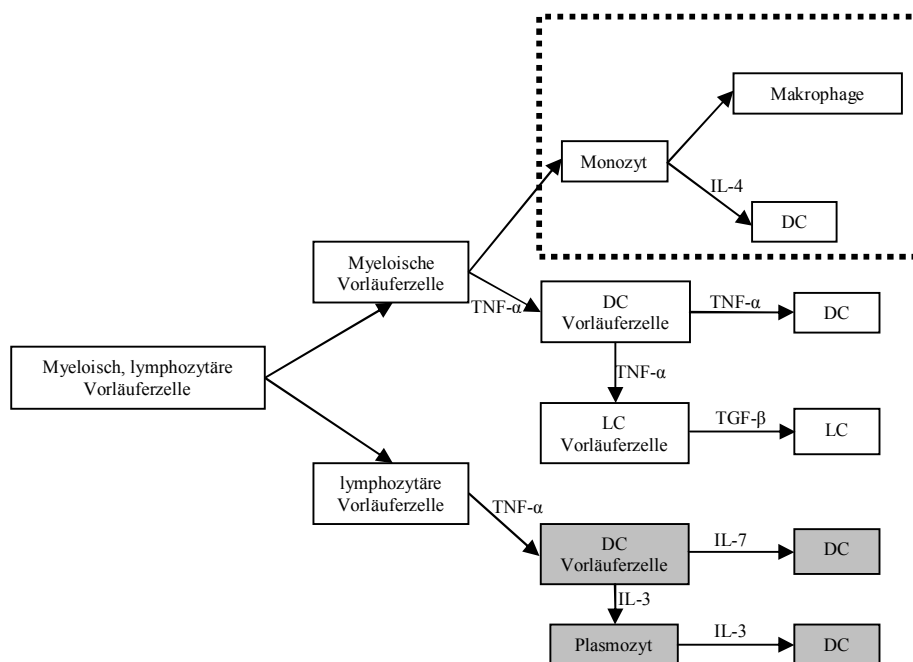


Abb.4) Modell a zur Differenzierung menschlicher dendritischer Zellen (DC). Dieses derzeit bei der Mehrzahl der Wissenschaftler favorisierte Modell geht davon aus, dass es zwei weitestgehend unabhängige Differenzierungswege für DC gibt. Aus der myeloischen Vorläuferzelle gehen letztendlich die DC der lymphatischen Organe und die Langerhanszellen (LC) hervor. Aus einer lymphozytären Vorläuferzelle entstehen die lymphozytären DC zu denen die DC des Thymus und die Plasmozyten gehören. Nach Ardavin et al. (29)

Modell a (Abb.4) sieht die Koexistenz von 2 parallelen und unabhängigen Differenzierungswegen vor, entweder über eine myeloische oder eine lymphozytäre

Vorläuferzelle. Die Hauptgruppe der DCs, nämlich die, welche man in der Haut und in lymphozytären Organen findet, und die Langerhans Zellen, wären demnach myeloischen Ursprungs. Lymphozytären Ursprungs wären demnach die DCs des Thymus, interstitielle DCs und die plasmazytären DCs.

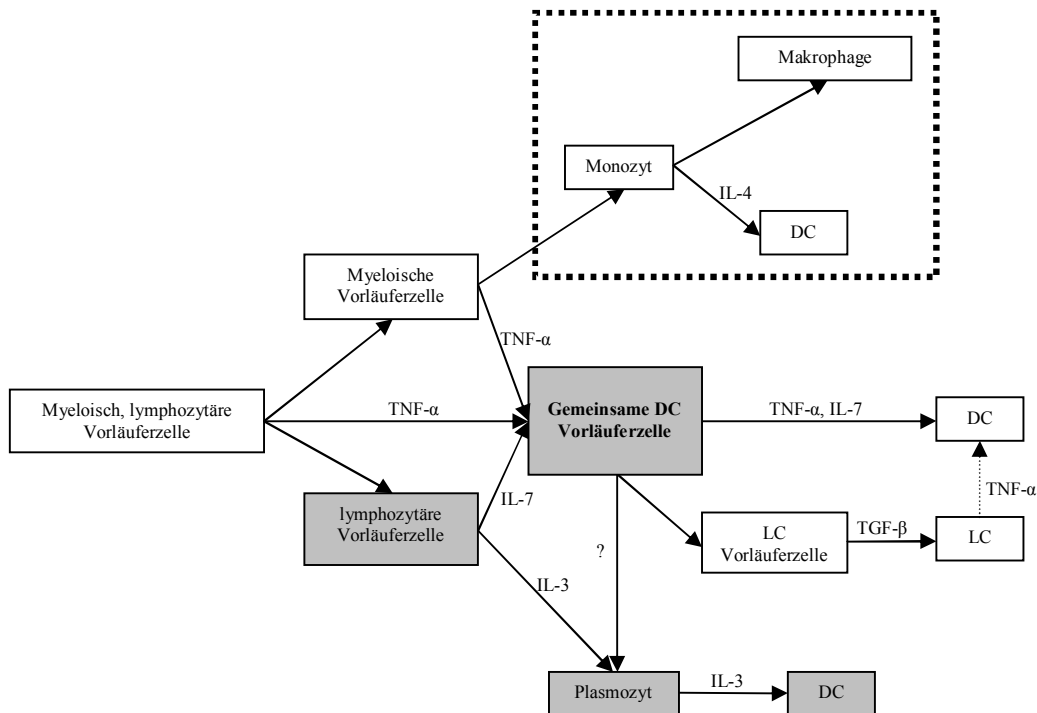


Abb.5) Modell b zur Differenzierung menschlicher dendritischer Zellen (DC). Dieses alternative Modell geht davon aus, dass es eine gemeinsame Vorläuferzelle für die meisten, wenn nicht sogar alle DC gibt. Nach Ardavin et al. (29)

Modell b (Abb.5) sieht eine gemeinsame DC Vorläuferzelle vor, die sich aus myeloischen, lymphozytären oder einer noch ursprünglicheren Vorläuferzelle im Knochenmark oder extramedullär entwickeln könnte. Eine Einteilung der DCs in eine myeloische oder lymphozytäre Linie ist bei diesem Modell nicht möglich. Übereinstimmend in beiden Modellen können sich DCs aber auch direkt aus Monozyten entwickeln. Die DCs, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind auf diesem, experimentell gesicherten, Differenzierungsweg gewonnen worden.

## 2. Zielsetzung

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich schwerpunktmässig mit der Differenzierung von Zellen des mononukleären Phagozytensystems. Im Zentrum der wissenschaftlichen Aktivitäten steht die grundlegende Fragestellung, wie Gene zellspezifisch oder differenzierungsabhängig reguliert werden, vor allem welchen Einfluss epigenetische Mechanismen und Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression haben. In den letzten Jahren erweckte die Gruppe von KLF Transkriptionsfaktoren in der Molekularbiologie zunehmende Aufmerksamkeit, da man ihnen eine wichtige Rolle in der Regulation unterschiedlichster Gene zuschreibt.

Diese Arbeit sollte aus der großen Gruppe der bekannten KLF-Transkriptionsfaktoren diejenigen herausfinden, bei denen während der Monozytendifferenzierung eine starke Regulation vorhanden ist, die also eine potentiell wichtige Rolle bei der Differenzierung spielen könnten. Mithilfe der reversen Transkription und anschliessender Real-time PCR sollte versucht werden die KLF zu identifizieren, wo starke Unterschiede hinsichtlich der relativen mRNA Expressionslevel bestehen, um dann die Regulation dieser Proteine proteinchemisch zu verifizieren. Ziel sollte es sein, eine Vorstellung von der Bedeutung der KLF auf die Genregulation im MPS zu bekommen. Zum näheren Verständnis wie KLF als Aktivatoren oder Repressoren der Genexpression wirken, sollte mit mehreren, potentiell bedeutsamen KLF-Proteinen versucht werden, die Expression eines ausgewählten exemplarischen Genes zu aktivieren und zu unterdrücken.

Fernziel derartiger Untersuchungen ist es, näheren Einblick in die Regulation der unspezifischen zellulären Abwehr innerhalb des Immunsystems des Menschen zu gewinnen, als wichtige Voraussetzung für die Entwicklung immunmodulatorischer Therapien.

## 3.Material

### 3.1.Geräte

Autoklav	Walter, Geislingen
Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Brutschränke	Heraeus, Osterode
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Densitometer	Molecular Dynamics, Krefeld
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Entwicklungsanlage	Agfa, Köln
LightCycler	Roche, Mannheim
Luminometer Sirius	Berthold, Oakville, Kanada
Mikroskope	Leitz, Heidelberg
Mikrowelle (Privileg 8020)	Quelle, Nürnberg
PCR-Thermocycler (Modell 4800)	Perkin Elmer, Überlingen
PCR-Thermocycler (Modell PTC-200)	MJ-Research/Biometra, Oldendorf
pH-Meter	Knick, Berlin
Photokamera	Polaroid, Cambridge, USA
Sterilbank (Lamin Air: HA 2472)	Heraeus, Osterode
Thermomixer (Modell 5436)	Eppendorf, Hamburg
Wasserbäder	Julabo, Seelstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen:	
Varifuge 20 RS	Heraeus, Sepatech
Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Multifuge 3S-R	Heraeus, Osterode
Picofuge	Heraeus, Osterode
Micro-Centrifuge II	Labtech, Korea

### 3.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (ECL)	Amersham, Braunschweig
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturplatten (6,24,96 wells)	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15, 50, 250 ml)	Falcon, Heidelberg

### 3.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

### 3.4 Antikörper

Name	Immunglobulin	Konzentration	Firma
KLF1	Hase	1:1000	Santa Cruz
KLF3	Hase	1:2000	Santa Cruz
KLF6	Hase	1:100	Santa Cruz
KLF8	Hase	1:1000	Santa Cruz
KLF12	Hase	1:1000	Santa Cruz

### 3.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

Plasmid DNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Promega, Madison, USA
Protease Inhibitor Set	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim, Roche, Mannheim
Reverse Transkriptase Superskript II	Gibco BRL, Eggenstein
RNase Inhibitor	Amersham, Braunschweig

### 3.6 Molekulargewichtstandards

#### DNA-Längenstandards:

1 Kbplus Leiter						Gibco BRL, Eggenstein				
100	200	300	400	500	650	850	1000	1650	2000	3000
4000	5000	6000	7000	8000	9000	10000	11000	12000	bp	

#### Molekulargewichtsstandarts für Proteine

Kaleidoscope Prestained Standards						Bio Rad, CA, USA				
198	126	81	40	31	17	7 kDa				

### 3.7 Vektoren

pGL3-Basic	(Reporterplasmid)	Promega, Madison, USA
pMT3	(Expressionsplasmid)	
pMT2-hKLF6	(Expressionsplasmid)	
pMT2-hKLF8	(Expressionsplasmid)	
pCMV	(Expressionsplasmid)	
MADpro 450 bp	(Reporterplasmid)	
MADpro 150 bp	(Reporterplasmid)	

### 3.8 Primersequenzen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz in 5'-3' Richtung</b>
KLF 1 S	CGGCAAGAGCTACACCAAGAG
KLF 1 AS	AACAGGCTTCTTGTCCCATCC
KLF 2 S	CAAGACCTACACCAAGAGTTCGC
KLF 2 AS	CACAGATGGCACTGGAATGG
KLF 4 S	ACAAAGAGTTCCCATCTCAAGGC
KLF 4 AS	TGTGTTTACGGTAGTGCCTGGTC
KLF 5 S	GAAACGACGCATCCACTACTG
KLF 5 AS	TCCCAGGTACACTTGTATGGC

KLF 6 S	CAAGGGAAATGGCGATGC
KLF 6 AS	CATCACTTCTTGCAAAACGCC
KLF 7 S	TACAACTTGTCCACGACACCG
KLF 7AS	AGCTTTCCTCAATGCACGG
KLF 8 S	AGGGACTACAGCAAGAACCAGC
KLF 8 AS	TGTATGGATTCTGCGGTGAGC
KLF 9 S	GAAAATCCTCCCATCTCAAAGC
KLF 9 AS	AGCGGACAGCGGAACTG
KLF 10 S	TAAGGAGTCACATCTGTAGCCAC
KLF 10 AS	GGACAGTTCATCAGAACGGG
KLF 11 S	ACCTACTTCAAAGTTCCCACC
KLF 11 AS	CATGAAACGTCGGTCACACAC
KLF 12 S	TGGAATCTGAACAAGGGTCTCC
KLF 12 AS	ATTGACAAGTCCACTGGCTCAG
KLF 13 S	AAGCACAAGTGCCACTACGC
KLF 13 AS	GAACTTCTTGTTGCAGTCCTGC
KLF 15 S	ATGTACACCAAAGCAGCCAC
KLF 15 AS	TCTCGCACACAGGACACTGG
KLF 16 S	GCAAACCCTGAAGACACCC
KLF 16 AS	ACCAGGTCCCAGTGATCAGC
CHI3L1 S	AAGGTCACCATTGACAGCAGC
CHI3L1 AS	CCTCAACATGTACCCCACAGC
CCL13 S	CTGAAGAGCTATGTGATCACCACC
CCL13 AS	GTAGCAGAGTTCAAGTCTTCAGGG
MADDAM S	AGG ATG TTG TAT GGA GGC C
MADDAM AS	TCC TGC CAC ATT CAC CTT

ADAM19 S	AGGATGTTGTATGGAGGCC
ADAM19 AS	TCCTGCCACATTCACCTT
Actin-β S	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
Actin-β AS	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
CPM S	TATACTCCCGAAGCTTAACGCC
CPM AS	ATGTAGTTGTAATCTTGCATTCCACC

### 3.9 Zelllinien und Bakterien

#### Eukaryonte Zelllinien:

THP-1	humane monozytäre Leukämiezelllinie (DSM ACC 16)
HT 29	humane Coloncarzinomzellen (DSM ACC 299)
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie (DSM ACC 57)

#### Bakterienstämme

DH10B	<i>E.coli</i> Bakterien
-------	-------------------------

## 4. Methoden

### 4.1 Zellbiologische Methoden

#### 4.1.1 Kultivierung von Bakterien

##### Anlegen einer Bakterienflüssigkultur

###### Reagenzien:

LB-Medium	10 g	NaCl
	10 g	Bactotryptone
	5 g	Hefeextrakt
ad 1000 ml mit aqua bidest, autoklavieren		

###### Arbeitsablauf:

Die ampicillinresistenten Bakterienstämme wurden in LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert.

##### Herstellung einer LB-amp-Platte

###### Reagenzien:

LBamp-Platte	15 g	Agar
	1000 ml	LB-Medium
	100 µg/ml	Ampicillin

###### Arbeitsablauf:

Das LB-Medium wird mit dem Agar vermischt und mehrmals unter stetigem Rühren aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind. Nach Abkühlen auf 60°C wird Ampicillin hinzu gegeben. Dann verteilt man das Gemisch auf die Kulturplatten und lässt es Abkühlen.

Mit einer Impföse ausgestrichene Bakterien wachsen bei 37°C über Nacht.

##### Herstellung einer Glycerinkultur

Eine dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen findet bei -80°C statt. Dazu wird 600 µl einer 1:1 Mischung aus Glycerin und LB-Medium mit 600µl der jeweiligen Bakteriensuspension gemischt und in Kryroröhrchen auf -80°C gestellt.

## 4.1.2 Kultur eukaryontischer Zellen

### **Kulturbedingungen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5 %CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zelllinien THP-1 und HT29 wurden in RPMI 1640 Nährmedium (Gibco) mit 10% hitzeinaktiviertem FKS und den Zusätzen L-Glutamin (2 mM), 2 ml Vitamine, Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), Natriumpyruvat (1 mM), 2-Mercaptoethanol (50 µM) kultiviert. (alle Zusätze Fa. Gibco, Eggenstein). Alle Zelllinien wurden in regelmässigen Abständen mittels eines ELISAs (Mycoplasmen Detection Kit, Fa. Roche) laut Anleitung des Herstellers auf Mycoplasmen untersucht.

### **Passagieren**

Nicht-adhärenente Zellen (THP-1) wurden zum Passagieren abzentrifugiert (8 min, 1200 rpm, 4°C) mit PBS (4°C) gewaschen, erneut zentrifugiert und in frisches Medium, in neue Zellkulturflaschen 1:10 verdünnt aufgenommen.

Adhärenente HT29-Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5 min mit 0,05% Trypsin; 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die abgelösten Zellen in frisches Medium, in neue Zellkulturflaschen 1:10 verdünnt aufgenommen.

### **Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung**

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstestes bestimmt. Dabei verdünnt man die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau (0,2% in physiologischer Kochsalzlösung) und betrachtet die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Tote Zellen färben sich dunkel, lebende färben sich nur schwach an. Zählt man die lebenden Zellen eines Großquadrates (=16 Kleinquadrate) der Zählkammer aus, so berechnet sich die Zellzahl in einem ml durch folgende Formel:

$$z \text{ [Zellen/ml]} = Z \times V \times 104$$

Z= Zahl der vitalen Zellen eines Großquadrats (1 mm<sup>2</sup>)

V= Verdünnungsfaktor

## **Einfrieren**

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in eiskaltem Einfriermedium (50% RPMI, 40% FCS, 10% DMSO) suspendiert. Nach dem Überführen in Kryoröhrchen wurden die Zellen 24 h bei -70°C gelagert, um dann längerfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt zu werden.

## **Auftauen:**

Die stickstoffgekühlten Zellen wurden in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und in vorgewärmtes Medium aufgenommen. Zum Entfernen von DMSO-Rückständen wurden die Zellen abzentrifugiert (300x g, 8 min 4 °C) und in frischem Medium resuspendiert.

## 4.1.3 Gewinnung und Kultur primärer Zellen

### **4.1.3.1 Elutriation von Monozyten**

#### Reagenzien:

Ficoll-Paque ( Pharmacia, Freiburg)

PBS

PBS/6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

HANKS "Balanced Salt Solution" mit 6 % autologem Blutplasma

#### Arbeitsprotokoll:

Von gesunden Spendern wurde in einer Leukaphrese ein Leukozyten angereichertes Blutkonzentrat gewonnen (Graw et al. 1977). Die mononukleären Zellen (MNC) wurden aus dem Konzentrat durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque isoliert und dreimal mit PBS gewaschen (Johnson et al. 1977). Die daraus folgende Monozytenisolierung erfolgte über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (Sanderson et al. 1977).

#### Einstellungsparameter bei der Elutriation:

<b>Fraktion</b>	<b>Durchflußrate Pumpe (ml/min)</b>	<b>Enthaltene Zellen</b>
1a	52	Thrombozyten
1b	57	Kleine Lymphozyten
2a	64	Kleine Lymphozyten
2b	74	Kleine Lymphozyten
2c	92	Große Lymphozyten
3	111	Monozyten

Die Elutriation erfolgte in einer 50 ml Kammer mit einer Beckman-Zentrifuge. Kammer, Pumpe und Schlauchsystem wurden mit 6 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sterilisiert und zweimal für je 20 min mit PBS gespült. Die Eichung erfolgte bei einer konstanten Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2500 Upm bei 4 °C; bei einer Durchflußrate von 52 ml/min wurde die Kammer mit den MNC beschickt. Bei konstantem Zulauf von HANKS wurde die Durchflußrate schrittweise gesteigert und die obenstehende Fraktion gesammelt. Der Anteil an CD14-positiven Zellen (Monozyten) in Fraktion 3 wurde immunhistochemisch oder durch Durchflußzytometrie bestimmt. Die Reinheit der Monozytenfraktion lag zwischen 60- 90%. Die Monozyten wurden bei 1200 Upm abzentrifugiert und in Medium (RPMI 1640) aufgenommen.

#### **4.1.3.2 Kultivierung von Makrophagen**

Frisch elutrierte Monozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in hydrophoben Teflonbeutel eingesät. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 2 % humanem AB-Serum verwendet. Nach 7 Tagen wurden die Zellen durch Reiben der Teflonmembran gelöst und mikroskopisch auf ihre Morphologie hin untersucht.

#### **4.1.3.3 Kultivierung dendritischer Zellen**

Die elutrierten Monozyten werden in RPMI 1640 Nährmedium (10% FCS angereichert) mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml gesät. Durch Zugabe von rGM-CSF (100U/ml) und rIL-4 (50 U/ml) entwickeln sich innerhalb von 10 Tagen dendritische Zellen. Zur Reifestimulation wurde ein Teil der dendritischen Zellkultur an Tag 7 mit LPS (100ng/ml) stimuliert.

#### 4.1.4 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effektene (Qiagen)

Die Transfektion der eukaryontischen Zelllinie HT29 erfolgte mit Hilfe des Effectene™ Transfection Reagent Ansatzes von Qiagen. Hierbei handelt es sich um eine nicht liposomale Lipidformel, die mit einem Enhancer und einem Puffer EC bindet und so unter Komplexbildung Plasmid-DNA in die eukaryontische Zelle einbauen kann.

##### Arbeitsablauf:

26 Eppendorfcups (1,5ml) werden beschriftet und mit den entsprechenden Plasmiden gemäß folgendem Pippitierschema versetzt:

	<b>Plasmid Reporter</b>	<b>Expressionsplasmid 1</b>	<b>Expressionsplasmid 2</b>
1,2	1,6 µl basic	2,4 µl 699	-----
3,4	1,6 µl basic	1,2 µl 702	1,2 µl 699
5,6	1,6 µl basic	1,2 µl 699	1,2 µl 703
7,8	1,6 µl basic	1,2 µl 702	1,2 µl 703
9,10	1,6 µl 450 MAD	2,4 µl 699	-----
11,12	1,6 µl 450 MAD	1,2 µl 702	1,2 µl 699
13,14	1,6 µl 450 MAD	1,2 µl 699	1,2 µl 703
15,16	1,6 µl 450 MAD	1,2 µl 702	1,2 µl 703
17,18	1,6 µl 150 MAD	2,4 µl 699	-----
19,20	1,6 µl 150 MAD	1,2 µl 702	1,2 µl 699
21,22	1,6 µl 150 MAD	1,2 µl 699	1,2 µl 703
23,24	1,6 µl 150 MAD	1,2 µl 702	1,2 µl 703
25,26	1,6 µl CMV	2,4 µl 699	-----

Man fügt jeweils 1 µl Renilla, 292µl EC Puffer und 16 µl Enhancer hinzu, schüttelt kräftig, und inkubiert die Suspension für 5 min (bei 37°C). Anschliessend werden 50 µl effectene in jedes Eppendorfcup hinzugemischt und für weitere 8 min inkubiert. Diese Ansätze gibt man vorsichtig auf das entsprechend nummerierte Kompartiment der 6-Loch-Platten, schwenkt die 6-Loch-Platten vorsichtig und stellt diese bis Tag 3 in den Brutschrank (bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

#### 4.1.5 Luciferase Assay (Promega)

Koppelt man an den MADDAM-Promotor ein Reporteragen, dessen Expression direkt proportional zu einer messbaren Proteinaktivität ist, so kann damit indirekt auf die Aktivität des Promotors geschlossen werden. Messgröße des „Promega’s Renilla Luciferase Assay System“® ist die Luciferaseaktivität.

### Reagenzien:

Renilla Luciferase Assay Lysis Buffer

Renilla Luciferase Assay Reagent

Stop and Glow Reagent

PBS

### Arbeitsablauf:

Das Nährmedium wird von den transfizierten, adhärennten Zellen abgenommen und die Zellen werden mehrmals mit PBS gewaschen. Anschliessend gibt man 350-500 µl Renilla Luciferase Assay Lysis Puffer hinzu, so dass die Zellschicht vollständig überdeckt ist. Auf einem Schüttler werden die 6-Loch-Platten nun für 15 min bei 20°C geschwenkt und danach in EppendorfCups (für 7-8min bei max g) abzentrifugiert. Jeweils 20 µl des Zelllysats werden mit 100µl des Renilla Luciferase Assay Reagent vermischt und auf dem Luminometer vermessen. Zur Bestimmung von Renilla als Referenz wurde die Mischung anschließend mit 100 µl "Stop and Glow"- Reagenz gemischt, gevortext und erneut im Luminometer vermessen.

## 4.2 Proteinchemische Methoden

### 4.2.1 Zellkernextraktion durch hypotonische/Nonidet P-40 Lyse (Roche) von Makrophagen und dentrischen Zellen

#### Reagenzien:

PBS

Puffer A:

100µl (10 mM)	HEPES (1M) pH7.9; 4°C
100µl (10 mM)	KCl (2 M)
15 µl (1.5 mM)	MgCl <sub>2</sub> (1 M)
50 µl (0.5 mM)	DTT (100 mM)
10 µl (20 µg/ml)	Antipain (20 µg/µl)
40 µl (80 µg/ml)	Chymostatin (20 µg/µl)
5 µl (10 µg/ml)	E64 (20 µg/µl)
25 µl (2,5 µg/ml)	Leupeptin (1 µg/µl)
10 µl (1 µg/ml)	Pepstatin (1 µg/µl)

10 µl (2 µg/ml)           Aprotinin (2 µg/µl)  
 100 µl (1,0 mM)        PMSF (100 mM)  
 100 µl (1,0 mM)        Sodium-o-vanadate (100 mM)  
 ad 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>millip</sub>

Puffer B:

Zellen	Endkonzentration	Puffer A	NP-40
Hela	0,3 %	940 µl	60 µl
THP-1	0,5 %	900 µl	100 µl
MAK	0,5 %	900 µl	100 µl
DC's	0,4 %	920 µl	80 µl

Puffer C:

20 µl (20 mM)           Hepes (1 M) pH 7,9; 4°C  
 84 µl (420 mM)        NaCl (5 M)  
 310 µl (25 %)         Glycerol (80%)  
 1,5 µl (1,2 mM)       MgCl<sub>2</sub> (1 M)  
 0,4 µl (0,2 mM)       EDTA (0,5 M) pH 8,0  
 5 µl (0,5 mM)         DTT (100 mM)  
 2,5 µl (50 µg/ml)     Antipain (20 µg/µl)  
 8 µl (160 µg/ml)     Chymostatin (20 µg/µl)  
 1 µl (20 µg/ml)       E 64 (20µg/µl)  
 5 µl (5,0 µg/ml)     Leupeptin (1 µg/µl)  
 1 µl (1 µg/ml)        Pepstatin (1 µg/µl)  
 5 µl (0,5 mg/ml)     Pefabloc SC (100 µg/µl)  
 1 µl (2 µg/ml)        Aprotinin (2µg/µl)  
 10 µl (1,0 mM)       PMSF (100 mM)  
 10 µl (1,0 mM)       Sodium-o-vanadate (100 mM)  
 ad 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>millip</sub>

Arbeitsablauf:

Die geernteten Zellen (min 10x 10<sup>6</sup>) wurden dreimal mit PBS (10 ml, 4°C) gewaschen. (Zellwaschprogramm der Zentrifuge, Überstand wurde verworfen). Währenddessen wurde der hypotone Puffer A frisch erstellt. Nachdem die Zellen das 3. Mal in PBS aufgenommen wurden, erfolgte die mikroskopische Zählung von 50µl der mit Trypanblau angefärbten Zellen. Die restliche Suspension wurde erneut zentrifugiert und das entstandene Zellpellet so

mit Puffer A resuspendiert, dass eine einheitliche Konzentration von  $1 \times 10^7$  /ml entstand. Während der 3 minütigen Inkubationszeit der Suspension wurde Puffer B erstellt. Danach wurden die Zellen herunterzentrifugiert (6' 2000 Upm -9°C) und das entstandene Pellet in 150-200µl Puffer A und der gleichen Menge Puffer B aufgelöst. Die dadurch ausgelöste Lyse wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Die Inkubation mit dem Detergent Nonidet enthaltenden Puffer B wurde dann beendet, als die Zellen zum größten Teil lysiert erschienen. Bei erfolgter Lyse wurden die Zellen abzentrifugiert (6' 2000 Upm -9°C) und mit 500 µl Puffer A gewaschen und abermals zentrifugiert, um das restliche Detergent zu entfernen. Nun wurden die entstandenen Pellets in den zwischenzeitlich hergestellten Puffer C je nach Größe in 30-60µl resuspendiert und 8 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13 000 Upm 10' bei -9°C) wurde der Überstand mit den löslichen Kernbestandteilen in 22µl Aliquots eingefroren.

#### 4.2.2 Zellkernextraktion durch hypotonische/mechanische Lyse von Monozyten

##### Reagenzien:

PBS

Puffer A und C wie oben.

##### Arbeitsablauf:

Nachdem die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (10 ml) gewaschen (300rpm 6') worden sind, wurden sie ein weiteres Mal in PBS aufgenommen. 50µl dieser Suspension wurde mit Trypanblau (50µl) gefärbt, um die Zellkonzentration mikroskopisch mit Hilfe einer Zählkammer zu bestimmen. Anschliessend wird die übrige Suspension erneut abzentrifugiert (300 rpm 6'), das Zellpellet in Puffer A (200µl/  $50 \times 10^6$  Zellen) resuspendiert und in Eppendorftubes transferiert. Das entstandene Gemisch wurde 15 min auf Eis stehen gelassen, um die Zellen anschließend durch 12-15 maliges hoch-und-runterziehen durch eine 23-26 Gauge Injektionsnadel (ohne Luftblasen zu erzeugen) zu lysieren. Nach mikroskopischer Beobachtung der Lyse, erfolgte die Auftrennung des Lysats durch Zentrifugation (6' bei 2500 rpm bei -9°C) und Verwerfen des Überstandes. Das entstandene Pellet wurde nun in 133µl Puffer C unter Verwendung weiter Pipettenspitzen resuspendiert. Bei einer Temperatur von 4°C wurde das Gemisch 30 min im end-to-end Schüttler rotieren gelassen um es dann bei 10.000 rpm, 5 min abzentrifugieren. Aus dem Überstand wurden 20µl Aliquots erstellt, die dann bei -70°C eingefroren wurden.

### 4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Reagenzien:

Acrylamid-Stammlösung:	146 g Acrylamid
AA (30 %)	4,0 g BIS ad 500 ml mit aqua bidest.
Untergelpuffer:	90.83 g (1,5M) Tris/HCl pH 8.8 Ad 500 ml mit aqua bidest
Obergelpuffer:	30g (0.5M) Tris/HCl pH 6.8 Ad 500 ml mit aqua bidest
SDS-Stammlösung (10%):	10g (10%) SDS Ad 100 ml mit aqua bidest
Trispuffer TP (1.25M)	13g (1.25M) Tris/HCl pH 6.8 Ad 100 ml mit aqua bidest
SDS-Probenpuffer PP (2x)	10ml (20%) Glycerin 5 ml (125mM) TP (1.25M) 2-Mercaptoethanol (14.4 M) 10 mg Bromphenolblau Ad 50 ml mit aqua bidest
Ammoniumperusulfat AP (10%)	100mg (10%) Ammoniumpersulfat Ad 1 ml mit aqua bidest (täglich frisch hergestellt)
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)	15g (40mM) Tris 216 (0.95 M) Glycin 15 g (0,5%) SDS Ad 3000 ml mit aqua bidest

Laemmli-Elektrodenpuffer (1x)

Laemmli-Elektrodenpuffer (5x)

1/5 verdünnt

### Arbeitsablauf:

Je nach gewünschter Acrylamid (AA) Konzentration wurden zur Herstellung des Untergels Stammlösungen nach folgendem Pippitierschema erstellt:

Endkonzentration AA	7.5%	10%	12%	13,5%	15%
AA (30%)	25 ml	33ml	40 ml	45 ml	50 ml

25 ml                      Untergelpuffer

1.0 ml                     SDS (10%)

ad 100 ml                Aqua bidest

Von diesen Stammlösungen wurden am Vortag der geplanten Elektrophorese 6 ml mit 6 µl TEMED und 30µl frisch hergestelltem AP (10%) vermischt und dann in eine Elektrophoresekammer gegossen. Um eine glatte Begrenzung des Gels zu erhalten wurde das Gel anschließend mit wenigen Tropfen wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach halbstündiger Polymerisation unter 20°C wurde das Isobutanol wieder entfernt um über Nacht vollständig im Kühlschrank zu Polymerisieren.

Am nächsten Tag wurde zunächst das 5% ige Obergel hergestellt. Hierfür wurde wiederum eine Stammlösung verwendet, die sich folgendermassen zusammensetzte:

Obergelpuffer                      25 ml

SDS (10%)                            1ml

AA (30%)                              16.65 ml

Aqua bidest                           57.35 ml

Bei Verwendung von 5 ml der Stammlösung wurde nun zur Herstellung des Obergels 5 µl TEMED und 40 µl AP (10%) hinzugefügt und die Mischung auf das Untergel gegossen. Man befestigt einen Kamm und wartet min. 30 min bis zur völligen Auspolymerisation. Nun spannt man das Gel in die Elektrophoresekammer und füllt die Kammer mit Laemli-Puffer. Anschliessend werden 9µl der Kernextrakte mit derselben Menge SDS2K verdünnt und für 7 min bei 95°C schüttelnd erhitzt. Dann werden jeweils 17 µl der Protein-SDS2K-Gemische

und des Kolloidoskopmarker in die einzelnen Taschen pipittiert und die Elektrophorese gestartet. Zunächst wählt man eine Spannung von 60V (18 mA) bis die Proben in das Untergel eingelaufen sind, um die Spannung dann auf 90V (16mA) zu erhöhen. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Kolloidmarkerbanden vollständig aufgetrennt zu sehen sind.

#### 4.2.4 Western Blot (semi-dry-Technik)

##### Reagenzien:

Anodenpuffer A:	36.3 g (0.3 M)	Tris pH 10.4
	200 ml (20%)	Methanol
	ad 1000 ml mit aqua bidest.	
Anodenpuffer B:	3.03 g (25mM)	Tris pH 10.4
	200 ml (20%)	Methanol
	ad 1000 ml mit aqua bidest	
Kathodenpuffer C:	5.20g (4mM)	$\epsilon$ -Amino-n-Capronsäure pH 7.6
	200 ml (20%)	Methanol
	ad 1000 ml mit aqua bidest	

##### Arbeitsablauf:

Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel aus der Kammer genommen und anhand folgendem Schema in die Blotappatur eingebaut:

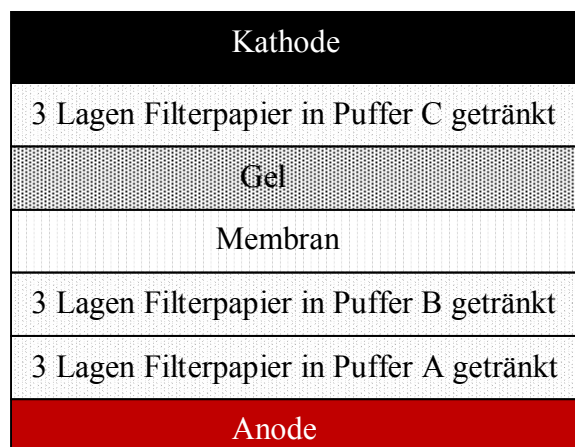


Abb. 6) Aufbau des Blotsandwich zur Anfertigung eines Western Blots



500 ml

TBS-Stammlösung (2x)

Milchpulverlösung 5%      100ml (5 g Milchpulver+100 ml TBS-TWEEN)

### Antikörper

KLF	Spezies	Verdünnung für Westernblot	Größe des Antigens
3	Rabbit	1:2000	38.8 kD
6	Rabbit	1:100	31.9 kD
8	Rabbit	1:1000	39.3 kD
12	Rabbit	1:1000	44.3kD

### Arbeitsablauf:

Die Immobilon-P-Membran wurde zur Absättigung der freien Bindungsstellen über Nacht in Milchpulverlösung (5%) bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag ist die Membran durch mehrmaliges Schwenken in TBS-Puffer gewaschen worden, um sie dann mit dem 1. Antikörper zu inkubieren. Verdünnt wurden die Antikörper entsprechend obiger Tabelle mit Milchpulverlösung (5%) bis die Membran vollständig bedeckt war.

Die nachfolgenden Schritte finden allesamt auf einem Schüttler während kontinuierlicher Durchmischung statt: Zunächst lässt man den 1. Antikörper 1 h einwirken, um die Membran dann 3 mal für 10 min mit Waschpuffer TBS-TWEEN zu inkubieren. Anschliessend wiederholt man das Prozedere mit dem 2. Antikörper, der in einer Konzentration von 1:2000 verwendet wurde. Nach einer einstündigen Einwirkungszeit und weiterem dreimaligen Waschen kann die Membran mittels ECL gefärbt werden.

### **4.2.5.3 ECL-Färbung von Proteinen**

Reagenzien:                      ECL-Detektions-Kit                      Fa. Amersham

Die ECL-Färbung erfolgte mit dem Peroxidase-Substrat (ECL-Substrat) nach dem Protokoll des Herstellers. Bei der Färbung katalysiert die am sekundären AK gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol was zur Chemilumineszenz führt. Auf sensitiven Autoradiographiefilmen (Amersham), die 1 min, 2 min, 5 min und 10 min in einer Röntgenkassette der Chemilumineszenz ausgesetzt werden, entstehen geschwärzte Banden je nach Intensität der Lumineszenz. Die Dunkelfärbung des Radiographiefilmes ist also abhängig von der Menge des gebundenen sekundären AK.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Präparation und Analyse von DNA

#### 4.3.1.1 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

##### Reagenzien:

SOC-Medium:        20 g    Bactotryptone  
                          5 g     Yeast Extract  
                          0,6 g   NaCl  
                          0,2 g   KCl  
                          ad 1000 ml mit aqua bidest., autoklaviert

nach Abkühlung:    10 ml   MgCl<sub>2</sub> (1 M), sterilfiltriert  
                          10 ml   MgSO<sub>4</sub> (1 M), sterilfiltriert  
                          10 ml   Glucose (2 M), sterilfiltriert

##### Arbeitsablauf:

0,1-1 µg Plasmid-DNA (in 2-5 µl) werden mit 50µl kompetenten Bakterien (DH10B) vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Die Suspension wird danach für 2 min auf 42°C erhitzt und nochmals auf Eis gestellt. Nach Zugabe der fünffachen Menge des Bakteriensuspensionsvolumens an SOC-Medium werden die Bakterien 60 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend werden 50-150µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten ausgestrichen und für 8-12 h bei 37°C inkubiert. Zur Präparation der Plasmid-DNA werden mehrere Klone gepickt und Flüssigkulturen angesetzt. Die erfolgreiche Transformation überprüft man durch Restriktionverdau und Sequenzierung.

#### 4.3.1.2 Midi-Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus E.coli DH10B wurde mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

##### Arbeitsablauf:

Die über Nacht gewachsene Flüssigkultur wurde zunächst durch Zentrifugation (2500g, 4°C, 20min) geerntet. Das entstandene Pellet wird in 4 ml P1 gelöst, mit 4 ml P2 versetzt, vorsichtig vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun mischt man 4ml P3

hinzu und füllt das Lysat in die QIAfilter. Nach einer Inkubationszeit von 10 min drückt man es durch die QIAfilter und gibt zum gefilterten Lysat 1 ml ER Puffer hinzu. Anschliessend lässt man das Gemisch 30 min inkubieren, um es dann auf die equilibrierte QIAtip Säule aufzutragen. Nachdem das Lysat schwerkraftbedingt in die Säule eingedrungen ist, wäscht man sie mehrere Male mit 10 ml QC-Puffer. Die DNA eluiert man nun mit 5 ml QN-Puffer und fällt sie durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol. Die Trennung der Phasen erfolgt durch Zentrifugation (15000g, 30 min, 4°C) und anschliessendem Verwerfen des Überstandes. Das so entstandene Pellet wäscht man mit 40 ml Ethanol (96%), zentrifugiert (13.000g, 4°C, 5 min) erneut, und lässt das neue Pellet für 10 min lufttrocknen um es dann in einem passenden Volumen von TE-Puffer wieder aufzulösen.

### 4.3.1.3 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden zur analytischen Größenbestimmung in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

#### Reagenzien:

TAE (50x):	242,3 g (2 M)	Tris
	20,5 g (250 mM)	NaAc/HAc pH 7,8
	18,5 g (50 mM)	EDTA
	ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	
Ladepuffer DNA (5x):	500 µl (50 mM)	Tris/HCl pH 7,8
	500 µl (1 %)	SDS (20 %)
	1 ml (50 mM)	EDTA (0,5 M) pH 8,0
	4 ml (40 %)	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
	ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	

Ethidiumbromid

Agarose

#### Arbeitsprotokoll:

Zur Herstellung eines DNA-Gels (1%) wurde 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE (1x) vermischt und mehrmals aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 55°C wurde 2,5 µl Ethidiumbromid zugefügt und das Gel dann gegossen.

Die mit dem Ladepuffer (im Verhältnis 1:4) versetzte DNA wurde bei 60-80V für 1h elektrophoretisch getrennt. Laufpuffer war TAE (1x), 1 Kb plus Leiter (Gibco) wurde als DNA-Größenstandart verwendet.

#### 4.3.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Überprüfung von DNA Sequenzen erfolgte durch Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen und anschließender Gelelektrophorese. Die so entstandenen Banden wurden mit einem Längenstandart verglichen und so auf Authentizität überprüft.

##### Reagenzien:

Die Plasmide pMT3, pMT2-hKLF6, pMT2-hKLF8 wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*, das MADDAM 450 mit *XhoI* und MADDAM 150 mit *MlnI*. verdaut.

2 µl (=1µg)	DNA
2 µl	Restriktionsenzym
15 µl	Puffer H 15 µl

##### Arbeitsablauf:

Der Verdau erfolgte über 1,5 h bei 37°C. Anschliessend wurden die Proben auf ein DNA Gel (siehe andere Stelle) aufgetragen und bei einer Spannung von 60 V elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 4.3.2 Präparation und Analyse von RNA

##### 4.3.2.1 RNA-Extraktion mit Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform

##### Reagenzien:

Solution D:	47.2 g	Guanidinthiocyanat (4M)
	2,5 ml	NaCitrat (1M 7.0 pH)
	1,67ml	Sarcosyl (0,5%)
	ad 100ml mit H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	
NaAcetat (2M)	16,4 g (2M)	NaAcetat (wasserfrei)
	ad 50ml mit H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	
	titriert auf pH 4.0 mit Essigsäure	

ad 100ml mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

Phenol<sub>wassergesättigt</sub>

frisches Phenol im Wasserbad schmelzen

(Deckel aufmachen, bei 70°C in Wasserbad R19 unter Abzug)

0,1% 8-Hydroxychinolin

80ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> dazugeben und schütteln, ü.N absetzen lassen

(Phenol sollte zu ¼ mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> überschichtet sein)

Chloroform- Isoamylalkohol 2ml Isoamylalkohol (Giftschrank)

ad 100ml Chloroform

Isopropanol (70%)

Ethanol (80%)

Mercaptoethanol

#### Arbeitsablauf:

Solution D (1 ml/ 5 Mio Zellen) wird mit Mercaptoethanol in einer Konzentration von 143/1 versetzt. Das Medium wird von den adhären Zellen der Kulturschalen abgegossen und 2ml (bei einem Durchmesser der Schale von 150 mm) des SolutionD/Mercaptoethanol-Gemisches werden hinzugegeben. Mit einem Zellschaber werden die Zellen abgekratzt und in ein Zellröhrchen überführt. Danach zieht man das Gemisch min. 10 mal durch eine 20 Gauge Spritze um so eine Lyse herbeizuführen. Nun versetzt man das Lysat mit NaAcetat (2M) in einer Konzentration von 1:10.

Zur Extraktion der DNA versetzt man das Lysat anschliessend mit dem wassergesättigtem Phenol (1 ml/ 5 Mio Zellen) und dem Chloroform-Isoamylalkohol (0,2 ml/ 5 Mio Zellen).

Nach kräftigem Schütteln bildet sich eine milchige Suspension, die man für 15 min auf Eis stehen lässt. Nach einer Zentrifugation (30 min, bei 150000 g, 4°C) nimmt man die wässrige Phase ab, verwirft sie und fügt zur unteren Phase etwas mehr als 1ml/5 Mio Zellen Isopropanol hinzu. Die Suspension wird kräftig geschüttelt und bei -20°C für mindst. 2 h, besser über Nacht gefällt.

Nach Ablauf der Fällung wird das Gemisch zentrifugiert (30 min, bei 150000 g, 4°C) und der Überstand vorsichtig abgekippt. Das hierbei entstandene Pellet wird in 0,6 ml Solution D

resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorfcup überführt. Man gibt 0,7 ml Isopropanol hinzu und fällt ein weiteres Mal (bei -20°C, für mindst. 2 h, besser über Nacht).

Am nächsten Tag erhält man durch Zentrifugation (20 min, 13000rpm, 4°C) wiederum ein Pellet, dass man mit Ethanol (80%) wäscht. Hierfür löst man das Pellet in 1 ml Ethanol (80%) auf und zentrifugiert (20 min, 4°C, 13000rpm). Mit dem entstandenen Pellet wiederholt man den Vorgang indem man ein weiteres mal Ethanol hinzufügt und anschließend zentrifugiert. Zuletzt löst man das Pellet je nach Größe in 20µl-100µl DEPC-Wasser auf und friert die Suspension bei -20°C ein.

#### 4.3.2.2 RNA-Gelelektrophorese mit 1%igem Agarosegel

##### Reagenzien:

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

<b>Agarose</b>	0,3 g	0,5 g	1,5 g	2,5 g
<b>H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub></b>	22,8 ml	38 ml	115 ml	190 ml
<b>MOPS (20 x)</b>	1,5 ml	2,5 ml	7,5 ml	12,5 ml
	nach dem Abkühlen auf 60°C			
<b>Formaldehyd</b>	5,3 ml	8,8 ml	26,5 ml	44 ml
<b>insgesamt</b>	<b>30 ml</b>	<b>50 ml</b>	<b>150 ml</b>	<b>250 ml</b>

Je nach erforderlicher Gesamtmenge wird die Agarose mit MOPS/H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> vermischt und mehrmals aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind. Im Anschluss lässt man das

Gel auf ca. 60°C abkühlen, fügt dann unter Rühren das Formaldehyd hinzu und gießt das Gel in die vorbereiteten Gelkammern.

Die RNA-Proben werden zusammen mit dem Ladepuffer (im Verhältnis 1:5) 20 min bei 65°C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und aufgetragen. Als Laufpuffer dient MOPS (1 x), die Elektrophorese erfolgt bei 40 V für 4-6 h.

#### **4.3.2.3 Reverse Transkription (RT)**

Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe des SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kits der Firma Invitrogen durchgeführt.

##### Reagenzien:

RNA	1 µg
ad 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>auto</sub>	
SuperScript™ II RT	1 µl
5X First-Strand Buffer	4 µl
DTT (0.1 M)	2 µl
dNTP	1 µl
Retroscript Randomprimers	1 ml

##### Arbeitsablauf:

Die RNA, die Randomprimers und die dNTPs werden vermischt, für 5 min bei 65°C inkubiert und zügig auf Eis gekühlt. Anschliessend fügt man den 5XFirst-Strand Puffer und die DTT hinzu, vortext das Reaktionsgemisch und inkubiert für 2 min bei 42°C. Nach Zugabe von SuperScript™ II RT benötigt die cDNA-Synthese 50 min (bei 42°C) um dann bei 70°C (15 min) gestoppt zu werden. Durch die abschliessende 15minütigen Behandlung bei 70°C wird das restliches Enzym denaturiert und die cDNA kann für weitere Experimente (z.B. Real-time PCR) genutzt werden.

#### 4.3.2.4 Real-time PCR

Quantitative Real-time PCR wurde mittels Quantitect SYBR-green Kit (Qiagen) im 20 µl- Maßstab am LightCycler® (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Durch eine vorherige RT der Proben-RNA war es möglich, die RNA-Expression verschiedener Gene in Bezug zu setzen zu einem Haushaltsgen. In mehreren Probeläufen wurde durch gezielte Analyse als geeignetes Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin identifiziert.

In den Probeläufen stellten sich folgende Zyklusparameter als geeignet heraus:

Programmschritt	Zeit (sec.)	Temp (°C)	Zyklen
Denaturierung	15	95	55
Primer-annealing	20	58	
Elongation	25	72	

Die Überprüfung der Produktgrößen erfolgte stichprobenartig durch elektrophoretische Auftrennung und dem Vergleich mit bekannten Standards. Die Spezifität der Produkte wurde anhand der Schmelzkurven des LightCycler® überprüft. Die ICSBP-Werte wurden auf die Expression des Houskeeping-Gens „beta-aktin“ normalisiert. Die relativen Mengen wurden anhand einer Standardkurve bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine lineare Regression dreier log Verdünnungen zur Zyklusnummer (CP), bei der die 2. Ableitung der gemessenen Fluoreszenz maximal war, aufgetragen. Die Amplifizierungseffizienz E wurde über die Steigung des Logarithmus der Standardgerade (slope) berechnet:  $E = 10^{-1/slope}$ .

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Relative RNA-Expressionslevel der KLF in mononukleären Zellen

Ein vorrangiges Ziel dieser Arbeit sollte es sein, innerhalb der Gruppe von 16 bekannten KLF-Faktoren geeignete Kandidaten zu finden, die entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen oder DCs haben könnten. In einem ersten Schritt wurde ein Monozytenkonzentrat verschiedener gesunder Spender mittels Elutriation gewonnen (vgl. 4.1.3.1). Ein Teil des Eluats wurde in Teflonbeutel mit einem Nährmedium und 2% AB-Serum unter Zellkulturbedingungen für weitere 7 Tage kultiviert. Ein weiterer Teil wurde in mit 10% FCS angereichertem Nährmedium mit rGM-CSF und rIL-4 versetzt. Unter diesen Bedingungen kommt es nach 7 Tagen zur Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen bzw. DCs.

Aus den frischen Monozyten und den daraus kultivierten Makrophagen und DCs wurde mRNA extrahiert, um dann mittels quantitativer „real-time“ RT-PCR ein Expressionsprofil zu erhalten.

Als Primer dienten die in 3.8 aufgeführten KLF Sequenzen, als Bezugsprotein wurde grundsätzlich das Housekeeping Gen ACTB gewählt, welches in zahlreichen PCR-Vorläufen ein konstantes Expressionsprofil in Monozyten, DC und Makrophagen zeigt.

Um eine gewisse Konsistenz der Daten unterschiedlicher Spender zu gewährleisten wurde als zusätzliche Qualitätskontrolle vier bekannte Marker mit hoher spezifischer Expression entweder in Makrophagen oder DC untersucht.

CHI3L1, ein Gen das für ein menschliches 39kDa Glycoprotein kodiert, wird beispielsweise erst in späten Stadien der Differenzierung zum Makrophagen stark hochreguliert, weder in Monozyten, noch in DC ist eine Expression vorhanden (30). Diese selektive Expression bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit (Abb.7a).

Das Gen, das für die Metalloprotease MADDAM (= *Metalloprotease and Disintegrin dendritic antigen marker*) kodiert, besitzt hingegen eine zelltypspezifische Expression in humanen dendritischen Zellen (31). Das Expressionsmuster der verwendeten Zellkulturen steht im Einklang mit der bekannten selektiven Expression von MADDAM, wobei die durch LPS stimulierten DCs eine höhere Expression des Gens aufweisen als unstimulierte (Abb. 7b).

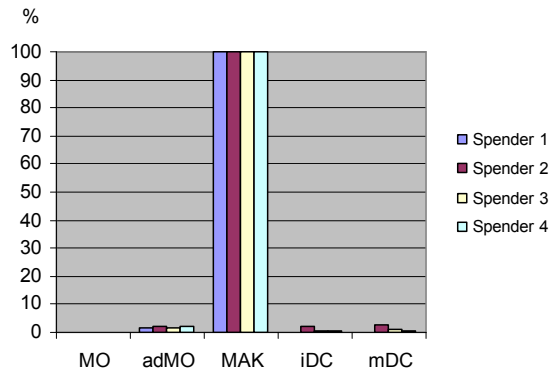


Abb. 7a) Relative mRNA-Spiegel von CHI3L

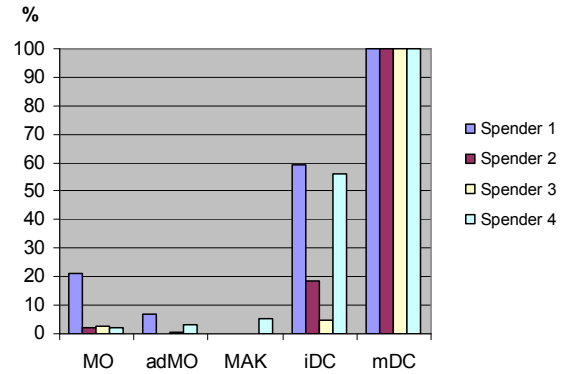


Abb. 7b) Relative mRNA-Spiegel von MADDAM

Bestimmung der mRNA-Expression von Markergenen während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von CHI3L (in Abb. 7a) bzw. MADDAM (in Abb. 7b) wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MAK (in Abb. 7a) oder mDC (in Abb. 7b) dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

CCL13, ein Cytokin, das unter anderem für Chemotaxis in Monozyten zuständig ist, wird in seiner Expression bei der Differenzierung zur DC stark hochreguliert, während Makrophagen nur ein sehr schwaches Expressionsmuster aufweisen. Im Gegensatz dazu steht das Enzym Carboxypeptidase M (CPM), welches selektiv bei Makrophagen ein hohes Expressionsmuster aufweist (Abb. 8a,b).

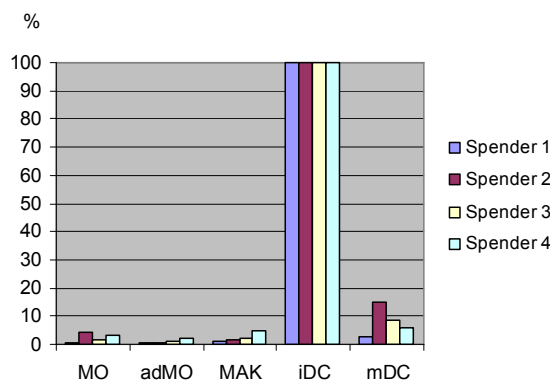


Abb.8a ) Relative mRNA-Spiegel von CCL13

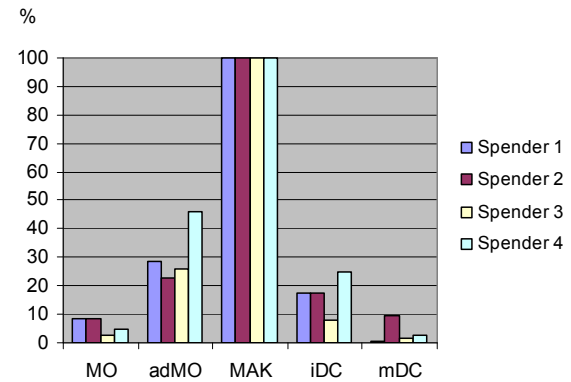


Abb.8b) Relative mRNA-Spiegel von CPM

Bestimmung der mRNA-Expression von Markergenen während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von CCL13 (in Abb 8a) bzw. CPM (in Abb. 8b) wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von iDC (in Abb 8a) oder MAK (in Abb 8b) dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Die im Zuge dieser Doktorarbeit angefertigten Messreihen bestätigten die Expressionsprofile die in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben sind.

### 5.1.1 KLF 1

Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Regulation der Erythropoese einnimmt.

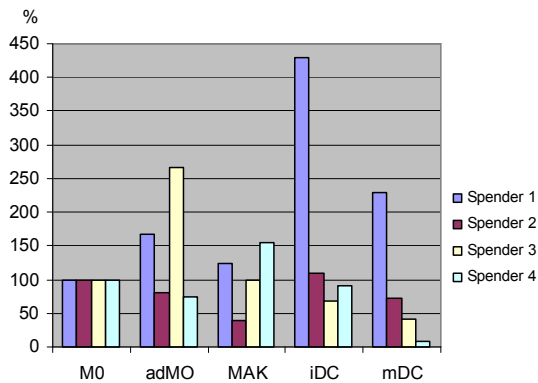


Abb. 9) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF1 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF1 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

In der PCR zeigten sich bei den untersuchten Zellen des MPS durchgehend niedrige Expressionslevel für KLF1, was mit der Zellspezifität dieses KLF-Transkriptionsfaktors für erythrozytäre Zellen zusammenhängen dürfte. Die Rolle von KLF1 bei der Differenzierung innerhalb des MPS scheint gering zu sein, zumindest ist trendmässig keine Expressionsregulation zu erkennen.

### 5.1.2 KLF2

Für KLF2 wurde in anderen Arbeiten bereits eine inhibierende Funktion auf die inflammatorische Aktivierung von Monozyten beschrieben. Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass die Expression von KLF2 in Makrophagen weitaus geringer ist als in den ursprünglichen Monozyten (32).

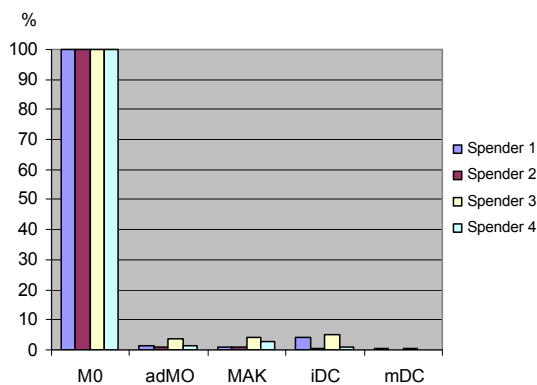


Abb.10) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF2 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF2 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Die vorliegende Arbeit bestätige die niedrigen Expressionslevel für KLF2 in Makrophagen. Daneben wurde jedoch eine ähnlich niedrige Expression in DC gemessen. Während frische Monozyten KLF2 noch sehr stark exprimieren, fällt die Expression dieses Transkriptionsfaktors schon bei den Monozyten nach eintägiger Kultur stark ab. Sie verbleibt während der weiteren Ausdifferenzierung, egal ob zu DC oder MAK, auf diesem, sehr niedrigen, Niveau.

### 5.1.3 KLF4

Bei den Zellen des MPS zeigt sich für KLF4 ein ähnliches Expressionsmuster wie für KLF2. KLF4 weist eine hohe Expression in Monozyten und eine zu vernachlässigende Expression in den betrachteten differenzierteren Zellen auf. Darüberhinaus exprimieren DC, die durch LPS stimuliert wurden, um ein Vielfaches weniger KLF4 als die inaktiven DC.

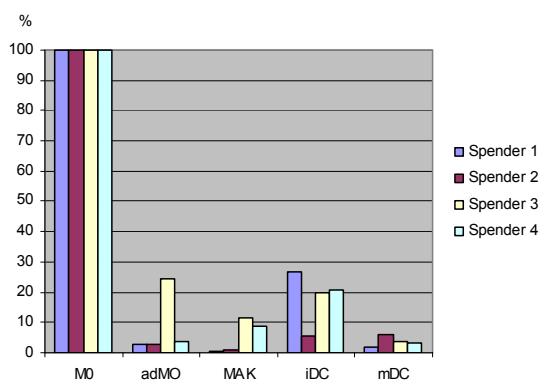


Abb. 11) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF4 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF4 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.4 KLF 5

Bei Verwendung passender KLF5-Primer waren in adhärenen Monozyten und Makrophagen im Vergleich zu frischen Monozyten nur wenige Transkripte zu messen. Die Expression in iDC war bei den untersuchten Spendern unterschiedlich. Während bei der Hälfte der Spender kaum KLF5 Expression vorhanden ist, ist bei der anderen Hälfte die Expression höher als in M0. Übereinstimmend zeigte sich hingegen, dass aktivierte mDC den Transkriptionsfaktor deutlich höher exprimieren als die inaktiven iDC.

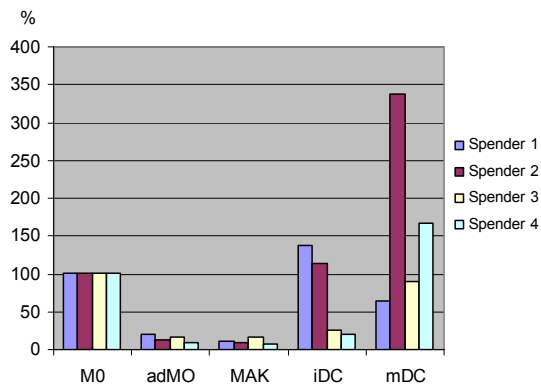


Abb. 12) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF5 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF5 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.5 KLF 6

Das Expressionsprofil von KLF6 ähnelt dem von KLF5, generell ist die Regulation jedoch weniger stark. Die Anzahl der KLF6 Transkripte geht während der Differenzierung tendenziell zurück, adhärenente Monozyten exprimieren weniger KLF6 als frische Monozyten. Die Expression in Makrophagen ist vergleichbar mit der adhärenente Monozyten. Dendritische Zellen liegen in ihrer Expression zwischen Makrophagen und Monozyten, nach Aktivierung weisen DC insgesamt eine stärkere KLF6 Expression auf.

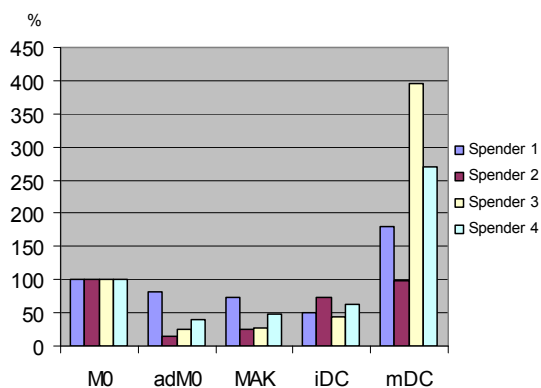


Abb. 13) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF6 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF6 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.6 KLF 7

Bei der Aktivierung der MO kommt es bei den untersuchten Zellen zu einer deutlichen Runterregulation der KLF7 Expression. Differenziert sich der adhärenente Monozyt zu DC, so bleibt das Expressionniveau gering, bei der Entwicklung zu MAK kommt es hingegen zu einem leichten Anstieg.

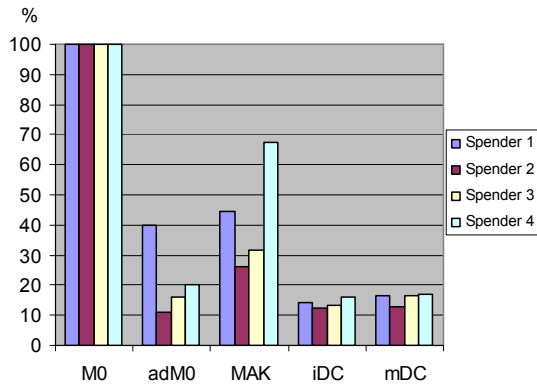


Abb. 14) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF7 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF7 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.7 KLF8

KLF8 zeigt bei Messung der relativen mRNA Level ein sehr spezifisches Profil mit geringer Expression in MO und einer deutlich stärkerer in den differenzierten Zellen. Während die Expression von KLF8 in adMO noch auf niedrigem Niveau ist, zeigen MAK und DC eine auffällig starke Expression. Dieses Expressionsmuster, mit einer starken Hochregulation während der Differenzierung, ist im Vergleich zu allen anderen KLF, einzigartig.

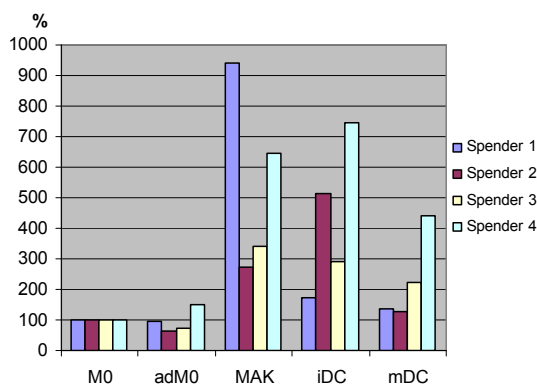


Abb.15 ) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF8 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF8 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Beim Vergleich des Expressionsprofils von KLF8 mit dem anderer KLF fiel eine weitere Besonderheit von KLF8 auf. Zwischen MO und adMO ist die Expressionshöhe von KLF8 identisch, es hat somit keine Regulation des Transkriptionsfaktors nach der Adhärenz der Monozyten stattgefunden. Alle anderen KLF weisen deutlich unterschiedliche Expressionslevel beim Vergleich frischer mit adhärenen Monozyten auf. Es stellte sich deshalb die Frage, wann genau KLF8 hochreguliert würde.

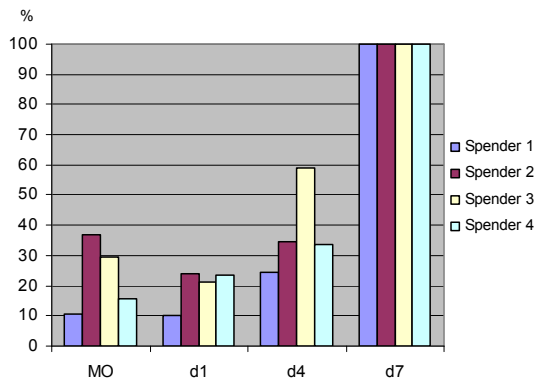


Abb. 16) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF8 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF8 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (d1), in adhärenen Monozyten nach viertägiger Kultur (d4) und in fertigen Makrophagen (d7) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MAK (=d7) dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Abb. 16) zeigt, dass die Hochregulation von KLF8 vor allem zwischen dem 4. Tag (d4) und dem siebten Tag (d7) der Differenzierung zum Makrophagen stattfindet. Da an d7 bereits reife Makrophagen vorliegen, wird KLF8 erst sehr spät exprimiert.

### 5.1.8 KLF9

Bei der Auswertung der PCR Ergebnisse ergaben sich für KLF9 sehr ähnliche relative mRNA-Level in Monozyten und Makrophagen. Eine klare Regulation der KLF9 Expression konnte nicht festgestellt werden. Einzig stimulierte dendritische Zellen scheinen um ein Vielfaches weniger KLF9 zu exprimieren.

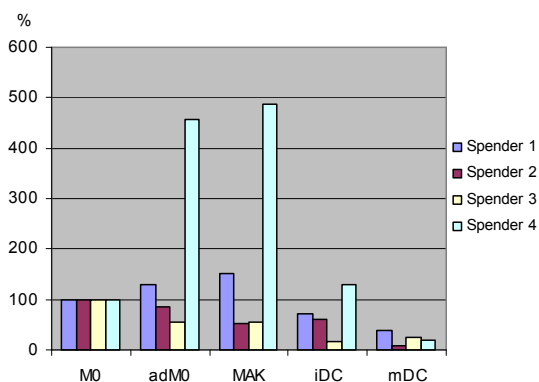


Abb. 17) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF9 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF9 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.9 KLF10

Für KLF10 konnte hingegen eine klare Regulation beobachtet werden. Frische Monozyten exprimieren KLF10 durchschnittlich 4 mal stärker als adhärenen Monozyten. Bei der weiteren Entwicklung der adhärenen Monozyten zu Makrophagen verändert sich die Expression nicht wesentlich. Auch dendritische Zellen exprimieren deutlich weniger KLF10 als Monozyten, aktivierte DC exprimieren trendmässig weniger als nichtaktivierte.

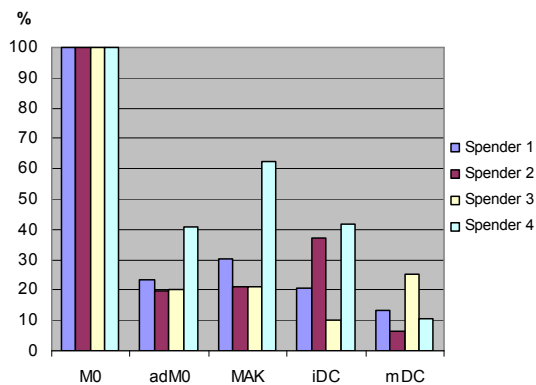


Abb. 18) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF10 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF10 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.10 KLF11

Das Expressionsprofil von KLF11 in den untersuchten Zellen ähnelt dem von KLF10. Die KLF11 Expression in Makrophagen entspricht wie auch bei KLF10 etwa 20% der Expression in frischen Monozyten. Schon adhärenente Monozyten exprimieren KLF11 auf diesem niedrigen Niveau. Bei der weiteren Differenzierung zum MAK bleibt die Expression nahezu unverändert. Die KLF11 Expression in DC ist tendenziell höher als in MAK, bei KLF10 war die Expression dort dagegen tendenziell niedriger.

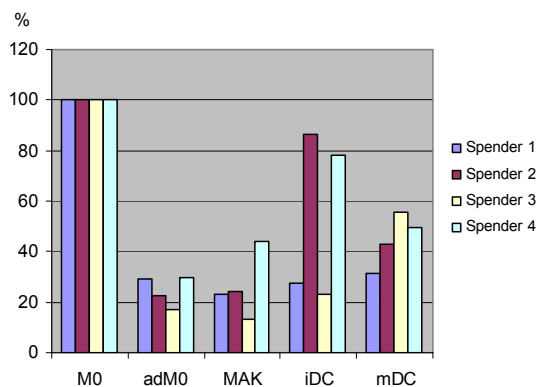


Abb. 19) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF11 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF11 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

### 5.1.11 KLF12

Für KLF12 lag die Anzahl der RNA-Transkripte in Monozyten im 10 bis 100fachen Bereich der Transkripte in Makrophagen. Dendritische Zellen enthalten durchschnittlich halb so viele Transkripte wie MO, jedoch auch um ein Vielfaches mehr als adMO oder MAK. Die KLF12 Expression scheint deshalb gerade bei der Ausdifferenzierung zum Makrophagen als sehr zellspezifisch für undifferenzierte Monozyten.

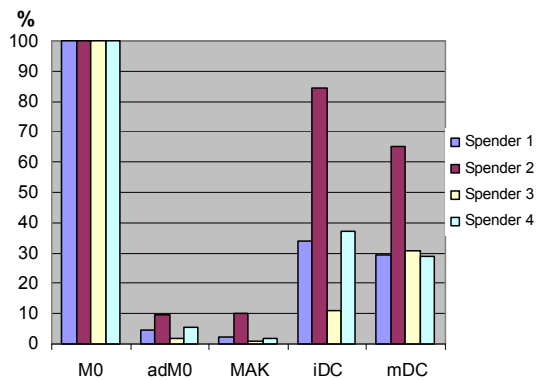


Abb. 20) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF12 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF12 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärenen Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Die in einer Elutriation gewonnenen Monozyten weisen jedoch Verunreinigungen auf. Bei den gewonnenen Elutriaten waren nur 50-80% der verwendeten Zellen tatsächlich Monozyten, die sich durch Positivität für das Antigen CD14 auszeichnen. Vorallem Lymphozyten (zwischen 9% und 43%) verunreinigen das Elutriat. Die Expression des jeweiligen KLF in Lymphozyten beeinflusst deshalb entscheidend die gewonnenen Daten. Um einen Eindruck von der Stärke der Expression der KLF in Lymphozyten zu erhalten, wurden zusätzlich lymphozytäre Zellen zweier Spender der Lightcycler PCR mit den KLF-Primern unterzogen.

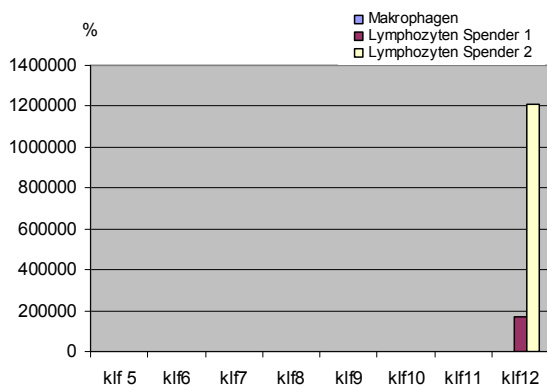


Abb. 21) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF9, KLF10, KLF11 und KLF12 in humanen Lymphozyten und Makrophagen. Die Expression der Transkriptionsfaktoren wurde mittels qRT-PCR in Lymphozyten bei zwei Spendern bestimmt. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MAK dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde.

Wie Abb.21) zeigt, wird KLF12 in Lymphozyten sehr stark exprimiert. Alle anderen KLF werden in Lymphozyten hingegen kaum exprimiert, sodass ihr Einfluss bei der bisherigen Ergebnissauswertung vernachlässigt werden konnte. Da KLF12 in den Lymphozyten, die das Elutriat verunreinigen, jedoch extrem exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob die oben erwähnte selektive Expression von KLF12 in Monozyten nicht in erster Linie durch die KLF12 Expression in den das Elutriat verunreinigenden Lymphozyten verursacht wird.

### 5.1.12 KLF13

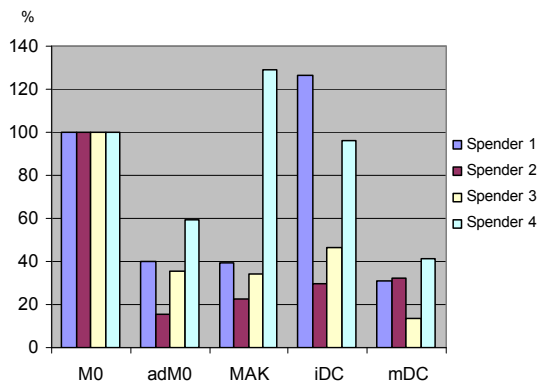


Abb. 22) Bestimmung der mRNA-Expression von KLF13 während der Differenzierung humaner Monozyten. Die Expression von KLF13 wurde mittels qRT-PCR in frisch isolierten Monozyten (MO), in adhärennten Monozyten nach eintägiger Kultur (adMO), in Makrophagen (MAK), in dendritischen Zellen (iDC) und in mit LPS aktivierten DC (mDC) gemessen. Die Werte sind relativ zur ACTB Expression und zu den Expressionswerten von MO dargestellt, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde, und entsprechen Mittelwerten aus 2 Messungen/Spender.

Die KLF13 Expression in adMO ist niedriger als bei frischen MO. Aktivierte dendritische Zellen exprimieren ebenfalls deutlich weniger KLF13 als MO. Für Makrophagen und frische DC ist kein Trend erkennbar.

### 5.1.13 KLF3, KLF14, KLF15, KLF16

KLF3, KLF14, KLF15 und KLF16 konnten wegen des Fehlens spezifischer Primer nicht näher untersucht werden.

## 5.2 Proteinchemischer Nachweis von KLF in Kernlysaten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte es sein, einige ausgewählte KLF direkt proteinchemisch nachzuweisen. Die in der Elutriation gewonnenen Monozytenkonzentrate wurden dazu, entsprechend dem Vorgehen oben, zur Ausreifung gebracht. Neben den frischen Monozyten (MO) wurden Makrophagen (MAK) betrachtet, dendritische Zellen (iDC) und mit LPS stimulierte DC (mDC). Die Proteine des Zellkerns wurden dabei stets durch eine hypotonische Lyse isoliert, nur bei Monozyten wurde die Kombination einer hypotonisch/mechanischen Lyse verwendet. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und der Nachweis durch Western Blot und Immunfärbung.

### 5.2.1 KLF6

Abb.23 zeigt Western Blots von Proteinkernextrakten unterschiedlicher Monozytenspender mit den daraus gewonnenen adhärenenten Monozyten, Makrophagen, DC und stimulierte DC. Die spezifische Bande für den verwendeten Antikörper KLF6 liegt bei 31,9 kD. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, zeigt sich für Makrophagen keine Bande, KLF6 kann hier nicht nachgewiesen werden. Die stärkste Bande für KLF6 erkennt man bei allen 3 Spendern übereinstimmend für unstimulierten DC, schwächere Banden für stimulierte DC und Monozyten.

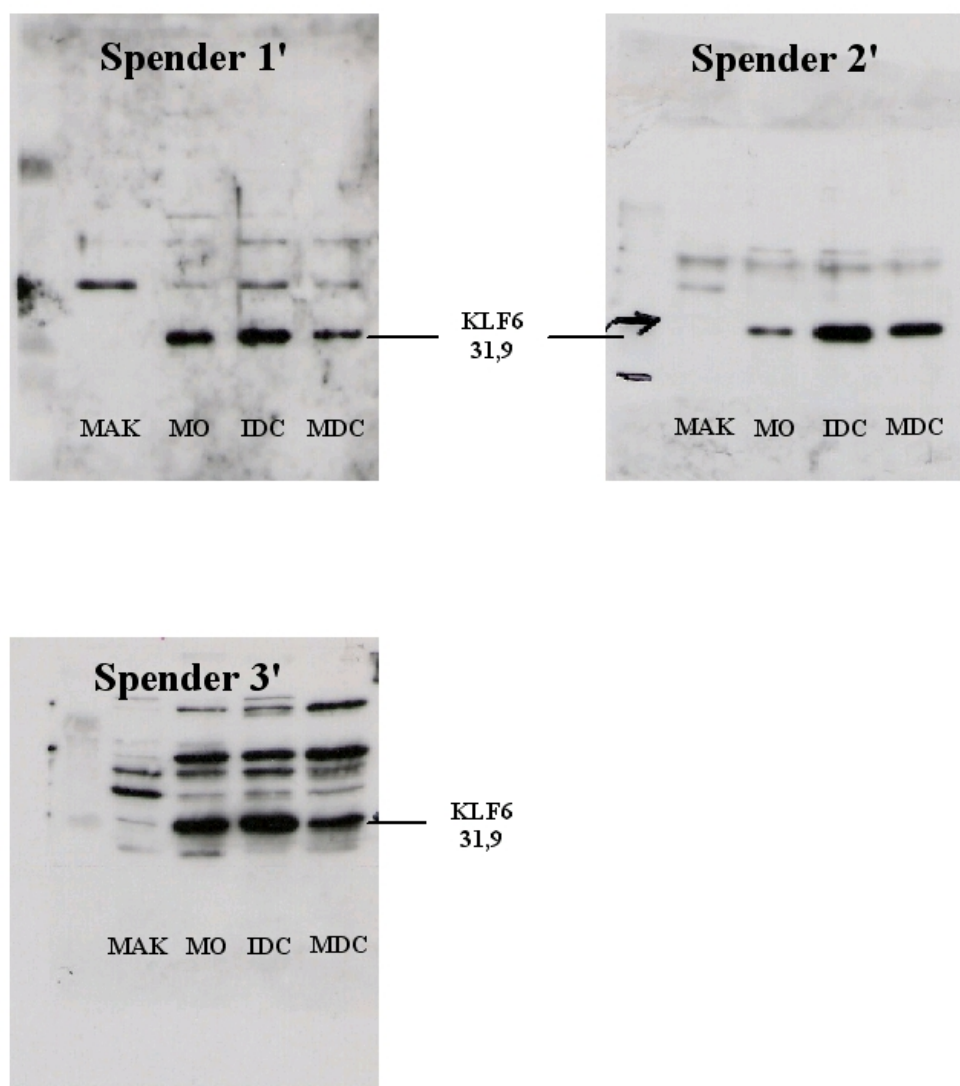


Abb. 23) Western Blots von Proteinkernextrakten adhärenenten Monozyten (D1), Makrophagen (D7), frischer Monozyten (MO), dendritischer Zellen (DC) und stimulierter DC (MDC) dreier unterschiedlicher Spender (Spender 1'-3'), es wurde ein AK gegen KLF6 verwendet.

## 5.2.2 KLF8

In einer weiteren Serie wird ein AK gegen KLF8 verwendet, dessen spezifische Bande bei 39,3 kD liegt. Monozyten zeigen bei allen 3 Spendern nur eine schwache spezifische Bande, Makrophagen eine deutlich stärkere (siehe Abb.24). Bei den Spendern 2' und 3' existieren zusätzlich starke Banden für iDC und mDC, bei Spender 1' ist dort keine KLF8 Expression nachweisbar.

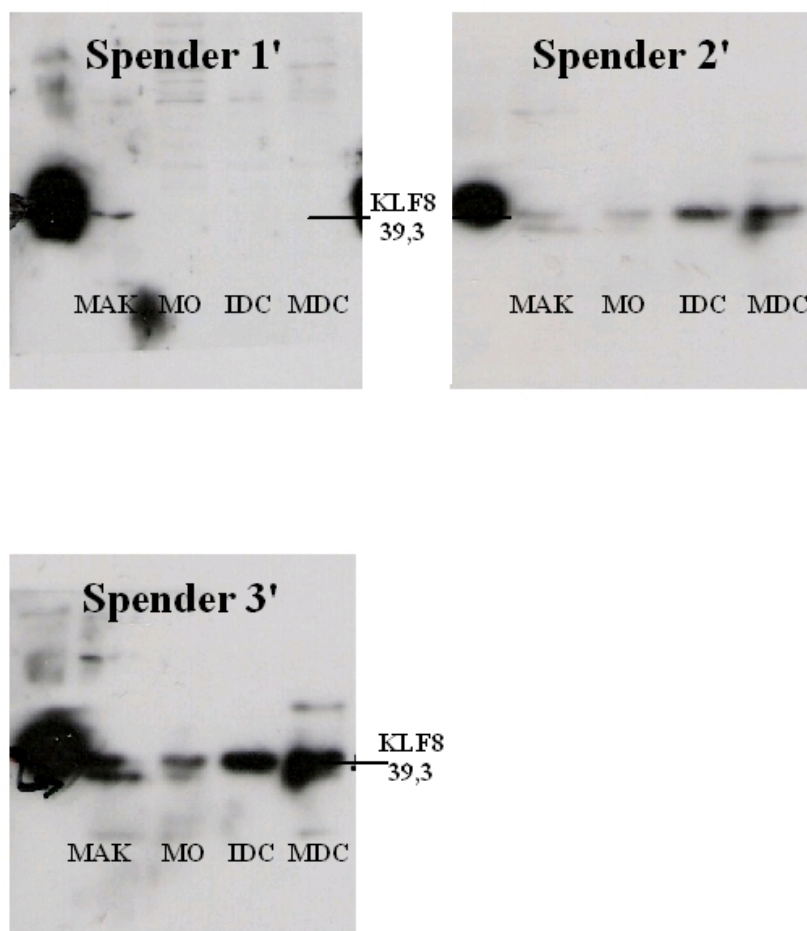


Abb. 24) Western Blots von Proteinkernextrakten adherenter Monozyten (D1), Makrophagen (D7), frischer Monozyten (MO), dendritischer Zellen (DC) und stimulierter DC (MDC) dreier unterschiedlicher Spender (Spender 1'-3'), es wurde ein AK gegen KLF8 verwendet.

### 5.2.3 KLF12

Bei Verwendung eines Antikörpers gegen KLF12 liegt die spezifische Bande im Western Blot bei 44,3 kD. Alle 3 Spender zeigen für Makrophagen keine spezifische Bande, deutliche Banden erkennt man jedoch übereinstimmend für Monozyten und DC.

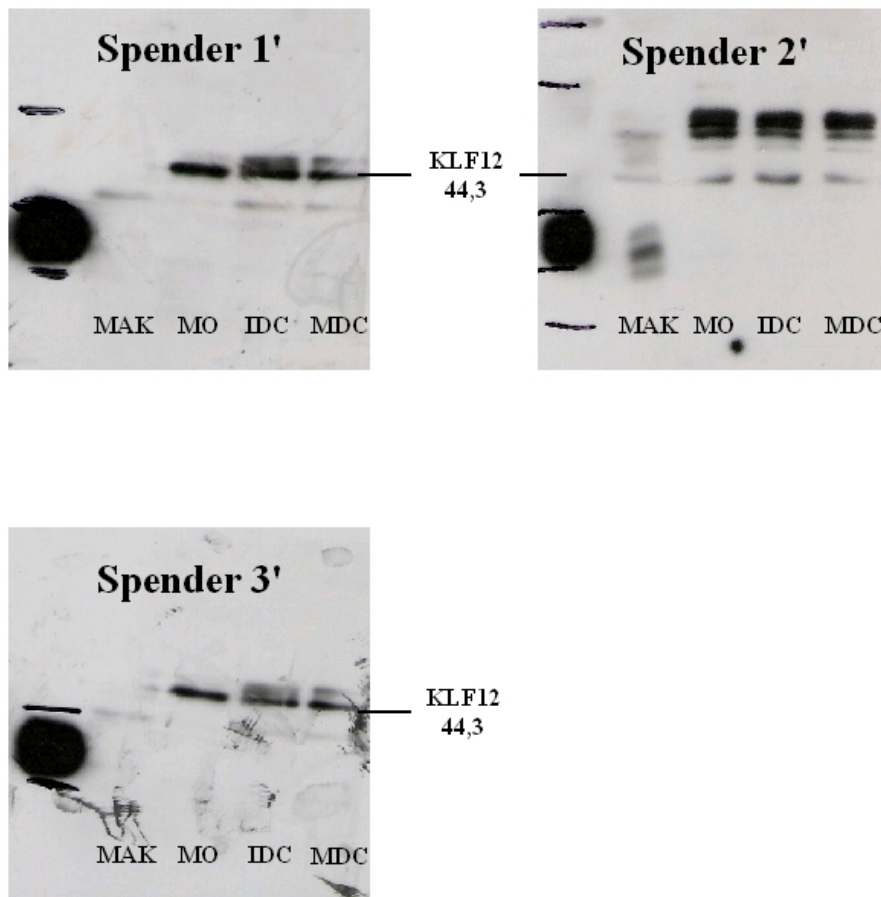


Abb. 25) Western Blots von Proteinkernextrakten adhärenter Monozyten (D1), Makrophagen (D7), frischer Monozyten (MO), dendritischer Zellen (DC) und stimulierter DC (MDC) dreier unterschiedlicher Spender (Spender 1'-3'), es wurde ein AK gegen KLF12 verwendet.

### 5.3 KLF als Aktivatoren und Repressoren des MADDAM-Promotors

Zum besseren Verständnis der transkriptionellen Regulation durch KLF, aber auch um einen Eindruck von der Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren zu bekommen, wurde die Wirkung von zwei ausgewählten KLF auf die Genexpression näher untersucht. Als geeignete Kandidaten wurden KLF6 und KLF8 gewählt, KLF6 als starker Expressionaktivator und KLF8 als typischer CtBP-vermittelter Repressor. Die relative Expression des MADDAM Promotors (*Metalloprotease and Disintegrin dendritic antigen marker*) diente zur Charakterisierung des Einflusses der beiden KLF auf dessen Genexpression.

Durch Datenbankanalysen ergab sich, dass der stromaufwärts vom Transkriptionsstart des MADDAM Gens befindliche Sequenzbereich viele mögliche Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren enthält. Zur Charakterisierung des proximalen Promotors konnte in unserer Arbeitsgruppe der Bereich der Sequenz, der für die maximale Aktivierung durch GC bindende Transkriptionsfaktoren notwendig ist, auf 150bp bestimmt werden (33). Dieser 150 bp umfassende proximale Promotor von MADDAM wurde in ein Luciferase Reporterplasmid kloniert. Nach einer Transfektion des Konstrukts in die Kolonadenomzelllinie HT-29 wurden zusätzlich präparierte Expressionsplasmide für KLF6, KLF8 und pTM3 (leerer Expressionsvektor) kotransfiziert.

In einem Ansatz wurde nur KLF6 kotransfiziert, im nächsten nur KLF8 und schliesslich beide Faktoren, um dadurch eine Aussage über den Einfluss der beiden KLFs auf die relative Promotorenaktivität von MADDAM zu erhalten. Dadurch, dass der MADDAM Promotor in ein Luciferase-Reporterplasmid kloniert worden war, konnte die Aktivität bequem mit Hilfe eines Chemilumineszenzassays nachgewiesen werden. Zur Messung der Transfektionseffizienz diente ein Renilla-Luciferasegen, das zusätzlich ko-transfiziert wurde.

Abb.26) zeigt die relative Aktivität des MADDAM (150bp) Promotors nach erfolgter Transfektion. Die Aktivität der lediglich mit pMT3 transfizierten Zellen entspricht in der Abbildung 100%. Durch eine zusätzliche Transfektion mit KLF6 kommt es zu einer geringen Aktivitätssteigerung um 20%. Der Einfluß von KLF8 auf die Promotorenaktivität ist weitaus deutlicher. Zusätzlich transfiziertes KLF8 verringert die ursprüngliche Promotorenaktivität um ein Vielfaches auf ca.20% des Ausgangswertes. Werden gleiche Mengen KLF6 und KLF8 DNA gleichzeitig transfiziert, so zeigt der Luciferaseessay nur 30% der Aktivität, die mit dem leeren Expressionsvektor pMT3 erreicht wurde.

Insgesamt wurde der Versuch 4 mal wiederholt, bei den oben beschriebenen relativen Änderungen der Promotorenaktivität handelt es sich um die Mittelwerte aller Versuchsansätze. Erwähnenswert ist ausserdem, dass der Trend zur gesteigerten Promotorenaktivität von KLF6 und der deutlichen Minderung der Aktivität durch KLF8 in jedem einzelnen Ansatz signifikant war.

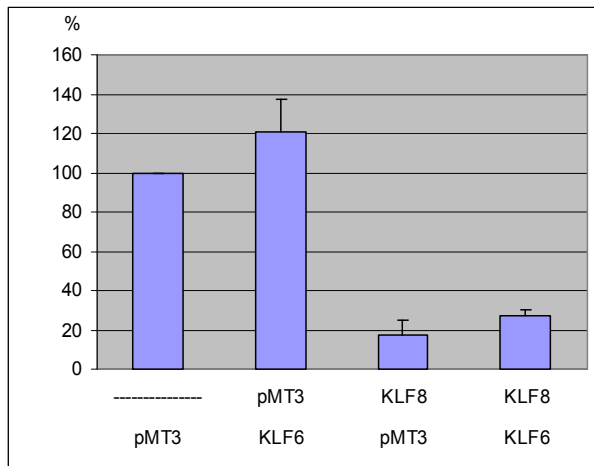


Abb.26) Transfektion des proximalen 150 bp Promotors MADDAM in die HT-29 Zelllinie mit anschliessender Co-Transfektion von KLF6, KLF8 und pMT3. In den MADDAM Promotor war ein Luciferase-Reporterplasmid geklont worden. Die Abbildung zeigt die, mit Hilfe eines Chemiluminiszenzassays gemessene, relative MADDAM-Promotorenaktivität als Mittelwert von insgesamt 4 Messungen. Die Aktivität des nur mit pMT3 transfizierten Konstrukts wurde als Referenzwert auf 100% normiert. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung der 4 Messungen an.

Ein weiterer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Versuch sollte die Frage klären, was passieren würde, wenn man für die Transfektion eine längere Basensequenz verwendet, die mit 450 bp deutlich über den definierten proximalen MADDAM-Promotor, der GC-reiche Transkriptionsfaktoren bindet, hinausgeht.

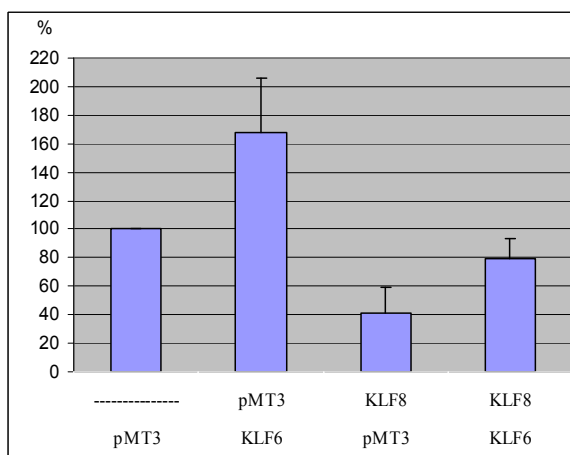


Abb.27) Transfektion des 450 bp Promotors MADDAM in die HT-29 Zelllinie mit anschliessender Co-Transfektion von KLF6, KLF8 und pMT3. In den MADDAM Promotor war ein Luciferase-Reporterplasmid geklont worden. Die Abbildung zeigt die, mit Hilfe eines Chemiluminiszenzassays gemessene, relative MADDAM-Promotorenaktivität als Mittelwert von insgesamt 4 Messungen. Die Aktivität des nur mit pMT3 transfizierten Konstrukts wurde als Referenzwert auf 100% normiert. Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung der 4 Messungen an.

In Abb.27) erkennt man bei Verwendung der längeren Basensequenz eine deutlichere Aktivitätssteigerung nach Transfektion mit KLF6 im Vergleich zur kürzeren Basensequenz. Während sich die Aktivität des 150 bp MADDAM Promotor nur um durchschnittlich 20% erhöhte, kam es zu einer signifikant stärkeren Aktivitätserhöhung um ca. 60% bei

Verwendung des 450bp Promotors. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse, die bei Transfektion mit KLF8 ermittelt wurden. Auf den größeren 450 bp Promotor wirkt KLF8 als deutlich schwächerer Repressor, als auf den 150 bp Promotor. Transfiziert man den 450bp Promotor mit dem Aktivator KLF6 und dem Repressor KLF8, überwiegt insgesamt, wie beim 150 bp Promotor, die Repression. Diese fällt jedoch erwartungsgemäß, bei deutlich höherem Aktivierungspotential von KLF6 und geringerer Repression von KLF8, im Vergleich zum kürzeren Promotor, geringer aus.

## 6. Diskussion

Transkriptionsfaktoren stellen Modulatoren der Zelldifferenzierung und Zellproliferation dar, dadurch dass sie bestimmte Gene aktivieren oder deren Expression unterdrücken. In der Vergangenheit konnte bereits die wichtige Rolle der SP-Familie für die Genregulation gezeigt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die bisher bekannten

Transkriptionsfaktoren im Laufe der nächsten Jahre mit zunehmendem molekularbiologischen Verständnis, um viele weitere ergänzt werden. Erst durch genaueres Verständnis der Mechanismen der Genregulation wird es möglich sein, die Bedeutung der einzelnen Faktoren für verschiedene Zellen, deren Differenzierung und Entartung abschätzen zu können. Geht man davon aus, dass die Aktivierung von Onkogenen oder die Unterdrückung von Supressorgen maßgeblich Einfluß auf die Entstehung und das Fortschreiten eines Tumors haben, so könnte ein besseres Verständnis der transkriptionellen Regulation zur Entwicklung neuer medikamentöser Ansatzpunkte in der onkologischen Therapie führen.

Der SP-Proteinfamilie strukturell sehr ähnlich, aber weit weniger erforscht, ist die KLF-Familie. Es hat sich gezeigt, dass KLF-Proteine in jedem Gewebe vorkommen, doch Ihre Expression ist stark von der Zellart und deren Entwicklungsstadium abhängig. Der Schluss liegt nahe, dass die Expressionslevel der einzelnen KLF maßgeblich zur Differenzierung eukaryontischer Zellen beitragen. In Hinblick auf die potentiell wichtige Rolle der KLF auf die Genregulation war in der Vergangenheit von anderen Gruppen bereits für bestimmte Zellarten versucht worden, typische Expressionsprofile zu erforschen. Im Mittelpunkt des medizinischen Interesses steht dabei besonders die Frage, inwieweit sich das Expressionsprofil pathologischer Zellformen von physiologischen unterscheidet. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit Jahren schwerpunktmässig mit der Erforschung der Genregulation in mononukleären Zellen als wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr. Die Zellen des MPS stellen wegen ihrer funktionellen Vielfalt und Präsenz in den meisten menschlichen Geweben, aber auch wegen ihrer Verfügbarkeit über Stammzellen eine sehr interessante Zellgruppe dar. Hauptziel dieser Arbeit war es, eine Vorstellung davon zu bekommen, welchen Einfluss die KLF-Transkriptionsfaktoren auf die Aktivierung und Differenzierung dieser Zellgruppe haben.

Mononukleäre Zellen entstehen aus einer myeloischen Stammzelle, die sich über die Vorstufe des Monoblasten zum Monozyten entwickelt. Durch Zytokine werden die Monozyten zur Migration in die unterschiedlichen Gewebe angeregt. Dort angekommen erfolgt aus einem

Großteil der Monozyten die Differenzierung zum Makrophagen. Daneben entwickelt sich aus den eingewanderten Monozyten ein Teil der dendritischen Zellen des Menschen.

Die Nachahmung dieser in vivo Zelldifferenzierung erfolgte durch Kultur von Monozyten, die in einer Zellelustration von gesunden Spendern gewonnen wurden. Unter Zugabe essentieller Medien, Wachstumsfaktoren und Zytokine entstanden innerhalb von 8 Tagen Makrophagen sowie unreife dendritische Zellen. Von reifen DC spricht man, wenn in vivo eine Aktivierung durch Antigene stattgefunden hat, experimentell entspricht dies der erfolgten Stimulation mit LPS.

In dieser Arbeit wurde die Expression der KLF1-16 in den auf diesem Wege kultivierten adhärenen Monozyten (adMO), Makrophagen (MAK), unreifen DC (iDC), mit LPS stimulierten DC (mDC) und frischen Monozyten (MO) miteinander verglichen. Die Realtime-PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression stellte dabei ein elegantes Verfahren dar, um aus der Gruppe der KLF diejenigen heraus zu finden, wo eine deutliche Regulation während der Differenzierung vorhanden ist. Die Menge an spezifischer mRNA in einer Zelle stellt jedoch nur eine Näherung an die tatsächlich produzierte Proteinmenge dar. Auch die Translation, also die Synthese der Proteine aus der mRNA in den Ribosomen wird durch viele biochemische Mechanismen reguliert. Die Syntheserate von Proteinen ist eng mit dem Zellwachstum verbunden, eine Veränderung der Wachstumsbedingungen führt schnell zu einem Anstieg oder Absinken der Syntheserate. Ausserdem kann eine Zelle erhöhte mRNA Mengen kompensieren, indem ribosomale Proteine als Repressoren ihrer eigenen Translation wirken. Weitere Einflussfaktoren wie der Transport der mRNA aus dem Zellkern und alternatives Spleißen sollen hier nur erwähnt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es deshalb, einige ausgewählte KLF in den Kernlysaten durch Antikörper direkt nachzuweisen.

KLF1 spielt eine wichtige Rolle in der Erythropoese, speziell in der Regulierung der Expression der Beta- und Gammaglobine. In homozygoten Knockout-Föten findet keine Transkription der beta-Gene mehr statt, während sich die gamma-Gen Transkription durch KLF1 merklich erhöht (34). Eine hohe Expression wurde ausser in erythrozytären Zellen noch in Mastzellen beschrieben.

Wegen seiner hohen selektiven Expression in erythrozytären Zellen wurde KLF1 ursprünglich als EKLF (Erythroid Kruppel-like factor) bezeichnet. Erwartungsgemäß sind deshalb die Expressionslevel von KLF1 in den untersuchten Zellen des MPS durchgehend

sehr niedrig. Der Transkriptionsfaktor dürfte bei der Differenzierung im MPS eine untergeordnete Rolle spielen.

Nach der Entdeckung von KLF1 war es im Anschluss möglich durch Hybridisierungsversuche das Genom der Maus nach ähnlichen Sequenzen zu screenen. Lingrel et al. konnten so einen cDNA Klon isolieren, den sie wegen seiner hohen Expression in der Lunge LKLF nannten. Um die in vivo Funktion des LKLF näher zu verstehen, wurden LKLF (-/-) Knockout-Experimente durchgeführt, die zeigten, dass es bei Fehlen des KLF2 Gens zu einem sicheren Verbluten des Mäuseembryos kam (36). Die fehlende Überlebensfähigkeit dieser Knockoutmäuse infolge der hochgradig gestörten Angiogenese machte die Analyse der Bedeutung von KLF2 für andere Gewebearten schwierig. Durch Anzucht chimärer Mäuse konnte jedoch eine weitere wichtige Bedeutung des Faktors für die Entwicklung reifer T-Lymphozyten und für die Lunge gezeigt werden. Fehlte KLF2, so kam es bei den T-Lymphozyten zur vorzeitigen Apoptose und in der Lunge zeigten sich schwere histologische Störungen. (35)

Innerhalb des MPS wurde für KLF2 eine inhibierende Funktion auf die inflammatorische Aktivierung von Monozyten beschrieben (37). Eine bedeutende KLF2 Expression konnte in der vorliegenden Arbeit ausschliesslich in frischen Monozyten gemessen werden. Dies würde im Einklang mit der Vermutung stehen, dass nur ein weitestgehendes Fehlen der KLF2-Expression zur Ausdifferenzierung von Monozyten führt.

Faktoren, die die Aktivierung der Monozyten in der Blutbahn, die nachfolgende Invasion ins Gewebe und die Ausdifferenzierung zum Makrophagen hemmen, sind von besonders hohem wissenschaftlichem Interesse. Man nimmt an, dass eine Vielzahl chronisch entzündlicher Erkrankungen pathogenetisch die Ursache in einer Überaktivierung der Monozyten hat. KLF2 als Inhibitor kommt so eine protektive Rolle zu, was im Einklang mit der Beobachtung steht, dass die Expression von KLF2 in zirkulierenden Monozyten bei Autoimmunerkrankungen und bei Patienten mit KHK vermindert ist (37).

Auf der Suche nach weiteren Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielen, wurde KLF4 mit Hilfe einer NIH3T3 cDNA kloniert. Das C-terminale Ende von KLF 4 mit den 3 bereits beschriebenen Zinkfingern ist in seiner Sequenz KLF 1 und KLF2 sehr ähnlich, sodass sie zusammen eine Untergruppe nah verwandter KLF-Faktoren bilden. KLF4 kommt in besonderem Ausmaß in den Zellen des Gastrointestinaltrakts vor, daher auch der ursprüngliche Name GKLF, daneben kann eine nennenswerte KLF4 Expression auch in anderen Organen gefunden werden, z.B. in der

Lunge, dem Hoden, der Haut, dem Thymus und vaskulären Endothelzellen (36). Besonders stark wird KLF4 dabei in stark differenzierten, post-mitotischen Zellen des Intestinaltrakts exprimiert, eine Tatsache die mit dem anti-proliferativen Effekt des Faktors zusammenhängt (38). Bei in vitro Experimenten zeigte sich beispielsweise, dass nichtproliferierende NIN3T3 Zellen eine hohe KLF4 Expression aufweisen, während aktiv proliferierende NIN3T3 Zellen KLF4 nur gering bis gar nicht exprimieren. Gibt man zu einer nichtproliferierenden serumfreien Kultur dieser Zelllinie frisches Serum hinzu, so geht gleichzeitig mit der Aktivierung der Zellen auch deren KLF4 Expression stark zurück. Aus dieser Beobachtung schloss man, dass es sich bei KLF4 um einen wachstumshemmenden Transkriptionsfaktor handelt (39).

Bei den Zellen des MPS geht die KLF4-Expression gleichzeitig mit der Aktivierung der Monozyten sehr stark zurück. In einer aktuellen Arbeit konnte zwischenzeitlich gezeigt werden, dass KLF4 für die inflammatorische Aktivierung von Monozyten wichtig ist. Ausserdem spielt der Transkriptionsfaktor eine bedeutende Rolle für die Differenzierung ortsständiger Monozyten. Durch Verwendung einer menschlichen HL60-Leukämiezelllinie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von KLF4 die monozytäre Differenzierung dieser Zelllinie stimuliert, während die myeloische Differenzierung unterdrückt wird (60).

KLF5 oder auch IKLF (intestinal enriched Krüppel-like Faktor) wurde anfänglich isoliert durch die große Ähnlichkeit zu KLF2. Genau wie KLF4 wird KLF5 besonders stark im Intestinaltrakt exprimiert, dort aber im Gegensatz zu KLF4 vor allem in den Krypten, dem Ort der aktiven Zellteilung. Es wurde gezeigt, dass KLF5 von KLF4 in der Regulation wichtiger Gene antagonisiert wird. Die Anwesenheit von KLF 5 vermindert die Selbstaktivierung von KLF4 über den KLF4 Promotor, während KLF4 den KLF5 Promotor deaktiviert. Beide Faktoren konkurrieren mit sehr ähnlichen Bindungssequenzen um die jeweiligen Promotoren (39). Während KLF4 wie oben beschrieben als Inhibitor der Zellentwicklung gilt, hat KLF5 einen wachstumsfördernden Effekt. So führt eine starke Expression von KLF5 in NIH3T3 - und IEC6- Zellen zu einer erhöhten Proliferationsrate und sogar zu einem abgewandelten Phänotypen, der sich durch unkontrolliertes Wachstum auszeichnet (40).

In unterschiedlichen Tumormodellen zeigte sich jedoch, dass KLF5 je nach Tumorentität einmal als Suppressor, einmal als Onkogen wirken kann. Auch bei der Differenzierung mononukleärer Zellen verhält sich der Transkriptionsfaktor hinsichtlich seiner Expression verschieden. Während bei einer Differenzierung der MO zu MAK die gesamte Expression verloren geht, weisen aktivierte DC eine deutlich höhere KLF5 Expression auf, als die

inaktive Form. Dies zeigt, dass die generelle Aussage, dass KLF5 als wachstumsfördernder Transkriptionsfaktor bei aktivierten Zellen generell stärker exprimiert wird als bei inaktiven, so wohl nicht zutrifft.

KLF6 ist ein 283 Aminosäuren enthaltendes Protein mit einer 201 Aminosäuren umfassenden Aktivierungsdomäne und einer 82 Aminosäuren langen DNA Bindungsdomäne. Im Allgemeinen scheint es sich bei KLF6 um einen Wachstumssuppressor zu handeln, der p21, einen Kinaseinhibitor, hochreguliert. Das Protein p21 verhindert die Phosphorylierung des Rb-Proteins und hält so die Bindung des Rb-Proteins zum Transkriptionsfaktor E2F aufrecht. Der gebundene Transkriptionsfaktor E2F ist dann nicht in der Lage, die Schlüsselgene des Zellzyklus zu aktivieren. Dadurch fördert p21 einen Zellzyklusarrest an der G1/S Schnittstelle. Der bekannte Tumorsuppressor p53 ist beispielsweise ein wichtiger Aktivator von p21. Der Verlust von p53 durch Mutation ist ein bedeutendes Ereignis in der Pathogenese einer Tumorzelle, weil dadurch die Aktivierung von p21 unterbleibt und die wichtige G1/S Kontrollstelle des Zellzyklus aufgehoben wird (41).

Aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, dass die Mutation von KLF6 völlig unabhängig von p53 zur Karzinogenese führen kann. Während bei ca. der Hälfte aller menschlichen Tumoren p53 Mutationen vorliegen, konnte bei der anderen Hälfte diese Mutation nicht gezeigt werden. KLF6 als p53-unabhängiger Aktivator von p21 könnte in der Pathogenese dieser Tumoren ohne p53 Mutation eine wichtige Rolle spielen (42).

Wie von einem Suppressor des Zellzyklus zu erwarten, zeigte sich in der RT-PCR, dass inaktive Monozyten KLF6 deutlich stärker exprimieren als aktivierte MAK.

Übereinstimmend dazu, kann KLF6 proteinchemisch in MO nachgewiesen werden, in MAK jedoch nicht. Auch DC zeigen nach Aktivierung übereinstimmend deutlich schwächere Banden im Western Blot als unreife DC.

Bereits bei der Entdeckung von KLF7 fiel auf, dass dieser Transkriptionsfaktor in unterschiedlichsten Zellen exprimiert wird. Man gab ihm deshalb initial den Namen UKLF (ubiquitärer KLF). Im menschlichen Gewebe findet man die stärkste Expression innerhalb des zentralen und peripheren Nervensystem. KLF7-Knockoutmäuse waren nicht überlebensfähig und wiesen schwere neurologische Schäden auf, sodass KLF7 eine wichtige Rolle in der Neurogenese zugeschrieben wurde (43). In Fibroblastenzellkulturen konnte ausserdem gezeigt werden, dass es durch eine KLF7-Überexpression zu einer Akkumulation des Zellzyklusinhibitors p21 und einen Wachstumsstopp kommt (44). KLF7 könnte auch eine Rolle bei der Differenzierung der MO spielen. Frische Monozyten exprimieren deutlich mehr

KLF7 als adMO. Mit Beginn der Differenzierung geht die Expression auf ca. 20% zurück und verharrt bei der Differenzierung zu DC auf diesem Level, MAK exprimieren durchschnittlich ca. 40% des Ausgangswertes.

KLF3, KLF8 und KLF12 bilden wegen ihrer großen strukturellen Übereinstimmung (mindestens 92,6 % Sequenzgleichheit) und ihrer ähnlichen Funktionsweise innerhalb der KLF eine Untergruppe. Die Mitglieder dieser Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass sie als Transkriptionsrepressoren unter entscheidender Mitwirkung von CtBP (C-terminal-binding-protein) wirken. CtBPs haben eine große Ähnlichkeit in der Abfolge ihrer Aminosäuren zu NAD-abhängigen Hydroxyaciddehydrogenasen und aktuelle biochemische Studien bestätigen, dass es sich bei CtBP tatsächlich um funktionelle Dehydrogenasen handelt, die mit NAD<sup>+</sup> interagieren (45). Die CtBPs aktivieren HDACs (histone deacetylase), die verantwortlich für den Umbau des Chromatingerüsts in die genetisch inaktive Form sind. Zusätzlich interagieren die CtBPs auch, unabhängig von HDAC, mit weiteren Corepressoren, welche wichtige Bestandteile von für die Chromatinfaltung verantwortlichen Komplexen sind. CtBPs haben so die Möglichkeit Gene für die Transkription zu inaktivieren, indem sie die Nukleosomen physikalisch, beispielsweise in ihrer Faltung, verändern, also in eine transkription inaktive DNA Form überführen (46).

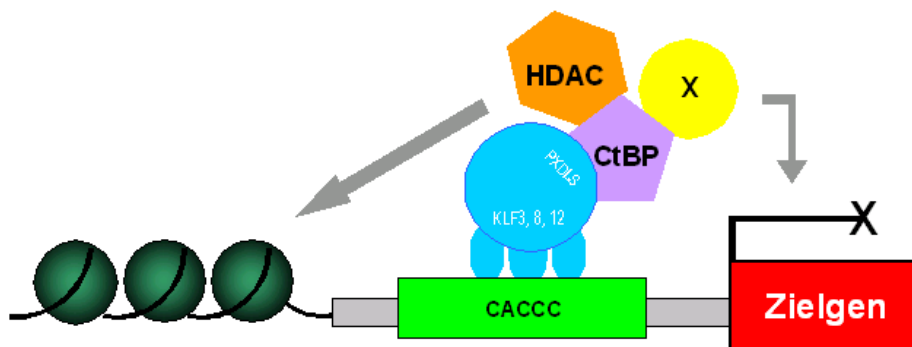


Abb.28) Modell zur CtBP-vermittelten Transkriptionsrepression der KLF3, 8, 12 (Referenz 46). Der jeweilige KLF bindet an die Erkennungssequenz des Promotors des betreffenden Zielgens. Der KLF bindet dann durch ein spezielles PXDLS-Motiv an ein CtBP-Protein. CtBP wiederum aktiviert Proteine die für die Chromatinkomprimierung verantwortlich sind, sog. HDACs. Dadurch wird die Transkription unter Mitwirkung der CtBP unterdrückt. Das X steht in der Abbildung für einen weiteren nicht bekannten Inhibitor, der zusätzlich eine Rolle in der Genrepression spielen dürfte.

Abb.28 zeigt die Funktionsweise der CtBP-vermittelten Transkriptionsfaktoren. Auf Abb.29 erkennt man den strukturellen Aufbau der so wirkenden KLF mit dem für diese Faktoren typischen PXDLS-Motiv (Pro-Xaa-Asp-Leu-Ser). Dieses Motiv bindet an die Cofaktoren CtBP1 und CtBP2 deren Aufbau in Abb.30 dargestellt ist.



Abb.29) Struktureller Aufbau der KLF3,8,12, die wie oben beschrieben über CtBP ihre Genrepression ausüben. Die 3 charakteristischen Zinkfinger auf der rechten Seite, auf der linken Seite das PXDLS-Erkennungsmotiv, das für die CtBP-Bindung verantwortlich ist.

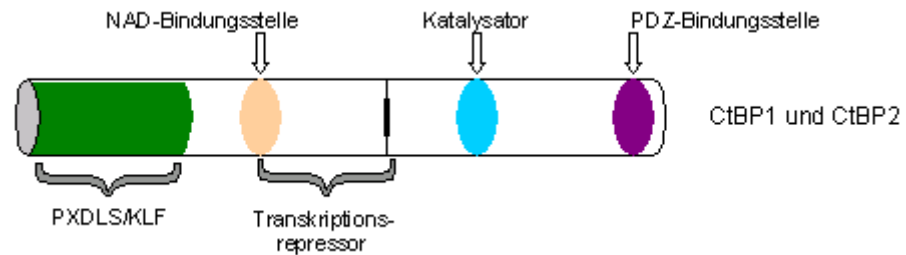


Abb.30) Struktureller Aufbau der CtBP: Auf der linken Seite die KLF-Bindungsstelle, weiter nach rechts die Repressordomäne. Weitere Cofaktoren (z.B. NAD) wirken über typische Sequenzen, die ebenfalls in der Abbildung bezeichnet werden. (Abb.27a,b nach Referenz 46)

Da KLF3, wegen eines fehlenden funktionierenden Primers, in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde, wird hier auch nicht näher auf dieses Gruppenmitglied eingegangen.

KLF8 wurde durch seine große Sequenzähnlichkeit zu KLF3 entdeckt und weist wie KLF3 und KLF12 das charakteristische PXDLS-Motiv zur CtBP-Bindung auf. Es hat sich gezeigt, dass die Funktion als Transkriptionsrepressor in hohem Maße von der vollständigen Intaktheit dieses Motivs abhängig ist. Da aber eine Mutation dieser Bindungsstelle die Fähigkeit als Repressor zu wirken nicht vollständig beseitigt, muss als Hinweis für die Existenz weiterer Corepressoren, die über andere Bindungsstellen wirken, gesehen werden (47).

KLF8 zeigt bei Messung der relativen mRNA Level ein sehr spezifisches Profil mit geringer Expression in MO und deutlich stärkerer in den aktivierten Zellen. Die auffällig starke Expression in MAK und DC im Vergleich zu MO war so bei keinem anderen Transkriptionsfaktor vorhanden. Der Western Blot bestätigte, dass die Expression in MO fehlt, in MAK, iDC und mDC jedoch deutlich vorhanden ist. Mit diesem besonderen Expressionsmuster unterscheidet sich KLF8 deutlich von KLF12, dem dritten Mitglied dieser Gruppe. Eine Antwort auf die Frage, warum ein Repressor in aktivierten Zellen stärker exprimiert wird als in den inaktiven Monozyten sollten die Transfektionsversuche bringen (siehe S.73f).

Das letzte Mitglied der Unterfamilie der KLF, die an CtBP binden und dabei als Transkriptionsrepressoren wirken, stellt KLF12 dar. Im Gegensatz zu den beiden anderen Mitgliedern der Gruppe, KLF3 und KLF8, die CACCC Zielsequenzen erkennen, interagiert

KLF12 mit einer CAGTGGG Zielsequenz (48). Der Transkriptionsfaktor weist große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Tumorsuppressor WT-1 auf, einem Protein, das die embryonische Genexpression während der terminalen Zelldifferenzierung unterdrückt. In der RT-PCR wird KLF12 10-100 fach stärker in MO, als in adMO und MAK exprimiert. Ein so deutlicher Unterschied in der Höhe der Expressionslevel zeigte sich für keinen anderen KLF. Bei der Bewertung dieses Ergebnisses muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Aufreinigung der MO bei der Elutriation Grenzen gesetzt sind. Untersucht man die verwendeten Zellen auf ihre Positivität für CD14, ein sehr spezifisches Antigen, welches so nur in Monozyten exprimiert wird, zeigt sich, dass die Monozytenkonzentrate Verunreinigungen v.a. in Form von Lymphozyten aufweisen. Die KLF12 Expression in Lymphozyten ist jedoch sehr stark ausgeprägt. Alle anderen KLF werden von den verunreinigenden Lymphozyten nur mittelgradig exprimiert. Bei der Bewertung der Ergebnisse für die KLF12-Expression in den MPS-Zellen muss man also die Expression in Lymphozyten berücksichtigen. Für alle anderen KLF kann sie vernachlässigt werden. Die Frage blieb also offen, ob frische Monozyten wirklich deutlich mehr KLF12 als adMO und MAK exprimieren, oder ob die gemessene hohe Expression nicht in erster Linie durch lymphozytäre Verunreinigungen verursacht wird. Ergänzend erfolgte der Nachweis von KLF12 proteinchemisch im Western Blot. Übereinstimmend mit den RT-PCR-Ergebnissen war keine Expression in MAK und adMO nachzuweisen, deutlich jedoch die Expression in MO. In iDC und mDC kann KLF12 PCR-technisch als auch proteinchemisch nachgewiesen werden. Da sich beide Zellarten, iDC und MAK, innerhalb von 7 Tagen ausdifferenzieren haben, dürften die lymphozytären Verunreinigungen nach dieser Zeit vergleichbar sein. KLF12 weist jedoch deutliche Unterschiede in der Expression zwischen iDC und MAK auf. Dies kann nur damit erklärt werden, dass eine Regulation stattgefunden haben muss. KLF12 scheint deshalb ein geeigneter Marker für frische Monozyten zu sein, seine Expression geht sofort nach Aktivierung verloren. KLF12 könnte demnach als potenter Repressor der Monozytenaktivierung dienen.

Eine weitere Gruppe von KLF Faktoren zu der KLF9, KLF10, KLF11, KLF13 und KLF16 gehört, wirkt als Transkriptionsrepressor über sog. HDACs. HDACs steht für Histondeacetylasen und beschreibt eine Enzymklasse zur Histonmodifikation. HDACs entfernen Acetylgruppen von acetylierten Lysinresten am N-terminalen Histonende. Durch die Deacetylierung bekommt die Aminosäure Lysin wieder eine positive elektrische Ladung. Dies erhöht die Affinität des Histonendes für das negativ geladene Phosphat-Gerüst der DNA.

Durch die folgende Blockierung der DNA für Transkriptionsfaktoren wird die DNA-Transkription herunterreguliert.

Die KLF dieser Untergruppe interagieren mit dem Co-Repressor-Protein Sin3. Sin3 ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Komplex, u.a RBAP46 (retinoblastoma protein-associated protein 46), RBAP48, HDAC1, HDAC2, SAP30 (Sin3-associated protein 30) und mSin3A/Sin3B (49-51).

mSin3A besteht dabei unter anderem aus 4 ähnlichen Aminosäuresequenzen, jede davon verantwortlich für die Bildung einer besonderen Helixstruktur, einer sogenannten PAH (paired amphipathic helix region). Diese PAH Domänen binden die unterschiedlichsten Transkriptionsfaktoren, für die KLF-Proteine scheint die 2.PAH entscheidend zu sein (52).

Abb.31) gibt eine Übersicht über den Aufbau der KLF, die mit Hilfe von mSin3A als Repressoren wirken. In Abb.32) ist der Aufbau von mSin3A zu sehen. Zusammenfassend zeigt Abb.33) ein Modell der mSin3-vermittelten Genrepression.

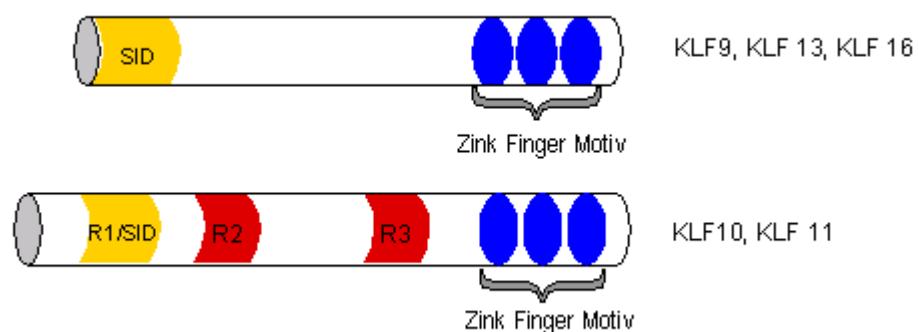


Abb.31) Struktureller Aufbau der KLF9,13,16,10,11, die zur Repression den Cofaktor mSin3 benötigen. Auf der Abbildung erkennt man die SID-Domäne, die mit mSin3 interagiert. Daneben die typischen Zinkfinger. KLF10 und KLF11 weisen darüber hinaus 3 sehr ähnliche Repressordomänen auf, die mit R1, R2, R3 bezeichnet sind. R1 bindet bei diesen beiden Faktoren mSin3.

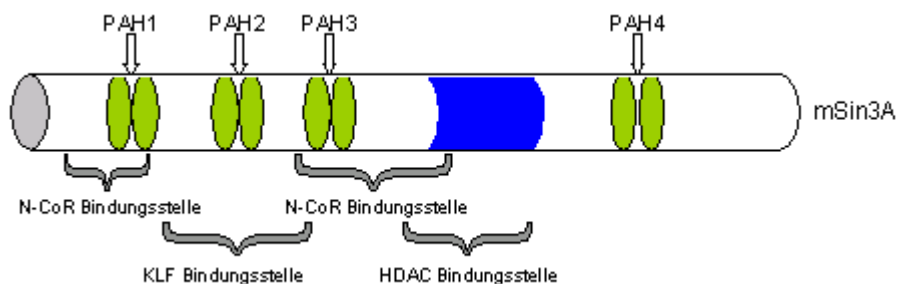


Abb.32) mSin3A besteht aus 4 PAH Proteine. Die Bindungsstelle für die KLF, HDAC und N-CoR (die wichtigen Corepressor) sind unterhalb gekennzeichnet. (Abb.28a,b nach Referenz 46)

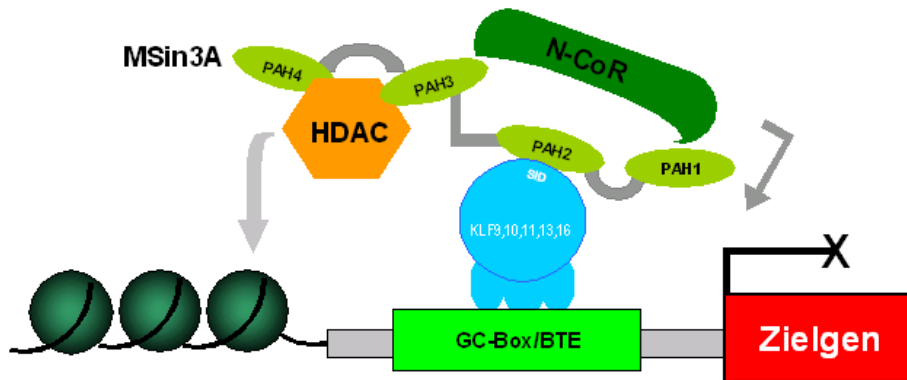


Abb. 33) Modell der mSin3-vermittelten Repression. Die KLF binden an die typischen GC-Boxen im Promotor des Zielgens. Die SID Domäne der KLF binden an den Corepressor mSin3A indem sie mit dem Protein PAH2 interagieren. Dadurch kann mSin3A N-CoR einen weiteren Corepressor rekrutieren, der die Transkriptionsmaschinerie inhibiert. Zusätzlich werden HDACs aktiviert, die die DNA-Struktur in inaktives Heterochromatin verändern. (nach Referenz 46)

In der Gruppe der KLF, die BTE (basic transcription element)-eine einfache GC-Box Sequenz im CYP1A1 Promotor (Cytochrom P4501A1) binden, war KLF9 der erste Transkriptionsfaktor der identifiziert und geklont wurde (53). Das Zinkfinger-Motiv von KLF9 erkennt die BTE ähnlich gut, wie Sp1 (54). Obwohl beide, KLF9 und Sp1, die Genexpression von Promotoren mit vielen GC-Boxen wie z.B. dem SV40 early promotor (simian virus 40) aktivieren, wirkt KLF9 auf den CYP1A1 Promotor mit nur einem BTE als Repressor, im Gegensatz zu Sp1 der einen starker Aktivator des CYP1A1 Promotors darstellt (55). KLF9 kommt in vielen verschiedenen Zellen vor, besondere Bedeutung scheint der Transkriptionsfaktor während der neuronalen Entwicklung zu haben (56). Die Unterschiede in den KLF9 Expressionsleveln sind bei den untersuchten Zellen des MPS weniger stark, als bei anderen KLF. Tendenziell zeigte sich jedoch, dass aktivierte DC weniger KLF9 exprimieren als inaktive und deutlich weniger als MO. Bei der Differenzierung zum Makrophagen ist keine klare Regulation beobachtbar. Die Herabregulation des Transkriptionsrepressors könnte deshalb bei der Differenzierung und anschließenden Aktivierung dendritischer Zellen eine gewisse Rolle spielen, eine Bedeutung von KLF9 bei der Differenzierung zu Makrophagen ist wohl zu vernachlässigen.

Der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor KLF10 wurde ursprünglich als Produkt eines Gens, das in menschlichen osteoblastischen Zellen TGF- $\beta$  abhängig hochreguliert wird, identifiziert. Zusätzlich konnte eine verstärkte KLF10 Expression durch Behandlung mit wachstumstimulierenden Faktoren hervorgerufen werden, z.B. durch den bone morphogenetic factor2 und EGF (epidermal growth factor) (57). Unabhängig davon wurde KLF10 auch als wachstumsfaktorabhängiges Gen aus der Prostata, dem Hirn und dem Pankreas der Ratte

isoliert und erhielt dabei die Namen EGR- $\alpha$  (early growth response gene  $\alpha$ ), GIF (glial cell-derived neurotrophic factor inducible transcription factor) und rat TIEG (58,59). In vielen Zellen stellt TGF- $\beta$ 1 einen starken Inhibitor des Zellwachstums durch die Induktion eines Zellzyklusarrest und der Apoptose dar. Die Stimulation der Expression von KLF10 durch TGF- $\beta$ 1 zeigt, dass KLF10 an der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Stark exprimiertes KLF10 hat ähnliche antiproliferative und apoptotische Wirkung wie TGF- $\beta$ 1 und Lombert et al geht sogar davon aus, dass KLF10 die biologische Wirkung von TGF- $\beta$ 1 vermittelt (46). Die Expression im MPS ist beispielhaft dafür, wie man es für einen potenten Repressor erwartet. Inaktive Monozyten exprimierten KLF10 bei fast allen Spendern übereinstimmend ca. 4 mal stärker als adhärenente Monozyten. In vivo werden die Monozyten durch Zytokine zur Einwanderung ins Gewebe und nachfolgenden Ausreifung angeregt. Berücksichtigt man die Ergebnisse dieser Arbeit und die wichtige Rolle die TGF- $\beta$ 1 in anderen Arbeiten zugeschrieben wird, so kann man annehmen, dass es durch die Zytokine zu einer Runterregulation der KLF10 Expression kommt. Diese Runterregulation könnte entscheidenden Einfluss darauf haben, dass die einwandernden Monozyten aktiviert werden. Wie groß die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktor für die Aktivierung von Zellen letztendlich wirklich ist, müssen weitere Untersuchungen klären. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch eine wichtige Rolle für KLF10 nahe.

KLF11/TIEG2 weist große strukturelle Ähnlichkeiten zu KLF10 auf. Die Sequenz der C-terminalen DNA-Bindungsdomäne ist zu 90% identisch, der N-Terminus zu 44%. Funktionell ist beiden Proteinen gemeinsam, dass ihre Expression durch TGF- $\beta$  induzierbar ist und beide eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation einnehmen (46). Auch in der Expression in den untersuchten mononukleären Zellen sind sich KLF10 und KLF11 sehr ähnlich. Die KLF11 Expression in Makrophagen entspricht etwa 20% der Expression in frischen Monozyten. Schon adhärenente Monozyten exprimieren KLF11 auf diesem niedrigen Niveau. Die relativen Expressionslevel sind also nahezu identisch mit KLF10, einzig in der Expression in DC bestehen Unterschiede. Zusammenfassend kann postuliert werden, dass auch die Runterregulation des Repressors KLF11, genau wie es für KLF10 zutrifft, eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Monozyten spielen könnte.

Die Entdeckung von KLF13 und KLF16 erweiterte die Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die die BTE Bindungsstelle erkennen. KLF13 aktiviert z.B. den Promotor von RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted, ein chemotaxisches Zytokin)

und den  $\beta$ -Globulin Promotor. Am CYP1A1 Promotor (mit einer typischen BTE Bindungsstelle) wirkt KLF13 aber als Repressor (46). KLF13 konkurriert auf der einen Seite mit Sp1 um die DNA-Bindung, auf der anderen Seite rekrutiert KLF13, wie bereits für KLF9 beschrieben, den mSin3A-HDAC Corepressorkomplex. (52)

KLF13 gehört wie KLF 9, KLF10, KLF11 und KLF16 zur Gruppe der über HDACs wirkenden Transkriptionsrepressoren. KLF13 bindet dafür an eine typische BTE Bindungsstelle an den CYP1A1 Promotor und konkurriert dort mit dem Aktivator SP1 (48,46). Während der Aktivierung der MO geht die KLF13 Expression deutlich zurück. Bei der weiteren Differenzierung der MPS-Zellen ist kein klarer Trend zu erkennen. Wie für die anderen KLF dieser Untergruppe auch, würde der Rückgang der Expression bei der Aktivierung der Monozyten gut zur Funktion als Genrepressor passen, insgesamt ist die Regulation deutlich geringer ausgeprägt als bei anderen KLF. Dies lässt den Schluss zu, dass die Rolle von KLF13 bei der Differenzierung von Monozyten auch eher zu vernachlässigen ist.

Für KLF16 lag kein funktionierender Primer vor, auf den Transkriptionsfaktor wird deshalb nicht eingegangen.

Die transkriptionelle Regulation eines Gens wird unter anderem über die Promotorstruktur und die zur basalen Aktivierung nötigen Transkriptionsfaktoren bestimmt. Den unterschiedlichen KLF werden hierbei die Funktion eines Transkriptionsaktivators oder Transkriptionsrepressors zugeschrieben, in vielen Fällen können KLF aber auch beides sein, Aktivator und Repressor, je nach Promotor auf den sie wirken. Zum besseren Verständnis der transkriptionellen Regulation durch KLF wurde der Einfluss von KLF6 und KLF8 auf die Expression von MADDAM (=Metalloprotease and Disintegrin dendritic antigen marker) untersucht. In unserer Arbeitsgruppe wurde durch Ehrnsberger et al. (33) bereits die Bedeutung von MADDAM bei der Differenzierung mononukleärer Zellen gezeigt. Der 150 bp umfassende proximale Promotor von MADDAM weist 4 GC-Boxen auf, das typische Motiv für die Bindung von KLF-Transkriptionsfaktoren. Abb. 34 zeigt in der oberen Zeile die Sequenz des menschlichen MADDAM Promotors, zum Vergleich zeigt die untere Zeile den sehr ähnlichen murinen MADDAM Promotor.

```

-191  . . . . CGCGGTCTCCCTCACTGAGCCAGCCCGCTCCCGGAGTCTCGCCA- hADAM19
      . . . . CTGGGTGTCTTCACTGAGTCAGCGATGCTCCCGGGGGTTCCTTC mADAM19

      GC box(1)   GC box(2)
-143  GCTCCTCCCGGCCCTCCCTCCAGC-----CCCCTCCGG-GC-TGG hADAM19
      GCTCCTCCCACTGCTGTCCCTCCAGCCACCACCAACCCCCTCCTCCGGTGG mADAM19

      NF-κB   VDRE   GC box(3)
-103  AGCCTCCCTCCTCC-ATCCCCTGGCGGAGGCCCGCGGGGCTGGAGGCCGGAG hADAM19
      CGCCTCCCTCCTCCATCCAGGCAG-AGCCCTGAGGGGCTAGGGGCCGGAG mADAM19

      GC box(4)
-52   CGTCTCGGCCGAGGGCTGGGAGCCGGGTGGGAGCGCGGGCGAGCCGGGG hADAM19
      CGTCTGGGATGTGGGCTGGGTGGCTTTA-----GGCCGGC- mADAM19

      Inr   humaner Transkriptionsstart
-6     GGTTCAGACCGCCTCCACCGCCG---GGCAGTGGGCAGGT-ATGGCTGA hADAM19
      GTTGTCTGAAAACCTCCGCCCGCTAGCCCGGGGCAGGCAATGGCAGG mADAM19
      muriner Transkriptionsstart

      Kozak
42    GGGCGTGTGAGCGCCGAGCGCTAAGGG-CCGCCGCCACCATGCCAGGG . . . hADAM19
      GGATGTGTGATTGCGGACAGTGAGAGGGCCGTGCTATCATGCCCGGG . . . mADAM19

```

Abb. 34) Sequenz des menschlichen MADDAM-Promotors (obere Zeile), zum Vergleich der sehr ähnliche murine MADDAM-Promotor. Gekennzeichnet sind die GC-Boxen als typische Bindungsstellen der KLF. (aus Referenz 33)

Als primäres Ziel galt es, die in der Literatur beschriebene Rolle von KLF6 als Aktivator der Genexpression beispielhaft durch Messung der MADDAM-Promotoraktivität zu sichern. Dazu wurde der 150 bp umfassende proximale Promotor von MADDAM in ein Luciferase Reporterplasmid kloniert. Nach einer Transfektion des Konstrukts in die Kolonadenomzelllinie HT-29 wurde zusätzlich präparierte Plasmid-DNA von KLF6 kotransfiziert. Bei der Messung der Reporteraktivität zeigte sich im Vergleich zum Ausgangswert nur eine Aktivitätssteigerung um 20%. Die GC-Bindungsstellen, von denen anzunehmen war, maßgeblich für die Wirkung der KLF zu sein, befinden sich alle innerhalb der 150 bp Sequenz. Wären alleine diese Bindungsstellen für die Wirkung des KLF6 auf die Promotorenaktivität verantwortlich, würde bei Verwendung des längeren 450 bp umfassenden MADDAM-Promotorenfragments keine Aktivitätssteigerung zu erwarten sein. Entgegen dieser Erwartung konnte KLF6 die Aktivität des 450 bp MADDAM-Promotors jedoch um 60% erhöhen. Folglich muss es ausserhalb des 150bp Fragments weitere Bindungsstellen für KLF6 geben, oder aber die potentere Wirkung erklärt sich über Cofaktoren, die stromaufwärts der 150 bp binden. Die wahrscheinlichere Erklärung wären bisher unbekannte Cofaktoren, da ihre wichtige Rolle bereits für viele andere KLF

beschrieben worden ist. Ziel der weiteren Erforschung der Genregulation durch KLF wird es sein, solche Cofaktoren zu identifizieren und weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel einzelner Transkriptionsfaktoren zu gewinnen.

Der bei den Transkriptionsversuchen verwendete Promotor reguliert natürlicherweise die Expression des dazugehörigen Gens MADDAM. MADDAM wird in Monozyten exprimiert und während der in vitro Differenzierung zu Makrophagen herunterreguliert. Dagegen wird MADDAM im Verlauf der in vitro Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert und durch die terminale Differenzierung nochmals nach oben reguliert. Vergleicht man die relativen m-RNA-Level in den untersuchten mononukleären Zellen von MADDAM mit denen von KLF6 (vgl. Abb.7b mit Abb.13), so zeigt sich eine erstaunlich genaue Übereinstimmung. adMO und MAK exprimieren weder KLF6 noch MADDAM, während ihre Genexpression in iDC übereinstimmend leicht erhöht ist und am höchsten bei mDC. Eine isolierte starke Expression in mDC weist ausser KLF6 kein anderer KLF auf. Das MADDAM Gen wird noch selektiver, ausschließlich in DC exprimiert.

Da KLF6 den MADDAM Promotor aktivieren kann, und die Expressionslevel von KLF6 und MADDAM sehr ähnlich sind, könnte der Schluss gezogen werden, dass KLF6 bedeutenden Einfluss auf die Hochregulation der MADDAM-Expression besitzt. Wie wichtig die Rolle letztendlich wirklich ist, müssen weitere Versuche klären.

KLF8 gehört, wie KLF12, zur Unterfamilie der CtBP bindenden Repressoren. Die Expression von KLF8 im MPS unterscheidet sich jedoch, wie bereits weiter oben dargestellt, deutlich von anderen Repressoren. Die aktivierten Zellen des MPS, also MAK und DC weisen eine viel höhere KLF8 Expression auf als inaktive MO. Alle anderen KLF-Repressoren zeigen umgekehrt eine deutlich höhere Expression in inaktiven MO im Vergleich zu den aktivierten Zellen. Das Expressionsmuster von KLF8 erscheint deshalb zunächst unverständlich.

Für andere Transkriptionsfaktoren konnte aber bereits gezeigt werden, dass sie je nach zellulärem Kontext und Zellart einmal als Aktivator, einmal als Repressor fungieren können. Wenn KLF8 also bei der Differenzierung der mononukleären Zellen gar kein Repressor wäre, sondern ein Aktivator, wäre eine einfache Erklärung für die Expression von KLF8 in diesen Zellen gefunden. Zunächst war von Interesse, wie sich eine Transfektion mit KLF8 auf die MADDAM-Promotoraktivität auswirken würde. In den Transfektionsversuchen wirkte KLF8 aber, übereinstimmend mit den meisten wissenschaftlichen Quellen, als sehr starker Repressor. Bei der Verwendung des 150bp Promotors kam es zu einer Verringerung der Reporteraktivität auf 20% des Ausgangswertes. Wurde KLF8 und der Aktivator KLF6

transfiziert, zeigt der Luciferaseassay eine Aktivität von 30% des Ausgangswertes. Anders als für KLF6 war die Wirkung bei Verwendung des längeren 450 bp Promotors deutlich geringer, mit ihm konnte eine Verringerung der Promotoraktivität auf nur 40 % des Ausgangswertes erreicht werden.

Dieser Versuch zeigte, dass KLF8 zumindest auf den verwendeten MADDAM-Promotoren als starker Repressor wirkt, er zeigte aber auch, dass im Gegensatz zu KLF6 die entscheidenden Bindungsstellen für KLF8 im 150bp Promotor liegen. Dort befinden sich die 4 GC-Boxen, die klassische Bindungsstelle für KLF-Faktoren. Eine Erklärung für die starke Expression in den aktivierten Zellen des MPS im Gegensatz zur deutlich niedrigeren in Monozyten war mit dem Transfektionsversuch jedoch nicht gefunden.

Beim Vergleich des Expressionsprofils von KLF8 mit dem anderer KLF fiel eine weitere Besonderheit von KLF8 auf. Zwischen MO und adMO verändert sich die KLF8 Expression nicht, erst in der späten Entwicklung zum Makrophagen steigt sie um das fünffache an. Die fehlende Regulation des Transkriptionsfaktors zwischen MO und adMO deuten darauf hin, dass KLF8 bei der Aktivierung von MO keine Rolle spielt. KLF8 könnte jedoch als möglicher Repressor der Makrophagenaktivierung wirken. Inwieweit es nach einer Aktivierung von MAK durch Antigenstimulierung zu einem Rückgang der KLF8 Expression kommt, müssen weitere Versuche klären.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde die Expression der Krüppel-like Faktoren (KLF) während der Differenzierung mononukleärer Zellen untersucht. Durch RT-PCR wurden Expressionsprofile der KLF 1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 in Monozyten (MO), Makrophagen (MAK), unstimulierten Dendritischen Zellen (DC) und stimulierten DC angefertigt. Eine deutliche Regulation während der Differenzierung konnte dabei für KLF2, KLF4, KLF5, KLF6, KLF7, KLF8, KLF11 und KLF12 gezeigt werden.

KLF6, KLF8 und KLF12 wurden zusätzlich proteinchemisch mittels Gelelektrophorese und Westernblot nachgewiesen. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der RT-PCR konnte folgendes gezeigt werden:

1. Der Zellzyklussuppressor KLF6 wird in MO deutlich stärker exprimiert als in MAK.
2. KLF8 weist ein besonderes Expressionsmuster auf mit geringer Expression in MO und deutlich stärker in MAK und DC. Alle anderen untersuchten KLF haben eine deutlich höhere Expression in MO als in den ausdifferenzierten MAK und DC.
3. Die deutlichste Regulation während der Differenzierung mononukleärer Zellen weist KLF12 auf. KLF12 wird in MAK nicht exprimiert, in MO hingegen stark, daneben weisen jedoch auch lymphozytäre Zellen eine deutliche KLF12 Expression auf.

Zum näheren Verständnis der transkriptionellen Regulation wurde anschließend der Einfluss der KLF6 und KLF8 auf die Expression von MADDAM untersucht. Die stärkste Regulation in den Transfektionsversuchen war für KLF 8 durch Verwendung des 150 bp langen proximalen Promotors zu erreichen. Bei KLF6 hingegen konnte mit einem 450 bp Fragment eine weitere Aktivitätssteigerung im Vergleich zum kürzeren 150 bp Fragment beobachtet werden. Es wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, dass die typischen GC-Boxen, die als Hauptbindungsstelle der KLF gelten, alle innerhalb des 150 bp Promotors liegen. Für den Genrepressor KLF8 scheinen diese Bindungsstellen entscheidend zu sein. Für KLF6 müssen hingegen weitere Bindungsstellen, außerhalb der klassischen proximalen Promotorregion, vorhanden sein.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von MADDAM in mononukleären Zellen der Expression von KLF6 tendenziell sehr ähnlich ist. Außerdem wurde bewiesen, dass KLF6 den MADDAM Promotor aktivieren kann. Der Transkriptionsfaktor KLF6 könnte deshalb eine wichtige Bedeutung für die Hochregulation von MADDAM haben.

Zusammengefasst zeigte die vorliegende Arbeit, dass eine deutliche Regulation der KLF Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung mononukleärer Zellen stattfindet. Den Stellenwert, den die veränderte Expression der KLF-Transkriptionsfaktoren dabei für die Differenzierung mononukleärer Zellen einnimmt, werden weitere Untersuchungen klären müssen.

## 8. Referenzen

1. Feinberg, M., Lin, Z., Fisch, S., Jain, M.K. (2004) *Trends Cardiovasc. Med.* , 241-6.
2. Lomberk, G., Urrutia, R., (2005) *Biochem.J.*, Vol.392, 1-11
3. Banerjee, S.S., Feinberg M.W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R.L., Denkinge, D.J., Kawahara, R., Hauner, H., Jain, M.K., (2003) *J. Biol. Chem.*, 2581-2584
4. Kanazawa, A., Kawamura, Y., Sekine, A., Iida, A., et al. (2005) *Diabetologia*, 1315-22
5. Dynan, W.S., Tjian, R., (1983) *Cell* 35 79-87
6. Philipsen, S., Suske, G., (1999) *Nucleic Acids Res.*
7. Kaczynski, J., Cook, T., Urrutia, R., (2003) *Genome Biology*, Vol. 4, Iss. 2, Artic. 206
8. Suske, G., Bruford, E., Philipsen, S., (2005) *Genomics*, 551-6
9. Elrod-Erickson, M., Pabo, C.O., (1999) *J. Biol. Chem.*, 19281-19285
10. Dang, D.T., Pevsner, J., Yang, V.W., (2000), *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1103-1121
11. Anderson K.P., Kern, S.B., Crable, S.C., Lingrel, J.B., (1995) *Mol. Cell. Biol.*, 5957-5965
12. Shields, J.M., Christy, R.J., Yang, V.W., (1996) *J. Biol. Chem.* 20009-17
13. White, J.A., McAlpine, P.J., Antonarakis, S., et al., (1997) *Genomics* 468-471
14. Jackle, H., Rosenberg, U.B., Preiss, A., et al., (1985) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 465-473.
15. Safe, S., Abdelrahim, M., (2005) *European Journal of Cancer* 2438-2448
16. Bouwman, P., Philipsen, S., (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* 195:27-28
17. Van Furth, R., (1992) In "Mononuclear Phagocytes, Biology of monocytes and macrophages", Kluwer Academic Publishers.
18. Ziegler-Heibrock, H.W., (2000) *Journal of Leukocyte Biology* 603-606
19. Burke, B., Lewis, C.E., (2002) "The Macrophage", Oxford university press
20. Geissmann, F., Jung, S., Littmann, D.R., (2003) *Immunity*, 19, 71-82
21. Caux, C., Lebeque, S., Liu, Y.J., Bancherau, J., (1999) in Lotze, M. and Thomson, A.W., *Dendritic Cells*. Academic Press, San Diego, 63-92
22. Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., et al., (1972) *Bull. World Health Organ* 47, 651-658
23. Just, U., Friel, J., Heberlein, C., Tamura, T., Baccarini, M., et al., (1993) *Growth Factors* 9 291-300

24. Valledor, A.F., Borrás, F.E., Culler-Young, M., Celada, A., (1998) *Journal of Leukocyte Biology* 63:405-417
25. Steinman, R.M., Cohn, Z.A., (1973) *The journal of Experimental Medicine*, 1142-1162
26. Voso, M. T., Burn, T. C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G., Tenen, D. G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 7932-7936
27. Smith, L. T., Hohaus, S., Gonzalez, D. A., Dziennis, S. E., Tenen, D. G. (1996) *Blood* 88, 1234-1247
28. Ogawa, M., (1993) *Blood* 81, 2844-2853
29. Ardavin, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuere, F., et al. (2001) *Trends in Immunology* 691-700
30. Rehli, M., Niller, H.H., Ammon, C., Langmann, S., Schwarzfischer, L., Andreesen, R., Kraus, S.W., (2003) *J. Biol. Chem.* 44058-44067
31. Fritsche, J., Moser, M., Faust, S., Peuker, A., Buttner, R., Andreesen, R., Kreutz, M. (2000) *Blood* 96, 732-739.
32. Das, H., Kumar, A., Lin, Z., Patino, W.D., Hwang, P.M., Feinberg, M.W., Majumder, P.K., Jain, M.K., (2006) *PNAS* 6653-6658
33. Ehrnsberger, A., (2004) *Transkriptionelle Regulation von MADDAM / ADAM19*, Promotion Universität Regensburg
34. Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F., Fraser, P., (1996) *Genes&Development* 2894-902
35. Wani, A.M., Wert, S.M., Lingrel, J.B., (1999) *Journal of biol. Chemistry*
36. Dang, D.T., Pevsner, J., Yang, V.W., (2000) *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1103-1121
37. Das, H., Kumar, A., Lin, Z., Patino, W.D., Hwang, P.M., Feinberg, M.W., Majumder, P.K., Jain, M.K., (2006) *PNAS* 6653-6658
38. Shields, J.M., Christy, R.J., Yang, V.W., (1996) *J. Biol. Chem.* 20009-17
39. Ghaleb, A.M., Nandan, M.O., Chanchevalap, S., Dalton, I.M., Hisamuddin, I.M., Yang, V.W., (2005) *Cell Res.* 92-96
40. Sun, R., Chen, X., Yang, V.W., (2001) *J. Biol. Chem.* 6897-900
41. Yin, D., Komatsu, N., Miller, C.W., Chumakov, A.M., Marschesky, A., McKenna, R., Black, K.L., Koeffler, H.P., (2007) *Int. Journal of Oncology*, 65-72
42. Isaacs, W., De Marzo, A., Nelson, W.G., (2002) *Cancer Cell* 113-116

43. Laub, F., Lei, L., Sumiyoshi, H., Kajimura, D., et al., (2005) *Molecular and cellular biology* 5699-711
44. Smaldone, S., Laub, F., Else, C., Dragomir, C., Ramirez, F., (2004) *Molecular and cellular biology* 1058-1069
45. Kumar, V., Carlson, J., Ohgi, K., Edwards, T., Rose, D., et al., (2002) *Mol. Cell* 857-869
46. Lomberk, G., Urrutia, R., (2005) *Biochem. Journal* 1-11
47. Van Vilet, J., Turner, J., Crossley, M., (2000) *Nucleic Acids Res.* 1955-1962
48. Imhof, A., Schuierer, M., Werner, O., Moser, M., Roth, C., Bauer, R., Buettner, R., (1999) *Mol. Cell. Biol.* 194-204
49. Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L., Ayer, D.E. (1997) *Cell* 341-347
50. Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., (1997) *Cell* 349-356
51. Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., (1997) *Cell* 357-364
52. Kacyznski, J., Zhang, J.S., Ellenrieder, V., Conley, A., Duenes, T., Kester, H., van Der Burg, B., Urrutia, R., (2001) *J. N. Chem.* 36749-36756
53. Yanagida, A., Sogawa, K., Yasumoto, K.I., Fujii-Kuriyama, Y., (1995) *Mol. Cell. Biol.* 1470-1475
54. Sogawa, K., Kikuchi, Y., Imataka, H., Fujii-Kuriyama, Y., Hayami, M. (1993) *J. Biochem.* 605-609
55. Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K., Kikuchi, Y., Sasano, K., Kobayashi, A., Hayami, M., Fujii-Kuriyama, Y., (1992) *EMBO J.* 3663-3671
56. Morita, M., Kobayashi, A., Yamashita, T., Shimanuki, T., Nakajima, O., Takashi, S., Ikegami, S., Inokuchi, K., Yamashita, K., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., (2003) *Mol. Cell. Biol.* 2489-2500
57. Subramaniam, M., Harris, S.A., Ozrler, M.J., Rasmussen, K., Riggs, B.L., Spelsberg T.C. (1995) *Nucleic Acids Res.* 4907-4912
58. Blok, L.J., Grossmann, M.E., Perry, J.E., Tindall, D.J. (1995) *Mol. Endocr.* 1610-1620
59. Yajima, S., Lammers, C.H., Lee, S.H., Hara, Y., Mizuno, K., Mouradian, M.W., (1997) *J. Neurosci.* 8657-8666
60. Alder, J.K., Georgantas, R.W., Hildreth, R.L., Kaplan, I.M., (2008) *J. Immunol.* 5645-52

## **8. Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Jochen Richard Spieß

geb.: 15.05.1981 in Heidelberg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Richard Spieß, Dipl.-Ingenieur Elektrotechnik; Monika Spieß, Hausfrau

Geschwister: Simone Spieß, Dipl. Wirtschaftsingenieurin FH

### **Schulbildung**

09/1987 bis 07/1991 Geschwister Scholl Grundschule Burglengenfeld

09/1991 bis 06/2000 Johann-Michael-Fischer-Gymnasium

### **Hochschulstudium**

10/2000 bis 9/2002 vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

10/2002 bis 10/2006 klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

### **Abschlüsse**

6/2000 Abitur

9/2002 Abschluss Ärztliche Vorprüfung

10/2006 Abschluss der Ärztlichen Prüfung

### **Studienbegleitende Praktika**

04/01 Pflegepraktikum im Krankenhaus Burglengenfeld

08/01 Pflegepraktikum im Krankenhaus Burglengenfeld

02/03 Famulatur in der Anästhesie Intensivstation der Universitätsklinik Regensburg

09/03 Famulatur in der Allgemeinchirurgischen Abteilung der Barmherzigen Brüder Regensburg

08/04 Famulatur in der internen Ambulanz des Krankenhaus Burglengenfeld

03/05 Famulatur in der Radiologischen Abteilung der Universitätsklinik Regensburg

10/05- 09/06 Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Regensburg, Wahlfach Strahlentherapie

### **Ärztliche Tätigkeit**

Seit 12/06 Assistenzarzt Innere Abteilung des Krankenhauses Burglengenfeld, Chefarzt Dr. Riedhammer

## 9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Burglengenfeld, 5.7.2008

---

Jochen Spieß