

# **Transkriptionelle Regulation von MADDAM / ADAM19**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) der Naturwissenschaftlichen  
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin der  
Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Achim Ehrnsperger  
aus Regensburg**

**2004**

Promotionsgesuch eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. M. Kreutz

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Kurtz

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Modrow

2. Gutachter: PD Dr. M. Kreutz

3. Gutachter: Prof. Dr. R. Sterner

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2001 bis Dezember 2004 in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg unter der Anleitung von PD Dr. M. Kreutz.

## ***Danksagung***

Für seine großzügige Unterstützung und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Andreesen herzlich danken.

Bei Prof. Dr. Susanne Modrow bedanke ich mich für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit und die konstruktiven Diskussionen in Lunchseminaren und persönlichen Gesprächen.

Insbesondere möchte ich mich bei PD Dr. Marina Kreutz bedanken. Für die Betreuung und Ratschläge in jeder Hinsicht. Dank Internet hatten wir immer einen guten Draht zueinander . Vielen Dank auch an dieser Stelle für die gemeinsamen Kongressteilnahmen in Wien, Maastricht und Luxemburg, ich kam jedesmal mit neuen *Aha*-Erlebnissen nach Hause.

Meinen herzlichen Dank möchte ich auch PD Dr. Michael Rehli aussprechen, der oftmals ‚rettende Ideen‘ hatte und mir damit neuen Mut zum Weitermachen gab.

Danke an alle Makrophagenforscher/-innen aus dem Forschungsbau H1 und Kathi. Ich denke, es ist eines der freundlichsten und angenehmsten Labors weit und breit. Deswegen danke für über drei Jahre ‚schönen Alltag‘.

Liebe Sportsfreunde Sabine und Thomas, Monika, Claudia – auch wenn du meistens *KEINE ZEIT* hast, Herr Mööhle, Richard und Martina, Oliver, Maria (unser ‚*danish chick*‘), Kommissar Sven, Susanne, Gerhard und Sandra, Peter und Rainer. Nie war Sport so gut wie mit Euch. Und Carol: ich weiß, dass du heimlich trainierst!

Vielen Dank an die besten Nachbarn, Gerti und Klaus. Danke für die gemeinsamen Unternehmungen und Freizeitgestaltungen – sportlicher, kultureller und kulinarischer Art. Es gibt sicher nicht viele Mathematiker, die sich für Chromatinimmunpräzipitation interessieren.

An meine Eltern und Familie, die mich durch Kindergarten, Schule und Studium begleitet haben, vielen Dank für jede Art der Unterstützung.

mille grazie Vicky – mio grande amore....

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	9
1.1	Die Zellen des Immunsystems .....	9
1.1.1	Funktionen und Effektormechanismen .....	9
1.1.2	Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen.....	11
1.1.3	Differenzierungsabhängige Genexpression.....	16
1.2	MADDAM, eine Metalloprotease der ADAM-Familie.....	21
1.2.1	Expressionsmuster in Mensch und Maus .....	22
1.2.2	Funktionen des MADDAM Proteins .....	22
1.3	Epigenetische Regulationsmechanismen .....	23
1.3.1	Methylierung von CpG Inseln .....	23
1.3.2	Modifikation von Histonresten.....	24
2	Zielsetzung.....	27
3	Material und Methoden .....	28
3.1	Materialien und Geräte .....	28
3.1.1	Geräte.....	28
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel.....	29
3.1.3	Chemikalien.....	29
3.1.4	Antikörper .....	29
3.1.5	Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits.....	30
3.1.6	Molekulargewichtstandards .....	31
3.1.7	Vektoren .....	31
3.1.8	Oligonukleotide .....	31
3.1.9	Bakterien und Zelllinien .....	35
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Zellkultur .....	36
3.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	39
3.2.3	Immunologische Methoden.....	54
3.2.4	Proteinchemische Methoden .....	55
4	Ergebnisse .....	61

4.1	MADDAM Expressionsanalyse .....	61
4.2	Definition des gesamten MADDAM Transkripts und der potentiell regulatorischen Regionen.....	62
4.3	Transkriptionelle Regulation durch 1,25-Vitamin D <sub>3</sub> .....	64
4.3.1	Bindung von VDR/RXR an „Vitamin D response Elemente“ (VDRE's) .....	64
4.3.2	Induktion eines VDRE-Luciferase Reporters durch 1,25-Vitamin D <sub>3</sub> .....	65
4.3.3	Endogene 1,25-Vitamin D <sub>3</sub> Produktion .....	68
4.4	Charakterisierung des proximalen Promotors.....	70
4.4.1	Definition des proximalen Promotorbereichs .....	71
4.4.2	Identifizierung und Charakterisierung essentieller Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen.....	72
4.5	Regulation durch epigenetische Veränderungen.....	79
4.5.1	DNA-Methylierung des MADDAM Promotors .....	80
4.5.2	Histon-Acetylierung am MADDAM Promotor .....	82
4.5.3	Expressionsanalyse von Histonacetylasen und Histon-deacetylasen in Makrophagen und dendritischen Zellen .....	86
5	Diskussion.....	89
5.1	Die Rolle von Transkriptionsfaktoren für die differentielle Transkription von MADDAM.....	89
5.2	Die Chromatinstruktur als entscheidender Faktor .....	95
5.3	Transkriptionelle Regulation von MADDAM durch 1,25-Vitamin D <sub>3</sub> .....	100
6	Zusammenfassung .....	106
7	Literaturverzeichnis .....	108

# Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb	Abbildung
AP	Ammoniumpersulfat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Rinderserumalbumin
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	„copy DNA“
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
DC	„Dendritic Cell“
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GM-CSF	„granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HRP	„Horseradish Peroxidase“
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani

LPS	Lipopolsaccharid
MAC	Makrophagen
M-CSF	„macrophage-colony stimulating factor“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MNC	mononukleäre Zellen
MO	Monozyten
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
NP-40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbolmyristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonsäure
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
STBS	„suspension TBS“
TAE	„Tris-Acetate/EDTA Electrophoresis Buffer“
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N` , N`-Tetramethylethylendiamin
TGE	Tris-Glycine/EDTA
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Zellen des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem funktioniert durch das Zusammenspiel von angeborenen und erworbenen Immunantworten. Beide Komponenten des Systems erfüllen spezifische Aufgaben und kooperieren miteinander, um unseren Organismus vor Infektionen durch Viren, Pilze, Bakterien oder Parasiten zu schützen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen und dendritische Zellen) dienen zum einen als ‚erste Verteidigungslinie‘ zum sofortigen und unspezifischen Schutz gegen Krankheitserreger, auf der anderen Seite sind vor allem dendritische Zellen zur Aktivierung des spezifischen, erworbenen Teils des Immunsystems notwendig, der aus B- und T-Zellen besteht.

### 1.1.1 Funktionen und Effektormechanismen

Bei der Erkennung von Krankheitserregern durch das angeborene Immunsystem spielen unter anderem Moleküle wie Lipopolysaccharid (LPS) aus bakteriellen Zellwänden, doppelsträngige RNA aus Viren oder unmethylierte CpG DNA aus Bakterien eine wesentliche Rolle. Diese Strukturen werden von Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten mittels Oberflächenrezeptoren wie z.B. „Toll-like“ Rezeptoren ganz allgemein als ‚fremd‘ erkannt und die Erreger durch Mechanismen wie Phagozytose oder der Freisetzung von cytotoxischen und antimikrobiellen Mediatoren vernichtet. Zudem werden große Mengen an Zytokinen produziert, die ihrerseits als Botenstoffe für die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen verantwortlich sind. Körpereigene Zellen, die durch Entartung oder aufgrund viraler Infektion ihre MHC I Expression auf der Oberfläche herunterreguliert haben, werden durch NK-Zellen erkannt und eliminiert. Die Bekämpfung von mehrzelligen Parasiten kommt wiederum durch eine Wechselwirkung des angeborenen und erworbenen Immunsystems zustande. Hierbei ist eine vorausgehende Markierung mit Antikörpern des Isotyps IgE notwendig, damit

Mastzellen mit ihren IgE-Rezeptoren die Parasiten erkennen und die Histamin- und Protease-beladenen Granula entleeren. Vor allem die Proteasen sind im Folgenden zur Bekämpfung der Parasiten nötig.

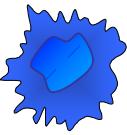
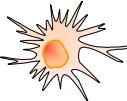
Zelltyp	Funktionen
	Neutrophile Granulozyten frühe, schnelle Einwanderung in entzündliche Gewebe und Phagocytose
	Makrophagen effiziente Phagocytose und Freisetzung verschiedener Zytokine
	dendritische Zellen Phagocytose, Antigenpräsentation und Einleitung der adaptiven Immunantwort
	NK-Zellen Lyse virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen, Aktivierung von Makrophagen
	B-Zellen Antikörperproduktion
	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen Lyse virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen
	CD4 <sup>+</sup> T-Zellen Produktion und Sekretion von Zytokinen zur - Stimulierung von Wachstum und Differenzierung von B-Zellen - Makrophagenaktivierung / -deaktivierung

Abb. 1: Übersicht der wichtigsten Typen von Immunzellen. Modifiziert nach *Abbas 2003*

Im Gegensatz zu den erwähnten Strukturen aus Bakterien oder Viren sind für die Aktivierung der erworbenen Immunantwort definierte Antigene verantwortlich, die von Antigen-spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von B- und T-Zellen erkannt werden.

Die Gruppe der T Zellen ist aufgeteilt in MHC II restringierte CD4<sup>+</sup> T Helperzellen, und MHC I restringierte CD8<sup>+</sup> zytotoxische T Zellen. Bei den CD4<sup>+</sup> Helperzellen handelt es sich um eine Population von T Zellen, die nach der eigenen Aktivierung durch Antigenkontakt über MHC II Zytokine produziert und sekretiert, die wiederum aktivierende Einflüsse auf B Zellen und auch

Makrophagen haben. CD8<sup>+</sup> cytotoxische T Zellen hingegen spielen bei der Erkennung und Abtötung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen eine wichtige Rolle. B Zellen sind neben T Zellen die zweite große Gruppe innerhalb der Lymphozyten und für die Produktion von Antikörpern verantwortlich, die Aufgaben bei der Opsonisierung, der Aktivierung des Komplementsystems oder der Aktivierung von Mastzellen besitzen.

### **1.1.2 Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen**

Makrophagen zeichnen sich vor allem durch ihre unspezifische Phagozytoseaktivität gegenüber mikrobiellen Strukturen und Tumorzellen aus (Fanger et al., 1989; Weiser et al., 1987), wohingegen dendritische Zellen mehr durch ihre Eigenschaft als professionelle antigenpräsentierende Zellen gekennzeichnet sind (Banchereau and Steinman, 1998; Van Voorhis et al., 1983). Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* können Makrophagen und dendritische Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes differenzieren.

#### **1.1.2.1 Wachstumsfaktoren und Differenzierungsmodelle**

Monozyten entstehen im Knochenmark unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren, den „colony-stimulating factors“ (CSF). Hierbei spielen vor allem GM-CSF („granulocyte/macrophage“-CSF), M-CSF („macrophage“-CSF) und multi-CSF (IL-3) eine wichtige Rolle (Barreda et al., 2004). Nach ihrer Reifung im Knochenmark treten Monozyten in die Blutbahn über, zirkulieren dort zwei bis drei Tage und gelangen schließlich durch den Vorgang der Migration durch die Endothelschicht in verschiedene Gewebe, wo sie weiter zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass in Gewebe einwandernde Monozyten aufgrund von gewebespezifischen oder entzündlichen Faktoren sowohl zu Makrophagen, als auch zu dendritischen Zellen differenzieren (Randolph et al., 1999). Bezuglich der Entwicklung von Monozyten zu entweder Makrophagen oder dendritischen Zellen kennt man zwei Subtypen von Monozyten im humanen System, die durch ihre unterschiedliche Expression von CD14 und CD16 charakterisiert sind (Ziegler-Heitbrock and Ulevitch, 1993). In diesem Zusammenhang ist gezeigt,

dass nur  $CD14^{++} CD16^-$  Monozyten als Vorläufer von dendritischen Zellen in Frage kommen und die davon abgegrenzten  $CD14^+ CD16^+$  Monozyten wahrscheinlich nicht zu dendritischen Zellen differenzieren können (Thomas and Lipsky, 1994). In Analogie zum humanen System hat man auch in der Maus zwei Subtypen von Monozyten gefunden. Dieses sind CX<sub>3</sub>CR1-hochexprimierende und CX<sub>3</sub>CR1-niedrigexprimierende Monozyten, die sich in ihrem Migrationsverhalten unterscheiden und abhängig von ihrer CX<sub>3</sub>CR1 Expression in entweder entzündliche (CX<sub>3</sub>CR1-unabhängig) oder nicht-entzündliche (CX<sub>3</sub>CR1-abhängig) Gewebe einwandern. Im Gegensatz zu den humanen Untergruppen hat sich aber gezeigt, dass im Maussystem beide Populationen zu dendritischen Zellen differenzieren können (Geissmann et al., 2003).

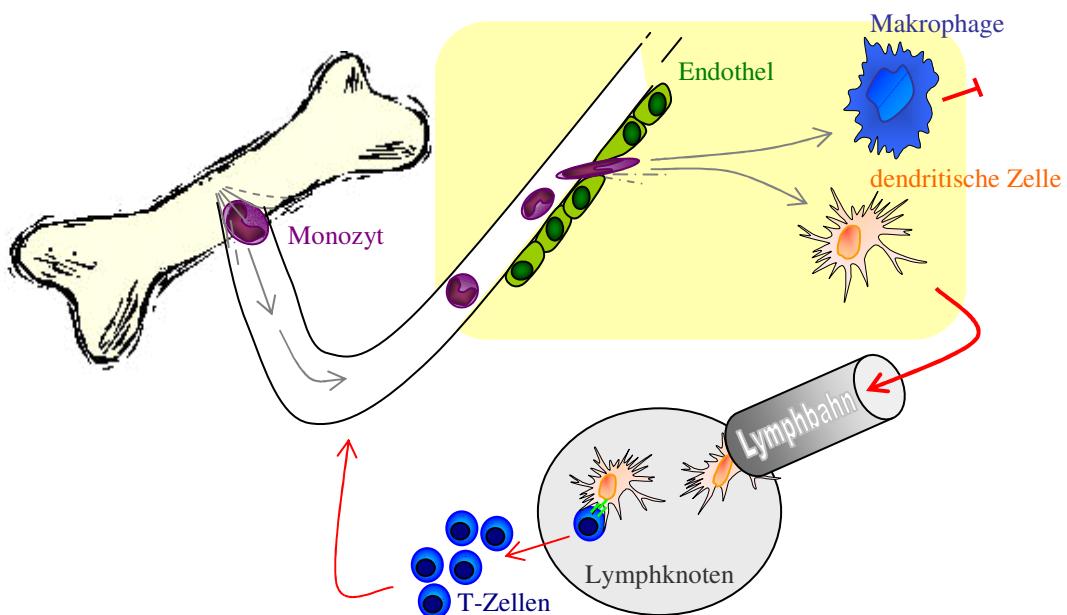


Abb. 2: Beispielhafte Darstellung der Differenzierung von Monozyten, die aus dem Knochenmark in die Blutbahn übertreten, durch das Endothel in Gewebe einwandern und zu Makrophagen oder dendritischen Zellen differenzieren. Dendritische Zellen migrieren zu benachbarten Lymphknoten und induzieren antigenspezifische T-Zell Proliferation.

Die dendritischen Zellen nehmen während ihrer Differenzierung verschiedenste Partikel aus ihrer Umgebung durch Phagozytose auf und prozessieren diese. Nach erfolgter Reifung wandern sie dann über afferente Lymphbahnen in die benachbarten Lymphknoten, wo sie das prozessierte Material T-Zellen präsentieren und damit eine T-Zell Antwort induzieren (Banchereau and Steinman, 1998).

Für vergleichende Analysen von MAC und DC könnten theoretisch primäre Zellen aus verschiedenen Geweben zu Versuchszwecken aufgereinigt werden, dies ist aber aufwendig und praktisch nur sehr schwer durchführbar. Aus diesem Grund greift man auf *in vitro* Differenzierungsmodelle zurück, mit deren Hilfe man aus aufgereinigten Monozyten durch definierte Kulturbedingungen MAC und DC generieren kann.

Zur *in vitro* Differenzierung von Makrophagen werden Monozyten für sieben Tage mit humanem AB-Serum kultiviert (Andreesen et al., 1983). Ein im Serum enthaltener Faktor, der die Makrophagendifferenzierung *in vitro* induzieren kann, ist humanes Immunglobulin G (IgG), welches an Fc Rezeptoren der Monozyten bindet und dadurch die Differenzierung einleitet (Akiyama et al., 1988). Ein zweiter, essentieller Faktor für die Makrophagendifferenzierung ist M-CSF. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* spielt M-CSF eine entscheidende Rolle bei der Makrophagendifferenzierung. M-CSF *knock-out* Mäuse entwickeln keine Makrophagen (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982) und auch *in vitro* gilt M-CSF als Überlebens- und Differenzierungsfaktor (Brugger et al., 1991). M-CSF wird zudem nach Adhärenz von Monozyten selbst gebildet (Becker et al., 1987).

Auch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> kann *in vitro* die Differenzierung von Makrophagen induzieren (Kreutz and Andreesen, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expression des M-CSF Rezeptors, als auch die M-CSF Produktion in Monozyten durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> positiv beeinflusst wird (Zhu et al., 2002) und dass dies ein wichtiger Mechanismus der 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – vermittelten Makrophagendifferenzierung ist.

Für die Differenzierung zu dendritischen Zellen werden Monozyten für ebenfalls sieben Tage mit FCS, GM-CSF und IL-4 kultiviert (de Waal et al., 1993; Zhou

and Tedder, 1996), wodurch ‚unreife‘ dendritische Zellen entstehen. Die terminale Differenzierung geschieht für weitere 48 Stunden z.B. unter dem Einfluss von entweder TNF- $\alpha$ , LPS oder CD40 Ligation und ist mit einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80, CD86), MHC II und weiteren Differenzierungsmarkern, wie z.B. CD83 verbunden (Banchereau and Steinman, 1998). Auf diese Weise *in vitro*-generierte dendritische Zellen entsprechen phänotypisch den primären interstitiellen DC's, der verschiedenen Gewebe. Neben den interstitiellen DC's finden sich *in vivo* auch Langerhans Zellen, die als professionell antigenpräsentierende Zellen in der Epidermis vorliegen und sich aus CD34 $^{+}$  Vorläuferzellen unter dem Einfluss von GM-CSF, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 differenzieren (Caux et al., 1992; Strobl and Knapp, 1999). Transplantationsmodelle im Maussystem haben gezeigt, dass diese Art von dendritischen Zellen extrem langlebig ist und bis zu 18 Monaten in der Epidermis überdauern kann (Merad et al., 2002). *In vitro* können Langerhans Zellen auch aus Monozyten generiert werden. Hierzu werden Monozytenkulturen für sechs Tage mit GM-CSF und IL-15 stimuliert und zur terminalen Differenzierung wiederum mit LPS, TNF- $\alpha$  oder CD40 Ligand inkubiert (Mohamadzadeh et al., 2001). Eine dritte Gruppe von dendritischen Zellen, die ‚plazmozytären dendritischen Zellen‘ entwickeln sich nicht wie die zuvor beschriebenen interstitiellen DC oder Langerhans Zellen aus myeloischen Vorläufern, sondern differenzieren ausgehend von lymphatischen Vorläuferzellen und benötigen IL-3 als Wachstumsfaktor (Dakic and Wu, 2003). Nach Stimulierung durch CD40 Ligation spielt diese Art von dendritischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion von T<sub>H</sub>2-vermittelten Immunantworten und ist ausserdem an der Regulation von T-Zell Toleranz beteiligt (Gilliet and Liu, 2002).

#### 1.1.2.2 Der Einfluss von 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>

Die physiologisch aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-Vitamin D<sub>3</sub>) wirkt einerseits positiv auf die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und andererseits negativ auf die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen (Andreesen et al., 1990; Tsoukas et al.,

1984; Choudhuri et al., 1990). Diese 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> abhängigen Differenzierungseffekte werden über den intrazellulären Vitamin D Rezeptor (VDR) vermittelt, der nach Ligation mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) eingeht und als Komplex an „Vitamin D response element“ (VDRE) in Promotorregionen verschiedener Zielgene bindet. In Abhängigkeit von der Interaktion mit anderen Kofaktoren kann VDR/RXR als Aktivator oder Repressor der Transkription verschiedener Gene agieren (Christakos et al., 2003).

In Abbildung 3 ist ein Komplex von VDR/RXR mit Kofaktoren gezeigt. Die Kofaktoren werden funktionell in zwei Gruppen eingeteilt. Einerseits gibt es eine Gruppe von Enzymen mit Histonacetyltransferase (HAT) – Aktivität, hierzu gehören Faktoren wie z.B. *SRC*, *CBP* oder *PCAF*. Die zweite Gruppe von Faktoren, die mit VDR/RXR komplexieren sind Proteine wie z.B. *DRIP*, *CRSP*, *ARC* oder *NAT*. Diese Proteine besitzen keine Enzymaktivität und wirken über direkte Protein-Protein Wechselwirkungen stabilisierend auf den Transkriptionskomplex mit RNA-Polymerase II (siehe hierzu auch Kapitel 5.3!) (Rachez et al., 2000).

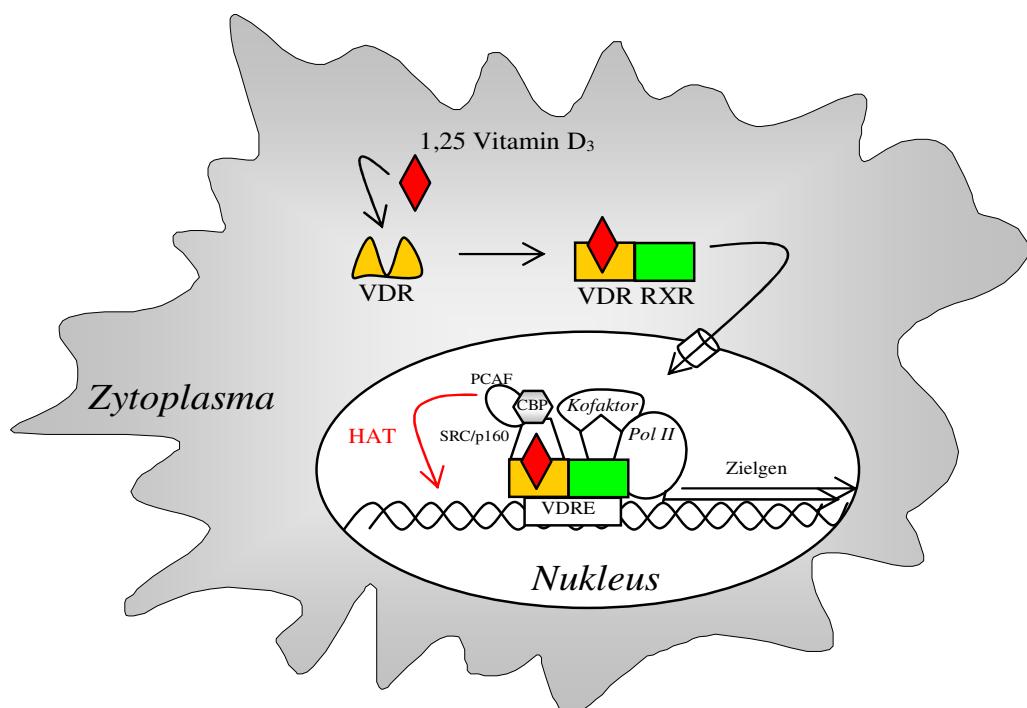


Abb. 3: Schematische Übersicht der transkriptionellen Regulation durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>. VDR-RXR Heterodimere binden nach Ligation mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> im Zellkern am Promotor eines Vitamin-D induzierbaren Gens und interagieren mit verschiedenen Kofaktoren.

Differenzierungsabhängige Gene, deren Transkription positiv durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> reguliert werden, sind unter anderem M-CSF, c-fms, CD14, CYP24, NF-κB und auch MADDAM (Zhu et al., 2002; Zhang et al., 1994; Armbrecht and Boltz, 1991; Fritsche et al., 2000). Die Regulation geschieht dabei entweder direkt, d.h. durch Bindung des VDR-RXR Heterodimers am Zielgen (wie bei CYP24) oder indirekt über die Aktivierung von anderen Transkriptionsfaktoren. Ein Beispiel hierfür ist die Regulation von CD14 als Makrophagenmarker durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>. Der VDR-RXR Komplex bindet nicht am CD14 Promotor, sondern moduliert in einer bislang unbekannten Weise die Aktivität des Transkriptionsfaktors SP-1. SP-1 gilt als essentieller Transkriptionsfaktor zur Aktivierung des CD14 Gens (Zhang et al., 1994).

Wie bereits erwähnt, wird die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> gehemmt. Funktionelle Effekte sind hierbei die Herunterregulation verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α oder INFα (Lemire, 1995; Bhalla et al., 1991). Die Mechanismen, die für die Regulation der verschiedenen Gene verantwortlich sind konnten zwar im Einzelnen noch nicht geklärt werden, allerdings ist für die Hemmung des IL-12 Gens exemplarisch gezeigt, dass 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> zunächst die NF-κB Expression supprimiert und die IL-12 Regulation ein sekundärer Effekt der NF-κB Regulation ist (D'Ambrosio et al., 1998). Weiterhin ist seit kurzem bekannt, dass zwei VDRE's im Promotorbereich des relB Gens vorhanden sind und die Bindung von VDR-RXR Heterodimeren an diese Elemente mit einer Blockierung der relB Transkription verbunden ist, d.h. VDR/RXR wirkt in diesem System als Repressor (Dong et al., 2003). Da eine Vielzahl von Genen in dendritischen Zellen über NF-κB reguliert wird, ist die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – vermittelte transkriptionelle Repression von relB sehr wahrscheinlich ein entscheidender Mechanismus, durch den 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> die Reifung und Aktivierung dendritischer Zellen verhindert.

### 1.1.3 Differenzierungsabhängige Genexpression

Der Prozess der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen hin zu spezialisierten Zelltypen wie Makrophagen und dendritischen Zellen verläuft

über mehrere Zwischenstufen und der Bildung von Vorläuferzellen, die durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und Markergene charakterisiert sind. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick, über die differentielle Expression von Transkriptionsfaktoren geben, die durch ihre An- oder Abwesenheit das „Schicksal“ einer Zelle bestimmen.

#### 1.1.3.1 Differentielle Expression von Transkriptionsfaktoren

Während der Hämatopoese entwickeln sich als erster Schritt die myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Hierbei werden Differenzierungs- und Proliferationssignale aus der Umgebung von Oberflächenrezeptoren über verschiedene Signalwege in den Kern weitervermittelt, wo Transkriptionsfaktoren die Expression von zelltyp- und entwicklungsspezifischen Genen steuern (Valledor et al., 1998). Über essentielle Transkriptionsfaktoren während früher Entwicklungsstadien ist derzeit noch wenig bekannt, wobei die Transkriptionsfaktoren GATA-2 und c-myb als Marker für Stammzellen mit hoher Teilungsrate gelten. Der Verlust von GATA-2 führt im Maussystem dazu, dass die Tiere keine Hämatopoese mehr haben und ca. 10 Tage nach ihrer Geburt sterben (Briegel et al., 1993; Tsai et al., 1994). Während der weiteren Differenzierung in der lymphatischen und myeloischen Reihe kennt man, wie in Abbildung 4 zu sehen, einige spezifische Transkriptionsfaktoren, die zur Expression von zelltypspezifischen Genen notwendig sind.

Ohne die jeweiligen Faktoren im einzelnen näher zu beschreiben, lassen sich zusammenfassend folgende Dinge festhalten:

Es gibt Proteine wie GATA-2 und cMyb, die vor allem in frühen Entwicklungsphasen für die anhaltende Proliferation und Selbsterhaltung der Stammzellen eine große Rolle spielen. Daneben sind z.B. Transkriptionsfaktoren wie C/EBP, PU.1, PAX5, GATA-1 oder GATA-3 für die Differenzierung spezifischer Zelltypen wie Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten usw. nötig. Regulationsmechanismen, die die Expression von entwicklungs- und zelltypspezifischen Proteinen steuern beruhen teilweise auf dem Vorhandensein von einzelnen Transkriptionsfaktoren.

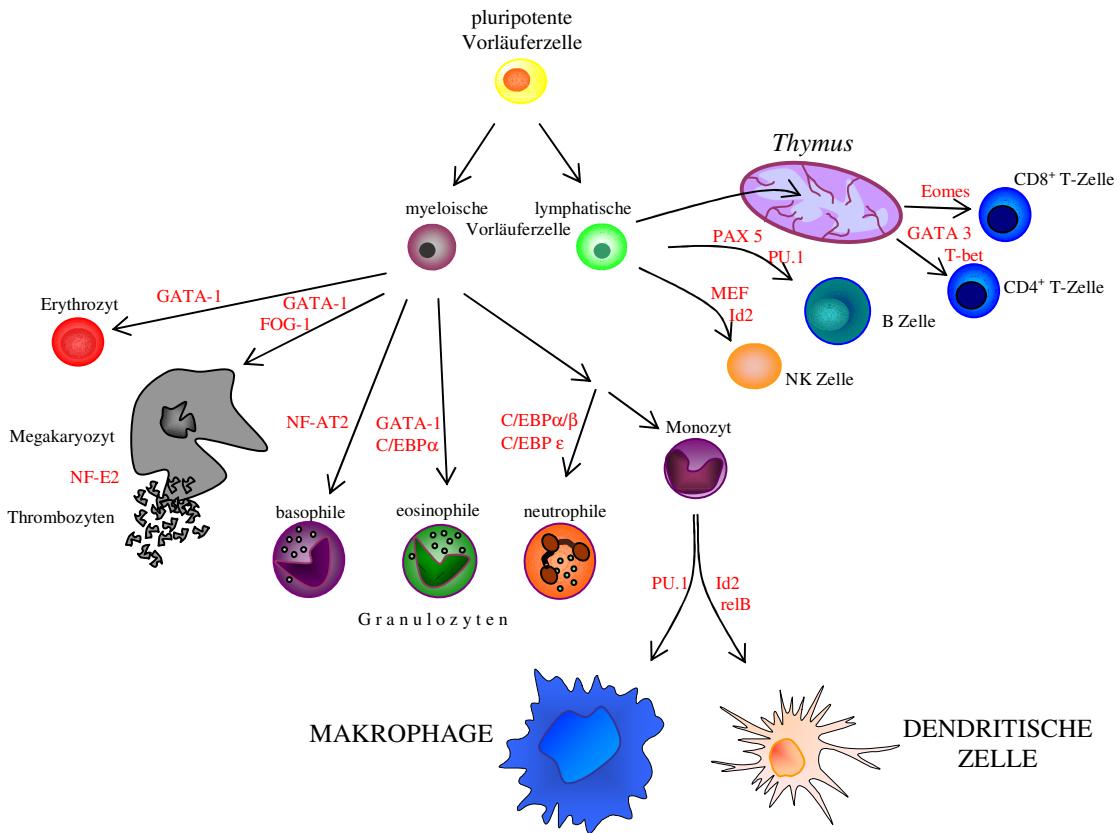


Abb. 4: Stammbaum der Hämatopoiese. Entwicklungsspezifische Transkriptionsfaktoren sind rot markiert und die Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen ausgehend von Monozyten dargestellt.

NF-E2 wird beispielsweise nur in der späten Phase der Megakaryozytendifferenzierung exprimiert und ist zu diesem Zeitpunkt für die spezifische Hochregulation von Genen wie  $\beta$ -Tubulin notwendig (Shivdasani, 2001). Hierdurch kommt es zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und dem Zerfall des Megakaryozyten.

Neben dieser zelltypspezifischen Expression eines einzelnen Transkriptionsfaktors ist in vielen anderen Fällen die Kombination und das Verhältnis von mehreren Transkriptionsfaktoren zueinander von entscheidender Bedeutung. PU.1, ein Mitglied der Ets-Familie von Transkriptionsfaktoren ist zum Beispiel wichtig für die Differenzierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und auch B-Zellen. PU.1 reguliert die Transkription von Proteinen

wie CD11b, CD18, den Rezeptoren für M-CSF, GM-CSF und G-CSF und auch von Mannose- und Scavenger-Rezeptoren (Anderson et al., 1998). PU.1-defiziente Mäuse entwickeln keine Makrophagen, Neutrophile und in ihrer Funktion stark beeinträchtigte B-Zellen (Scott et al., 1994). Dieser Transkriptionsfaktor ist also für die Entwicklung dieser Zelltypen unbedingt notwendig, aber nicht alleine verantwortlich und reguliert zusammen mit anderen Faktoren das jeweilige Schicksal von Vorläuferzellen. Im Falle der B-Zell Entwicklung hat sich gezeigt, dass PAX5 in Kombination mit PU.1 B-Zell spezifische Gene steuert (Bartholdy and Matthias, 2004). Bei Makrophagen und Neutrophilen hingegen ist für die Entwicklung aus gemeinsamen Vorläufern vor allem das Verhältnis von PU.1 und C/EBP $\alpha$  wichtig. PU.1 und C/EBP $\alpha$  sind zwar generell in beiden Populationen vorhanden, allerdings zeigen Makrophagen hohe PU.1 und niedrige C/EBP $\alpha$  Expressionslevel und im Falle von Neutrophilen ist dieses Verhältnis umgekehrt (Dahl et al., 2003).

Makrophagen und dendritische Zellen ähneln sich wie in vielen anderen Bereichen auch in der Expression von Transkriptionsfaktoren. Eine Ausnahme hiervon ist relB, eine Untereinheit der NF- $\kappa$ B Famile. RelB wird während der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen deutlich stärker hochreguliert als während der Differenzierung zu Makrophagen (Ammon et al., ; Baltathakis et al., 2001; Platzer et al., 2004) und relB defiziente Mäuse haben einen Defekt in der Entwicklung dendritischer Zellen (Wu et al., 1998). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der mit der Differenzierung von dendritischen Zellen in Verbindung gebracht wird, ist Id2. Hierbei handelt es sich um einen helix-loop-helix Transkriptionsfaktor, dessen Abwesenheit in Mäusen dazu führt, dass diese keine Langerhans-Zellen mehr entwickeln. Durch Microarray-Analysen hat sich auch gezeigt, dass Id2 die Expression von B-Zell spezifischen Genen in dendritischen Zellen unterdrückt (Hacker et al., 2003). Dies stellt letztendlich einen weiteren, wichtigen Mechanismus dar, wie Differenzierung funktionieren kann - nämlich durch die Hochregulation zelltypspezifischer Gene und der gleichzeitigen Repression von Genen, die charakteristisch für andere Zelltypen sind.

### 1.1.3.2 Differentiell regulierte Markergene in Makrophagen und dendritischen Zellen

Makrophagen und dendritische Zellen sind nahe verwandte Zelltypen, die phänotypisch viele Gemeinsamkeiten besitzen. Zur Charakterisierung von dendritischen Zellen und deren Subtypen verwendet man häufig Markergene, die häufig mit der Eigenschaft der dendritischen Zellen als professionelle antigenpräsentierende Zellen zusammenhängen. Aus der untenstehenden Liste sind daher Genprodukte bekannt, die Funktionen bei der Antigen-Aufnahme, -Prozessierung und -Präsentation über MHC II haben und auch an der Migration der dendritischen Zellen und der Interaktion mit Lymphozyten beteiligt sind.

DC-Marker	Referenz
CD1a	Chu <i>et al.</i> , 1983
CD83	Zhou <i>et al.</i> , 1992
Fascin p55	Mosialos <i>et al.</i> , 1996
DC-CK1	Adema <i>et al.</i> , 1997
DC-LAMP	de Saint-Vis <i>et al.</i> , 1998
Langerin	Valladeau <i>et al.</i> , 1999
DC-SIGN	Geijtenbeek <i>et al.</i> , 2000
BDCA-2	Dziona <i>et al.</i> , 2000
B7-DC	Tseng <i>et al.</i> , 2001
MADDAM	Fritsche <i>et al.</i> , 2000
CLEC1	Colonna <i>et al.</i> , 2000
CLIP170/restin	Sahin <i>et al.</i> , 2002
Id2	Hacker <i>et al.</i> , 2003

DC-SIGN (DC-specific ICAM-grabbing non-integrin) ist zum Beispiel ein Molekül, das sowohl für die Internalisierung von Antigenen, als auch für eine spätere Migration der dendritischen Zellen eine wichtige Rolle spielt (Engering *et al.*, 2002). DC-LAMP gehört zur Familie von Lysosomen assoziierten Membran Glyko-proteinen, die Ähnlichkeiten mit dem Scavenger-Rezeptor CD68 haben. DC-LAMP scheint ein zentrales Protein bei der Antigenprozessierung und der nachfolgenden Beladung der Peptide auf MHC II zu sein (Saint-Vis *et al.*, 1998; Barois *et al.*, 2002). Für eine koordinierte Interaktion mit T-Zellen und B-Zellen nach Aktivierung der dendritischen Zellen spielen DC-CK1 und B7-DC eine wichtige Rolle: DC-CK1 ist ein sezerniertes

CC-Chemokin, das zur Anlockung von B- und T-Zellen benutzt wird (Vissers et al., 2001) und B7-DC stellt ein kostimulatorisches Molekül dar, das zur Familie der B7-Proteine gehört, über PD1 mit T-Helferzellen interagiert und zusammen mit B7.1 und B7.2 für die Aktivierung von T-Zellen notwendig ist (Tseng et al., 2001).

Die Funktionen von Decysin und MADDAM in dendritischen Zellen ist noch nicht geklärt, jedoch gehören beide Proteine zu einer Familie von Metalloproteasen (ADAMs), die potentiell eine Aufgabe bei der gerichteten Migration und der damit verbundenen Degradation der extrazellulären Matrix haben könnten.

## 1.2 MADDAM, eine Metalloprotease der ADAM-Familie

MADDAM („Metalloprotease and Disintegrin dendritic antigen marker“), ist mit einer Protein-Sequenzhomologie von 84% das humane Ortholog des murinen ADAM19 (meltrin  $\beta$ ) (Fritsche et al., 2000). Es gehört zu einer Familie von Proteasen, die als „ADAM“-Familie („a Disintegrin and Metalloprotease“) bekannt ist. Die gemeinsame Struktur mit der namensgebenden Disintegrin- und Metalloproteasedomäne bestimmt auch im wesentlichen die Funktionen, die diese Gruppe an Proteinen auszeichnet und im Bereich der Zell-Adhäsion und Proteaseaktivität zu finden ist (Primakoff and Myles, 2000). Eine wichtige Funktion der Disintegrine als Adhäsionsmolekül ist mit in der Verschmelzung von Spermium und Eizelle gegeben. In diesem Fall bindet die Disintegrin-Domäne von ADAM 2 an das auf der Eizelle befindliche Integrin  $\alpha_6\beta_1$  und leitet damit den Verschmelzungsprozess ein (Chen et al., 1999). Viele ADAM Proteine sind auch durch ihre Funktion als Proteasen charakterisiert. Beispiele hierfür sind ADAM17 („TACE“), das durch Abspaltung aus zunächst membrangebundenem TNF- $\alpha$  die lösliche Form produziert (Moss et al., 1997), oder ADAM10 (Kuzbanian), das für die Abspaltung von „Delta“, einem Notch-Liganden, und damit für viele Differenzierungsprozesse benötigt wird (Qi et al., 1999).

### 1.2.1 Expressionsmuster in Mensch und Maus

Die Expressionsmuster von humanem und murinem ADAM19 wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen durch Hybridisierung von „multi-tissue-blots“ und Standard Northern-Blot Methoden in verschiedenen Geweben untersucht. Zusammenfassend hat sich ergeben, dass in beiden Spezies hohe Expressionslevel von ADAM19 in Herz, Gehirn und Lunge vorhanden sind. Im Menschen finden sich ausserdem hohe Level in Plazenta, Kolon und peripheren Blutleukozyten (Inoue et al., 1998; Wei et al., 2001). Neben der gewebespezifischen Expression, ist auch eine zelltypspezifische Expression in humanen dendritischen Zellen bekannt, die MADDAM als molekularen Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und dendritischen Zellen definiert (Fritsche et al., 2000).

### 1.2.2 Funktionen des MADDAM Proteins

Untersuchungen zu funktionellen Eigenschaften des MADDAM Proteins kommen zum größten Teil aus dem Maussystem. Verschiedene Gruppen haben unabhängig voneinander gefunden, dass ADAM19 wahrscheinlich eine wichtige Stellung bei der Neurogenese hat. Eine grundlegende Erkenntnis dazu war, dass Neuregulin-1 (NRG), ein Mitglied der Familie epidermaler Wachstumsfaktoren, ein direktes Substrat von ADAM19 darstellt und dessen Spaltung zur Freisetzung von löslichem NRG-1 führt. NRG's fördern unter anderem die Synthese von Acetylcholinrezeptoren und die Differenzierung von Schwann'schen Zellen des Nervensystems (Cheng et al., 1998). Zudem zeigen NRG-defiziente Mäuse eine Störung der frühen Entwicklungsstadien des Herzens und des zentralen Nervensystems (Meyer and Birchmeier, 1995). Neben der bisher bekannten Variante von ADAM19 wurde auch eine kürzere, durch alternatives Spleißen entstandene Isoform (meltrin  $\beta$  mini) beschrieben, der sowohl die Metalloprotease-, als auch die Disintegrindomäne fehlen. Eine Überexpression dieser kurzen Form in neuronalen Zellen führte zur Ausbildung von langen Axonen in diesem Zellsystem, wobei der Mechanismus dieses Effekts noch nicht geklärt ist (Kurisaki et al., 2002).

In Übereinstimmung mit NRG-defizienten Mäusen, die Störungen in der Entwicklung des Herzens haben, zeigen auch ADAM19 *knock-out* – Mäuse eine stark beeinträchtigte Entwicklung des Herzens. Die meisten Tiere sterben vor oder kurz nach der Geburt aufgrund ihrer Herzfehler (Zhou et al., 2004; Kurohara et al., 2004)

Mögliche Funktionen von ADAM19 im Immunsystem wurden bisher noch nicht untersucht. Es gibt *in vitro* Daten die zeigen, dass ADAM19 grundsätzlich (ähnlich wie ADAM17 / TACE) in der Lage ist TNF- $\alpha$  zu spalten. Eine vergleichende Untersuchung hat jedoch belegt, dass die Effizienz dieser enzymatischen Spaltung durch ADAM17 deutlich höher ist als bei ADAM19 und dass daher *in vivo* wahrscheinlich nur ADAM19 hochexprimierenden Zellen einen Beitrag zur TNF $\alpha$ -Freisetzung liefern (Zheng et al., 2004).

### 1.3 Epigenetische Regulationsmechanismen

Die Transkription von Genen wird auf unterschiedlichen Ebenen kontrolliert. Dabei spielen nicht nur die DNA-Sequenz und die Interaktion mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle, sondern auch die sterischen Bedingungen an der DNA. Einflüsse, die die Konformation der DNA und deren Zugänglichkeit zum Transkriptionskomplex beeinflussen, werden unter dem Begriff „Epigenetik“ zusammengefasst. Zwei wesentliche Mechanismen der epigenetischen Transkriptionskontrolle sind die Methylierung von CpG-Inseln und die Modifikationen von Histon-Resten.

#### 1.3.1 Methylierung von CpG Inseln

Die Methylierung der DNA an Cytosin-Resten in CpG Inseln ist sehr häufig mit einer Repression der Transkription verbunden und spielt bei vielen regulatorischen Prozessen wie z.B. der Inaktivierung von X-Chromosomen, der Inaktivierung repetitiver Elemente, dem Vorgang des „genomic imprinting“ oder auch der Stillegung von Transgenen eine wichtige Rolle (Razin and Riggs, 1980). Weiterhin ist eine Demethylierung der DNA mit der Entstehung von

Tumoren verbunden, wenn z.B. Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren fehlreguliert werden (Singal and Ginder, 1999).

Über den zugrundeliegenden Mechanismus der Repression durch Methylierung gibt es derzeit zwei mögliche Erklärungen: Zum einen weiß man, dass die Bindung einiger Transkriptionsfaktoren wie AP2, E2F oder NF- $\kappa$ B an methylierte DNA aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist. Die strukturelle Modifikation der DNA durch Methylierung würde also im einfachsten Fall dazu führen, dass Transkriptionsfaktoren ihre Bindestellen nicht mehr erkennen und Transkription nicht mehr stattfindet (Tate and Bird, 1993). Da es aber Transkriptionsfaktoren gibt, die unabhängig vom Methylierungsstatus der DNA an ihre Motive binden können (wie z.B. SP-1), muss es noch alternative Möglichkeiten der aktiven Repression geben. In diesem Zusammenhang spielen die methyl-CpG-bindenden Proteine MeCP1 und MeCP2 eine entscheidende Rolle: beide erkennen methylierte Cytosin-Reste in CpG-Inseln, binden daran und blockieren dadurch die Bindung anderer Faktoren, die zur Aktivierung der Transkription nötig wären, wirken also als dominante Repressoren (Meehan et al., 1989). Von MeCP2 ist außerdem eine Interaktion mit weiteren Ko-Repressoren bekannt. Bindungspartner sind interessanterweise auch Histondeacetylasen (HDAC), die aktiv an der Deacetylierung von Histonresten beteiligt sind (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Hier besteht also eine Verbindung von DNA-Methylierung und Histon-Modifikation.

### 1.3.2 Modifikation von Histonresten

Die DNA im Zellkern eukaryotischer Organismen ist in Einheiten von Nukleosomen verpackt, die selbst wiederum aus einem Histonoktamer und der umwundenen DNA zusammengesetzt sind. Modifikationen (der positiv geladenen) Histonreste durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung verändern die Wechselwirkung zwischen Histonen und der DNA und können daher Einfluss auf die Dichte der Chromatinstruktur und damit auch auf die transkriptionelle Regulation haben (Berger, 2002). Die Acetylierung von Histonresten und deren Effekte auf die Regulation der Transkription ist (im Vergleich zu anderen Modifikationen) eine relativ gut charakterisierte Art der

post-transkriptionellen Veränderung von Histonen und im wesentlichen abhängig von zwei Gruppen von Enzymen, den Histonacetyltransferasen (HAT) und den Histon-Deacetylasen (HDAC), durch deren Vorhandensein und Aktivität der Grad an Histonacetylierung bestimmt wird (Wade, 2001). Generell korelliert eine starke Histonacetylierung mit einer erhöhten Transkriptionsrate, wohingegen eine Erniedrigung der Histonacetylierung mit einer Repression der Genexpression verbunden ist (Forsberg and Bresnick, 2001).

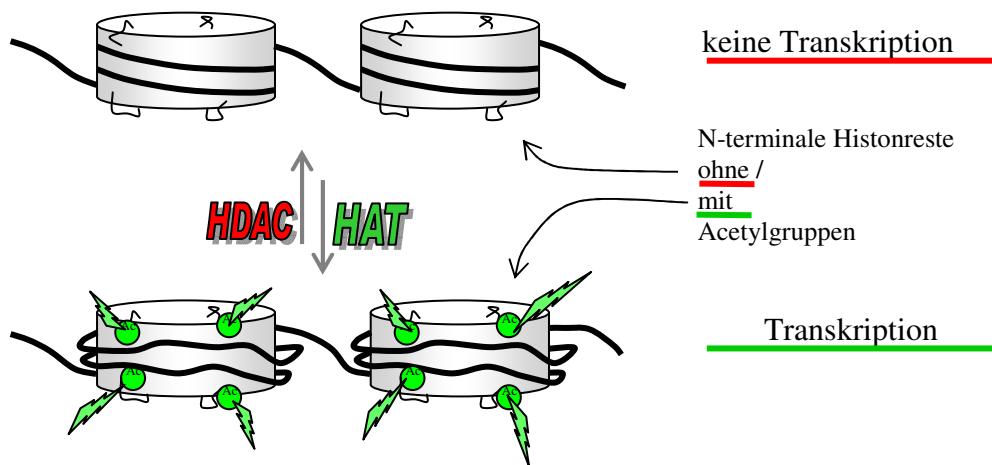


Abb. 5: Die verschiedenen Zustände der Nukleosomen werden durch das Gleichgewicht von HDAC- und HAT-Aktivität bestimmt. Acetylgruppen an den Histonresten sorgen für die Lockerung der DNA-Histon-Interaktion.

Zur spezifischen Acetylierung interagieren die verschiedenen Mitglieder der HAT-Familien mit Transkriptionsfaktoren oder Teilen des basalen Transkriptionskomplexes und übertragen unter ATP-Verbrauch Acetylreste von Acetyl-CoA auf die jeweiligen Histone. Diese ganz allgemein als „Kofaktoren mit HAT-Aktivität“ bezeichnete Proteinfamilie ist unterteilt in Gruppen der GCN5-/PCAF-, MYST-, TAF<sub>II</sub>p250-, CBP/p300- und SRC- Kofaktoren, die zum größten Teil für die Acetylierung von Histon H3 und Histon H4 verantwortlich sind (Marmorstein, 2001).

Für eine ebenfalls streng regulierte Deacetylierung der Histonreste und der damit verbundenen Kondensation der Chromatinstruktur ist eine Interaktion von Mitgliedern der HDAC-Familie mit Transkriptionsfaktoren oder dem Methyl-CpG bindenden Protein MeCP2 notwendig. Grundsätzlich unterscheidet man

aufgrund von Sequenzhomologien drei Klassen von Histondeacetylasen. Mitglieder der Klasse I teilen Sequenzmotive mit dem Transkriptions-Regulator RPD3 aus der Hefe, Mitglieder der Klasse II haben Ähnlichkeiten mit der Deacetylase HDA1 (ebenfalls aus Hefe) und Deacetylasen der Klasse III gehören zu einer Gruppe, die auch als Sirtuine bezeichnet werden und NAD<sup>+</sup> als Kofaktor benötigen, um Acetylgruppen von Histonresten zu entfernen (de Ruijter et al., 2003; North and Verdin, 2004). Die Inhibierung von HDAC's kann zu einer Hyperacetylierung von Histonen führen, die wiederum durch die Relaxierung der DNA-Konformation eine erhöhte Transkriptionsrate zur Folge hat. Unabhängige Untersuchungen mit Hilfe der „micro-array-Technologie“ und der „differential display“ PCR-Methode haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine Regulation der Transkription durch die alleinige Inhibierung der HDAC's nur in ca. 3-4% aller menschlichen Gene stattfindet und die Genregulation durch Histonacetylierung somit ein sehr spezifischer Mechanismus ist (Munster et al., 2001; Della et al., 2001; Van Lint et al., 1996).

## 2 Zielsetzung

In unserer Arbeitsgruppe wurde das humane Homolog zu murinem ADAM19 kloniert. MADDAM (Metalloprotease and Disintegrin dendritic cell antigen marker) wird in Monozyten exprimiert, kann aber in aus Monozyten generierten Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Dagegen wird MADDAM in aus Monozyten generierten dendritischen Zellen exprimiert. Zudem wird die MADDAM Expression in Monozyten durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> erhöht. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die transkriptionelle Regulation von MADDAM genauer untersucht werden. Nach der Klonierung des proximalen Promotors des MADDAM Gens sollten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert und charakterisiert werden, die einerseits die spezifische Expression von MADDAM in dendritischen Zellen und andererseits die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> vermittelte Hochregulation in Monozyten erklären. Daneben sollten mögliche epigenetische Mechanismen der Genregulation untersucht werden, die die transkriptionelle Regulation dieses Gens beeinflussen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien und Geräte

##### 3.1.1 Geräte

Autoklav	Walter, Geislingen
Beta-Counter	Berthold, Oakville, Kanada
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	MWG- Biotech, Ebersberg
Entwicklungsanlage	Agfa, Köln
Durchflußzytometer	Becton-Dickinson, USA
LightCycler	Roche, Mannheim
Mikroskope	Leitz, Heidelberg
PCR-Thermocycler (Modell PTC-200)	MJ-Research/Biometra
pH-Meter	Knick, Berlin
Phosphoimager	Amersham, Braunschweig
Luminometer Sirius	Berthold, Kanada
Sterilbank (Lamin Air: HA 2472)	Heraeus, Osterode
Wasserbäder	Julabo, Seelstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen:	Beckman Coulter, USA
Elutriator, Avanti J-20XP	
Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg
ELISA- Platten	Greiner, Nürtingen
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50, 225 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäß (0.5, 1.5, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen für Durchflußzytometer	Falcon, Heidelberg
Röntgenfilme (ECL)	Amersham, Braunschweig
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
PVDF Transfermembran	Millipore, Eschborn

### 3.1.3 Chemikalien

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

### 3.1.4 Antikörper

monoklonale Antikörper:

CD14-FITC (MY4)	Maus IgG2b	Coulter, USA
HLA-ABC FITC	Maus IgG2a	CBL
IgG gesamt	Maus IgG	Coulter
CBP	Maus IgG	Santa Cruz, USA
PCAF	Maus IgG	Santa Cruz, USA

---

TAF II p250	Maus IgG	Santa Cruz, USA
polyklonale Seren:		
Aktin	Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
acetyl Histon H3	Kaninchen	Upstate, Hamburg
acetyl Histon H4	Kaninchen	Upstate, Hamburg
SP-1	Kaninchen	Santa Cruz, USA
SP-3	Kaninchen	Santa Cruz, USA
p50	Kaninchen	Santa Cruz, USA
p65	Kaninchen	Santa Cruz, USA
relB	Kaninchen	Santa Cruz, USA
cRel	Kaninchen	Santa Cruz, USA
VDR	Kaninchen	Biomol, Hamburg
Ziege anti Maus	Maus IgG, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
Ziege anti Kaninchen	Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
Kaninchen anti Ziege	Ziegen IgG, HRP-konjugiert	Dako, Hamburg

### 3.1.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

cōplete <sup>®</sup> Inhibitor	Roche, Mannheim
Expand High Fidelity PCR Systeme	Roche, Mannheim
Protease Inhibitor Set	Roche, Mannheim
Plasmid Mini/ Midi/ Maxi Kit	Qiagen, Hilden
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Promega, Madison, USA
QuantiTect SYBR green	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim

Reverse Transkriptase SuperSkript II	Gibco BRL, Eggenstein
RNAse Inhibitor	Amersham, Braunschweig
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq PCR-mix	Promega, Madison, USA
First Choice RLM-RACE	Ambion, Austin

### 3.1.6 Molekulargewichtstandards

DNA- Längenstandards:

1 Kbplus Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
-----------------	-----------------------

Molekulargewichtstandards für Proteine:

Kaleidoscope Prestained Standards	Bio Rad, CA, USA
-----------------------------------	------------------

Protein Standard low range	Bio Rad, CA, USA
----------------------------	------------------

Protein Standard high range	Bio Rad, CA, USA
-----------------------------	------------------

### 3.1.7 Vektoren

pBlueskript	Stratagene, CA, USA
-------------	---------------------

pcDNA 3.1 V5 His	Invitrogen, CA, USA
------------------	---------------------

pGI3Basic	Promega, Madison, USA
-----------	-----------------------

### 3.1.8 Oligonukleotide

#### Sequenzierprimer

M13fw 5`-TTG TAA AAC GAC GGC CAG TG-3`

M13rev 5`-GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT-3`

---

MADproSeq3500	5'-CTA AAG AGG CTC AGA AAA AGG-3'
MADproSeq3000	5'-TTC TGC CCT ATT GTT TAT GTA A-3'
MADproSeq2500	5'-AGT GCA GTG GCG TGA TCT-3'
MADproSeq2000	5'-GAC TGT GAC AAA GAG CTA TGG T-3'
MADproSeq1500	5'-AAG TGT TGA AGA TGA GGC CT-3'
MADproSeq1000	5'-CCA ATT TAA TAG ACG TAG TGC T-3'
MADproSeq500	5'-ACT TCA TGC TGT GCT TTG G-3'

### PCR-Primer

MADDAM S	5'-AGG ATG TTG TAT GGA GGC C-3'
MADDAM AS	5'-TCC TGC CAC ATT CAC CTT-3'
Actin S	5'-CTA CGT CGC CCT GGA CTT CGA GC-3'
Actin AS	5'-GAT GGA GCC GCC GAT CCA CAC G-3'
ADAM12 S	5'-TGA GCA TGT GCA CGG CAG ACC AGT-3'
ADAM12 AS	5'- GTG GTG GCA TTG CAG CAG CGA TTC-3'
ADAM17 S	5'-CCG AAT GAG GAC CAG GGA GGG AAA TA-3'
ADAM17 AS	5'-TGT TCA GCA TCG ACA TAG GGC ACA CA-3'
Decysin S	5'- TGG TGT GAA GAG CAC TGA CGG GAA AC-3'
Decysin AS	5'- GGC CCA GCT CAT GTG ACA TCA CTC C-3'
CD14 S	5'- CTC AAC CTA GAG CCG TTT CT-3'
CD14 AS	5'- CAG GAT TGT CAG ACA GGT CT-3'
DCCK1 S	5'- ACA AAG AGC TCT GCT GCC TC-3'
DCCK1 AS	5'- CCC ACT TCT TAT TGG GGT CA-3'
HDAC1 S	5'-CAA TGA AGC CTC ACC GAA TC-3'
HDAC1 AS	5'-TGG AGC GCA AGA ATT TAA TG-3'

---

HDAC2 S	5'-AAT CC GCA TGA CCC ATA AC-3'
HDAC2 AS	5'-CAT GTT ATC TGG TCT TAT TGA C-3'
HDAC3 S	5'-CAA GAC CGT GGC CTA TTT C-3'
HDAC3 AS	5'-TGG TAT GGC TTG AAG ACG-3'
HDAC4 S	5'-ATC AAG CAA CAA CAG GAG ATG-3'
HDAC4 AS	5'-GCC CTT CTC CTT GTT CTT G-3'
HDAC5 S	5'-AAG AGA GTG CCA TTG CCA G-3'
HDAC5 AS	5'-TCT GGT CCA AAG AAG CAT G-3'
HDAC7 S	5'-TGC ACC ACC ACC TCT TCC TAG C-3'
HDAC7 AS	5'-TTC GCT TGC TCT TGT CCT TGT G-3'
HDAC8 S	5'-GGG CCA GTA TGG TGC ATT C-3'
HDAC8 AS	5'-CCC TCT TGG CTG ACC TTC TG-3'
sirt1 S	5'-CGA GAT AAC CTT CTG TTC GGT G-3'
sirt1 AS	5'-AAG TAT ATG GAC CTA TCC GTG G-3'
sirt2 S	5'-TGG TGG AGA AGC AGA CAT GG-3'
sirt2 AS	5'-CCT TCC AAG GTC AGC TCG TC-3'
sirt5 S	5'-GGA GCT GGA GGT TAT TGG AG-3'
sirt5 AS	5'-CGC CGG TAG TGG TAG AAC TC-3'
sirt6 S	5'-GGC AGT CTT CCA GTG TGG TG-3'
sirt6 AS	5'-TCC TCC ATG GTC CAG ACT CC-3'
mluMADproS	5'-CAA ACG CGT CTG GAG GAA AGG TGA TT-3'
xhoMADproAS	5'-CAA CTC GAG ACC TGC CCA CTG CCC-3'
mluMADpro240 S	5'-TAG CAA CGC GTG CGT CCA CCA AATC C-3'
mluMADpro150 S	5'-TAG CAA CGC GTA GCT CCT CCC CGG C-3'
mluMADpro129S	5'-TAG CAA CGC GTT CCA GCC CCC TCC G-3'

---

mluMADpro75S	5'-TAG CAA CGC GTC GGG GCT GGA GGC-3'
mluMADpro47S	5'-TAG CAA CGC GTC TGG GAG CCG GGT GG-3'
Mut GC-box2 S	5'-TAG CAA CGC GTA GCT CCT CCC CGG CCC CTA ACT CC-3'
NF mut2 S	5'-TCC GGG CTG GAG CCT ATC CTC-3'
NF mut1 AS	5'-GGA TAG GCT CCA GCC CGG AG-3'
Mut GC-box3 S	5'-GGC TGG AAT CGG AGC GTC TCG-3'
Mut GC-box3 AS	5'-TCA GCC TGA AAG TGC GTC TTA AGT TGA GAG AG-3'
VDRE mut2 S	5'-TCC CCT CGC CCA TCC CCT GG-3'
VDRE mut1 AS	5'-ATG GGC GAG GGG AGG CTC CA-3'
MAD ChIP S	5'-AGT CTC GCC AGC TCC TCC CC-3'
MAD ChIP AS	5'-CCT CAG CCA TAC CTG CCC ACT-3'
Dec ChIP S	5'- ACA ATC GTA ATG GTC CAG TT-3'
Dec ChIP AS	5'-GGA CTC ACA TCT GGA CAC TG-3'

### Oligonukleotide für gelshift / EMSA

GC-box 1/2	5'-TCG CCA GCT CCT CCC CGG CCC CTC CCT CCA GCC C-3'
NF-kB	5'-CCC CTC CGG GCT GGA GCC TCC CCT CCT CC-3'
VDRE 100	5'-GCC TCC CCT CCT CCA TCC CCT GGC GGA G-3'
VDRE 190	5'-TCC CCG CGG TCT CCC TCA CCT GAG CCA GC-3'
VDRE intron	5'-CCT GGG AGG TGG CAG AGG TCG GGG AAA-3'
VDRE osteocalc.	5'-GAC TCA CCG GGT GAA CGG GGG CAT TGC GA-3'
GC-box 3	5'-CGG GGC TGG AGG CGG AGC GTC TCG GCC-3'
GCmut1	5'-TCG CCA GCT CCT TTA CGG CCC CTC CCT CCA GCC C-3'

GCmut2 5'-TCG CCA GCT CCT CCC CGG CCC CTT TCT CCA GCC C-3'

GCmut1&2 5'-TCG CCA GCT CCT TTA CGG CCC CTT TCT CCA GCC C-3'

### 3.1.9 Bakterien und Zelllinien

#### 3.1.9.1 Zelllinien:

THP-1	humane myeloide Leukämiezelllinie (DSM ACC 16)
HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie (DSM ACC 57)
U937	humane myeloide Lymphomzelllinie (DSM ACC 5)
MonoMac6 (MM6)	humane myeloide Leukämiezelllinie (DSM ACC 124)
CaCo-2	humane Kolon Adenokarzinomzelllinie (DSM ACC 169)
HT-29	humane Kolon Adenokarzinomzelllinie (DSM ACC 299)
SF-9	Insekten Zelllinie, <u>spodoptera frugiperda</u> (DSM ACC 125)

THP-1, U937 und MonoMac6 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. HeLa, CaCo-2 und HT-29 Zellen hingegen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum bei 7% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert.

Folgende Zusätze wurden dem Medium beigefügt: L-Glutamin (2mM), 2 ml Vitamine, Penicillin/ Streptomycin (100 U/ml), Natriumpyruvat (1mM), 2-Mercaptoethanol (50µM). Zur Kultur der MM6 Zellen wurde dem Medium zusätzlich 1ml „OPI-Supplement“ (sigma) pro 100 ml Medium zugefügt.

FCS (Gibco) wurde vor Gebrauch bei 56°C für 30 min inaktiviert.

#### 3.1.9.2 Bakterienstamm: DH10B

benötigte Lösungen/Reagenzien zur Bakterienkultur:

LB-Medium:	10 g	NaCl
	10 g	Bactotryptone

	5 g	Hefeextrakt
	ad 1000 ml mit aqua bidest., autoklavieren	
LB <sup>amp</sup> -Platten:	1,5 g	Agar
	ad 100 ml mit LB-Medium aufkochen	
	abkühlen auf 60 °C	
	100 µg/ml	Ampicillin → Platten gießen

Die Bakterien wurden bei 37 °C entweder unter Schütteln als Flüssigkultur in LB Medium gehalten, oder auf Agarplatten über Nacht kultiviert. Für Transformationen wurde fertiges SOC-Medium verwendet. (siehe Molekularbiologische Methoden). Um die Kultur dauerhaft bei –80 °C lagern zu können, wurden 600 µl einer 1:1-Mischung aus Glycerin und LB-Medium mit 600 µl Bakteriensuspension gemischt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Adhärente Zellen (HeLa, CaCo-2 und HT-29) wurden nach Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen und 5 bis 10 min mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37 °C inkubiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurden sie in Medium mit Serum aufgenommen, um Trypsin/EDTA zu inaktivieren und je nach Zelltyp 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt.

In Suspension wachsende Zellen wie THP-1, U937 und MonoMac6 wurden regelmäßig auf ihre Dichte überprüft und in einer Konzentration von 0,3 bis 1,0 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml Medium gehalten.

### 3.2.1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung:

Benötigte Materialien:

Trypanblaulösung: 0,2% (w/v) Trypanblau  
in 0,9%iger NaCl-Lösung

Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde bestimmt, indem die Zellsuspension mit Trypanblaulösung 1:2 verdünnt wurde. Tote Zellen werden mit Trypanblau dunkel angefärbt und sind im Mikroskop deutlich von lebenden Zellen unterscheidbar. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die lebenden Zellen innerhalb eines Großquadrats (16 Kleinquadrate) gezählt.

Berechnung der Zellzahl:  $z \text{ [Zellen/ml]} = Z \times V \times 10^4$

$Z$  = Zahl der ungefärbten Zellen in einem Großquadrat (1 mm<sup>2</sup>)

$V$  = Verdünnungsfaktor

### 3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen

Einfriermedium: 50% RPMI 1640

40% FCS

10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium suspendiert. Nach Überführen in Kryoröhrchen wurden die Zellen 24h bei -80 °C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt, schnell angetaut, anschließend in kaltem PBS gewaschen (300xg, 8 min, 4 °C) und mit frischem Medium wieder in Kultur genommen.

### 3.2.1.3 Mycoplasmentest:

Die Kontamination von Zelllinien durch Mykoplasmen verändert deren Wachstum und Verhalten generell. Um dies zu verhindern, wurden in regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf Mykoplasmen untersucht und nur Zellen für Experimente verwendet, die eindeutig negativ getestet waren.

Dies erfolgte mit Hilfe eines ELISA (Mycoplasma Detection Kit) laut Anleitung des Herstellers (Roche).

### 3.2.1.4 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen

#### Isolierung von Monozyten:

Von gesunden Spendern wurde in einer Leukapherese ein Leukozyten-angereichertes Blutkonzentrat gewonnen (Graw et al. 1971). 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 daran anschließende Monozytenisolierung erfolgte über eine Gegenstrom-Zentrifugation (Elutriation) (Sanderson et al. 1977). Hierbei befinden sich die Zellen in einer Zentrifugationskammer, in der durch einen einstellbaren Pumpendruck entgegen der Zentrifugationskraft die Zellen nach ihrer Größe sortiert und fraktioniert werden, d.h. je größer und schwerer die Zellen, desto mehr Pumpendruck muss aufgewendet werden.

#### In vitro Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen:

Monozyten wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in Teflonbeutel eingesät, deren Innenseite hydrophob ist. Durch die hydrophobe Oberfläche kommt es zu einer weniger starken Adhäsion der Monozyten an den Kulturboden und es können nach der Differenzierung noch intakte/vitale Makrophagen geerntet und für weitere Versuche eingesetzt werden. Die Differenzierung erfolgte in RPMI 1640 Medium incl. 2% humanen AB-Serum für 7 Tage.

Um die Zellen nach der Differenzierung zu ernten, wurde der Beutel für 25 min im Kühlschrank gelagert und anschließend die Zellen durch leichtes Reiben abgelöst. Die Morphologie der Makrophagen (relativ groß mit langen Ausläufern und adhärent) wurde unter dem Mikroskop überprüft.

In vitro Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen:

Zur Generierung dendritischer Zellen wurden Monozyten zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml RPMI 1640 mit 10% FCS in Zellkulturflaschen für 7 Tage kultiviert. Folgende Zusätze wurden dem Medium beigefügt: GM-CSF (100 U/ml), IL-4 (50 U/ml). Die typische Morphologie der Zellen (kleiner als Makrophagen, „weniger rund“ und in Suspension wachsend) wurde unter dem Mikroskop begutachtet. Zur terminalen Differenzierung wurde am Tag 5 LPS (10 ng/ml) für 48 Stunden zugegeben.

### **3.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.2.1 Transformation von E.coli**

Für eine Transformation wurden 10 - 500 ng Plasmid (in 10  $\mu$ l) mit 50  $\mu$ l kompetente Bakterien gemischt und 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden im Wasserbad bei 42°C für 60 sec erhitzt und sofort für 2 min wieder auf Eis gestellt. Nach Zugeben von 250  $\mu$ l SOC-Medium (Invitrogen) wurden die Bakterien 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. 100  $\mu$ l der Suspension wurde auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert (Sambrook et al., 1989).

Für die Herstellung von Minipreps wurden mehrere Kolonien gepickt und nach über Nacht Kultur in LB<sup>amp</sup>-Medium präpariert. Die Transformation wurde durch Sequenzierung überprüft und Glycerinkulturen wurden angelegt.

#### **3.2.2.2 Mini-/ Midi-/ Maxi-Präparation**

Plasmide wurden laut Anleitung des Herstellers (Mini-Prep: Promega; Midi- und Maxi-Prep: Qiagen „endo-free“!) präpariert. Grundsätzlich basiert das Prinzip der Plasmid-Präparation auf der alkalischen Lyse von Bakterien und einer

anschließender Aufreinigung der DNA über hydrophile Säulen oder Membrane. Wenn die präparierte DNA für Transfektionen verwendet wurde, musste bei der DNA Präparation das von den Bakterien stammende und bei einer Transfektion störende Endotoxin entfernt werden. Dies geschah mit einem speziellen „Endotoxin-removal buffer“ (Qiagen), der im Lysat befindliches Endotoxin bindet und somit eine Interaktion mit dem hydrophilen Säulenmaterial verhindert.

### 3.2.2.3 Agarose-Gel für DNA:

benötigte Puffer:

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 mit aqua bidest.		
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 aqua bidest.		

Die Agarose wurde mit H<sub>2</sub>O aufgekocht und unter Rühren auf 60°C abgekühlt, TAE (50x) und Ethidiumbromid zugefügt und das Gel gegossen. Als Laupuffer diente TAE (1x) und der Ladepuffer für DNA wurde in einem Verhältnis von 1:4 eingesetzt. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte der Lauf bei 80-100 Volt.

### 3.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion

Die Aufbereitung von DNA aus Agarosegelen wurde mittels QiaEx nach Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Ausgeschnittene Gelfragmente mit der enthaltenen DNA wurden dabei aufgeschmolzen und die freie DNA an Sepharose-beads gekoppelt, gewaschen und in Wasser eluiert.

### 3.2.2.5 Restriktionsverdau

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen wurden die Puffer- und Enzymkombinationen der Firma Roche Diagnostics verwendet. Grundsätzlich wurden Ansätze im 20µl-Format folgendermaßen durchgeführt:

x µl template DNA (0,1 – 10 µg)

2 µl Puffer – je nach Enzym abgestimmt (Roche-Tabelle)

ad 18 µl H<sub>2</sub>O

2 µl Enzym

---

→ 1 Stunde bei 37 °C inkubieren

### 3.2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Isolierte und durch Restriktionsverdau gewonnene DNA-Fragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Plasmide ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. DNA-Fragmente, die über PCR gewonnen wurden, wurden in den pCR 2.1-Topo-Vektor (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers kloniert.

### 3.2.2.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen wurden von Geneart, Biopark, Regensburg angefertigt. Sequenzvergleiche und –analysen wurden mit verschiedenen Programmen durchgeführt (z.B. Generunner, Blast (National Center of Biotechnology

Information), MatInspector und PromoterInspector (Genomatix.de), Repeatmasker („A.F.A.Smith and P.Green“) ; <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>).

### 3.2.2.8 Markierung von Oligonukleotiden mit $\alpha$ -<sup>32</sup>P

Sense und Antisense Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen synthetisiert. Zur Generierung von Doppelstrang-DNA wurden die Einzelstränge in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zusammenpipettiert und durch Erhitzen auf 95°C und langsames Abkühlen auf RT „annealt“. Die endständige Markierung dieser Oligos mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P wurde von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig) mittels Polynukleotid-Kinase durchgeführt, einem Enzym, welches die Bindung von Phosphatresten an freie 5'-Enden der DNA katalysiert.

### 3.2.2.9 Präparation und Analyse von RNA

RNA wurde mittels RNeasy-mini Säulen von Qiagen nach Hersteller-Angaben präpariert. Hierbei handelt es sich um das gleiche Prinzip wie zur Aufreinigung von DNA, allerdings werden dazu Puffersysteme verwendet, mit denen spezifisch RNA am Säulenmaterial angereichert wird. Die Konzentration isolierter RNA und deren Reinheit wurde photometrisch bestimmt und deren Qualität durch Agarose-Gele überprüft.

#### 1% Agarose-Gel für RNA

benötigte Lösungen (Molaritäten entsprechen der Endkonzentration):

MOPS (20x)	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 <sub>DEPC</sub>		

Ladepuffer RNA 10 ml Formamid deionisiert  
 3,5 ml (2,2 M) Formaldehyd  
 1 ml MOPS (20x)  
 0,8 ml Bromphenolblau  
 0,2 g 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.

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

Die Agarose wurde in MOPS/H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgekocht, auf ca. 60 °C abgekühlt, das Formaldehyd unter Rühren zugegeben und das Gel gegossen. Die RNA-Proben wurden zusammen mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 für 20 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und aufgetragen. Als Laupuffer diente MOPS (1x), die Elektrophorese erfolgte bei 80 V

### 3.2.2.10 Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte mit dem Superscript II Kit der Firma Invitrogen. Ausgangsmenge waren 1 µg Gesamt-RNA, die mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl gebracht wurde. Dem Ansatz wurden 1 µl „Random Decamers“ als Primer und 1 µl dNTP (10 pmol/µl) zugegeben, alles für 5 min bei 65 °C erhitzt, auf 4 °C abgekühlt und nach Zugabe von 2 µl DTT, 4

$\mu$ l Puffer und 1  $\mu$ l RNase Inhibitor (Amersham Biosciences) bei 42 °C für weitere 2 min inkubiert.

Nach Zugabe von 1  $\mu$ l reverser Transkriptase erfolgte die Reaktion bei 42 °C für 50 min. Nach Denaturieren des Enzyms bei 70 °C, 15 min. wurde die cDNA abgekühlt, der Ansatz mit 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt, und auf -20 °C gelagert.

### 3.2.2.11 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mit Hilfe zweier entgegengesetzt orientierter, spezifischer Primer lassen sich bei der PCR aus DNA-Proben Sequenzen amplifizieren (Mullis et al., 1986). Es lassen sich hierbei geringe DNA-Mengen oder bei vorhergehender reverser Transkription auch zelluläre RNA analysieren. Diese Methode wurde zur Klonierung von 5`-Enden (RACE-PCR), zur Kontrolle von Insertgrößen (Plasmid-PCR), zur Quantifizierung von RNA-Transkripten (real-time PCR) oder zur Amplifizierung von DNA aus genomischen „templates“ genutzt.

### 3.2.2.12 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR

10  $\mu$ g gesamt-RNA von dendritischen Zellen wurden nach Protokoll des Herstellers für die RLM-Race-PCR (FirstChoice RLM-PCR kit, Ambion) zur Bestimmung der 5`-Sequenz des MADDAM-Transkripts verwendet. Bei dieser Methode werden zunächst alle freien 5' Phosphatreste entfernt, dann die 5' CAP-Strukturen abgespalten und an die dadurch freigewordenen 5' Phosphatreste ein Adapter ligiert. Somit ligieren Adapter nur an vollständige, ‚gecappte‘ mRNA's und die nachfolgende PCR mit adapterspezifischen und genspezifischen Primern liefert den 5' gelegenen Transkriptionsstart.

Folgende Primer wurden benutzt:

RACE SM1                    5'-TGC AGG GCA AAC GCC AGC AAG CAG A-3'

RACE SM3                    5'-CGC TCA CAC GCC CTC AGC CAT ACC T-3'

RACE Outer (adapter) 5'-GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG-3'

RACE Inner (adapter) 5'-CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT  
TGA TG-3'

Programm: 94 °C 2 min.

94 °C 30 sec	30 Zyklen	}
60 °C 30 sec		
72 °C 40 sec		
72 °C 7 min		
4 °C		

Das PCR-Produkt wurde anschließend in den pCR 2.1-Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

### 3.2.2.13 Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR wurden mittels Quantitect SYBR-green kit (Qiagen) im 20µl - Maßstab am LightCycler® (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen synthetisiert, Sequenzen → siehe Methodenteil.

Programm: 94 °C 15 min.

94 °C 15 sec	50 Zyklen	}
60 °C 20 sec		
72 °C 25 sec		
60 °C – 90 °C Schmelzkurve		
4 °C		

Die Produktgröße wurde anfangs im Agarosegel kontrolliert und Schmelzkurven dienten zur Kontrolle der Spezifität des PCR Produkts. Die relativen Mengen an RNA wurden anhand einer Standardkurve mit vier verschiedenen Verdünnungen (1, 1:10, 1:50, 1:100) bestimmt. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Regressionsgerade berechnet, in der die

Konzentration der Verdünnung und die dazugehörige Zyklenanzahl aufgetragen sind, bei der die gemessenen Fluoreszenz des PCR-Produkts eine definierte Größe hat. Diese Fluoreszenzintensität wurde von der LightCycler-Sofware für jeden Lauf neu bestimmt und lag im linearen Amplifikationsbereich des PCR Produkts. Die MADDAM, HDAC und Sirtuin - Werte wurden auf die Expression des housekeeping-Gens  $\beta$ -Actin normalisiert. Die Effizienz E eines PCR-Laufs wurde über die Steigung der Standardgerade (slope) berechnet ( $E = 10^{-1/slope}$ ) und lag abhängig von den verwendeten Primern zwischen 1,8 und 2.

### 3.2.2.14 Bisulfit – Sequenzierung

benötigte Reagenzien:

Natronlauge (3 M)	frisch hergestellt
Hydrochinon (0,4 M)	frisch hergestellt
Bisulfit (3,8 M, $\text{NaHSO}_3$ )	frisch hergestellt
Ammoniumacetat (10 M)	

Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung wurde der Methylierungsstatus einer Sequenz untersucht. Dabei wurden zu 5  $\mu\text{g}$  genomischer DNA 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 5,5  $\mu\text{l}$  NaOH zugegeben und 15 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden 15  $\mu\text{l}$  Hydrochinon, sowie 540  $\mu\text{l}$  Bisulfatlösung zugefügt und im PCR Cycler mit folgendem Program behandelt:

95°C 3 min } 5 Zyklen  
55°C 57 min }

Bei diesem Schritt geschieht eine Deaminierung von Cytosin zu Uracil, während 5-Methylcytosin unverändert bleibt, d.h. nach Aufreinigung der DNA und einer nachgeschalteten PCR-Amplifikation eines beliebigen Bereichs können zuvor methylierte CpG Reste von nichtmethylierter DNA mittels Sequenzierung unterschieden werden, indem nicht methylierte CpG Dinukleotide bei der Sequenzierung als TpG Dinukleotide gelesen werden.

Die behandelte DNA wurde über Wizard-Spin Säulen (Promega) aufgereinigt und in 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Mit 11 µl NaOH wurde erneut 15 min bei 37°C denaturiert. Durch Zugabe von Ammoniumacetat und eiskaltem Ethanol wurde die DNA bei -80°C gefällt und das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 50 µl TE Puffer gelöst.

Anschließend wurde für den sense-Strang eine „Nested“-PCR durchgeführt.

folgende Primer wurden verwendet:

MAD-BiSeq-SF1 5'-GAT GGT GTT GGG TGA ATT ATT T-3'

MAD-BiSeq-SF2 5'-GGT GTT TGG TAT AGT GTG GGA T-3'

MAD-BiSeq-SR1 5'-CTA ACC ACT TAC TTA TCC ATC CAA A-3'

MAD-BiSeq-SR2 5'-TAC ACC CCC TAA CAT AAT AAC AAC A-3'

## Programm für 1.PCR:

## Programm für 2.PCR:

94 °C 30 sec

94 °C 1 min

94 °C 10 sec  
55 °C 15 sec  
72 °C 1:10 min

94 °C 15 sec  
55 °C 15 sec  
72 °C 1:10 min

72°C 4 min 72°C, 4 min  
Jeweils 10 µl wurden auf einem Agarosegel überprüft, der Rest wurde mit Polyethylenglykol gefällt und in Trispuffer gelöst. Daraufhin erfolgte die Separation der Reaktionen mit  $\lambda$ -DNA-SGS.

### 3.2.2.15 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Zur Überprüfung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Fragmente des MADDAM Promotors wurden EMSA/gelshift Experimente durchgeführt.

benötigte Lösungen (angegebene Molaritäten/Konzentrationen beziehen sich auf die Stammlösungen):

---

	KCl (2 M)	20 µl
	DTT ( 100 mM)	10 µl
	MgCl <sub>2</sub> (1 M)	3 µl
	EDTA (0,5 M)	2 µl
	H <sub>2</sub> O ad 100 µl	
Sonde (5 pmol/µl), Kompetitoren (100 - 500 pmol/µl)		
„Cocktail“ (für 1 Ansatz)	Glycerol (80%)	1,5 µl
	10x Bindepuffer	1 µl
	poly d(I/C) (1 g/µl)	0,5 µl
	Sonde	1 µl
	H <sub>2</sub> O ad 8 µl	
Leerpuffer	10x Bindepuffer	10 µl
	Glycerol (80%)	15 µl
	H <sub>2</sub> O	75 µl
Blaumarker	Leerpuffer	10 µl
	DNA-Ladepuffer	2 µl

In die vorbereiteten Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde Kompetitor und H<sub>2</sub>O vorgelegt, im Isotopenlabor der „Cocktail“ hinzugegeben. Nach Zugabe des Kernextrakts folgte eine Inkubation von 10 min bei RT. Anschließend wurde der Antikörper hinzugefügt und wieder 15 min inkubiert.

Die Polyacrylamidgele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit Laupuffer TGE (Tris-Glycin-EDTA) oder TBE (Tris-Borat-EDTA) aufgefüllt und die Taschen mit Laupuffer gespült. Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese bei 160 V, 25 mA pro Gel für ca. 2 h durchgeführt.

Das Gel wurde aus der Apparatur in 5%ige Essigsäure für 15 min fixiert und anschließend auf Whatman-Filterpapier im Vakuum-Trockner 1 h bei 80 °C

getrocknet. Die Detektion erfolgte mit Europium-beschichteten,  $^{32}\text{P}$  sensitiven „screens“ am Phospholmager®.

#### Polyacrylamidgel 15 ml/Gel

	6%	6,5%	7%	7,5%	8%	8,5%	9%
10x Gelpuffer	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Acrylamid 40%	2,3 ml	2,4 ml	2,6 ml	2,8 ml	3 ml	3,2 ml	3,4 ml
H <sub>2</sub> O milli	11,1 ml	11 ml	10,8 ml	10,6 ml	10,4 ml	10,2 ml	10 ml
Amm.peroxodisulfat (10%)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

#### 3.2.2.16 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP-Methode wurde verwendet, um *in vivo* gebundenes Kernprotein an definierte DNA-Bereiche nachzuweisen. Im Falle des MADDAM und Decysin-Promotors geschah dies mit spezifischen Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 und H4, einer anschließenden Anreicherung über Immunpräzipitation und einer Quantifizierung der im Komplex mit dem Kernprotein gefällten DNA durch PCR.

benötigte Lösungen (Molaritäten und Prozentangaben entsprechen Stammkonzentrationen):

CLS	3,5 ml	HEPES pH 7,9
	1,4 ml	NaCl (5M)
	140 µl	EDTA (0,5M)
	175 µl	EGTA (0,2M)
	43,8 ml	H <sub>2</sub> O

vor Gebrauch : 7 ml CLS + 3 ml Formaldehyd (37%)

STOP 1,38 M Glycin in PBS

CBM 20µl HEPES / KOH (1mM), pH 7,9

85 µl KCl (2 M)

4 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0)

ad 1,8 ml mit aqua bidest (1667 µl) (fertig)

frisch zugeben: 20µl PMSF (100 mM)

2 µl Pepstatin (1 µg/µl)

2 µl Aprotinin (2 µg/µl)

L1A 900 µl CBM

ad 1 ml mit aqua bidest (100 µl)

L1B 900 µl CBM

100 µl NP-40 (10%)

L2 500 µl HEPES / KOH (1 M), pH 7,5 @ 25 °C

500 µl SDS 20%

200 µl EDTA (0,5 M)

ad 10 ml mit aqua bidest (fertig)

frisch zugeben: 100 µl PMSF (100 mM)

10 µl Pepstatin (1 µg/µl)

10 µl Aprotinin (2 µg/µl)

DB 332 µl HEPES / KOH (1 M), pH 7,5 @ 25 °C

48 µl EDTA (0,5 M)

666 µl NaCl (5 M)

2,2 ml NP-40 (10%)

ad 20 ml aqua bidest (16,7 ml)

+ 1 ml BSA (20% in PBS - stock)  
+ 100 µl NaBu (1M in PBS - stock)  
frisch zugeben: 200µl PMSF (100 mM)  
20 µl Pepstatin (1 µg/µl)  
20 µl Aprotinin (2 µg/µl)  
WB 400 µl HEPES / KOH (1 M), pH 7,5 @ 25 °C  
2 ml LiCl (5 M)  
80 µl EDTA (0,5 M)  
ad 20 ml aqua bidest  
+ 100µl BSA (20% in PBS - stock)  
+ 100 µl NaBu (1M in PBS - stock)  
EB 1 x TE pH 8,0 und 1% SDS Endkonz.

Pro Ansatz wurden  $5 \times 10^6$  Zellen mit 1ml CLS-Puffer je 10 ml Zellsuspension für 10 min. fixiert und anschließend durch Zugabe von 1,1 ml Glycin pro 10 ml überschüssiges Formaldehyd gebunden („quenching“). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 250 µl hypotonem Puffer L1A resuspendiert, für 5 min. auf RT inkubiert und anschließend mit 250µl Puffer L1B innerhalb 10 min. auf RT lysiert. Die freien Kerne wurden in 500 µl Lysepuffer L2 aufgenommen und mittels Ultraschall im Sonicator (3x 10 sec. Pulse, *Stufe 2*) geschert. Übrige, größere Membranfragmente und Kernreste wurden durch 10 min. Zentrifugation bei 10.000 rpm pelletiert und die im Überstand befindliche DNA in 150µl Aliquots aufgeteilt und mit 1350 µl dilution-buffer „DB“ verdünnt. Die Präzipitation der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit Antikörpern, spezifisch gegen acetyliertes Histon H3/H4, die zuvor über Nacht bei 4 °C an magnetische „beads“ der Firma Dynal gekoppelt wurden. Die präzipitierten Komplexe wurden anschließend 3 mal mit WB gewaschen und mit 2x 150 µl EB konnten die DNA-Protein-Komplexe von den beads eluiert werden. Die Protein-DNA Vernetzung wurde durch 4 stündiges Erhitzen auf 65 °C und Zugabe von NaCl in einer

Endkonzentration von 200 mM wieder aufgelöst (*reverse crosslinking*). Die somit durch Präzipitation angereicherte und freie DNA wurde durch Phenol-Chloroform aufgereinigt und mittels quantitativer PCR analysiert.

### 3.2.2.17 Transfektionen

Transfektionen wurden dazu eingesetzt, um verschiedene Reporterplasmide in Zelllinien, aber auch primären Zellkulturen auf ihre Aktivität hin zu testen. Je nach Zelltyp haben sich verschiedene Arten der Transfektion als optimal erwiesen und kamen wie folgt zum Einsatz:

Transfektion mittel Effectene (HeLa Zellen):

Am Tag 0 wurden 250.000 Zellen/2 ml pro Ansatz in 6-well Platten eingesät.

Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion:

Jeweils 500 ng DNA wurden in 150 µl Puffer EC aufgenommen und mittels 8 µl „enhancer“ und kurzem vortexen kondensiert. Nach ca. 5 min. auf RT wurden jeweils 25 µl „effectene Liposomen“ zugegeben, der Ansatz gevortext und für weitere 5 min. auf RT stehen gelassen. Der Transfektionsansatz wurde tröpfchenweise zu den Zellen gegeben und am Tag 3 die Expression des Luciferase-Reporters überprüft.

Transfektion mittels DEAE/ Dextran (THP-1 Zellen)

Benötigte Lösungen:

STBS-Puffer:

Tris pH 7,4 (25 mM)	25 ml
NaCl (137 mM)	8 g
KCl (5 mM)	0,372 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,6 mM)	0,084 g
CaCl <sub>2</sub> (0,7 mM)	0,102 g

MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM) 0,101 g

mit H<sub>2</sub>O bidest ad 1 l.

DEAE- Stammlösung (10 mg/ml) in STBS Puffer, sterilfiltriert

Es wurden am Tag 0 500.000 Zellen/ml in Zellkulturflaschen eingesät, am Tag 1 pro Ansatz 6 ml Zellsuspension abzentrifugiert und mit 5 ml STBS gewaschen. In ein Eppendorfröhrchen wurden 70 µl STBS vorgelegt, mit 200 ng DNA und 10 ng Renilla-Referenzgen gemischt, dazu 70 µl DEAE in STBS (800 µg/ml Stammlösung) pipettiert und die Mischung auf die Zellen gegeben. Nach 20 min Inkubation bei 37°C wurde zum Stoppen der Reaktion 5 ml STBS hinzugefügt und 2x mit STBS gewaschen, um dann das Pellet in 6 ml Medium mit 10% FCS aufzunehmen und in Zellkulturschalen zu überführen. Am Tag 3 wurde die Expression der Luciferase anhand der Enzymaktivität bestimmt.

#### Transfektion mittels Amaxa Nucleofection

Aus primären Monozyten differenzierte Makrophagen bzw. dendritische Zellen wurden mit dem „DC nucleofection Kit“ (Amaxa) nach Hersteller-Angaben transfiziert. Pilot-Experimente mit einem GFP-Plasmid haben gezeigt, dass die Transfektionseffizienz bei diesen Zellen bei ca. 10% liegt (siehe Ergebnisteil). Es wurden pro Ansatz 2.000.000 Zellen und 5 µg DNA verwendet und die Proteinexpression (GFP oder Luciferase) nach 16 Stunden gemessen.

#### 3.2.2.18 Luciferase-Reporter Assay

Luciferase wurde als Reportergen zur Untersuchung der Aktivität von Promotorkonstrukten oder zur Untersuchung von gezielten Mutationen in Promotorkonstrukten verwendet. Hierbei wurde ein Testsystem der Firma Promega benutzt, das die gleichzeitige Messung von „firefly-Luciferase“ als Reporter und „renilla-Luciferase“ als interne Transfektionskontrolle erlaubt.

Mit Luciferase-Konstrukten transfizierte Zellen wurden nach 48 Stunden durch Zugabe von „*Passive Lysis Buffer*“ nach Herstellerangaben lysiert. Zur Quantifizierung der exprimierten firefly-Luciferase wurden 20 µl Lysat mit 100 µl

„Luciferase Reagenz LAR II“ in einem 5 ml Polystyrenröhrchen gemischt. Zur Bestimmung von „renilla-Luciferase“ als Referenz, wurde die Mischung anschließend mit 100 µl „Stop and glow“-Reagenz gemischt, gevortext und im Luminometer vermessen.

### 3.2.3 Immunologische Methoden

#### 3.2.3.1 Durchflusszytometrie - Färbung von Oberflächenantigenen

Die Durchflusszytometrie wurde zur Analyse der Oberflächenexpression von CD14 und MHC I auf 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – stimulierten THP-1 Zellen angewendet.

benötigte Lösungen:

FACS-Waschpuffer

	5 ml (600 µg/l)	Immunglobulin-Lösung (60 mg/ml)
	5 ml (0,1%)	Na-azid-Stammlösung
		zu 500 ml PBS zugeben.
Fixierlösung	1 g (1%)	Paraformaldehyd ad 100 ml mit aqua bidest., auf 60 °C erhitzen und einige Tropfen NaOH-Lösung zugeben, bis die Trübung verschwunden ist und den pH auf 7,4 einstellen

5x10<sup>5</sup> THP-1 Zellen/ Ansatz wurden zweimal mit je 500 µl FACS- Waschpuffer in FACS- Röhrchen gewaschen (1400 Upm, 5 min, 4 °C).

Das Pellet wurde resuspendiert und mit dem CD14, bzw. MHC I oder IgG<sub>gesamt</sub> Antikörper 30 min. auf 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen mit je 500 µl Waschpuffer. Mit je 500 µl PFA-Puffer wurden die Zellen fixiert und konnten so bis zum Messen maximal eine Woche bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden, ohne an Fluoreszenz zu verlieren. Die

Messung erfolgte am FACScan-Gerät der Firma Becton/Dickinson mit der Auswertesoftware CellQuest.

### 3.2.4 Proteinchemische Methoden

#### 3.2.4.1 Präparation von Zellkerextrakten

Reagenzien (angegeben ist jeweils dieStammkonz)

Puffer A:	100 µl	Hepes (1 M) pH 7,9
	100 µl	KCl (2 M)
	15 µl	MgCl <sub>2</sub> (1 M)
	50 µl	DTT (100 mM)
	10 µl	Antipain (20 µg/ul)
	40 µl	Chymostatin (20 µg/ul)
	5 µl	E64 (20 µg/ul)
	25 µl	Leupeptin (1 µg/ul)
	10 µl	Pepstatin (1 µg/ul)
	10 µl	Aprotinin (2 µg/ul)
	100 µl	PMSF (100 mM)
	100 µl	Sodium-o-vanadat (100 mM)
	ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O millip., frisch herstellen.	

Puffer B: Puffer A +

0,4 - 1% (je nach Zelltyp) NP-40

Puffer C:	20 µl	HEPES (1 M) pH 7,9
	84 µl	NaCl (5 M)
	310 µl	Glycerol (80%)
	1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (1 M)

---

0,4 µl	EDTA (0,5 M) pH 8,0
5 µl	DTT (100 mM)
2,5 µl	Antipain (20 µg/ul)
8 µl	Chymostatin (20 µg/ul)
1 µl	E64 (20 µg/ul)
5 µl	Leupeptin (1 µg/ul)
1 µl	Pepstatin (1 µg/ul)
5 µl	Pefabloc SC (100 µg/ul)
1 µl	Aprotinin (2 µg/ul)
10 µl	PMSF (100 mM)
10 µl	Sodium-o-vanadat (100 mM)
2 µl	1,10 Phenanthroline

ad 1 ml mit H<sub>2</sub>O<sup>millip.</sup>, frisch herstellen.

Nach dem Ernten der Zellen (mind. 10<sup>7</sup>) wurden sie zweimal mit eiskaltem, steriles PBS gewaschen. Die Zellen wurden in Puffer A mit einer Konzentration von 1-2x10<sup>7</sup>/ ml Zellen resuspendiert und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Aufgrund der Hypotonie der Lösung kommt es zur Volumenzunahme der Zellen. Nach 3 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (6 min, 2000 Upm, 4 °C), in 150-200 µl Puffer A resuspendiert und nach Zugabe der gleichen Menge Puffer B gevortext. Bei diesem Schritt erfolgte die Lyse der Zellen durch das Detergenz Nonidet P40. Die Inkubation auf Eis erfolgte je nach Zelltyp zwischen 5 und 15 min, bis die Zellkerne frei vorlagen (am Mikroskop verfolgen!). Durch Waschen mit 500 µl Puffer A (6 min, 2500 Upm, -9 °C) wurde restliches Detergenz entfernt und das Pellet in 60-80 µl Puffer C resuspendiert (8 min, Eis) - die Hypertonie von Puffer C führte zur Diffusion der löslichen Kernproteine. Bei 13000 Upm, 10 min, -9 °C wurden die Zellkernreste abzentrifugiert und die Lagerung des Überstands mit den enthaltenen Kernproteinen erfolgte bei -80 °C.

## 3.2.4.2 SDS-PAGE

benötigte Lösungen (angegebene Gewichts-% oder Molaritäten beziehen sich auf die Endkonzentration):

Acrylamid-Stammlösung:	146 g	Acrylamid
	4,0 g	Bisacrylamid
Ad 500 ml mit aqua bidest.		
Untergelpuffer:	90,83 g	Tris/ HCl pH 8,8
	Ad 500 ml mit aqua bidest.	
Obergelpuffer:	30 g	Tris/ HCl pH 6,8
	Ad 500 ml mit aqua bidest.	
SDS-Stammlösung (10%):	10 g	SDS
	Ad 100 ml mit aqua bidest.	
Trispuffer (1,25 M):	13 g	Tris/ HCl pH 6,8
	Ad 100 ml mit aqua bidest.	
SDS-Probenpuffer (2x):	10 ml (20%)	Glycerin
	5 ml (125 mM)	Trispuffer
	2 g (4%)	SDS
	5 ml (10%)	2-Mercaptoethanol
	10 mg (0,02%)	Bromphenolblau
	ad 50 ml mit aqua bidest.	
Ammoniumpersulfat (10%)	100 mg Ammoniumpersulfat	
	Ad 1 ml mit aqua bidest.	
Laemmli-Elektrodenpuffer (5x):	15 g (40 mM)	Tris
	216 g (0,95 M)	Glycin

15 g (0,5%) SDS

ad 3000 ml mit aqua bidest.

Die Herstellung des Untergels (Trenngel) erfolgte am Vortag, um eine vollständige Polymerisation zu erreichen. Vor der Zugabe von TEMED (Radikalstabilisator) und APS (Radikalstarter) wurde die benötigte Menge an Untergel-Stammlösung (5 ml für Minigel, 12 ml für Maxigel) im Wasserstrahl-Vakuum entgast.

Das gegossene Gel wurde mit wenigen Tropfen wassergesättigtem Isobutanol und nach der Polymerisation mit Untergelpuffer überschichtet (1:3 verdünnt) und über Nacht bei 4 °C auspolymerisiert.

Am nächsten Tag wurde das Obergel gegossen (nach 30 min abgeschlossen) und die fertigen Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Elektrodenpuffer wurde Laemmli-Puffer 5x (1:5 verdünnt) eingesetzt. Die Proben wurden 1:1 mit (2x) SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95 °C erhitzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 18 mA pro Minigel oder 25 mA pro Maxigel für 60 und 180 min (Shapiro et al., 1967, Laemmli et al., 1970).

### 3.2.4.3 Western-Blotting

verwendete Lösungen (angegebene Gewichts-% oder Molaritäten beziehen sich auf die Endkonzentration):

Anodenpuffer A: 36,3 g (0,3 M) Tris pH 10,4  
200 ml (20%) Methanol  
ad 1000 ml mit aqua bidest.

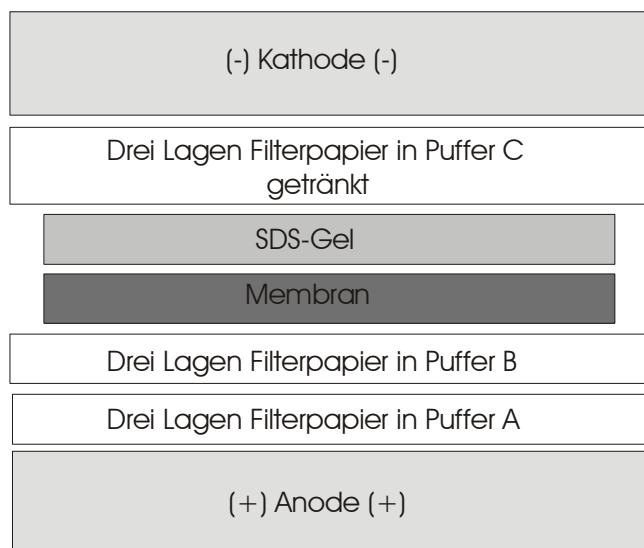
Anodenpuffer B: 3,03 g (25 mM) Tris pH 10,4  
200 ml (20%) Methanol  
ad 1000 ml mit aqua bidest.

Kathodenpuffer C: 5,20 g (4 mM) Capronsäure pH 7,6

200 ml (20%) Methanol

ad 1000 ml mit aqua bidest.

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen erfolgte im „semi-dry-Verfahren“ (Towbin et al., 1979) nach der Auftrennung durch SDS-PAGE. In die drei Blotpuffer wurden jeweils drei Whatman-Filterpapiere gelegt, die Membran auf Gelgröße zugeschnitten und mit Puffer B benetzt ( PVDF-Immobilon-P-Membran 0,45 um, Millipore, vorher erst in Methanol geschwenkt). Von dem aus der Elektrophoresekammer entnommenen Gel wurde das Obergel entfernt und kurz in Blotpuffer B geschwenkt. Der Zusammenbau des Blotsandwichs ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Beim Aufbau muss darauf geachtet werden, dass er luftblasenfrei ist, damit ein vollständiger, flächendeckender Proteintransfer erfolgen kann. Der Transfer wurde mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 30-45 min durchgeführt (Towbin et al., 1979).



### 3.2.4.4 Proteinauf trennung und -blot mittels NOVEX – System

Zur Auftrennung großer Proteine (über 200 kD) wurden Fertiggele der Firma Invitrogen und das Novex-System zum Proteintransfer benutzt. Es kamen Gradientengele mit 3-8% Polyacrylamid zum Einsatz. Elektrophorese und Proteinblot wurden nach Anleitung des Herstellers in einer Novex-Kammer durchgeführt.

---

### 3.2.4.5 Immunofärbung von Proteinblots

benötigte Lösungen:

TBS Stammlösung 2x	4,8 g (40 mM)	Tris/HCl pH 8,0
	18 g (0,3 M)	NaCl
	0,74 g (2 mM)	EDTA
	50 mg (0,05%)	NaN <sub>3</sub>
	ad 1000 ml mit aqua bidest.	
TBS 0,1% Tween 20	1 ml Tween 20	
	500 ml TBS-Stammlösung 2x	
	ad 1000 ml mit aqua bidest.	

5%ige Milchpulver-Lösung: 5% Milchpulver in TBS/Tween lösen

Die Membranen wurden nach dem elektrophoretischen Transfer über Nacht bei 4°C in Blocking-Lösung inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurde der in der Blocking-Lösung verdünnte primäre Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (je nach Antikörper 1:100 bis 1:2000) auf die Membran gegeben und 1,5 h bei RT geschwenkt. Danach wurde 3 mal für 10 min mit Waschlösung gewaschen und eine weitere Stunde mit Enzym -gekoppeltem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:2000) gegen den primären Antikörper inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschritten wurde die ECL-Färbung (Amersham ECL<sup>detection</sup>) durchgeführt. Dabei katalysiert die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol und die entstehende Chemilumineszenz wird auf einem sensitiven „Hyperfilm“ (Amersham) detektiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 MADDAM Expressionsanalyse

MADDAM ist ein molekularer Marker zur Unterscheidung von *in vitro* differenzierten dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen (MAC). Um einen Überblick über die Expressionslevel von MADDAM in unterschiedlichen Zelltypen zu bekommen, wurde aus verschiedenen myeloiden und epithelialen humanen Zelllinien RNA isoliert und mittels quantitativer ‚real-time‘ RT-PCR ein Expressionsprofil ermittelt. Abbildung 6 zeigt die relativen Mengen an MADDAM Transkripten bezogen auf die Expression in dendritischen Zellen eines repräsentativen Spenders. Ausser in den epithelialen Darmzelllinien CaCo-2 und HT-29 wurde MADDAM in keiner der anderen untersuchten Zelllinien exprimiert.

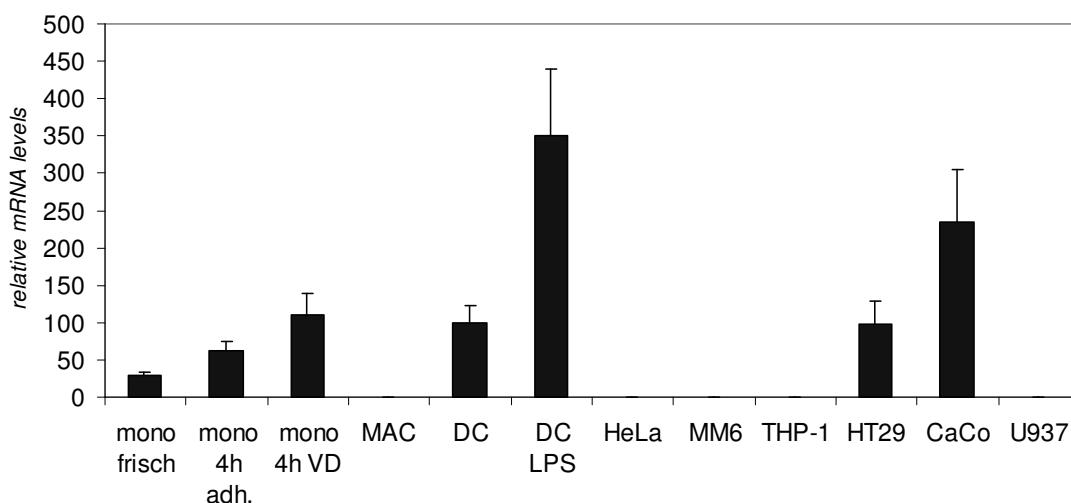


Abb. 6: Real-time RT-PCR zur Bestimmung der MADDAM Expression in primären Monozyten (mono), die nach Elutriation direkt lysiert wurden (frisch), oder 4 Stunden in Plastikschalen adhären (*adh.*) +/-  $10^{-7}$  M 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> kultiviert wurden, aus Monozyten generierten Makrophagen (MAC), bzw. dendritischen Zellen (DC) +/- 10 ng/ml LPS und den angegebenen Zelllinien. Die entsprechenden Werte sind relativ zur MADDAM-Expression in dendritischen Zellen angegeben und mittels  $\beta$ -*actin* normalisiert.

Durch diese Untersuchungen konnten auch die bereits mittels Northern Blot gezeigten Expressionsdaten in primären Zellen bestätigt werden, d.h. die sehr

niedrigen MADDAM mRNA Level in frisch isolierten Monozyten steigen nach vier Stunden Adhärenz stark an und man kann diese Expression durch Zugabe von 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> verdoppeln. Dendritische Zellen zeigen ähnliche Expressionshöhen wie adhärente Monozyten und durch die terminale Differenzierung der DC (hier mit LPS) kommt es zu einer starken Hochregulation des MADDAM Transkripts. Makrophagen zeigten eine kaum detektierbare, in Bezug zu dendritischen Zellen sehr niedrige MADDAM Expression.

Neben der Regulation des MADDAM Gens durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> in primären Monozyten wurde auch eine mögliche Induktion in myeloiden Zelllinien untersucht. In Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie kam es zu einer frühen (nach 4 Stunden Stimulation, bei MM6) oder späten (nach 48 Stunden Stimulation, bei THP-1) Induktion des Gens.

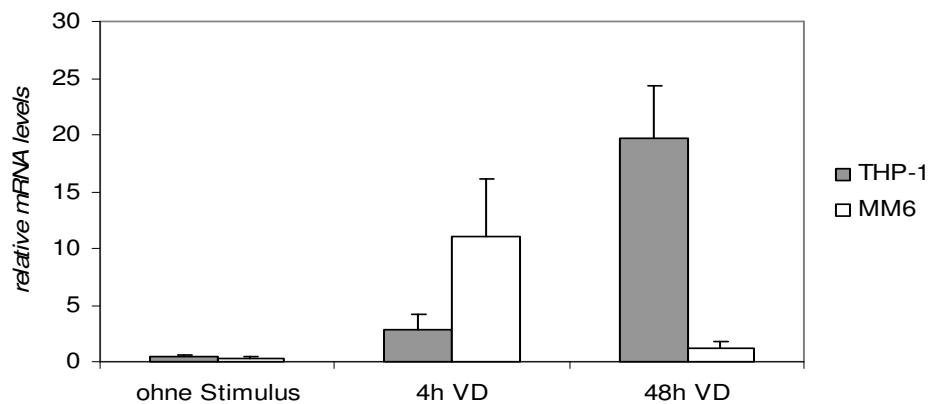


Abb. 7: Real-time RT-PCR zur Bestimmung der MADDAM Expressionslevel in THP-1 (blau), bzw. MM6 (violet). Die Zellen wurden 4h bzw. 48h mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> ( $10^{-7}$  M) stimuliert, RNA isoliert und die MADDAM Expression quantifiziert.

## 4.2 Definition des gesamten MADDAM Transkripts und der potentiell regulatorischen Regionen

Zu Beginn dieser Arbeit war der Translationsstart, jedoch nicht der Transkriptionsstartpunkt des MADDAM Gens bekannt. Um den Promotorbereich zu bestimmen, wurde die 5' nichtcodierende Region charakterisiert. Hierzu wurde die Methode der *RNA ligase-mediated rapid*

*amplification of cDNA ends* (RLM-RACE) verwendet. Gesamt RNA von dendritischen Zellen wurde mit alkalischer Phosphatase (CIP = „calf intestine phosphatase“) behandelt, was die Phosphatreste am 5`-Ende von andegradierter mRNA oder nicht-proteincodierender RNA entfernt, da beide keine schützende CAP-Struktur enthalten. Anschließend wurde mit TAP („tobacco acid pyrophosphatase“) die Cap-Struktur intakter mRNA-Moleküle entfernt und somit spezifisch die zuvor „gecapten“ mRNA's Phosphatreste freigelegt. Ein Adapter mit bekannter Sequenz konnte nun über die Phosphatreste an das 5`-Ende vollständiger mRNA's ligiert werden. Mit spezifischen Primern für Adapter und MADDAM Gen wurde das 5`-Ende mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Damit wurde die bereits veröffentlichte cDNA des MADDAM Gens (EMBL/GenBank/DDBJ accession no. Y13786) um 15 bp erweitert und der 5' nichtcodierende Bereich auf 79 bp festgelegt. Das Gen liegt auf Chromosom 5, umfasst 94,6 kb (Transkriptlänge 6,46 kb) und enthält 23 Exons mit einem Translationsstart in Exon I. Abbildung 8 zeigt einen Sequenzausschnitt des möglichen Promotorbereichs, des ersten Exons und eines Teils des ersten Introns.

Durch Datenbankanalysen (*Matinspector / Promoterinspector*) zeigte sich, dass sowohl im Promotorbereich, als auch im ersten Intron Bindestellen für bekannte Transkriptionsfaktoren wie z.B. SP-1 oder NF-κB vorhanden sind, die potentiell bei der Regulation des Gens eine Rolle spielen könnten. Interessant schien bei dieser ersten Datenbankanalyse auch das Vorhandensein von insgesamt drei „*Vitamin D response elementen*“ (VDRE's). Somit könnte ähnlich wie bei einer Reihe anderer 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> induzierbarer Gene (Christakos et al., 2003) ein direkter, genomicscher Effekt für die Hochregulation des MADDAM Transkripts nach kurzzeitiger 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation verantwortlich sein.

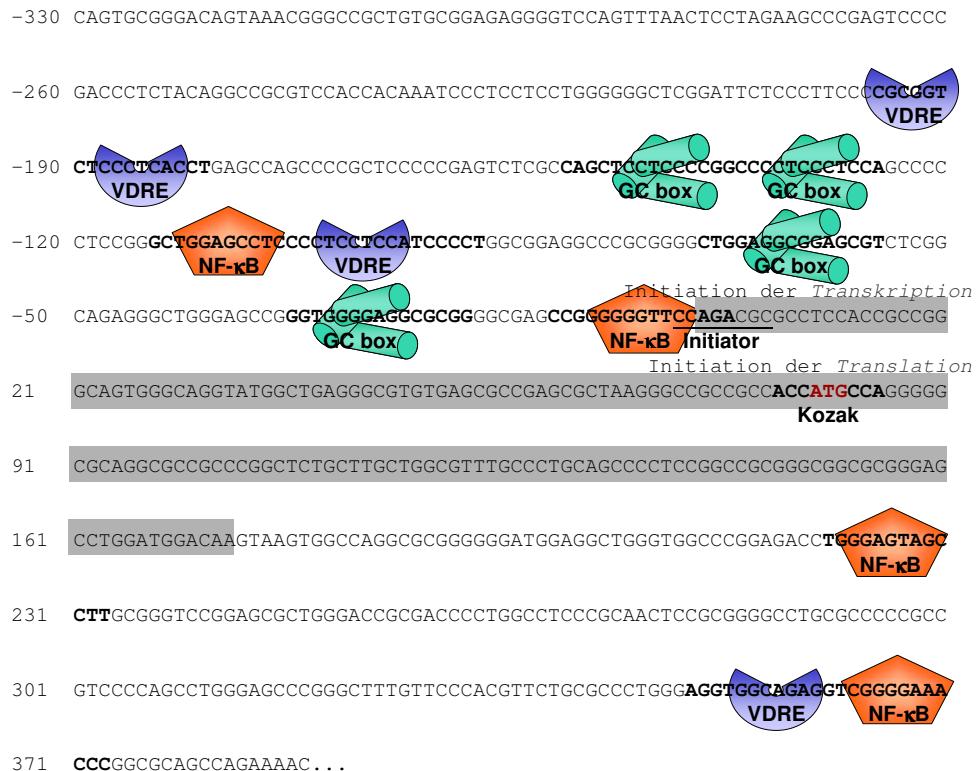


Abb. 8: Sequenzausschnitt mit Exon-1 (grau hinterlegt), Intron-1 (unterer Abschnitt) und dem möglichen Promotorbereich des MADDAM Gens (oberer Abschnitt). Die Bindestellen für NF-κB (orange), die GC-boxen (grün) und die „Vitamin D response-Elemente“ (VDRE, blau) wurden durch Datenbankanalysen identifiziert und der Transkriptionsstart durch RLM-RACE bestimmt.

## 4.3 Transkriptionelle Regulation durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>

### 4.3.1 Bindung von VDR/RXR an „Vitamin D response Elemente“ (VDRE's)

Die physiologisch aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-Vitamin D<sub>3</sub>) wirkt über die Bindung an den intrazellulären Vitamin D Rezeptor. Nach Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor und Translokation in den Zellkern bindet dieser Komplex an Promotoren von 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> induzierbaren Genen und führt zur Modulation der transkriptionellen Aktivität. Um zu untersuchen, ob die identifizierten VDRE's im proximalen MADDAM Promotor funktionell aktiv sind und VDR-RXR Heterodimere binden können, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Hierbei dienten <sup>32</sup>P-markierte, doppelsträngige Oligonukleotide mit den jeweiligen VDRE's als

Sonde und VDR, bzw. RXR wurden als rekombinante Proteine alleine oder in Kombination zugegeben. Als Positivkontrolle wurde ein Oligonukleotid mit der VDRE-Sequenz aus dem Osteocalcinpromotor verwendet, von der eine Interaktion mit VDR/RXR Heterodimeren bekannt war. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, kam es sowohl beim Osteocalcin-Element, als auch beim VDRE<sup>intron</sup> und schwach beim VDRE<sup>100</sup> zur Bildung eines DNA-Protein-Komplexes (Gelshift). Außerdem war für die Komplexbildung das Vorhandensein von sowohl VDR als auch RXR notwendig.

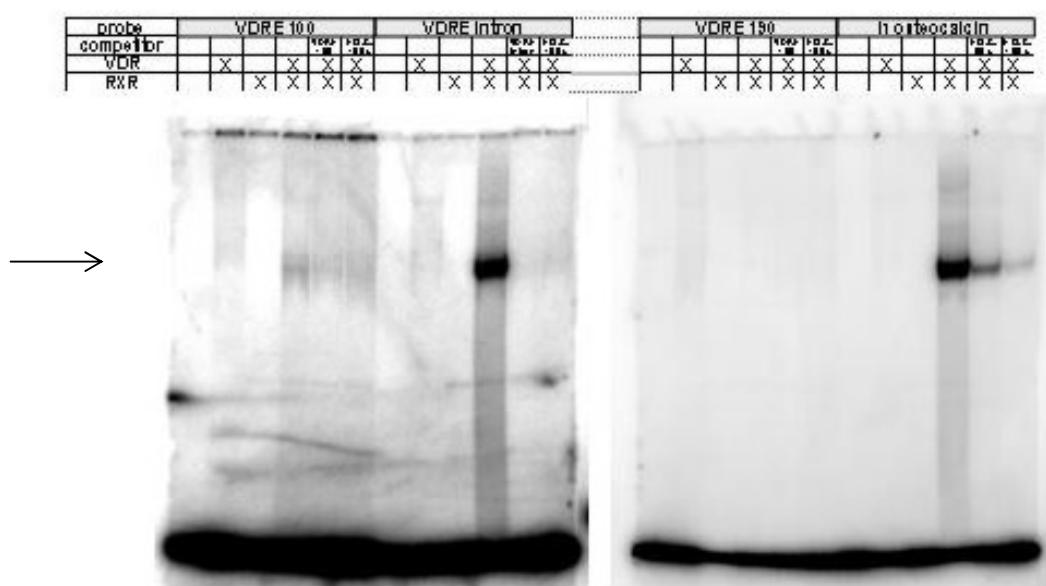


Abb. 9: EMSA/Gelshift zur Untersuchung des Bindeverhaltens von VDR-RXR an die Elemente VDRE<sup>100, 190, intron</sup> und VDRE<sup>osteocalcin(o.c.)</sup>. <sup>32</sup>P-gelabelte Sonden wurden mit rekombinanten VDR und/oder RXR inkubiert und die DNA-Protein-Komplexe über Polyacrylamidgele aufgetrennt.

Um die Spezifität der Protein-DNA Interaktion zu belegen, wurden als Kompetitoren nicht-markierte Oligonukleotide im Überschuss zugegeben. Neben den entsprechenden kalten Sonden funktionierte auch die Osteocalcin-Konsensussequenz als Kompetitor bei VDRE<sup>intron</sup> und VDRE<sup>100</sup>.

#### 4.3.2 Induktion eines VDRE-Luciferase Reporters durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>

Die grundsätzlich mögliche Interaktion von VDR/RXR Heterodimeren an zwei der drei möglichen VDRE's im MADDAM Promotor wurde mit den Gelshift Untersuchungen gezeigt. Durch Verwendung eines Reportersystems sollte im

Folgenden die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> induzierte Modulation der Transkription, abhängig von den jeweiligen VDRE's in einem zellulären Kontext untersucht werden. Hierzu wurden drei Kopien der jeweiligen VDRE's vor das Luciferase-Reportergen kloniert. Ein zwischengeschalteter SV40 Promotor sorgte in diesem System für die basale Aktivierung des Luciferasegens (Abb. 10). Die Stimulation mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> induziert die Bindung von VDR/RXR an ein VDRE und führt somit zur Erhöhung der Luciferaseaktivität. Bei nicht funktionellen VDRE's hingegen sollte keine Änderung der Luciferaseaktivität nach Stimulierung stattfinden.

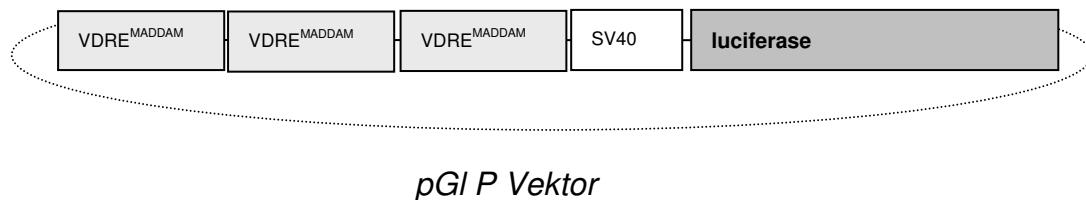


Abb. 10: Schematische Darstellung der VDRE-Luciferasekonstrukte (VDRE-luc). Vor den SV40 Promotor wurden mehrere Kopien der jeweiligen VDRE's kloniert, die nach Vitamin D Stimulierung die Transkription des Luciferase-Reporters funktionsabhängig beeinflussen.

Als Zellsystem wurden THP-1 Zellen verwendet, weil diese wie in Abbildung 11 zu sehen, generell eine starke 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Antwort zeigen. Nachweislich kam es durch Stimulation dieser Zellen mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> zu einer Hochregulation von CD14, einem Monozyten/Makrophagenmarker. Die CD14-Hochregulation wird durch den Vitamin D Rezeptor vermittelt und ist somit ein funktioneller Nachweis für das Ansprechen dieser Zellen auf 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>. Als Kontrolle wurde die Expression von MHC I auf den gleichen Zellen gemessen, worauf die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation keinen Einfluss hatte (Abb. 6)

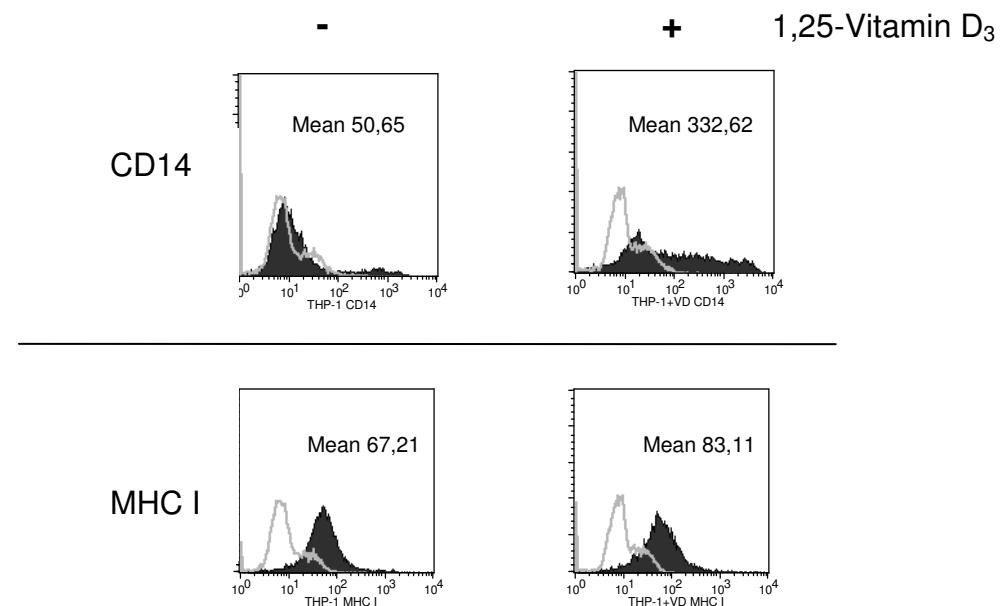


Abb. 11: FACS-Analyse von THP-1 Zellen, die für 48h mit  $10^{-7}$ M 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert wurden. Gezeigt ist jeweils eine Oberflächenfärbung gegen CD14 (oben) und MHC I (unten) mit und ohne 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation.

Um die Funktionalität der VDRE-Luciferasekonstrukte zu untersuchen, wurden THP-1 Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und anschließend mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen mit den dargestellten Transgenen VDRE<sup>0.c.</sup>, VDRE<sup>190</sup>, VDRE<sup>100</sup> und VDRE<sup>intron</sup>. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, wobei jeder Versuch eine transiente Transfektion der angegebenen Konstrukte und eine nachfolgende 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation beinhaltet. Durch Verwendung des VDRE<sup>0.c.</sup> als Positivkontrolle konnte eine 5,3 fache Induktion gegenüber nicht stimulierter Zellen gemessen werden. VDRE<sup>190</sup>, VDRE<sup>100</sup> und VDRE<sup>intron</sup> induzierten die Luciferaseaktivität auf 1,6 bis 2,0 fach gegenüber der jeweiligen nicht-stimulierten Kontrolle.

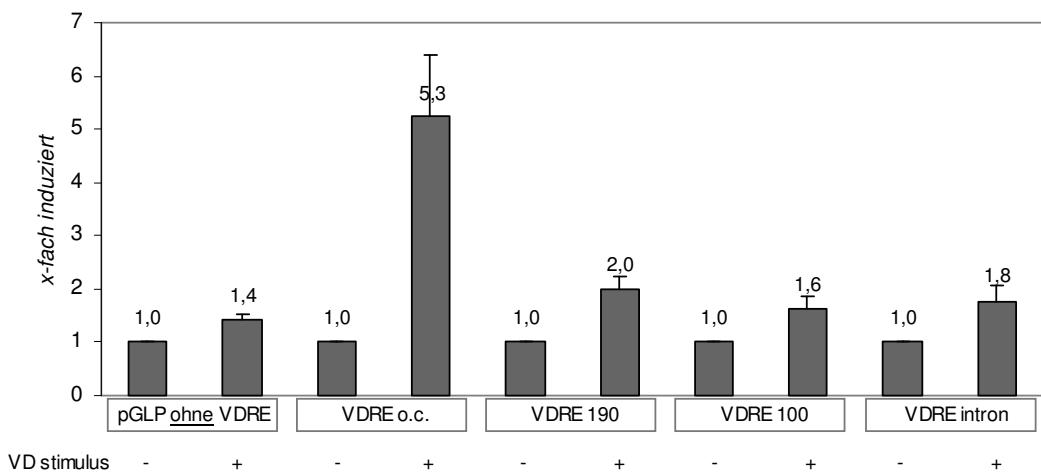


Abb. 12: 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> abhängige Induktion des Luciferase-Reportergens. THP-1 Zellen wurden mit den VDRE-luc Reportern transfiziert und für 48h mit 10<sup>-7</sup> M 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert. Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert der jeweiligen Induktion gegenüber der nicht-stimulierten Kontrolle von drei unabhängigen Versuchen wieder.

#### 4.3.3 Endogene 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Produktion

1,25-Vitamin D<sub>3</sub> entsteht aus seinem Vorläufer 25 Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-Vitamin D<sub>3</sub>) durch eine Hydroxylierung, die normalerweise in der Niere stattfindet und durch das Enzym 25-Vitamin D<sub>3</sub> - 1 $\alpha$ -Hydroxylase katalysiert wird. Die 1 $\alpha$ -Hydroxylase gilt als Schlüsselenzym bei der 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Synthese und wird auch in Makrophagen stark exprimiert, d.h. Makrophagen sind als „extrarenale Quelle“ der 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Produktion bekannt. Der Vorläufer 25-Vitamin D<sub>3</sub> kommt im Serum in 1000 fach höherer Konzentration vor als die aktive Form 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> und stellt somit keinen limitierenden Faktor dar.

Für die Regulation des MADDAM Gens war es nun von Interesse, ob es in Bezug auf 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>-Produktion durch Makrophagen oder dendritische Zellen Unterschiede gibt und somit der aktive Ligand für den VDR in der jeweiligen Zellpopulation in unterschiedlicher Konzentration vorliegt. Deshalb wurde die Expression der 1 $\alpha$ -Hydroxylase in Makrophagen und dendritischen Zellen bestimmt. Sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene hat sich gezeigt, dass Makrophagen das Enzym stark exprimieren, dendritische Zellen aber nur sehr schwach. Durch die terminale Differenzierung mit LPS wird das Enzym

allerdings auch in dendritischen Zellen stark nach oben reguliert. Auf RNA Mengen bezogen finden sich sogar deutlich höhere Mengen als in Makrophagen.

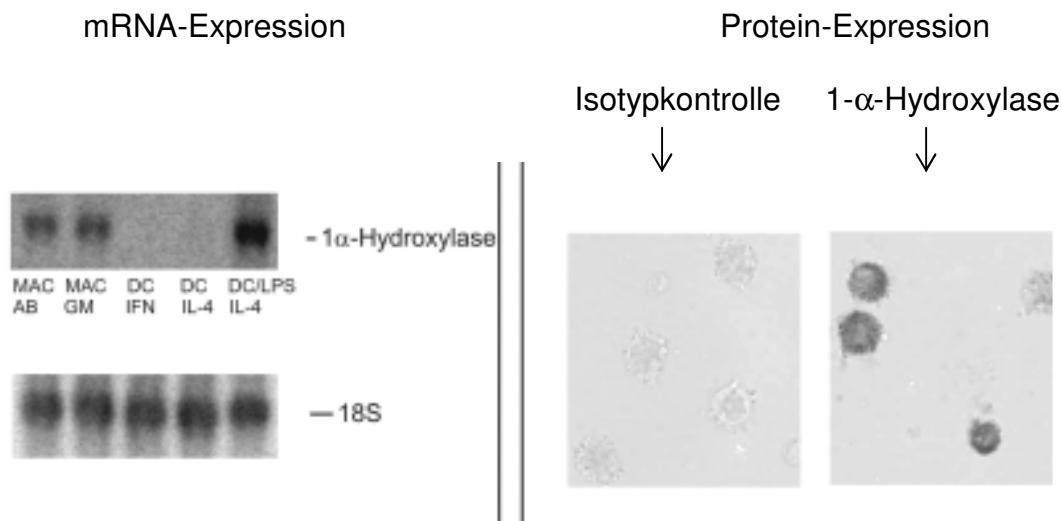


Abb. 13: Expression der  $25(\text{OH})\text{VD}_3$  1- $\alpha$ -Hydroxylase. Links: Northern-blot Analyse zur Bestimmung der mRNA Level der 1 $\alpha$ -Hydroxylase in Makrophagen (MAC), die entweder mit humanem Serum (AB) oder M-CSF differenziert wurden und dendritischen Zellen (DC), die mit Interferon (IFN/GM) bzw. IL-4/GM-CSF differenziert wurden. Rehybridisierung des Blots mit einer 18S Sonde diente zur Beladungskontrolle. Rechts: Protein-Färbung von LPS-stimulierten dendritischen Zellen mit IgG (Isotypkontrolle) und 25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  1- $\alpha$ -Hydroxylase-spezifischem Antiserum.

Zusätzlich zu den Expressionsdaten auf mRNA und Protein Niveau wurde die tatsächliche Umsetzung von 1,25-Vitamin  $\text{D}_3$  ausgehend von 25-Vitamin  $\text{D}_3$  in den jeweiligen Zelltypen bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst für vier bzw. sechs Tage differenziert und anschließend unter serumfreien Bedingungen der Vorläufer 25-Vitamin  $\text{D}_3$  für weitere 24 Stunden mit oder ohne LPS zugegeben. Während dieser 24 Stunden sollte die Umsetzung von 25-Vitamin  $\text{D}_3$  zu 1,25-Vitamin  $\text{D}_3$  erfolgen und messbar sein. Die Menge an 1,25-Vitamin  $\text{D}_3$  in Überständen und Lysaten der Kulturen wurden mittels ELISA bestimmt. Wie in folgender Abbildung zu sehen, bilden sowohl Makrophagen als auch reife dendritische Zellen sehr hohe Mengen an 1,25-Vitamin  $\text{D}_3$ .

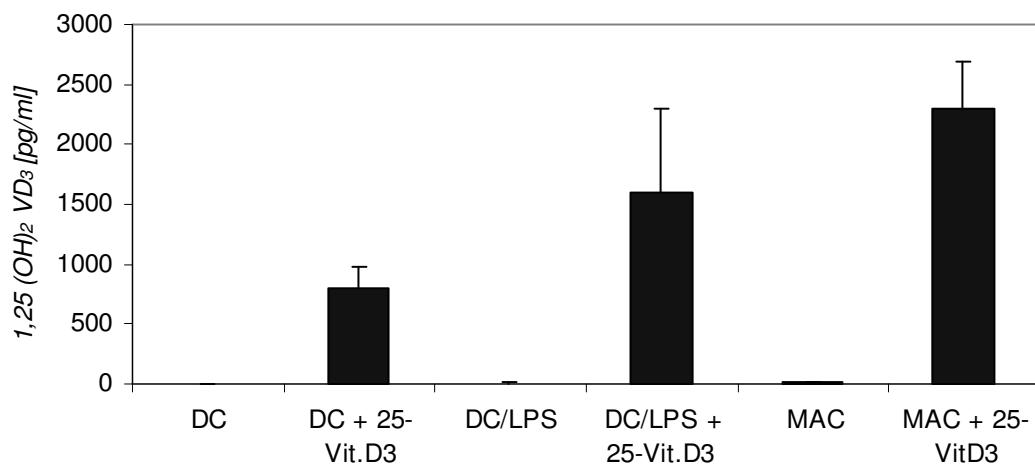


Abb. 14: 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – Synthese durch dendritische Zellen (DC) bzw. Makrophagen (MAC). Die jeweiligen Zelltypen wurden für 7 Tage aus Monozyten differenziert und weitere 24 Stunden mit oder ohne 25-Vitamin D<sub>3</sub> –Substrat inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die gebildete Menge an 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> quantifiziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die transkriptionelle Regulation des MADDAM Gens durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> sehr wahrscheinlich ein direkter, genomischer Effekt ist und durch Bindung des VDR/RXR am MADDAM Promotor (und/oder Intron1) vermittelt wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von 25-Vitamin D<sub>3</sub> zur physiologisch aktiven Form enzymabhängig nicht nur in Makrophagen, sondern auch in dendritischen Zellen geschieht, wodurch theoretisch eine autokrine und parakrine Regulation denkbar wäre.

#### 4.4 Charakterisierung des proximalen Promotors

Die transkriptionelle Regulation eines Gens wird unter anderem über die Promotorstruktur und die zur basalen Aktivierung nötigen Transkriptionsfaktoren bestimmt. 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 wurde

zunächst der Bereich dieser Sequenz bestimmt, der für die maximale Aktivierung notwendig ist und im Folgenden die darin befindlichen, relevanten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren näher definiert.

#### 4.4.1 Definition des proximalen Promotorbereichs

Um den notwendigen Sequenzabschnitt des Promotors zur Aktivierung der MADDAM Transkription zu definieren wurden verschieden lange Fragmente von 3,6 kB bis 47 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes in ein Luciferase Reporterplasmid kloniert. Diese Konstrukte wurden in die monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 und in die epitheliale Karzinomzelllinie HeLa transient transfiziert. Zusätzlich wurde ein Konstrukt ko-transfiziert, welches das Renilla-Luciferasegen unter der Kontrolle des TK-Promotors enthält und als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente. In beiden Zelllinien war die Aktivität des Promotors bei einer Fragmentlänge von 150 bp maximal (Abb. 15), d.h. die Region bis 150 bp proximal zum Transkriptionsstart umfasst den für die Regulation wichtigen Bereich und wird im Folgenden als proximaler Promotor bezeichnet.

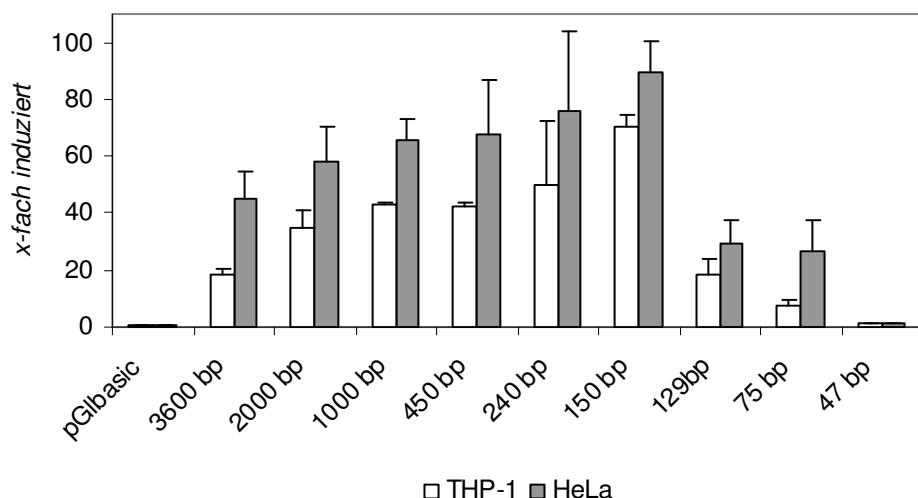


Abb. 15: Bestimmung des proximalen Promotors durch Luciferase-Reporterassays. Promotorfragmente von 3600 bp bis 47 bp stromaufwärts des MADDAM Transkriptionsstarts wurden transient in THP-1 und HeLa Zellen transfiziert und die Promotoraktivität relativ zum pGL Basic-Vektor angegeben. Die gezeigten Werte sind der Durchschnitt und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.4.2 Identifizierung und Charakterisierung essentieller Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen

4.4.2.1 Mutationsanalysen und Vergleich mit dem murinen ADAM19 Promotor Datenbankuntersuchungen zeigten, dass im proximalen Promotor Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren vorhanden sind (Abb. 8). Die verkürzten Luciferase-Konstrukte mit 129 bp, 75 bp und 47 bp aus den vorangegangenen Versuchen unterscheiden sich von den längeren Vergleichskonstrukten durch das Fehlen verschiedener GC-Boxen, dem VDRE<sup>100</sup> und einer NF-κB site. Durch Mutation der einzelnen Bindestellen alleine und in Kombination sollte nun untersucht werden, welchen Einfluss die jeweiligen Faktoren auf die Aktivität des Promotors haben. In Abb. 16 ist links die schematische Darstellung der mutierten Stellen aufgezeigt und rechts die verbliebene Restaktivität des Promotors, bezogen auf das 150 bp Konstrukt ohne Mutation. Es wurden wiederum vergleichend THP-1 und HeLa Zellen transient mit den Luciferase-Konstrukten transfiziert, um eventuell zelltypspezifische Unterschiede der Wichtigkeit einzelner Faktoren herauszufiltern. Auffallend war, dass alleine die Mutation von GC-box 3 in beiden Zelllinien zu einem Abfall der Promotoraktivität auf ca. 25% des Ausgangswertes führte. In Kombination mit einer Mutation in GC-box 2 und/oder der NF-κB Stelle ließ sich die Aktivität des Promotors bis auf 10% des Ausgangswertes reduzieren. Durch Mutation von GC-box 2 alleine zeigte sich ein Rückgang der Aktivität auf ca. 50%. Dies erschien zunächst widersprüchlich, da durch Deletion derselben GC-box im 129 bp Konstrukt ein deutlich höherer Aktivitätsverlust gemessen wurde (vgl. Abb. 15). Die direkt an GC-Box 2 gekoppelte GC-Box 1 wurde erst nach einer erneuten Datenbankanalyse entdeckt und durch eine Doppel-Mutation beider GC-Boxen ließ sich ein Aktivitätsrückgang auf die erwarteten 35 % belegen. In Bezug auf das VDRE<sup>100</sup> hatte eine Mutation unterschiedliche Effekte, d.h HeLa Zellen zeigten einen viel drastischeren Rückgang der Promotoraktivität als THP-1.

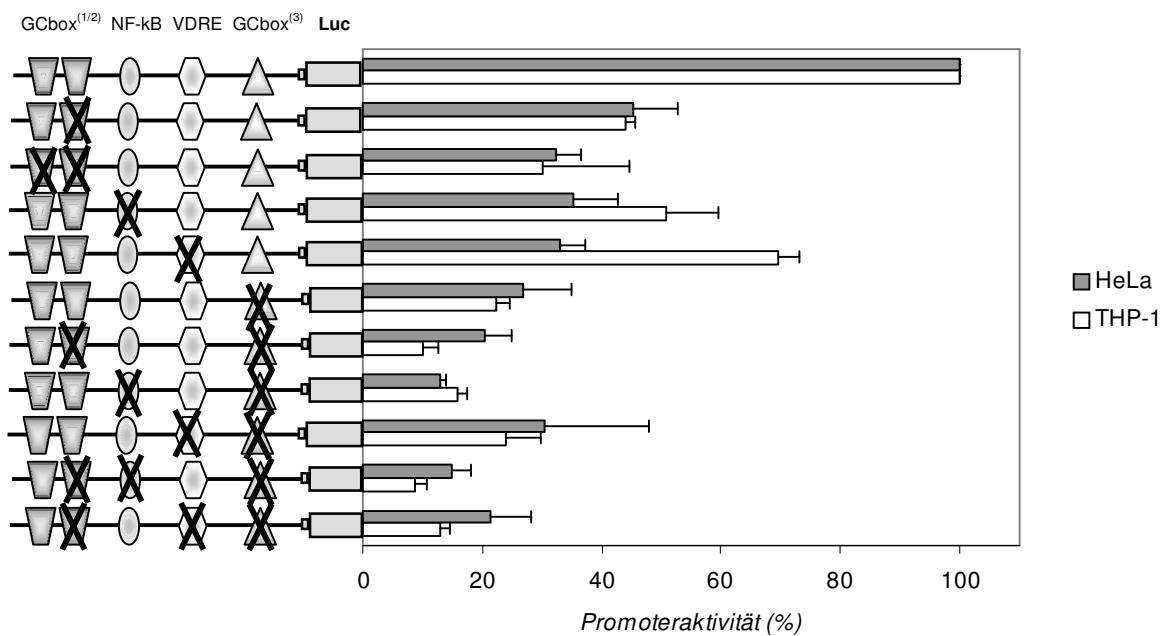


Abb. 16: Mutationsanalysen des proximalen Promotors. Die schematisch dargestellten möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im proximalen Promotor wurden einzeln und in Kombination mutiert und der daraus resultierende Aktivitätsverlust im Luciferaseassay relativ zum Konstrukt ohne Mutation angegeben.

In Abb. 17 findet sich eine zusammenfassende Darstellung des proximalen Promotors mit den untersuchten Bindestellen und eine Gegenüberstellung mit der Sequenz des bereits publizierten murinen ADAM19 Promotors. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es auch im Maus-System durch alleinige Mutation einer GC-box, die der humanen GC-box 3 entspricht, zu einem ähnlichen Aktivitätsverlust kommt. Die GC-box 3 ist in ihrer Erkennungssequenz zu 100% homolog zur humanen Sequenz und relativ zum Transkriptionsstart gleich positioniert. Diese Versuche lassen den Schluss zu, dass die untersuchten Bindestellen essentiell für die basale Aktivierung des MADDAM Promotors sind.

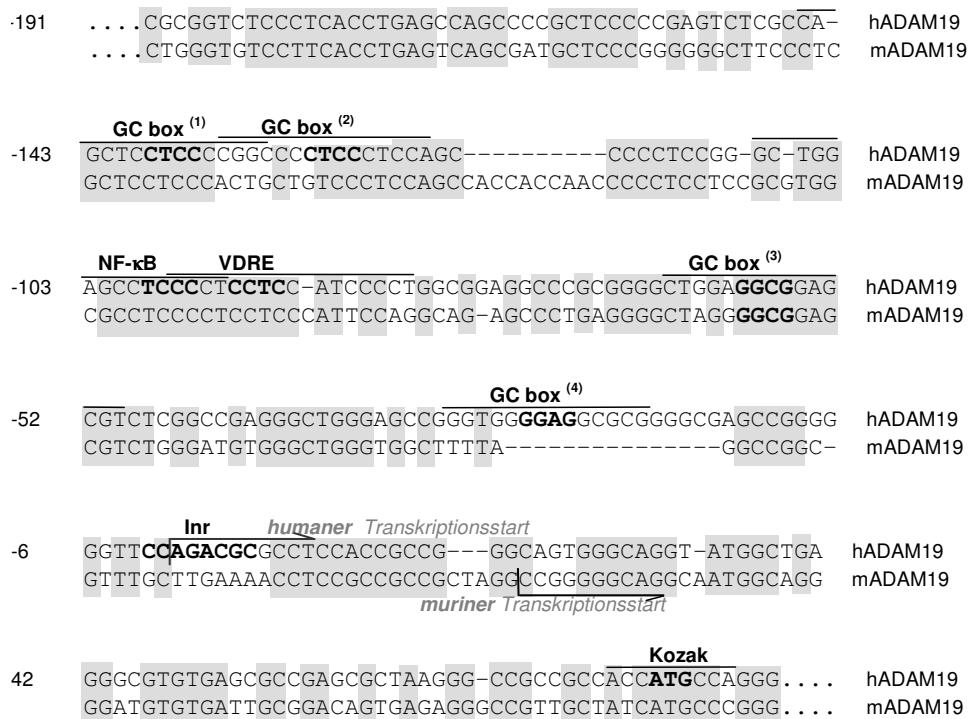


Abb. 17: Vergleichende Darstellung der proximalen Promotoren des humanen (h, obere Zeile) und murinen (m, untere Zeile) ADAM19/MADDAM. Identische Sequenzbereiche sind grau hinterlegt, Bindestellen im humanen MADDAM Promotor markiert und Erkennungssequenzen fett markiert.

Neben dem Sequenzvergleich von murinem ADAM19 und seinem humanen Ortholog MADDAM war es von generellem Interesse, ob sich auch im Maussystem eine differentielle RNA-Expression von ADAM19 in dendritischen Zellen und Makrophagen nachweisen lässt. Um dies zu untersuchen, wurden Northern-Blot Analysen mit RNA aus Maus-Knochenmarksmakrophagen, dendritischen Zellen und als Vergleich der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 durchgeführt. Die Makrophagen wurden aus Vorläuferzellen des Knochenmarks von gesunden Balb C – Mäusen nach einem Standard-Protokoll mit M-CSF als Wachstumsfaktor generiert, wohingegen die dendritischen Zellen eine etablierte Zelllinie (D1) sind, die funktionelle Eigenschaften wie Phagozytose, Expression von MHC II, Aktivierbarkeit und Zytokinsekretion von primären dendritischen Zellen besitzen (Ricciardi-Castagnoli). Es zeigte sich, dass ADAM19 im

Maussystem nicht nur von dendritischen Zellen, sondern auch von Makrophagen exprimiert wird. Eine 48 stündige Stimulation von NIH3T3 Zellen mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> oder PMA führte jeweils zur Hochregulation des ADAM19 Transkripts und Stimulation der Makrophagen mit LPS für 48 Stunden regulierte die ADAM19 Transkription nach unten. Zusätzlich zu den primären Makrophagen zeigte auch die Makrophagenzelllinie RAW eine deutliche ADAM19 Expression (nicht abgebildet).

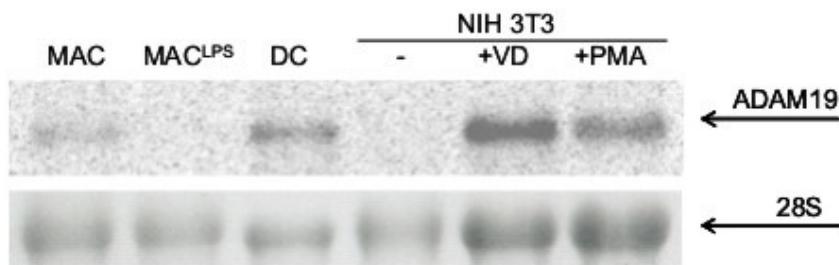


Abb. 18: Northern Blot zur Untersuchung der ADAM19-Expression in Maus Makrophagen (MAC), dendritischen Zellen (DC) und der Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 +/- 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> oder PMA Stimulus für 48h. Als Beladungskontrolle ist die 28S RNA im Ethidiumbromidgel gezeigt.

#### 4.4.2.2 EMSA

Mit Hilfe der „electrophoretic mobility shift assays“ (EMSA) wurde untersucht, inwieweit Kernextrakte von primären humanen dendritischen Zellen und Makrophagen bzw. die darin enthaltenen Proteine an verschiedene DNA-Fragmente des proximalen Promoters binden. Es zeigte sich, dass Proteine aus Kernextrakten von Makrophagen, DC und LPS stimulierten DC gleichermaßen gut an die untersuchten DNA Fragmente aus dem MADDAM Promotor binden. Als Sonden dienten <sup>32</sup>P-markierte DNA Oligonucleotide, die die GC-Boxen 1 und 2, NF-κB, VDRE<sup>100</sup> oder GC-Box 3 enthalten, also die Bindestellen, die durch die Mutationsanalysen als essentiell definiert wurden.

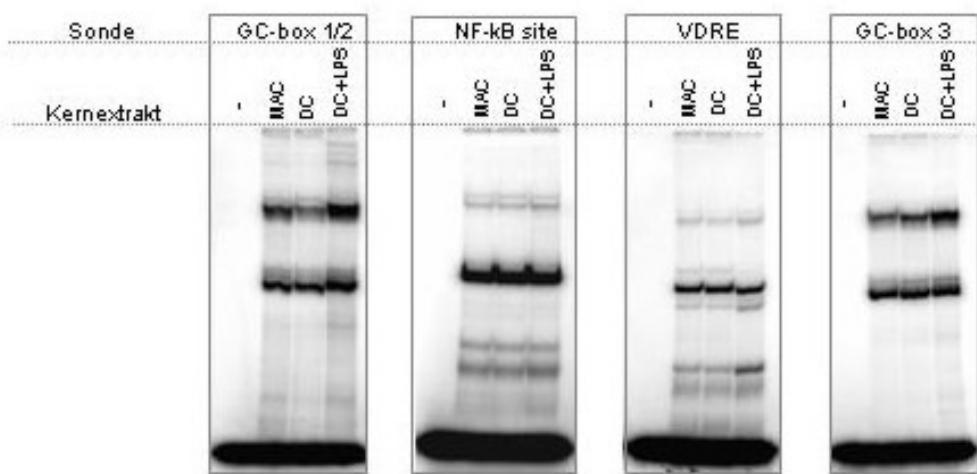


Abb. 19: EMSA mit  $^{32}\text{P}$  markierten Sonden der einzelnen Transkriptionsfaktor-Bindestellen des MADDAM Promotors und Kernextrakten aus Makrophagen (MAC) und dendritischen Zellen (DC) +/- LPS

Die spezifische Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren an die DNA wurde mittels „Supershift“ nachgewiesen. Hier zeigte sich, dass an die postulierten GC-boxen die Transkriptionsfaktoren SP-1 und SP-3 binden, der Vitamin D Rezeptor (aus einem Zellkerンextrakt – nicht rekombinant wie in Abb. 9!) an VDRE<sup>100</sup> bindet und an der NF-κB Stelle Homo- oder Heterodimere von p50, p65 und cRel binden.

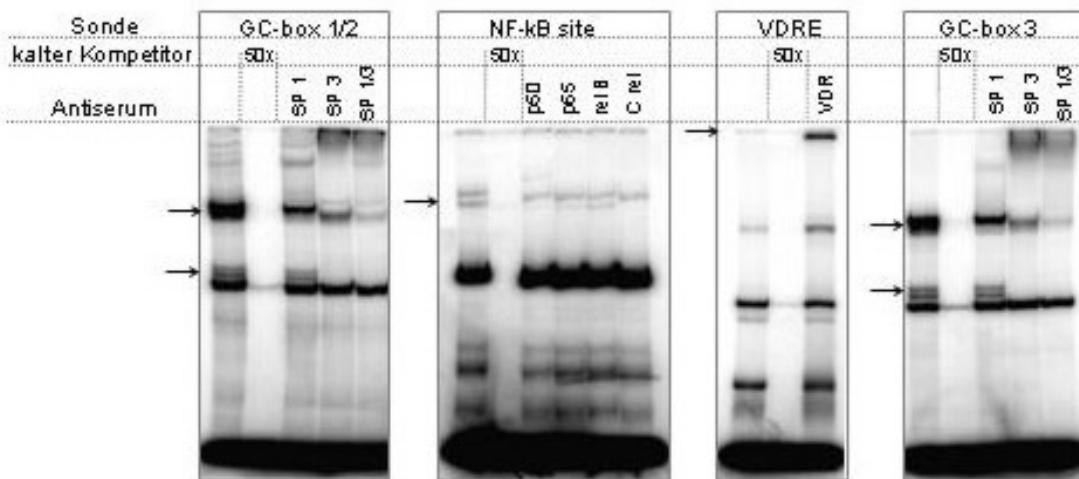


Abb. 20: Supershift Analysen mit den gleichen Sonden wie in Abb. 19 und Kernextrakten aus LPS-stimulierten DC. Für Supershift-Experimente wurden die Antikörper gegen SP-1 und SP-3 alleine und in Kombination eingesetzt, da die Banden für SP-Faktoren teilweise übereinander lagen. Die Kompetition erfolgte mit kalten, nicht markierten Sonden im 50-fachen Überschuss.

Zusätzlich konnte durch Kompetitions-Versuche gezeigt werden, dass beide GC-boxen 1 und 2 funktionell sind. Mit einem nicht markierten, „kalten Kompetitor“, der entweder die eine oder die andere GC-box mutiert hatte, konnte trotzdem eine spezifische DNA-Bindung von SP-1 und SP-3 verhindert werden und erst durch Mutation beider Bindestellen kam keine Kompetition mehr zustande.

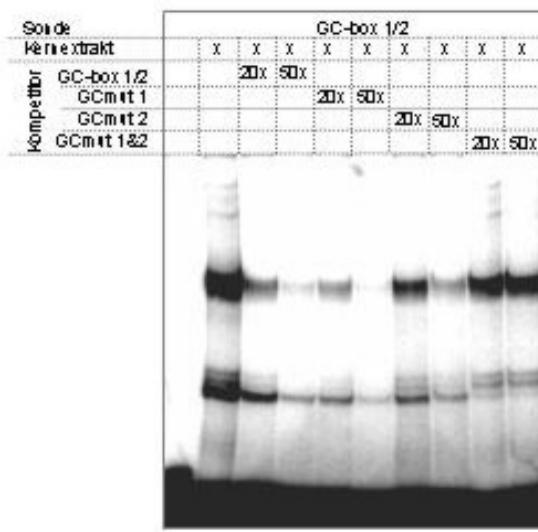


Abb. 21: Kompetitions-assay mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde, die die GC-boxen 1&2 enthält (siehe vorherige Versuche) und Kernextrakt von LPS-stimulierten dendritischen Zellen. Zur Kompetition wurden nicht-markierte Oligonucleotide im 20- und 50-fachen Überschuss eingesetzt, die entweder homolog zur Sondensequenz waren (GC-box 1&2), oder eine Mutation in der ersten (mut1), der zweiten (mut2) oder beiden (mut1&2) SP-Bindestellen hatten.

#### 4.4.2.3 Transfektion von primären Makrophagen und dendritischen Zellen

Die bisherigen Daten geben nur wenig Hinweise, wie eine Zelltypspezifische Expression des MADDAM Gens in dendritischen Zellen reguliert werden könnte. In Reporterversuchen und EMSA scheint die basale Aktivierung des Promoters hauptsächlich durch die Bindung von SP-Faktoren und NF- $\kappa$ B an den 150 bp langen proximalen Sequenzabschnitt reguliert zu sein. Theoretisch ist es jedoch denkbar, dass andere differenzierungsabhängig exprimierte Transkriptionsfaktoren an die identifizierten und/oder weitere Regionen binden und für die zelltypspezifische Regulation verantwortlich sind.

Um dieser Frage nachzugehen, sollten primäre Makrophagen und dendritische Zellen mit dem 150 bp Luciferase-Konstrukt transfiziert und anschließend ein Reporterassay durchgeführt werden. Das Problem bestand darin, diese Zelltypen effizient zu transfizieren. Mit den Standardmethoden DEAE-Dextran, Liposomen (unterschiedlicher Art) oder Elektroporation war dies bisher nicht möglich. Durch Verwendung des *Nucleofection*-Systems der Firma Amaxa ließ sich allerdings eine Transfektionseffizienz von ca. 10 % in Makrophagen und dendritischen Zellen erreichen, was für den geplanten Reporterassay ausreichend ist. Abbildung 22 zeigt am Beispiel der GFP-expression die erfolgreiche Transfektion beider Zelltypen.

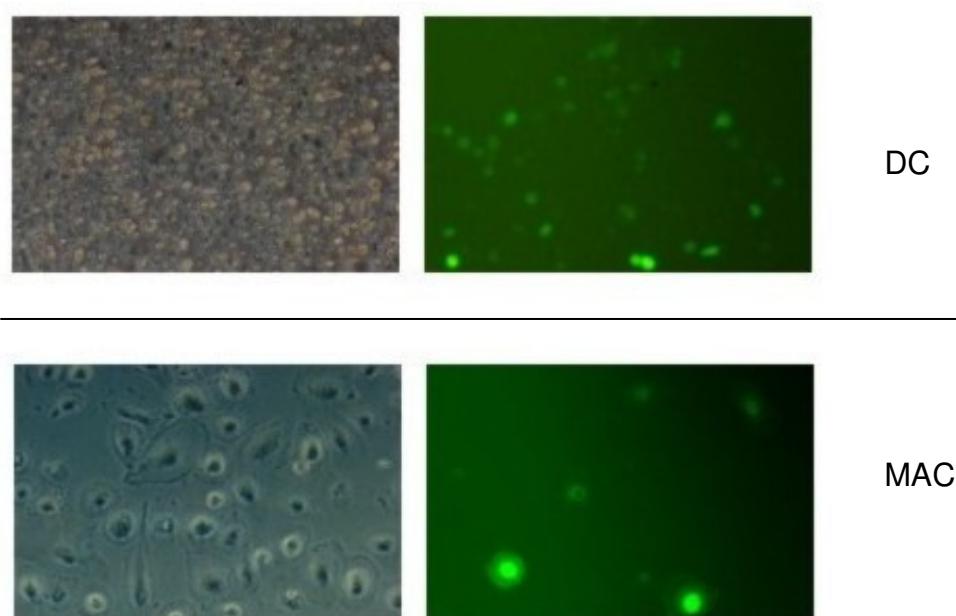


Abb. 22: Transfektion von primären DC (oben) und Makrophagen (unten) mit GFP. Die beiden Zelltypen wurden für 7 Tage differenziert, mittels *Amaxa nucleofection* transfiziert und die GFP-Expression 16h nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Zur Transfektion mit dem 150 bp Luciferase-Konstrukt wurden in vier unabhängigen Versuchen Monozyten für 7 Tage zu Makrophagen und reifen dendritischen Zellen differenziert (DC wurden an Tag 5 mit 10 ng/ml LPS stimuliert), anschließend die Transfektion durchgeführt und die Zellen am nächsten Tag im Luciferase-Assay getestet. In Abb. 23 ist der Mittelwert von

vier Experimenten aufgetragen und man sieht, dass der proximale Promotor in dendritischen Zellen ca. zweimal aktiver ist als in Makrophagen. Dieser Unterschied kann zwar die starke zelltypspezifische Expression in dendritischen Zellen nicht erklären, deutet aber auf eine mögliche Rolle bestimmter Transkriptionsfaktoren für die Regulation des MADDAM Gens hin.

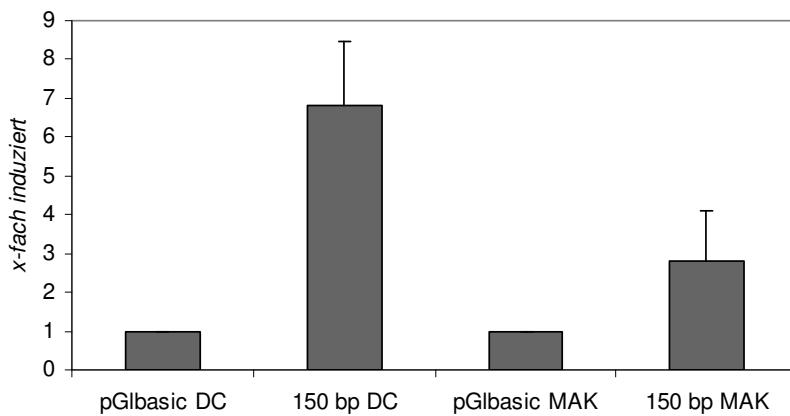


Abb. 23: Luciferaseassay zur Bestimmung der Aktivität des proximalen Promotors in primären dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen (MAC). Dargestellt ist die durchschnittliche Luciferaseaktivierung von vier unabhängigen Versuchen und unterschiedlichen Spendern relativ zum pGL Basic Vektor.

## 4.5 Regulation durch epigenetische Veränderungen

Die Epigenetik untersucht Mechanismen der Genregulation, die nicht auf der Grundlage von DNA-Sequenz und der Interaktion mit regulatorischen Proteinen beruhen, sondern ‚epi‘, d.h. neben der Basenfolge einen Einfluss auf die Transkription haben.

Bezogen auf die transkriptionelle Regulation der MADDAM Expression durch epigenetische Veränderungen kommen grundsätzlich zwei Mechanismen in Frage: zum Einen könnte eine selektive DNA Methylierung des MADDAM Promotors in Makrophagen dessen Transkription differenzierungsabhängig blockieren, auf der anderen Seite könnten Modifikationen in der Chromatinstruktur ebenfalls differenzierungsabhängig auf die MADDAM Expression Einfluß nehmen. Beide Möglichkeiten der Regulation wurden untersucht.

#### 4.5.1 DNA-Methylierung des MADDAM Promotors

Die Rolle der DNA-Methylierung für die Regulation des MADDAM Gens wurde zunächst mit Hilfe der Zelllinien U937 und THP-1 untersucht. Beide Zelllinien exprimieren MADDAM nicht, d.h. wenn DNA-Methylierung für die Repression des MADDAM Gens verantwortlich ist, müsste ein Demethylierung die MADDAM Expression induzieren. Demethylierung kann in proliferierenden Zellen durch Stimulation mit 5-Aza-deoxycytidin erreicht werden. Diese Substanz dient als Substrat аналогon zu Cytidin und wird – wenn im Überschuss vorhanden – bei der Zellteilung anstelle von üblichem Cytidin in entstehende DNA Stränge eingebaut. 5-Aza-deoxycytidin kann selbst aus sterischen Gründen nicht methyliert werden und führt so nach dem Einbau in zuvor methylierte Regionen zur Demethylierung.

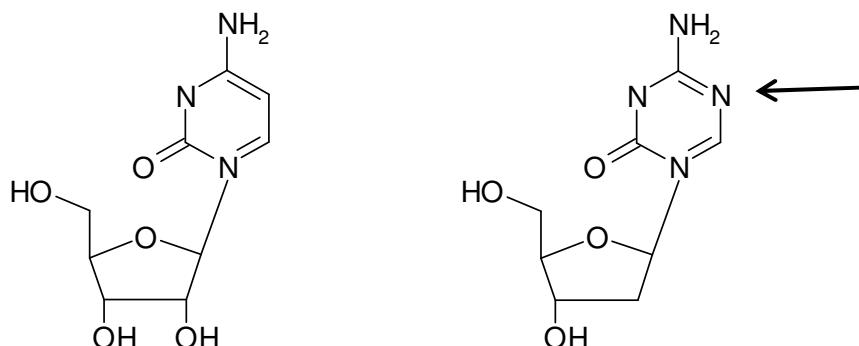


Abb. 24: Vergleich der Strukturen von Cytidin (links) und 5-Aza-2-Deoxycytidin.

Die Stimulierung der THP-1 und U937 Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden (und zusätzlich 4 Tage), in denen sich diese Zellen aufgrund ihrer normalen Proliferationsrate mindestens einmal teilen sollten. Nach der Stimulation wurde aus diesen Zellen RNA isoliert und über real-time RT-PCR die Transkription des MADDAM Gens bestimmt. Wie in Abb. 25 erkennbar, ließ sich die MADDAM Transkription nur in U937 Zellen induzieren, nicht in THP-1. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass spezifisch in U937 Zellen der MADDAM Promotor methyliert vorliegt.

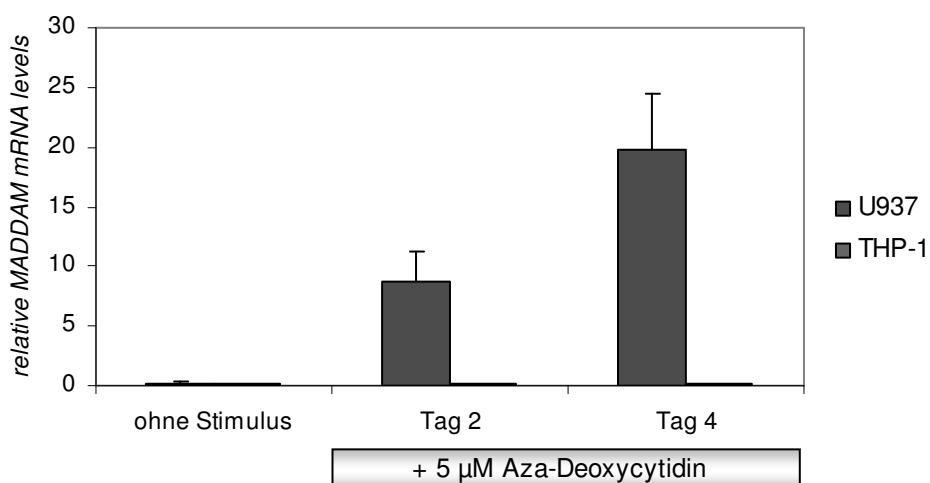


Abb. 25: Induktion der MADDAM Transkription nach Demethylierung durch Aza-Deoxycytidine in U937 versus THP-1 Zellen. RNA beider Zelltypen wurde von unstimulierten Zellen und an Tag 2 und 4 nach Stimulation isoliert. Die Expression des MADDAM Gens wurde durch 'real-time' RT-PCR bestimmt und auf  $\beta$ -actin normalisiert.

Zur Analyse des Methylierungsstatus in Makrophagen und dendritischen Zellen ist die Anwendung dieser Methode nicht möglich, da diese Zellen sich nicht mehr teilen. Aus diesem Grund wurde eine alternative Methode zur Bestimmung des Methylierungsstatus gewählt, die Bisulfit-Sequenzierung. Bei dieser Methode wird unmethyliertes Cytosin durch eine Deaminierung zu Uracil umgewandelt und bei einer anschließenden PCR zu Thymidin umgeschrieben. Aus einem CpG wird also ein TpG. Ursprünglich methyliertes Cytosin wird dabei nicht verändert. Durch die Sequenzierung des MADDAM Promotorbereichs nach Bisulfitbehandlung zeigte sich, dass weder Makrophagen, noch dendritische Zellen eine CpG Methylierung im Bereich des MADDAM Promotors aufweisen. Als Kontrolle wurden auch Produkte aus Bisulfit-Reaktionen von THP-1 und U937 Zellen sequenziert. Hier bestätigte sich das Ergebnis aus den Versuchen mit Aza-deoxycytidine, d.h. in U937 Zellen war ein hoher Anteil der CpG Reste methyliert, in THP-1 Zellen nicht. In der folgenden Abbildung sind die Sequenzchromatogramme nach Bisulfit-Reaktionen mit DNA aus U937 Zellen und Makrophagen gezeigt. Der Ausschnitt umfasst einen Bereich von 30 Nukleotiden um die GC-box 3 des MADDAM Promotors und zeigt die Sequenzierung des anti-sense Strangs, daher sind unmethylierte CpG Dinukleotide nach Bisulfitreaktion und Sequenzierung als CpA erkennbar.

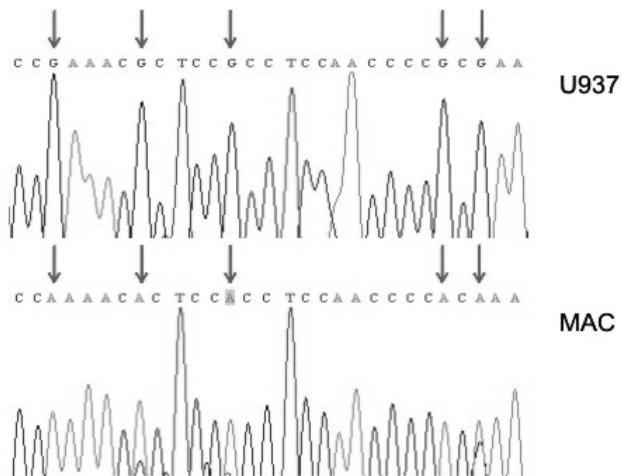


Abb. 26: Sequenzierung genomischer DNA von U937 Zellen (oben) und Makrophagen (unten) nach Bisulfit-Reaktion. Gezeigt ist der anti-sense Strang im Bereich der GC-box3 des MADDAM Promotors, nicht-methylierte CpG Dinukleotide sind als CpA dargestellt.

Aus diesen Versuchen zeigt sich, dass Demethylierung am Promotor nicht automatisch mit einer vorhandenen Expression korreliert. Der MADDAM-Promotor war in primären Zellen grundsätzlich demethyliert und das Gen trotzdem differentiell exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen zelltypspezifischer MADDAM-Expression und CpG-Methylierung des Promotors besteht also bei primären Makrophagen und dendritischen Zellen nicht.

#### 4.5.2 Histon-Acetylierung am MADDAM Promotor

Im Bereich der Histon-Modifikationen ist vor allem die Acetylierung von endständigen Lysin- oder Argininresten mit einer Erhöhung der Transkriptionsrate verbunden. Um den Effekt von Histonacetylierung auf die MADDAM Transkription zu untersuchen wurden zunächst Expressionsstudien in den Zelllinien THP-1 und U937 durchgeführt. Die Hyperacetylierung wurde in den genannten Zelllinien mit Trichostatin A (TSA), einem Breitband-Inhibitor von Histon-Deacetylases in verschiedenen Konzentrationen erreicht. Nach TSA Stimulierung der Zellen wurden zunächst Zellkernlysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 bzw. acetyliertes Histon H4 untersucht und eine starke Acetylierung von Histon H3 und H4 gefunden. Im folgenden Western Blot sind vergleichend zu den Kernlysaten von THP-1 +/-

TSA auch Kernlysate von DC und Makrophagen gezeigt, die keine generellen Unterschiede im Acetylierungsgrad der Histone aufweisen.

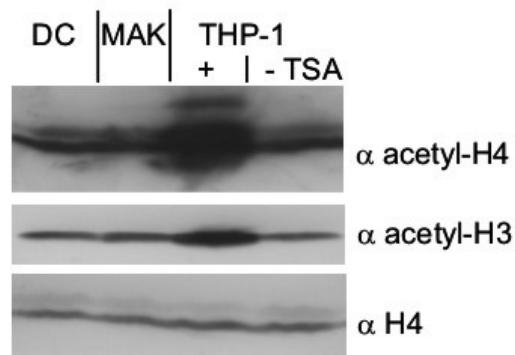


Abb. 27: Western Blot zur Untersuchung des Acetylierungsgrades von Histon H3 und H4 in dendritischen Zellen, Makrophagen, THP-1 und THP-1 nach TSA-Stimulierung. Als Beladungskontrolle wurde mit einem Antikörper gegen Histon H4 gefärbt, der nicht zwischen acetylierter und nicht-acetylierter Form unterscheidet.

Parallel zu den Proteinblots wurde auch die mRNA von THP-1 und U937 Zellen nach TSA-Stimulierung isoliert und wiederum mittels real-time RT-PCR die Transkription des MADDAM Gens bestimmt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Hochregulation des MADDAM Transkripts durch TSA in THP-1 Zellen, nicht aber in U937.

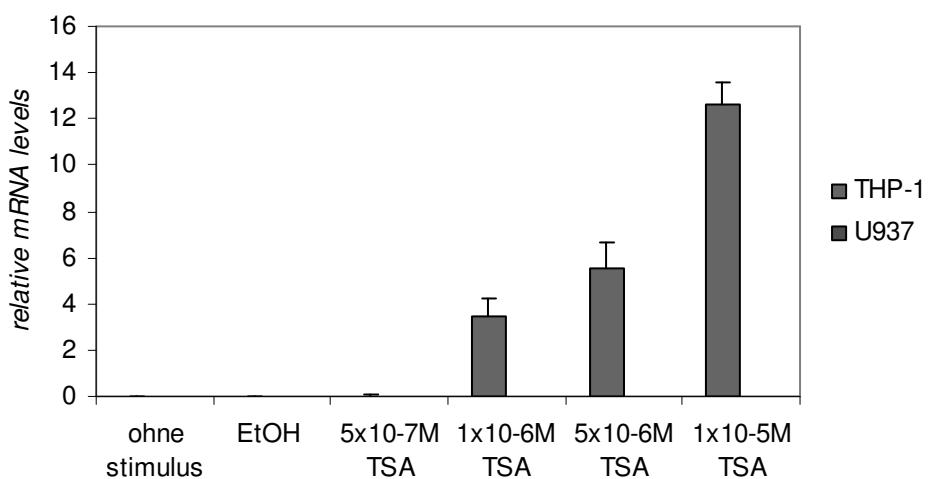


Abb. 28: Dosisabhängige Hochregulation der MADDAM Transkription in THP-1 (blau) und nicht U937 (violett) nach Stimulation mit TSA. Die Zellen wurden mit TSA in den angegebenen Konzentrationen über Nacht stimuliert und anschließend mittels real-time RT PCR die MADDAM Transkription quantifiziert. EtOH: Lösungsmittelkontrolle

Durch die Stimulation der Zellen mit TSA und der damit verbundenen Hochregulation der MADDAM Transkription stellte sich die Frage, ob die Acetylierung im THP-1 System generell auf die Transkriptionsrate verschiedener Gene Einfluss nimmt, oder spezifisch auf wenige Gene wirkt. Daher wurden die mRNA Level verschiedener Mitglieder der ADAM-Familie und Monozyten/Makrophagen/DC Marker vor und nach TSA Stimulierung bestimmt. In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis einer semiquantitativen RT-PCR dargestellt und klar erkennbar, dass keines der anderen Gene über TSA reguliert wird, das MADDAM-Gen allerdings die bereits gefundene Hochregulation zeigt.

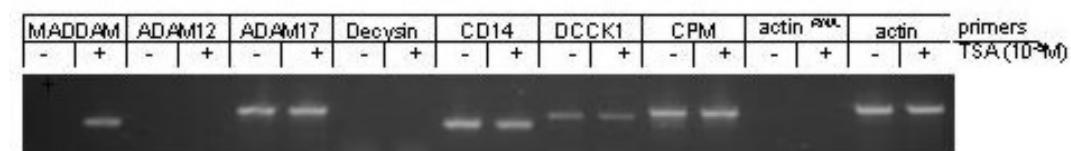


Abb. 29: Semiquantitative RT-PCR. RNA aus THP-1 +/- TSA ( $10^{-5}$  M) wurde revers transkribiert und mittels konventioneller PCR die Expression der beschriebenen Gene überprüft. Actin <sup>RNA</sup> – template diente als Negativ-Kontrolle, Actin <sup>cDNA</sup> – template als Beladungskontrolle.

Neben TSA wurden auch andere Inhibitoren von Histon-Deacetylasen wie z.B. Splitomycin oder BML 210, die wie TSA auch HDAC's der Klasse I und II inhibieren getestet. Daneben wurde Nicotinamid als Inhibitor von Histondeacetylasen der Klasse III ebenfalls getestet. In Bezug auf die MADDAM Hochregulation in THP-1 waren diese Inhibitoren zwar nicht so potent wie TSA, zeigten allerdings ebenfalls einen deutlichen Effekt (Abb. 25).

Da in THP-1 Zellen ein direkter Zusammenhang zwischen Histonacetylierung und MADDAM Expression besteht, liegt der wesentliche Unterschied der Regulation zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen eventuell auch am unterschiedlichen Acetylierungsmuster der Histone im MADDAM Promotorbereich. Um dieser Frage nachzugehen, wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) gegen acetyliertes Histon der Grad an Acetylierung im MADDAM Promotorbereich bei Makrophagen und dendritischen Zellen verglichen.

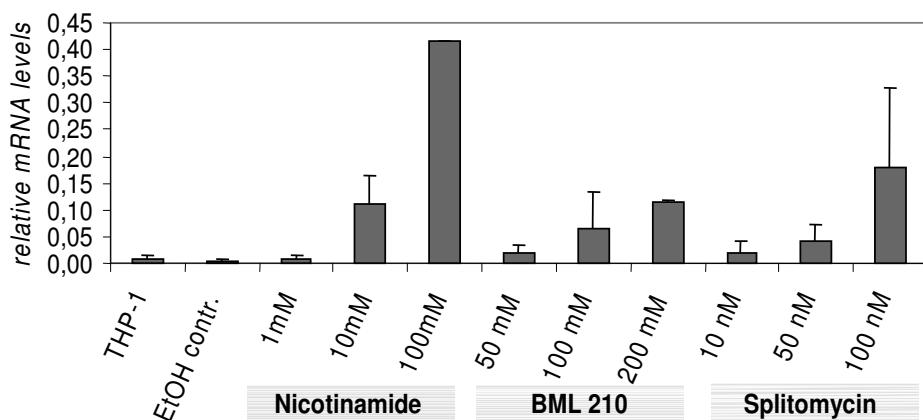


Abb. 30: Dosisabhängige Hochregulation der MADDAM Transkription in THP-1 durch andere Inhibitoren von Histon-Deacetylasen. Die MADDAM Expression wurde durch real-time RT PCR bestimmt.

Hierzu wurden die *in vitro* differenzierten Zellen zunächst mit Formaldehyd fixiert und somit sämtliches Kernprotein fest an die assoziierte DNA gekoppelt. Mittels definierter Pulse von Ultraschall konnte die genomische DNA in Fragmente von durchschnittlich 1 kB geschert und anschließend die DNA-Protein-Komplexe über Antikörper gegen acetyliertes Histon H3 bzw. H4 präzipitiert werden. Durch den Präzipitations-Schritt wurde spezifisch DNA angereichert, die an acetyliertes Histon gebunden vorlag. In einer nachgeschalteten PCR wurde dann quantifiziert, wie stark beispielsweise der Promotorbereich des MADDAM Gens angereichert wurde und das Ergebnis vergleichend von Makrophagen und dendritischen Zellen dargestellt. Es zeigte sich, dass Histone im Bereich des MADDAM Promotors in dendritischen Zellen sehr viel stärker acetyliert sind als in Makrophagen und dass durch die terminale Differenzierung mit LPS diese Acetylierung in DC nochmals verstärkt wird. Neben dem MADDAM Promotor wurde auch der Promotorbereich eines anderen ADAM Gens (Decysin) untersucht. Hier ließen sich nur geringe Unterschiede im Acetylierungsmuster nachweisen, was die spezifische Wirkung der Acetylierung auf die Regulation des MADDAM Gens nochmals unterstreicht. Als Kontrolle wurden auch ChIP Experimente mit THP-1 Zellen durchgeführt. Wie erwartet, fanden sich im Bereich des MADDAM Promotors in

TSA stimulierten THP-1 Zellen stark acetylierte Histone, während ohne TSA keine Acetylierung in diesem Bereich nachzuweisen war.

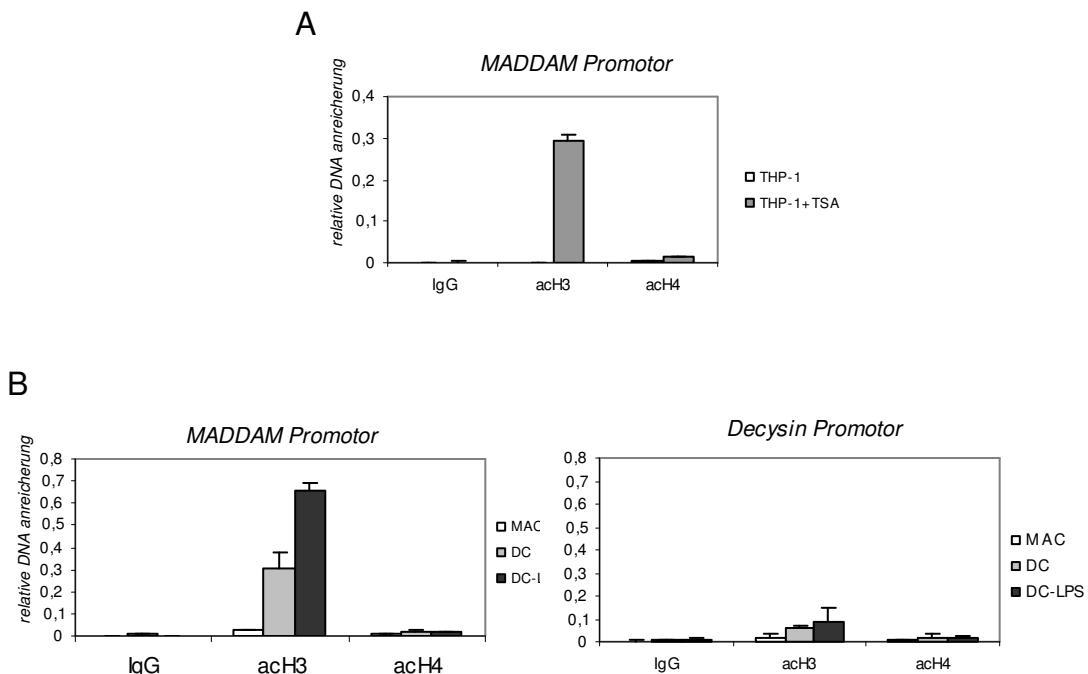


Abb. 31: Quantitative Auswertung der Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) gegen acetyliertes Histon H3 und H4 in THP-1 Zellen (**A**, oben) und primären dendritischen Zellen und Makrophagen (**B**, unten). Präzipitierte DNA wurde mit MADDAM- und Decysin-spezifischen Primern mittels real-time PCR analysiert und die relative Anreicherung durch ChIP im Diagramm dargestellt. Unspezifische Bindung an IgG Antikörper aus dem Kaninchen dienten als Negativ-Kontrolle.

#### 4.5.3 Expressionsanalyse von Histonacetyltransferasen und Histondeacetyltransferasen in Makrophagen und dendritischen Zellen

Der jeweilige Acetylierungsstatus von Histonen wird definiert und reguliert von zwei großen Gruppen von Enzymen, den Histonacetyltransferasen (HAT's), die die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf endständige Lysin-Reste von Histonen katalysieren und den Histondeacetyltransferasen (HDAC's), die die Acetylgruppen aktiv von Histonresten entfernen. Ziel der folgenden Versuchsreihe war es, eventuelle Unterschiede im Expressionsmuster von HAT's und HDAC's in dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden und damit eine Erklärung für die starke Histon-Acetylierung am MADDAM Promotor

in dendritischen Zellen zu erhalten. Die gewählten Vertreter der HAT's acetylieren bevorzugt Histon H3 (Marmorstein, 2001). Bezuglich ihrer Expression zeigte sich, dass während der Differenzierung zu Makrophagen vor allem CBP („CREB binding protein“) stark nach unten reguliert wird, und der mit CBP dimerisierende Faktor PCAF („p300/CBP associated factor“) in Makrophagen ebenfalls nur schwach exprimiert wird. Während der Differenzierung zu dendritischen Zellen allerdings wird CBP auf dem gleichen Level wie in Monozyten exprimiert und PCAF nochmals weiter hochreguliert.

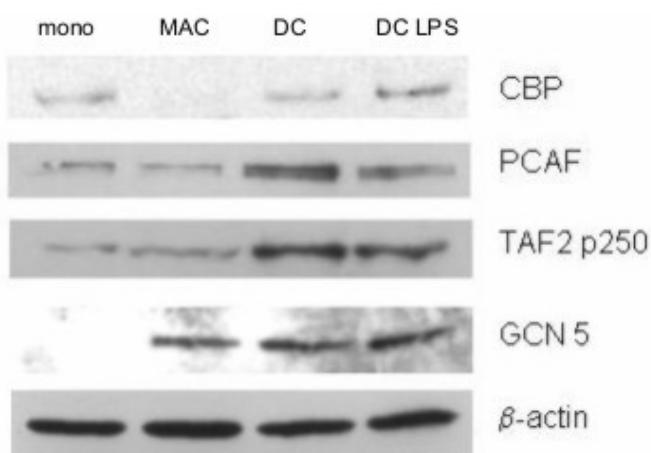


Abb. 32: Vergleichende Protein-Expression wichtiger HAT's in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen +/- LPS. Komplettlysate der jeweiligen Zelltypen wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen CBP, PCAF, TAF2p250 und GCN5 untersucht.  $\beta$ -actin diente als Beladungskontrolle.

TAF2 p250 wird ebenfalls während der DC Differenzierung hochreguliert und GCN 5 scheint relativ gleich in Makrophagen und DC's vorhanden zu sein, nicht aber in Monozyten.

Die Gruppe der HDAC's wird unterteilt in drei Klassen (Klasse I, II und Klasse III = Sirtuine). Anhand dieser Einteilung wurden jeweils zwei Vertreter aus jeder Klasse gewählt und dessen Expressionslevel in Makrophagen und dendritischen Zellen mittels real-time RT-PCR gemessen. Abb. 33 zeigt, dass es Unterschiede in den Expressionshöhen zwischen beiden Zelltypen gibt. Die meisten HDAC's wurden tendenziell in dendritischen Zellen hochreguliert, nur HDAC 2, sirt 5 und sirt 6 wurden in Makrophagen höher exprimiert. Bei HDAC 8

fanden sich keine Unterschiede zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen.

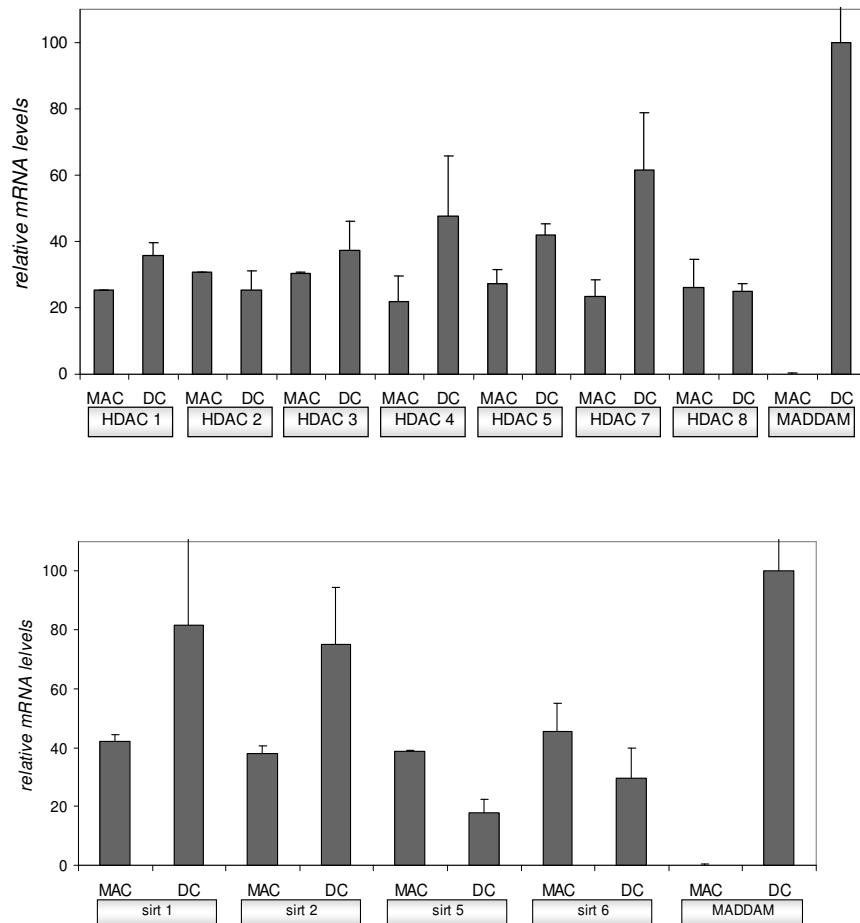


Abb. 33: RNA Expressionslevel verschiedener Mitglieder der HDAC/sirtuin-Genfamilie, vergleichend in Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Werte sind Mittelwerte von zwei unabhängigen RNA-Präparationen unterschiedlicher Spender und relativ zur MADDAM Expression in dendritischen Zellen angegeben.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass es deutliche differenzierungsabhängige Unterschiede im Expressionsmuster von HAT's und HDAC's gibt, die wenn sie am MADDAM Promotor vorhanden wären für die unterschiedliche Acetylierung der benachbarten Histone verantwortlich sein könnten.

## 5 Diskussion

MADDAM ist ein molekularer Differenzierungsmarker für dendritische Zellen und wird in Makrophagen nicht exprimiert (Fritsche et al., 2000). MADDAM ist daher ein „Modellgen“, dessen transkriptionelle Regulation einen grundlegenden Beitrag zum Verständnis differenzierungsabhängiger Genexpression von dendritischen Zellen und Makrophagen leisten kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Charakterisierung des proximalen Promotors auch die Chromatinkonformation und deren Einfluss auf die MADDAM Expression untersucht. Die Acetylierung von Histonresten im Bereich des MADDAM Promotors scheint ein wesentlicher Faktor bei der Regulation dieses Gens zu sein, die wahrscheinlich durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren und Histon-modifizierenden Kofaktoren zustandekommt. Weiterhin wurde der Mechanismus der 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – vermittelten Regulation der MADDAM Transkription untersucht. Hierbei zeigte sich, dass drei potentielle Bindestellen für VDR-RXR Heterodimere im MADDAM Promotor und Intron 1 existieren, die für die direkten, genomischen Effekte verantwortlich sind. Damit ist MADDAM eines der wenigen Gene, bei denen bisher „Vitamin D response Elemente“ identifiziert wurden.

### 5.1 Die Rolle von Transkriptionsfaktoren für die differentielle Transkription von MADDAM

Die Charakterisierung des MADDAM Promotors durch Deletions- und Mutations-Reporterassays und parallel dazu durchgeführte EMSA Experimente hat im wesentlichen gezeigt, dass zur basalen Expression dieses Gens vor allem die Transkriptionsfaktoren der SP-Familie und NF-κB notwendig sind. Durch alleinige Mutation der GC-Boxen 1,2 und 3, die im Folgenden als Bindestellen für SP-1 und SP-3 definiert wurden, kam es zu einem Aktivitätsverlust von über 80%. SP-Faktoren spielen also eine wesentliche Rolle bei der Initiation der Transkription des MADDAM Gens. Die grundlegende Frage in diesem Zusammenhang ist, ob ubiquitär exprimierte

Transkriptionsfaktoren wie SP-1 und SP-3 eine differentielle Genregulation steuern können. Eine relativ einfache Erklärung wäre, dass die Proteinlevel von SP-1 während der Differenzierung zu Makrophagen und dendritischen Zellen unterschiedlich reguliert werden. Eine systematische Untersuchung dieser Fragestellung wurde bisher noch nicht durchgeführt, allerdings zeigen immunhistochemische Versuche im Maussystem, dass es deutliche quantitative Unterschiede in der SP-1 Konzentration abhängig vom Gewebe- oder Zelltyp gibt (Saffer et al., 1991). Neben SP-1 wurde durch die EMSA-Experimente auch eine mögliche Bindung von SP-3 an die verschiedenen GC-Boxen im MADDAM-Promotor gezeigt. SP-3 gilt ganz allgemein als „schwächerer“ Aktivator als SP-1 und kann unter Umständen auch als Repressor fungieren (Resendes and Rosmarin, 2004). Wegen der möglichen Bindung beider Faktoren an die selbe GC-Box und der damit verbundenen Kompetition um die Bindung ist wahrscheinlich auch das Verhältnis von SP-1 zu SP-3 in Makrophagen versus dendritischen Zellen von großer Wichtigkeit.

Sowohl SP-1, als auch SP-3 unterliegen posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung und proteolytischer Prozessierung. Im Falle der Phosphorylierung von SP-1 entsteht aus der unmodifizierten Form mit 95 kD eine weitere, 105 kD große Isoform (Rao et al., 1998). Zelltypspezifisch findet man in nicht-myeloischen HeLa Zellen fast ausschließlich die 95 kD Form und in myeloischen MonoMac 6 Zellen vorwiegend die phosphorylierte 105 kD Isoform. Am Beispiel des CD14 Promoters ist in diesem Zusammenhang gezeigt, dass nur die phosphorylierte Variante in der Lage ist, die Transkription des Makrophagenmarkers CD14 zu induzieren (Zhang et al., 1994). Daher wird CD14 nur in MonoMac 6 Zellen, nicht aber in HeLa exprimiert. Eine weitere Isoform von SP-1 wurde in der myeloischen Zelllinie HL-60 gefunden. Es handelt sich um ein 30 kD großes Spaltprodukt von SP-1, das nur noch die DNA-Bindedomäne und keine Aktivierungsdomäne mehr enthält. Die Prozessierung von SP-1 wird in diesem Fall von der Serinprotease „Myeoblastin“ vermittelt und führt zur funktionellen Inaktivierung von SP-1 (Rao et al., 1998). Interessant ist die Existenz dieser Isoform deshalb, da während der Differenzierung der HL-60 Zellen mittels 1,25-

Vitamin D<sub>3</sub> in Richtung Makrophagen die Menge dieser Isoform differenzierungsabhängig abnimmt, dafür aber in den differenzierten Zellen wieder die 105 kD Variante vorliegt. Der Grund hierfür liegt in einer 1,25-Vitamin D3 – induzierten Runterregulation der Myeoblastin-Protease, die zur Spaltung von SP-1 nötig ist (Resendes and Rosmarin, 2004).

Diese Beispiele zeigen, dass SP-1 und SP-3 Faktoren zelltyp- und differenzierungsabhängige Modifikationen erfahren und diese Veränderungen einen gravierenden Einfluss auf das Aktivierungspotential der SP - Proteine haben können. In welchem Ausmaß sich Makrophagen und dendritische Zellen in Bezug zur SP - Expression bzw. Modifikation unterscheiden ist derzeit nicht klar. Ausser MADDAM sind auch andere Marker von dendritischen Zellen wie CD83 und IL-12(p35) bekannt, deren Expression von SP-1 und SP-3 gesteuert wird (Van Lint et al., 1996; Berchtold et al., 2002). Daneben gibt es allerdings auch Makrophagen-spezifische Gene wie CD14, deren Expression ebenfalls von SP-1 abhängt (Zhang et al., 1994).

Im Gegensatz zu den relativ ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren SP-1 und SP-3 werden die Untereinheiten der NF-κB Familie während der Differenzierung von dendritischen Zellen stark hochreguliert und sind an der zelltypspezifischen Regulation vieler Gene beteiligt (Ammon et al., ; Baltathakis et al., 2001; Platzer et al., 2004). Auch bei der Regulation des MADDAM Gens spielt NF-κB eine entscheidende Rolle. Das Bindemotiv für NF-κB aus dem MADDAM Promotor zeigte in den EMSA-Experimenten eine Interaktion mit Heterodimeren aus p50, p65 und cRel, und die alleinige Mutation der NF-κB Stelle im Reporterassay hatte einen Aktivitätsverlust von ca. 55% zur Folge. Die MADDAM Transkription wird in 2 definierten Situationen deutlich nach oben reguliert, die eine Aktivierung von NF-κB und die nachfolgende Rekrutierung an den MADDAM Promotor vermuten lassen: Ein sehr starkes Signal wird durch die Behandlung von unreifen dendritischen Zellen mit LPS ausgelöst. Durch diesen Stimulus konnte (spenderabhängig) eine bis zu 5-fache Hochregulation der MADDAM Transkription gegenüber unstimulierten Kontrollen beobachtet werden. LPS verursacht die Aktivierung von NF-κB über eine initiale Bindung

an den LPS-Rezeptor (CD14). Durch die anschließende Komplexierung mit dem Adaptermolekül MD2 und Toll-like-Rezeptor 4 wird eine Signalkaskade induziert, an deren Ende die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren steht - unter anderem auch NF-κB (Guha and Mackman, 2001). Weiterhin regulieren frisch isolierte Monozyten nach Adhärenz an Plastik die MADDAM Transkription deutlich nach oben. In Zusammenhang mit der allgemeinen Stimulation von Monozyten durch Adhärenz an Plastik ist ebenfalls eine Aktivierung von NF-κB beschrieben (Lofquist et al., 1995). Die Hochregulation der MADDAM Transkription nach LPS-Stimulierung in dendritischen Zellen einerseits und nach der Aktivierung von Monozyten durch Adhärenz andererseits deuten also zusammen darauf hin, dass NF-κB für die aktivierungsspezifische MADDAM-Regulation verantwortlich ist.

Die Promotoren der DC-Marker CD83 und IL-12(p35) haben neben den essentiellen GC-Boxen ebenfalls Bindestellen für NF-κB und werden durch NF-κB-Aktivierung nach LPS- oder TNF-α - Stimulation hochreguliert (Vaidyanathan et al., 2001; Berchtold et al., 2002). Im Falle der Stimulation mit TNF-α kommt es zur Ligation des TNF-Rezeptors und einer durch TRAF(TNF Rezeptor assoziierter Faktor)-Proteine verursachten Aktivierung von NF-κB und anderen Transkriptionsfaktoren (Dempsey et al., 2003). Bezuglich der MADDAM Expression ist gezeigt, dass neben LPS auch TNF-α die Transkription in dendritischen Zellen hochreguliert (Fritsche et al., 2000). Die Aktivierung von NF-κB und Bindung am MADDAM Promotor wäre somit in beiden Fällen (der LPS und TNF-α Stimulation) eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt.

Der Vergleich der Promotor-Regionen des humanen MADDAM Gens mit dem murinen ADAM19 zeigte, dass beide regulatorische Bereiche relativ stark konserviert sind. In der Region, die als proximaler Promotor des MADDAM Gens definiert wurde, findet sich eine Übereinstimmung von 67%. Weiterhin ist die im MADDAM Promotor gelegene „GC-Box 3“ in ihrer Erkennungssequenz zu 100% erhalten und die Bindung von SP-Faktoren spielt für die Aktivierung der ADAM19 Transkription im Maussystem eine ebenso wichtige Rolle wie die

Bindung an die GC-Box 3 im humanen System (Kurohara et al., 2000). Ein Unterschied zwischen beiden Spezies ist in einer Region zu finden, in der im humanen Promotor zwei GC-Boxen als „Modul“ vorliegen. Durch EMSA-Versuche konnte bestätigt werden, dass auf einer Länge von ca. 30 Basenpaaren zwei funktionelle SP-Bindestellen vorhanden sind. Mit kalten Kompetitoren, die entweder die erste oder die zweite GC-Box mutiert hatten, konnte jeweils eine Bindung von SP-Faktoren an die radioaktiv markierte DNA kompetiert werden, d.h. beide GC-Boxen sind in der Lage SP-Faktoren effektiv zu binden. Bei der gleichzeitigen Mutation beider Bindestellen als Negativ-Kontrolle wurde wie erwartet keine Kompetition mehr erreicht. Im Maussystem liegt anstelle dieser hochaffinen SP-Bindestelle durch Austausch von insgesamt vier Basenpaaren eine Bindestelle für NF- $\kappa$ B vor. Ob dieser Austausch einen Effekt auf das Expressionsmuster von ADAM19 in der Maus hat ist eine offene Frage, könnte aber mit der Expression von ADAM19 in primären Knochenmarks-Makrophagen und auch in der Makrophagenzelllinie RAW zusammenhängen. Durch Northern Blot Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass Makrophagen, die aus dem Knochenmark gesunder Mäuse differenziert wurden, ADAM19 exprimieren. In dendritischen Zellen (Zelllinie D1, Riccardi castagnoli) ließen sich zwar deutlich höhere Expressionslevel nachweisen, trotzdem scheint ADAM19 im Maussystem auch von Makrophagen exprimiert zu werden. Eine Gemeinsamkeit im murinen und humanen System ist daher die hohe Expression des ADAM19/MADDAM Gens in dendritischen Zellen. Dies wirft wiederum die Frage nach der Funktion des ADAM19 Proteins im Immunsystem auf. ADAM19-defiziente Mäuse wurden kürzlich von zwei Gruppen parallel veröffentlicht (Zhou et al., 2004; Kurohara et al., 2004). Der gemeinsame Phänotyp dieser Mäuse ist dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere entweder während oder kurz nach der Geburt aufgrund ihrer Herzfehler sterben. Über mögliche Funktionsstörungen des Immunsystems dieser Tiere gibt es bisher noch keine Informationen, allerdings geht die Gruppe um Kurohara weiter und beschreibt, dass ein Substrat von ADAM19 (Neuregulin1) während der frühen Entwicklungsstadien nicht nur im Nervengewebe, sondern auch in Herzmuskelzellen exprimiert wird. Bei der

Differenzierung des Herzens könnte eventuell die proteolytische Spaltung und Freisetzung von löslichem Neuregulin 1 eine wichtige Rolle spielen, da Neuregulin-defiziente Mäuse im Embryonalstadium starke Störungen in der Ausbildung ihres zentralen Nervensystems und ihrer Herzen haben (Meyer and Birchmeier, 1995). In Bezug auf immunologische Vorgänge ist es daher ebenso wichtig, sich mit möglichen Substraten von ADAM19 oder MADDAM zu beschäftigen, um dadurch Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins im Immunsystem machen zu können. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich beschrieben, dass MADDAM-überexprimierende Zellen lösliches TNF- $\alpha$  produzieren (Zheng et al., 2004). TNF- $\alpha$  wird normalerweise von einem Enzym namens TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) autokatalytisch gespalten, um lösliches TNF- $\alpha$  als Botenstoff in die Peripherie auszusenden (Primakoff and Myles, 2000). Die sehr hohe Expression von MADDAM in terminal differenzierten dendritischen Zellen könnte für eine verstärkte Prozessierung und Produktion von löslichem TNF- $\alpha$  in entzündlichen Geweben verantwortlich sein und somit die Immunantwort verstärken.

Da wesentliche Unterschiede zwischen myeloiden Zelllinien und primären Zellen bestehen, ergab sich die Frage inwieweit der proximale Promotor Aktivitätsunterschiede in primären Makrophagen und dendritischen Zellen zeigt. Um diese Frage zu klären, wurden Versuche durchgeführt, in denen Luciferase als Reporter unter der Kontrolle des MADDAM 150 Basenpaar proximalen Promotors in entweder Makrophagen oder reifen dendritischen Zellen exprimiert wurde. Transient transfizierte dendritische Zellen von verschiedenen Spendern zeigten eine ca. 2 fach höhere Expression des Luciferase Reporters als Makrophagen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die am proximalen Promotor bindenden Transkriptionsfaktoren zumindest teilweise an der DC-spezifischen Expression des MADDAM Gens beteiligt sind. Die beobachtete spezifische Expression in dendritischen Zellen ist aber wahrscheinlich auf weitere regulatorische Mechanismen zurückzuführen. Mit diesen Versuchen relativiert sich darüber hinaus die Möglichkeit der bereits angesprochenen spezifischen Regulation über SP-Faktoren und Mitglieder der NF- $\kappa$ B Familie. Wäre in Makrophagen und dendritischen Zellen tatsächlich die unterschiedliche

Modifikation von SP-Faktoren alleine für die zelltypspezifische Expression von MADDAM verantwortlich, so hätte sich in den Transfektionen der primären Zellen ein deutlicherer Unterschied zeigen müssen.

Neben dem proximalen Promotor können theoretisch auch „weit entfernt“ liegende DNA-Abschnitte und daran bindende Faktoren (z.B. Enhancer) für die MADDAM Regulation verantwortlich sein. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

## 5.2 Die Chromatinstruktur als entscheidender Faktor

DNA-Methylierung oder Histon-Acetylierung haben einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation vieler Gene. Daher wurde untersucht, inwieweit solche epigenetischen Mechanismen an der Regulation der MADDAM Expression beteiligt sind.

Die Methylierung von CpG Dinukleotiden in Promotorregionen ist generell mit einer Repression der Transkription verbunden (Razin and Cedar, 1991). Im Falle von MADDAM könnte daher eine in Monozyten vorliegende und während der Differenzierung zu Makrophagen anhaltende Methylierung des MADDAM Promoters die fehlende Expression in diesen Zelltypen erklären. Während der Differenzierung zu dendritischen Zellen dagegen müsste differenzierungsabhängig eine aktive Demethylierung stattfinden, damit Transkription in dendritischen Zellen stattfinden kann. Eine solche Art der aktiven Demethylierung ist bisher nur in frühen Stadien der Embryonalentwicklung nach der Befruchtung der Eizelle bekannt, in denen das väterliche Genom zunächst einheitlich demethyliert und anschließend wieder gerichtet methyliert wird (Mayer et al., 2000). Demethylierung findet ansonsten immer in passiver Form statt, d.h. dieser Vorgang ist an Zellteilung und den Einbau unmethylierter Nukleotide in den DNA Strang gebunden (Razin and Riggs, 1980) – Monozyten und dendritische Zellen teilen sich nicht mehr (Cavanagh et al., 1998), darum wäre eine aktive (enzymatische) Demethylierung in dendritischen Zellen die einzige Möglichkeit, den MADDAM Promotorbereich zu demethylieren. Durch

Bisulfit-Reaktionen und anschließender Sequenzierung des MADDAM Promotors aus genomischer DNA von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen hat sich gezeigt, dass die Regulation des MADDAM Gens unabhängig von einer Methylierung der CpG Reste stattfinden muss, weil keinerlei Methylierung in diesem Bereich nachzuweisen war. Zum Vergleich wurden auch Bisulfit-Reaktionen mit DNA aus den Zelllinien THP-1 und U937 durchgeführt. Interessanterweise zeigte die Leukämie-Zelllinie U937 einen relativ hohen Grad an Methylierung, der wahrscheinlich mit dem grundsätzlich veränderten Methylierungsmuster in leukämischen Zellen zusammenhängt (Galm et al., 2004). Durch Demethylierung mittels Aza-Deoxycytidin ließ sich die MADDAM Expression in U937 Zellen induzieren, während bei THP-1 Zellen dieser Effekt nicht eintrat.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Methylierung von CpG Dinukleotiden zwar generell eine Möglichkeit ist die MADDAM Expression zu reprimieren (wie in U937), bei der Regulation in Makrophagen und dendritischen Zellen spielt diese Art der DNA-Modifikation jedoch keine Rolle.

Die Beobachtung, dass in THP-1 Zellen nach Aza-Deoxycytidin keine Induktion der MADDAM Transkription stattfand führte zur Überlegung, dass in diesem Fall andere Chromatin-modifizierende Prozesse wie z.B. die Acetylierung von Histonresten einen Einfluss auf die MADDAM Transkription haben könnten. Durch die Verwendung von HDAC-Inhibitoren wie TSA, BML210, Splitomycin oder Nicotinamid konnte die MADDAM Transkription in THP-1 Zellen dosisabhängig induziert werden. Im Gegensatz zu den übrigen Inhibitoren, die nur auf HDAC's der Klasse I und II wirken, inhibiert Nicotinamid spezifisch die Deacetylierung durch Sirtuine (HDAC der Klasse III) (Starai et al., 2004). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in THP-1 Zellen verschiedene Arten von HDAC's an der aktiven Deacetylierung der Histone am MADDAM Locus beteiligt sind. In U937 hingegen wurde MADDAM durch die alleinige Inhibition der Histondeacetylasen nicht induziert, was die dominant repressive Eigenschaft der DNA Methylierung in diesen Zellen nochmals unterstreicht. Die Verwendung der genannten Inhibitoren resultiert in einer Hyperacetylierung der Histone, der Relaxierung des Chromatins und einer leichteren Zugänglichkeit

der DNA für den Transkriptionskomplex (de Ruijter et al., 2003). Im Fall des MADDAM Gens ist in THP-1 Zellen die Hyperacetylierung alleine ausreichend, um die Expression zu induzieren. Dies ist ein relativ spezifischer Mechanismus, wenn man berücksichtigt, dass die Anzahl der Gene, die alleine durch Acetylierung von Histonen reguliert wird bei ca. 3-4% liegt (Della et al., 2001). In Übereinstimmung mit der Beobachtung aus anderen Zellsystemen, in denen die Transkription von nur relativ wenigen Genen durch die alleinige Behandlung mit TSA induziert wurde, waren auch in THP-1 Zellen andere Mitglieder der ADAM-Familie oder Markergene von dendritischen Zellen und Makrophagen nach TSA-Stimulierung nicht reguliert, sondern nur MADDAM. Die Aktivierbarkeit der MADDAM-Expression durch Inhibition von Histondeacetylasen deutet darauf hin, dass eine Kondensation des Chromatins und folglich eine Unzugänglichkeit der DNA für alle nötigen Transkriptionsfaktoren und den gesamten Transkriptionskomplex durch eine dauernde Deacetylierung verursacht wird. Unklar bleibt jedoch, durch welche Interaktionen die verantwortlichen HDAC's am MADDAM-Locus assoziiert sind. Hinweise, dass SP-1 im Komplex mit HDAC's an der Deacetylierung von Promotoren beteiligt sein könnte, kommen aus Untersuchungen am INK4d-Gen (Yokota et al., 2004), und am Promotor des p21<sup>WAF1</sup>-Gens (Nakano et al., 1997; Sowa et al., 1999). Die Produkte beider Gene haben Funktionen in der Regulation des Zellzyklus und eine Induktion der Expression durch TSA korreliert jeweils mit einem Proliferationsstop von Tumorzellen (Donadelli et al., 2003; Yokota et al., 2004). Beide Gene werden ähnlich wie MADDAM dosisabhängig durch TSA hochreguliert. Im Falle des INK4d-Gens ist zusätzlich durch Chromatin Immunpräzipitation gezeigt, dass im unstimulierten Zustand sowohl SP-1, als auch HDAC2 am Promotor vorliegen, nach TSA-Stimulierung allerdings kein HDAC2 mehr nachweisbar ist. Offensichtlich wirkt TSA hier nicht nur auf die enzymatische Aktivität von HDAC2, sondern auch auf dessen Interaktion mit anderen Proteinen. Die Stimulierung mit TSA führt also in diesem Fall zunächst zu einer Dissoziation von HDAC2, danach kommt es zu einer verstärkten Acetylierung an Histonen in der Region und schließlich zur beobachteten Hochregulation von INK4d. Für den p21<sup>WAF1</sup>-Promotor ist in diesem Zusammenhang auch gezeigt, dass durch

getrennte Mutationen zweier SP-1 Bindestellen jeweils das Ansprechen auf TSA stark vermindert wird (Sowa et al., 1999). Bezogen auf die MADDAM Regulation in THP-1 Zellen ist dies ein interessantes Modell, da wegen der hochaffinen SP-1 Bindestellen eine Wechselwirkung eines solchen SP-1/HDAC-Komplexes mit der DNA durchaus denkbar wäre.

Durch Chromatin Immunpräzipitationsversuche konnte die starke Acetylierung von (vor allem) Histon H3 am MADDAM-Locus in THP-1 Zellen nach TSA-Behandlung bestätigt werden. Gleichzeitig zeigte sich die differenzierungsabhängige Acetylierung der Histone H3 und H4 in dendritischen Zellen und keine Acetylierung in Makrophagen. Die gemessenen Unterschiede der Acetylierungsgrade in Makrophagen und dendritischen Zellen können grundsätzlich durch differentielle Expression von Histondeacetylasen oder Acetyltransferasen erklärt werden. Die gegensätzliche Aktivität, die Balance untereinander und die jeweilige Rekrutierung von HAT's und HDAC's an den Promotor, bestimmen letztendlich miteinander den Acetylierungslevel der Histone (Wade, 2001).

Zur Bestimmung differenzierungsabhängiger Unterschiede der HDAC Expression wurden die mRNA-Level von insgesamt 11 Mitgliedern aller drei HDAC-Familien bestimmt. Unter den ausgewählten HDAC-Genen wurde keines spezifisch nur in Makrophagen exprimiert, allenfalls HDAC2, sirt 5 und sirt 6 zeigten in Makrophagen tendenziell höhere mRNA-Werte als in dendritischen Zellen. Dies deutet zunächst also nicht auf eine verstärkte Deacetylierung der Histone in Makrophagen hin. Obwohl keine offensichtlichen Unterschiede der Expressionshöhen in beiden Zellpopulationen gefunden wurden, kann es trotzdem Unterschiede in der Aktivität der Histondeacetylasen geben. Von Mitgliedern der Sirtuin-Familie (HDAC's der Klasse III) weiß man beispielsweise, dass die Enzymaktivität abhängig von NAD<sup>+</sup> reguliert wird (Denu, 2003). NAD<sup>+</sup> wirkt in diesem System als Koenzym, dessen Spaltung zur Aufnahme der Acetylgruppe des Substrates (acetyliertes Histon) und der Freisetzung von Nikotinamid führt. Da NAD<sup>+</sup> in viele metabolische Prozesse verwickelt ist und abhängig vom Stoffwechsel jeder Zelle in hohen oder niedrigen Konzentrationen vorliegt, ist die Regulation der Sirtuin-Aktivität immer

---

an die Eigenschaften und Energiezustände der jeweiligen Zelltypen gekoppelt. Für Makrophagen ist in diesem Zusammenhang ein starker Anstieg der intrazellulären NAD<sup>+</sup> Konzentration nach Interferon  $\gamma$  - Aktivierung beschrieben (Grant et al., 1999), der eine erhöhte Aktivität der Sirtuine und damit der Deacetylierung von Histonen zur Folge haben könnte.

Nicht nur die Expression und Aktivität von HDAC's, sondern auch die der HAT's sind letztendlich entscheidend für den Acetylierungsgrad der regulations-relevanten Histone. Histonacetyltransferasen, die im engeren Sinn mit einer Acetylierung von Histon H3 in Verbindung gebracht werden und daher bei der Acetylierung von Histon H3 während der Differenzierung zu dendritischen Zellen wichtig sein könnten sind GCN5, CBP, PCAF und TAFIIp250 (Marmorstein, 2001). Die Untersuchung der Proteinexpression dieser Kofaktoren mit Acetyltransferase-Aktivität zeigte eine Hochregulation von PCAF und TAFIIp250 in dendritischen Zellen, eine Runterregulation von CBP in Makrophagen und eine Hochregulation von GCN5 in sowohl Makrophagen, als auch dendritischen Zellen.

CBP (CREB binding Protein) gehört zu einer Familie von Kofaktoren, die als CBP/p300-Familie bezeichnet werden und einerseits durch ihre allgemeine Funktion als transkriptionelle Koaktivatoren und im weiteren durch ihre Histonacetyltransferase-Aktivität gekennzeichnet sind (Arany et al., 1995; Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996). Die Struktur dieses Koaktivators ist durch das Vorhandensein dreier Zinkfinger, einer „CREB“-Bindedomäne und einer glutaminreichen Domäne charakterisiert, die jeweils zur Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, weiteren Kofaktoren und dem basalen Transkriptions-komplex befähigt sind (Goodman and Smolik, 2000). CBP wird auch als „Brücken“- oder „Gerüstprotein“ bezeichnet, da es einzelne Transkriptionsfaktoren mit dem ganzen Transkriptionskomplex verbindet und so zur Stabilisierung von Multienzymkomplexen wesentlich beiträgt (Chan and La Thangue, 2001). Weitere Kofaktoren, die mit CBP komplexieren können und ebenso wie CBP eine Histonacetyltransferase (HAT)-Domäne enthalten sind PCAF und GCN5. Ein mögliches Modell, dass für die verstärkte Acetylierung in dendritischen Zellen sprechen würde und mit den

Expressionsdaten der HAT's übereinstimmt, wäre die Bindung von CBP an die MADDAM-spezifischen Transkriptionsfaktoren, eine weitere Komplexierung mit z.B. PCAF und GCN5 und eine anschließende Acetylierung der benachbarten Histone.

Da CBP als potentiell zentrales Protein in Makrophagen deutlich niedriger exprimiert wird als in dendritischen Zellen und gleichzeitig die Kofaktoren PCAF und TAFIIp250 während der DC-Reifung hochreguliert werden, könnte diese Kombination an Kofaktoren eine starke differenzierungsabhängige Acetylierung der Histone am MADDAM Locus erklären.

Eine ähnliche, differenzierungsabhängige Hochregulation der HAT-Aktivität ist auch während der Kalzium-abhängigen Keratinozytendifferenzierung beschrieben. Hier ist gezeigt, dass durch die erhöhte PCAF-Expression das Protein „ap97“ hochreguliert wird, während in Zellen mit mutiertem PCAF diese Hochregulation nicht stattfindet (Kawabata et al., 2002).

### **5.3 Transkriptionelle Regulation von MADDAM durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub>**

Ganz allgemein hat sich durch Stimulationsversuche angedeutet, dass 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> direkte, genomische Effekte am MADDAM Locus verursacht. Da es sich bei primären Monozyten und der Zelllinie MonoMac 6 um eine relativ schnelle (4 Stunden) transkriptionelle Hochregulation des MADDAM Gens handelt, ist eine Regulation über sekundäre oder zwischengeschaltete Proteine wie am CD14 Promotor (Zhang et al., 1994) eher unwahrscheinlich. Die weitere Charakterisierung der drei VDRE's mittels EMSA und den Luciferase Reporterassays deutet auf eine direkte Interaktion von VDR-RXR Heterodimeren mit der DNA am MADDAM Promotor hin. In den EMSA – Versuchen konnte die Protein-DNA Interaktion zwar nur von zwei der drei möglichen VDRE's gezeigt werden, allerdings hatte gerade VDRE<sup>190</sup>, das im EMSA keine VDR-RXR Wechselwirkung einging, die stärkste Aktivierung der Luciferase Expression verursacht. Diese Diskrepanz lässt sich eventuell dadurch erklären, dass im EMSA-Versuchsansatz nur DNA und rekombinantes

VDR/RXR Protein verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um einen standardisierten Versuchsansatz, mit dem auch verschiedene andere Gruppen VDRE's aus 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> regulierten Genen charakterisiert haben, der allerdings auf die Präsenz des VDR-Liganden verzichtet (Wang et al., 2004; Gonzalez et al., 2002; Kitazawa et al., 2003). Beim Reporterassay hingegen werden transfizierte Zellen mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert, was zur Komplexierung mit VDR und RXR führt. Die Bindung von 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> an seinen Rezeptor und eine Komplexierung mit weiteren Kofaktoren wirkt sich möglicherweise positiv auf die Affinität des VDR/RXR Heterodimers zur DNA aus. Dies führt in einem definierten Zellsystem zur verstärkten Bindung des Komplexes an die entsprechenden „Vitamin D response Elemente“, während die Interaktion der selben DNA-Fragmente mit den gleichen Proteinen im artifiziellen EMSA System nicht beobachtet werden kann. Für eine korrekte Untersuchung der VDR-Wechselwirkung mit der DNA ist deshalb immer die Kombination der genannten Methoden nötig.

Die physiologisch aktive Form von Vitamin D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-Vitamin D<sub>3</sub>) beeinflusst die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen positiv (Choudhuri et al., 1990; Kreutz and Andreesen, 1990) und hat zugleich einen negativen Einfluss auf die Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen und Lymphozyten (Tsoukas et al., 1984; Iho et al., 1986). Dieser Einfluss wird dabei meist durch die transkriptionelle Regulation von reifungsassoziierten Genen gesteuert, an deren regulatorischen Regionen über „Vitamin D response elemente“ (VDRE) Komplexe des Vitamin D Rezeptors (VDR), Retinoid X Rezeptors (RXR) und 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> binden können (Hannah and Norman, 1994). VDR und RXR stellen in diesem System keinen limitierenden Faktor dar, da sie ubiquitär exprimiert werden und sowohl in Makrophagen, als auch dendritischen Zellen vorhanden sind (Kizaki et al., 1991; Kreutz et al., 1993; Brennan et al., 1987). Weiterhin ist bereits beschrieben, dass verschiedene Zelltypen wie Endothelzellen, Dickdarmepithel und Makrophagen eine extrarenale Quelle der 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Produktion darstellen (Zehnder et al., 2002; Tangpricha et al., 2001; Reichel et al., 1987;

Kreutz et al., 1993) und die Umwandlung des Vorläufers 25-Vitamin D<sub>3</sub> zu physiologisch aktivem 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> vermitteln können.

Primäre Monozyten und die Zelllinie MonoMac 6 zeigen wie erwähnt eine sehr rasche Hochregulation der MADDAM Transkription nach 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation, THP-1 Zellen hingegen regulieren erst 48 Stunden nach Stimulation die MADDAM Expression nach oben. Prinzipiell sprechen solch lange Stimulationszeiten nicht für eine direkte Regulation über Rekrutierung des VDR/RXR Komplexes an den MADDAM Promotor. Für den Fall der THP-1 Zellen konnte jedoch mit den vorausgehenden HDAC-Inhibitionsexperimenten gezeigt werden, dass die Chromatinstruktur am MADDAM Locus sehr dicht und relativ unzugänglich für den Transkriptionskomplex ist. Gerade diese Tatsache spricht für ein Modell von Dilworth und Chambon (Dilworth and Chambon, 2001). Abhängig von einer initialen Bindung des VDR/RXR Heterodimers wird in einem mehrstufigen Prozess die Chromatinstruktur modifiziert, wodurch im Anschluss Proteine des Transkriptionsapparates einen verbesserten Zugang zur DNA haben. Dabei dient die anfänglich relativ lockere Bindung des VDR/RXR Komplexes an dicht gepackte DNA dazu, einen Angriffspunkt für Kofaktoren der p160/SRC-1 Familie zu schaffen. Dieser Schritt ist Ausgangspunkt für die weitere Komplexierung mit anderen Kofaktoren wie p300/CBP, pCIP und PCAF, deren Gemeinsamkeit die schon erwähnte HAT-Aktivität ist. Die Interaktion dieser Kofaktoren untereinander und mit VDR und anderen nukleären Rezeptoren wurde bereits von verschiedenen Gruppen beschrieben (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996; McKenna et al., 1998; Torchia et al., 1998). Im nächsten Schritt erfolgt die von den Kofaktoren erwähnte Acetylierung der umliegenden Histonreste und eine damit verbundene Lockerung der Histon-DNA-Wechselwirkungen. Die anschließende Bindung der promotorspezifischen Transkriptionsfaktoren leitet zusammen mit einem eventuellen Austausch von Kofaktoren (Rachez et al., 2000; Treuter et al., 1999) den Transkriptionsprozess ein. Diese Abfolge von Ereignissen dauert prinzipiell länger als ein alleiniges Binden von VDR/RXR am Promotor und sofortiger Transaktivierung, d.h. die 48 stündige Stimulation und späte Induktion der MADDAM Transkription könnte durch die THP-1 spezifische

Chromatinstruktur verursacht werden. Hinzukommt die in THP-1 Zellen beobachtete starke Aktivität verschiedener Histondeacetylasen, die eine Acetylierung des MADDAM Promotors durch VDR-assozierte Histonacetyltransferasen zeitlich verzögern, da acetylierte Histone sehr schnell wieder deacetyliert werden.

Ähnlich wie bei der Aktivierung des CD14 Promotors nach 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> Stimulation (Zhang et al., 1994) könnte auch bei der MADDAM Regulation die Modifikation des Transkriptionsfaktors SP-1 und eine damit verbundene Veränderung der Interaktion mit anderen Proteinen in THP-1 Zellen eine zusätzliche, wichtige Rolle spielen.

Für den Promotor des p27<sup>Kip1</sup> Gens ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass zur Initiation der Transkription ein Komplex aus SP-1 und VDR benötigt wird (Huang et al., 2004). Eine Repression von SP-1 mittels RNA-Interferenz führte zu einer deutlich verminderten 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> vermittelten Induktion. Weiterhin konnte in der Kolonkarzinom-Zelllinie SW620, die eine sehr niedrige VDR-Expression zeigt und nicht auf 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> reagiert (Shabahang et al., 1993), durch Überexpression des Vitamin D Rezeptors wieder eine Hochregulation von p27<sup>Kip1</sup> beobachtet werden. Die direkte Interaktion von VDR mit SP-1 über Protein-Protein Wechselwirkungen wurde mittels DNA Affinitäts-Präzipitation bestätigt.

Die genaue Interaktionsstelle von SP-1 mit VDR konnte bisher noch nicht definiert werden. Denkbar ist allerdings, dass diese Interaktion in THP-1 Zellen am MADDAM Promotor durch die Präsenz von Histondeacetylasen erschwert wird, wenn nämlich HDAC's genau an der Stelle an SP-1 binden, die zur Interaktion mit VDR nötig wäre. Die Interaktion von SP-1 mit Histondeacetylasen wurde bereits erwähnt (Yokota et al., 2004; Nakano et al., 1997) und würde im gegebenen Fall zu einer Kompetition mit VDR um die Bindung an SP-1 führen. Da durch Stimulation mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> auch dessen Rezeptor nach oben reguliert wird (Christakos et al., 2003), wird diese Kompetition zugunsten des Vitamin D Rezeptors verschoben und eine verstärkte Interaktion von SP-1 mit VDR führt im Anschluss zur erhöhten

MADDAM Expression. Ein analoger Vorgang ist bereits am Promotor des Thymidinkinase Gens beschrieben (Doetzhofer et al., 1999), an dem nicht VDR, sondern der Transkriptionsfaktor E2F1 mit Histondeacetylasen um die Bindung an SP-1 kompetiert. SP-1 liegt hier in 3T3 Zellen in einem Komplex mit HDAC1 vor und ist für die Repression der Thymidinkinase verantwortlich. Durch TSA Behandlung wird die Transkription dieses Gens ähnlich wie bei MADDAM dosisabhängig nach oben reguliert. Weiter konnte gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von HDAC1 die beachbare Bindestelle für E2F1 nicht besetzt ist, bei Blockierung von HDAC1 durch TSA allerdings eine Verdrängung der Histondeacetylase durch E2F1 stattfindet und Transkription stattfindet. Alternativ konnte auch durch alleinige Überexpression von E2F1 die Bindung von HDAC1 an SP-1 in diesem Promotor verhindert werden und die Expression der Thymidinkinase fand ebenfalls statt. Dieses Beispiel zeigt, dass das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und ganz allgemein die Kompetition von aktivierenden und supprimierenden Faktoren insgesamt gesehen werden muss.

Für die Erklärung der MADDAM Repression während der Makrophagen-differenzierung sind wiederum verschiedene Möglichkeiten denkbar. Sehr wahrscheinlich ist in dieser Hinsicht allerdings eine zentrale Stellung des VDR-RXR-Komplexes, da im Verlauf der Differenzierung sowohl der Vitamin D Rezeptor hoch exprimiert wird, als auch die Produktion von physiologisch aktivem 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stattfindet und beides in großen Mengen vorhanden ist. Eine Kompetition des Vitamin D Rezeptors mit anderen Faktoren am MADDAM Promotor wird während der Makrophagendifferenzierung also sehr wahrscheinlich zugunsten der VDR-Bindung an die VDRE's im MADDAM Promotor und Intron 1 ausgehen. Ein Beleg für diese These ist die Beobachtung, dass LPS und die damit verbundene Aktivierung von NF-κB keinerlei Effekt auf die MADDAM-Expression in Makrophagen haben (Fritsche et al., 2003). VDRE<sup>100</sup> und VDRE<sup>intron</sup> überschneiden sich jeweils in wenigen Basen mit einer Bindestelle für NF-κB, d.h. die ausbleibende Hochregulation der MADDAM Expression nach LPS-Stimulation kann durch eine Kompetition von VDR und NF-κB am MADDAM Promotor erklärt werden. Ein ähnlicher

Mechanismus ist auch bei der Hemmung der IL-2 Expression in 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> stimulierten T-Zellen beschrieben (Alroy et al., 1995). Hier kompetieren der Transkriptionsfaktor AP-1 und der VDR/RXR Komplex um die Bindung am IL-2 Promotor. Nach Stimulierung mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> führt ein Überschuss von VDR/RXR im Zellkern zur Verdrängung von AP-1, was die beobachtete Hemmung der IL-2 Expression erklärt.

In den allermeisten Fällen ist eine Bindung von VDR/RXR in regulatorischen Regionen mit einer Aktivierung der Transkription verbunden. Diese Aktivierung wird wie erwähnt meist über die Interaktion von Kofaktoren erreicht, die entweder durch ihre HAT-Aktivität die Chromatinstruktur beeinflussen oder als Brückenproteine den Transkriptionskomplex stabilisieren und auch die Rekrutierung der RNA-Polymerase II positiv beeinflussen (Rachez et al., 2000). Der positive Einfluss auf die MADDAM Expression durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> ist in primären Monozyten und den erwähnten Zelllinien klar erkennbar. Für wenige Fälle ist allerdings eine Bindung von VDR/RXR an regulatorische Regionen mit einer deutlichen Repression der Transkription verbunden (Alroy et al., 1995; Im et al., 2002; Hines et al., 2004). Die Mechanismen dieser Repression sind noch nicht vollständig geklärt und die erwähnte Kompetition von VDR/RXR mit essentiellen Transkriptionsfaktoren ist sehr wahrscheinlich nicht die einzige Möglichkeit, wie die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> – vermittelte Repression ermöglicht wird. Korepressoren wie SMRT und NCoR, die mit verschiedenen nukleären Rezeptoren komplexieren können (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995) sind bisher noch nicht im Komplex mit VDR beschrieben worden. Ob während der Makrophagendifferenzierung bisher nicht identifizierte Korepressoren an der Runterregulation von 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> regulierten Genen beteiligt sind, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

MADDAM (Metalloprotease and disintegrin dendritic cell antigen marker) ist ein molekularer Marker zur Unterscheidung von *in vitro* differenzierten Makrophagen und dendritischen Zellen. 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. Weiterhin wird die Transkription des MADDAM Gens in Monozyten durch 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> deutlich verstärkt.

Zur Charakterisierung der regulatorischen Mechanismen, die die Expression des MADDAM Gens kontrollieren, wurde zunächst der Transkriptionsstartpunkt und der proximale Promotorbereich von MADDAM bestimmt. Dieser Bereich umfasst eine Region von ca. 150 Basenpaaren und enthält Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie SP-1, SP-3, NF-κB und VDR/RXR. Mittels Reporter- und EMSA-Analysen konnte die Funktionalität dieser Bindestellen bestätigt werden. Weiterhin wurden auch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im ersten Intron des MADDAM Gens gefunden, von denen ein „*Vitamin D response Element*“ (VDRE) mitverantwortlich für die Regulation der MADDAM Transkription nach Stimulation mit 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> sein könnte. Zwei weitere solcher VDRE's befinden sich im proximalen Promotor, die möglicherweise zusammen mit dem VDRE aus Intron1 die 1,25-Vitamin D<sub>3</sub> vermittelte Regulation steuern.

Durch Deletions- und Mutationsexperimente wurden in Reporteranalysen die SP- und NF-κB Bindestellen als essentiell zur Aktivierung der MADDAM Transkription definiert, allerdings zeigen Transfektionen mit Reporterplasmiden in primären Makrophagen und dendritischen Zellen geringe Aktivitätsunterschiede. Dies deutet darauf hin, dass weitere regulatorische Mechanismen für die zelltypspezifische Expression verantwortlich sind.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass MADDAM eines der wenigen Gene ist, dessen Expression wesentlich durch epigenetische Mechanismen reguliert wird.

Die Methylierung von CpG Resten im Promotorbereich spielt dabei wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da die DNA von verschiedenen Spendern und der Zelllinie THP-1 am MADDAM Promotor nicht methyliert vorlagen. Vielmehr sind Modifikationen der Chromatinstruktur, die durch Acetylierung von Histonresten verursacht werden von entscheidender Wichtigkeit. In THP-1 Zellen konnte die MADDAM Expression durch alleinige Inhibition von Histondeacetylasen dosisabhängig induziert werden. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Acetylierungsgrad der Histone am MADDAM Promotor von primären Makrophagen und dendritischen Zellen.

Zur Histonacetylierung notwendige Kofaktoren wie CBP, PCAF und TAFIIp250 werden in dendritischen Zellen sehr viel stärker exprimiert als in Makrophagen. Die bessere Verfügbarkeit dieser Acetyltransferasen ist möglicherweise der entscheidende Unterschied, durch den dendritische Zellen die Expression des MADDAM Gens steuern.

## 7 Literaturverzeichnis

Akiyama,Y., Griffith,R., Miller,P., Stevenson,G.W., Lund,S., Kanapa,D.J., and Stevenson,H.C. (1988). Effects of adherence, activation and distinct serum proteins on the in vitro human monocyte maturation process. *J. Leukoc. Biol.* 43, 224-231.

Alroy,I., Towers,T.L., and Freedman,L.P. (1995). Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol. Cell Biol.* 15, 5789-5799.

Ammon,C., Mondal,K., Andreesen,R., and Krause,S.W. Differential expression of the transcription factor NF-kappaB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Feb. 5. ;268. (1.):99. -105. 268, 99-105.

Anderson,K.L., Smith,K.A., Conners,K., McKercher,S.R., Maki,R.A., and Torbett,B.E. (1998). Myeloid development is selectively disrupted in PU.1 null mice. *Blood* 91, 3702-3710.

Andreesen,R., Brugger,W., Scheibenbogen,C., Kreutz,M., Leser,H.G., Rehm,A., and Lohr,G.W. (1990). Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.* 47, 490-497.

Andreesen,R., Picht,J., and Lohr,G.W. (1983). Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J. Immunol. Methods* 56, 295-304.

Arany,Z., Newsome,D., Oldread,E., Livingston,D.M., and Eckner,R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* 374, 81-84.

Armbrecht,H.J. and Boltz,M.A. (1991). Expression of 25-hydroxyvitamin D 24-hydroxylase cytochrome P450 in kidney and intestine. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D and age. *FEBS Lett.* 292, 17-20.

Baltathakis,I., Alcantara,O., and Boldt,D.H. (2001). Expression of different NF-kappaB pathway genes in dendritic cells (DCs) or macrophages assessed by gene expression profiling. *J. Cell Biochem.* 83, 281-290.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.

Barois,N., Saint-Vis,B., Lebecque,S., Geuze,H.J., and Kleijmeer,M.J. (2002). MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic.* 3, 894-905.

- Barreda,D.R., Hanington,P.C., and Belosevic,M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp Immunol.* **28**, 509-554.
- Bartholdy,B. and Matthias,P. (2004). Transcriptional control of B cell development and function. *Gene* **327**, 1-23.
- Becker,S., Warren,M.K., and Haskill,S. (1987). Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *J. Immunol.* **139**, 3703-3709.
- Berchtold,S., Muhl-Zurbes,P., Maczek,E., Golka,A., Schuler,G., and Steinkasserer,A. (2002). Cloning and characterization of the promoter region of the human CD83 gene. *Immunobiology* **205**, 231-246.
- Berger,S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 142-148.
- Bhalla,A.K., Paavonen,T., Williams,M.M., Delves,P.J., and Lydyard,P.M. (1991). Regulation of interleukin-1 and tumour necrosis factor gene expression in myelomonocytic cell lines by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Immunology* **72**, 61-64.
- Brennan,A., Katz,D.R., Nunn,J.D., Barker,S., Hewison,M., Fraher,L.J., and O'Riordan,J.L. (1987). Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. *Immunology* **61**, 457-461.
- Briegel,K., Lim,K.C., Plank,C., Beug,H., Engel,J.D., and Zenke,M. (1993). Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev.* **7**, 1097-1109.
- Brugger,W., Kreutz,M., and Andreesen,R. (1991). Macrophage colony-stimulating factor is required for human monocyte survival and acts as a cofactor for their terminal differentiation to macrophages in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **49**, 483-488.
- Caux,C., Dezutter Dambuyant,C., Schmitt,D., and Banchereau,J. (1992). GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261.
- Cavanagh,L.L., Saal,R.J., Grimmett,K.L., and Thomas,R. (1998). Proliferation in monocyte-derived dendritic cell cultures is caused by progenitor cells capable of myeloid differentiation. *Blood* **92**, 1598-1607.
- Chakravarti,D., LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M., and Evans,R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**, 99-103.
- Chan,H.M. and La Thangue,N.B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell Sci.* **114**, 2363-2373.
- Chen,J.D. and Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-457.
- Chen,M.S., Tung,K.S., Coonrod,S.A., Takahashi,Y., Bigler,D., Chang,A., Yamashita,Y., Kincade,P.W., Herr,J.C., and White,J.M. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11830-11835.

- Cheng,L., Esch,F.S., Marchionni,M.A., and Mudge,A.W. (1998). Control of Schwann cell survival and proliferation: autocrine factors and neuregulins. *Mol. Cell Neurosci.* 12, 141-156.
- Choudhuri,U., Adams,J.A., Byrom,N., McCarthy,D.M., and Barrett,J. (1990). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces normal mononuclear blood cells to differentiate in the direction of monocyte-macrophages. *Haematologia. Budapest.* 23, 9-19.
- Christakos,S., Dhawan,P., Liu,Y., Peng,X., and Porta,A. (2003). New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J. Cell Biochem.* 88, 695-705.
- D'Ambrosio,D., Cippitelli,M., Coccio,M.G., Mazzeo,D., Di Lucia,P., Lang,R., Sinigaglia,F., and Panina-Bordignon,P. (1998). Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J. Clin. Invest.* 101, 252-262.
- Dahl,R., Walsh,J.C., Lancki,D., Laslo,P., Iyer,S.R., Singh,H., and Simon,M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029-1036.
- Dakic,A. and Wu,L. (2003). Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. *Leuk. Lymphoma* 44, 1469-1475.
- de Ruijter,A.J., van Gennip,A.H., Caron,H.N., Kemp,S., and van Kuilenburg,A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370, 737-749.
- de Waal,M., Figdor,C.G., Huijbens,R., Mohan-Peterson,S., Bennett,B., Culpepper,J., Dang,W., Zurawski,G., and de Vries,J.E. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J. Immunol.* 151, 6370-6381.
- Della,R.F., Criniti,V., Della,P., V, Borriello,A., Oliva,A., Indaco,S., Yamamoto,T., and Zappia,V. (2001). Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett.* 499, 199-204.
- Dempsey,P.W., Doyle,S.E., He,J.Q., and Cheng,G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 193-209.
- Denu,J.M. (2003). Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+) -dependent deacetylases. *Trends Biochem. Sci.* 28, 41-48.
- Dilworth,F.J. and Chambon,P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.
- Doetzlhofer,A., Rotheneder,H., Lagger,G., Koranda,M., Kurtev,V., Brosch,G., Wintersberger,E., and Seiser,C. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol. Cell Biol.* 19, 5504-5511.
- Donadelli,M., Costanzo,C., Faggioli,L., Scupoli,M.T., Moore,P.S., Bassi,C., Scarpa,A., and Palmieri,M. (2003). Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells. *Mol. Carcinog.* 38, 59-69.

Dong,X., Craig,T., Xing,N., Bachman,L.A., Paya,C.V., Weih,F., McKean,D.J., Kumar,R., and Griffin,M.D. (2003). Direct transcriptional regulation of RelB by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs: physiologic and therapeutic implications for dendritic cell function. *J. Biol. Chem.* **278**, 49378-49385.

Engering,A., Geijtenbeek,T.B., van Vliet,S.J., Wijers,M., van Liempt,E., Demaurex,N., Lanzavecchia,A., Fransen,J., Figdor,C.G., Piguet,V., and van Kooyk,Y. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* **168**, 2118-2126.

Fanger,M.W., Shen,L., Graziano,R.F., and Guyre,P.M. (1989). Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* **10**, 92-99.

Forsberg,E.C. and Bresnick,E.H. (2001). Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world. *Bioessays* **23**, 820-830.

Fritzsche,J., Moser,M., Faust,S., Peuker,A., Buttner,R., Andreesen,R., and Kreutz,M. (2000). Molecular cloning and characterization of a human metalloprotease disintegrin--a novel marker for dendritic cell differentiation. *Blood* **96**, 732-739.

Fritzsche,J., Muller,A., Hausmann,M., Rogler,G., Andreesen,R., and Kreutz,M. (2003). Inverse regulation of the ADAM-family members, decysin and MADDAM/ADAM19 during monocyte differentiation. *Immunology* **110**, 450-457.

Galm,O., Wilop,S., Reichelt,J., Jost,E., Gebbauer,G., Herman,J.G., and Osieka,R. (2004). DNA methylation changes in multiple myeloma. *Leukemia* **18**, 1687-1692.

Geissmann,F., Jung,S., and Littman,D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82.

Gilliet,M. and Liu,Y.J. (2002). Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum. Immunol.* **63**, 1149-1155.

Gonzalez,E.A., Disthabanchong,S., Kowalewski,R., and Martin,K.J. (2002). Mechanisms of the regulation of EGF receptor gene expression by calcitriol and parathyroid hormone in UMR 106-01 cells. *Kidney Int.* **61**, 1627-1634.

Goodman,R.H. and Smolik,S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**, 1553-1577.

Grant,R.S., Passey,R., Matanovic,G., Smythe,G., and Kapoor,V. (1999). Evidence for increased de novo synthesis of NAD in immune-activated RAW264.7 macrophages: a self-protective mechanism? *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 1-7.

Guha,M. and Mackman,N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* **13**, 85-94.

Hacker,C., Kirsch,R.D., Ju,X.S., Hieronymus,T., Gust,T.C., Kuhl,C., Jorgas,T., Kurz,S.M., Rose-John,S., Yokota,Y., and Zenke,M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* **4**, 380-386.

Hannah,S.S. and Norman,A.W. (1994). 1 alpha,25(OH)2 vitamin D3-regulated expression of the eukaryotic genome. *Nutr. Rev.* **52**, 376-382.

- Hines,E.R., Kolek,O.I., Jones,M.D., Serey,S.H., Sirjani,N.B., Kiela,P.R., Jurutka,P.W., Haussler,M.R., Collins,J.F., and Ghishan,F.K. (2004). 1,25-dihydroxyvitamin D3 down-regulation of PHEX gene expression is mediated by apparent repression of a 110 kDa transfactor that binds to a polyadenine element in the promoter. *J. Biol. Chem.* 279, 46406-46414.
- Horlein,A.J., Naar,A.M., Heinzel,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Soderstrom,M., Glass,C.K., and . (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Huang,Y.C., Chen,J.Y., and Hung,W.C. (2004). Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3. *Oncogene* 23, 4856-4861.
- Iho,S., Takahashi,T., Kura,F., Sugiyama,H., and Hoshino,T. (1986). The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on in vitro immunoglobulin production in human B cells. *J Immunol* 136, 4427-4431.
- Im,H.J., Craig,T.A., Pittelkow,M.R., and Kumar,R. (2002). Characterization of a novel hexameric repeat DNA sequence in the promoter of the immediate early gene, IEX-1, that mediates 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-associated IEX-1 gene repression. *Oncogene* 21, 3706-3714.
- Inoue,D., Reid,M., Lum,L., Kratzschmar,J., Weskamp,G., Myung,Y.M., Baron,R., and Blobel,C.P. (1998). Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* 273, 4180-4187.
- Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J., and Wolffe,A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191.
- Kamei,Y., Xu,L., Heinzel,T., Torchia,J., Kurokawa,R., Gloss,B., Lin,S.C., Heyman,R.A., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.
- Kawabata,H., Kawahara,K., Kanekura,T., Araya,N., Daitoku,H., Hatta,M., Miura,N., Fukamizu,A., Kanzaki,T., Maruyama,I., and Nakajima,T. (2002). Possible role of transcriptional coactivator P/CAF and nuclear acetylation in calcium-induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 8099-8105.
- Kitazawa,S., Kajimoto,K., Kondo,T., and Kitazawa,R. (2003). Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J. Cell Biochem.* 89, 771-777.
- Kizaki,M., Norman,A.W., Bishop,J.E., Lin,C.W., Karmakar,A., and Koeffler,H.P. (1991). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor RNA: expression in hematopoietic cells. *Blood* 77, 1238-1247.
- Kreutz,M. and Andreesen,R. (1990). Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 76, 2457-2461.
- Kreutz,M., Andreesen,R., Krause,S.W., Szabo,A., Ritz,E., and Reichel,H. (1993). 1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 82, 1300-1307.

- Kurisaki,T., Wakatsuki,S., and Sehara-Fujisawa,A. (2002). Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. *FEBS Lett.* **532**, 419-422.
- Kurohara,K., Komatsu,K., Kurisaki,T., Masuda,A., Irie,N., Asano,M., Sudo,K., Nabeshima,Y., Iwakura,Y., and Sehara-Fujisawa,A. (2004). Essential roles of Meltrin beta (ADAM19) in heart development. *Dev. Biol.* **267**, 14-28.
- Kurohara,K., Matsuda,Y., Nagabukuro,A., Tsuji,A., Amagasa,T., and Fujisawa-Sehara,A. (2000). Meltrin beta (ADAM19) gene: cloning, mapping, and analysis of the regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 522-527.
- Lemire,J.M. (1995). Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**, 599-602.
- Lofquist,A.K., Mondal,K., Morris,J.S., and Haskill,J.S. (1995). Transcription-independent turnover of I kappa B alpha during monocyte adherence: implications for a translational component regulating I kappa B alpha/MAD-3 mRNA levels. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1737-1746.
- Marmorstein,R. (2001). Structure of histone acetyltransferases. *J. Mol. Biol.* **311**, 433-444.
- Mayer,W., Niveleau,A., Walter,J., Fundele,R., and Haaf,T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501-502.
- McKenna,N.J., Nawaz,Z., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11697-11702.
- Meehan,R.R., Lewis,J.D., McKay,S., Kleiner,E.L., and Bird,A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* **58**, 499-507.
- Merad,M., Manz,M.G., Karsunky,H., Wagers,A., Peters,W., Charo,I., Weissman,I.L., Cyster,J.G., and Engleman,E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* **3**, 1135-1141.
- Meyer,D. and Birchmeier,C. (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**, 386-390.
- Mohamadzadeh,M., Berard,F., Essert,G., Chalouni,C., Pulendran,B., Davoust,J., Bridges,G., Palucka,A.K., and Banchereau,J. (2001). Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **194**, 1013-1020.
- Moss,M.L., Jin,S.L., Milla,M.E., Bickett,D.M., Burkhardt,W., Carter,H.L., Chen,W.J., Clay,W.C., Didsbury,J.R., Hassler,D., Hoffman,C.R., Kost,T.A., Lambert,M.H., Leesnitzer,M.A., McCauley,P., McGeehan,G., Mitchell,J., Moyer,M., Pahel,G., Rocque,W., Overton,L.K., Schoenen,F., Seaton,T., Su,J.L., Becherer,J.D., and et al (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha [published erratum appears in *Nature* 1997 Apr 17;386(6626):738]. *Nature* **385**, 733-736.
- Munster,P.N., Troso-Sandoval,T., Rosen,N., Rifkind,R., Marks,P.A., and Richon,V.M. (2001). The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* **61**, 8492-8497.

- Nakano,K., Mizuno,T., Sowa,Y., Orita,T., Yoshino,T., Okuyama,Y., Fujita,T., Ohtani-Fujita,N., Matsukawa,Y., Tokino,T., Yamagishi,H., Oka,T., Nomura,H., and Sakai,T. (1997). Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J. Biol. Chem.* 272, 22199-22206.
- Nan,X., Ng,H.H., Johnson,C.A., Laherty,C.D., Turner,B.M., Eisenman,R.N., and Bird,A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- North,B.J. and Verdin,E. (2004). Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 5, 224.
- Ogryzko,V.V., Schiltz,R.L., Russanova,V., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Platzer,B., Jorgl,A., Taschner,S., Hocher,B., and Strobl,H. (2004). RelB regulates human dendritic cell subset development by promoting monocyte intermediates. *Blood* 104, 3655-3663.
- Primakoff,P. and Myles,D.G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16, 83-87.
- Qi,H., Rand,M.D., Wu,X., Sestan,N., Wang,W., Rakic,P., Xu,T., and Artavanis-Tsakonas,S. (1999). Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283, 91-94.
- Rachez,C., Gamble,M., Chang,C.P., Atkins,G.B., Lazar,M.A., and Freedman,L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol. Cell Biol.* 20, 2718-2726.
- Randolph,G.J., Inaba,K., Robbiani,D.F., Steinman,R.M., and Muller,W.A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753-761.
- Rao,J., Zhang,F., Donnelly,R.J., Spector,N.L., and Studzinski,G.P. (1998). Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J. Cell Physiol* 175, 121-128.
- Razin,A. and Cedar,H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* 55, 451-458.
- Razin,A. and Riggs,A.D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210, 604-610.
- Reichel,H., Koeffler,H.P., and Norman,A.W. (1987). Synthesis in vitro of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 24,25- dihydroxyvitamin D3 by interferon-gamma-stimulated normal human bone marrow and alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 262, 10931-10937.
- Resendes,K.K. and Rosmarin,A.G. (2004). Sp1 control of gene expression in myeloid cells. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 171-181.
- Saffer,J.D., Jackson,S.P., and Annarella,M.B. (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol. Cell Biol.* 11, 2189-2199.
- Saint-Vis,B., Vincent,J., Vandenabeele,S., Vanbervliet,B., Pin,J.J., Ait-Yahia,S., Patel,S., Mattei,M.G., Banchereau,J., Zurawski,S., Davoust,J., Caux,C., and Lebecque,S. (1998). A

novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity*. 9, 325-336.

Scott,E.W., Simon,M.C., Anastasi,J., and Singh,H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.

Shabahang,M., Buras,R.R., Davoodi,F., Schumaker,L.M., Nauta,R.J., and Evans,S.R. (1993). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor as a marker of human colon carcinoma cell line differentiation and growth inhibition. *Cancer Res.* 53, 3712-3718.

Shivdasani,R.A. (2001). Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* 19, 397-407.

Singal,R. and Ginder,G.D. (1999). DNA methylation. *Blood* 93, 4059-4070.

Sowa,Y., Orita,T., Hiranabe-Minamikawa,S., Nakano,K., Mizuno,T., Nomura,H., and Sakai,T. (1999). Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 886, 195-199.

Starai,V.J., Takahashi,H., Boeke,J.D., and Escalante-Semerena,J.C. (2004). A link between transcription and intermediary metabolism: a role for Sir2 in the control of acetyl-coenzyme A synthetase. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 115-119.

Strobl,H. and Knapp,W. (1999). TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes. Infect.* 1, 1283-1290.

Tangpricha,V., Flanagan,J.N., Whitlatch,L.W., Tseng,C.C., Chen,T.C., Holt,P.R., Lipkin,M.S., and Holick,M.F. (2001). 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase in normal and malignant colon tissue. *Lancet* 357, 1673-1674.

Tate,P.H. and Bird,A.P. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 226-231.

Thomas,R. and Lipsky,P.E. (1994). Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 153, 4016-4028.

Torchia,J., Glass,C., and Rosenfeld,M.G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 373-383.

Treuter,E., Johansson,L., Thomsen,J.S., Warnmark,A., Leers,J., Pelto-Huikko,M., Sjoberg,M., Wright,A.P., Spyrou,G., and Gustafsson,J.A. (1999). Competition between thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) 220 and transcriptional intermediary factor (TIF) 2 for binding to nuclear receptors. Implications for the recruitment of TRAP and p160 coactivator complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 6667-6677.

Tsai,F.Y., Keller,G., Kuo,F.C., Weiss,M., Chen,J., Rosenblatt,M., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tseng,S.Y., Otsuji,M., Gorski,K., Huang,X., Slansky,J.E., Pai,S.I., Shalabi,A., Shin,T., Pardoll,D.M., and Tsuchiya,H. (2001). B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193, 839-846.

- Tsoukas,C.D., Provvedini,D.M., and Manolagas,S.C. (1984). 1,25-dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 224, 1438-1440.
- Vaidyanathan,H., Gentry,J.D., Weatherman,A., Schwartzbach,S.D., and Petro,T.M. (2001). Differential response of the murine IL-12 p35 gene to lipopolysaccharide compared with interferon-gamma and CD40 ligation. *Cytokine* 16, 1-9.
- Valledor,A.F., Borras,F.E., Cullell Young,M., and Celada,A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 63, 405-417.
- Van Lint,C., Emiliani,S., and Verdin,E. (1996). The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr.* 5, 245-253.
- Van Voorhis,W.C., Valinsky,J., Hoffman,E., Luban,J., Hair,L.S., and Steinman,R.M. (1983). Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J. Exp. Med.* 158, 174-191.
- Vissers,J.L., Hartgers,F.C., Lindhout,E., Teunissen,M.B., Figdor,C.G., and Adema,G.J. (2001). Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 69, 785-793.
- Wade,P.A. (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* 10, 693-698.
- Wang,T.T., Nestel,F.P., Bourdeau,V., Nagai,Y., Wang,Q., Liao,J., Tavera-Mendoza,L., Lin,R., Hanrahan,J.H., Mader,S., and White,J.H. (2004). Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J. Immunol.* 173, 2909-2912.
- Wei,P., Zhao,Y.G., Zhuang,L., Ruben,S., and Sang,Q.X. (2001). Expression and enzymatic activity of human disintegrin and metalloproteinase ADAM19/meltrin beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 744-755.
- Weiser,W.Y., Van Niel,A., Clark,S.C., David,J.R., and Remold,H.G. (1987). Recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates intracellular killing of Leishmania donovani by human monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 166, 1436-1446.
- Wiktor-Jedrzejczak,W.W., Ahmed,A., Szczylik,C., and Skelly,R.R. (1982). Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J. Exp. Med.* 156, 1516-1527.
- Wu,L., D'Amico,A., Winkel,K.D., Suter,M., Lo,D., and Shortman,K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 9, 839-847.
- Yokota,T., Matsuzaki,Y., Miyazawa,K., Zindy,F., Roussel,M.F., and Sakai,T. (2004). Histone deacetylase inhibitors activate INK4d gene through Sp1 site in its promoter. *Oncogene* 23, 5340-5349.
- Zehnder,D., Bland,R., Chana,R.S., Wheeler,D.C., Howie,A.J., Williams,M.C., Stewart,P.M., and Hewison,M. (2002). Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) by human endothelial cells is regulated by inflammatory cytokines: a novel autocrine determinant of vascular cell adhesion. *J Am. Soc. Nephrol.* 13, 621-629.

- Zhang,D.E., Hetherington,C.J., Gonzalez,D.A., Chen,H.M., and Tenen,D.G. (1994). Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Immunol.* 153, 3276-3284.
- Zheng,Y., Saftig,P., Hartmann,D., and Blobel,C. (2004). Evaluation of the contribution of different ADAMs to tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) shedding and of the function of the TNF $\alpha$  ectodomain in ensuring selective stimulated shedding by the TNF $\alpha$  convertase (TACE/ADAM17). *J. Biol. Chem.* 279, 42898-42906.
- Zhou,H.M., Weskamp,G., Chesneau,V., Sahin,U., Vortkamp,A., Horiuchi,K., Chiusaroli,R., Hahn,R., Wilkes,D., Fisher,P., Baron,R., Manova,K., Basson,C.T., Hempstead,B., and Blobel,C.P. (2004). Essential role for ADAM19 in cardiovascular morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 24, 96-104.
- Zhou,L.J. and Tedder,T.F. (1996). CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2588-2592.
- Zhu,K., Glaser,R., and Mrowietz,U. (2002). Vitamin D(3) and analogues modulate the expression of CSF-1 and its receptor in human dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 1211-1217.
- Ziegler-Heitbrock,H.W. and Ulevitch,R.J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14, 121-125.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

.....

Achim Ehrnsperger