

Technische Universität München
Physik-Department
Lehrstuhl für Biophysik E22

In vitro Untersuchungen zur Regulation der
humanen CD43- und CD11c-Gene

Jens Martin Teodoridis

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. M. Kleber

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

2. Univ.-Prof. Dr. M. Schleicher

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 24.04.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 11.07.2002 angenommen.

1. Zusammenfassung	3
2. Abkürzungsverzeichnis	5
3. Einleitung	8
3.1. Die Diapedese von Monozyten	8
3.2. Signaltransduktion in Monozyten	9
3.3. CD43	10
3.4. CD11c, eine der α -Untereinheiten der β_2 -Integrine	12
3.5. Aufgabe und Fragestellung.....	15
4. Methoden.....	17
4.1. Herstellung von Zellkernextrakten.....	17
4.2. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	17
4.3. Elektromobilitäts-Shift Experiment (EMSA).....	18
4.4. Verwendete Oligonukleotide.....	19
4.5. Verwendete Plasmid DNS.....	22
4.5. Transformation von E. coli.....	23
4.6. Isolierung von Plasmid DNS.....	24
4.7. Zellkultur.....	24
4.8. Trypan-Blue Anfärbung von Eukaryonten	25
4.9. Transfektion von Eukaryonten	25
4.10. Messung der Luziferase-Aktivität	26
4.11. Messung der β -Galactosidase-Aktivität	26
4.12. Berechnung der Promotoraktivitäten.....	27
5. Ergebnisse	28
5.1. Identifizierung neuer cis-Elemente in den CD43- und CD11-Promotoren	28
5.1.1. Die CD43-Promotorregion (+18/+39) beeinflusst Genaktivitäten	28
5.1.2. PyRo1 und PyRo2 binden an die Region (+18/+39).....	30
5.1.3. Charakterisierung der PyRo1-Erkennungssequenz	33
5.1.4. PyRo1-Bindung beeinflusst die CD43-Promotoraktivität.....	35
5.1.5. PyRo1-Bindungsstellen in den CD11-Promotoren	35
5.1.6. Deletion der PyRo1-Bindungsstelle im CD11c-Promotor	38
5.1.7. Weiterführende Resultate.....	38
5.2. Der Einfluss von Pur α auf die CD43- und CD11c-Promotoren	39
5.2.1. Pur α verringert die CD43-Promotoraktivität	39
5.2.2. Pur α bindet den CD11c-Promotor	42
5.2.3. Die Pur α -Bindungsstelle beeinflusst die CD11c-Promotoraktivität	45
5.2.4. Einfluss der Ca ²⁺ -Konzentration auf die CD11c-Promotoraktivität	47
5.2.5. Pur α kooperiert mit Sp1 während der Differenzierung von U937-Zellen.....	49
5.3. Untersuchung der abnormalen CD11c-Expression in Haarzell-Leukämie	51
5.3.1. Der CD11c-Promotor ist in HZL-Lymphozyten aktiv	51
5.3.2. Suppression des CD11c-Promotors in HZL-Lymphozyten.....	51
5.3.2. Aktivierung des CD11c-Promotors in Jurkat-Zellen.....	53
6. Diskussion der Ergebnisse.....	54
6.1. Mögliche Mechanismen zur Regulation des CD43-Promotors.....	54
6.2. Mögliche Mechanismen zur Regulation des CD11c-Promotors	59
6.3. Vergleich von Pur α mit MS-2.....	63
6.4. Mögliche Ursachen der fehlerhaften CD11c-Expression in HZL	65
7. Ausblick	67
8. Publikationen und eingereichte Manuskripte.....	68
9. Literaturverzeichnis.....	69

1. Zusammenfassung

Eines der Forschungsgebiete der Biophysik ist die interzelluläre Adhäsion. Offensichtlich sind die einzelnen Zellen mehrzelliger Lebewesen in der Lage, aneinander oder an einer Matrix zu haften, um dem Organismus eine Gestalt zu geben und Funktionalitäten zu ermöglichen. Andererseits können komplexe Lebensformen Zellen besitzen, die nicht aneinander haften, z.B. Erythrozyten, die einzeln im Blutstrom treiben und Sauerstoff transportieren. Eine interessante Stellung nehmen Leukozyten ein, da sie auf äußere Signale mit Veränderung ihrer adhäsiven Eigenschaften reagieren können. Bestimmte Zellen des Immunsystems zirkulieren im ruhenden Zustand im Blutstrom, ohne an den Gefäßwänden zu haften, bis sie durch Signale veranlasst werden, die Blutgefäße zu verlassen und im umliegenden Gewebe Aufgaben durchzuführen.

Zu diesen Zellen gehören die Monozyten, eine Untergruppe der mononuklearen Phagozyten, die auf die Vernichtung von körperfremden Antigenen spezialisiert sind und im ruhenden Zustand im Blut zirkulieren. Vorzeitige Haftung an das Endothel wird durch Expression des antiadhäsiven Glykoproteins CD43 (Leukosialin, Sialophorin) auf der monozytischen Membran verhindert. Im Verlauf der Aktivierung durch bakterielle Moleküle oder Entzündungssignale wird der antiadhäsive Charakter von CD43 durch Proteolyse verringert. Gleichzeitig erhöht sich die Expression und Freisetzung des Rezeptors CR4 ($\alpha_x\beta_2$, p(150,95)), der aus den Untereinheiten CD11c und CD18 besteht und an der Adhäsion am Endothel und der extrazellulären Matrix, der Chemotaxe und der Phagozytose beteiligt ist.

CD11c wird normalerweise hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert. Bei der Haarzell-Leukämie (HZL) tritt jedoch eine abnormale, starke CD11c-Expression in Lymphozyten auf, die zur Diagnose der Erkrankung dient.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Mechanismen untersucht, die im Verlauf der monozytischen Aktivierung die Transkription der CD43- und CD11c-Gene beeinflussen. Des Weiteren wurden Ursachen der bei Haarzell-Leukämie (HZL) auftretenden abnormalen konstitutiven Expression von CD11c in Lymphozyten untersucht.

In den Promotoren der humanen CD43- und CD11c-Gene wurden potenziell einzelsträngige *cis*-Elemente und an sie bindende *trans*-Faktoren identifiziert. Hierbei wurde demonstriert, dass diese DNS-Regionen für die Aktivitäten der CD43- und CD11c-Promotoren wichtig sind. Im Verlauf der monozytischen Aktivierung wurde die Bindung eines Einzelstrang-bindenden Faktors, PyRo1, an diese Regionen beobachtet. In weiteren Experimenten wurde Interaktion eines weiteren Einzelstrang-bindenden Proteins, Pur α , mit den CD43- und CD11c-Promotoren nachgewiesen.

Bindung von Pur α an den CD43-Promotor führt zu einer Verringerung seiner Aktivität, während der CD11c-Promotor durch Pur α aktiviert wird. Der Transkriptionsfaktor Pur α scheint somit Teil eines Mechanismus zur gleichzeitigen Verringerung der Antiadhäsion und Erhöhung der Adhäsion im Verlauf der monozytischen Aktivierung darzustellen.

Es handelt sich hierbei um den ersten bekannten Hinweis, dass die CD43- und CD11c-Promotoren das Potential zur Einzelstrangbildung besitzen. Es ist ebenfalls der erste Nachweis, dass die Aktivität des CD43-Promotors im Verlauf der monozytischen Aktivierung sinkt und dass dieser Vorgang durch Pur α gesteuert wird. Die Untersuchung der abnormalen CD11c-Expression in HZL-Lymphozyten ergab, dass sie durch konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors JunD verursacht wird. Es wurde weiter gezeigt, dass das proto-Onkogen Ras die Aktivität des CD11c-Promotors in HZL-Lymphozyten beeinflusst. Da bekannt ist, dass Störungen von JunD und Ras kanzerogen wirken können, lassen sich Transformation und CD11c-Expression in Haarzell-Leukämie als gemeinsame Folge eines Defekts in der Kontrolle des proto-Onkogens Ras auffassen. Diese Ergebnisse können dazu beitragen, die molekularen Ursachen der Haarzell-Leukämie besser zu verstehen und ihre Behandlung zu erleichtern.

2. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ATP	Adenosintriphosphat
β -Gal	β -Galactosidase
CaM	Calmodulin
CD n	Differenzierungscluster n
CD11a-d	Bekannte α -Untereinheiten der β_2 -Integrine
CD18	Gemeinsame β -Untereinheit der β_2 -Integrine
CD43	Leukosialin, Sialophorin
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBP α	C/enhancer binding protein
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
COS	CV1 origin SV40 (transformierte Zelllinie)
CR3	Komplement Rezeptor Typ 3 (CD11b/CD18)
CR4	Komplement Rezeptor Typ 4 (CD11c/CD18)
DAG	Diacylglycerin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Electromobility shift assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERM	Ezrin, Radixin, Moësin
Fc γ R	Fc γ (<i>fragment crystalline</i>)-Rezeptor
g	Erdbeschleunigung ($9,81\text{ms}^{-2}$)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde(n)
HIV	Human immunodeficiency virus
hnRNP-K	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-K
HZL	Haarzell-Leukämie
iC3b	Inaktiviertes Komplement 3b-Fragment
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IP $_3$	Inositol-1,4,5-triphosphat

JCV	JC Virus
JNK	c-jun N-terminal kinase
JNKK	JNK kinase
kDa	1000 Dalton
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPK3	MAPKK kinase
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein 2
MEK	MAPK ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MHC-1	Haupthistokompatibilitätskomplex-1
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS
nAChR β 4	Nicotinic acetylcholine receptor subunit β 4
NIF	Neutrophil inhibiting factor
OD _n	Optische Dichte bei der Wellenlänge n
ONPG	o-Nitrophenylgalactosid
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pRb	Produkt des Retinoblastom-Gens
Pu	Purinbase (A oder G)
Pur α	Purin-rich element binding protein A
Py	Pyrimidinbase (C oder T)
PyRo	Pyrimidine recognition
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RSV	Rous-Sarkom-Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SL	Slipped loop
<i>src</i>	Sarcoma
SV40	Simian Virus 40
T4PNK	T4 Polynukleotidkinase

Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit(s)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
YB-1	Y-box binding protein 1

3. Einleitung

3.1. Die Diapedese von Monozyten

Monozyten sind auf die Vernichtung von körperfremden Antigenen spezialisierte Leukozyten, die im ruhenden Zustand im Blutstrom zirkulieren. Sie werden durch Entzündungssignale oder durch Kontakt zu bakteriellen Molekülen aktiviert, woraufhin sie die Blutgefäße verlassen und in das umliegende Gewebe wandern (Diapedese) (Abb. 3.1.), um dort als sogenannte Makrophagen durch Phagozytose Krankheitserreger zu zerstören [1].

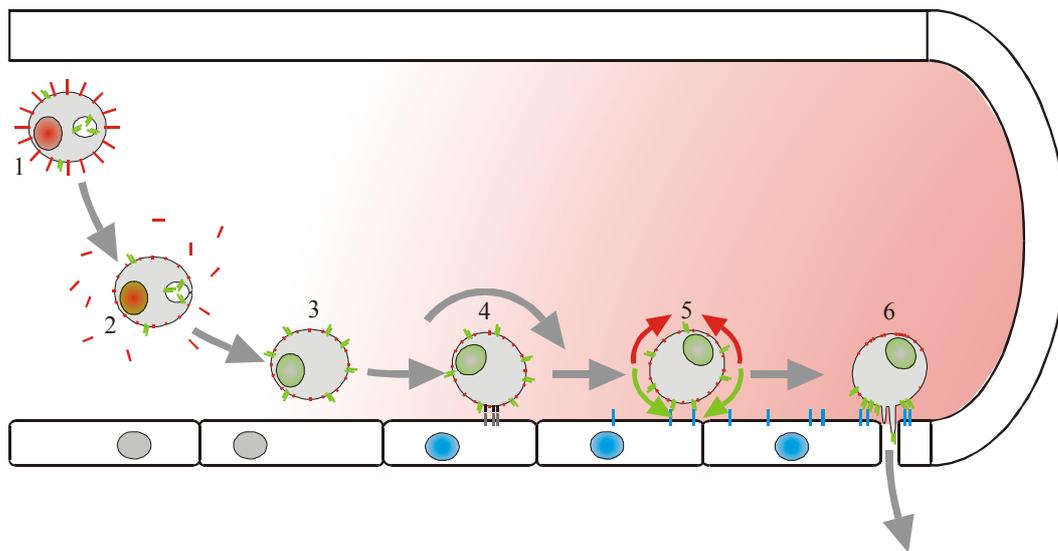


Abb. 3.1.: (1) CD43 (rot) verringert die Adhäsion ruhender Monozyten an das Endothel. (2) Aktivierung führt zu Proteolyse von CD43 sowie Freisetzung und Neubildung von β_2 -Integrinen (grün). Aktivierte, adhäsive Monozyten (3) werden durch Rollen an der Blutgefäßwand (4) verlangsamt. (5) Nach fester Haftung, z.B. an ICAM-1 (blau), erfolgt Umverteilung von CD43 und β_2 -Integrinen und die Monozyte beginnt, das Blutgefäß zu verlassen (6). Nach [1].

Im ersten Schritt kommt es zur Proteolyse des antiadhäsiven Glykoproteins CD43, wodurch sich dessen antiadhäsiver Charakter verringert. Dies ermöglicht einen ersten Kontakt zum Endothel, der von Selektinen und ihren Liganden vermittelt wird. In diesem Stadium rollen die Monozyten an der Gefäßwand (*rolling*) und werden im Blutstrom abgebremst. Als nächstes kommt es zur Bindung von freigesetzten Integrinen auf der Membran der Monozyten an Adhäsionsmoleküle (*intercellular adhesion molecules*, ICAMs) des entzündeten Endothel und zum vollständigen Halt der Immunzellen (*firm adhesion*). Danach beginnt die aktive Wanderung der Monozyten, zu deren Zweck die Zelle durch Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts eine Polarität entwickelt. Hierbei werden proadhäsive Moleküle auf der Kontaktseite,

antiadhäsive Moleküle hingegen auf der entgegengesetzten Seite angereichert. Durch Polymerisation von Filamenten in Wanderungsrichtung und ihrem Abbau auf der rückwärtigen Seite kommt es zu einer gerichteten Bewegung, die der Monozyte das Hindurchzwängen zwischen den Endothelzellen erlaubt.

3.2. Signaltransduktion in Monozyten

Die Aktivierung von Monozyten kann *in vivo* durch verschiedene extrazelluläre Reize, darunter Entzündungssignale oder bakterielle Moleküle, erfolgen (Abb. 3.2.). CD14 bindet Lipopolysaccharide (LPS) und aktiviert Phospholipase C (PLC) [2] sowie *src*-Kinasen [3-5].

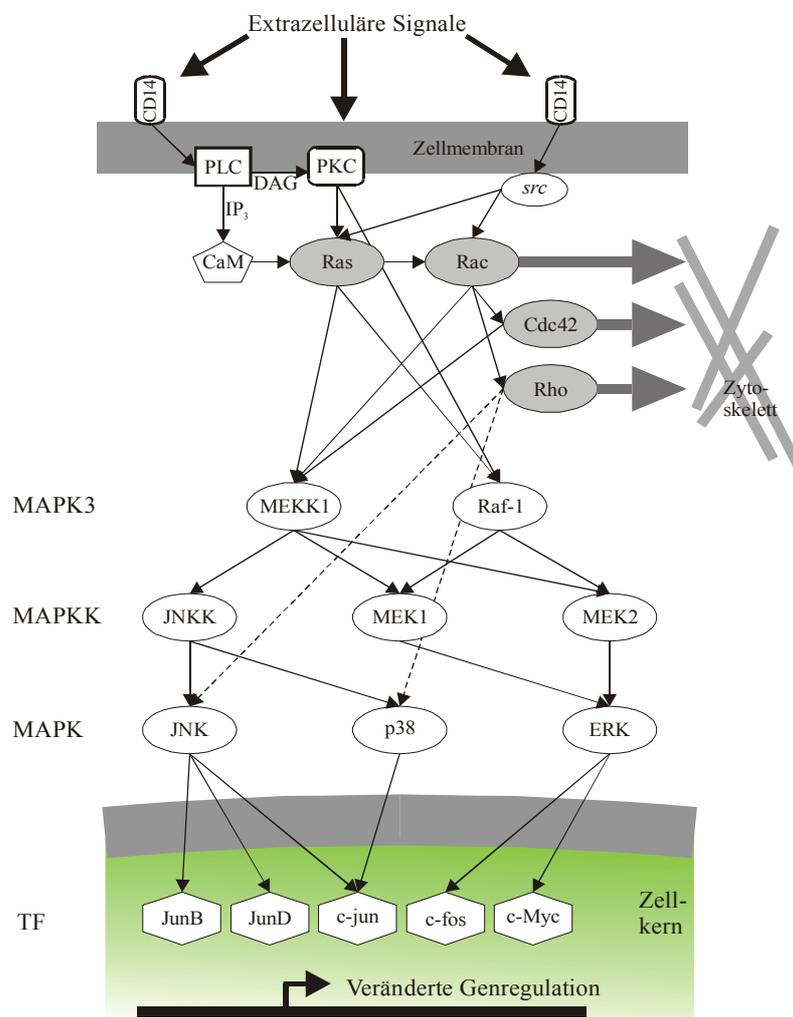


Abb. 3.2.: Extrazelluläre Reize aktivieren Proteinkinase C (PKC), Calmodulin (CaM) und *src*-Kinasen, die über GTPasen (Ras, Rac, Cdc42, Rho), die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalkaskade und Transkriptionsfaktoren (TF) die Aktivitäten von Genen modulieren. Nach [3-10].

PLC hydrolysiert das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ führt zur Freisetzung

von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und damit zur Aktivierung Calmodulin (CaM)-abhängiger Prozesse [11]. DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC), die ebenso wie die *src*-Kinasen das Signal an eine Reihe kleiner GTPasen wie Ras, Rac, Cdc42 und Rho weiterleitet. Diese regulieren Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts und aktivieren eine Kaskade von Proteinkinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK), die letztendlich mehrere Transkriptionsfaktoren im Zellkern regulieren [3-10]. *In vitro* kann PKC durch Zugabe von Phorbolestern wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert werden [12, 13]. Ca^{2+} kann mit Hilfe von Calciumionophoren, z.B. Ionomycin, A23187 [14] oder 4-Br-A23187 [15] aus Calcisomen freigesetzt werden.

3.3. CD43

Die vorzeitige Diapedese ruhender Leukozyten wird durch die Expression des Glykoproteins CD43 (Leukosialin, Sialophorin) (Swissprot#P16150) auf ihrer Oberfläche erschwert. Matures CD43 besteht aus 381 Aminosäuren, von denen 235 die N-terminale extrazelluläre Domäne, 23 eine Transmembranregion, und 123 den zytosolischen C-Terminus bilden [16]. Die extrazelluläre Domäne, die eine stabförmige, 45nm lange Konformation einnimmt [17], besitzt eine N- und 25 O-Glykosylierungsstellen, und erhält durch Übertragung von Kohlenhydratgruppen mit einem hohen Gehalt an N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) auf viele dieser Positionen negative Ladungen [16] (Abb. 3.3.).

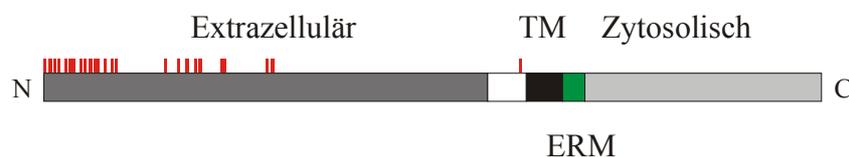


Abb. 3.3.: Humanes CD43. Die Transmembrandomäne (TM) ist schwarz, der proteolytisch abgespaltene N-Terminus der extrazellulären Domäne dunkelgrau, Glykosylierungsstellen sind als rote Striche dargestellt. ERM-Proteine binden mit ihren N-Termini an den grün dargestellten Teil (ERM) des zytosolischen C-Terminus, nach [16-22].

Bedingt durch unterschiedliche Glykosylierung von CD43 schwankt seine scheinbare Größe in verschiedenen Subpopulationen von Leukozyten zwischen 95, 105 und 130kDa. Aufgrund der negativen Ladungen, der stabförmigen Struktur und seiner hohen Konzentration auf der Membran wurde vermutet, dass CD43 die Adhäsion an andere Zellen sterisch und elektrostatisch verhindern kann [23]. *In vivo* ließ sich dieser antiadhäsive Charakter in CD43-defizienten Mäusen zeigen, deren Leukozyten verstärkt am Endothel haften [24].

Im Verlauf der Aktivierung von Leukozyten muss die Abstoßung zur Blutgefäßwand überwunden werden, und es kommt zur proteolytischen Abspaltung einer glykosylierten, etwa 220 Aminosäuren umfassenden Region der extrazellulären CD43-Domäne, welche als „Galaktoglykoprotein“ im Blutserum nachweisbar ist [18, 25, 26]. Aufgrund dieser Modifikation verringert sich der antiadhäsive Charakter der verbleibenden extrazellulären CD43-Domäne auf der leukozytischen Membran und ermöglicht proadhäsiven Rezeptoren wie Selektinen und Integrinen die Bindung an ihre Liganden auf den Endothelzellen.

Obwohl CD43 *in vivo* antiadhäsiv wirkt, sind *in vitro* extrazelluläre Liganden bekannt, die von Lymphozyten exprimiertes CD43 binden. Es handelt sich hierbei um CD54 [27], Galectin-1 [28], MHC-I [29] und Sialoadhesin [30]. Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich vermutlich durch die unterschiedliche Glykosylierung von CD43 in verschiedenen Leukozyten erklären, durch die seine antiadhäsiven Eigenschaften beeinflusst werden [31].

Interessanterweise sind *in vivo* und *in vitro* Fälle bekannt, in denen CD43 von Tumor- und Metastasengewebe [32, 33] bzw. malignen Zelllinien [34] exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung besteht darin, dass die Erkennung CD43-exprimierender Krebszellen durch das Immunsystem erschwert und somit das Tumorwachstum begünstigt wird.

Nachdem Leukozyten an der Blutgefäßwand zum Stillstand gekommen sind, beginnen sie aktiv in das umliegende Gewebe vorzudringen. Den Beginn dieser Wanderung markiert eine Umverteilung pro- und antiadhäsiver Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, wobei CD43 durch Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts am Uropod angereichert wird und dort mit Ezrin, Radixin und Moësin, den ERM-Proteinen, kolokalisiert [35, 36]. *In vitro* bindet CD43 durch nahe der Zellmembran gelegene, positiv geladene Aminosäuren die N-Termini der ERM-Proteine, die wiederum über ihre C-Termini mit Aktinfilamenten verknüpft sind und auf diese Weise eine Verbindung zwischen CD43 und dem Aktin-Zytoskelett darstellen [22, 37]. Die Bindung von ERM-Proteinen an Membranproteine wie CD43 ist durch RhoA regulierbar, das zusammen mit Cdc42 und Rac zu den kleinen GTPasen gehört, die eine zentrale Stellung in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts einnehmen und unter anderem die Ausbildung von Filopodien, Lamellipodien und Stressfasern beeinflussen [38].

Das humane CD43-Gen wurde unabhängig voneinander von zwei verschiedenen Gruppen beschrieben [16, 20]. Sein Promotor besitzt keine konservierten TATA- oder CAAT-Boxen, die für konstitutiv exprimierte Gene typisch sind [16, 20], aber ein Initiator-Element, welches eine schwache basale Expression bewirken kann [39, 40] (Abb. 3.4.). Bindung des Faktors MS-2 an den CD43-Promotor wurde in EMSA-Experimenten nachgewiesen [41]. In Leukozyten wird der Promotor durch Bindung

des ubiquitären Transkriptionsfaktors Sp1 an die G-reiche Sequenz nahe der Position +1 aktiviert [42]. In den Promotor eingeführte Mutationen zeigten, dass besonders die Nukleotide (+9/+10) kritisch für seine Aktivität sind. In anderen Zellen wird die CD43-Expression durch Methylierung einer den Promotor flankierenden Region [43] und anschließende Bindung von *methyl-CpG-binding protein* (MeCP2) unterdrückt [44].

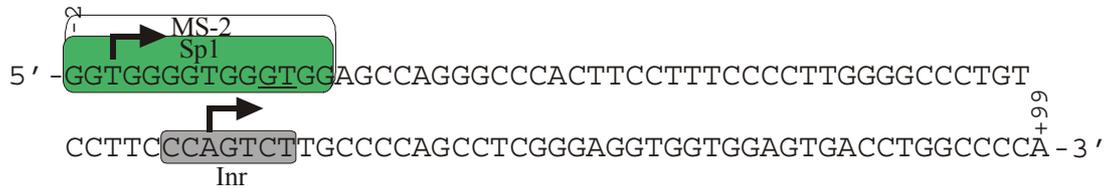


Abb. 3.4.: Die humane CD43-Promotorregion (-2/+99). Die zwei Transkriptionsstarts sind mit Pfeilen markiert, das Initiatorelement (Inr) ist grau hervorgehoben. Die Bindungsstellen für Sp1 (grün) und MS-2 (weiß) sind eingerahmt. Die für die Promotoraktivität kritischen Nukleotide der Sp1-bindenden Sequenz sind unterstrichen. Nach [16, 20, 41, 42].

3.4. CD11c, eine der α -Untereinheiten der β_2 -Integrine

Die bisher bekannten β_2 -Integrine umfassen vier heterodimere Rezeptoren, in denen CD11a [45], CD11b [46], CD11c [47] oder CD11d [48] eine von vier möglichen α - und CD18 [49] die gemeinsame β -Untereinheit darstellt (Tab. 3.1.).

Name	MW	Rezeptor	Extrazelluläre Liganden	Exprimierende Zellen
CD18	95 kDa	β_2 -Integrine	<i>Histoplasma capsulatum</i>	Alle Leukozyten
CD11a	180 kDa	$\alpha_L\beta_2$ LFA-1	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	Alle Leukozyten
CD11b	155 kDa	$\alpha_M\beta_2$ CR3	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, iC3b, Faktor X, Fibrinogen, Heparin, Fc γ RII, Fc γ RIII, NIF, <i>E. coli</i>	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK Zellen
CD11c	150 kDa	$\alpha_X\beta_2$ p(150,95) CR4	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen, Kollagen, LPS	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, NK Zellen, (Bei Haarzell-Leukämie: Lymphozyten)
CD11d	160 kDa	$\alpha_D\beta_2$ CD11d/CD18	ICAM-3, VCAM-1	Monozyten, Makrophagen, Schaumzellen

Tab. 3.1.: Übersicht über die Untereinheiten der β_2 -Integrine, die Zellen, die sie exprimieren, und ihre extrazellulären Liganden [48-71].

CD18 wird von allen Leukozyten exprimiert, die α -Untereinheiten jedoch bevorzugt von bestimmten Subpopulationen, weswegen nur diese funktionsfähige Heterodimere bilden. Im ruhenden Zustand exprimieren Monozyten LFA-1, CR3, CR4 und $\alpha_D\beta_2$ nur in geringem Umfang. Im Verlauf ihrer Aktivierung und anschließenden Differenzierung zu Makrophagen kommt es jedoch zur verstärkten Expression der CD11-Gene und zur Freisetzung der Rezeptoren aus intrazellulären Speichern, wodurch die Konzentration der β_2 -Integrine auf der Zellmembran steigt [72]. Die vier β_2 -Integrine besitzen verschiedene Liganden, die hauptsächlich auf anderen Leukozyten, Endothelzellen, Bakterien und in der extrazellulären Matrix vorkommen (Tab. 3.1.). Durch Bindung an diese Moleküle ermöglichen sie aktivierten Monozyten, an der Blutgefäßwand zu haften, durch das dahinter befindliche Gewebe zu wandern, andere Leukozyten an den Entzündungsherd zu leiten und Krankheitserreger direkt oder nach Markierung durch Antikörper oder Komplement-Proteine (Opsonisierung) zu binden. Deswegen nehmen die β_2 -Integrine eine zentrale Stellung bei Adhäsionsprozessen von Monozyten und Makrophagen ein [1, 72]. Fehlerhafte oder reduzierte Expression der β_2 -Integrine führt zu Störungen des Immunsystems (*leukocyte adhesion deficiency*), die sich in verzögerten Immunreaktionen und einer größeren Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen äußert [72, 73].

Ruhende Monozyten exprimieren weniger CD11c als CD11a oder CD11b, im Verlauf der Aktivierung ändert sich dies und CD11c wird am stärksten exprimiert [74]. CD11c (Swissprot#P20702) ist, wie oben erwähnt, die α -Untereinheit des Rezeptors CR4. Matures CD11c besitzt ein Molekulargewicht von etwa 150kDa und besteht aus 1144 Aminosäuren. Von diesen bilden 1088 die N-terminale extrazelluläre Domäne, 21 die Transmembranregion und 35 den zytosolischen C-Terminus [72]. Die extrazelluläre Region besitzt acht Glykosylierungsstellen, sieben Cystinbrücken und sieben Integrin-Domänen. Diese nehmen eine β -Propeller Struktur ein [75] und besitzen teilweise Ca^{2+} -Bindungsstellen [76] (Abb. 3.5.). Zwischen den Domänen 2 und 3 liegt eine etwa 200 Aminosäuren umfassende globuläre Domäne (I- bzw. A-Domäne) mit einer Bindungsstelle für zweiwertige Metallionen (*metal ion dependent adhesion site*, MIDAS) [77], die an der Bindung der CD11c-Liganden ICAM-1 [65, 66], iC3b [67], Fibrinogen [68, 69], Kollagen [70] und LPS [71] beteiligt ist. Bindungsstudien zeigten, dass manche I-Domänen Zustände hoher oder niedriger Affinität zu Liganden einnehmen können [78]. Umfangreiche Strukturuntersuchungen ergaben, dass I-Domänen in zwei verschiedenen Konformationen (*open* bzw. *closed*) vorliegen [65, 79, 80], obwohl die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse zuerst unklar war [81]. Mittlerweile gelang der Nachweis, dass ein Zusammenhang zwischen Konformation der I-Domäne und ihrer Affinität zu Liganden besteht [82, 83].

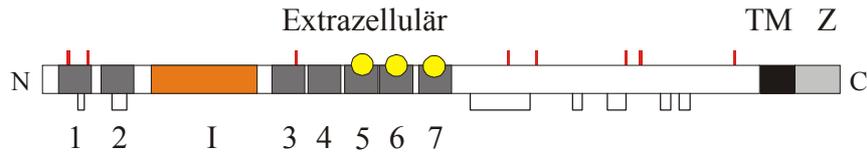


Abb. 3.5.: Humanes CD11c. Die Transmembrandomäne (TM) ist schwarz, der zytosolische C-Terminus (Z) hellgrau dargestellt. Die sieben Integrin-Domänen (1-7) sind dunkelgrau, Ca^{2+} -Bindungsstellen mit gelben Kreisen, die I-Domäne (I) ist orange markiert. Glykosylierungsstellen sind als rote Striche dargestellt, Cystinbrücken schwarz. Nach [72, 75, 76].

CD11c wird normalerweise hauptsächlich von myeloiden Zellen exprimiert. Bei der Haarzell-Leukämie (HZL) tritt jedoch eine abnormale, starke CD11c-Expression in Lymphozyten auf, die zur Diagnose der Erkrankung dient [84]. HZL-Lymphozyten besitzen außerdem aufgrund von Veränderungen ihres Zytoskeletts viele Filopodien und Lamellipodien, die zu einer morphologischen Ähnlichkeit mit Makrophagen führen [85, 86].

Der Promotor des humanen CD11c-Gens besitzt mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die seine Aktivität regulieren (Abb. 3.6.). c-jun/JunB enthaltendes AP-1 bindet in ruhenden Monozyten in geringem Umfang an die Position (-60/-54), im Verlauf der Aktivierung wurde starke Bindung der AP-1 Dimere c-fos/c-jun, Fra-1/c-jun und c-jun/JunB an den CD11c-Promotor beobachtet [87]. Der Promotor besitzt eine weitere AP-1-Bindungsstelle (-50/-44), die mit der ersten kooperiert [88]. In der monozytischen Zelllinie HL60 wurde Bindung eines noch nicht identifizierten Ets-Faktors an die Sequenz (-42/-35) beobachtet [88]. Diese Bindungsstelle ist notwendig für die volle Aktivität der AP-1-Bindungssequenz um Position -60. In der Nähe des Transkriptionsstarts befindet sich eine weitere Ets-Bindungsstelle, an die in der monozytischen Zelllinie THP-1 PU.1 bindet und als negativer Regulator des CD11c-Promotors fungiert [89]. In der promonozytischen Zelllinie U937 binden zusätzlich GABP-Proteine an diese Bindungsstelle. Insgesamt fünf Bindungsstellen für Sp1 wurden *in vivo* und *in vitro* identifiziert [90, 91]. Obwohl Sp1 ubiquitär ist, wurde seine Bindung an diese Stellen nur in aktivierten Monozyten beobachtet. Von den vier ursprünglich identifizierten Sp1-Bindungsstellen *a-d* bewirkt Deletion der Stelle *c* die größte Verringerung der Promotoraktivität [91]. Später wurde gezeigt, dass die Sp1-Bindungsstellen *a-d* in aktivierten Monozyten ebenfalls mit Sp3 interagieren [92]. Beide Transkriptionsfaktoren kooperieren bei der Aktivierung des CD11c-Promotors mit c-jun [91, 92]. Um Position -85 wurde Bindung von c-Myb festgestellt, allerdings führte die Mutation der Bindungsstelle zu keiner Veränderung des CD11c-Promotors in differenzierenden Monozyten [93]. Diese Bindungsstelle überlappt teilweise mit einer Bindungsstelle für C/EBP-Proteine

[94]. In ruhenden Monozyten bindet C/EBP α , im Verlauf der Aktivierung wurde zusätzlich Bindung von C/EBP β nachgewiesen. Die C/EBP-Proteine aktivieren den Promotor und kooperieren hierbei mit Sp1.

In einer Studie wurde über Bindung von Oct-2 an den Promotor in aktivierten Monozyten berichtet [95]. Mutation dieser Bindungsstelle führte zu einer erhöhten CD11c-Promotoraktivität. In verschiedenen, nicht-myeloiden Zelllinien führte Überexpression von c-Myc zu einer Verringerung der CD11c-Promotoraktivität [96]. Für diesen Effekt war die intakte AP-1-Bindungsstelle um Position -60 notwendig.

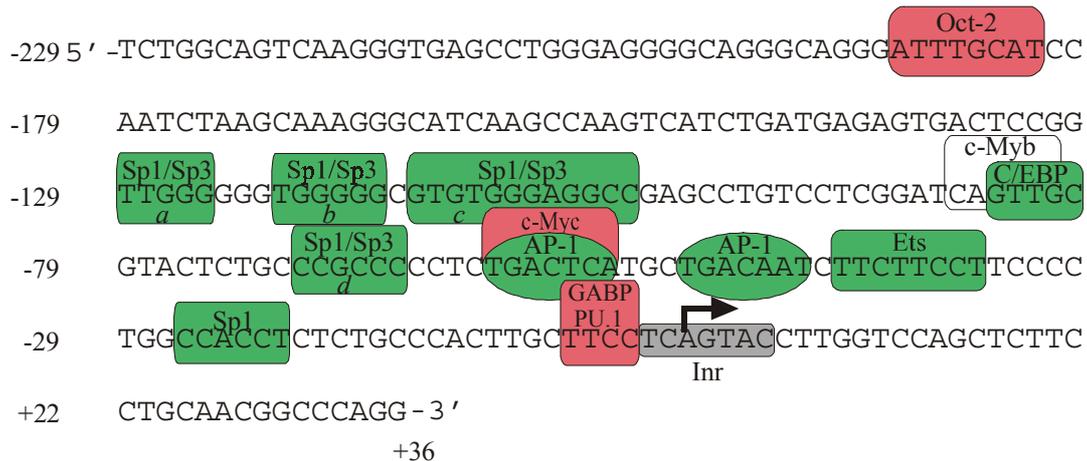


Abb. 3.6.: Die humane CD11c-Promotorregion (-229/+36). Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil markiert, das Initiatorelement (Inr) grau eingrahmt und die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind grün (aktivierend), rot (supprimierend) oder weiß (unbekannter Effekt) dargestellt. Nach [87-98].

3.5. Aufgabe und Fragestellung

CD11c als Stellvertreter der β_2 -Integrine und CD43 können als Antagonisten in Bezug auf Adhäsion/Antiadhäsion betrachtet werden. Im Verlauf der monozytischen Aktivierung findet Regulation von CD11c unter anderem auf Ebene der Transkription statt. Im Gegensatz dazu beruhen die bekannten Mechanismen zur Regulation von CD43 im Verlauf der monozytischen Aktivierung auf posttranslationalen Modifikationen. Eventuell vorhandene Mechanismen auf Ebene der Transkription sind nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten *in vitro* neue *cis*-Elemente in den CD11c- und CD43-Promotoren, daran bindende *trans*-Faktoren und ihr Einfluss auf die Promotoraktivität charakterisiert werden. Der Schwerpunkt wurde hierbei auf Faktoren gelegt, die beide Promotoren im Verlauf der monozytischen Aktivierung beeinflussen und ihre koordinierte Regulation ermöglichen.

Des Weiteren sollten die Ursachen für die abnormale Expression von CD11c in Haarzell-Leukämie (HZL) untersucht werden. Da für diese Erkrankung eine erhöhte CD11c-Expression charakteristisch ist, können Kenntnisse der hierfür

verantwortlichen Mechanismen dazu beitragen, die molekularen Grundlagen der Haarzell-Leukämie besser zu verstehen.

4. Methoden

4.1. Herstellung von Zellkernextrakten

Die Herstellung von Zellkernextrakten dient der Gewinnung von Proteinen aus Zellkernen. Zu ihrer Isolation wurden etwa $250 \cdot 10^6$ Zellen bei $1800 \cdot g$ abzentrifugiert, dreimal mit je 15ml eiskaltem 1xPBS (120mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 pH7,2) gewaschen und durch Resuspension in 4ml eiskaltem Puffer 1 (10mM NaCl, 0,4M Saccharose, 10mM Tris.HCl pH7,8, 0,2mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,5% NP-40) aufgeschlossen. Puffer 1-4 enthielten zusätzlich 0,5mM PMSF 1mg/ml Pepstatin, 1mg/ml Leupeptin, 50mg/ml Antipain und 1mg/ml Aprotinin (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Nach 30min Inkubation auf Eis wurden 4ml Puffer 2 (10mM NaCl, 1,5M Saccharose, 10mM Tris.HCl pH7,8, 0,2mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT) mit der Suspension überschichtet. Nach Zentrifugation mit $20000 \cdot g$ für 20min bei 4°C verblieben zytosolische Bestandteile im Überstand, während die dichteren Zellkerne ein Pellet bildeten, das anschließend mit 4ml eiskaltem Puffer 3 (10mM NaCl, 0,4M Saccharose, 10mM Tris.HCl pH7,8, 0,2mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT) gewaschen und zu einer Konzentration von $3 \cdot 10^7$ Zellkerne/100 μl in eiskaltem Puffer 4 (20mM Tris.HCl pH7,8, 300mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,5mM DTT, 25% Glycerin) resuspendiert wurde. Nach Inkubation auf Eis für 60min wurde über Nacht bei 4°C gegen Puffer 4 dialysiert. Ungelöste Partikel wurden durch Zentrifugation mit $16000 \cdot g$ bei 4°C für 10min entfernt, der den Zellkernextrakt enthaltende Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Protein-Konzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode [99] bestimmt.

4.2. Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

DNS-Fragmente lassen sich durch Übertragung einer radioaktiven Phosphatgruppe von der γ -Position eines ATP-Moleküls auf das 5'-Ende eines DNS-Strangs durch das Enzym T4 Polynukleotidkinase (T4PNK) radioaktiv markieren [100]. Zu diesem Zweck wurden 20ng eines Oligonukleotids (Genosys, The Woodlands, TX) für 2h mit 25 μCi γ - ^{32}P -ATP (New England Nuclear, Boston, MA) und 20U T4PNK (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) in 1xPNK-Puffer (50mM Tris.HCl, 10mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 50mM DTT, 1mM Spermidin, pH8,2) in einem Gesamtvolumen von 40 μl bei 37°C inkubiert. Nach Beenden der Markierungsreaktion wurde noch vorhandenes γ - ^{32}P -ATP durch Ausschlusschromatographie unter Verwendung von Sephadex G-25 Säulen (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) gemäß Herstellerangaben entfernt. Hierzu wurde zuerst überschüssiger Säulenpuffer durch Zentrifugation für 5min bei 4°C und $1500 \cdot g$ entfernt. Anschließend wurde der

Markierungsansatz auf die Säule aufgetragen und durch erneute Zentrifugation bei den gleichen Bedingungen in ein Reaktionsgefäß eluiert.

4.3. Elektromobilitäts-Shift Experiment (EMSA)

Durch EMSA-Experimente lassen sich *in vitro* Interaktionen zwischen DNS und Proteinen oder anderen Faktoren nachweisen [101]. Inkubation radioaktiv markierter DNS mit Zellkernextrakten ermöglicht die Bildung von Komplexen, die bei anschließender Trennung auf einem Polyacrylamidgel langsamer wandern. Der Nachweis bestimmter Proteine in dem DNS-enthaltenden Komplex gelingt in sogenannten „Supershift“-Experimenten durch Zugabe eines Antikörpers, wodurch sich ein noch langsamer wanderndes Addukt bilden kann. Bei „Kompetitionsexperimenten“ zur Identifizierung der für die Bindung eines Faktors notwendigen Nukleotide wird nicht-radioaktive DNS im Überschuss zugegeben. Falls diese denselben Faktor bindet, beeinträchtigt sie die Bildung eines Komplexes zwischen radioaktiver Probe und DNS-bindendem Faktor und führt zum Verschwinden des langsamer wandernden radioaktiv markierten Komplexes.

Doppelsträngige, radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden durch Erhitzen komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide bei 90°C für 5min in 100mM NaCl und langsames Abkühlen auf 4°C hergestellt.

In einem Gesamtvolumen von 20µl wurden 1,3µg Zellkernextrakt bei 0°C 15min in 1xEMSA-Puffer (70mM KCl, 5mM NaCl, 20mM Tris.HCl pH7,5, 0,5mM EDTA, 1mM DTT, 10% (v/v) Glycerin) und in Gegenwart von 2,4µg poly(dIdC:dIdC) (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) inkubiert. Bei Kompetitionsexperimenten wurde zu der Bindungsreaktion ein 50- bis 400-facher molarer Überschuss an nichtmarkiertem Oligonukleotid zugegeben. Nach Zugabe von 0,3ng radioaktiv markiertem Oligonukleotid wurde die Lösung für weitere 30min bei 0°C inkubiert. Im Falle der „Supershift“ Experimente wurde die Bindungsreaktion in Gegenwart von 1µl Antikörperlösung entweder 9C12 (monoklonal, gegen Purα gerichtet) [102] (freundlicherweise von Dr. E. Johnson, Mount Sinai School of Medicine, New York, zur Verfügung gestellt) oder Egr-1 (polyklonal, gegen Egr-1 gerichtet) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durchgeführt. DNS-Protein-Komplexe wurden auf einem 6% Polyacrylamid-Gel in 0,5xTBE (44,5mM Tris, 44,5mM Borsäure, 1mM EDTA pH8,5) bei 180V und 4°C aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Hierzu wurde ein medizinischer Röntgenfilm (Eastman Kodak, Rochester, NY) über Nacht bei -80°C durch das zuvor getrocknete Gel belichtet.

4.4. Verwendete Oligonukleotide

CD11aGAGA:	5' -GCACACCTCCCTCCCCGCCTG-3' 3' -CGTGTGGAGGGAGGGGCGGAC-5'
CD11aLYM:	5' -TTTTGGATGATGTGAAAATGCAAG-3' 3' -AAAACCTACTACACTTTTACGTTC-5'
CD11aPyRoSS:	5' -CAAATCCCACGGGCCTCCTGACG-3'
CD11bPyRoASS:	5' -GCCTGCCCACCCTTCCTCCCCAGCTT-3'
CD11cEts:	5' -CACTTGCTTCCTCAGTACC-3' 3' -GTGAACGAAGGAGTCATGG-5'
CD11cP2:	5' -GTGTGGGAGGCCGAGC-3'
CD11cP3:	5' -GAGGGGGCGGGCAGAGT-3'
CD11cP4:	5' -AGAGAGGTGGCCAGGG-3'
CD11cPMt:	5' -ATTTTAATTAATA-3'
CD11cPWt:	5' -AGGGGAAGGAAGA-3'
CD11cPWt-R:	5' -TCTTCCTTCCCCT-3'
CD11cPyRo:	5' -TGGGGGGTGGGGGCGTGTG-3' 3' -ACCCCCACCCCCGCACAC-5'
CD11cPyRoASS:	5' -CACACGCCCCACCCCCA-3'
CD11cPyRoSS:	5' -TGGGGGGTGGGGGCGTGTG-3'
CD11cSp:	5' -CGTGTGGGAGGCCGAGCCT-3' 3' -GCACACCCTCCGGCTCGGA-5'
CD11dPyRoSS:	5' -TCCTACCCACTGTGCCCTCCTC-3'

CD18BoxA: 5' -CACCACTTCCTCCAAGGAG-3'
 3' -GTGGTGAAGGAGGTTCCCTC-5'

CD43PUR-1: 5' -GGTGGGGTGGGTGGAGCCA-3'
 3' -CCACCCACCCACCTCGGTCCC-5'

CD43PUR-2: 5' -GGTGGGGTGGGTGGAGCCA-3'

CD43PyRo: 5' -GGGCCCACTTCCTTTCCCCTTG-3'
 3' -GGGTGAAGGAAAGGGGAAC-5'

CD43PyRoASS: 5' -CAAGGGGAAAGGAAGTGGGCC-3'

CD43PyRoSS: 5' -GGGCCCACTTCCTTTCCCCTTG-3'

CD43Mut-01: 5' -GGGGGGTGTTCCTTTCCCCTTG-3'

CD43Mut-02: 5' -GGGCCACAAGGAATCCCCTTG-3'

CD43Mut-03: 5' -GGGCCCACTTCCTTAGGGGATG-3'

CD43Mut-04: 5' -GGGGGGTGAAGGAATCCCCTTG-3'

CD43Mut-05: 5' -GGGCCACAAGGAAAGGGGATG-3'

CD43Mut-06: 5' -GGGGGGTGTTCCTTAGGGGATG-3'

CD43Mut-07: 5' -GGGGGGTGAAGGAAAGGGGATG-3'

CD43Mut-08: 5' -GGGCCCACTTCCTTCTTTTCTG-3'

CD43Mut-09: 5' -GGGCCCACTTCCTTCTAATCTG-3'

CD43Mut-10: 5' -GGGCCCACTTCCTTCATTACTG-3'

CD43Mut-11: 5' -GGGCCCACTTCCTTCATATATG-3'

Consensus AP-1: 5' -CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3'
 3' -GATCACTACTCAGTCGGCCTAG-5'

Consensus AP-2: 5' -GATCGAACTGACCGCCCGCGGCCCGT- 3'
 3' -CTAGCTTGACTGGCGGGCGCCGGGCA- 5'

Consensus AP-3: 5' -CTAGTGGGACTTTCCACAGATC- 3'
 3' -GATCACCCCTGAAAGGTGTCTAG- 5'

Consensus CREB: 5' -GATTGGCTGACGTCAGAGAGCT- 3'
 3' -CTAACCGACTGCAGTCTCTCGA- 5'

Consensus GRE: 5' -GATCAGAACACAGTGTTCTCTA- 3'
 3' -CTAGTCTTGTGTCACAAGAGAT- 5'

Consensus NF-1: 5' -ATTTTGGCTTGAAGCCAATATG- 3'
 3' -TAAAACCGAACTTCGGTTATAC- 5'

Consensus NF-κB: 5' -GATCGAGGGGACTTTCCCTAGC- 3'
 3' -CTAGCTCCCCTGAAAGGGATCG- 5'

Consensus Oct-1: 5' -GATCGAATGCAAATCACTAGCT- 3'
 3' -CTAGCTTACGTTTAGTGATCGA- 5'

Consensus Sp1: 5' -GATCGATCGGGCGGGGCGATC- 3'
 3' -CTAGCTAGCCCCGCCCCGCTAG- 5'

GC-Rep: 5' -GGCTGGATGTGGTGGCTCAC- 3'

MHC PU.1: 5' -GATCCGTCCCAAGTGAGGAACCAATCAGCATTG- 3'
 3' -CTAGGCAGGGTTCACCTCCTTGGTTAGTCGTAAC- 5'

NS: 5' -GAGTTAGCTCACTCATTAGG- 3'

NS-1: 5' -TATTAATTAAAAT- 3'

SV40 PU.1: 5' -CCTCTGAAAGAGGAACTTGGT- 3'
 3' -GGAGACTTTCTCCTTGAACCA- 5'

4.5. Verwendete Plasmid DNS

Auf dem promotorlosen Luziferase-Reporterplasmid **pATLuc** [41] basieren die Luziferase-Reporterplasmide **p11Wt**, **p11ΔP**, **p11ΔPur**, **p43Wt**, **p43ΔP** und **p43μP**. In p11Wt bzw. p11ΔP steht das Luziferase-Gen unter Kontrolle der CD11c-Promotorregion (-128/+36) bzw. (-117/+36) [103]. In p11ΔPur [104] wurden im Promotor (-128/+36) auf dem *antisense*-Strang die Nukleotide 5'-GGGGAAGGAAG-3' der (-30/-40)-Region zu 5'-TTTAAATTAAT-3' mutiert (Abb. 4.1.).

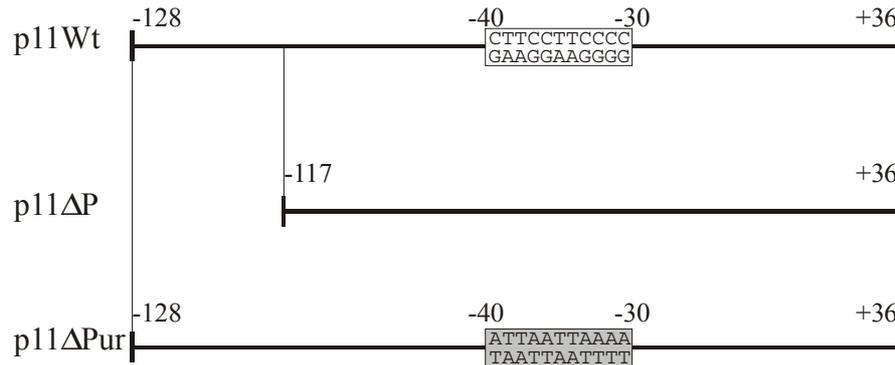


Abb. 4.1.: Darstellung der CD11c-Promotoren in p11Wt, p11ΔP und p11ΔPur.

Im Reporterplasmid p43Wt steht das Luziferase-Gen unter Kontrolle des CD43-Promotors (-2/+99). p43ΔP wurde durch Deletion der Promotorregion (+18/+39) aus p43Wt erzeugt. In p43μP wurde die Sequenz 5'-TCCCCT-3' in der (+18/+39)-Region des CD43-Promotors (-2/+99) durch 5'-CATATA-3' ersetzt [103] (Abb. 4.2.).

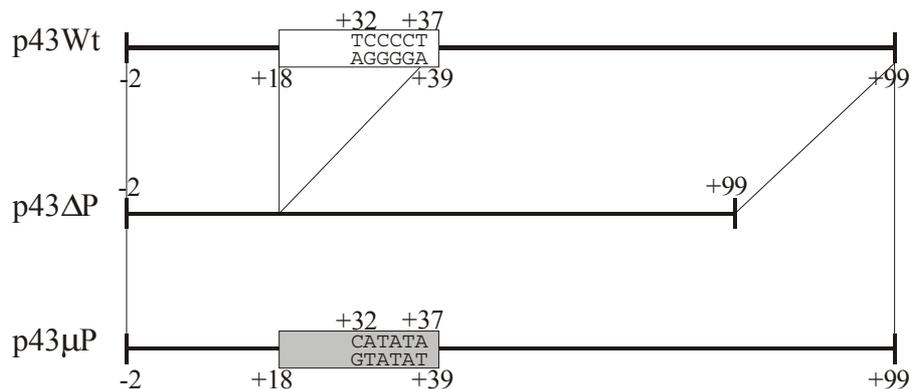


Abb. 4.2.: Darstellung der CD43-Promotor-Konstrukte in p43Wt, p43ΔP und p43μP.

Das Luziferase-Reporterplasmid **pGL3-Promoter** (Promega, Madison, WI) enthält ein Luziferase-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors. Das Luziferase-Reporterplasmid **pGL3-HYP** basiert auf dem Plasmid pGL3-Promoter und enthält

zusätzlich *upstream* des SV40-Promotors ein Tetramer der Region (+18/+39) des CD43-Promotors [103] (Abb. 4.3.).

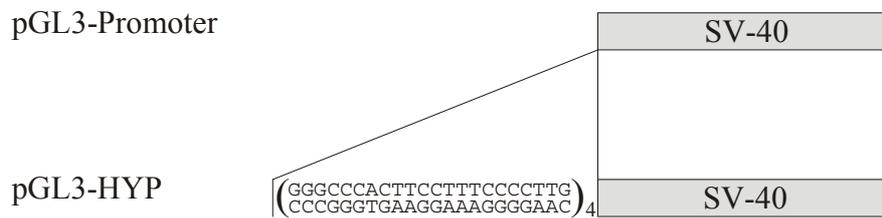


Abb. 4.3.: Darstellung der Promotor-Konstrukte in pGL3-Promoter und pGL3-HYP.

Das Pur α -Expressionsplasmid **pHAPur1**, in dem die Pur α -cDNS unter Kontrolle des CMV-Promotors steht, wurde freundlicherweise von Dr. E. Johnson (Mount Sinai School of Medicine, New York) zur Verfügung gestellt. Das entsprechende Kontrollplasmid **pHA** wurde durch Entfernen der Pur α -cDNS aus pHAPur1 hergestellt [105].

Das Sp1-Expressionsplasmid **pCMV-Sp** enthält die Sp1-cDNS unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das entsprechende Kontrollplasmid **pCMV Δ -Sp** wurde durch Entfernen der Sp1-cDNS aus pCMV-Sp erhalten [104].

Auf dem den CMV-Promotor enthaltenden, „leeren“ Kontrollplasmid **pCMV** beruhen die Expressionsplasmide **RasN17**, **RasV12** und **TAM67**. pCMV und TAM67 wurden freundlicherweise von Dr. M. Birrer (National Institutes of Health, Rockville, MD) zur Verfügung gestellt. RasN17 und RasV12 wurden freundlicherweise von Dr. J. Kyriakis (Harvard Medical School, Boston, MA) zur Verfügung gestellt.

Im JunD-Expressionsplasmid **pRSV-hjD** steht die JunD-cDNS unter Kontrolle des RSV-Promotors. pRSV-hjD und das entsprechende, „leere“ Kontrollplasmid **pRSV** wurden freundlicherweise von Dr. Y. Shaul (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt.

Das β -Galactosidase-Expressionsplasmid **pRSV β** enthält ein β -Galactosidase-Gen unter Kontrolle des RSV-Promotors (Promega, Madison, WI).

4.5. Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot des transformationskompetenten *E. coli* Bakterienstammes XL-2 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) wurde auf Eis aufgetaut. 20 μ l der Bakteriensuspension wurden in ein 15ml Zentrifugationsröhrchen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) gegeben und nach Zugabe von 0,3 μ l 1,44M β -Mercaptoethanol für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von ca. 50ng DNS wurde die Suspension für weitere 30min auf Eis inkubiert. Das Zentrifugationsröhrchen wurde für 30sec in ein 42°C

warmes Wasserbad getaucht („Hitzeschock“) und anschließend 2min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 400µl LB-Medium (1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) wurden die Bakterien 1h in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. 100µl der Suspension wurden auf LB-Agarplatten (1,5% (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium) mit dem korrekten Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6. Isolierung von Plasmid DNS

Plasmid DNS aus dem Bakterienstamm XL-2 Blue wurde mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA) isoliert. 500ml LB-Medium (1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) mit dem korrekten Antibiotikum wurden mit Bakterien angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation mit 4500*g bei 4°C pelletiert, in 10ml Puffer P1 (50mM Tris.HCl, 10mM EDTA, pH8,0, 100µg/ml RNase A) resuspendiert und durch Zugabe von 10ml Puffer P2 (200mM NaOH, 1%SDS) und Inkubation für 5min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Neutralisation durch Zugabe von 10ml Puffer P3 (3M KAc, pH5,5) und Inkubation bei Raumtemperatur für 5min wurden ungelöste Bakterienbestandteile durch Zentrifugation mit 12000*g bei 4°C für 15min entfernt. Der Überstand, in dem sich die Plasmid DNS befand, wurde auf eine Anionenaustauschsäule, die zuvor mit 10ml Puffer QBT (750mM NaCl, 50mM MOPS, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100, pH7,0) äquilibriert worden war, geladen. An die Säule gebundene Plasmid DNS wurde zweimal mit je 30ml Puffer QC (1M NaCl, 50mM MOPS, 15% Isopropanol, pH7,0) gewaschen und bei höherem pH mit 15ml Puffer QF (1,25M NaCl, 50mM Tris.HCl, 15% Isopropanol, pH8,5) eluiert. Endotoxine (Lipopolysaccharide) wurden durch Zugabe von 15ml Phenol (GIBCO BRL, Rockville, MD) und 30sec vortexen aus der wässrigen Phase entfernt. Die organische Phase wurde verworfen, die wässrige Phase wurde dreimal mit je 15ml Diethylether (Fisher Scientific, Springfield, NJ) gewaschen. Plasmid DNS wurde durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol präzipitiert, zweimal mit je 4ml Ethanol gewaschen und *in vacuo* getrocknet. Die Konzentration der Plasmid DNS wurde nach Resuspension in TE (50mM Tris.HCl, 1mM EDTA, pH7,5) durch Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD₂₆₀) bestimmt, wobei zugrunde gelegt wurde, dass 50µg doppelsträngige DNS eine OD₂₆₀ von 1 besitzen.

4.7. Zellkultur

Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in Gegenwart der Antibiotika Penicillin G (100U/ml) und Streptomycin (50mg/ml) bei 37°C in 5% CO₂ gezüchtet.

Die Zelllinien Mo (ATCC# CRL-8066, HZL-Lymphozyten), CEM (#CCL-119, T-Lymphoblasten), Jurkat (#TIB-152, T-Lymphozyten), K562 (#CCL-243, Proerythro-/Promegakaryozyten), U937 (#CRL-1593.2, Promonozyten) wurden gemäß den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC) kultiviert. Die Zelllinien EH und HK (HZL-Lymphozyten) wurden freundlicherweise von Dr. G. B. Faguet (Veterans Administration Medical Center, Augusta, GA) zur Verfügung gestellt und in α -MEM (GIBCO BRL, Rockville, MD) mit 2mM Glutamin (GIBCO BRL, Rockville, MD), 15% fetales Kälberserum (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA), 5,5 μ M 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO) gezüchtet.

4.8. Trypan-Blue Anfärbung von Eukaryonten

Die Anfärbung von Eukaryonten mit dem blauen Farbstoff Trypan-Blue dient der Unterscheidung toter und lebender Zellen. Trypan-Blue dringt aufgrund seiner Größe und Ladung nicht in lebende Zellen ein, weswegen diese farblos bleiben. Die Zellmembran toter oder sterbender Zellen hingegen wird für den Farbstoff durchlässig, der diese Zellen blau färbt [106]. 500 μ l der Zellsuspension und 100 μ l 0,4%Trypan-Blue Lösung (GIBCO BRL, Rockville, MD) wurden gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Anteil toter Zellen mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt.

4.9. Transfektion von Eukaryonten

40*10⁶ Zellen wurden durch Zentrifugation mit 1800*g für 5min bei Raumtemperatur pelletiert und zweimal mit je 35ml unsupplementiertem Medium gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 400 μ l unsupplementiertem Medium resuspendiert und in eine Elektroporationskuvette mit 4mm Spaltweite (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) gefüllt. 25 μ g DNS in 25 μ l TE (50mM Tris.HCl, 1mM EDTA, pH7,5) wurde zu den Zellen gegeben und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit ihnen vermischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5min wurden die Zellen in einem Gene-Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) bei 960 μ F und der optimalen Spannung elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden in der Elektroporationskuvette für weitere 5min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in 30ml supplementiertem Medium resuspendiert und bei 37°C in 5%CO₂ inkubiert. Wo angegeben, wurden die Zellen durch Addition von 100ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Sigma, St. Louis, MO) aktiviert.

Transfektionsbedingungen:

Zelllinie	EH, HK	K562, U937	CEM, Jurkat, Mo
Spannung [V]	250	280	300

DNS-Zusammensetzung:

Experiment	Promotor-Aktivität	Transaktivierung (ein Transaktivator)	Transaktivierung (zwei Transaktivatoren)
Luziferase-Reporterplasmid	23µg	8µg	8µg
Transaktivator 1	---	16µg	8µg
Transaktivator 2	---	---	8µg
pRSVβ	2µg	1µg	1µg

16h nach der Transfektion wurden die Zellen pelletiert und zweimal mit je 15ml und einmal mit 1ml eiskaltem 1xPBS (120mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ pH7,2) gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 200µl „1xLysis Buffer“ (Promega, Madison, WI) resuspendiert und durch Inkubation für 15min bei Raumtemperatur lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation mit 16000*g bei 4°C für 2min pelletiert, der Überstand wurde für die Messung der β-Galactosidase- und der Luziferase-Aktivitäten verwendet.

4.10. Messung der Luziferase-Aktivität

Die von Luziferase katalysierte Oxidation von Luziferin zu Oxoluziferin verläuft unter Lichtemission [107]. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 100µl des Überstandes mit 600µl „Luziferase Assay Substrat Buffer“ (Promega, Madison, WI) in einer Luminometer Kuvette (Pharmingen, San Diego, CA) gemischt und die über 30sec gemittelte Lichtemission in einem Monolight 2010 Luminometer (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA) gemessen.

4.11. Messung der β-Galactosidase-Aktivität

Bei der Hydrolyse des farblosen o-Nitrophenylgalactosid (ONPG) durch β-Galactosidase entsteht gelbes o-Nitrophenol [108]. Zur Bestimmung der β-Galactosidase-Aktivität wurden 50µl des Überstandes mit demselben Volumen 2xβ-Gal Puffer (200mM Na₂HPO₄ pH7,3, 2mM MgCl₂, 100mM β-Mercaptoethanol, 1,33mg/ml ONPG) bei 37°C inkubiert. Nach Gelbfärbung der Lösung wurde die Reaktion durch Zugabe von 300µl 1M Na₂CO₃ gestoppt. Die Gelbfärbung wurde

durch Messung der OD₄₂₀ in einem BECKMAN DU640 Spektrophotometer (Beckman, Fullerton, CA) quantifiziert.

4.12. Berechnung der Promotoraktivitäten

Promotoraktivitäten wurden anhand der gemessenen Luziferase- und β -Galactosidase-Aktivitäten berechnet, wobei die β -Galactosidase-Aktivität als Maß für die Effektivität der Transfektion angesehen wurde. Die normalisierte Luziferase-Aktivität ergab sich aus der Division der Luziferase-Aktivität durch die dazugehörige β -Galactosidase-Aktivität. Die „n-fache Aktivität“ eines Promotors (*fold above background*) wurde durch Division der normalisierten Luziferase-Aktivität des ihn enthaltenden Luziferase-Expressionsplasmids (z.B. p43Wt) durch die normalisierte Luziferase-Aktivität des zugrundeliegenden Luziferase-Expressionsplasmids ohne den zu untersuchenden Promotor (z.B. pATLuc) erhalten.

Transaktivierung bzw. Transsuppression wurde berechnet, indem die „n-fache Aktivität“ eines Promotors bei Kotransfektion eines Transaktivatorplasmids (z.B. pHAPur1) durch die „n-fache Aktivität“ desselben Promotors bei Kotransfektion des entsprechenden, aber keine cDNS enthaltenden Plasmids (z.B. pHA) dividiert wurde.

Soweit nicht anders angegeben, repräsentieren die Ergebnisse den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken die Standardabweichung.

5. Ergebnisse

5.1. Identifizierung neuer cis-Elemente in den CD43- und CD11-Promotoren

5.1.1. Die CD43-Promotorregion (+18/+39) beeinflusst Genaktivitäten

CD43 wird in allen Leukozyten exprimiert. Um zu bestätigen, dass die humane CD43-Promotorregion (-2/+99) in verschiedenen leukozytischen Zelllinien aktiv ist, wurde in Transfektionsexperimenten die Aktivität des Plasmids p43Wt mit der Aktivität des Plasmids pATLuc verglichen. In p43Wt steht ein Luziferase-Gen unter der Kontrolle der CD43-Promotorregion (-2/+99), während pATLuc ein promotorloses Luziferase-Gen enthält. Die Transfektionsexperimente wurden in den Zelllinien Jurkat, CEM, K562 und U937 mit oder ohne anschließende PMA-Behandlung (U937±PMA) durchgeführt, und zeigten, dass die CD43-Promotorregion (-2/+99) in allen untersuchten Zelllinien aktiv ist, wobei sie in CEM (T-Lymphoblasten) die geringste, in K562 (Proerythro-/Promegakaryozyten) die stärkste Aktivität besitzt (Abb. 5.1.).

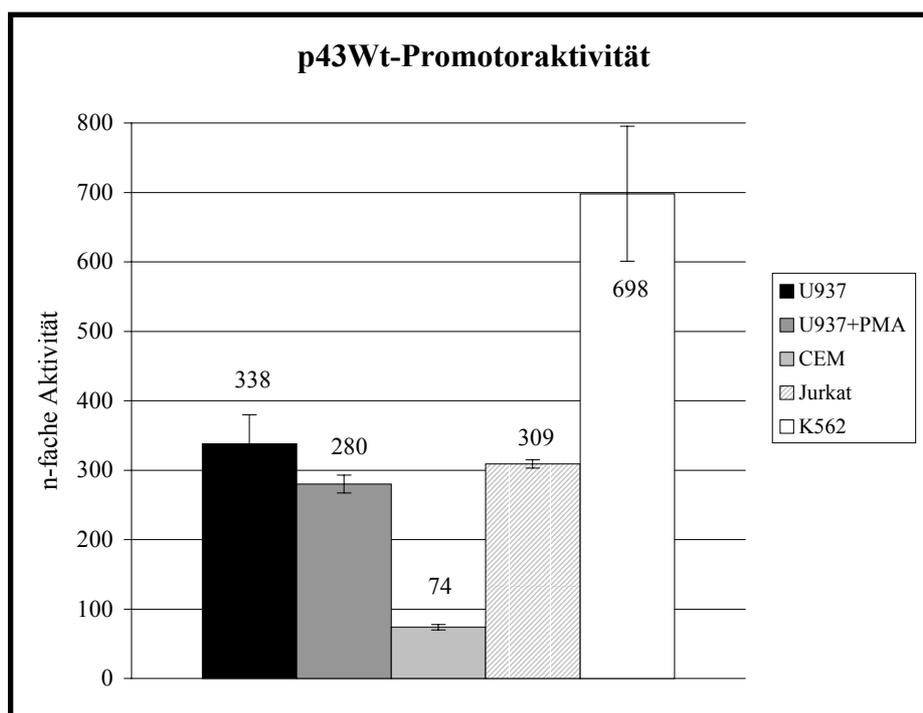


Abb. 5.1.: Darstellung der p43Wt-Promotoraktivitäten als n-facher Wert der Aktivität des promotorlosen Plasmids pATLuc.

In Vorversuchen war demonstriert worden, dass der DNS-Bereich (+18/+39) der CD43-Promotorregion *in vitro* Nuclease S1-hypersensitiv ist und deswegen einzelsträngig vorliegen kann [103]. Da einzelsträngige DNS-Bereiche sowohl für die DNS-Replikation [109] als auch DNS-Transkription wichtig sind [110], sollte

untersucht werden, ob die Region (+18/+39) die CD43-Promotoraktivität beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde sie aus dem CD43-Promotor (-2/+99) in p43Wt entfernt, und die Aktivität des daraus resultierenden Plasmids p43ΔP in Transfektionsexperimenten mit der von p43Wt verglichen. In allen untersuchten Zelllinien besaß p43ΔP eine um durchschnittlich 88% verringerte Promotoraktivität verglichen mit p43Wt (Abb. 5.2.). Aus diesen Versuchen ergab sich somit, dass die Region (+18/+39) für die Aktivität des CD43-Promotors notwendig ist.

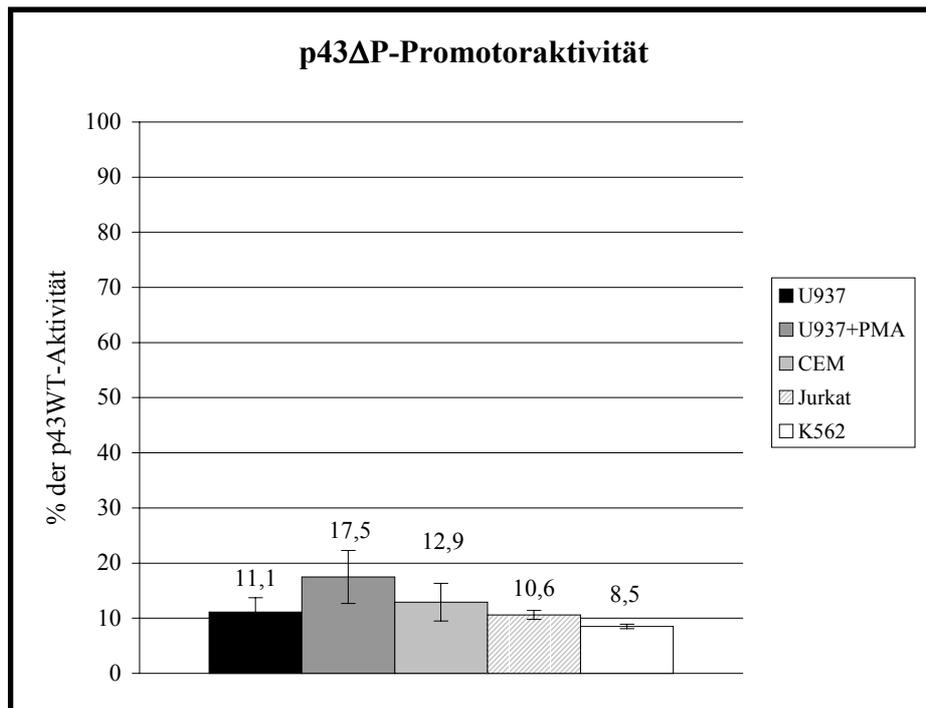


Abb. 5.2.: Auswirkung der Deletion der Region (+18/+39) auf die CD43-Promotoraktivität. Die Aktivität von p43Wt ist als 100% festgelegt.

Da die Aktivität des CD43-Promotors in Abwesenheit der Region (+18/+39) sinkt, wurde angenommen, dass diese Promotorregion aktivierend wirkt. Falls dies zutrifft, sollte sie in der Lage sein, einen anderen, heterologen Promotor zu aktivieren. Um ein stärkeres Signal zu erhalten, wurde ein Tetramer dieser Sequenz 5' des SV40-Promotors in das Plasmid pGL3-Promoter kloniert. Transfektion des daraus resultierenden Plasmids pGL3-HYP in alle untersuchten Zelllinien ergab, dass das Tetramer der Region (+18/+39) zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führte und somit in der Lage war, den SV40-Promotor zu aktivieren. Diese Aktivierung war in den lymphoiden Zelllinien CEM und Jurkat allerdings schwächer als in den myeloiden Zelllinien K562 und U937±PMA (Abb. 5.3.).

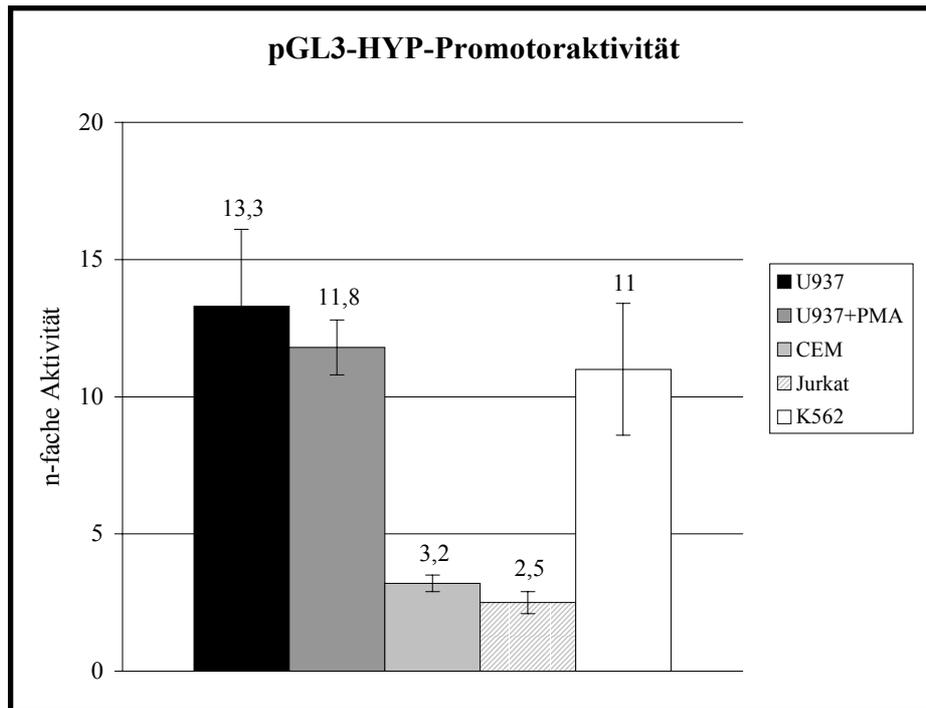


Abb. 5.3.: Aktivierung des SV40-Promotors durch ein Tetramer der CD43-Region (+18/+39) in PGL3-HYP, bezogen auf die Aktivität von pGL3-Promoter.

Insgesamt wurde aus den Transfektionen von p43 Δ P und pGL3-HYP gefolgert, dass die Nuclease S1-hypersensitive Region (+18/+39) aktivierend wirkt, da sie für die CD43-Promotoraktivität notwendig ist und ihr Tetramer darüber hinaus den SV40-Promotor aktivieren kann.

5.1.2. PyRo1 und PyRo2 binden an die Region (+18/+39)

Um zu untersuchen, ob die Region (+18/+39) Proteine oder andere Faktoren bindet, die für die aktivierende Wirkung verantwortlich sein könnten, wurden EMSA-Experimente mit dem radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotid CD43PyRo und Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Abb. 5.4.). Hierbei zeigte sich, dass CD43PyRo mit zwei Faktoren interagieren kann, die PyRo1 (Pyrimidine Recognition) und PyRo2 genannt wurden. Bindung von PyRo2 wurde nur in Zellkernextrakten aus U937 \pm PMA beobachtet, weswegen sie möglicherweise spezifisch für monozytische Zelllinien ist. PyRo1-Bindung an CD43PyRo ließ sich in allen untersuchten Zellen demonstrieren, mit Ausnahme von U937, in denen die Interaktion erst nach PMA-Behandlung beobachtet wurde.

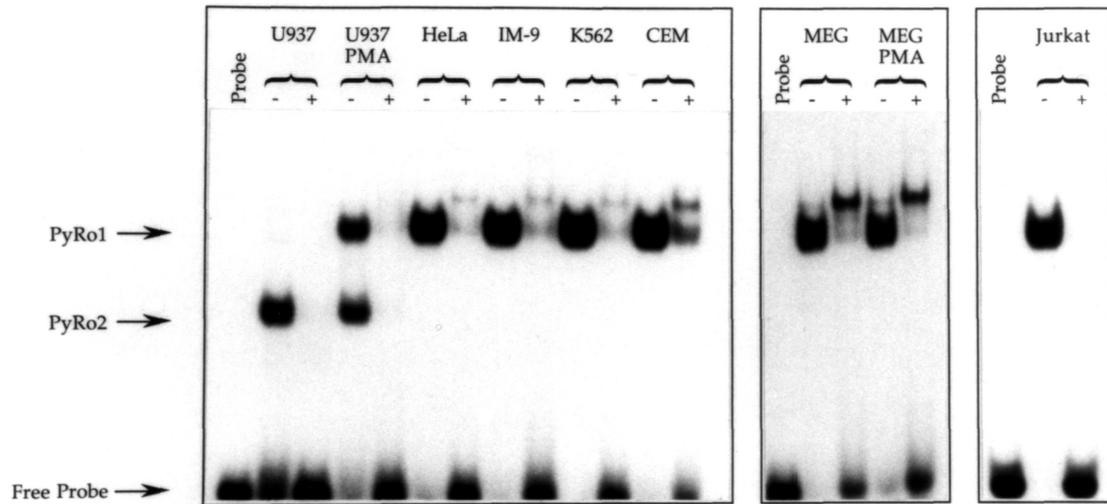


Abb. 5.4.: EMSA-Experiment mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid CD43PyRo und Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien. Probe: CD43PyRo ohne Zellkernextrakt, (-); mit Zellkernextrakt, (+); mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss von unmarkiertem CD43PyRo.

Kompetitionsexperimente mit einem 50-fachen molaren Überschuss von Bindungssequenzen anderer Transkriptionsfaktoren verhinderten nicht die Bildung der PyRo1- und PyRo2-DNS-Komplexe, was die Spezifität der Komplexbildung unterstreicht (Abb. 5.5.).

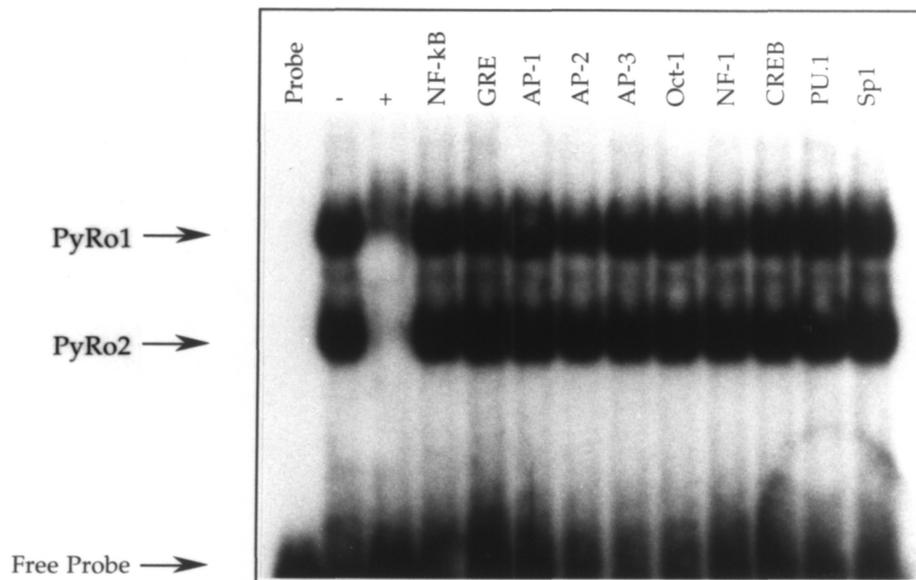


Abb. 5.5.: EMSA-Experiment mit Zellkernextrakt aus U937+PMA, radioaktiv markiertem CD43PyRo als Probe und verschiedenen Kompetitoren. Probe: CD43PyRo ohne Zellkernextrakt, (-); mit Zellkernextrakt, (+); mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss von unmarkiertem CD43PyRo, restliche Bahnen: mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss jeweiliger Kompetitor-DNS.

Da die Region (+18/+39) *in vitro* potenziell einzelsträngig vorliegt, wurde untersucht, ob PyRo1 oder PyRo2 einzelsträngige DNS binden können. Hierzu wurden gesondert EMSA-Experimente mit Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen und dem einzelsträngigen Oligonukleotid CD43PyRoSS bzw. dem dazu komplementären CD43PyRoASS durchgeführt, die zeigten, dass PyRo1 den Pyrimidin-reichen Einzelstrang CD43PyRoSS bindet, nicht jedoch den Purin-reichen Gegenstrang CD43PyRoASS (Abb. 5.6.). PyRo2-DNS-Komplexe traten unter diesen Bedingungen nicht auf, woraus geschlossen wurde, dass dieser Faktor eine geringere Affinität zu einzelsträngiger DNS besitzt.

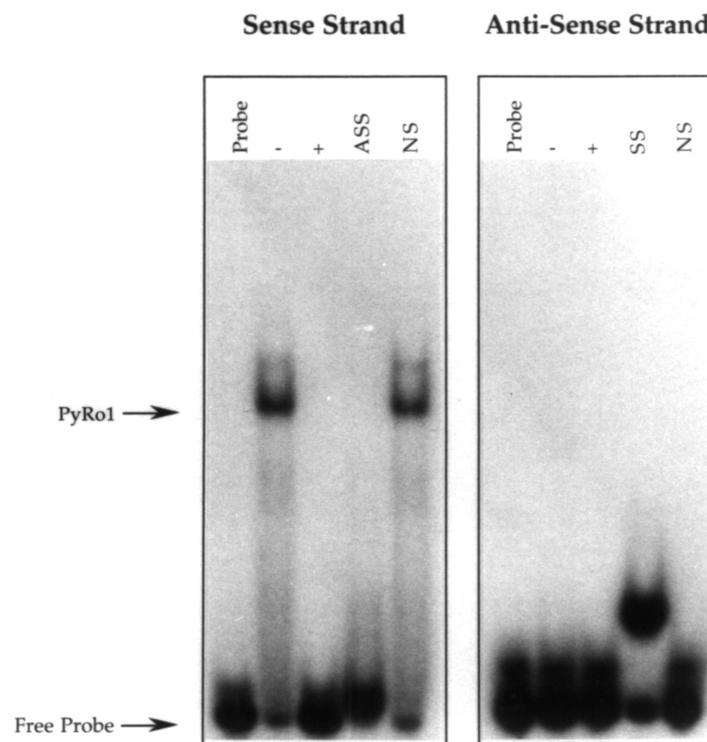


Abb. 5.6.: (**Sense Strand**) EMSA-Experiment mit CD43PyRoSS als Probe allein (Probe), mit Zellkernextrakt aus U937+PMA in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit eines 250-fachen Überschusses verschiedener Kompetitoren: (+): CD43PyRoSS, (ASS): CD43PyRoASS, (NS): unspezifisches Oligonukleotid NS

(**Anti-Sense Strand**) EMSA-Experiment mit CD43PyRoASS als Probe allein (Probe), mit Zellkernextrakt aus U937+PMA in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit eines 250-fachen Überschusses verschiedener Kompetitoren: (+): CD43PyRoASS, (SS): CD43PyRoSS, (NS): unspezifisches Oligonukleotid NS

5.1.3. Charakterisierung der PyRo1-Erkennungssequenz

Um die PyRo1-Erkennungssequenz in CD43PyRoSS zu identifizieren, wurde das Oligonukleotid in drei Blöcke unterteilt, die einzeln und in Kombination miteinander mutiert wurden (Abb. 5.7.).

CD43PyRoSS	5' -GGGCCCACTTCCTTTCCCTTG- 3'
Mut-01	5' -GGGGGGTGTTCCTTTCCCTTG- 3'
Mut-02	5' -GGGCCACAAAGGAATCCCTTG- 3'
Mut-03	5' -GGGCCACTTCCTTAGGGGATG- 3'
Mut-04	5' -GGGGGGTGAAGGAATCCCTTG- 3'
Mut-05	5' -GGGCCACAAAGGAAAGGGGATG- 3'
Mut-06	5' -GGGGGGTGTTCCTTAGGGGATG- 3'
Mut-07	5' -GGGGGGTGAAGGAAAGGGGATG- 3'
Mut-08	5' -GGGCCACTTCCTTCTTTCTG- 3'
Mut-09	5' -GGGCCACTTCCTTCTAATCTG- 3'
Mut-10	5' -GGGCCACTTCCTTCATTACTG- 3'
Mut-11	5' -GGGCCACTTCCTTCATATATG- 3'

Abb. 5.7.: Die Sequenz des PyRo1-bindenden Oligonukleotids (CD43PyRoSS), darunter die in EMSA-Experimenten eingesetzten mutierten Versionen. Mutierte Nukleotide sind farblich hervorgehoben.

In EMSA-Experimenten wurde die Fähigkeit der einzelnen Mutationen, mit dem PyRo1-CD43PyRoSS-Komplex zu kompetieren, untersucht. Ziel war es, Nukleotide zu identifizieren, die für die Interaktion mit PyRo1 notwendig sind. Diese sollten daran zu erkennen sein, dass die PyRo1-Bindung an das radioaktiv markierte Oligonukleotid CD43PyRoSS in allen Konkurrenzexperimenten erhalten bleibt, in denen die PyRo1-Erkennungssequenz im nicht-markierten Kompetitor mutiert ist (Abb. 5.8.).

Mutation des ersten Blocks (CCCAC → GGGTG):

In den Oligonukleotiden Mut-01, Mut-04, Mut-06 und Mut-07 wurde der erste Block allein oder in Kombination mit den anderen Blöcken mutiert. Mut-01 und Mut-04 konnten PyRo1 noch binden, Mut-06 und Mut-07, in denen gleichzeitig der dritte Block mutiert wurde, jedoch nicht (Abb. 5.8.). Da Mut-01 und Mut-04 PyRo1 binden, ist die Sequenz CCCAC nicht für die Interaktion mit PyRo1 notwendig.

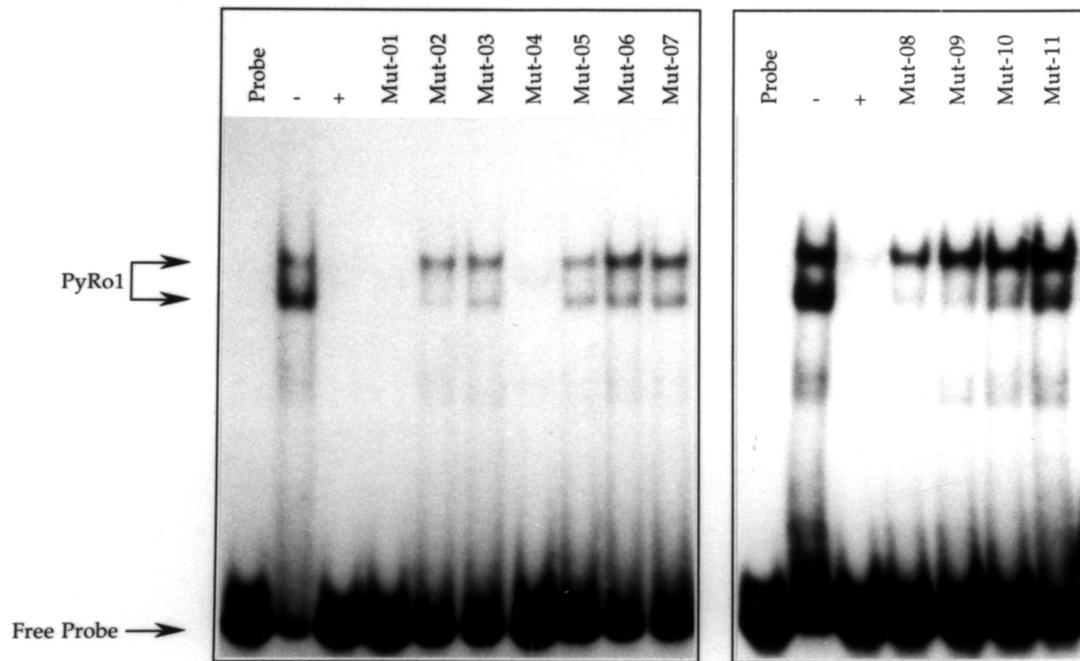


Abb. 5.8.: EMSA-Experiment mit CD43PyRoSS als Probe allein (Probe), mit Zellkernextrakt aus U937+PMA in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit eines 200-fachen Überschusses der verschiedenen mutierten Oligonukleotide Mut-01 bis Mut-11.

Mutation des zweiten Blocks (TTCCTT → AAGGAA):

Oligonukleotide Mut-02, Mut-05 und Mut-07, in denen der zweite Block mutiert wurde, interagierten nicht mehr mit PyRo1. Wenn jedoch der zweite und gleichzeitig der erste Block mutiert wurden (Mut-04), wurde PyRo1 wieder gebunden. Der Einfluss des zweiten Blocks auf die Interaktion mit PyRo1 hängt also von der benachbarten Sequenz ab. Daraus folgt, dass der zweite Block die Interaktion mit PyRo1 beeinflussen kann, aber nicht notwendig ist, da benachbarte Sequenzen gleichzeitig Einfluss auf die Bindung ausüben.

Mutation des dritten Blocks (TCCCCT → AGGGGA bzw. CTTTTC):

Mutation des dritten Blocks allein (Mut-03) oder in Kombination mit den anderen Blöcken (Mut-05, Mut-06 und Mut-07) führte zum Verlust der PyRo1-Bindung. Deswegen ist der dritte Block mit der Sequenz TCCCCT notwendig für die Wechselwirkung mit PyRo1. Mutation der PyRo1-Erkennungssequenz TCCCCT zu CTTTTC (MUT-08), durch die der Pyrimidin-Anteil erhalten blieb, führte ebenfalls zum Verlust der Interaktion mit PyRo1. Dies legt nahe, dass PyRo1 nicht beliebige Pyrimidin-reiche Sequenzen, sondern bevorzugt bestimmte Nukleotidfolgen bindet.

5.1.4. PyRo1-Bindung beeinflusst die CD43-Promotoraktivität

Um den Einfluss der Interaktion zwischen PyRo1 und der Sequenz TCCCCT auf die Aktivität des CD43-Promotors zu bestimmen, wurde in dem Plasmid p43 μ P die Sequenz TCCCCT durch CATATA ersetzt, welche in EMSA-Kompetitionsexperimenten PyRo1 nicht mehr band (Abb. 5.8, Spur Mut-11). Bei Transfektion von p43 μ P verringerte sich die Promotoraktivität in Jurkat-Zellen auf 65% und in K562 auf 48% der Aktivität der ursprünglichen Sequenz in p43Wt (Abb. 5.9.). Dieses Ergebnis zeigt, dass Bindung von PyRo1 die Aktivität des CD43-Promotors regulieren kann und dass dieser Effekt in verschiedenen Zelllinien variiert.

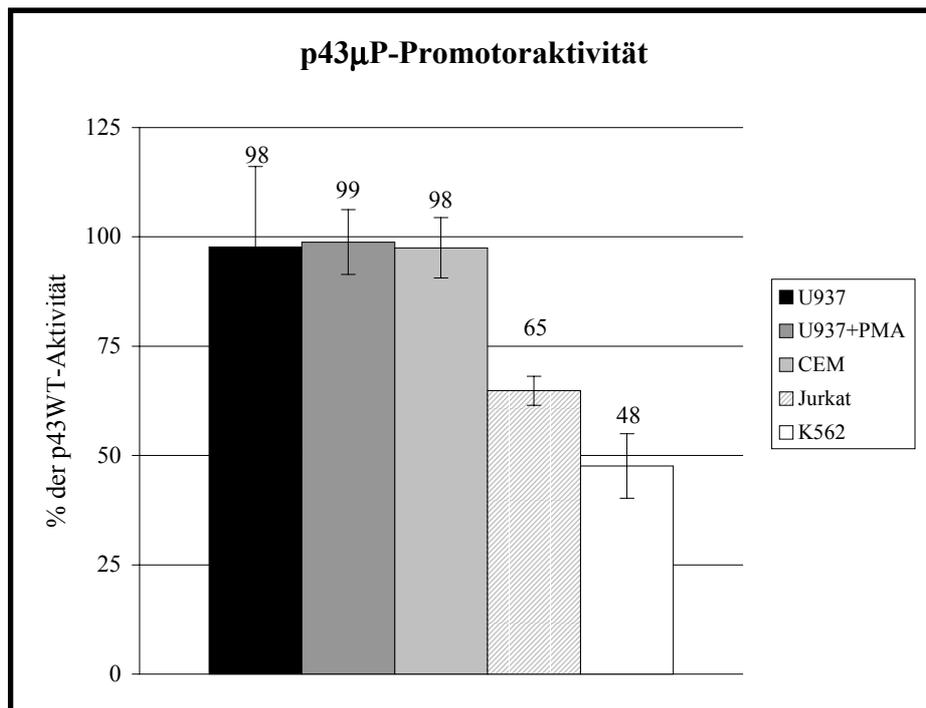


Abb. 5.9.: Auswirkung der Mutation der PyRo1-Bindungsstelle im Plasmid p43 μ P auf die Aktivität der CD43-Promotoraktivität, bezogen auf die Aktivität von p43Wt, in dem die PyRo1-Erkennungssequenz intakt ist.

5.1.5. PyRo1-Bindungsstellen in den CD11-Promotoren

Beim Vergleich der PyRo1-Erkennungssequenz im CD43-Promotor mit den Sequenzen der Promotoren der CD11-Gene fielen weitere potenzielle PyRo1-Bindungsstellen auf, die alle das Motiv CCCAC, gefolgt von einer Cytidin-reichen Sequenz, besitzen (Abb. 5.10.). In EMSA-Experimenten mit einzelsträngigen Oligonukleotiden waren diese Promotorsequenzen in der Lage, mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid CD43PyRoSS um die Bindung von PyRo1 zu konkurrieren (Abb. 5.11.).

CD43 5' -GGGCCCACTTCCTTTCCCTTG-3' (CD43PyRoSS)
 CD11a 5' -CAAATCCCACGGGCCTCCTGACG-3' (CD11aPyRoSS)
 CD11b 5' -GCCTGCCCACCCTTCCTCCCCAGCTT-3' (CD11bPyRoASS)
 CD11c 5' -CACACGCCCCACCCCCCA-3' (CD11cPyRoASS)
 CD11d 5' -TCCTACCCACTGTGCCCTCCTC-3' (CD11dPyRoSS)

Abb. 5.10.: Vergleich der CD43-PyRo1-Bindungsstelle mit potenziellen PyRo1-Bindungsstellen in den Promotoren der CD11-Gene. Das in allen Sequenzen vorkommende Motiv CCCAC ist unterstrichen, die Cytidin-reichen Sequenzen sind grau gefärbt.

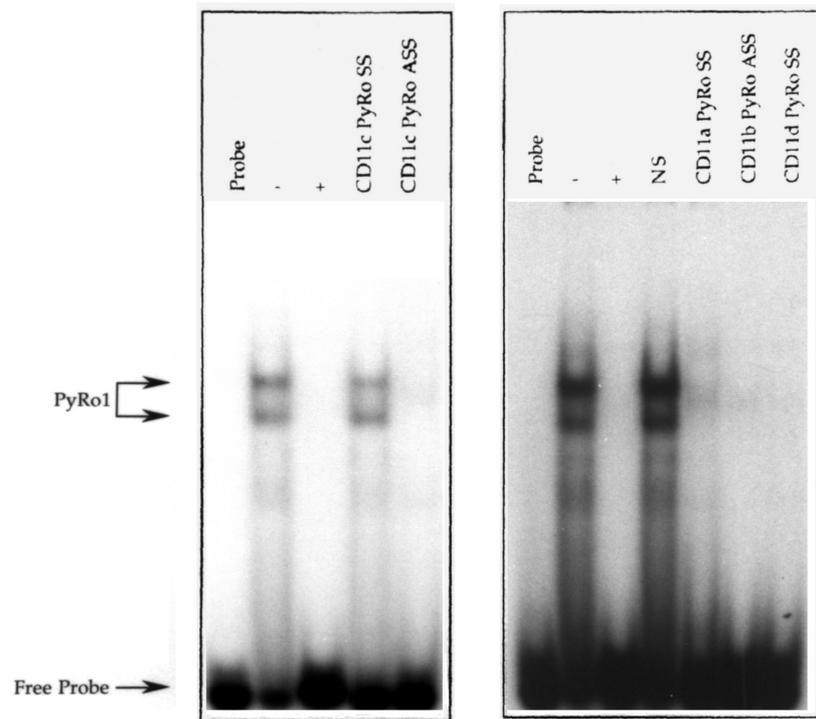


Abb. 5.11.: EMSA-Experiment mit CD43PyRoSS als radioaktiv markierter Probe allein (Probe) oder mit Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen, (-): in Abwesenheit von Kompetitor-DNS, (+): in Anwesenheit eines 250-fachen Überschusses CD43PyRoSS, andere Bahnen: in Anwesenheit eines 250-fachen Überschusses jeweiliger Kompetitor-DNS.

EMSA-Experimente mit der PyRo1-Bindungsstelle des humanen CD11c-Promotors (CD11cPyRo) als Probe und Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien ergaben ein Bindungsmuster, das dem von CD43PyRoSS entspricht (Abb. 5.12.). Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Oligonukleotiden demonstrierten, dass es sich um eine spezifische Bindung handelt (Abb. 5.13.). Zusammen zeigen diese Experimente, dass PyRo1 *in vitro* nicht nur den Promotor des CD43-Gens, sondern auch die Promotoren der vier CD11-Gene bindet.

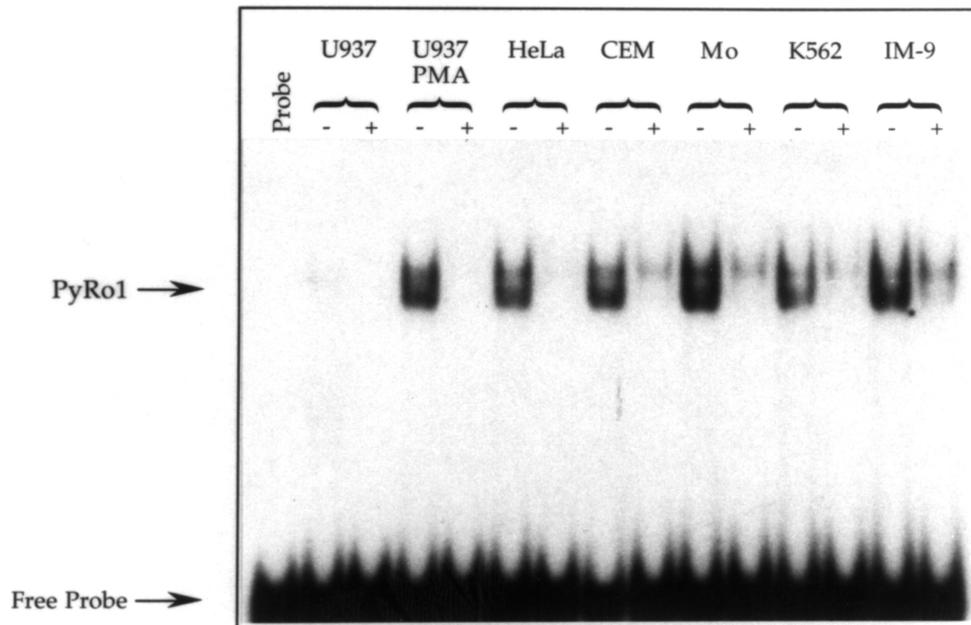


Abb. 5.12.: EMSA-Experiment mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid CD11cPyRo und Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien. Probe: CD11cPyRo ohne Zellkernextrakt, (-): mit Zellkernextrakt, (+): mit Zellkernextrakt und 400-fachem Überschuss von unmarkiertem CD11cPyRo.

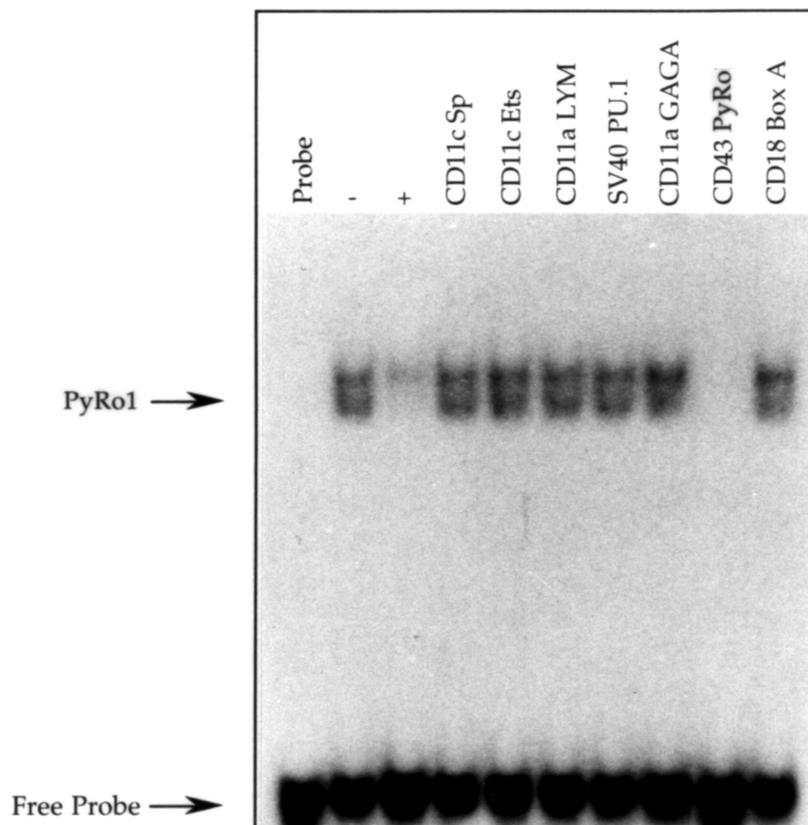


Abb. 5.13.: EMSA-Experiment mit Zellkernextrakt aus Mo-Zellen, radioaktiv markiertem CD11cPyRo als Probe und verschiedenen Kompetitoren. Probe: CD11cPyRo ohne Zellkernextrakt, (-): mit Zellkernextrakt, (+): mit Zellkernextrakt und 250-fachem Überschuss von unmarkiertem CD11cPyRo, restliche Bahnen: mit Zellkernextrakt und 250-fachem Überschuss jeweiliger Kompetitor-DNS.

5.1.6. Deletion der PyRo1-Bindungsstelle im CD11c-Promotor

Das Plasmid p11Wt enthält das Luziferase-Gen unter der Kontrolle der humanen CD11c-Promotorregion (-128/+36). Um den Einfluss der PyRo1-bindenden DNS-Region (-128/-118) auf die Promotoraktivität zu untersuchen, wurde sie in dem Plasmid p11ΔP aus dem Promotor entfernt. In Transfektionsexperimenten in Jurkat und PMA-behandelten U937 zeigte p11ΔP eine um 47% bzw. 31% geringere Promotoraktivität verglichen mit p11Wt (Abb. 5.14.). Die Abwesenheit der PyRo1-Bindungsstelle wirkt sich also negativ auf die Aktivität des humanen CD11c-Promotors aus, allerdings ist der Effekt schwächer als im CD43-Promotor.

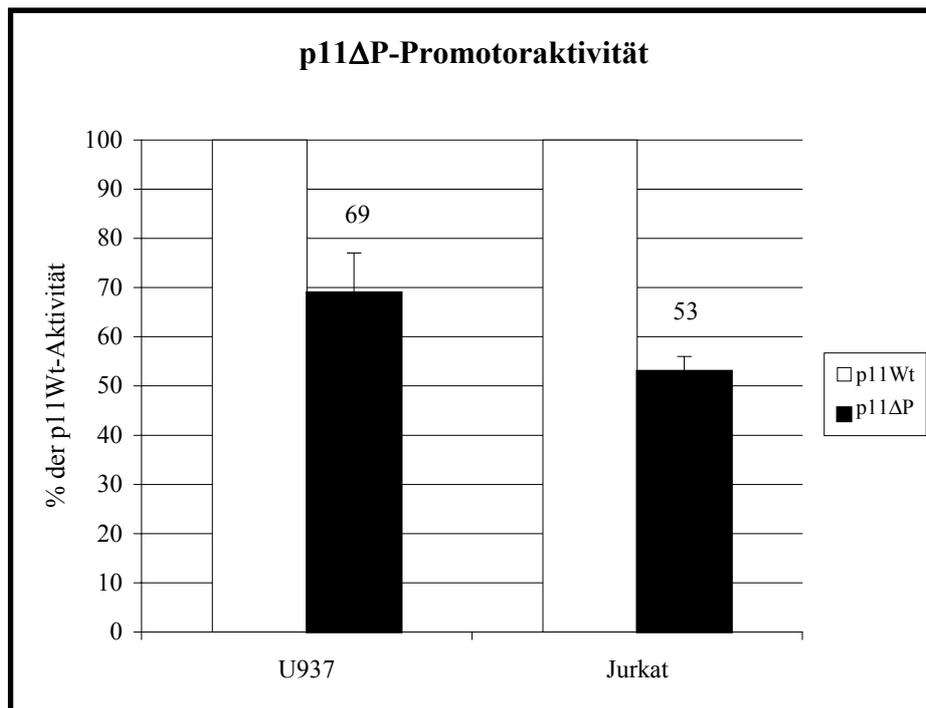


Abb. 5.14.: Auswirkung der Deletion der Region (-128/-118) auf die CD11c-Promotoraktivität in den Zelllinien U937 bzw. Jurkat. Die Aktivität von p11Wt in der jeweiligen Zelllinie ist als 100% definiert.

5.1.7. Weiterführende Resultate

In weiterführenden Experimenten gelang es, PyRo1 zu isolieren und ein Fragment seiner Aminosäuresequenz zu bestimmen, die identisch zu einem Fragment von hnRNP-K ist (C. S. Shelley und N. Da Silva, persönliche Mitteilung). In EMSA-Experimenten wurde die Bindung eines bakteriell exprimierten GST-hnRNP-K Fusionsproteins an die Sequenz CD43PyRoSS gezeigt (C. S. Shelley und N. Da Silva, persönliche Mitteilung). Dies legt nahe, dass es sich bei PyRo1 um den ubiquitären Transkriptionsfaktor hnRNP-K handelt, der einzelsträngige DNS und RNS binden kann [111].

5.2. Der Einfluss von $\text{Pur}\alpha$ auf die CD43- und CD11c-Promotoren

5.2.1. $\text{Pur}\alpha$ verringert die CD43-Promotoraktivität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Promotoraktivität von CD43 im Verlauf der monozytischen Differenzierung sinkt. Tatsächlich verringert sich die Aktivität der CD43-Promotorregion (-2/+99) in U937-Zellen, die 16h mit PMA behandelt wurden, nur um etwa 20% verglichen mit ihrer Aktivität in unbehandelten U937-Zellen (siehe oben, Abb. 5.1.). Die CD43-Promotoraktivität sinkt aber stärker, nämlich auf 57% ihrer Aktivität in unbehandelten U937-Zellen, wenn die PMA-Behandlung nur für 5h erfolgt (C. S. Shelley, persönliche Mitteilung, Abb. 5.15.).

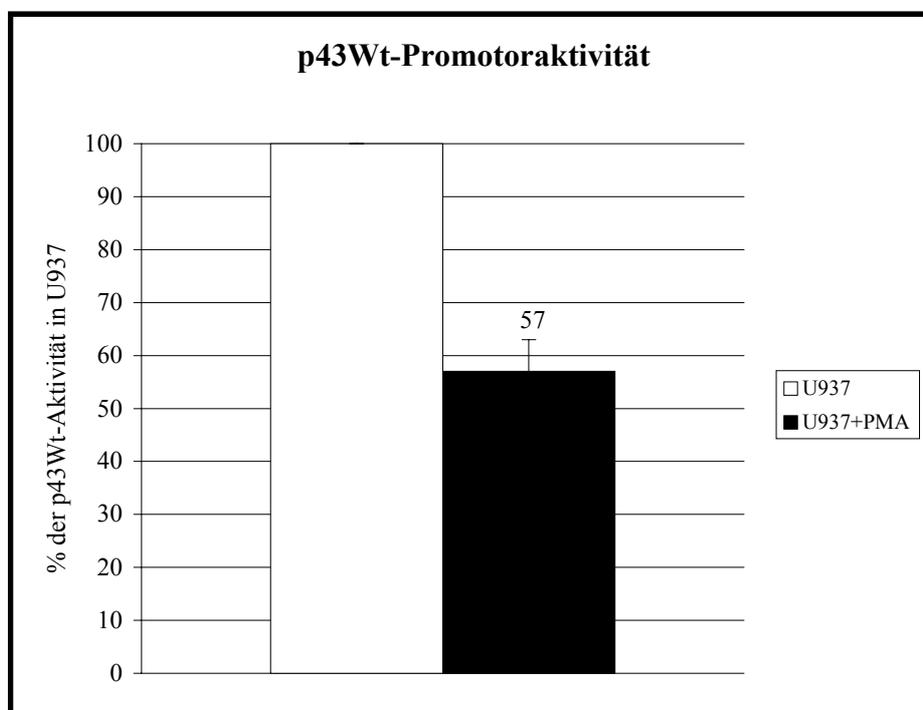


Abb. 5.15.: Die Aktivität des CD43Wt-Promotors in der Zelllinie U937 nach fünfstündiger PMA-Behandlung (U937+PMA). Die Aktivität des CD43Wt-Promotors in unbehandelten U937-Zellen (U937) wurde als 100% definiert.

Um die Ursache für die Reduzierung der Promotoraktivität herauszufinden, wurde nach Faktoren gesucht, die - ähnlich PyRo1 - erst nach PMA-Behandlung der Zelllinie U937 an Sequenzen des CD43-Promotors binden. Hierbei wurde in EMSA-Experimenten ein Faktor gefunden, der in PMA-behandelten U937-Zellen die CD43-Promotorregion (-2/+17) bindet (Abb. 5.16.).

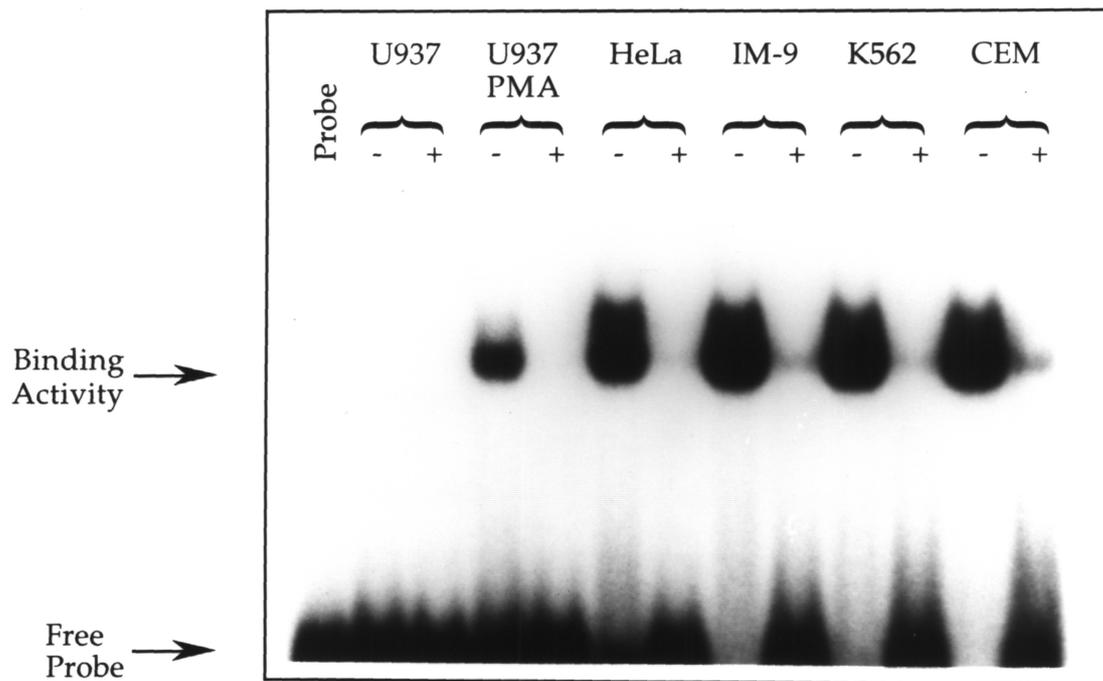


Abb. 5.16.: EMSA-Experiment mit dem radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotid CD43PUR-1 und Zellkernextrakten aus verschiedenen Zelllinien. Probe: CD43PUR-1 ohne Zellkernextrakt, (-): mit Zellkernextrakt, ohne Kompetitor-DNS, (+): mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss von unmarkiertem CD43PUR-1.

Die Expression des Faktors ist nicht auf Monozyten beschränkt, da er auch in Zellkernextrakten aus anderen Leukozyten und der Zelllinie HeLa Bindungsaktivität zeigt. Die Bindung des Faktors an die CD43-Promotorregion (-2/+17) scheint spezifisch, da sie in Konkurrenzexperimenten durch die Gegenwart mehrerer Oligonukleotide nicht beeinflusst wurde (Abb. 5.17.). Besonders hervorzuheben ist, dass die Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors Sp1 die Interaktion des bis dahin unbekanntes Faktors mit der CD43-Promotorregion (-2/+17) nicht beeinträchtigt (Abb. 5.17., Spur Sp1), obwohl diese Region Sp1 binden kann [42].

Die CD43-Promotorregion (-2/+17) enthält ein GGA- und drei GGT-Motive, die das Erkennungsmotiv des Transkriptionsfaktors Pur α darstellen, der bevorzugt mit einzelsträngiger DNS interagiert [111]. In weiteren EMSA-Experimenten mit einzelsträngiger DNS als Probe zeigte sich, dass der GGN-reiche Strang (N \neq G) hinreichend für die Bindung des Faktors war. Zugabe des monoklonalen Antikörpers 9C12, der den Transkriptionsfaktor Pur α bindet, führte zur Bildung eines größeren Komplexes („Supershift“) (Abb. 5.18.). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein immunologisch von Pur α ununterscheidbarer Faktor in aktivierten U937-Zellen die CD43-Promotorregion (-2/+17) bindet.

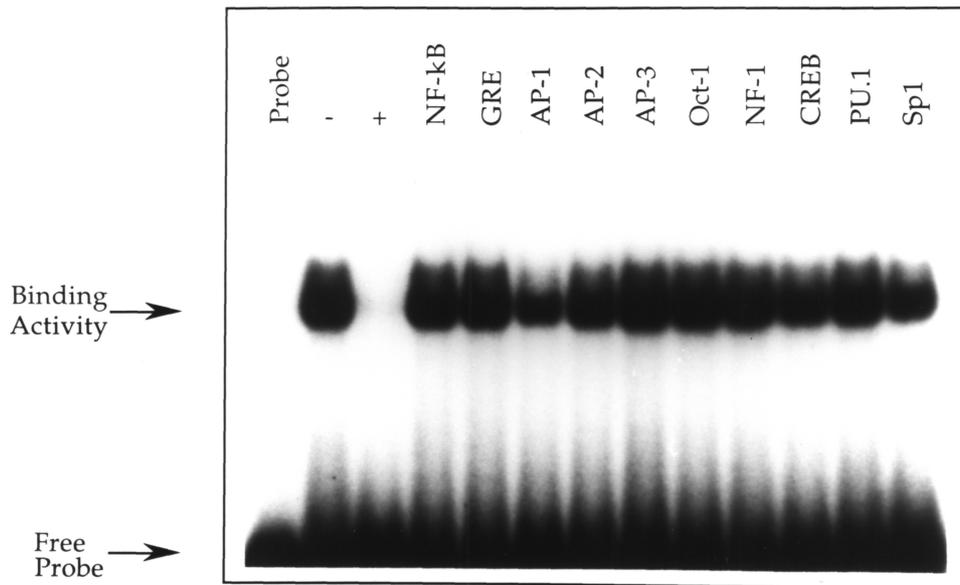


Abb. 5.17.: EMSA-Experiment mit Zellkernextrakt aus U937+PMA, radioaktiv markiertem doppelsträngigem CD43PUR-1 als Probe und verschiedenen Kompetitoren. Probe: CD43PUR-1 ohne Zellkernextrakt, (-): mit Zellkernextrakt, (+): mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss von unmarkiertem CD43PUR-1, restliche Bahnen: mit Zellkernextrakt und 50-fachem Überschuss jeweiliger Kompetitor-DNS.

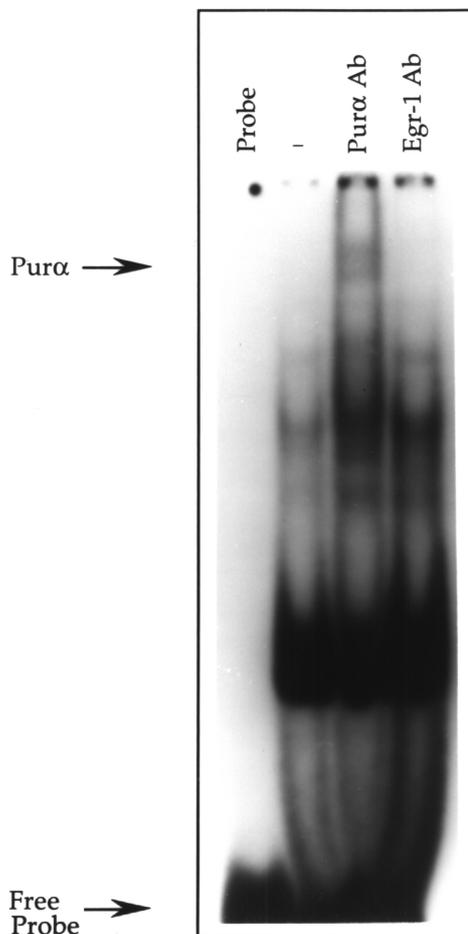


Abb. 5.18.: EMSA-Experiment mit Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen und CD43PUR-2 als radioaktiv markierter, einzelsträngiger Probe. (Probe): CD43PUR-2 ohne Zellkernextrakt. Alle anderen Spuren enthalten Zellkernextrakt, (-): ohne Antikörper, (Pur AB): mit monoklonalem α -Pur α Antikörper 9C12, (Egr AB): mit polyklonalem α -Egr-1 Antikörper Egr-1.

Um zu überprüfen, ob die nach PMA-Behandlung beobachtete Bindung von Pur α an den CD43-Promotor für die Verringerung seiner Aktivität verantwortlich ist, wurden U937-Zellen mit p43Wt und dem Pur α -Expressionsplasmid pHAPur1 kotransfiziert und anschließend mit PMA behandelt. Hierbei sank die CD43-Promotoraktivität auf 54% ihres Wertes bei Kotransfektion des Kontrollplasmids pHA (Abb. 5.19.). Pur α ist also in aktivierten U937-Zellen in der Lage, die CD43-Promotoraktivität zu verringern.

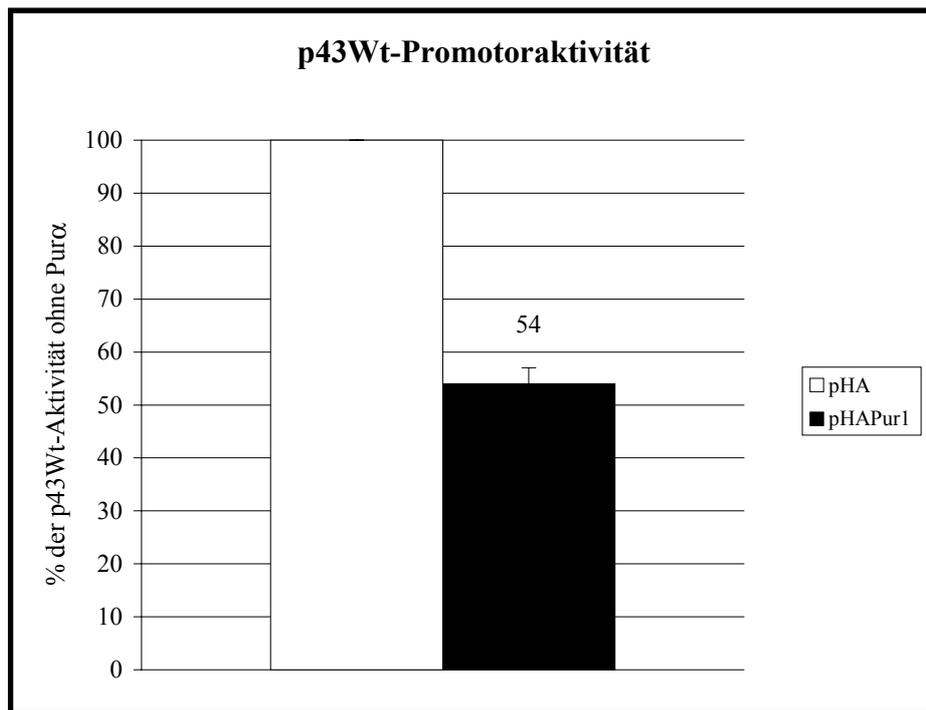


Abb. 5.19.: Kotransfektion des Pur α -Expressionsplasmids pHAPur1 verringert die Aktivität des CD43Wt-Promotors in PMA-behandelten U937-Zellen. Die Aktivität des CD43Wt-Promotors bei Kotransfektion von pHA wurde als 100% definiert.

5.2.2. Pur α bindet den CD11c-Promotor

Da PyRo1/hnRNP-K in der Zelllinie U937 nach PMA-Behandlung nicht nur den CD43-, sondern auch den CD11c-Promotor bindet, stellte sich die Frage, ob Pur α hierzu ebenfalls in der Lage ist. Bei einer Analyse der CD11c-Promotorsequenz wurden vier potenzielle Pur α -Bindungsstellen gefunden, von denen drei mit Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1 überlappen (Abb. 5.20.).

Um Pur α -Bindung an diese Sequenzen zu bestätigen, wurden EMSA-Experimente mit dem einzelsträngigen Oligonukleotid CD11cPWt und Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen durchgeführt. Diese Versuche zeigten Interaktion zwischen dem radioaktiv markierten Oligonukleotid und einem Faktor, der das gleiche

Bindungsverhalten wie Pur α besitzt, von dem gegen Pur α gerichteten monoklonalen Antikörper 9C12 erkannt wird (Abb. 5.21.) und somit von Pur α ununterscheidbar ist.

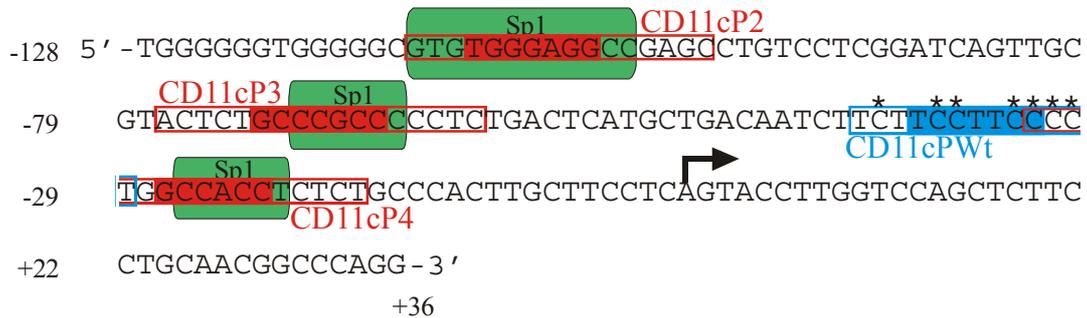


Abb. 5.20.: Darstellung des CD11c-Promotors mit drei Sp1-Bindungsstellen (grün) und den potenziellen Pur α -Bindungsstellen (rot: mit Sp1-Bindungsstellen überlappend, blau: keine Überlappung). Die Lage der in EMSA-Experimenten verwendeten Oligonukleotide ist rot bzw. blau eingerahmt.

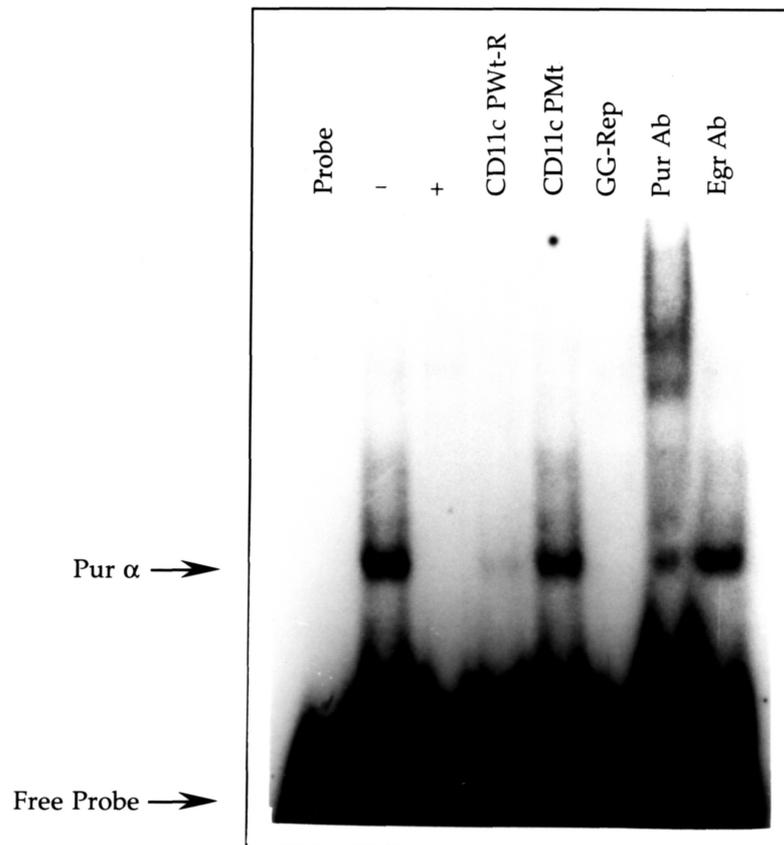


Abb. 5.21.: EMSA-Experiment mit CD11cPWt als radioaktiv markierter, einzelsträngiger Probe und Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen. (Probe): CD11cPWt ohne Zellkernextrakt. Alle anderen Spuren enthalten Zellkernextrakt, (-): ohne Kompetitor-DNS, (+): mit 200-fachem Überschuss CD11cPWt, (CD11cPWt-R, CD11cPMt, GG-Rep): mit 200-fachem Überschuss jeweiliger Kompetitor-DNS, (Pur Ab): mit monoklonalem α -Pur α Antikörper 9C12, (Egr Ab): mit polyklonalem α -Egr-1 Antikörper Egr-1.

Um die anderen potenziellen Bindungsstellen zu analysieren, wurde ihre Fähigkeit untersucht, in EMSA-Experimenten mit CD11cPWt zu kompetitieren. Hierbei zeigte sich, dass alle drei Oligonukleotide ebenfalls Pur α binden können (Abb. 5.22.), und dass der CD11c-Promotor folglich *in vitro* vier Bindungsstellen für diesen Transkriptionsfaktor besitzt.

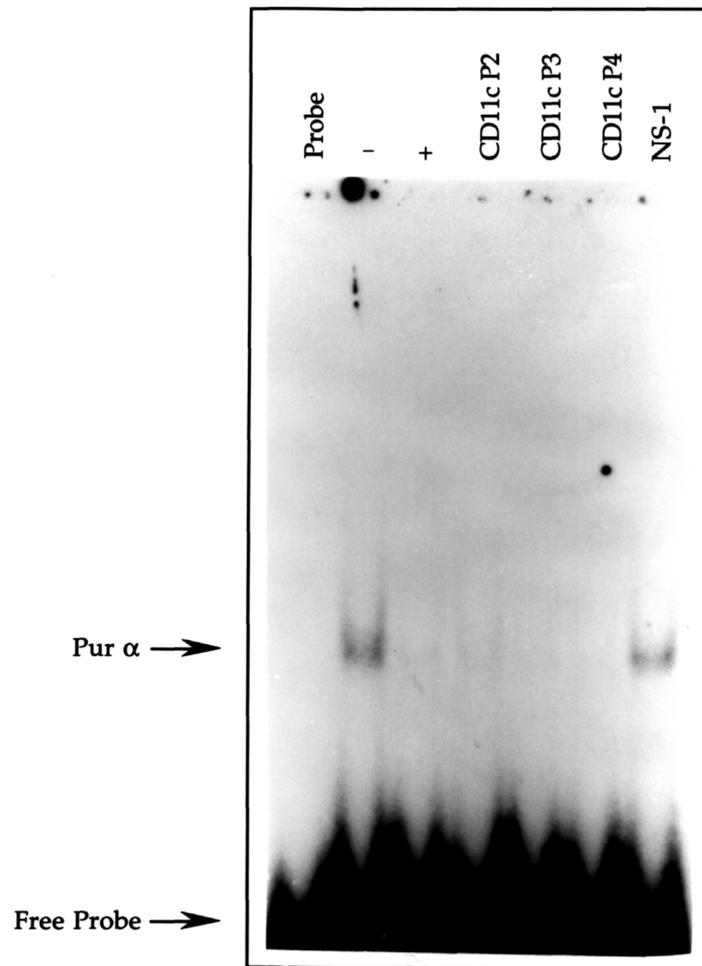


Abb. 5.22.: EMSA-Experiment mit CD11cPWt als radioaktiv markierter, einzelsträngiger Probe und Zellkernextrakt aus PMA-behandelten U937-Zellen. (Probe): CD11cPWt ohne Zellkernextrakt. Alle anderen Spuren enthalten Zellkernextrakt; (-): ohne Kompetitor-DNS; (+): mit 200-fachem Überschuss CD11cPWt; (CD11cP2, CD11cP3, CD11cP4, NS-1): mit 200-fachem Überschuss jeweiliger Kompetitor-DNS.

Während der monozytischen Aktivierung steigt die CD11c-Expression [112, 113]. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Aktivität von Pur α unter diesen Bedingungen ebenfalls zunimmt. Zu diesem Zweck wurden EMSA-Experimente mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid CD11cPWt und Zellkernextrakten aus U937-Zellen vor und nach PMA-Behandlung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sich die DNS-Bindungsfähigkeit von Pur α im Verlauf der monozytischen Aktivierung erhöht (Abb. 5.23.).

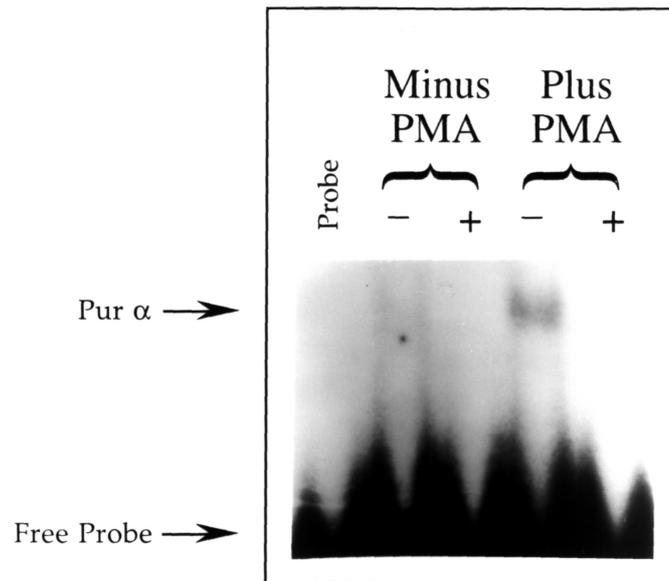


Abb. 5.23.: EMSA-Experiment mit CD11cPWT als radioaktiv markierter, einzelsträngiger Probe und Zellkernextrakten aus U937-Zellen vor (Minus PMA) bzw. nach (Plus PMA) PMA-Behandlung in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) eines 200-fachen Überschusses an unmarkierter Kompetitor-DNS.

5.2.3. Die Pur α -Bindungsstelle beeinflusst die CD11c-Promotoraktivität

Ziel der folgenden Experimente war, die Bedeutung der Interaktion zwischen Pur α und dem CD11c-Promotor für dessen Aktivität zu bestimmen. Ein Problem war, dass drei der vier Sequenzen nicht nur Pur α , sondern auch Sp1 binden. Mutationen oder Deletionen in diesen Bereichen würden wahrscheinlich das Bindungsverhalten beider Transkriptionsfaktoren beeinflussen und somit die Interpretation des beobachteten Effekts erschweren. Deswegen wurden im Plasmid p11 Δ Pur in der vierten Pur α -Bindungsstelle des CD11c-Promotors G \rightarrow T Mutationen eingeführt, die in EMSA-Experimenten zum Verlust der Interaktion mit Pur α geführt hatten (vgl. Abb. 5.21., Spur CD11cPMt). In Transfektionsexperimenten in U937+PMA besaß p11 Δ Pur eine um 91% geringere Promotoraktivität als p11Wt (Abb. 5.24.).

Als nächstes sollte bestimmt werden, ob p11Wt bzw. p11 Δ Pur durch Pur α aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde das Pur α -Expressionsplasmid pHAPur1 zusammen mit den Reporterplasmiden p11Wt bzw. p11 Δ Pur in U937 transfiziert und die Zellen anschließend mit PMA behandelt. Hierbei zeigte sich, dass die Promotoraktivität von p11Wt um den Faktor 3,5 stieg, die Promotoraktivität von p11 Δ Pur jedoch nur um den Faktor 1,7 (Abb. 5.25.). Folglich besteht *in vitro* eine Korrelation zwischen der Bildung eines Pur α -DNS-Komplexes und der Fähigkeit von Pur α , den CD11c-Promotor zu aktivieren. Mutation der Pur α -Bindungsstelle in der Region (-44/-29) führt zu einer Verringerung der Transaktivierung um etwa 50%.

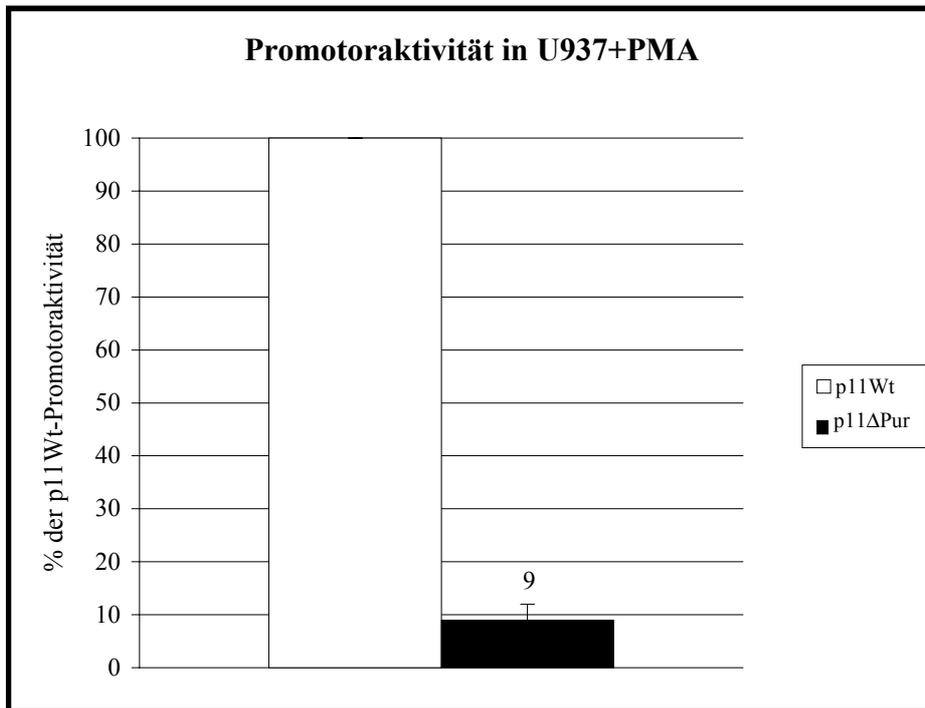


Abb. 5.24.: Vergleich der Promotoraktivitäten von p11Wt und p11ΔPur in der PMA-behandelten Zelllinie U937. Die Aktivität von p11Wt ist als 100% festgelegt.

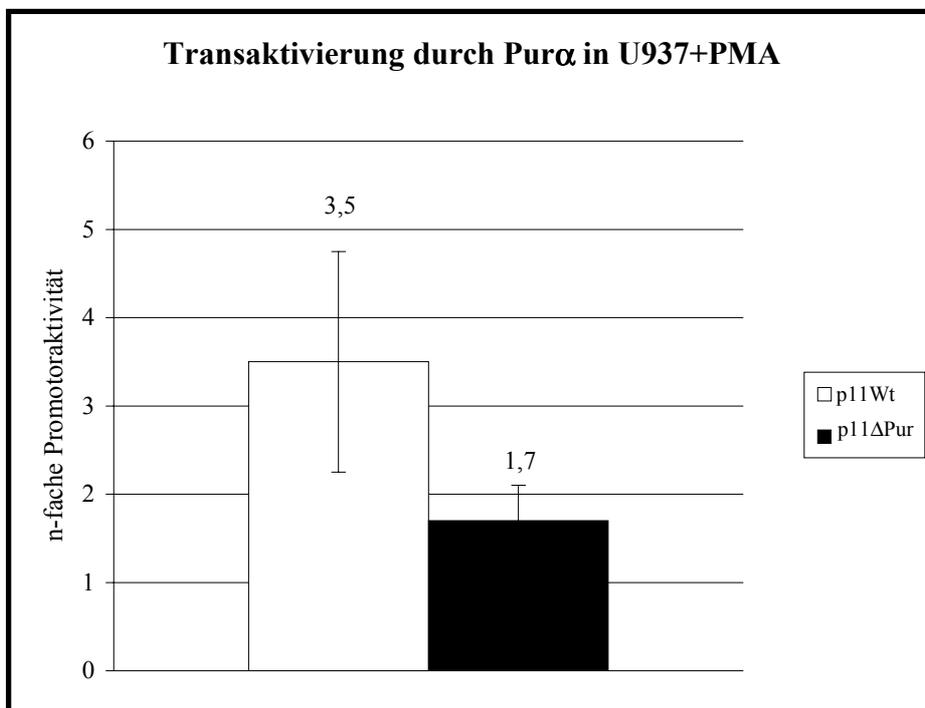


Abb. 5.25.: Transaktivierung von p11Wt (mit intakter Purα-Bindungsstelle) und p11ΔPur (mit mutierter Purα-Bindungsstelle) durch pHAPur1 in PMA-behandelten U937-Zellen.

5.2.4. Einfluss der Ca^{2+} -Konzentration auf die CD11c-Promotoraktivität

Behandlung von Monozyten mit PMA führt zur verstärkten Bindung von $\text{Pur}\alpha$ an DNS (siehe Abb. 5.23.) und gleichzeitig zu einer Aktivierung der CD11-Promotoren [97, 113, 114]. Die Promotoraktivität von CD11d erhöht sich außerdem nach Behandlung mit dem Calciumionophor A23187, das die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern bewirkt [115]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die DNS-Bindungsfähigkeit von $\text{Pur}\alpha$ in Gegenwart von Calmodulin, das andere Proteine in Abhängigkeit von Ca^{2+} beeinflusst, zunimmt [116]. Deswegen sollte als nächstes untersucht werden, ob die Freisetzung von Ca^{2+} die Fähigkeit von $\text{Pur}\alpha$, den CD11c-Promotor zu aktivieren, erhöht. In einem ersten Experiment wurden U937-Zellen 20h in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von A23187 kultiviert, um zu bestimmen, ob das Calciumionophor toxisch auf die Zellen wirkt. Trypan-Blue Anfärbung ergab, dass die Überlebensrate der Zellen bei einer A23187-Konzentration bis 100nM bei etwa 90% lag, bei höheren Konzentrationen jedoch sank (Abb. 5.26.). In den nachfolgenden Experimenten wurde eine A23187-Konzentration von 50nM eingesetzt, um toxische Effekte zu vermeiden.

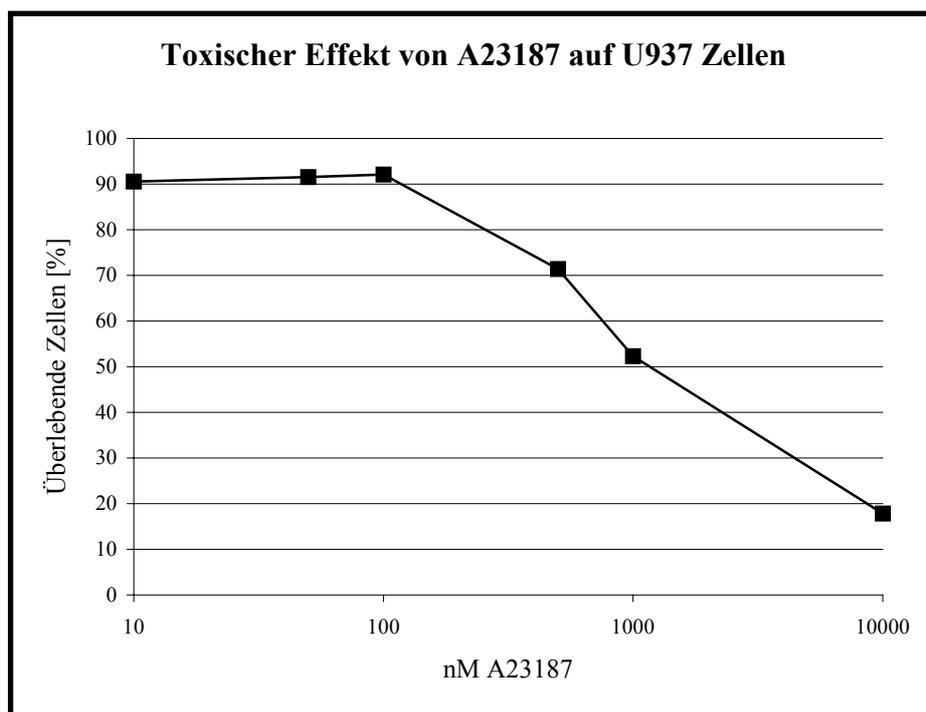


Abb. 5.26.: Überlebensrate von U937-Zellen nach 20h in Gegenwart der angegebenen Konzentration des Calciumionophors A23187.

In A23187-behandelten U937-Zellen führte Kotransfektion von pHAPur1 zu einer Aktivierung des CD11c-Promotors um den Faktor 1,3 (Abb. 5.27.). Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis ein Problem der experimentellen Durchführung widerspiegelt, wurde in einer gleichzeitig durchgeführten Transfektion die Aktivierung von p11Wt durch Pur α in PMA-behandelten U937 gemessen. Unter diesen Bedingungen wurde eine 2,7-fache Aktivierung des CD11c-Promotors beobachtet, die vergleichbar zu früheren Ergebnissen ist.

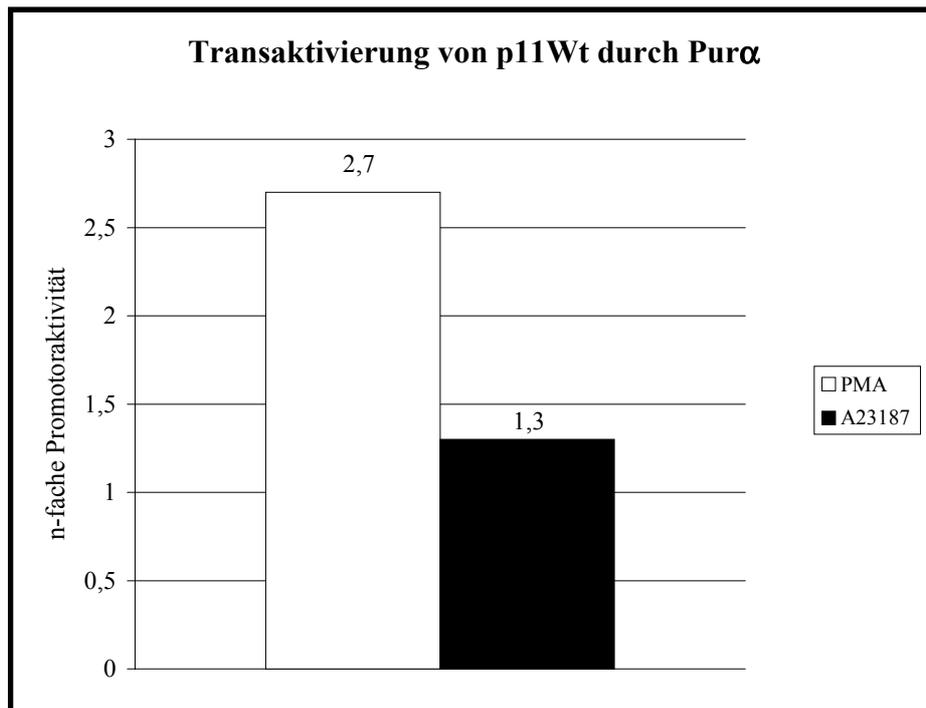


Abb. 5.27.: Vergleich der Transaktivierung von p11Wt durch Pur α in U937-Zellen in Gegenwart des Calciumionophors A23187 (50nM) bzw. PMA.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von zwei weiteren Calciumionophoren auf die funktionelle Aktivität von Pur α untersucht. Pur α aktivierte den CD11c-Promotor in U937-Zellen, die mit 50nM Ionomycin und 50nM 4-Br-A23187 behandelt wurden, um den Faktor 1,5, während in PMA-behandelten U937-Zellen eine 2,5-fache Aktivierung gemessen wurde (Abb. 5.28.).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern unter diesen Versuchsbedingungen nur eine schwache Aktivierung von CD11c durch Pur α ermöglicht.

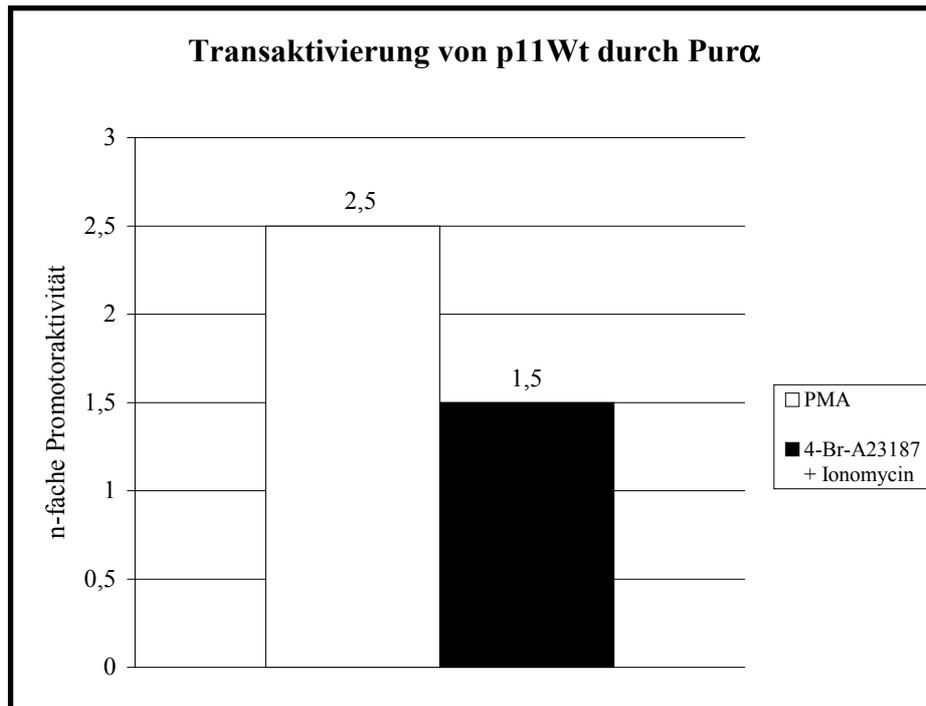


Abb. 5.28.: Vergleich der Transaktivierung von p11Wt durch Pur α in U937-Zellen in Gegenwart der Calciumionophore 4-Br-A23187 und Ionomycin (jeweils 50nM) bzw. PMA.

5.2.5. Pur α kooperiert mit Sp1 während der Differenzierung von U937-Zellen

Die funktionelle Aktivität von Pur α wird durch Interaktion mit mehreren Proteinen, darunter Sp1 [117], YB-1 [118], Pur β [119] und pRb [102] beeinflusst. Da bekannt ist, dass Sp1 den CD11c-Promotor bindet [98] und seine Bindungsstellen mit denen von Pur α überlappen, sollte geklärt werden, ob Pur α und Sp1 einander im CD11c-Promotor beeinflussen. Möglich wäre zum Beispiel, dass die beiden Faktoren miteinander um die Bindung an den CD11c-Promotor konkurrieren. Um dies zu überprüfen, wurde in Transfektionsexperimenten der Einfluss von Sp1 oder Pur α alleine und zusammen auf das Plasmid p11Wt untersucht.

Kotransfektionen von p11Wt mit Sp1 oder Pur α alleine in U937-Zellen zeigten jeweils einen Anstieg der Aktivität des CD11c-Promotors (Abb. 5.29.). Kotransfektion von p11Wt mit Pur α und Sp1 zusammen führten zu einer Aktivierung, die in etwa der Summe der Aktivierungen, die jeweils von Pur α oder Sp1 allein ausgeübt wurden, entsprach.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Pur α und Sp1 bei der Aktivierung des CD11c-Promotors kooperieren, und dass die von ihnen verursachte kooperative Aktivierung nach PMA-Behandlung etwa um den Faktor 2,5 steigt.

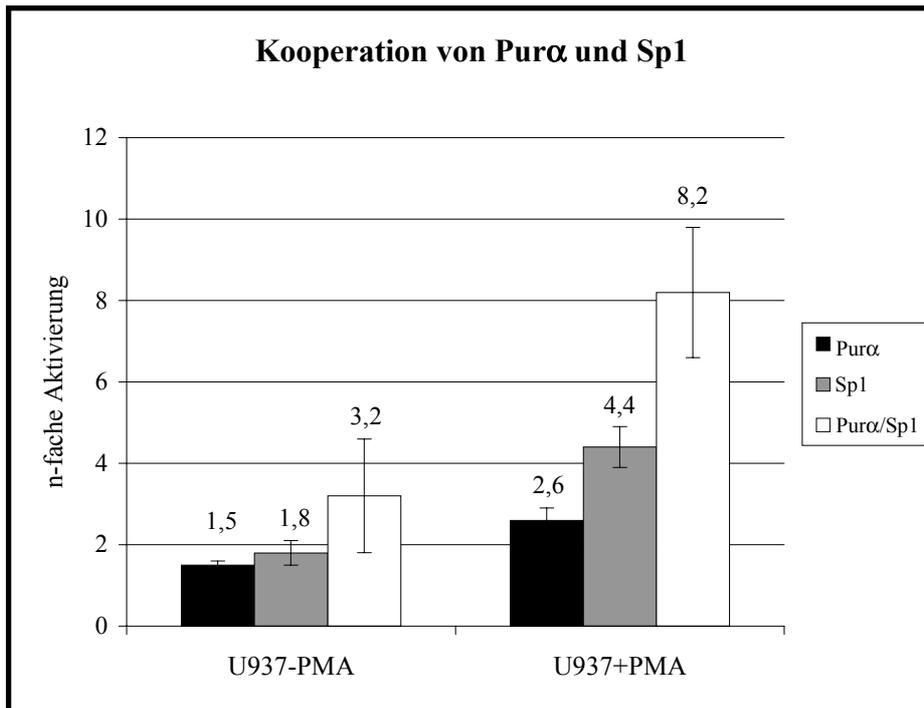


Abb. 5.29.: Transaktivierung von p11Wt durch Sp1, Pur α bzw. Sp1 und Pur α in U937-Zellen in Abwesenheit („U937-PMA“) bzw. Gegenwart von PMA („U937+PMA“).

5.3. Untersuchung der abnormalen CD11c-Expression in Haarzell-Leukämie

5.3.1. Der CD11c-Promotor ist in HZL-Lymphozyten aktiv

CD11c wird in Lymphozyten an Haarzell-Leukämie (HZL) erkrankter Personen so stark exprimiert, dass sein Nachweis als diagnostischer Marker dient. Da möglich ist, dass diese abnormale Expression durch Mutationen im CD11c-Promotor verursacht wird, wurde zuerst *in vitro* untersucht, ob der Wildtyp-CD11c-Promotor (-128/+36) in verschiedenen HZL-Lymphozyten erhöhte Aktivität besitzt. Transfektionsexperimente zeigten, dass die CD11c-Promotoraktivität in den HZL-Zelllinien Mo, EH und HK 3-8 mal höher war als in der Zelllinie IM-9 (Abb. 5.30.). Dies führte zu der Annahme, dass die abnormale CD11c-Expression in HZL auf Veränderungen außerhalb des CD11c-Gens zurückzuführen ist.

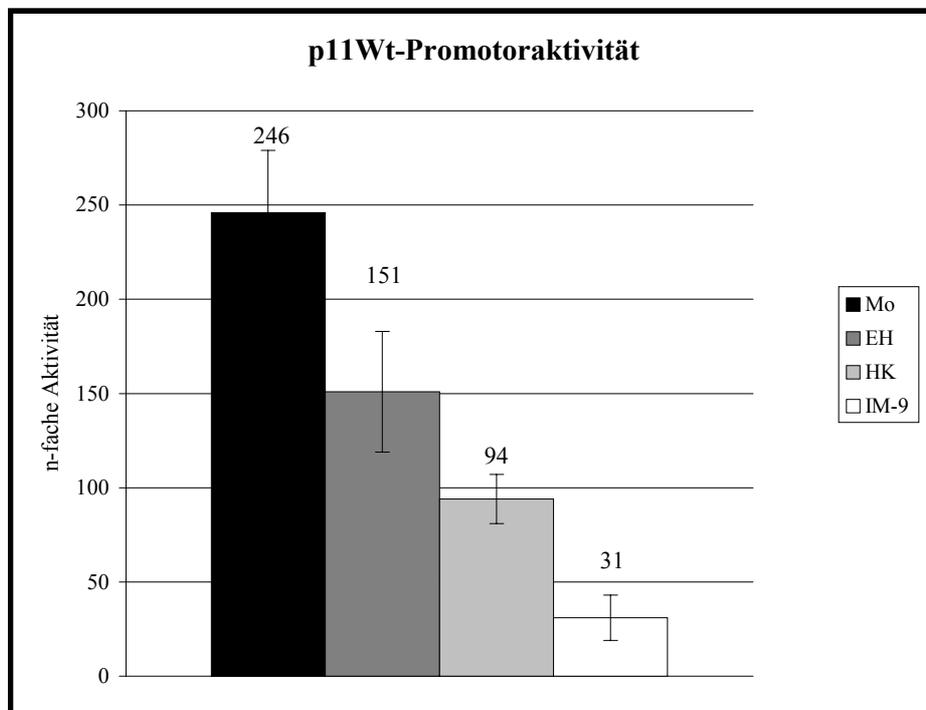


Abb. 5.30.: p11Wt-Promotoraktivität in den HZL-Zelllinien Mo, HK, EH und der Zelllinie IM-9 (B-Lymphozyten) als n-facher Wert der Aktivität des promotorlosen Plasmids pATLuc.

5.3.2. Suppression des CD11c-Promotors in HZL-Lymphozyten

In Vorversuchen war gezeigt worden, dass die CD11c-Promotoraktivität in HZL-Lymphozyten stark von einer AP-1 Bindungsstelle abhängt, und dass in diesen Zellen JunD Hauptbestandteil des an den CD11c-Promotor gebundenen AP-1 Komplexes ist [120].

Um zu untersuchen, ob JunD für die Aktivität des CD11c-Promotors in HZL-Lymphozyten notwendig ist, wurde der Transkriptionsfaktor durch Expression einer dominant negativen Mutante, TAM67, inhibiert. TAM67 wurde durch Entfernen der Transaktivierungsdomäne aus JunD erhalten, ist aber noch in der Lage, DNS zu binden [121, 122]. In Kotransfektionsexperimenten war TAM67 in der Lage, die CD11c-Promotoraktivität um 81% zu reduzieren (Abb. 5.31).

JunD wird durch eine Signalkaskade von Proteinkinasen aktiviert, welche wiederum unter Kontrolle kleiner GTPasen wie Rho, Rac und Ras stehen [123]. Um zu überprüfen, ob die CD11c-Promotoraktivität in Mo-Zellen durch Unterdrückung dieser Signalkaskade reduziert werden kann, wurden Kotransfektionen mit RasN17 durchgeführt, das aufgrund einer Mutation eine geringere Affinität zu GTP besitzt und deshalb bevorzugt im GDP-gebundenen, inaktiven Zustand bleibt [124]. Hierbei zeigte sich, dass die Expression des dominant negativen RasN17 in Mo-Zellen zu einer Reduktion der CD11c-Promotoraktivität um 35% führte (Abb. 5.31.). In HZL-Lymphozyten kann folglich die CD11c-Expression durch Blockade des Ras/JunD Signalweges verringert werden.

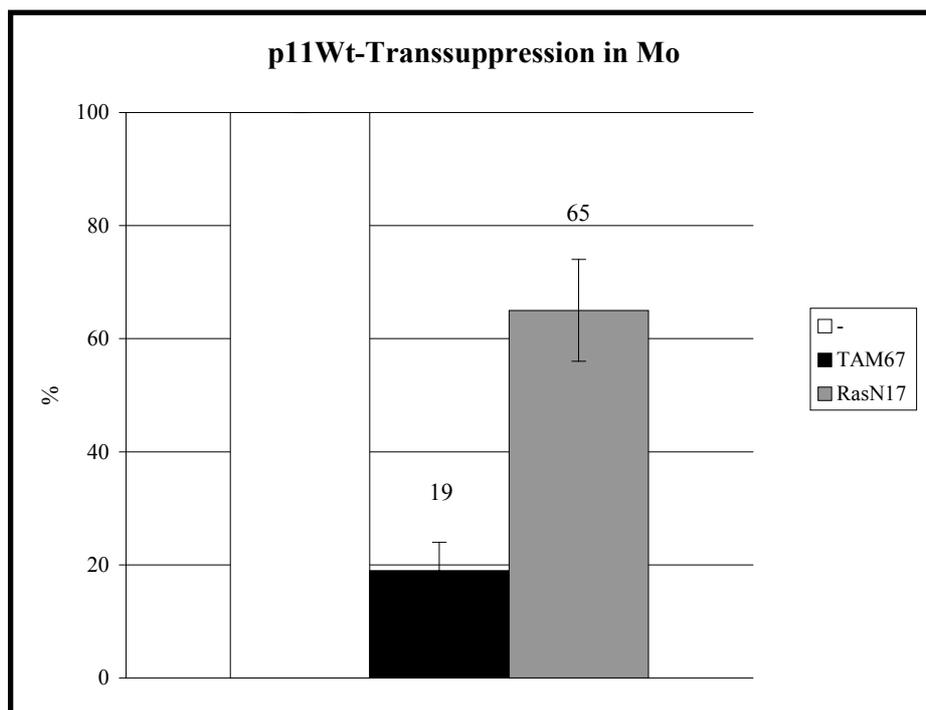


Abb. 5.31.: Unterdrückung der CD11c-Promotoraktivität in der Zelllinie Mo (Haarzell-Leukämie) durch TAM67 (dominant negativ zu JunD) bzw. RasN17 (dominant negativ zu Ras). Die Promotoraktivität von p11Wt bei Kotransfektion des Plasmids pCMV (-) wurde als 100% definiert.

5.3.2. Aktivierung des CD11c-Promotors in Jurkat-Zellen

Um zu überprüfen, ob Überexpression von JunD die CD11c-Expression in Lymphozyten, die nicht HZL-Ursprungs sind, erhöht, wurden Transfektionsexperimente in der Zelllinie Jurkat durchgeführt. Kotransfektion von JunD führte hierbei nicht zu einer Erhöhung der CD11c-Promotoraktivität (98%) (Abb. 5.32.). Aktivierung von endogenem JunD durch Expression der konstitutiv aktiven Ras Mutante RasV12, deren GTPase-Aktivität verringert ist [125], führte jedoch zu einer Aktivierung des CD11c-Promotors auf 346% (Abb. 5.32.). Ausgedrückt als n-fache Aktivität verglichen mit pATLuc beträgt der Wert 131 und ist damit vergleichbar mit CD11c-Promotoraktivitäten in HZL-Lymphozyten.

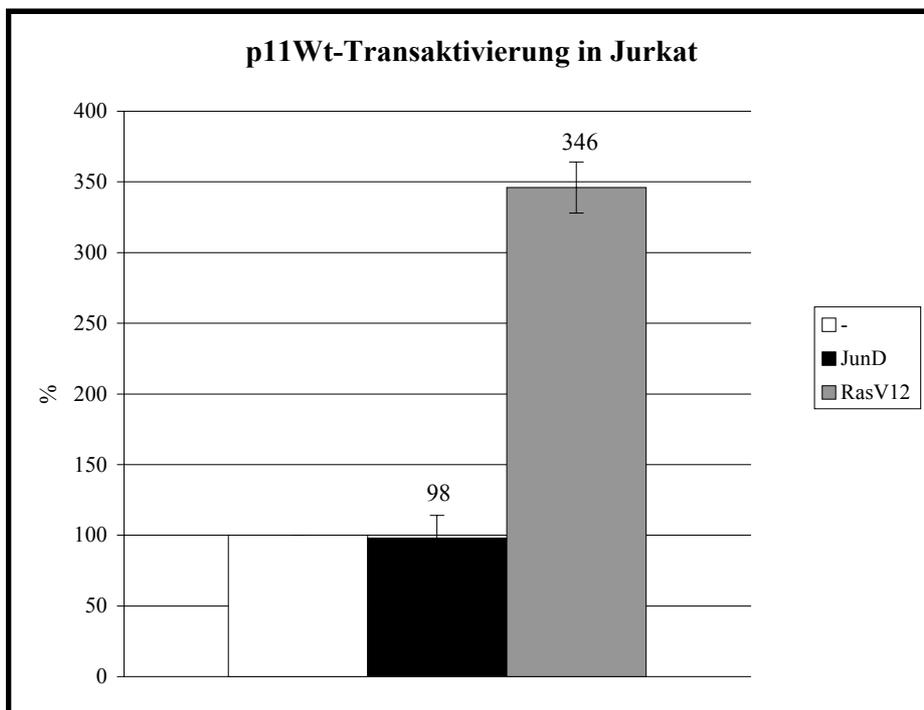


Abb. 5.32.: Erhöhung der CD11c-Promotoraktivität in der Zelllinie Jurkat durch Kotransfektion von JunD bzw. RasV12 (konstitutiv aktive Mutante von Ras). Die Promotoraktivität von p11Wt bei Kotransfektion des Plasmids pCMV bzw. pRSV (-) wurde als 100% definiert.

6. Diskussion der Ergebnisse

6.1. Mögliche Mechanismen zur Regulation des CD43-Promotors

CD43 ist in den meisten humanen Leukozyten exprimiert. Der Promotor des humanen CD43-Gens wird durch Interaktion der Nukleotide (+3/+8) mit dem ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 aktiviert [42]. Die Beschränkung der CD43-Promotoraktivität auf Leukozyten wird durch CpG-Methylierung und anschließende Bindung von MeCP2 an den Promotor erreicht [43, 44].

Die Region +18/+39 des CD43-Promotors besitzt aufgrund ihrer Hypersensitivität *in vitro* gegenüber Nuclease S1 das Potential zur Einzelstrangbildung [103]. Die Bildung einzelsträngiger DNS-Bereiche ist wichtig für Replikation und Transkription, da beide Vorgänge eine lokale Dissoziation des Doppelstrangs erfordern. Das Auftreten einzelsträngiger DNS-Bereiche kann durch flankierende DNS-Sequenzen unterstützt werden, z.B. durch Ausbildung von nicht-klassischen Strukturen. Wiederholt auftretende DNS-Sequenzen, Repetitionen, lassen in Abhängigkeit von ihrer Orientierung alternative Basenpaarungen zu. Direkte Repetitionen ermöglichen „slipped loop“-Strukturen (SL-Strukturen), die zwei ungepaarte Bereiche enthalten [126-129]. Invertierte Repetitionen begünstigen Kreuzstrukturen (*cruciform structures*), die ebenfalls über zwei einzelsträngige Schleifen verfügen [130-133].

Solche Strukturen lassen sich in der Nähe des Transkriptionsstarts des CD43-Gens postulieren. In der Region (-2/+17), die eine Pur α -Bindungsstelle enthält, befinden sich direkte Repetitionen GGTGG. Mit ihrer Hilfe lässt sich eine „slipped loop“-Struktur formulieren, die zur Bildung zweier einzelsträngiger Schleifen führt. Auf einer dieser Schleifen liegen GGN-Repetitionen, die das Bindungsmotiv von Pur α darstellen (Abb. 6.1.). In der Nähe der Region (+18/+39) befinden sich invertierte Repetitionen (CAGGGCCC bzw. GGGCCCTG), aufgrund derer eine Kreuzstruktur in diesem Bereich formuliert werden kann. Auf einem der einzelsträngigen Bereiche dieser Struktur befindet sich die Bindungsstelle von PyRo1/hnRNP-K (TCCCCT).

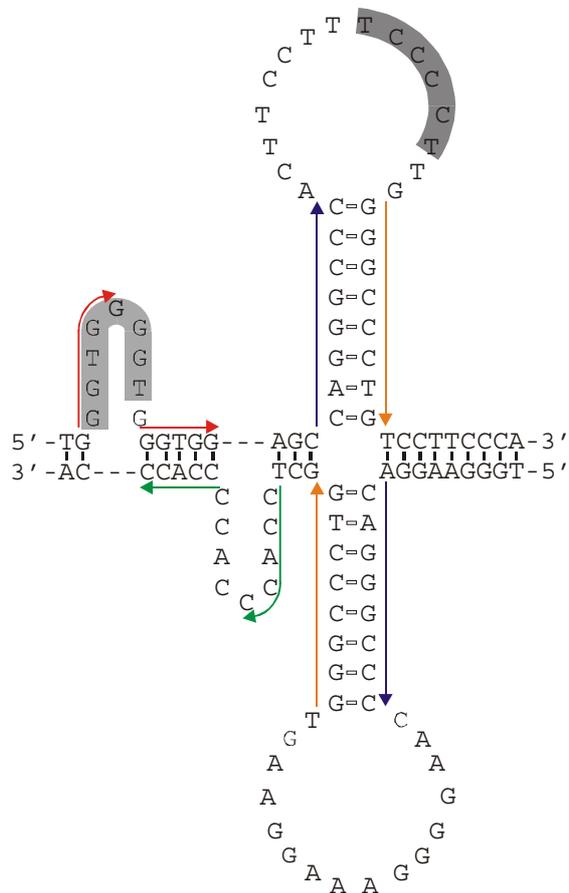


Abb. 6.1.: *Oben*: Die doppelsträngige Sequenz der Region (-4/+48) des CD43-Promotors. Die direkten und invertierten Repetitionen sind mit Pfeilen markiert.

Darunter: Schema der potenziellen „slipped loop“-Struktur der Region (-2/+17) und Kreuzstruktur der Region (+18/+39) des CD43-Promotors nach [105]. Die Kreuzstruktur kommt durch Ausbildung von Basenpaaren zwischen den invertierten Repetitionen eines DNS-Stranges zustande. Die einzelsträngigen Bindungssequenzen von Pur α und PyRo1/hnRNP-K sind hellgrau bzw. dunkelgrau unterlegt.

Die Region (+18/+39) ist notwendig für die Aktivität des CD43-Promotors, da ihre Deletion zu einer Verringerung der Promotoraktivität um etwa 88% führt. Im Gegensatz dazu wirken sich Mutationen, die ihre Bindung zu PyRo1 beeinträchtigen, wesentlich geringer auf die Promotoraktivität aus. Daher ist nicht anzunehmen, dass der Effekt der Deletion auf die Promotoraktivität durch fehlende Interaktion mit

Transkriptionsfaktoren, speziell PyRo1/hnRNP-K, verursacht wird, sondern wahrscheinlich durch die hypersensitive Region selbst, möglicherweise durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung der oben skizzierten Kreuzstruktur, die nahe des Transkriptionsstarts liegt.

An die beiden in der Nähe des Transkriptionsstarts gelegenen potenziell einzelsträngigen Bereiche (-2/+17) und (+18/+39) wurde *in vitro* nach PMA-Behandlung Bindung der Transkriptionsfaktoren PyRo1/hnRNP-K und Pur α nachgewiesen. hnRNP-K (Swissprot#Q07244) bindet Poly(C)-Sequenzen in Nukleinsäuren und gehört zu einer etwa 20 Mitglieder umfassenden Proteinfamilie, die ubiquitär exprimiert und unter anderem an Transkription, Translation, Spleißen und Kontrolle der Stabilität von mRNS beteiligt ist [134]. Die Struktur des gesamten Proteins wurde bisher nicht aufgelöst, lediglich die Kristallstruktur einer Domäne (KH3), die einzelsträngige DNS bindet, wurde bestimmt [135]. Von hnRNP-K sind vier verschiedene Varianten mit 458 bis 464 Aminosäuren und Molekulargewichten um 50kDa bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen, und Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C (PKC) [136] und *src*-Kinasen [137] besitzen (Abb. 6.2.).



Abb. 6.2.: Darstellung von hnRNP-K nach [136]. Am N-Terminus befindet sich eine saure Region (rot). Die drei K-Homologie Domänen (KH1-3) und die RGG-Box (RGG) sind an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligt. Die Funktion der Prolin-reichen Sequenz (P) ist nicht bekannt. Tyr²³⁶ und Ser³⁰², die von *src*-Kinasen bzw. PKC phosphoryliert werden, sind mit Y bzw. S gekennzeichnet. An- oder Abwesenheit zweier C-terminaler Bereiche (schwarz bzw. weiß) unterscheidet die vier bekannten Spleißvarianten.

src-Kinasen werden in Monozyten in einem CD14-abhängigen Prozess aktiviert [138] und phosphorylieren hnRNP-K an Tyr²³⁶. Dadurch wird anschließende Phosphorylierung von hnRNP-K an Ser³⁰² durch PKC begünstigt [137], ein Vorgang, der *in vitro* auch in PMA-stimulierten COS-Zellen beobachtet wurde [139]. *In vitro* Studien zeigen, dass Phosphorylierung von hnRNP-K seine Affinität zu RNS [136] und DNS [140] beeinflusst. Zusammengefasst lässt dies folgende Hypothese zu: Die geringe Affinität von hnRNP-K zum CD43-Promotor in ruhenden Monozyten wird nach Aktivierung der Zellen durch posttranslationale Modifikationen, möglicherweise Phosphorylierung durch mehrere Kinasen, erhöht. Dadurch wird die Bindung von hnRNP-K an den CD43-Promotor begünstigt (Abb. 6.3.).

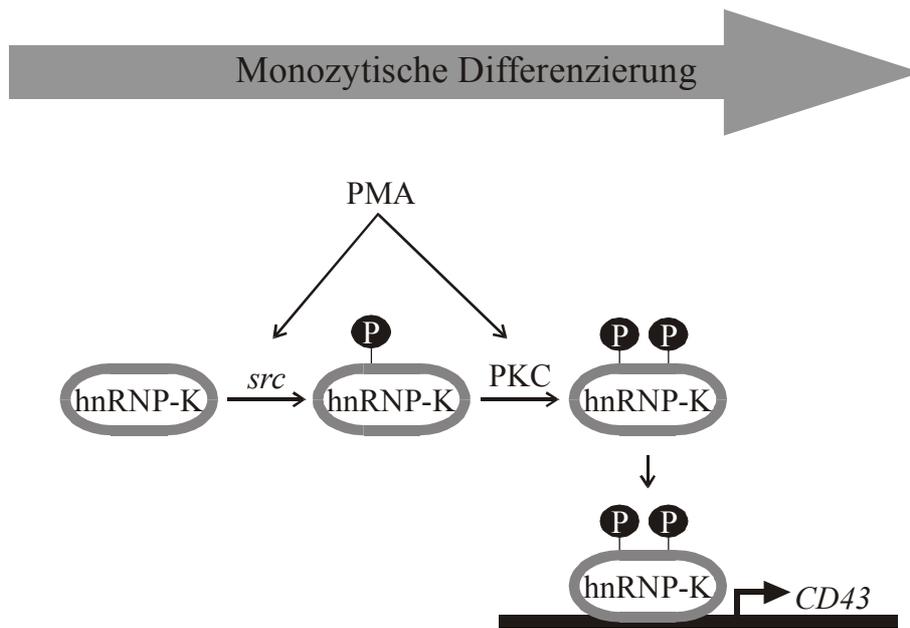


Abb. 6.3.: Möglicher Mechanismus zur Modulation der DNS-Affinität von hnRNP-K im Verlauf der monozytischen Aktivierung *in vitro*. PMA aktiviert *src*-Kinasen (*src*) und Proteinkinase C (PKC), die hnRNP-K phosphorylieren und dadurch seine DNS-Affinität erhöhen.

Pur α (Swissprot#Q00577) wurde zuerst in humanen HeLa-Zellen aufgrund seiner Fähigkeit, einzelsträngige Purin-reiche DNS zu binden, entdeckt [111]. Später wurden homologe Proteine in verschiedenen Geweben anderer Organismen nachgewiesen [141-143]. Das ursprünglich charakterisierte 28kDa Polypeptid stellt vermutlich nur einen Teil des gesamten Proteins dar, das aus 322 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 39kDa besteht. Die Struktur von Pur α ist nicht bekannt, aber verschiedenen Domänen konnten Funktionen wie Bindung von DNS oder anderen Proteinen zugeordnet werden [144] (Abb. 6.4.).

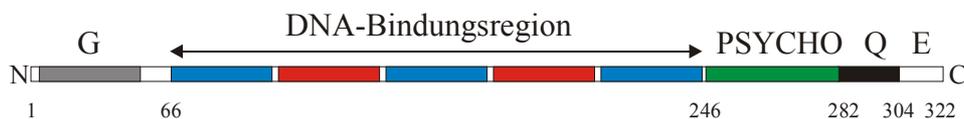


Abb. 6.4.: Domänen des humanen Transkriptionsfaktors Pur α : (G) Glycin-reicher Bereich unbekannter Funktion, DNS-Bindungsregion mit drei basischen (blau) und zwei sauren (rot) Bereichen, (PSYCHO) homolog zu viralen Proteinen, (Q) Glutamin-reicher Transaktivator, (E) Glutamat-reiche Region unbekannter Funktion, nach [144].

Puro α bindet bevorzugt Wiederholungen des Motivs GGN in einzelsträngiger DNS und RNS [111] und beeinflusst in Säugetieren die Expression mehrerer Gene, darunter die für myelin basic protein [142, 145], TGF β 1 [146], smooth muscle α -actin [147, 148], c-Myc [111, 149], Neuropeptid Y [116], nicotinic acetylcholine receptor subunit β 4 (nAChR β 4) [116] und FE65 [150]. Des Weiteren ist Puro α an der Regulation viraler Sequenzen beteiligt, z.B. in HIV-1 [151] und JCV [118].

Puro α bindet und supprimiert den CD43-Promotor in PMA-behandelten U937-Zellen. Die Bindungsstelle überlappt mit der des Transkriptionsfaktors Sp1, der bevorzugt doppelsträngige DNS bindet und den CD43-Promotor aktiviert. Eine ähnliche Situation ist im nAChR β 4-Promotor bekannt, wo Bindung von hnRNP-K und Puro α an die Region E1 dazu führt, dass die benachbarte, Sp1-bindende Region E2 bevorzugt einzelsträngig vorliegt. Dadurch wird die Bindung von Sp1 an die Region E2 inhibiert, was zur Inaktivierung des nAChR β 4-Promotors führt [141] (Abb. 6.5.). Eine vergleichbare Situation ist auch in Monozyten vorstellbar: Im ruhenden Zustand bindet Sp1 den CD43-Promotor und bewirkt die Expression des Gens. Im Verlauf der monozytischen Aktivierung binden hnRNP-K und Puro α an den CD43-Promotor und halten ihn in einer einzelsträngigen Konformation, die eine geringere Affinität zu Sp1 hat, wodurch die Aktivität des Promotors sinkt.

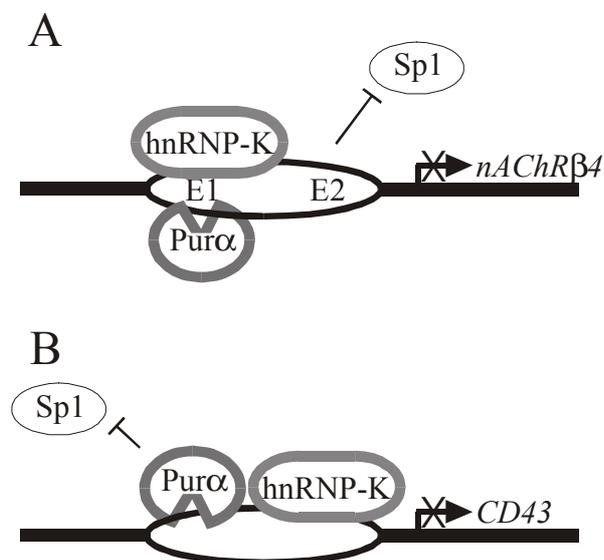


Abb. 6.5.: (A) hnRNP-K und Puro α supprimieren den nAChR β 4-Promotor durch Bildung einer einzelsträngigen Region (dünne Linie), die eine geringere Affinität zu dem Aktivator Sp1 besitzt, nach [141]. (B) Mögliche Inaktivierung des CD43-Promotors in aktivierten Monozyten durch einen ähnlichen Mechanismus. Die putative Sekundärstruktur aus Abb. 6.1. ist vereinfacht wiedergegeben.

6.2. Mögliche Mechanismen zur Regulation des CD11c-Promotors

Der CD11c-Promotor besitzt in ruhenden Monozyten nur geringe Aktivität, die im Verlauf der monozytischen Aktivierung erheblich zunimmt. Die Expression von CD11c wird von mehreren Transkriptionsfaktoren, darunter Oct-2 [95], Sp1 [91, 98], Sp3 [92], AP-1 [87], PU.1 [89], C/EBP [94], c-Myb [93], MS-2 [97] und einem Ets-Faktor [88] beeinflusst.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung der Transkriptionsfaktoren PyRo1/hnRNP-K und Pur α an den CD11c-Promotor und die Bedeutung ihrer Bindungsstellen für seine Aktivität demonstriert. Da beide Faktoren bevorzugt einzelsträngige DNS binden, liegt es nahe, nicht-klassische Sekundärstrukturen mit einzelsträngigen Bereichen zu formulieren.

Die Region (-128/-110) des CD11c-Promotors bindet in aktivierten Monozyten PyRo1/hnRNP-K und ist von Bedeutung für die Promotoraktivität, was vermuten lässt, dass sie potenziell einzelsträngig vorliegt. Unter Zuhilfenahme der direkten Repetitionen TGGGGG können „slipped loop“-Strukturen gebildet werden, auf deren einzelsträngigen Schlaufen C-reiche Bindungsstellen für PyRo1/hnRNP-K liegen (Abb. 6.6.).

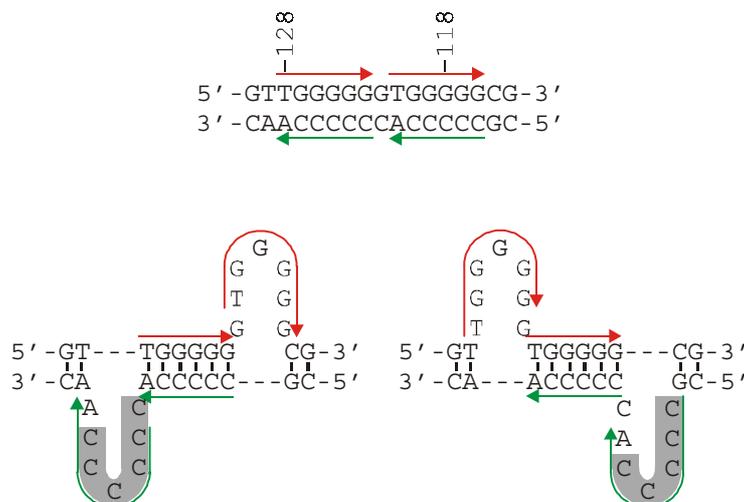


Abb. 6.6.: Die doppelsträngige Region (-128/-114) des CD11c-Promotors, darunter zwei mögliche Sekundärstrukturen mit einzelsträngigen Schlaufen, auf denen Bindungsstellen für PyRo1/hnRNP-K liegen.

Der CD11c-Promotor besitzt außerdem direkte Repetitionen, welche mit der Pur α -Bindungsstelle im Bereich der Nukleotide (-44/-29) überlappen und unter deren Zuhilfenahme sich ebenfalls in diesem Bereich eine „slipped loop“-Struktur

formulieren lässt. Eine der hierbei resultierenden Sekundärstrukturen besitzt eine Pur α -Bindungsstelle, die bis auf ein G einzelsträngig vorliegt (Abb. 6.7.).

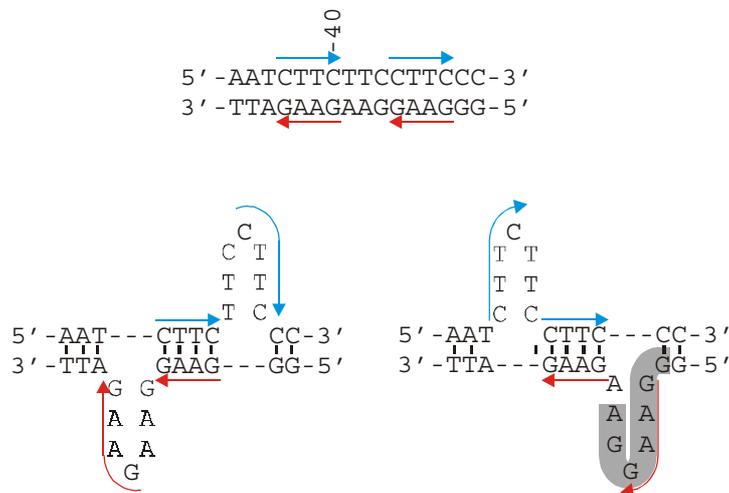


Abb. 6.7.: Die Sequenz (-46/-31) des CD11c-Promotors mit der Pur α -Bindungsstelle um die Nukleotide (-40/-30), darunter zwei mögliche „slipped loop“-Strukturen. Die Repetitionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die einzelsträngige Pur α -Bindungsstelle ist grau hinterlegt.

In diesem Fall würden die in p11 Δ Pur eingeführten Mutationen, die zu einem Rückgang der Promotoraktivität um etwa 90% führten, allerdings nicht nur die Pur α -Bindung beeinträchtigen, sondern auch die Bildung der „slipped loop“-Struktur, da sich die mutierten Nukleotide teilweise in einer der direkten Repetitionen befinden.

Kürzlich wurde berichtet, dass Pur α in der Lage ist, DNS-Doppelstränge zu dissoziieren [152]. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung lässt sich auch ein Mechanismus vorstellen, in dem Pur α direkt an den DNS-Doppelstrang bindet, seine Dissoziation begünstigt und auf diese Weise zur Bildung einzelsträngiger Regionen im CD11c-Promotor führt. In diesem Falle wäre die geringere Aktivität von p11 Δ Pur auf die fehlende Bindung von Pur α zurückzuführen.

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden lassen sich die beiden erwähnten Strukturen nicht unterscheiden. Ihre Bildung könnte sich aber ähnlich auf den Promotor auswirken, sei es durch die Dissoziation der DNS-Stränge nahe des Transkriptionsstarts, oder durch Erzeugung eines einzelsträngigen DNS-Gelenkes, das die Wechselwirkung verschiedener, DNS-gebundener Faktoren ermöglicht.

In der Zelllinie HL-60 wurde nach PMA-Behandlung Bindung eines nicht näher charakterisierten Ets-Faktors an eine teilweise mit der Pur α -Bindungsstelle überlappende Sequenz beobachtet [88]. Dies scheint schwer vereinbar mit dem Modell der Pur α -Bindung und der Bildung einer einzelsträngigen DNS-Region.

Möglicherweise reflektieren diese Ergebnisse einen Unterschied zwischen den Zelllinien U937 und HL-60. Zelllinienspezifische Unterschiede bei der Besetzung einer Bindungsstelle nahe des CD11c-Transkriptionsstarts sind bekannt. Zum Beispiel bindet in der monozytischen Zelllinie THP-1 PU.1 diese Sequenz, in U937-Zellen binden darüber hinaus GABP-Proteine [89].

In verschiedenen Studien wurden mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im CD11c-Promotor mutiert oder entfernt [87, 88, 91, 94, 95, 103]. Durch Vergleich der Aktivitäten der resultierenden mutierten Promotoren mit der Aktivität der ursprünglichen Sequenz lässt sich der Einfluss der verschiedenen Promotorabschnitte abschätzen (Abb. 6.8.). Hierbei zeigt sich, dass die Mutation der Pur α -Bindungsstelle zur geringsten CD11c-Promotoraktivität führt. Dies unterstreicht, unabhängig von der Sekundärstruktur des CD11c-Promotors, die Bedeutung dieser Pur α -Bindungsstelle.

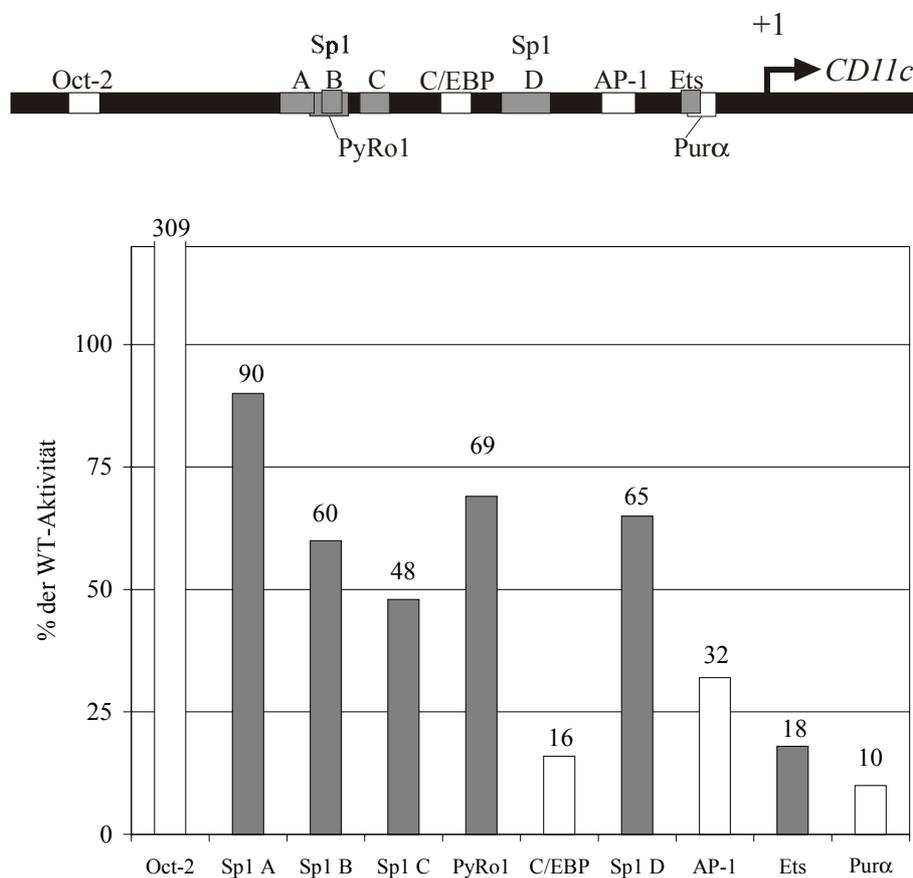


Abb. 6.8.: Mutationen (weiß) und Deletionen (grau) im CD11c-Promotor und ihre Auswirkungen auf seine Aktivität in monozytischen Zelllinien. Die Mutation der Pur α -Bindungsstelle führt zur stärksten Verringerung der Promotoraktivität. Darstellung der CD11c-Promotorregion nicht maßstäblich, nach [87, 88, 91, 94, 95, 103].

In der PMA-behandelten Zelllinie U937, einem *in vitro* Modell für aktivierte Monozyten, aktiviert Pur α den CD11c-Promotor um den Faktor 3,5. Dies ist vergleichbar mit der von anderen Transkriptionsfaktoren verursachten Aktivierung des CD11c-Promotors in der monozytischen Zelllinie HL-60. Sp3 aktiviert die Promotoraktivität in diesem System um den Faktor 4,3, Sp1 um den Faktor 3,4 [92], c-fos um den Faktor 2,5 und c-jun um den Faktor 1,8 [88]. In der Zelllinie HeLa aktiviert C/EBP α den CD11c-Promotor um den Faktor 2 [94].

Unter physiologischen Bedingungen wird PKC durch Diacylglycerin aktiviert, das zusammen mit IP₃ durch Hydrolyse von PIP₂ gebildet wird. IP₃ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern, z.B. den Calcisomen, welches ebenfalls PKC aktiviert und zusätzlich durch Interaktion mit Calmodulin die Funktion anderer Proteine reguliert. Da Pur α in Gegenwart von Calmodulin *in vitro* eine höhere Affinität zu DNS besitzt [116], wurde untersucht, ob die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern hinreichend für die Aktivierung des CD11c-Promotors durch Pur α ist.

Unter den verwendeten Bedingungen wurde nur eine geringfügige Aktivierung des CD11c-Promotors durch Pur α in Gegenwart verschiedener Calciumionophoren beobachtet. Bei Behandlung mit 50nM A23187 wurde der CD11c-Promotor von Pur α um den Faktor 1,3 transaktiviert, in Gegenwart von 50nM Ionomycin und 50nM 4-Br-A23187 um den Faktor 1,5. Die Freisetzung von Ca²⁺ befähigte Pur α unter diesen Bedingungen nur zu einer geringen Aktivierung des CD11c-Promotors. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass sich bei Behandlung von U937-Zellen mit Calciumionophoren die Expression der β_2 -Integrine nicht erhöht [153]. Dennoch scheint die Freisetzung von Ca²⁺ notwendig für die Aktivierung des CD11c-Promotors zu sein, da bei gleichzeitiger Anwesenheit von PMA und Ca²⁺-Antagonisten keine Erhöhung der CD11c-Expression gemessen wurde [153].

Die Aktivität von Pur α wird durch Bindung anderer Proteine, darunter YB-1 [118], T-Antigen [154], pRb [102], Pur β [119], Calmodulin [116] und Sp1 [117], beeinflusst. Von diesen Proteinen bindet nur Sp1 ebenfalls den CD11c-Promotor, und zwar an drei Positionen, die mit den Pur α -Bindungsstellen überlappen [90-92, 94, 98]. Die einzelnen Bindungsstellen sollten nicht gleichzeitig von beiden Faktoren besetzt werden, da Pur α einzelsträngige DNS, Sp1 hingegen doppelsträngige DNS bevorzugt. Experimente, die den Einfluss der beiden Transkriptionsfaktoren aufeinander bestimmen sollten, zeigten, dass Pur α und Sp1 bei der Aktivierung des CD11c-Promotors kooperieren. Für diesen Effekt existieren verschiedene Erklärungen. Die beiden Faktoren könnten zur gleichen Zeit den CD11c-Promotor an unterschiedlichen Stellen binden und auf diese Weise ihren Einfluss auf den Promotor verstärken.

Eine andere Erklärung wäre die Modulation der Pur α -DNS-Bindung durch Sp1. Im Gehirn der Maus kooperieren Sp1 und Pur α bei der Aktivierung des MBP-Gens [117].

In Geweben mit höchster MBP-Expression wurde eine phosphorylierte Form von Sp1 beobachtet, die eine höhere Affinität zu Pur α besaß und deren Fähigkeit zur DNS-Bindung erhöhte. Die Interaktion zwischen Pur α und Sp1 wurde nur in Abwesenheit von DNS beobachtet, gleichzeitige Bindung an DNS hingegen nicht. Eine ähnliche Situation tritt auch in humanen Monozyten auf. Im Verlauf ihrer Differenzierung kommt es zur Phosphorylierung von Sp1 [155, 156], zur Erhöhung der DNS-Affinität von Pur α und zu einem Anstieg der CD11c-Promotoraktivität. Ein Mechanismus ähnlich dem im Gehirn der Maus ist also auch in humanen Monozyten vorstellbar: Demnach würde Sp1 im Verlauf der monozytischen Differenzierung phosphoryliert, anschließend Pur α binden und es dergestalt modifizieren, dass dessen Affinität für den CD11c-Promotor steigt (Abb. 6.9.).

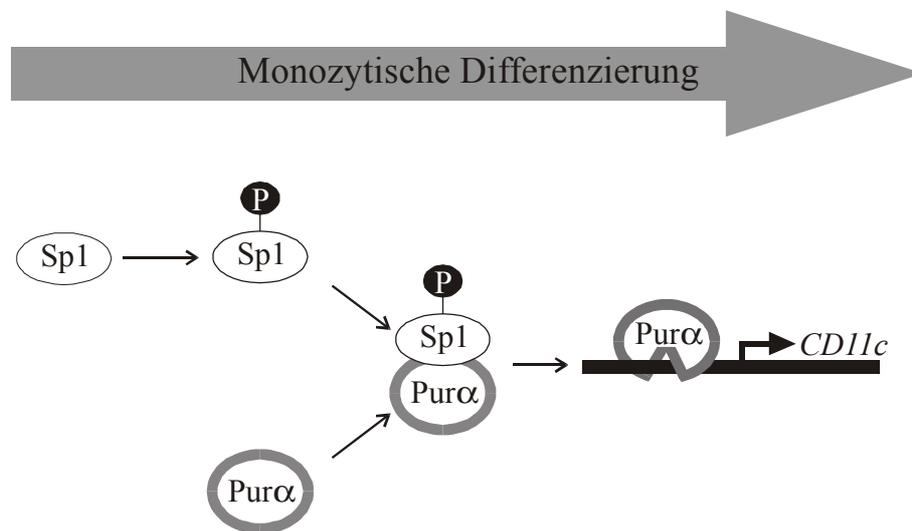


Abb. 6.9.: Möglicher Mechanismus der Kooperation zwischen Sp1 und Pur α . Im Verlauf der Differenzierung wird Sp1 phosphoryliert, diese Form bindet Pur α und erhöht dessen DNS-Affinität.

6.3. Vergleich von Pur α mit MS-2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass Pur α im Verlauf der Differenzierung von Monozyten Teil eines Mechanismus zur Verringerung der CD43- und Erhöhung der CD11c-Promotoraktivitäten ist. Da während der monozytischen Differenzierung auch die Aktivität der CD11a- und CD11b-Promotoren erhöht wird, stellt sich die Frage nach weiteren Mechanismen zu ihrer koordinierten Regulation. Mehrere Transkriptionsfaktoren, darunter der bislang nicht identifizierte Faktor MS-2 [97, 41], regulieren die CD11a- und CD11b-Promotoren (Abb. 6.10.).

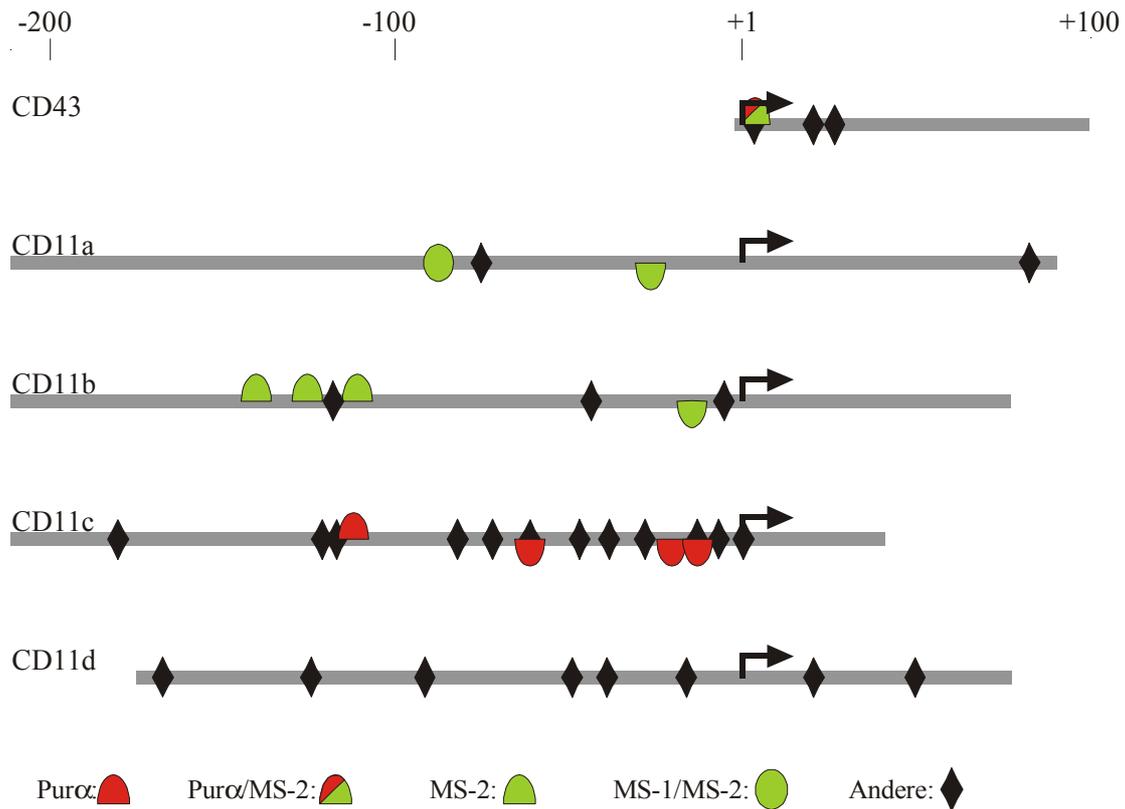


Abb. 6.10.: Die Promotoren der humanen CD43- und CD11-Gene und daran bindende Faktoren. Nach [41, 42, 87, 91-95, 97, 98, 103-105, 157-159]

Beim Vergleich von MS-2 mit Pur α lassen sich einige Gemeinsamkeiten feststellen. Beide Faktoren wurden in den gleichen untersuchten Zelllinien, nämlich HeLa, CEM, K562 und PMA-behandelten U937 beobachtet und binden das gleiche DNS-Motiv, nämlich Häufungen des Triplets GGN, wobei N für alle Basen außer G steht [41, 97, 104, 105, 111]. Die Erkennungssequenz von MS-2 wurde ursprünglich mit Hilfe von Gelshift-Versuchen als CCNCCC definiert [41] und im folgenden zu einer etwas variableren Sequenz erweitert [97]. In beiden Studien zu MS-2 wurde allerdings doppelsträngige DNS verwendet, weswegen in der MS-2-DNS-Bindungsreaktion nicht nur der C-reiche, sondern auch der dazu komplementäre G-reiche Strang vorhanden war. Da kurze doppelsträngige DNS-Sequenzen zu einem nicht unerheblichen Grad in ihre Einzelstränge dissoziieren, war somit in den Bindungsreaktionen auch einzelsträngige, G-reiche DNS präsent. Die Analyse der MS-2 bindenden, komplementären Sequenzen ergibt das Pur α -Konsensusmotiv (Abb. 6.11.).

JunD stellt in HZL-Lymphozyten den Hauptbestandteil von AP-1 dar, war aber in Transfektionsexperimenten in Lymphozyten anderen Ursprungs nicht hinreichend, um den CD11c-Promotor zu aktivieren. Hierfür wurden zwei mögliche Erklärungen in Betracht gezogen: Erstens könnten HZL-Lymphozyten mutiertes JunD exprimieren, dessen Fähigkeit zur Aktivierung des CD11c-Promotors nicht durch Expression des Wildtyp-Proteins erreicht wird. Mehrere Mutationen der Jun- und Fos-Proteine, die ihre Funktionen beeinflussen und mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht werden, sind bekannt [174-183]. Eine zweite Erklärung besteht darin, dass möglicherweise spezifisch in HZL-Lymphozyten eine konstitutive Aktivierung von AP-1 bzw. JunD durch *upstream* gelegene Kontrollmechanismen vorliegt. Menge und Aktivität der Jun- und Fos-Proteine wird durch Kontrolle der Transkription und diverse posttranslationale Modifikationen reguliert [174, 175, 184-197]. Phosphorylierung der Jun- und Fos-Proteine wird von den kleinen GTPasen Ras, Rac, Cdc42 und einer nachgeschalteten Kaskade mehrerer Proteinkinasen kontrolliert [198-200]. Ras reguliert Rac und Cdc42, die auch Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen, besonders die Bildung von Lamellipodien und Filopodien [201, 202]. Solche morphologischen Veränderungen sind ebenfalls typisch für HZL-Lymphozyten. Eine fehlerhafte, chronische Expression von H-Ras wurde in der HZL-Zelllinie ESKOL beobachtet [203]. Die Ergebnisse der Kotransfektionen mit RasN17 und RasV12 zeigen, dass Ras sowohl in HZL-Lymphozyten als auch Lymphozyten anderen Ursprungs zur Aktivität des CD11c-Promotors beiträgt. Fehlerhafte Kontrolle von Ras könnte eine gemeinsame Ursache für die abnormale Proliferation, Morphologie und CD11c-Expression der Lymphozyten bei HZL darstellen.

7. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* demonstriert, dass die Aktivitäten der CD43- und CD11c-Promotoren von PyRo1/hnRNP-K-Bindungsstellen beeinflusst werden. Kotransfektionen mit hnRNP-K-Expressionsplasmiden werden es erlauben, eventuelle Transaktivierung der Promotoren durch PyRo1/hnRNP-K zu messen.

Die Transkriptionsfaktoren Pur α und MS-2 sind hinsichtlich ihrer funktionalen Aktivität, DNS-Bindungssequenz und ihrem Molekulargewicht bislang ununterscheidbar. Erste Hinweise zur Klärung der Frage, ob die beiden Faktoren identisch sind, können Supershift-Experimente mit MS-2-bindenden Oligonukleotiden und α -Pur α -Antikörpern liefern. Isolierung von MS-2 und Bestimmung seiner Aminosäuresequenz beziehungsweise Klonieren des entsprechenden Gens sollte gesicherte Erkenntnisse diesbezüglich liefern.

HZL-Lymphozyten exprimieren konstitutiv CD11c und besitzen eine veränderte, Makrophagen-ähnliche Morphologie. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem *in vitro* Modell gezeigt, dass der CD11c-Promotor in HZL-Lymphozyten unter Kontrolle des proto-Onkogens Ras steht. Im nächsten Schritt sollte *in vitro* die Hypothese überprüft werden, dass Ras auch für die Morphologie von HZL-Lymphozyten verantwortlich ist.

8. Publikationen und eingereichte Manuskripte

O. C. Farokhzad, J. M. Teodoridis, H. Park, M. A. Arnaout und C. S. Shelley, *CD43 Gene Expression is Mediated by a Nuclear Factor Which Binds Pyrimidine-Rich Single-Stranded DNA*, *Nucleic Acids Res*, 28 (2000), S. 2256-67.

C. S. Shelley, N. Da Silva und J. M. Teodoridis, *During U937 Monocytic Differentiation Repression of the CD43 Gene Promoter is Mediated by the Single-Stranded DNA Binding Protein Pur α* , *Br J Haematol*, 115 (2001), S. 159-66.

C. S. Shelley, J. M. Teodoridis, H. Park, O. C. Farokhzad, E. P. Bottinger und M. A. Arnaout, *During Differentiation of the Monocytic Cell Line U937, Pur α Mediates Induction of the CD11c β_2 Integrin Gene Promoter*, *J Immunol*, 168 (2002), S. 3887-93.

F. Vavva, J. M. Teodoridis, H. Park, A. Georgakis, O. C. Farokhzad, E. P. Bottinger, N. Da Silva, P. Rousselot, C. Chomienne, M. A. Arnaout und C. S. Shelley, *CD11c Gene Expression in Hairy-Cell Leukemia is Dependent Upon Activation of the Proto-Oncogenes Ras and JunD*, *Blood*, Submitted (2002).

9. Literaturverzeichnis

- [1] I. Roitt, J. Brostoff und D. Male, *Immunology*, Mosby, London, 1998.
- [2] C. W. Chow, S. Grinstein und O. D. Rotstein, *Signaling Events in Monocytes and Macrophages*, New Horiz, 3 (1995), S. 342-51.
- [3] B. K. English, J. N. Ihle, A. Myracle und T. Yi, *Hck Tyrosine Kinase Activity Modulates Tumor Necrosis Factor Production by Murine Macrophages*, J Exp Med, 178 (1993), S. 1017-22.
- [4] I. Stefanova, M. L. Corcoran, E. M. Horak, L. M. Wahl, J. B. Bolen und I. D. Horak, *Lipopolysaccharide Induces Activation of CD14-Associated Protein Tyrosine Kinase p53/56lyn*, J Biol Chem, 268 (1993), S. 20725-8.
- [5] C. D. Beaty, T. L. Franklin, Y. Uehara und C. B. Wilson, *Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Production in Human Monocytes: Role of Tyrosine Phosphorylation in Transmembrane Signal Transduction*, Eur J Immunol, 24 (1994), S. 1278-84.
- [6] M. Guha und N. Mackman, *LPS Induction of Gene Expression in Human Monocytes*, Cell Signal, 13 (2001), S. 85-94.
- [7] C. Hagemann und J. L. Blank, *The Ups and Downs of MEK Kinase Interactions*, Cell Signal, 13 (2001), S. 863-75.
- [8] D. Hanahan und R. A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, Cell, 100 (2000), S. 57-70.
- [9] B. Brenner, E. Gulbins, K. Schlottmann, U. Koppenhoefer, G. L. Busch, B. Walzog, M. Steinhausen, K. M. Coggeshall, O. Linderkamp und F. Lang, *L-Selectin Activates the Ras Pathway Via the Tyrosine Kinase p56lck*, Proc Natl Acad Sci U S A, 93 (1996), S. 15376-81.
- [10] B. Brenner, S. Weinmann, H. Grassme, F. Lang, O. Linderkamp und E. Gulbins, *L-Selectin Activates JNK Via src-Like Tyrosine Kinases and the Small G- Protein Rac*, Immunology, 92 (1997), S. 214-9.
- [11] T. Meyer, D. Holowka und L. Stryer, *Highly Cooperative Opening of Calcium Channels by Inositol 1,4,5- Trisphosphate*, Science, 240 (1988), S. 653-6.
- [12] C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, P. Aller, E. Yague und C. Bernabeu, *Phorbol Esters Induce Differentiation of U-937 Human Promonocytic Cells in the Absence of LFA-1/ICAM-1-Mediated Intercellular Adhesion*, Eur J Biochem, 191 (1990), S. 599-604.
- [13] S. Matikainen und M. Hurme, *Comparison of Retinoic Acid and Phorbol Myristate Acetate as Inducers of Monocytic Differentiation*, Int J Cancer, 57 (1994), S. 98-103.
- [14] A. H. Guse, E. Roth und F. Emmrich, *Intracellular Ca²⁺ Pools in Jurkat T-Lymphocytes*, Biochem J, 291 (1993), S. 447-51.

- [15] R. W. Holl, M. O. Thorner, J. R. Zysk und D. A. Leong, *Ionophore Bromo-A23187 Reveals Cellular Calcium Stores in Single Pituitary Somatotropes*, *Mol Cell Endocrinol*, 64 (1989), S. 105-10.
- [16] C. S. Shelley, E. Remold-O'Donnell, A. E. Davis, 3rd, G. A. Bruns, F. S. Rosen, M. C. Carroll und A. S. Whitehead, *Molecular Characterization of Sialophorin (CD43), the Lymphocyte Surface Sialoglycoprotein Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989), S. 2819-23.
- [17] J. G. Cyster, D. M. Shotton und A. F. Williams, *The Dimensions of the T Lymphocyte Glycoprotein Leukosialin and Identification of Linear Protein Epitopes That Can Be Modified by Glycosylation*, *Embo J*, 10 (1991), S. 893-902.
- [18] K. Schmid, M. A. Hediger, R. Brossmer, J. H. Collins, H. Haupt, T. Marti, G. D. Offner, J. Schaller, K. Takagaki, M. T. Walsh und et al., *Amino Acid Sequence of Human Plasma Galactoglycoprotein: Identity with the Extracellular Region of CD43 (Sialophorin)*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992), S. 663-7.
- [19] C. S. Shelley, E. Remold-O'Donnell, F. S. Rosen und A. S. Whitehead, *Structure of the Human Sialophorin (CD43) Gene. Identification of Features Atypical of Genes Encoding Integral Membrane Proteins*, *Biochem J*, 270 (1990), S. 569-76.
- [20] S. Kudo und M. Fukuda, *A Short, Novel Promoter Sequence Confers the Expression of Human Leukosialin, a Major Sialoglycoprotein on Leukocytes*, *J Biol Chem*, 266 (1991), S. 8483-9.
- [21] A. Pallant, A. Eskenazi, M. G. Mattei, R. E. Fournier, S. R. Carlsson, M. Fukuda und J. G. Frelinger, *Characterization of cDNAs Encoding Human Leukosialin and Localization of the Leukosialin Gene to Chromosome 16*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989), S. 1328-32.
- [22] S. Yonemura, M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo und S. Tsukita, *Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins Bind to a Positively Charged Amino Acid Cluster in the Juxta-Membrane Cytoplasmic Domain of CD44, CD43, and ICAM-2*, *J Cell Biol*, 140 (1998), S. 885-95.
- [23] E. Remold-O'Donnell, C. Zimmerman, D. Kenney und F. S. Rosen, *Expression on Blood Cells of Sialophorin, the Surface Glycoprotein That is Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome*, *Blood*, 70 (1987), S. 104-9.
- [24] N. Manjunath, R. S. Johnson, D. E. Staunton, R. Pasqualini und B. Ardman, *Targeted Disruption of CD43 Gene Enhances T Lymphocyte Adhesion*, *J Immunol*, 151 (1993), S. 1528-34.

- [25] V. Bazil und J. L. Strominger, *CD43, the Major Sialoglycoprotein of Human Leukocytes, Is Proteolytically Cleaved from the Surface of Stimulated Lymphocytes and Granulocytes*, Proc Natl Acad Sci U S A, 90 (1993), S. 3792-6.
- [26] P. Rieu, F. Porteu, G. Bessou, P. Lesavre und L. Halbwachs-Mecarelli, *Human Neutrophils Release Their Major Membrane Sialoprotein, Leukosialin (CD43), During Cell Activation*, Eur J Immunol, 22 (1992), S. 3021-6.
- [27] Y. Rosenstein, J. K. Park, W. C. Hahn, F. S. Rosen, B. E. Bierer und S. J. Burakoff, *CD43, a Molecule Defective in Wiskott-Aldrich Syndrome, Binds Icam-1*, Nature, 354 (1991), S. 233-5.
- [28] K. E. Pace, C. Lee, P. L. Stewart und L. G. Baum, *Restricted Receptor Segregation into Membrane Microdomains Occurs on Human T Cells During Apoptosis Induced by Galectin-1*, J Immunol, 163 (1999), S. 3801-11.
- [29] J. Stockl, O. Majdic, P. Kohl, W. F. Pickl, J. E. Menzel und W. Knapp, *Leukosialin (CD43)-Major Histocompatibility Class I Molecule Interactions Involved in Spontaneous T Cell Conjugate Formation*, J Exp Med, 184 (1996), S. 1769-79.
- [30] T. K. van den Berg, D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die und P. R. Crocker, *Cutting Edge: CD43 Functions as a T Cell Counterreceptor for the Macrophage Adhesion Receptor Sialoadhesin (Siglec-1)*, J Immunol, 166 (2001), S. 3637-40.
- [31] M. Fukuoka, K. Fukudome, Y. Yamashita, M. Tokushima, K. Miyake und M. Kimoto, *Antiadhesive Function of 130-Kd Glycoform of CD43 Expressed in CD4 T- Lymphocyte Clones and Transfectant Cell Lines*, Blood, 96 (2000), S. 4267-75.
- [32] M. Santamaria, A. Lopez-Beltran, M. Toro, J. Pena und I. J. Molina, *Specific Monoclonal Antibodies against Leukocyte-Restricted Cell Surface Molecule CD43 React with Nonhematopoietic Tumor Cells*, Cancer Res, 56 (1996), S. 3526-9.
- [33] R. Sikut, O. Nilsson, D. Baeckstrom und G. C. Hansson, *Colon Adenoma and Cancer Cells Aberrantly Express the Leukocyte- Associated Sialoglycoprotein CD43*, Biochem Biophys Res Commun, 238 (1997), S. 612-6.
- [34] D. Baeckstrom, K. Zhang, N. Asker, U. Ruetschi, M. Ek und G. C. Hansson, *Expression of the Leukocyte-Associated Sialoglycoprotein CD43 by a Colon Carcinoma Cell Line*, J Biol Chem, 270 (1995), S. 13688-92.
- [35] S. Seveau, H. Keller, F. R. Maxfield, F. Piller und L. Halbwachs-Mecarelli, *Neutrophil Polarity and Locomotion are Associated with Surface Redistribution of Leukosialin (CD43), an Antiadhesive Membrane Molecule*, Blood, 95 (2000), S. 2462-70.

- [36] J. M. Serrador, M. Nieto, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. Gonzalez-Amaro, P. Sanchez-Mateos und F. Sanchez-Madrid, *CD43 Interacts with Moesin and Ezrin and Regulates its Redistribution to the Uropods of T Lymphocytes at the Cell-Cell Contacts*, *Blood*, 91 (1998), S. 4632-44.
- [37] S. Tsukita und S. Yonemura, *Cortical Actin Organization: Lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteins*, *J Biol Chem*, 274 (1999), S. 34507-10.
- [38] T. Matsui, S. Yonemura und S. Tsukita, *Activation of ERM Proteins in Vivo by Rho Involves Phosphatidyl-Inositol 4-Phosphate 5-Kinase and Not Rock Kinases*, *Curr Biol*, 9 (1999), S. 1259-62.
- [39] S. T. Smale und D. Baltimore, *The "Initiator" as a Transcription Control Element*, *Cell*, 57 (1989), S. 103-13.
- [40] S. T. Smale, M. C. Schmidt, A. J. Berk und D. Baltimore, *Transcriptional Activation by Sp1 as Directed through Tata or Initiator: Specific Requirement for Mammalian Transcription Factor IId*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990), S. 4509-13.
- [41] C. S. Shelley, O. C. Farokhzad und M. A. Arnaout, *Identification of Cell-Specific and Developmentally Regulated Nuclear Factors That Direct Myeloid and Lymphoid Expression of the CD11a Gene*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993), S. 5364-8.
- [42] S. Kudo und M. Fukuda, *Transcriptional Activation of Human Leukosialin (CD43) Gene by Sp1 through Binding to a GGGTGG Motif*, *Eur J Biochem*, 223 (1994), S. 319-27.
- [43] S. Kudo und M. Fukuda, *Tissue-Specific Transcriptional Regulation of Human Leukosialin (CD43) Gene Is Achieved by DNA Methylation*, *J Biol Chem*, 270 (1995), S. 13298-302.
- [44] S. Kudo, *Methyl-Cpg-Binding Protein MeCP2 Represses Sp1-Activated Transcription of the Human Leukosialin Gene When the Promoter Is Methylated*, *Mol Cell Biol*, 18 (1998), S. 5492-9.
- [45] K. Kurzinger, T. Reynolds, R. N. Germain, D. Davignon, E. Martz und T. A. Springer, *A Novel Lymphocyte Function-Associated Antigen (LFA-1): Cellular Distribution, Quantitative Expression, and Structure*, *J Immunol*, 127 (1981), S. 596-602.
- [46] T. Springer, G. Galfre, D. S. Secher und C. Milstein, *Mac-1: A Macrophage Differentiation Antigen Identified by Monoclonal Antibody*, *Eur J Immunol*, 9 (1979), S. 301-6.
- [47] T. A. Springer, L. J. Miller und D. C. Anderson, *P150,95, the Third Member of the Mac-1, LFA-1 Human Leukocyte Adhesion Glycoprotein Family*, *J Immunol*, 136 (1986), S. 240-5.

- [48] M. Van der Vieren, H. Le Trong, C. L. Wood, P. F. Moore, T. St John, D. E. Staunton und W. M. Gallatin, *A Novel Leukointegrin, $\alpha D\beta 2$, Binds Preferentially to ICAM-3*, *Immunity*, 3 (1995), S. 683-90.
- [49] S. K. Law, J. Gagnon, J. E. Hildreth, C. E. Wells, A. C. Willis und A. J. Wong, *The Primary Structure of the Beta-Subunit of the Cell Surface Adhesion Glycoproteins LFA-1, CR3 and p150,95 and its Relationship to the Fibronectin Receptor*, *Embo J*, 6 (1987), S. 915-9.
- [50] S. L. Newman, C. Bucher, J. Rhodes und W. E. Bullock, *Phagocytosis of Histoplasma Capsulatum Yeasts and Microconidia by Human Cultured Macrophages and Alveolar Macrophages. Cellular Cytoskeleton Requirement for Attachment and Ingestion*, *J Clin Invest*, 85 (1990), S. 223-30.
- [51] S. D. Marlin und T. A. Springer, *Purified Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) is a Ligand for Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1)*, *Cell*, 51 (1987), S. 813-9.
- [52] D. E. Staunton, M. L. Dustin und T. A. Springer, *Functional Cloning of ICAM-2, a Cell Adhesion Ligand for LFA-1 Homologous to ICAM-1*, *Nature*, 339 (1989), S. 61-4.
- [53] A. R. de Fougerolles und T. A. Springer, *Intercellular Adhesion Molecule 3, a Third Adhesion Counter-Receptor for Lymphocyte Function-Associated Molecule 1 on Resting Lymphocytes*, *J Exp Med*, 175 (1992), S. 185-90.
- [54] M. S. Diamond, D. E. Staunton, A. R. de Fougerolles, S. A. Stacker, J. Garcia-Aguilar, M. L. Hibbs und T. A. Springer, *ICAM-1 (CD54): A Counter-Receptor for Mac-1 (CD11b/CD18)*, *J Cell Biol*, 111 (1990), S. 3129-39.
- [55] M. S. Diamond und T. A. Springer, *A Subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) Molecules Mediates Neutrophil Adhesion to ICAM-1 and Fibrinogen*, *J Cell Biol*, 120 (1993), S. 545-56.
- [56] M. S. Diamond, R. Alon, C. A. Parkos, M. T. Quinn und T. A. Springer, *Heparin is an Adhesive Ligand for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*, *J Cell Biol*, 130 (1995), S. 1473-82.
- [57] J. Xie, R. Li, P. Kotovuori, C. Vermot-Desroches, J. Wijdenes, M. A. Arnaout, P. Nortamo und C. G. Gahmberg, *Intercellular Adhesion Molecule-2 (CD102) Binds to the Leukocyte Integrin CD11b/CD18 through the A Domain*, *J Immunol*, 155 (1995), S. 3619-28.
- [58] B. L. Myones, J. G. Dalzell, N. Hogg und G. D. Ross, *Neutrophil and Monocyte Cell Surface p150,95 has iC3b-Receptor (CR4) Activity Resembling CR3*, *J Clin Invest*, 82 (1988), S. 640-51.
- [59] D. C. Altieri, W. L. Wiltse und T. S. Edgington, *Signal Transduction Initiated by Extracellular Nucleotides Regulates the High Affinity Ligand Recognition of the Adhesive Receptor CD11b/CD18*, *J Immunol*, 145 (1990), S. 662-70.

- [60] S. D. Wright, J. I. Weitz, A. J. Huang, S. M. Levin, S. C. Silverstein und J. D. Loike, *Complement Receptor Type Three (CD11b/CD18) of Human Polymorphonuclear Leukocytes Recognizes Fibrinogen*, Proc Natl Acad Sci U S A, 85 (1988), S. 7734-8.
- [61] H. R. Petty und R. F. Todd, 3rd, *Integrins as Promiscuous Signal Transduction Devices*, Immunol Today, 17 (1996), S. 209-12.
- [62] A. Gbarah, C. G. Gahmberg, G. Boner und N. Sharon, *The Leukocyte Surface Antigens CD11b and CD18 Mediate the Oxidative Burst Activation of Human Peritoneal Macrophages Induced by Type 1 Fimbriated Escherichia Coli*, J Leukoc Biol, 54 (1993), S. 111-3.
- [63] P. J. Muchowski, L. Zhang, E. R. Chang, H. R. Soule, E. F. Plow und M. Moyle, *Functional Interaction between the Integrin Antagonist Neutrophil Inhibitory Factor and the I Domain of CD11b/CD18*, J Biol Chem, 269 (1994), S. 26419-23.
- [64] M. Van der Vieren, D. T. Crowe, D. Hoekstra, R. Vazeux, P. A. Hoffman, M. H. Grayson, B. S. Bochner, W. M. Gallatin und D. E. Staunton, *The Leukocyte Integrin $\alpha D\beta 2$ Binds VCAM-1: Evidence for a Binding Interface between I Domain and VCAM-1*, J Immunol, 163 (1999), S. 1984-90.
- [65] A. McDowall, B. Leitinger, P. Stanley, P. A. Bates, A. M. Randi und N. Hogg, *The I Domain of Integrin Leukocyte Function-Associated Antigen-1 Is Involved in a Conformational Change Leading to High Affinity Binding to Ligand Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)*, J Biol Chem, 273 (1998), S. 27396-403.
- [66] J. Blackford, H. W. Reid, D. J. Pappin, F. S. Bowers und J. M. Wilkinson, *A Monoclonal Antibody, 3/22, to Rabbit CD11c Which Induces Homotypic T Cell Aggregation: Evidence That ICAM-1 Is a Ligand for CD11c/CD18*, Eur J Immunol, 26 (1996), S. 525-31.
- [67] C. A. Bilsland, M. S. Diamond und T. A. Springer, *The Leukocyte Integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a Receptor for iC3b. Activation by a Heterologous Beta Subunit and Localization of a Ligand Recognition Site to the I Domain*, J Immunol, 152 (1994), S. 4582-9.
- [68] J. D. Loike, B. Sodeik, L. Cao, S. Leucona, J. I. Weitz, P. A. Detmers, S. D. Wright und S. C. Silverstein, *CD11c/CD18 on Neutrophils Recognizes a Domain at the N Terminus of the α Alpha Chain of Fibrinogen*, Proc Natl Acad Sci U S A, 88 (1991), S. 1044-8.
- [69] S. U. Nham, *Characteristics of Fibrinogen Binding to the Domain of CD11c, an α Subunit of p150,95*, Biochem Biophys Res Commun, 264 (1999), S. 630-4.

- [70] R. Garnotel, L. Rittie, S. Poitevin, J. C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F. X. Maquart, A. Randoux und P. Gillery, *Human Blood Monocytes Interact with Type I Collagen through $\alpha X\beta 2$ Integrin (CD11c-CD18, Gp150-95)*, *J Immunol*, **164** (2000), S. 5928-34.
- [71] R. R. Ingalls und D. T. Golenbock, *CD11c/CD18, a Transmembrane Signaling Receptor for Lipopolysaccharide*, *J Exp Med*, **181** (1995), S. 1473-9.
- [72] M. A. Arnaout, *Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18*, *Blood*, **75** (1990), S. 1037-50.
- [73] R. W. Wilson, C. M. Ballantyne, C. W. Smith, C. Montgomery, A. Bradley, W. E. O'Brien und A. L. Beaudet, *Gene Targeting Yields a CD18-Mutant Mouse for Study of Inflammation*, *J Immunol*, **151** (1993), S. 1571-8.
- [74] L. J. Miller, R. Schwarting und T. A. Springer, *Regulated Expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 Glycoprotein Family During Leukocyte Differentiation*, *J Immunol*, **137** (1986), S. 2891-900.
- [75] C. Huang und T. A. Springer, *Folding of the β -Propeller Domain of the Integrin α Subunit Is Independent of the I Domain and Dependent on the $\beta 2$ Subunit*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (1997), S. 3162-7.
- [76] T. A. Springer, *Folding of the N-Terminal, Ligand-Binding Region of Integrin α -Subunits into a β -Propeller Domain*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (1997), S. 65-72.
- [77] J. O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout und R. Liddington, *Crystal Structure of the α Domain from the α Subunit of Integrin CR3 (CD11b/CD18)*, *Cell*, **80** (1995), S. 631-8.
- [78] X. Du, M. Gu, J. W. Weisel, C. Nagaswami, J. S. Bennett, R. Bowditch und M. H. Ginsberg, *Long Range Propagation of Conformational Changes in Integrin $\alpha IIb \beta 3$* , *J Biol Chem*, **268** (1993), S. 23087-92.
- [79] J. O. Lee, L. A. Bankston, M. A. Arnaout und R. C. Liddington, *Two Conformations of the Integrin A-Domain (I-Domain): A Pathway for Activation?*, *Structure*, **3** (1995), S. 1333-40.
- [80] C. Oxvig, C. Lu und T. A. Springer, *Conformational Changes in Tertiary Structure near the Ligand Binding Site of an Integrin I Domain*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (1999), S. 2215-20.
- [81] E. T. Baldwin, R. W. Sarver, G. L. Bryant, Jr., K. A. Curry, M. B. Fairbanks, B. C. Finzel, R. L. Garlick, R. L. Heinrichson, N. C. Horton, L. L. Kelley, A. M. Mildner, J. B. Moon, J. E. Mott, V. T. Mutchler, C. S. Tomich, K. D. Watenpaugh und V. H. Wiley, *Cation Binding to the Integrin CD11b I Domain and Activation Model Assessment*, *Structure*, **6** (1998), S. 923-35.

- [82] R. Li, P. Rieu, D. L. Griffith, D. Scott und M. A. Arnaout, *Two Functional States of the CD11b A-Domain: Correlations with Key Features of Two Mn²⁺-Complexed Crystal Structures*, *J Cell Biol*, **143** (1998), S. 1523-34.
- [83] J. P. Xiong, R. Li, M. Essafi, T. Stehle und M. A. Arnaout, *An Isoleucine-Based Allosteric Switch Controls Affinity and Shape Shifting in Integrin CD11b A-Domain*, *J Biol Chem*, **275** (2000), S. 38762-7.
- [84] J. S. Kristensen, J. Ellegaard und P. Hokland, *A Two-Color Flow Cytometry Assay for Detection of Hairy Cells Using Monoclonal Antibodies*, *Blood*, **70** (1987), S. 1063-8.
- [85] F. Caligaris-Cappio, L. Bergui, L. Tesio, G. Corbascio, F. Tousco und P. C. Marchisio, *Cytoskeleton Organization is Aberrantly Rearranged in the Cells of B Chronic Lymphocytic Leukemia and Hairy Cell Leukemia*, *Blood*, **67** (1986), S. 233-9.
- [86] M. Palutke, R. W. Weise, P. Tabaczka, C. Varadachari und A. Axelrod, *Hairy Cells and Macrophages: A Comparative Study*, *Lab Invest*, **39** (1978), S. 267-80.
- [87] C. Lopez-Rodriguez, H. C. Kluin-Nelemans und A. L. Corbi, *AP-1 Regulates the Basal and Developmentally Induced Transcription of the CD11c Leukocyte Integrin Gene*, *J Immunol*, **156** (1996), S. 3780-7.
- [88] J. D. Noti, C. Reinemann und M. N. Petrus, *Regulation of the Leukocyte Integrin Gene CD11c is Mediated by AP1 and Ets Transcription Factors*, *Mol Immunol*, **33** (1996), S. 115-27.
- [89] C. Lopez-Rodriguez und A. L. Corbi, *PU.1 Negatively Regulates the CD11c Integrin Gene Promoter through Recognition of the Major Transcriptional Start Site*, *Eur J Immunol*, **27** (1997), S. 1843-7.
- [90] A. L. Corbi und C. Lopez-Rodriguez, *CD11c Integrin Gene Promoter Activity During Myeloid Differentiation*, *Leuk Lymphoma*, **25** (1997), S. 415-25.
- [91] J. D. Noti, B. C. Reinemann und M. N. Petrus, *Sp1 Binds Two Sites in the CD11c Promoter in Vivo Specifically in Myeloid Cells and Cooperates with AP1 to Activate Transcription*, *Mol Cell Biol*, **16** (1996), S. 2940-50.
- [92] J. D. Noti, *Sp3 Mediates Transcriptional Activation of the Leukocyte Integrin Genes CD11c and CD11b and Cooperates with c-Jun to Activate CD11c*, *J Biol Chem*, **272** (1997), S. 24038-45.
- [93] M. A. Rubio, C. Lopez-Rodriguez, A. Nueda, P. Aller, A. L. Armesilla, M. A. Vega und A. L. Corbi, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Phorbol Ester, and Sodium Butyrate Induce the CD11c Integrin Gene Promoter Activity During Myeloid Cell Differentiation*, *Blood*, **86** (1995), S. 3715-24.

- [94] C. Lopez-Rodriguez, L. Botella und A. L. Corbi, *Ccaat-Enhancer-Binding Proteins (C/EBP) Regulate the Tissue Specific Activity of the CD11c Integrin Gene Promoter through Functional Interactions with Sp1 Proteins*, J Biol Chem, 272 (1997), S. 29120-6.
- [95] C. Lopez-Rodriguez, M. Zubiaur, J. Sancho, A. Concha und A. L. Corbi, *An Octamer Element Functions as a Regulatory Element in the Differentiation-Responsive CD11c Integrin Gene Promoter: Oct-2 Inducibility During Myelomonocytic Differentiation*, J Immunol, 158 (1997), S. 5833-40.
- [96] C. Lopez-Rodriguez, M. D. Delgado, A. Puig-Kroger, A. Nueda, E. Munoz, J. Leon, C. Bernabeu und A. L. Corbi, *c-Myc Inhibits CD11a and CD11c Leukocyte Integrin Promoters*, Eur J Immunol, 30 (2000), S. 2465-71.
- [97] O. C. Farokhzad, C. S. Shelley und M. A. Arnaout, *Induction of the CD11b Gene During Activation of the Monocytic Cell Line U937 Requires a Novel Nuclear Factor MS-2*, J Immunol, 157 (1996), S. 5597-605.
- [98] C. Lopez-Rodriguez, H. M. Chen, D. G. Tenen und A. L. Corbi, *Identification of Sp1-Binding Sites in the CD11c (p150,95 α) and CD11a (LFA-1 α) Integrin Subunit Promoters and Their Involvement in the Tissue-Specific Expression of CD11c*, Eur J Immunol, 25 (1995), S. 3496-503.
- [99] M. M. Bradford, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Anal Biochem, 72 (1976), S. 248-54.
- [100] J. Sambrook und D. Russell, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- [101] M. Fried und D. M. Crothers, *Equilibria and Kinetics of Lac Repressor-Operator Interactions by Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Nucleic Acids Res, 9 (1981), S. 6505-25.
- [102] E. M. Johnson, P. L. Chen, C. P. Krachmarov, S. M. Barr, M. Kanovsky, Z. W. Ma und W. H. Lee, *Association of Human Pur α with the Retinoblastoma Protein, Rb, Regulates Binding to the Single-Stranded DNA Pur α Recognition Element*, J Biol Chem, 270 (1995), S. 24352-60.
- [103] O. C. Farokhzad, J. M. Teodoridis, H. Park, M. A. Arnaout und C. S. Shelley, *CD43 Gene Expression is Mediated by a Nuclear Factor Which Binds Pyrimidine-Rich Single-Stranded DNA*, Nucleic Acids Res, 28 (2000), S. 2256-67.
- [104] C. S. Shelley, J. M. Teodoridis, H. Park, O. C. Farokhzad, E. P. Bottinger und M. A. Arnaout, *During Differentiation of the Monocytic Cell Line U937, Pur α Mediates Induction of the CD11c β_2 Integrin Gene Promoter*, J Immunol, 168 (2002), S. 3887-93.

- [105] C. S. Shelley, N. Da Silva und J. M. Teodoridis, *During U937 Monocytic Differentiation Repression of the CD43 Gene Promoter is Mediated by the Single-Stranded DNA Binding Protein Pur α* , Br J Haematol, 115 (2001), S. 159-61.
- [106] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Wiley, New York, 2000.
- [107] J. R. de Wet, K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski und S. Subramani, *Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells*, Mol Cell Biol, 7 (1987), S. 725-37.
- [108] N. Rosenthal, *Identification of Regulatory Elements of Cloned Genes with Functional Assays*, Methods Enzymol, 152 (1987), S. 704-20.
- [109] T. Boulikas, *Common Structural Features of Replication Origins in All Life Forms*, J Cell Biochem, 60 (1996), S. 297-316.
- [110] R. M. Wadkins, *Targeting DNA Secondary Structures*, Curr Med Chem, 7 (2000), S. 1-15.
- [111] A. D. Bergemann und E. M. Johnson, *The Hela Pur Factor Binds Single-Stranded DNA at a Specific Element Conserved in Gene Flanking Regions and Origins of DNA Replication*, Mol Cell Biol, 12 (1992), S. 1257-65.
- [112] T. Bellon, C. Lopez-Rodriguez, M. A. Rubio, G. Jochems, C. Bernabeu und A. L. Corbi, *Regulated Expression of p150,95 (CD11c/CD18; $\alpha X/\beta 2$) and VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha 4/\beta 1$) Integrins During Myeloid Cell Differentiation*, Eur J Immunol, 24 (1994), S. 41-7.
- [113] J. D. Noti und B. C. Reinemann, *The Leukocyte Integrin Gene CD11c Is Transcriptionally Regulated During Monocyte Differentiation*, Mol Immunol, 32 (1995), S. 361-9.
- [114] A. L. Back, K. A. Gollahon und D. D. Hickstein, *Regulation of Expression of the Leukocyte Integrin CD11a (LFA-1) Molecule During Differentiation of HL-60 Cells Along the Monocyte/Macrophage Pathway*, J Immunol, 148 (1992), S. 710-4.
- [115] M. H. Grayson, M. Van der Vieren, S. A. Sterbinsky, W. Michael Gallatin, P. A. Hoffman, D. E. Staunton und B. S. Bochner, *$\alpha d\beta 2$ Integrin Is Expressed on Human Eosinophils and Functions as an Alternative Ligand for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)*, J Exp Med, 188 (1998), S. 2187-91.
- [116] C. H. Kuo, E. Nishikawa, H. Ichikawa, T. Sadakata, S. Y. Niu und N. Miki, *Calmodulin Functions as an Activator of Pur α Binding to Single-Stranded Purine-Rich DNA Elements (Pur Elements)*, Biochem Biophys Res Commun, 255 (1999), S. 406-11.

- [117] A. Tretiakova, A. Steplewski, E. M. Johnson, K. Khalili und S. Amini, *Regulation of Myelin Basic Protein Gene Transcription by Sp1 and Pur α : Evidence for Association of Sp1 and Pur α in Brain*, J Cell Physiol, 181 (1999), S. 160-8.
- [118] M. Safak, G. L. Gallia und K. Khalili, *Reciprocal Interaction between Two Cellular Proteins, Pur α and YB-1, Modulates Transcriptional Activity of JCVCY in Glial Cells*, Mol Cell Biol, 19 (1999), S. 2712-23.
- [119] R. J. Kelm, Jr., J. G. Cogan, P. K. Elder, A. R. Strauch und M. J. Getz, *Molecular Interactions between Single-Stranded DNA-Binding Proteins Associated with an Essential MCAT Element in the Mouse Smooth Muscle α -Actin Promoter*, J Biol Chem, 274 (1999), S. 14238-45.
- [120] F. Vavva, J. M. Teodoridis, H. Park, A. Georgakis, O. C. Farokhzad, E. P. Bottinger, N. Da Silva, P. Rousselot, C. Chomienne, M. A. Arnaout und C. S. Shelley, *CD11c Gene Expression in Hairy-Cell Leukemia is Dependent Upon Activation of the Proto-Oncogenes Ras and JunD*, Blood, Submitted (2002).
- [121] Z. Dong, M. J. Birrer, R. G. Watts, L. M. Matrisian und N. H. Colburn, *Blocking of Tumor Promoter-Induced AP-1 Activity Inhibits Induced Transformation in Jb6 Mouse Epidermal Cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 91 (1994), S. 609-13.
- [122] P. H. Brown, R. Alani, L. H. Preis, E. Szabo und M. J. Birrer, *Suppression of Oncogene-Induced Transformation by a Deletion Mutant of c-Jun*, Oncogene, 8 (1993), S. 877-86.
- [123] L. Lim, E. Manser, T. Leung und C. Hall, *Regulation of Phosphorylation Pathways by p21 GTPases. The p21 Ras- Related Rho Subfamily and its Role in Phosphorylation Signalling Pathways*, Eur J Biochem, 242 (1996), S. 171-85.
- [124] L. A. Feig und G. M. Cooper, *Inhibition of NIH 3T3 Cell Proliferation by a Mutant Ras Protein with Preferential Affinity for GDP*, Mol Cell Biol, 8 (1988), S. 3235-43.
- [125] M. Trahey, R. J. Milley, G. E. Cole, M. Innis, H. Paterson, C. J. Marshall, A. Hall und F. McCormick, *Biochemical and Biological Properties of the Human N-Ras p21 Protein*, Mol Cell Biol, 7 (1987), S. 541-4.
- [126] M. Z. Gorgoshidze, E. E. Miniati, A. A. Gorin, E. I. Demchuk, V. A. Farutin und V. I. Ivanov, *[SLS--a New Type of Polynucleotide Chain Folding]*, Mol Biol (Mosk), 26 (1992), S. 1263-73.
- [127] E. B. Khomyakova, M. V. Petrova, E. E. Minyat und V. I. Ivanov, *Slipped Loop Structure of DNA: A Specific Nucleotide Sequence Forms Only One Unique Conformer*, FEBS Lett, 422 (1998), S. 265-8.

- [128] E. E. Minyat, E. B. Khomyakova, M. V. Petrova, E. M. Zdobnov und V. I. Ivanov, *Experimental Evidence for Slipped Loop DNA, a Novel Folding Type for Polynucleotide Chain*, J Biomol Struct Dyn, 13 (1995), S. 523-7.
- [129] N. B. Ulyanov, K. D. Bishop, V. I. Ivanov und T. L. James, *Tertiary Base Pair Interactions in Slipped Loop-DNA: An NMR and Model Building Study*, Nucleic Acids Res, 22 (1994), S. 4242-9.
- [130] G. E. Lee, J. H. Kim und I. K. Chung, *Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage on the Cruciform Structure Formed within the 5'upstream Region of the Human β -Globin Gene*, Mol Cells, 8 (1998), S. 424-30.
- [131] D. M. Lilley und L. R. Hallam, *The Interactions of Enzyme and Chemical Probes with Inverted Repeats in Supercoiled DNA*, J Biomol Struct Dyn, 1 (1983), S. 169-82.
- [132] L. S. Shlyakhtenko, V. N. Potaman, R. R. Sinden und Y. L. Lyubchenko, *Structure and Dynamics of Supercoil-Stabilized DNA Cruciforms*, J Mol Biol, 280 (1998), S. 61-72.
- [133] D. G. Tenen, L. L. Haines, U. M. Hansen, R. G. Martin und D. M. Livingston, *Formation of a Cruciform Structure at the Simian Virus 40 Replication Origin Abolishes T-Antigen Binding to the Origin in Vitro*, J Virol, 56 (1985), S. 293-7.
- [134] A. M. Krecic und M. S. Swanson, *hnRNP Complexes: Composition, Structure, and Function*, Curr Opin Cell Biol, 11 (1999), S. 363-71.
- [135] J. L. Baber, D. Libutti, D. Levens und N. Tjandra, *High Precision Solution Structure of the C-Terminal KH Domain of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K, a c-Myc Transcription Factor*, J Mol Biol, 289 (1999), S. 949-62.
- [136] K. Dejgaard, H. Leffers, H. H. Rasmussen, P. Madsen, T. A. Kruse, B. Gesser, H. Nielsen und J. E. Celis, *Identification, Molecular Cloning, Expression and Chromosome Mapping of a Family of Transformation Upregulated hnRNP-K Proteins Derived by Alternative Splicing*, J Mol Biol, 236 (1994), S. 33-48.
- [137] J. Ostrowski, D. S. Schullery, O. N. Denisenko, Y. Higaki, J. Watts, R. Aebersold, L. Stempka, M. Gschwendt und K. Bomsztyk, *Role of Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of the Interaction of Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein K Protein with its Protein and RNA Partners*, J Biol Chem, 275 (2000), S. 3619-28.
- [138] P. Herrera-Velit und N. E. Reiner, *Bacterial Lipopolysaccharide Induces the Association and Coordinate Activation of p53/56lyn and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Monocytes*, J Immunol, 156 (1996), S. 1157-65.

- [139] D. S. Schullery, J. Ostrowski, O. N. Denisenko, L. Stempka, M. Shnyreva, H. Suzuki, M. Gschwendt und K. Bomsztyk, *Regulated Interaction of Protein Kinase C δ with the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Protein*, J Biol Chem, 274 (1999), S. 15101-9.
- [140] J. Ostrowski, Y. Kawata, D. S. Schullery, O. N. Denisenko, Y. Higaki, C. K. Abrass und K. Bomsztyk, *Insulin Alters Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Protein Binding to DNA and RNA*, Proc Natl Acad Sci U S A, 98 (2001), S. 9044-9.
- [141] Q. Du, A. E. Tomkinson und P. D. Gardner, *Transcriptional Regulation of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes. A Possible Role for the DNA-Binding Protein Pur α* , J Biol Chem, 272 (1997), S. 14990-5.
- [142] S. Haas, P. Thatikunta, A. Steplewski, E. M. Johnson, K. Khalili und S. Amini, *A 39-kD DNA-Binding Protein from Mouse Brain Stimulates Transcription of Myelin Basic Protein Gene in Oligodendrocytic Cells*, J Cell Biol, 130 (1995), S. 1171-9.
- [143] M. Hu, C. B. Bigger und P. D. Gardner, *A Novel Regulatory Element of a Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Interacts with a DNA Binding Activity Enriched in Rat Brain*, J Biol Chem, 270 (1995), S. 4497-502.
- [144] G. L. Gallia, E. M. Johnson und K. Khalili, *Puralpha: A Multifunctional Single-Stranded DNA- and RNA-Binding Protein*, Nucleic Acids Res, 28 (2000), S. 3197-205.
- [145] V. Muralidharan, A. Tretiakova, A. Steplewski, S. Haas, S. Amini, E. Johnson und K. Khalili, *Evidence for Inhibition of MyEF-2 Binding to MBP Promoter by MEF-1/Pur α* , J Cell Biochem, 66 (1997), S. 524-31.
- [146] P. Thatikunta, B. E. Sawaya, L. Denisova, C. Cole, G. Yusibova, E. M. Johnson, K. Khalili und S. Amini, *Identification of a Cellular Protein That Binds to Tat-Responsive Element of TGF β -1 Promoter in Glial Cells*, J Cell Biochem, 67 (1997), S. 466-77.
- [147] R. J. Kelm, Jr., S. Sun, A. R. Strauch und M. J. Getz, *Repression of Transcriptional Enhancer Factor-1 and Activator Protein-1- Dependent Enhancer Activity by Vascular Actin Single-Stranded DNA Binding Factor 2*, J Biol Chem, 271 (1996), S. 24278-85.
- [148] R. J. Kelm, Jr., P. K. Elder, A. R. Strauch und M. J. Getz, *Sequence of cDNAs Encoding Components of Vascular Actin Single-Stranded DNA-Binding Factor 2 Establish Identity to Pur α and Pur β* , J Biol Chem, 272 (1997), S. 26727-33.
- [149] M. Jurk, F. Weissinger, F. Lottspeich, U. Schwarz und E. L. Winnacker, *Characterization of the Single-Strand-Specific BPV-1 Origin Binding Protein, SPSF I, as the HeLa Pur α Factor*, Nucleic Acids Res, 24 (1996), S. 2799-806.

- [150] N. Zambrano, S. De Renzis, G. Minopoli, R. Faraonio, V. Donini, A. Scaloni, F. Cimino und T. Russo, *DNA-Binding Protein Pur α and Transcription Factor YY1 Function as Transcription Activators of the Neuron-Specific FE65 Gene Promoter*, *Biochem J*, 328 (1997), S. 293-300.
- [151] L. G. Chepenik, A. P. Tretiakova, C. P. Krachmarov, E. M. Johnson und K. Khalili, *The Single-Stranded DNA Binding Protein, Pur α , Binds HIV-1 Tar RNA and Activates HIV-1 Transcription*, *Gene*, 210 (1998), S. 37-44.
- [152] N. Darbinian, G. L. Gallia und K. Khalili, *Helix-Destabilizing Properties of the Human Single-Stranded DNA- and RNA-Binding Protein Pur α* , *J Cell Biochem*, 80 (2001), S. 589-95.
- [153] S. Pedrinaci, F. Ruiz-Cabello, O. Gomez, A. Collado und F. Garrido, *Protein Kinase C-Mediated Regulation of the Expression of CD14 and CD11/CD18 in U937 Cells*, *Int J Cancer*, 45 (1990), S. 294-8.
- [154] N. N. Chen, C. F. Chang, G. L. Gallia, D. A. Kerr, E. M. Johnson, C. P. Krachmarov, S. M. Barr, R. J. Frisque, B. Bollag und K. Khalili, *Cooperative Action of Cellular Proteins YB-1 and Pur α with the Tumor Antigen of the Human JC Polyomavirus Determines Their Interaction with the Viral Lytic Control Element*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995), S. 1087-91.
- [155] S. S. Kolla und G. P. Studzinski, *Constitutive DNA Binding of the Low Mobility Forms of the AP-1 and Sp-1 Transcription Factors in HL60 Cells Resistant to 1- β -D- Arabinofuranosylcytosine*, *Cancer Res*, 54 (1994), S. 1418-21.
- [156] M. M. Zutter, E. E. Ryan und A. D. Painter, *Binding of Phosphorylated Sp1 Protein to Tandem Sp1 Binding Sites Regulates α 2 Integrin Gene Core Promoter Activity*, *Blood*, 90 (1997), S. 678-89.
- [157] H. L. Pahl, R. J. Scheibe, D. E. Zhang, H. M. Chen, D. L. Galson, R. A. Maki und D. G. Tenen, *The Proto-Oncogene PU.1 Regulates Expression of the Myeloid-Specific CD11b Promoter*, *J Biol Chem*, 268 (1993), S. 5014-20.
- [158] H. M. Chen, H. L. Pahl, R. J. Scheibe, D. E. Zhang und D. G. Tenen, *The Sp1 Transcription Factor Binds the CD11b Promoter Specifically in Myeloid Cells in Vivo and is Essential for Myeloid-Specific Promoter Activity*, *J Biol Chem*, 268 (1993), S. 8230-9.
- [159] J. D. Noti, A. K. Johnson und J. D. Dillon, *Structural and Functional Characterization of the Leukocyte Integrin Gene CD11d. Essential Role of Sp1 and Sp3*, *J Biol Chem*, 275 (2000), S. 8959-69.
- [160] A. Saxon, R. H. Stevens und D. W. Golde, *T-Lymphocyte Variant of Hairy-Cell Leukemia*, *Ann Intern Med*, 88 (1978), S. 323-6.

- [161] R. Schwarting, H. Stein und C. Y. Wang, *The Monoclonal Antibodies Alpha S-Hcl 1 (α Leu-14) and Alpha S-Hcl 3 (α Leu-M5) Allow the Diagnosis of Hairy Cell Leukemia*, *Blood*, 65 (1985), S. 974-83.
- [162] D. W. Golde, R. H. Stevens, S. G. Quan und A. Saxon, *Immunoglobulin Synthesis in Hairy Cell Leukaemia*, *Br J Haematol*, 35 (1977), S. 359-65.
- [163] N. H. Heintz, Y. M. Janssen und B. T. Mossman, *Persistent Induction of c-Fos and c-Jun Expression by Asbestos*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993), S. 3299-303.
- [164] D. T. Yamanishi, J. A. Buckmeier und F. L. Meyskens, Jr., *Expression of c-Jun, Jun-B, and c-Fos Proto-Oncogenes in Human Primary Melanocytes and Metastatic Melanomas*, *J Invest Dermatol*, 97 (1991), S. 349-53.
- [165] M. Fujimoto, P. J. Sheridan, Z. D. Sharp, F. J. Weaker, S. Kagan-Hallet und J. L. Story, *Proto-Oncogene Analyses in Brain Tumors*, *J Neurosurg*, 70 (1989), S. 910-5.
- [166] B. Neyns, Katesuwanasing, J. Vermeij, C. Bourgain, B. Vandamme, K. Amfo, W. Lissens, P. DeSutter, E. Hooghe-Peters und J. DeGreve, *Expression of the Jun Family of Genes in Human Ovarian Cancer and Normal Ovarian Surface Epithelium*, *Oncogene*, 12 (1996), S. 1247-57.
- [167] A. D. Miller, T. Curran und I. M. Verma, *c-Fos Protein Can Induce Cellular Transformation: A Novel Mechanism of Activation of a Cellular Oncogene*, *Cell*, 36 (1984), S. 51-60.
- [168] W. M. Lee, C. Lin und T. Curran, *Activation of the Transforming Potential of the Human Fos Proto-Oncogene Requires Message Stabilization and Results in Increased Amounts of Partially Modified Fos Protein*, *Mol Cell Biol*, 8 (1988), S. 5521-7.
- [169] V. Raymond, J. A. Atwater und I. M. Verma, *Removal of an mRNA Destabilizing Element Correlates with the Increased Oncogenicity of Proto-Oncogene Fos*, *Oncogene Res*, 5 (1989), S. 1-12.
- [170] J. Schutte, J. Viallet, M. Nau, S. Segal, J. Fedorko und J. Minna, *Jun-B Inhibits and c-Fos Stimulates the Transforming and Trans-Activating Activities of c-Jun*, *Cell*, 59 (1989), S. 987-97.
- [171] J. Schutte, J. D. Minna und M. J. Birrer, *Deregulated Expression of Human c-Jun Transforms Primary Rat Embryo Cells in Cooperation with an Activated C-Ha-Ras Gene and Transforms Rat-1a Cells as a Single Gene*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989), S. 2257-61.
- [172] J. Z. Qin, R. Dummer, G. Burg und U. Dobbeling, *Constitutive and Interleukin-7/Interleukin-15 Stimulated DNA Binding of Myc, Jun, and Novel Myc-Like Proteins in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells*, *Blood*, 93 (1999), S. 260-7.

- [173] N. Mori, M. Fujii, K. Iwai, S. Ikeda, Y. Yamasaki, T. Hata, Y. Yamada, Y. Tanaka, M. Tomonaga und N. Yamamoto, *Constitutive Activation of Transcription Factor AP-1 in Primary Adult T- Cell Leukemia Cells*, *Blood*, 95 (2000), S. 3915-21.
- [174] C. Abate, L. Patel, F. J. Rauscher, 3rd und T. Curran, *Redox Regulation of Fos and Jun DNA-Binding Activity in Vitro*, *Science*, 249 (1990), S. 1157-61.
- [175] W. J. Boyle, T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin und T. Hunter, *Activation of Protein Kinase C Decreases Phosphorylation of c-Jun at Sites That Negatively Regulate its DNA-Binding Activity*, *Cell*, 64 (1991), S. 573-84.
- [176] T. Curran, A. D. Miller, L. Zokas und I. M. Verma, *Viral and Cellular Fos Proteins: A Comparative Analysis*, *Cell*, 36 (1984), S. 259-68.
- [177] T. Curran, C. Van Beveren und I. M. Verma, *Viral and Cellular Fos Proteins Are Complexed with a 39,000-Dalton Cellular Protein*, *Mol Cell Biol*, 5 (1985), S. 167-72.
- [178] D. Forrest und T. Curran, *Crossed Signals: Oncogenic Transcription Factors*, *Curr Opin Genet Dev*, 2 (1992), S. 19-27.
- [179] T. Kameda, A. Akahori, M. H. Sonobe, T. Suzuki, T. Endo und H. Iba, *JunD Mutants with Spontaneously Acquired Transforming Potential Have Enhanced Transactivating Activity in Combination with Fra-2*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993), S. 9369-73.
- [180] Y. Maki, T. J. Bos, C. Davis, M. Starbuck und P. K. Vogt, *Avian Sarcoma Virus 17 Carries the Jun Oncogene*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (1987), S. 2848-52.
- [181] M. Nishizawa, N. Goto und S. Kawai, *An Avian Transforming Retrovirus Isolated from a Nephroblastoma That Carries the Fos Gene as the Oncogene*, *J Virol*, 61 (1987), S. 3733-40.
- [182] C. Van Beveren, S. Enami, T. Curran und I. M. Verma, *Fbr Murine Osteosarcoma Virus. II. Nucleotide Sequence of the Provirus Reveals That the Genome Contains Sequences Acquired from Two Cellular Genes*, *Virology*, 135 (1984), S. 229-43.
- [183] C. Van Beveren, F. van Straaten, T. Curran, R. Muller und I. M. Verma, *Analysis of Fbj-Musv Provirus and c-Fos (Mouse) Gene Reveals That Viral and Cellular Fos Gene Products Have Different Carboxy Termini*, *Cell*, 32 (1983), S. 1241-55.
- [184] C. Abate, D. Luk und T. Curran, *A Ubiquitous Nuclear Protein Stimulates the DNA-Binding Activity of Fos and Jun Indirectly*, *Cell Growth Differ*, 1 (1990), S. 455-62.

- [185] C. Abate, D. Luk, R. Gentz, F. J. Rauscher, 3rd und T. Curran, *Expression and Purification of the Leucine Zipper and DNA-Binding Domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun Contact DNA Directly*, Proc Natl Acad Sci U S A, 87 (1990), S. 1032-6.
- [186] P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich und M. Karin, *Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common cis Element Recognized by a TPA-Modulated trans-Acting Factor*, Cell, 49 (1987), S. 729-39.
- [187] P. Angel, K. Hattori, T. Smeal und M. Karin, *The Jun Proto-Oncogene Is Positively Autoregulated by its Product, Jun/AP-1*, Cell, 55 (1988), S. 875-85.
- [188] J. R. Barber und I. M. Verma, *Modification of Fos Proteins: Phosphorylation of c-Fos, but Not v-Fos, Is Stimulated by 12-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate and Serum*, Mol Cell Biol, 7 (1987), S. 2201-11.
- [189] T. Curran und J. I. Morgan, *Superinduction of c-Fos by Nerve Growth Factor in the Presence of Peripherally Active Benzodiazepines*, Science, 229 (1985), S. 1265-8.
- [190] C. C. Franklin, V. Sanchez, F. Wagner, J. R. Woodgett und A. S. Kraft, *Phorbol Ester-Induced Amino-Terminal Phosphorylation of Human Jun but Not JunB Regulates Transcriptional Activation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 89 (1992), S. 7247-51.
- [191] B. R. Franza, Jr., F. J. Rauscher, 3rd, S. F. Josephs und T. Curran, *The Fos Complex and Fos-Related Antigens Recognize Sequence Elements That Contain AP-1 Binding Sites*, Science, 239 (1988), S. 1150-3.
- [192] W. W. Lamph, P. Wamsley, P. Sassone-Corsi und I. M. Verma, *Induction of Proto-Oncogene Jun/AP-1 by Serum and TPA*, Nature, 334 (1988), S. 629-31.
- [193] R. Muller, R. Bravo, D. Muller, C. Kurz und M. Renz, *Different Types of Modification in c-Fos and its Associated Protein p39: Modulation of DNA Binding by Phosphorylation*, Oncogene Res, 2 (1987), S. 19-32.
- [194] T. Nakamura, R. Datta, S. Kharbanda und D. Kufe, *Regulation of Jun and Fos Gene Expression in Human Monocytes by the Macrophage Colony-Stimulating Factor*, Cell Growth Differ, 2 (1991), S. 267-72.
- [195] B. J. Pulverer, J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki und J. R. Woodgett, *Phosphorylation of c-Jun Mediated by MAP Kinases*, Nature, 353 (1991), S. 670-4.
- [196] T. Wilson und R. Treisman, *Removal of Poly(A) and Consequent Degradation of c-Fos mRNA Facilitated by 3' AU-Rich Sequences*, Nature, 336 (1988), S. 396-9.

- [197] S. Xanthoudakis und T. Curran, *Identification and Characterization of Ref-1, a Nuclear Protein That Facilitates AP-1 DNA-Binding Activity*, *Embo J*, 11 (1992), S. 653-65.
- [198] O. A. Coso, M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki und J. S. Gutkind, *The Small GTP-Binding Proteins Rac1 and Cdc42 Regulate the Activity of the JNK/SAPK Signaling Pathway*, *Cell*, 81 (1995), S. 1137-46.
- [199] A. Minden, A. Lin, F. X. Claret, A. Abo und M. Karin, *Selective Activation of the JNK Signaling Cascade and c-Jun Transcriptional Activity by the Small GTPases Rac and Cdc42hs*, *Cell*, 81 (1995), S. 1147-57.
- [200] A. Minden, A. Lin, M. McMahon, C. Lange-Carter, B. Derijard, R. J. Davis, G. L. Johnson und M. Karin, *Differential Activation of ERK and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases by Raf-1 and MEKK*, *Science*, 266 (1994), S. 1719-23.
- [201] A. J. Ridley und A. Hall, *The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors*, *Cell*, 70 (1992), S. 389-99.
- [202] A. J. Ridley, H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann und A. Hall, *The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling*, *Cell*, 70 (1992), S. 401-10.
- [203] W. H. Harvey, O. S. Harb, S. T. Kosak, J. C. Sheaffer, L. R. Lowe und N. A. Heerema, *Interferon- α -2b Downregulation of Oncogenes H-Ras, C-Raf-2, c-Kit, c-Myc, c-Myb and c-Fos in ESKOL, a Hairy Cell Leukemic Line, Results in Temporal Perturbation of Signal Transduction Cascade*, *Leuk Res*, 18 (1994), S. 577-85.