

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
Molekularbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. P. Becker

**Charakterisierung von HSS-2, einer B-zell-
spezifischen, regulatorischen DNA-Sequenz im
Bereich des Ig λ -Enhancers des Menschen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Priska Kraißer
aus Kufstein
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.-G. Klobeck

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Brocker
Priv. Doz. Dr. M. Speicher

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen

Prüfung: 18.12.2002

An diese Stelle gehören Worte des Dankes, die Herrn Prof. H.-G. Klobeck für die Betreuung meiner Arbeit, für die stets bereitwillige Hilfeleistung und für die wertvollen Anregungen gebühren. Für ihren Einsatz möchte ich auch Frau G. Combriato danken.

Mein Dank gilt auch den Institutsangehörigen, vor allem meinen Kolleginnen Birthe und Susi, für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Der größte Dank ergeht jedoch an meine Eltern für ihre ständige Unterstützung und Förderung. Auch danke ich Rudi für sein Verständnis, seine Geduld und Hilfe.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das molekulare Arsenal des Immunsystems.....	1
1.2	Transkriptionsregulation und ihre Beeinflussung durch Chromatin und Nukleosomen	7
1.3	Aufgabenstellung	10
2	MATERIALIEN	13
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	13
2.2	Chemikalien	13
2.3	Radiochemikalien	14
2.4	Enzyme	14
2.5	Kits	15
2.6	Lösungen, Medien und Puffer	15
2.7	DNA.....	18
2.7.1	Längenstandards	18
2.7.2	Vektoren	18
2.7.3	Oligonukleotide	18
2.8	Zelllinien	18
2.9	Bakterienstamm.....	19
2.10	Computerprogramme	19
3	METHODEN	20
3.1	Molekularbiologische Standardmethoden	20
3.1.1	DNA-Spaltung und DNA-Ligierung	20
3.1.2	Gelelektrophorese	20
3.1.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	20
3.1.4	Klonierung	21
3.1.4.1	Vorbereitung der Plasmide	21
3.1.4.2	Herstellung elektrokompenter Zellen	21
3.1.4.3	Elektroporation	21
3.1.4.4	Plasmidisolierung für die präparative und analytische Verwendung .	22

3.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	22
3.1.6	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	23
3.2	In-vivo-Reportergen-Assay.....	24
3.2.1	Transiente Transfektion.....	24
3.2.2	Luciferase-Aktivitätsmessung.....	24
3.3	In-vivo-Footprinting.....	26
3.3.1	Methylierung von DNA mit DMS und Spaltung mit Piperidin.....	26
3.3.1.1	Freie DNA.....	26
3.3.1.2	Zell-DNA.....	28
3.3.2	Ligierungsvermittelte PCR (LMPCR).....	29
3.3.2.1	Standardprotokoll.....	29
3.3.2.2	GC-reiches PCR-System.....	30
3.3.3	Analyse der LMPCR-Produkte.....	31
3.4	Biologische Sicherheit.....	32
4	ERGEBNISSE.....	34
4.1	Transiente Transfektionen und Reporter-Expressionsassays.....	34
4.1.1	Transfektion durch Elektroporation.....	36
4.1.1.1	Parameter.....	37
4.1.1.2	Einfluß der DNA auf die Transfektionseffizienz.....	39
4.1.1.2.1	Qualitative Aspekte.....	39
4.1.1.2.2	Quantitative Aspekte.....	40
4.1.2	Ermittlung und Auswertung der Elektroporationsergebnisse.....	41
4.1.3	Beschreibung der Konstrukte und ihr Einfluß auf die Expression.....	44
4.1.3.1	5'- bzw. 3'-Deletionen in HSS-2.....	44
4.1.3.2	Mutationen in HSS-2.....	52
4.1.3.3	Deletionen flußaufwärts von HSS-2.....	54
4.2	In-vivo-Footprinting.....	63
4.2.1	Einflüsse auf den Erfolg der LMPCR.....	64
4.2.1.1	Auswahl der DNA-Polymerasen.....	64
4.2.1.2	PCR-Parameter.....	67
4.2.2	Optimierung der LMPCR-Methode.....	68

4.2.3	Vorbehandlung der Zelllinien (TPCK, PMA), Methylierung und Kontrolle der DNA-Spaltung.....	73
4.2.4	Adaptierung der LMPCR-Methode für GC-reiche Regionen	78
4.2.5	Auswertung der In-vivo-Footprintversuche und Analyse der Ergebnisse.....	83
4.2.5.1	Auswertung der In-vivo-Footprintversuche	83
4.2.5.2	Computerunterstützte Sequenzanalyse	100
5	DISKUSSION	103
5.1	Die verschiedenen Methoden zur genaueren Eingrenzung und Charakterisierung von HSS-2	103
5.2	Interpretation der Versuchsergebnisse	106
5.2.1	Hinweise auf wichtige Bereiche in HSS-2 durch transiente Transfektion.....	106
5.2.2	Beschreibung der identifizierten Faktoren und ihre Rolle während der B-Zellentwicklung.....	109
5.3	Was bedeuten diese Ergebnisse ?	115
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	LITERATURVERZEICHNIS	123
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	133
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136

ANHANG

LEBENS LAUF

1 Einleitung

1.1 Das molekulare Arsenal des Immunsystems

In der uns umgebenden Welt befindet sich eine Vielzahl potentiell infektiöser Systeme, angefangen von Würmern über Pilze bis hin zu Viren. Sie alle müssen durch ein raffiniertes Verteidigungssystem, das uns in Form unseres Immunsystems zur Verfügung steht, bekämpft, an ihrer Ausbreitung im Körper gehindert und schließlich vernichtet werden.

Um diese Aufgaben zu erfüllen, hat das Immunsystem die Fähigkeiten Fremdmoleküle zu erkennen, diese zu zerstören und ein Gedächtnis zu entwickeln, das erlaubt, auf eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger sofort zu reagieren.

Haut und Körpersekrete bilden den ersten Schutz gegen Eindringlinge. Wenn sie doch in den Körper gelangen, werden zwei verschiedene spezifische Verteidigungsmechanismen aktiv: die zelluläre und die humorale Immunantwort (Zusammenfassung in: Silbernagl und Despopoulos, 1991; Janeway und Travers, 1997; Burmester und Pezzutto, 1998).

Die zelluläre Immunabwehr beginnt mit der Phagozytose durch Makrophagen. Diese präsentieren den T-Zellen an ihrer Oberfläche Teile der Erreger, die sogenannten Antigene. Dadurch entstehen Gedächtniszellen und für diese spezifische Abwehrreaktion zuständige T-Lymphozyten, die durch ihre Lymphokine wieder Makrophagen aktivieren oder direkt als zytotoxische T-Lymphozyten die Zellen mit den Erregern abtöten.

Bei der humoralen Immunabwehr startet die Eliminierung von Eindringlingen mit der Bindung eines Antigens an membrangebundene Antikörper (Immunglobuline, Ig) auf der B-Lymphozytenoberfläche sowie der Präsentation des Antigens durch Makrophagen oder durch die B-Zellen selbst. Daraufhin werden mit Hilfe von T-Helferzellen B-Zellen aktiviert, aus denen Gedächtnis- und Plasmazellen entstehen. Letztere bilden dann Antikörper und sezernieren diese ins Plasma. Dort markieren die für die jeweiligen Antigene spezifischen Antikörper die Erreger, um von anderen Abwehrsystemen (Phagozyten, Komplementsystem) erkannt und vernichtet zu werden.

Da langlebige Gedächtniszellen die Information bei der Erstantwort gespeichert haben, setzt eine Immunglobulinproduktion bei erneutem Kontakt mit dem Erreger rascher und stärker ein.

Die Immunglobuline sind Y-förmige Glykoproteine, die beim Menschen, wie bei den meisten Säugetieren, aus zwei identischen leichten (L = light) und zwei identischen schweren (H = heavy) Ketten bestehen. Nur bei Kamelen, Lamas und Dromedaren sind die Antikörper aus zwei identischen schweren Ketten aufgebaut (Übersicht in Muyldermans et al., 2001).

Im Falle der leichten Ketten unterscheidet man zwischen λ - und κ -Ketten, wobei eine bestimmte B-Zelle immer nur einen Typ exprimiert. Nach heutigem Wissensstand besitzen die verschiedenen Typen keine funktionellen Unterschiede und treten beim Menschen zu 40% beziehungsweise 60% auf.

Die schweren Ketten bestimmen die fünf Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE), welche sich in Molekulargewicht und Funktionalität unterscheiden (Tab. 1).

	Molekulargewicht	schwere Kette	leichte Kette
IgG	150000	γ	κ / λ
IgA	160000 bzw. 320000	α	κ / λ
IgM	900000	μ	κ / λ
IgD	185000	δ	κ / λ
IgE	200000	ϵ	κ / λ

Tab. 1: Antikörpertypen

Bemerkenswert ist, daß die Gene für diese Ketten auf verschiedenen Chromosomen verteilt sind. Die H-Kette (Sequenz und Übersicht des H-Locus in Matsuda et al., 1998) wird auf Chromosom 14, die κ -Kette (Kawasaki et al., 2001) auf Chromosom 2 und die λ -Kette (Kawasaki et al., 1997) auf Chromosom 22 kodiert.

Die leichten Ketten setzen sich aus einer konstanten (C_L) und einer variablen (V_L) Domäne zusammen, während sich die schweren Ketten in eine variable (V_H) Domäne und drei (bei IgM und IgE vier) konstante (C_H) Domänen einteilen lassen (Abb. 1). Konstante und variable Domänen sind aus je etwa 110 Aminosäuren aufgebaut

(Branden und Tooze, 1991). Der variable Teil zeichnet sich durch eine extreme Variabilität der Polypeptidketten aus.

Disulfidbrücken verbinden die beiden H-Ketten und jede schwere mit einer leichten Kette und ermöglichen somit eine flexible Struktur.

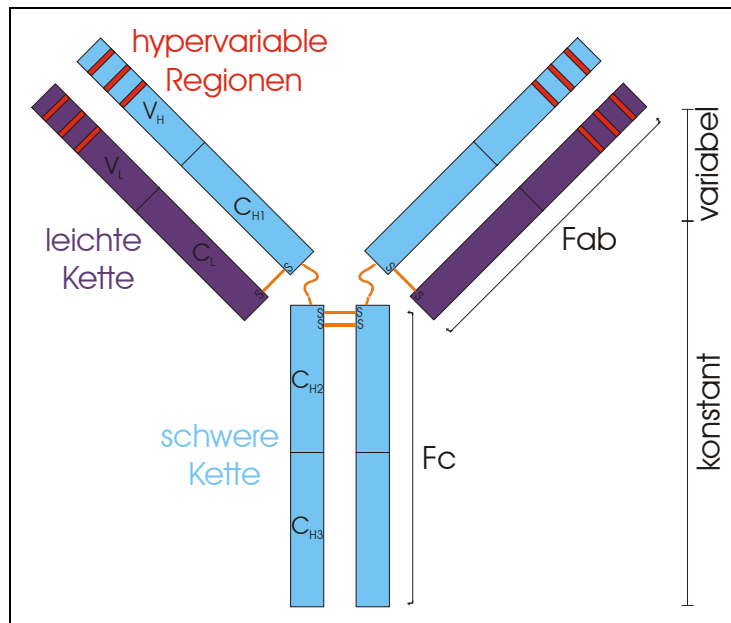


Abb. 1: Antikörperstruktur am Beispiel des IgG

Enzymatisch, das heißt durch Einwirkung von Papain, lassen sich Immunglobuline in zwei Fragmente spalten. Das antigenbindende Fragment Fab besteht aus der variablen und ersten konstanten Domäne der schweren Kette und der vollständigen leichten Kette. Das kristallisierbare Fragment Fc setzt sich aus der zweiten und dritten konstanten Domäne der schweren Kette zusammen und ist für die Bindung an Rezeptoren auf körpereigenen Zellen und die Signalübermittlung verantwortlich. Für die Vernetzung der Antikörper mit Antigenen spielt die Flexibilität zwischen Fab und Fc eine wichtige Rolle.

Die variablen Regionen je einer leichten und schweren Kette bilden zusammen die zwei Antigenbindungsstellen. Hier gibt es Bereiche, die eine hohe Variabilität der Aminosäuresequenz aufweisen, die sogenannten hypervariablen Regionen (complementarity de-termining regions = CDRs). Sie bestimmen durch Substitution einzelner Aminosäuren die Spezifität der Antigenbindung.

Da sich ein Individuum gegen sehr viele Antigene schützen muß und daher eine enorme Zahl verschiedener spezifischer Antikörper benötigt wird, kann es keine vollständigen Gene für die variablen Domänen geben. Das menschliche Genom ist dafür zu klein. Um

dennoch die Vielfalt der Antikörper, deren Zahl auf etwa 10^8 geschätzt wird, zu erreichen, ist ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen nötig.

Für die variablen Regionen gibt es im Genom zahlreiche DNA-Abschnitte, deren V(variable)-, D(diversity)- und J(joining)-Segmente zufällig und im Laufe der B-Zellentwicklung schrittweise rekombiniert werden (Übersicht in Schatz et al., 1992). Die variable Domäne der schweren Kette, welche als erstes umgelagert wird, setzt sich aus V-, D- und J-Segmenten, die der leichten Kette nur aus V- und J-Segmenten zusammen. Das C(constant)-Segment baut den konstanten Teil jeder Kette auf.

Für die leichten Ketten vom λ -Typ enthält das Chromosom 22 einen Cluster von V_λ -Gensegmenten, auf den Paare von J_λ - und C_λ -Genen folgen. Bei κ -Ketten schließen sich auf Chromosom 2 der V_κ -Einheit J_κ -Abschnitte und ein einzelnes C_κ -Gen an. Dieses Schema ist auch in Chromosom 14 für die schweren Ketten zu finden, mit Ausnahme von einem D_H -Cluster, der zwischen V_H - und J_H -Elementen eingeschoben ist. Eine Rekombination erfolgt nur zwischen Gensegmenten, die sich auf demselben Chromosom befinden.

Die Umlagerungsreaktionen sind das Ergebnis einer Aktivierung durch einen Multi-enzymkomplex, der V(D)J-Rekombinase. Diese besteht aus Enzymen für das Schneiden und die Reparatur von DNA und ist an Genumstrukturierungen sowohl in B- als auch in T-Zellen beteiligt. Sie erkennt in allen Loci an jedem V-, D- und J-Segment die gleiche Rekombinationssignalsequenz (RSS), welche sich aus einer Heptamer-Spacer-Nonamer-Struktur zusammensetzt, und wird durch die Produkte von rekombinationsaktivierenden Genen (RAG-1 und -2) initiiert (Übersicht in Fugmann et al., 2000). Im Verlauf der Rekombinationen lagern sich immer RSS mit 12mer- und 23mer-Spacern durch die Wechselwirkungen mit RAG-1- und -2-Produkten, die spezialisierte Endonukleasen darstellen, zusammen. Die Aktivität von RAG-1 und -2, die in sich entwickelnden Lymphozyten nur gemeinsam exprimiert werden, ist entwicklungsabhängig und beginnt noch bevor sich die Linien der B- und T-Zellen trennen. Während der B-Zellentwicklung wird sie immer wieder unterdrückt und gesteigert, bis sie schließlich bei reifen Zellen nicht mehr feststellbar ist.

Die Inaktivierung der Rekombinationsmaschinerie in reifen Zellen ist nötig, um eine Produktion von unselektierten Antigenrezeptoren und eine aberrante Umordnung zu verhindern (rekombinatorische Diversität). Die Genumlagerungen spielen eine wichtige

Rolle in der Ig-Transkriptionskontrolle, da dadurch die Promotoren unter den Einfluß der sehr starken Ig-Enhancer (Transkriptionsverstärker) kommen. Erst dann kann die Plasmazelle die enormen Antikörpermengen produzieren.

Außerdem besteht zur Erhöhung der Diversität die Möglichkeit, beim Zusammenbau der verschiedenen Gensegmente an den Verknüpfungsstellen bis zu 20 Nukleotide zufällig ein- bzw. abzubauen (junktionale Vielfalt).

Weiters lagern sich verschiedene schwere mit leichten Ketten vom λ - oder κ -Typ und verschiedene variable Regionen der L- und H-Ketten aneinander (kombinatorische Diversität).

Darüber hinaus können zur Steigerung der Antikörpervielfalt nach der Exprimierung eines Antikörpers Punktmutationen in den variablen Regionen bereits ungeordneter Gene auftreten. Diese sogenannten somatischen Hypermutationen erfolgen erst nach der B-Zellstimulierung durch Antigenkontakt in den Keimzentren (Übersicht in: Wabl et al., 1999; Jacobs und Bross, 2001). Jene B-Zellen, deren Antikörper eine höhere Antigenaffinität als die anderen besitzen, werden selektiert und reifen zu antikörpersezernierenden Zellen aus.

Eine Kombination aller hier geschilderten Vorgänge ermöglicht trotz einer begrenzten Anzahl von Genen ein enormes spezifisches Antikörperrepertoire.

Die schrittweisen V(D)J-Umordnungen und die Expression der Immunglobulingene der H- und L-Ketten charakterisieren die Stufen der B-Zellentwicklung (Abb. 2).

Als Reaktion auf bestimmte Signale, wie Zytokine oder Zell-Zell-Kontakt, entstehen B-Lymphozyten im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen (Übersicht in: Clark und Lane, 1991; Henderson und Calame, 1998; Busslinger et al., 2000). Diese entwickeln sich zu Progenitor-B-Zellen (Pro-B-Zelle) und dann zu Prä-B-Zellen, welche bereits, ohne mit einem Fremdanigen in Kontakt gekommen zu sein, auf ihrer Oberfläche intakte μ -Ketten exprimieren. Aus den Prä-B-Zellen werden schließlich unreife B-Zellen, die durch Apoptose sterben, falls ihre auf der Oberfläche bereits exprimierte Immunglobuline (IgM) an Autoantigene binden, was bedeutet, daß jeder weitere Reifungsprozeß antigenabhängig ist (Übersicht in Melchers et al., 1994).

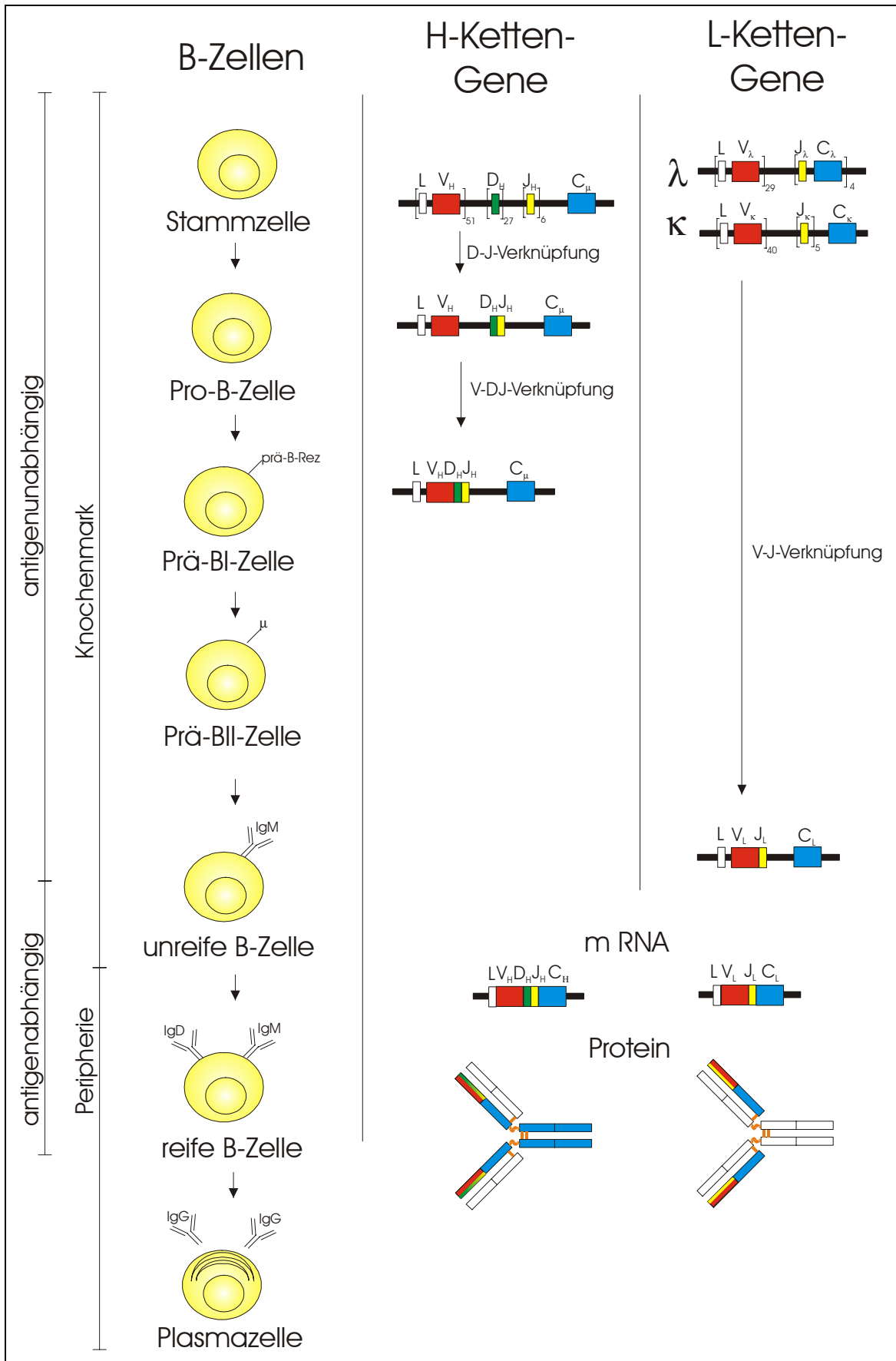


Abb. 2: Zusammenfassung der B-Zellentwicklung und Gensegmentumordnung (Übersicht in Melchers und Rolink, 1998)

In diesem Reifungsstadium verlassen die überlebenden Zellen das Knochenmark und wandern in lymphatische Organe, wo sie nun zu reifen B-Zellen differenzieren und als solche auf ihrer Oberfläche IgM und gleichzeitig IgD, das durch differenziertes Spleißen aus dem selben Transkript entsteht, exprimieren. Einige Zellen vollziehen nach einer bereits erfolgten Antigenstimulierung einen Klassenwechsel (class switch), bei dem die genetische Information für den konstanten Teil der H-Kette ausgetauscht wird, und exprimieren dann IgG, IgE oder IgA (Übersicht in: Tonegawa, 1983; Chen und Alt, 1993). In dieser Form zirkulieren die Lymphozyten, bis sie auf passende Antigene treffen, und reifen dann zu antikörperproduzierenden Plasmazellen heran (Übersicht in Arpin et al., 1995).

1.2 Transkriptionsregulation und ihre Beeinflussung durch Chromatin und Nukleosomen

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) stellt in ihrer doppelsträngigen Helixform den Träger des Erbmaterials, das heißt der gesamten genetischen Information, dar. Die Größe dieser Gesamtheit an genetischer Information, die als Genom bezeichnet wird, beträgt beim Menschen zirka drei Milliarden Basenpaare. Nach heutigen Schätzungen beläuft sich die Zahl der Gene auf etwa 25 000 bis 40 000 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter, 2001; Wirth, 2001).

Um die sich daraus ergebende lineare Länge von mehreren Metern so zu kürzen, daß das Genom im Zellkern Platz findet, muß die DNA einem komplexen, mehrstufigen Packungsschema unterworfen werden (Zusammenfassung in Ross, 1996). Dabei winden sich zuerst 146 Basenpaare der DNA-Doppelhelix 1,65-mal um einen Proteinoktamer-komplex, der aus Histonen besteht (zur Struktur siehe Luger et al., 1997). Diese sogenannten Nukleosome organisieren sich dann zu einer superspiralisierten Struktur, welche in Schleifenform zusammengepackt wird. Im Verlauf der Zellteilung (Mitose) lagern sich diese Schleifen als Chromatin zu Chromosomen um (Abb. 3).

Eine der wichtigsten Aufgaben der DNA neben Replikation und Rekombination ist die Proteinerzeugung, welche durch die Expression entsprechender Gene erfolgt. Reguliert wird dieser Vorgang durch spezifische Veränderungen der Chromatinstruktur, die damit

die Transkription ermöglichen (Übersicht in: Felsenfeld, 1996; Wolffe und Hayes, 1999). Diese Tatsache ist Gegenstand intensiver Forschung.

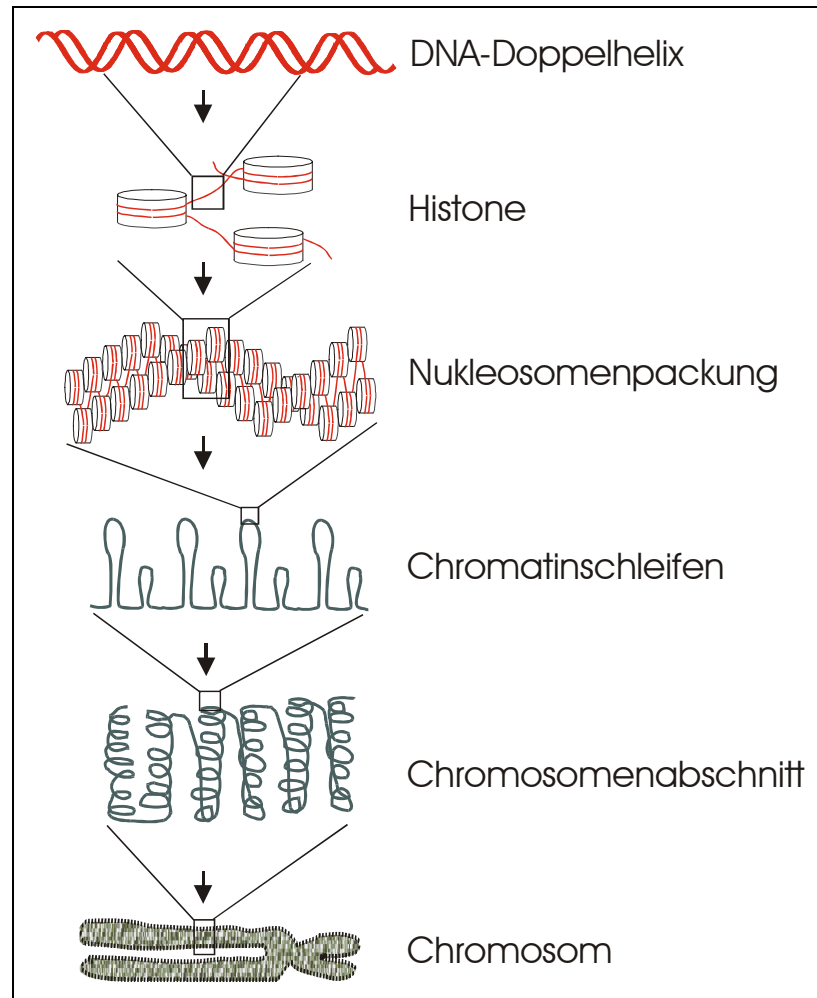


Abb. 3: Packungsschema der genomischen DNA

Obwohl in jeder Zelle die komplette genetische Information eines Organismus enthalten ist, werden je nach Gewebe und Zellart nur bestimmte Abschnitte der DNA transkribiert. Dafür sind unterschiedliche aktivierende Proteine zuständig, die für die jeweilige Zellart spezifisch sind. Nur wenn eine genau definierte Kombination dieser Transkriptionsfaktoren an einen Promotor bindet, setzt die Transkription ein. Dazu besitzen diese Proteine funktionelle Domänen, die einerseits DNA und andererseits weitere Faktoren binden können.

Da allerdings die DNA mit den Histonoktameren assoziiert und das Chromatin sehr dicht gepackt ist, können Proteine, die zum Beispiel für die Transkription eine wichtige Rolle

spielen, nicht an in Nukleosomen verpackte DNA binden. Das heißt, die DNA muß an Steuerelementen, wie Promotor- und Enhancer-Regionen, durch chromatinverändernde Effektoren für die Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht werden. Eine Lockerung dieser Strukturen kann durch histonmodifizierende Enzyme, wie Histonacetylasen, -phosphorylasen und -methylasen, und ATP-abhängige chromatinverändernde Komplexe erfolgen (Kornberg und Lorch, 1999; Cheung et al., 2000; Wu und Grunstein, 2000).

Bei der Acetylierung der Arginin- und Lysinreste der Histonproteine, dem bisher am besten charakterisierten Vorgang in aktiven Transkriptionsbereichen des Chromatins, verlieren diese ihre positiven Ladungen und können nicht mehr an die negativ geladene DNA binden. So ermöglichen Koaktivatoren mit Histonacetyltransferaseaktivität als Bestandteile des Transkriptionskomplexes, daß Nukleosome, die für das Anheften von Proteinen ein Hindernis darstellen, nur mehr partiell mit der DNA assoziieren können und diese für Transkriptionsfaktoren zugänglich machen.

Außerdem wurden Komplexe, wie SWI/SNF, CHRAC und NURF, gefunden, die mit Hilfe verschiedener ATPasen (z.B. ISWI) die Chromatinstruktur verändern, Nukleosome von einem bestimmten DNA-Abschnitt wegbewegen und damit zelluläre Prozesse wie die Transkription regulieren (Armstrong et al., 1998; Längst et al., 1999; Bustin, 2001; Längst und Becker, 2001).

Die Erkenntnis, daß Transkriptionsfaktoren direkt oder über Adapterproteine katalytische Aktivität vor allem hinsichtlich der Histonacetylierung besitzen, verdeutlicht die Wichtigkeit der Chromatinstruktur für die Effizienz der Transkription.

So kontrollieren genregulatorische Proteine, die noch nicht näher bekannt sind, auch, inwieweit das Chromatin der Immunglobulingene für die Rekombinationsenzyme zugänglich ist. Informationen über die involvierten Transkriptionsfaktoren können beispielsweise über In-vivo-Footprinting erhalten werden.

Die Kontrolle der Locuszugänglichkeit ist eine wichtige Aufgabe von entwicklungs- und gewebsspezifischen Enhancern, die als Eintrittspunkte für histonmodifizierende Enzyme und ATP-abhängige „remodeling“-Maschinen fungieren.

Ig-Enhancer gehören zu den stärksten Enhancern und sind verantwortlich für die Regulation der Genumlagerung und Zugänglichkeit des Chromatins, indem sie bestimmen, welche Loci für die Transkription geöffnet werden.

Da Details über die Zugänglichkeitskontrolle noch nicht bekannt sind, müssen die Enhancer noch genauer untersucht werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit HSS-2, einem synergistisch wirkenden Element des $Ig\lambda$ -Enhancers.

1.3 Aufgabenstellung

Die Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck arbeitet seit einigen Jahren an der Erforschung von regulatorischen Elementen im menschlichen λ -Locus, welcher auf Chromosom 22q11.2 lokalisiert und 911 kB lang ist (Kawasaki et al., 1997). Einen Großteil davon nimmt der V-Bereich (69 $V\lambda$ -Gene) in Anspruch. Ergebnisse der Gruppe lassen den Schluß zu, daß alle $V\lambda$ -Abschnitte relativ zueinander und zu den $J\lambda$ - und $C\lambda$ -Segmenten gleich ausgerichtet sind und somit Rekombinationen nur durch Deletionen stattfinden. Es befinden sich in 3'-Richtung sieben JC-Einheiten, von denen allerdings nur vier eine kodierende Funktion haben (Combriato und Klobeck, 1991).

In der Nachbarschaft dieser $J\lambda C\lambda$ -Gruppen konnten Bereiche mit gelockerter Chromatinstruktur (sogenannte DNase-hypersensitive Regionen, HSS), welche damit Zutritt für wichtige Faktoren gewährleisten, gefunden werden. Dies ist mit Hilfe von DNase I möglich, da dieses Enzym nur im Falle einer Zugänglichkeit spaltet. Durch DNase I-Behandlung können regulatorische Elemente der $Ig\lambda$ -Loci, aber auch Elemente mit synergistischen oder entwicklungsabhängigen Effekten identifiziert werden, welche über Expressionsversuche mit Reportergenkonstrukten nicht erfaßbar sind.

Die kartierten DNase I-hypersensitiven Regionen (HSS) wurden in 5'→3'-Richtung von 0 bis 3 durchnummeriert (Abb. 4). HSS-2, -3 und ein Teil von HSS-1 finden sich nur in B-Zellen, während HSS-0 und ein Teil von HSS-1 in verschiedenen Zelltypen vorkommen. Drei dieser Regionen (HSS-1, -2 und -3), die innerhalb von 10 kB flußabwärts des $C\lambda 7$ -Segments liegen, bilden zusammen einen sehr starken gewebsspezifischen Enhancer ($Ig\lambda$ -Enhancer; Asenbauer und Klobeck, 1996; Asenbauer et al., 1999). Solche transkriptionsaktivierenden Elemente steuern die Expression der rekombinierten Immunglobulingene und ermöglichen der Plasmazelle die Produktion einer großen Antikörpermenge. Während HSS-3 bereits alleine einen Enhancer darstellt, wirken HSS-1 und -2 ausschließlich synergistisch und erhöhen die Enhanceraktivität (Asenbauer et al., 1999).

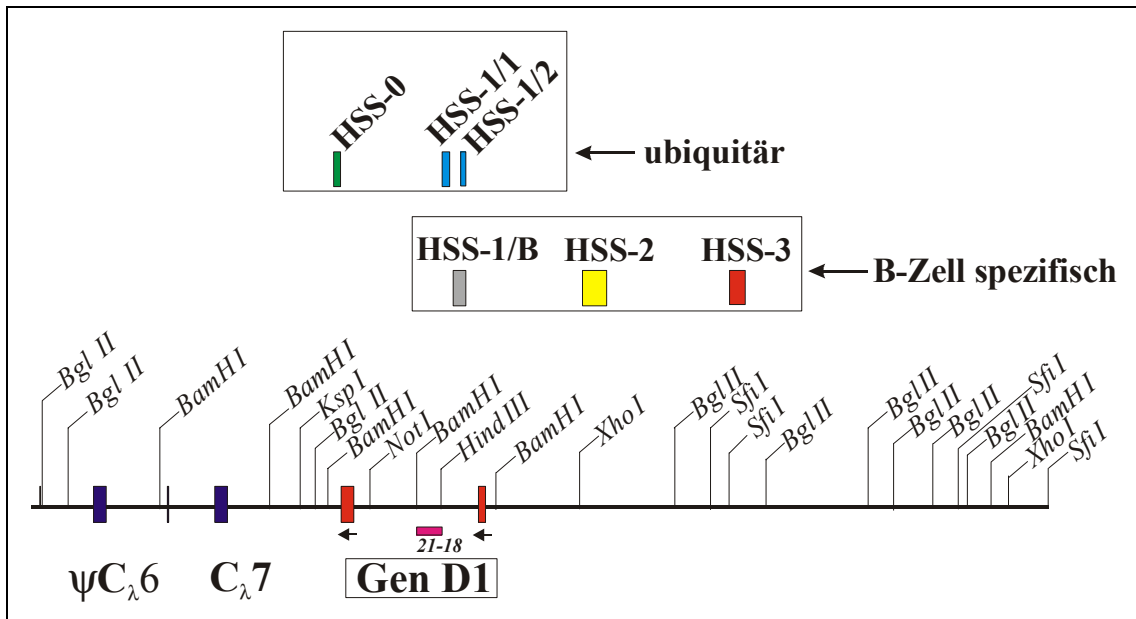


Abb. 4: DNase I-hypersensitive Bereiche im humanen Igl-Locus

In der Restriktionskarte wurden die Spaltstellen angegeben. Zwei der sieben C_{λ} -Gensegmente sind sichtbar und als Kästchen eingezeichnet. Jeweils flußaufwärts dieser Elemente ist ein J_{λ} -Segment (Vasicek und Leder, 1990; Combriato und Klobeck, 1991) als senkrechter Strich dargestellt. Die zwei anschließenden Kästchen symbolisieren Exon 1 und 2 des Gens D1, wobei die Pfeile die Transkriptionsrichtung angeben. Der Balken zeigt die Lage der zur Hybridisierung verwendeten Sonde 21-18. Die kartierten DNase I-hypersensitiven Regionen (Asenbauer, 1996) liegen flußabwärts von $C_{\lambda}7$ und wurden nach ihrem Auftreten in 5'→3'-Richtung von 0 bis 3 durchnummeriert. Die Einteilung von HSS-1 ist in Friess (2001) zu finden.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung der DNase I-hypersensitiven Region 2 (HSS-2) des humanen λ -Locus, die aus technischen Gründen (GC-reicher Bereich) von H. Asenbauer nicht weiter als auf zirka 1 kB eingegrenzt werden konnte. Es ist nicht bekannt, wo innerhalb dieser großen Region die transkriptionsregulatorischen Bereiche liegen und in welchen B-Zellstadien die in der reifen B-Zelle festgestellte Hypersensitivität noch auftritt.

Mittels transients Transfektion von reifen B-Zellen sollten die für die Transkription wichtigen Bereiche eingegrenzt und die Einflüsse von Mutationen und HSS-1 bestimmt werden.

Anschließend wurde die gesamte HSS-2-Region mit Hilfe des In-vivo-Footprintings auf mögliche Proteinbindungsstellen und ihre Veränderungen während der B-Zellentwicklung hin untersucht, um hypersensitive Bereiche weiter einengen zu können.

Über die Datenbank Transfac (Wingender et al., 2001) wurden den Bindungsstellen dann putative Transkriptionsfaktoren zugeordnet.

Voraussetzung für diese Versuche war die Herstellung verschiedener HSS-2-Konstrukte durch Klonierung und die DNA-Gewinnung und -Behandlung mit Dimethylsulfat und Piperidin.

Das Ziel des Projektes bestand darin, Klarheit über die Rolle von HSS-2 in der B-Zell-differenzierung und Immunglobulingenexpression zu bekommen.

2 Materialien

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Casy [®] -1 Cell Counter and Analyser System	Schärfe System, Reutlingen
E. coli Pulser	Biorad Laboratories, München
Fuji Medical X-Ray Film (Super RX)	Fuji Foto, Düsseldorf
GeneAmp PCR system 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp PCR system 2700	Applied Biosystems, Weiterstadt
GeneAmp PCR system 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Pulser	Biorad Laboratories, München
Gene Pulser Cuvette (0,4 cm-Elektrode)	Biorad Laboratories, München
Gene Pulser / E. coli Cuvette (0,1 cm-Elektrode)	Biorad Laboratories, München
Image Master VDS	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kodak Scientific Imaging Film (Biomax MR)	Integra Bioscience, Fernwald
LKB 1209 Rackbeta LSC2 [³² P]-Čerenkov	Pharmacia, Freiburg
Luminometer Lumat LB 9501/16	Berthold Technologies, Bad
Wildbad	
Multi-Guard-Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern (0,1-10 µl, 5-200µl, 100-1000 µl)	Roth, Karlsruhe
Multi-Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 5-200µl, 100-1000 µl)	Roth, Karlsruhe
NucTrap [®] Probe Purification Columns	Stratagene, Amsterdam
Phosphorimager BAS 1500	Fuji Foto, Düsseldorf
Ultraspec 2000 (UV/VIS) Spektrometer	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.2 Chemikalien

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)

BlueSlick	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg
dNTPs (Deoxynucleoside-Triphosphate-Set)	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTP-Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Fötales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin c.c.pro, Heidelberg
Gentamycin	c.c.pro, Heidelberg
Glutamin	c.c.pro, Heidelberg
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit (USA)
PMA (12-Myristyl-13-acetylphorbolsäureester)	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640-Medium	c.c.pro, Heidelberg
Seakem ME Agarose	FMC Bioproducts, Rockland (USA)
SequaGel™-6 (USA)	National Diagnostics, Atlanta
Tris	Roche Diagnostics, Mannheim
TPCK (N-Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon)	Sigma, Deisenhofen
weitere Chemikalien	Merck, Darmstadt

2.3 Radiochemikalien

dATP (γ [³² P]; > 6000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Freiburg
---	------------------------------

2.4 Enzyme

AmpliTaqGold-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, Heidelberg
Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim

2.5 Kits

Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega, Heidelberg
EndoFree [™] Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
GC-rich PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
QIAGEN Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden

2.6 Lösungen, Medien und Puffer

Agarplatten:

- 5 g/l NaCl
- 10 g/l Trypton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 13 g/l Agar
- 150 mg/l Ampicillin

10xAuftragspuffer (für Agarosegele):

- 50 mM EDTA
- 50% Saccharose
- 0,1% Bromphenolblau

10xHMFMEinfriermedium:

- 63 g/l K₂HPO₄
- 4,5 g/l Natriumcitrat
- 0,9 g/l MgSO₄·7H₂O
- 9 g/l (NH₄)₂SO₄
- 18 g/l KH₂PO₄
- 414 ml/l Glycerin

LB-Medium:

5 g/l NaCl

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

Zur Selektion von ampicillinresistenten Klonen wurden 150 mg/l Ampicillin zugegeben.

PBS:

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

2,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2PO_4

2xPCR-Puffer:

200 $\mu\text{l/ml}$ 10xPuffer (mit DNA-Polymerasen mitgeliefert)

400 μM dATP

400 μM dCTP

400 μM dGTP

400 μM dTTP

ST-Puffer:

100 mM NaCl

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

4xStop-Lösung:

80 mM EDTA

4% SDS

2,4 mg/ml Proteinase K

TAE-Puffer (Laufpuffer für Agarosegele):

40 mM Tris
20 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
CH₃COOH ad pH 7,4
0,5 mg/l Ethidiumbromid

10xTBE-Puffer (Laufpuffer für Polyacrylamidgele):

0,1 M Tris
0,1 M Borsäure
20 mM EDTA
pH 8,3

TE-Puffer:

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0

Zellkulturmedium für normales Wachstum:

RPMI 1640-Medium
15% fötales Kälberserum
4 mM Glutamin

Zellkulturmedium nach Elektroporation:

RPMI 1640-Medium
20% fötales Kälberserum
4 mM Glutamin
100 µg/ml Gentamycin

2.7 DNA

2.7.1 Längenstandards

Gene Ruler, 1kB DNA Ladder	MBI Fermentas, Amherst (USA)
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche Diagnostics, Mannheim

2.7.2 Vektoren

pGL3- λ Pro	Arbeitsgruppe H.-G. Klobeck (Asenbauer et al., 1999)
pRL-TK	Promega, Heidelberg

2.7.3 Oligonukleotide

PCR-Primer (s. Anhang)	MWG Biotech, Ebersberg
------------------------	------------------------

2.8 Zelllinien

Daudi	reife B-Zelllinie	$\kappa^+/\kappa^{\text{del}}$, λ^0/λ^0	Klein et al., 1968
MN60	reife B-Zelllinie	$\kappa^{\text{del}}/\kappa^-$, λ^+/λ^-	Roos et al., 1982
BV173	Prä-B-Zelllinie	$\kappa^0/\kappa^{-/+}$, λ^0/λ^0	Pegoraro et al., 1983
CCRF-CEM	T-Zelllinie	κ^0/κ^0 , λ^0/λ^0	Foley et al., 1965
Jurkat	T-Zelllinie	κ^0/κ^0 , λ^0/λ^0	Schneider et al., 1977
K562	myeloische Zelllinie	κ^0/κ^0 , λ^0/λ^0	Lozzio und Lozzio, 1975

Erklärung des Genotyps bezüglich der IgL-Loci:

κ^0 , λ^0 :	keine Umlagerung der Gensegmente
κ^+ , λ^+ :	produktive Umlagerung der Gensegmente
κ^- , λ^- :	aberrante Umlagerung der Gensegmente
κ^{del} :	Umlagerung des κ -deletierenden Elements

Die Zelllinien, deren Genotyp H. Asenbauer bestimmte (Asenbauer, 1996), wurden schon vorher in der Arbeitsgruppe verwendet und waren somit bereits vorhanden.

2.9 Bakterienstamm

Epicurian coli XL1-Blue: recA1 endA1

gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1

lac[F' proAB lac1^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

Stratagene, Amsterdam

2.10 Computerprogramme

Excel 2000

Microsoft Corporation

Image Master 1D Software

Amersham Pharmacia, Freiburg

Transfac

Wingender et al., 2001

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die molekularbiologischen Grundtechniken wurden, soweit nicht anders beschrieben, gemäß Sambrook (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

3.1.1 DNA-Spaltung und DNA-Ligierung

Für Analysen wurde 1 µg DNA mit 5 U einer Restriktionsendonuklease versetzt und im vom Hersteller mitgelieferten 10xPuffer (im Verhältnis 1:10) eine halbe bis eine Stunde lang bei 37°C gespalten. War eine Kombination von zwei Enzymen mit unterschiedlichen Puffern notwendig, wurde die erste Spaltung mit dem Enzym durchgeführt, für das der Hersteller den Puffer mit der niedrigeren Salzkonzentration empfahl, und dann die zweite Spaltung mit dem Enzym, für das die höhere Salzkonzentration nötig war.

1 µg der gespaltenen Plasmid-DNA wurde schließlich mit entsprechenden DNA-Fragmenten in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffer unter Verwendung von 0,5 U T4-DNA-Ligase über Nacht im Kühlschrank ligiert.

3.1.2 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese können DNA-Fragmente nach ihrer Größe, welche durch parallel aufgetragene Längenstandards bestimmbar ist, aufgetrennt werden. Dazu wurden die Proben mit einem Auftragspuffer (10:1; Kap. 2.6) versetzt und auf das Gel aufgebracht. Als Gele wurden Agarosegele mit Konzentrationen je nach Fragmentgröße zwischen 0,7% und 1,4% verwendet. Anschließend wurde eine Spannung von 80-100 Volt angelegt. Zur Sichtbarmachung der DNA im UV-Licht (254 nm) diente das Interkalans Ethidiumbromid, das in einer Konzentration von 0,5 mg/l sowohl im Gel als auch im TAE-Laufpuffer (Kap. 2.6) enthalten war.

3.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Fragmentisolierung aus Agarosegelen erfolgte durch Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell und durch Reinigung mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits

entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die dadurch erhaltene DNA wurde in TE-Puffer (Kap. 2.6) gelöst.

3.1.4 Klonierung

3.1.4.1 Vorbereitung der Plasmide

Die Vektoren und einzubauenden Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten, aufgereinigt und dann mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten. Die benötigten Plasmide entstanden schließlich durch Ligierung von gespaltenen Vektoren mit den Inserts.

3.1.4.2 Herstellung elektrokompenter Zellen

Als Ausgangsmaterial für die Produktion elektrokompenter Zellen diente der E. coli-Stamm XL1-Blue der Firma Stratagene. Dieser wurde zuerst in 10 ml LB-Medium (Kap. 2.6) über Nacht bei 37°C und Schütteln mit 220 Upm zum Wachsen angeregt, dann in einem Liter des gleichen Mediums angeimpft und so lange inkubiert, bis die optische Dichte der Zellsuspension 0,5 - 0,7 betrug. Voraussetzung für die weiteren Schritte war, die Zellen immer bei möglichst 0°C zu halten. In einer gekühlten Umgebung wurden die Bakterien 15 Minuten lang bei 3200 Upm zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes waren drei Waschschrte nötig, um die Salzkonzentration, die den Elektroporationsschritt stört, zu senken. Gewaschen, das heißt suspendiert und zentrifugiert, wurde mit 1000 ml, mit 500 ml und dann mit 250 ml eiskaltem zehnpromzentigen Glycerin unter den gleichen Bedingungen wie bei der Ernte. Schließlich betrug die Konzentration durch Zugabe von 3-4 ml Glycerin $1-3 \times 10^{10}$ Zellen/ml. Die Suspension aus elektrokompenten E. coli wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.1.4.3 Elektroporation

Die bei -80°C aufbewahrte Suspension aus elektrokompenten E. coli wurde kurz vor der Transfektion auf Eis getaut. Auch die Küvetten (Gene Pulser / E. coli Cuvette) mußten eiskalt sein und wurden deshalb zirka fünf Minuten vorher in eine -20°C-Gefriertruhe gelegt. Die Transfektion erfolgte durch gemeinsame Elektroporation von 40 µl elektrokompenter Zellen und 1 µl des Ligierungsansatzes (zirka 0,2 µg Plasmid-DNA mit ampicillinresistenzexprimierendem Gen) mit dem Gene Pulser bei 1700 Volt. Das Prinzip der Elektroporation beruht darauf, daß durch Anlegen von elektrischem Strom die

Entladung eines Plattenkondensators erwirkt wird und dadurch ein einzelner Stromstoß entsteht, der die Zellwände porös macht.

Anschließend wurde die Suspension in 1 ml ampicillinfreies LB-Medium (Kap. 2.6) pipettiert und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Dann wurden mit einem Spatel zuerst 150 µl und danach der auf dem Spatel verbleibende Rest dieser Kultur auf je einer ampicillinhaltigen Agarplatte (Kap. 2.6) ausgestrichen. Durch Inkubieren der Platten über Nacht in einem Brutschrank mit 37°C konnten Plasmide enthaltende Einzelkolonien selektiv wachsen, welche gepickt und in 2,5 ml-Übernachtskulturen angeimpft wurden. Die Aufarbeitung dieser Kulturen folgte der Vorschrift für die Plasmidisolierung zu analytischen Zwecken.

3.1.4.4 Plasmidisolierung für die präparative und analytische Verwendung

Für die Plasmidisolierung zu analytischem Gebrauch wurden 1,5 ml Zellsuspension verwendet und nach der Methode von Birnboim aufgearbeitet (Birnboim und Doly, 1979).

Im Gegensatz dazu waren für den präparativen Bedarf eine höhere Qualität der Aufarbeitung und größere Startmengen nötig. Als Ausgangsmaterial diente eine 2 ml-Vorkultur vom gewünschten Klon, die durch Animpfen einer Einzelkolonie und durch Inkubieren über Nacht bei 37°C und 220 Upm entstand. Die Vorkultur wurde in 250 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (Kap. 2.6) überführt, über Nacht bei 37°C inkubiert und geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3200 Upm die Ernte der Zellen. Der Großteil davon wurde anschließend mit dem JETSTAR Plasmid Purification Kit aufgearbeitet. Dem Rest der Zellsuspension wurde HMFM-Einfriermedium (1:10; Kap. 2.6) zugegeben, um eine Aufbewahrung über längere Zeit bei -80°C zu ermöglichen.

3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Technik (Saiki et al., 1988; McPherson et al., 1995) wurde bei Klonierungen verwendet, für die bekannte DNA-Sequenzen als Inserts amplifiziert werden sollten. Die Inserts konnten mit Hilfe von Oligonukleotiden (Primer) der Firma MWG Biotech hergestellt werden. Um die optimalen Anlagerungstemperaturen der Oligonukleotide zu finden, wurden die Angaben des Herstellers beachtet, mit den errechneten Temperaturen (nach der bewährten Faustregel: 4° pro C bzw. G + 2° pro A bzw. T) verglichen und über

Agarosegelelektrophorese ausgewertete Test-PCRs durchgeführt. Durch das Tragen von Handschuhen und das Verwenden von Filterpipettenspitzen konnten Kontaminationen in Reaktionsansätzen vermieden werden. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug meistens 50 μl , die Konzentration der Primer 1 μM und die der Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) 200 μM . Die Proben enthielten 3 U einer thermostabilen Polymerase (beispielsweise Pfu oder Taq), zwei Primer, die zu amplifizierende DNA (zirka 200 $\text{pg}/\mu\text{l}$) und eine Vormischung aus dem mitgelieferten Puffer und den einzelnen Nukleotiden (Kap. 2.6). Um die DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, wurden nach zweiminütiger Denaturierung bei 94°C folgende Schritte 30-mal durchgeführt:

Denaturierung: 94°C / 20 s

Primeranlagerung: X°C / 20 s (X entspricht der gefundenen optimalen Anlagerungstemperatur)

Kettenverlängerung: 72°C / 2 min

Anschließend kam es zum Abbruch aller Reaktionen durch Abkühlung auf 4°C. Dann folgte eine Überprüfung der PCR-Ergebnisse über Elektrophorese mit Hilfe eines Agarosegels und eine Reinigung der Ansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit laut Angaben des Herstellers.

3.1.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die In-vivo-Footprinting-Methode (Kap. 3.3.2) machte radioaktiv markierte Oligonukleotide notwendig. Die Markierung erfolgte mit $\gamma[^{32}\text{P}]\text{dATP}$ unter Einwirkung einer Polynukleotidkinase (PNK). Dafür wurde der Ansatz, der den vom Hersteller mitgelieferten Puffer, 2 μl des 50 μM Primers, 1 μl $\gamma[^{32}\text{P}]\text{dATP}$ und 10 U PNK enthielt, für eine Stunde bei 37°C in den Heizblock gestellt und anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit oder über NucTrap[®] Probe Purification-Säulen von Stratagene nach Vorschrift gereinigt. Das markierte Oligonukleotid wurde mit 50 μl bidestilliertem Wasser oder 70 μl ST-Puffer (Kap. 2.6) eluiert und dann die Aktivität im Čerenkov-Zähler bestimmt. Die Werte lagen meist zwischen ein und zwei Millionen Cpm/ μl .

3.2 In-vivo-Reportergen-Assay

3.2.1 Transiente Transfektion

Für die transiente Transfektion durch Elektroporation wurden die menschlichen B-Zelllinien Daudi und MN60 verwendet, welche im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ und 92% Luftfeuchte) inkubiert wurden.

Wichtige Voraussetzungen für den Erfolg der Versuche war, daß sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt in einem exponentiellen Wachstum befanden. Das Prinzip der Elektroporation beruht darauf, daß durch Anlegen von elektrischem Strom die Entladung eines Plattenkondensators (Potter et al., 1984) erwirkt wird und dadurch ein einzelner Stromstoß entsteht, der die Zellwände porös macht.

Zuerst mußten die B-Lymphozyten 15 Minuten lang bei 1000 Upm abzentrifugiert, dann mit RPMI 1640-Medium gewaschen, um Serumreste und die darin enthaltenen Nukleasen zu entfernen, und in diesem bis zu einer Endkonzentration von 6×10^7 Zellen/ml suspendiert werden.

Schließlich wurden 400 µl dieser Suspension zu einem vorbereiteten Probendoppelansatz von 120 µl DNA-Lösung pipettiert. Diese Lösung bestand aus 20 µg eines luciferase-kodierenden Plasmidklons und aus 1 µg eines Kontrollplasmids, das das Gen für die Renilla-Luciferase trug (Abb. 5).

Dann wurde dieser Ansatz auf zwei 0,4 cm-Elektroporationsküvetten aufgeteilt und bei 200 Volt und 960 µFarad zirka 55 ms lang mit einem Gene Pulser von Biorad elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde anschließend in 10 ml RPMI 1640-Medium mit besonders hohem fötalen Kälberserum-Anteil (20%; Kap. 2.6) und einem Gentamycinzusatz überführt.

3.2.2 Luciferase-Aktivitätsmessung

Nach zwei Tagen im Brutschrank erfolgte durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 1200 Upm die Zellernte und ein anschließendes Waschen mit PBS (Kap. 2.6).

Das erhaltene Zellpellet wurde laut Herstellerprotokoll in 100 µl Lyse-Puffer des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems aufgenommen und nach einer Stunde zehn Minuten lang zentrifugiert. Dadurch gelangten die zu messenden Enzyme aus der Zelle in den Überstand.

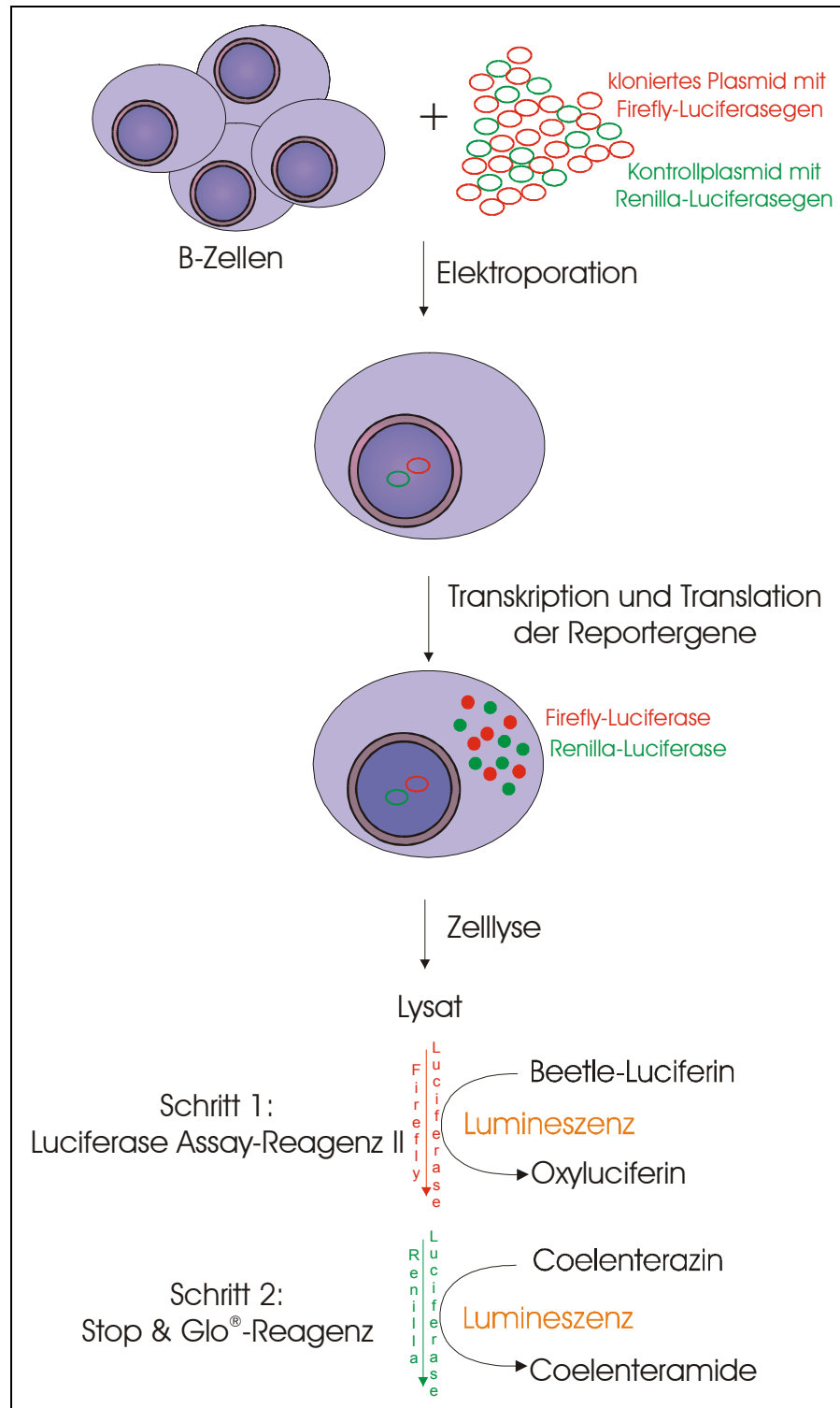


Abb. 5: Prinzip des In-vivo-Reporterassays

Die Plasmide mit den Firefly- bzw. Renilla-Luciferasegenen werden durch Elektroporation in den Zellkern der B-Zellen transfiziert und die Gene dort transkribiert. Anschließend erfolgt im Zytoplasma die Expression der Firefly- und Renilla-Luciferase. Diese Proteine können dann mit Hilfe des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems über Lumineszenz gemessen werden.

Vom Überstand wurden für die Doppelmessungen zweimal 10 µl abgenommen und im Luminometer mit 100 µl Beetle-Luciferin aus dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega (Beetle-Luciferin ist das Substrat der durch das Reporter gen kodierte Firefly-Luciferase) vermischt.

Die Luciferaseaktivität konnte nun dadurch bestimmt werden, daß im Verlauf der enzymatischen Reaktion Photonen emittiert und vom Luminometer der Firma Berthold zehn Sekunden lang gezählt wurden. Durch das anschließende Pipettieren von 100 µl Stop & Glo[®]-Reagenz aus dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega in das bereits gemessene Röhrchen wurde aufgrund der veränderten Reaktionsbedingungen (Ionenkonzentration und pH-Wert) die Firefly-Luciferase gehemmt und die Renilla-Luciferase aktiviert, deren Chemolumineszenz dann ebenfalls quantitativ erfasst werden konnte.

Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte mit dem Microsoft-Programm Excel.

3.3 In-vivo-Footprinting

3.3.1 Methylierung von DNA mit DMS und Spaltung mit Piperidin

3.3.1.1 Freie DNA

Als Referenz bei der Footprinting-Methode kam die freie Plazenta-DNA AF, welche von der Arbeitsgruppe Klobeck präpariert wurde, zum Einsatz.

Die in der Folge beschriebenen Reaktionsschritte führen zur Methylierung der DNA und danach zur Spaltung an den methylierten Guanosinen.

Zuerst fand eine Behandlung von 200 µl DNA-Lösung, die zirka 60 µg DNA enthielt, mit 10 µl unterschiedlich konzentrierten Dimethylsulfat (DMS)-Vorverdünnungen (10%, 1%, 0,1%) statt. Diese Methylierungsreaktionen bei Raumtemperatur wurden nach 30 Sekunden durch Zugabe von 20 µl eiskaltem Natriumacetat und 550 µl eiskaltem absoluten Ethanol gestoppt. Es folgte ein fünfminütiges Durchfrieren des Ansatzes in einem Trockeneis-/Ethanolbad und nach dem Auftauen ein zehnminütiges Abzentrifugieren, um die DNA vollständig auszufällen. Anschließend wurde die Plazenta-DNA in 450 µl TE (Kap. 2.6) gelöst, durch das Dazumischen von 50 µl 2,5 M Natriumacetat und 550 µl Isopropanol umgefällt und in 90 µl bidestilliertem Wasser gelöst.

Schließlich fanden durch 30-minütige Einwirkung von 10 μ l 10 M Piperidin bei 90°C an den methylierten Guanosinen Brüche einzelner DNA-Stränge statt (Maxam und Gilbert, 1980; Abb. 6).

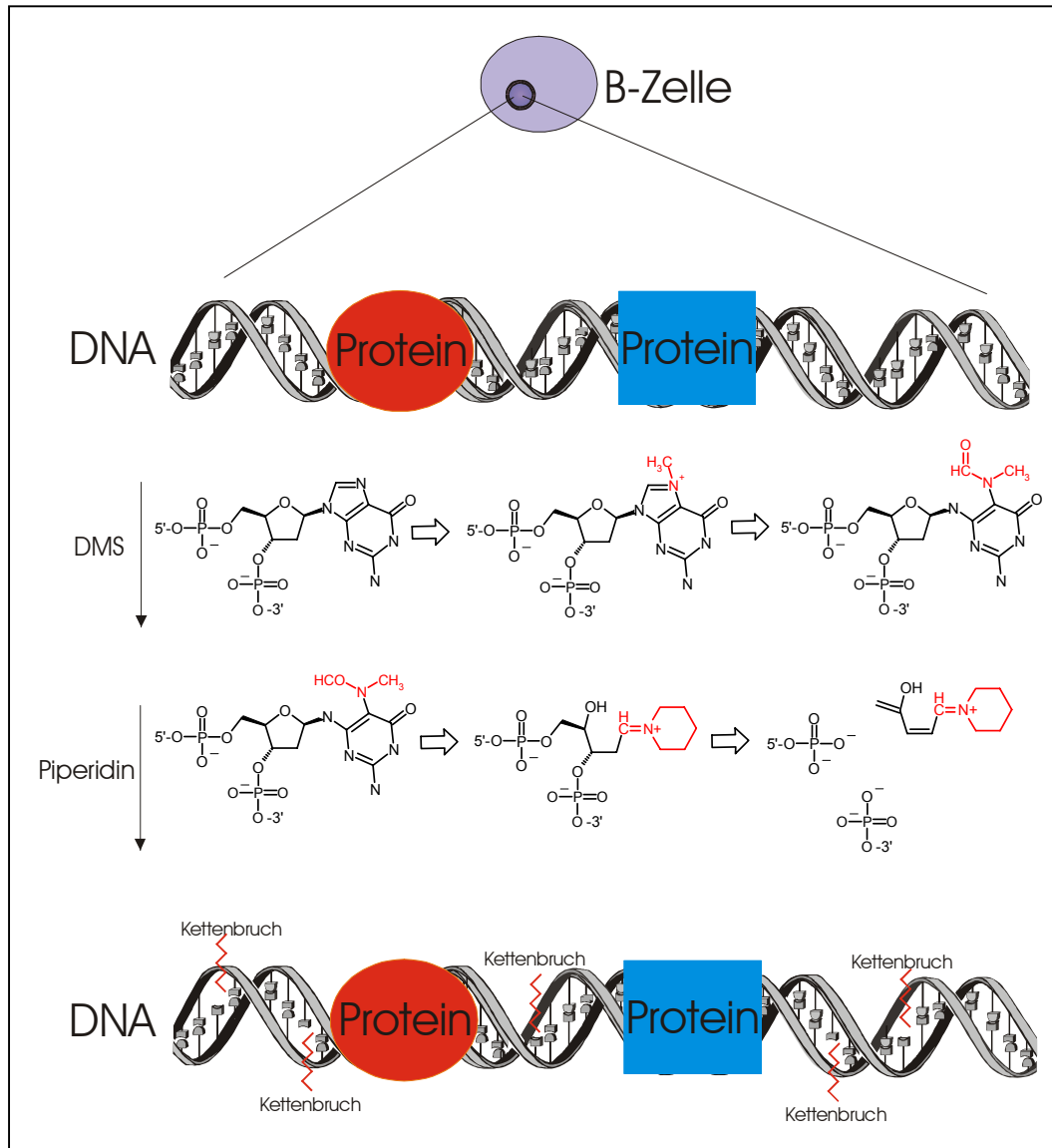


Abb. 6: DNA-Methylierung mit DMS und Spaltung mit Piperidin

Die DNA wird an den nicht mit Proteinen bedeckten Guanosinen mit Hilfe von DMS partiell methyliert und durch Piperidin an diesen Stellen gespalten.

Um den Erfolg dieser Reaktionen festzustellen, wurde der durch zweimalige Natriumacetat/Isopropanolfällung gereinigte und in 100 μ l 10 mM Tris (pH 7,5) gelöste Ansatz über Elektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel überprüft.

3.3.1.2 Zell-DNA

Für die In-vivo-Footprinting-Versuche wurde genomische DNA der Zelllinien Daudi, MN60, BV173, CCRF-CEM, Jurkat und K562 benötigt und zum Teil mit PMA oder TPCK vorbehandelt.

Zuvor erfolgte die Bestimmung der Zellkonzentration aller Zelllinien mit dem Casy-Zellzählgerät. So konnten die zu erntenden Mengen der Zellsuspensionen festgelegt werden. Das 15 Minuten, eine oder zwölf Stunden vor der Zellernte zugegebene PMA lag im Medium in einer Konzentration von 100 ng/ml und das zwölf Stunden vorher hinzugefügte TPCK 50 µM vor.

Schließlich wurden die Zellen für die folgende Methylierung durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 1000 Upm und Suspendieren in fötales Kälberserum (Kap. 2.6) enthaltendem Medium gewonnen. Im letzten Schritt wurde eine Konzentration in der Größenordnung von 10^8 Zellen/ml eingestellt.

Die In-vivo-Methylierung fand durch Zugabe von DMS auf 0,1% Endkonzentration und sowohl fünf- als auch zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur statt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zumischen der zehnfachen Menge an eiskaltem PBS (Kap. 2.6) und zehnmütiges Zentrifugieren bei 1500 Upm. Anschließend wurden die Zellen in PBS (Kap. 2.6) zu einer Konzentration von 5×10^7 /ml suspendiert und zur DNA-Präparation eine Stunde mit einer 4xStop-Lösung (Kap. 2.6) bei 50°C behandelt, um die Proteinase K ausreichend lange einwirken zu lassen.

Aus dem erhaltenen Zelllysate konnte mit Hilfe von Phenol (gesättigt; pH 8) und Chloroform die genomische DNA extrahiert, über eine Natriumacetat/Isopropanolfällung gereinigt und in 200 µl TE (Kap. 2.6) gelöst werden. 20 µl davon wurden für die Gelkontrolle abgenommen und die verbleibenden 180 µl mit 20 µl 10 M Piperidin 30 Minuten bei 90°C inkubiert, was zu Einzelstrangbrüchen an den methylierten Guanosinen führte.

Nach zweimaliger Natriumacetat/Isopropanolfällung folgte das Lösen der genomischen DNA in 200 µl 10 mM Tris (pH 7,5), wovon je 10 µl für die Gelkontrolle und LMPCR (Mueller und Wold, 1989; Pfeifer et al., 1989) verwendet wurden. Die endgültige Konzentration betrug etwa 60 µg DNA pro 200 µl Tris.

3.3.2 Ligierungsvermittelte PCR (LMPCR)

3.3.2.1 Standardprotokoll

Für die erste Reaktion, die Strangauffüllreaktion, wurden 10 µl der methylierten und anschließend gespaltenen DNA (wie oben beschrieben), 1 µl 50 µM Oligonukleotid-1, 25 µl 2xPCR-Puffer (Kap. 2.6), 1 µl (3 U) Pfu-Polymerase und 13 µl bidestilliertes Wasser in einen Ansatz pipettiert und bei 94°C in das PCR-Gerät gestellt. Nach fünf Minuten Denaturierung fand ein fünfminütiges Anlagern des Primers bei der optimalen Temperatur und eine 30-minütige Kettenverlängerung statt. Durch die Verwendung der Pfu-Polymerase entstanden DNA-Doppelstränge mit glatten Enden, welche für die anschließende Ligierung nötig waren.

Der PCR-Ansatz wurde über den QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und mit 30 µl 10 mM Tris (pH 7,5) eluiert.

Dann folgte das Ligieren eines TAG-Adapters an das glatte Ende eines Doppelstrangs. Dazu wurden doppelsträngige Oligonukleotidadapter (Sequenz s. Anhang) aus je 20 µl 50 µM TAG-1 und -2, 25 µl 1 M Tris (pH 7,5) und 35 µl bidestilliertem Wasser bei 95°C und dann durch langsames Abkühlen hergestellt und 5 µl davon mit der DNA des gesamten Eluats unter Zuhilfenahme von 3 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer über Nacht im Kühlschrank ligiert.

Anschließend kam es durch eine PCR zur Amplifizierung der unterschiedlich langen DNA-Fragmente, von denen der TAG-Doppelstrangadapter jeweils ein Strangende bildete. Dazu enthielt der PCR-Ansatz 2 µl des Ligierungsansatzes, 1 µl 50 µM Oligonukleotid-2, 1 µl des 50 µM adapterspezifischen Oligonukleotids TAG-3, 0,5 µl AmpliTaqGold-Polymerase, 25 µl 2xPCR-Puffer (Kap. 2.6) und 20,5 µl bidestilliertes Wasser. Das Oligonukleotid-2 und TAG-3 dienten als Primer an je einem der beiden bekannten komplementären Strangenden. Der Ansatz durchlief im PCR-Gerät nach zwölfminütiger Enzymaktivierung und gleichzeitiger Denaturierung der DNA bei 94°C 30-mal je 20 Sekunden mit 94°C, 30 Sekunden mit X°C und 3 Minuten mit 72°C und anschließend eine einmalige Abkühlung auf 4°C. X°C stellt die optimierte Anlagerungstemperatur, die auf TAG-3 und das Oligonukleotid-2 abgestimmt wurde, dar.

Der letzte Schritt dieser LMPCR bestand aus der radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente mit Hilfe eines mit ³²P markierten Primers-3. Dies geschah durch eine Strangauffüllreaktion eines 20 µl-Ansatzes aus 2 µl des vorhergehenden PCR-Produkts, 1,5 µl

des markierten Oligonukleotids-3, 0,2 µl AmpliTaqGold-Polymerase, 10 µl 2xPCR-Puffer (Kap. 2.6) und 6,3 µl bidestilliertem Wasser. Der Ansatz wurde zwölf Minuten mit 94°C, dann 15-mal je 20 Sekunden mit 94°C, 30 Sekunden mit X°C und 3 Minuten mit 72°C behandelt, wobei X°C die optimale Anlagerungstemperatur ist (Abb. 7).

3.3.2.2 GC-reiches PCR-System

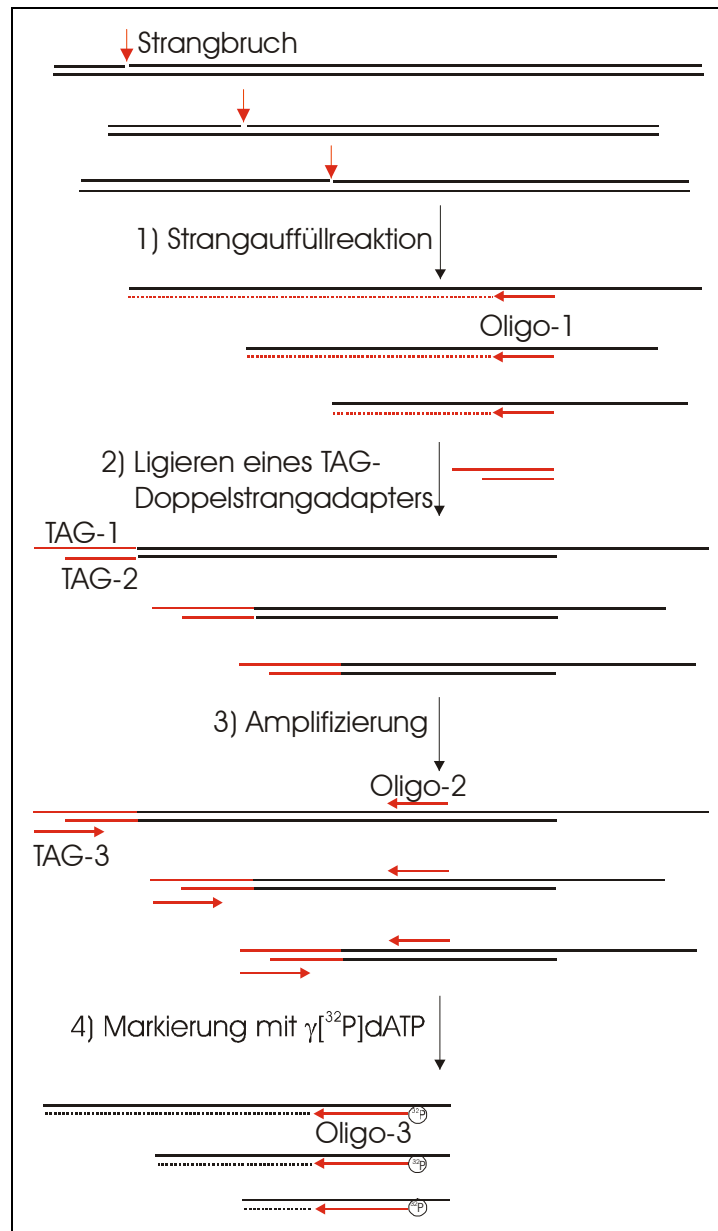


Abb. 7: LMPCR

Die DNA-Doppelstränge werden denaturiert und die durch Strangbrüche (s. Abb. 6) entstandenen Fragmente mit Hilfe des Oligonukleotids-1 aufgefüllt. An ein Strangende erfolgt die Ligierung eines TAG-Doppelstrangadapters. Der Amplifizierungsschritt wird mit dem Oligonukleotid-2 und TAG-3, welche an je ein Strangende binden, durchgeführt. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid-3 dient zur Markierung der Fragmente mit ^{32}P .

Bis zur Ligierung des TAG-Doppelstrangadapters an die DNA-Fragmente wurde nach dem Standardprotokoll, ab der Amplifizierung mit TAG-3 und Primer-2 nach dem GC-reichen PCR-System-Protokoll von Roche vorgegangen, da bei GC-reichen Sequenzen weitere Reagentien (z.B. DMSO) zur Verhinderung unerwünschter Basenpaarungen bzw. zur Verringerung der Schmelztemperatur nötig sind.

Für die Amplifizierung nach diesem Protokoll waren zwei Mastermixe nötig, um eine sofortige Reaktion der Komponenten miteinander zu verhindern.

Der 35 µl-Mastermix 1 setzte sich aus je 1 µl 50 µM TAG-3, 50 µM Oligonukleotid-2 und 10 mM dNTP-Mix von Applied Biosystems, aus 2 µl des Ligierungsansatzes, 5-25 µl der 5 M Resolution Solution und 5-25 µl Wasser zusammen, wobei die zu verwendenden Mengen der letzten beiden Bestandteile, das heißt die optimale Molarität der Resolution Solution, über Probegele bestimmt werden konnten. Die Resolution Solution, das Wasser, der Enzymmix und Puffer stammten aus dem GC-reichen PCR-System-Kit und mußten vor dem Gebrauch auf Eis getaut und zentrifugiert werden.

Schließlich wurde der Mastermix 1 mit einem 15 µl-Mastermix 2, der 1 µl (2 U) eines Enzymmixes, 10 µl des 5xPCR-Puffers und 4 µl Wasser enthielt, vermischt und erst bei 95°C (hot start) in das PCR-Gerät gestellt. Dort fanden folgende Schritte statt:

95°C / 3 min

30-mal: 95°C / 30 s, X°C / 30 s, 72°C / 3 min (X°C ist die optimale Anlagerungstemperatur)

72°C / 7 min

4°C / ∞

Dann erfolgte die radioaktive Markierung durch Herstellen und Mischen von 6 µl Mastermix 2 (wie oben beschrieben) und 14 µl Mastermix 1, der in diesem Fall aus 0,4 µl dNTP-Mix, 1,5 µl radioaktiv markiertem Primer-3, 2 µl PCR-Produkt, 2-10 µl Resolution Solution und 0,1-8,1 µl Wasser bestand, und durch eine anschließende Polymerasekettenreaktion unter den gleichen Bedingungen wie oben, abgesehen von einer Verringerung der Zyklenzahl auf 15.

3.3.3 Analyse der LMPCR-Produkte

Die radioaktiv markierten Produkte wurden mit Hilfe von Polyacrylamidgelen analysiert.

Um die DNA-Fragmente aufzutrennen, kam ein 6%iges Polyacrylamidgel (SequaGel™-6) in einer Größe von 20x40 cm und einer Dicke von 0,5 mm und der TBE-Laufpuffer (Kap. 2.6) zur Anwendung.

Der aufzutragende Ansatz bestand aus 1 µl des markierten PCR-Produkts, 3 µl bidestilliertem Wasser und 2 µl eines Auftragspuffers, der 95% Formamid, 20 mM EDTA und 0,05% Bromphenolblau und Xylencyanol enthielt. Durch fünfminütiges Erhitzen dieser Probe auf 95°C und anschließendes Abkühlen auf Eis erfolgte ein Denaturieren der doppelsträngigen DNA-Stücke.

5 µl davon wurden dann auf das 15 Minuten in TBE-Puffer (Kap. 2.6) präelektrophoretisierte Gel aufgetragen und durch das Anlegen einer Stromstärke von zirka 25 mA in zwei bis drei Stunden aufgetrennt.

Danach wurde eine der beiden Glasplatten, die mit BlueSlick beschichtet waren, vom Gel abgehoben, dieses auf ein Filterpapier aufgebracht und im Geltrockner bei 80°C unter Vakuum etwa zwei Stunden lang getrocknet.

Eine Visualisierung der Ergebnisse konnte durch Exponieren des Gels auf einem Biomax MR-Film von Kodak (für einige Tage) oder auf einem Super RX-Film von Fuji zusammen mit einer Verstärkerfolie bei -70°C (über Nacht) erreicht werden.

Durch den Vergleich der Bandenmuster der genomischen mit der freien DNA ließen sich bei der Zell-DNA Bereiche erkennen, in denen einzelne Banden fehlten. Das heißt, hier konnte keine DNA-Spaltung an den Guanosinen stattfinden, da diese Bereiche durch angelagerte Proteine vor Einzelstrangbrüchen geschützt waren (Abb. 8).

3.4 Biologische Sicherheit

Alle Experimente erfolgten unter Berücksichtigung der entsprechenden Regeln des Gentechnikgesetzes. Das Laboratorium wurde per Bescheid der Regierung von Oberbayern vom 18.03.1987, Aktenzeichen A13-15/1/0168/7, registriert.

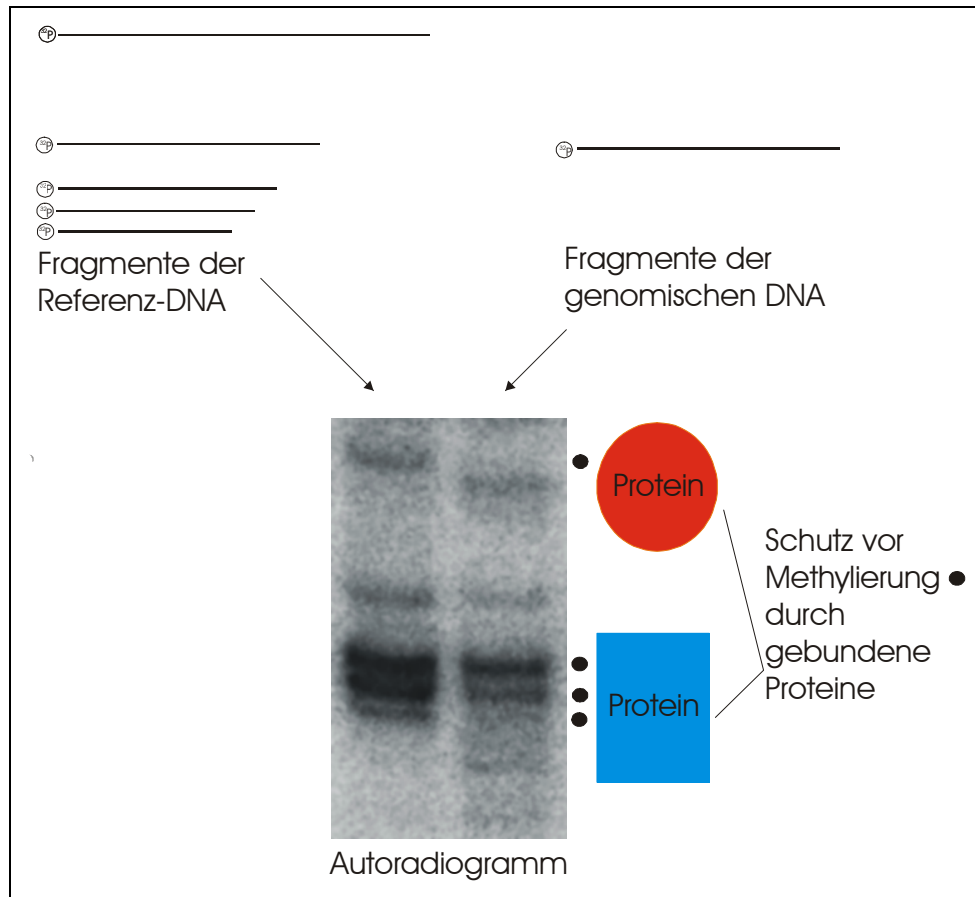


Abb. 8: Ergebnis der LMPCR

Die genomische DNA kann an Stellen, die mit Proteinen bedeckt sind, nicht gespalten werden. Aus diesem Grund fehlen der proteinbindenden DNA die entsprechenden Fragmente, die auch im Autoradiogramm im Vergleich zur Referenz-DNA nicht sichtbar sind.

4 Ergebnisse

4.1 Transiente Transfektionen und Reporter-Gen-Expressionsassays

Als Transfektion wird das Einschleusen von Fremd-DNA in Zellen bezeichnet. Ein Teil der transfizierten Zellen nimmt die fremde DNA auf, die nach einer bestimmten Zeit und abhängig von der Struktur ins Genom eingebaut wird. Die Expressionseffizienz der eingeschleusten Gene kann untersucht werden.

Durch eine geeignete Transfektionsmethode werden Konstrukte mit leicht nachweisbaren Reporter-Genen, deren Transkription von einem eukaryontischen Promotor gesteuert wird, und möglichen Enhancerelementen in Zellen gebracht und die Genexpressionen nach zwei Tagen über einen enzymatischen oder nichtenzymatischen Test ermittelt. Damit können wichtige Erkenntnisse über den Einfluß bestimmter Enhancerregionen auf die Transkription des Reporter-Genes gewonnen werden.

Untersucht wurde der Einfluß der DNase I-hypersensitiven Region HSS-2 auf die Expression eines Reporter-Genes. HSS-2 erstreckt sich über einen relativ großen Bereich von zirka 1000 Bp, da sie bei ihrer Kartierung aus technischen Gründen nicht näher eingrenzbar war (Asenbauer, 1996). HSS-2 besitzt keine Enhanceraktivität, wirkt allerdings alleine oder gemeinsam mit HSS-1 ausgeprägter synergistisch auf das I γ -Enhancer-element HSS-3 (Asenbauer, 1996).

Da HSS-2 keine eigene Enhanceraktivität besitzt, kann der Einfluß dieses Bereichs auf die Transkription eines Reporter-Genes nur in Gegenwart von HSS-3 bestimmt werden. Dazu wurden Konstrukte angefertigt, bei denen Teile von HSS-2 deletiert wurden.

Das Ausgangsmaterial für die Reporter-Gen-Konstrukte bildeten die beiden Plasmide pPL-1 und pPL-1mut5 (Combriato und Klobeck, 2002). pPL-1 und pPL-1mut5 enthalten einen I γ -Promotor, ein Luciferasegen, ein Ampicillinresistenzgen und dazwischen eine zirka 9 kB lange Region mit HSS-1, -2 und -3 (Abb. 9).

Für die Charakterisierung von HSS-2 erfolgten verschiedene Versuche. Zuerst wurden zur näheren Eingrenzung von HSS-2 im entsprechenden Bereich des pPL-1mut5 5'- bzw. 3'-Deletionen vorgenommen. Danach folgte die Untersuchung der Einflüsse verschiedener Punktmutationen in HSS-2 des pPL-1 auf die Transkriptionsregulation.

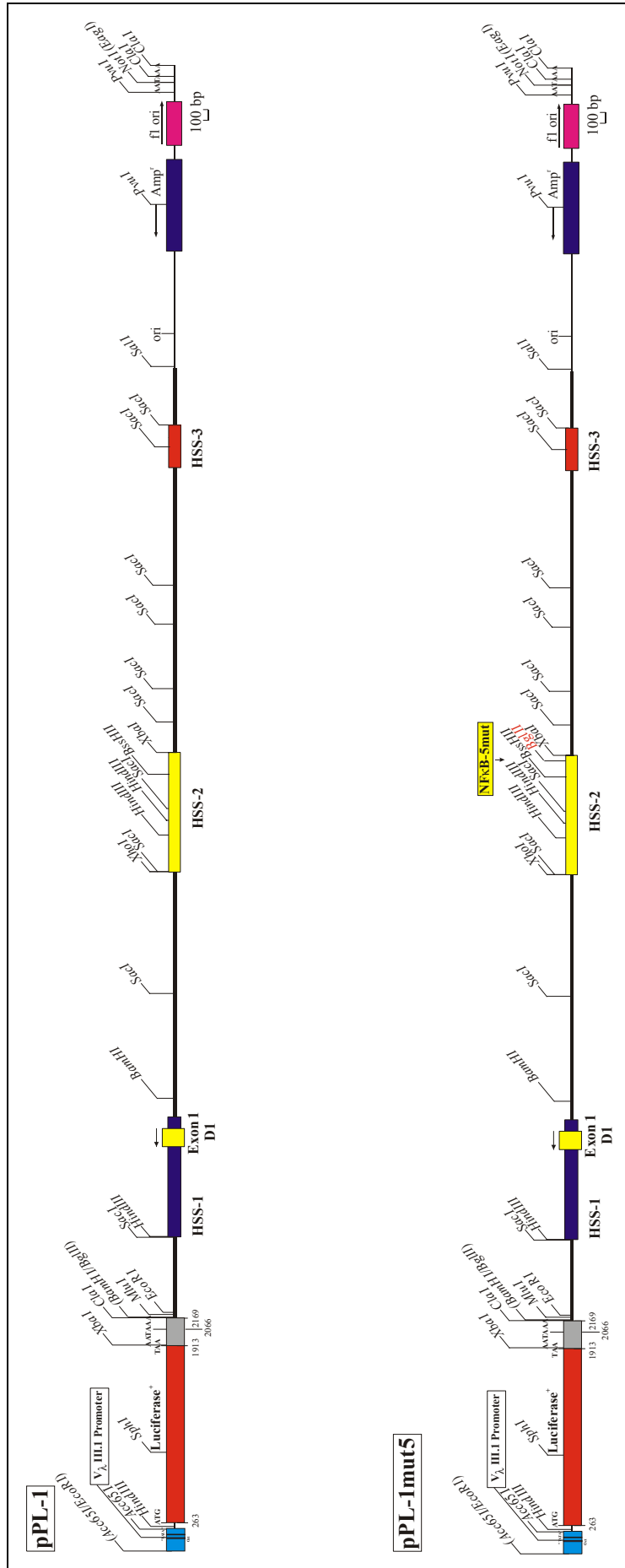


Abb. 9: Schematische Darstellung der Ausgangskonstrukte pPL-1 und pPL-1mut5
(s. vorhergehende Seite)

Die Restriktionskarten von pPL-1 und pPL-1mut5 zeigen in Form von Balken (abgesehen von ori) den V_{λ} -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (unverändert bzw. mutiert durch Einführen einer BglII-Spaltstelle), HSS-3, Elemente prokaryontischen Ursprungs, wie ori (Replikationsursprung) und Amp^r (Ampicillin-resistenzgen) sowie das Phagenelement fl ori. Der gesamte Bereich zwischen HindIII (HSS-1) und Sall entspricht der genomischen Situation. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung. Der Maßstab bzw. die Positionen sind in Bp angeführt.

Schließlich wurden flußaufwärts von HSS-2 auf pPL-1 und pPL-1mut5 verschieden lange Regionen deletiert und die mögliche Veränderung der Genexpression gemessen.

4.1.1 Transfektion durch Elektroporation

Das größte Hindernis für die DNA-Einschleusung stellt bei Zellen die Zellmembran dar (Brown, 1993). Um diese Barriere zu überwinden, gibt es mehrere Möglichkeiten.

Die DNA kann an Moleküle, sogenannte Carrier, gebunden und über diese in die Wirtszelle gebracht werden (z.B. Transfectam-Methode (Behr et al., 1989), DEAE-Dextran-Methode (McCutchan und Pegano, 1968), Transferrinfektion (Cotten et al., 1993)).

Eine andere Methode ist die Elektroporation. Dabei werden die Zellen durch Entladung eines Plattenkondensators einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, der vorübergehend Poren in der Zellmembran entstehen läßt, sodaß die DNA-Moleküle in das Zellinnere gelangen können.

Das Problem aller Transfektionsmethoden ist, daß die DNA zelltypabhängig nur von einer geringen Anzahl an Zellen (bei B-Lymphozyten von relativ wenigen) aufgenommen wird (Asenbauer, 1996).

Die Arbeitsgruppe Klobeck testete die genannten Methoden auf ihre Transfektionseffizienz durch Transfektion eines Reportergenplasmids, das das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* enthält, und kam, ausgehend von der Stärke der Luciferaseaktivität, zu dem Schluß, daß die Elektroporation bei B-Zellen die verhältnismäßig größte Effektivität aufwies (Asenbauer, 1996). Deshalb wurden alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche zur Transkriptionsregulation mit Hilfe der Elektroporation und des Luciferasegens aus *Photinus pyralis* als Reportergen durchgeführt. Dieses Gen wurde deshalb verwendet, da hier keine Hintergrundaktivität zu erwarten war und die quantitative Bestimmung seines Produkts durch eine hohe Sensitivität ausgezeichnet ist.

Als Zelllinien dienten MN60 und Daudi, da sie reife B-Lymphozyten sind, somit leichte Ketten produzieren und sich sehr effizient elektroporieren lassen. Für beide wurden die Elektroporationsbedingungen vor Beginn der Expressionsexperimente optimiert.

4.1.1.1 Parameter

Es gibt einige Parameter, die die Elektroporation beeinflussen und die für jede einzelne Zelllinie vor den eigentlichen Versuchen getestet werden müssen.

So spielt die Temperatur der Küvette und des Elektroporationsansatzes eine wichtige Rolle. Einige Zellen, wie MN60 und Daudi, können bei Raumtemperatur elektroporiert werden, andere benötigen Temperaturen um 0°C, um eine ausreichende Transfektionseffizienz zu erzielen. Dafür müssen die Küvette, die Zellsuspension und die Probe auf Eis gelagert werden.

Weiters haben die angelegte Spannung und die zu elektroporierende Probenmenge großen Einfluß auf die Effizienz der Transfektion. Das Optimum der angelegten Spannung ist von Zelle zu Zelle unterschiedlich und liegt zwischen 150 und 250 Volt. Dabei gilt, daß mit einer Erhöhung der Spannung zum einen die Durchlässigkeit der Zellwände steigt, zum anderen aber die Überlebensrate der Zellen abnimmt. Somit stellt die optimale Spannung eine Kompromißlösung unter Berücksichtigung dieser beiden Effekte dar. Zur Elektroporation von MN60 und Daudi wurden 200 Volt angelegt. Die Transfektion von $1-1,5 \times 10^7$ Zellen/ml fand in einem Ansatzvolumen von 250 µl statt.

Die Abbildung 10 zeigt am Beispiel der Zelllinie Daudi die Bestimmung der optimalen Bedingungen hinsichtlich Temperatur und Spannung durch transiente Transfektionen. Die Versuche wurden mit Hilfe von pPL-1 und pGL3λModHSS3 (Abb. 11) durchgeführt. Das Konstrukt pGL3λModHSS3, das bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden war, enthält den V_{λ} -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, HSS-3 und prokaryontische Anteile (ori, Amp^r). HSS-3 befindet sich 340 Basenpaare flußabwärts des Reportergens und ist zirka 390 Basenpaare lang.

Alle elektroporierten Ansätze enthielten eine konstante Zellzahl (1×10^7) und Plasmidmenge (10 µg pro Elektroporationsansatz). Variiert wurden die angelegten Spannungen (150 V, 200 V, 250 V) und die Temperaturen (RT, 0°C). Dadurch, daß nur gleiche Konstrukte in konstanten Mengen und bei gleicher Zellzahl miteinander verglichen wurden, konnte auf die Kotransfektion des pRL-TK-Kontrollvektors, der normalerweise als so-

genannter innerer Standard zum Ausgleich von Unterschieden bezüglich Mengen, Transfektionseffizienz und dergleichen mitelektroporiert wird, verzichtet werden.

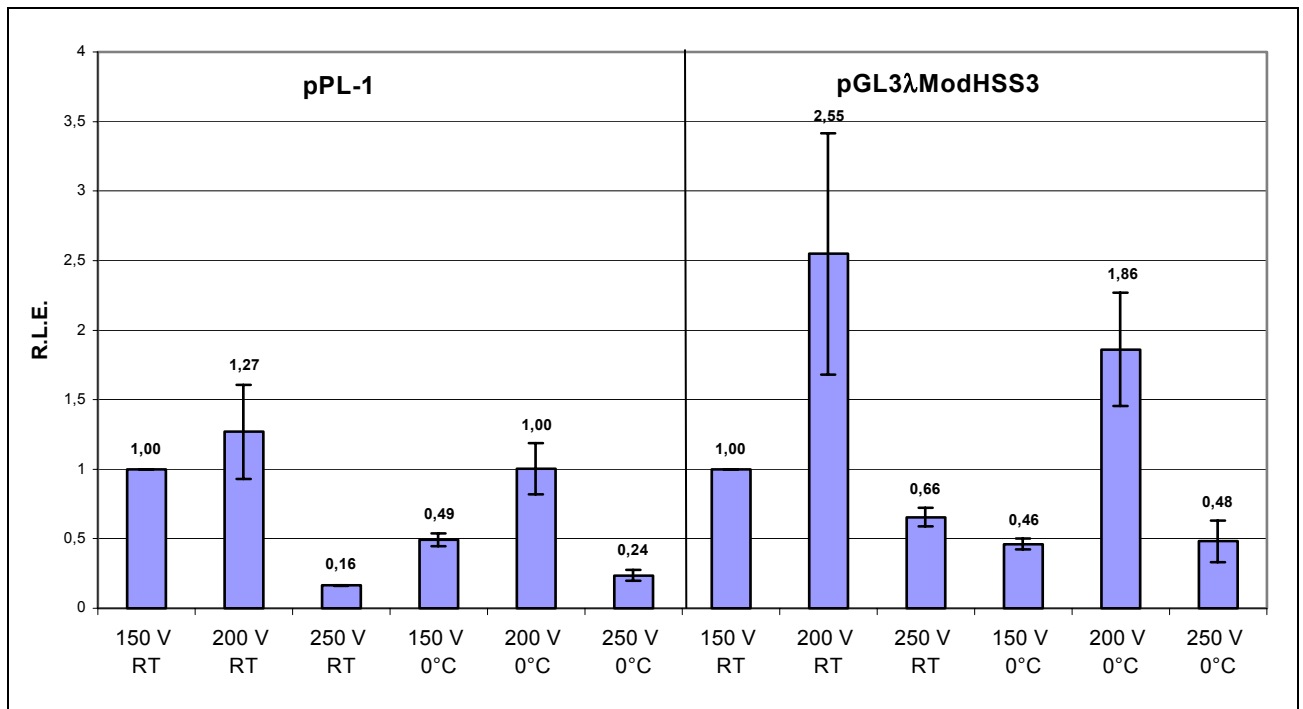


Abb. 10: Bestimmung der optimalen Temperatur- und Spannungsbedingungen für Daudi
Das Säulendiagramm zeigt in R.L.E. (relative Lichteinheiten) die Enzymaktivität für die zwei Konstrukte bei verschiedenen Spannungen und Temperaturen. Die Mittelwerte aus den zwei Werten des Doppelsatzes, die auf den normierten Wert der Bedingungen 150 V (Volt) und RT (Raumtemperatur) bezogen wurden, sowie die Standardabweichungen sind angegeben.

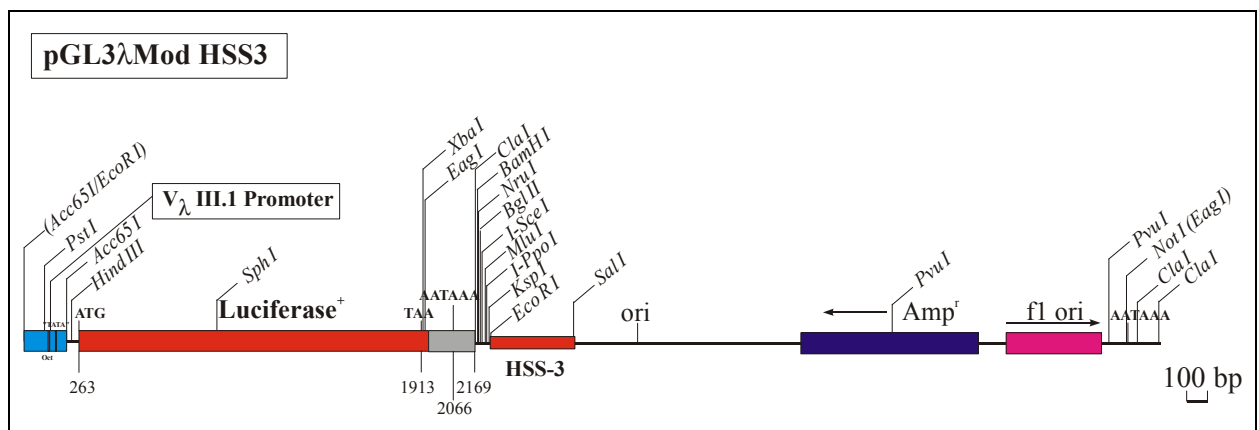


Abb. 11: Vergleichskonstrukt pGL3λModHSS3

Die Restriktionskarte zeigt in Form von Balken (abgesehen von ori) den V_{λ} -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, die DNase I-hypersensitive Region HSS-3, Elemente prokaryontischen Ursprungs, wie ori (Replikationsursprung) und Amp^r (Ampicillinresistenzgen) sowie das Phagenelement fl ori. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung. Der Maßstab bzw. die Positionen sind in Bp angeführt.

Alle Varianten (zum Beispiel 150 V bei RT) wurden sowohl bei pPL-1 als auch bei pGL3 λ ModHSS3 jeweils zweimal getestet, das heißt, es konnten durch Pipettieren eines Doppelansatzes je zwei Elektroporationen durchgeführt und dadurch zwei Meßwerte pro Variation erhalten werden.

Die Auswertung der Transfektionsergebnisse, das heißt der Luciferaseaktivität in relativen Lichteinheiten, erfolgte mittels Excel (für eine genauere Beschreibung der Ermittlung und Auswertung der Elektroporationsergebnisse siehe Kap. 4.1.2).

Zu beachten ist, daß die Zellen vor der Elektroporation in RPMI 1640-Medium, das kein fötales Kälberserum enthält, gewaschen und suspendiert werden. Das Kälberserum kann nämlich Enzyme, wie DNasen, enthalten, die die Plasmid-DNA im Elektroporationsansatz bereits vor der Transfektion abbauen.

Wichtig war, daß die erhaltene Zellsuspension relativ bald für die Elektroporation verwendet wurde, da die Zellen mit der Zeit sterben und dadurch die Transfektionseffizienz stark beeinträchtigt wird.

4.1.1.2 Einfluß der DNA auf die Transfektionseffizienz

4.1.1.2.1 Qualitative Aspekte

Die Transfektionseffizienz hängt von der Beschaffenheit der DNA-Präparation, das heißt von der DNA-Konformation und -Sauberkeit ab.

Durch ein konsequentes Vorgehen nach der Vorschrift zur Plasmidaufarbeitung wurde versucht, DNA zu erhalten, die vor allem in Supercoilform vorlag, keine E. coli-DNA und RNA enthielt und möglichst salzfrei war. So konnte das Risiko, daß in den Versuchsergebnissen Transfektionseffizienzunterschiede innerhalb der einzelnen Plasmide zum Tragen kamen, gesenkt werden.

Außerdem wurden immer mindestens zwei verschiedene Präparationen gleicher Konstrukte in einer Versuchsreihe elektroporiert, um Verfälschungen der Expressionsdaten durch Abweichungen von den oben beschriebenen Kriterien möglichst gering zu halten.

Um die Konformation der Plasmide zu überprüfen, wurde die ungespaltene DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.1.1.2.2 Quantitative Aspekte

Unabhängig von der Größe der Reportergenkonstrukte wurden jeweils 10 µg für die Elektroporation eingesetzt. Die Konzentrationen konnten mit Hilfe des Ultraspec 2000 Spektrometers von Amersham Pharmacia bestimmt werden. Der Einsatz von konstanten Mengen (10 µg) und Vergleichskonstrukten (pPL-1) war sehr wichtig, um die Transfektionsergebnisse der einzelnen Konstrukte miteinander vergleichen zu können, vor allem im Hinblick auf die zu erwartenden, durch die ausschließlich synergistische Wirkung von HSS-2 relativ kleinen Aktivitätsunterschiede.

Ein Elektroporationsansatz enthielt 10 µg des zu untersuchenden Plasmidkonstrukts und 0,5-1 µg des Kontrollvektors pRL-TK in TE-Lösung. In Versuchen wurde festgestellt, daß bei einer Verringerung oder Erhöhung der Konstruktmenge (zwischen 4 µg und 12 µg) bei einer gleichbleibenden Zellzahl auch die Enzymaktivität im selben Maße abfiel oder stieg. Bei steigenden Reporterplasmidmengen kann eine verminderte Expression beobachtet werden, was auf ein vermehrtes Zellsterben zurückzuführen ist (Übersicht in Hagman et al., 1990).

In den ersten Versuchen wurden zur Auswertung der Expressionsdaten die Ergebnisse auf die Molarität eines bestimmten Konstruktes bezogen. Das entfiel in späteren Versuchen, da hier die sogenannte Mengenbereinigung über die Auswertung von Gelen mit Hilfe der Image Master 1D-Software stattfand. Es stellte sich nämlich heraus, daß die spektroskopische Mengenbestimmung oft ungenau war.

So wurde ein Aliquot aus den Elektroporationsansätzen entnommen, mit der Restriktionsendonuklease ClaI das Luciferasegen herausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgetrennt. Unabhängig von der Größe der einzelnen Konstrukte hatten alle ClaI-Fragmente die gleiche Länge, was einen Vergleich der Mengen möglich machte. Anschließend wurden die Gele mit der Kamera des Image Master VDS fotografiert und die DNA-Mengen ihrer ClaI-Banden über die Anzahl der gemessenen Bildpunkte (Pixel) mit der Image Master 1D-Software bestimmt. Um eine dem tatsächlichen DNA-Gehalt entsprechende Auswertung zu gewährleisten, war es nötig, sowohl verschiedene als auch möglichst geringe Mengen des selben Ansatzes auf das Gel aufzutragen. Die verschiedenen Mengen ermöglichten eine zusätzliche Kontrolle der Genauigkeit dieser Methode. Durch den Einsatz geringer DNA-Mengen konnte eine quantitative Ermittlung aller Bildpunkte erfolgen, da sich bei erhöhter Bandenintensität Pixel

überlagern und sich daraus ein geringerer DNA-Gehalt ergeben würde. So wurden meistens jeweils zirka 0,4 µg und 0,2 µg DNA aus jedem Elektroporationsansatz und 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg, 0,4 µg und 0,5 µg eines Referenzplasmids (pPL-1) pro Bahn verwendet (Abb. 12). Schließlich ermöglichte die Image Master 1D-Software die Erstellung einer Kalibrierkurve mit dem Referenzplasmid, auf die sich dann alle Werte bezogen. pPL-1 wurde als sogenannter externer Standard in jedem Versuch mitelektroporiert und die Expressionswerte in der anschließenden Auswertung gleich 1 gesetzt. Darauf konnten alle Werte innerhalb eines Experiments bezogen werden. Somit war es auch möglich, die verschiedenen Versuche miteinander zu vergleichen.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis des Gels von Abbildung 12.

Die mit Hilfe des Computerprogramms Excel ermittelten und auf pPL-1 bezogenen Mittelwerte aus den Divisionsergebnissen der beiden Luciferase-Werte mit den beiden Renilla-Werten wurden mit den Mittelwerten aus Abbildung 13 multipliziert und damit mengenkoriert.

Die Auswertung ist im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

4.1.2 Ermittlung und Auswertung der Elektroporationsergebnisse

Die für die Elektroporation verwendeten Konstrukte enthielten den B-zellspezifischen Promotor V_{λ} -III.1 und ein Reporter-gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, das Firefly-Luciferasegen (Asenbauer et al., 1999). Der Vorteil dieses Gens ist, daß es in der Wirtszelle nicht vorkommt und dessen Produkte leicht nachweisbar sind.

Um experimentelle Schwankungen, die biologische Systeme mit sich bringen, zum Beispiel hinsichtlich des Zellwachstums, der Transfektionseffizienz, und sonstige Ungenauigkeiten, wie unterschiedliche Pipettierolumina, auszugleichen und Ergebnisse miteinander vergleichbar zu machen, war die Verwendung eines internen Standards nötig. Dazu diente der pRL-TK-Kontrollvektor von Promega, der das Luciferasegen von *Renilla pyriformis* (Renilla-Luciferasegen) und den vom Firefly-Luciferasegen unabhängigen, konstitutiven Thymidinkinasepromotor enthielt. Dieser wurde zusammen mit den Reporter-genkonstrukten in die selben Zellen geschleust (Kotransfektion).

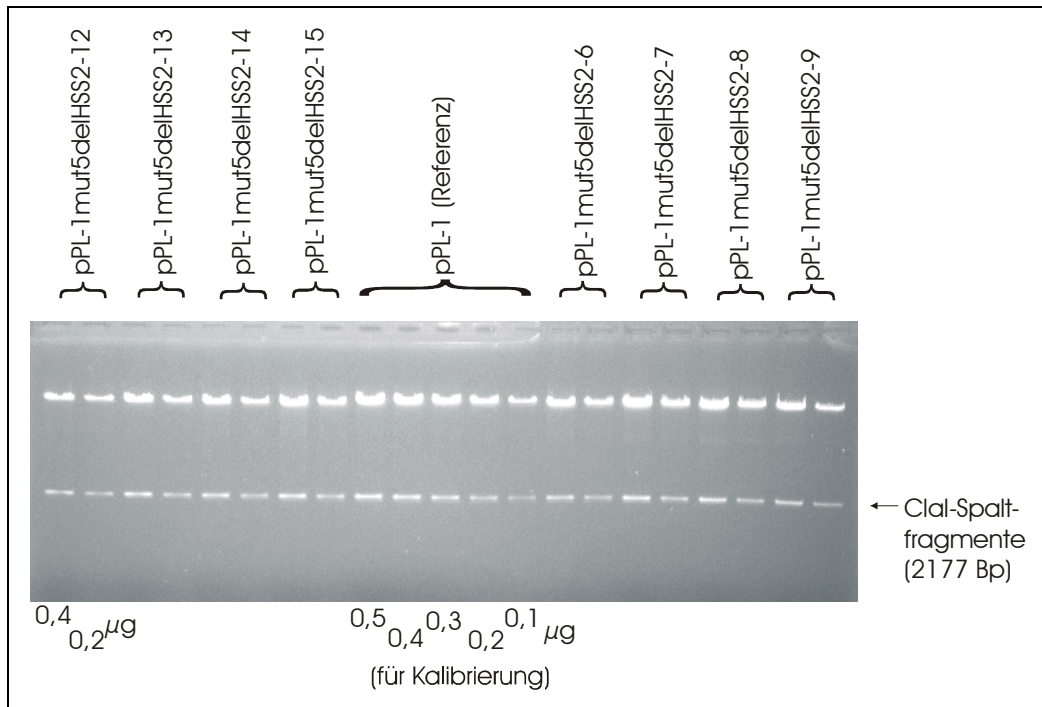


Abb. 12: ClaiI-Spaltung zur Mengenbereinigung

Das Agarosegel zeigt die für die Mengenbereinigung benötigten ClaiI-Spaltfragmente. Über den Banden sind die verwendeten Plasmidkonstrukte und unterhalb des Bildes die aufgetragenen Mengen in μg angegeben.

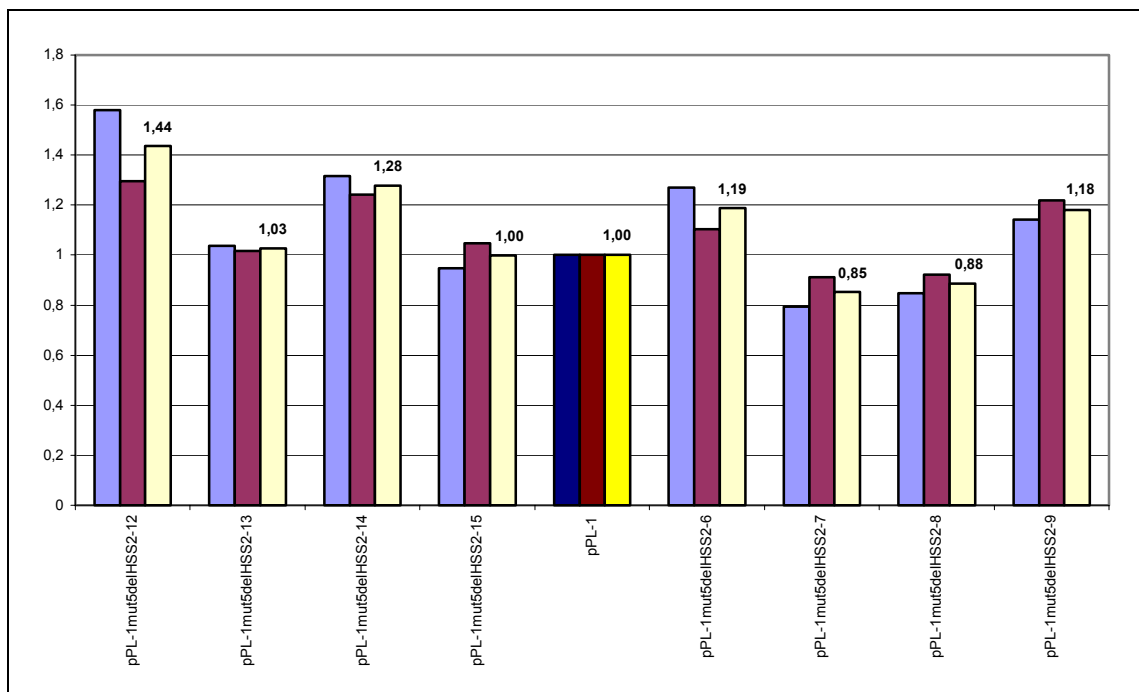


Abb. 13: Auswertung des in Abbildung 12 gezeigten Gels

Das Säulendiagramm zeigt die Mengenbereinigungsfaktoren für die verwendeten Konstrukte, wobei laut spektroskopischer Messung der Balken 1 einer Menge von 0,4 μg , Balken 2 0,2 μg und Balken 3 dem Mittelwert der beiden entspricht. Die Werte stammen von der Auswertung mit der Image Master 1D-Software und wurden auf pPL-1 bezogen.

Die Produkte des Firefly- und Renilla-Luciferasegens konnten nacheinander im selben Ansatz bestimmt werden, da sie für ihre Aktivierung unterschiedliche Salzkonzentrationen und pH-Werte benötigten. Um von oben beschriebenen Schwankungen unbeeinflusste Ergebnisse zu erhalten, die ausschließlich die Transkriptionsrate der Konstrukte wiedergeben sollten, wurde die Aktivität des Reportergens auf die des Renillagens bezogen, was möglich war, da aufgrund des unterschiedlichen Promotors die Expression des Renillagens von der des Reportergens unabhängig ist.

Durch das Einhalten bestimmter, im folgenden geschilderter Vorgangsweisen konnten verlässliche Ergebnisse erzielt werden.

So kamen immer verschiedene DNA-Präparationen gleicher Konstrukte innerhalb eines Versuchs zur Anwendung, um eventuelle Unterschiede hinsichtlich der DNA-Sauberkeit und damit der Transfektionseffizienz auszugleichen.

Darüber hinaus wurde für jedes Reportergenkonstrukt, das auch das Renillagen enthielt, ein sogenannter Doppelansatz pipettiert. Dieser Doppelansatz diente der Durchführung zweier paralleler Elektroporationen.

Außerdem erfolgte eine weitere Elektroporation eines gleichen Plasmids zu einem späteren Zeitpunkt der Untersuchungsreihe, um eine eventuelle Qualitätsveränderung der Zellsuspension zu erfassen.

Weiters wurden in jedem Experiment die Plasmide pPL-1 als externer und pRL-TK als interner Standard eingesetzt. Der externe Standard pPL-1 wurde in jedem Versuch mitelektroporiert und in der späteren Auswertung gleich 1 gesetzt. Dann wurden die Ergebnisse aller Konstrukte darauf bezogen, was dazu diente, die verschiedenen Versuche miteinander vergleichen zu können.

Die Aussagekraft der Expressionsdaten konnte auch durch zweimalige Messung der Enzymaktivität einer Probe (Doppelansatz) und durch Bestimmen der beiden Luciferasen im selben Ansatz (Kotransfektion) erhöht werden.

Schließlich wurden die Versuche mehrmals wiederholt, bis von jedem Plasmidkonstrukt mindestens acht Einzelwerte zur Bildung des Mittelwertes vorlagen.

Zur Auswertung aller Versuchsdaten (in relativen Lichteinheiten) diente das Microsoft-Programm Excel. Durch die Division des jeweils ersten bzw. zweiten Wertes der zweifach gemessenen Firefly-Luciferaseaktivität eines Konstruktes durch den ersten bzw. zweiten Wert der Renilla-Luciferaseaktivität wurden die beiden aufeinander bezogen. Dieser Bezug wurde jeweils für die unabhängig voneinander transfizierten

Doppelansätze ermittelt. Aus den zwei Divisionsergebnissen erfolgte dann die Berechnung des Mittelwertes, der weiter verwendet wurde. Jeder Versuchswert stellt somit das arithmetische Mittel des Doppelansatzes dar.

Da von allen Plasmiden unabhängig von der Konstruktgröße 10 µg eingesetzt wurden, mußten die Größen der Reportergenkonstrukte auf die Größe des Kontrollvektors bezogen werden. Durch den daraus erhaltenen Faktor konnten die auf den inneren Bezugsvektor (pPL-1=1) normierten Werte größenbereinigt werden.

Schließlich stellte sich heraus, daß die spektroskopischen Mengenbestimmungen oft ungenau waren. Um die Versuche verlässlicher zu machen, wurden die eingesetzten DNA-Mengen zusätzlich mit Hilfe des Image Master-Systems kontrolliert.

Durch die Verwendung des Image Master-Systems entfiel die Größenbereinigung, da auf den Gelen eine Bestimmung der DNA-Mengen über ClaI-Spaltfragmente stattfand, welche alle die gleiche Größe hatten. Zur Definition wurden Werte der Kalibrierkurve gleich 0,25, 0,5, 0,75, 1 und 1,25 gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Zur Fehlerrückführung erfolgte die Bildung des Mittelwertes aus den Faktoren für die aufgetragenen, unterschiedlichen Mengen, wobei der Wert für die kleinere Menge auf die größere hochgerechnet wurde und alle Werte auf den äußeren, auf 1 normierten Standard pPL-1 bezogen wurden (siehe auch Abb. 13).

Der Aktivitätsmittelwert des innerhalb eines Versuchs mehrmals elektroporierten äußeren Standards wurde gleich 1 gesetzt und die Zahlen aller anderen Konstrukte darauf skaliert. Die Mengenerbereinigung der Mittelwerte aller Konstrukte erfolgte dann durch Multiplikation mit den oben beschriebenen Faktoren.

Als Maß für die Streuung der bereinigten Einzelwerte um den Mittelwert fand die Standardabweichung Verwendung, die sich nach folgender Formel berechnet:

$$S = \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

(S = Standardabweichung, X = Einzelwert, n = Anzahl der Einzelwerte)

4.1.3 Beschreibung der Konstrukte und ihr Einfluß auf die Expression

4.1.3.1 5'- bzw. 3'-Deletionen in HSS-2

Bei der Feinkartierung der hypersensitiven Regionen im Iglλ-Locus konnte von H. Asenbauer HSS-2 auf eine Größe von zirka 1 kB eingengt werden (Abb. 9).

Nun sollte versucht werden, durch 5'- bzw. 3'-Deletionen in HSS-2 diesen Bereich näher einzugrenzen bzw. funktionell zu charakterisieren, da HSS-2 ein wichtiges synergistisches Element zum HSS-3-Enhancer darstellt.

Als Ausgangsplasmid diente pPL-1mut5 (Combriato und Klobeck, 2002; Abb. 9). Dieses entstand aus pPL-1, indem es durch Mutation in der NFκB-5-Bindungsstelle (am 3'-Ende von HSS-2) zur Einführung einer BglII-Spaltstelle, die zirka 40 Basen von der XbaI-Stelle entfernt liegt, kam. pPL-1mut5 setzt sich aus dem B-zellspezifischen Promotor V_{λ} -III.1 (aus dem V_{λ} -Gensegment V_{λ} -III.1 neben der $C_{\lambda}1$ -Region), dem Luciferasegen aus *Photinus pyralis* als Reporter gen, dem zirka 9 kB langen Bereich mit den DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1, -2 und -3 (HSS-1 und -3 unverändert, HSS-2 mutiert) und dem prokaryontischen Anteil mit dem Ampicillinresistenzgen zusammen.

Um detaillierte Erkenntnisse zu erhalten, erfolgten schrittweise Deletionen unterschiedlich großer Bereiche bis zur vollständigen Entfernung von HSS-2 zwischen der XhoI- und der BglII-Spaltstelle, welche zusammen mit dem HSS-2-Bereich flußabwärts der BglII-Stelle bei allen Konstrukten erhalten blieben.

Zur Herstellung der Konstrukte (Abb. 14) wurde durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BglII HSS-2 aus pPL-1mut5 deletiert und durch PCR-Fragmente ersetzt, die sich aus einer am 5'- bzw. 3'-Ende verkürzten HSS-2-Sequenz zusammensetzten (Abb. 15 und Abb. 16).

Die Fragmente enthielten am 5'-Ende eine XhoI- und am 3'-Ende eine BglII-Spaltstelle, was dadurch erreicht werden konnte, daß bei der PCR Oligonukleotide verwendet wurden, deren Sequenzen (s. Anhang) an je einem Ende auch eine XhoI- bzw. BglII-Spaltstelle aufwiesen.

So diente der Primer HS2-10 mit seiner XhoI-Spaltstelle zusammen mit den Oligonukleotiden HS2-17 bis -20, die Träger einer BglII-Spaltstelle waren, zur Erzeugung der 3'-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-6, -7, -8, -9; Abb. 15). Die Herstellung der 5'-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-12, -13, -14, -15; Abb. 16) erfolgte unter Verwendung von HS2-11 (BglII-Spaltstelle) und HS2-13 bis -16, die eine XhoI-Spaltstelle enthielten.

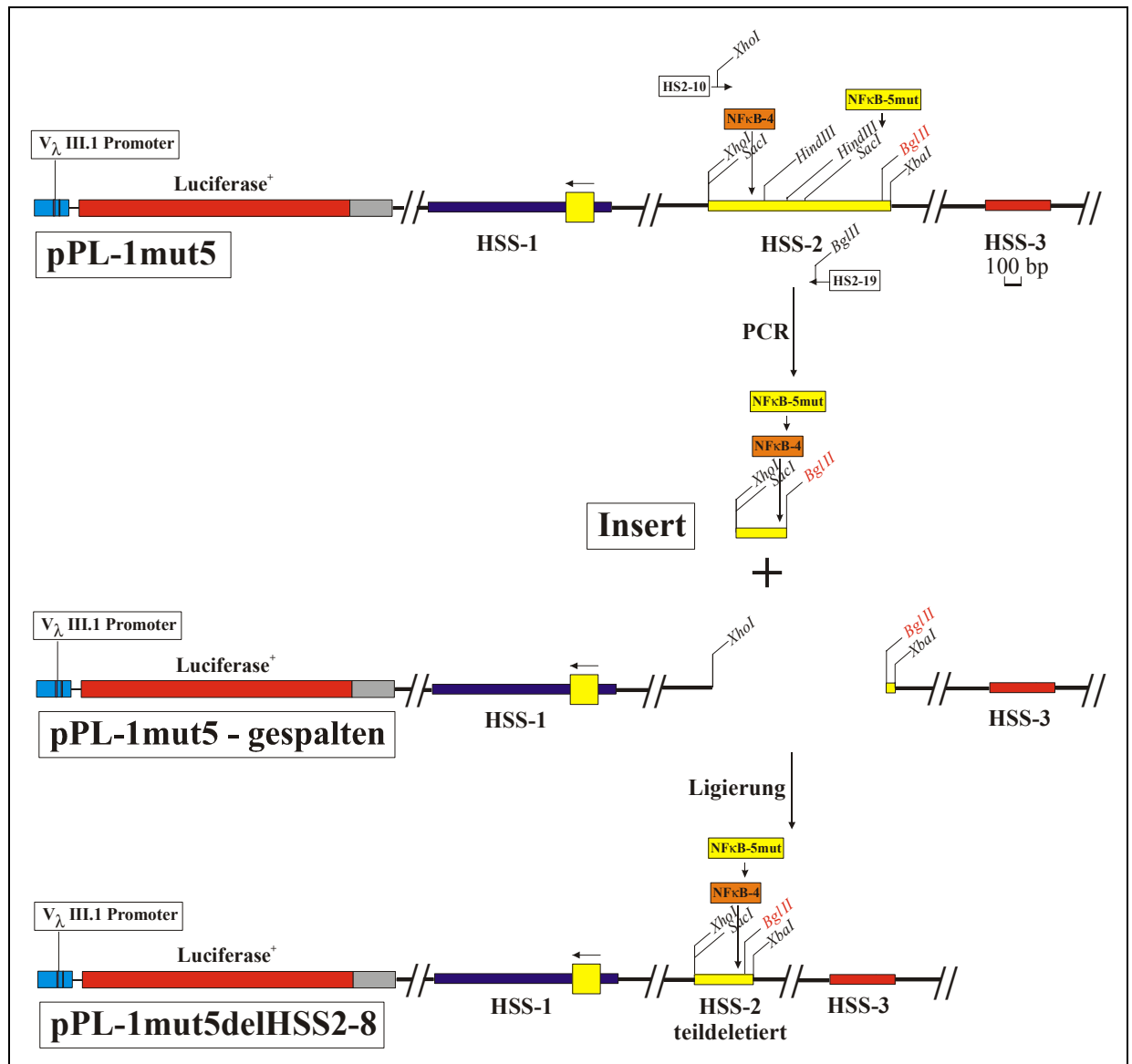


Abb. 14: Herstellung eines HSS-2-Deletionskonstrukts am Beispiel von pPL-1mut5delHSS2-8

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor V_{λ} III.1, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (mutiert durch Einführen einer BglII-Spaltstelle) und HSS-3. In HSS-2 sind die wichtigsten Spalt- bzw. die zwei NFκB-Bindungsstellen und die Primer HS2-10 und HS2-19 eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung.

Zur Herstellung der Konstrukte wurde durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BglII HSS-2 aus pPL-1mut5 deletiert und durch PCR-Fragmente ersetzt, die sich aus einer am 5'- bzw. 3'-Ende verkürzten HSS-2-Sequenz zusammensetzten.

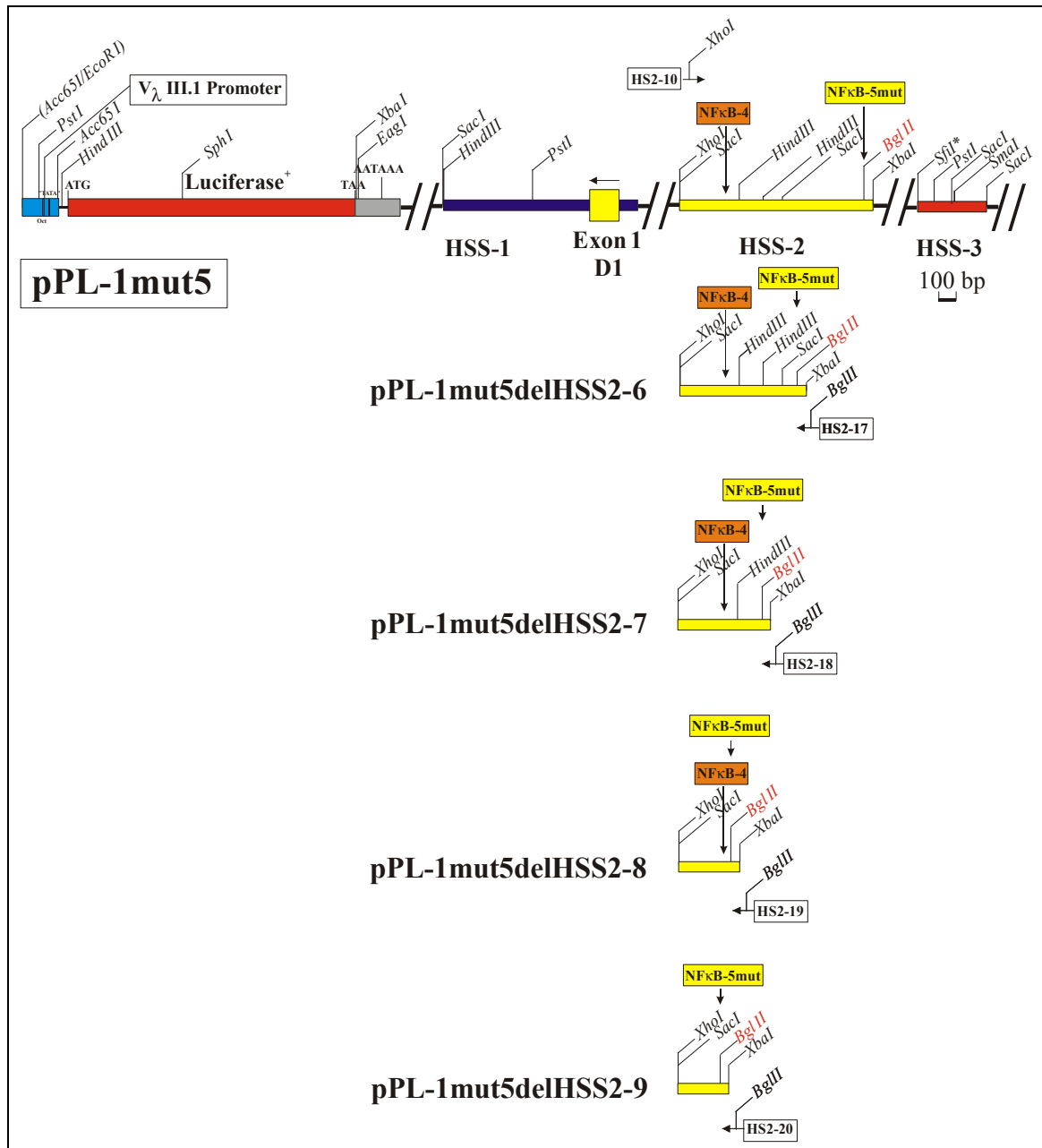


Abb. 15: 3'-HSS-2-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-6, -7, -8 und -9) und die zur Herstellung verwendeten Primer (flußabwärts HS2-10; flußaufwärts HS2-17, -18, -19 und -20)

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor V_{λ} III.1, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (mutiert durch Einführen einer BglII-Spaltstelle) und HSS-3. Es sind die wichtigsten Spalt- bzw. in HSS-2 die zwei NFκB-Bindungsstellen und die verwendeten Primer eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung. Die Konstrukte pPL-1mut5delHSS2-6, -7, -8 und -9 unterscheiden sich von pPL-1mut5 durch die zwischen der XhoI- und BglII-Spaltstelle verbliebene HSS-2-Region, die für jedes Konstrukt dargestellt ist.

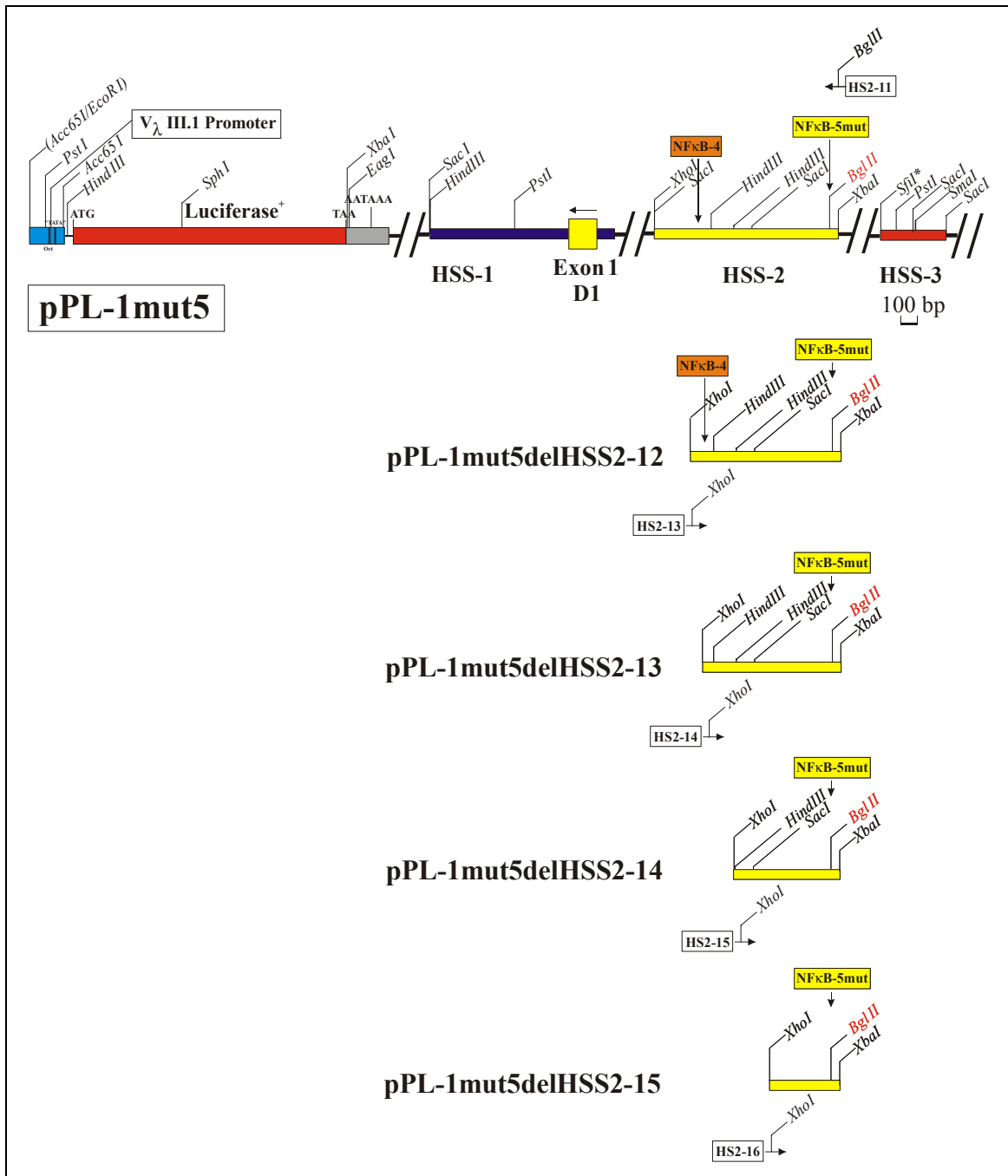


Abb. 16: 5'-HSS-2-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-12, -13, -14 und -15) und die zur Herstellung verwendeten Primer (flußaufwärts HS2-11; flußabwärts HS2-13, -14, -15 und -16)

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor V_{λ} III.1, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (mutiert durch Einführen einer BglII-Spaltstelle) und HSS-3. Es sind die wichtigsten Spalt- bzw. in HSS-2 die zwei NF κ B-Bindungsstellen und die verwendeten Primer eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung. Die Konstrukte pPL-1mut5delHSS2-12, -13, -14 und -15 unterscheiden sich von pPL-1mut5 durch die zwischen der XhoI- und BglII-Spaltstelle verbliebene HSS-2-Region, die für jedes Konstrukt dargestellt ist.

Um Fehler in der Polymerasekettenreaktion und damit in den Fragmentsequenzen zu vermeiden, wurde die Pfu-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, da diese eine Korrekturlesefunktion besitzt. Außerdem wurde als Ausgangs-DNA nur 0,01 µg pPL-1mut5 und eine maximale PCR-Zyklenzahl von 30 gewählt, um eine Plateauphase der Polymerasekettenreaktion zu vermeiden.

Nach der Polymerasekettenreaktion wurden die erhaltenen Fragmente und der pPL-1mut5 mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und BglII gespalten, über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Spaltprodukte isoliert. Dann erfolgte die Ligierung des durch Herausschneiden von HSS-2 linearisierten Vektors mit je einem DNA-Fragment, was möglich war, weil die überhängenden Enden der XhoI-Spaltstellen und der BglII-Spaltstellen kompatibel waren.

Allerdings bestand die Möglichkeit, daß die Fragmente nicht in gewünschter Form, sondern als Multimere eingebaut wurden. Um dies zu überprüfen und die gesuchten Konstrukte auszuwählen, wurden die fertigen Plasmidkonstrukte mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und BglII (Abb. 9) gespalten und über Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 17).

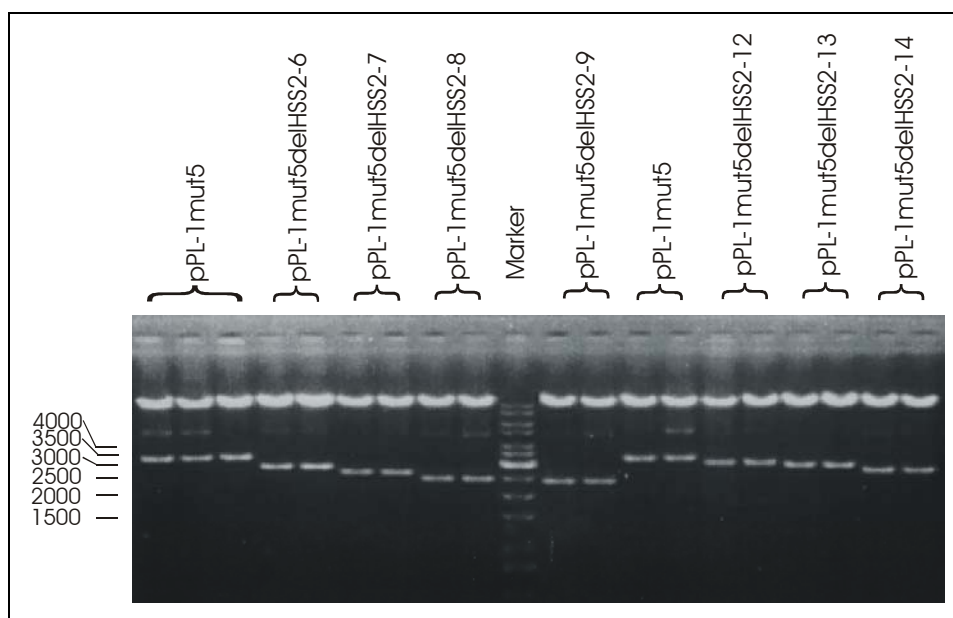


Abb. 17: Konstruktkontrolle mittels BamHI/BglII-Spaltung
Auf dem Agarosegel sind drei bzw. zwei Plasmidaufreinigungen der verwendeten Konstrukte dargestellt. Die Längen (in Bp) der Markerfragmente sind links angegeben.

Schließlich kamen die gewünschten Konstrukte für die Expressionsversuche mittels Elektroporation der B-Zelllinien Daudi und MN60 und für die anschließende Auswertung mit dem Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega zur Anwendung.

In der Folge wurden die Ergebnisse nicht auf pPL-1mut5, sondern auf pPL-1 bezogen, da beide Plasmide die gleiche Enzymaktivität aufwiesen (s. Kapitel 4.1.3.2).

Bei Betrachtung der Resultate (Abb. 18) lassen sich keine größeren Enzymaktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Deletionskonstrukten als 30% feststellen. Das war zu erwarten, da die komplett vorhandenen HSS-1 und -3 auch ohne die ausschließlich synergistische Einwirkung von HSS-2 eine hohe Expressionsrate aufweisen.

Aktivitätsunterschiede von bis zu 10% wurden außer Acht gelassen, da sie den Rahmen für experimentelle Schwankungen darstellen.

So zeigen die Versuchsdaten, daß die schrittweise im 3'-Bereich von HSS-2 deletierten Konstrukte, die die NFκB-4-Stelle noch tragen (pPL-1mut5delHSS2-6, -7, -8), im Vergleich zu pPL-1 keinen Einfluß auf die Expression ausüben. Erst pPL-1mut5delHSS2-9, bei dem NFκB-4 fehlt, weist eine 25%ige Verringerung der Enzymaktivität auf.

Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß wichtige regulatorische Bereiche erst kurz vor der NFκB-4-Bindungsstelle flußabwärts auftreten.

Im Fall der 5'-Deletionskonstrukte pPL-1mut5delHSS2-13, -14 und -15 konnte ein schrittweiser Abfall der Expressionswerte beobachtet werden. Je kürzer die eingebauten Fragmente waren, umso mehr fiel auch die Transkriptionsaktivität ab. Diese Konstrukte besaßen keine NFκB-4-Bindungsstelle, was sich negativ auf die Expressionsrate auswirkte. Ihre auf pPL-1 bezogene Aktivität reduzierte sich auf 85%, 84% bzw. 66%. Im Vergleich dazu wies auch der pPL-1mut5delHSS2, dem HSS-2 vollständig fehlte, eine Aktivitätsminderung um 31% auf. Eine Ausnahme bildete pPL-1mut5delHSS2-12, bei dem der Wert 15% über der pPL-1-Aktivität lag.

Diese Resultate bestätigten die Folgerungen aus den Versuchen mit den 3'-Deletionen. Auch hier hat es den Anschein, als wären die für die Transkriptionskontrolle essentiellen Regionen um die NFκB-4-Stelle lokalisiert.

Die Expressionsdaten aller Deletionskonstrukte demonstrierten, daß vor allem die 5'-Region der HSS-2 eine wichtige Rolle zur Ausübung des synergistischen Einflusses auf HSS-3 spielt.

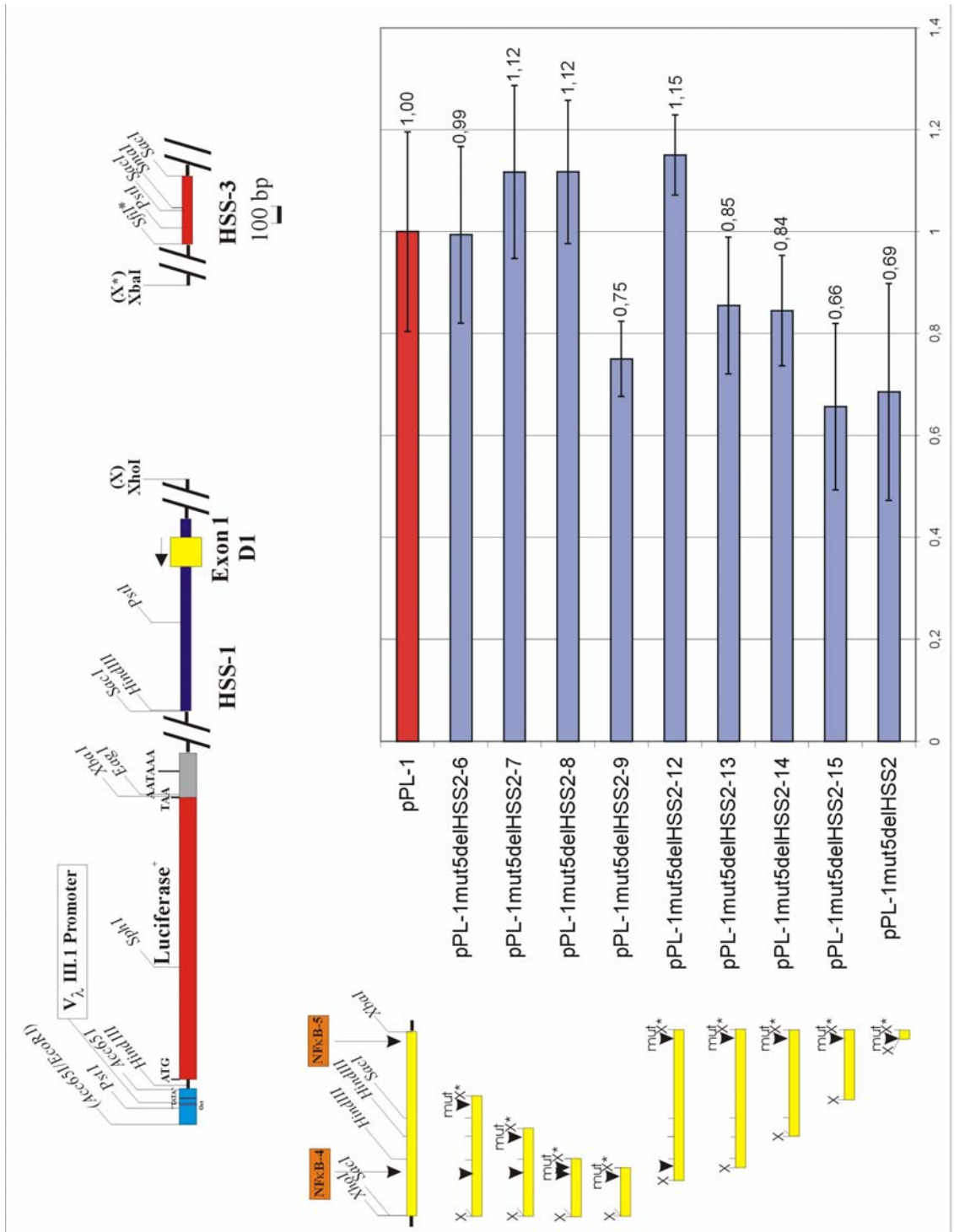


Abb. 18: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der 5'- bzw. 3'-HSS-2-Deletionskonstrukte anhand der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten (\pm Standardabweichung) (s. vorhergehende Seite)

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor $V_{\lambda III.1}$, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1) und HSS-3. Zur Eingrenzung der Lage von HSS-2 sind die Spaltstellen XhoI (X) und XbaI (X*) angegeben. Es sind die wichtigsten Spaltstellen eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Zur Verdeutlichung wurden neben dem Balkendiagramm, das die Enzymaktivität in relativen Lichteinheiten (Mittelwert \pm Standardabweichung) bezogen auf pPL-1 wiedergibt, die Strukturen des veränderten HSS-2-Bereichs der einzelnen Konstrukte schematisch dargestellt, wobei die Spaltstellen durch Striche, die NF κ B-Bindungsstellen durch schwarze Pfeile und die mutierte Stelle (mut) gekennzeichnet sind.

4.1.3.2 Mutationen in HSS-2

pPL-1 (Abb. 9) enthält sieben mögliche NF κ B-Bindungsstellen, die alle von G. Combriato durch Einfügen einer BglIII-Spaltstelle mutiert wurden (Combriato und Klobeck, 2002).

Um den Einfluß der beiden in HSS-2 enthaltenen NF κ B-Bindungsstellen auf die Transkription zu untersuchen und die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche besser interpretieren zu können, wurden zwei Plasmide, nämlich pPL-1mut5 und pPL-1mut4,5, ausgewählt (Abb. 19).

Bei diesen erfolgte der Nukleotidaustausch und damit die gleichzeitige Einführung einer BglIII-Spaltstelle, um das Gelingen der Mutation besser überprüfen zu können, in der NF κ B-5- bzw. NF κ B-4- und -5-Bindungsstelle.

Vor dem Einsatz für die Transfektionsversuche wurden die beiden Plasmide zur Kontrolle noch mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und BglIII gespalten und über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 20).

Die Ergebnisse aus den Experimenten sind in Abbildung 21 dargestellt. Als Bezugspunkt für die Enzymaktivitätswerte diente pPL-1.

Beide getesteten Mutationskonstrukte zeigten keine Aktivitätsminderung gegenüber dem Ausgangsplasmid, da Aktivitätsunterschiede von 10% als Folge experimenteller Schwankungen betrachtet wurden.

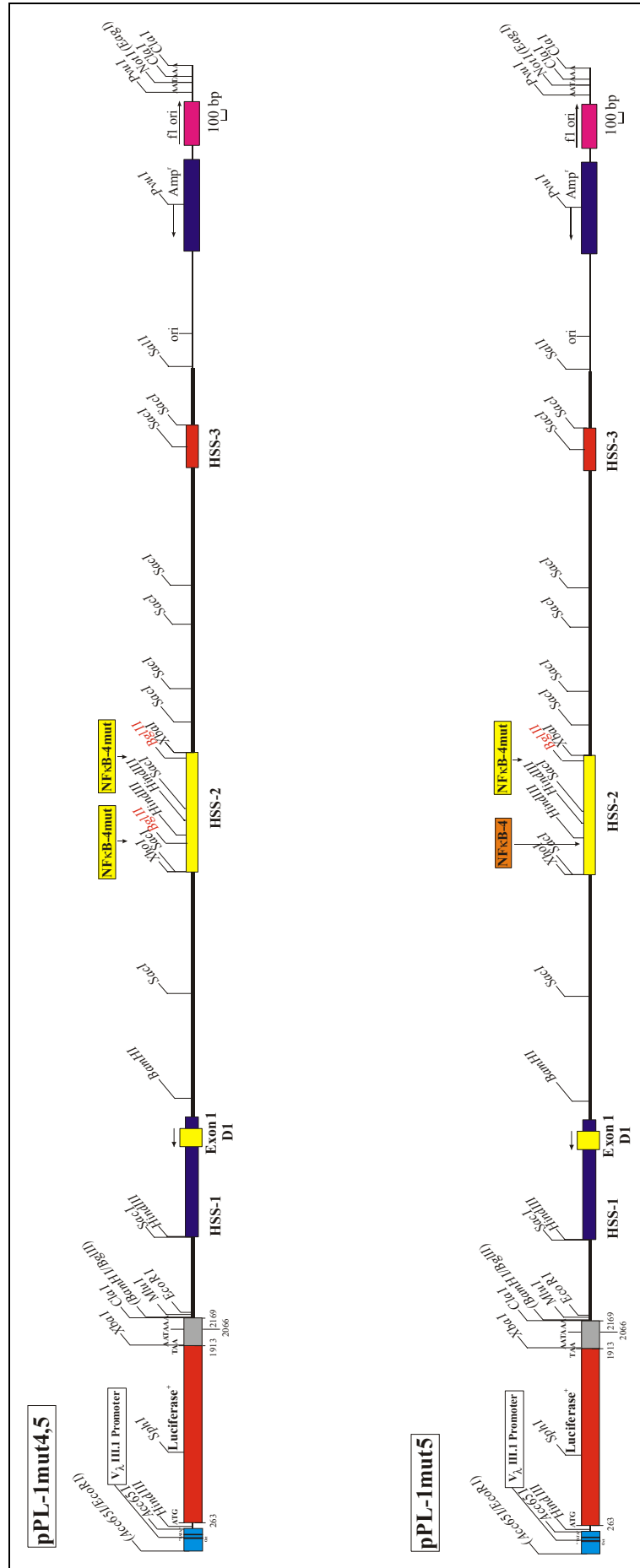


Abb. 19: Konstrukte mit Mutationen in HSS-2
(s. vorhergehende Seite)

Die Restriktionskarten von pPL-1mut4,5 und pPL-1mut5 zeigen in Form von Balken (abgesehen von ori) den V_λ -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (mutiert durch Einführen von zwei bzw. einer BglIII-Spaltstelle), HSS-3, Elemente prokaryontischen Ursprungs, wie ori (Replikationsursprung) und Amp^r (Ampicillinresistenzgen) sowie das Phagenelement $f1$ ori. Der gesamte Bereich zwischen HindIII (HSS-1) und Sall entspricht der genomischen Situation. Die Pfeile beschreiben die Transkriptionsrichtung. Der Maßstab bzw. die Positionen sind in Bp angeführt.

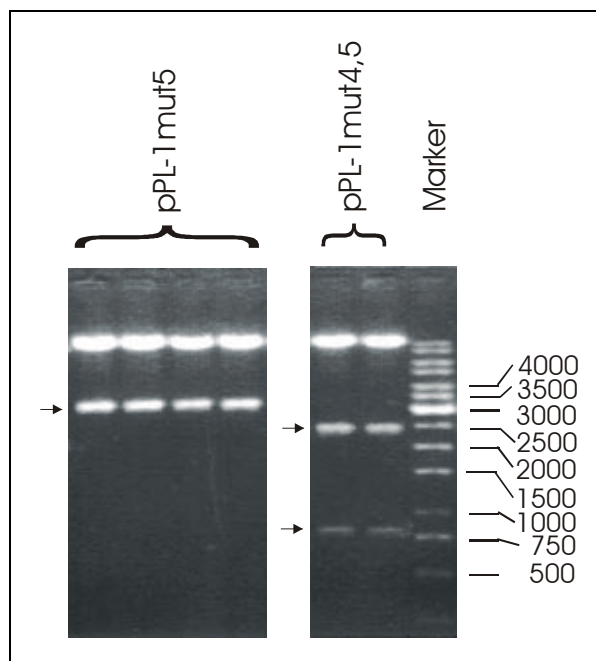


Abb. 20: Konstruktkontrolle mittels BamHI/BglIII-Spaltung

Auf dem Agarosegel sind vier bzw. zwei verschiedene Plasmidaufreinigungen dargestellt. Die Verwendung mehrerer Präparationen für die Elektroporationen war nötig, um Verfälschungen der Expressionsdaten aufgrund eventueller Transfektionseffizienzunterschiede durch verschiedene DNA-Konformationen zu vermeiden. Die Pfeile markieren die wichtigen Fragmente. Die Längen (in Bp) der Markerfragmente sind rechts angegeben.

4.1.3.3 Deletionen flußaufwärts von HSS-2

Die bisher beschriebenen Versuche konzentrierten sich alle auf die funktionelle Charakterisierung von HSS-2 durch Deletionen bzw. Mutationen innerhalb dieses Bereichs.

Nun erfolgte eine Untersuchung, wie stark sich die Transkription verändert, wenn den Deletionskonstrukten die ebenfalls auf HSS-3 synergistisch wirkende Region HSS-1 fehlt.

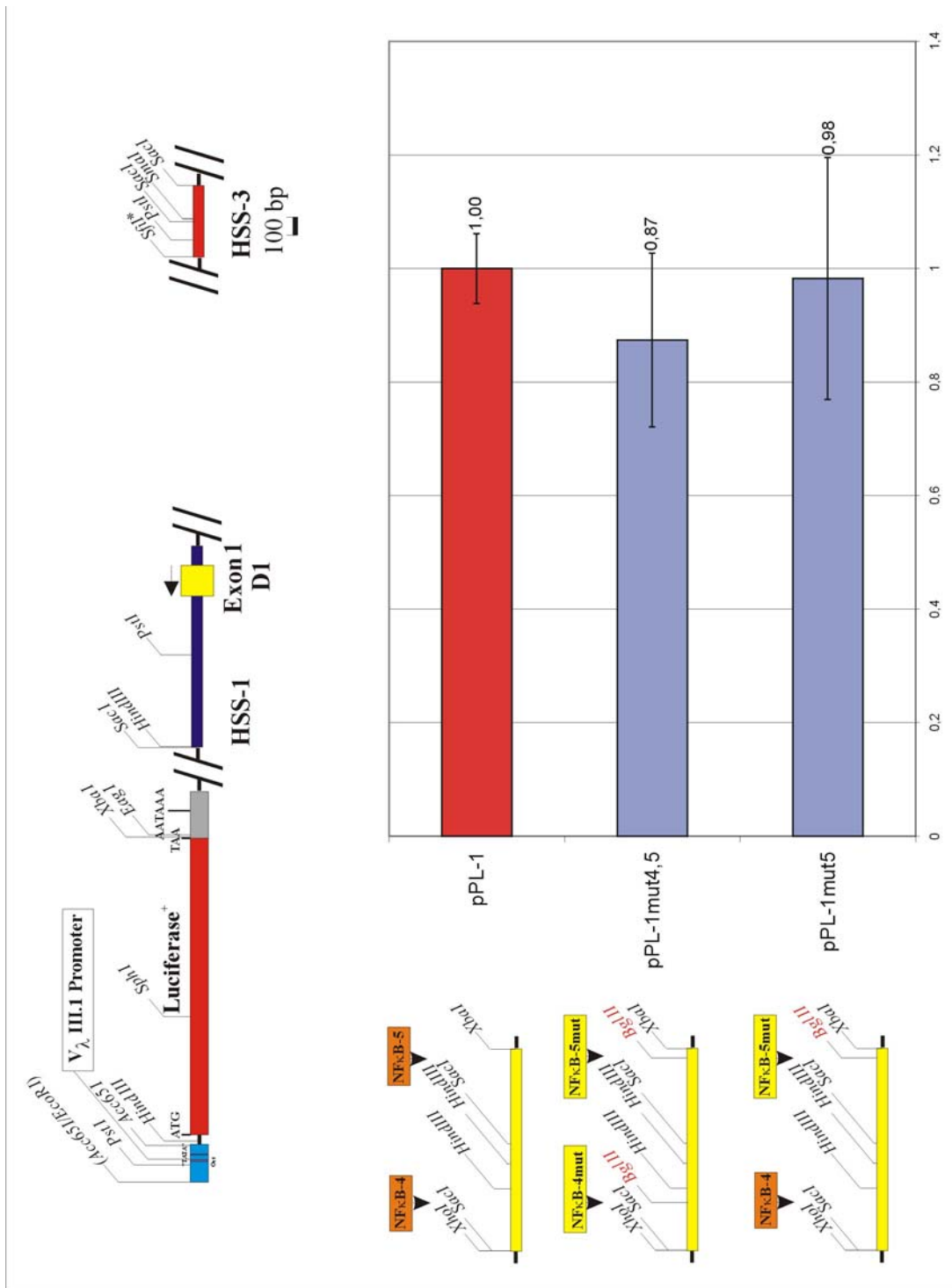


Abb. 21: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der Konstrukte mit Mutationen in

HSS-2 anhand der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten (\pm Standardabweichung)

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor $V_{\lambda}III.1$, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (mit dem Exon 1 des Gens D1) und HSS-3. Es sind die wichtigsten Spaltstellen eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt.

Zur Verdeutlichung wurden neben dem Balkendiagramm, das die Enzymaktivität in relativen Lichteinheiten (Mittelwert \pm Standardabweichung) bezogen auf pPL-1 wiedergibt, die Strukturen des veränderten HSS-2-Bereichs der einzelnen Konstrukte dargestellt, wobei die unmutierten und die durch Einführen von einer bzw. zwei BglII-Spaltstellen mutierten NFκB-Bindungsstellen angegeben sind.

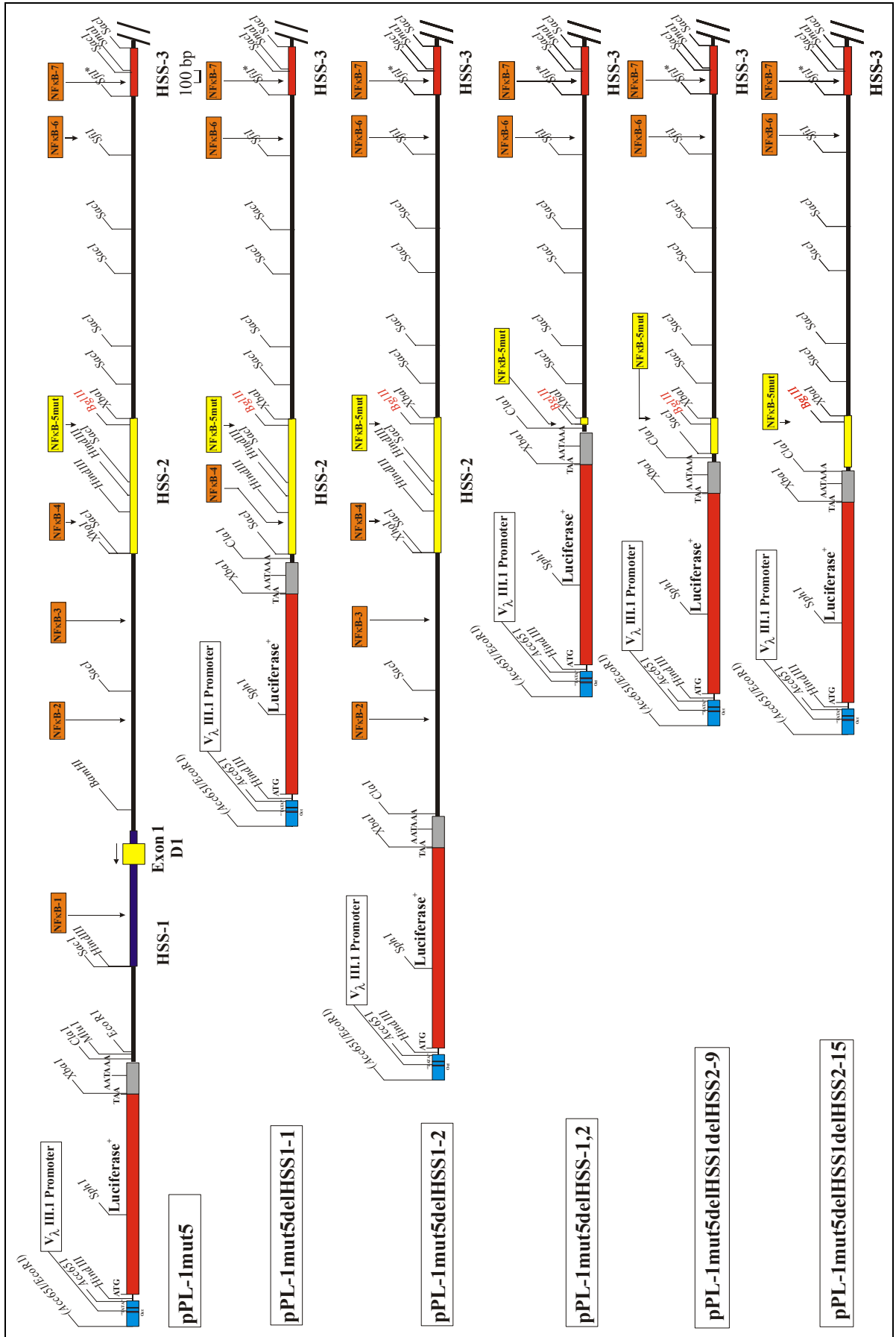
Außerdem wurden Experimente durchgeführt, die den Einfluß des Bereichs zwischen HSS-1 und HSS-2 bestimmen sollten. Der Abstand zwischen diesen beiden synergistisch auf den HSS-3-Enhancer wirkenden hypersensitiven Regionen beträgt 3,3 kB (Asenbauer, 1996), was die Frage aufwirft, welche Funktionen dieser relativ große Abstand ausübt. Daß die räumliche Anordnung eine gewisse Bedeutung für die Transkriptions-regulation haben könnte, wäre vorstellbar, da der Promotor mit den hypersensitiven Regionen HSS-1, -2 und -3 wechselwirkt. Ein Ergebnis, das keinen Einfluß des dazwischen liegenden Bereichs bestätigen würde, ließe das weitere Arbeiten mit kürzeren Konstrukten zu, womit eine erhebliche Erleichterung in der Herstellung der Konstrukte erzielt werden könnte.

Zur Herstellung der HSS-1- und -2-Deletionskonstrukte pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9, -15 und pPL-1mut5delHSS-1,2 (Abb. 22) dienten pPL-1mut5delHSS2-9, -15 bzw. pPL-1mut5delHSS2. In diesen Plasmiden wurden die gesamte HSS-1-Region und der Bereich zwischen HSS-1 und -2 durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen MluI und XhoI deletiert, mit Hilfe einer Polymerase glatte Enden hergestellt und die Konstrukte anschließend ligiert.

Um den Einfluß von HSS-1 auf HSS-2 und -3 und den Einfluß des Bereichs zwischen HSS-1 und -2 auf die Expression zu untersuchen, wurden Konstrukte ausgehend von pPL-1 und pPL-1mut5 gewählt. Beiden wurden sowohl HSS-1 als auch die komplette Region zwischen HSS-1 und -2 mit Hilfe von MluI und XhoI herausgeschnitten, wodurch die Konstrukte pPL-1delHSS1-1 (Abb. 23) und pPL-1mut5delHSS1-1 (Abb. 22) entstanden. Auch erfolgte in pPL-1 und pPL-1mut5 eine Deletion von HSS-1 und einem geringen Teil flußaufwärts zwischen HSS-1 und -2 durch Spaltung mit MluI und BamHI. Daraus gingen die Plasmide pPL-1delHSS1-2 (Abb. 23) und pPL-1mut5delHSS1-2 (Abb. 22) hervor.

Abb. 22: Konstrukte mit Deletionen flußaufwärts von HSS-2 von pPL-1mut5 ausgehend
(s. nächste Seite)

Die Restriktionskarten zeigen in Form von Balken den V_{λ} -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (nur im Ausgangskonstrukt pPL-1mut5 vorhanden; mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 (mutiert durch Einführen einer BglII-Spaltstelle und in einigen Konstrukten teildeletiert) und HSS-3. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Es sind die wichtigsten Spalt- bzw., wo vorhanden, die NF κ B-Bindungsstellen eingezeichnet.



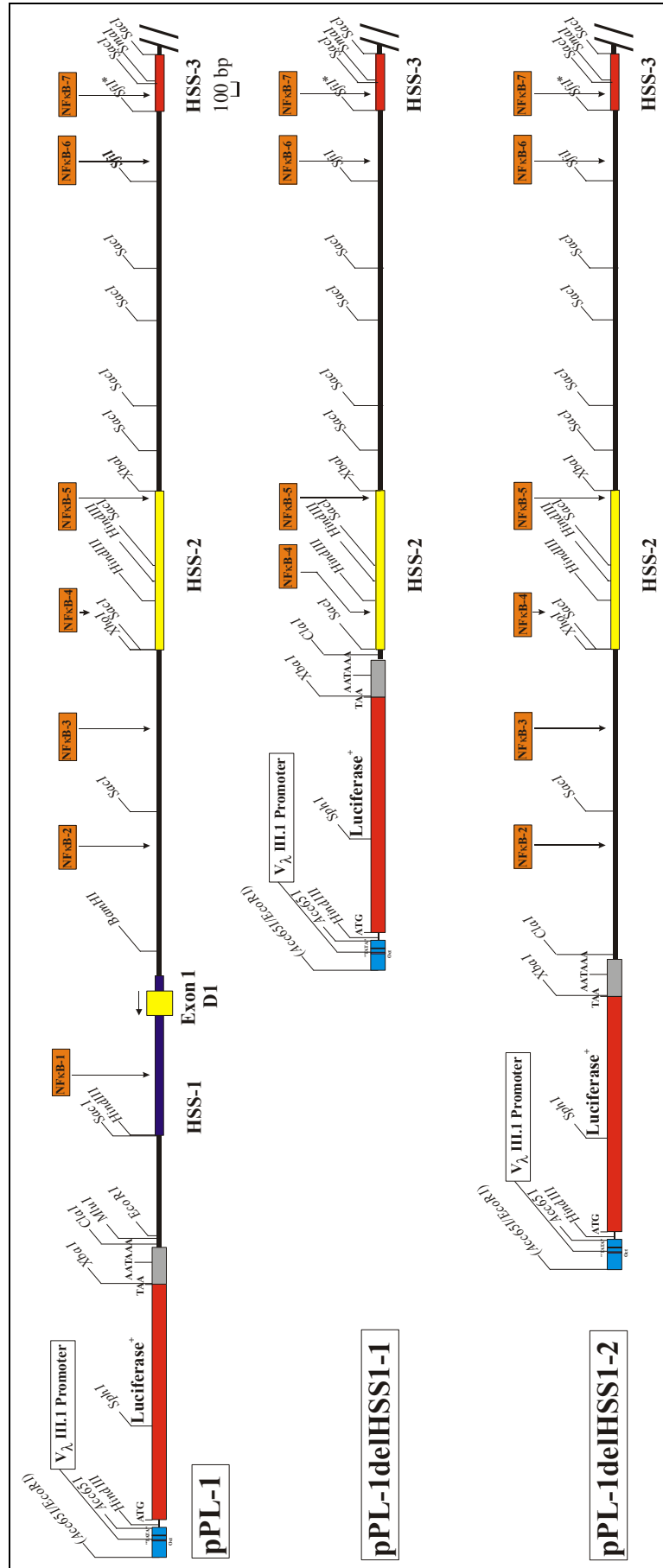


Abb. 23: Konstrukte mit Deletionen flußaufwärts von HSS-2 von pPL-1 ausgehend
(s. vorhergehende Seite)

Die Restriktionskarten zeigen in Form von Balken den V_λ -Promotor, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis*, die DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1 (nur im Ausgangskonstrukt pPL-1 vorhanden; mit dem Exon 1 des Gens D1), HSS-2 und HSS-3. Der Maßstab ist in Bp angeführt. Es sind die wichtigsten Spalt- bzw., wo vorhanden, die NF κ B-Bindungsstellen eingezeichnet.

Kontrolliert wurden die Konstrukte durch Spaltung mit HindIII (pPL-1delHSS1-1, -2), mit HindIII und BglII (pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9, -15, pPL-1mut5delHSS1-1, -2, -1,2) bzw. HindIII und SalI (pGL3 λ ModHSS3) und durch anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (Abb. 24).

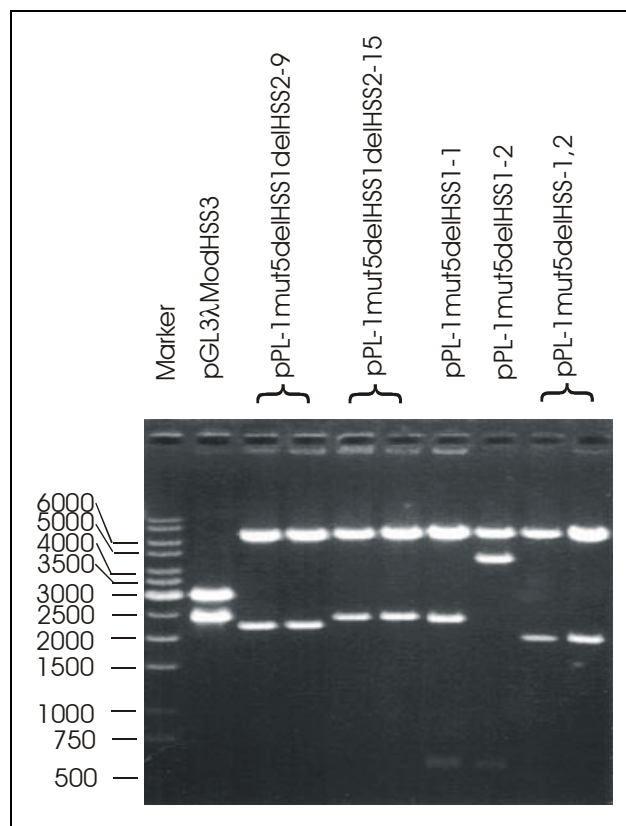


Abb. 24: Konstruktkontrolle mittels Spaltung mit HindIII (pPL-1delHSS1-1, -2), mit HindIII und BglII (pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9, -15, pPL-1mut5delHSS1-1, -2, -1,2) bzw. HindIII und SalI (pGL3 λ ModHSS3)

Auf dem Agarosegel sind zum Teil verschiedene Plasmidaufreinigungen dargestellt. Die Längen (in Bp) der Markerfragmente sind links angegeben.

Die Expressionswerte wurden auch hier auf die des pPL-1 bezogen (Abb. 25).

Die Auswertung der Transfektionsdaten zeigt, daß das Vergleichskonstrukt pGL3- λ ModHSS3 nur 24% der Aktivität von pPL-1 erreichte. Im Vergleich dazu wiesen pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9 und -15 eine Expressionsaktivität von zirka 40% auf, was auch der von pPL-1mut5delHSS1,2 entsprach.

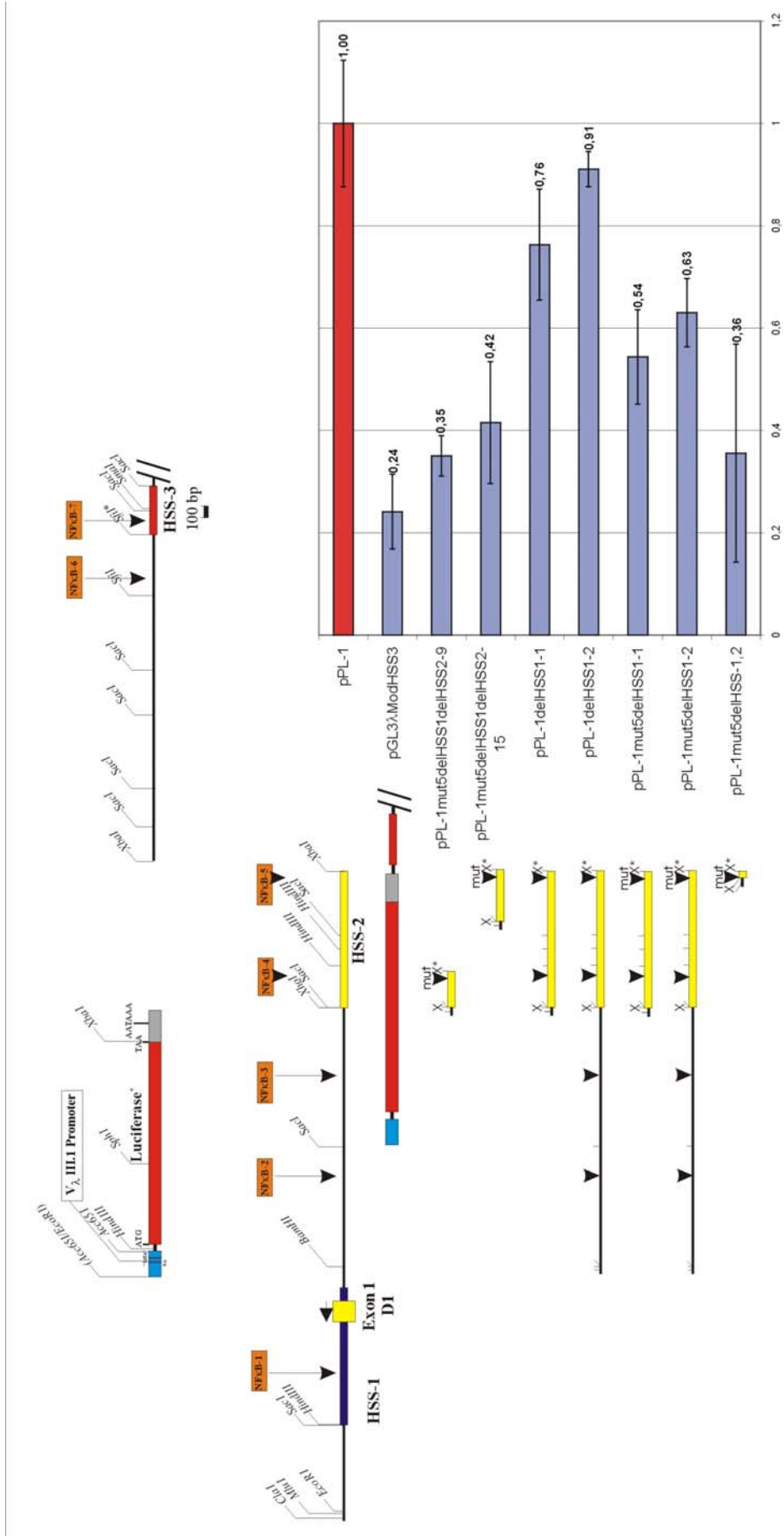


Abb. 25: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der Konstrukte mit Deletionen flüßaufwärts von HSS-2 anhand der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten (\pm Standardabweichung) (s. vorhergehende Seite)

Die schematische Darstellung zeigt in Form von Balken den B-zellspezifischen Promotor $V_{\lambda III.1}$, das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* und die DNase I-hypersensitive Region HSS-3. Es sind die wichtigsten Spaltstellen sowie die NF κ B-Bindungsstellen eingezeichnet. Der Maßstab ist in Bp angeführt.

Zur Verdeutlichung wurden neben dem Balkendiagramm, das die Enzymaktivität in relativen Lichteinheiten (Mittelwert \pm Standardabweichung) bezogen auf pPL-1 wiedergibt, die Strukturen des veränderten HSS-1- und -2-Bereichs der einzelnen Konstrukte schematisch dargestellt, wobei im Fall der Deletionskonstrukte die Spaltstellen durch Striche, die NF κ B-Bindungsstellen durch schwarze Pfeile, die Spaltstellen XhoI bzw. XbaI durch X bzw. X* und die mutierte Stelle (mut) gekennzeichnet sind. Zum besseren Verständnis sind bei pPL-1 HSS-1 (mit Exon 1 des Gens D1) und -2 als Balken sowie die wichtigsten Spaltstellen und die NF κ B-Bindungsstellen dargestellt. Für pGL3 λ ModHSS3 ist das gesamte Konstrukt bis HSS-3 wiedergegeben.

Außerdem nahmen die Aktivitäten von pPL-1mut5delHSS-1,2, bei dem HSS-1 und -2 komplett fehlten, von pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9 und -15, bei denen HSS-1 ganz und HSS-2 zum Großteil, einschließlich der NF κ B-4-Stelle, deletiert wurden, im Vergleich zu pPL-1 um etwa 60% ab, was die Wichtigkeit von HSS-1 und -2 für die Enhanceraktivität von HSS-3 verdeutlicht.

Schließlich wurde auch der Einfluß von HSS-1 auf HSS-2 und -3 und der Einfluß des Bereichs zwischen HSS-1 und -2 bei Anwesenheit von HSS-2 und -3 auf die Expression untersucht. Bezogen auf pPL-1 kam es bei pPL-1delHSS1-1 bzw. pPL-1mut5delHSS1-1, deren HSS-2 direkt an das Luciferasegen grenzte, zu einer Aktivitätsminderung von 24% bzw. 46% und bei pPL-1delHSS1-2 bzw. pPL-1mut5delHSS1-2, deren HSS-2 sich im Abstand von zirka 2 kB zum Luciferasegen befand, von etwa 10% bzw. 40%. Sowohl die von pPL-1 als auch von pPL-1mut5 abstammenden Konstrukte ohne Abstand zum Luciferasegen wiesen je eine 10%ige Abnahme der Aktivität gegenüber dem entsprechenden Konstrukt mit Abstand auf.

Vergleicht man nun die Expressionsdaten der beiden von pPL-1 ausgehenden Plasmide (pPL-1delHSS1-1, -2) mit denen der von pPL-1mut5 stammenden Plasmide (pPL-1mut5delHSS1-1, -2), so fällt auf, daß der jeweils entsprechende Wert sich um zirka 30% unterscheidet. Das heißt, die Konstrukte, bei denen in der NF κ B-5-Bindungsstelle eine Mutation vorgenommen wurde (pPL-1mut5delHSS1-1, -2) und dadurch diese Stelle als Erkennungssequenz für NF κ B verloren ging, zeigen eine geringere Transkriptionsaktivität. Eine Erklärung dafür wäre, daß pPL-1delHSS1-1 und -2 eine NF κ B-Stelle mehr als pPL-1mut5delHSS1-1 und -2 besitzen und dadurch der Verlust

von HSS-1 und damit auch einer NFκB-Bindungssequenz besser kompensiert werden kann.

Interessant ist es auch, die Werte von pPL-1mut5delHSS1-1 und -2, denen HSS-1 fehlt, mit denen von pPL-1mut5delHSS-1,2, aus dem HSS-1 und -2 deletiert wurden, zu vergleichen. Hier erkennt man deutlich den transkriptionssteigernden Einfluß von HSS-2. Fehlen nämlich die beiden synergistisch wirkenden, hypersensitiven Regionen HSS-1 und -2, sinkt die Expressionsrate auf zirka 40% (bezogen auf pPL-1). Ist allerdings HSS-2 komplett vorhanden, fällt die Aktivität nur auf etwa 50% bzw. 60% ab.

4.2 In-vivo-Footprinting

Ausgehend von den Resultaten der transienten Transfektionen, die erste Hinweise auf wichtige Bereiche in HSS-2 lieferten, wurde nun mit Hilfe der In-vivo-Footprinting-Methode versucht, die für die Funktion von HSS-2 wichtigen, mit Proteinen interagierenden Sequenzbereiche genauer zu definieren.

Die Versuche erfolgten mit B- und Nicht-B-Zellen. So konnten durch Vergleiche mögliche Proteinbindungsstellen leichter identifiziert werden, da HSS-2 ausschließlich in B-Lymphozyten vorkommt.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß in intakten Zellen gebundene Transkriptionsfaktoren die Guanosine ihrer Bindungssequenzen vor Methylierung mit DMS schützen und damit die isolierte DNA an diesen Positionen mit Piperidin nicht gespalten werden kann. Mit der DNA assoziierte Histone können eine Methylierung nicht verhindern.

Durch Methylierung und anschließende Piperidinbehandlung entstehen viele Fragmente unterschiedlicher Länge. Da diese in sehr kleinen Mengen vorliegen, wird ein Nachweis erst durch die PCR-Technik ermöglicht. Hierzu eignet sich besonders die Methode der LMPCR, da sie durch eine hohe Sensitivität charakterisiert ist. Bei der LMPCR (s. Kap. 3.3.2) entsteht durch eine Auffüllreaktion mit Hilfe eines Primers ein DNA-Doppelstrang, bei dem an ein Ende ein Oligonukleotidadapter (TAG-Doppelstrangadapter) ligiert wird. Zur Amplifizierung bindet an dieses Doppelstrangende ein adapter-spezifischer Primer und an das andere Ende ein HSS-2-sequenzspezifischer Primer.

Um die Fragmente analysieren zu können, erfolgt eine einseitige Strangauffüllreaktion mit einem radioaktiv markierten Primer.

Eine anschließende Auftrennung der markierten Fragmente über ein Gel dient zur Sichtbarmachung von Sequenzbereichen, die durch Proteinbindungen vor Methylierung geschützte G-Reste enthalten. In der Nachbarschaft solcher Bereiche besteht die Möglichkeit, daß auch eine Verstärkung der Methylierung auftritt. Proteinbindende Sequenzabschnitte, die nur aus A- und T-Nukleotiden bestehen und daher auch selten vorkommen, können mit dieser Methode nicht untersucht werden.

Die Spezifität der LMPCR läßt sich damit erklären, daß immer ein Satz aus drei Primern, die der Sequenz nach unmittelbar aufeinander folgen oder sich sogar

überschneiden, verwendet wird. Dies verhindert die Bildung von Artefakten, die durch Anlagern der Oligonukleotide an nicht gewünschte Positionen entstehen können. In so einem Fall ist es dem für die darauffolgende Polymerasekettenreaktion verwendeten Primer nicht möglich, an die DNA zu binden und diese zu amplifizieren.

4.2.1 Einflüsse auf den Erfolg der LMPCR

Da die LMPCR über mehrere Schritte erfolgt, ist die Anzahl an variierbaren Parametern besonders groß. So beeinflussen die Bestandteile eines PCR-Ansatzes (Konzentration, Reinheit, Wahl der DNA-Polymerase und der Primer), die PCR-Bedingungen (Temperatur, Zeit, Zyklenzahl) und die verwendete PCR-Apparatur den Erfolg der Reaktionen (Innis et al., 1990; McPherson et al., 1995).

In der Arbeitsgruppe wurde laufend versucht, die Methode weiter auszuarbeiten und die Parameter zu optimieren.

4.2.1.1 Auswahl der DNA-Polymerasen

Die Wahl einer geeigneten DNA-Polymerase spielt eine wichtige Rolle für das Gelingen der LMPCR und erfolgt unter Beachtung der jeweiligen Reaktionsziele.

Im ersten Schritt der LMPCR werden die durch Piperidinspaltung erhaltenen DNA-Fragmente denaturiert und ihre Einzelstränge durch eine PCR mit Hilfe einer Polymerase und eines geeigneten Oligonukleotids aufgefüllt. Hier ist das Ziel, glatte Enden für die anschließende Adapterligierung zu erhalten. Dazu wäre die Verwendung der Klenow-DNA-Polymerase möglich. Ihr Temperaturoptimum liegt allerdings bei 37°C, wodurch dann die Gefahr besteht, daß relativ viele Artefakte durch falsches Anlagern der Oligonukleotide produziert werden.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von Taq-DNA-Polymerase dar. Die Wahrscheinlichkeit der Artefaktentstehung ist bei dieser wesentlich geringer, da durch ihr Temperaturoptimum bei 72°C eine höhere Primeranlagerungstemperatur gewählt werden kann. Jedoch neigt sie dazu, an das 3'-Ende des hergestellten Doppelstrangs Basen anzuhängen, die, um glatte Enden zu erhalten, nach der Polymerasekettenreaktion enzymatisch abgetrennt werden müßten. Einfacher ist es aber, die glatten Enden bereits während der Auffüllreaktion zu produzieren.

Als ideal erwies sich schließlich die Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase (Cline et al., 1996). Sie stammt aus *Pyrococcus furiosus*, ist thermostabil, was die Artefaktbildung

wesentlich herabsetzt, und hat die Fähigkeit zum Korrekturlesen, was durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität erzielt wird. Im Vergleich zu anderen thermostabilen Polymerasen zeichnet sie sich durch eine sehr geringe Fehlerrate beim Ablesen der DNA und durch ihre fehlende terminale Desoxynukleotidyltransferaseaktivität aus. Das ermöglicht der Pfu-DNA-Polymerase, glatte Enden herzustellen, die für die T4-DNA-Ligase zur Ligation des Adapters an den DNA-Doppelstrang nötig sind.

Im nächsten Schritt der LMPCR sollen die DNA-Fragmente amplifiziert werden. Da die Gefahr der Artefaktbildung durch Vorliegen vieler Einzelstränge aus der ersten Reaktion groß ist, wurde die AmpliTaqGold-DNA-Polymerase verwendet (Bost et al., 1997). Der Vorteil ihrer Verwendung gegenüber der Taq-Polymerase liegt in der Inaktivität bei niedrigen Temperaturen, wodurch die Reaktionsansätze bei Raumtemperatur pipettiert werden können und sich die Entstehung von Artefakten unterbinden läßt, da sich Oligonukleotide vor allem bei niedrigen Temperaturen unspezifisch anlagern.

Um zu untersuchen, ob mit Hilfe der AmpliTaqGold- oder der Taq-DNA-Polymerase bessere LMPCR-Ergebnisse erzielt werden können, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem bei gleichen Bedingungen nur die Polymerasen variiert wurden. Für die Strangauffüllreaktion wurde immer die Pfu-Polymerase verwendet. Der Amplifizierungsschritt und die radioaktive Markierung fanden unter Zuhilfenahme entweder der AmpliTaqGold- oder der Taq-DNA-Polymerase mit je 10, 15 und 20 Zyklen statt. Das Autoradiogramm (Abb. 26) zeigt, daß die Verwendung beider Polymerasen zu keiner Artefaktbildung führt. Durch den Gebrauch von drei auf der Sequenz hintereinanderliegenden Oligonukleotiden können unspezifische Anlagerungen verhindert werden, da eventuell entstandene Artefakte aus dem Amplifizierungsschritt durch das dritte Oligonukleotid bei der radioaktiven Markierung nicht mehr generiert werden. Allerdings läßt sich aus den Versuchsergebnissen erkennen, daß mit der AmpliTaqGold-DNA-Polymerase eine größere spezifische Menge erhalten werden kann, da bereits die Amplifizierung spezifischer abläuft. Um die AmpliTaqGold-Polymerase für die PCR vollständig zu aktivieren, ist es nötig, sie zwölf Minuten lang einer Temperatur von 94°C auszusetzen. Auch für die anschließende radioaktive Markierung der amplifizierten Fragmente erwies sich die AmpliTaqGold-DNA-Polymerase als geeignet.

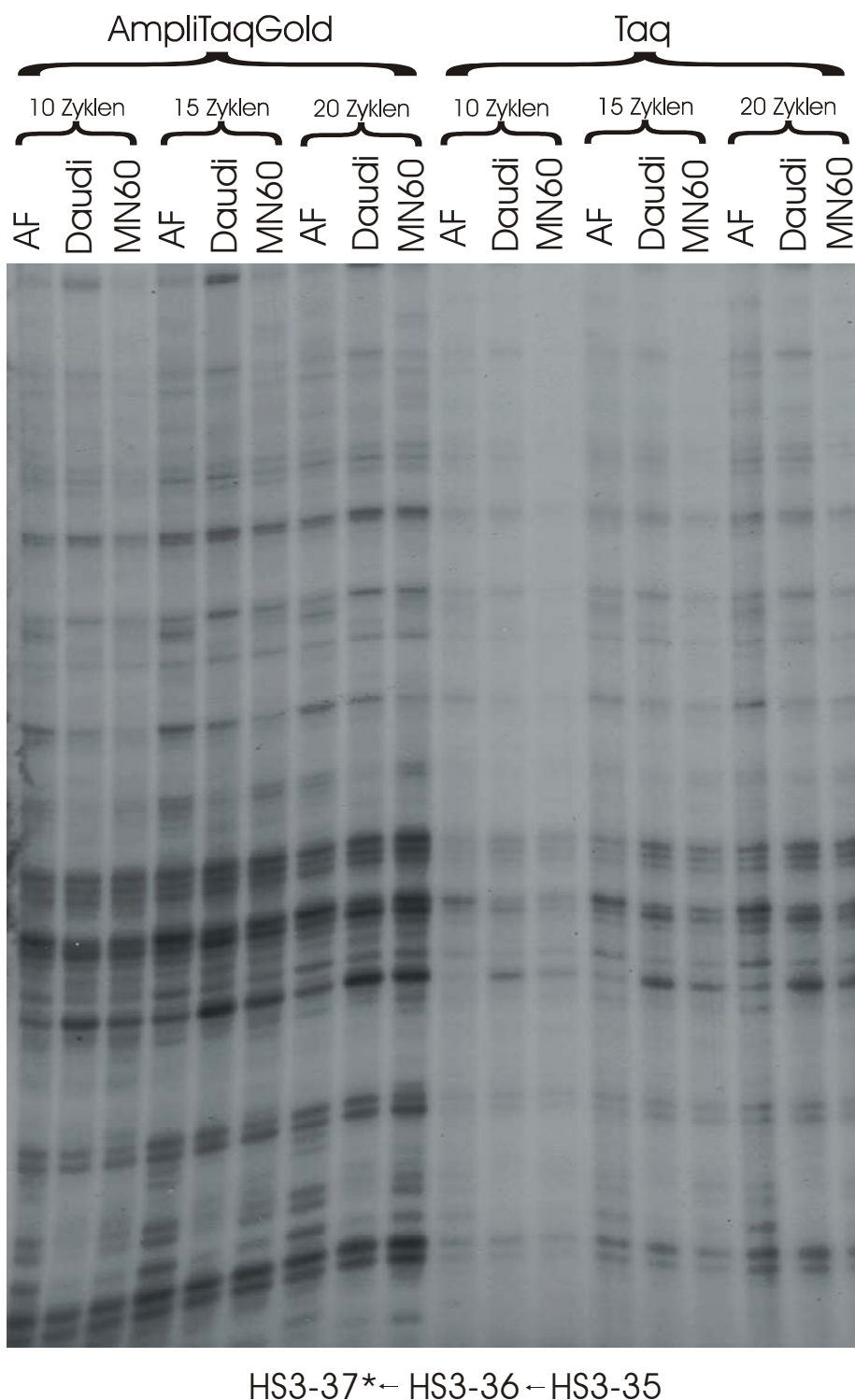


Abb. 26: Vergleich der PCR-Effizienz bei Verwendung der AmpliTaqGold- bzw. Taq-DNA-Polymerase anhand einer In-vivo-Footprintanalyse von HSS-3 mit den Oligonukleotiden HS3-35, -36 und -37* (Combriato und Klobeck, 2002)

Das Autoradiogramm zeigt die Ergebnisse für verschiedene Zelllinien bzw. Reaktionsbedingungen (Zyklen), wobei die einzelnen Bahnen entsprechend beschriftet sind (AF=Plazenta-DNA AF). Die bessere Ausbeute bei Verwendung von AmpliTaqGold-DNA-Polymerase ist im linken Teil des Bildes zu sehen. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Für die Strangauffüllreaktion wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Der Amplifizierungsschritt und die radioaktive Markierung fanden unter Zuhilfenahme entweder der AmpliTaqGold- oder der Taq-DNA-Polymerase mit je 10, 15 und 20 Zyklen statt. Die verwendeten Anlagerungstemperaturen sind im Anhang aufgelistet.

4.2.1.2 PCR-Parameter

Das Gelingen der LMPCR hängt auch vom verwendeten PCR-System und dessen Einstellungen bezüglich Temperaturen, Zeiten und Zyklenzahl ab.

Für alle Versuche wurde das GeneAmp-PCR-System von Applied Biosystems verwendet, das über eine Deckelheizung verfügt und damit das Verdampfen eines Teils des Reaktionsansatzes unterbindet. Durch den Wasserverlust würde es zu Änderungen der Salzkonzentrationen kommen und dadurch die Polymerasekettenreaktion negativ beeinflussen. Der Gebrauch von dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäßen dient der Optimierung des Systems, da diese einen raschen Temperatenausgleich gewährleisten und somit kürzere Reaktionszeiten möglich sind.

Einen wichtigen Parameter stellt auch die Denaturierungszeit dar. Sie sollte nicht zu lange gewählt werden, da es sonst zu einer Inaktivierung der DNA-Polymerase und zur Beeinträchtigung der DNA-Qualität führt. Weiters spielen die Anlagerungstemperaturen der Primer eine wichtige Rolle. Es ist günstig, wenn sie zwischen 55°C und 70°C liegen, da bei zu niedrigen Temperaturen die Gefahr der Artefaktbildung durch falsches Anlagern der Oligonukleotide steigt und eine höhere Temperatur als die Kettenverlängerungstemperatur (72°C) keinerlei Vorteil bringt. Außerdem sollte im Amplifizierungsschritt der LMPCR die Anlagerungstemperatur des Primers-2 so gewählt werden, daß sie in etwa der des TAG-Oligonukleotids entspricht. Auch die Extensionszeit ist variabel und muß je nach Länge der gewünschten DNA-Fragmente und nach der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerasen bestimmt werden. Als Richtlinie dafür gilt, daß ein DNA-Abschnitt um zirka 1000 Basen pro Minute verlängert werden kann.

Darüber hinaus beeinflußt die Zyklenzahl den Erfolg der LMPCR, wobei 25 bis 30 Zyklen bevorzugt verwendet werden. Liegt die Anzahl höher, erreicht die Reaktion eine Plateauphase, in der die Verfügbarkeit von Nukleotiden und auch der DNA-Polymerase begrenzt ist und somit kürzere Fragmente angereichert werden. Dadurch werden mögliche Unterschiede verwischt und mehr Artefakte gebildet. Werden allerdings weniger Zyklen gewählt, kann die Menge des PCR-Produkts zu gering sein. Daher muß ein Kompromiß gefunden werden, der bei möglichst geringer Zyklenzahl eine zufriedenstellende Ausbeute gewährleistet.

4.2.2 Optimierung der LMPCR-Methode

Die meisten der im vorhergehenden Kapitel geschilderten Parameter für die LMPCR konnten vor den Versuchen theoretisch bestimmt werden. Die Festlegung der ungefähren Anlagerungstemperaturen der Primer war über eine Faustregel (s. Kap. 3.1.5) möglich, die optimale Bestimmung konnte allerdings nur experimentell erfolgen. Die Oligonukleotide (Abb. 27 und Anhang) wurden so ausgewählt, daß ihre Sequenzen zirka 20 Basen lang waren und deren Gehalt an Guanosinen und Cytosinen etwa 50% betrug. Außerdem sollten die Primerenden von Adenosinen oder Thyminen flankiert und die G- und C-Reste gleichmäßig über die Sequenz verteilt sein.

Um die optimalen Anlagerungstemperaturen und die Spezifität der Oligonukleotide zu ermitteln und dadurch den Erfolg der LMPCR zu gewährleisten, wurden Test-PCRs bei unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen durchgeführt.

Die Versuche erfolgten mit Hilfe des GeneAmp-PCR-Systems von Applied Biosystems nach der LMPCR-Methode, mit den Ausnahmen, daß als Matrize das Plasmid pPL-1 (Abb. 9), das die zu untersuchende Region mit HSS-2 enthielt, diente und daß auf die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden verzichtet wurde. In diesen In-vitro-Tests wurde der Ablauf der LMPCR simuliert, mit den Vorteilen, daß die Primer zusammen mit dem TAG-Oligonukleotid getestet werden konnten und keine radioaktive Markierung nötig war. So konnte die optimale Anlagerungstemperatur des Primers festgestellt und gleichzeitig auf die des TAG-Oligonukleotids abgestimmt werden.

Zuerst wurde pPL-1 mit der Restriktionsendonuklease XbaI bzw. XhoI gespalten, wobei die XbaI-Spaltstelle das 3'-Ende und die XhoI-Spaltstelle das 5'-Ende des zu untersuchenden HSS-2-Bereichs darstellen.

Anschließend erfolgte eine Strangauffüllreaktion nach dem LMPCR-Protokoll bei einer Anlagerungstemperatur von 60°C. Dazu wurden die Spaltprodukte des pPL-1 und die Oligonukleotide HS2-10 bzw. HS2-42, deren komplementäre Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende von HSS-2 liegen, verwendet. Es gingen Fragmente hervor, die den Bereich der gesamten HSS-2-Stelle umfassen.

Dann wurde der TAG-Doppelstrangadapter an die durch Strangauffüllung entstandenen Fragmente ligiert.

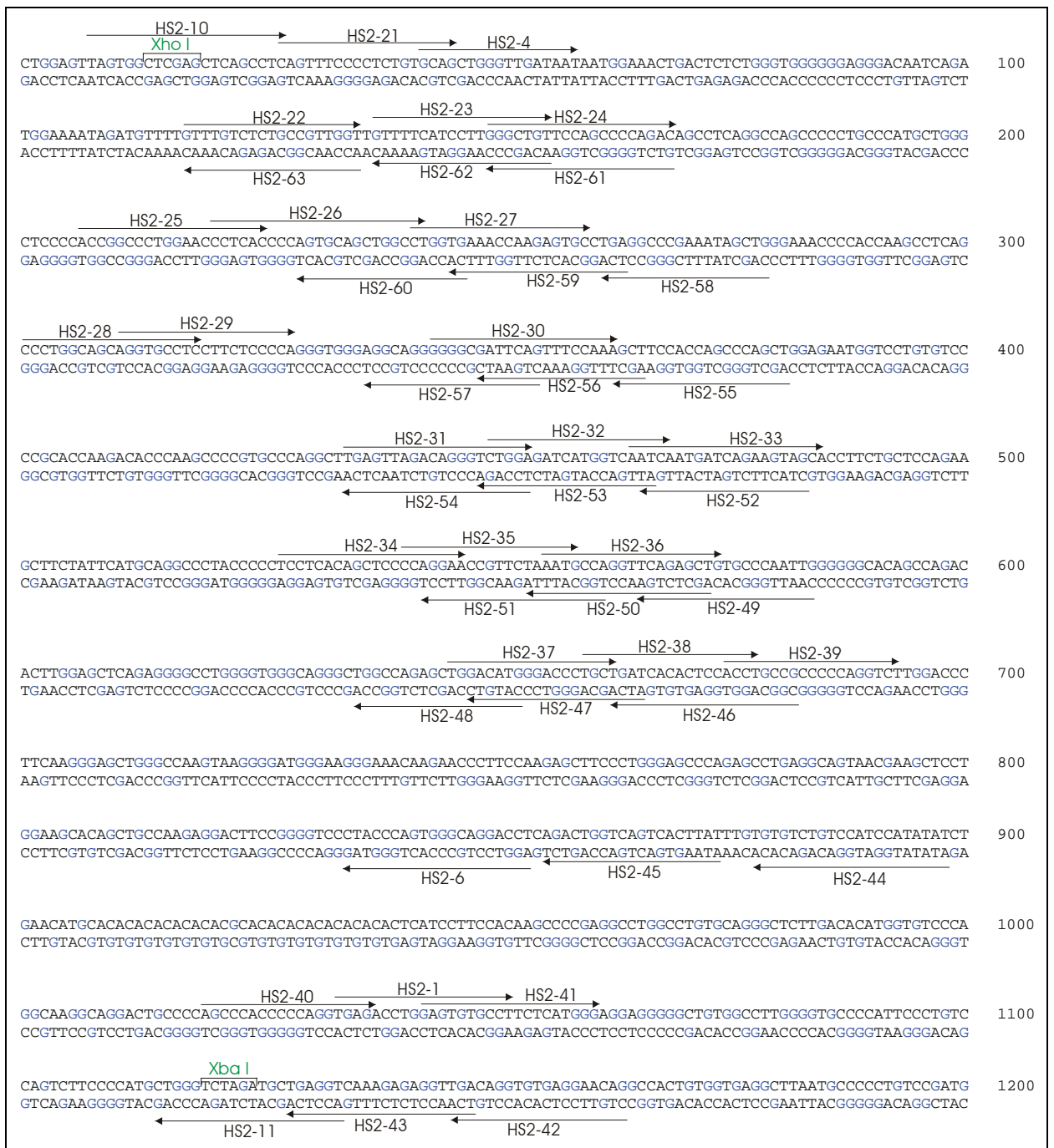


Abb. 27: Sequenz von HSS-2 und die Positionen der verwendeten Oligonukleotide. Die Spaltstellen XhoI und XbaI sind eingezeichnet.

Schließlich folgte der Amplifizierungsschritt unter Verwendung der AmpliTaqGold-Polymerase, der Ligierungsprodukte, die als Matrizen der zu untersuchenden Oligonukleotide auf dem Strang (HS2-1, -4, -10, HS2-21 bis -41) und Gegenstrang (HS2-6, -11, HS2-42 bis -63) dienten, und von TAG-3 als Primer bei Anlagerungstemperaturen von 60°C, 65°C und 68°C und mit 35 Zyklen.

Die PCR-Produkte wurden zur Beurteilung der Primer über Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt, wobei eine optimale Fragmentausbeute bei möglichst keinen Nebenbanden wünschenswert war (Abb. 28). Nach Verwendung einer geeigneten Anlagerungstemperatur war für jedes spezifische Oligonukleotid ein Fragment mit bekannter Länge sichtbar. Nebenbanden waren auf unspezifisches Anlagern der Primer zurückzuführen, wurden aber außer Acht gelassen, da diese Artefakte nach Durchführung der radioaktiven Markierung mit Hilfe eines dritten Oligonukleotids nicht mehr auftraten.

Konnte allerdings der entsprechende Primer durch eine zu hohe Anlagerungstemperatur nicht binden, waren keine Banden sichtbar. Eine Reduktion der Temperatur um 5°C erwies sich als zielführend. Die hier ermittelten Anlagerungstemperaturen sind im Anhang aufgelistet.

Trotz dieser In-vitro-Tests der LMPCR-Bedingungen war es möglich, daß bei den eigentlichen Versuchen Artefakte gebildet wurden, da hier das Gesamtgenom untersucht wurde und dadurch auch mehr Stellen vorhanden waren, an die die Primer binden konnten. Aber zumindest wurden durch die Vorversuche Artefakte so gut wie möglich ausgeschlossen.

Um möglichst den gesamten Bereich von HSS-2 zu untersuchen, wurden die Sätze aus je drei Primern, die für die LMPCR nötig waren, auf beiden Strängen in einem Abstand von zirka 100 Basen ausgewählt. Das stellt in etwa die Strecke dar, die mit einem Oligonukleotidsatz erfaßt werden kann.

In manchen Bereichen (Abb. 29) war eine Analyse nicht möglich, da dort repetitive Sequenzen vorlagen, die für die Polymerasen sehr schwierig zu amplifizieren waren, oder keine passenden Primer ohne Artefaktbildung gefunden werden konnten.

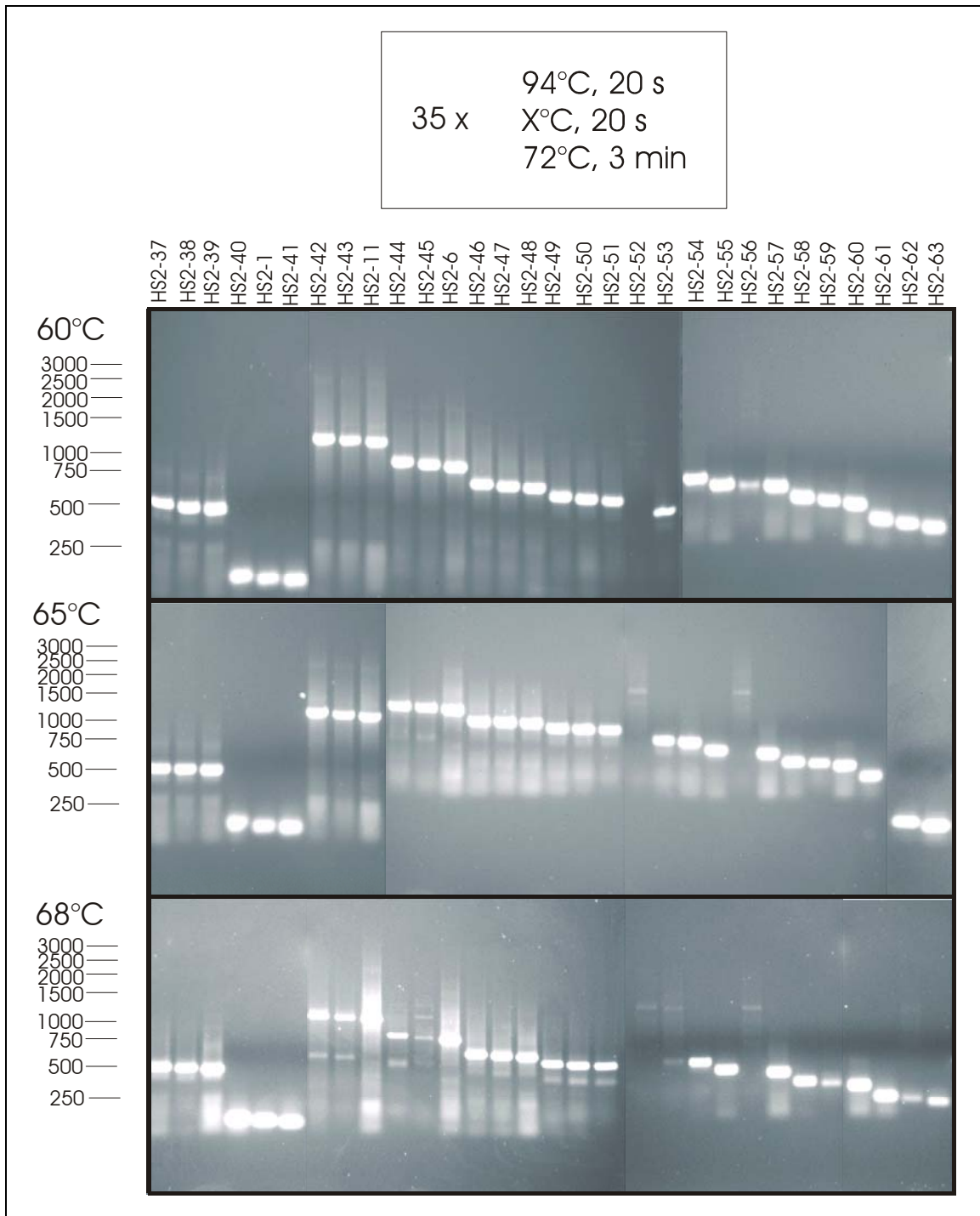


Abb. 28: Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperaturen für die LMPCR

Unter den einzelnen Bahnen sind die unterschiedlichen HSS-2-Primer angegeben. Die Größen der Markerfragmente wurden am linken Rand aufgelistet. Die Temperaturen X sind jeweils neben den Agarosegelbildern zu finden. Die in manchen Bildern sichtbaren Nebenbanden kommen durch unspezifische Anlagerungen bei zu niedrigen Temperaturen zustande. Bei zu hohen Temperaturen lassen sich keine Fragmente mehr erkennen.

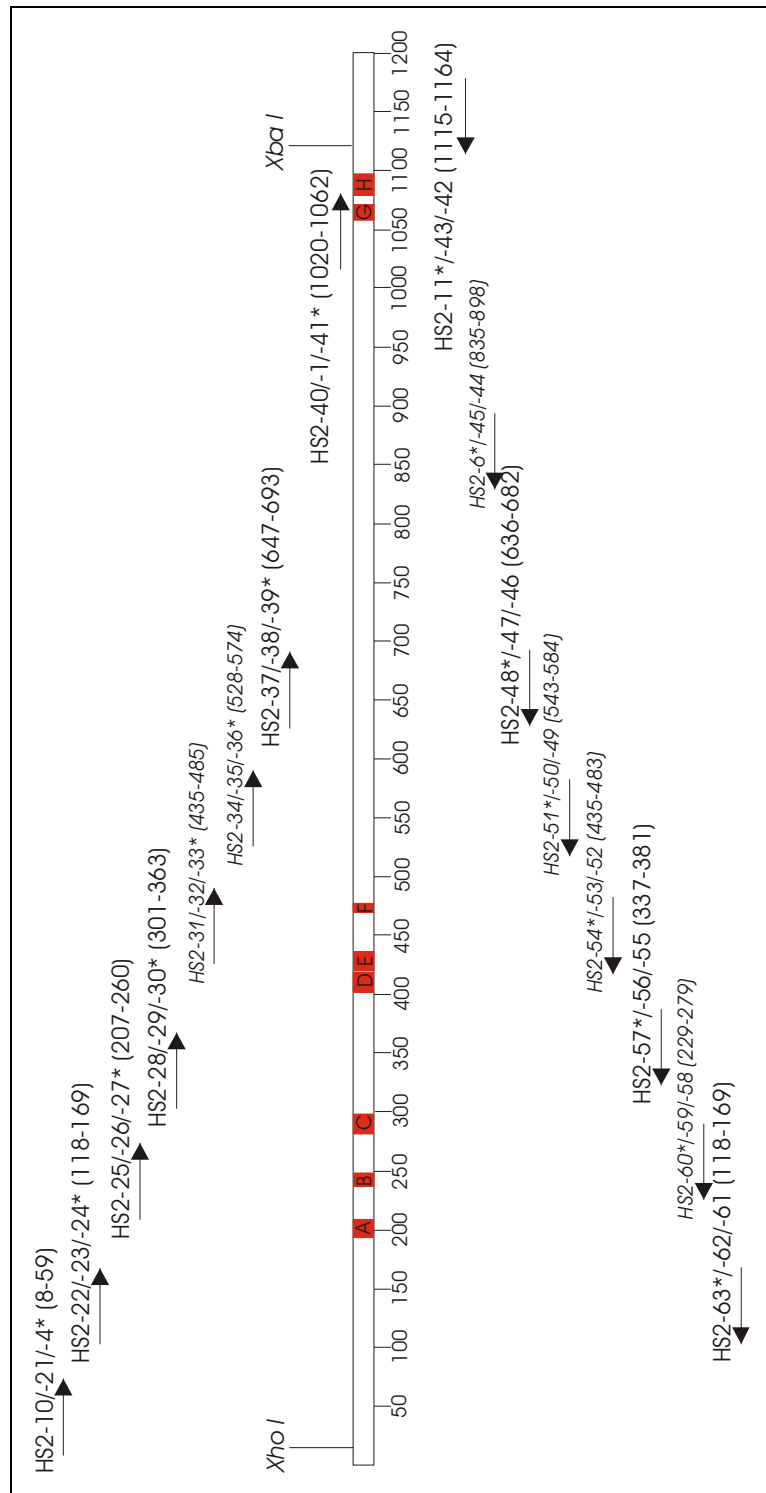


Abb. 29: Überblick über die zur Untersuchung von HSS-2 verwendeten Oligonukleotidsätze. Der Balken stellt die in 50-Bp-Schritten angegebene HSS-2-Sequenz dar, in welche die gefundenen Footprints (Abb. 36) als Kästchen mit den Buchstaben A-H eingezeichnet sind. Oberhalb des Balkens sind die Strang-, unterhalb die Gegenstrangoligonukleotidsätze aufgelistet (die Pfeile stehen für die 5'→3'-Richtung). Die Sterne kennzeichnen die radioaktiv markierten Primer. In den Klammern sind die Positionen (in Bp), wo die Primer binden, angegeben. Die kursiv dargestellten Oligonukleotidsätze konnten nicht ausgewertet werden.

4.2.3 Vorbehandlung der Zelllinien (TPCK, PMA), Methylierung und Kontrolle der DNA-Spaltung

Um die HSS-2-Region auf mögliche Proteinbindungsstellen hin zu untersuchen, kamen für die In-vivo-Footprinting-Methode verschiedene Zelllinien zur Anwendung.

Die Verwendung der reifen B-Zelllinien Daudi und MN60, der Prä-B-Zelllinie BV173, der T-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat sowie der myeloischen Zelllinie K562 ermöglicht Vergleiche und eine bessere Bewertung der gefundenen Ergebnisse.

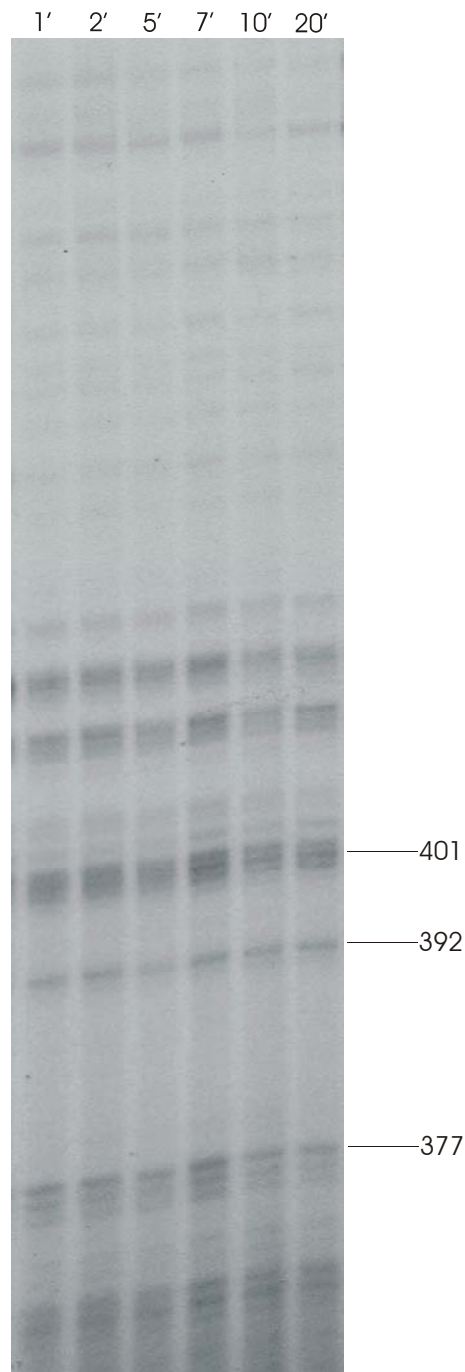
Als Referenz diente die freie DNA der Plazenta AF, die im Gegensatz zur genomischen DNA aus den oben angeführten Zellen keine Proteinbindungen aufweist. Der Vergleich mit Nicht-B-Zellen ermöglicht die Beurteilung, ob bestimmte Transkriptionsfaktoren B-zellspezifisch gebunden werden.

In der Arbeitsgruppe konnten durch eine computergestützte Suche in HSS-2 zwei Sequenzbereiche für mögliche NF κ B-Bindungsstellen gefunden werden (Combriato und Klobeck, 2002). NF κ B stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der im Zytoplasma einer Zelle vorliegt und durch das Protein I κ B daran gehindert wird, in den Zellkern vorzudringen. Erst durch den regulierten Abbau von I κ B kann NF κ B in den Nukleus wandern. In reifen B-Zellen ist NF κ B konstitutiv aktiviert, in anderen Zellen induzierbar (Übersicht in: Baeuerle und Baltimore, 1996; Baeuerle, 1998).

Um eine tatsächliche Bindung von NF κ B im HSS-2-Bereich abzuklären, konnte das Zusammenspiel zwischen I κ B und NF κ B für die Versuche dahingehend ausgenutzt werden, daß die Zellen vor der Ernte mit TPCK bzw. PMA behandelt wurden. TPCK verhindert und PMA aktiviert den Abbau von I κ B, wodurch dann NF κ B im einen Fall im Zytoplasma verbleibt und im anderen Fall in den Zellkern gelangen kann (Henkel et al., 1993).

Nach der Vorbehandlung der Zellen (mit TPCK bzw. PMA) wurden diese 5 bis 15 Minuten lang mit Hilfe von DMS einer Methylierungsreaktion unterzogen. Vorversuche zeigten, daß diese Einwirkzeit völlig ausreicht, um aus den verschiedenen Zellen für die LMPCR brauchbare, partiell methylierte DNA zu erhalten. Das Ziel ist es nämlich, Bedingungen zu schaffen, daß die partielle Methylierung optimal verläuft. Erfolgte eine zu starke Methylierung der genomischen DNA, resultierten aus der LMPCR nur kurze Fragmente, die dann nicht den gesamten gewünschten Bereich von zirka 100 Basen dar-

stellen konnten. In weiten Bereichen, das heißt, wenn die Sequenz nicht viele Guanosine enthält, spielt die Einwirkzeit keine große Rolle (Abb. 30). Allerdings gewinnt sie bei GC-reichen Systemen an Bedeutung. So wurden immer zwischen 5 und 15 Minuten gewählt, um in einem guten, mittleren Zeitbereich zu liegen.



HS2-28 – HS2-29 – HS2-30*

Abb. 30: Autoradiogramm zur Bestimmung des Einflusses der DMS-Einwirkzeit anhand des Oligonukleotidsets HS2-28, -29 und -30*

Unter Verwendung von MN60 wurde die Auswirkung der unterschiedlich langen DMS-Einwirkzeiten (in Minuten) untersucht. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.

Der Erfolg der DNA-Methylierung und anschließenden Piperidinspaltung wurde über ein Agarosegel kontrolliert (Abb. 31). Hier war zu erkennen, daß nach der Behandlung mit Piperidin die Anzahl der großen Fragmente deutlich abnimmt.

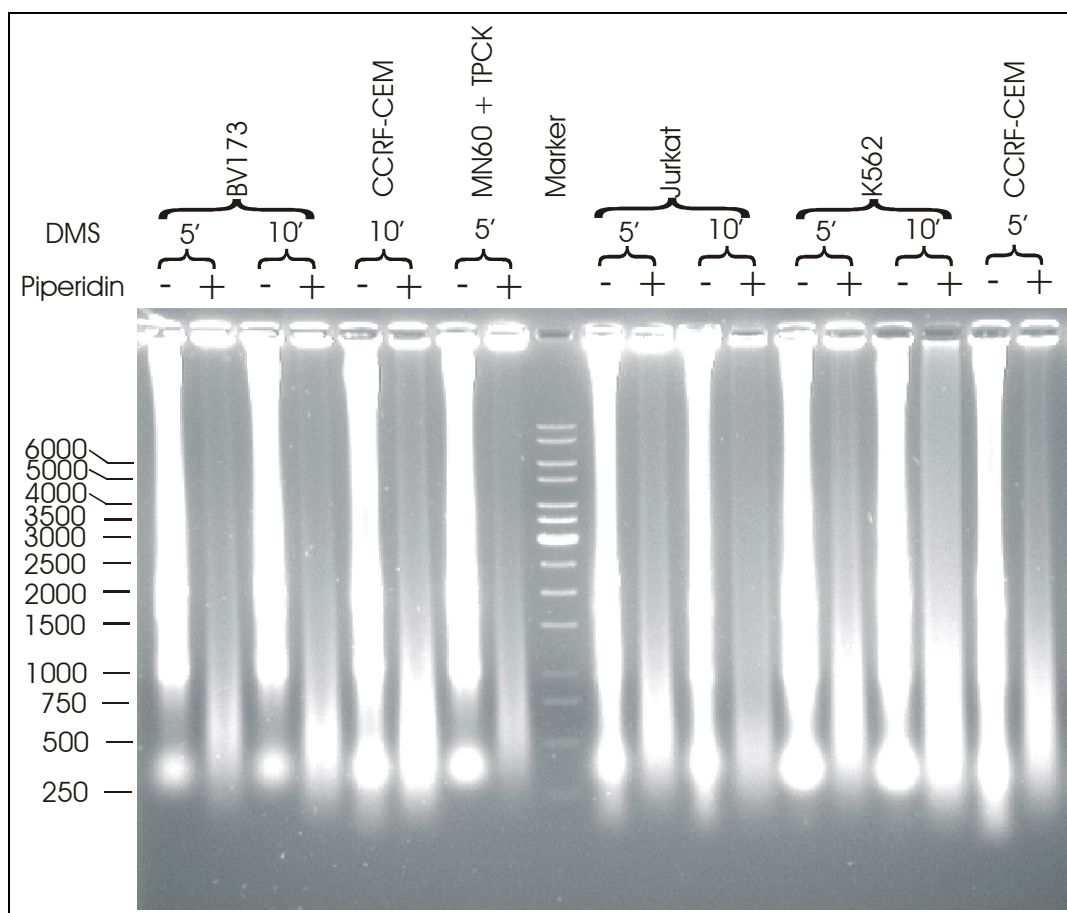


Abb. 31: Methylierung und Piperidinspaltung

Das Agarosegel zeigt die DNA vor (-) und nach (+) der Spaltung mit Piperidin. Die Zeitangaben in Minuten geben die Methylierungszeit mit DMS wieder. Die Größen der Markerfragmente sind links angegeben.

Außerdem wurde die Qualität der behandelten DNA auch über ein Sequenzgel geprüft. Dafür wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits getestetes Oligonukleotidset aus dem eigentlichen Enhancer HSS-3 verwendet (Abb. 32; Combriato und Klobeck, 2002). Es wurde zur Bestimmung der DNA-Qualität der Bereich der NF κ B-Bindungsstelle gewählt, da hier in reifen B-Zellen bereits eindeutig Footprints nachgewiesen wurden. Die Abbildung 32 zeigt eindeutig den Erfolg der partiellen DNA-Methylierung, da alle bereits identifizierten Footprints sichtbar sind.

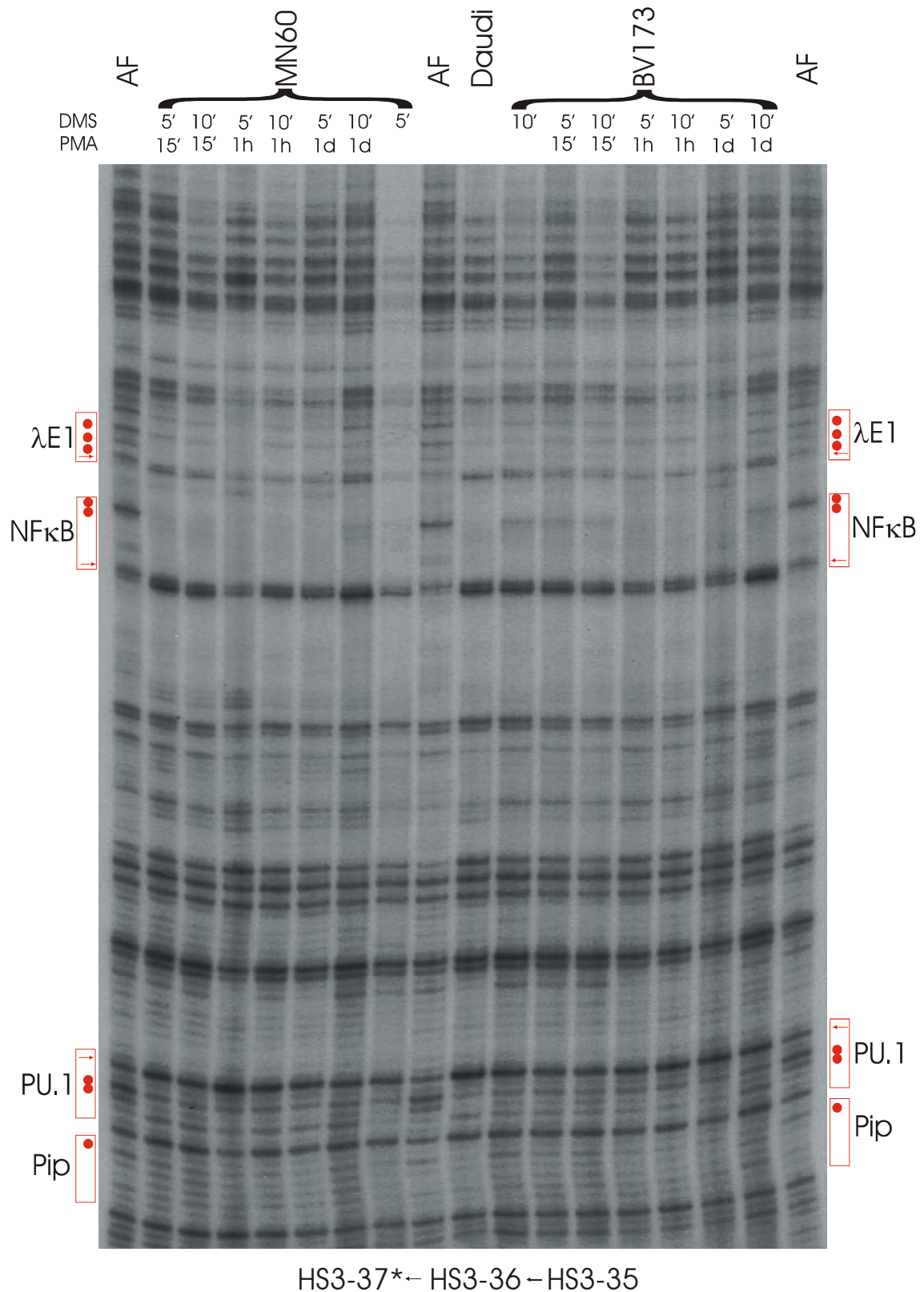


Abb. 32: Autoradiogramm zur Untersuchung der DNA-Qualität anhand des bereits getesteten Oligonukleotidsets HS3-35, -36 und -37*
 Die Einwirkzeiten von DMS und PMA auf die unterschiedlichen Zelllinien sind angegeben. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine und die Pfeile die verstärkt methylierten G-Reste. Die Boxen markieren die benannten Footprints (Combrinato und Klobeck, 2002). Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer.

Weiters läßt sich erkennen, daß die Stimulierung mit PMA funktioniert hat und verläßlich ist, da die NFκB-Stelle bei den reifen B-Zelllinien MN60 und Daudi und bei der Prä-B-Zelllinie BV173 vor Methylierung geschützt wurde. Bei BV173 wird der Schutz erst all-mählich nach einer PMA-Behandlungszeit von mehr als einer Stunde augenscheinlich. Dies läßt sich damit erklären, daß NFκB in der reifen B-Zelle konstitutiv aktiviert ist und daher der Footprint bei MN60 und Daudi auch ohne PMA sichtbar ist, jedoch in anderen Zellen im Zellkern nicht konstitutiv vorliegt, sondern induzierbar ist und deswegen der Footprint bei BV173 erst nach einer PMA-Stimulierung von mehr als einer Stunde zu erkennen ist.

4.2.4 Adaptierung der LMPCR-Methode für GC-reiche Regionen

Im Laufe der Versuche stellte sich heraus, daß bestimmte Regionen in HSS-2 beim Vorgehen nach dem Standardprotokoll für die LMPCR Probleme bereiteten, indem die Autoradiogramme aufgrund von Artefakten nicht auswertbar waren. So wurden Überlegungen unternommen, ob dieses Problem eventuell am hohen GC-Gehalt dieser Regionen liegen konnte. GC-Basen destabilisieren nämlich das System, sie bringen die Polymerasen zum „Stottern“ und führen somit zu Falscheinbauten. Außerdem verhindern viele Guanosine die Methylierungsreaktion und damit auch die Spaltung.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß die G- und C-Nukleotide im Nukleotidmix zu Ende gehen, was dazu führt, daß die Polymerase andere Nukleotide einbaut, wodurch Stränge nicht fertig synthetisiert werden und Nebenbanden entstehen können.

Schließlich wurde versucht, das Problem durch die Verwendung des GC-reichen PCR-Systems von Roche zu lösen. Das enthält nämlich die Resolution Solution, die das Aufschmelzen von GC-Basenpaaren durch die Erniedrigung des Schmelzpunkts erleichtert.

Entsprechend dem Protokoll wurde für den Amplifizierungsschritt der LMPCR und für die radioaktive Endmarkierung der mitgelieferte Enzymmix verwendet. Dieser setzt sich aus der von *Thermus aquaticus* stammenden, thermostabilen Taq-DNA-Polymerase und der Tgo-DNA-Polymerase, die auch thermostabil ist und Korrekturlesefunktion durch 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, zusammen. Gemeinsam führen sie zu einer besseren Qualität der PCR, indem sie die Spezifität erhöhen und die Ablesefehlerrate verringern. Da beide Polymerasen bereits bei niedriger Temperatur aktiv sind, wurden die Reaktionsansätze auf Eis pipettiert und erst in das PCR-Gerät gestellt, wenn dieses eine Temperatur von 95°C erreicht hatte (Warmstart). Das verhinderte ein Anlagern des

Primers bei niedriger Temperatur an eine nicht genau komplementäre Sequenz und als Folge eine unspezifische Amplifizierung der Fragmente.

Es stellte sich also heraus (Abb. 33), daß mit diesem System die Artefaktbildungen stark reduziert und dadurch wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Aus diesem Grund wurden alle bereits vorher untersuchten Bereiche noch einmal mit dem GC-reichen PCR-System überprüft.

Da dieses System für die Amplifizierung und Markierung eingesetzt wurde, war es nötig, die Temperaturen für alle dafür benötigten Oligonukleotide aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Enzymen und Puffern (Salzkonzentration) im Vergleich zur LMPCR-Methode nach dem Standardprotokoll neu zu bestimmen. Dazu wurden die Vorschriften zur LMPCR und des GC-reichen PCR-Systems befolgt, freie und ge-nomische DNA benutzt und immer die drei zusammengehörigen Oligonukleotide miteinander bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen im Amplifizierungs- und Markierungsschritt getestet.

Mit der Bestimmung der optimalen Primertemperaturen ging in beiden Schritten die Festlegung der benötigten Molaritäten der Resolution Solution einher (Abb. 34). So wurden die Konzentrationen der Resolution Solution (zwischen 0,5 und 2 M) im PCR-Ansatz und die Anlagerungstemperaturen variiert. Die Auswertung fand nach der radioaktiven Markierung über Sequenzgele statt.

Außerdem wurde untersucht, ob nur der Amplifizierungsschritt oder die radioaktive Markierung oder beide mit dem GC-reichen PCR-System durchgeführt werden sollten. Die Versuche erfolgten einerseits mit der AmpliTaqGold-DNA-Polymerase und andererseits mit dem Enzymmix aus dem System von Roche. Wie Abbildung 35 zeigt, wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn für beide Schritte das System von Roche verwendet wurde.

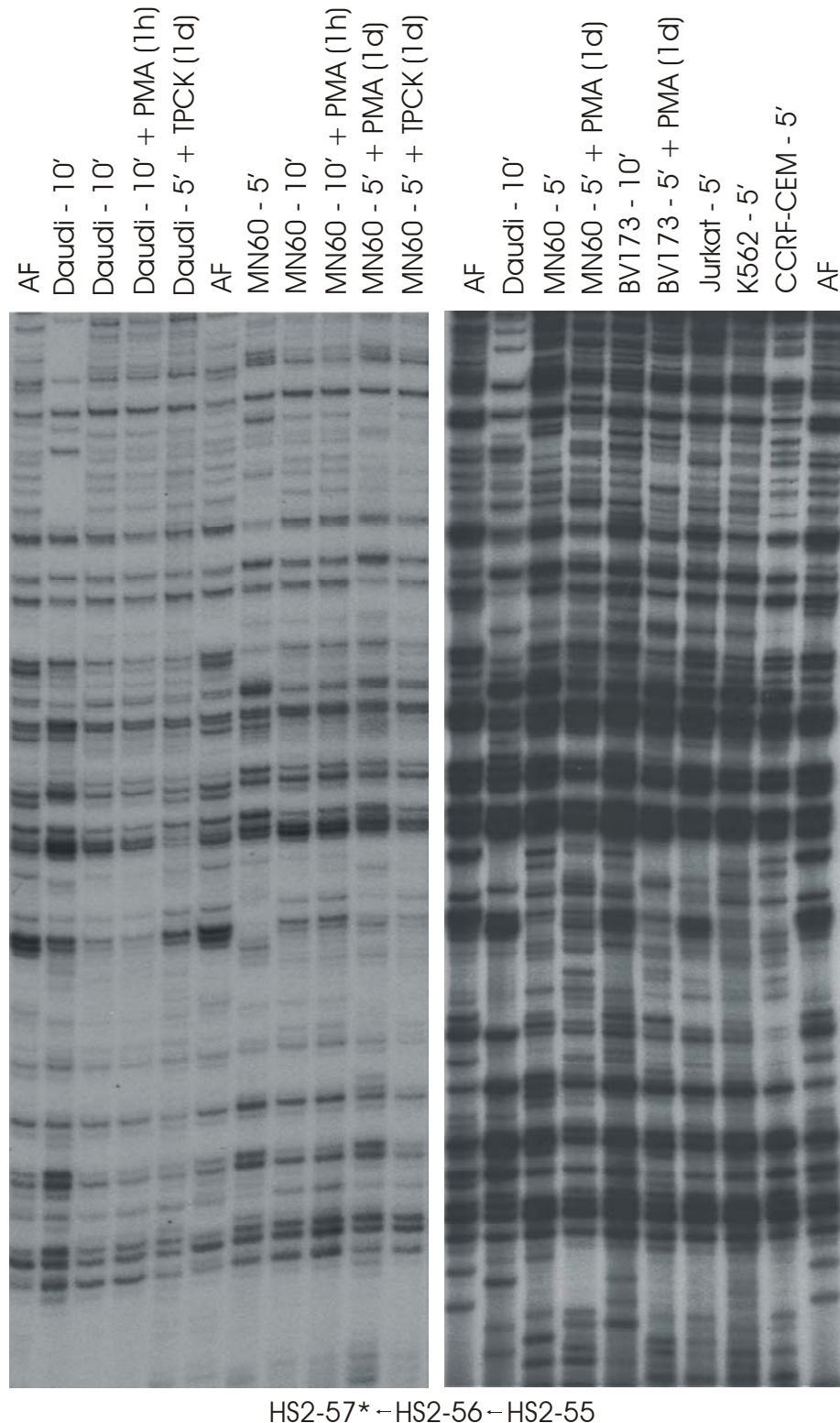
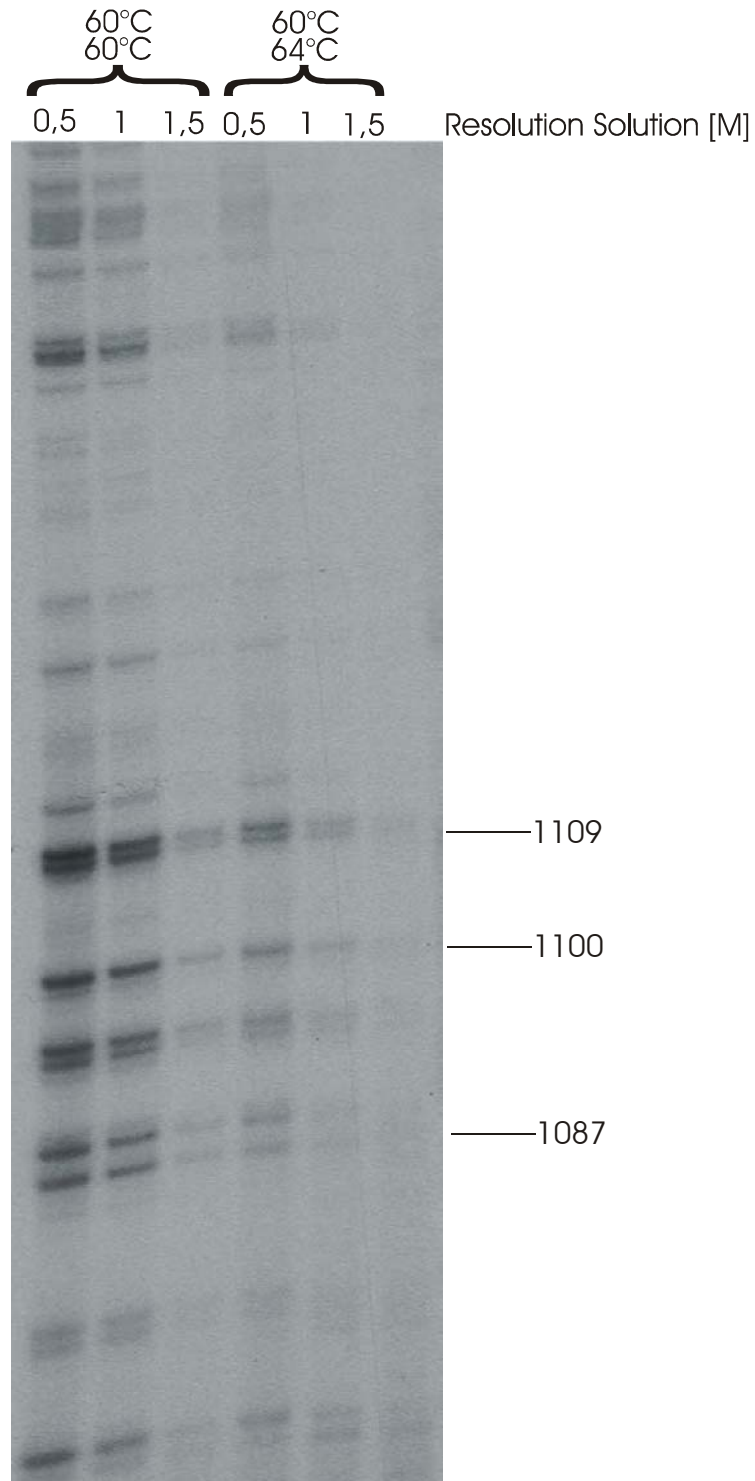


Abb. 33: Autoradiogramme des Oligonukleotidsets HS2-55, -56 und -57*

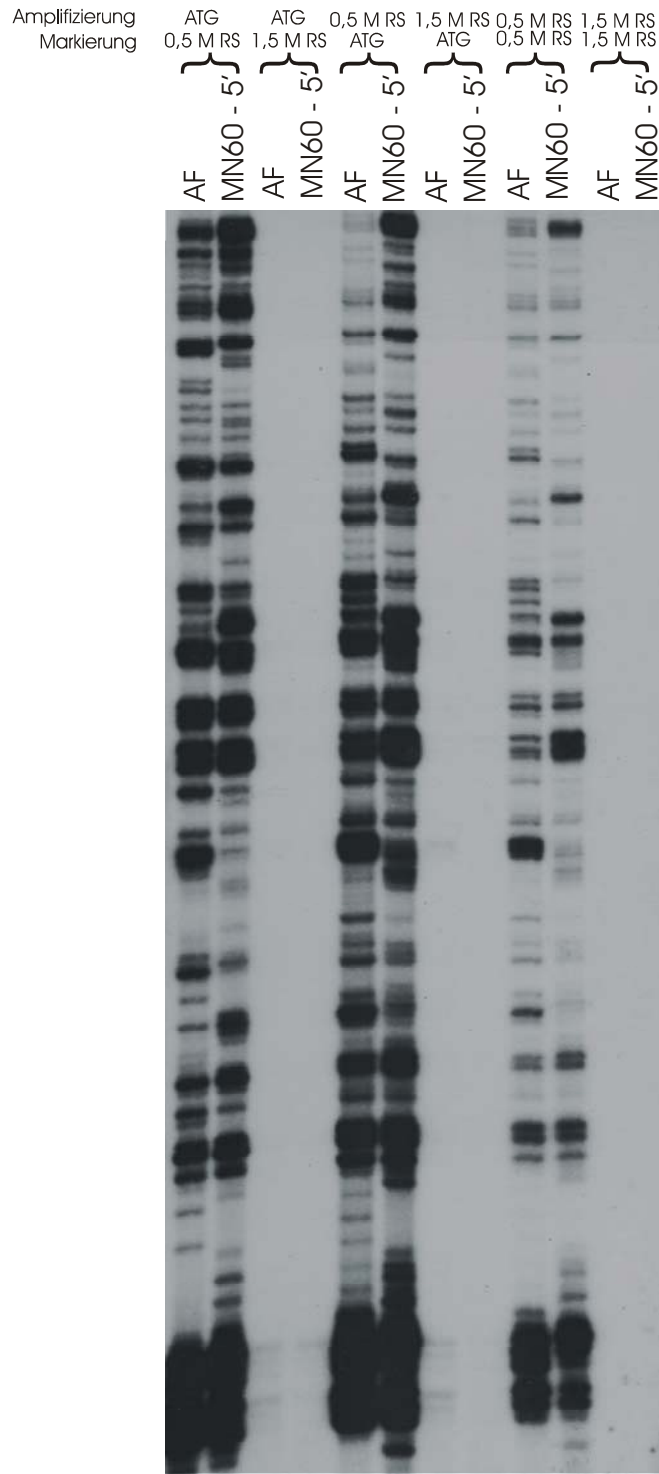
Das linke Autoradiogramm entstand mit Hilfe des GC-reichen PCR-Systems, das rechte nach dem Standardprotokoll. Die Einwirkzeiten von DMS und PMA auf die unterschiedlichen Zelllinien sind angegeben. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer.



HS2-40—HS2-1—HS2-41*

Abb. 34: Autoradiogramm zur Bestimmung der optimalen Primeranlagerungstemperaturen und Molaritäten der Resolution Solution für das GC-reiche System von Roche am Beispiel des Oligonukleotidsets HS2-40, -1 und -41*

Der Test erfolgte mit MN60 und den angegebenen Molaritäten (M) der Resolution Solution. Die obere Temperatur entspricht der Anlagerungstemperatur für den Amplifizierungsschritt, die untere gibt die bei der Markierung verwendete Temperatur wieder. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.



HS2-57* – HS2-56 – HS2-55

Abb. 35: Autoradiogramm zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für das GC-reiche System von Roche am Beispiel des Oligonukleotids HS2-55, -56 und -57*

Der Test erfolgte mit den angegebenen Molaritäten (M) der Resolution Solution und mit MN60 im Vergleich zur Plazenta DNA AF. Die DMS-Einwirkzeit ist in Minuten angegeben. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. ATG steht für die AmpliTaqGold-Polymerase und RS für die Resolution Solution aus dem GC-reichen PCR-System. Der Amplifizierungs- bzw. Markierungsschritt erfolgte entweder mit der AmpliTaqGold-Polymerase nach dem Standardprotokoll oder mit dem Enzymmix und der Resolution Solution nach dem GC-reichen PCR-Protokoll.

4.2.5 Auswertung der In-vivo-Footprintversuche und Analyse der Ergebnisse

4.2.5.1 Auswertung der In-vivo-Footprintversuche

Für die Experimente kamen sowohl jene Zelllinien, die HSS-2 enthalten (Daudi, MN60, BV173, K562 – nur schwach), als auch zu Vergleichszwecken solche, denen HSS-2 fehlt (Jurkat, CCRF-CEM), zum Einsatz.

Wie die Ergebnisse der transienten Transfektionsversuche (s. Kap. 4.1.3) zeigten, sind die für die Transkription wichtigen Bereiche in HSS-2 um die beiden NFκB-Bindungsstellen lokalisiert. Daher wurden mit Hilfe der In-vivo-Footprinting-Methode vor allem diese Regionen genauer untersucht.

Falls Transkriptionsfaktoren an die DNA gebunden sind, werden in diesem Bereich die Guanosine durch proteinvermittelte DNA-Strukturveränderungen mit größerer Wahrscheinlichkeit methyliert oder vor Methylierung und damit die DNA vor Spaltung mit Piperidin entweder vollständig oder teilweise geschützt. Dies läßt sich nach der LMPCR auf einem Autoradiogramm durch Vergleiche mit methylierter und dann gespaltener, freier DNA anhand einzelner verstärkter (in den folgenden Abbildungen mit Pfeilen gekennzeichnet) oder entweder fehlender oder abgeschwächter Banden (in den folgenden Abbildungen mit Punkten gekennzeichnet) erkennen.

Einzelne, in ihrer Intensität veränderte Banden, die sich nicht in unmittelbarer Umgebung von anderen solchen Banden befinden, werden als putative Proteinbindungsstellen außer Acht gelassen und in der folgenden Übersicht mit einem Fragezeichen versehen.

Alle Sequenzbereiche, die mehrere geschützte G-Reste beinhalten, werden als In-vivo-Footprints bezeichnet und als Boxen mit fortlaufenden Buchstaben (A bis H) dargestellt (Abb. 36a und b).

Flußaufwärts der NFκB-4-Stelle (Footprint C in Abb. 36a) liegen die zwei Footprints A und B. Zwischen A und B befindet sich ein einzelnes, vor Methylierung geschütztes Guanosin, und zwischen B und C treten drei einzelne, geschützte G-Reste auf. Nach C folgen in 3'-Richtung die Footprints D, E und F, wobei zwischen E und F wieder ein nicht methyliertes Guanosin alleine vorkommt. Alle diese Footprints sind auf einem Bereich von 200 Bp vorzufinden (Position 197-373 in Abb. 36a).

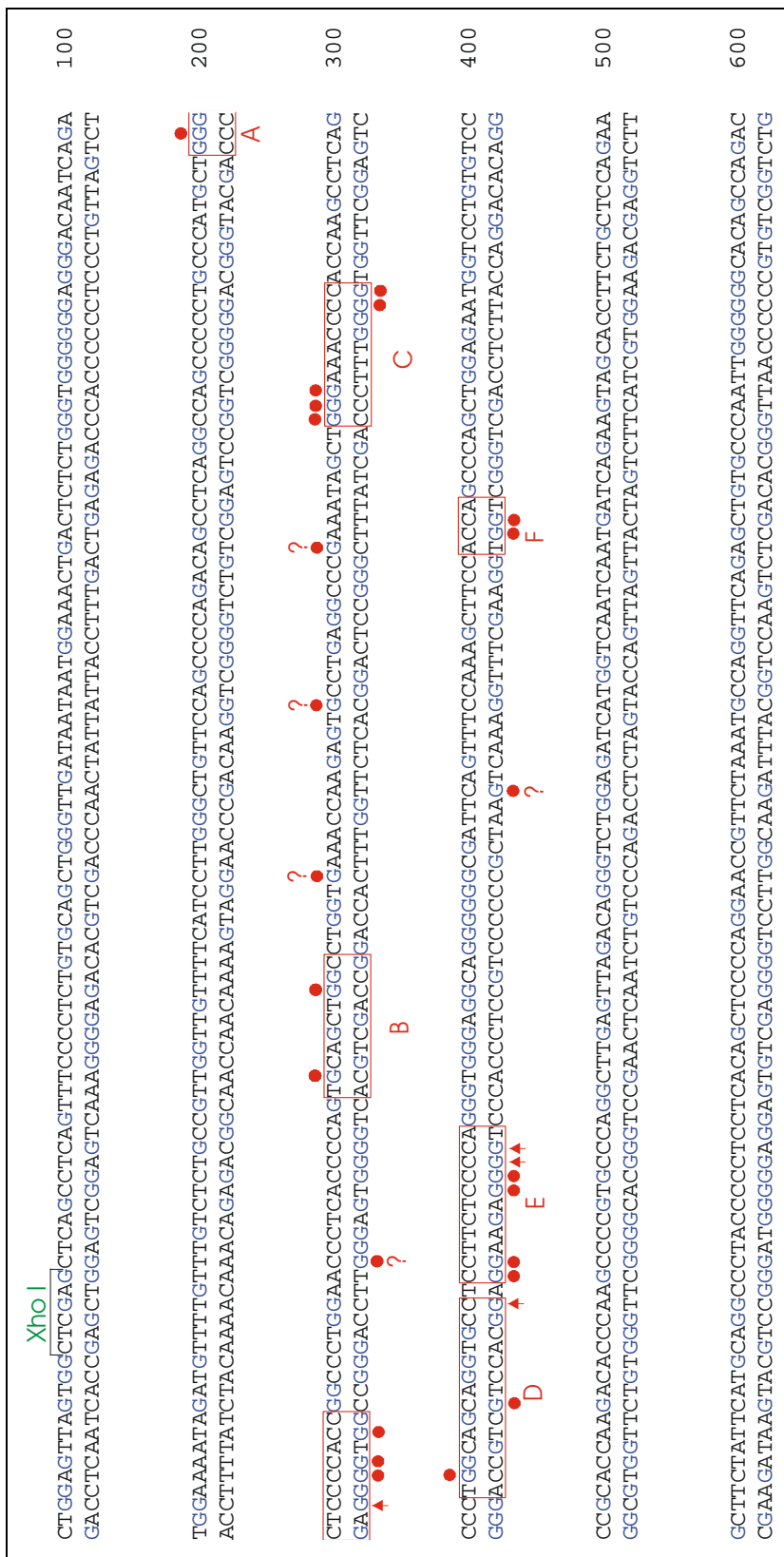


Abb. 36a: Footprints der HSS-2-Region

Die vor Methylierung geschützten Guanosine sind mit Punkten, die verstärkt methylierten G-Reste mit Pfeilen und die einzelnen, nicht methylierten Guanosine mit Fragezeichen gekennzeichnet. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints. Die XhoI-Spaltstelle ist angegeben.

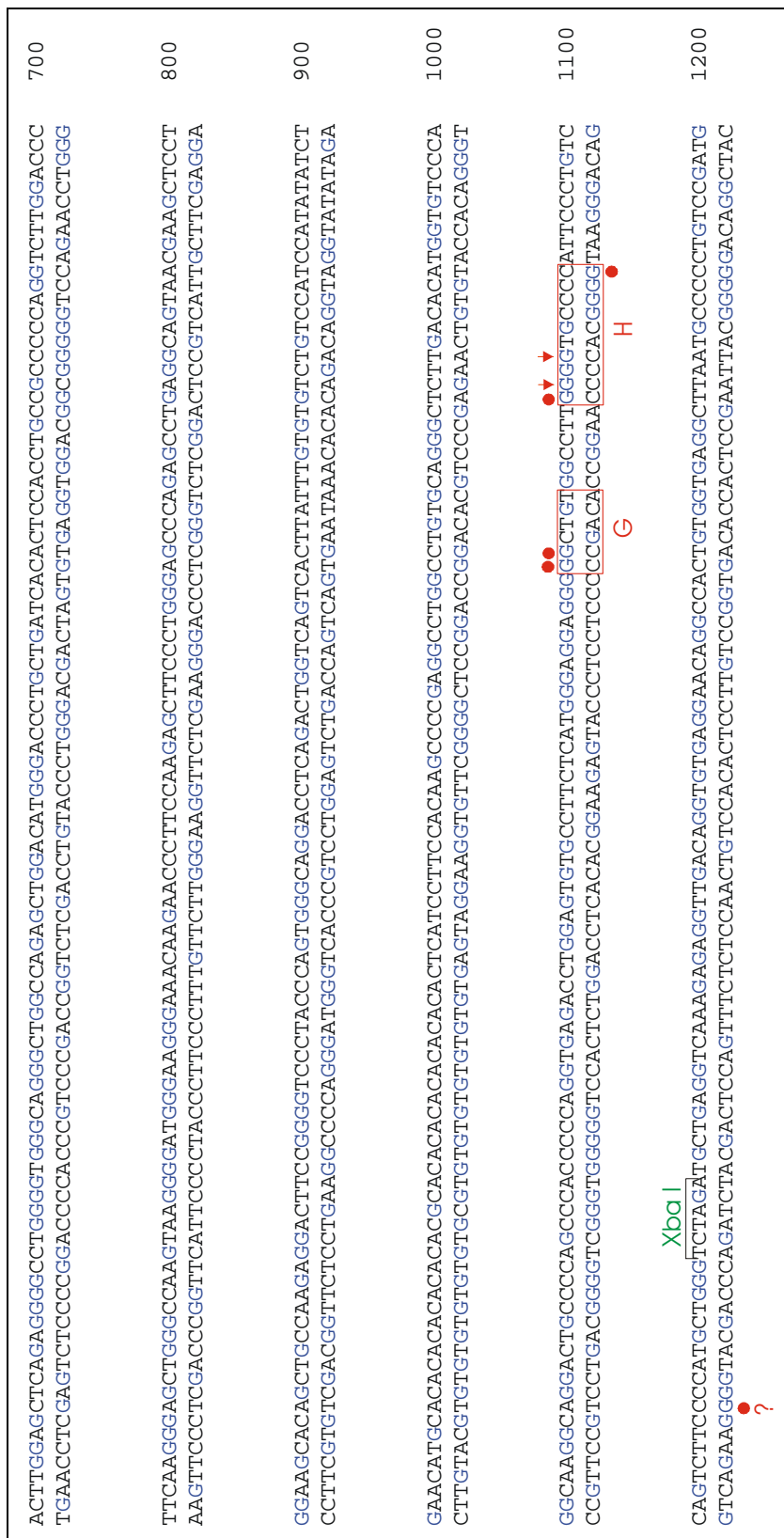


Abb. 36b: Footprints der HSS-2-Region

Die vor Methylierung geschützten Guanosine sind mit Punkten, die verstärkt methylierten G-Reste mit Pfeilen und die einzelnen, nicht methylierten Guanosine mit Fragezeichen gekennzeichnet. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints. Die XbaI-Spaltstelle ist angegeben.

Dann schließt sich eine Region von zirka 600 Basenpaaren an, die aufgrund repetitiver Sequenzen und nicht funktionierender Oligonukleotidsätze nur zum Teil untersucht wurde (Abb. 29). Dort konnten keine Hinweise auf Proteinbindungen gefunden werden. Darauf folgt ein aus etwa 100 Basenpaaren bestehender Bereich um die NFκB-5-Bindungsstelle (Footprint H) mit den Footprints G, H und einem nicht methylierten Guanosin (Abb. 36b).

Falls im Strang und Gegenstrang der Footprints Guanosine enthalten waren, konnten außer bei den Footprints B und G an beiden Strängen vor Methylierung geschützte Guanosine gefunden werden.

Die Abbildungen 37 bis 47 zeigen ausgewählte Autoradiogramme und werden im Folgenden näher beschrieben. Die dabei verwendeten Oligonukleotidsätze sind in Abbildung 29 dargestellt.

In den Abbildungen 37 und 38 lassen sich keine vor Methylierung geschützten Guanosine erkennen.

Wie die Abbildungen 39 und 40 (Gegenstrang und Strang) zeigen, kommt Footprint A in den reifen B-Zelllinien Daudi und MN60 und in den T-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat vor, jedoch nicht in der Prä-B-Zelllinie BV173 und myeloischen Zelllinie K562. Die Vorbehandlung der Zellen mit PMA (Daudi, MN60, BV173) und TPCK (Daudi, MN60) übt hier keinen Einfluß auf die Methylierungsintensität aus.

Der Schutz des einzeln vorkommenden Guanosins zwischen Footprint A und B ist bei Daudi, MN60, Jurkat, K562 und CCRF-CEM erkennbar (Abb. 39).

Footprint B (Abb. 40 und 41) liegt eindeutig in Daudi, MN60 und BV173 vor, allerdings nicht in Jurkat, K562 und CCRF-CEM.

Die drei folgenden, isoliert vorliegenden, nicht methylierten G-Reste treten in allen sechs getesteten Zelllinien auf, außer das erste Guanosin flußabwärts nicht in CCRF-CEM (Abb. 40 und 41).

Schließlich folgt Footprint C, der die NFκB-4-Bindungsstelle bildet, in Position 279 bis 288. Die Autoradiogramme von Strang und Gegenstrang sind in den Abbildungen 41 und 42 dargestellt. Im Vergleich zur Plazenta-DNA AF sind die Banden der drei Guanosine vom oberen Strang in ihrer Intensität in allen sechs Zelllinien stark abgeschwächt (Abb. 41).

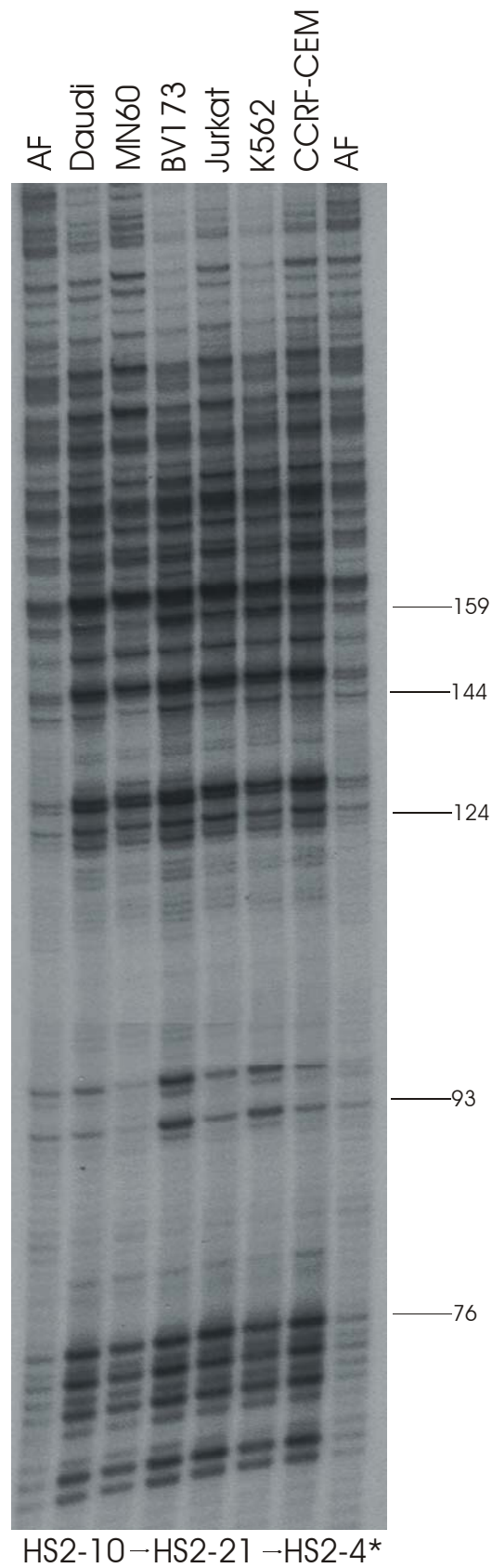


Abb. 37: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-10, -21 und -4*
Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.

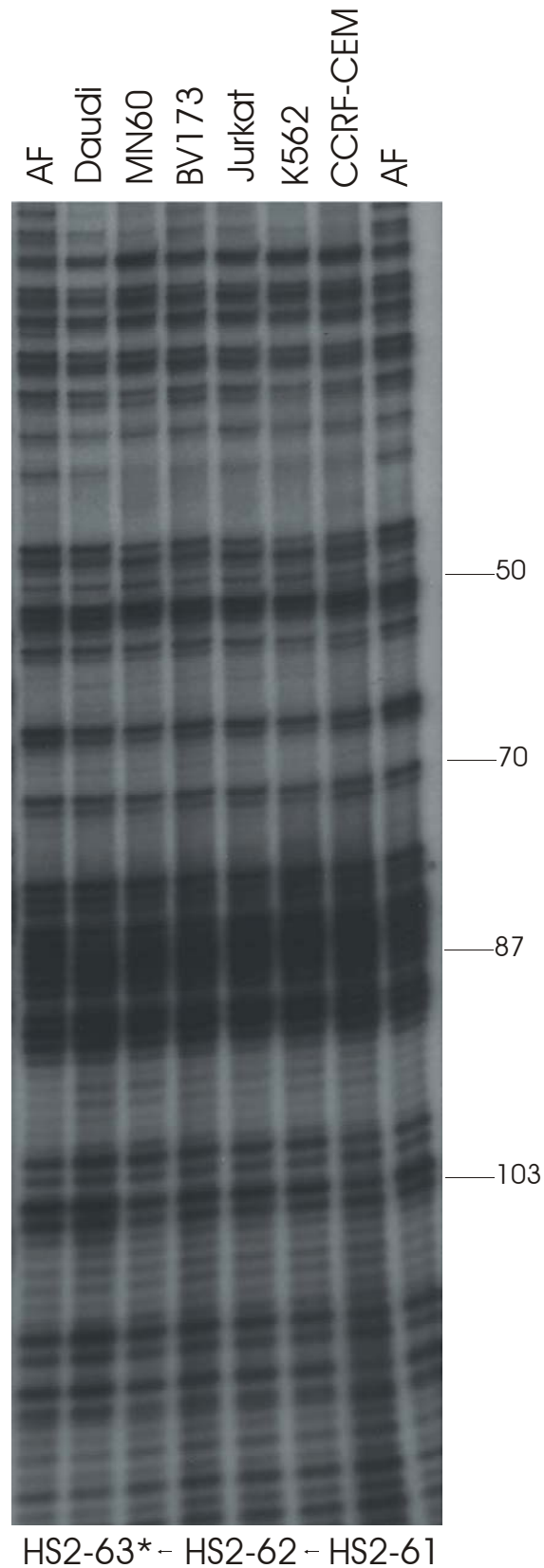


Abb. 38: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-61, -62 und -63*
Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.

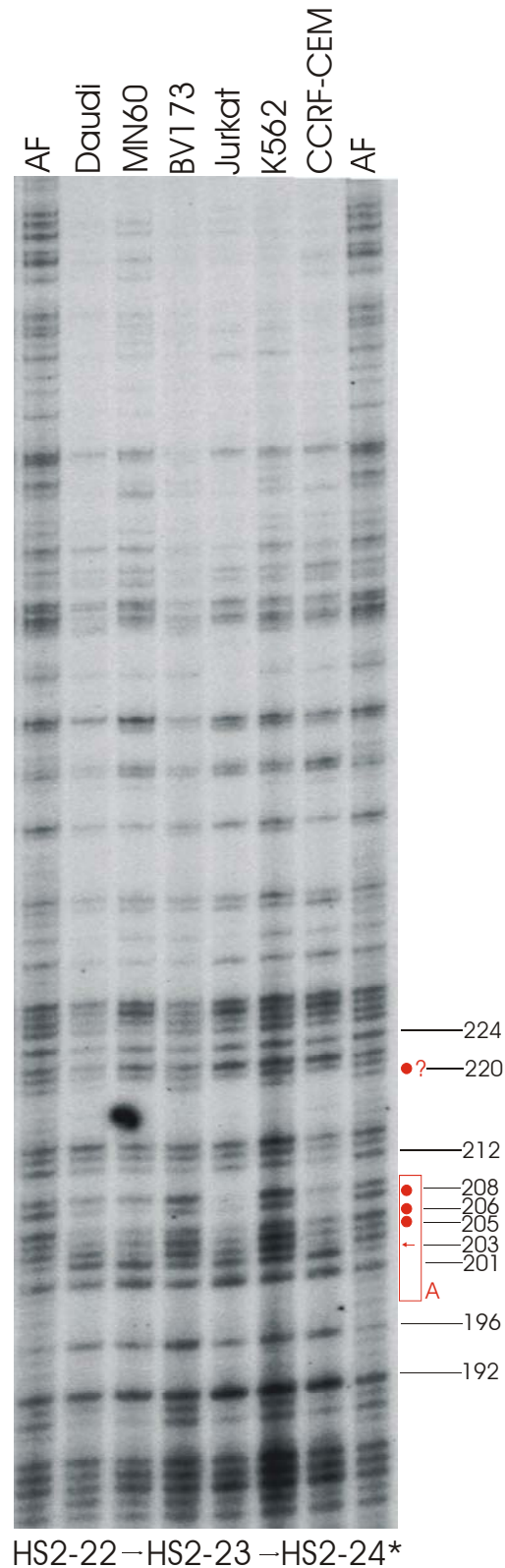
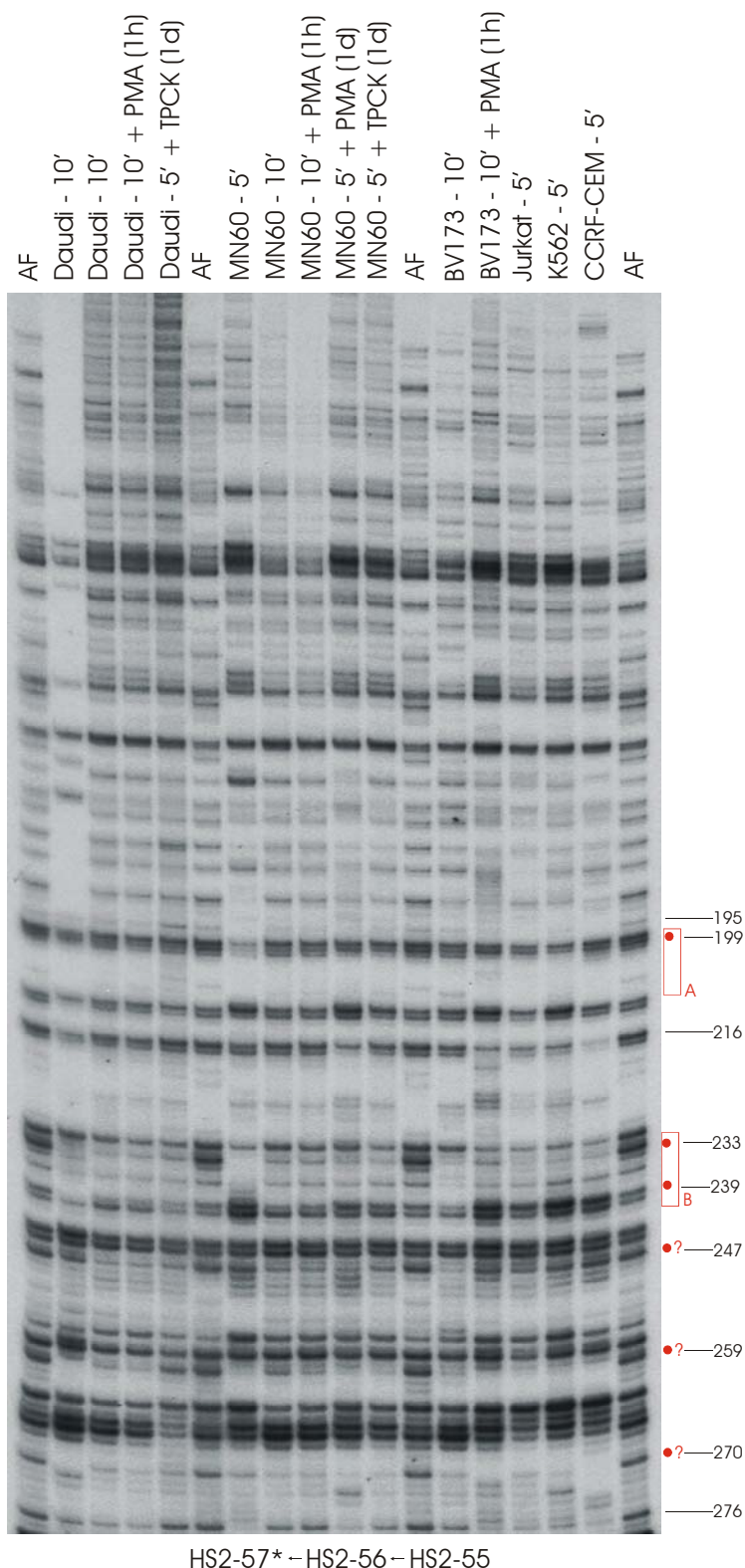
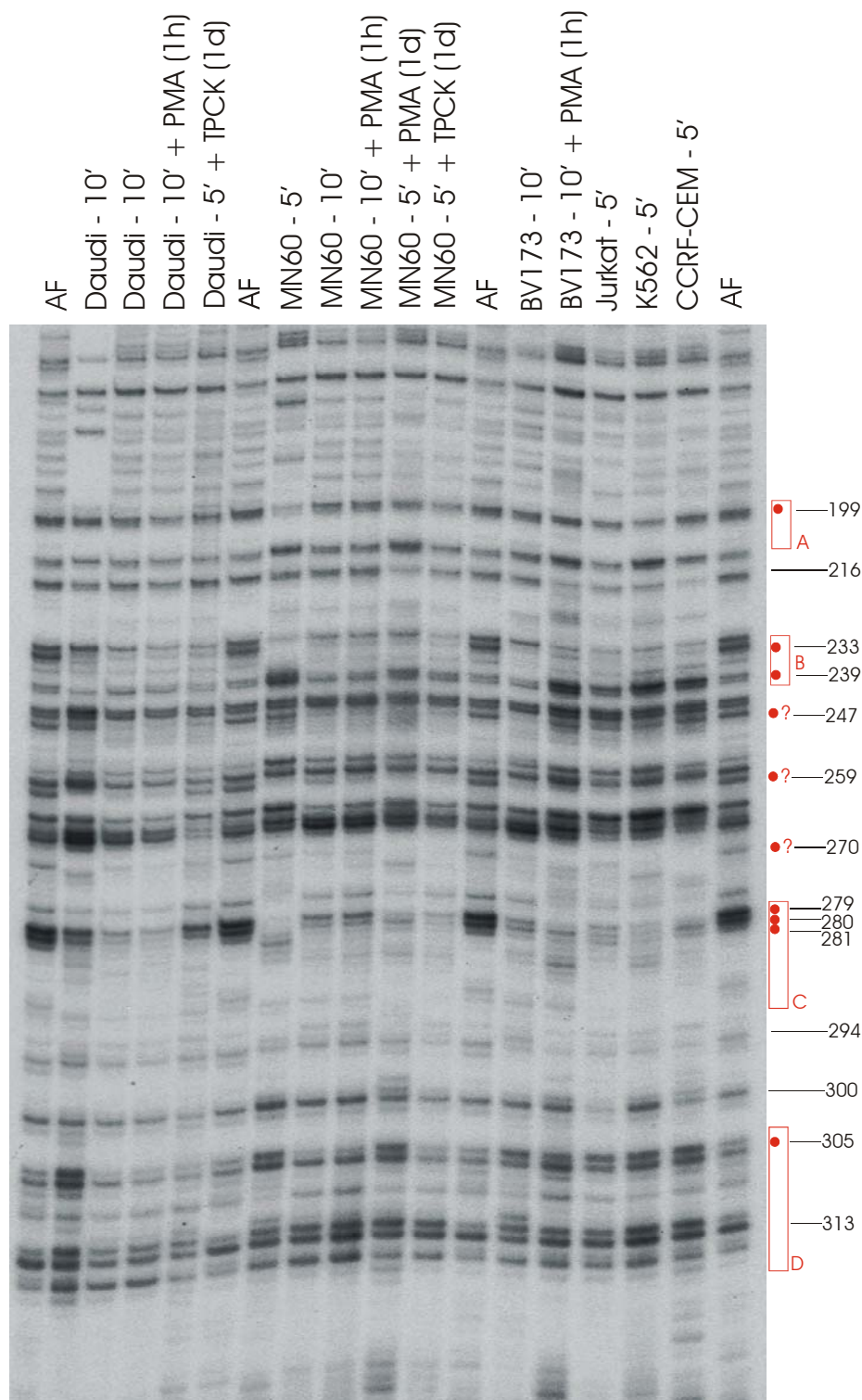


Abb. 39: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-22, -23 und -24*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine, die Pfeile die verstärkt methylierten G-Reste und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.



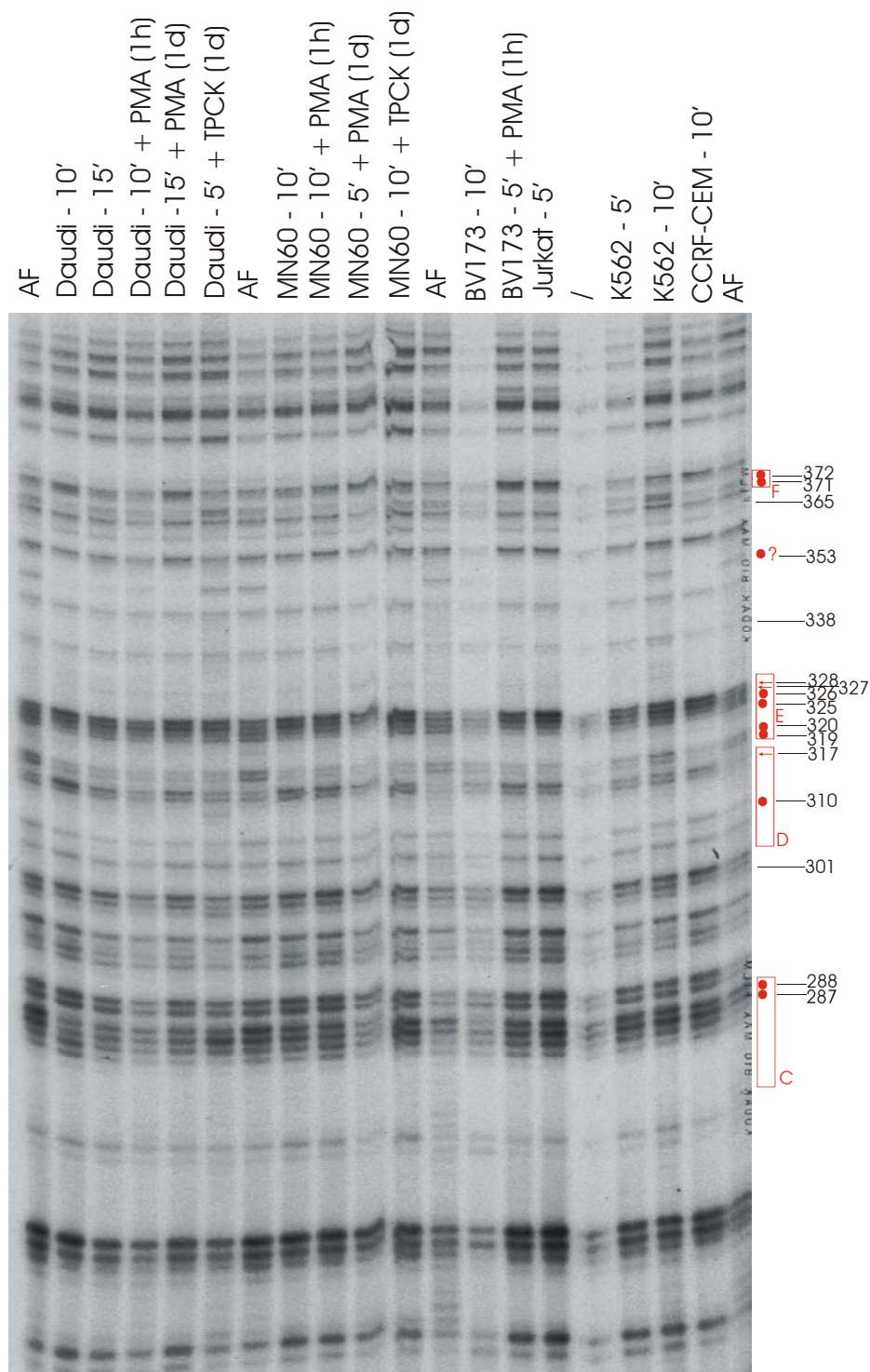
HS2-57* - HS2-56 - HS2-55

Abb. 40: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-55, -56 und -57*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.



HS2-57* – HS2-56 – HS2-55

Abb. 41: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-55, -56 und -57*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.



HS2-25 – HS2-26 – HS2-27*

Abb. 42: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-25, -26 und -27*

Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine, die Pfeile die verstärkt methylierten G-Reste und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.

Bei Daudi, MN60 und BV173 führt eine PMA-Behandlung zu einer noch größeren Abschwächung der Banden als ohne Vorbehandlung. Durch die TPCK-Stimulierung kann bei Daudi die Intensitätsabnahme verhindert werden. Abbildung 42 zeigt die vier G-Reste des Footprints C auf dem Gegenstrang, wobei die letzten beiden Guanosine fluß-aufwärts bei Daudi, MN60 und BV173 vor Methylierung geschützt sind, aber nicht bei Jurkat, K562 und CCRF-CEM. Es fällt auf, daß der Schutz bei Daudi und MN60 durch PMA verstärkt und durch TPCK vermindert wird.

Betrachtet man nun Footprint D, so läßt sich auf einem Strang (Abb. 41) ein Schutz eines Gs bei den Zelllinien Daudi und MN60 und auf dem Gegenstrang (Abb. 42 und Abb. 43) ein geschütztes und ein verstärkt methyliertes G bei Daudi, MN60 (bei beiden kann der Effekt durch TPCK-Behandlung aufgehoben werden) und BV173 erkennen.

Direkt auf Footprint D folgt Footprint E, der G-Reste nur im Gegenstrang (Abb. 42 und Abb. 43) enthält. Vier der Guanosine weisen bei Daudi, MN60, BV173, Jurkat und CCRF-CEM eine Abschwächung und zwei eine Verstärkung ihrer Banden auf.

In Position 353 (auf dem Gegenstrang) befindet sich ein einzelnes, vor Methylierung geschütztes G (Abb. 42 und Abb. 43) bei Daudi, MN60, BV173, Jurkat und CCRF-CEM.

Den letzten im 5'-Bereich von HSS-2 gefundenen Footprint stellt der Footprint F dar (Abb. 42 und Abb. 43). Er besteht aus zwei geschützten Guanosinen auf dem Gegenstrang, was bei Daudi, MN60, bei denen der Schutz durch TPCK-Behandlung verloren geht, BV173, Jurkat und CCRF-CEM erkennbar ist.

Es folgt ein langer Bereich ohne erkennbare Footprints (Abb. 44 und 45).

Im 3'-Bereich von HSS-2 liegt Footprint G mit zwei geschützten Guanosinen (Abb. 46), die in allen sechs untersuchten Zelllinien (Daudi, MN60, BV173, Jurkat, K562, CCRF-CEM) auffindbar sind.

Anschließend folgt Footprint H, der die NFκB-5-Bindungsstelle bildet und aus zwei geschützten und zwei verstärkt methylierten G-Resten besteht. In den Abbildungen 46 und 47 sind die Autoradiogramme von Strang und Gegenstrang dargestellt. Diese im Vergleich zur freien Plazenta-DNA AF veränderten Bandenintensitäten kommen in Daudi, MN60, BV173, Jurkat, K562 und CCRF-CEM vor und können durch PMA- oder TPCK-Behandlung nicht beeinflusst werden.

Kurz vor dem 3'-Ende von HSS-2 in Position 1109 tritt auf dem Gegenstrang ein einzelnes, geschütztes Guanosin bei Daudi, MN60 und CCRF-CEM auf (Abb. 47).

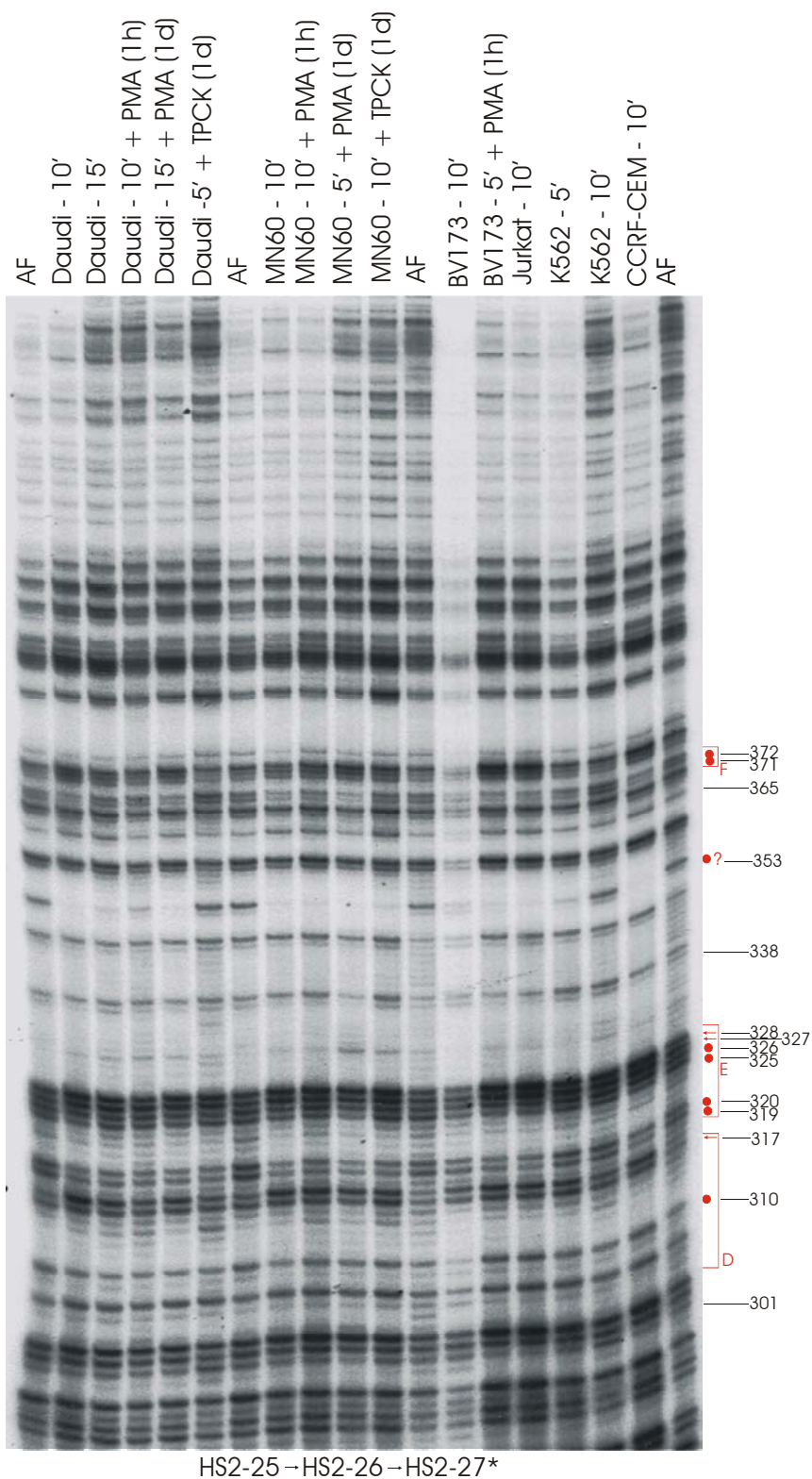


Abb. 43: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-25, -26 und -27*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine, die Pfeile die verstärkt methylierten G-Reste und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.

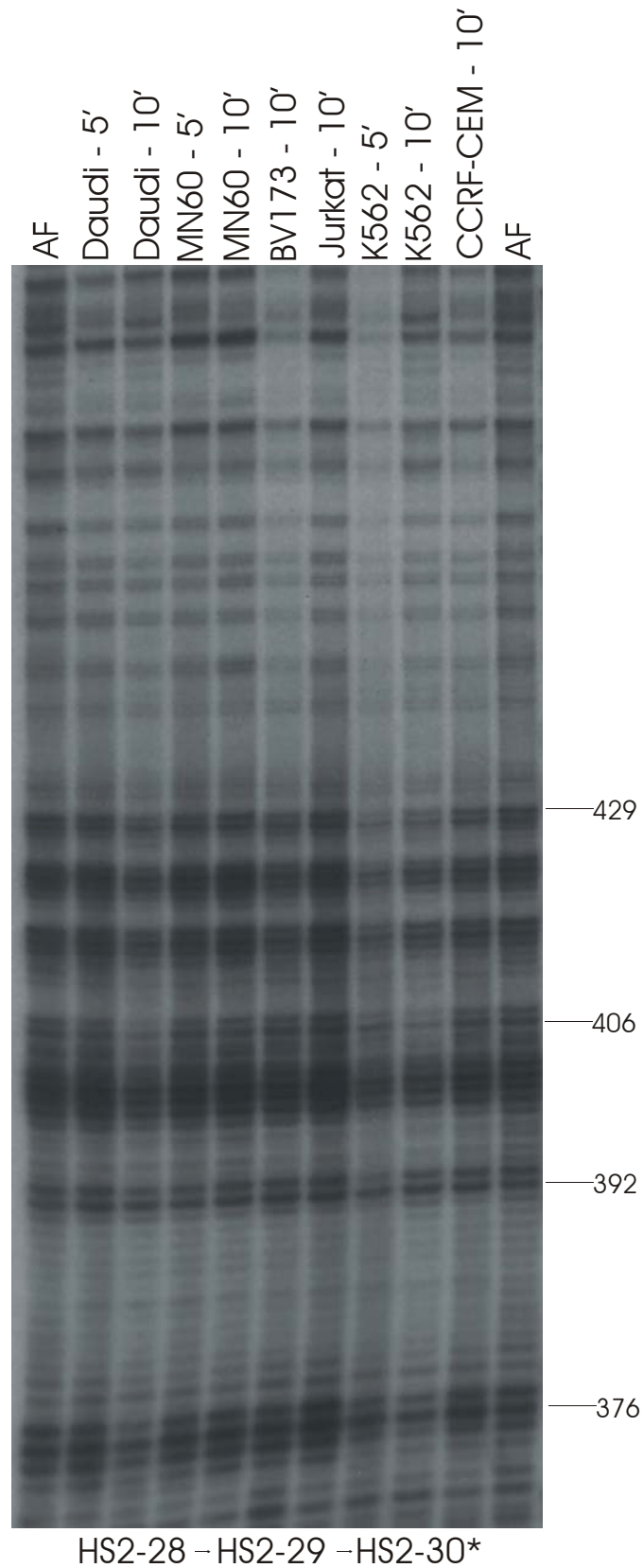


Abb. 44: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-28, -29 und -30*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien und der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.

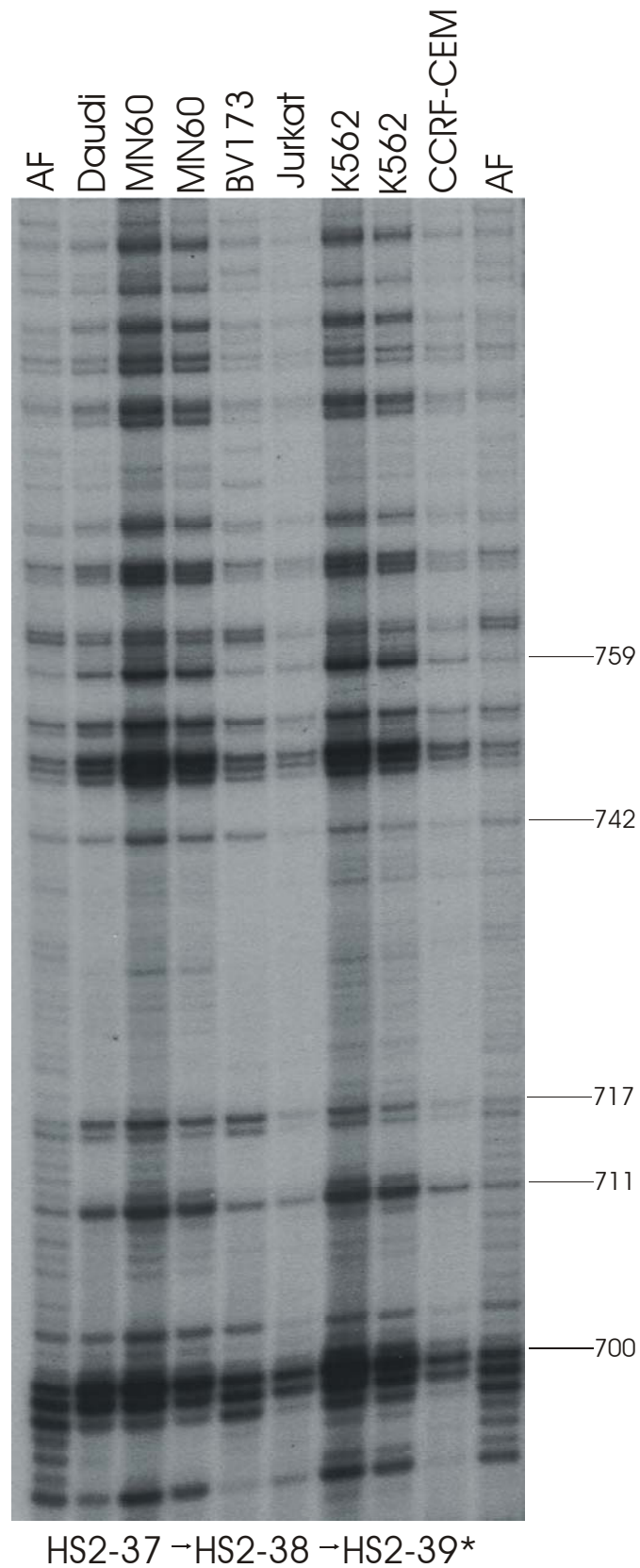
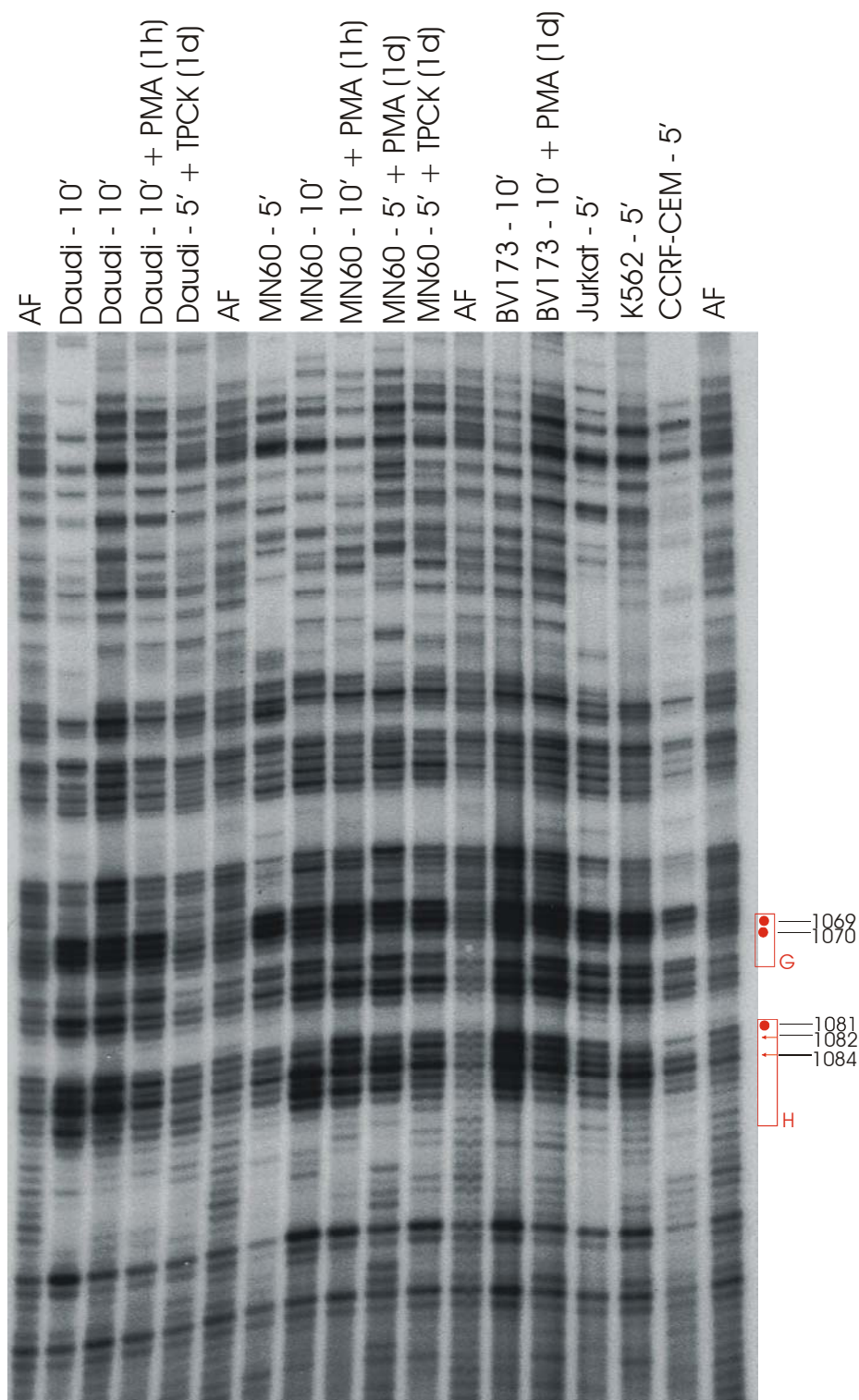
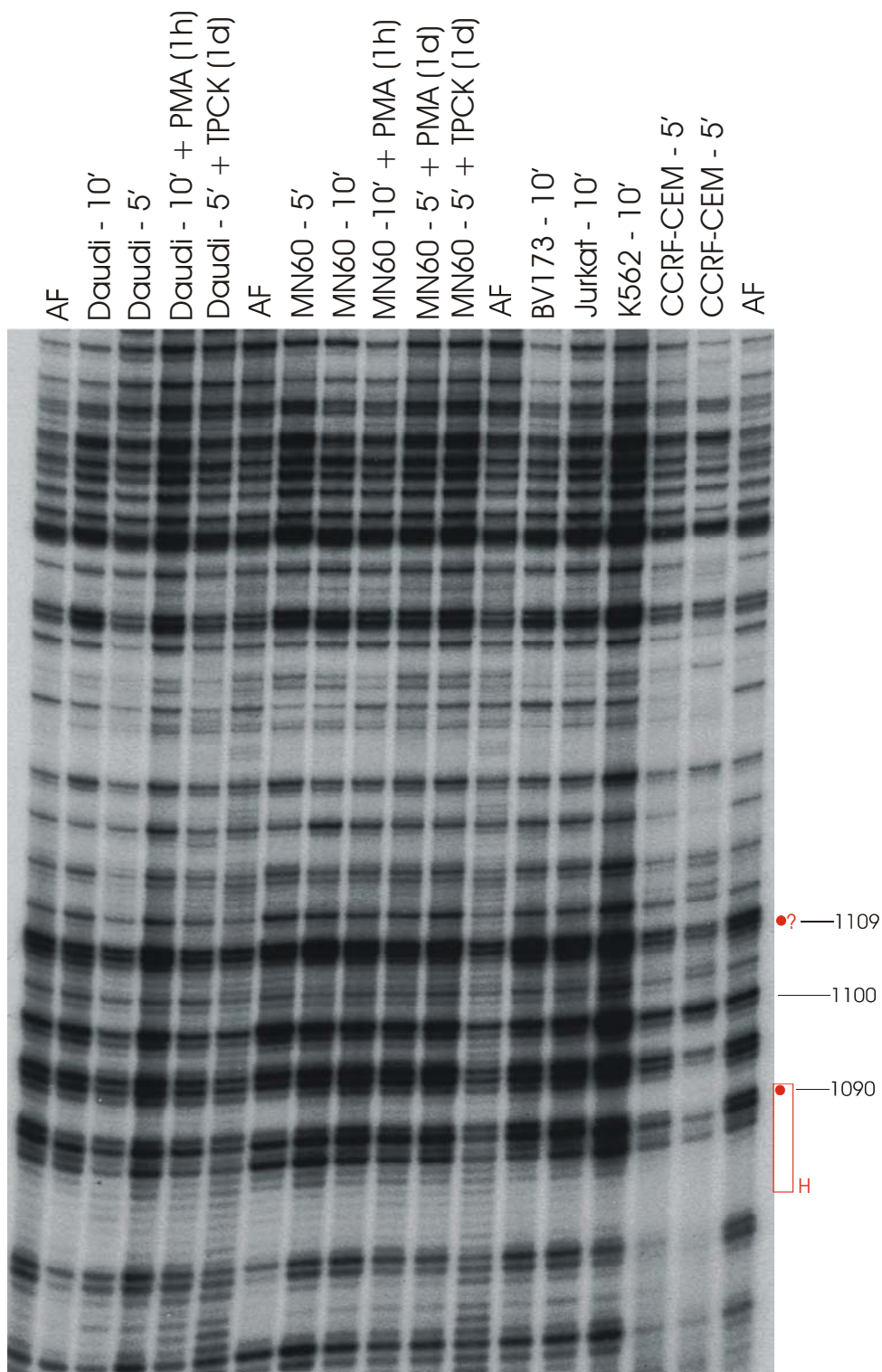


Abb. 45: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-37, -38 und -39*
 Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an.



HS2-11* -HS2-43 -HS2-42

Abb. 46: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-42, -43 und -11*
Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine und die Pfeile die verstärkt methylierten G-Reste. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.



HS2-40 → HS2-1 → HS2-41*

Abb. 47: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-40, -1 und -41*

Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Primer. Die einzelnen Bahnen sind mit den Namen der entsprechenden Zelllinien, der DMS-Einwirkzeit (in Minuten) und der Art und Dauer der Vorbehandlung (PMA, TPCK) versehen. AF steht für die freie Plazenta-DNA AF. Die Zahlen am rechten Rand geben die Positionen der Guanosine nach der HSS-2-Sequenz (Abb. 27) an. Die Punkte kennzeichnen die vor Methylierung geschützten Guanosine und die Fragezeichen die einzelnen, nicht methylierten Guanosine. Die Boxen markieren die mit Buchstaben bezeichneten Footprints.

4.2.5.2 Computerunterstützte Sequenzanalyse

Im Anschluß an die In-vivo-Footprinting-Versuche erfolgte eine computergestützte Suche nach Sequenzelementen in HSS-2, die Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren darstellen. Dazu wurde die Datenbank Transfac (Wingender et al., 2001) verwendet.

Die Ergebnisse aus dieser Suche wurden mit denen der Versuche verglichen, was in den Abbildungen 48a und b zusammengefaßt ist. Hier scheinen die mittels Transfac gefundenen Bindungselemente als Boxen, die mit dem abgekürzten Namen des bindenden Transkriptionsfaktors gekennzeichnet wurden, auf.

Zu den meisten Footprints, die in den Experimenten entdeckt wurden, passen Proteinbindungsstellen, die aus der Sequenzanalyse hervorgingen. So konnten Footprint A die Transkriptionsfaktoren Ikaros-2 und MZF-1, Footprint B AP-4 und E47, Footprint C NF κ B, Footprint D AP-4, NF-1, E47, LMO2 und Δ EF1, Footprint E Ikaros-2 und MZF-1 und Footprint H NF κ B zugeordnet werden. Für Footprint F und G zeigte die Sequenzanalyse keine Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren auf. Das einzeln auftretende, vor Methylierung geschützte Guanosin zwischen Footprint E und F liegt in der Bindungssequenz der Faktoren NF-AT und Gfi-1 und das nach Footprint H in der von Ikaros-1, -2 und MZF-1.

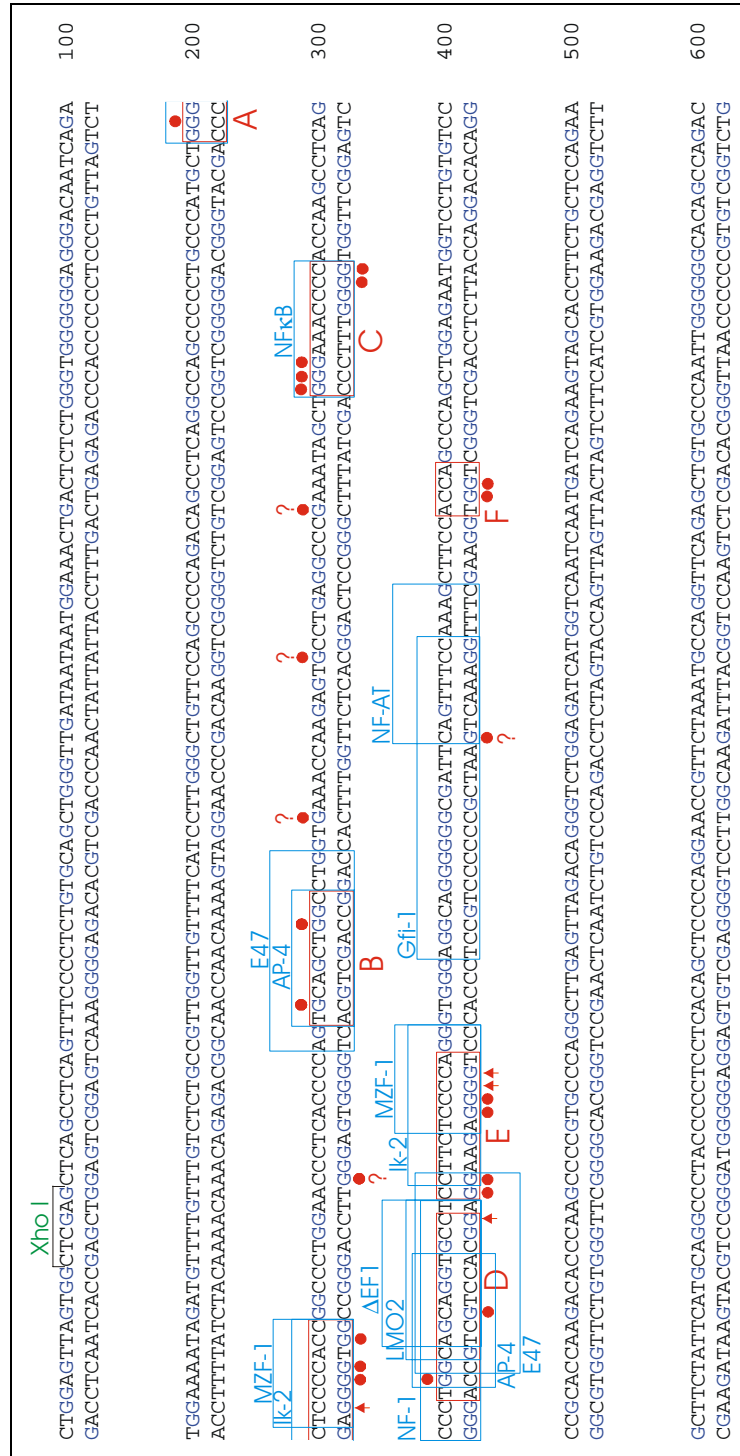


Abb. 48a: Vergleich der Ergebnisse aus den In-vivo-Footprintversuchen mit denen der computerunterstützten Sequenzanalyse in HSS-2

Die vor Methylierung geschützten Guanosine sind mit Punkten, die verstärkt methylierten G-Reste mit Pfeilen und die einzelnen, nicht methylierten Guanosine mit Fragezeichen gekennzeichnet. Die mit Buchstaben markierten Boxen zeigen die gefundenen Footprints aus den In-vivo-Footprintversuchen und die mit den Namen von Transkriptionsfaktoren versehenen Boxen die gefundenen Bindungsstellen von bekannten Faktoren aus der computerunterstützten Sequenzanalyse. Die XhoI-Spaltstelle ist angegeben.

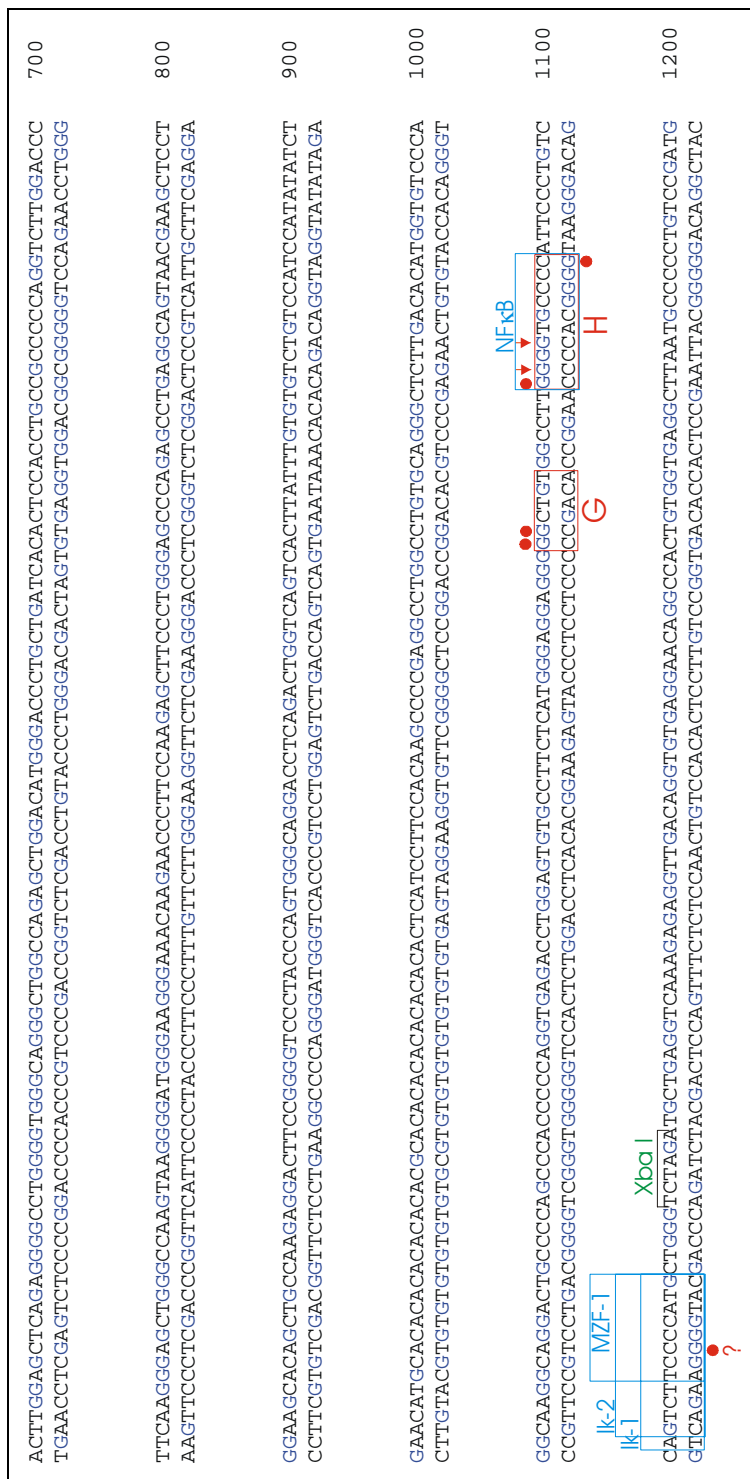


Abb. 48b: Vergleich der Ergebnisse aus den In-vivo-Footprintversuchen mit denen der computerunterstützten Sequenzanalyse in HSS-2

Die vor Methylierung geschützten Guanosine sind mit Punkten, die verstärkt methylierten G-Reste mit Pfeilen und die einzelnen, nicht methylierten Guanosine mit Fragezeichen gekennzeichnet. Die mit Buchstaben markierten Boxen zeigen die gefundenen Footprints aus den In-vivo-Footprintversuchen und die mit den Namen von Transkriptionsfaktoren versehenen Boxen die gefundenen Bindungsstellen von bekannten Faktoren aus der computerunterstützten Sequenzanalyse. Die XbaI-Spalststelle ist angegeben.

5 Diskussion

5.1 Die verschiedenen Methoden zur genaueren Eingrenzung und Charakterisierung von HSS-2

Das Chromatin stellt eine Barriere für alle Regulations- und Transkriptionsvorgänge dar. Damit eine Transkription bestimmter Genloci erfolgen kann, muß eine offene, aufgelockerte Chromatinstruktur vorliegen, an die transkriptionsregulierende Proteine binden können. Voraussetzung für die Öffnung des Chromatins ist die Bindung eines sequenzspezifischen Masterfaktors. Erst dann wird eine bestimmte Region hypersensitiv, und erst dann können weitere Faktoren binden.

Es gibt verschiedene Faktoren, die das Chromatin in einen aktiven Zustand überführen. Solche chromatinverändernde Faktoren können histonmodifizierende Eigenschaften, wie eine Histonacetylierungsaktivität, besitzen, oder ATP-abhängige „remodeling“-Komplexe, wie SWI/SNF, sein, die zur Verschiebung von Nukleosomen führen (Gregory und Hörz, 1998; Lee und Young, 2000).

Trotz des Humangenomprojekts (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter, 2001), bei dem das gesamte menschliche Genom entschlüsselt wurde, können keine verlässlichen Aussagen über wichtige regulative DNA-Abschnitte getroffen werden, da die Sequenz keine Informationen über den Zustand des Chromatins und damit der Zugänglichkeit der DNA liefert.

Um mehr über die Zugänglichkeit bestimmter Genabschnitte zu erfahren, was Voraussetzung für das Verständnis der Funktion regulatorischer Elemente, wie Enhancer, Silencer, Rekombinationssignalsequenzen und synergistische Bereiche, ist, und um diese Motive in der Umgebung von Genen identifizieren und charakterisieren zu können, sind verschiedene Schritte erforderlich.

Mit Hilfe der DNase I, die die DNA in zugänglichen Bereichen (mit offener Chromatinstruktur) spaltet, können aktive Bereiche sichtbar gemacht werden. Aktives Chromatin wiederum ist ein Hinweis darauf, daß es sich um eine funktionell wichtige Region handelt, in der regulatorische Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) binden können.

Mit direkten Tests, wie der transienten Transfektion, können zwar Promotoren, Enhancer, Silencer usw., jedoch keine synergistischen Elemente gefunden werden. Dies gelingt nur mit Hilfe der DNase I, die das Aufspüren und grobe Lokalisieren von synergistischen Bereichen über die Hypersensitivität ermöglicht.

Die genauere Eingrenzung der gefundenen Regionen kann dann über die transiente Transfektion erfolgen.

Um dort mögliche Proteinbindungsstellen aufzuspüren, wird die In-vivo-Footprinting-Methode eingesetzt.

In der Arbeitsgruppe wurden DNase I-Hypersensitivitätsversuche durchgeführt (Asenbauer, 1996; Asenbauer et al., 1999), um den menschlichen $Ig\lambda$ -Locus auf wichtige Sequenzabschnitte hin zu untersuchen.

So konnten bei der Kartierung des humanen λ -Locus die DNase I-hypersensitiven Bereiche HSS-1, -2 und -3 identifiziert werden. Diese drei Regionen bilden gemeinsam einen sehr starken, gewebsspezifischen Enhancer, der 3' von den $C\lambda$ -Genen liegt und wichtige Vorgänge wie die V(D)J-Umlagerung, Transkription und somatische Hypermutation kontrolliert.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war schließlich die nähere Charakterisierung von HSS-2. Dieser hypersensitive Bereich kommt nur in B-Zellen vor und besitzt alleine keine Enhanceraktivität, wirkt allerdings zusammen mit HSS-1 synergistisch auf das $Ig\lambda$ -Enhancerelement HSS-3 (Asenbauer et al., 1999). HSS-2 konnte aus technischen Gründen im Zusammenhang mit repetitiven Sequenzen bisher nicht genauer als auf zirka 1000 Basenpaare eingegrenzt werden.

Um nun die für die synergistische Wirkung wichtigen Bereiche in HSS-2 zu ermitteln, wurden transiente Transfektionsversuche mit Luciferasereportergeräten durchgeführt. Allerdings sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln, da das vorliegende Chromatin unter den Versuchsbedingungen nicht der In-vivo-Situation entspricht. Außerdem unterliegen die Versuchsdaten deutlichen Schwankungen durch Unterschiede in der Zelldichte und auch in der Dauer der Zellwachstumsphase zwischen der Elektroporation und der Enzymmessung. Geringe Aktivitätsveränderungen können daher nur schwer erkannt werden.

Aus diesen Gründen liefern die transienten Transfektionsexperimente zum Teil zu ungenaue Ergebnisse, um die Transkriptionsregulation von Genen zu untersuchen. Die Methode dient aber einerseits zum ersten Festlegen wichtiger Sequenzbereiche und andererseits zur Bestätigung bereits erhaltener Daten.

Anschließend wurde die HSS-2-Region mit Hilfe von In-vivo-Footprinting-Versuchen auf mögliche Proteinbindungsstellen hin untersucht.

Der Vorteil von In-vivo-Experimenten ist, daß der tatsächlichen Situation in der lebenden Zelle entsprechende, realistische Aussagen über Proteinbindungen gemacht und in der Folge Schlüsse über die Transkriptionskontrolle gezogen werden können. Außerdem wird im Gegensatz zu Chromatinstudien sehr wenig DNA benötigt.

Die In-vivo-Footprinting-Methode erweist sich als sehr verlässlich, da keine falsch-positiven Ergebnisse erhalten werden können. Es werden nämlich nur Stellen detektiert, an denen der DNA-Strang nicht gespalten wurde, das heißt, an denen keine Methylierung stattgefunden hat. Da die Transkription eines Gens einem dynamischen Prozeß unterliegt, bei dem sich die Proteinbedeckung der DNA laufend ändert, sind entsprechende Transkriptionsfaktoren während der Methylierung nur in einem Teil der Zellen an die DNA gebunden. Daher werden nicht alle Guanosine innerhalb eines Footprints vor Methylierung geschützt. Zudem kann ein Schutz der Guanosine bei Bindung eines Proteins nicht immer auf beiden Strängen festgestellt werden, das heißt, daß ein Footprint oft nur auf einem Strang gefunden wird. Die Ursache dafür liegt in der räumlichen Struktur des DNA-Protein-Komplexes und in der Art der Bindungsmotive des Transkriptionsfaktors (Helix-Loop-Helix, Zink-Finger, Leucin-Zipper, ...).

Im Anschluß an diese In-vivo-Footprinting-Versuche wurde die HSS-2-Sequenz mit der Datenbank Transfac (Wingender et al., 2001) nach proteinbindenden Sequenzelementen abgesucht. Dabei konnten den meisten entdeckten Footprints Faktoren zugeordnet werden. Natürlich wurden bei der Sequenzanalyse auch Bindungsstellen gefunden, für die in den In-vivo-Footprinting-Experimenten keine Proteinbedeckung nachzuweisen war. Diese wurden jedoch aufgrund der Überlegenheit des experimentellen Ansatzes ausgeschlossen. Gelretentionsanalysen mit Antikörpern („electrophoretic mobility shift assay“) könnten zwar die Proteinbindungen bestätigen, würden aber nicht unbedingt die In-vivo-Situation widerspiegeln. Dies wäre nur durch In-vivo-Crosslinking-Versuche mit spezifischen Antikörpern möglich. Allerdings sind diese Experimente sehr aufwendig, da ver-

schiedene Antikörper benötigt werden. Der Einsatz dieser Methode lohnt sich nur zum Nachweis sehr wichtiger Faktoren und Bindungsstellen.

5.2 Interpretation der Versuchsergebnisse

5.2.1 Hinweise auf wichtige Bereiche in HSS-2 durch transiente Transfektion

Durch die Deletion von HSS-2 (zwischen der XhoI- und BglII-Spaltstelle; s. Abb. 18), die zu einer starken Aktivitätsminderung führte, konnte die Wichtigkeit dieser DNase I-hypersensitiven Region für den Synergismus auf den Ig λ -Enhancer HSS-3 nachgewiesen werden.

Ein weiterer Versuch (s. Abb. 25) mit Konstrukten, in denen sowohl HSS-1 als auch HSS-2 deletiert wurden, verdeutlichte die synergistisch transkriptionssteigernde Wirkung der beiden DNase I-hypersensitiven Bereiche.

Durch die Verwendung von schrittweisen HSS-2-Deletionskonstrukten (5'- bzw. 3'-Bereich von HSS-2; s. Abb. 18) stellte sich heraus, daß vor allem die 5'-Region von HSS-2 für die Transkriptionskontrolle eine wichtige Rolle spielt.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß den NF κ B-Bindungsstellen eine sehr wichtige Aufgabe in der Regulation der Genexpression im menschlichen Ig λ -Locus zukommt. Dazu wurde bei allen Deletionskonstrukten die NF κ B-5-Stelle mutiert. Dann erfolgte die Deletion der NF κ B-4-Stelle (s. Abb. 18), was zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität führte.

Interessante Ergebnisse lieferte ein Experiment mit Konstrukten, die keine HSS-1-Region enthielten und deren NF κ B-5-Stelle mutiert wurde (s. Abb. 25). Im Vergleich zu Konstrukten mit einer unmutierten NF κ B-5-Bindungsstelle zeigten die Konstrukte mit der Punktmutation eine stärkere Abschwächung der Expressionsrate. Der Versuch bestätigt wieder in eindeutiger Weise den starken Einfluß von NF κ B auf die Transkription. Dieser Effekt konnte allerdings durch Einführen von Punktmutationen in die beiden NF κ B-Bindungsstellen von HSS-2 nicht beobachtet werden (s. Abb. 21).

Für ein besseres Verständnis dieser Ergebnisse ist es nötig, einige Überlegungen anzustellen.

Da HSS-3 bereits alleine einen starken Enhancer darstellt, ist der synergistische Effekt von HSS-2 zwar statistisch signifikant, aber nur moderat, das heißt somit auch leicht überdeckbar. Der Aktivitätsverlust von HSS-3 aufgrund der vollständigen HSS-2-Deletion liegt nämlich nur im Bereich von 30%. Außerdem enthalten die Mutationskonstrukte im Gegensatz zu den HSS-1- und HSS-2-Deletionskonstrukten noch alle Bindungsstellen für andere, die Transkription beeinflussende Faktoren und die NFκB-Bindungsstelle aus HSS-1, womit eventuelle Aktivitätsunterschiede kompensiert werden und dadurch ein geringerer Einfluß auf die Änderung der Expressionsrate zu erwarten ist.

Daß derartig kleine Unterschiede in der Genexpression oft nicht deutlich hervortreten, kann folgende Ursachen haben.

Eine Messung der Enzymaktivität erfolgte erst zirka 48 Stunden nach der Elektroporation. Nach dieser Zeit hat das Zellwachstum eventuell bereits eine Plateauphase erreicht, in der mögliche Aktivitätsänderungen nicht mehr erkannt werden können.

Darüber hinaus wird die Lumineszenz im Luminometer in einem Bereich von mehreren Millionen Lichtblitzen ermittelt, wodurch geringe Unterschiede nicht mehr feststellbar sind.

Zudem ist zu hinterfragen, inwieweit die Ergebnisse aus diesen Studien auf die In-vivo-Situation im Genom umgelegt werden können, da die Chromatinstruktur eines Reporter-genplasmids in einem Transfektionssystem vermutlich nicht der im Genom entspricht. Daher hat diese Methode In-vitro-Charakter. Obwohl die DNA des transfizierten Plasmids wie die genomische DNA um Histonoktamere gewunden ist, gestaltet sich die Anordnung der Nukleosome auf dem Plasmid bei jeder Transfektion möglicherweise unregelmäßig und zufällig (Cheung et al., 2000). Damit können durch die veränderte Zugänglichkeit des Chromatins immer andere Proteine binden, was zu verfälschten und nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen kann.

Letztlich stellt die transiente Transfektion sicherlich keine In-vivo-Methode dar, gibt jedoch Aufschluß darüber, welche Bereiche wichtig sind oder nicht.

Die genomische 3'-Region von C_λ enthält sieben mögliche NFκB-Bindungsstellen, die ursprünglich über eine Sequenzanalyse identifiziert und inzwischen durch Versuche verifiziert wurden. NFκB-1, -4, -5 und -7 sind funktionell und innerhalb der drei DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1, -2 und -3 lokalisiert (Combriato und Klobeck, 2002).

In transienten Transfektionsversuchen der Arbeitsgruppe Klobeck wurde der Einfluß von kombinierten Punktmutationen in allen sieben NFκB-Bindungsstellen auf die Enzymaktivität untersucht.

Wie in Combriato und Klobeck (2002) beschrieben, verhalten sich die NFκB-4-, -5- und -7-Bindungsstellen synergistisch zueinander. Die NFκB-7-Stelle in HSS-3 vermittelt den stärksten Einfluß auf die Igλ-Transkriptionsregulation. Die anderen NFκB-Stellen können die Genexpression nur beeinflussen, wenn die NFκB-7-Stelle intakt ist.

Mit diesen und den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten konnte entgegen der bisherigen Meinung (Hagman et al., 1990; Blomberg et al., 1991), daß nur der IgH- und Igκ-Intronenhancer der Maus und des Menschen NFκB-abhängig reguliert sind, gezeigt werden, daß auch die Funktion des menschlichen Igλ-Enhancers von NFκB gesteuert wird (Combriato und Klobeck, 2002). Der menschliche Igλ-Enhancer ist aber im Gegensatz zum Igκ-Intronenhancer nicht unbedingt von NFκB abhängig, eine Induzierung dieses Transkriptionsfaktors während der B-Zellentwicklung führt jedoch zu einer weiteren Transkriptionsverstärkung. Die Aktivität von NFκB reicht nicht aus, um in HSS-2 und -3 das Chromatin zu öffnen.

Bemerkenswert ist, daß der Igλ-Enhancer von Mensch und Huhn, jedoch nicht der der Maus durch NFκB reguliert wird, da dort die NFκB-Bindungsstelle mutiert ist. Vermutlich ist das Fehlen einer funktionellen NFκB-Bindungsstelle dafür verantwortlich, daß die λ-Gene am Beginn der L-Kettenumlagerung nicht mit den κ-Genen konkurrieren können. Damit ließe sich erklären, warum bei der Maus 95% der leichten Kette als κ-Typ vorliegen, jedoch beim Menschen nur 60% vom κ-Typ sind.

Immunglobulinenhancer sind neben der Transkriptionsregulation vollständig umgelagerter Immunglobulingene auch an der Zugänglichkeitskontrolle des Chromatins während der B-Zellentwicklung beteiligt. Bis jetzt noch unbekannte Faktoren binden an den Enhancer und sind an der Steuerung von chromatinverändernden Komplexen, die die Chromatinstruktur der Immunglobulinloci öffnen, beteiligt (Übersicht in Smale und Fisher, 2002). Erst nach Vorliegen eines aktiven Chromatins, vermutlich durch Wechselwirkungen von Proteinen mit Enhancerelementen, kann eine Immunglobulinumlagerung stattfinden (Sleckman et al., 1996).

NFκB rekrutiert den Transkriptionskoaktivator CBP/p300 (Zhong et al., 1998), der eine Verbindung zur basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen kann und Histonacetylie-

rungeigenschaften besitzt (Bannister und Kouzarides, 1996). Dies läßt vermuten, daß die Histonacetylierung, die mit einer aktiven Chromatinstruktur zusammenhängt, am Wirkungsmechanismus von NF κ B beteiligt ist. Durch die Öffnung des Chromatins im Ig λ -Locus kann sich die V(D)J-Rekombinase an die Rekombinationssignalsequenz anlagern, was zu V(D)J-Umlagerungen führt (Sleckman et al., 1996).

Da nicht nur NF κ B eine Rolle in der Transkriptionsregulation des Ig λ -Locus spielt, sondern auch andere Faktoren einen Einfluß ausüben, wurde im weiteren HSS-2 dahingehend untersucht.

5.2.2 Beschreibung der identifizierten Faktoren und ihre Rolle während der B-Zellentwicklung

Die Abbildung 49 zeigt einen zusammenfassenden Überblick über die Versuchsergebnisse. In der schematischen Darstellung sind neben HSS-2 die bereits untersuchten hypersensitiven Regionen HSS-1 (Friess, 2001) und HSS-3 (Blomberg et al., 1991; Combriato und Klobeck, 2002) entsprechend ihrer Lage flußabwärts von C λ 7 eingezeichnet. Die detaillierte Abbildung von HSS-2 läßt erkennen, daß Footprints im 5'- und 3'-Bereich identifiziert wurden. Dazwischen liegt eine footprintlose Region mit repetitiven Sequenzen. Zwar ist keine sichere Aussage möglich, aber durch die auffällige Footprintanordnung kann über einen HSS-2-Bereich, der aus zwei Teilen besteht, spekuliert werden.

Mit der In-vivo-Footprinting-Methode konnten bindende Proteine, die für die Funktion von HSS-2 eine wichtige Rolle spielen und unter anderem Transkriptionsfaktoren sein können, in Form von acht vor Methylierung geschützten Bereichen (Footprints) auf der genomischen DNA ermittelt werden.

Analysiert man die Verteilung dieser Bereiche, so befinden sich sechs Footprints im 5'-Bereich und zwei im 3'-Bereich von HSS-2. Dazwischen liegt eine große Region (zirka 600 Bp) mit repetitiven Sequenzen, in der keine geschützten Bereiche gefunden wurden. Die Datenbank Transfac (Wingender et al., 2001) ermöglichte es schließlich, den meisten entdeckten Footprints bestimmte Faktoren zuzuordnen.

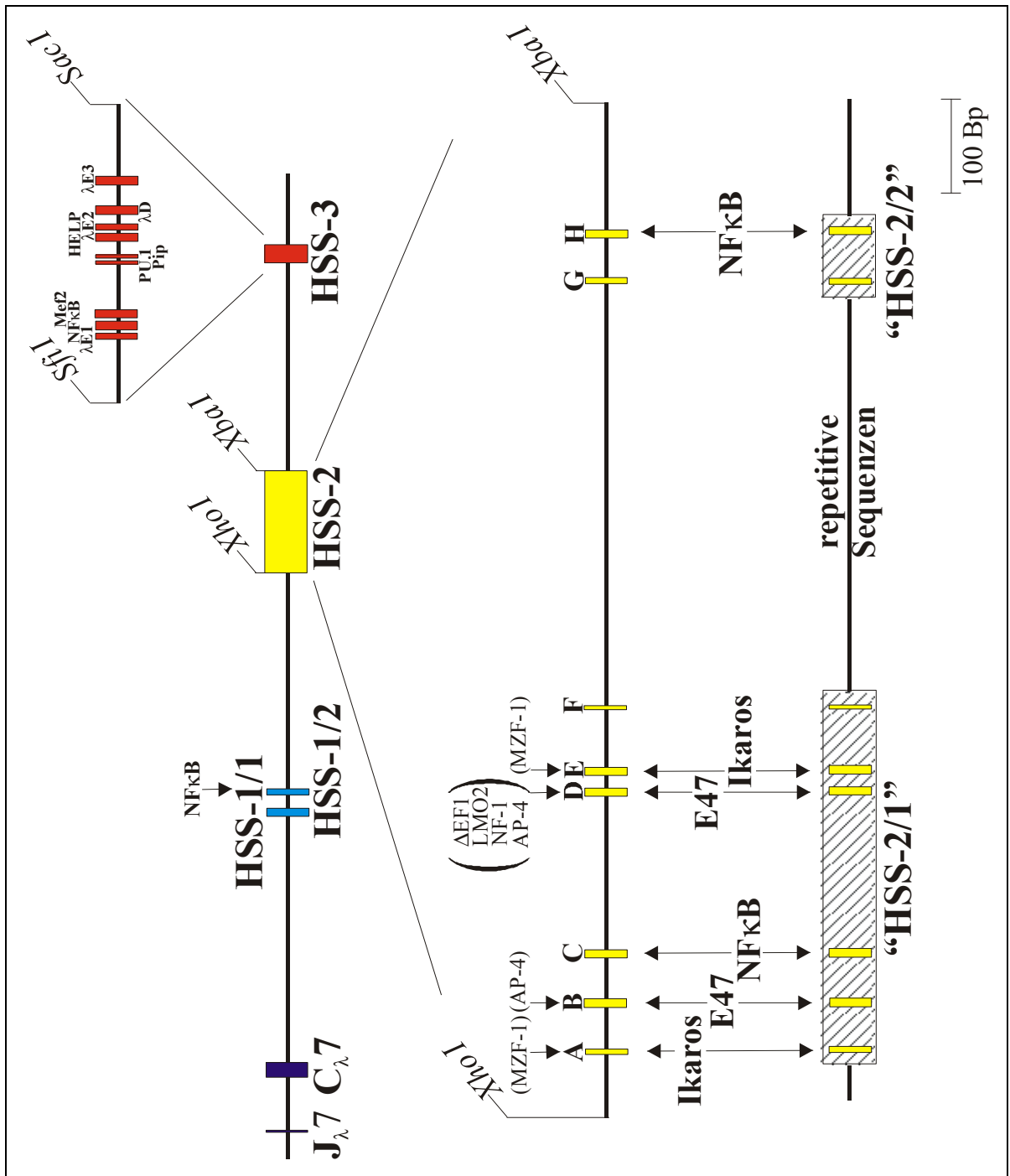


Abb. 49: Schematische Übersicht der Versuchsergebnisse

Eingezeichnet sind die hypersensitiven Regionen HSS-1, -2 und -3 mit den entsprechenden Spaltstellen und identifizierten Faktoren sowie die Gensegmente J_λ7. Die mit Buchstaben versehenen Kästchen stellen die gefundenen Footprints dar. Über und unter den geschützten Sequenzabschnitten stehen die Namen der möglichen Faktoren, wobei die weniger wahrscheinlich an die DNA bindenden Proteine in Klammern gesetzt sind. Der Maßstab ist in Basenpaaren angegeben.

So wurden Bindungsstellen für AP-4, ΔEF1, E47, Gfi-1, Ik-1, -2, LMO2, MZF-1, NF-AT, NF-1 und NFκB identifiziert.

Die Proteine sind im Anschluß beschrieben:

AP-4 (activator protein 4):

Der an Enhancer bindende Transkriptionsfaktor AP-4 ist ein Helix-Loop-Helix(HLH)-Protein, das virale und zelluläre Gene aktiviert. Die HLH-Struktur und die angrenzende basische Region sind essentiell für die DNA-Erkennung und -Bindung. AP-4 enthält zwei Leucin-Zipper-Elemente, die zwar keine Rolle in der DNA-Bindung spielen, aber für die Dimerisierung in Abwesenheit von DNA benötigt werden. Leucin-Zipper-2 fördert vor allem die Homodimerentstehung. Bemerkenswert ist, daß AP-4 keine Heterodimere mit anderen HLH-Proteinen bilden kann. Der Transkriptionsfaktor interagiert häufig mit AP-1 (Hu et al., 1990).

Δ EF1:

Der den delta-kristallinen Enhancer bindende Transkriptionsfaktor Δ EF1 ist ein Repressor und enthält sieben Zinkfingerstrukturen. Er wirkt auf den lensenspezifischen Δ 1-kristallinen Enhancer, kann kompetitiv an E2-Box-Elemente, welche die Bindungsstellen für verschiedene HLH-Aktivatoren darstellen, binden, blockiert dadurch den Ig κ -Enhancer und unterdrückt MyoD-abhängige Prozesse (Sekido et al., 1994).

E47:

E47, ein Produkt des E2A-Gens, ist ein an die κ E2-Sequenz bindender Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor, der mit den IgH- und Ig κ -Genenhancern interagiert und damit eine wichtige Rolle während der B-Zellentwicklung von der Progenitorzelle zur reifen B-Zelle spielt. E47 kann nur den ersten Genumlagerungsschritt in der B-Zellentwicklung aktivieren, für die weitere Entwicklung sind zusätzliche Faktoren nötig (Schlüssel et al., 1991). Er aktiviert Keimbahntranskripte der schweren Kette, D- zu J-Umlagerungen und die Transkription von RAG-1, -2 und dem IgH-stimulierenden Oct-2-Gen (Bain und Murre, 1998; Henderson und Calame, 1998). E47 bildet sowohl Homo- als auch Heterodimere (mit MyoD) und bindet mit der basischen Region an die DNA (Zhuang et al., 1996). Im Gegensatz zur Heterodimerisierung mit gewebsspezifischen HLH-Proteinen

scheint die B-zellspezifische DNA-Bindung durch ein E47-Homodimer charakterisiert zu sein (Shen und Kadesch, 1995).

Gfi-1 (growth factor independence 1):

Gfi-1 ist ein sechs Zinkfinger enthaltender Transkriptionsfaktor, der nur im Thymus, in der Milz und den Hoden erzeugt wird. Dieses Protein scheint bei der Onkogenese und T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle durch Repression der diese Prozesse inhibierenden Gene zu spielen. Potentielle Gfi-1-Bindungsstellen kommen auch in vielen anderen eukaryontischen Promotor-Enhancer-Regionen vor, wie in Enhancern von Zytokingenen und von Promotoren menschlicher Zytomegalieviren (Zweidler-McKay et al., 1996).

Ik-1, -2 (Ikaros):

Das Ikarosgen kodiert für ein DNA-bindendes Protein, das mehrere Zinkfinger motive enthält. Die unterschiedlichen Genprodukte, die durch alternatives Spleißen in verschiedenen Mengen und abhängig vom Entwicklungsstadium der Zelle entstehen, erhalten ihre funktionellen Eigenschaften durch spezielle Kombinationen der Zinkfinger-einheiten (Molnar und Georgopoulos, 1994). Aufgrund der Fähigkeit verschiedene Proteine hervorzubringen, ist das Ikarosgen ein Hauptregulator während der Lymphozytenentwicklung (Cortes et al., 1999). Ikaros-1 und -2 kommen vor allem im Nukleus von frühen Lymphozyten, reifen T-Zellen, frühen fötalen Leberzellen, reifenden Thymuszellen und postnatalen Milzzellen vor, binden unterschiedlich stark an die gleichen Erkennungssequenzen in Lymphozyten und stellen effektive Transkriptionsaktivatoren dar. Der Faktor wird sowohl bereits in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, wo es für die Differenzierung zu Lymphozyten notwendig ist, als auch in reifen Lymphozyten (Henderson und Calame, 1998). Ikaros spielt bereits vor dem ersten Kontrollpunkt in der B-Zellentwicklung eine wichtige Rolle, während E47 erst für den zweiten Entwicklungskontrollpunkt benötigt wird. Die Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Ikaros-Isoformen ist essentiell für eine normale Lymphozytenentwicklung (Sun et al., 1996). Abgesehen von der Transkriptionsaktivierung können Ikarosproteine auch als Transkriptionsrepressoren wirken. Diese Repression scheint mit einer Hypoacetylierung von Histonen einherzugehen (Koipally et al., 1999). Ikaros stellt einen Teil von Transkriptionskomplexen dar, die Histondeacetylierungs- oder Nukleosom-„remodeling“-Aktivität aufweisen (Cortes et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor reguliert

RAG-1 und die Gene des IL-2-Rezeptors, von Ig- α , VpreB, λ 5 und der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (Henderson und Calame, 1998).

LMO2 (TTG-2, Rhombotin 2, LIM-only protein 2, RBTN2):

LMO2 besteht aus zwei LIM-Domänen. Gemeinsam mit GATA-1, Tal-1, Ldb1 und E47 bildet LMO2 als Bindeglied zwischen diesen Proteinen einen DNA-Bindungskomplex, der in der Hämatopoese eine Rolle spielen könnte. Bei T-Zelleukämien tritt eine Überexpression von LMO2 auf (Wadman et al., 1997).

MZF-1:

MZF-1 ist ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, der in hämatopoetischen Progenitorzellen vorkommt und bei der Differenzierung zu Myeloidzellen eine Rolle spielt (Morris et al., 1994).

NF-AT (nuclear factor of activated T cells):

Die Proteine, die zur NF-AT-Familie gehören, spielen eine wichtige Rolle in der induzierbaren Gentranskription der Immunantwort, vor allem in der Transkription von Zytokingenen. Sie sind nicht nur in T-Zellen, sondern auch in den meisten anderen Zellen des Immunsystems vorhanden. Mittlerweile sind mehrere Isoformen bekannt, die in vier Gruppen (NF-AT1 bis 4) zusammengefaßt werden und unterschiedliche Gewebsspezifität aufweisen. Die Aktivität von NF-AT wird durch Calcineurin reguliert, das die Translokation dieser Transkriptionsfaktoren vom Cytoplasma in den Zellkern kontrolliert. Die DNA-Bindungsdomäne der NF-AT-Proteine hat vermutlich die gleiche dreidimensionale Struktur wie die der Proteine der Rel-Familie. Allerdings bindet NF-AT als Monomer und nicht wie Rel als Dimer. Die Wechselwirkung mit κ B-ähnlichen Sequenzen erfolgt über zwei NF-AT-Monomere. Häufig binden diese Transkriptionsfaktoren auch in Kooperation mit AP-1-Proteinen (Rao et al., 1997).

NF-1 (nuclear factor 1):

Die Transkriptionsfaktoren der NF-1-Familie regulieren die adenovirale DNA-Replikation und die Transkription vieler viraler und zellulärer Gene. In Wirbeltieren gibt es vier verschiedene NF-1-Gene, die durch alternatives Spleißen je bis zu neun unterschiedliche

Isoformen erzeugen können. Die Proteine bilden Homo- und Heterodimere, die eine Vielzahl an Promotoren von zum Beispiel Albumingenen beeinflussen (Neves et al., 1999).

NF κ B (NF κ B complex):

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der 1986 erstmals in B-Zellen, gebunden an den I κ B-Intronenhancer, gefunden wurde. Inzwischen entdeckte man das κ B-Motiv auch in Promotor- und Enhancerregionen anderer Zellen, zum Beispiel in Zytokin- und Zelladhäsionsmolekülgengen. Insgesamt werden über 60 proinflammatorische Gene durch NF κ B reguliert. Eine wichtige Rolle spielt NF κ B auch bei der B-Zellentwicklung, wo es vor allem beim Übergang vom Prä-B-Zellstadium zur unreifen B-Zelle stark induziert wird (Henderson und Calame, 1998). Als NF κ B wird das Dimer von zwei Mitgliedern der NF κ B/Rel-Proteinfamilie bezeichnet, wobei das p50/p65-Dimer das am besten untersuchte ist. Derzeit sind in Säugetieren fünf Mitglieder der NF κ B/Rel-Familie (c-Rel, NF κ B-1 (p50, p105 als Vorläufer), -2 (p52, p100 als Vorläufer), RelA (p65), RelB) bekannt, die durch die sogenannte Rel-Domäne (zirka 300 Aminosäuren), die für die DNA-Bindung, Dimerisierung und Wechselwirkung mit I κ B verantwortlich ist, charakterisiert sind (Baeuerle und Baltimore, 1996; Ghosh et al., 1998). Obwohl die meisten NF κ B-Proteine Aktivatoren (z.B. p50/p65, p50/c-Rel, p65/p65) sind, gibt es einige Kombinationen, die inaktiv sind oder als Repressoren wirken (z.B. p50-, p52-Homodimer). Die Fähigkeit der verschiedenen Dimere, geringfügig unterschiedliche DNA-Sequenzen zu erkennen, erlaubt eine sehr feine Regulierung der Genexpression. Die Dimere unterscheiden sich durch Zellspezifität, Zelllokalisierung und unterschiedliche Aktivierungswege. In der inaktiven Form liegen die NF κ B-Dimere komplexiert mit I κ B vor, wodurch die NF κ B-Kernlokalisationssequenz verdeckt und somit die Wanderung von NF κ B in den Zellkern verhindert wird (Baldwin, 1996). Da NF κ B direkt auf Signale reagiert und nicht erst synthetisiert werden muß, wird es zu den primären Transkriptionsfaktoren gezählt. Die Aktivierung von NF κ B erfolgt durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und anschließenden Abbau von I κ B, wodurch NF κ B vom Inhibitorprotein getrennt wird und in den Zellkern wandern kann. Ausgelöst wird diese Phosphorylierung durch Streß (UV-Licht, Sauerstoffradikale), Infektionen (Lipopolysaccharide, dsRNA) oder Zytokine (TNF- α , IL-1). I κ B wird jedoch im Zytoplasma schnell neu gebildet, wandert dann in

den Zellkern und löst dort durch Komplexbildung NF κ B von der DNA. In der Folge wird dieser Komplex wieder zurück ins Zytoplasma transportiert. TPCK verhindert die Abspaltung von I κ B (Henkel et al., 1993) und inaktiviert damit NF κ B, PMA dagegen stimuliert NF κ B. Zusätzlich zu seiner Rolle als Regulator von Entzündungen und der Immunantwort ist NF κ B wichtig zur Regulation der Apoptose und zellulären Proliferation (Bauerle, 1998). In der reifen B-Zelle liegt der Faktor konstitutiv aktiviert im Zellkern vor. Während der Reifung der Prä-B-Zellen zu B-Zellen wird das Inhibitorprotein I κ B instabil, was zu einer konstitutiven NF κ B-Aktivität in reifen B-Zellen führt. Es ist allerdings noch inaktiviertes NF κ B im Zytoplasma vorhanden (Reya und Grosschedl, 1998), das durch extrazelluläre Stimuli zusätzlich aktiviert werden kann.

Einige der identifizierten Faktoren (AP-4, Δ EF1, Gfi-1, LMO2, MZF-1, NF-AT, NF-1) beeinflussen die B-Zellentwicklung nicht und spielen daher eine untergeordnete bzw. keine Rolle in der Regulierung des I γ λ -Locus. Das heißt, es ist sehr unwahrscheinlich, daß sie im untersuchten Bereich binden.

Eine wichtige Rolle in der B-Zellentwicklung und -differenzierung spielen hingegen die Transkriptionsfaktoren E47, Ikaros und NF κ B. Daher ist es wahrscheinlicher, daß es diese Faktoren sind, deren Footprints gefunden wurden.

5.3 Was bedeuten diese Ergebnisse ?

Bekannt ist, daß der I γ λ -Enhancer aus HSS-1, -2 und -3 besteht, wobei HSS-1 und -2 gemeinsam synergistisch auf den eigentlichen Enhancer HSS-3 wirken und HSS-2, -3 und ein Teil von HSS-1 B-zellspezifisch sind (Asenbauer und Klobeck, 1996; Asenbauer et al., 1999).

Die Regulierung des λ -Locus kann mit der des κ -Locus verglichen werden, da es Parallelen von HSS-1 zum κ -Intronenhancer und von HSS-2 und -3 zum κ -3'-Enhancer gibt. Das Chromatin des κ -Intronenhancers wird vor dem des 3'- κ -Enhancers geöffnet. Somit spielt der κ -Intronenhancer eine wichtige Rolle für den Transkriptionsstart der I γ κ -Gene (Sleckman et al., 1996). Seine Aktivität nimmt mit der Chromatinöffnung des stärkeren 3'- κ -Enhancers ab. Er besitzt wie ein Teil von HSS-1 bereits im Prä-B-Zellstadium

DNase I-Hypersensitivität (Asenbauer et al., 1999), während der κ -3'-Enhancer wie HSS-2 und -3 erst im reifen B-Zellstadium hypersensitiv wird.

Versuche mit LPS-Stimulierungen in murinen Prä-B-Zellen (Parslow und Granner, 1982) zeigten, daß im κ -Intronenhancer DNase I-Hypersensitivität induziert werden kann, während beim κ -3'-Enhancer und bei den Ig λ -Enhancerelementen HSS-2 und -3 kein Einfluß auf die Chromatinstruktur zu erkennen war (persönliche Mitteilung von H.-G. Klobeck), obwohl beide funktionelle NF κ B-Bindungsstellen besitzen.

Dies könnte bedeuten, daß nicht nur im Ig κ -Locus (κ -Intronenhancer), sondern auch im Ig λ -Locus (HSS-1) ein Enhancerelement schon in einem frühen B-Zellentwicklungsstadium aktiv wird und die anderen Enhancerelemente (κ -3'-Enhancer bzw. HSS-2 und -3) erst zu einem späteren Zeitpunkt der Differenzierung eine Rolle in der Transkriptionsaktivierung spielen.

So wäre es möglich, daß im Ig λ -Locus zuerst das Chromatin von HSS-1 geöffnet wird und von dort ausgehend verzögert das von HSS-2 und -3.

Das läßt vermuten, daß durch den Synergismus von HSS-1 und -2 auf HSS-3 der Ig λ -Enhancer entwicklungsabhängig reguliert wird. Ob es im Laufe der B-Zellentwicklung zu einer gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Aktivierung der Chromatinstruktur der drei hypersensitiven Regionen kommt, ist jedoch noch zu klären.

Um eine aktive Chromatinstruktur überhaupt herstellen zu können, ist vermutlich ein gewebs- und sequenzspezifischer Masterfaktor nötig, der als erstes an die DNA bindet und dann andere Faktoren „anlockt“, die schließlich das Chromatin über Histonmodifizierung oder Nukleosom-„remodeling“ öffnen (Übersicht in Smale und Fisher, 2002). Erst dann können Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren binden und damit Transkriptionsprozesse beginnen. Die Gewebsspezifität von solchen Masterfaktoren erklärt auch, daß z.B. in einer B-Zelle nur bestimmte Loci des Genoms für die Transkription zugänglich werden.

Die B-Zellentwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle bis zur reifen B-Zelle wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, die einer Hierarchie unterworfen sind, gesteuert (Abb. 50). Dabei ist von den drei gefundenen, für die B-Zelle wichtigen Faktoren

als erster Ikaros nötig. Ikaros steuert die Entwicklung einer hämatopoetischen Stammzelle zu einer lymphoiden Vorläuferzelle. Daß aus dieser eine Pro-B-Zelle wird, hängt unter anderem von E47 ab. NF κ B spielt vor allem in der späteren B-Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle.

Nun stellt sich die Frage, welche der drei identifizierten, an der Regulierung von B-zell-spezifischen Vorgängen beteiligten Transkriptionsfaktoren (E47, Ikaros, NF κ B) die Rolle eines Masterfaktors für die Chromatinöffnung des Ig λ -Locus spielen könnten.

Zuerst fällt auf, daß in allen drei hypersensitiven Bereichen des Ig λ -Enhancers NF κ B-Bindungsstellen vorliegen. Da wäre es naheliegend, daß NF κ B der Masterfaktor ist. Eine Betrachtung des κ -Intronenhancers zeigt, daß die Blockierung von NF κ B (Scherer et al., 1996) dazu führt, daß keine Keimbahntranskripte mehr gebildet werden und somit auch keine Ig-Umlagerungen stattfinden. Das Auftreten von Keimbahntranskripten ist nämlich ein Hinweis auf die Zugänglichkeit des Chromatins für die Rekombinase. Das läßt den Schluß zu, daß NF κ B im Ig κ -Locus für die Rekombination nötig ist.

Wie oben erwähnt, kann mit LPS eine Hypersensitivität im κ -Intronenhancer erreicht werden, was ebenfalls für eine direkte Beteiligung von NF κ B spricht und die Notwendigkeit des Enhancers für die Umlagerungsvorgänge unterstreicht. Unter Berücksichtigung der oben diskutierten Parallelen zwischen dem κ - und λ -Locus bietet sich eine Übertragung dieser Schlußfolgerungen auf den λ -Locus an.

Bei der Betrachtung von Versuchsergebnissen mit PMA-Behandlung läßt sich allerdings erkennen, daß durch die NF κ B-Stimulierung im Ig λ -Locus keine Hypersensitivität erreicht werden kann, das heißt, HSS-2 und -3 werden nicht ausgebildet. Außerdem tritt NF κ B während der B-Zellentwicklung erst in späteren Stadien auf (Scherer et al., 1996). Somit ist es eher unwahrscheinlich, daß NF κ B die Funktion eines Masterfaktors besitzt, da NF κ B alleine nicht ausreicht, um das Chromatin zu öffnen.

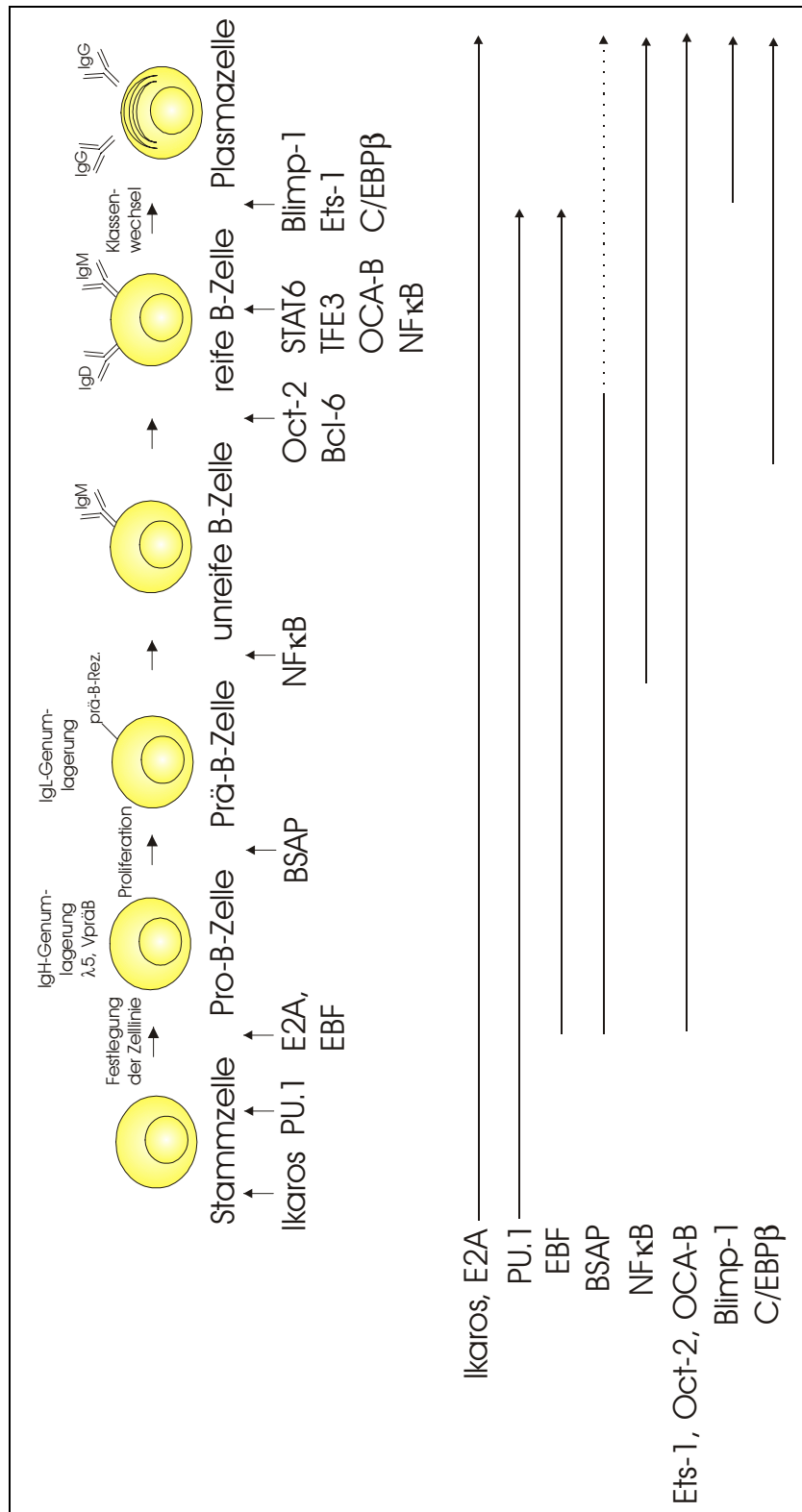


Abb. 50: Transkriptionsregulation während der B-Zellentwicklung
 Abgebildet sind die verschiedenen B-Zellstadien mit den jeweiligen Oberflächenproteinen und darunter die zum jeweiligen Zeitpunkt essentiellen Faktoren. Die durchgehenden Pfeile zeigen die Stadien, in denen die Transkriptionsfaktoren exprimiert sind, die unterbrochenen Pfeile stehen für eine verringerte Expression (Henderson und Calame, 1998; O’Riordan und Grosschedl, 2000; Romanow et al., 2000; Schebesta et al., 2002).

Eventuell könnte Ikaros diese Rolle erfüllen. Möglicherweise ist Ikaros durch seine starke Beteiligung an Histondeacetylierungsreaktionen oder ATP-abhängigen chromatinverändernden Vorgängen in die Zugänglichkeitskontrolle der DNA involviert. Der Transkriptionsfaktor könnte dafür verantwortlich sein, daß ein bestimmter Chromatinbereich für die Bindung weiterer Faktoren unzugänglich bleibt oder geöffnet und damit transkribiert wird.

Schließlich kommt auch E47 als Masterfaktor in Frage, da dieser Transkriptionsfaktor Bindungsstellen in allen Immunglobulinenhancern (Glozak und Blomberg, 1996) hat und als Homodimer B-zellspezifisch ist. Der Faktor beeinflusst die B-Zelldifferenzierung als einer der Hauptregulatoren in fast allen Stadien (Quong et al., 2002). Zudem zeigen Versuche mit Nierenzellen (Romanow et al., 2000), daß geschlossenes Chromatin eines Ig-Locus durch Zugabe von E2A-Proteinen geöffnet werden kann, was heißt, daß E47 alleine offensichtlich die DNA-Zugänglichkeit ermöglicht. Die E2A-Proteine binden dabei Koaktivatoren, wie den SAGA-Komplex oder p300, die beide Histonacetyltransferaseaktivität besitzen. Die Fähigkeit zur direkten Chromatinöffnung würde E47 als Masterfaktor prädestinieren.

Da jedoch E47, wie erwähnt, in allen Ig-Enhancern vorkommt und in fast allen B-Zellstadien wirkt (s. Abb. 50), ist es unklar, wie die geordnete Reihenfolge der Genumlagerungen (IgH vor Ig κ vor Ig λ) eingehalten werden kann. Eine Möglichkeit wäre, daß in den unterschiedlichen Stadien und Loci verschiedene E47-Mengen vorhanden sind. Viel wahrscheinlicher ist jedoch ein konzertierter Mechanismus, bei dem zusätzliche Faktoren zur richtigen Zeit die Chromatinzugänglichkeit ermöglichen (Romanow et al., 2000).

Konkret hieße das, daß E47 als Masterfaktor den Zugang für die Rekombinase zur Rekombinationsmaschinerie über die Chromatinzugänglichkeit steuert. Nur über die Zugänglichkeitskontrolle kann eine geordnete Umlagerung erreicht werden, da die V(D)J-Rekombinase in allen Stadien aktiv ist. Daß zusätzliche Faktoren für die Öffnung des Chromatins nötig sind, beweist die Tatsache, daß der Ig λ -Locus erst im Prä-B-Zellstadium aktiv ist und nicht schon bereits beim ersten Auftreten von E47 sehr früh in der B-Zellentwicklung (zwischen Stammzelle und Pro-B-Zelle; s. Abb 50). Im Prä-B-Zellstadium könnte dann als zusätzlicher Faktor zur Änderung des Chromatinzustandes NF κ B eine Rolle spielen und somit in der richtigen zeitlichen Abfolge eine additive Wirkung ausüben.

Um Gewißheit über den Masterfaktor zu erhalten, müssen noch genauere Untersuchungen vorgenommen werden. Als erstes wären noch Crosslinking-Versuche durchzuführen, um sicher sein zu können, daß es überhaupt diese Transkriptionsfaktoren sind, die binden. Auch sollten verschiedene humane Zellstadien mit Hilfe der In-vivo-Footprinting-Methode auf die unterschiedliche Proteinbedeckung hin untersucht werden. Dadurch können Hinweise auf die sich ändernde Hypersensitivität erhalten werden.

Aus den Versuchen scheint hervorzugehen, daß vor allem die Transkriptionsfaktoren NF κ B, Ikaros und E47 die Ausübung der synergistischen Wirkung von HSS-2 auf HSS-3 entscheidend beeinflussen. Alle besitzen die Fähigkeit, Transkriptionskomplexe zu bilden, die die Zugänglichkeit des Chromatins durch Histonacetylierung bzw. -deacetylierung oder ATP-abhängige Nukleosom-, „remodeling“-Vorgänge steuern können. Damit wird die DNA ausgehend vom Enhancer für zum Teil noch nicht bekannte Faktoren und Koaktivatoren zugänglich, worauf die Transkription der Ig λ -Gene erfolgen kann.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen können keine Aussagen über die entwicklungsabhängige Regulation des λ -Locus und über Unterschiede in der Faktorbindung während der verschiedenen B-Zellentwicklungsstadien getroffen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch die Voraussetzungen für genaue B-Zellentwicklungsuntersuchungen erarbeitet.

Da ein Wissen über die Proteinbedeckung der DNA im Pro- und Prä-B-Zellstadium sehr wichtig wäre, um Faktoren zu finden, die an der Ausbildung von HSS-1, -2 und -3 beteiligt sind, wird die Arbeitsgruppe Klobeck dahingehende Versuche durchführen.

In weiteren Untersuchungen sind die Veränderungen der Chromatinstruktur und der Transkription sowie die Mechanismen der Zugänglichkeitskontrolle des gesamten Ig λ -Locus während der verschiedenen B-Zellstadien zu erforschen.

Dabei ist zu beachten, daß Experimente mit Prä-B-Zellen der Maus nicht möglich sind, da es hier keine HSS-1- und -2-Bereiche gibt und der Ig λ -Locus vermutlich anders gesteuert wird. Die Versuche könnten allerdings mit transgenen Mäusen, die den menschlichen Ig λ -Locus und somit auch alle hypersensitiven Regionen enthalten, in verschiedenen Zellstadien durchgeführt werden (Popov et al., 1999).

Als Alternative wäre es möglich, für die Versuche humane Pro- und Prä-B-Zellen zu verwenden. Für die Chromatinstudien im Humangenom sind allerdings sehr viele Zellen, das heißt zirka 10^7 Zellen pro Gelbahn, nötig. Eine solche Menge von Primärzellen aus dem Knochenmark zu erhalten, gestaltet sich sehr schwierig. Aus diesem Grund werden derartige Untersuchungen mit Hilfe der In-vivo-Footprinting-Methode durchgeführt, da für diese wesentlich weniger Zellen benötigt werden. Die Versuche liefern die selben Ergebnisse wie die Chromatinanalyse.

6 Zusammenfassung

Der menschliche Ig λ -Enhancer besteht aus den drei DNase I-hypersensitiven Regionen HSS-1, -2 und -3, wobei HSS-3 den eigentlichen Enhancer darstellt und HSS-1 und -2 gemeinsam auf HSS-3 synergistisch wirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die B-zellspezifische Region HSS-2 näher einzugrenzen und zu charakterisieren.

Dazu wurden transiente Transfektionen und In-vivo-Footprinting-Versuche durchgeführt.

Die Transfektionsexperimente erfolgten mit den reifen B-Zelllinien MN60 und Daudi. Dazu wurden Luciferasereportergerkonstrukte mit Punktmutationen in den beiden NF κ B-Bindungsstellen von HSS-2 oder mit 5'- bzw. 3'-Deletionen in HSS-2 eingesetzt. Die Auswertung der Daten ergab, daß der Transkriptionsfaktor NF κ B eine sehr wichtige Rolle in der Regulierung des humanen Ig λ -Locus spielt. Die Transkriptionskontrolle durch NF κ B erfolgt als Bestandteil von Transkriptionskomplexen unter anderem über die Öffnung des Chromatins, womit die DNA auch für andere Faktoren zugänglich wird.

Die anschließenden In-vivo-Footprinting-Versuche sollten Aufschluß über die Proteinbedeckung der genomischen DNA von B-Zellen in HSS-2 geben. Für die Untersuchungen wurden die reifen B-Zelllinien Daudi und MN60, die Prä-B-Zelllinie BV173, die T-Zelllinien Jurkat und CCRF-CEM und die myeloische Zelllinie K562 verwendet und zum Teil mit PMA oder TPCK vorbehandelt. Als Nachweismethode diente die LMPCR, als Vergleichs-DNA die freie Plazenta-DNA AF. Den meisten geschützten Sequenzbereichen, deren Anordnung eine Unterteilung von HSS-2 in zwei Teile ermöglicht, konnten mit der Datenbank Transfac bestimmte Faktoren zugeordnet werden. Einige der identifizierten Proteine spielen in der B-Zellentwicklung eine wichtige Rolle. Eine wahrscheinliche Bindung an die Sequenz des HSS-2-Bereichs ist von E47, Ikaros und NF κ B anzunehmen. Alle drei stellen Transkriptionsfaktoren dar, die die B-Zellentwicklung und -differenzierung in verschiedenen Stadien steuern.

Als Masterfaktor für die Chromatinöffnung im Ig λ -Locus kommt vermutlich E47 in Frage, die synergistische Wirkung von HSS-2 wird wahrscheinlich durch NF κ B, Ikaros und E47 entscheidend beeinflusst.

7 Literaturverzeichnis

- Armstrong, J.A., Bieker, J.J. und Emerson, B.M. (1998) A SWI/SNF-Related Chromatin Remodeling Complex, E-RC1, Is Required for Tissue-Specific Transcriptional Regulation by ELKF In Vitro. *Cell* 95, 93-104
- Arpin, Ch., Dechanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J. und Liu, Y.-J. (1995) Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science* 268, 720-722
- Asenbauer, H. (1996) Regulatorische Elemente im Immunglobulin-Lambda-Locus des Menschen. *Dissertation, Fakultät für Biologie an der Universität München*
- Asenbauer, H., Combriato, G. und Klobeck, H.-G. (1999) The immunoglobulin lambda light chain enhancer consists of three modules which synergize in activation of transcription. *Eur.J.Immunol.* 29, 713-724
- Asenbauer, H. und Klobeck, H.-G. (1996) Tissue-specific deoxyribonuclease I-hypersensitive sites in the vicinity of the immunoglobulin C-lambda cluster of man. *Eur.J.Immunol.* 26, 142-150
- Baeuerle, P.A. (1998) I κ B-NF- κ B Structures: At the Interface of Inflammation Control. *Cell* 95, 729-731
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1996) NF- κ B: Ten Years After. *Cell* 87, 13-20
- Bain, G. und Murre, C. (1998) The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Sem.Imm.* 10, 143-153
- Baldwin, A.S. (1996) The NF- κ B and I κ B Proteins: New Discoveries and Insights. *Ann.Rev.Immunol.* 14, 649-681
- Bannister, A.J. und Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643

- Behr, J.-P., Demeneix, B., Loeffler, J.-P. und Perez-Mutul, J. (1989) Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86, 6982-6986
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- Blomberg, B.B., Rudin, Ch.N. und Storb, U. (1991) Identification and Localization of an Enhancer for the Human lambda L Chain Ig Gene Complex. *J.Immunol.* 147, 2354-2358
- Bost, D.A., Zalloua, P.A. und Abramson, R.D. (1997) Amplitaq Gold: Biochemical Characterization and PCR Optimization. *FASEB J.* 11, A1370
- Branden, C. und Tooze, J. (1991) Introduction to Protein Structure. *Garland Publishing, Inc., New York*
- Brown, T.A. (1993) Gentechnologie für Einsteiger. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Burmester, G.-R. und Pezzutto, A. (1998) Taschenatlas der Immunologie. *Thieme Verlag, Stuttgart*
- Busslinger, M., Nutt, S.L. und Rolink, A.G. (2000) Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr.Opin.Immunol.* 12, 151-158
- Bustin, M. (2001) Chromatin unfolding and activation by HMGN chromosomal proteins. *Trends Biochem.Sci.* 26, 431-437
- Chen, J. und Alt, F.W. (1993) Gene rearrangement and B-cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 5, 194-200
- Cheung, P., Allis, C.D. und Sassone-Corsi, P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-271
- Clark, E.A. und Lane, P.J.L. (1991) Regulation of human B-cell activation and adhesion. *Ann.Rev.Immunol.* 9, 97-127

- Cline, J., Braman, J.C. und Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24, 3546-3551
- Combriato, G. und Klobeck, H.-G. (1991) V-lambda and J-lambda-C-lambda gene segments of the human immunoglobulin lambda light chain locus are separated by 14 kb and rearrange by a deletion mechanism. *Eur.J.Immunol.* 21, 1513-1522
- Combriato, G. und Klobeck, H.-G. (2002) Regulation of Human Ig λ Light Chain Gene Expression by NF κ B. *J. Immunol.* 168, 1259-1266
- Cortes, M., Wong, E., Koipally, J. und Georgopoulos, K. (1999) Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr.Opin.Immunol.* 11, 167-171
- Cotten, M., Wagner, E. und Birnstiel, M.L. (1993) Receptor-mediated transport of DNA into eucaryotic cells. *Methods Enzymol.* 217, 618-644
- Felsenfeld, G. (1996) Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-19
- Foley, G.E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B.G., Boone, B.A. und McCarthy, R.F. (1965) Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18, 522-529
- Friess, B. (2001) Untersuchungen zur Funktion einer regulatorischen DNA-Sequenz im Bereich des Ig λ -Enhancers des Menschen. *Dissertation, Fakultät für Medizin an der Universität München*
- Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villey, I.J. und Schatz, D.G. (2000) The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Ann.Rev.Immunol.* 18, 495-527
- Ghosh, S., May, M.J. und Kopp, E.B. (1998) NF- κ B and Rel-Proteins: Evolutionary Conserved Mediators of Immune Responses. *Ann.Rev.Immunol.* 16, 225-260
- Glozak, M.A. und Blomberg, B.B. (1996) The human λ immunoglobulin enhancer is controlled by both positive elements and developmentally regulated negative elements. *Mol.Immunol.* 33, 427-438

- Gregory, P.D. und Hörz, W. (1998) Life with nucleosomes: Chromatin remodelling in gene regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10, 339-345
- Hagman, J., Rudin, Ch.N., Haasch, D., Chaplin, D. und Storb, U. (1990) A novel enhancer in the immunoglobulin lambda locus is duplicated and functionally independent of NF kappa B. *Genes Dev.* 4, 978-992
- Henderson, A. und Calame, K. (1998) Transcriptional Regulation During B Cell Development. *Ann.Rev.Immunol.* 16, 163-200
- Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben, N.Y. und Baeuerle, P.A. (1993) Rapid proteolysis of IkappaB-alpha is necessary for activation of transcription factor NFkappaB. *Nature* 365, 182-185
- Hu, Y.F., Luscher, B., Admon, A., Mermod, N. und Tjian, R. (1990) Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev.* 4, 1741-1752
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J. (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press, San Diego*
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921
- Jacobs, H. und Bross, L. (2001) Towards an understanding of somatic hypermutation. *Curr.Opin.Immunol.* 13, 208-218
- Janeway, Ch.A. und Travers, P. (1997) Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Asakawa, S., Sasaki, T., Klobeck, H.-G., Combriato, G., Zachau, H.G. und Shimizu, T. (2001) Evolutionary dynamics of the human immunoglobulin kappa locus and the germline repertoire of the V-kappa genes. *Eur.J.Immunol.* 31, 1017-1028

- Kawasaki, K., Minoshima, S., Nakato, E., Shibuya, K., Shintani, A., Schmeits, J.L., Wang, J. und Shimizu, N. (1997) One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus. *Genome Res.* 7, 250-261
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J.S., Nadkarni, J.J., Wigzell, H. und Clifford, P. (1968) Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* 28, 1300-1310
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. und Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J.* 18, 3090-3100
- Kornberg, R.D. und Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 9, 148-151
- Längst, G. und Becker, P.B. (2001) Nucleosome Mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J.Cell Science* 114, 2561-2568
- Längst, G., Bonte, E.J., Corona, D.F.V. und Becker, P.B. (1999) Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* 97, 843-852
- Lee, T.I. und Young, R.A. (2000) Transcription of Eucaryotic Protein-Coding Genes. *Annu.Rev.Genet.* 34, 77-137
- Lozzio, C.B. und Lozzio, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260
- Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K.-I., Hayashida, H., Miyata, T. und Honjo, T. (1998) The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *J.Exp.Med.* 188, 2151-2162

-
- Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499-560
- McCutchan, J.H. und Pegano, J.S. (1968) Enhancement of the infectivity of Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J.Natl.Cancer Inst.* 41, 351-357
- McPherson, M.J., Hames, B.D. und Taylor, G.R. (1995) PCR 2 - A Practical Approach. *Oxford University Press, Oxford*
- Melchers, F., Haasner, D., Grawunder, U., Kalberer, Ch., Karasuyama, H., Winkler, T. und Rolink, A.G. (1994) Roles of IgH and L chains and of surrogate H and L chains in the development of cells of the B lymphocyte lineage. *Ann.Rev.Immunol.* 12, 209-225
- Melchers, F. und Rolink, A.G. (1998) B-lymphocyte development and biology. *Fundamental Immunology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 183-224*
- Molnar, A. und Georgopoulos, K. (1994) The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zink finger DNA binding proteins. *Mol.Cell.Biol.* 14, 8292-8303
- Morris, J.F., Hromas, R. und Rauscher, F.J. (1994) Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol.Cell.Biol.* 14, 1786-1795
- Mueller, P.R. und Wold, B. (1989) In Vivo Footprinting of a Muscle Specific Enhancer by Ligation Mediated PCR. *Science* 246, 780-786
- Muyldermans, S., Cambillau, Ch. und Wyns, L. (2001) Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem.Sci.* 26, 230-235

- Neves, L., Duchala, C.S., Godinho, F., Haxhiu, M.A., Colmenares, C., Macklin, W.B., Campbell, Ch.E., Butz, K.G. und Gronostajski, R.M. (1999) Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 11946-11951
- Parslow, T.G. und Granner, D.K. (1982) Chromatin changes accompany immunoglobulin κ gene activation: a potential control region within the gene. *Nature* 299, 449-451
- Pegoraro, L., Matera, L., Ritz, J., Levis, A., Palumbo, A. und Biagini, G. (1983) Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J.Natl.Cancer Inst.* 70, 447-453
- Pfeifer, G.P., Steigerwald, S.D., Mueller, P.R., Wold, B. und Riggs, A.D. (1989) Genomic Sequencing and Methylation Analysis by Ligation Mediated PCR. *Science* 246, 810-813
- Popov, A.V., Zou, X., Xian, J., Nicholson, I.C. und Brüggemann, M. (1999) A Human Immunoglobulin λ Locus Is Similarly Well Expressed in Mice and Humans. *J.Exp.Med.* 189, 1611-1619
- Potter, H., Weir, L. und Leder, P. (1984) Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B-lymphocytes by electroporation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81, 7161-7165
- Quong, M.W., Romanow, W.J. und Murre, C. (2002) E Protein Function in Lymphocyte Development. *Ann.Rev.Immunol.* 20, 301-322
- Rao, A., Luo, C. und Hogan, P.G. (1997) Transcription Factors of the NFAT-Family: Regulation and Function. *Ann.Rev.Immunol.* 15, 707-747
- Reya, T. und Grosschedl, R. (1998) Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Curr.Opin.Immunol.* 10, 158-165

- Romanow, W.J., Langerak, A.W., Goebel, P., Wolvers-Tettero, I.L.M., van Dongen, J.J.M., Feeney, A.J. und Murre, C. (2000) E2A and EBF Act in Synergy with V(D)J Recombinase to Generate a Diverse Immunoglobulin Repertoire in Nonlymphoid Cells. *Mol.Cell* 5, 343-353
- Roos, G., Adams, A., Giovanella, B., Lundgren, E., Nilsson, K., Nordenson, I. und Sundstrom, C. (1982) Establishment and characterization of a human EBV-negative B cell line (MN 60). *Leuk.Res.* 6, 685-693
- Ross, D.W. (1996) Introduction to Molecular Medicine. *Springer, New York*
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning 2nd edition. *Cold Spring Harbour Press, New York*
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. und Schlissel, M.S. (1992) V(D)J Recombination: Molecular Biology and Regulation. *Ann.Rev.Immunol.* 10, 359-383
- Schebest, M., Heavey, B. und Busslinger, M. (2002) Transcriptional control of B-cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 14, 216-223
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Bendall, H.H., Zhang, G.M., Ballard, D.W. und Oltz, E.M. (1996) Corepression of RelA and c-Rel Inhibits Immunoglobulin κ Gene Transcription and Rearrangement in Precursor B Lymphocytes. *Immunity* 5, 563-574
- Schlissel, M.S., Voronova, A. und Baltimore, D. (1991) Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev.* 5, 1367-1376
- Schneider, U., Schwenk, H.U. und Bornkamm, G. (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute

- lymphoblastic leukemia and leukemic transformed Non-Hodgkin lymphoma. *Int.J.Cancer* 19, 621-626
- Sekido, R., Murai, K., Funahashi, J.-I., Kamachi, Y., Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y.-I. und Kondoh, H. (1994) The delta-Crystallin Enhancer-Binding Protein deltaEF1 Is a Repressor of E2-Box-Mediated Gene Activation. *Mol.Cell.Biol.* 14, 5692-5700
- Shen, C.-P. und Kadesch, T. (1995) B-Cell-Specific DNA Binding by an E47 Homodimer. *Mol.Cell.Biol.* 15, 4518-4524
- Silbernagl, S. und Despopoulos, A. (1991) Taschenatlas der Physiologie. *Thieme Verlag, Stuttgart*
- Sleckman, B.P., Gorman, J.R. und Alt, F.W. (1996) Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu.Rev.Immunol.* 14, 459-481
- Smale, S.T. und Fisher, A.G. (2002) Chromatin Structure and Gene Regulation in the Immune System. *Annu.Rev.Immunol.* 20, 427-462
- Sun, L., Liu, A. und Georgopoulos, K. (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 15, 5358-5369
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581
- Vasicek, T.J. und Leder, P. (1990) Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J.Exp.Med.* 172, 609-620
- Venter, J.C. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351
- Wabl, M., Cascalho, M. und Steinberg, C. (1999) Hypermutation in antibody affinity maturation. *Curr.Opin.Immunol.* 11, 186-189
- Wadman, I.A., Osada, H., Grütz, G.G., Agulnick, A.D., Westphal, H., Forster, A. und Rabbitts, T.H. (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule

- assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 16, 3145-3157
- Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michael, H., Ohnhäuser, R., Prüß, M., Schacherer, F., Thiele, S. und Urbach, S. (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 29, 281-283
- Wirth, B. (2001) Das Humangenomprojekt. *Nachrichten aus der Chemie* 49, 321-324
- Wolffe, A.P. und Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* 27, 711-720
- Wu, J. und Grunstein, M. (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem.Sci.* 25, 619-623
- Zhong, H., Voll, R.E. und Ghosh, S. (1998) Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol.Cell.* 1, 661-671
- Zhuang, Y., Cheng, P. und Weintraub, H. (1996) B-Lymphocyte Development Is Regulated by the Combined Dosage of Three Basic Helix-Loop-Helix Genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol.Cell.Biol.* 16, 2898-2905
- Zweidler-McKay, P.A., Grimes, H.L., Flubacher, M.M. und Tschlis, P.N. (1996) Gfi-1 Encodes a Nuclear Zinc Finger Protein That Binds DNA and Functions as a Transcriptional Repressor. *Mol.Cell.Biol.* 16, 4024-4034

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Antikörperstruktur am Beispiel des IgG	3
Abb. 2:	Zusammenfassung der B-Zellentwicklung und Gensegmentum- ordnung.....	6
Abb. 3:	Packungsschema der genomischen DNA.....	8
Abb. 4:	DNase I-hypersensitive Bereiche im humanen Ig λ -Locus	11
Abb. 5:	Prinzip des In-vivo-Reportergen-Assays	25
Abb. 6:	DNA-Methylierung mit DMS und Spaltung mit Piperidin.....	27
Abb. 7:	LMPCR	30
Abb. 8:	Ergebnis der LMPCR.....	33
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Ausgangskonstrukte pPL-1 und pPL- 1mut5.....	35
Abb. 10:	Bestimmung der optimalen Temperatur- und Spannungsbedingungen für Daudi	38
Abb. 11:	Vergleichskonstrukt pGL3 λ ModHSS3	38
Abb. 12:	ClaI-Spaltung zur Mengenbereinigung.....	42
Abb. 13:	Auswertung des in Abbildung 12 gezeigten Gels	42
Abb. 14:	Herstellung eines HSS-2-Deletionskonstrukts am Beispiel von pPL- 1mut5delHSS2-8	46
Abb. 15:	3'-HSS-2-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-6, -7, -8 und -9) und die zur Herstellung verwendeten Primer (flußabwärts HS2-10; flußaufwärts HS2-17, -18, -19 und -20).....	47
Abb. 16:	5'-HSS-2-Deletionskonstrukte (pPL-1mut5delHSS2-12, -13, -14 und -15) und die zur Herstellung verwendeten Primer (flußaufwärts HS2- 11; flußabwärts HS2-13, -14, -15 und -26)	48
Abb. 17:	Konstruktkontrolle mittels BamHI/BglII-Spaltung.....	49
Abb. 18:	Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der 5'- bzw. 3'-HSS- 2-Deletionskonstrukte anhand der Mittelwerte der relativen Luciferase-aktivitäten (\pm Standardabweichung)	51
Abb. 19:	Konstrukte mit Mutationen in HSS-2	53

Abb. 20: Konstruktkontrolle mittels BamHI/BglII-Spaltung.....	54
Abb. 21: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der Konstrukte mit Mutationen in HSS-2 anhand der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten (\pm Standardabweichung).....	55
Abb. 22: Konstrukte mit Deletionen flußaufwärts von HSS-2 von pPL-1mut5 ausgehend.....	57
Abb. 23: Konstrukte mit Deletionen flußaufwärts von HSS-2 von pPL-1 ausgehend.....	58
Abb. 24: Konstruktkontrolle mittels Spaltung mit HindIII (pPL-1delHSS1-1, -2), mit HindIII und BglII (pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9, -15, pPL-1mut5delHSS1-1, -2, -1,2) bzw. HindIII und Sall(pGL3 λ ModHSS3).....	59
Abb. 25: Zusammenfassung der Expressionsergebnisse der Konstrukte mit Deletionen flußaufwärts von HSS-2 anhand der Mittelwerte der relativen Luciferaseaktivitäten (\pm Standardabweichung).....	60
Abb. 26: Vergleich der PCR-Effizienz bei Verwendung der AmpliTaqGold- bzw. Taq-DNA-Polymerase anhand einer In-vivo-Footprintanalyse von HSS-3 mit den Oligonukleotiden HS3-35, -36 und -37*.....	66
Abb. 27: Sequenz von HSS-2 und die Positionen der verwendeten Oligonukleotide.....	69
Abb. 28: Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperaturen für die LMPCR.....	71
Abb. 29: Überblick über die zur Untersuchung von HSS-2 verwendeten Oligonukleotidsets.....	72
Abb. 30: Autoradiogramm zur Bestimmung des Einflusses der DMS-Einwirkzeit anhand des Oligonukleotidsets HS2-28, -29 und -30*.....	74
Abb. 31: Methylierung und Piperidinspaltung.....	75
Abb. 32: Autoradiogramm zur Untersuchung der DNA-Qualität anhand des bereits getesteten Oligonukleotidsets HS3-35, -36 und -37*.....	76
Abb. 33: Autoradiogramme des Oligonukleotidsets HS2-55, -56 und -57*.....	79
Abb. 34: Autoradiogramm zur Bestimmung der optimalen Primeranlagerungstemperaturen und Molaritäten der Resolution Solution für das GC-	

reiche System von Roche am Beispiel des Oligonukleotidsets HS2-40, -1 und -41*	80
Abb. 35: Autoradiogramm zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für das GC-reiche System von Roche am Beispiel des Oligonukleotidsets HS2-55, -56 und -57*	81
Abb. 36: Footprints der HSS-2-Region.....	83/84
Abb. 37: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-10, -21 und -4*.....	86
Abb. 38: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-61, -62 und -63*.....	87
Abb. 39: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-22, -23 und -24*.....	88
Abb. 40: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-55, -56 und -57*.....	89
Abb. 41: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-55, -56 und -57*.....	90
Abb. 42: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-25, -26 und -27*.....	91
Abb. 43: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-25, -26 und -27*.....	93
Abb. 44: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-28, -29 und -30*.....	94
Abb. 45: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-37, -38 und -39*.....	95
Abb. 46: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-42, -43 und -11*.....	96
Abb. 47: Autoradiogramm von HSS-2 mit den Oligonukleotiden HS2-40, -1 und -41*.....	97
Abb. 48: Vergleich der Ergebnisse aus den In-vivo-Footprintversuchen mit denen der computerunterstützten Sequenzanalyse in HSS-2.....	99/100
Abb. 49: Schematische Übersicht der Versuchsergebnisse	108
Abb. 50: Transkriptionsregulation während der B-Zellentwicklung.....	116

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillinresistenzgen
ATG	AmpliTaqGold-DNA-Polymerase
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	für die konstante Region des Immunglobulins kodierendes Gensegment (constant)
C	Cytidin
CDR	hypervariable Region des Immunglobulins (complementarity determining region)
Ci	Curie
Cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
d	Tag
D	für die variable Region einer schweren Immunglobulinkette kodierendes Gensegment (diversity)
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	und andere (et alii)
Fab	antigenbindendes Fragment des Immunglobulins
Fc	kristallisierbares Fragment des Immunglobulins
G	Guanosin
h	Stunde

H	schwere Immunglobulinkette (heavy)
HLH	Helix-Schleife-Helix (helix-loop-helix)
HSS	hypersensitiver Bereich (hypersensitive site)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J	für die variable Region eines Immunglobulins kodierendes Gensegment (joining)
Kap.	Kapitel
kB	Kilobasen (=10 ³ Basenpaare)
L	leichte Immunglobulinkette (light)
LMPCR	ligierungsvermittelte PCR (ligation mediated PCR)
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
ori	Replikationsursprung
PBS	Natriumchlorid-Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMA	12-Myristyl-13-acetylphorbolsäureester (Phorbol-12-myristat-13-acetat)
PNK	Polynukleotidkinase
RAG	rekombinationsaktivierende Gene (recombination activating genes)
R.L.E.	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RS	Resolution Solution
RSS	Rekombinationssignalsequenz
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
ST	Natriumchlorid-Tris-Puffer
T	Thymidin
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer

TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Anlagerungstemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalaninchlormethylketon
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzymeinheit (unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
V	für die variable Region eines Immunglobulins kodierendes Gensegment (variable)
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Anhang

Anhang A

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Oligonukleotide mit ihren Sequenzen, ihrem Verwendungszweck und ihren Anlagerungstemperaturen (T_m) angeführt. HS steht für die Primer aus der jeweiligen HSS-Region. FP kennzeichnet die Verwendung für die In-vivo-Footprinting-Methode, K die Verwendung zur Konstruktherstellung für die Transfektionsversuche. ST entspricht der Anlagerungstemperatur nach dem Standardprotokoll und GC nach dem GC-reichen PCR System.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung	T _m (°C) ST / GC
HS2-1	TGAGACCTGGAGTGTGCCT	FP	68 / 60
HS2-4	GCAGCTGGGTTGATAATAAT	FP	68 / 55
HS2-6	AGGTCCTGCCACTGGGTAG	FP	68
HS2-10	TAGTGGCTCGAGCTCAGCCTC	FP / K	60
HS2-11	ACCTCAGCATCTAGACCCAGC	FP / K	68 / 58
HS2-13	CCTCACTCGAGTGCAGCTGGCC	K	68
HS2-14	CAAGCCTCGAGCCTGGCAGCAGGTGCCT	K	68
HS2-15	TTCTGCTCGAGAAGCTTCTATTCATGC	K	68
HS2-16	GACCCCTCGAGGGAGCTGGGCCAAGT	K	68
HS2-17	GTCCAAGATCTGGGGCGGCAGGTGGAGT	K	68
HS2-18	TGAATAGATCTTTCTGGAGCAGAAGGTGCT	K	68
HS2-19	TGGGGAGATCTAGGCACCTGCTGCCAGGGC	K	68
HS2-20	TCAGGAGATCTTGTTTCACCAGGCCAG	K	68
HS2-21	CAGTTTCCCTCTGTGCAG	FP	68 / 58
HS2-22	GTTTGTCTCTGCCGTTGGT	FP	68
HS2-23	GTTTTATCCTTGGGCTGT	FP	60 / 45
HS2-24	GGGCTGTTCCAGCCCCAGA	FP	68 / 50
HS2-25	ACCGGCCCTGGAACCCTCA	FP	68
HS2-26	CCTCACCCAGTGCAGCTG	FP	68 / 58
HS2-27	CTGGTGAAACCAAGAGTGC	FP	68 / 56
HS2-28	CCCTGGCAGCAGGTGCCTC	FP	68
HS2-29	AGGTGCCTCCTTCTCCCA	FP	68 / 58
HS2-30	GGGCGATTCAGTTTCCAAA	FP	68 / 55
HS2-31	TGAGTTAGACAGGGTCTGGA	FP	68
HS2-32	CTGGAGATCATGGTCAATCA	FP	68
HS2-33	ATCAATGATCAGAAGTAGCA	FP	60
HS2-34	TCCTCACAGCTCCCAGGAA	FP	68
HS2-35	CCAGGAACCGTTCTAAATG	FP	68
HS2-36	AATGCCAGGTTTCAGAGCTG	FP	68
HS2-37	TGGACATGGGACCCTGCT	FP	68
HS2-38	TGCTGATCACACTCCACCT	FP	68
HS2-39	ACCTGCCGCCCCAGGTCT	FP	68
HS2-40	AGCCCACCCCAAGGTGAGA	FP	68
HS2-41	GAGTGTGCCTTCTCATGGGA	FP	68 / 60
HS2-42	CTGTTCCCTCACACCTGTCA	FP	68
HS2-43	TCAACCTCTCTTTGACCTCA	FP	68 / 56
HS2-44	ATATATGGATGGACAGACACA	FP	68
HS2-45	ATAAGTGACTGACCAGTCT	FP	65
HS2-46	CGGCAGGTGGAGTGTGATC	FP	68
HS2-47	ATCAGCAGGGTCCCATGTC	FP	68
HS2-48	CATGTCCAGCTCTGGCCA	FP	68

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendung	Tm (°C) ST / GC
HS2-49	CAATTGGGCACAGCTCTGA	FP	68
HS2-50	AGCTCTGAACCTGGCATTTA	FP	68
HS2-51	TGGCATTTAGAACGGTTCCT	FP	68
HS2-52	CTACTTCTGATCATTGAT	FP	55
HS2-53	ATTGACCATGATCTCCAGA	FP	65 / 52
HS2-54	TCCAGACCCTGTCTAACTCA	FP	68 / 57
HS2-55	AGCTGGGCTGGTGGAAGCT	FP	68
HS2-56	AGCTTTGGAAACTGAATC	FP	60 / 56
HS2-57	CTGAATCGCCCCCTGCCT	FP	68 / 64
HS2-58	CAGCTATTTGCGGCCTCA	FP	68
HS2-59	TCAGGCACTCTTGTTTCA	FP	68 / 55
HS2-60	TCACCAGGCCAGCTGCACT	FP	68 / 60
HS2-61	GTCTGGGGCTGGAACAGCC	FP	68
HS2-62	ACAGCCCAAGGATGAAAAC	FP	68 / 62
HS2-63	ACCAACGGCAGAGACAAAAC	FP	68 / 57
HS3-35	AGCTGCACAAACATCCAGCA	FP	60
HS3-36	AGCAGCAGCCCTGAAACTGC	FP	65
HS3-37	AAACTGCCCATGCTCCTCC	FP	64
TAG-1	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC	LMPCR	80
TAG-2	GAATTCAGATC	LMPCR	30
TAG-3	GCGGTGACCCGGGAGATC	LMPCR	62

Anhang B

In der folgenden Tabelle sind die hergestellten Konstrukte, deren Größe, Herkunft und die zur Herstellung verwendeten Oligonukleotide aufgelistet.

Klon	Größe [Bp]	Herkunft	Oligo-nukleotide
pPL-1mut5delHSS2-6	13440	pPL-1mut5	HS2-10; HS2-17
pPL-1mut5delHSS2-7	13253	pPL-1mut5	HS2-10; HS2-18
pPL-1mut5delHSS2-8	13071	pPL-1mut5	HS2-10; HS2-19
pPL-1mut5delHSS2-9	13006	pPL-1mut5	HS2-10; HS2-20
pPL-1mut5delHSS2-12	13622	pPL-1mut5	HS2-13; HS2-11
pPL-1mut5delHSS2-13	13552	pPL-1mut5	HS2-14; HS2-11
pPL-1mut5delHSS2-14	13355	pPL-1mut5	HS2-15; HS2-11
pPL-1mut5delHSS2-15	13147	pPL-1mut5	HS2-16; HS2-11
pPL-1mut5delHSS2	12770	pPL-1mut5	
pPL-1mut5delHSS1delHSS2-9	8895	pPL-1mut5delHSS2-9	
pPL-1mut5delHSS1delHSS2-15	9036	pPL-1mut5delHSS2-15	
pPL-1mut5delHSS1-1	9723	pPL-1mut5	
pPL-1mut5delHSS1-2	11832	pPL-1mut5	
pPL-1mut5delHSS-1,2	8655	pPL-1mut5delHSS2	
pPL-1delHSS1-1	9723	pPL-1	
pPL-1delHSS1-2	11832	pPL-1	