

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Lipopolysaccharide (LPS) als ein Bestandteil der Zellhülle gramnegativer Bakterien sind aufgrund ihrer Bedeutung für die Pathogenese der bakteriellen Infektion ausführlich in Human- und Veterinärmedizin untersucht worden. Während der akuten Phase der bakteriellen Infektion aktivieren Lipopolysaccharide das Immunsystem des Wirtes, in dessen Zentrum der Makrophage als Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunantwort steht. Makrophagen werden durch LPS aktiviert und reagieren u.a. mit der Synthese und Sekretion von Entzündungsmediatoren, aber auch mit der Mobilisation ihrer bakteriziden und cytotoxischen Fähigkeiten, zu denen auch die Synthese des Lysozyms zählt. Lysozym ist ein antibakteriell wirkendes Enzym, das als ein sekretorisches Hauptprodukt von Makrophagen mit fast universeller Präsenz im Körper zu finden ist. Die Expression des Lysozyms wird kontinuierlich während der Makrophagenreifung aktiviert, mit niedriger Expression in myeloiden Zellen und hoher Expression in reifen Makrophagen.

Der Makrophagenaktivierung durch LPS liegen komplizierte Signalkaskaden zugrunde, an deren Ende eine positive und negative Regulation der Aktivität von Genen steht. Trotz der Bedeutung der LPS-Makrophagen-Wechselwirkungen, weiß man nur wenig über die Mechanismen, mit denen LPS in Makrophagen die Expression Gene aktiviert oder inaktiviert.

In dieser Arbeit sind mit Hilfe molekulargenetischer Methoden einige molekulare Mechanismen charakterisiert worden, die in einer LPS-stimulierten Hühnermyelomonozyten-Zelllinie zur Regulation der Expression des Lysozyms beitragen.

Es ist gezeigt worden, daß LPS-behandelte HD11-Zellen (Myelomonozyten) morphologische Charakteristika von reifen Makrophagen annehmen. Diese Veränderungen sind begleitet von einem drastischen Anstieg der Expression des Lysozyms, der durch RNase-Protection Assay und Northern Analysen nachgewiesen worden ist.

Die Aktivierung einiger Gene durch LPS wird häufig auf transkriptioneller Ebene durch Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B reguliert. So existiert auch im Promotor des Lysozyms eine  $\kappa$ B-ähnliche Bindungsstelle. In dieser Arbeit sind durch Gelretardationsversuche in den Kernextrakten von HD11-Zellen LPS-induzierbare Proteine der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie identifiziert worden.

Der -6,1 kb Lysozymenhancer besteht aus multiplen Elementen, die zu seiner zellspezifischen Aktivität in Myelomonocyten beitragen. Ein 44 bp umfassendes Fragment des -6,1 Lysozymenhancers, das sich über zwei dieser multiplen Elemente (D und E) erstreckt, vermittelt in Myelomonocyten die LPS-aktivierte Expression des Lysozymgens.

In dieser Arbeit sind durch Gelretardationsversuche in Kernextrakten von HD11-Zellen LPS-induzierbare, myeloidspezifische Proteinkomplexe der C/EBP-Familie identifiziert worden, die spezifisch an stark degenerierten C/EBP-Bindungsstellen in den Elementen D und E des -6,1 kb Lysozymenhancers binden. Durch Immunomobility-Shift Assay ist gezeigt worden, daß der myeloidspezifische Transkriptionsfaktor NF-M wesentlicher Bestandteil dieser Proteinkomplexe ist. Transiente Transfektionsexperimente der HD11-Zellen mit dem Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-(CAT)gen unter Kontrolle der Elemente D und E des -6,1 kb Lysozymenhancers zeigen, daß die Mutation der C/EBP-Bindungsstellen in D und E eine Reduktion ihrer transkriptionellen Aktivität verursacht und ihre Ansprechbarkeit durch LPS erlöschen läßt. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen zur Bindungsaktivität von NF-M aus Gelretardationsversuchen mit Oligonukleotiden, in denen die C/EBP-Bindungsstellen in den Elementen D und E mutiert waren. Die Bindung von NF-M erlöscht mit der Mutation der Elemente D und E.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, daß die Bindung von NF-M an die Elemente D und E des -6,1 kb Lysozymenhancers sowohl für die myeloidspezifische Expression des Lysozymgens als auch für die vollständige LPS-induzierte Expression des Lysozymgens in HD11-Zellen notwendig ist.

In Experimenten mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid ist festgestellt worden, daß die LPS-induzierte Erhöhung der Bindungsaktivität der Proteinkomplexe an die Elemente D und E abhängig von der Synthese der Proteinkomponenten dieser Proteinkomplexe ist. Durch Northern Analysen ist eine LPS-induzierte Erhöhung der Expression des NF-M-Gens nachgewiesen worden. Folglich scheint zumindest für NF-M eine gesteigerte Synthese für die LPS-induzierbare Bindungsaktivität an die Elemente D und E notwendig zu sein.

Die in dieser Arbeit für die Regulation des Lysozymgens in LPS-stimulierten Myelomonocyten des Huhnes erzielten Ergebnisse bieten möglicherweise auf Makrophagen übertragbare Ansätze zur weiteren Klärung von LPS-Makrophagen-Wechselwirkungen.

## 7 SUMMARY

Ralph Goethe

Regulation of the lysozyme gene expression in a lipopolysaccharide-stimulated chicken myelomonocytic cell line

Lipopolysaccharides (LPS), as a part of the outer membrane of gram-negative bacteria, has been extensively studied as major factors contributing to the pathogenesis of bacterial infection in human and veterinary medicine. During acute phases of bacterial infection LPS activates the immune system, where macrophages link unspecific and specific immune responses. Macrophages are activated by LPS and respond to LPS with synthesis and secretion of cytokines, but also by mobilization of their bacteriocytic and cytotoxic capacities including the synthesis of the lysozyme.

Lysozyme is an antibacterial enzyme produced in macrophages. As a major secretory product of macrophages lysozyme is present almost everywhere in the body. During macrophage development the activity of the lysozyme gene is continuously increasing with low expression in myeloid cells and higher expression in mature macrophages.

Macrophage activation by LPS is based on complex signal transduction pathways that lead to a positive or negative regulation of genes. Despite the importance of the LPS-macrophage interactions, mechanisms by which LPS activates or inactivates gene expression in macrophages are poorly understood.

In the present study some molecular mechanisms are characterized that contribute to the LPS-inducible regulation of the lysozyme gene in a chicken myelomonocytic cell line.

LPS-treated HD11 cells (chicken myelomonocytes) assume morphological characteristics of mature macrophages. These changes are accompanied by a dramatic increase in expression of the lysozyme mRNA. This was proven by RNase-protection assay and Northern Analysis.

The activation of several genes by LPS is regulated at the transcriptional level by transcription factors such as NF- $\kappa$ B. The promoter of the lysozyme gene contains a

$\kappa$ B-like-sequence. In this study LPS-inducible protein complexes of the NF- $\kappa$ B/Rel-family were identified by gel retardation assay in nuclear extracts of HD11 cells.

The -6,1 kb lysozyme enhancer consists of multiple elements that contribute to its cell specific activity in myelomonocytes. A 44 bp subfragment of the -6,1 kb lysozyme enhancer that extends over two of these elements (D und E) mediates LPS-induced lysozyme gene expression in HD11 cells.

In this study LPS-inducible, myeloid-specific protein complexes of the CCAAT enhancer binding protein (C/EBP)-family were identified by gel retardations assays. Their specific binding to highly degenerated C/EBP-binding sites within the elements D and E was demonstrated. Immunomobility shift assays identify the myeloid-specific transcription factor NF-M as an major component of these protein complexes. Transient transfection of HD11 cells by chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene controlled by the elements D and E of the -6,1 kb lysozyme enhancer show that point mutation within the C/EBP-binding sites of D and E causes a reduction of basal activity and abolishes LPS-responsiveness of the -6,1 kb enhancer. These data correlate with results from gel retardation assays, in which oligonucleotides containing point mutations in the elements D and E show abolished binding activity of NF-M.

This study demonstrate for the first time, that binding of NF-M to the elements D and E of -6,1 kb lysozyme enhancer is not only necessary for the myeloid-specific expression of the lysozyme gene, but also for complete LPS-activated expression of the lysozyme in HD11 cells.

Treatment of HD11 cells with cycloheximide, a strong inhibitor of protein synthesis, causes a strong reduction of the LPS-induced binding activity of protein complexes to the elements D and E. Hence the increasing binding activity of protein complexes to the elements D and E after LPS-stimulation of HD11 cells is dependent on protein synthesis. Additionally LPS-inducible expression of the NF-M gene has been detected by Northern Analysis. Therefore at least increasing synthesis of NF-M seems to be necessary for the LPS-inducible binding activity to the elements D und E.

Assuming that the results - given by the present study - on the regulation of the lysozyme gene in LPS-stimulated myelomonocytes are applicable to macrophages, they will contribute to a further explanation of the LPS-makrophage interactions.