

Technische Universität München

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

**Die Rolle von I κ B β im LPS-induzierten
Sepsismodell**

Melanie Scheibel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung der Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

Prüfer der Dissertation; 1.Univ.-Prof. Dr. M.Schemann
2.Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am: 16.05.07 bei der Technischen Universität München eingereicht
und der die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt 13.09.07 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	12
1.2 Die Rolle der Makrophagen	13
1.3 Toll-Like Rezeptoren bei Wirbeltieren	14
1.4 TLR4/MD2	15
1.5 Die Rolle von NF- κ B im angeborenen Immunsystem.....	16
1.5.1 MyD88 –abhängiger Signalweg	17
1.5.2 MyD88-unabhängiger Signalweg	17
1.6 Die NF- κ B Proteinfamilie und I κ B-Proteinfamilie.....	18
1.7 I κ B β	22
1.8 Zytokine - Mediatoren des Immunsystems	25
1.9 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Verwendete Materialien	29
2.1.1 Geräte.....	29
2.1.2 Verbrauchsmaterial	30
2.1.3 Chemikalien	30
2.1.4 Antikörper und ELISA-Kits.....	31
2.1.5 Enzyme	32
2.1.6 Plasmide.....	32
2.1.7 PCR-Primer und Oligonucleotide	33

2.1.8 Kits.....	34
2.2 Medien und Puffer.....	35
2.2.1 Stammlösungen und Puffer.....	35
2.2.2 Medien für Bakterienkulturen.....	37
2.2.3 Medien für Zellkultur.....	38
2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere	39
2.3.1 Bakterienstämme.....	39
2.3.2 Zelllinien.....	39
2.3.3 Versuchstiere.....	39
2.4 Plasmidvektoren.....	40
2.4.1 Verwendete Plasmide.....	40
2.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	40
2.5 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	41
2.6 Histologische Methoden.....	41
2.6.1 Hämatoxylin-Erythrosin (HE) Färbung von Gewebeschnitten.....	41
2.6.2 Immunfluoreszenz.....	42
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	42
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA	42
2.7.2 Agarosegelelektrophorese.....	42
2.7.3 Mutagenese von Plasmid-DNA	43
2.7.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen.....	44
2.7.5 Echtzeit-RT-PCR	44
2.8 Affymetrix Chip	45
2.9 Zellkulturmethoden	46
2.9.1 Herstellung von M-CSF aus L292-Fibroblasten.....	46
2.9.2 Isolierung und Kultivierung von Kupfferzellen.....	46

2.9.3	Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	47
2.9.4	Kultivierung und Transfektion von RAW264.7 Makrophagen	48
2.9.5	Stimulation von differenzierten Knochenmarksmakrophagen, Kupfferzellen und RAW264.7 Makrophagen	49
2.10	Biochemische Methoden	49
2.10.1	Gesamtzell-Proteinextrakte aus kultivierten Knochenmarksmakrophagen	49
2.10.2	Zellkern-Proteinextrakte aus Knochenmarksmakrophagen und Raw267.4 Zellen	49
2.10.3	Luziferase-Assay mit transfizierten RAW264.7 Makrophagen	50
2.10.4	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)	50
2.10.5	Western-Blot	51
2.10.6	Streptavidin-biotin <i>Pull Down Assay</i>	52
2.10.7	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	52
2.11	<i>In vivo</i> Methoden	54
2.11.1	Organentnahme	54
2.11.2	LPS-Injektionen	54
2.12	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Reaktion von $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Mäusen nach LPS-Injektion	56
3.1.1	Injektion von LPS	56
3.1.2	Bestimmung der Zytokinsekretion im Blut nach LPS Injektion	57
3.1.3	Bestimmung der transkribierten mRNA in verschiedenen Organen nach LPS-Injektion	58
3.1.4	Histologische Untersuchungen der Lunge nach LPS Injektion	60
3.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen in $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Immunzellen	61
3.2.1	Untersuchung der Zytokinsekretion und Proteinproduktion in	

Kupfferzellen nach Stimulation mit LPS	61
3.2.2 Untersuchung der Proteinexpression in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS.....	63
3.2.3 Untersuchung der mRNA–Synthese, Zytokinsekretion und Proteinproduktion in Knochenmarkszellen nach Stimulation mit LPS	64
3.2.4 Affymetrix Chip Analysen von Knochenmarksmakrophagen.....	66
3.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchung an Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS.....	68
3.3 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Bestimmung der Funktion von I κ B β im LPS induzierten NF- κ B Signalweg	69
3.3.1 <i>Knock down</i> von I κ B β in RAW264.7 Makrophagen.....	69
3.3.2 Messung der Zytokinsekretion nach <i>knock down</i> von I κ B β	69
3.3.3 Untersuchung des <i>knock downs</i> von I κ B β auf verschiedenen IL-1 β Luziferase-Konstrukte.....	71
3.4 Untersuchung der Regulation von Interleukin-1 β durch I κ B β	73
3.4.1 Promoteranalysen des murinen Interleukin-1 Gens	73
3.4.2 ChIP-Analysen des IL-1 β Promoters in RAW267.4 Makrophagen nach Stimulation mit LPS.....	74
3.4.3 ChIP-Analysen des IL-1 β Promoters in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS.....	76
3.4.4 Streptavidin-biotin <i>Pull Down Assay</i> in RAW264.7 Makrophagen und nukleäre Lokalisation von I κ B β nach Stimulation	78
3.4.5 Untersuchung des <i>knock down</i> von cRel auf die IL-1 β Sekretion.....	79
4 Diskussion	81
5 Zusammenfassung.....	89
6 Literaturverzeichnis.....	91
7 Danksagung	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 TLRs und ihre Liganden	14
Abb. 2 Aktivierung von TLR4 durch LPS	16
Abb. 3 Modell der NF- κ B-Aktivierung mit verschiedenen Stimuli	19
Abb. 4 NF- κ B und I κ B-Protein Familie	21
Abb. 5 Sterbeverlauf bei I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen nach Injektion mit 50 mg/kg LPS	56
Abb. 6 Überlebenskurve bei I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen nach Injektion mit 30 mg/kg LPS	57
Abb. 7 Zytokinkonzentration im Serum von I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen nach Injektion von LPS	58
Abb. 8 <i>In vivo</i> mRNA-Menge aus Leber und Milz nach LPS-Injektion in I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.....	59
Abb. 9 H/E Färbung der Lunge nach LPS Injektion	60
Abb. 10 <i>In vitro</i> Zytokin-Sekretion von Kupfferzellen nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS	61
Abb. 11 Western-Blot Analysen von zytoplasmatischen Extrakten von mit 1 μ g/ml LPS stimulierten Kupfferzellen.....	62
Abb. 12 Expression von NF- κ B/Rel und I κ B-Proteinen in Knochenmarksmakrophagen	63
Abb. 13 mRNA Menge in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit 1 μ g/ml LPS	64
Abb. 14 <i>In vitro</i> Zytokin-Sekretion in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation	65
Abb. 15 Proteinmenge von IL-1 β in I κ B β ^{-/-} und I κ B β ^{+/+} Knochenmarksmakrophagen	66
Abb. 16 Affymetrix-Chip mit Knochenmarksmakrophagen	67
Abb.17 Immunfluoreszenz mit Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS	68

Abb. 18 Western-Blot-Analyse von RAW264.7 Zellen nach Transfektion mit siRNA	69
Abb. 19 Zytokin-Menge von IL-1 β , MIP-2 und TNF- α in RAW264.7 Zellen nach <i>knock down</i> von I κ B β	70
Abb. 20 Basensequenzen der unmutierten und mutierten κ B-Stellen des IL-1 β -Promotors	71
Abb. 21 Co-Transfektion von IL-1 β -Promotor-Luziferase-Konstrukten in RAW264.7 Makrophagen und Einfluss des I κ B β <i>knock down</i> auf die Induktion von IL-1 β	72
Abb. 22 Potentieller Promotorbereich des IL-1 β Gens	73
Abb. 23 Effizienz-Kontrolle der Sonifizierung in RAW264.7 Makrophagen.....	74
Abb. 24 Chromatin Immun-Präzipitation zur Untersuchung der Bindung von I κ B β an den IL-1 β Promotor in RAW264.7 Makrophagen.....	75
Abb. 25 Chromatin Immun-Präzipitation zur Untersuchung der Bindung verschiedener NF- κ B Proteine an das IL-1 β Gen in RAW264.7 Makrophagen	76
Abb. 26 Chromatin Immun-Präzipitation des IL-1 β Promotors in Knochenmarksmakrophagen	77
Abb. 27 Streptavidin-Biotin <i>Pull Down Assay</i> mit RAW264.7 Makrophagen.....	78
Abb. 28 Western-Blot Analysen von RAW264.7 Makrophagen nach Transfektion mit siRNA	79
Abb. 29 Zytokin-Sekretion in RAW264.7 Zellen nach <i>knock down</i> von cRel und I κ B β	79
Abb. 30 Modell der IL-1 β Genregulation durch I κ B β	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einige wichtige Zytokine	25
Tabelle 2 Verwendete Antikörper	31
Tabelle 3 Verwendete Enzyme	32
Tabelle 4 Verwendete Plasmide	32
Tabelle 5 Primer zur Genotypisierung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/+}$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{+/+}$ Mäusen ..	33
Tabelle 6 Primer für die <i>in vitro</i> -Mutagenese der κB -Stellen in der upstream vom IL-1 β Promoter gelegenen Region.....	33
Tabelle 7 Primer für die Echtzeit-RT-PCR	33
Tabelle 8 Verwendete Oligonucleotide für CHIP-PCR	34
Tabelle 9 Oligonukleotide für Streptavidin-Biotin <i>Pull Down</i>	34
Tabelle 10 Verwendete siRNA.....	34
Tabelle 11 Verwendete Kits.....	34
Tabelle 12 Verwendete Zellkulturmedien	38
Tabelle 13 Verwendete Bakterienstämme.....	39
Tabelle 14 Verwendete Zelllinien mit Herkunftsangaben	39
Tabelle 15 Verwendete Luciferase-Konstrukte	40

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Bp	Basenpaare
BSA	(bovine) Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
C-	Carboxy-
cDNA	mRNA komplementär DNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
cpm	<i>counts per minute</i>
DC	dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-dATP/dCTP/dGTP/dTTP
ddRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunosorbent-assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
IKK	I κ B-Kinase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF-3	Interferon regulatory factor 3
IRAK	Interleukin Rezeptor assoziierte Kinase
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

Ko	knock out
KLS	Kernlokalisationsignal
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inhibitory protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-	Amino-
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	nukleärer Faktor " <i>kappa light chain enhancer</i> " von aktivierten B-Zellen
NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationsignal
OD	optische Dichte
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polmerase chain reaction</i>
PEST-Sequenz	Proteinsequenz reich an Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S), und Threonin (T)
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
PKA	Proteinkinase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANK(L)	<i>receptor activator of NF-κB (ligand)</i>
Rel	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homologue</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit vorhergehender reverser Transkription

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Natriumdodecylsulfat
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat EDTA
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
WB	Western-Blot

1 Einleitung

Jeden Tag sind Organismen unterschiedlichen infektiösen Organismen, wie Bakterien, Viren, Pilze oder einzelligen Parasiten ausgesetzt. Daher hat sich in höheren Vertebraten im Laufe der Evolution zur Bekämpfung dieser pathogenen Organismen ein sehr komplexes Immunsystem ausgeprägt. Dieses lässt sich in angeborenes und erworbenes (adaptives) Immunsystem einteilen. Die beiden Arten der Immunantwort sind eng miteinander verbunden und somit in der Lage Fremdkörper als Reize zu erfassen, auf sie mit einer spezifischen Antwort zu reagieren und dabei das Ergebnis in Erinnerung zu behalten.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Die erste „Verteidigungslinie“ im Kampf gegen eingedrungene Pathogene bildet das angeborene Immunsystem, indem es die Anwesenheit und der Art der Infektion wahrnimmt. Dabei bietet es Schutz durch unspezifische Abwehrmechanismen wie zum Beispiel durch anatomische (Haut, Schleimhäute) oder physiologische Barrieren (Temperatur, pH-Wert). Aber auch zelluläre Bestandteile, die sich aus natürlichen Killerzellen, Granulozyten, Epithelzellen, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) zusammensetzen, wobei letztere den Übergang zum erworbenen Immunsystem darstellen, sind Bestandteil der angeborenen Immunantwort (Janeway and Medzhitov 2002) und bieten zusammen mit löslichen Faktoren und Defensinen, sowie dem Komplementsystem zusätzlichen Schutz. Des Weiteren spielt das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Effektorzellen des erworbenen Immunsystems (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Um dies zu ermöglichen, finden sich auf Oberflächen von Zellen des angeborenen Immunsystems eine Reihe von Rezeptoren, die so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR), welche in der Lage „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) bakterielle Bestandteile wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) oder CpG (Cytosin Guanosin) DNA zu erkennen (Janeway and Medzhitov 2002). Diese PRRs liegen in unterschiedlichen Formen vor. Sie sind entweder auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Kompartimenten zu finden, oder sie liegen sekretiert in Blut oder Gewebeflüssigkeit vor. Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem der Makrophagen Mannose-Rezeptor (MMR), sowie die Rezeptoren der Toll-like Familie (TLR) (Janeway and Medzhitov 2002). Mit Hilfe dieser Rezeptoren ist das angeborene Immunsystem in der Lage, sehr früh eingedrungene Pathogene zu erkennen und spezifische

Abwehrmechanismen zu aktivieren.

1.2 Die Rolle der Makrophagen

Als eine der ersten zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems, spielen Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Erkennung von Krankheitserregern (Gordon 1995). Sie stellen eine heterogene Population von Zellen dar, die ubiquitär in unterschiedlichen Geweben und Organen verteilt sind. Die Differenzierung der Makrophagen erfolgt im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen, den Monozyten, mittels des Wachstumsfaktors M-CSF. Die Repräsentanten der Makrophagen können im Gewebe fixiert oder auch frei vorliegen, wobei ihnen unterschiedliche Aufgaben zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Entzündung zukommen. Zu den unterschiedlichen Makrophagenklassen gehören die Makrophagen der Lamina propria des Intestinaltrakts, die die größte Quelle an Makrophagen im Körper darstellen. Kupffersche Sternzellen in der Leber repräsentieren die wichtigste Komponente der mononukleären Phagozyten. Außerdem sind einige Vertreter der Makrophagen im zentralen Nervensystem vorzufinden, sowie die Alveolarmakrophagen der Lunge und die metallophilen Makrophagen in der Marginalzone der roten Pulpa in der Milz (Gordon 1995; Gordon and Taylor 2005). Ihre Aktivierung erfolgt zum einen durch Komplementspaltprodukte die von Fc-Immunglobulin- und Komplementrezeptoren erkannt werden und mit denen sie opsonisierte Partikel aufnehmen können. Und zum anderen direkt durch konservierte Oberflächenrezeptoren, den so genannten PRR. Dies führt nach Aktivierung der Makrophagen durch Fremdbestandteile zur Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1, die in der Lage sind, durch eine Kaskade weitere Zytokine zu initiieren. Zudem erfolgt die Sekretion von Chemokinen und verschiedenen anderen Botenstoffen, wodurch die Rekrutierung und Aktivierung von dendritischen Zellen sowie Zellen der erworbenen Immunantwort eingeleitet wird. Durch die Präsentation von Peptidbestandteilen des Erregers an die T-Zellen erfolgt anschließend die erregerspezifische Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Zusätzlich sind Makrophagen in der Lage nach ihrer Aktivierung mikrobielle Erreger durch Phagozytose zu vernichten.

1.3 Toll-Like Rezeptoren bei Wirbeltieren

Eine sehr wichtige Rolle innerhalb der PRR-Familie nehmen die Toll-like Rezeptoren (TLR) bei der Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigenbestandteilen, sowie der Aktivierung des angeborenen Immunsystems ein. TLR stellen einen Typ I Transmembran Rezeptor dar und setzen sich in der Maus aus 11, und im Menschen aus 13 verschiedenen Familienmitgliedern zusammen. Die Rezeptoren zeigen eine Leucin-reiche (LRRs) extrazelluläre Domäne und eine intrazelluläre Domäne, die aufgrund ihrer Homologie zum IL-1R als Toll/IL1R (TIR) Domäne bezeichnet wird (Bowie and O'Neill 2000). Die Lokalisation der jeweiligen TLR hängt von der molekularen Struktur ihrer Liganden ab. Daher sind TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5 aufgrund ihrer Spezifität für extrazelluläre Bestandteile wie triacetylierte Lipopeptide, diacetylierte Lipopeptide, LPS und Flagellin auf der Zelloberfläche zu finden (Abb.1). TLR3, TLR7 und TLR 9 hingegen erkennen dsRNA, ssRNA sowie CpG DNA und sind daher in endosomalen Kompartimenten lokalisiert (Kawai and Akira 2005).

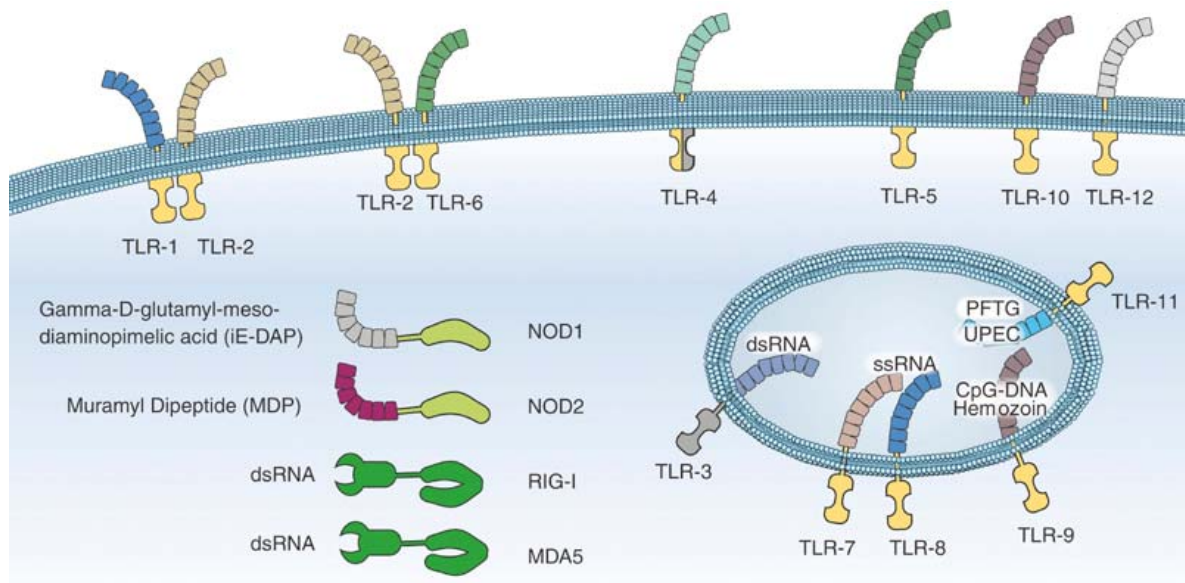


Abb. 1 TLRs und ihre Liganden

PRR die zur Aktivierung von NF- κ B führen. Die Liganden von TLR-1 und TLR-2 stellen triacetylierte Lipopeptide und Peptidoglycane dar. Die Rezeptoren TLR-2 und TL-6 sind in der Lage z.B. diacetylierte Lipopeptide und Hefe Zymosan zu binden. TLR-4 hingegen bindet z.B. LPS und Mannan. Für TLR-5 wurde die Bindung von Flagellin beschrieben. TLR-3, 7, 8, 9 11 befinden sich in den endosomalen Kompartimenten. und NOD1, NOD2, RIG-1 und MDA5 im Zytoplasma. (Hayden, West et al. 2006)

Dabei haben alle TLR Rezeptoren die Aufgabe nach Aktivierung durch „Pathogen-associated molecular patterns“ eine Signalkaskade über Adaptermoleküle zu initiieren, die

letztlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 führt. Somit erfolgt die Produktion sowie Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-1 β , TNF- α oder IL-6 (Janeway and Medzhitov 2002). Diese Zytokinsekretion hat die Stimulation des Immunsystems und somit die Bekämpfung der Infektion zur Folge.

1.4 TLR4/MD2

Die Funktion der TLR in Säugetieren als PRRs wurde zunächst aus der Homologie zu dem *Drosophila* Toll Rezeptor, dem so genannten TLR4 (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997) geschlussfolgert. Es konnte dann gezeigt werden, dass eine konstitutiv aktive Form dieses Rezeptors zu Expression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α führt, sowie zur Co-Stimulation des Moleküles B7, welches für die Aktivierung von T-Zellen verantwortlich ist. Des Weiteren zeigten Untersuchungen der Mauslinie C3H/HeJ, die eine Resistenz gegen LPS aufweisen, dass Punktmutationen innerhalb der TIR-Domäne von TLR4 verantwortlich für den Defekt in der LPS-induzierten Signalkaskade sind. Ein anderer Mausstamm, der so genannte B10 ScCR Stamm, zeigt Defekte innerhalb des *tlr4* Gens, was ebenfalls eine relativ selektive Reaktion auf LPS zur Folge hat (Poltorak, He et al. 1998; Qureshi, Lariviere et al. 1999). Zusammengenommen ergaben diese Studien eine essentielle Rolle für TLR4 bei der Erkennung von LPS. Allerdings zeigten spätere Studien ein weitaus komplexeres Netzwerk, das für die Initiierung der LPS-Signalkaskade verantwortlich ist. Wichtige Erkenntnisse dafür erbrachte die Entdeckung des „lipopolysaccharide binding protein“ (LBP), sowie des CD14 (CGI-linked surface protein) (Schumann, Leong et al. 1990; Wright, Ramos et al. 1990). Dabei zeigte sich, dass LPS an das LBP im Serum bindet mit CD14 interagiert und von TLR4 gebunden wird (Abb.2). CD14 überträgt LPS somit an den TLR4. Dieser Komplex ist mit MD-2 essentiell für die Erkennung von LPS (Shimazu, Akashi et al. 1999). Das Einleiten einer intrazellulären Signalkaskade führt letztendlich zur Aktivierung von NF- κ B.

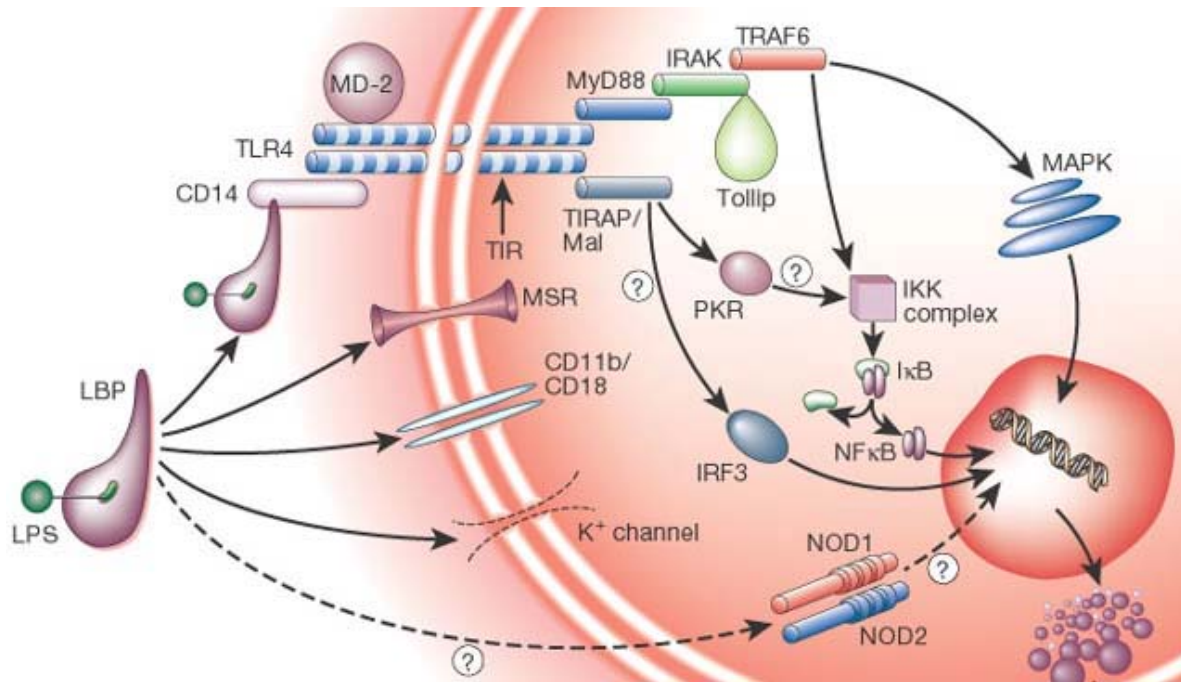


Abb. 2 Aktivierung von TLR4 durch LPS

LPS wird zunächst von dem „LPS-binding protein“ (LBP) gebunden. Dieser Komplex interagiert mit CD-14. Durch die Bindung an den TLR-4-MD-2-Komplex wird die Signalkaskade initiiert. Des Weiteren ist LPS in der Lage andere Zelloberflächen Moleküle wie den „macrophage scavenger receptor“ (MSR), CD11b/CD18 und Ionenkanäle zu aktivieren. Der MyD88 abhängige Signalweg wird durch die Bindung der intrazellulären TLR-Domäne TIR („Toll/IL-1 receptor homology domain“) an IRAK (IL-1 receptor associated kinase“) initiiert und führt letztendlich zur Aktivierung von NF-κB durch den IKK-Komplex. Dabei erfolgt die Aktivierung über die Adaptermoleküle MyD88 („myeloid differentiation protein 88“) und TIRAP/Mal („TIR-domain containing adapter protein“). Der MyD88 unabhängige Signalweg verläuft über das Adaptermolekül TIRAP/Mal. Zum einen kann dabei über PKR („RNA-dependent protein kinase“) IRF-3 („interferon regulatory factor“) aktiviert werden, zum anderen kommt es zur Aktivierung des IKK-Komplexes, der nach Phosphorylierung der IκB-Proteine zur Freisetzung von NF-κB führt (Cohen 2002).

1.5 Die Rolle von NF-κB im angeborenen Immunsystem

Der NF-κB Signalweg nimmt unter allen bekannten Signalwegen aufgrund seiner schnellen Aktivierbarkeit, und seiner vielfältigen Funktion innerhalb des angeborenen Immunsystems und erworbenen Immunsystems, eine wichtige Rolle ein. Dabei erfolgt die Aktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch eine Vielzahl von Stimuli wie z.B. bakterielle Produkten, viralen Infektionen, oxidativem Stress, Rezeptorliganden und einige pharmakologischen Wirkstoffen sowie Chemikalien (Pahl 1999). Entsprechend seines fast ubiquitären Vorkommens hat NF-κB Funktionen bei der Steuerung inflammatorischer Prozesse, Apoptose, Hämatopoese und in der Entwicklung eine essentielle Rolle (Baldwin 1996; Ghosh, May et al. 1998; Gilmore 1999).

Die transkriptionelle Aktivierung einer Vielzahl von zellulären und viralen Genen erfolgt durch sogenannte κB-Stellen innerhalb der jeweiligen Promoterregionen, die spezifische

Bindestellen für NF- κ B darstellen. Dadurch kommt es zur Regulation komplexer Effektormoleküle wie z.B. Zytokinen, die für die Aktivierung, Proliferation und weitere Effektorfunktionen bedeutend sind. Bislang sind mehr als 100 verschiedene NF- κ B regulierte Gene bekannt, die eine oder mehrere κ B-Sequenzelemente enthalten. Dazu zählen Interleukine und Wachstumsfaktoren, Zytokine und Zelladhäsionsrezeptoren, Gene die in der Apoptose eine wichtige Rolle einnehmen, sowie Immunmodulatoren (Pahl 1999). NF- κ B spielt auch eine wichtige Rolle bei einer Reihe von inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, und Asthma. Zudem wird NF- κ B mit Erkrankungen wie Arteriosklerose und Alzheimer in Verbindung gebracht (Baldwin 1996; Kaltschmidt, Uherek et al. 1997).

1.5.1 MyD88-abhängiger Signalweg

Nach der Bindung von LPS an den TLR4 können zwei unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung von NF- κ B initiiert werden (Abb.2). Beim MyD88-abhängigen Signalweg bindet MyD88 in Abhängigkeit vom "TIR-domain containing adaptor protein" (TIRAP) an den Rezeptor Komplex (Abb.2) (Hornig, Barton et al. 2002; Yamamoto, Sato et al. 2002; Kawai and Akira 2005). Anschließend bindet die N-terminale Domäne von MyD88 an einen Komplex aus IRAK 4 und IRAK 1, die somit einen aktiven Komplex bilden und an den „TNF-receptor-associated factor,, (TRAF6) binden können. Über die Aktivierung von „TGF β -activated kinase-1“ (TAK1) kommt es letztendlich zur Aktivierung des IKK-Komplexes, der daraufhin I κ B-Proteine, die Inhibitoren von NF- κ B, phosphoryliert und sie damit für die Degradation markiert (Sato, Sanjo et al. 2005). Somit werden NF- κ B Dimere frei und sind in der Lage in den Nukleus zu translozieren, um an diverse Promotersequenzen unterschiedlicher Gene zu binden und deren Transkription zu aktivieren.

1.5.2 MyD88-unabhängiger Signalweg

Erstaunlicherweise hatte sich in MyD88^{-/-} Zellen nach Stimulation mit LPS gezeigt, dass NF- κ B aktiviert werden kann, wenn auch verzögert (Kawai, Adachi et al. 1999). Dies führte zu der Entdeckung eines weiteren Signalwegs, dem so genannten MyD88-unabhängigen Signalweg, der über das Adaptermolekül „TIR domain containing adaptor inducing interferon-beta“ (TRIF) initiiert wird und zur Aktivierung von IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) sowie NF- κ B führt (Abb.2). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt dabei über die Interak-

tion von TRIF mit dem „receptor interacting protein“ (RIP). Durch die Aktivierung von RIP kommt es wiederum zu Aktivierung von TRAF6 und schließlich zur Aktivierung des IKK-Komplexes. IRF-3 hingegen wird von zwei Molekülen gleichzeitig aktiviert. Zum einen vom Adaptermolekül TRIF sowie durch TRAM (TRIF related adaptor molecule bzw. TIR domain containing adaptor molecule 2 TICAM-1) (Oshiumi, Matsumoto et al. 2003). Dadurch erfolgt die Aktivierung von IKK α und TBK1, zwei Familienmitglieder der IKK-Familie, die IRF-3 aktivieren, welches anschließend in den Nukleus transloziert um als Transkriptionsfaktor für Typ-I Interferone zu agieren (Shimada, Kawai et al. 1999; Kawai, Takeuchi et al. 2001) (Abb.2).

1.6 Die NF- κ B Proteinfamilie und I κ B-Proteinfamilie

NF- κ B Familie stellt eine Gruppe von Proteinen dar, die evolutiv hoch konserviert und strukturell verwandt sind. Ihre Regulation erfolgt durch Translokation zwischen Zytoplasma und Nukleus nach Stimulation der Zelle (Birbach, Gold et al. 2002). In Säugetieren umfasst diese Gruppe fünf verschiedene NF- κ B-Mitglieder. Dazu zählen RelA/p65, cRel, RelB, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52). Alle verschiedenen Proteine weisen eine hoch konservierte 300 Aminosäuren lange DNA- und Dimerisierungsdomäne (Rel-Domäne) auf, die zudem ein Kernlokalisierungssignal (KLS) trägt. NF- κ B1 und NF- κ B2 stellen im Gegensatz zu RelA/p65, cRel und RelB Vorläuferproteine dar, die nach Stimulation proteolytisch in die aktive Form als p50 und p52 gespalten werden (Ghosh, May et al. 1998) (Abb.3). Die NF- κ B-Proteine sind in der Lage untereinander Homo- und Heterodimere zu bilden. Der erste beschriebene Komplex zeigte Dimere aus p50 und p65 (Grilli, Chiu et al. 1993). Bislang konnten 12 verschiedene Homo- oder Heterodimere an DNA gebunden und transkriptionell aktiv nachgewiesen werden (Hoffmann, Natoli et al. 2006). Die Kontrolle der NF- κ B Komplexe erfolgt dabei durch die Interaktion mit I κ B-Proteinen (inhibitor of NF- κ B), die zum einen NF- κ B-Dimere in unstimulierten Zellen im Zytoplasma zurückhalten und zum anderen die Genregulation durch Ablösen der jeweiligen NF- κ B Komplexe von der DNA durch Bindung unterbrechen und NF- κ B aus dem Nukleus translozieren (Abb.3).

Die direkte Aktivierung von NF- κ B erfolgt zunächst über den so genannten IKK-Komplex (inhibitory κ B komplex). Dieser Komplex setzt sich aus zwei homologen katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) zusammen und wird durch gegenseitige Phosphorylierung der beiden Untereinheiten akti-

viert. Anschließend werden abhängig vom Stimulus zwei verschiedene Wege induziert. Zum einen der klassische Weg, der hauptsächlich über die I κ B Kinase (IKK) β induziert wird und über die Phosphorylierung der drei I κ B Proteine I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ erfolgt.

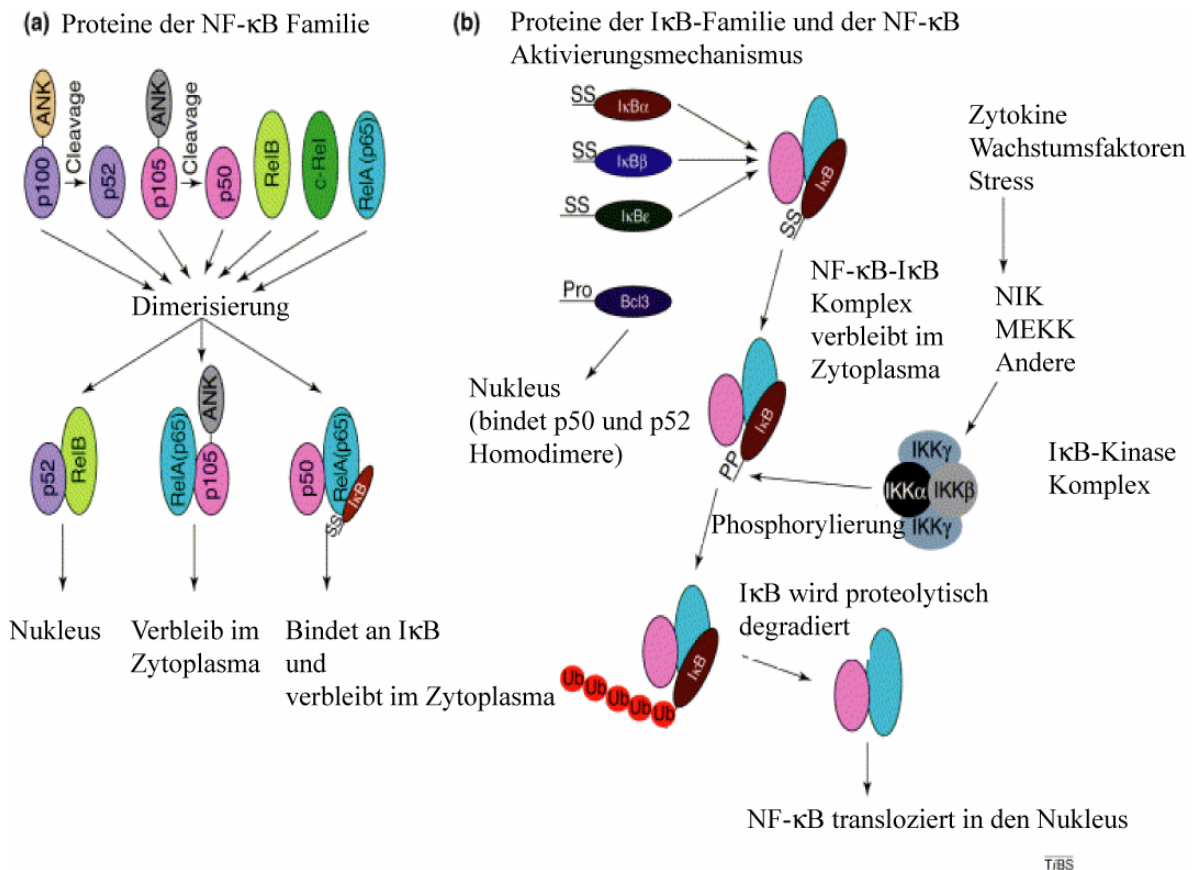


Abb. 3 Modell der NF- κ B-Aktivierung mit verschiedenen Stimuli

a) Die NF- κ B-Familienmitglieder. Mit einigen Ausnahmen sind alle NF- κ B-Untereinheiten in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden. Im unstimuliertem Zustand sind die meisten NF- κ B-Komplexe an I κ B-Proteine gebunden und verbleiben im Zytoplasma. Eine Ausnahme stellen p52-RelB Komplexe dar, die nicht an I κ B-Proteine binden sondern direkt in den Zellkern translozieren.

b) Die wichtigsten Mitglieder der I κ B-Proteine und der NF- κ B-Aktivierungsmechanismus. I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ interagieren mit den NF- κ B-Dimeren und maskieren ihre NLS. Nach Stimulation werden sie vom IKK-Komplex phosphoryliert und anschließend degradiert. NF- κ B transloziert in den Nucleus und aktiviert spezifische Gene. Bcl-3 wird direkt in den Zellkern transloziert, bindet dort an p50 und p52 und fungiert als Transkriptionsfaktor (nach (Perkins 2000)). PP= Phosphorylierung, SS= die zwei Serinreste der I κ B-Proteine

Der alternative Weg dagegen wird durch IKK α aktiviert und nutzt die Vorstufe von p52, das Vorläuferprotein p100, dessen C-terminale ARD Domäne wie die I κ B Proteine als Inhibitor aktive NF- κ B-Komplexe von der DNA lösen kann (Gilmore 2006).

Die Freisetzung von p52 führt zur Bildung von RelB/p52 Komplexen, die im alternativen NF- κ B Weg bevorzugt an der Entwicklung von lymphoiden Organen und der erworbenen Immunantwort beteiligt sind und wird durch Signale wie z.B. RANKL und BLys induziert.

Der klassische NF- κ B Weg spielt hingegen eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort und wird durch die Stimuli TNF- α , IL-1 und LPS aktiviert (Senftleben, Cao et al. 2001; Senftleben, Li et al. 2001; Solan, Miyoshi et al. 2002).

Weitere wichtige Regulatoren von NF- κ B stellen die I κ B-Proteine dar (Abb.4). Die I κ B-Proteine wurden als zytoplasmatische Inhibitoren von NF- κ B entdeckt. Nach Aktivierung des IKK-Komplexes, phosphoryliert dieser die jeweiligen I κ B-Proteine, welche in unstimulierten Zellen durch Bindung an NF- κ B Komplexe deren nukleäre Lokalisationssequenz maskieren und somit eine Translokation von NF- κ B Komplexen verhindern. Nach der Phosphorylierung werden die I κ B-Proteine ubiquitiniert und vom 26S Proteasom degradiert. In Säugetieren sind bislang 7 verschiedene Familienmitglieder bekannt. Dazu zählen I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , I κ B γ (p105 C-Terminus), I κ B δ (p100 C-terminale Domäne) und Bcl-3 (Abb.4). Gekennzeichnet sind die unterschiedlichen I κ B-Proteine durch ihre so genannten Ankyrin-Motive, die eine Anzahl zwischen 6-7 je nach I κ B erreichen (Abb.4). Sie dienen der Maskierung der NLS von NF- κ B und somit der Verhinderung der Translokation in den Zellkern. Die Proteine I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ enthalten konservierte Serinreste innerhalb ihrer N-terminalen Domäne, die von spezifischen Kinasen erkannt werden und nach Aktivierung der Zelle phosphoryliert werden (Li and Nabel 1997; Whiteside, Epinat et al. 1997). Es hat sich gezeigt, dass die jeweiligen I κ B-Proteine unterschiedliche Präferenzen bei der Bindung von NF- κ B-Dimeren aufweisen. So assoziiert I κ B α z.B. bevorzugt mit Dimeren aus RelA und c-Rel, jedoch nicht mit Dimeren, die RelB beinhalten oder mit p50 und p52 Homodimeren (Thompson, Phillips et al. 1995). Bcl-3 weist eine höhere Affinität zu p50/p50 und p52/p52 Homo- und Heterodimeren auf (Bates and Miyamoto 2004). Für I κ B β konnte eine Abhängigkeit von p65 gezeigt werden. In p65^{-/-} Fibroblasten ergaben Untersuchungen, dass die Proteinmenge von I κ B β stark reduziert vorliegt. Diese Abhängigkeit zeigt die Fähigkeit von p65, I κ B β zu stabilisieren und von proteasomalem Abbau zu schützen. Es wurde postuliert, dass die Kontrolle von I κ B β durch p65 eine wichtige Rolle bei der zellulären Entwicklung einnimmt (Wang, Ladner et al. 2005). Außerdem konnte eine bevorzugte Bindung von I κ B β an das NF- κ B Protein cRel nachgewiesen werden. (Liou and Hsia 2003)

Anhand von Studien zeigte sich in den letzten Jahre, dass die Inhibitoren von NF- κ B auch eine entscheidende Rolle bei der NF- κ B abhängigen transkriptionellen Regulation in Form von Co-Faktoren im Zellkern einnehmen (Bates and Miyamoto 2004).

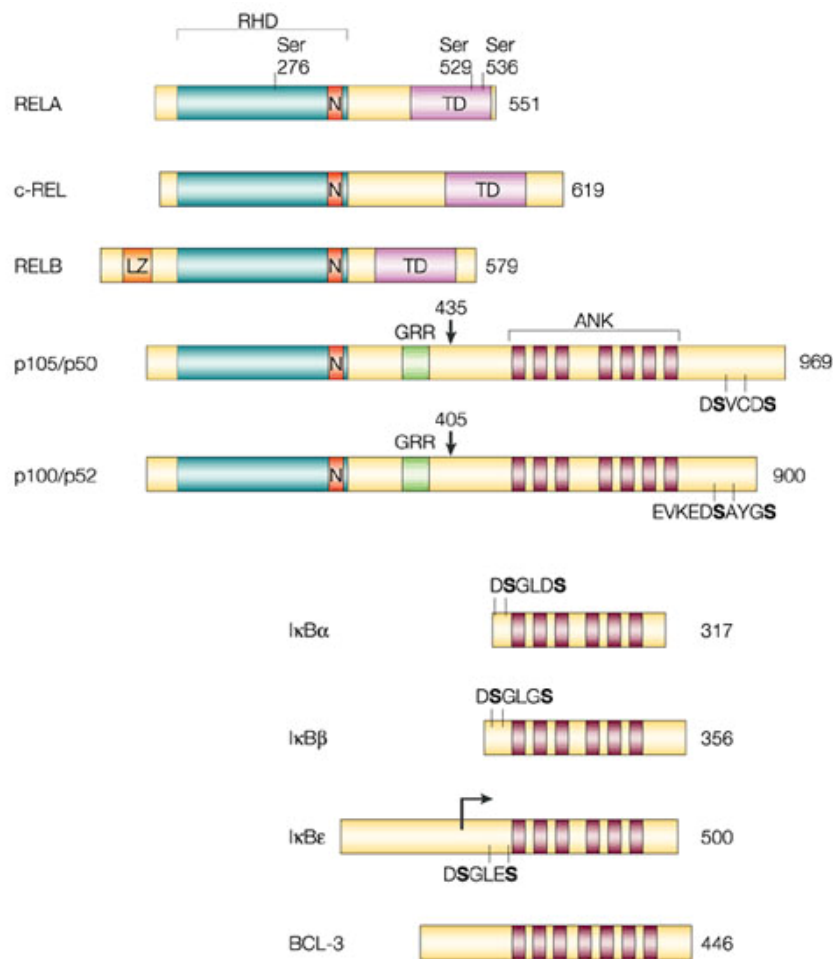


Abb. 4 NF-κB und IκB-Protein Familie

Alle NF-κB-Proteine besitzen die so genannte Rel-Homologie Domäne (RHD), die für die Dimerisierung, die nukleäre Lokalisation, sowie die DNA-Bindung von Bedeutung ist. Die Proteine cRel, RelA/p65 und RelB besitzen zudem eine nicht-homologe Transaktivierungsdomäne (TD). RelB enthält zusätzlich ein Leucin-Zipper Motiv (LZ). Die Proteine p100 und p105 enthalten am N-Terminus die RDH Domäne und am C-Terminus die sogenannten Ankyrin repeats, die der Interaktion dienen. Durch proteolytische Spaltung kommt es zur Bildung von p52 und p50. IκB-Proteine besitzen jeweils 6 bis 7 Ankyrin repeats (ANK). Die Ankyrin repeats der IκB Proteine interagieren mit der Rel-Homologie Domäne und verhindern somit die Translokation der NF-κB Dimere in den Nukleus. (Li and Verma 2002)

Für die nukleär induzierten IκB-Proteine Bcl-3 und IκBζ konnte eine Funktion als Co-Aktivatoren im Komplex mit NF-κB nachgewiesen werden. Für Bcl-3 ergab sich eine Funktion als Co-Repressor für p50 und p52 Dimere (Franzoso, Bours et al. 1992). Im Vergleich zu Bcl-3 konnte für IκBζ nachgewiesen werden, dass nach Stimulation mit LPS neu synthetisiertes IκBζ direkt an der Transkription von NF-κB regulierten Zielgenen beteiligt ist (Yamamoto, Yamazaki et al. 2004). IκBζ^{-/-} Makrophagen wiesen nach LPS Stimulation eine signifikante Reduktion der IL-6 Transkription auf, und anhand von Chromatin Immunpräzipitations Analysen konnte eine direkte Interaktion von IκBζ mit NF-κB am IL-6

Promotor gezeigt werden. Auch für die zytoplasmatischen I κ B-Proteine, wie I κ B α , konnte neben klassischen Funktionen die Beteiligung an der Regulation des Notch Targetgens *hes1* (Aguilera, Hoya-Arias et al. 2004) nach Stimulation gezeigt werden. Des Weiteren konnte I κ B β in einer hyperphosphorylierten Form in einem ternären Komplex aus I κ B β /NF- κ B/DNA nachgewiesen werden (Suyang, Phillips et al. 1996; Weil, Laurent-Winter et al. 1997). Somit ergibt sich für die Familie der I κ B ein neuer regulatorischer Funktionsbereich als Co-Faktor von NF- κ B entweder durch Repression oder Aktivierung der Transkription von NF- κ B-regulierten Genen. Anhand des direkten Agierens im Zellkern scheinen die I κ B-Proteine eine wichtige Rolle bei der Entwicklung sowie der Apoptose einzunehmen.

1.7 I κ B β

Innerhalb der I κ B-Proteinfamilie stellen I κ B α und I κ B β die Hauptisoformen der NF- κ B Inhibitoren dar. Trotz ihrer verschiedenen strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten gibt es große Unterschiede in der Regulation und Funktion zwischen diesen beiden Proteinen. Beim Menschen wurden im Gegensatz zur Maus drei unterschiedliche Splicingvarianten von I κ B β durch Interaktion mit dem Thyroidrezeptor identifiziert, wobei die längere Form eine Homologie zu murinem I κ B β aufweist (Hirano, Chung et al. 1998). Die Klonierung und Charakterisierung des murinen I κ B β erfolgte 2000 (Budde and Ghosh 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass das murine Protein einen Promoterbereich von 349 kb umfasst und die cDNA eine Größe von 1.3 kb aufweist.

I κ B β liegt ubiquitär vor und konnte im Immunsystem, Intestinaltrakt, Gehirn, sowie in den Testis nachgewiesen werden. I κ B α und I κ B β werden beide nach Stimulation abgebaut und enthalten konservierte Serin- und Lysinreste am N-Terminus, sowie eine PEST-Sequenz am C-Terminus (Thompson, Phillips et al. 1995). Bezüglich der Degradation unterscheiden sich beide I κ B Proteine deutlich. I κ B α wird nach Stimulation sehr schnell abgebaut, und die Resynthese erfolgt abhängig von NF- κ B. Anschließend transloziert I κ B α in den Nukleus, löst die DNA/NF- κ B Bindung und exportiert NF- κ B zurück ins Zytoplasma. Die Regulation von I κ B β erfolgt im Gegensatz zu I κ B α unabhängig von NF- κ B. Es konnte zwar eine κ B Sequenzen sowohl in der humanen als auch in der murinen I κ B β Promotorsequenz gefunden werden (Budde, Wu et al. 2002). Allerdings zeigte sich in humanen Zellen, dass eine Bindung von p65 an die Promotorsequenz von I κ B β nach Stimulation mit IL-1 β unzu-

reichend für eine Expression von I κ B β ist (Griffin and Moynagh 2006). Zudem wird I κ B α durch alle bekannten Stimuli, wie LPS, TNF- α und IL-1 induziert, abgebaut und somit NF- κ B aktiviert (Tran, Merika et al. 1997), im Gegensatz zu I κ B β , dessen Proteolyse durch sehr wenige Stimulatoren abhängig vom Zelltyp erfolgt. Nach Stimulation wird I κ B β sehr langsam abgebaut. Abhängig vom Zelltyp und vom Stimulus wird I κ B β einer anhaltenden Degradation unterzogen, was eine längere NF- κ B Aktivierung zur Folge hat (Sun, Ganchi et al. 1993; Klement, Rice et al. 1996; Hoffmann, Levchenko et al. 2002). I κ B α hingegen ist für eine schnelle aber auch kurze Aktivierung von NF- κ B verantwortlich. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass I κ B α /NF- κ B Komplexe in unstimulierten Zellen in der Lage sind zwischen Zytoplasma und Nukleus zu „shutteln“. I κ B β /NF- κ B Komplexe dagegen sind nicht in der Lage in unstimulierten Zellen in den Zellkern zu translozieren. Es zeigte sich bei Röntgenstrukturanalysen der I κ B β /NF- κ B Komplexe, dass gebundenes I κ B β die Nukleus-lokalisationssequenz (NLS) von NF- κ B-Dimere bedeckt und somit die Translokation in den Zellkern verhindert. Bei der Bindung von I κ B α an NF- κ B bleibt eine NLS der beiden Dimere frei und somit ist eine Translokation der I κ B α /NF- κ B Komplexe in den Zellkern in unstimulierten Zellen möglich (Huxford, Huang et al. 1998; Jacobs and Harrison 1998; Malek, Chen et al. 2001). Das „shutteln“ vom Zellkern zurück in das Zytoplasma wird durch das so genannte „nuclear export signal“ (NES) innerhalb von I κ B α und p65 begünstigt (Arenzana-Seisdedos, Turpin et al. 1997; Harhaj and Sun 1999; Johnson, Van Antwerp et al. 1999; Hoffmann, Leung et al. 2003). Diese NES Sequenz findet sich nicht bei I κ B β . Neusynthetisierten I κ B β ist am C-Terminus unphosphoryliert, und es wird vermutet, dass dies zu einer Konformationsänderung von I κ B β /NF- κ B Komplexen führt und somit eine Translokation von I κ B β /NF- κ B in den Zellkern ermöglicht. I κ B β ist außerdem in der Lage in hypophosphorylierter Form mit I κ B α um die NF- κ B Bindung zu konkurrieren, es ist aber nicht in der Lage NF- κ B von der DNA zu lösen (Suyang, Phillips et al. 1996; DeLuca, Petropoulos et al. 1999). In WEH231 B-Zellen konnte eine hypophosphorylierte Form von I κ B β nachgewiesen werden, die in der Lage ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus stabile Komplexe mit p65/cRel Komplexen zu bilden. Zudem konnte eine direkte Bindung dieses ternären Komplexes an spezifische κ B-Stellen nachgewiesen werden (Suyang, Phillips et al. 1996; Phillips and Ghosh 1997). Anhand von Kristallstrukturanalysen eines ternären Komplexes aus p65/I κ B β /NF- κ B/DNA konnte gezeigt werden, dass dieser zum einen eine sehr starke Ähnlichkeit zur Kristallstruktur des

p65/p50 I κ B α /NF- κ B/DNA Komplexes aufweist und zum anderen wurde angenommen, dass die p65/I κ B β -Komplexe in der Lage sind NF- κ B spezifische Promotoren zu binden und transkriptionell zu regulieren, so ähnlich wie dies bei Bcl-3/p50 oder Bcl-3/p52 Komplexen beobachtet werden kann (Franzoso, Bours et al. 1992; Bours, Franzoso et al. 1993). Bislang wurde der Phänotyp für I κ B β Knock-out Mäuse noch nicht beschrieben, allerdings wurde eine I κ B β Knock-in Maus generiert, bei der I κ B β unter der Kontrolle des I κ B α Promoters exprimiert wird. Die Mäuse zeigen keine embryonale Letalität, die normalerweise bei I κ B α Knock-out Mäusen am 13 Tag postnatal eintritt (Cheng, Ryseck et al. 1998). Dies hat gezeigt, dass überlappende Funktionen zwischen diesen beiden Proteinen besteht, jedoch scheinen beide Proteine unterschiedlich wichtige Rollen innerhalb des Organismus bei der Regulation von NF- κ B einzunehmen. *In vitro* Daten in den vergangenen Jahren ergaben Einblicke in die Biochemie von I κ B β . So konnte gezeigt werden, dass die Degradation von I κ B β sehr stark abhängig vom Stimulus sowie vom Zelltyp ist. LPS, TNF- α und PMA aktivieren den Abbau von I κ B β , wohingegen IL-1 und INF- γ keinen Einfluss auf die Aktivierung von I κ B β haben (Thompson, Phillips et al. 1995; Johnson, Douglas et al. 1996; Weil, Laurent-Winter et al. 1997). Die Funktion von I κ B β wurde in Endothelzellen (Johnson, Douglas et al. 1996), B-Zellen (Suyang, Phillips et al. 1996; Phillips and Ghosh 1997; Doerre and Corley 1999), T-Zellen (Harhaj, Maggirwar et al. 1996), Peritonealmakrophagen (Velasco, Diaz-Guerra et al. 1997), Leberzellen (Fan, Li et al. 2004), in Nervenzellen, sowie Kolonepithelzellen (Wu and Ghosh 1999) untersucht. Es hat sich gezeigt, dass I κ B β in der Lage ist mit Retinoidrezeptoren im Zellkern zu interagieren und somit die durch Retinsäure aktivierte Gentranskription gehemmt wird, was eine NF- κ B unabhängige Funktion von I κ B β denkbar macht (Na, Kim et al. 1998).

Bisherige *in vivo* Daten stammen von Thymus-spezifischen Mäusen. Dabei wurde mutiertes nicht mehr degradierbares I κ B β unter der Kontrolle des *lck* Promotors in T-Zellen exprimiert (Attar, Macdonald-Bravo et al. 1998). Es zeigte sich, dass mutiertes I κ B β die NF- κ B Aktivität nach der Degradation von I κ B α in den T-Zellen blockiert, und es konnten Störungen in den peripheren T-Zellen und in der Stimulation und Proliferation nachgewiesen werden.

1.8 Zytokine - Mediatoren des Immunsystems

Zytokine stellen eine Gruppe von zuckerhaltigen Proteinen im Organismus dar, die der Kommunikation und Interaktion zwischen Zellen dienen. Sie nehmen bei der Induktion und Regulation von Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle ein. Nach Stimulation des Immunsystems, wie zum Beispiel durch Lipopolysaccharide werden Zytokine vermehrt synthetisiert.

Tabelle 1 Einige wichtige Zytokine

Zytokin	Herkunft	Wirkung
Interleukin 1	Makrophagen, B-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, NK-Zellen, Granulozyten	Klassisches proinflammatorisches Zytokin, Stimulation der Makrophagen und Neutrophilen, Endothelaktivierung, Fieber
Interleukin 6	T-/B-Zellen; Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten	Proliferation und Ausreifung der T- und B-Zellen, Induktion zur Produktion der Akute-Phase Proteine in der Leber
Interleukin 8	Stromazellen, Fibroblasten	Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen
Interleukin 10	T-Zellen	Inhibitor der Makrophagenfunktion
Interleukin 12	B-Zellen, Zellen und Granulozyten	Induktion einer Th1 Antwort, proinflammatorisches Zytokin, Induktion der Produktion von Interferon- γ und anderen Zytokinen der NK- und T-Zellen, Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität.
TNF- α	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen	Proinflammatorisches Zytokin, Antitumoreffekte

Zytokine werden in vier Hauptgruppen untergliedert: 1. Interferone, z.B. INF- γ , 2. Interleukine z.B. IL-1, IL-6; 3. Chemokine z.B. Macrophage inflammatory Protein 2 (MIP-

2), MIP- α und 4. Tumornekrosefaktoren z.B. TNF- α , TNF- β . Die Signale werden dabei über spezifische Rezeptoren vermittelt und können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkung haben (Nathan 1987; Vilcek and Lee 1991). Zu der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine werden z.B. IL-1, TNF- α , IL-6 gezählt, welche stimulierend wirken. Die antiinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-4 und IL-12 hingegen wirken hemmend. Neutrophile, natürliche Killerzellen und Makrophagen sind nach Infektion die ersten Zellen, die Zytokine als Mediatoren sezernieren. Die wichtigsten Zytokine nach einer bakteriellen Infektion stellen TNF- α und IL-1 dar. Sie dienen als Hauptmediatoren für die lokale Rekrutierung von phagozytotischen Zellen. Zusammen mit IL-6 kommt es zu einer systemischen Antwort, die zur Eliminierung der Bakterien führt. Neben ihrer schützenden Funktion haben Zytokine zudem die Aufgabe spezifische regulatorische Antworten zu lenken. So können z.B. TNF- α , IL-1, IL-18, IL-12 und IL-10 direkt die Zellvermittelte Immunantwort regulieren, indem sie das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen beeinflussen (Oberholzer, Oberholzer et al. 2000). IL-1 und TNF- α haben als Mediatoren der angeborenen Immunantwort einige gemeinsame biologische Eigenschaften (Dinarello 2000). Zum einen werden beide Zytokine am Ort der Entzündung sezerniert, zum anderen verstärken sie gegenseitig ihre biologische Wirksamkeit. TNF- α dient in niedrigen Konzentrationen der autokrinen und parakrinen Regulation von Entzündungsreaktionen im Gewebe. Zudem erfolgt die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, sowie der Aktivierung von eingewanderten Leukozyten, durch deren weitere Zytokinausschüttung es zur Akkumulation von Entzündungsherden am Ort der Inflammation kommt (Vassalli 1992). Wird TNF- α vermehrt ausgeschüttet, kann es in den Blutkreislauf gelangen und dort systemisch wirken. Dies hat u.a. durch Temperatursollwertverstellung im Hypothalamus eine Fieberinduktion zur Folge. Zudem wird die Ausschüttung weiterer Zytokine wie IL-1 und IL-6 induziert, was zu einer veränderten Proteinsynthese in den Hepatozyten der Leber führt. Ist die Ausschüttung von TNF- α zu massiv, kann es zu einer verminderten Gewebepfusion und zu schweren Gerinnungsstörungen kommen, die bis zum septischen Schock führen können (Vassalli 1992; Hack, Aarden et al. 1997). IL-1 wirkt mit seinen zwei Isoformen IL-1 α und IL-1 β synergistisch mit TNF- α . Diese beiden Zytokine werden als 31 kDa Vorläuferproteine synthetisiert (Dinarello 1996). Während pro-IL-1 α biologisch aktiv sein kann und im Zytosol der Zelle verbleibt, ist pro-IL-1 β erst nach proteolytischer Spaltung biologisch aktiv. Zusammen mit TNF- α verstärkt sich dessen Effekt auf die Gerinnung, den Zellmetabolismus, die Fieberinduktion und die Expression von Adhäsionsmole-

külen. Außerdem wird die Synthese von IL-6 und weiteren wichtigen Entzündungsmediatoren durch TNF- α und IL-1 reguliert (Dinarello 2000). Weiterhin wird die Hämatopoese, sowie die Ausreifung von Lymphozyten von IL-1 stimuliert. IL-6 stellt den wichtigsten Mediator für die Synthese von Akut-Phasen Proteinen dar (Kishimoto, Akira et al. 1995). Dabei erfolgt die Synthese von IL-6 durch TNF- α und IL-1, wobei durch einen negativen feedback die Synthese von IL-1 blockiert wird. IL-6 ist außerdem ein Wachstumsfaktor für B-Zellen und ein wichtiger Vermittler für das erworbene Immunsystem (Hirano, Akira et al. 1990). IL-6 scheint neben seiner proinflammatorischen Funktion auch antiinflammatorische Wirkung zu haben; durch seine Eigenschaft wird die Expression von TNF- α herunterreguliert (Tilg, Trehu et al. 1994). Antiinflammatorische Zytokine, zu denen IL-4, IL-10 und IL-13 gezählt werden, wirken einer übermäßigen Stimulation entgegen indem sie die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen vermindern und die Aktivierung von Entzündungszellen hemmen. Obwohl Zytokine eine wichtige Rolle bei der Abwehrreaktion einnehmen, können sie bei zu hoher Sekretion und bei Eintreten in den Blutkreislauf, veranlasst durch bakterielle Bestandteile, verheerende Folgen für den Organismus zeigen, die letztendlich zur schweren Sepsis oder dem septischen Schock führen können. Dabei werden parallel mehrere Kaskaden aktiviert, die zur Gerinnungsaktivierung, Permeabilitätsstörungen und Mikrozirkulationsstörungen und schließlich zur Gewebshypoxie und so zum Organversagen führen.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die detaillierte Untersuchung der $I\kappa B\beta^{-/-}$ Mauslinie, die im Rahmen der Dissertation von Bettina Klein generiert wurde. Die Mäuse sollten einer Injektion mit LPS unterzogen werden, um festzustellen, ob $I\kappa B\beta$ eine essentielle Rolle im angeborenen Immunsystem bei der Abwehr von Infektionen einnimmt. Dabei sollte eine Beteiligung von $I\kappa B\beta$ bei der Regulation der Expression von Zytokinen *in vivo* und *in vitro* in isolierten Kupfferzellen, sowie in Knochenmarksmakrophagen untersucht werden. Anhand dieser Analysen sollte ein von $I\kappa B\beta$ reguliertes Zielgen identifiziert werden. Eine weitere Aufgabe bestand darin, festzustellen auf welcher regulatorischen Ebene $I\kappa B\beta$ die Expression des identifizierten Gens kontrolliert, und wie NF- κ B an der Genregulation transkriptionell beteiligt ist. Schließlich sollte der Einfluss bzw. die Beteiligung von $I\kappa B\beta$ auf die DNA-Bindung von NF- κ B und auf die durch NF- κ B induzierte Aktivierung des Zielgens untersucht werden. Außerdem sollte zur weiteren Untersuchung der Funktionalität von $I\kappa B\beta$ ein *in vitro* Model mittels siRNA etabliert werden, um damit den direkten Einfluss von $I\kappa B\beta$ auf das Zielgen zu analysieren. Zusammengefasst sollte eine Funktion von $I\kappa B\beta$ in einem *in vivo* relevanten Regulationsmechanismus des murinen Immunsystems beschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoreseapparatur	Hofer
Bakterienschüttler Certomat	Termoshake
Elektroblot-Kammer für Western-Blot	Biometra
Elektrophoreseapparaturen	Hofer/Pharmacia
ELISA-Reader:	SLT Spectra
Entwicklermaschine	Amersham Bioscience
Heizblöcke	Eppendorf
Homogenisator	Polytron PT 3100, Kinematica AG
Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Imagemaster	QuantityOne, BioRad
Luminometer Mumat LB 9501	Berthold
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Odyssey Infrared Imaging System	Licor
Photometer	NanoTrop NP-10, Peqlab
pH-Meter	WTW
Pipetten	Eppendorf
Plastikmaterial für Zellkultur	Greiner
Spannungsgeräte	Hofer/Pharmacia
Sterilbank	Heraeus
Taqman	ABI Prism, 7700 Sequence Dector
Thermocycler	Biometra
Waagen/Feinwaage	Sartorius
Westernblottapparatur	Biometra
Zellkultur Inkubatoren	Heraeus
Zentrifugen	Heraeus, Eppendorf

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Chemilumineszenzfilme	Amersham Bioscience
Blottingpapier	Whatman
Immobilon™.P	Millipore
Einfrierröhrchen	Nunc
Einmalpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Falcon, Greiner
Einmalspitzen	Becton Dickinson
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt
Pipettenspitzen	PEQLab
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße für PCR	Biozym
Zellkulturschalen	Falcon/Becton Dickinson
Zellschaber	Greiner
Spritzen	Single use syringes, Codan
Kanülen	27G x 3/4“, BD Biosciences

2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen Biochrom KG (Berlin), Boehringer (Mannheim), BioRad (München), Difco (Detroit, MI, USA), Fluka (Neu.Ulm), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Amersham/Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Häen (Seelze, Deutschland), Roth (Karlsruhe), Seromed (Berlin), Serva (Heidelberg), Sigma (Grünwalden), USB (über Amersham, Braunschweig), Delta.Pharma (Pfullingen) bezogen. Alle Chemikalien trugen den Reinheitsgrad 'p.a.' oder 'reinst'.

2.1.4 Antikörper und ELISA-Kits

Tabelle 2 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper				
Spezifität	Spezies	Verwendung	Bezeichnung und Artikelnummer	Hersteller
RelAp65	Kaninchen	WB ChIP	C-20 sc-372	Santa cruz
c-Rel	Kaninchen	WB ChIP	C-Rel (C) Sc-71	Santa cruz
NF-κBp50 und p105	Ziege	WB ChIP	C-19 Sc-1190	Santa cruz
NF-κBp52 und p100	Kaninchen	WB ChIP	K-27 Sc-298	Santa cruz
IκBα	Kaninchen	WB ChIP	C-21 Sc-371	Santa cruz
IκBβ	Kaninchen	WB ChIP	C-20 Sc-945	Santa cruz
IκBε	Kaninchen	WB	M-364 Sc-7155	Santa cruz
IL-1β	Mouse	WB, IHC	Detektion- Antikörper aus ELISA Duo set (DY 401)	R&D Systems
Pol II	Kaninchen	ChIP	N-20 Sc-899	Santa cruz
Antikörper für die Ladungskontrolle				
β-Aktin		WB	Monoclonal anti β-Actin A 5316	Sigma-Aldrich
α-Tubulin		WB	Monoclonal An- ti-α-Tubulin T6199	Sigma-Adrich
Sekundäre Antikörper				
FITC-Antikörper		Immunfluoreszenz		Invitrogen
Anti-rabbit-biotinylated		ICH	BA-9200	Vector Laborato- ries
Alexa Fluor 680 goat		WB	A21109	Molekular Probes
Alexa Fluor 680 rabbit		WB	A21058	Molekular Probes

Die verwendeten Elisa-Kits zur Bestimmung der murinen Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6 und MIP-2 wurden von R&D Systems bezogen.

2.1.5 Enzyme

Tabelle 3 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Sigma
Reverse Transcriptase (Superscript)	Applied Biosystems
Taq Polymerase	Sigma
QIATaq	QIAGEN
DNase	QIAGEN

2.1.6 Plasmide

Zum Anziehen der jeweiligen Plasmide wurde der Bakterienstamm Top 10 von Invitrogen verwendet.

Tabelle 4 Verwendete Plasmide

Verwendung	Plasmid	Herkunft
Luziferase-Reporter Plasmide	pGL3 Basic	Promega
Mutagenese der IL-1 β Promoter-sequenz	pBluescript II	Stratagene

2.1.7 PCR-Primer und Oligonucleotide

Die folgenden Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert:

Tabelle 5 Primer zur Genotypisierung von $I\kappa B\beta^{-/-}$, $I\kappa B\beta^{-/+}$ und $I\kappa B\beta^{+/+}$ Mäusen

Bezeichnung	Sequenz
Wildtyp-Allel	5'-GAGCCCTTCCTGGATTTC-3'
	5'-CCTCAAACCTCACACCCACTG-3'
Mutiertes Allel	5'-TGACCCACCGCCCGCATGT-3'
	5'-CCTCAAACCTCACACCCACTG-3'

Tabelle 6 Primer für die *in vitro*-Mutagenese der κB -Stellen in der upstream vom IL-1 β Promoter gelegenen Region

Zielgen	Sequenz	Bezeichnung
Mutation der $\kappa B1$ Stelle	5'-CATTCTTCTAACGTGTTGGAATCCA GTATTTTAATGTGGAC-3'	mut $\kappa B1$ -FP
	5'-GTCCACATTAATAACTAGATTCC AACACGTTAGAAGAATC-3'	mut $\kappa B1$ -RP
Mutation der $\kappa B2$ Stelle	5'-CCCATTTATCCATCTGTAAGTG TTAGGAGCCCTAACTTAAGTAG-3'	mut $\kappa B2$ -FP
	5'-GTACTIONTTAGGGTATAATGGG GGCTCTCAACACTTACAGAT-3	mut $\kappa B2$ -RP

Tabelle 7 Primer für die Echtzeit-RT-PCR

Zielgen	Sequenz	Bezeichnung
Interleukin 1 β	5'-CTCAATGGACAGAATATCAACCAACA-3'	IL-1 β F
	5'-ACAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTTG-3'	IL-1 β R
Interleukin-6	5'-TCGGAGGCTTAATTACACATGTTCT-3'	IL-6 F
	5'-GCATCATCGTTGTTTCATACAATCA-3'	IL-6 R
TNF- α	5'-ATGAGAAGTTCCCAAATGGCC-3'	TNF- α F
	5'-TCCACTTGGTGGTTCGCTACG-3'	TNF- α R
Cyclophilin	5'-ATGGTCAACCCACCGTGT-3'	Cyclo-F
	5'-TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTGTC-3'	Cyclo-R

2 Material und Methoden

Tabelle 8 Verwendete Oligonucleotide für ChIP-PCR

Zielgen	Sequenz	Bezeichnung
IL-1 κB1	5'-TCCCTGGAAGTCAAGGGGTGG-3'	ChIPmILbeta3F
IL-1 κB1	5'-TCTGGGTGTGCATCTACGTGCC-3'	ChIPmILbeta4R
TNF-alpha	5'-TCCCTCCTGGCTAGTCCCTTGC-3'	ChIPmTNFa-1R
	5'-AGGGCCACTACCGCTTCCTCC-3'	ChIPmTNFa-2F
MIP-2	5'-CAAACAGTGTACTTACGCAGACG-3'	MIP2-ChIP-for
	5'-CTAGCTGCCTGCCTCATTCTAC-3'	MIP2-ChIP-rev

Tabelle 9 Oligonukleotide für Streptavidin-Biotin *Pull Down*

Bezeichnung	Sequenz	
IL-1 β κB1	5'-AACCAGGAAAACCCAATATTT-3'	Bio-IL1b-3

Tabelle 10 Verwendete siRNA

Bezeichnung	Sequenz
IκBβ	5'-GACUGGAGGCUACAACUAG-3'
cRel	5'-AUAGCAUGUUGACAUCAGAUACU-3'
Kontroll-siRNA	5'-AACAGTCGCGTTTGCGACT-5'

2.1.8 Kits

Tabelle 11 Verwendete Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Plasmid-Präparation für Klonierungen	Plasmid Mini/Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid-Präparation für Transfektionen	EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
<i>In vitro</i> -Mutagenese	QuikChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNA-Isolierung aus der Leber	RNasy Mini Kit	QIAGEN
RNA-Isolierung aus Knochenmarksmakrophagen	RNasy Mini Kit	QIAGEN

und Raw264.7 Makrophagen

Proteinmessung (nach Bradford)	Bio-Rad Protein Assay	BioRad
Nukleäre Extrakte	Nuclear Extraction kit	Active Motif
Luziferase-Assey	Luciferase Assay System	Promega

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung		
PBS	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄
			pH 7,4
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50%	(v/v)	Phenol pH 8,0
	48%	(v/v)	Chloroform
	2%	(v/v)	Isoamylalkohol
TE-Puffer	10	mM	Tris pH 8,0
	1	mM	EDTA
Proteinase K	10 mg/ml in H ₂ O _{bidest} gelöst		
10x TAE-Puffer	0,4	M	Tris pH 8,0
	0,01	M	EDTA
	0,2	M	Eisessig
L1-Puffer (ChIP-Assay):	50	mM	Tris pH 8,0
	2	mM	EDTA pH 8,0
	0,1%		NP-40
	10%		Glycerol
L2-Puffer (ChIP-Assay):	50	mM	Tris pH 8,0

2 Material und Methoden

	5	mM	EDTA pH 8,0
	1%		SDS
Dilutionspuffer (ChIP-Assay):	50	mM	Tris pH 8,0
	0,5	mM	EDTA
	0,5%		NP-40
	200	mM	NaCl
Hochsalzpuffer (ChIP-Assay):	20	mM	Tris pH 8,0
	1%		EDTA
	500	mM	NaCl
	0,1%		SDS
LiCl-Puffer (ChIP-Assay):	20	mM	Tris
	1	mM	EDTA
	0,5%		NP-40
	250	mM	LiCl
	0,5%		Na-deoxycholat
Niedrigsalz-Puffer (ChIP-Assay):	10	mM	Tris pH 8,0
	1	mM	EDTA
Elutions-Puffer (ChIP-Assay):	10	mM	Tris pH 8,0
	1	mM	EDTA
	1%		SDS
Bindepuffer (Pull-down)	12%		Glycerol
	4	mM	Tris pH 7,9
	150	mM	KCl
	12	mM	HEPES
	1	mM	DTT
	10	µg	poly (dA-dT)
Immunpräzipitationspuffer:	15	mM	HEPES pH 7,9
	150	mM	NaCl
	01	mM	EDTA
	0,5%		NP-40
	10%		Glycerol

2 Material und Methoden

10xTBS	200	mM	Tris pH 7,6
	1,37	M	NaCl
Ethdiumbromid	1	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	
Puffer A (nukleäre Extrakte)	10	mM	Hepes pH 7,9
	10	mM	KCl
	0,1	mM	EDTA
	0,1	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	0,5	mM	PMSF
Puffer C (nukleäre Extrakte)	20	mM	Hepes pH 7,9
	0,4	mM	NaCl
	0,1	mM	EDTA
	0,1	mM	EGTA
	1	mM	DTT
	5	mM	PMSF
Unmasking Solution (IHC)	10	mM	Tris-Base
			pH 10
	0,05%		Tween20

2.2.2 Medien für Bakterienkulturen

Für die Kultivierung von *E.coli* wurde ausschließlich autoklaviertes (121°C/2 bar/20min) Luria-Bertani (LB) Vollmedium verwendet. Um das Festmedium zu erhalten, wurden vor dem Autoklavieren pro Liter Medium 12 g Agar zugegeben. Die Anzucht der Bakterien erfolgte unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C, Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben inkubiert. Die so gezogenen Bakterien wurden durch zentrifugieren bei 6000 rpm für 10 min bei 4 °C gewonnen.

LB-Medium	10	g/l	Trypton
	5	g/l	Hefeextrakt
	10	g/l	NaCl
			pH 7,5
LB-Festmedium	40	g/l	Bactoagar

2 Material und Methoden

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml

Zur langfristigen Lagerung wurden die Bakterienkulturen mit 50 % Gyzerin vermischt und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Medien für Zellkultur

Tabelle 12 Verwendete Zellkulturmedien

Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien			
Zelltypen			
RAW264.7	Kupfferzellen	Knochenmarks- makrophagen	L929-Fibroblasten
Grundmedium			
DMEM-Medium	RPMI-Medium	Pluznik-Medium	RPMI-Medium
Zusätze			
10% FCS	10% FCS	RPMI-Medium	10%FCS
1% P/S	1% P/S	20 % FCS	1 % P/S
		10% M-CSF	
		5 % Pferdeserum	
		1% P/S	

Das Grundmedium RPMI 1640 für die Kultivierung der Knochenmarksmakrophagen und Kupfferzellen wurde von der Firma Sigma bezogen. Alle anderen verwendeten Grundmedien und Zusätze von der Firma Invitrogen. Die Zusätze FCS und Pferdeserum für die Kultivierung der Knochenmarksmakrophagen wurden von der Firma PAA bezogen. Der Wachstumsfaktor M-CSF wurde als Kulturüberstand des M-CSF produzierenden Klons L292 zugesetzt.

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.3.1 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet

Tabelle 13 Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E.coli</i> TOP 10	<i>mcrA</i> Δ (<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

2.3.2 Zelllinien

Tabelle 14 Verwendete Zelllinien mit Herkunftsangaben

Zelllinie	Gewebe	Spezies/Herkunft
L292	Fibroblasten	Maus/DSM ACC 2, Dt. Sammlung von Mikroorg. Und Zellkulturen, Braunschweig
RAW264.7	Makrophagen	Maus/ ATCC; LGC Promochem GmbH, Wesel

2.3.3 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im Klinikum rechts der Isar in spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten. Die Generierung der I κ B β Deleter Mäuse erfolgte im Rahmen einer Dissertation von Bettina Klein an der Universität Ulm, Abteilung Innere Medizin I. Dabei wurde ein *ikkb*-Rekombinationsvektor generiert wobei die Gen-Inaktivierung von *ikkb* mittels des Cre-lox-Systems durch flankierende loxP-Sequenzen zwischen Intron 3 und Intron 5 erlangt wurde. Dies hatte zur Folge, dass die Exons 4 und 5 gewebespezifisch deletiert werden konnten. Als Blastozytenspender dienten C57BL/6 Mäuse. Zur Eliminierung von I κ B β wurden die Tiere mit einer Deleter-Cre Maus verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV)-Promotors in allen Zellen zu allen Zeitpunkten produziert. Der erlangte Phänotyp wurde mittels Southernblot und Western-Blot Analysen untersucht.

2.4 Plasmidvektoren

2.4.1 Verwendete Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten IL-1 B Promoter Luziferase-Konstrukte wurden in der Universität Ulm, Abteilung für Innere Medizien I hergestellt. Bei der Klonierung der jeweiligen Luziferase Konstrukte wurden verschiedene Längen des humanen Interleukin-1 β Promotors über Schnittstellen in den Vektor pGL3-Basic kloniert.

Tabelle 15 Verwendete Luciferase-Konstrukte

Bezeichnung der Konstrukte	Länge/Funktion
-518-IL1B-Luc	518 bp des IL-1B Promoters / 2 funktionelle κ B-Sites
-399-IL1B-Luc	399 bp des IL-1B Promoters / 1 funktionelle κ B-Sites
-133-IL-1B-Luc	133 bp des IL-1B Promoters / ohne funktionelle κ B-Sites

2.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen κ B-Stellen (κ B1 und κ B2) in den Plasmiden -518-IL1B-Luc und -399-IL1B-Luc mittels QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit und den in Tabelle.5 angegebenen Primern durch *in-vitro* Mutagenese deletiert (siehe 2.6.3).

2.5 ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Der Assay beruht auf einer quantitativen *Sandwich* Enzym-Immunoassay Technik und wurde nach den Angaben des Hersteller (R&D Systems) durchgeführt. Dabei wurden mit spezifischen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, in die die Standards und Proben pipettiert wurden. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit und mehreren Waschschritten, um die ungebundenen Antkörper zu entfernen, wurde ein Enzym-gekoppelter sekundärer Antikörper dazugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsperiode und mehreren Waschschritten wurde die Substratlösung dazu pipettiert und inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach 20 Minuten abgestoppt und die Proben bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen und ausgewertet. Es wurden die folgenden Zytokine mit den entsprechenden Kits von R&D Systems gemessen: IL1 β , IL-6, MIP-2, TNF- α und die Messwerte anschließend mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.6 Histologische Methoden

2.6.1 Hämatoxylin-Erythrosin (HE) Färbung von Gewebeschnitten

Die in 4% Formalin fixierten Organe wurden zu Paraffinschnitten weiterverarbeitet und anschließend 2,5 μ m dicke Schnitte angefertigt. Zunächst wurden die Präparate mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert (je 2x5 min 99%Alkohol, 96% Alkohol, und 76 % Alkohol). Danach folgte das Anfärben der Schnitte in einem Hämatoxylin-Bad (Merck). Dazu wurden die Schnitte 30-45 sek inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Nach dem Färben mit Eosin (Merck) (45 sek) wurden die Präparate wiederum unter fließendem Wasser gespült. Anschließend folgte das Entwässern der Gewebeschnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2x 1 min 70% Alkohol, 96% Alkohol, 99% Alkohol und Rotihistol (Merck)) und die Beschichtung der Schnitte mit einem Tropfen Per-tex (Medite GmbH) sowie einen Deckglas.

2.6.2 Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der nukleären Lokalisation von I κ B β wurde Knochenmarksmakrophagen auf Plastikobjektträgern (Lab-Tek Chamber Slide Systems, Nunc) 24 Stunden kultiviert und anschließend für eine Stunde mit LPS stimuliert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4% Formaldehyd (15 min). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0.3% Triton X-100 für 10 min behandelt. Geblockt wurde zunächst mit 3% BSA für 30 min. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte in 3% BSA über Nacht, dazu wurden die jeweiligen Antikörper verdünnt, p65 1:500; I κ B β 1:200 und I κ B α 1:150. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 3% BSA mit einem FITC-markierten (Fluoreszein) sekundären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgten nochmals drei Waschschrte mit PBS. Vor der Versiegelung mit Deckgläschen wurden die fixierten Zellen mit DAPI-Farbstoff-haltiger, fluoreszenzverstärkender und -schützender Lösung Vectashield (Vector Laboratories) überdeckt. Die DAPI (4'-6'-diamidino-2-phenyllindol)-Färbung diente zur Co-Lokalisation bzw. Färbung der Nuklei. DAPI wurde in der Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop, Axiophot (Zeiss) analysiert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid DNA für Klonierungen und Sequenzierungen wurde je nach Menge der benötigten DNA, mittels Mini- oder Maxi-Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen isoliert. Die DNA-Isolierung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

2.7.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Gelen aus Agarose, deren Konzentrationen je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle zwischen 1-2% Agarose variierte. Nach Aufkochen der Agarose in 1xTAE Puffer wurde das Gel vor dem Gießen auf 55°C abgekühlt. Vor dem Beladen der Proben wurden diese mit einem 6-fach konzent-

rierten Ladepuffer (QIAGEN) versehen. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1xTAE Puffer und Ethidiumbromid gefüllten Horizontalapparatur bei 100 V. Die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte durch UV-Licht (302nm) mit Hilfe eines Geldokumentationssystems. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde ein DNA-Marker mit einer Bandbreite von 100-1000 bp (Qiagen) verwendet.

2.7.3 Mutagenese von Plasmid-DNA

Für die Mutagenese der -399-IL1B-Luc Plasmide wurde die so genannte „Site directed-Mutagenesis“-Methode (Stratagene) zur Deletion innerhalb der Promotersequenz verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Synthese der Mutagenese-Primer (25-45 bp), mit Schmelztemperaturen unter 78°C. Die „Site directed-Mutagenesis“ der Promotorregion erfolgte mit dem wt-399-IL1b-Luc Konstrukt und dem -518-IL-1B-Luc Konstrukt zusammen mit den jeweiligen Oligonukleotiden (siehe Tabelle 5), einem Gemisch aus Nukleotiden und der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase unter folgenden PCR-Bedingungen:

80°C	Pause		
95°C	30 sec		
95°C	30 sec	}	18 x
55°C	1 min		
68°C	5 min		
37°C	Pause		

Nach der Amplifikation erfolgte ein Restriktionsverdau der nichtmutierten, methylierten DNA durch das Restriktionsenzym Dpn I. Nach der Transformation der mutierten Plasmid-DNA in Top10 *E.coli* -Zellen und Inkubation über Nacht wurde die DNA mit dem Mini-Prep-Kit (Qiagen) präpariert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch gezieltes Einfügen von Basenpaarsequenzen für Restriktionsenzyme mit anschließendem Restriktionsverdau und Elektrophorese auf einem Agarosegel kontrolliert. Zusätzlich wurde das Vorhandensein der Mutationen durch Sequenzierung (MWG-Biotech) bestätigt.

2.7.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe und Zellen

Für die Isolierung von RNA aus Makrophagen und Gewebe wurden alle verwendeten Geräte und Materialien mit RNase ZAP (Sigma) vorbehandelt. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Protokolls des RNeasy Kits von Qiagen. Zur Entfernung restlicher genomischer DNA wurde ein DNA-Verdauungsschritt (RNase-free DNase Set, Qiagen) vor dem Waschen und Eluieren der RNA auf den Mini-Kit-Säulen durchgeführt. Die RNA-Sedimente der Organe wurden in 100-200 μl DEPC- H_2O gelöst, die Sedimente der RAW264.7-Macrophagen und der Knochenmarksmakrophagen in je 30 μl DEPC- H_2O . Nach der Konzentrationsbestimmung im Photometer und der Gelkontrolle wurden 1 μg RNA für die reverse Transkription verwendet.

2.7.5 Echtzeit-RT-PCR

1 μg RNA wurden mit dem TaqMan reverse Transcription Reagent Kit (Applied Biosystems) laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Ansatz:

Reagenz	$\mu\text{l}/\text{Ansatz}$
10xRT-Puffer	5
dNTP	11
MgCl_2	10
Hexamere	2,5
RNA-Inhibitor	1
Multiscribe RT (50U/ μl)	1,25
RNA	1 μg
H_2O	x

Die RT-PCR erfolgte nach folgendem Programm:

25°C	10 min
48°C	1h
95°C	5min
4°C	Pause

Zur relativen Quantifizierung der spezifischen mRNA wurde die cDNA mit spezifischen Primern mittels Echtzeit-RT-PCR amplifiziert. Als Kontrolle diente die parallel amplifizierte Cyclophilin-cDNA. Zur Detektion der cDNA Menge wurde der in doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (PE Applied Biosystems) eingesetzt. Die Echtzeit-RT-PCR Bedingungen waren:

50°C	2min		
95°C	10min		
95°C	1min	}	40 x
60°C	15sec		
72°C	1min		

2.8 Affymetrix Chip

Mit Hilfe der Affymetrix Analyse sollte die Expression verschiedener Gene von unstimulierten und stimulierten Knochenmarksmakrophagen untersucht werden. Es wurde der GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array verwendet (enthält ca. 34000 gut charakterisierte Mausgene wichtiger Signalwege sowie Gene für spezielle Targets) von Affymetrix. Die Prozessierung der isolierten RNA erfolgte nach dem von Affymetrix vorgegebenen Protokoll und unter Verwendung der empfohlenen Kits (vgl. GeneChip® Expression Analysis Manual, section 2). Hierbei wurde die zelluläre RNA zunächst durch reverse Transkription in einzelsträngige, dann in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese diente anschließend als Vorlage für eine *in vitro* Transkription zur Synthese biotin-markierter cRNA. Die cRNA wurde fragmentiert und auf dem Chip sequenzspezifisch mit den dort aufgebrauchten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Die Detektion erfolgte im Anschluss durch die Bindung eines Phycoerythrin gekoppelten Streptavidin-Antikörper-Komplexes, dessen Fluoreszenzsignal mit Hilfe des GeneArray Scanner 3000 gemessen wurde. Die Menge an emittiertem Licht ist der Menge an gebundenen cRNA-Fragmenten proportional. Die Array-Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Expressionist Analyst Pro Software.

2.9 Zellkulturmethoden

2.9.1 Herstellung von M-CSF aus L292-Fibroblasten

M-CSF wird für die Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen benötigt und von L929-Fibroblasten unter bestimmten Kultivierungsbedingungen sezerniert. Dazu wurden L929-Fibroblasten in RPMI-1640 Medium (siehe 2.2.3) in kleine Zellkulturflaschen (25 cm², 50 ml, Greiner) angesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz (ca. 3 Tage) erfolgten mehrere Expansionsschritte in mittlere (75 cm², 250 ml) und große Zellkulturflaschen (150 cm², 550 ml). War die gewünschte Zellzahl (8-12 Tage) erreicht, erfolgte das Einengen der L929-Fibroblasten in RPMI1640 Medium mit 1% P/S jedoch ohne FCS in einer Zelldichte von 6×10^7 Zellen/20 ml oder $1,5 \times 10^8$ /50 ml zur Anreicherung des Wachstumsfaktors M-CSF. Der Medienüberstand, der M-CSF enthält, wurde nach 3-4 Tagen Kultivierung bei 3000 rpm, 10 min und 4°C abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Falcon überführt und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.9.2 Isolierung und Kultivierung von Kupfferzellen

Um Kupfferzellen aus der Leber zu isolieren wurden die Mäuse zunächst narkotisiert. Danach erfolgte die Perfusion der Leber mit zunächst ca. 50 ml Hank's balanced salt solution (HBSS) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺. Um die Zellen aus der Leber zu lösen wurde anschließend mit 50 ml HBSS und Kollagenase perfundiert. Danach wurde die Leber in eine Petrischale mit sterilem Williams-Medium überführt und unter der Sterilbank mit Pipettenspitzen zerkleinert, resuspendiert und über einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend wurde bei 1100 rpm 2 min 4°C zentrifugiert, um einen Grossteil der Hepatozyten zu entfernen. Der Überstand mit den Nicht-Parenchymzellen (NPZ) wurde in ein neues Falcon überführt. Um weitere Hepatozyten zu entfernen wurde abermals zentrifugiert (1100 rpm 2 min 4°C). Zur Gewinnung der Nicht-Parenchymzellen wurden die Zellen bei 8000 rpm 10 min 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um die Kupfferzellen von den restlichen Nicht-Parenchymzellen zu trennen, wurde ein Percollgradient verwendet. Dazu wurde aus einer Percoll-Stammlösung ein Gradient aus verschiedenen Percoll-Verdünnungen mit 1x PBS angesetzt, in einem Falcon zunächst 50% Percoll vorgelegt, dieses sehr vorsichtig mit 25% Percoll überschichtet, gefolgt von 10 ml der gewonnenen Zellsuspension. Die Separation der Zellen erfolgte durch Abzentrifugieren bei 8000 rpm 20

min. Die Zellverteilung durch den Percoll-Gradienten nach der Zentrifugation verteilt sich folgenmaßen:

Bodenpellet:	Vor allem noch intakte Hepatozyten, Erythrozyten und Leukozyten
50 %-Percoll-Phase :	Kupfferzell-angereichert und andere NPZ
Interphase:	Endothelzell-angereichert und andere NPZ
25%- Percoll-Phase:	fast keine Zellen
Überstand:	Zelldebris, tote Zellen, wenig NPZ

Die Kupfferzellen waren vornehmlich in der Interphase und der 50% Percoll-Phase vorzufinden. Somit wurden die Phasen bis zur Interphase vorsichtig durch Absaugen entfernt. Die 50%-Percoll-Phase sowie die Interphase wurden in ein neues Falcon überführt, mit PBS verdünnt und bei 8000 rpm 10 min 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 10 ml RPMI resuspendiert und die Zellen gezählt. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen in einer 12 Wellplatte ausplattiert. Nach 15 min erfolgte ein Mediumwechsel, um eine weitere Trennung von Endothelzellen durch selektive Adhärenz zu erreichen. Die Stimulationsexperimente erfolgten 24 h nach Kultivierung.

2.9.3 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen

Zur Isolierung der Knochenmarksmakrophagen aus der Maus wurden die Knochen zwischen Hüft- und Fußgelenk, sowie zwischen Schulter- und Handgelenk herauspräpariert. Dann wurden die Knochen 1-2 min in 70% EtOH zur Desinfektion und anschließend in 4°C kaltem PBS bis zur weiteren Präparation auf Eis gelegt. Zum Ausspülen des Knochenmarks wurden Ellenbogen- und Kniegelenk entfernt. Das Knochenmark wurde mittels Durchspülen der Röhrenknochen mit kaltem PBS, pH 7,0, und einer 10 ml Spritze mit Kanüle Nr. 16 in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4°C, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS gewaschen, gut resuspendiert, 10 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in Pluznik-Medium (65% RPMI1640, 15% FCS, 15% L929-Überstand (siehe 2.2.3), 5% Pferdeserum) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellen in großen 10 cm Bakterien-Petrischalen in einer Dichte von $3.0-3.5 \times 10^6/10$ ml ausgesät und ca. 7 Tage in Pluznik-Medium bei 5% CO₂, 37°C, ohne Me-

diumswechsel kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die adhärenen Zellen mit HBSS (Fa. PAA) ohne Ca/Mg gewaschen, je 4 ml Accutase® (Fa. PAA) auf die Platte pipettiert und bei 37°C ca. 15 min inkubiert, um das Ablösen der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann mit einer 5 ml Pipette abgespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen 5 min bei 1000 g, 4°C, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in Pluznik-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. $2,5 \times 10^7$ Zellen/15 cm Zellkulturschale bzw. 2×10^6 Zellen/6-well wurden für die jeweiligen Versuche ausplattiert.

2.9.4 Kultivierung und Transfektion von RAW264.7 Makrophagen

Für die Transfektion der RAW264.7 Zellen wurden sowohl für die Luziferaseversuche als auch für den *knock down* mit siRNA $1,8 \times 10^5$ Zellen/6 Wellplatte ausplattiert und 24 Stunden lang kultiviert. Vor der Transfektion wurden die Zellen je zweimal mit RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Anschließend wurden 800 µl RPMI-Medium ohne Zusätze vorgelegt und die Zellen zunächst in den Brutschrank zurückgestellt. Der Transfektionsansatz in Transfektionröhrchen für einen Ansatz wurde folgendermaßen durchgeführt:

1facher Ansatz	5 µl siRNA (200 nM) 180 µl Optimem (Invitrogen) 1 µl Plasmid DNA (nur für Luziferase-Assays)
Mastermix 1facher Ansatz	2,5 µl Oligofectamine (Invitrogen) 12,5 µl Optimem

Vor Zugabe des Oligofectamins in den Mastermix wurde der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 15 µl (pro Ansatz) des Mastermixes zum Transfektionsansatz gegeben und für weitere 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen mit 200 µl Transfektionsansatz pro Well. 4 Stunden nach der Transfektion wurde den Zellen 1 ml (pro Well) Medium mit 20% FCS gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit RPMI-Medium (10% FCS und 1% P/S). Stimulationsversuche für ELISA oder Luziferase-Assay wurden 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt.

2.9.5 Stimulation von differenzierten Knochenmarksmakrophagen, Kupfferzellen und RAW264.7 Makrophagen

Für die Stimulationen der Knochenmarksmakrophagen, Kupfferzellen und RAW264.7 Makrophagen mit LPS (Stock 100 ng/ μ l, Endkonzentration 100 ng/ml (1:1000), Sigma) wurden die Substanz nach Lösen in PBS steril aliquotiert und in der entsprechenden Konzentration dem Medium kurz vor Gebrauch zugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte entweder die Zellernte aus 15 cm Platten für die Gewinnung von nukleären und zytoplasmatischen Extrakten, Chromatinimmunpräzipitationen, Western-Blot Analysen oder aus 6-Well für die Echt-Zeit-RT-PCR und ELISA.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Gesamtzell-Proteinextrakte aus kultivierten Knochenmarksmakrophagen

Die kultivierten RAW264.7 Makrophagen, Knochenmarksmakrophagen und Kupfferzellen (2.7.2-2.7.4) wurden nach Absaugen des Mediums zunächst mit 4°C PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 μ l pro 6-Well IP-Puffer. Dabei wurde der IP-Puffer kurz vor Verwendung mit einem Proteaseinhibitor-Cocktail (1/100) versetzt. Die Zellen wurden von der Platte abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß bei 4°C für 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde das Lysat mit 13000 rpm bei 4°C 10 min zentrifugiert, der erhaltene Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.2 Zellkern-Proteinextrakte aus Knochenmarksmakrophagen und RAW267.4 Zellen

Kultivierte Knochenmarksmakrophagen und RAW264.7 Makrophagen auf einer 15 mm Schale stimuliert und nach Entfernung des Medium zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml isotonischem Puffer (Puffer A), wobei die Zellkulturschale auf Eis gestellt wurde. Danach wurden die Zellen von der Schale mit einem Schaber entfernt und in ein Reaktionsgefäß auf Eis überführt und für 15 min inkubiert, um die Osmolyse der Zellen zu gewährleisten. Die Zelllyse erfolgte mechanisch über eine Spritze/Kanüle (27G). Die Zellen wurden 7-8 mal durch auf- und abziehen in einer Spritze

aufgeschlossen und anschließend wurde das Zelllysate bei 3600 rpm 4°C 5 min abzentrifugiert. Der Überstand (zytoplasmatisches Extrakt) wurde vorsichtig vom nukleären Extrakt getrennt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Das nukleäre Extrakt wurde anschließend zweimal mit Puffer A gewaschen. Die Salzextraktion erfolgte durch Zugabe eines Hochsalzpuffers (Puffer C) und die anschließende 30-minütige Inkubation der Proben bei 4°C auf einem Schüttler. Anschließend wurden nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen 15 min bei 13000 rpm 4°C zentrifugiert, der Überstand aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.3 Luziferase-Assay mit transfizierten RAW264.7 Makrophagen

Die transfizierten RAW264.7 Makrophagen (2.7.4) wurden 48 h nach Transfektion mit Plasmiden und siRNA geerntet. Nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde 80 µl pro 6-well Lysepuffer (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, Promega) zugegeben und die Zellkulturplatten 20 min auf einem Schwenker inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C tiefgefroren. Zur Analyse der Luziferase Expression wurden die Lysate nach dem Auftauen 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Messung wurden zu 50 µl vorgelegtem Luziferase-Assay-Reagenz 50 µl der Lysatüberstände zugegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Lumineszenz mittels eines Luminometers bestimmt.

2.10.4 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (PAGE)

Bei dieser Methode werden Proteine unter denaturierten Bedingungen nach ihrer Größe getrennt. Das anionische, amphiphatische Reagenz SDS bindet an das Protein (1 SDS Molekül pro 1.4 Aminosäure) und verleiht ihm somit einen Überschuss an negativer Ladung. Diese Ladung verhält sich nahezu proportional zur Proteingröße wodurch die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wird. Die Proteine können anhand verschiedener Färbemethoden sichtbar gemacht werden. Zunächst wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Zellextrakte mittels Bradford-Assay (BioRad) bestimmt und auf die gewünschte Proteinkonzentration durch eine Verdünnung mit 1x Auftragspuffer (Lämmli 1970) eingestellt, der zur Reduktion von Disulfidbrücken 5% β-Mercaptoethanol enthielt. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen, wurden die Proben für 5 min bei 95°C inkubiert.

2 Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden 10% und 12,5%ige Trenngelle mit 3% Sammelgelen hergestellt. Zur Auftrennung der Proteine wurden 30 mA pro Gel angelegt. Für eine Gelgröße von $10 \times 8 \times 0.075 \text{ cm}^3$ wurden folgende Reagenzien verwendet:

Verwendete Lösungen:

10x Laufpuffer:	250 mM Tris/HCl, pH 8,8, 2 M Glycin, 1% SDS
5x Auftragspuffer: (5x Lämmli)	10% SDS (w/v), 50% Glycerin (v/v), 300 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0.05% Bromphenolblau (w/v), 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Trenngelpuffer (4x):	0.8 % SDS, 5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer (2x):	0.4 % SDS, 0.25 M Tris/HCl, pH 6,8
Acrylamid (40 % w/v):	Acrylamid/Bisacrylamid = 38:2
Zur Polymerisation :	10 % APS (w/v); 50 μ l/Gel 100% TEMED; 10 μ l/Gel

2.10.5 Western-Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden beim Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie später immunospezifisch nachgewiesen werden (Towbin et al., 1979). Das Blotting erfolgte in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Khyse-Anderson, 1984) bei einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 90 Minuten. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der geblotteten Proteine wurde ein Proteinmarker (BioRad) verwendet. Um nicht-spezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Blotten für 30 min in 5% Magermilchpulver in PBS+ 0,1 % NP-40 inkubiert. Danach wurde die Membran für 90 min oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach 3×10 min Waschen mit PBS + 0,1% NP-40 erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 in 5% Magermilchpulver, PBS+ 0,1 % NP-40 verdünntem sekundären IgG Alexa680 gekoppelten Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Netherland) für 45 min. Schließlich wurde zur Entfernung von nichtgebundenem sekundärem Antikörper die Membran abermals 3×10 min in PBS-NP-40 (0,1%) PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System (Licor, Bad Homburg, Germany).

2.10.6 Streptavidin-biotin *Pull Down Assay*

Für den Streptavidin-Biotin *Pull Down Assay* wurden 2×10^7 Zellen pro Platte pro Zeitpunkt ausplattiert und mit LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 5ml kaltem PBS mit Phosphataseinhibitor gewaschen. Das Trennen von zytoplasmatischen und nukleären Extrakten erfolgte mit dem Nuklear Extraction kit (active motif) nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay (BioRad) bestimmt. Für den *Pull Down* wurde für jeden Ansatz 500 μg Protein und 1 μg des 5'gelabelten Oligonukleotids eingesetzt und in Bindepuffer für 20 min bei RT inkubiert. Außerdem wurden 100 μl der Streptavidin-Agarose (Invitrogen) mit 200 μg BSA und 20 μg poly (dA-dT) sowie 20 μg salmon sperm DNA (Invitrogen) bei 25°C für 10 min präabsorbiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 30 μl Streptavidin-Agarose-beads zum Ansatz gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Protein-DNA-Streptavidin-Agarose-Komplexes wurde dieser in 2x Lämmli bei 95°C aufgekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.10.7 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) stellt eine sehr sensitive Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen Protein und DNA dar. Durch die Immunpräzipitation mittels spezifischer Antikörper und anschließender Untersuchung von Promoterbereichen mittels PCR, kann das funktionelle Zusammenspiel zwischen Transkriptionsfaktoren, Cofaktoren und den regulatorischen Elementen der DNA sehr gut untersucht werden.

Für die Chromatin Immun-Präzipitation wurden 2×10^7 Zellen pro 15mm Schale in 30 ml RPMI-Medium für jeden Zeitpunkt ausplattiert. Nach der Stimulation wurde dem Medium 810 μl (Endkonzentration 1% in 30 ml) Formaldehyd zugegeben. Dabei gewährleistet Formaldehyd eine kovalente Bindung der Proteine mit der DNA und der Proteine untereinander. Anschließend wurde 3420 μl 1,25 M Glycin zugegeben und für 5 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimaligem mit kaltem PBS gewaschen, 1 ml L1-Puffer (1:100 Proteaseinhibitor, Sigma) zugegeben und die Zellen mit einem Schaber von der Platte entfernt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit einer Spritze/Kanüle (25 G) mechanisch lysiert und die Zellkerne bei 3600 rpm 5 min, 4°C abzentrifugiert. Das Zytoplasma wurde verworfen und das Zellpellet in 700 μl L2-Puffer (1:100 Proteaseinhibitor) resuspendiert. Das Zerkleinern der

DNA erfolgte mittels Ultraschall, dabei wurden die DNA der RAW264.7 Makrophagen 10 x 10 Sekunden bei einer Intensität von 60% beschallt wohingegen für die DNA der Knochenmarksmakrophagen 5 x 15 Sekunden bei 60%-tiger Intensität ausreichend war. Nach anschließender Kontrolle der DNA mittels Agarosegelelektrophorese, konnte eine Fragmentierung der DNA in 200-600 kb große Einzelfragmente erreicht werden. Schließlich wurden die Proben 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Konzentration der DNA-Menge mit dem Photometer bestimmt. Für die Immun-Präzipitation wurde 50 µg der DNA auf ein Endvolumen von 1600 µl mit Dilutionpuffer verdünnt und die Proben zunächst mit 80 µl Protein-A-Agarose (Invitrogen) für 1 h im Kühlraum auf einem Rotator inkubiert. Danach wurde die Protein-A-Agarose bei 800 rpm 4°C abzentrifugiert, 1500 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 2-5 µg Antikörper zugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Rotator im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 60 µl Protein-A-Agarose, die für 2 h inkubiert wurde. Anschließend wurden die DNA-Protein-Agarose Komplexe mit je 3 x 1ml Hochsalz-Puffer, 3 x 1ml LiCl-Puffer und 3 x 1ml Nidrigsalzpuffer (je 1 min, 800 rpm, 4°C) gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch zweimalige hintereinander folgende Zugabe von 300 µl Elutionspuffer. Die Proben wurden dazu gevortext und bei 65°C für 15 min unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Danach wurden die Agarose-beads 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert und 250 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem insgesamt 500 µl Eluat wurden 30 µl 5 M NaCl pipettiert und die Proben bei 65°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 µl Proteinase K zugegeben und die Proben 2 Stunden bei 42°C inkubiert. Die Extraktion der DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt. Dazu wurden die Proben in Phase Lock Gel light Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt, 532 µl Phenol/Chloroform zugegeben und gut geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 13000 rpm (RT) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Phase-Lock Gefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 515 µl Chloroform, Schütteln der Proben und die Zentrifugation 5 min bei 13000 rpm. Danach wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol, sowie 5 M NaAc und 2 µl tRNA (Sigma) und drei bis vier-maliges invertieren. Anschließend wurde die Proben für 30 min in den -20 °C Schrank gestellt und danach 30 min bei 13000 rpm 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und 45 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet 2 Stunden bei RT getrocknet und danach in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Amplifikation der DNA erfolgte mit spezifischen Primern für die jeweiligen Promotor-

sequenzen unter Verwendung des REDTaq ReadyMix PCR Reaction kit (Sigma).

PCR-Bedingungen:

80°C	Pause		
94°C	2 min	}	Annealingtemperatur je nach Primerpaar 32-38 x
94°C	45 s		
60-64°C	45 s		
72°C	45 s		
72°C	10 min		
4°C	Pause		

Die Bindung der verschiedenen Proteine an die jeweiligen Promotorstellen wurde anschließend anhand Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.11 *In vivo* Methoden

2.11.1 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen wurden diese durch cervikale Dislokation (Genickbruch) schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen.

2.11.2 LPS-Injektionen

Zur Untersuchung der Mortalität der I κ B β -Deleter und Wildtyp-Mäuse wurde den Mäusen 50 und 30 mg/kg LPS (Serotyp 0111:04, Sigma) interperitoneal injiziert. Nach 0, 1, 2 und 6 Stunden wurde den Tieren ein kleiner Teil des Schwanzes entfernt, das Blut mit einer Einkapillarpipette (nach Prof. Delbrück, Brand) entnommen und das Blut in ein Reaktionsgefäß überführt. Daraus wurde durch 15 min Inkubation auf Eis und anschließendem 10-minütigem Abzentrifugieren das Serum gewonnen. Die Tiere für die Organentnahme wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten nach der LPS Injektion getötet und die Organe für die RNA-Isolierung wurden entnommen, zerkleinert und in 1ml RLT-Puffer (Qiagen) homogenisiert.

Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch die Regierung Oberbayern; AZ: 209.1/211-2531-10/04

2.12 Statistische Auswertung

Die grafische Darstellung wurde mit „SigmaPlot“ vorgenommen (Jandel Scientific, Corte Madera, USA). Die Daten wurden als Mittelwerte \pm S.E.M (Standardfehler) angegeben. Zur Feststellung der statistischen Signifikanz von Unterschieden zwischen verschiedenen Gruppen wurde der Student-t-Test zur Überprüfung vorangegangener Stichproben auf Normalverteilung eingesetzt. Alle Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Reaktion von $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen nach LPS-Injektion

3.1.1 Injektion von LPS

Die Infektion von Mäusen mit Bestandteilen der Zellwand gram-negativer Bakterien, so genannte Lipopolysaccharide (LPS), ist ein gut charakterisiertes Modellsystem zur Untersuchung der Immunreaktion in der Maus. Um die Rolle von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ innerhalb der Immunabwehr nach einer Infektion mit gram-negativen Bakterien zu untersuchen, wurden $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäuse mit LPS injiziert. Es wurde die Mortalität der $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{+/+}$ -Mäuse anhand einer sehr hohen toxischen LPS Dosis untersucht, die eine sehr starke Sepsisreaktion der Mäuse hervorruft und bei Wildtyp Mäusen innerhalb von 24 Stunden zum Tod durch Multiorganversagen führt. Zunächst wurde den Mäusen eine Dosis von 50 mg/kg LPS interperitoneal injiziert. Nach 30 Stunden waren alle Mäuse an den Folgen der Sepsis gestorben, wobei beobachtet werden konnte, dass die Kontroll-Wildtyp Mäuse einige Stunden früher tot waren als die $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäuse (Abb.5).

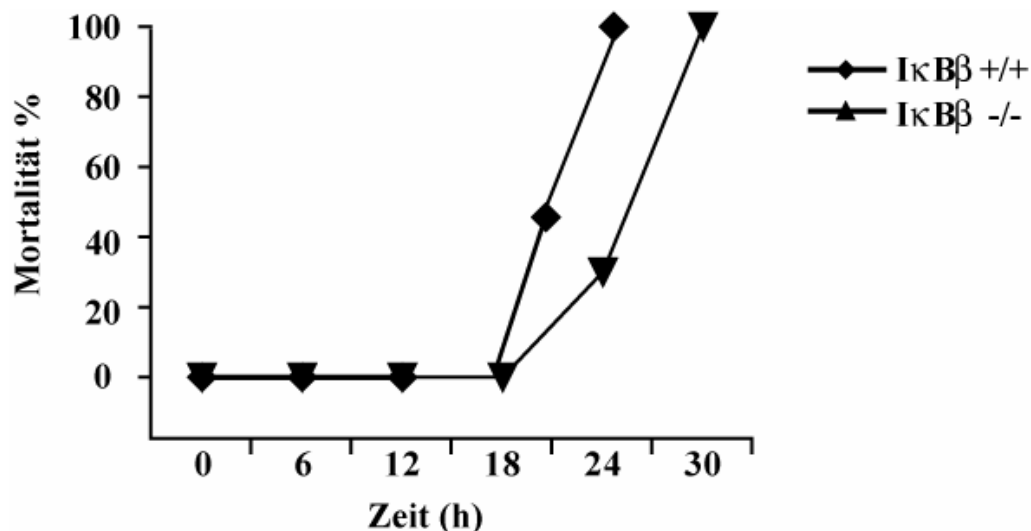


Abb. 5 Sterbeverlauf bei $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen nach Injektion mit 50 mg/kg LPS
Jeweils 3 $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und 3 $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{+/+}$ Mäuse wurden 50 mg/kg LPS interperitoneal injiziert.

Um den Zeitraum der eintretenden Sepsis zu verzögern, wurde das Experiment mit 30 mg/kg LPS wiederholt und der Verlauf der Sepsis beobachtet. Anschließend wurde den Mäusen vor der LPS-Injektion, sowie 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Injektion, Blut aus der Schwanzvene entnommen. Beide Mausgruppen bekamen zwei Stunden nach LPS-Injektion

erste Anzeichen von septischem Schock wie Schüttelfrost und Temperaturanstieg. Nach 18 Stunden starben in der Wildtyp Kontrollgruppe die ersten Mäuse an den Folgen des septischen Schocks, wohingegen bei den $I\kappa B\beta^{-/-}$ Mäusen keine äußeren Anzeichen der Sepsis zu erkennen war (Abb. 6). 24 Stunden nach LPS-Injektion waren alle Wildtyp $I\kappa B\beta$ Mäuse tot. In der Gruppe der $I\kappa B\beta^{-/-}$ Mäuse hingegen war keine einzige Maus an den Folgen der Sepsis gestorben. Dies ließ auf eine Funktion von $I\kappa B\beta$ im angeborenen Immunsystem nach einer Infektion mit LPS schließen.

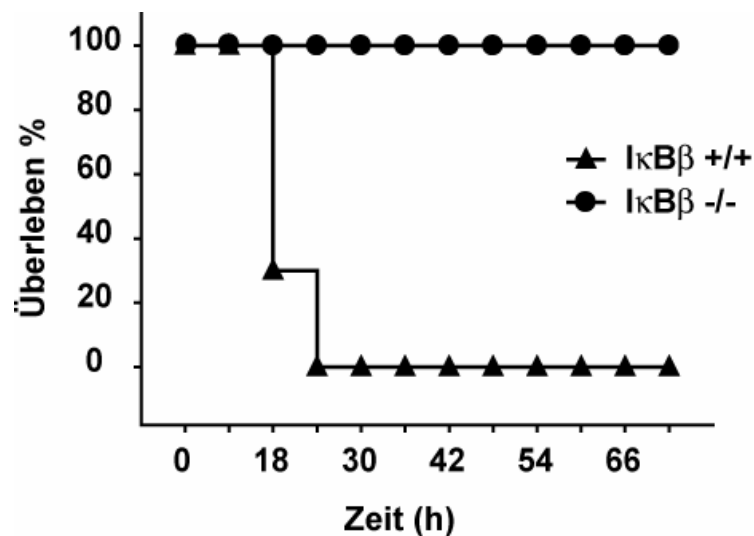


Abb. 6 Überlebenskurve bei $I\kappa B\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen nach Injektion mit 30 mg/kg LPS
Jeweils 6 $I\kappa B\beta^{-/-}$ und 6 $I\kappa B\beta^{+/+}$ Mäuse wurden mit 30 mg/kg LPS interperitoneal injiziert. Die Anzahl der Überlebenden wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden bestimmt und ist in % der Anzahl der injizierten Tiere angegeben.

3.1.2 Bestimmung der Zytokinsekretion im Blut nach LPS Injektion

Die inflammatorische Antwort des Immunsystems nach LPS-Injektion resultiert in einem sehr schnellen Anstieg der Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6. Die Sekretion dieser Zytokine wurde im Serum der $I\kappa B\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäuse 1, 2 und 6 Stunden nach LPS-Injektion untersucht (Abb.7). Während in den Wildtyp-Mäusen die Zytokinkonzentration von TNF- α bereits eine Stunde nach LPS-Injektion und die Sekretion von IL-1 β , sowie IL-6 nach 6 Stunden signifikant erhöht war, konnten in den Seren der $I\kappa B\beta^{-/-}$ Mäuse zu diesen Zeitpunkten deutlich geringere Zytokinspiegel nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen deuteten auf eine mögliche Ursache für das Überleben der $I\kappa B\beta^{-/-}$ Mäuse hin, die eine deutliche Reduktion der Zytokine aufweisen, die für das Einlei-

ten einer Sepsis mitverantwortlich sind hin.

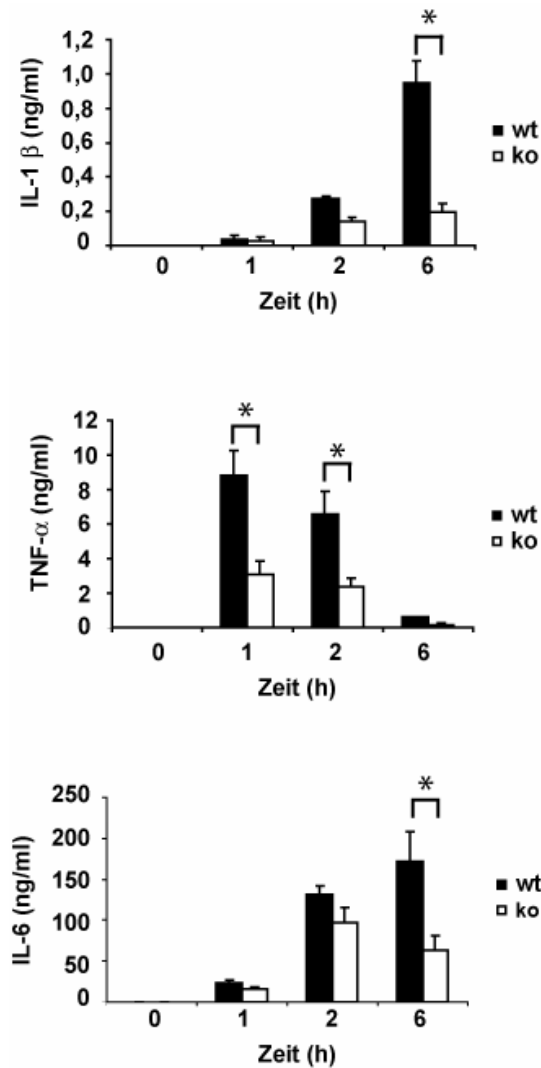


Abb. 7 Zytokinkonzentration im Serum von $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen nach Injektion von LPS
0, 1, 2 und 6 Stunden nach LPS-Injektion von 30 mg/kg wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und die Konzentration der Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 in den entsprechenden Seren durch ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente mit je 3 Tieren pro Mausstrang. Die Statistik erfolgt mittels Student's *t* test: $P^* < 0.05$ zwischen $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen.

3.1.3 Bestimmung der transkribierten mRNA in verschiedenen Organen nach LPS-Injektion

Um nähere Einblicke in die Ursache der zu beobachtenden LPS-Toleranz in $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen zu erhalten, wurde $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen 30 mg/kg LPS injiziert, und die Sepsisvermittelten Organe Milz und Leber zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 6 und 12 Stunden entnom-

3 Ergebnisse

men. Die isolierte RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR-Analysen mit spezifischen Primern untersucht. Dabei zeigte die Analyse von IL-1 β , TNF- α und IL-6 in den Organen Milz und Leber der Wildtyp-Mäuse bereits eine Stunde nach Injektion einen deutlichen Anstieg. In den Organen der I κ B β ^{-/-} Mäuse konnte in der Milz kein Unterschied in der mRNA-Menge im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nach gewiesen werden. Die mRNA-Mengen von IL-1 β , TNF- α und IL-6 in der Leber der I κ B β ^{-/-} Mäuse zeigten hingegen einen signifikanten Unterschied. Alle untersuchten Zytokinmengen in der Leber waren 1 Stunde nach LPS-Injektion im Vergleich zu Wildtyp Tieren deutlich verringert (Abb.8).

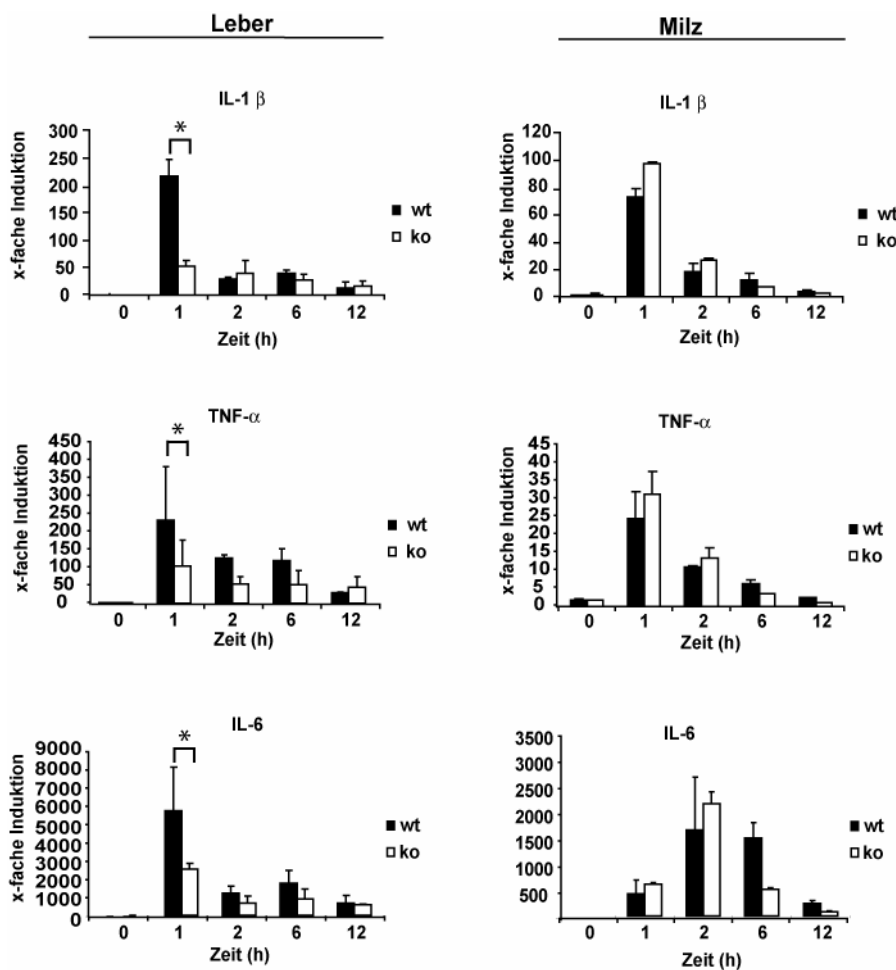


Abb. 8 *In vivo* mRNA-Menge aus Leber und Milz nach LPS-Injektion in I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen
Den Mäusen wurden 30 mg/kg LPS interperitoneal injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Injektion wurde den Tieren die Leber und Milz entnommen und daraus die Gesamt-RNA extrahiert. Mit IL-1 β , TNF- α und IL-6-spezifischen Primern wurden durch Echtzeit-RT-PCR die jeweiligen Zytokin-mRNA-Spiegel gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert Daten von 3 Mäusen pro Zeitpunkt. Die Statistik erfolgt mittels Student's *t* test: P* < 0.05 zwischen I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Mäusen.

3.1.4 Histologische Untersuchungen der Lunge nach LPS Injektion

Aufgrund der Resistenz der $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen gegen LPS in einer normalerweise lethalen Dosis, wurde den $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp-Mäusen die Lunge 6 Stunden nach LPS Injektion entnommen und histologisch mittels H/E Färbung untersucht. Dabei konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den Knock-out und Wildtyp-Mäusen bezüglich der Infiltration von Neutrophilen innerhalb des Lungengewebes nachgewiesen werden (Abb.9). In beiden Genotypen kam es zu einer gleichermaßen starken Infiltration von Neutrophilen in das Lungengewebe nach LPS-Injektion.

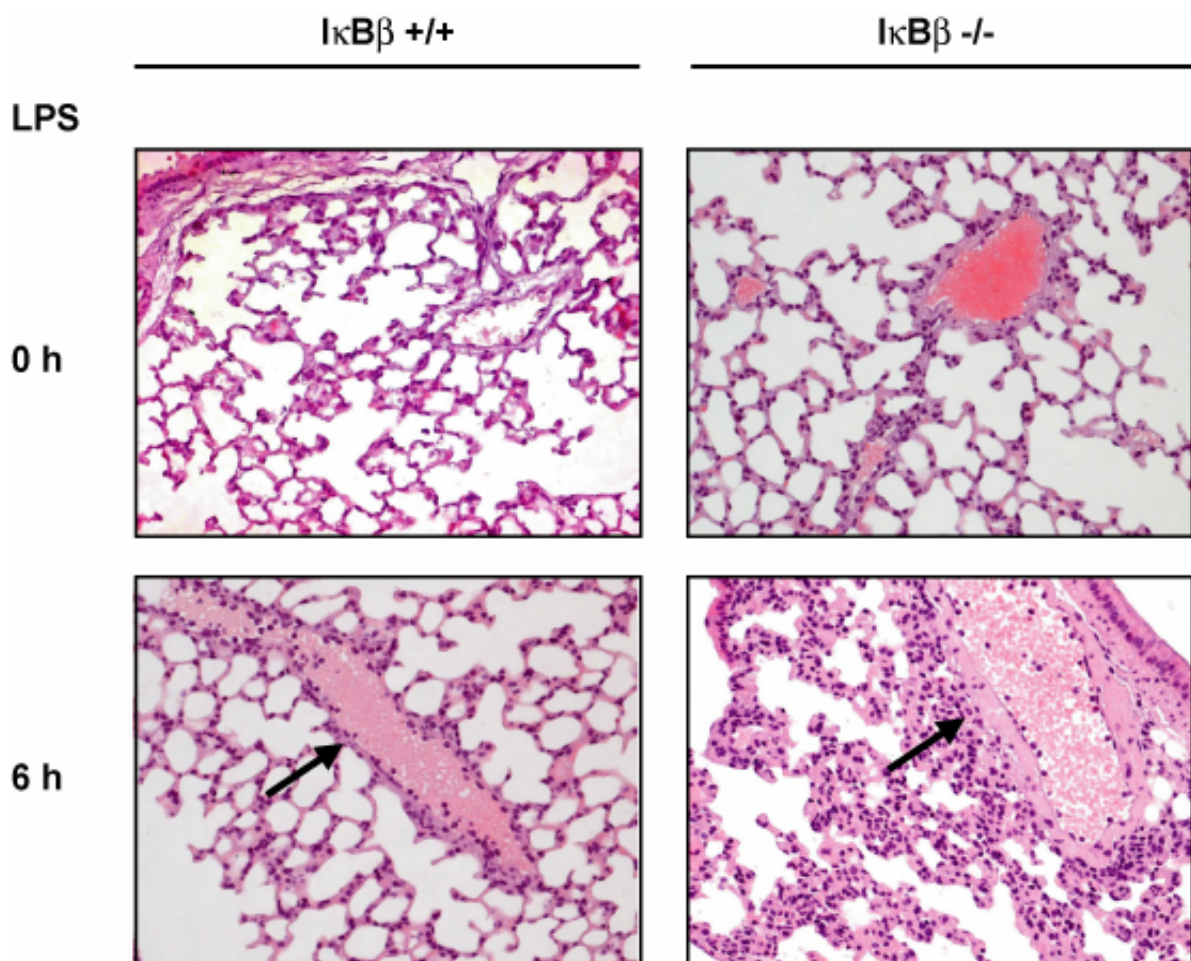


Abb. 9 H/E Färbung der Lunge nach LPS Injektion

Zu den Zeitpunkten 0 und 6 Stunden nach LPS Injektion (30 mg/kg) wurde den $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen die Lunge entnommen und histologisch mittels H/E-Färbung untersucht. Die Aufnahmen erfolgen mittels einer 200-fachen Vergrößerung.

3.2 *In vitro* Untersuchungen in $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Immunzellen

3.2.1 Untersuchung der Zytokinsekretion und Proteinproduktion in Kupfferzellen nach Stimulation mit LPS

Aufgrund der nachgewiesenen reduzierten mRNA-Zytokin-Synthese von IL-1 β , TNF- α und IL-6 in der Leber von $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ -Mäusen, wurde als nächstes die Zytokinausschüttung von Kupfferzellen aus $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen näher untersucht.

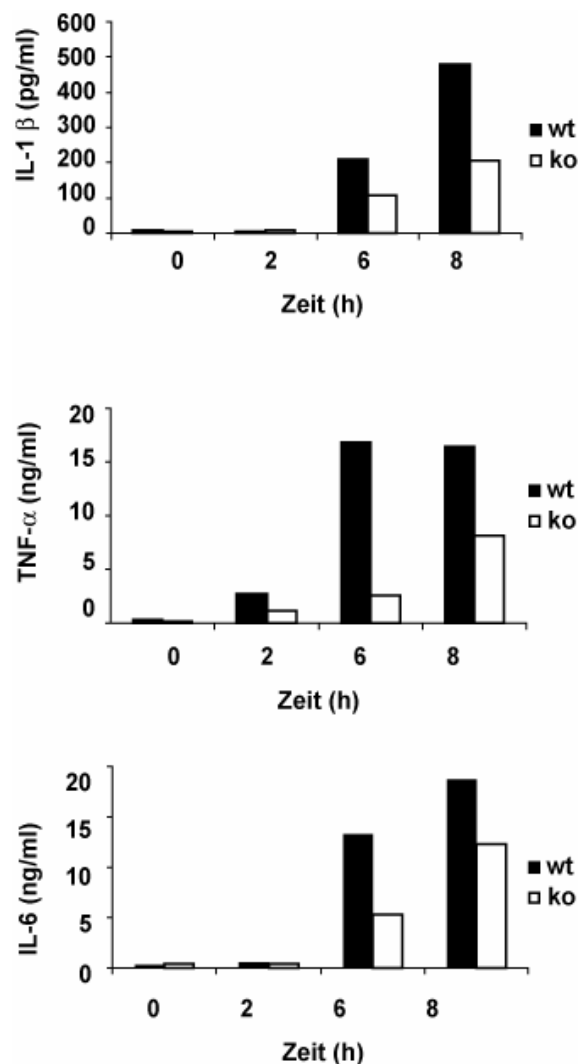


Abb. 10 *In vitro* Zytokin-Sekretion von Kupfferzellen nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS

Die isolierten Kupfferzellen aus der Leber von je 3 $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und 3 Wildtyp Mäusen wurden gepoolt und nach 24-stündiger Kultivierung mit 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LPS stimuliert. Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Zellüberstände genommen und darin die Konzentration von IL-1 β , TNF- α und IL-6 mittels ELISA bestimmt.

Kupfferzellen stellen eine Population der Makrophagen in der Leber dar, die neben Granulozyten als erstes auf Infektionen durch Zytokinausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 reagiert. Daher wurden die Kupfferzellen aus der Leber von I κ B β ^{-/-} und Wildtyp Zellen isoliert und nach 24 Stunden mit LPS stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten zeigte sich im Überstand der Wildtyp-Kupfferzellen eine signifikante Konzentration der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6, wohingegen die Zytokinsekretion in den *Knockout* Zellen sehr stark reduziert war (Abb.10). Somit ist zu vermuten, dass die Kupfferzellen der Leber eine Zellpopulation im Organismus der injizierten Mäuse darstellen, die mitverantwortlich für die Reduktion der Zytokine im Serum der I κ B β ^{-/-} Tiere sind. Die reduzierte Zytokinsynthese von IL-1 β konnte auch in Western-Blot-Analysen von Ganzzelllysaten der Kupfferzellen zwei Stunden nach Stimulation in I κ B β ^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden (Abb.11).

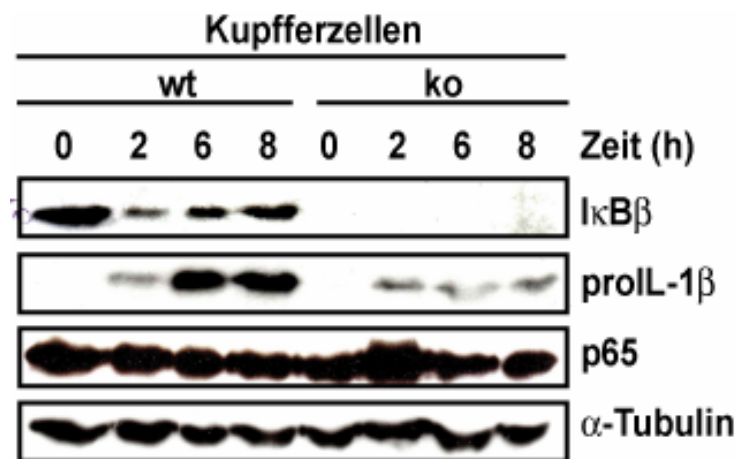


Abb. 11 Western-Blot Analysen von zytoplasmatischen Extrakten von mit 1 μ g/ml LPS stimulierten Kupfferzellen

Untersuchung der IL-1 β Proteinkonzentration in I κ B β ^{-/-} und Wildtyp Kupfferzellen nach Stimulation zu den angegebenen Zeitpunkten. Für die Gesamtzellextrakte wurden die Kupfferzellen aus der Leber von je 3 I κ B β ^{-/-} Mäuse und 3 Wildtyp-Mäusen isoliert, anschließend gepoolt und für 24 Stunden vor der Stimulation ausplatziert.

3.2.2 Untersuchung der Proteinexpression in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS

Da die Expression von NF- κ B/Rel und I κ B-Proteinen zum Teil einer transkriptionellen Autoregulation unterliegt, wurde die Expression von p65/RelA, c-Rel, NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), sowie I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ mit spezifischen Antikörpern nach Stimulation mit LPS in Knochenmarksmakrophagen untersucht. Dabei haben die Western-Blot Analysen gezeigt, dass das Fehlen von I κ B β im Vergleich zu Wildtyp Knochenmarksmakrophagen auf die Proteinproduktion von NF- κ B/Rel-Familienmitgliedern nach Stimulation unbeeinflusst abläuft. Wie auch in vorherigen Untersuchung von Bettina Klein, konnte in I κ B β ^{-/-} Knochenmarksmakrophagen eine etwas verringerte Neusynthese von I κ B α 2 Stunden nach LPS Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 12).

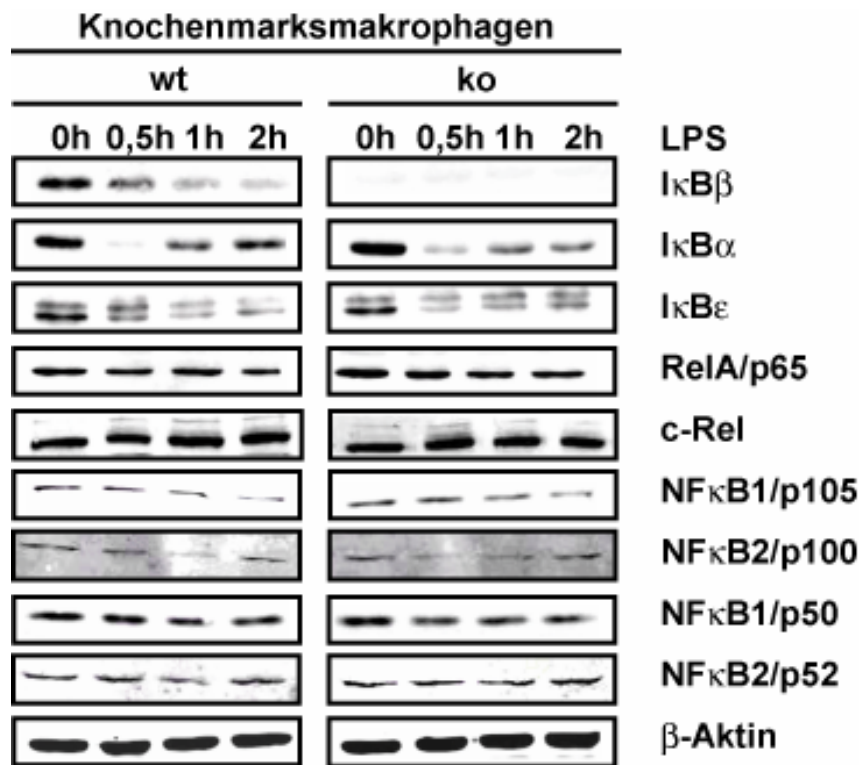


Abb. 12 Expression von NF- κ B/Rel und I κ B-Proteinen in Knochenmarksmakrophagen
Western-Blot-Analysen aus I κ B β ^{-/-} und Wildtyp-Ganzzelextrakten von Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS. β -Aktin dient dabei als Ladungskontrolle.

3.2.3 Untersuchung der mRNA-Synthese, Zytokinsekretion und Proteinproduktion in Knochenmarkszellen nach Stimulation mit LPS

Als nächstes wurde untersucht, ob $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ auch in Knochenmarksmakrophagen einen Einfluss auf die Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 hat. Daher wurden Knochenmarksmakrophagen aus $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen isoliert, nach sieben-tägiger Kultivierung mit LPS stimuliert und die Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und isoliert.

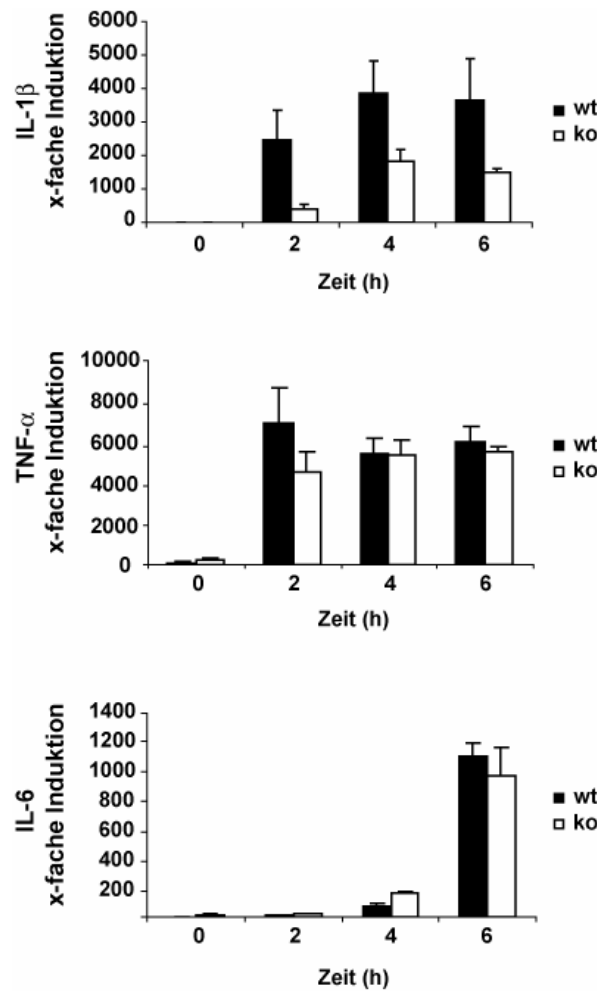


Abb. 13 mRNA Menge in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS

0, 1, 2, 6 und 10 Stunden nach Stimulation wurde die mRNA isoliert, in cDNA revers transkribiert und die mRNA-Menge von IL-1 β , TNF- α und IL-6 mittels Echt-Zeit-RT-PCR nachgewiesen. Für den Versuch wurden die Zellen von jeweils 3 $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und 3 Wildtyp Mäusen nach der Isolation gepoolt. Der Mittelwert stellt das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

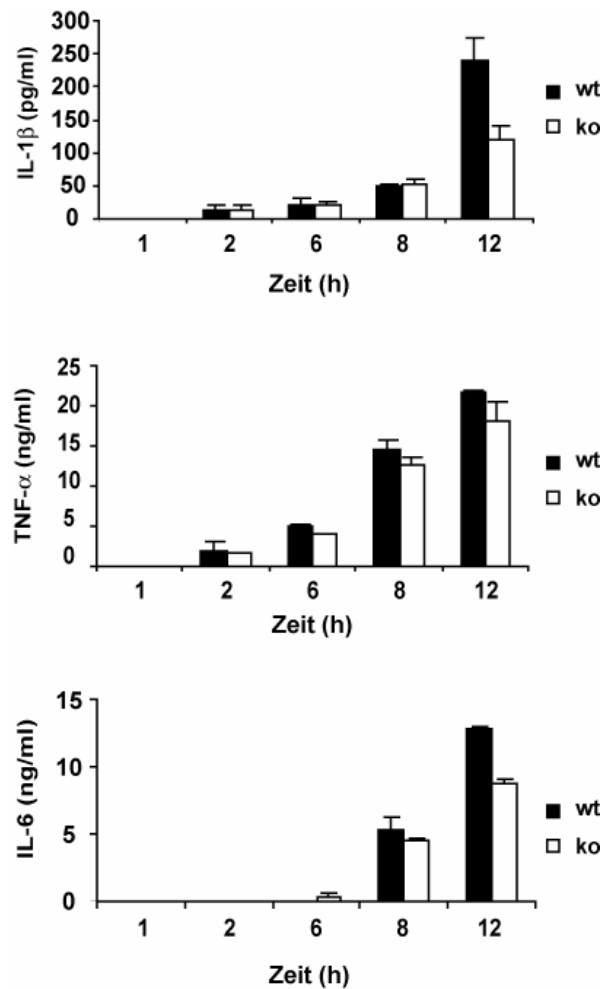


Abb. 14 *In vitro* Zytokin-Sekretion in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation

Nach 0, 1, 2, 6 und 10 Stunden nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS wurden die Zellüberstände gewonnen und die Zytokine mittels ELISA bestimmt. Die Werte stellen die Mittelwerte und Standardabweichung von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten dar, wobei für jeden Versuch 3 $\text{IkB}\beta^{-/-}$ und 3 Wildtyp-Mäuse gepoolt wurden.

Nach der Echt-Zeit-RT-PCR Analyse ergaben sich die größten mRNA-Mengenunterschiede zwischen Wildtyp- und $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Makrophagen bei IL-1 β (Abb.13). Dabei ist die größte Differenz 2 Stunden nach Stimulation zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist die mRNA-Menge im Wildtyp um das sechsfache höher im Vergleich zur mRNA-Menge in den $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Makrophagen, während sich in den $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Makrophagen nur eine schwache Induktion der mRNA von IL-1 β zeigt und stets deutlich unter dem Niveau der Wildtyp-Makrophagen bleibt. Gegenätzlich zu den *in vivo* Daten der Leber verhält sich die mRNA-Menge von TNF- α und IL-6. Bei der Expression von TNF- α und IL-6 konnte kein Unterschied zwischen Wild-Typ und $\text{IkB}\beta^{-/-}$ Knochenmarksmakrophagen beobachtet werden. Die nach der Stimulation mit LPS von Makrophagen in den Überstand sezernierten Zytokine wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt (Abb.14). 10

Stunden nach Stimulation mit LPS war in den Überständen der Wildtyp-Makrophagen 2,5fach mehr IL-1 β vorhanden als in den Überständen der I κ B $\beta^{-/-}$ Makrophagen. Ebenfalls wie in der mRNA Expression war in der Sekretion von TNF- α kein Unterschied erkennbar. Bei der Sekretion von IL-6 konnte ein 1,5facher Unterschied zwischen Wildtyp-und I κ B $\beta^{-/-}$ Makrophagen nachgewiesen werden.

Die verminderte Proteinproduktion von IL1- β zeigte sich auch in Western-Blot Analysen von stimulierten Knochenmarksmakrophagen. Zwei Stunden nach LPS-Stimulation konnte in den Ganzzelllysaten von Wildtyp-und I κ B $\beta^{-/-}$ Makrophagen exemplarisch wesentlich weniger IL1- β im Vergleich zu Wildtyp Makrophagen nachgewiesen werden (Abb.15). Aus den Echt-Zeit-RT PCR und ELISA-Daten, sowie der Western-Blot Analysen geht hervor, dass in Knochenmarksmakrophagen IL-1 β als NF- κ B abhängiges Gen von I κ B $\beta^{-/-}$ direkt oder indirekt reguliert werden könnte.

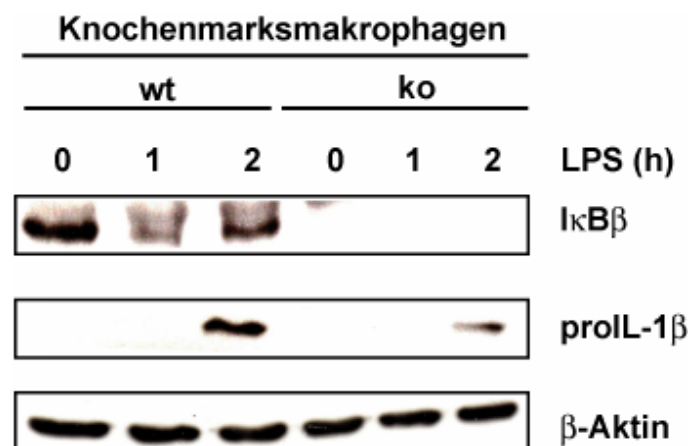


Abb. 15 Proteinmenge von IL-1 β in I κ B $\beta^{-/-}$ und I κ B $\beta^{+/+}$ Knochenmarksmakrophagen
Western-Blot-Analysen von Ganzzellextrakten aus Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS. Untersuchung der IL-1 β Zytokinmenge in I κ B $\beta^{-/-}$ und I κ B $\beta^{+/+}$ Lysaten nach Stimulation. β -Aktin diente dabei als Ladungskontrolle.

3.2.4 Affymetrix Chip Analysen von Knochenmarksmakrophagen

Um weitere Gene zu erfassen, die in Knochenmarksmakrophagen von I κ B $\beta^{-/-}$ Mäusen in ihrer Regulation beeinflusst sein könnten, wurde ein Gen-Array mit unstimulierter und stimulierter cRNA der Wild-Typ und I κ B $\beta^{-/-}$ Knochenmarksmakrophagen durchgeführt. Für die Analyse der Genexpression wurde der Zeitpunkt 2 Stunden nach Stimulation gewählt, da sich in den vorherigen *in vitro* Untersuchungen gezeigt hat, dass der Genexpressionsunterschied von IL-1 β zu diesem Zeitpunkt am stärksten ist. Für die Genexpression von IL-1 β

bestätigten auch die Daten der Affymetrix Chip einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen $I\kappa B\beta^{-/-}$ und Wildtyp Makrophagen. 2 Stunden nach Stimulation zeigte sich ein vielfach stärkere Induktion von IL-1 β in den Wildtyp-Makrophagen im Vergleich zu den $I\kappa B\beta^{-/-}$ Makrophagen (Abb.16).

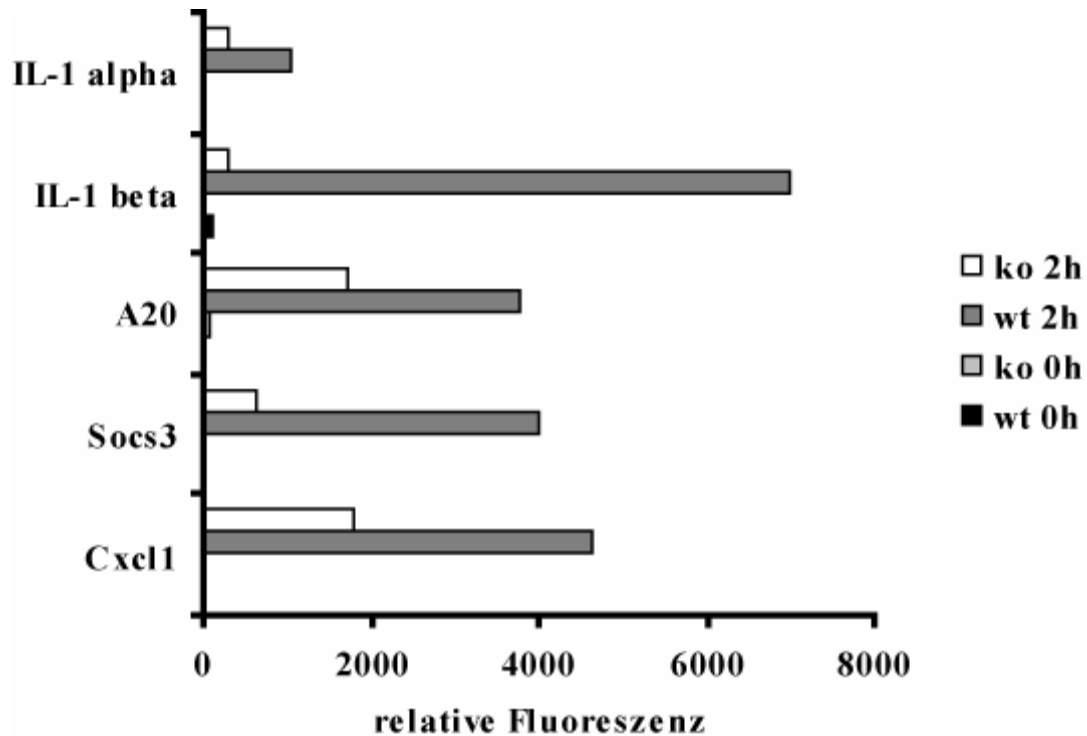


Abb. 16 Affymetrix-Chip mit Knochenmarksmakrophagen

Die Knochenmarksmakrophagen von je einer $I\kappa B\beta^{-/-}$ und einer Wildtyp Mäuse wurden isoliert und nach Kultivierung 2 Stunden mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und nach Protokoll der Firma Affymetrix in cRNA umgeschrieben, markiert auf einen Chip sequenzspezifisch hybridisiert und vermessen.

Als weitere Gene fielen IL-1 α , SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling family), CXCL-1 (CXC chemokine ligand), sowie A20 reduziert in $I\kappa B\beta^{-/-}$ -Knochenmarksmakrophagen heraus (Abb.16). Für TNF- α und IL-6 konnte kein signifikanter Unterschied zwei Stunden nach LPS-Stimulation in der Expression nachgewiesen werden. Somit ist zu vermuten, dass neben der von IL-1 β die Expression weiterer Gene beeinflusst wird, und dass $I\kappa B\beta$ an der Genregulation dieser Gene zu diesem Zeitpunkt der Stimulation direkt oder auch indirekt beteiligt ist.

3.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchung an Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS

Für den Nachweis der nukleären Lokalisation von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ nach Stimulation mit LPS wurden Knochenmarksmakrophagen aus $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ und Wildtyp-Mäusen isoliert und die Zellen nach Stimulation mit LPS mittels mikroskopischer Immunfluoreszenz untersucht. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC gekoppelter Antikörper verwendet, die Gegenfärbung der Kerne erfolgte mittels DAPI. Dabei konnte in Wildtyp-Makrophagen $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ in unstimulierten Knochenmarksmakrophagen im Zytoplasma lokalisiert nachgewiesen werden (Abb.17). Nach Stimulation der Zellen zeigte sich nach 2 Stunden eine Translokation von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ in den Nukleus der Zellen. Als Kontrolle dienten Knochenmarksmakrophagen aus $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen, bei denen sich $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ nicht nachweisen ließ. Die Translokation von p65 in den Zellkern nach Stimulation diente als Positivkontrolle.

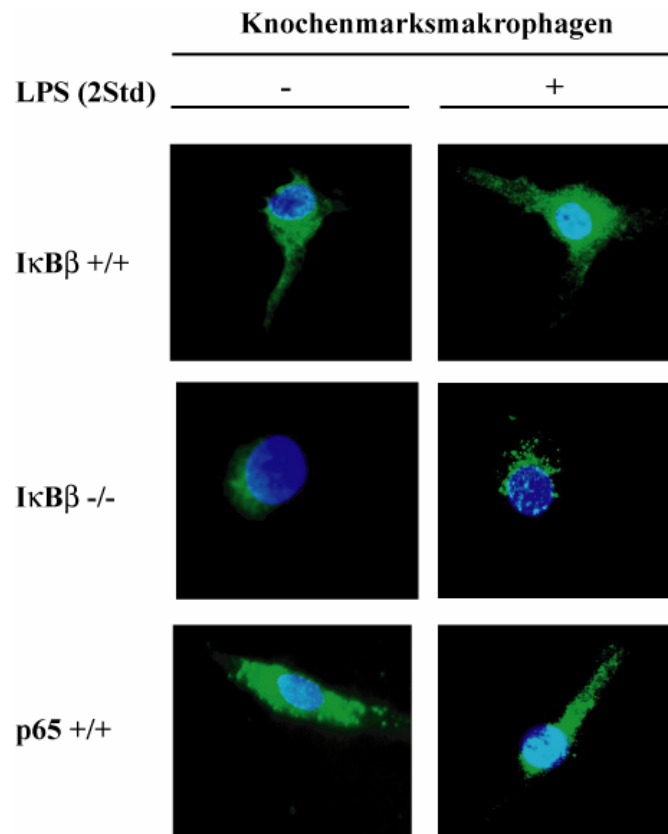


Abb.17 Immunfluoreszenz mit Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS

Immunfluoreszenzfärbung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ und p65 in Kern und Zytoplasma in unstimulierten und stimulierten Knochenmarksmakrophagen. Die Färbung erfolgte mit sek. FITCs Antikörpern und DAPI als Kernfarbstoff. Grün: FITCs-AK; Dunkelblau: DAPI; Hellblau: Überlappung aus grün und dunkelblau. Die Zellen wurden mit einer 600-fachen Vergrößerung aufgenommen.

3.3 *In vitro* Untersuchungen zur Bestimmung der Funktion von I κ B β im LPS induzierten NF- κ B Signalweg

3.3.1 *Knock down* von I κ B β in RAW264.7 Makrophagen

Um den Einfluss von I κ B β auf die Genexpression von IL-1 β *in vitro* in einem Makrophagenzellsystem zu untersuchen, wurde siRNA gegen I κ B β in RAW264.7 Makrophagen transfiziert und die Zellen nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurden die Proteine mittels Westernblot untersucht. Es wurde dabei mit zwei verschiedenen siRNAs gegen I κ B β gearbeitet, die unterschiedliche Gensequenzen auf der I κ B β mRNA erkennen. Diese zeigten beide eine eindeutige Reduktion der I κ B β Proteinproduktion. Mit der I κ B β +542 siRNA wurde eine Reduktion der Proteinmenge um 60 % von I κ B β erreicht und die siRNA I κ B β +333 zeigte eine 50%tige Proteinreduktion von I κ B β (Abb.18)

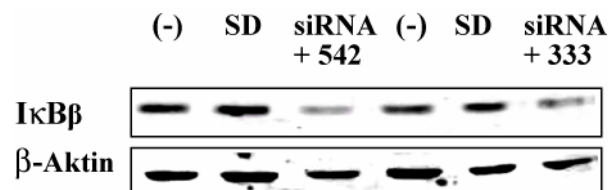


Abb. 18 Western-Blot-Analyse von RAW264.7 Zellen nach Transfektion mit siRNA

Die Zellextrakte wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet und der *knock down* von I κ B β mittels spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot untersucht. Sie unspezifische scramble duplex (SD) siRNA diente als negativ Kontrolle.

3.3.2 Messung der Zytokinsekretion nach *knock down* von I κ B β

Nach der Etablierung des *knock downs* von I κ B β in RAW264.7 Makrophagen wurde der Einfluss der Translationsreduktion von I κ B β auf die Zytokinsekretion von RAW264.7 Zellen nach Stimulation mit LPS untersucht. Aufgrund der besseren Effizienz der Translationsreduktion wurde für die weiteren Untersuchungen die I κ B β siRNA +542 verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA mit LPS stimuliert, der Überstand abgenommen und anschließend die Zytokinsekretion von IL-1 β , MIP-2 und TNF- α mittels ELISA untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits 6 Stunden nach Stimulation in den Zellen, die mit siRNA gegen I κ B β transfiziert waren, eine Reduktion der Zytokinsekretion um 50% detektiert werden konnte. 8 Stunden nach Stimulation war der Sekretionsun-

3 Ergebnisse

terschied zwischen mit scramble duplex (Kontroll siRNA) behandelten Makrophagen und siRNA $I\kappa B\beta$ behandelten Makrophagen noch deutlich erkennbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Translationsreduzierung von $I\kappa B\beta$ in RAW264.7 Makrophagen einen direkten Einfluss auf die Zytokinsekretion von IL-1 β hat (Abb.19).

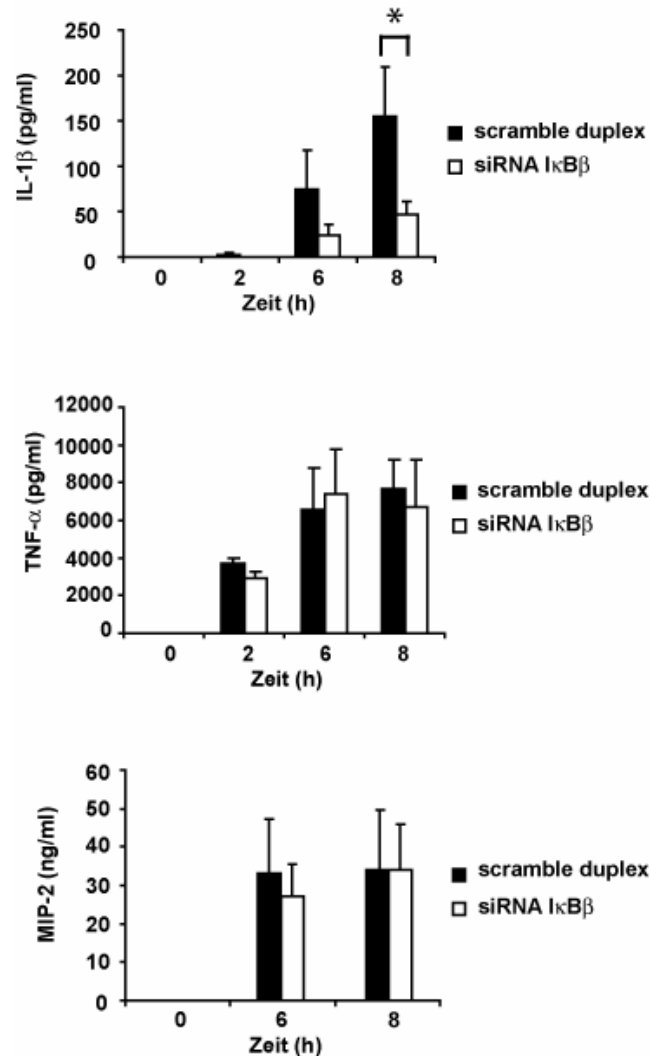


Abb. 19 Zytokin-Menge von IL-1 β , MIP-2 und TNF- α in RAW264.7 Zellen nach *knock down* von $I\kappa B\beta$ 48 Stunden nach Transfektion mit siRNA wurden die Zellen stimuliert und anschließend der Überstand genommen. Die Zytokin-Sekretion von IL-1 β , MIP-2 und TNF- α wurde mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert, sowie die Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Versuchen. Die Statistik erfolgt mittels Student's *t* test: $P^* < 0.05$.

Des Weiteren wurde die Sekretion von MIP-2 und TNF- α untersucht. Beide Gene werden nach Stimulation mit LPS von NF- κ B reguliert. Nach *knock down* von $I\kappa B\beta$ konnte allerdings kein Unterschied in der Zytokinsekretion von MIP-2 und TNF- α in den Überständen stimulierter RAW264.7 Makrophagen nachgewiesen werden (Abb.19).

3.3.3 Untersuchung des *knock downs* von IκBβ auf verschiedenen IL-1β Luziferase-Konstrukte

Unterschiedliche Teile und Mutanten der IL-1β- Promoterregion wurden vor das Reporter- gen Luziferase kloniert, um die funktionelle Bedeutung von IκBβ für die transkriptionelle Regulation von IL-1β zu untersuchen (Abb.20). Dabei wurde die humane Promotersequenz von IL-1β verwendet, da diese eine sehr hohe Homologie zu der von murinem IL-1β aufweisen.



Abb. 20 Basensequenzen der unmutierten und mutierten κB-Stellen des IL-1β-Promotors

Basensequenz der κB-Stellen im IL-1β Promotor. Die κB-Stellen sind (schwarzer Kasten) mit Basenabfolge vergrößert dargestellt, und der Name der einzelnen Plasmide bezeichnet die Position upstream des Transkriptionsstarts. Die ausgetauschten Basen im mutierten -399-IL1B-Luc-Konstrukt sind rot dargestellt.

Diese Vektoren wurden in RAW264.7 Makrophagen co-transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach 48 Stunden bestimmt. Um die Bedeutung der zwei identifizierten im IL-1β-Promotor gelegenen κB-Stellen zu untersuchen, wurden Luc-Plasmide verwendet, die entweder beide κB-Stellen, eine oder keine beinhalten. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion in Raw264.7 Makrophagen eine 8,5-fache Induktion des IL-1β-Promoters 8 Stunden nach Stimulation mit LPS erreicht werden konnte (Abb.21). Die In-

3 Ergebnisse

duktion der beiden IL-1 β Konstrukte -518 (distale und proximale κ B-Stellen) und -399 (proximale κ B-Stelle) zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Induktionsstärke. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die proximale κ B-Stelle (-399) für die IL-1 β Regulation in RAW264.7 Zellen ausreicht. Das -133-IL-1 β -Luc-Konstrukt enthält ein 133 bp langes Fragment des IL-1 β Promoter ohne eine funktionelle κ B-Stelle, und repräsentiert den Luziferase-Background wie in nicht stimulierten Zellen.

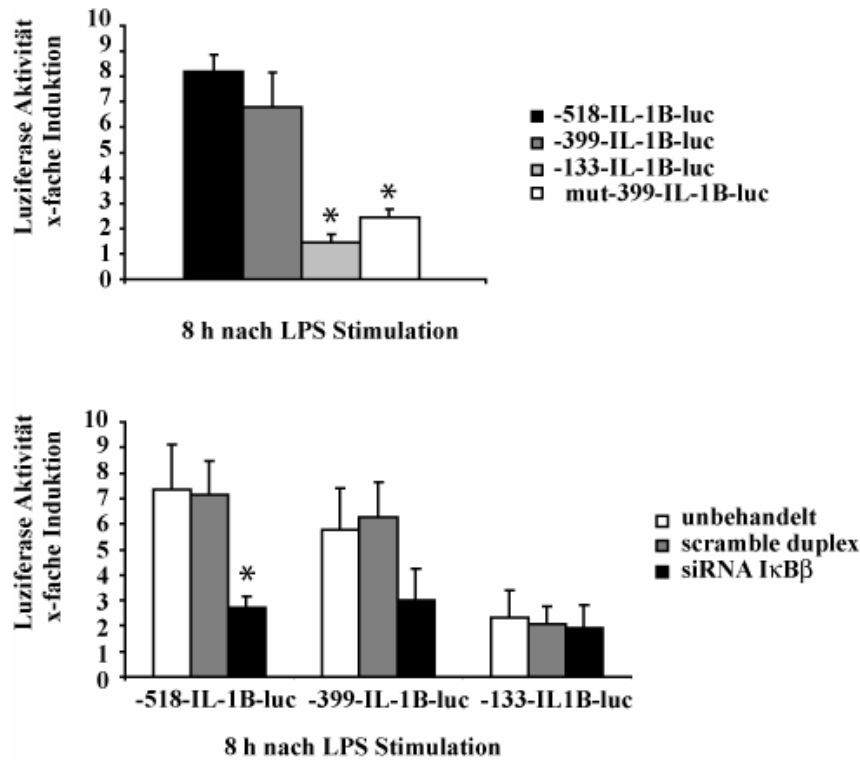


Abb. 21 Co-Transfektion von IL-1 β -Promotor-Luziferase-Konstrukten in RAW264.7 Makrophagen und Einfluss des I κ B β knock down auf die Induktion von IL-1 β

Die RAW264.7 Makrophagen wurden mit jeweils 1 μ g Plasmid-DNA, sowie mit entsprechender siRNA und Plasmid-DNA transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die gemessene Luziferase-Aktivität auf die jeweilige Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die Aktivitäten sind als Vielfaches der Co-transfektion ohne Stimulation mit LPS dargestellt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte der Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. Die Statistik erfolgt mittels Student's t test: $P^* < 0.05$.

Um eine NF- κ B abhängige IL-1 β Genregulation weiter zu untersuchen, wurde die proximale κ B-Stelle mutiert (Abb.20). Dabei konnte gezeigt werden, dass nach Mutation der proximalen κ B-Stelle des IL-1 β Promoters dieser nicht mehr durch IL-1 β induziert werden kann, was auf eine direkte Abhängigkeit von NF- κ B hindeutet (Abb.21).

Als nächstes wurde der Einfluss der siRNA gegen mRNA von I κ B β auf die Induzierbarkeit der verschiedenen Luc-Plasmide untersucht. Dazu wurden die RAW264.7 Makrophagen mit siRNA gegen I κ B β und Luziferase-Plasmiden co-transfiziert und 48 Stunden nach

Transfektion 8 Stunden mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Dabei zeigte sich, dass scramble duplex (Kontroll siRNA) keinen Einfluss auf die Luziferase Aktivität nach Stimulation mit LPS hat, während die spezifische siRNA gegen die mRNA von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ zu einer 2,5 fache Reduktion der Luziferasemenge führte (Abb.21). Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die vorherigen *in vivo* und *in vitro* Daten, dass $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ einen signifikanten Einfluss auf die Genregulation von IL-1 β zeigt.

3.4 Untersuchung der Regulation von Interleukin-1 β durch $\text{I}\kappa\text{B}\beta$

3.4.1 Promoteranalysen des murinen Interleukin-1 Gens

Zur Ermittlung einer funktionellen κB -Stelle im murinen IL-1 β Promotor wurde GenoMatrix verwendet. Dieses Programm ermöglicht eine Promotoranalyse von Gensequenzen aller bekannten Basenabfolgen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Dabei wurden im murine IL-1 β Promoter die dargestellten NF- κB Bindestellen (grau) ermittelt (Abb.22). Anschließend wurde für die Untersuchung der κB -Stellen mittels PCR verschiedenen Primernpaaren mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) zusammengestellt.

```

3241 tgtgcaactt aattcaggct cattctgctg atcacctagc actgatatgg tttcaacatg
3301 agactggcta tggtaattata agtaccctgg cagggcagga aagcaggagt ggggtgggtga
3361 gtgggggagc atcctcatag aggcagggga gggggagagg ataggggggtt tccggaggggg
3421 agacctggaa aagggataac atttgaaatg taaataaaga aaatatccaa taaaagaaaa
3481 aaataagcac cctggcatta tcagactgca taggcttgct tccagagttc cctgacccta
3541 tgataagtct aactgatac ctgcatactg tgtgtgccct gaccacaca aggaagtgcg
3601 tgtctctcca gaagcccctg ctaacacagt tgatggagag cacagaagca ccatccagtt
3661 accaaactcc aactgcaaag ctcctcagc ttaagcaca ggaggcgaga gaggtgacac
3721 acttctgggt gtgcatctac gtgcctacct ttgttcgca catcctgact taaaatgtac
3781 agctaaccce ggaaaaccce atatttttaa tattgacacc atctgcaca ttgtccaggg
3841 ggaaataatg ccattttcca ccacgatgac acacttgcga atgtgtcact atctgcaacc
3901 ccttgacttc cagggattag aaattatttc agggtagcaa tagcctcttc ccctaagaat
3961 tcccatcaag cttctcccc ctccccacc cttcagttt gttgtgaaat cagttaacc
4021 aagggaaat ttcacagctc ttcactctg ctttttagga ctataaaaca agggagggaa
4081 aacaagttgg acaacaaacc ctgcagtggt tcgaggccta ataggctcat ctgggatcc
  
```

Abb. 22 Potentieller Promotorbereich des IL-1 β Gens

Durch GenoMatrix ermittelte funktionelle Bereiche im murinen IL-1 β Promoter (grau). Mit Hilfe der Programme EIDorado, MatInspector und PromoterInspector und den Genomatix Tools der Firma Genomatix wurde ein potentieller Promotor des IL-1 β -Gens identifiziert und auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Die ermittelte Bindungsstellen sind entsprechend ihrer Übereinstimmung mit der Konsensussequenz farbig kodiert. Rot dargestellt ist die Transkriptionsstart (TATA-Box). Gelb dargestellt die Primer-Basensequenz für die ChIP-PCR Primer.

3.4.2 ChIP-Analysen des IL-1 β Promoters in RAW267.4 Makrophagen nach Stimulation mit LPS

Zur weiteren Untersuchung der transkriptionellen Regulierung von IL-1 β wurde die Chromatin-Immupräzipitation angewendet. Diese Methode ermöglicht eine Untersuchung endogener Protein/DNA-Interaktionen. Dazu wurde zunächst die DNA nach cross-linking mit Formaldehyd durch Sonifizierung zerkleinert um eine Fragmentgröße von 600 bp-200 bp großen DNA-Stücken zu erhalten. Dazu wurde das Kernlysats mit Ultraschall behandelt und die Effizienz auf einem Agarose-Gel kontrolliert (Abb.23).

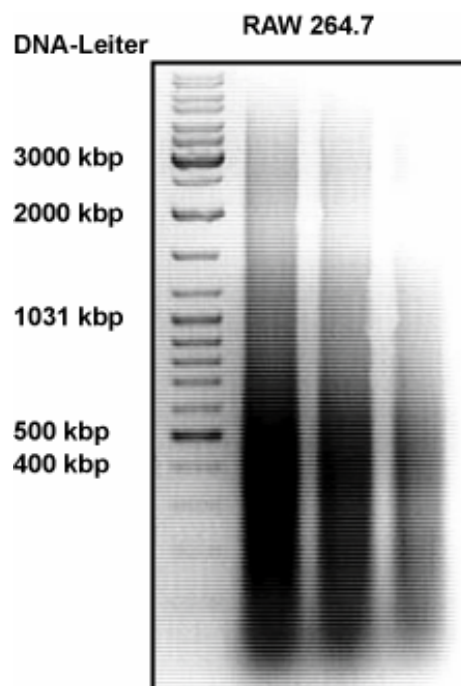


Abb. 23 Effizienz-Kontrolle der Sonifizierung in RAW264.7 Makrophagen

Kontrolle der DNA-Fragmentgröße nach Behandlung mit Ultraschall. Für die Präzipitation der DNA wurde eine Fragmentgröße der DNA von 200-600bp benötigt, dazu wurde 1 μ g DNA auf einem Agarosegel nach Behandlung mit Ultraschall analysiert um die Dauer, sowie die Stärke der Beschallung zu etablieren. Dargestellt sind verschiedene Zellzahlkonzentrationen nach Beschallung.

Zunächst wurde untersucht, ob I κ B β an die Promotorsequenz der ermittelten κ B-Stellen innerhalb des IL-1 β Promoters bindet.

An der distalen κ B-Stelle bindet acetyliertes Histon4 (acH4); ein Nachweis transkriptioneller Aktivität innerhalb der Promotorregion. Allerdings konnte keine Bindung von I κ B β zu keinem der stimulierten Zeitpunkte nachgewiesen werden. Im Gegensatz konnte an der proximalen κ B-Stelle des IL-1 β Promoters 3 Stunden nach LPS Stimulation eine Bindung

3 Ergebnisse

von I κ B β detektiert werden. Auch die Analysen der Region um die TATA-Box von IL-1 β zeigte eine direkte Bindung von I κ B β auf, sowie von acH4.

Anhand dieser Untersuchungen konnte davon ausgegangen werden, dass I κ B β direkt an der transkriptionellen Regulation von IL-1 β beteiligt ist (Abb.24).

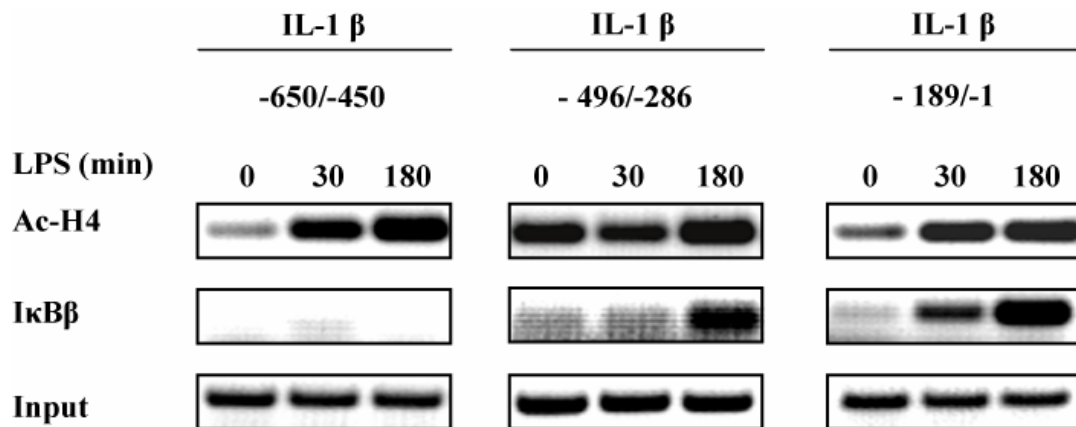


Abb. 24 Chromatin Immun-Präzipitation zur Untersuchung der Bindung von I κ B β an den IL-1 β Promotor in RAW264.7 Makrophagen

Nach 30 min und 180 min Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit LPS, wurde das Chromatin mittels spezifischen Antikörpern für I κ B β oder acH4 immunpräzipitert. Die präzipitierte DNA oder 10% der Chromatin-Input DNA wurden anschließend mittels PCR mit IL-1 β spezifischem Primern amplifiziert

Für die weitere Untersuchung des Transkriptions-Protein-Komplexes wurden in der Immun-Präzipitation verschiedenen Antikörper der NF- κ B-Familie eingesetzt. Weitere ChIP-Analysen in wiederholten Stimulationsexperimenten zeigten bei zweistündiger Stimulation mit LPS eine direkte Interaktion von I κ B β mit der proximalen κ B-Stelle, daher wurde diese Promoterregion zu diesem Stimulationszeitpunkt genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass p65 und c-Rel direkt am Promoter binden, wohingegen eine Rekrutierung von p50 und 52 nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.25). Die Bindung der RNA-Polymerase II diente dabei als Transkriptionsnachweis. Als Kontrolle wurde die Promoterregion des MIP-2 Genes untersucht. In früheren Studien wurde gezeigt, dass MIP-2 von NF- κ B nach LPS Stimulation reguliert wird. Eine Bindung von I κ B β an die Promoterregion von MIP-2 konnte nicht nachgewiesen werden. ChIP-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen p65, p50, p52 und c-Rel deuten auf eine Regulation von p65/p50 Heterodimeren am MIP-2 Promoter in RAW264.7 Makrophagen hin. Durch die Bindung der RNA-Polymerase II an die Promoterregion nach Stimulation kann von einer transkriptionellen Regulation ausgegangen werden.

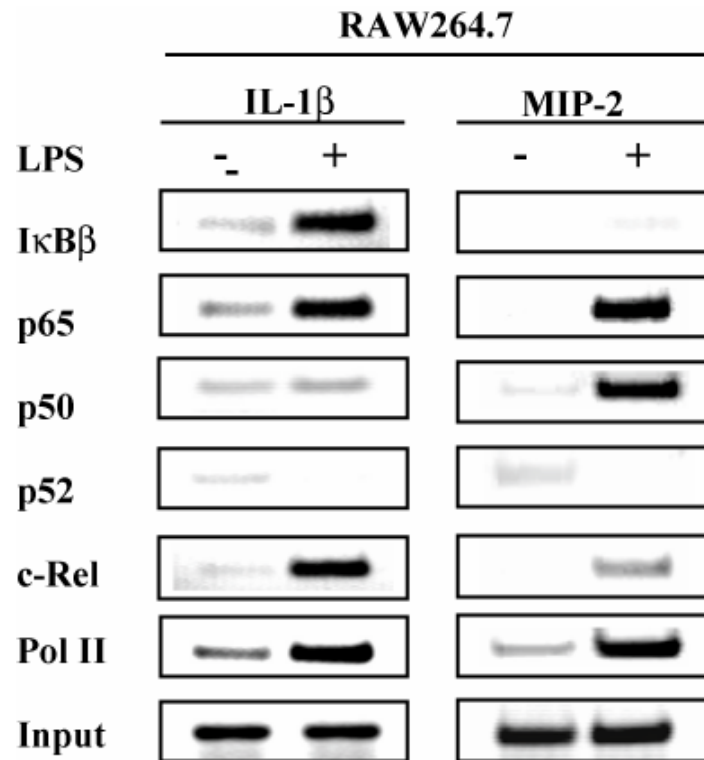


Abb. 25 Chromatin Immun-Präzipitation zur Untersuchung der Bindung verschiedener NF- κ B Proteine an das IL-1 β Gen in RAW264.7 Makrophagen

Nach 2 stündiger Stimulation von Raw264.7 Makrophagen mit LPS wurde das Chromatin mittels spezifischen Antikörpern für I κ B β , p65, p50 c-Rel und Pol II immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA oder 10% der Chromatin-Input DNA wurden anschließend mittels PCR mit spezifischem Primern amplifiziert.

3.4.3 ChIP-Analysen des IL-1 β Promoters in Knochenmarksmakrophagen nach Stimulation mit LPS

Als nächstes wurde die IL-1 β Promoterregion in I κ B β ^{-/-} und Wildtyp Knochenmarksmakrophagen mittel ChIP-Analysen untersucht. Dazu wurden die Knochenmarksmakrophagen aus den Mäusen präpariert und nach einer Woche Kultivierung mit LPS stimuliert. Anhand der ChIP-Analysen konnte analog zu den Untersuchungen der RAW264.7 Makrophagen gezeigt werden, dass I κ B β direkt am IL-1 β Promoter von Wildtypzellen bindet, aber nicht an die IL-1 β Promotorregion in I κ B β ^{-/-} Knochenmarksmakrophagen (Abb.26). Ebenfalls ließen sich im Wildtyp Heterodimere aus p65/cRel Komplexen am IL-1 β -Promoter nachweisen. Analysen der IL-1 β Promoterregion in I κ B β ^{-/-} Makrophagen zeigen einen Verlust der Rekrutierung von c-Rel an die κ B-Stelle des IL-1 β -Promoters. Außerdem zeigte sich anhand der ChIP-Analysen mit Antikörpern gegen RNA-Polymerase II,

dass die Transkription in $I\kappa B\beta^{-/-}$ - Knochenmarksmakrophagen durch die stark verringerte Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor im Vergleich zu stimulierten Wildtyp Makrophagen deutlich reduziert ist.

Als Kontrolle diente die NF- κ B Promoter-Stelle innerhalb des MIP-2 Gens, an der in Wildtyp-Knochenmarksmakrophagen eine Rekrutierung von p65/p50 Heterodimeren gezeigt werden konnte. Eine verminderte Bindung der Komplexe konnte in den $I\kappa B\beta^{-/-}$ Makrophagen nicht nachgewiesen werden. Wie auch in mit siRNA gegen $I\kappa B\beta$ mRNA transfizierten RAW264.7 Zellen scheint in Knochenmarksmakrophagen der Verlust von $I\kappa B\beta$ keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von MIP-2 zu haben.

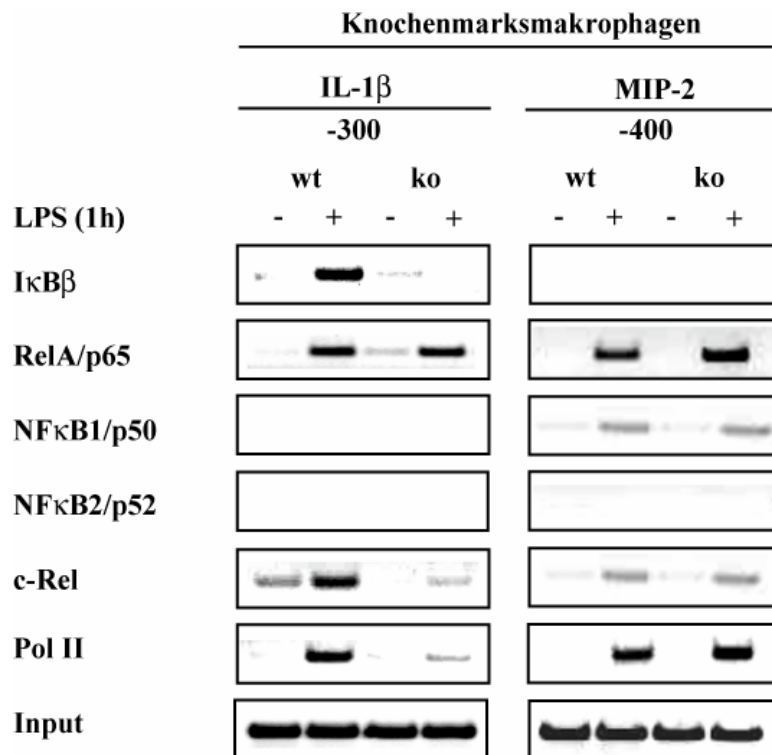


Abb. 26 Chromatin Immun-Präzipitation des IL-1 β Promotors in Knochenmarksmakrophagen

Nach Präparation der Knochenmarksmakrophagen aus 3 $I\kappa B\beta^{-/-}$ und 3 Wildtyp-Mäusen wurden die Zellen nach 7 Tagen für 1 Stunde mit LPS stimuliert und das Chromatin von stimulierten und unstimulierten Knochenmarksmakrophagen mit den spezifischen aufgelisteten Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurde die DNA und 10 % der Chromatin-Input DNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Chromatin-Input diente dabei als Ladungskontrolle.

3.4.4 Streptavidin-biotin *Pull Down Assay* in RAW264.7 Makrophagen und nukleäre Lokalisation von I κ B β nach Stimulation

Für die genauere Analyse der DNA/Protein Interaktion im Zellkern wurde ein Streptavidin-Biotin *Pull Down* in unstimulierten Zellen und 2 Stunden nach Stimulation von RAW264.7 Makrophagen etabliert. Dazu wurde die Sequenz der proximalen κ B-Stelle von IL-1 β als Oligosequenz verwendet und mit Biotin markiert. Nach Stimulation wurden die Kerne vom Zytoplasma getrennt und beide Fraktionen mit der markierten Sonde inkubiert. Nach der Präzipitation wurden die DNA/Protein Komplexe mittels Westernblot Analyse untersucht. Die nicht-stimulierten zytoplasmatischen Fraktionen der RAW264.7 Makrophagen zeigen eine Komplexbildung der Proteine p65/I κ B β vorwiegend in den zytoplasmatischen Fraktionen (Abb27). In stimulierten nukleären Fraktion der RAW264.7 Zellen konnte ein p65/c-Rel und I κ B β Komplex nachgewiesen werden, wohingegen die stimulierten zytoplasmatischen Fraktion keine Proteinkomplexe aus p65/c-Rel/I κ B β aufweisen.

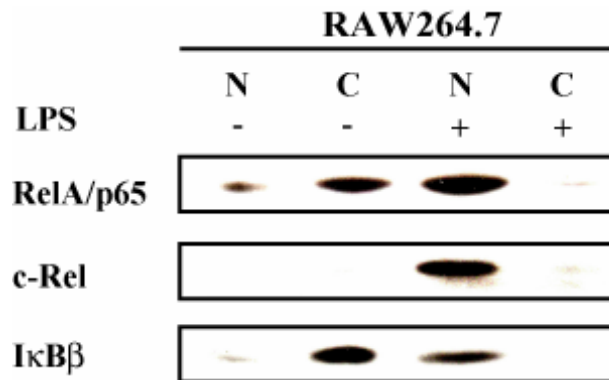


Abb. 27 Streptavidin-Biotin *Pull Down Assay* mit RAW264.7 Makrophagen

Nukleäre und zytoplasmatische Extrakte von unstimulierten und stimulierten RAW264.7 Zellen wurden mit einem biotinyliertem Oligonukleotid, welches die IL-1 β κ B-Sequenz beinhaltet, inkubiert. Der biotinylierte Oligonukleotid-DNA-Protein Komplex wurde anschließend mit Streptavidin-Agarose präzipitiert, nach dem Waschen auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen I κ B β , c-Rel und p65 analysiert (Z= zytoplasmatische Fraktionen, N= nukleäre Fraktionen).

Diese Komplexbildung aus p65/c-Rel/I κ B β konnte bereits in früheren Untersuchungen in WEHI-Zellen nachgewiesen werden (Phillips and Ghosh 1997).

Anhand der Chromatin-Immunpräzipitation, der Immunfluoreszenz und der Western-Blot Analysen des Streptavidin-Biotin Pulldown konnte eine nukleäre Lokalisation von I κ B β im Nukleus nachgewiesen werden. Die Untersuchung mittels Chromatin-Immunpräzipitation

und Streptavidin-Biotin *Pull down* zeigte zudem eine direkte Interaktion von I κ B β mit dem IL-1 β Promotor, sowie eine Komplexbildung mit den NF- κ B-Familienmitglieder p65/cRel.

3.4.5 Untersuchung des *knock down* von cRel auf die IL-1 β Sekretion

Abschließend wurde die Funktionalität von cRel bei der Regulation von IL-1 β untersucht. Dazu wurde ein *knock down* mit siRNA gegen cRel etabliert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellextrakte geerntet und anhand von Western-Blot Analysen untersucht. Dabei konnte eine 70% Translationsreduktion für cRel nachgewiesen werden (Abb. 28).

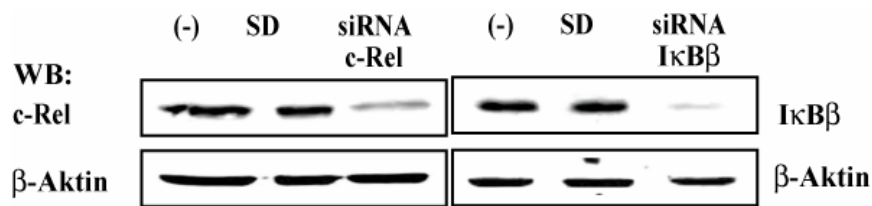


Abb. 28 Western-Blot Analysen von RAW264.7 Makrophagen nach Transfektion mit siRNA

Die Zellextrakte wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet und der *knock down* von I κ B β und c-Rel mittels spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot untersucht. Sie unspezifische scramble duplex (SD) siRNA diente als negativ Kontrolle.

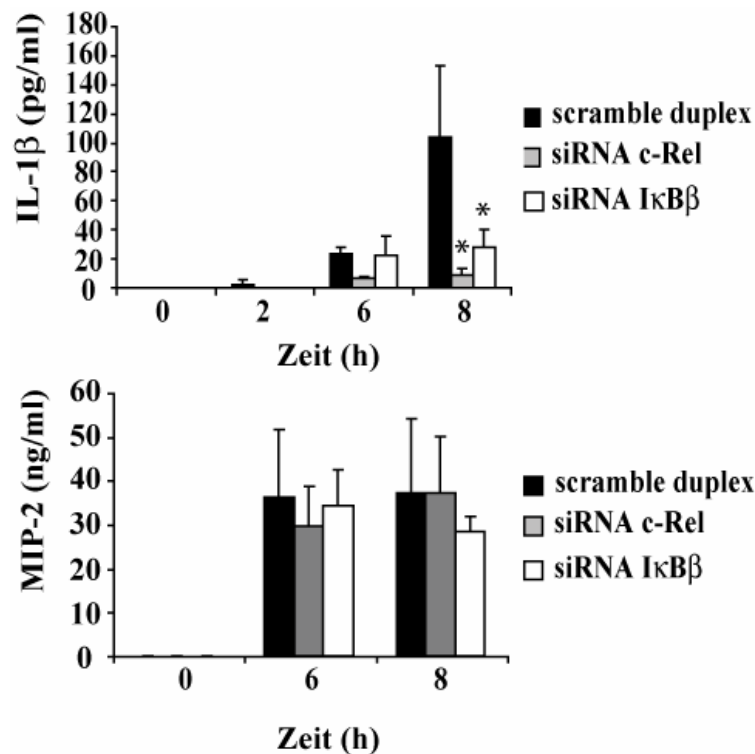


Abb. 29 Zytokin-Sekretion in RAW264.7 Zellen nach *knock down* von cRel und I κ B β

48 Stunden nach Transfektion mit siRNA wurden die Zellen stimuliert und anschließend der Überstand genommen. Die Zytokin-Sekretion von IL-1 β und MIP-2 wurde mittels ELSIA bestimmt. Der Mittelwert, sowie die Standardabweichung ergaben sich aus 5 unabhängigen Versuchen.

Anschließend wurde die Auswirkung des Proteinverlustes von I κ B β und cRel auf die Sekretion von IL-1 β mittels ELISA untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proteinreduktion beider Proteine eine signifikante Reduktion der IL-1 β Sekretion acht Stunden nach Stimulation zu Folge hat (Abb.29). Gegensätzlich zu Sekretion von MIP-2, bei der keine Reduktion nach *knock down* von cRel und I κ B β nachgewiesen werden konnte. Anhand dieser Untersuchungen konnte eine Funktionalität der cRel/I κ B β Komplexe bei der Genregulation von IL-1 β gezeigt werden.

4 Diskussion

NF- κ B nimmt eine der wichtigsten physiologischen Rollen im Immunsystem ein. Besonders bei der transkriptionellen Regulation von Zytokinen, antimikrobiellen Effektormolekülen, bei der Regulation von Genen der zellulären Differenzierung, für das Überleben und die Proliferation stellt NF- κ B einen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren im Organismus dar. Dabei sind die verschiedenen Familienmitglieder der NF- κ B Klasse sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem bedeutend. Die Aktivität der unterschiedlichen homo- und heterodimeren NF- κ B-Komplexe wird vornehmlich durch Interaktion mit Proteinen der I κ B-Familie reguliert. Nach Aktivierung der Zelle durch verschiedene Stimuli werden die an NF- κ B gebundenen I κ B-Mitglieder phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut. Daraufhin werden die NF- κ B-Komplexe frei und sind in der Lage in den Zellkern zu translozieren, um dort spezifisch an Sequenzen diverser Gene zu binden und deren Transkription zu regulieren.

Seit der Entdeckung der I κ B Proteine als zytoplasmatische Inhibitoren von NF- κ B haben viele Untersuchungen zum Verständnis ihrer Wirkungsweise beigetragen. Sie wurden zunächst als Faktoren identifiziert, die sowohl die DNA-Bindung von NF- κ B verhindern, als auch dessen Import in den Nukleus unterbinden. In den letzten Jahren ergaben eine Reihe von Analysen wichtige Hinweise für einen weiteren Funktionsbereich der I κ B Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder der I κ B-Proteine eine bedeutende Rolle bei der NF- κ B-abhängigen transkriptionellen Regulation einnehmen (Bates and Miyamoto 2004).

Innerhalb der I κ B-Proteinfamilie ist bislang das inhibitorische Protein I κ B α am besten charakterisiert. Seine Funktion und Regulation ist weitgehend *in vivo* und *in vitro* aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass der Genverlust von I κ B α zu postnataler Letalität bei Mäusen führt. Zudem zeigen diese Mäuse eine gesteigerte Entwicklung von Granulozyten und Hautdefekte (Beg, Sha et al. 1995; Klement, Rice et al. 1996). Die Rolle von I κ B β *in vivo* ist bislang weitgehend unklar. Sowohl in seiner Regulation als auch in seiner Transkription unterscheidet es sich zu I κ B α deutlich. Es wird vermutet, dass I κ B β auch bei NF- κ B-unabhängigen Signalwegen eine Rolle spielt (Tran, Merika et al. 1997; Na, Kim et al. 1998).

Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von I κ B β wurde eine *knock out* Mauslinie

durch homologe Rekombination im Rahmen der Dissertation von Bettina Klein generiert. Die $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäuse sind lebensfähig, fertil und weisen keine makroskopischen Abnormalitäten auf. Bei Injektion mit hochdosiertem LPS zeigte sich jedoch im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine ausgeprägte LPS Toleranz. Nach Injektion von 30 mg/kg LPS verstarben alle Wildtyp-Mäuse innerhalb von 24 Stunden an den Folgen eines septischen Schocks. $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäuse hingegen zeigen zunächst erste äußere Anzeichen wie Schüttelfrost und Fieber, erholen sich allerdings 48 Stunden nach Injektion vollständig. Bei der gewählten LPS Dosis wird in Wildtyp-Mäusen eine Sepsis eingeleitet, die zum Tod der Tiere durch Multiorganversagen führt. Dabei stellt LPS ein hoch potentes biologisches Toxin dar, welches das Abwehrsystem mit seinen Mediatoren selbst zum Angreifer werden lässt. Die zunächst notwendige Reaktion des Immunsystems auf das Endotoxin gerät dabei außer Kontrolle und führt zu einer generellen Überstimulation. Somit kommt es zu einer Organdysfunktion und Gerinnungsstörungen, bis hin zum Schock und Multiorganversagen (Cohen 2002). Untersuchungen der Zytokinspiegel im Blut von injizierten $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ - und Wildtypmäuse zeigten, im Gegensatz zu den Zytokinserumspiegeln der Wildtyp-Mäuse, eine starke Reduktion der proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, sowie IL-6 . Diese Zytokine stellen zunächst die ersten Mediatoren des angeborenen Immunsystems dar, um eingedrungene Pathogene erfolgreich zu bekämpfen. Im Fall der Sepsis führt ihre überschwellige Sekretion letztlich zu Dysregulation. Aufgrund des reduzierten Serumspiegels in $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen wird der Schwellenwert der Zytokinkonzentration nicht überschritten, somit kommt es in diesen Mäusen zu keiner Überreaktion des Körpers und folglich wird die Sepsisreaktion nicht eingeleitet (Buras, Holzmann et al. 2005). Anhand der zu beobachtenden LPS-Toleranz in $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen scheint $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ eine essentielle Funktion in der LPS induzierten Immunantwort einzunehmen. Die Analyse der immunvermittelnden Organe ergab in der Leber eine starke Reduktion der Zytokine in $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen nach LPS Injektion. In der Milz konnten keine Unterschiede in der Expression von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ sowie IL-6 nachgewiesen werden. Die Leber enthält die größte Anzahl an Makrophagen im Organismus, die sogenannten Kupfferzellen. Sie sind in den sinusoiden Bereichen der Leber lokalisiert, stehen in Kontakt mit dem Blutsystem des Verdauungstraktes und sind somit LPS direkt ausgesetzt. Kupfferzellen spielen bei der Erkennung von LPS eine bedeutende Rolle und sekretieren nach ihrer Aktivierung eine Reihe von Zytokinen (Mathison and Ulevitch 1979; Su, Goyert et al. 2002; Bilzer, Roggel et al. 2006). Daher wurden die Kupfferzellen der Leber aus $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ Mäusen und Wildtypmäusen isoliert und mit LPS stimuliert. Die Sekretion der Zytokine

IL-1 β , TNF- α und IL-6 in der Leber der LPS-injizierten Mäuse wurde signifikant reduziert, ebenso die IL-1 β Konzentration in den Kupfferzellen der I κ B β ^{-/-} Mäuse. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Kupfferzellen der Leber in den I κ B β ^{-/-} Mäusen mitverantwortlich für die reduzierte Zytokinsekretion sind, worauf vermutlich die LPS Toleranz dieser Tieren beruht.

Die Hämatoxilin/Eosin Färbungen des Lungengewebes zeigten bezüglich der Neutophilen- und Makrophageninfiltration 2 Stunden nach LPS Injektion keine signifikanten Unterschiede. In beiden Lungengeweben kommt es zu einer gleichermaßen starken Infiltration der Leukozyten. Die Infiltration der Leukozyten scheint folglich für das Überleben der I κ B β ^{-/-} Mäuse nicht von Bedeutung zu sein. Obwohl nicht auszuschließen ist, dass I κ B β direkt an der Regulation der immunologischen Mechanismen beteiligt ist, ist es wahrscheinlich, dass die signifikante LPS Toleranz der I κ B β ^{-/-} Mäuse auf die Reduktion der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 zurückzuführen ist.

Da Makrophagen eine der ersten Zellpopulation im Organismus darstellen, die auf Pathogene durch die Vermittlung der Immunantwort reagieren, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Einfluss von I κ B β auf die Proteinproduktion verschiedener NF- κ B und I κ B-Familienmitglieder in Knochenmarksmakrophagen untersucht. Dazu wurden Knochenmarkszellen isoliert und anschließend zur Differenzierung und Selektion in M-CSF haltigem Medium 7 Tage kultiviert. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass LPS über den Toll-like Rezeptor 4 die signalinduzierte Phosphorylierung von I κ B β stimuliert, was zum Abbau von I κ B β führt (Velasco, Diaz-Guerra et al. 1997). Dabei wurde im Gegensatz zu I κ B α eine persistente NF- κ B Aktivierung nach der Neusynthese von I κ B β beobachtet (Suyang, Phillips et al. 1996; Phillips and Ghosh 1997). Die Degradation von I κ B β konnte auch in anderen Zelltypen mit verschiedenen Stimuli wie IL-1 β , TNF- α und PMA beobachtet werden (Johnson, Douglas et al. 1996; Cheshire and Baldwin 1997). Vorarbeiten im Rahmen der Dissertation von Bettina Klein hatten gezeigt, dass in Knochenmarksmakrophagen messbare Zytokinkonzentrationen ausschließlich nach LPS-Stimulation nachzuweisen waren.

Untersuchung der Zytokinproduktion und Zytokinsekretion in Knochenmarksmakrophagen haben gezeigt, dass die mRNA Menge und sekretiertes IL-1 β Protein in I κ B β ^{-/-} Zellen signifikant reduziert ist. Dies konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit wie auch in den vorangegangenen Untersuchungen von Bettina Klein gezeigt werden. Im Gegensatz zu Kupfferzellen konnten in Knochenmarksmakrophagen keine signifikanten Unterschiede in

der Expressionskinetik von TNF- α und IL-6 nachgewiesen werden. Die Analysen der Genexpression mittels Affymetrix-Chip zeigten ein breites Spektrum von Genen, deren Transkription durch das Fehlen von I κ B β verändert ist. Es wurden besonders Gene gesucht, deren Expression nach LPS Stimulation mindestens fünffach induziert und im Fall der I κ B β ^{-/-} Knochenmarksmakrophagen stark reduziert ist. Neben IL-1 β fielen IL-1 α , SOCS-3, CXCL-1, sowie ein Mitglied der „tumor necrosis factor (ligand) superfamily“ und A20 durch stark reduzierte Genexpression im Vergleich zu Wildtypzellen auf. Wie bereits in der Literatur beschrieben, werden einige dieser Gene von NF- κ B reguliert (Laherty, Perkins et al. 1993; Cogswell, Godlevski et al. 1994). Somit besteht die Möglichkeit, dass die Abwesenheit von I κ B β einen direkten oder indirekten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation dieser Gene in Knochenmarksmakrophagen hat.

IL-1 β stellt neben TNF- α eines der ersten Zytokine dar, das nach Injektion von LPS oder auch Stimulation mit LPS induziert wird. Die Menge an IL-1 β war in allen Untersuchungen *in vivo* in I κ B β ^{-/-} Mäusen und *in vitro* in Kupfferzellen und Knochenmarksmakrophagen signifikant reduziert. Um nähere Einblicke in den Zusammenhang der LPS-vermittelten Regulation von IL-1 β durch NF- κ B zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein *knock down* mit spezifischer siRNA gegen I κ B β in RAW264.7 Makrophagen durchgeführt. Es wurden zwei siRNAs sowie eine scrambled siRNA als unspezifische Kontrolle verwendet. Während IL-1 β nach Stimulation der *knock down* Zellen mit LPS in geringeren Mengen sekretiert wird, scheint der *knock down* von I κ B β keinen Einfluss auf die Sekretion von MIP-2 und TNF- α zu haben, die beide nachweislich über NF- κ B reguliert werden (Collart, Baeuerle et al. 1990; Kim, Han et al. 2003). Anschließende Untersuchungen durch transiente Transfektion von RAW264.7 Makrophagen mit drei unterschiedlicher Luziferase-Reportergen-IL-1 β Promotor-Konstrukten, die entweder ein oder zwei κ B-Stellen enthalten, zeigten ebenfalls eine reduzierte Genregulation nach Stimulation mit LPS. Somit konnte ein direkter Einfluss von I κ B β auf die Induktion von IL-1 β bestätigt werden.

Bislang wurden in der humanen pro-IL-1 β Promotersequenz drei potentielle NF- κ B-Bindestellen identifiziert (Cogswell, Godlevski et al. 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass NF- κ B für die Regulation von IL-1 β den Genbereich -293/-286 bp upstream der TATA-Box eine wichtige transkriptionelle Funktion einnimmt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzlich die proximale κ B-Sequenz einen wichtigen Beitrag zur Regulation von IL-1 β leistet. Eine Mutation der proximalen κ B-Sequenz verdeutlichte eine transkripti-

onelle Abhängigkeit von NF- κ B mit einer stark reduzierten Induktion von IL-1 β nach Stimulation mit LPS, wie in der Literatur bereits beschrieben (Cogswell, Godlevski et al. 1994). Im Gegensatz zum Menschen wurden in Mäusen zwei κ B-Bindestellen gefunden. Zur genaueren Untersuchung der beiden detektierten murinen κ B-Bindestellen wurde Chromatin-Immunpräzipitation angewendet. In Untersuchungen der Kernextrakte von RAW264.7 Makrophagen, konnte an der proximalen κ B-Sequenz sowie in der TATA-Box Region eine direkte Bindung von I κ B β nach Stimulation mit LPS nachgewiesen werden. Anhand der Kristallstruktur von DNA/I κ B β /p65 Homodimer-Komplexen konnte bereits die Rolle von I κ B β im Komplex mit NF- κ B als regulatorische Einheit an spezifischen κ B-Bindestellen gezeigt werden (Malek, Huang et al. 2003). Des Weiteren wurden an der proximalen κ B-Sequenz die Bindung von p65/c-Rel Heterodimeren detektiert, im Gegensatz zu den NF- κ B Familienmitgliedern p50 und p52 deren Bindung an diese Promotorsequenz von IL-1 β nicht nachgewiesen werden konnte.

Chip-Analysen mit einem Antikörper gegen die RNA Polymerase II zeigten in dieser Arbeit eine direkte Transkriptionsaktivität innerhalb des Promotorbereiches. Die direkte Beteiligung von I κ B Proteine an der Transkription unterschiedlicher NF- κ B-abhängiger Gene wurde bereits anhand einiger Beispiele beschrieben. I κ B α konnte am Notch Targetgen *hes1* zusammen mit dem Histondeacetylasen (HDAC) 1 und 5 detektiert werden. Dabei wurde postuliert, dass I κ B α bei der Rekrutierung genrepromierender Komplexe an Promotoren eine wichtige Funktion einnimmt (Aguilera, Hoya-Arias et al. 2004). Diese Repressorfunktion konnte ebenfalls für Bcl-3 gezeigt werden. Bcl-3 ist dabei in der Lage, p50/p52-Komplexe von der jeweiligen Promoterregion abzulösen (Franzoso, Bours et al. 1992). Für das erst vor kurzen entdeckte nukleäre I κ B ζ konnte eine Funktion als Coaktivator in Assoziation mit p50 am IL-6 Promoter in Makrophagen gezeigt werden (Yamamoto, Yamazaki et al. 2004). Als Kontrollpromoterregion diente hier die Untersuchung des MIP-2 Promoters, der ebenfalls von NF- κ B nach LPS Stimulation reguliert wird. Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass diese Promoterregion von Komplexen aus p65, p50 aber auch cRel gebunden werden kann (Hoffmann, Leung et al. 2003; Bosisio, Marazzi et al. 2006). Dies konnte auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Zwei Stunden nach Stimulation konnte p65 und p50, sowie eine geringe Menge cRel an dieser Promoterregion von MIP-2 präzipitiert werden. Es wurde in unstimulierten zytoplasmatischen Extrakten zunächst ein Komplex aus I κ B β /p65 detektiert. Nach Stimulation der RAW264.7 Makrophagen konnte ein Komplex aus I κ B β /p65/cRel im Nukleus detektiert werden in Übereinstim-

mung mit vorherigen Daten, die diesen Komplex in B-Vorläuferzellen belegen (Phillips and Ghosh 1997). Die Frage wie I κ B β in den Nukleus der Zelle transloziert, konnte nicht geklärt werden. Es ist zu vermuten, dass es sich im Nukleus um eine hypophosphorylierte Form von I κ B β handelt. Es wurde diskutiert, dass eine geringe Menge von I κ B β in einem unphosphorylierten Zustand in der Zelle vorliegt, um NF- κ B-Komplexe in den Nukleus zu transportieren. Es ist jedoch unklar, ob I κ B β dauerhaft in diesem unphosphorylierten Zustand verbleibt, für den entweder eine I κ B β spezifische Phosphatase oder eine spezifische Kinase verantwortlich ist (McKinsey, Chu et al. 1997; Phillips and Ghosh 1997). Die Hypothese der Lokalisation von I κ B β -NF- κ B Komplexen im Nukleus wurde durch die Entdeckung des κ B-ras Proteins bestärkt, welches an die C-terminale PEST-Region von I κ B β binden kann. Es wurde zunächst angenommen, dass κ B-ras die Degradierung von I κ B β nach Stimulation verhindert. Genauere Untersuchungen haben gezeigt, dass κ B-ras zwischen „Ankyrin repeat“ 3 und 4 von I κ B β bindet und dadurch die Nukleuslokalisationssequenz von p65 verdeckt. Es wurde postuliert, dass nach dem Verlust von κ B-ras eine Nukleuslokalisationssequenz des NF- κ B-Dimers freiliegt, und somit eine Translokalisierung von I κ B β -NF- κ B Komplexen in den Nukleus von stimulierten Zellen ermöglicht wird (Chen, Wu et al. 2003).

Die *in vitro* Untersuchungen an RAW264.7 Makrophagen zeigten die Bedeutsamkeit des Komplexes aus cRel/p65 als regulatorischer Transkriptionsfaktor des IL-1 β Promoters nach LPS Stimulation und stehen im Einklang mit Daten aus p65^{-/-} Lebermakrophagen, die eine deutliche Reduktion der IL-1 β Expression aufzeigen (Wang, Ladner et al. 2005).

Im Fall des IL-1 β Promoters scheint ein Komplex aus p65/cRel-Dimeren für eine ausreichende Transkription unabdingbar zu sein. *In vivo* und *in vitro* Promoteranalysen bezüglich der physiologischen Regulierung des NF- κ B Systems haben in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass jedes NF- κ B Dimer eine spezifische transkriptionelle Aktivität an jedem Promoter aufweist (Lin, Gewert et al. 1995; Saccani, Pantano et al. 2003). Dabei sind NF- κ B Homo- und Heterodimere in der Lage, an Promoterbereiche mit κ B-Sequenzen zu binden, jedoch ist der Einfluss auf die Transkription sehr unterschiedlich. Die Funktion von diversen Co-Faktoren, wie z.B. unterschiedlichen Histonacylasen, spielt dabei eine essentielle Rolle. Histonacylasen bilden zusammen mit NF- κ B-Dimeren einen transkriptionellen Komplex, das so genannte „Enhanceosome“. So ist zu vermuten, dass I κ B β ein Teil dieses regulatorischen Komplexes in Form eines Co-Faktors darstellt. Kommt es zum

Verlust eines Co-Faktors, wie in den $\text{I}\kappa\text{B}\beta^{-/-}$ - Mäusen, kann dies zu einer Konformationsänderung innerhalb des Gesamtkomplexes führen. Somit ist eine vollständige Bindungsaktivität an die jeweiligen DNA-Bindesequenzen nicht mehr gewährleistet, und die Transkription erfolgt entweder gar nicht oder stark reduziert. Wie sich dieser Transkriptionskomplex zusammensetzt muss in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte für das $\text{I}\kappa\text{B}$ -Familienmitglied $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ eine wichtige Funktion innerhalb des LPS induzierten NF- κB Signalweges gezeigt werden. Dies verdeutlichen die *in vivo* Analysen anhand eines Sepsis Modells, bei dem alle Mäuse ohne $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ eine normalerweise lethale Dosis des Endotoxins LPS überleben. Außerdem weist die direkte Bindung von $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ an den Promotor von IL-1 β auf eine Co-Faktor-Funktion bei der Regulation NF- κB abhängiger Gene hin (Abb.30).

Dennoch muss in zukünftigen Experimenten analysiert werden, inwieweit die verwendeten Makrophagen die Zellpopulation darstellen, die für das Ausbleiben der Sepsis verantwortlich ist. Dazu müssen in weiterführenden Untersuchungen andere Zelltypen, wie z.B. Neutrophile, genauer untersucht werden.

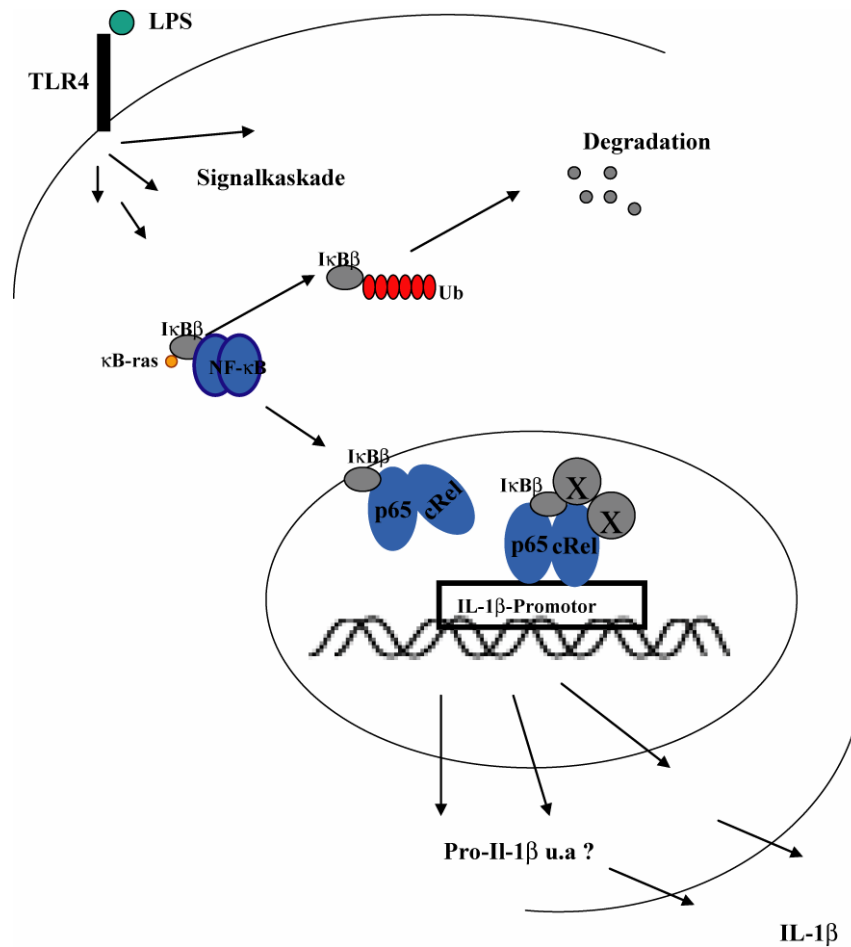


Abb. 30 Modell der IL-1β Genregulation durch IκBβ

Die Bindung von LPS an den Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) führt über eine Signalkaskade zum Abbau der IκB Proteine. Dabei scheint ein Teil von IκBβ, vermutlich durch das Protein κB-ras vor dem Abbau geschützt zu sein. In einer hypophosphorylierten Form ist IκBβ in der Lage mit NFκB Dimeren in den Zellkern zu translozieren um dort zusammen mit anderen Co-Faktoren als transkriptioneller Komplex für Gene wie IL-1β zu wirken.

5 Zusammenfassung

NF- κ B-Proteine spielen durch ihre Fähigkeit inflammatorische Gene zu aktivieren eine zentrale Rolle bei der Steuerung immunologischer Prozesse. Die Regulation und Aktivierung der NF- κ B Transkriptionsfaktoren erfolgt durch direkte Interaktion mit den Mitgliedern der I κ B Familie. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion von I κ B β wurde im Vorfeld eine I κ B β ^{-/-}-Mauslinie generiert. Diese Mäuse zeigen keinen äußeren Phänotyp. Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde die Rolle von I κ B β im LPS-induzierten Sepsis Modell untersucht. Dabei konnte eine hohe Resistenz gegen LPS in I κ B β ^{-/-} festgestellt werden. Da keine der injizierten I κ B β ^{-/-} Mäuse einem septischen Schock nach einer normalerweise letalen LPS Dosis erlag, deutet dies auf eine essentielle Funktion von I κ B β hin. Die Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF α und IL-6 war nach der Injektion von LPS deutlich vermindert. Des Weiteren konnte eine signifikante Reduktion von IL-1 β , TNF α und IL-6 nach LPS Injektion in der Leber und in isolierten Kupfferzellen der Leber nachgewiesen werden. Somit scheint das Immunsystem der I κ B β ^{-/-} Mäuse einen entscheidenden Defekt in der Synthese dieser Zytokine zu haben. Die Produktion einzelner NF- κ B-Proteine, die an der Regulation dieser Zytokine beteiligt sind, war in Knochenmarksmakrophagen aus I κ B β ^{-/-} Mäusen nicht beeinträchtigt. In diesen Knochenmarksmakrophagen konnte allerdings eine reduzierte IL-1 β Produktion und Sekretion nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden, die Genexpression von TNF- α und IL-6 war in diesem Zelltyp nicht verringert. Untersuchungen mittels RNA-Chip-Analysen deuten allerdings auf ein weites Spektrum beeinträchtigter Gene in den I κ B β ^{-/-} Knochenmarksmakrophagen hin.

In vitro Analysen mittels siRNA gegen I κ B β konnten einen direkten Einfluss von I κ B β auf die Induktion von IL-1 β nachweisen. Zwei potentielle NF- κ B Bindestellen konnte upstream vom Transkriptionsstart des murinen IL-1 β identifiziert werden. Chromatin-Immunpräzipitations Analysen zeigten eine direkte Bindung von I κ B β im Komplex mit p65/cRel an die proximale κ B Bindestelle des IL-1 β Promoters. Die Abwesenheit von I κ B β in Knochenmarksmakrophagen führte zu einer verminderten Rekrutierung von cRel an die Promoterregion. Dies belegend, konnte eine direkte Interaktion von I κ B β mit p65/cRel-Komplexen im Zellkern von Raw264.7 Makrophagen gezeigt werden. Außerdem ließ sich eine reduzierte Transkriptionseffizienz durch den Verlust der RNA Polymerase II innerhalb der Promoterregion nachweisen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass I κ B β eine entscheidende Rolle im LPS-induzierten Sepsis Modell einnimmt, und zum anderen wichtig als Co-Faktor bei der Genregulation von IL-1 β in Makrophagen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Aguilera, C., R. Hoya-Arias, et al. (2004). "Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16537-42.
- Arenzana-Seisdedos, F., P. Turpin, et al. (1997). "Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm." J Cell Sci **110 (Pt 3)**: 369-78.
- Attar, R. M., H. Macdonald-Bravo, et al. (1998). "Expression of constitutively active IkappaB beta in T cells of transgenic mice: persistent NF-kappaB activity is required for T-cell immune responses." Mol Cell Biol **18**(1): 477-87.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). "The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights." Annu Rev Immunol **14**: 649-83.
- Bates, P. W. and S. Miyamoto (2004). "Expanded nuclear roles for IkappaBs." Sci STKE **2004**(254): pe48.
- Beg, A. A., W. C. Sha, et al. (1995). "Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice." Genes Dev **9**(22): 2736-46.
- Bilzer, M., F. Roggel, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." Liver Int **26**(10): 1175-86.
- Birbach, A., P. Gold, et al. (2002). "Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus." J Biol Chem **277**(13): 10842-51.
- Bosisio, D., I. Marazzi, et al. (2006). "A hyper-dynamic equilibrium between promoter-bound and nucleoplasmic dimers controls NF-kappaB-dependent gene activity." Embo J **25**(4): 798-810.
- Bours, V., G. Franzoso, et al. (1993). "The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers." Cell **72**(5): 729-39.
- Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products." J Leukoc Biol **67**(4): 508-14.

- Budde, L. M. and S. Ghosh (2000). "Cloning and characterization of the gene encoding mouse IkappaBbeta." Gene **247**(1-2): 279-86.
- Budde, L. M., C. Wu, et al. (2002). "Regulation of IkappaBbeta expression in testis." Mol Biol Cell **13**(12): 4179-94.
- Buras, J. A., B. Holzmann, et al. (2005). "Animal models of sepsis: setting the stage." Nat Rev Drug Discov **4**(10): 854-65.
- Chen, Y., J. Wu, et al. (2003). "KappaB-Ras binds to the unique insert within the ankyrin repeat domain of IkappaBbeta and regulates cytoplasmic retention of IkappaBbeta x NF-kappaB complexes." J Biol Chem **278**(25): 23101-6.
- Cheng, J. D., R. P. Ryseck, et al. (1998). "Functional redundancy of the nuclear factor kappa B inhibitors I kappa B alpha and I kappa B beta." J Exp Med **188**(6): 1055-62.
- Cheshire, J. L. and A. S. Baldwin, Jr. (1997). "Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation." Mol Cell Biol **17**(11): 6746-54.
- Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, et al. (1994). "NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site." J Immunol **153**(2): 712-23.
- Cohen, J. (2002). "The immunopathogenesis of sepsis." Nature **420**(6917): 885-91.
- Collart, M. A., P. Baeuerle, et al. (1990). "Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B." Mol Cell Biol **10**(4): 1498-506.
- DeLuca, C., L. Petropoulos, et al. (1999). "Nuclear IkappaBbeta maintains persistent NF-kappaB activation in HIV-1-infected myeloid cells." J Biol Chem **274**(19): 13010-6.
- Dinarello, C. A. (1996). "Biologic basis for interleukin-1 in disease." Blood **87**(6): 2095-147.
- Dinarello, C. A. (2000). "Proinflammatory cytokines." Chest **118**(2): 503-8.
- Doerre, S. and R. B. Corley (1999). "Constitutive nuclear translocation of NF-kappa B in B cells in the absence of I kappa B degradation." J Immunol **163**(1): 269-77.
- Fan, C., Q. Li, et al. (2004). "IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflam-

- mation." J Clin Invest **113**(5): 746-55.
- Franzoso, G., V. Bours, et al. (1992). "The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF-kappa B-mediated inhibition." Nature **359**(6393): 339-42.
- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Gilmore, T. D. (1999). "The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction." Oncogene **18**(49): 6842-4.
- Gilmore, T. D. (2006). "Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives." Oncogene **25**(51): 6680-4.
- Gordon, S. (1995). "The macrophage." Bioessays **17**(11): 977-86.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-64.
- Griffin, B. D. and P. N. Moynagh (2006). "In vivo binding of NF-kappaB to the IkappaB-beta promoter is insufficient for transcriptional activation." Biochem J **400**(1): 115-25.
- Grilli, M., J. J. Chiu, et al. (1993). "NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system." Int Rev Cytol **143**: 1-62.
- Hack, C. E., L. A. Aarden, et al. (1997). "Role of cytokines in sepsis." Adv Immunol **66**: 101-95.
- Harhaj, E. W., S. B. Maggirwar, et al. (1996). "CD28 mediates a potent costimulatory signal for rapid degradation of IkappaBbeta which is associated with accelerated activation of various NF-kappaB/Rel heterodimers." Mol Cell Biol **16**(12): 6736-43.
- Harhaj, E. W. and S. C. Sun (1999). "Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50." Mol Cell Biol **19**(10): 7088-95.
- Hayden, M. S., A. P. West, et al. (2006). "NF-kappaB and the immune response." Oncogene **25**(51): 6758-80.
- Hirano, F., M. Chung, et al. (1998). "Alternative splicing variants of IkappaB beta establish differential NF-kappaB signal responsiveness in human cells." Mol Cell Biol **18**(5): 2596-607.
- Hirano, T., S. Akira, et al. (1990). "Biological and clinical aspects of interleukin 6." Immu-

- nol Today **11**(12): 443-9.
- Hoffmann, A., T. H. Leung, et al. (2003). "Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities." Embo J **22**(20): 5530-9.
- Hoffmann, A., A. Levchenko, et al. (2002). "The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation." Science **298**(5596): 1241-5.
- Hoffmann, A., G. Natoli, et al. (2006). "Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module." Oncogene **25**(51): 6706-16.
- Hornig, T., G. M. Barton, et al. (2002). "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." Nature **420**(6913): 329-33.
- Huxford, T., D. B. Huang, et al. (1998). "The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation." Cell **95**(6): 759-70.
- Jacobs, M. D. and S. C. Harrison (1998). "Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex." Cell **95**(6): 749-58.
- Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.
- Johnson, C., D. Van Antwerp, et al. (1999). "An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha." Embo J **18**(23): 6682-93.
- Johnson, D. R., I. Douglas, et al. (1996). "A sustained reduction in IkappaB-beta may contribute to persistent NF-kappaB activation in human endothelial cells." J Biol Chem **271**(27): 16317-22.
- Kaltschmidt, B., M. Uherek, et al. (1997). "Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(6): 2642-7.
- Kawai, T., O. Adachi, et al. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Toll-like receptor downstream signaling." Arthritis Res Ther **7**(1): 12-9.
- Kawai, T., O. Takeuchi, et al. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-

- independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.
- Kim, D. S., J. H. Han, et al. (2003). "NF-kappaB and c-Jun-dependent regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene expression in response to lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells." Mol Immunol **40**(9): 633-43.
- Kishimoto, T., S. Akira, et al. (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-54.
- Klement, J. F., N. R. Rice, et al. (1996). "IkappaBalpha deficiency results in a sustained NF-kappaB response and severe widespread dermatitis in mice." Mol Cell Biol **16**(5): 2341-9.
- Laherty, C. D., N. D. Perkins, et al. (1993). "Human T cell leukemia virus type I Tax and phorbol 12-myristate 13-acetate induce expression of the A20 zinc finger protein by distinct mechanisms involving nuclear factor kappa B." J Biol Chem **268**(7): 5032-9.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-34.
- Li, Z. and G. J. Nabel (1997). "A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription." Mol Cell Biol **17**(10): 6184-90.
- Lin, R., D. Gewert, et al. (1995). "Differential transcriptional activation in vitro by NF-kappa B/Rel proteins." J Biol Chem **270**(7): 3123-31.
- Liou, H. C. and C. Y. Hsia (2003). "Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease." Bioessays **25**(8): 767-80.
- Malek, S., Y. Chen, et al. (2001). "IkappaBbeta, but not IkappaBalpha, functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF-kappaB dimers by masking both NF-kappaB nuclear localization sequences in resting cells." J Biol Chem **276**(48): 45225-35.
- Malek, S., D. B. Huang, et al. (2003). "X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex." J Biol Chem **278**(25): 23094-100.
- Mathison, J. C. and R. J. Ulevitch (1979). "The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits." J Immunol **123**(5): 2133-43.

- McKinsey, T. A., Z. L. Chu, et al. (1997). "Phosphorylation of the PEST domain of I κ B β regulates the function of NF- κ B/I κ B β complexes." J Biol Chem **272**(36): 22377-80.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Na, S. Y., H. J. Kim, et al. (1998). "I κ B β interacts with the retinoid X receptor and inhibits retinoid-dependent transactivation in lipopolysaccharide-treated cells." J Biol Chem **273**(6): 3212-5.
- Nathan, C. F. (1987). "Secretory products of macrophages." J Clin Invest **79**(2): 319-26.
- Oberholzer, A., C. Oberholzer, et al. (2000). "Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N3-12.
- Oshiumi, H., M. Matsumoto, et al. (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors." Oncogene **18**(49): 6853-66.
- Perkins, N. D. (2000). "The Rel/NF- κ B family: friend and foe." Trends Biochem Sci **25**(9): 434-40.
- Phillips, R. J. and S. Ghosh (1997). "Regulation of I κ B β in WEHI 231 mature B cells." Mol Cell Biol **17**(8): 4390-6.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-25.
- Saccani, S., S. Pantano, et al. (2003). "Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimers." Mol Cell **11**(6): 1563-74.
- Sato, S., H. Sanjo, et al. (2005). "Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses." Nat Immunol **6**(11): 1087-95.
- Schumann, R. R., S. R. Leong, et al. (1990). "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein." Science **249**(4975): 1429-31.

- Senftleben, U., Y. Cao, et al. (2001). "Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway." Science **293**(5534): 1495-9.
- Senftleben, U., Z. W. Li, et al. (2001). "IKKbeta is essential for protecting T cells from TNFalpha-induced apoptosis." Immunity **14**(3): 217-30.
- Shimada, T., T. Kawai, et al. (1999). "IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases." Int Immunol **11**(8): 1357-62.
- Shimazu, R., S. Akashi, et al. (1999). "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4." J Exp Med **189**(11): 1777-82.
- Solan, N. J., H. Miyoshi, et al. (2002). "RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100." J Biol Chem **277**(2): 1405-18.
- Su, G. L., S. M. Goyert, et al. (2002). "Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G640-5.
- Sun, S. C., P. A. Ganchi, et al. (1993). "NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway." Science **259**(5103): 1912-5.
- Suyang, H., R. Phillips, et al. (1996). "Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B." Mol Cell Biol **16**(10): 5444-9.
- Thompson, J. E., R. J. Phillips, et al. (1995). "I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B." Cell **80**(4): 573-82.
- Tilg, H., E. Trehu, et al. (1994). "Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55." Blood **83**(1): 113-8.
- Tran, K., M. Merika, et al. (1997). "Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta." Mol Cell Biol **17**(9): 5386-99.
- Vassalli, P. (1992). "The pathophysiology of tumor necrosis factors." Annu Rev Immunol **10**: 411-52.
- Velasco, M., M. J. Diaz-Guerra, et al. (1997). "Rapid Up-regulation of IkappaBbeta and abrogation of NF-kappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide." J Biol Chem **272**(37): 23025-30.

- Vilcek, J. and T. H. Lee (1991). "Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions." J Biol Chem **266**(12): 7313-6.
- Wang, J., K. J. Ladner, et al. (2005). "RelA/p65 regulation of IkappaBbeta." Mol Cell Biol **25**(12): 4956-68.
- Weil, R., C. Laurent-Winter, et al. (1997). "Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha." J Biol Chem **272**(15): 9942-9.
- Whiteside, S. T., J. C. Epinat, et al. (1997). "I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity." Embo J **16**(6): 1413-26.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-3.
- Wu, C. and S. Ghosh (1999). "beta-TrCP mediates the signal-induced ubiquitination of IkappaBbeta." J Biol Chem **274**(42): 29591-4.
- Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signaling cascade shared by TLR2 and TLR4." Nature **420**(6913): 324-9.
- Yamamoto, M., S. Yamazaki, et al. (2004). "Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta." Nature **430**(6996): 218-22.

7 Danksagung

Die folgende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2003 bis Februar 2007 in der II Medizinischen Abteilung des Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, unter Leitung von Prof. Dr. Roland Schmid durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Schmid danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, sowie für die interessante Themenstellung. Des Weiteren möchte ich mich für die intensive Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken. Seine zahlreichen Anregungen und Ideen waren eine große Hilfe für den Fortgang meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Michael Schemann für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Günter Schneider für die bis zuletzt tatkräftige Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Dieter Saur und Dr. Florian Greten für die fachliche Unterstützung und anregenden Diskussionen bedanken.

Natürlich geht auch ein dickes Dankeschön an unsere technischen Angestellten Konstanze Geiger, Kornelia Kellnberger, Karen Dlubatz, Tatjana Netz und Birgit Kohnke-Ertl die mich bei so manchen Großansätzen super unterstützt haben. Zudem hatte ich mit ihnen sehr viel Spaß im Labor.

Auch bei Barbara Seidler, Dr. Ralf Fritsch, Dr. Fabian Geisler, Dr. Johannes von Burstin möchte ich mich bedanken, mit denen ich in kürzeren oder längeren Arbeitspauschen sehr viel Spaß hatte.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie für die fortwährende Unterstützung danken. Und ganz besonders danke ich meinem Mann für die Kraft alle „ups and downs“ durchzustehen.